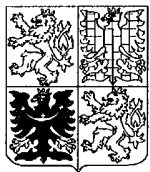


PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **19.08.1999**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **01.09.1998**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/RM000566**

(33) Země priority: **IT**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **12.09.2001**
(Věstník č. 9/2001)

(86) PCT číslo: **PCT/IT99/00268**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO00/11968**

(21) Číslo dokumentu:

2001 -541

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

A 23 L 1/30

A 23 L 1/302

A 23 L 1/305

A 61 K 31/00

(71) Přihlašovatel:

SIGMA-TAU HEALTHSCIENCE S. P. A., Pomezia,
IT;

(72) Původce:

Cavazza Claudio, Roma, IT;

(74) Zástupce:

Vandělíková Jana Ing., Petráská 12, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Antioxidační přípravek obsahující acetyl-L-
karnitin a kyselinu alfa-lipoovou**

(57) Anotace:

Přípravek obsahuje jako charakteristickou účinnou složku acetyl-L-karnitin nebo jeho farmakologicky přijatelnou sůl a kyselinu α -lipoovou. Je určen k prevenci a/nebo terapeutické léčbě různých změn a patologických stavů vyvolaných volnými radikály. Může mít formu doplňkové výživy, podpůrné výživy nebo léčiva.

Antioxidační přípravek obsahující acetyl-L-karnitin a kyselinu α -lipoovou

Oblast techniky

Předložený vynález se týká přípravku k prevenci a/nebo léčbě onemocnění tkání způsobených přítomností volných radikálů majících původ v životním prostředí; poškození mozku nebo myokardiálního poškození vyvolaného volnými radikály mající za následek cerebrální nebo myokardiální ischemii a doprovodnou reperfuzi; toxických nebo diabetických neuropatií a metabolických poruch glukozového cyklu.

Dosavadní stav techniky

O systémovém nedostatku alkanoyl-L-karnitinů (všudypřítomné přírodní sloučeniny, jejichž největší koncentrace se nacházejí ve veškerém kosterním svalstvu a v myokardiu) je známo, že vede ke svalové a funkční nedostatečnosti, kterou lze obnovit do normálního stavu podáváním těchto sloučenin zevně.

Přítomnost acetyl-L-karnitinu byla zjištěna jak v cerebrální, tak periferní nervové tkáni, kde je jeho přítomnost nutná k normálnímu vedení vzruchů nervy.

Vytváření energie karnitiny nastává přes intramitochondriální β -oxidaci mastných kyselin (β -odbourávání), rovněž tak jako přes oxidaci aminokyselin s rozvětvenými řetězci a regulací účinku inzulinu.

Pro účely charakterizace biologické aktivity karnitinů jsou důležité studie ukazující na jejich stabilizační účinek na buněčné fosfolipidové membrány a na integritu a deformabilitu erythrocytů.

Acetyl-L-karnitin chrání zvláště cerebrální tkáň proti peroxidačnímu jevu. Jestliže

bylo objasněno, že karnitin je nezbytný pro normální růst, pak je stejně pravdou, že při stárnutí byla zjištěna v porovnání s běžným stavem snížená hladina karnitinu.

Během metabolických pochodů spojených se stárnutím jsou stále zjišťovány zvýšené oxidativní procesy závisující na zvýšeném množství volných radikálů, které dávají nastartovat diabetickým lézím.

Snížená mitochondriální aktivita vede ke zvýšení hladiny oxidantů, kterým pak již dále nemohou účinně buňky vzdorovat.

Vzrůst koncentrace peroxidů, hydroxidů a atomárního kyslíku vytvářených aerobním metabolismem může vést k poškození makromolekul (DNK, proteinů a lipidů), což přispívá k nastartování degenerativních onemocnění včetně diabetu, který obvykle se stárnutím přichází. Snížená mitochondriální aktivita, která doprovází stárnutí je také provázena snížením kardiolipinu - difosfatylglycerolového derivátu, který vytváří část struktury mitochondriální membrány a hraje důležitou úlohu při udržování mitochondriální aktivity, zvláště v úrovni procesu β -odbourávání mastných kyselin. Mitochondriální aktivitu včetně β -odbourávání mastných kyselin lze opět aktivovat podáváním acetyl-L-karnitinu, který je také schopný obnovit normální koncentrace kardiolipinu v mitochondriu. Kladný účinek acetyl-L-karnitinu na mitochondriální aktivitu je také prokázán jeho schopností podporovat využívání glykolytické cesty tvorby ATP. Tyto účinky jsou pozorovány zvláště na neuronální úrovni, kde bylo prokázáno, že acetyl-L-karnitin je schopen předcházet neuronálním lézím nebo chronické neuronální degradaci.

Vedle snižování koncentrace karnitinů přítomných v těle je také během stárnutí zjišťováno snižování růstových faktorů (GF-I), zvláště snižování IGF-I (růstový faktor podobný inzulinu).

IGF-I a IGF-II a relaxin jsou peptidy náležející do skupiny proinzulinů, zvané též somatomediny.

IGF vykazuje homeostatické i trofické účinky, a to jak na úrovni centrálního, tak periferního nervového systému a klinické využívání těchto peptidů vedlo k blahodárným výsledkům pro mnoho degenerativních nervových poruch včetně diabetické neuropatie.

