PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19) ČESKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **07.09.2001**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **08.09.2000**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **2000/231429**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **15.10.2003**
(Věstník č. 10/2003)

(86) PCT číslo: **PCT/CA01/01287**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO02/020091**

(21) Číslo dokumentu:
2003 - 961

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.[7]:
A 61 K 31/727
A 61 K 31/737
A 61 P 7/02

(71) Přihlašovatel:
HAMILTON CIVIC HOSPITALS RESEARCH DEVELOPMENT, INC., Hamilton, CA;
LEO PHARMA A/S, Ballerup, DK;

(72) Původce:
Hirsh Jack, Hamilton, CA;
Johansen Kristian, Haellebaek, DK;
Weitz Jeffery I., Ancaster, CA;

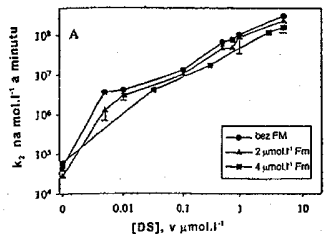
(74) Zástupce:
Korejzová Zdeňka JUDr., Spálená 29, Praha 1, 11000;

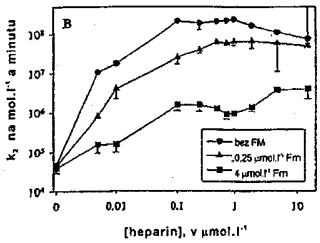
(54) Název přihlášky vynálezu:

Farmaceutický prostředek k inhibici nebo prevenci tvorby či aktivity thrombinu

(57) Anotace:

Řešení se týká farmaceutických prostředků a způsobů k inhibici nebo prevenci tvorby či aktivity thrombinu. Takové farmaceutické prostředky zahrnují kombinaci (a) alespoň jednoho heparinového oligosacharidového podílu a (b) alespoň jednoho dermatansulfátového oligosacharidového podílu.





CZ 2003 - 961 A3

č.j. 41660
18.08.03
2001-961

Farmaceutický prostředek k inhibici nebo prevenci tvorby či aktivity thrombinu.

Oblast techniky

Vynález se týká obecně prostředků a způsobů, sloužících k inhibici nebo prevenci tvorby či aktivity thrombinu.

Dosavadní stav techniky

Nadměrná tvorba thrombinu, která je charakteristická pro nemoce zahrnující infarkt, mozkovou mrtvici a trombózu hlubokých žil, může ohrožovat život a vyžaduje účinnou léčbu. V současnosti existují různé komerční přípravky, které blokují účinek thrombinu. Heparin, sulfatovaný polysacharid, působí jako protisrážlivé činidlo urychlením inhibice thrombinu a faktoru Xa prostřednictvím antithrombinu (AT) (J. Hirsh, Eng. J. Med. 324, 1565-1574, 1991). Ačkoliv se heparin široce používá k léčbě akutních koronárních ischemických příznaků, má svá omezení u pacientů, kteří prodělali perkutální koronární zákroky (J. J. Popma se spoluautory, Chest 108, 486-501, 1995), nebo pokuď je používán jako doplněk trombolytické léčby (R. Collins se spoluautory, BMJ 313, 652-659, 1996. Tato omezení vycházejí z neschopnosti komplexu AT-heparin inaktivovat srážecí enzymy, které se navazují na složky trombu, zvláště vazbu thrombinu na fibrin (P. J. Hogg a C. M. Jackson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 3619-3623, 1989; a J. I. Weitz se spoluautory, J. Clin. Invest. 86, 385-391, 1990).

Dermatansulfát (DS), sulfatovaný glukosaminoglykan, vykazující protitrombotickou aktivitu u laboratorních zvířat (D. Carrie se spoluautory, Thromb. Haemost. 68, 637-641, 1992; S. E. Matthiason se spoluautory, Haemostasis 25, 203-211, 1995; Y. Cadroy se spoluautory,

18.06.03

Arteriosclerosis and Thrombosis 13, 1213-1217, 1993; F. Fernandez se spoluautory, Br. J. Haematol. 64, 309-317, 1986), a u lidí (A. T. Cohen se spoluautory, Thromb. Haemost. 72, 793-798, 1994; G. Agnelli se spoluautory, Thromb. Haemost. 67, 203-208, 1992; P. Prandoni se spoluautory, Br. J. Surg. 79, 505-509, 1992 a V. DiCarlo se spoluautory, Thromb. Haemost. 82, 30-34, 1999), působí jako protisrážlivé činidlo tím, že katalyzuje pouze heparinový kofaktor II (HCII). Vzhledem k tomu, že thrombin je výlučným cílem HCII v plazmě, pokládá se dermatansulfát za selektivní inhibitor thrombinu (D. M. Tollefsen se spoluautory, J. Biol. Chem. 258, 6713-6716, 1983). Ačkoliv fibrin-navazující thrombin je před inaktivací chráněn komplexem heparin-HCII (D. Becker se spoluautory, J. Biol. Chem. 274, 6226-6233, 1999), nepřímé studie prováděné v plasmatických systémech naznačují, že fibrin-navazující thrombin je citlivý vůči inaktivaci komplexem DS-HCII (P. Bendayan se spoluautory, Thromb. Haemost. 71. 576-580, 1994. Ovšem dermatansulfát má praktická klinická omezení, vyplývající z jeho nízké specifické biologické aktivity, kombinované s vysokou viskozitou.

Přidání dermatansulfátu do komerčně dostupného heparinu o nízké molekulové hmotnosti (buď Enoxaparinu nebo Fragminu) mělo přídavný účinek na inhibci thrombinu *in vitro* (B. Cosmi se spoluautory, Thromb. Haemost. 70, 443-447, 1993). Ovšem testovaná kombinace není klinicky využitelná, neboť nepůsobí vůči fibrin-navazujícímu thrombinu a DS má nízkou účinnost a špatnou rozpustnost.

Podstata vynálezu

Již dříve bylo prokázáno, že kombinace oligosacharidového podílu získaného z heparinu (zde rovněž nazývaného "heparinový oligosacharidový podíl") a oligosacharidového podílu získaného z dermatansulfátu (zde rovněž nazývaného "dermatansulfátový oligosacharidový podíl") poskytuje výhodné inhibiční účinky jak

18.06.03

vzhledem k thrombinu v tekuté fázi, tak i vzhledem k fibrin-navazujícímu thrombinu. Vybrané kombinace heparinového oligosacharidového podílu a dermatanového oligosacharidového podílu poskytly neočekávaně větší než přídavné, to znamená synergické inhibiční účinky. Novým konceptem tohoto vynálezu je kombinovat oligosacharidové frakce k zajištění maximální protisrážlivé aktivity heparinu a dermatansulfátu, aniž by došlo ke zvýšení rizika krvácení.

Předpokládá se, že každý oligosacharidový podíl v kombinační léčbě inhibuje thrombin odlišným mechanismem. Aniž by bylo žádoucí vázat se teoretickým mechanismem působení, heparinový oligosacharidový podíl může inhibovat fibrin-navazující thrombin stejně jako thrombin tekuté fáze aktivací antithrombinu. Tato aktivace umožní katalyzování inaktivace faktoru Xa antithrombinem, čímž může být inhibována tvorba thrombinu.

Dermatansulfátový oligosacharidový podíl může inhibovat fibrin-navazující thrombin aktivací HCII. Ve svém aktivovaném prostorovém uspořádání (konformaci) se oblast aminového konce HCII váže na exogenní místo (exosite) I. Vzhledem k tomu, že se thrombin váže na fibrin prostřednictvím exogenního místa I, soutěží neboli kompetuje aktivovaný HCII s fibrinem o navázání thrombinu a vytlačuje thrombin z fibrinu. Takto vytlačený thrombin pak může být inaktivován prostřednictvím heparinu/HCII, dermatansulfátu/HCII nebo heparinu/antithrombinu.

Kombinační léčby, které k dosažení maximální účinnosti inhibují thrombin různými mechanismy, budou zlepšovat snášenlivost takové léčby a výsledkem bude snížené riziko vedlejších účinků, které mohou být vyvolány vysokými dávkami a dlouhodobým používáním léčiv při monoterapii. Kombinační léčba podle tohoto vynálezu tedy umožní použití nižších dávek každé složky (například alespoň 5x až 10x nižší

18.06.03

dávky, jak je uvedeno v Příkladu 2) a snížení záporných, toxických účinků každé složky. Nižší dávkování může poskytnout zvýšené rozpětí bezpečnosti ve srovnání s bezpečností každé složky, pokud je použita jako jediné činidlo. Kromě toho, pokud je vyhovující jednotka kombinovaného dávkování nabídnuta pacientovi, je obecně známo, že se zlepšená výhodnost odrazí ve zvýšené ochotě pacienta, stejně jako se sníží pravděpodobnost pacientova odmítnutí léčby, které je často spojeno s vícečetnými dávkovacími formami medikace.

Široce řečeno, předkládaný vynález se týká kombinační léčby k inhibici nebo prevenci tvorby thrombinu či jeho aktivace u pacienta, zahrnující podávání účinného množství (a) alespoň jednoho heparinového oligosacharidového podílu; a (b) alespoň jednoho dermatansulfátového oligosacharidového podílu pacientovi. V jednom aspektu tohoto vynálezu poskytuje kombinační léčba synergickou aktivitu. V jiném aspektu je poskytnut způsob inhibice nebo prevence tvorby či aktivace thrombinu u pacienta, zahrnující podávání pacientovi, který to potřebuje, kombinace účinných množství (s výhodou synergicky účinných množství) alespoň jednoho heparinového oligosacharidového podílu a alespoň jednoho dermatansulfátového oligosacharidového podílu.

"Kombinační léčba" nebo "podávání kombinace" znamená, že aktivní přísady jsou léčenému pacientovi podávány souběžně. Při podávání kombinace může být každá složka podávána ve stejnou dobu nebo následně v jakémkoliv pořadí a v různých časových okamžicích. Každá složka tedy může být podávána odděleně, ale v dostatečně krátkém časovém rozmezí pro poskytnutí požadovaného účinku (s výhodou synergického účinku).

Předkládaný vynález rovněž poskytuje prostředky zahrnující kombinaci (a) alespoň jednoho heparinového oligosacharidového podílu;

18.06.03

(b) alespoň jednoho dermatansulfátového oligosacharidového podílu, volitelně spolu s farmaceuticky přijatelným pomocným činidlem, nosičem nebo nosným prostředím (vehikulem). Předkládaný vynález také předpokládá farmaceutický prostředek v oddělených zásobnících a určený pro souběžné nebo následné podávání, který obsahuje heparinový oligosacharidový podíl a dermatansulfátový oligosacharidový podíl, které mohou být volitelně oba doplněny farmaceuticky přijatelnými pomocnými látkami, nosiči nebo vehikuly.

V jiném ztělesnění tento vynález poskytuje farmaceutický prostředek, zahrnující jednotku dávkování alespoň jednoho heparinového oligosacharidového podílu a jednotku dávkování dermatansulfátového oligosacharidového podílu, volitelně spolu s farmaceuticky přijatelnou pomocnou látkou, nosičem nebo vehikulem.

Výše zmíněné prostředky také zahrnují farmaceuticky přijatelné sole heparinového oligosacharidového podílu a dermatansulfátového oligosacharidového podílu, jako sodné, draselné, amonné, hořečnaté a vápenaté sole.

Podle jednoho aspektu je poskytnut farmaceutický prostředek obsahující kombinaci (a) alespoň jednoho heparinového oligosacharidového podílu a (b) alespoň jednoho dermatansulfátového oligosacharidového podílu, schopnou vyvinout synergický účinek v prevenci nebo inhibici tvorby či aktivity thrombinu. Takový způsob rovněž poskytuje farmaceutické prostředky, obsahující synergicky účinné množství kombinace alespoň jednoho heparinového oligosacharinového podílu a alespoň jednoho dermatansulfátového oligosacharidového podílu, v farmaceuticky přijatelné pomocné látce, nosiči nebo vehikulu.

18.06.03

V upřednostňovaném ztělesnění farmaceutické prostředky obsahují heparinový oligosacharidový podíl a dermatansulfátový oligosacharidový podíl v dávkách, které jsou alespoň 5x až 10x nižší než dávky každého podílu, vyžadované k prevenci nebo inhibici tvorby či aktivity thrombinu u pacienta.

V jiném aspektu se tento vynález týká použití prostředku obsahujícího kombinaci (a) alespoň jednoho heparinového oligosacharinového podílu a (b) alespoň jednoho dermatansulfátového oligosacharidového podílu pro přípravu léčiva k prevenci nebo inhibici tvorby či aktivity thrombinu. V jiném aspektu se tento vynález týká použití synergicky účinných množství alespoň jednoho heparinového oligosacharinového podílu a alespoň jednoho dermatansulfátového oligosacharidového podílu k přípravě farmaceutického prostředku pro inhibici nebo prevenci tvorby či aktivity thrombinu u pacienta.

Vzhledem k tomu, že se předkládaný vynález týká způsobu léčby, zahrnujícího kombinaci aktivních činidel, která mohou být podávána odděleně, týká se tento vynález také kombinování oddělených prostředků, obsahujících aktivní činidla, ve formě sady.

Tento vynález se také týká oligosacharidového podílu podle předkládaného vynálezu a prostředků a léčby, jak jsou zde obecně popsány, užívajících takové podíly.

Vynález rovněž předpokládá použití prostředků podle tohoto vynálezu nebo kombinační léčby podle tohoto vynálezu k prevenci a/nebo zlepšení prudkosti onemocnění, příznaků onemocnění a/nebo opakujícího se výskytu recidivy onemocnění, která jsou spojena s nadbytkem tvorby nebo aktivity thrombinu.

18.06.03

Tyto a jiné aspekty, rysy a výhody předkládaného vynálezu by měly být zřejmé odborníkovi v oboru z následujících obrázků a podrobného popisu.

Přehled obrázků na výkresech

Vynález bude lépe pochopitelný ve vztahu k vyobrazením, kde:

Obr. 1 znázorňuje účinky rozpustného fibrinu (Fm) na konstanty rychlosti druhého řádu u inhibice thrombinu prostřednictvím HCII, katalyzovanou dermatansulfátem (Obr. 1A) nebo heparinem (Obr. 1B). Konstanty rychlosti druhého řádu pro dermatansulfátem nebo heparinem katalyzovanou inhibici 10 $nmol.l^{-1}$ thrombinu působením 100 $nmol.l^{-1}$ HCII v přítomnosti či v nepřítomnosti Fm byly stanoveny za podmínek pseudoprvního řádu. Každý bod představuje průměr čtyř stanovení a kolmé úsečky vyjadřují standardní chybu stanovení.

Obr. 2 je grafem, znázorňujícím účinek 4 $\mu mol.l^{-1}$ fibrinového monomeru na inhibici thrombinu antithrombinem (AT) za přítomnosti heparinových oligosacharidových podílů o rostoucí molekulové hmotnosti, získaných za použití heparinázy.

Obr. 3 znázorňuje účinek heparinu a dermatansulfátu na vazbu thrombinu k fibrinu. Vazba thrombinu k chuchvalcům, sraženině fibrinu byla stanovena v přítomnosti rostoucích koncentrací buď heparinu (•) nebo dermatansulfátu, DS (o). Každý bod představuje průměr dvou měření a kolmé úsečky představují standardní chybu měření.

Obr. 4 je grafem, znázorňujícím účinek heparinu nebo heparinázou získaných podílů na vazbu thrombinu k chuchvalcům fibrinu.

18.06.03

Obr. 5 je grafem, znázorňujícím vytlačení thrombinu z fibrinu působením HCII v přítomnosti dermatansulfátu (DS) nebo standardního heparinu (SH).

Obr. 6A je grafem, znázorňujícím účinek kombinace heparinového oligosacharidového podílu : dermatansulfátového oligosacharidového podílu v poměru 5:1 ve srovnání se samotným heparinovým oligosacharidovým podílem na kumulativní průchodnost u modelu prevence králičí arteriární trombózy.

Obr. 6B je grafem, znázorňujícím účinek kombinace heparinového oligosacharidového podílu : dermatansulfátového oligosacharidového podílu v poměru 5:1 ve srovnání se samotným heparinovým oligosacharidovým podílem na kumulativní krevní ztrátu či úbytek u modelu králičí arteriární trombózy.

Obr. 7 je grafem, znázorňujícím srovnání účinku heparinu, LMWH, heparinového oligosacharidového podílu a hirudinu na průchodnost (Obr. 7A) a grafem, znázorňující srovnání účinků na krevní ztrátu (Obr.7B)

Obr. 8 je grafem, znázorňujícím účinek heparinového oligosacharidového podílu na usazování destiček v žilních transplantátech u modelu arteriární trombózy paviánů.

Obr. 9 je grafem, znázorňujícím účinek dermatansulfátového oligosacharidového podílu na usazování destiček v žilních transplantátech u modelu arteriární trombózy paviánů.