Mezi stárnutím a snižováním koncentrace karnitinů a růstových faktorů včetně IGF-I existuje vztah a obnovení hladiny těchto faktorů vnějším podáváním acetyl-L-karnitinu ospravedlňuje zájem o karnitiny za účelem jejich využívání k prevenci a léčbě neurodegenerativních onemocnění včetně diabetické neuropatie.

Bylo prokázáno, že i kyselina α -lipoová vykonává důležitou regulační funkci v metabolismu cukrů a aktivitě inzulínu. Kyselina α -lipoová je v přírodě velice rozšířená a to jak v rostlinné, tak živočišné říši a lze ji získávat s potravou. Nejprve byla zjištěna jako růstový faktor mnoha mikroorganismů, a potom izolována z hovězích jater vázaná na různé živočišné proteiny. Působí jako důležitý sběrač volných radikálů, hlavně radikálů odvozených od kontaminantů obsažených v životním prostředí. Nedávno bylo prokázáno, že je tato sloučenina také užitečná při regulaci využívání glukózy a působení inzulínu tak dalece, že vytváří důležitý faktor v prevenci diabetických neuropatií.

Bylo ukázáno, že peroxidaci lipidů, která při diabetické neuropatii vzrůstá, lze podáváním kyseliny α -lipoové nebo jednoho z jejích enantiomerů, regulovat a omezovat jak na cerebrální úrovni, tak na úrovni ischiatického nervu nebo očních čoček. Kyselina α -lipoová navíc inhibuje aldosoou reduktázu aktivovanou hyperglykemií a tato kyselina α -lipoová může tedy při diabetologických komplikacích hrát důležitou terapeutickou úlohu.

Kyselina α -lipoová zlepšuje inzulínem vyvolané svalové využívání glukózy a u diabetiků snižuje odpor proti působení inzulínu na glukózu. Vzhledem k antioxidačnímu působení kyseliny α -lipoové má tato kyselina také schopnost

působit neuroprotektivně proti poškození mozku vyvolaného ischemií a předpokládá se její terapeutická úloha v Parkinsonově chorobě a AIDS.

Antioxidační působení kyseliny α -lipoové může být jak přímé, tak nepřímé, a to přes obnovování koncentrací glutathionu a kyseliny askorbové.

Zatímco působení kyseliny α -lipoové na metabolismus cukrů při aktivaci trikarboxylového cyklu vedoucího k tvorbě ATP, pochází nutně z její schopnosti působit při oxidativní dekarboxylaci pyruvátu a dalších α -ketokyselin a přes acetáty jako koenzym, vytanou pro účely vyjádření mnohonásobného vynikajícího biologického působení, které tato sloučenina má v prevenci diabetických poruch na mysli i další cesty, kde tato kyselina α -lipoová působí svým ochranným účinkem.

Mezi těmito je nutno mít na mysli zvláště mechanismus spočívající v její schopnosti inhibovat po redukci na kyselinu dihydrolipoovou aktivaci faktoru nukleární transkripce (NF- κ B) reaktivními kyslíkovými skupinami (ROS), a tím na druhé straně inhibovat doprovázející kaskády neurotoxických a cytotoxických faktorů.

Jelikož mnoho komplikací spojených s diabetem, jako jsou neuropatie a oční zákaly je zprostředkováno ROS, může inhibice aktivace faktorů nukleární transkripce vytvářet mechanismus, přes který může kyselina α -lipoová zasahovat při prevenci onemocnění příbuzných s diabetem. Dále je nutno mít na mysli to, že u diabetiků je koncentrace kyseliny α -lipoové nižší než jsou normální hodnoty, a že podávání kyseliny α -lipoové může obnovit tuto hladinu k normálnímu stavu. Působí tedy v inzulinovém glukozovém transportu do buněčných membrán aditivně.

Chronické vystavování vysokým koncentracím glukózy může vést k neenzymatické reakci mezi glukózou a proteiny a k spontánní tvorbě vysoce reaktivních proteinů známých jako finální produkty glykosylace (Vyšší finální

produkty glykosylace = Advanced Glycosylation End Products = AGE). Mezi nejvíce sledované patří glykosylační produkty glukózy a albuminu, glukózy a kolagenu a glukózy a hemoglobinu. To, že AGE vznikají v tkáních a buňkách, jsou pro vysvětlení velkého podílu diabetických onemocnění u nervových, svalových a endotheliálních onemocnění všechno odpovídající faktory.

AGE ve skutečnosti zlepšují syntézu složek mimobuněčné matrice, zvýšení endotheliální permeability a tvorbu imunních komplexů a cytokines a působí neuronální a retinální ischemie, akumulaci myelinu a myelinickou degeneraci. Velké množství těchto sloučenin se tvoří jak v průběhu diabetu, tak při stárnutí.

Nedávno byl prokázán vztah mezi AGE a aktivací NF- κ B, protože kyselina α -lipoová měla schopnost inhibovat tuto reakci.

Glykosylace proteinu a oxidace glukózy glukózou při vyšších koncentracích společně s volnými radikály může tedy být jednou z dalších příčin odpovědných za abnormality tkání - zvláště abnormality nervových tkání - spojených s diabetem. Přítomnost kyseliny α -lipoové také inhibuje nebo omezuje stupňování glykosylačních reakcí nebo oxidace glukózy.

V pankreatických buňkách daných do styku se zánětlivými činidly byl pozorován další ochranný účinek kyseliny α -lipoové.

Co se týká působení kyseliny α -lipoové při prevenci a léčbě zákalů, může se připisovat nejen dalším mechanismům popsaným výše, ale také k obnovování koncentrací vitamínu C v oku, který je z důvodu hyperglykemie snížen vlivem konkurenčního transportu glukózy a vitamínu C.

Vzhledem k omezování koncentrace vitamínu E a vzrůstu koncentrace glutathionu byl klinickými studiemi také potvrzen ochranný účinek kyseliny α -lipoové proti náběhu neuropatií. Bylo pozorováno, že omezení nervových lézí je také doprovázeno omezením produktů peroxidačních reakcí, jak to bylo detekováno

snížením koncentrací malonylaldehydu. Další studie dalších středisek potvrdily její působení při léčbě diabetických neuropatií.

Podstata vynálezu

Překvapivě bylo zjištěno, že přípravek obsahující jako charakteristické složky v kombinaci:

(a) acetyl-L-karnitin nebo jeho farmakologicky přijatelné sole a

(b) kyselinu α -lipoovou

je významně účinný při prevenci a/nebo léčbě poškození tkání vyvolaných přítomností volných radikálů vlivem znečištění životního prostředí; cerebrálních nebo myokardiálních lézí vyvolaných volnými radikály a po cerebrální nebo myokardiální ischemii a jako výsledek reperfuze; toxických nebo diabetických neuropatií a metabolických poruch při hospodaření s glukózou.

Bylo také zjištěno, že složka (a) může dále příležitostně obsahovat „karnitin“ vybíraný ze skupiny sestávající z L-karnitinu, propionyl-L-karnitinu, valeryl-L-karnitinu, iso- valeryl-L-karnitinu nebo jejich farmakologicky přijatelných solí.

Hmotnostní poměr (a) : (b) se pohybuje od 100 : 1 do 1 : 10.

Přípravek může být podáván orálně, parenterálně, rektálně nebo transdermálně. Přípravek může mít formu a uplatňovat se jako doplňková výživa nebo jako skutečné léčivo spočívající v podpůrném nebo preventivním působení, nebo čistě terapeutickém působení, pro které byl přípravek určen k použití pro určitého jedince.

Toxikologické zkoušky

Jak o karnitinech, tak o kyselině α -lipoové je velmi dobře známo, že mají malou

toxicitu a dobrou tolerovatelnost. Tyto výhodné toxikologické charakteristiky karnitinů a kyseliny α -lipoové byly potvrzeny zkombinováním těchto složek a jejich podáváním krysám a myším ve vysokých dávkách. U těchto zvířat se ve skutečnosti prokázalo možné podávat množství až do více než 250 mg.kg^{-1} acetyl-L-karnitinu nebo 100 mg.kg^{-1} kyseliny α -lipoové parenterálně, rovněž tak jako 250 mg.kg^{-1} směsi karnitinů (acetyl-L-karnitinu, propionyl-L-karnitinu, iso-valeryl-L-karnitinu zkombinované ve vzájemném hmotnostním poměru 1 : 1) a více než 500 mg.kg^{-1} acetyl-L-karnitinu, 500 mg.kg^{-1} karnitinové směsi a 200 mg.kg^{-1} kyseliny α -lipoové orálně bez toho, aniž by některé ze zkoumaných zvířat uhynulo.

Také prodlužované podávání ve stravě 30 po sobě následujících dní a to jak skupině krys, tak skupině myší v dávkách 200 mg.kg^{-1} acetyl-L-karnitinu nebo 200 mg.kg^{-1} karnitinové směsi společně se 100 mg.kg^{-1} kyseliny α -lipoové prokázalo, že jsou tyto dávky dobře tolerovatelné a vedlo to ke zjištění, že se neprojeví žádné známky toxicity. U těchto zvířat byly provedeny různé zkoušky, a to jak na úbytek hmotnosti, tak krevní zkoušky, které vykazaly normální hodnoty, a dále byly provedeny histopatologické zkoušky na hlavních orgánech zvířat po jejich utracení na konci pokusu.

Zkoušky neuroprotektivního působení na pokusnou cerebrální ischemii

Vzhledem ke skutečnosti, že léze mající původ v cerebrální ischemii mají spojitost s tvorbou volných radikálů a oxidu dusného, a že jak karnitiny, tak kyselina α -lipoová působí ochranu proti toxickému působení volných radikálů, byla při těchto zkouškách vyvolána cerebrální ischemie okluzí střední cerebrální arterie (MCA) způsobem popsáným Scherkeyem (Scharkey, Y.: Nature, 371, 336, 1994) injikováním endothelinu-1 (120 pmol ve 3 nl) krysám pod anestezí během tří minut mikrokanylou umístěnou stereotakticky do piriform kortex v úrovni střední cerebrální arterie. Je vyvolána okluze arterie a výsledná ischemie se kontrolovala tři dny po tomto zákroku transkardiální perfuzí roztoku paraformaldehydu (4% v PBS).

Po odstranění mozku byl tento vložen do fixativa obsahujícího 10 % sacharozu a optickým mikroskopem zkoumány kryostatické řezy (20 nm) fixované krezolvioletí. Intravenózně byl 5 minut po injikování endothelinu podáván L-karnitin (50 mg.kg^{-1}) nebo směs karnitinů (směs 50 mg.kg^{-1} acetyl-L-karnitinu, propionyl-L-karnitinu, iso-valeryl-L-karnitinu ve vzájemném hmotnostním poměru 1 : 1) nebo kyselina α -lipoová (20 mg.kg^{-1}).