Obr. 10 je grafem, znázorňujícím účinek kombinace heparinového oligosacharidového podílu a dermatansulfátového oligosacharidového

18.06.03

podílu na usazování destiček v žilních transplantátech u modelu arteriární trombózy paviánů.

Podrobný popis vynálezu

Heparinový oligosacharidový podíl

"Oligosacharidový podíl získaný z heparinu" nebo "heparinový oligosacharidový podíl" je směsí oligosacharidů získaných z heparinu, charakterizovaných tím, že vykazují protisrážlivou aktivitu *in vitro* vzhledem k antithrombinu a k HCII. Takový podíl obsahuje heparinové řetězce, které jsou příliš krátké k provázání thrombinu a fibrinu, ale mají dostatečnou délku k provázání antithrombinu nebo HCII a thrombinu.

Podíl může zahrnovat směs oligosacharidů získaných z heparinu, charakterizovaných jednou, dvěma, třemi, čtyřmi, pěti, šesti, sedmi či více z následujících charakteristik:

(a) mají protisrážlivou aktivitu *in vitro,* vzhledem k antithrombinu a heparinovému kofaktoru II (HCII);
(b) oligosacharidy jsou příliš krátké k provázání thrombinu a fibrinu, ale mají dostatečnou vzdálenost k provázání antithrombinu nebo HCII a thrombinu;
(c) mají alespoň 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 % nebo 40 % oligosacharidů s alespoň jednou nebo více z pentasacharidových sekvencí;
(d) jsou obohaceny oligosacharidy, majícími rozmezí molekulové hmotnosti přibližně od 6 000 do přibližně 12 000, od 6 000 do 11 000 nebo od 6 000 do 10 000;
(e) oligosacharidy mají molekulové hmotnosti maxima přibližně mezi 7 000 a 10 000, 7 500 až 9 700 nebo 8 000 až 9 000;

18.06.03

(f) alespoň 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 % nebo 55 % oligosacharidů má molekulovou hmotnost větší nebo rovnající se 6 000;

(g) alespoň 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, nebo 40 % oligosacharidů má molekulovou hmotnost větší nebo rovnající se 8 000;

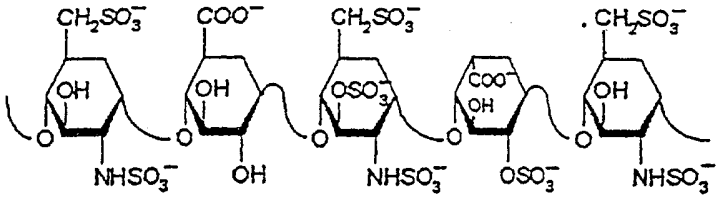
(h) vykazují polydispersitu od 1,1 do 1,8 a zvláště od 1,2 do 1,7; a

(i) mají podobné aktivity antifaktoru Xa a antifaktoru IIa a s výhodou mají poměr aktivity faktoru Xa a aktivity faktoru IIa přibližně od 2:1 do 1:1.

Podle jednoho aspektu tohoto vynálezu má podíl používaný v předkládaném vynálezu charakteristiky (a), (b), (c) a (d); (a), (b), (c) a (e); (a), (b), (e) a (f); (a), (b), (e) a (g); (a), (b), (e), (f), (g), (h) a (i); (b), (c), (e) a (g); (b), (d), (c), (h) a (i); (b), (c), (d) a (h); (b), (e), (h) a (i); (b), (e), (f), (h) a (i); (b), (e), (g), (h) a (i); nebo (a) až (i).

"Obohacený oligosacharidy" znamená, že podíl obsahuje alespoň 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 % nebo 50 % oligosacharidů v rozmezí stanovené nebo vymezené molekulové hmotnosti.

"Pentasacharidová sekvence" se týká klíčové strukturální jednotky heparinu, která sestává ze tří zbytků D-glukosaminu a dvou zbytků kyseliny uronové (viz struktura níže). Středový zbytek D-glukosaminu obsahuje jedinečnou 3-O-sulfátovou částici.



Pentasacharidová sekvence představuje minimální heparinovou strukturu, mající vysokou afinitu k antithrombinu (J. Choay se spoluautory, Biochem. Biophys. Res. Comm. 116, 492-499, 1983).

18.06.03

Vazba heparinu k antithrombinu prostřednictvím pentasacharidové sekvence vyvolává konformační změnu v reaktivní centrální smyčce, která přeměňuje antithrombin z pomalého na velmi rychlý inhibitor.

Heparinový oligosacharidový podíl obsahuje heparinové řetězce, které jsou příliš krátké k provázání thrombinu a fibrinu, jsou ale dostatečně dlouhé k provázání antithrombinu a thrombinu. Podíl zvolený pro použití v předkládaném vynálezu bude tedy schopný inhibovat fibrin-navazující thrombin, stejně jako thrombin tekuté fáze, katalýzou antithrombinu a inhibovat vytváření thrombinu katalýzou inaktivace faktoru Xa prostřednictvím antithrombinu. Podíly zvolené pro použití v předkládaném vynálezu jsou s výhodou ty, které inhibují stejně dobře fibrin-navazující thrombin i thrombin tekuté fáze.

Charakteristiky vhodných heparinových oligosacharidových podílů, kterých lze použít v předkládaném vynálezu, jsou uvedeny v Tabulce 1 a v Tabulce 2.

Heparinový oligosacharidový podíl, používaný v předkládaném vynálezu, může mít podobné aktivity antifaktoru Xa a antifaktoru IIa. V jednom ztělesnění se poměr aktivity faktoru Xa antifaktoru IIa pohybuje v rozmezí přibližně od 2:1 do 1:1. V upřednostňovaném ztělesnění se aktivita antifaktoru Xa pohybuje v rozmezí přibližně od 80 IU/mg do 155 IU/mg, s výhodou pak od 90 IU/mg do přibližně 140 IU/mg. V upřednostňovaném ztělesnění se aktivita antifaktoru IIa pohybuje v rozmezí přibližně od 20 IU/mg do 150 IU/mg a lépe od 40 IU/mg do přibližně 130 IU/mg.

Prostředky, způsoby a sady podle předkládaného vynálezu mohou použít modifikované heparinové prostředky, popsané v PCT/CA98/00548 (WO 98/55515; zveřejnění 10. 12. 1998), US přihlášce sér. čísla

18.06.03

60/141864, podané 30. 6. 1999 nebo US přihlášce sér. čísla 60/154744, podané 17. 9. 1999, které jsou zde začleněny jako odkaz.

Bude zřejmé, že se může podařit vyrábět heparinový oligosacharidový podíl pro použití v předkládaném vynálezu, který má speciálnější charakteristiky, patřící mezi ty, jmenované výše v bodech (d, (e), (h) a (i). Podíl může mít například rozmezí molekulové hmotnosti přibližně od 7 000 do 10 000; od 7 500 do 10 000; od 7 800 do 10 000; od 7 800 do 9 800; od 7 800 do 9 600; od 7 800 do 9 000; od 7 800 do 8 800; od 7 800 do 8 600; od 7 800 do 8 500 nebo od 8 000 do 8 500. Rovněž může být použit heparinový oligosacharidový podíl, mající molekulové hmotnosti maxima 7 800 až 10 000; 7 800 až 9 800; 7 800 až 9 600; 7 800 až 9 000; 7 800 až 8 800; 7 800 až 8 600; 7 800 až 8 500 nebo 8 000 až 8 500. Podíl používaný v prostředcích a způsobech podle tohoto vynálezu může být vyvinut tak, že má polydispersitu od 1,3 do 1,6. Nadto lze vyvinout podíly pro použití v předkládaném vynálezu tak, že mají jednu nebo více z následujících zvláštních charakteristik:

(i) poměr aktivity antifaktoru Xa a aktivity antifaktoru IIa přibližně od 1,5:1 do 1:1;
(ii) aktivitu antifaktoru Xa přibližně od 95 IU/mg do 120 IU/mg nebo přibližně od 100 do 110 IU/mg;
(iii) aktivitu antifaktoru IIa přibližně od 80 IU/mg do 100 IU/mg nebo přibližně od 90 IU/mg do 100 IU/mg.

V jednom ztělesnění tohoto vynálezu má heparinový oligosacharidový podíl jednu nebo více z následujících charakteristik:

(a) je obohacen o oligosacharidy v rozmezí molekulové hmotnosti od 6 000 do 10 000 a průměru v hodnotě přibližně 8 500;
(b) je bílou až šedobílou krystalickou pevnou látkou;
(c) je stálý při teplotě místnosti; a

18.06.03

(d) vykazuje polydispersitu přibližně 1,2 až 1,5 a s výhodou 1,5.

Heparinový oligosacharidový podíl pro použití v předkládaném vynálezu může být získán z tkání běžným způsobem přípravy oligosacharidu z heparinu, nebo může být také jinak syntetizován. Konkrétně může být heparinový oligosacharidový podíl vyroben z nerozděleného (nefrakcionovaného) heparinu nebo alternativně z heparinu o nízké molekulové hmotnosti (LMWH, low molecular weight heparin).

Heparinový oligosacharidový podíl může být z nerozděleného heparinu například získán tak, že se nejprve depolymerizuje nerozdělený heparin k získání heparinu o nižší molekulové hmotnosti a následně se izoluje nebo oddělí požadovaný heparinový oligosacharidový podíl. Nerozděleným heparinem může být buď komerční heparinový přípravek ve farmaceutické kvalitě, nebo surový heparinový přípravek, jaký je získán během extrakce aktivního heparinu ze savčích tkání nebo orgánů. Komerční heparinový výrobek (heparin podle US lékopisu) je dostupný z několika zdrojů (například od firmy Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri), obecně jako sůl alkalického kovu nebo alkalické zeminy (nejčastěji jako sodná sůl heparinu). Alternativně může být nerozdělený heparin extrahován ze savčích tkání nebo orgánů, zvláště z intestinálních, střevních sliznic nebo plic, například hovězích, vepřových nebo skopových, za použití množství způsobů, známých odborníkovi v oboru (viz například E. Coyne, Chemistry and Biology of Heparin, editor R. L. Lundblad se spoluautory, strany 9-17, Elsevier/North-Holland, New York, 1981). V upřednostněném ztělesnění je nerozděleným heparinem vepřový intestinální heparin.

V současnosti je známých mnoho způsobů depolymerizace heparinu, které se obecně zakládají na chemických nebo enzymových

18.06.03

reakcích. Heparinový oligosacharidový podíl podle tohoto vynálezu může být například vyroben ze standardního, nerozděleného heparinu benzylací a následnou alkalickou depolymerizací; depolymerizací kyselinou dusitou; enzymatickou depolymerizací účinkem heparinázy; peroxidativní depolymerizací a podobně. Heparinový oligosacharidový podíl může být zejména vyroben za použití depolymerizace kyselinou dusitou nebo oxidativní hydrolýzou za použití jodistanu, popsanou v PCT/CA98/00548 (WO 98/55515).

V jednom ztělesnění je heparinový oligosacharidový podíl vyroben z nerozděleného heparinu za použití depolymerizace heparinázou (viz například US 3 766 167 a US 4 396 762). V upřednostňovaném ztělesnění se výše zmíněný podíl vyrábí řízenou depolymerizací heparinázou.

Dermatansulfátový oligosacharidový podíl

"Oligosacharidový podíl získaný z dermatansulfátu" nebo "dermatansulfátový oligosacharidový podíl" je směs oligosacharidů získaných z dermatansulfátu a charakterizovaných malou nebo nulovou aktivitou vzhledem k antithrombinu, ale protisrážlivou aktivitou *in vitro* vzhledem k HCII. Dermatansulfát sestává ze střídajících se zbytků kyseliny uronové a N-acetylgalaktosaminu. K získání zbytků kyseliny iduronové se mnoho zbytků kyseliny glukorunové epimerizuje na C-5. Následně může probíhat O-sulfatace na C-4 nebo C-6 GalNAc nebo v poloze C-2 IdoA. Podíly, používané v předkládaném vynálezu, vykazují vyšší afinitu vůči HCII než přírodní, nerozdělený dermatansulfát.

Dermatansulfátový oligosacharidový podíl, zvolený pro použití v předkládaném vynálezu, je charakterizován jednou nebo více a nejlépe všemi z následujících charakteristik:

18.06.03

(a) obsah síry je 6,0 % až 10,0 % (hmotnost/hmotnost), například 6,0 až 8,0 % (hmotn./hmotn.) a s výhodou 6,5 až 8 % (hmotn./hmotn.);
(b) poměr sulfát/karboxyl je 1,2 až 2,5, například 1,2 až 2,0, například 1,3 až 1,8 a s výhodou 1,3 až 1,6;
(c) obsah disulfatovaného disacharidu je 20 % až 60 % (hmotn./hmotn.) a lépe 30 % až 60 % (hmotn./hmotn.) obsahu monosulfatovaného disacharidu;
(d) aktivita vůči thrombinu, zprostředkovaná heparinovým kofaktorem II, je v rozmezí od 20 do 60 IU/mg a lépe od 30 do 60 IU/mg.

V jednom ztělesnění tohoto vynálezu je dermatansulfátový oligosacharidový podíl zvolen tak, že obsahuje směs dermatansulfátových oligosacharidů, z nichž 90 % nebo více vykazuje molekulovou hmotnost v rozmezí přibližně 1 600 až 20 000 a molekulovou hmotnost maxima přibližně 4 500 až 8 000.

V upřednostňovaném ztělesnění tohoto vynálezu má dermatansulfátový oligosacharidový podíl jednu nebo více z následujících charakteristik:

(a) je obohacen oligosacharidy o molekulové hmotnosti v rozmezí od 5 000 do 8 000;
(b) je bílou až šedobílou krystalickou pevnou látkou;
(c) je stálý při teplotě místnosti; a
(d) vykazuje sulfonaci větší než 6,2 % hmotnostní.

Dermatansulfátový oligosacharidový podíl může být z tkání získán běžným způsobem přípravy takových oligosacharidů z nerozděleného (nefrakcionovaného) dermatansulfátu, nebo ho lze syntetizovat *de novo* z odpovídajících monosacharidů. Pro použití v předkládaném vynálezu se s výhodou používá způsob depolymerizace, který chrání a usnadňuje izolaci vysoce nabitých oblastí nerozděleného dermatansulfátu, majících

18.06.03

zlepšenou rozpustnost a účinnost ve srovnání s nerozděleným dermatansulfátem. Dermatansulfátový oligosacharidový podíl může být například vyráběn následujícími kroky: oxidací a depolymerizací dermatansulfátu jodistanovou oxidací, redukcí borohydridem, kyselou hydrolýzou a iontově výměnnou chromatografií.

Zdroje dermatansulfátu, které lze použít pro výrobu podílů, představují savčí tkáně, například savčí kůže, zahrnující cévní tkáň a pokožku z prasat a hovězího dobytka. Jako zdroj dermatansulfátu se s výhodou používá intestinální (střevní) mukóza.

Prostředky, způsoby a sady podle předkládaného vynálezu s výhodou používají směs dermatansulfátových oligosacharidů a způsoby výroby takových směsí, popsané v PCT/EP 98/03007 (WO 98/55514, zveřejněný 10. 12. 1998), který je zde začleněn jako odkaz.

Stanovení vlastností oligosacharidových podílů

Charakteristiky, týkající se molekulové hmotnosti heparinového nebo dermatanového oligosacharidového podílu, používaného v předkládaném vynálezu, mohou být stanoveny za použití standardních technik známých odborníkovi v oboru a jím používaných. Takové techniky zahrnují například GPC-HPLC, tedy vysoce účinnou gelovou chromatografii, měření viskozity, měření rozptylu světla, chemické nebo fyzikálně chemické stanovení funkčních skupin vytvořených během procesu depolymerizace a podobně. V upřednostňovaném ztělesnění jsou charakteristiky týkající se molekulové hmotnosti oligosacharidového podílu stanoveny vysoce účinnou gelovou (vylučovací) chromatografií.

K potvrzení vlastností a charakteristik heparinového nebo dermatanového oligosacharidového podílu, použitého v předkládaném vynálezu, mohou být zejména použity následující způsoby:

18.06.03

(a) stanovení molekulové hmotnosti prostřednictvím GPC-HPLC způsobem podle Dedema, Pharmeuropa 3, 202-218, 1991.

(b) stanovení obsahu síry podle evropského lékopisu, Ph. Eur., 2. vydání, V. 3.5.3.

(c) stanovení poměru sulfátu/karboxylátu podle evropského lékopisu, Ph. Eur. 1997: 0828.

(d) určení antithrombinové aktivity zprostředkované HCII pomocí chromogenního stanovení (Diagnostica Stago, Francie) v systému bez obsahu plasmy, se 4. mezinárodním heparinovým standardem (kód č. 82/502) jako standardem.

(e) stanovení antifaktoru Xa a antifaktoru IIa podle evropského lékopisu, Ph. Eur. 1997: 0828, přičemž oba způsoby jsou modifikovány použitím statistických metod pro stanovení s klesajícími poměry.

Prostředky a způsoby

Prostředky a způsoby podle tohoto vynálezu jsou použitelné při léčebných aplikacích k prevenci nebo léčbě stavů či onemocnění, které jsou charakterizované nadbytečným vytvářením thrombinu nebo nadměrnou aktivitou thrombinu a/nebo nadměrnou aktivací komplementu. Takové stavy se často vyskytují, pokud byl subjekt vystaven traumatu, například u chirurgických pacientů. Trauma způsobené zraněním nebo chirurgickým zákřokem má za následek cévní poškození a sekundární aktivaci srážlivosti krve. Tyto nežádoucí účinky mohou nastat po obecném nebo ortopedickém chirurgickém zákroku, gynekologickém chirurgickém zákroku, srdečním nebo cévním chirurgickém zákroku nebo po jiných chirurgických procedurách. Nadbytek thrombinu může rovněž komplikovat vývoj přirozených onemocnění jako je atherosklerόza, což může vyvolat infarkt, mozkovou mrtvici nebo gangrénu končetin. Způsoby a prostředky podle předkládaného vynálezu mohou být tedy použity k léčbě, prevenci nebo

18.06.03

inhibici mnoha důležitých kardiovaskulárních komplikací včetně nestabilní anginy, akutního infarktu myokardu, mozkových cévních příhod (mozkové mrtvice), plicní embolie, trombózy hlubokých žil, trombózy tepen a podobně.

Prostředky a způsoby podle tohoto vynálezu mohou být použity ke snížení nebo prevenci srážení během dialýzy a ke snížení nebo prevenci intravaskulárního srážení během chirurgických postupů na otevřeném srdci. Mohou být také použity k udržení průchodnosti medicínských přístrojů, jako jsou přístroje pro intravenosní injikaci.

V jednom aspektu tohoto vynálezu jsou poskytnuty způsoby a prostředky prevence a inhibování tvorby thrombinu nebo jeho aktivity u pacientů se zvýšeným rizikem vývoje trombů, vyvolaným léčenými podmínkami, které ruší hemostázi (například onemocněním koronárních tepen, atherosklerosou a podobně). V jiném aspektu jsou poskytnuty způsoby a prostředky pro pacienty se zvýšeným rizikem vývoje trombů po léčebném postupu jako je chirurgie srdce, žil, nebo perkutální koronární výkon. V jednom ztělesnění jsou způsoby a prostředky podle tohoto vynálezu použity při kardiopulmonárním by-passu. Prostředky nebo oligosacharidové podíly mohou být při způsobu podle tohoto vynálezu podávány před léčebným postupem, během něho anebo po něm.

Léčebná účinnost a toxicita mohou být stanoveny standardními farmaceutickými postupy na buněčných kulturách nebo za použití pokusných zvířat, jako výpočtem ED_{50} (dávky léčebně účinné u 50 % populace) nebo LD_{50} (dávky smrtelné pro 50 % populace). Léčebným indexem je dávkový poměr léčebných a toxických účinků a může být vyjádřen jako poměr ED_{50}/ LD_{50}. Přednost se dává farmaceutickým prostředkům, které vykazují širší léčebné indikace.

18.06.03

Pacienti, kteří mohou podstoupit kombinační léčbu nebo jim lze podávat prostředek podle tohoto vynálezu, zahrnují zvířata včetně savců a zejména lidi. Zvířata také zahrnují domácí zvířata včetně koní, krav, ovcí, drůbeže, ryb, prasat, koček, psů a zvířat chovaných v zoologických zahradách.

Prostředky podle předkládaného vynálezu, heparinový oligosacharidový podíl nebo dermatansulfátový oligosacharidový podíl, mohou být podávány jakýmikoliv způsoby, vytvářejícími kontakt aktivního činidla s místy, kde činidlo působí v těle pacienta. Heparinové a dermatansulfátové oligosacharidové podíly mohou být podávány souběžně nebo následně v jakémkoliv pořadí a v jakýchkoliv časových okamžicích k poskytnutí požadovaného účinku. Zkušený lékař nebo veterinář je schopen zvolit dávkovací režim, který by optimalizoval účinky prostředků a léčby podle tohoto vynálezu.

Uvedené prostředky mohou být podávány v orálních dávkovacích formách, jako jsou tablety, tobolky (přičemž tyto formy zahrnují prostředky pro opožděné uvolňování nebo nepřetržité uvolňování), pilulky, prášky, granule, léčebné nápoje, tinktury, suspenze, sirupy a emulze. Mohou být také podávány v intravenosní formě (jako bulus nebo infuze), intraperitoneální formě, subkutánní formě nebo intramuskulární formě, přičemž veškeré použité formy dávkování jsou dobře známé osobám s běžnou znalostí farmaceutického oboru. Prostředky podle tohoto vynálezu mohou být podávány také v intranasální formě při místním použití vhodných intranasálních vehikul, nebo transdermálně, například za použití běžných transdermálních náplastí. Podávání dávky při transdermální aplikaci bude v průběhu dávkovacího režimu spíše spojité než přerušované.

Předkládaný vynález zahrnuje kombinační léčby, poskytující synergickou aktivitu nebo synergicky účinná množství

18.06.03

dermatansulfátových a heparinových oligosacharidových podílů. Farmaceutické prostředky, vhodné pro použití v předkládaném vynálezu, zahrnují prostředky, v nichž jsou aktivní přísady obsaženy v synergicky účinném množství. Výraz "synergická aktivita" nebo "synergicky účinné množství" znamená, že k dosažení požadovaného výsledku, který je větší než výsledek dosažený za použití každého podílu samotného, bude přítomno dostatečné množství heparinového oligosacharidového podílu a dermatansulfátového oligosacharidového podílu. Příkladem může být zlepšená inhibice nárůstku thrombinu při léčbě kardiovaskulárních stavů týkajících se vytváření trombů, jako jsou ty, popsané výše, jako například zvýšená inaktivace thrombinu vázaného na sraženinu, zvýšená inhibice tvorby thrombinu katalyzováním inaktivace faktoru Xa, vyvolávané antithrombinem a podobně.

Dávkovací režim podle tohoto vynálezu se bude lišit v závislosti na známých faktorech, jako jsou farmakodynamické charakteristiky konkrétního činidla a jeho způsob a cesta podávání; druh, věk, pohlaví, zdravotní stav, léčený stav a hmotnost pacienta, typ a rozsah příznaků, druh současné léčby, četnost léčby, způsob podávání, stav ledvin a jater pacienta a požadovaný účinek. Účinné množství léčiva, požadované k prevenci, zvrácení nebo zastavení vývoje chorobného stavu může být snadno určeno běžně kvalifikovaným lékařem nebo veterinářem.

Prostředek nebo způsob podle tohoto vynálezu může zahrnovat jednotkovou dávku alespoň jednoho heparinového oligosacharidového podílu a jednotkovou dávku alespoň jednoho dermatansulfátového oligosacharidového podílu. Výraz "jednotková dávka" se týká jediné, tj. jednotlivé dávky, která může být podávána pacientovi, se kterou se dá snadno manipulovat a může být snadno balena, přičemž je fyzikálně a chemicky stálou jednotkou dávkování, zahrnující jak aktivní činidlo jako

18.06.03

takové, tak i směs aktivního činidla s pevnými nebo tekutými farmaceutickými pomocnými látkami, nosiči nebo vehikuly.

Aktivní činidla, tj. heparinový oligosacharidový podíl a dermatansulfátový oligosacharidový podíl, mohou být typicky každé přítomno ve farmaceutickém prostředku (nebo mohou být použita při léčbě podle tohoto vynálezu) v koncentračním rozmezí přibližně od 2 mg na dávku do 1 000 mg na dávku a lépe v koncentračním rozmezí přibližně od 5 mg na dávku do 500 mg na dávku. Denní dávkování se může široce lišit, ale obvykle bude spadat do koncentračního rozmezí přibližně od 20 mg na dávku a den přibližně do 100 mg na dávku a den a lépe do koncentračního rozmezí přibližně od 40 mg na dávku a den do přibližně 80 mg na dávku a den.

Poměr heparinového oligosacharidového podílu a dermatansulfátového oligosacharidového podílu může být v prostředku nebo při léčbě podle tohoto vynálezu 1:1 až 10:1, lépe 1:1 až 8:1, ještě lépe 2:1 až 6:1 a nejlépe 5:1.

Prostředky podle předkládaného vynálezu nebo jejich podíly typicky obsahují vhodná farmaceutická ředidla, pomocné látky, vehikula nebo nosiče, zvolené s ohledem na předpokládanou formu podání a odpovídající běžné farmaceutické praxi. Nosiče, vehikula a podobně mohou být upraveny k poskytnutí synergicky účinného množství aktivních podílů k inhibování nebo prevenci tvorby thrombinu nebo aktivity thrombinu u pacienta.

Vhodná farmaceutická ředidla, pomocné látky, vehikula a nosiče jsou popsány v standardní příručce, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company. Například pro orální podávání ve formě tobolky nebo tablety mohou být aktivní složky kombinovány s orálním, netoxickým, farmaceuticky přijatelným inertním nosičem jako je

laktóza, škrob, sacharóza, methylcelulóza, stearát hořečnatý, glukóza, síran vápenatý, fosforečnan vápenatý, mannitol, sorbitol a podobně. Pro orální podávání v tekuté formě mohou být složky léčiva kombinovány s jakýmkoliv orálním, netoxickým, farmaceuticky přijatelným, inertním nosičem jako je ethanol, glycerol, voda a podobně. V prostředcích nebo jejich složkách mohou být zahrnuty také vhodná pojiva (například želatina, škrob, kukuřičná sladidla, přírodní cukry včetně glukózy, přírodní a syntetické gumy a vosky), kluzná činidla (oleát sodný, stearát sodný, stearát hořečnatý, benzoát sodný, acetát sodný a chlorid sodný), rozvolňovadla (například škrob, methylcelulóza, agar, bentonit, a xanthanová guma), příchutě a barviva.

Přípravky pro parenterální podávání prostředku podle tohoto vynálezu mohou zahrnovat vodné roztoky, sirupy, vodné nebo olejové suspenze a emulze s pokrmovými oleji, jako je bavlníkový olej, kokosový olej nebo podzemnicový olej. Pro vodné suspenze lze použít dispergující nebo suspenzní činidla, zahrnující syntetické nebo přírodní gumy jako tragakant, alginát, klovatinu, dextran, sodnou karboxymethylcelulozu, želatinu, methylcelulózu a polyvinylpyrrolidon.

Prostředky pro parenterální podávání mohou zahrnovat sterilní vodná nebo nevodná rozpouštědla jako vodu, isotonický solný roztok, isotonický roztok glukózy, pufr nebo jiná rozpouštědla, výhodně používaná pro parenterální podávání léčebně účinných činidel. Prostředek určený pro parenterální podávání může také zahrnovat běžná přídavná činidla jako stabilizátory, pufry nebo konzervační látky, například antioxidanty jako methylhydroxybenzoát, nebo podobné přídavné látky.

Prostředek podle tohoto vynálezu může být sterilizován například filtrací přes přes filtr zachycující bakterie, přídavkem sterilizačních činidel k prostředku, ozářením prostředku nebo jeho zahřátím.

18.06.03

Alternativně mohou být podíly podle tohoto vynálezu poskytnuty jako sterilní pevné přípravky, například jako lyofilizovaný prášek, který se ve sterilním rozpouštědle snadno rozpustí bezprostředně před použitím.

Kromě dříve popsaných prostředků mohou být formovány také depotní prostředky. Takové dlouhodobě působící prostředky mohou být podávány prostřednictvím implantace (například subkutánně nebo intramuskulárně, tedy podkožně nebo do svalu), nebo intramuskulární injikací. Tyto podíly mohou být formovány například s vhodnými polymerními nebo hydrofobními materiály (například jako emulze v přijatelném oleji), nebo s iontově výměnnými pryskyřicemi, nebo jako těžce rozpustné deriváty, jako jsou těžce rozpustné sole.

Prostředky podle tohoto vynálezu a jejich složky mohou jako nosiče cílových léčiv obsahovat rozpustné polymery.

Poté, co byly vyrobeny, mohou být farmaceutické prostředky vloženy do vhodného zásobníku a označeny pro léčbu určeného stavu. Pro podávání prostředku podle tohoto vynálezu by takové označení mělo zahrnovat množství, četnost a způsob podávání.

Předkládaný vynález také zahrnuje způsoby používání prostředků podle tohoto vynálezu v kombinaci s jedním nebo více z přídavných léčebných činidel, zahrnujících bez omezení činidla inhibující krevní destičky nebo působící proti krevním destičkám jako aspirin, prioxicam, clopidogrel, ticlopidin, nebo receptorové antagonisty glykoproteinu IIb/IIIa, inhibitory trombinu jako boropeptidy, hirudin nebo argatroban; nebo trombolytická či fibrinolytická činidla jako aktivátory plasminogenu (jako tkáňový plasminogenový aktivátor), antistreplázu, urokinázu nebo streptokinázu; nebo jejich kombinace.

18.06.03

Kromě možné využitelnosti ve farmaceutických prostředcích pro léčbu výše uvedených kardiovaskulárních příznaků může odborník v oboru ocenit, že aktivní produkty mohou být použity i jako reagencie pro objasnění mechanismu srážlivosti krve *in vitro*.

Tento vynález bude podrobněji popsán pomocí specifických příkladů. Následující příklady jsou poskytnuty pro dokreslení a nejsou zamýšleny k omezení předkládaného vynálezu jakýmkoliv způsobem. Odborník v oboru snadno rozpozná množství různých nikoliv kritických parametrů, které mohou být změněny nebo modifikovány k poskytnutí v podstatě stejných výsledků.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Charakteristiky několika šarží heparinových oligosacharidových podílů použitých v předkládaném vynálezu a dalších heparinových podílů (UFH od firmy Sigma a enoxaparin od firmy Rhone-Poulenc Rorer) jsou shrnuty v Tabulce 2. Uváděné charakteristiky zahrnují střední molekulovou hmotnost, aktivitu, aktivitu anti-II_a, polydispersitu a hodnoty K_d. Polydispersita je poměr M_w/M_n (hmotnostně střední molekulové hmotnosti dělené číselně střední molekulovou hmotností) a je stanovena analýzou údajů v integračních tabulkách pro profily maxim z gelové filtrace heparinových vzorků. Hodnoty K_d byly získány měřením nárůstu fluorescence (excitace při 280 nm, emise při 340 nm), pozorovaného po titraci buď AT nebo II_a heparinovým vzorkem, dosazením titrační křivky I/I_0 vůči koncentraci heparinu do vazebné isotermální rovnice a získáním α (maximální změny fluorescence), K_d (disociační konstanty) a n (molárního množství heparinu, vyžadovaného k vazbě 1 molu ligandu). Stechiometrie vazby ligandu (1/n) se získá a

18.06.03

interpretuje jako podíl řetězců obsahujících pentasacharidy vzhledem ke každému z heparinových podílů.

Zvolený heparinový oligosacharidový podíl, na rozdíl od heparinu, nestabilizuje vazbu trombinu k fibrinu. To je prokázáno na studiích, kde přídavek fibrinového monomeru snížil rychlost inaktivace trombinu nerozděleným heparinem v přítomnosti jak AT, tak HCII. Oproti tomu měl fibrinový monomer pouze minimální inhibiční účinky na rychlost inhibice trombinu působením AT nebo HCII v přítomnosti ekvimolárních koncentrací heparinového oligosacharidového podílu. Další potvrzení toho, že zvolený heparinový oligosacharidový podíl nezvyšuje vazbu trombinu k fibrinu, bylo získáno měřením množství trombinu značeného ^{125}I, navázaného k fibrinovým chuchvalcům v přítomnosti nebo v nepřítomnosti heparinového oligosacharidového podílu nebo nerozděleného heparinu v koncentracích od 0 do 7 500 $nmol.l^{-1}$.

Příklad 2

Protitrombotická aktivita heparinových podílů a dermatansulfátových oligosacharidových podílů.

Pro srovnání protitrombotické aktivity heparinových oligosacharidových podílů, dermatansulfátových oligosacharidových podílů a kombinace heparinových a dermatanových oligosacharidových podílů byl použit mimotělní oběh. Tento oběh je podrobně popsán J. I. Weitzem se spoluautory, Circulation 99, 682-689, 1999. Stručně řečeno se různé koncentrace sloučeniny nebo sloučenin, které mají být testovány, přidají k rekalcifikované celé (kompletní) lidské krvi doplněné lidským fibrinogenem značeným prostřednictvím ^{125}I, udržované ve vodní lázni při 37 °C. Peristaltické čerpadlo čerpá krev přes krevní filtr o velikosti otvorů 40 μm. Krevní sraženina, zachycená na filtru, se stanoví

18.06.03

měřením tlaku na straně filtru pomocí tlakového měřidla zapojeného in-line. Sériové krevní vzorky byly odebrány z in-line zásobníku a jejich zbytková radioaktivita byla vypočítána jako ukazatel spotřeby fibrinogenu a tvorby chuchvalců. Kromě toho se měří doba počátku aktivovaného srážení.