Podle metody popsané Parkem (Park, C. K.: Anns. Neurol., 20, 150, 1989) byla vypočítána oblast zachvácená infarktem. Výsledky těchto zkoušek ukazují, že acetyl-L-karnitin, směs karnitinů a kyselina α -lipoová jsou všechny schopné omezit ischemickou oblast, avšak překvapivě největšího a nejvýznamnějšího výsledku bylo dosaženo s kombinací těchto látek a zvláště kombinací acetyl-L-karnitinu a kyseliny α -lipoové.

Tabulka 1

Rozsah ischemie (objem v mm^3) následkem okluze MCA (procento zmenšení objemu v porovnání s kontrolou)

	Objem (mm^3)
acetyl-L-karnitin	$25,6 \pm 1,5$
kyselina α -lipoová	$34,5 \pm 2,1$
karnitinová směs	$35,8 \pm 3,1$
acetyl-L-karnitin + kyselina α -lipoová	$85,3 \pm 4,4$
karnitinová směs + kyselina α -lipoová	$80,5 \pm 6,1$

Zkoušky pokusné diabetické hyperglykemie

Hyperglykemie, a to ať už způsobená tvorbou produktů glykosylace proteinů (AGE) nebo metabolickou hypoxií, je jedním ze základních faktorů zodpovědných za diabetické onemocnění a zvláště za diabetickou neuropatii.

Kontrolování glukózy v séru je tudíž jedním z nejdůležitějších prostředků v prevenci onemocnění spojených s diabetem. Při těchto zkouškách byla u krys vyvolána pokusná diabetes a potom byly provedeny zkoušky určující, zda může být vyvolaná hyperglykemie snížena podáváním acetyl-L-karnitinu nebo karnitinové směsi nebo kyseliny α -lipoové nebo kombinace těchto látek. Hyperglykemie byla u krys vyvolána subkutánním injikováním alloxanu (100 mg.kg^{-1}) a za hyperglykemické krys byly považovány ty, jejichž obsah glukózy v séru sedm dní po alloxanové injekci přesáhl hranici 450 mg.dl^{-1} .

Pokusně zkoušené látky byly podávány orálně po doby tři týdnů. Na konci tohoto období byla u různých skupin krys, a to jak hyperglykemických, tak těch, jimž byly podávány pokusné látky, stanovena v séru glukóza.

Získané výsledky prokazují, že jak karnitiny, tak kyselina α -lipoová samotné jsou schopné snižovat vysoké počáteční hodnoty glukózy v séru jen málo, avšak nejvýznamnější výsledek se projevil po podání karnitinů ve směsi s kyselinou α -lipoovou. V tomto případě, zvláště při kombinaci acetyl-L-karnitinu a kyseliny α -lipoové se projevil významný synergický účinek dvou látek, které jsou schopné snížit hodnoty glukózy v séru téměř k normálu.

Tabulka 2

Zkoušky pokusné hyperglykemie na krysách

Látka	glukoza v séru (mg.dl^{-1})	
	počáteční	po 21 dnech
kontrolní	456,8 $\pm$ 26	505,5 $\pm$ 31
acetyl-L-karnitin	509,5 $\pm$ 28	405,9 $\pm$ 25
karnitinová směs	490,2 $\pm$ 32	410,5 $\pm$ 35
kyselina α -lipoová	502,8 $\pm$ 36	360,4 $\pm$ 30
acetyl-L-karnitin + kyselina α -lipoová	489,6 $\pm$ 40	145,5 $\pm$ 21
karnitinová směs + kyselina α -lipoová	505,5 $\pm$ 39	170,5 $\pm$ 36

acetyl-L-karnitin = 200 mg.kg^{-1}

karnitinová směs = acetyl-L-karnitin + propionyl-L-karnitin + isovaleryl-L-karnitin ve vzájemném poměru 1 : 1

kyselina α -lipoová = 50 mg.kg^{-1}

Zkouška obsahu sorbitolu v oční čočce a ischiatickém nervu u diabetických krys

Jedna z nejčastějších příčin lézí vyvolaných diabetickou hyperglykemií anebo s tím spojených onemocnění očního nebo periferních nervů spočívá v nitrobuňkové akumulaci sorbitolu s následným snížením osmotického tlaku a buněčné integrity.

Tyto zkoušky byly provedeny na skupině krys, u kterých byla vyvolána diabetes intravenózním podáváním 50 mg.kg^{-1} streptozotocinu. Jeden týden po injikování byla v séru stanovena glukoza a ty krys, které měly hodnotu glukozy v séru nad 450 mg.dl^{-1} byly považovány za diabetické. Tato zvířata potom obdržela po osm po sobě jdoucích dnech intraperitoneální injekci acetyl-L-karnitinu (100 mg.kg^{-1}) nebo směsi karnitinů (100 mg.kg^{-1} acetyl-L-karnitinu, propionyl-L-karnitinu, isovaleryl-L-karnitinu ve vzájemném hmotnostním poměru 1 : 1) nebo kyseliny α -lipoové (25 mg.kg^{-1}) a to buď samotných nebo v různých kombinacích.

Po osmidenním působení byla u diabetických krys po vhodné izolaci stanovena koncentrace přítomného sorbitolu jak v ischiatickém nervu, tak v oční čočce a to

před i po působení podávaných látek. U všech zvířat bylo zjištěno snížení koncentrace sorbitolu, avšak nejvýznamnější snížení bylo zjištěno u zvířat, kterým byla podávána kombinace kyseliny α -lipoové a karnitinů a nejnižší hodnoty byly zaznamenány u skupiny na kterou se působilo kombinací acetyl-L-karnitinu a kyseliny α -lipoové.