Dvě klíčová kritéria, průchodnost a procentní množství fibrinogenu spotřebovaného v postupu srážení, byla použita ke stanovení účinnosti sloučenin, testovaných na tomto modelu. Průchodnost se měří jako doba do selhání filtru, pokus se zastaví po 90 minutách a určí se maximální doba průchodnosti.

Dermatansulfátový oligosacharidový podíl použitý v tomto vynálezu (rovněž označovaný v Příkladech a v Tabulce 3 jako LMWDS) měl následující charakteristiky: Mp = 5 000 (Da), Mw = 9 600 (Da) a polydispersitu 1,4. Heparinový oligosacharidový podíl získaný pomocí heparinázy byl připraven depolymerizací účinkem heparinázy, jak bylo popsáno výše a měl molekulovou hmotnost maxima 8 000, aktivitu anti-IIa přibližně 100 IU/mg, aktivitu anti-Xa přibližně 134 IU/mg a polydispersitu přibližně 1,5. Heparinový oligosacharidový podíl získaný pomocí oxidu dusitého byl připraven depolymerizací oxidem dusitým tak, jak je popsáno v PCT/CA98/00548 a měl molekulovou hmotnost 7 700, anti-IIa 84 IU/mg, aktivitu anti-Xa 123 IU/mg a polydispersitu 1,3. Heparinový oligosacharidový podíl získaný pomocí jodistanu byl připraven depolymerizací jodistanem tak, jak je popsáno v PCT/EP98/03007 (WO 98/55514, zveřejnění 10. 12. 1998) a měl molekulovou hmotnost maxima 7 900, aktivitu anti-IIa 19 IU/mg, aktivitu anti-Xa 43 IU/mg, polydispersitu 1,5.

Heparinové podíly s molekulovou hmotností maxima přibližně 8 000 (Da) byly zvoleny vzhledem k tomu, že odpovídají řetězcům obsahujícím přibližně 27 cukerných jednotek. K provázání trombinu a

18.06.03

antitrombinu je vyžadována minimální délka 18 cukerných jednotek. Vzhledem k tomu, že téměř všechny řetězce v těchto podílech sestávají z více než 18 sacharidových jednotek, mají dostatečnou délku ke katalýze inaktivace trombinu působením antitrombinu. Oproti tomu jsou tyto řetězce příliš krátké k provázání thrombinu a fibrinu, neboť takové provázání vyžaduje řetězce s obsahem 40 nebo více cukerných jednotek (tj. 12 000 nebo větší). V důsledku toho mají heparinové podíly se střední molekulovou hmotností 8 000 dobrou inhibiční aktivitu vzhledem ke thrombinu díky své schopnosti aktivovat antithrombin a jsou schopné inaktivovat thrombinovou vazbu na fibrin, neboť nespojují thrombin a fibrin a činí ho odolným vůči inaktivaci působením komplexů heparin/antitrombin nebo heparin/HCII. Oproti tomu enoxaparin, komerční heparin o nízké molekulové hmotnosti, mající střední molekulovou hmotnost přibližně 5 000 (Rhone-Poulenc Rorer, Montreal, PQ), sestává z řetězců, které jsou většinou příliš krátké k provázání thrombinu a antithrombinu, což vysvětluje, proč je jeho inhibiční aktivita vůči trombinu nižší než obdobná aktivita vůči faktoru Xa.

Jak bylo popsáno výše (J. I. Weitz se spoluautory, Circulation 99, 682-689, 1999), různé koncentrace každého z podílů byly přidány k rekalcifikované kompletní lidské krvi doplněné lidským fibrinogenem značeným prostřednictvím I^{125} a udržovány při teplotě 37 °C ve vodní lázni. Peristaltické čerpadlo bylo použito k čerpání krve přes krevní filtr o velikosti otvorů 40 μm. Srážení krve na filtru bylo stanovováno (a) měřením proximálního tlaku na filtru pomocí in-line tlakového měřidla a (b) odebíráním sériových krevních vzorků ze zásobníku a výpočtem zbytkové radioaktivity jako měřítka spotřeby fibrinogenu. Dále byly měřeny doby vytváření aktivovaných sraženin.

Jak je znázorněno v Tabulce 3, pokud je dermatansulfátový oligosacharidový podíl použit samotný, je třeba k udržení průchodnosti

18.06.03

filtru a k tomu, aby byla spotřeba fibrinogenu snížena na méně než 10 %, koncentrace 250 μg/ml . To je pozoruhodné vzhledem k tomu, že v předchozí práci bylo popsáno, že nerozdělený dermatansulfát byl v takovém oběhu neúčinný dokonce i v koncentraci 4 mg/ml (Weitz se spoluautory, Circulation, 1999),

Hodnoceny byly také kombinace dermatansulfátu o nízké molekulové hmotnosti a heparinového podílu získaného pomocí heparinázy (majícího Mw 8 000), nebo enoxaparinu. LMWDS byl účinný v koncentraci 100 μg/ml ve spojení s 1 μg/ml heparinového podílu získaného pomocí heparinázy (8 000), nebo v koncentraci 50 μg/ml ve spojení s 2 μg/ml téhož heparinového podílu. Oproti tomu koncentrace 50 μg/ml LMWDS byla neúčinná ve spojení s enoxaparinem v koncentraci 3 μg/ml, přičemž k selhání filtru došlo po 80 minutách a 85% spotřebě fibrinogenu. Tyto výsledky ukazují, že podíl získaný pomocí heparinázy je mnohem účinnější než enoxaparin.

Při použití kombinace LMWDS a heparinových podílů získaných pomocí heparinázy (8 000), byly tyto dvě látky účinné v 5x až 10x nižších dávkách, než byly dávky vyžadované k udržení průchodnosti za použití těchto látek samotných (tj. 50 μg/ml oproti 250 μg/ml u LMWDS a 1 μg/ml oproti 10 μg/ml u podílu získaného pomocí heparinázy).

Srovnány byly kombinace LMWDS (50 μg/ml), heparinových podílů získaných prostřednictvím heparinázy, kyseliny dusité a jodistanu a enoxaparinu (všechny tyto látky v koncentraci 2 μg/ml). Účinné byly kombinace LMWDS a heparinových podílů získaných prostřednictvím heparinázy nebo kyseliny dusité. Zbývající dvě kombinace nebyly účinné (viz Tabulka 4).

18.06.03

K dalšímu zhodnocení enoxaparinu a podílu získaného prostřednictvím heparinázy byly tyto dva podíly srovnány v gravimetricky odpovídajících dávkách (Tabulka 5). Enoxaparin byl dokonce i v koncentraci 30 μg/ml méně účinný než podíly, získané prostřednictvím heparinázy, o koncentraci 10 μg/ml.

Příklad 3

Srovnání účinku fibrinového monomeru na heparinem katalyzované a DS-katalyzované rychlosti inhibice trombinu působením HCII.

Účinek rozpustného fibrinového monomeru, připraveného tak, jak bylo popsáno dříve D. Beckerem se spoluautory v J. Biol. Chem. 274, 6226-6233, 1999, na rychlosti inhibice thrombinu působením HCII, byl nejprve zkoumán v přítomnosti nebo v nepřítomnosti rostoucích koncentrací DS či heparinu. Rychlostní konstanty druhého řádu (k_2) inhibice thrombinu působením HCII byly stanoveny za podmínek pseudoprvního řádu v přítomnosti či nepřítomnosti 3,3 μmol.l^{-1} heparinu nebo DS, nebo 4 μmol.l^{-1} SF, nebo obou činidel. Thrombin (10 nmol.l^{-1}) byl inkubován po dobu 5 minut při teplotě místnosti v TBS s obsahem 0,6% PEG-8 000 v přítomnosti různých koncentrací heparinu nebo DS (0 až 11 μmol.l^{-1}), SF (0 až 4 μmol.l^{-1}), 10 mmol.l^{-1} GPRP-NH_2 a 15 mmol.l^{-1} Tris-HCl, pH 7,5.

Reakční směsi (alikvoty 10 μl) byly aplikovány do 96 jamkových mikrotitračních destiček s kulatým dnem a stejný objem HCII (v koncentraci alespoň 10x vyšší než byla koncentrace thrombinu) byl do každé jamky přidán v časových intervalech od 2 sekund do 5 minut. Veškeré reakce byly zastaveny přídavkem 200 μmol.l^{-1} chromogenního substrátu (tGPR-pNA) v 200 μl TBS, obsahujícího 10 mg/ml polybrenu.

19.06.03

Zbytková aktivita thrombinu byla vypočítána měřením absorbance při 405 nm po dobu 5 minut za použití zařízení Spectra Max 340 Microplate Reader (od firmy Molecular Devices, Menlo Park, CA). Rychlostní konstanty pseudoprvního řádu (k_1) inhibice thrombinu byla stanoveny dosazením údajů do rovnice

$$k_1 . t = \ln ([P]_0/[P]_t)$$

kde $[P]_0$ je počáteční aktivita thrombinu a $[P]_t$ je aktivita thrombinu v čase t. Rychlostní konstanta druhého řádu, k_2, byla pak stanovena vydělením k_1 koncentrací HCII (Decker se spoluautory, 1999). Jak je znázorněno na Obr. 1 (část A), rozpustný fibrin (Fm) vyvolává v koncentracích 2 nebo 4 $\mu mol.l^{-1}$ pouze mírné, trojnásobné snížení DS-katalyzovaných rychlostí inhibice thrombinu účinkem HCII. Proti tomu Fm vyvolává dávkově závislé snížení heparinem katalyzovaných rychlostí inhibice thrombinu účinkem HCII (část B). Maximální, 240 násobné snížení rychlosti bylo pozorováno při koncentraci heparinu 1 $\mu mol.l^{-1}$ a při koncentraci Fm 4 $\mu mol.l^{-1}$, přičemž tato hodnota je v souhlasu s dříve popsanými hodnotami (D. Becker se spoluautory, 1999).

Srovnání účinku fibrinového monomeru na inaktivaci thrombinu antithrombinem v přítomnosti heparinu a v přítomnosti podílu získaného prostřednictvím heparinázy

Za použití podobné metodiky byly srovnány účinky rozpustného fibrinového monomeru na rychlosti inaktivace thrombinu antithrombinem v přítomnosti heparinu nebo v přítomnosti podílu, získaného prostřednictvím heparinázy (8 000). Jak je znázorněno na Obr. 2, s heparinem se rychlosti inaktivace thrombinu v přítomnosti fibrinového monomeru o koncentraci 4 $\mu mol.l^{-1}$ snížila přibližně 45x. Naproti tomu fibrinový monomer poskytl pouze desetinásobné snížení rychlosti

18.06.03

inaktivace thrombinu v přítomnosti podílu, získaného prostřednictvím heparinázy (8 000).

Účinek heparinu, DS, nebo podílu získaného prostřednictvím heparinázy (8 000) na vazbu ^{125}I-FPR-thrombinu na fibrin.

Již dříve bylo prokázáno, že heparin zvyšuje vazbu thrombinu k fibrinu, což je účinek, který nastává bez ohledu na to, zda heparin má vysokou nebo nízkou afinitu k AT, ale nastávající pouze s heparinovými řetězci o velikosti 11 200 (Da) nebo větší (P. J. Hogg a C. M. Jackson, J. Biol. Chem. 265, 241-247, 1990). V této studii byla schopnost DS napomáhat vazbě thrombinu k fibrinu srovnána s podobnou schopností heparinu. K tomuto účelu byly připraveny thrombin s blokovaným aktivním místem (FPR-thrombin) a ^{125}I-FPR-thrombin tak, jak je popsáno v práci J. C. Fredenburgha a spoluautorů, J. Biol. Chem. 272, 25493-25499, 1997). Vazba ^{125}I-FPR-thrombinu k fibrinovým chuchvalcům v přítomnosti nebo v nepřítomnosti buď heparinu nebo DS byla studována v TBS, obsahujícím 0,6% PEG-8 000 a 0,01% Tween-20. Fibrinogen (7,5 μmol.l^{-1}) byl inkubován s rostoucími koncentracemi buď heparinu nebo DS (0 až 2,5 μmol.l^{-1}) v celkovém objemu 40 μl v sériích mikrosedimentačních zkumavek (katalog. č. 72.702, Sarstedt Inc., St. Laurent, PQ). Srážení bylo zahájeno přidáním 10 μl zásobního roztoku A, obsahujícího 10 μmol.l^{-1} $CaCl_2$, 500 nmol.l^{-1} ^{125}I-FPR-thrombin a 10 nmol.l^{-1} thrombin.

Po 45 minutách inkubace při teplotě místnosti byl fibrin peletován odstředěním při 15 000 g po dobu 5 minut a alikvotní části supernatantu byly odebrány pro odečet gama-záření. Podíl thrombinu vázaného na fibrin byl vypočítán jako změna vazby ^{125}I-FPR-thrombinu ve srovnání s kontrolami, postrádajícími glykosaminglykany. Jak je znázorněno na Obr. 3, DS neměl žádný účinek na vazbu ^{125}I-FPR-thrombinu k

18.06.03

fibrinovým chuchvalcům, dokonce ani v koncentracích až do 1 $\mu mol.l^{-1}$. Naproti tomu heparin v koncentracích do 250 $nmol.l^{-1}$ zvyšuje vazbu ^{125}I-FPR-thrombinu k fibrinovým chuchvalcům dávkově závislým způsobem. Při koncentracích heparinu vyšších než 250 $nmol.l^{-1}$ se vazba ^{125}I-FPR-thrombinu k fibrinovým chuchvalcům snižuje, jako by odrážela hromadění rozdílných heparin-fibrinových a heparin-thrombinových populací. Při titraci thrombinu a Fm-Sepharose heparinem o nízké molekulové hmotnosti (LMW), enoxaparinem, došlo ve srovnání s obdobným účinkem DS pouze k malému zvýšení množství navázaného thrombinu. Tyto výsledky získané s enoxaparinem nebyly neočekávané, neboť heparinové řetězce jsou příliš krátké k provázání thrombinu a fibrinu.

Schopnost heparinázové frakce 8 000 (Da) (podílu získaného pomocí heparinázy o molekulové hmotnosti 8 000) napomáhat vazbě thrombinu k fibrinu byla také srovnána s obdobnou schopností heparinu. Jak je znázorněno na Obr. 4, podíl získaný prostřednictvím heparinázy vytvářel pouze malé zvýšení vazby thrombinu, zatímco heparin vyvolával mnohem větší zvýšení. Tyto nálezy ukazují, že podobně jako enoxaparain jsou řetězce v podílu získaném prostřednictvím heparinázy rovněž příliš krátké k provázání thrombinu a fibrinu.

Nahražení IIa z Fm-Sepharosy prostřednictvím HCII.

Vzhledem k tomu, že katalýza inhibice thrombinu působením HCII není v přítomnosti DS narušována fibrinem, musí být exogenní místo I exosite I) na thrombinu přístupné pro komplex DS-HCII i přes to, že se thrombin váže na fibrin prostřednictvím tohoto místa. Tato pozorování předpokládají, že komplex DS-HCII by měl být schopný vytlačit thrombin z fibrinu. To bylo testováno sledováním množství ^{125}I-FPR thrombinu vytlačeného z Fm-Sepharose zvýšenými koncentracemi HCII v

18.06.03

přítomnosti nebo nepřítomnosti DS (Obr. 5). HCII samotný měl v koncentracích až do trojnásobku fyziologické koncentrace omezenou kapacitu k vytlačení thrombinu z Fm-Sepharose. Pokud byl DS přítomný v koncentraci 2,5 $\mu mol.l^{-1}$, bylo pozorováno dávkově závislé vytlačování thrombinu. Maximální vytlačování bylo dosaženo při fyziologických koncentracích HCII, přičemž polovina maximálního účinku nastala při koncentraci 250 $nmol.l^{-1}$ HCII. V přítomnosti DS je tedy aminový konec HCII schopný účinně kompetovat (soutěžit) s fibrinem o vazbu na exogenní místo I thrombinu. Tyto nálezy ukazují, že komplex DS/HCII může vytěsnit thrombin z fibrinu, čímž ho učiní vnímavým vůči inaktivaci.