Výsledky těchto zkoušek také ukazují na překvapující stupeň synergického potenciačního působení kyseliny α -lipoové a karnitinů.

Tabulka 3

Obsah sorbitolu v oční čočce a ischiatickém nervu diabetických krys

Látka	sorbitol ($\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$)	
	čočka	ischiatický nerv
kontrolní	$0,44 \pm 0,06$	$0,078 \pm 0,008$
diabetická zvířata	$40,2 \pm 3,9$	$1,85 \pm 0,21$
acetyl-L-karnitin	$32,7 \pm 2,5$	$1,15 \pm 0,11$
karnitinová směs	$30,5 \pm 2,9$	$1,05 \pm 0,09$
kyselina α -lipoová	$30,8 \pm 3,2$	$1,08 \pm 0,10$
acetyl-L-karnitin + kyselina α -lipoová	$14,7 \pm 2,8$	$0,55 \pm 0,08$
Karnitinová směs + kyselina α -lipoová	$16,4 \pm 1,9$	$0,65 \pm 0,07$

Zkoušky přežití a růstu nervových buněk na které se působilo IGF-I, karnitiny a kyselinou α -lipoovou.

Z pohledu důležité úlohy, kterou při ochraně funkční integrity nervových buněk, zvláště proti toxickým lézím, které se vyskytují v průběhu diabetického onemocnění, hraje inzulínu podobný růstový faktor (IGF-I) jsme zvažovali, zda působení IGF-I pomáhající růstu a přežití mozkových buněk je podporováno přítomností karnitinů nebo kyseliny α -lipoové nebo těchto látek ve směsi v kultivačním mediu. Proto byly izolovány mozkové buňky krys chovu Wistar způsobem popsaným Thanguiponem (Thanguipon, W.: Dev. Brain Res., 11, 177, 1983) a rozetřeny na misky s hustotou $3 \cdot 10^5 \cdot \text{cm}^{-2}$. Ke kultivačnímu mediu byl přidán cytosin arabinofuranosid (10 mM) k zabránění replikace neneuronálních buněk. Po osmi dnech byly buňky promyty a udržovány v kultuře, ve které bylo sérum nahrazeno BME (Bazální Eaglovo medium, Life Technologies, Gaithersburg, Md) obsahujícím 5 mM KCl. Zkoušené látky byly přidány přímo k

séru připravenému takto: IGF-I odpovídající 25 ng.ml^{-1} acetyl-L-karnitinu (100 ng.ml^{-1}) nebo karnitinové směsi (100 ng.ml^{-1}) nebo kyseliny α -lipoové a to buď samotných nebo v kombinaci.

Přežívání buněk a růst v kultivačním mediu byl pozorován 24 hodin po přidání látek k mediu na 35 mm miskách s 10 ng.ml^{-1} fluoresceinacetátu technikou popsanou Jonesem (Jones, K. H.: J. Histochem. Cytochem., 33, 77, 1985). Počítání buněk bylo prováděno na fluorescenčním mikroskopu. Výsledky těchto zkoušek ukazují, že účinek IGF-I na podporu růstu izolovaných mozkových buněk je významně potenciován přítomností karnitinu a kyseliny α -lipoové, které však samotné nedávají vzniknout významným změnám, a největšího účinku potenciace růstu dosaženo pokud jsou karnitiny, zvláště acetyl-L-karnitin zkombinován s kyselinou α -lipoovou.

Tabulka 4

Zkoušky růstu izolovaných mozkových buněk způsobeného IGF-I a jeho potenciace v přítomnosti acetyl-L-karnitinu, karnitinové směsi a kyseliny α -lipoové

Látka	Růst buněk (% proti kontrolním)
IGF-I	$45 \pm 2,8$
acetyl-L-karnitin	$5 \pm 0,51$
karnitinová směs	$9 \pm 0,91$
kyselina α -lipoová	$5 \pm 0,39$
IGF-I + acetyl-L-karnitin	$65 \pm 5,8$
IGF-I + karnitinová směs	$60 \pm 3,5$
IGF-I + kyselina α -lipoová	$70 \pm 6,1$
IGF-I + acetyl-L-karnitin + kyselina α -lipoová	$98 \pm 7,3$
IGF-I + karnitinová směs + kyselina α -lipoová	$90 \pm 6,9$

Zkoušky regenerace ischiatického nervu u diabetických krys

Krasy s vyvolanou diabetes, jejichž ischiatický nerv byl odříznut mají oproti normálním krysám horší regenerativní schopnost.

Tyto zkoušky byly provedeny za účelem zjištění, zda lze u diabetických krys urychlit regeneraci ischiatického nervu použitím acetyl-L-karnitinu, karnitinové směsi nebo kyseliny α -lipoové nebo kombinací těchto látek. Technika použitá u těchto zkoušek je jednou a technik popsaných Fernandezem (Fernandez, E.: Int. J. Clin. Pharmacol. Res., 10, 85, 1990).

U skupiny krys byla diabetes (glukoza v séru nad 450 mg.dl^{-1}) vyvolána subkutánním injikováním 100 mg.kg^{-1} alloxanu. Ve stravě byly krysám podávány acetyl-L-karnitin, karnitinová směs a kyselina α -lipoová. a to v denní dávce 200 mg.kg^{-1} karnitinu, 200 mg.kg^{-1} karnitinové směsi (acetyl-L-karnitin + propionyl-L-karnitin + isovaleryl-L-karnitin ve vzájemném hmotnostním poměru 1 : 1) a 50 mg.kg^{-1} kyseliny α -lipoové. Sloučeniny byly podávány týden před odříznutím ischiatického nervu a po dobu třiceti dnů po tomto odříznutí.

Ischiatický nerv byl odříznut pod anestezí a to po vystavení této anestezie jeho 1 cm v úrovni ischiatického ústí kanálku. Hranice léze byla označena epineurálním stehem. Třicet dnů po odříznutí nervu byla po utracení zvířat zkoumána tkáň tibiálního nervu jedné hlavní větve ischiatického nervu. Čtyři řezy tibiálního nervu mající přibližně 4 mm délky byly podrobeny morfologickým a morfometrickým zkoumáním poloautomatickým zobrazovacím analyzátozem (Zeiss Videoplan Image Analyzer).

Byly počítány regenerující axony a jejich hustota na 100 nm^2 , rovněž tak jako degenerativní prvky. Takto se ukázalo možné sledovat degeneraci prvků tibiálního nervu vyvolanou diabetes, která byla působením acetyl-L-karnitinu, karnitinové

směsi a kyselinou α -lipoovou upravena téměř až na normální hodnoty.

Co se týká prevence diabetického poškození, byly tak působením podávaného acetyl-L-karnitinu a karnitinové směsi v kombinaci s kyselinou α -lipoovou získány zjevné výsledky regenerace nervu, a dále se v této zkoušce ukázal významný a neočekávaný synergický účinek kombinace podle tohoto vynálezu.

Tabulka 5

Počet a hustota degenerovaných prvků tibiálního nervu diabetických krys po odříznutí ischiatického nervu

Látka	počet	hustota (na 100 nm ²)
kontrolní	965±141	0,31±0,04
acetyl-L-karnitin	560±61	0,16±0,02
karnitinová směs	520±55	0,14±0,02
kyselina α -lipoová	590±0,70	0,20±0,04
acetyl-L-karnitin + kyselina α -lipoová	340±0,41	0,10±0,01
karnitinová směs + kyselina α -lipoová	360±0,55	0,11±0,02

Zkoušky neuromuskulární vodivosti

Jednou z nejzřejmějších abnormalit u periferních neuropatií a zvláště u neuropativního diabetu je zpomalování neuromuskulární vodivosti, které se odráží ve změnách motorické aktivity.

V těchto zkouškách jsme u krys vyvolali intravenózním injikováním 50 mg.kg⁻¹ streptozotocinu u těchto pokusných zvířat (krysy se střední hmotností 300 g)

experimentální diabetes. U zvířat s vyvolaným diabetem (glukoza v séru nad 450 mg.dl^{-1}) byla měřena neuromuskulární rychlost vedení vzruchu (NMCV). Na konci byl ischiatický nerv izolován (ve 2 cm délce) a sval soleus oddělen od gastrocnemia a jeho distální šlacha odříznuta a připojena na isometrický převodník, který zaznamenával sílu svalových stahů (MCF). Sval byl stimulován přes ischiatický nerv dvěma elektrodami připojenými k stimulátoru vloženými do vzdálenosti 10 mm od nervu.

Bipolární elektroda byla umístěna na distální konec svalu k zobrazení elektromyogramu pomocí osciloskopu.

Hodnota NMCV byla měřena v m.s^{-1} , dělením vzdálenosti mezi stimulačními elektrodami středním rozdílem latence mezi sepnutím napětí ECG vyvolaného na dvou stranách. Hodnota MCF byla vyjádřena v mm.

Tabulka 6

Zkoušky neuromuskulární vodivosti u diabetických krys (po 4 týdnech)

Látka	NMCV (m.s^{-1})	MCF (mm)
kontrolní	$42,2 \pm 2,4$	$49,3 \pm 3,1$
diabetické	$34,5 \pm 2,1$	$34,6 \pm 2,9$
diabetické + acetyl-L-karnitin	$38,5 \pm 1,9$	$40,6 \pm 3,4$
diabetické + karnitinová směs	$39,9 \pm 2,1$	$41,2 \pm 2,7$
diabetické + kyselina α -lipoová	$40,1 \pm 1,5$	$41,9 \pm 3,3$
diabetické + acetyl-L-karnitin + kyselina α -lipoová	$43,4 \pm 2,4$	$48,9 \pm 3,9$
diabetické + karnitinová směs + kyselina α -lipoová	$42,0 \pm 3,1$	$47,5 \pm 4,1$

Zkouška abnormalit motorické koordinace

Tyto zkoušky byly provedeny na „myších s poruchou rovnováhy (wobbler)“, což

jsou tak říkajíc zvířata, která se projevují nestálou, vrávoravou chůzí, abnormální polohou končetin a omezenou rychlostí pohybu. Tyto abnormality jsou podmíněny postupující atrofií motoneuronových a muskulokutánních nervových vláken, ovlivňujících zvláště přední končetiny. Zkoušky byly provedeny podle postupu navrženého Mitsumotem (Mitsumoto, H.: Annal. Neurol., 36, 14, 1994). Po diagnostikování byl myším s poruchou rovnováhy podáván po dobu dvaceti po sobě jdoucích dnů orálně acetyl-L-karnitin (200 mg.kg^{-1}), karnitinová směs (200 mg.kg^{-1}) nebo kyselina α -lipoová (50 mg.kg^{-1}), nebo tyto látky v různých kombinacích. Zkoumání těchto myší v porovnání s kontrolními bylo prováděno hodnocením doby, po kterou se každé zvíře udrží na hraně nakloněné destičky (čas výdrže) a také doby potřebné k překonání vzdálenosti 10 cm (čas běhu).