Příklad 4

Studie účinnosti vůči krácení
Model prevence vůči arteriární trombóze u králíků

Model prevence vůči arteriární trombóze u králíků (Green se spoluautory, J. Lab. Clin. Med. 127, 583-587, 1996; Klement se spoluautory, J. Lab. Clin. Med. 132, 181-185, 1998; Klement se spoluautory, Blood 94, 2735-2743, 1999) byl použit k testování účinnosti a bezpečnosti podílů a prostředků podle tohoto vynálezu. V tomto modelu se králíkovi injikuje testovaná protisrážlivá látka a malé množství fibrinogenu značeného ^{125}I. Kontrolním zvířatům se místo protisrážlivé látky injikuje fyziologický roztok. O pět minut později je distální aorta podrobena balónkové endoteliální denudaci, ke snížení toku krve je použita stenóza (stažení ovázáním) a stěna aorty je podrobena vnějšímu poškození 16 svorkami. V nepřítomnosti protisrážlivě působícího činidla vyvolává spojení traumatického poškození cévní stěny a sníženého toku krve rychlé srážení. Rozsah srážení může být sledován spojitě měřením krevního toku za použití

18.06.03

ultrazvukové sondy, umístěné distálně vůči stenóze. Pokus probíhá po injikaci protisrážlivého činidla celkově 90 minut. Hlavním příznakem účinnosti je procento doby, po kterou céva zůstane otevřená v průběhu 90 minutového pozorování. Bezpečnost různých protitrombotických činidel může být stanovena u stejných zvířat za použití modelu krvácení z ucha, který zahrnuje vytvoření pěti zářezů přes celou šířku králičího ucha a měření souhrnné ztráty krve v průběhu 30 minutového časového období. To představuje sloučení dvou zvířecích modelů, modelu prevence arteriární trombózy s modelem krvácení z uší, k tomu, aby požadovaný počet zvířat mohl být snížen na 50 %. Takový model, navržený pro studium prevence arteriární trombózy, napodobuje klinické podmínky, jako jsou nestabilní angína nebo krvácení po endarterektomii karotidy.

Heparinový oligosacharidový podíl

Účinnost a bezpečnost heparinového oligosacharidového podílu (označovaného zde jako "V21") byla srovnávána s nerozděleným heparinem, LMWH, hirudinem nebo kontrolou dostávající fyziologicky roztok u modelu prevence arteriární trombózy u králíků. Testované sloučeniny byly podávány 5 minut před vytvořením arteriární stenózy a před poškozením. Pro stanovení účinnosti byl měřen tok krve (vyjádřený jako procenta průchodnosti) v průběhu 90 minut, zatímco králičí model krvácení z ucha byl použit k měření bezpečnosti. Rychlé krvácení bylo pozorováno v nepřítomnosti protisrážlivé látky (SAL, tedy fyziol. roztok) a při vysokých dávkách heparinu (UFH). V21 a hirudin (HIR) byly mnohem účinnější při udržování průchodnosti než LMWH. Jak je znázorněno na Obr. 7, V21 poskytoval 100% průchodnost v dávkách působících minimální krvácení (dolní část Obr.7), zatímco hirudin vykazoval v dávkách vyžadovaných pro jeho účinnost mnohem větší náchylnost ke krvácení.

18.06.03

Dermatansulfátový oligosacharidový podíl

Účinnost dermatansulfátového oligosacharidového podílu (označovaného zde jako "H2403") byla testována na modelu prevence arteriární trombózy u králíků a na králičím modelu krvácení z uší. Dvacet zvířat bylo rozděleno do čtyř skupin. Poté jim byly podány koncentrace od 1 mg/kg do 10 mg/kg H2403 tak, jak je uvedeno v Tabulce 6.

H2403 vytvářel dávkově závislé zvýšení průchodnosti. Průchodnost činidla 76 až 96 % pro všechny dávky H2403 v rozmezí od 2,5 do 10 mg/kg, ale byla pouze 14% při aplikaci dávky 1 mg/kg. Průměrná doba do první okluze (vytvoření vměstku) byla 44 až 54 minut u dávkového rozmezí 2,5 až 10 mg/kg H2403, ale pouze 1 minuta u dávky 1 mg/kg.

Ve shodě s těmito nálezy byl spojený krevní tok v aortě v rozmezí od 160 do 288 ml/hodinu u dávkového rozmezí 2,5 až 10 mg/kg H2403, ale menší než 20 ml/hodinu u dávky 1 mg/kg. Tok krve se podstatně lišil u každého ze zvířat, což přispívalo k velkým standardním odchylkám. Ovšem sklon k nižšímu krevnímu toku aortou při nižší dávce H2403-123 může být snadno pozorován u souboru zápisů z měření u jednotlivých králíků, stejně jako u zprůměrovaných zápisů. Tyto údaje podporují celkový závěr, že průchodnost nastává u dávky 2,5 mg/kg H2403 a dávek vyšších.

Malé zvýšení radioaktivity sraženin a cévní stěny (od 15 % srovnávací hodnoty do 19 %) bylo pozorováno při snížení dávky H2403 z 5 mg/kg na 2,5 mg/kg, ovšem velké snížení (33 % srovnávací hodnoty) bylo pozorováno při snížení dávky H2403 na 1 mg/kg. Tyto údaje rovněž

18.06.03

podporují celkový závěr, že významné zvýšení účinnosti nastává u tohoto modelu při dávce 2,5 mg/kg H2403 a vyšších dávkách.

Bezpečnost LMWDS byla stanovována u stejných králíků za použití modelu krvácení z uší. Podání H2403 poskytlo dávkově závislé zvýšení ztráty krve s významně zvýšeným krvácením (80 µl a větším) při dávkách vyšších než 2,5 mg/kg. Údaje týkající se průchodnosti i okluze ukazují, že účinnost LMWDS nastává při dávkách větších nebo rovnajících se 2,5 mg/kg.

Souhrnně lze říci, že na základě průchodnosti, doby vytvoření okluze, sjednoceného toku krve a ukládání radioaktivně značeného fibrinogenu, tedy všech měřených parametrů, vykazuje H2403 v modelu králičí arteriární trombózy účinnost v dávce 2,5 mg/kg nebo vyšší. Významné zvýšení krvácení ovšem nastává při dávkách vyšších než 2,5 mg/kg.

Kombinace V21 a H2403-123 (maticová studie)

Jak bezpečnost, tak i účinnost přípravků V21 + LMWDS byly testovány na modelu králičí arteriární trombózy a prevence. Sto novozélandských králíků samců bylo rozděleno do 20 léčených skupin po 5 zvířatech (viz Tabulka 7) a poté jim byla podána intravenózní dávka jednoho přípravku V21/LMWDS ve formě bolusu na skupinu (dávkovací matice viz Tabulka 8). Poté následovala opakovaná dávka ve formě spojité infuze, podávané v průběhu doby, zbývající do 90 minut průběhu pokusu.

Křivky dávkové odpovědi vzhledem ke složkám V21 a LMWDS byly slučitelné s dřívějšími studiemi, přičemž rozšiřovaly dávkové rozmezí takových studií směrem k menším dávkám.

18.06.03

V21 měl lepší profil účinnosti vzhledem k bezpečnosti než LMWDS a při testovaných dávkách jak V21, tak i LMWDS vykazovaly slabé křivky dávkové závislosti pro krvácení. Přídavek LMWDS k V21 krvácení významně nezvýšil. Aditivní nebo synergické účinky LMWDS na V21 byly pozorovány u účinnosti, ale nikoliv u krvácení.

Hmotnost sraženiny, průchodnost a ztráta krve byly souběžně testovány pro dávkové kombinace V21-LMWDS ve snaze zjistit optimální kombinace. Bylo prokázáno, že účinné jsou následující poměry V21:LMWDS: 1:1, 4:1, 5:1. Průchodnost a ztráta krve byly testovány u kombinace 5:1. Průchodnost byla vyšší u králíků, kteří obdrželi kombinaci V21 : LMWDS v poměru 5:1 než u králíků, kteří obdrželi stejnou dávku samotného V21 (Obr. 6A), zatímco krvácení nebylo zvýšené (Obr. 6B).

Příklad 5

Model trombózy u paviánů

Studie na paviánech byla prováděna ke stanovení profilů přínosu vůči riziku podávání V21, LMWDS a kombinace těchto činidel. Tento model zahrnoval stanovení tvorby akutní trombózy na dakronovém cévním transplantátu v průběhu 60 minut po umístění do arteriovenózního zkratu (Hanson se spoluautory, Arteriosclerosis 5, 595-603, 1985).

Nejprve měla všechna zvířata chronicky vně upevněný zkrat ze silikonové gumy, chirurgicky umístěný mezi stehenní tepnu a žílu. Tyto zkraty nevytvářely měřitelnou aktivaci destiček. Pro stanovení tvorby trombů byl do systému zkratu zaveden segment testovací hadičky s centrálně umístěným dakronovým transplantátem (2 cm x 4,0 mm, vnitřní průměr) a vystaven proudění krve po dobu jedné hodiny. Hadičkovými

18.06.03

segmenty zkratu jsou standardní silikonové gumy, o vnitřním průměru 4,0 mm, které jsou netrombogenickým materiálem. Tok krve byl udržován na hodnotě 100 ml/minutu svorkou, umístěnou distálně vzhledem k testovanému úseku a byl měřen spojitě za použití ultrazvukového průtokometru.

Autologní destičky paviánů byly označeny prostřednictvím 1 mCi ^{111}Indium-oxinu. Radioaktivně značené účinnosti byly v průměru větší než 90 %. Shromažďování destiček označených ^{111}In bylo měřeno spojitě, za použití gama scintilační kamery (General Electric 400T). Údaje byly shromažďovány v pětiminutových intervalech a byly analyzovány za použití systému počítačového zpracovávání obrazu, propojeného s kamerou. Celkový počet uložených destiček byl vypočítán vydělením radioaktivity uložených destiček (počet impulsů za minutu) aktivitou ^{111}In-destiček v kompletní krvi (počet impulsů za minutu/ml) a vynásobením počtem obíhajících destiček (destičky/ml).

Obsah fibrinu ve všech trombech, vytvořených po 60 minutách vystavení transplantátu krevnímu toku, byl měřen následovně. Deset minut před iniciací tvorby trombů byl zvířatům intravenózně injikován homologní paviání fibrinogen, radioaktivně označený prostřednictvím 5 μCi ^{125}I. Po vystavení krevnímu toku po dobu 1 hodiny byl trombogenní dakronový transplantát důkladně promyt isotonickým fyziologickým roztokem. Vzhledem k překryvu mezi emisními spektry ^{111}In a ^{125}I, je před odečítáním aktivity ^{125}I v trombech za použití počítače gama k dispozici alespoň 30 dnů pro rozpad ^{111}In (poločas = 2,8 dne).

Celkové nashromáždění fibrinu se potom vypočítá tak, že se uložená radioaktivita ^{125}I (impulsy za minutu) vydělí radioaktivitou (impulsy za minutu/ml) fibrinogenu, který lze vysrážet a vynásobením koncentrací fibrinogenu v oběhu (v mg/ml), měřenou v každém pokusu.

18.06.03

Bezpečnost se hodnotí přímým měřením doby krvácení, tak, jak bylo popsáno Hansonem se spoluautory v Arteriosclerosis, 1985, viz výše.

Souběžné kontrolní studie byly prováděny na 6 neovlivňovaných zvířatech. Vytváření trombu na dakronových transplantátech bylo posuzováno tak, jak bylo popsáno výše a doby srážení (APTT, PT), aktivita faktoru Xa (stanovení Spectrozyme; American Diagnostica) a doby krvácení (Bt) byly měřeny jak bezprostředně po umístění transplantátu, tak i 1 hodinu poté. Kromě toho bylo pro stanovení thrombinových časů odebráno 0,5 ml citrátem ovlivněné plasmy paviánů (v každém časovém bodě).

Studie s V21 a LMWDS

Nejprve byl studován V21, počínaje celkovými dávkami 0,5 mg/kg, 1 mg/kg a 2 mg/kg (přičemž 50 % celkové dávky bylo podáváno ve formě bolusu a zbytek byl podáván jako spojitá infuse v průběhu 65 minut). Pět minut po podání bolusu byl vložen dakronový transplantát a sledování destiček bylo prováděno dalších 60 minut, po jejichž uplynutí byl transplantát odebrán a studie byla zakončena.

LMWDS byl testován obdobným způsobem, počínaje dávkami 2 mg/kg, 5 mg/kg a 10 mg/kg. Při dávce 2 mg/kg bylo 50 % celkové dávky podáno jako bolus a zbytek jako spojitá infuze v průběhu 65 minut. Relativní poměr bolusu vůči LMWDS v infuzi byl následně upraven k dosažení ustálených dob srážení. Tedy při dávce 5 mg/kg byly poměry množství bolus/infuze u dvou paviánů 50 %/50 % a 33 %/67 %. Při dávce 10 mg/kg byly tyto poměry 20-25 % (bolus)/75-80 % (infuze), výsledkem čehož byly konstantní hodnoty APTT v průběhu 60 minut infuze.

18.06.03

Následně bylo podávání V21 a LMWDS kombinováno v dávkách 0,5 mg/kg V21 + 0,5 mg/kg LMWDS; 1 mg/kg V21 + 1 mg/kg LMWDS; 2 mg/kg V21 a 5 mg/kg LMWDS; a 2 mg/kg V21 a 10 mg/kg LMWDS (přičemž 50 % dávky V21 a 20 % dávky LMWDS bylo injikováno jako bolus a zbytek byl podáván spojitou infuzí v průběhu 65 minut). Tento dávkovací režim poskytoval téměř konstantní hodnoty APTT v průběhu 60 minutové infuze. Zobrazování destičkového trombu, doby krvácení a laboratorní měření rovněž probíhaly tak, jak zde bylo popsáno.

Výsledky měření tvorby destičkového trombu po 60 minutách vystavení toku krve (nebo ve kterémkoliv dřívějším časovém okamžiku) byly srovnány za použití Studentova t-testu (two-tailed Student t-test).

Výsledky

Účinky V21 na trombózu dakronového transplantátu jsou znázorněny na Obr. 8. Nižší dávka V21, tedy dávka 0,5 mg/kg, nesnížila ukládání destiček pod kontrolní hodnoty, které byly v průměru 2,96 ± 0,85 x 10^9 destiček po 60 minutách vystavení toku krve. Střední dávka 1 mg/kg snížila ukládání destiček po 60 minutách o 24 %, zatímco vyšší dávka 2 mg/kg snížila ukládání destiček o 57 % (Obr. 8).

Fibrin byl působením V21 snížen dávkově závislým způsobem. Při nejvyšší dávce bylo celkové shromažďování fibrinu sníženo o 59 % (z 2,54±0,37 mg u kontrol na 1,05±0,52 mg u skupiny, která dostala dávku 2 mg/kg). V21 také prodloužilo APTT dávkově závislým způsobem na > 200 sekund při dávce 2 mg/kg. Měření PT byla téměř neovlivněna. Doby krvácení nebyly účinkem V21 významně zvýšené, v průměru činily jen 5,1 minuty u skupiny ovlivněné dávkou 2 mg/kg. Je možné zmínit, že jedno zvíře ve skupině dostávající dávku 0,5 mg/kg vykázalo dobu krvácení 12 minut; ovšem ve světle dalších pozorování u této skupiny i u dalších dávkových skupin se tento výsledek jeví jako rušivý.

18.06.03

Účinky LMWDS na tvorbu trombů na dakronovém transplantátu jsou uvedeny na Obr. 9. V rozmezí dávek od 2 do 10 mg/kg nedošlo k žádnému snížení ukládání destiček. Podobně LMWDS nesnížil tvorbu fibrinu na dakronovém transplantátu, nebo nezkrátil dobu krvácení. Doby srážení APTT byly působením LMWDS prodlouženy, při dávce 10 mg/kg pak byly přibližně zdvojeny (průměr: 59,1 s během 60 minut oproti 28,7 s Pre); doby srážení PT nebyly ovlivněny.

Výsledky, týkající se tvorby trombů na dakronovém transplantátu při kombinovaném působení V21 a LMWDS, jsou uvedeny na Obr. 10. V kombinaci s 2 mg/kg V21 byla dvěma zvířatům (paviánům) zavedena infuze s 10 mg/kg LMWDS a jedno další zvíře obdrželo dávku 5 mg/kg LMWDS. Významné snížení ukládání destiček bylo pozorováno při dávce 2 mg/kg V21 + (5-10 mg/kg) LMWDS; ovšem tento účinek byl srovnatelný s účinkem samotného V21 při stejné dávce (viz Obr. 8 a 10). Podobně bylo snížené ukládání fibrinu, pozorované při kombinovaných léčbách, srovnatelné se snížením po podání V21 samotného. Doby krvácení byly téměř neovlivněné. Zatímco hodnoty PT byly převážně neovlivněné (prodloužení PT o 2 sekundy při nejvyšších dávkách), APTT hodnoty byly v průměru > 500 sekund (oproti průměru 269 sekund po aplikaci samotného V21 v dávce 2mg/kg).

Model využívající paviány, použitý v těchto studiích, je modelem s rychlým krevním tokem, který napomáhá rychlému transportu a využití destiček, ve spojení s vysoce trombogenním povrchem (dakronový transplantát), poskytujícím silný počáteční podnět. Za těchto podmínek není tvorba fibrinu rozsáhlá a protisrážlivá činidla byla obecně neúčinná (např. standardní heparin, pentasacharid, standardní dermatansulfát). Přesto na tomto modelu snížil V21 arteriální tvorbu destiček a fibrinových trombů o > 50 % bez prodloužení doby krvácení.