Výsledky těchto zkoušek ukazují, že podávání acetyl-L-karnitinu, karnitinové směsi a kyseliny α -lipoové těmto zvířatům zlepšuje v porovnání s kontrolními zvířaty jak čas výdrže, tak čas běhu, ale také se dosahuje nejlepšího účinku při podávání těchto látek v kombinaci a zvláště v kombinaci acetyl-L-karnitinu a kyseliny α -lipoové. U těchto zkoušek se také projevil významný a neočekávaný synergický potenciační účinek karnitinů a kyseliny α -lipoové.

Tabulka 7

Zkouška procentuálního zvýšení času běhu

kontrolní	55±4,5
acetyl-L-karnitin	35±3,2
karnitinová směs	38±4,1
kyselina α -lipoová	40±3,9
acetyl-L-karnitin + kyselina α -lipoová	20±1,9
karnitinová směs + kyselina α -lipoová	26±2,1

Tabulka 8

Zkouška procentuálního zvýšení času výdrže

kontrolní	70±5,5
acetyl-L-karnitin	55±4,6
karnitinová směs	60±3,8
kyselina α -lipoová	50±5,9
acetyl-L-karnitin + kyselina α -lipoová	25±3,2
karnitinová směs + kyselina α -lipoová	30±2,8

Zkoušky senzorických neuronálních lézí vyvolaných cisplatinem

Prodávající podávání cisplatinu pokusným zvířatům je schopné způsobit léze v senzorických neuronech a způsobit významné abnormality propioceptivní percepce.

V těchto zkouškách jsme hodnotili ochranný účinek působený orálním podáváním 300 mg.kg⁻¹ acetyl-L-karnitinu nebo 300 mg.kg⁻¹ karnitinové směsi (acetyl-L-karnitin + propionyl-L-karnitin + isovaleryl-L-karnitin ve vzájemném hmotnostním poměru 1 : 1) nebo 50 mg.kg⁻¹ kyseliny α -lipoové nebo těchto látek v různých kombinacích po dobu sedmi po sobě jdoucích dní na toxicitu vyvolanou subkutánním injikováním 10 mg.kg⁻¹ cisplatinu po dobu sedmi po sobě jdoucích dnů.

Abnormality propioceptivní senzorické percepce vyvolané u myši cisplatinem byly hodnoceny rotační zkouškou (Apfel, S. C.: Ann. Neurol., 29, 89, 1991).

Výsledky získané v těchto zkouškách ukazují, že cisplatin způsobuje podstatné prodloužení času k dosažení rovnováhy u zvířat, která obdržela cisplatin v porovnání s kontrolními zvířaty a omezení stejného řádu u zvířat, která obdržela samotný acetyl-L-karnitin nebo samotnou kyselinu α -lipoovou, skupina zvířat s kombinací acetyl-L-karnitinu a kyseliny α -lipoové naproti tomu vykazovala vyrovnanou schopnost, prakticky stejnou jako u zvířat, která nebyla intoxikována cisplatinem. Také v těchto zkouškách se projevilo významné synergické působení

karnitinů a kyseliny α -lipoové.

Tabulka 9

Zkoušky neurosenzorických abnormalit vyvolaných cisplatinem (zkouška rotací)

cisplatin	látko	čas k dosažení rovnováhy (v sekundách)
	kontrolní	14,8±1,4
cisplatin	-	8,4±0,8
cisplatin	acetyl-L-karnitin	9,5±0,6
cisplatin	karnitinová směs	8,9±0,6
cisplatin	kyselina α -lipoová	9,9±0,8
cisplatin	acetyl-L-karnitin + kyselina α -lipoová	14,4±1,8
cisplatin	karnitinová směs+ kyselina α -lipoová	13,8±2,1

Zkoušky provedené k hodnocení účinků nového přípravku potvrzující, že je schopen plného působení opravňují k prohlášení novosti samotného vynálezu a ukazují především na neočekávané a překvapující synergické působení, které jsou složky schopné vyvolat, pokud se použijí v kombinaci.

Na základě synergické interakce jeho složek je zde v tomto vynálezu popsán přípravek vhodný k preventivnímu působení proti toxickému poškození a metabolickým poruchám z nichž vznikají neuronální léze akutní nebo chronické povahy. Může být použit zvláště k léčbě neuropatií a zvláště diabetických periferních neuropatií.

Z pohledu jeho antioxidační schopnosti lze tento přípravek také použít k prevenci nebo léčbě abnormalit toxického nebo anoxického původu spojeného s uvolňováním volných radikálů v mozku, játrech, srdci nebo dalších orgánech a tkáních.

Z pohledu schopnosti přípravku podporovat působení IGF-I a patologické

abnormality spojené se stárnutím jako jsou neurodegenerativní poruchy, lze jeho používáním získat dále také určité výhody.

Ilustrativní příklady složení přípravků podle vynálezu, nikterak však tento vynález neomezuující jsou uvedeny dále.

Příklady provedení

1)	acetyl-L-karnitin	mg	500
	kyselina α -lipoová	mg	50
2)	karnitinová směs	mg	500
	(acetyl-L-karnitin, propionyl-L-karnitin, isovaleryl-L-karnitin ve stejných hmotnostních množstvích)		
	kyselina α -lipoová	mg	50
3)	acetyl-L-karnitin	mg	250
	kyselina α -lipoová	mg	25
4)	karnitinová směs	mg	250
	(acetyl-L-karnitin, propionyl-L-karnitin, isovaleryl-L-karnitin ve stejných hmotnostních množstvích)		
	kyselina α -lipoová	mg	25
5)	acetyl-L-karnitin	mg	1
	kyselina α -lipoová	mg	100
6)	acetyl-L-karnitin	mg	250
	kyselina α -lipoová	mg	25
	methionát selenu	μ g	50
	glycinát zinečnatý	mg	10
	stearát hořečnatý	mg	20
	taurin	mg	50
	Vitamin E	mg	10
	koenzym Q ₁₀	mg	10
	β -karoten	mg	10
	vitamin C	mg	30

Farmakologicky přijatelnou solí L-karnitinu nebo alkanoyl-L-karnitinu se míní jakákoliv sůl těchto účinných složek a kyseliny nedávající vznik nežádoucím toxickým nebo vedlejším účinkům. Tyto kyseliny jsou farmaceutickým odborníkům dobře známy.

Neomezuujícími příklady vhodných solí jsou tyto: chlorid, bromid, jodid, aspartát,

kyselý aspartát, citrát, kyselý citrát, vínan, fosfát, kyselý fosfát, fumarát, kyselý fumarát, glycerofosfát, glukofosfát, mléčnan, maleinát, kyselý maleinát, orotát, šťavelan, kyselý šťavelan, síran, kyselý síran, trichloracetát, trifluoracetát a methansulfonát.

Seznam schválených farmakologicky přijatelných solí je uveden v Int. J. of Pharm., 33, 201 - 217, 1986; tato poslední publikace je zde uvedena jako odkaz.

Přípravek podle vynálezu může také obsahovat vitaminy, koenzymy, minerální látky a antioxidanty.

Při výrobě přípravků odpovídajících specifickému způsobu podávání se použijí odpovídající excipienty, které jsou odborníkům ve farmacii a potravinářském průmyslu známy.

Patentové nároky

1. Přípravek, který obsahuje v kombinaci:
 - (a) acetyl-L-karnitin nebo jeho farmakologicky přijatelnou sůl; a
 - (b) kyselinu α -lipoovou.
2. Přípravek podle nároku 1 vyznačující se tím, že složka (a) dále obsahuje „karnitin“ vybíraný ze skupiny sestávající z L-karnitinu, propionyl-L-karnitinu, valeryl-L-karnitinu, isovaleryl-L-karnitinu nebo jejich farmakologicky přijatelných solí nebo jejich směsí.
3. Přípravek podle nároku 1 nebo 2 vyznačující se tím, že hmotnostní poměr (a) : (b) se pohybuje v rozmezí od 100 : 1 do 1 : 10.
4. Přípravek podle kteréhokoliv z předchozích nároků vyznačující se tím, že farmakologicky přijatelná sůl L-karnitinu nebo alkanoyl-L-karnitinu se vybírá ze skupiny obsahující: chlorid, bromid, jodid, aspartát, kyselý aspartát, citrát, kyselý citrát, vínan, fosfát, kyselý fosfát, fumarát, kyselý fumarát, glycerofosfát, glukofosfát, mléčnan, maleinát, kyselý maleinát, orotát, kyselý šťavelan, síran, kyselý síran, trichloracetát, trifluoracetát a methansulfonát.
5. Přípravek podle kteréhokoliv z předchozích nároků, který dále obsahuje vitaminy, koenzymy, minerální látky a antioxidanty.
6. Přípravek podle kteréhokoliv z předchozích nároků, který lze podávat orálně ve formě doplňkové výživy.
7. Přípravek podle kteréhokoliv z předchozích nároků, který lze podávat orálně, parenterálně, rektálně nebo transdermálně ve formě léčiva.
8. Doplňková výživa podle nároku 6 k prevenci poškození tkání způsobeného

přítomností volných radikálů pocházejících ze znečištěného životního prostředí; k prevenci mozkových nebo myokardiálních lézí vyvolaných volnými radikály po cerebrální nebo myokardiální ischemii a doprovázející reperfuzi; k prevenci diabetických nebo toxických neuropatií a metabolických poruch v glukozovém cyklu.

9. Léčivo podle nároku 7 k terapeutické léčbě onemocnění způsobených přítomností volných radikálů pocházejících ze znečištěného životního prostředí; mozkových nebo myokardiálních lézí vyvolaných volnými radikály po cerebrální nebo myokardiální ischemii a doprovázející reperfuzi; diabetických nebo toxických neuropatií a metabolických poruch v glukozovém cyklu
10. Doplnková výživa podle nároku 6 nebo 8 v tuhé, polotuhé nebo kapalné formě.
11. Léčivo podle nároku 9 v tuhé, polotuhé nebo kapalné formě.
12. Doplnková výživa podle nároku 10 ve formě tablet, pastilek, pilulek, tobolek, granulí nebo sirupů.
13. Léčivo podle nároku 11 ve formě tablet, pastilek, pilulek, tobolek, granulí, sirupů, fiol nebo kapek.