18.06.03

Tabulka 1

	podíl 1	podíl 2	podíl 3
Mp (Da)	8 400	8 300	8 000
D	1,3	1,6	1,5
0-2 kDa (%)	0,7	3,2	2,2
2-4 kDa (%)	9,3	18,2	17,2
4-6 kDa (%)	19,0	18,5	19,2
6-8 kDa (%)	20,8	15,3	15,9
8-10 kDa (%)	16,8	11,7	12,4
10-12 kDa (%)	12,5	9,3	9,4
12-14 kDa (%)	8,5	7,1	7,7
14-16 kDa (%)	5,1	5,0	5,4
> 16 kDa (%)	7,3	11,7	10,6

Tabulka 2

Charakteristiky heparinového oligosacharidového podílu ve srovnání s heparinem a LMWH

sloučenina	šarže č.	střední Mw	polydi-spersita	K_d(AT) nM	anti-IIa	K_d(II_a) nM
heparinový oligosa-charidový podíl	200899 42192-2 42182-2 45262-1	8 050 8 450 8 500 8 500	1,5 1,2 1,3 1,5	62 20	100 67	872 ---
nerozdělený heparin (Sigma)	36H0763	15 000	---	32	---	---
Enoxaparin/LMWH (Rhone-Poulenc)	C900509 9	4 500	---	47	---	---

18.06.03

Tabulka 3

Protitrombotická aktivita dermatansulfátu o nízké molekulové hmotnosti (LMWDS) samotného nebo v kombinaci s heparinázovým podílem 8 000 Da či enoxaparinem v mimotělním oběhu

LMWDS	heparináza	enoxaparin	doba do selhání filtru	spotřeba fibrinogenu	výchozí ACT
µg/ml	µg/ml	µg/ml	minuty	%	sekundy
250	-	-	> 90	9	349
220	-	-	> 90	15	336
200	-	-	65	82	342
100	1	-	> 90	9	320
80	1	-	> 90	13	316
60	1	-	70	81	273
50	2	-	> 90	7	308
50	1	-	45	85	296
25	3	-	85	62	339
25	2	-	75	72	288
50	-	3	80	85	294

18.06.03

Tabulka 4

Protitrombotická aktivita LMWDS(50 μg/ml) v kombinaci s 2 μg/ml heparinázového, dusitanového nebo jodistanového podílu či s 2 μg/ml enoxaparinu v mimotělním oběhu

přípravky	doba do selhání filtru, minuty	spotřeba fibrinogenu %	výchozí ACT, sekundy
LMWDS a heparináz. podíl 8 450	> 90	11,2	292
LMWDS a podíl kys. dusité 7 700	> 90	16,6	299
LMWDS a jodistanový podíl 10 100	45	85,4	256
LMWDS a enoxaparin	85	80,5	260

Tabulka 5

Srovnání protitrombotické aktivity enoxaparinu heparinázou připraveného podílu v mimotělním oběhu

činidlo	dávka μg/ml	doba do selhání filtru, minuty	spotřeba fibrinogenu %
enoxaparin	10	25	82
	20	70	65
	30	> 90	33
heparináz. podíl (8450 Da)	10	> 90	11

18.06.03

Tabulka 6

Léčené skupiny

skupina	H2403 bolus, i.v.	H2403 infuze, i.v.	počet zvířat
1	10 mg/kg	10 mg/kg	5
2	5 mg/kg	5 mg/kg	5
3	2,5 mg/kg	2,5 mg/kg	5
4	1 mg/kg	1 mg/kg	5

Tabulka 7

Léčené skupiny

skupina	V-21	LMWDS	počet zvířat
1	fyziol. roztok	fyziol. roztok	5
2	0,125 mg/kg	-	5
3	0,25 mg/kg	-	5
4	0,50 mg/kg	-	5
5	2,50 mg/kg	-	5
6	-	0,125 mg/kg	5
7	-	0,25 mg/kg	5
8	-	0,50 mg/kg	5
9	0,125 mg/kg	0,125 mg/kg	5
10	0,25 mg/kg	0,125 mg/kg	5
11	0,50 mg/kg	0,125 mg/kg	5
12	2,50 mg/kg	0,125 mg/kg	5
13	0,125 mg/kg	0,25 mg/kg	5

18.06.03

14	0,25 mg/kg	0,25 mg/kg	5
15	0,50 mg/kg	0,25 mg/kg	5
16	2,50 mg/kg	0,25 mg/kg	5
17	0,125 mg/kg	0,50 mg/kg	5
18	0,25 mg/kg	0,50 mg/kg	5
19	0,50 mg/kg	0,50 mg/kg	5
20	2,50 mg/kg	0,50 mg/kg	5

Tabulka 8

Dávkovací matice

V-21/LMWDS	LMWDS (mg/kg)			
V-21 (mg/kg)	0,00/0,00	0,00/0,125	0,00/0,25	0,00/0,50
	0,125/0,00	0,125/0,125	0,125/0,25	0,125/0,50
	0,25/0,00	0,25/0,125	0,25/0,25	0,25/0,50
	0,50/0,00	0,50/0,125	0,50/0,25	0,50/0,50
	2,50/0,00	2,50/0,125	2,50/0,25	2,50/0,50

Předkládaný vynález nemá být ve svém rozsahu omezen zde popisovanými specifickými ztělesněními, neboť taková ztělesnění jsou zamýšlena jako pouze jednotlivá dokreslení jednoho aspektu vynálezu a jakákoli funkčně ekvivalentní ztělesnění spadají rovněž do rozsahu předkládaného vynálezu. Ve skutečnosti budou z předcházejícího popisu a obrázků odborníkovi v oboru kromě těch zde popsaných a ukázaných zřejmé i různé modifikace tohoto vynálezu. Takové modifikace jsou zamýšleny jako spadající do rozsahu připojených patentových nároků.

Veškeré publikace, patenty a přihlášky vynálezů, které jsou zde zmiňovány, jsou zde začleněny jako odkaz ve své úplnosti ve stejném

18.06.03

rozsahu jako v tom případě, že jednotlivá publikace, patent nebo přihláška vynálezu byla specificky a jednotlivě označena za začleněnou jako odkaz ve své úplnosti. Citace kteréhokoliv zde uvedeného odkazu není připuštěním toho, že by takový odkaz byl dostupný jako dosavadní stav techniky pro předkládaný vynález.

Je třeba uvést, že tak, jak jsou použity zde a v připojených patentových nárocích, zahrnují jednotná čísla výrazů "takový"či "tento" i množné číslo, pokud však ze smyslu textu nevyplývá opak.

18.06.03

2001-961

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Farmaceutický prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje kombinaci (a) alespoň jednoho heparinového oligosacharidového podílu a (b) alespoň jednoho dermatansulfátového oligosacharidového podílu, pro použití jako léčivo.

2. Farmaceutický prostředek podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že heparinový oligosacharidový podíl zahrnuje směs oligosacharidů získaných z heparinu, charakterizovaných jednou, dvěma, třemi, čtyřmi, pěti, šesti, sedmi či více z následujících charakteristik:

(a) mají protisrážlivou aktivitu *in vitro* vzhledem k antithrombinu a heparinovému kofaktoru II (HCII);
(b) oligosacharidy jsou příliš krátké pro provázáníní thrombinu a fibrinu, ale mají dostatečnou vzdálenost pro připojení antithrombinu nebo HCII k thrombinu;
(c) mají alespoň 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 % nebo 40 % oligosacharidů s alespoň jednou nebo více z pentasacharidových sekvencí;
(d) jsou obohaceny oligosacharidy, majícími rozmezí molekulové hmotnosti přibližně od 6 000 do přibližně 12 000, od 6 000 do 11 000 nebo od 6 000 do 10 000;
(e) oligosacharidy mají molekulové hmotnosti maxima přibližně mezi 7 000 a 10 000, 7 500 až 9 700 nebo 8 000 až 9 000;
(f) alespoň 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 % nebo 55 % oligosacharidů má molekulovou hmotnost větší nebo rovnající se 6 000;
(g) alespoň 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, nebo 40 % oligosacharidů má molekulovou hmotnost větší nebo rovnající se 8 000;
(h) vykazují polydispersitu od 1,1 do 1,8; a
(i) mají obdobné aktivity antifaktoru Xa a antifaktoru IIa.

18.06.03

3. Farmaceutický prostředek podle nároku 2, v y z n a č u j í c í s e t í m, že heparinový oligosacharidový podíl má charakteristiky (a), (b), (c) a (d); (a), (b), (c) a (e); (a), (b), (e) a (f); (a), (b), (e) a (g); (a), (b), (e), (f), (g), (h) a (i); (b), (c), (e) a (g); (b), (d), (c), (h) a (i); (b), (c), (d) a (h); (b), (e), (h) a (i); (b), (e), (f), (h) a (i); (b), (e), (g), (h) a (i); nebo (a) až (i).

4. Farmaceutický prostředek podle nároku 2, v y z n a č u j í c í s e t í m, že heparinový oligosacharidový podíl má jednu nebo více z následujících charakteristik:

(a) je obohacen o oligosacharidy v rozmezí molekulové hmotnosti od 6 000 do 10 000 a průměru v hodnotě přibližně 8 500;
(b) je bílou až šedobílou krystalickou pevnou látkou;
(c) je stálý při teplotě místnosti; a
(d) vykazuje polydispersitu přibližně 1,2 až 1,5.

5. Farmaceutický prostředek podle nároku 2, 3, nebo 4 v y z n a - č u j í c í s e t í m, že dermatansulfátový oligosacharidový podíl je charakterizován jednou nebo více z následujících charakteristik:

(a) obsah síry je 6,0 % až 10,0 % (hmotnost/hmotnost), lépe 6,0 až 8,0 % (hmotn./hmotn.) a ještě lépe 6,5 až 8 % (hmotn./hmotn.);
(b) poměr sulfát/karboxyl je 1,2 až 2,5, lépe 1,2 až 2,0, ještě lépe 1,3 až 1,8 a nejlépe 1,3 až 1,6;
(c) obsah disulfatovaného disacharidu je 20 % až 60 % (hmotn./hmotn.) a lépe 30 % až 60 % (hmotn./hmotn.) obsahu monosulfatovaného disacharidu;
(d) aktivita vůči thrombinu zprostředkovaná heparinovým kofaktorem II je v rozmezí od 20 do 60 IU/mg a lépe od 30 do 60 IU/mg.

18.06.03

6. Farmaceutický prostředek podle nároku 2, 3, nebo 4 v y z n a č u j í c í s e t í m, že dermatansulfátový oligosacharidový podíl je charakterizován jednou nebo více z následujících charakteristik:

(a) je obohacen oligosacharidy o molekulové hmotnosti v rozmezí od 5 000 do 8 000;
(b) je bílou až šedobílou krystalickou pevnou látkou;
(c) je stálý při teplotě místnosti; a
(d) vykazuje větší než 6,2% sulfonaci vzhledem ke hmotnosti.

7. Farmaceutický prostředek podle nároku 2, 3, nebo 4 v y z n a č u j í c í s e t í m, že dermatansulfátový oligosacharidový podíl zahrnuje směs dermatanových polymerních řetězců, z nichž 90 % nebo více vykazuje molekulovou hmotnost v rozmezí přibližně 1 600 až 20 000 a molekulovou hmotnost maxima přibližně 4 500 až 8 000.

8. Farmaceutický prostředek podle kteréhokoliv z nároků 1 až 7, v y z n a č u j í c í s e t í m, že množství (a) a (b) jsou účinná pro uplatnění synergického účinku v prevenci nebo inhibici thrombinové aktivity či tvorby thrombinu.

9. Farmaceutický prostředek podle kteréhokoliv z nároků 1 až 8, v y z n a č u j í c í s e t í m, že dávky heparinového oligosacharidového podílu a dermatansulfátového oligosacharidového podílu jsou alespoň 5x až 10 x nižší než dávky každého podílu, vyžadované k prevenci nebo inhibici thrombinové aktivity či tvorby thrombinu u pacienta.

10. Farmaceutický prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje synergicky účinné množství kombinace alespoň jednoho heparinového oligosacharidového podílu a alespoň jednoho

18.06.03

dermatansulfátového oligosacharidového podílu ve farmaceuticky přijatelném nosiči.

11. Farmaceutický prostředek podle nároku 10, v y z n a č u j í c í s e t í m, že farmaceuticky přijatelný nosič je upraven pro poskytnutí synergicky účinného množství podílů k prevenci nebo inhibici thrombinové aktivity či tvorby thrombinu u pacienta.

12. Kombinační léčba k prevenci nebo inhibici thrombinové aktivity či tvorby thrombinu u pacienta, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje podávání účinného množství (a) alespoň jednoho heparinového oligosacharidového podílu a (b) alespoň jednoho dermatansulfátového oligosacharidového podílu pacientovi.

13. Kombinační léčba podle nároku 12, v y z n a č u j í c í s e t í m, že tento způsob poskytuje synergickou aktivitu.

14. Kombinační léčba podle nároku 12 nebo 13, v y z n a č u j í c í s e t í m, že heparinový oligosacharidový podíl a dermatansulfátový oligosacharidový podíl jsou podávány současně nebo odděleně.

15. Kombinační léčba podle nároku 12, 13 nebo 14, v y z n a č u j í c í s e t í m, že heparinový oligosacharidový podíl zahrnuje směs oligosacharidů získaných z heparinu, charakterizovaných jednou, dvěma, třemi, čtyřmi, pěti, šesti, sedmi či více z následujících charakteristik:

(a) mají protisrážlivou aktivitu *in vitro* vzhledem k antithrombinu a heparinovému kofaktoru II (HCII);
(b) oligosacharidy jsou příliš krátké k provázání thrombinu a fibrinu, ale mají dostatečnou vzdálenost pro připojení antithrombinu nebo HCII k thrombinu;

18.06.03

(c) mají alespoň 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 % nebo 40 % oligosacharidů s alespoň jednou nebo více z pentasacharidových sekvencí;
(d) jsou obohaceny oligosacharidy, majícími rozmezí molekulové hmotnosti přibližně od 6 000 do přibližně 12 000, od 6 000 do 11 000 nebo od 6 000 do 10 000;
(e) oligosacharidy mají molekulové hmotnosti maxima přibližně mezi 7 000 a 10 000, 7 500 až 9 700 nebo 8 000 až 9 000;
(f) alespoň 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 % nebo 55 % oligosacharidů má molekulovou hmotnost větší nebo rovnající se 6 000;
(g) alespoň 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, nebo 40 % oligosacharidů má molekulovou hmotnost větší nebo rovnající se 8 000;
(h) vykazují polydispersitu od 1,1 do 1,8; a
(i) mají obdobné aktivity antifaktoru Xa a antifaktoru IIa.

16. Kombinační léčba podle nároku 15, vyznačující se tím, že heparinový oligosacharidový podíl má charakteristiky (a), (b), (c) a (d); (a), (b), (c) a (e); (a), (b), (e) a (f); (a), (b), (e) a (g); (a), (b), (e), (f), (g), (h) a (i); (b), (c), (e) a (g); (b), (d), (c), (h) a (i); (b), (c), (d) a (h); (b), (e), (h) a (i); (b), (e), (f), (h) a (i); (b), (e), (g), (h) a (i); nebo (a) až (i).

17. Kombinační léčba podle kteréhokoliv z nároků 12 až 16, vyznačující se tím, že dermatansulfátový oligosacharidový podíl je charakterizován jednou nebo více z následujících charakteristik:
(a) obsah síry je 6,0 % až 10,0 % (hmotnost/hmotnost), lépe 6,0 až 8,0 % (hmotn./hmotn.) a ještě lépe 6,5 až 8 % (hmotn./hmotn.);
(b) poměr sulfát/karboxyl je 1,2 až 2,5, lépe 1,2 až 2,0, ještě lépe 1,3 až 1,8 a nejlépe 1,3 až 1,6;
(c) obsah disulfatovaného disacharidu je 20 % až 60 % (hmotn./hmotn.) a lépe 30 % až 60 % (hmotn./hmotn.) obsahu monosulfatovaného disacharidu;

18.06.03

(d) aktivita vůči thrombinu zprostředkovaná heparinovým kofaktorem II je v rozmezí od 20 do 60 IU/mg a lépe od 30 do 60 IU/mg.

18. Kombinační léčba podle kteréhokoliv z nároků 12 až 16, v y z n a č u j í c í s e t í m, že dermatansulfátový oligosacharidový podíl zahrnuje směs dermatanových polymerních řetězců, z nichž 90 % nebo více vykazuje molekulovou hmotnost v rozmezí přibližně 1 600 až 20 000 a molekulovou hmotnost maxima přibližně 4 500 až 8 000.

19. Způsob inhibice nebo prevence thrombinové aktivity nebo tvorby thrombinu u pacienta, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se pacientovi, který to potřebuje, podávají v kombinaci synergicky účinná množství alespoň jednoho heparinového oligosacharidového podílu a alespoň jednoho dermatansulfátového oligosacharidového podílu.

20. Použití prostředku nebo kombinační léčby podle kteréhokoliv z předcházejících nároků pro prevenci a/nebo zlepšení závažnosti choroby, příznaků choroby a/nebo pravidelnosti opakování choroby, spojené s nadbytkem tvorby nebo aktivity thrombinu.

21. Použití prostředku obsahujícího kombinaci (a) alespoň jednoho heparinového oligosacharidového podílu a (b) alespoň jednoho dermatansulfátového oligosacharidového podílu pro výrobu léčiva k prevenci nebo inhibici thrombinové aktivity či tvorby thrombinu.

22. Použití synergicky účinných množství alespoň jednoho heparinového oligosacharidového podílu a alespoň jednoho dermatansulfátového oligosacharidového podílu pro výrobu farmaceutického prostředku k prevenci nebo inhibici thrombinové aktivity či tvorby thrombinu.

18.06.03

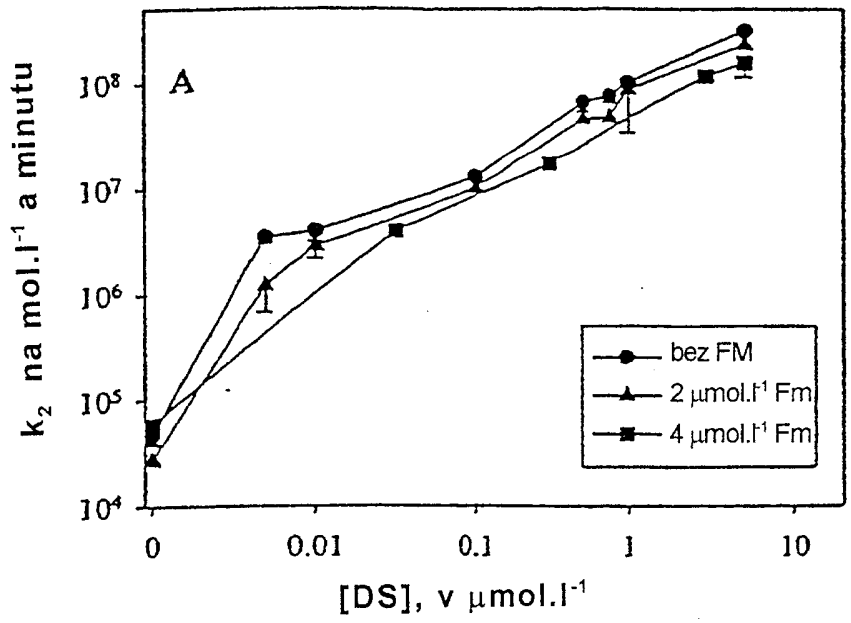
23. Farmaceutický prostředek podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je ve formě sady.

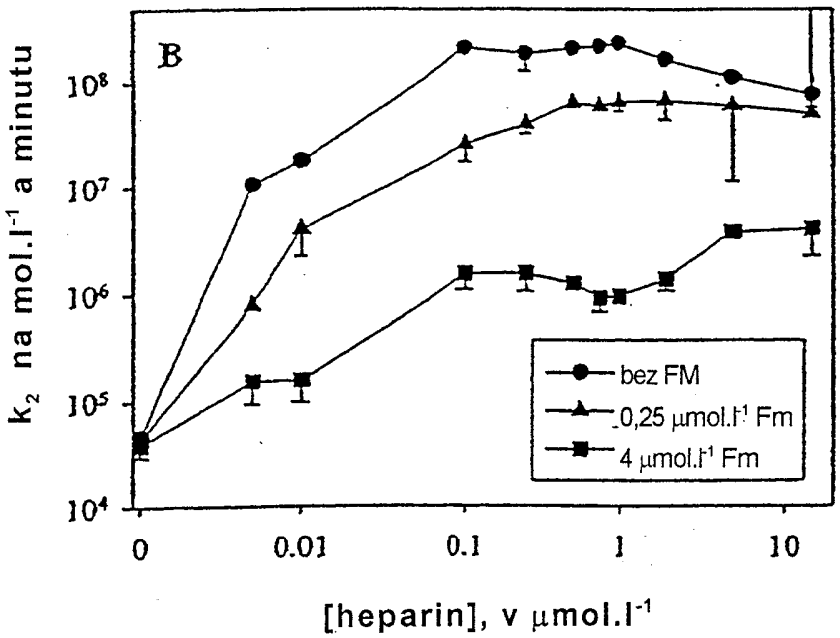
18.06.03

11/11

2003-961

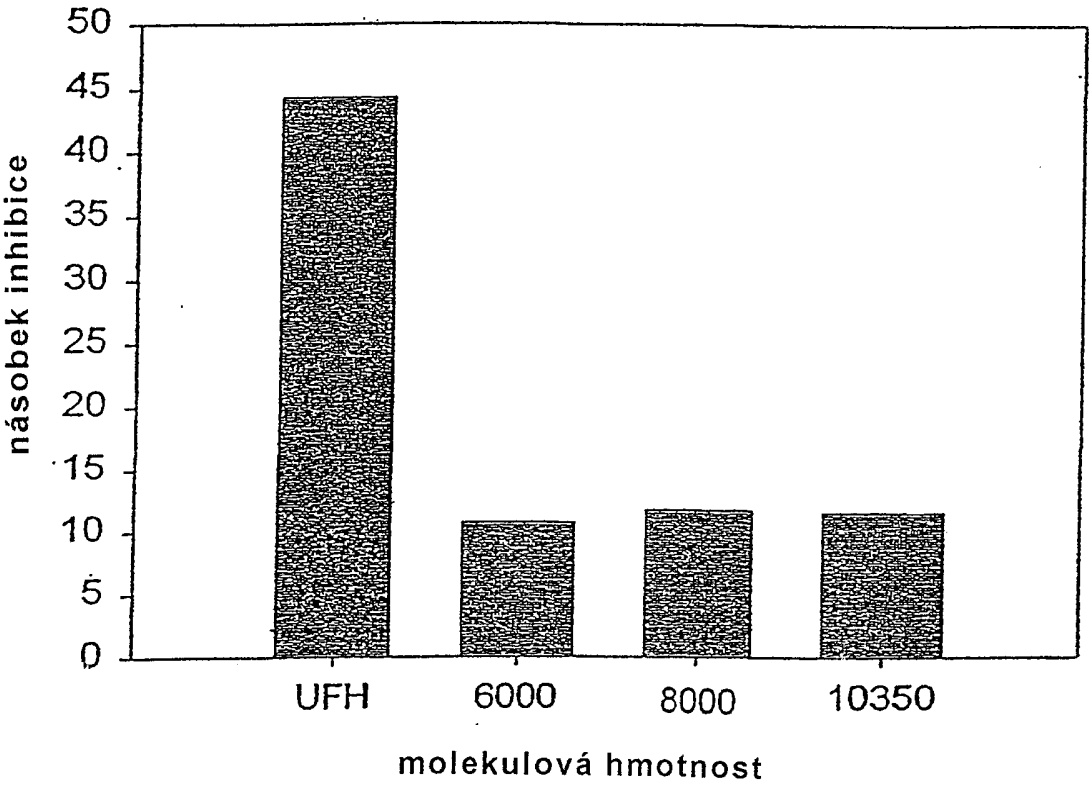
Obr. 1





18.06.03
2001-961
2/11

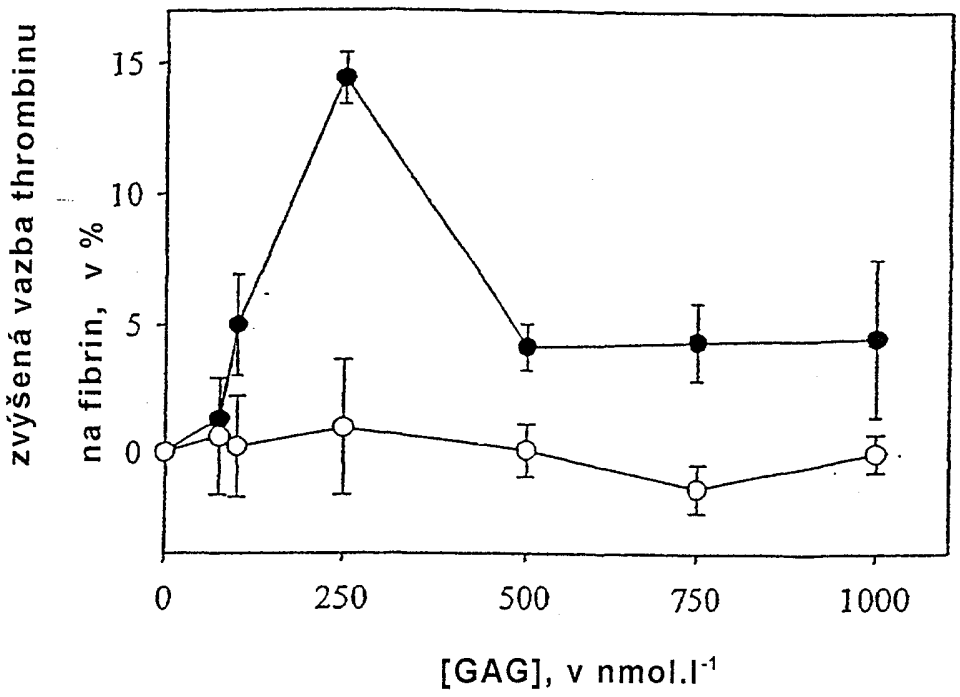
Obr. 2



18.06.03

1001-961.

Obr. 3

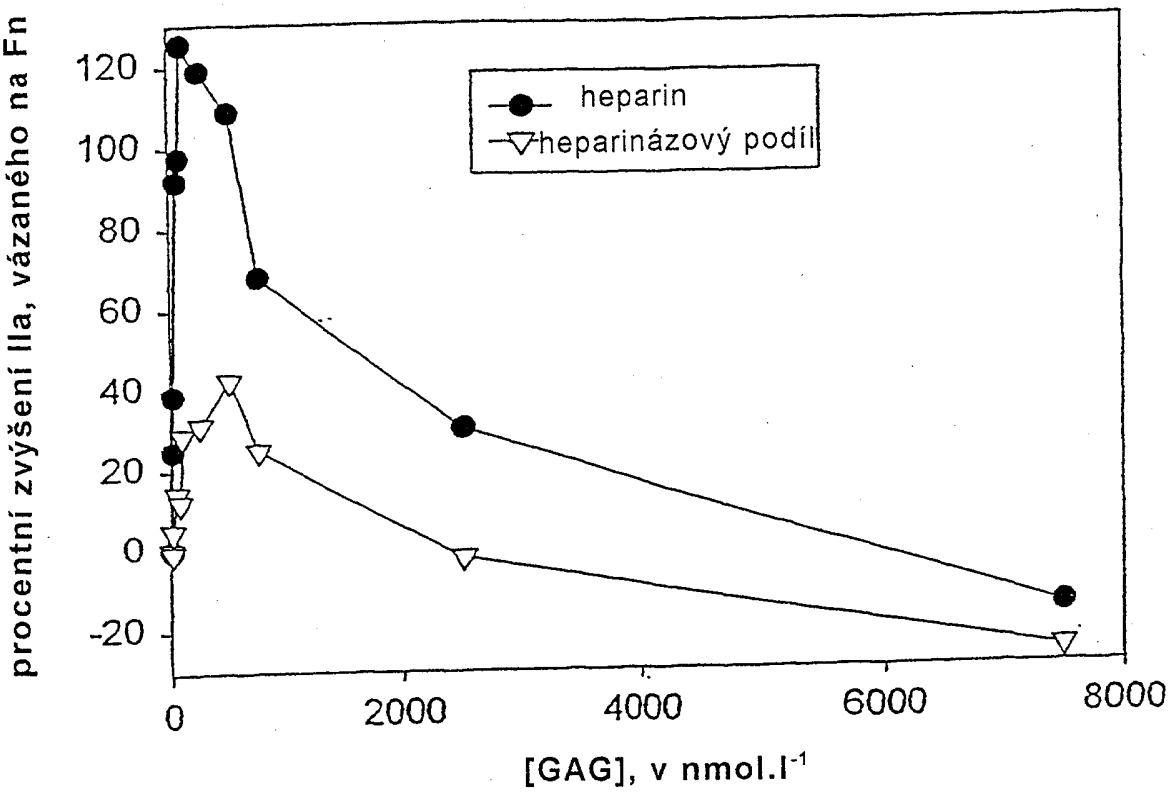


18.06.03

2001-961

4/11

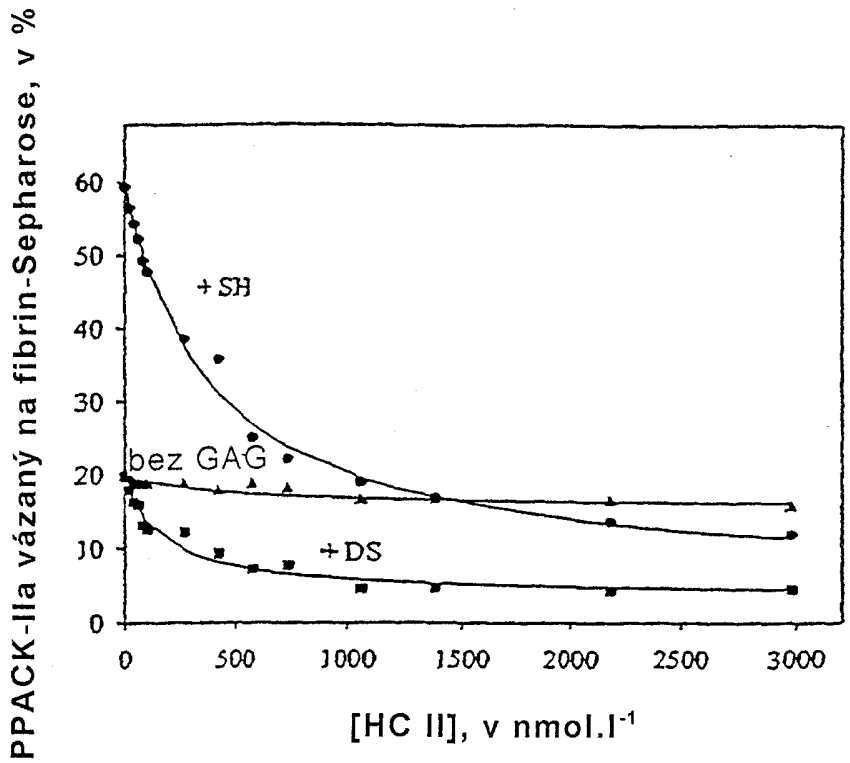
Obr. 4



18.06.03

2003-961

Obr. 5



18.06.03

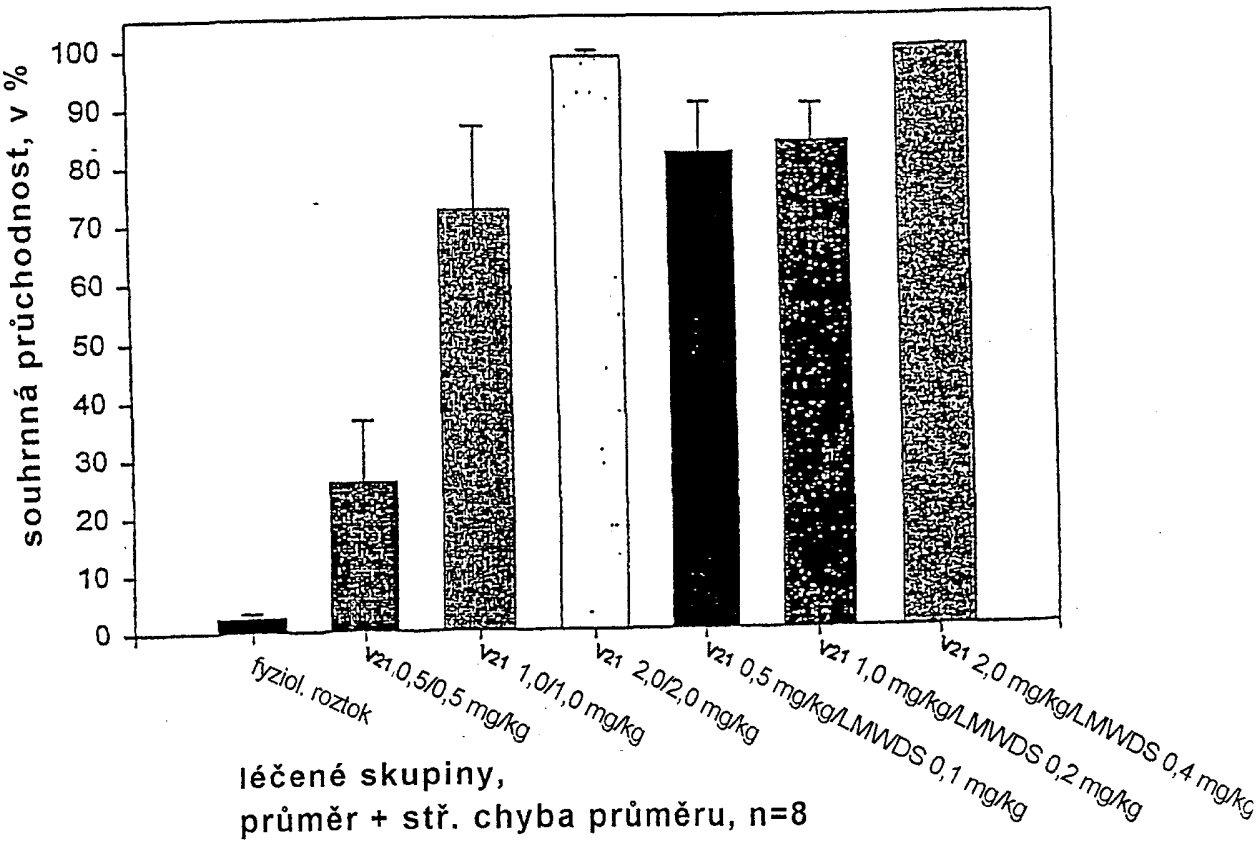
2001-961

6/11

Obr. 6A

WDN studie souhrnné průchodnosti v %

na modelu prevence thrombózy a krvácení



léčené skupiny,

průměr + stř. chyba průměru, n=8

18.06.03

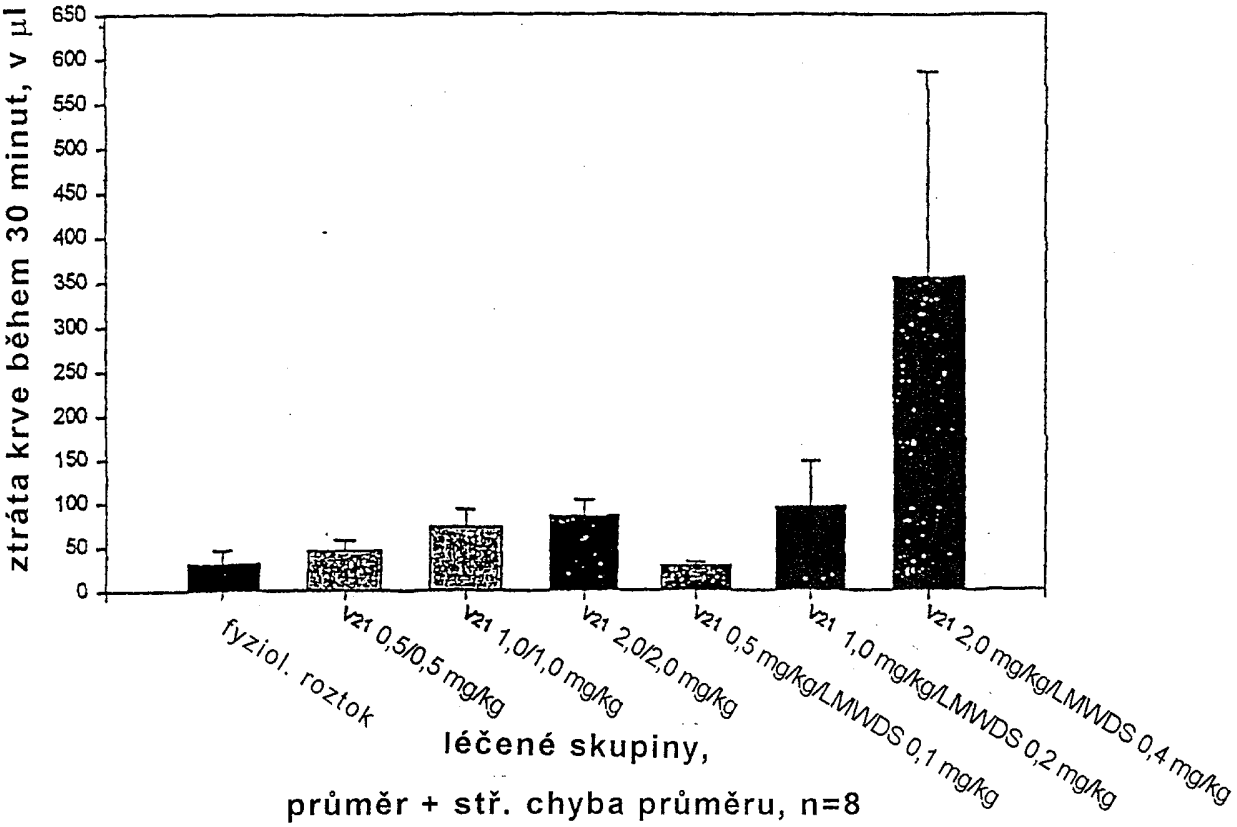
7/11

2001-961

Obr. 6B

WDN studie souhrnné ztráty krve během 30 minut

na modelu prevence thrombózy a krvácení



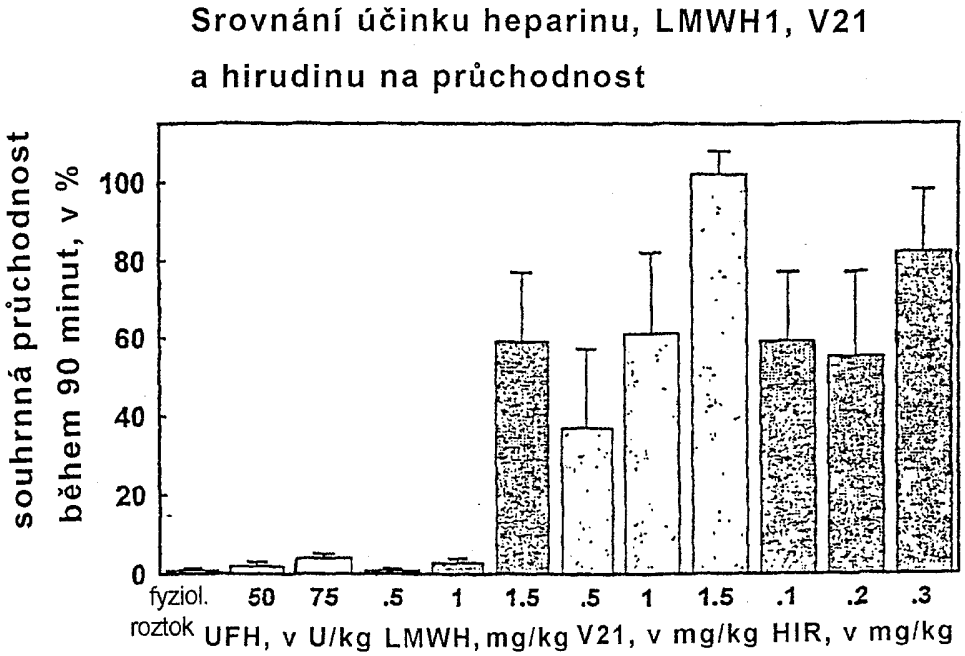
18.06.03

2/11

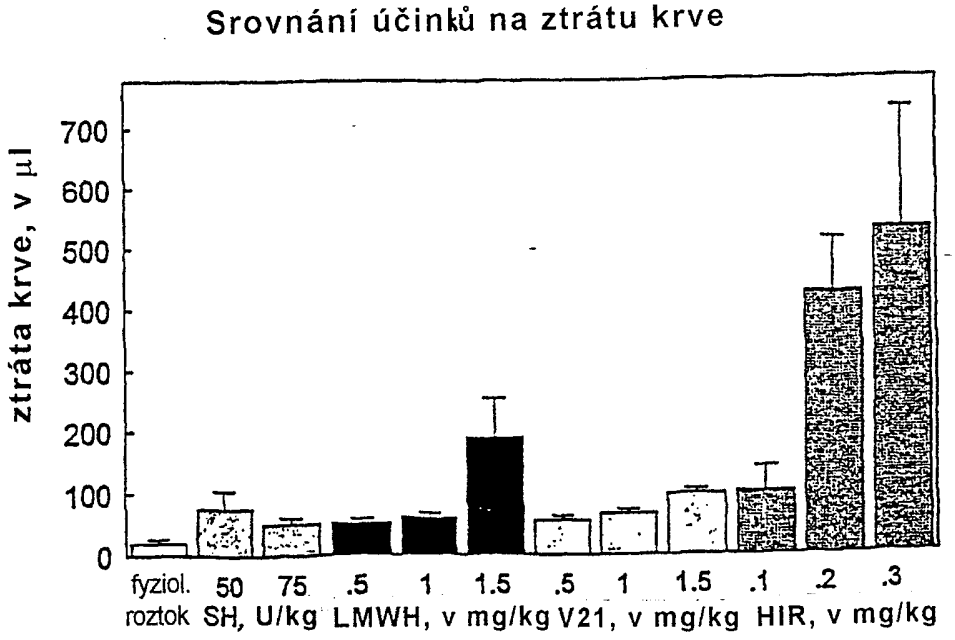
2001-961

Obr. 7

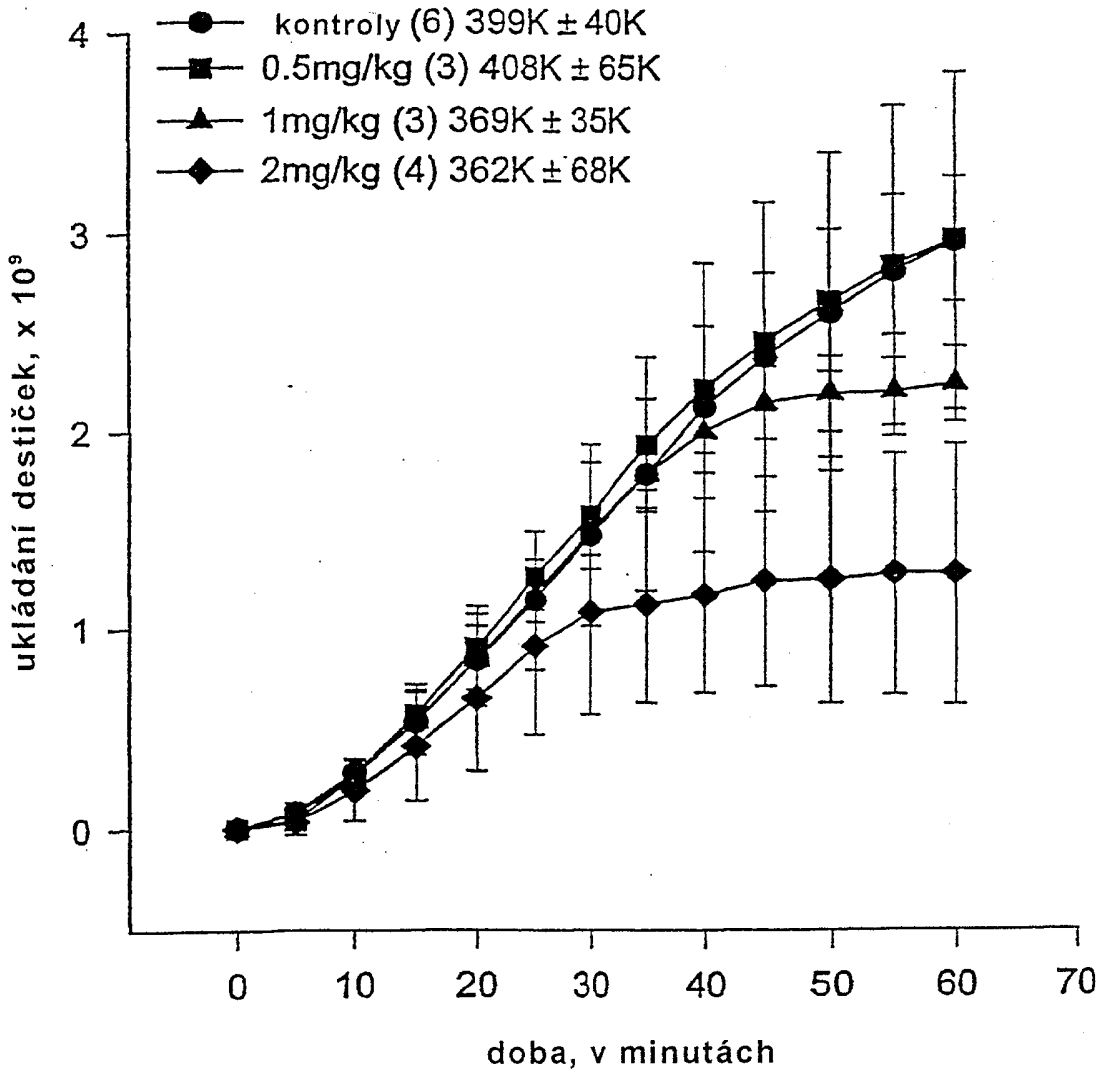
A



B



Obr. 8

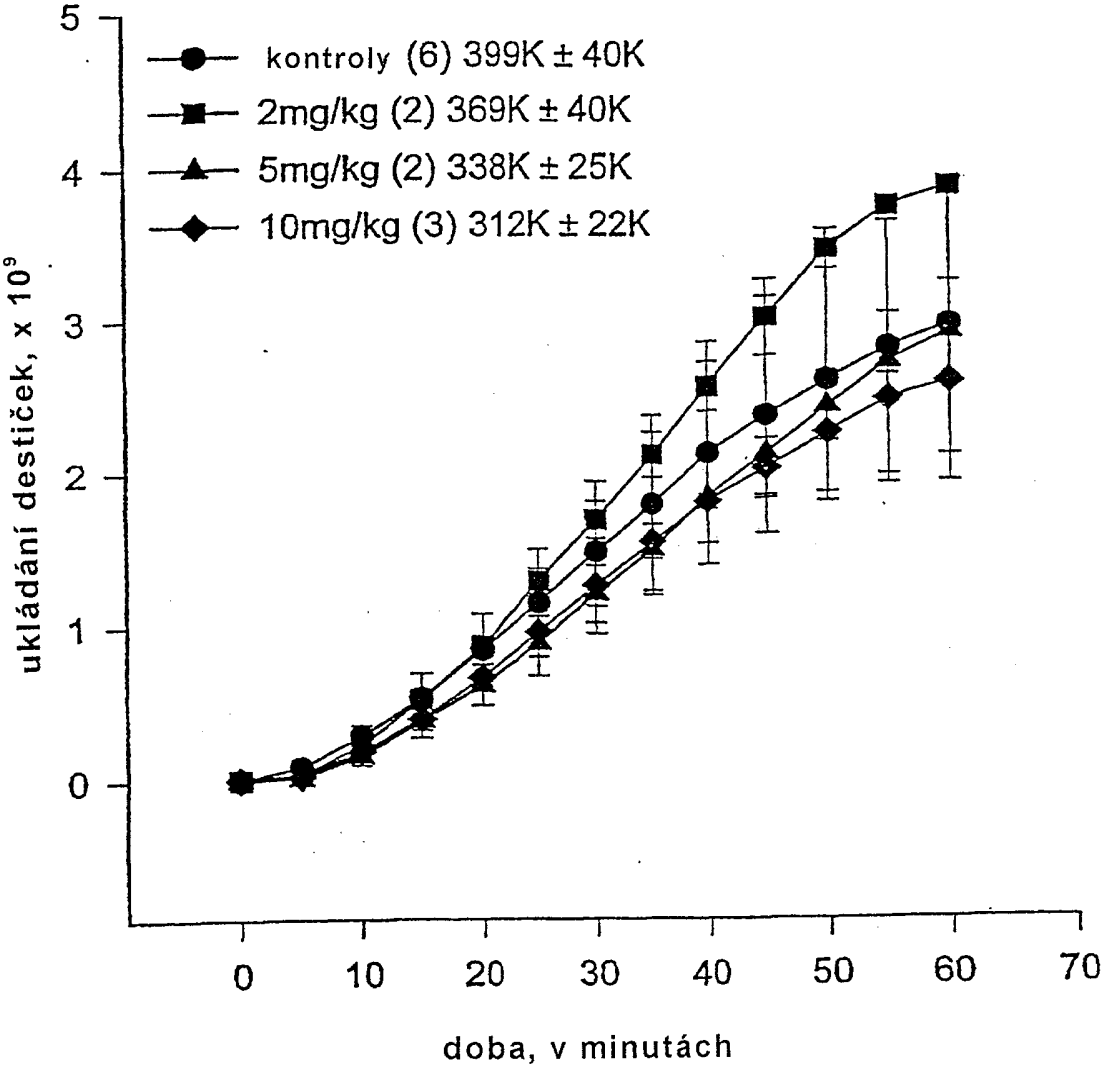

kontroly (6) 399K ± 40K
0.5mg/kg (3) 408K ± 65K
1mg/kg (3) 369K ± 35K
2mg/kg (4) 362K ± 68K
ukládání destiček, x 10⁹
0
1
2
3
4
0
10
20
30
40
50
60
70
doba, v minutách

18.06.03

10/11

2001-961

Obr. 9



18.06.03

11/11

2001-961

Obr.10

