

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

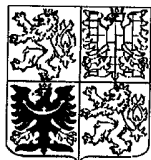
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

312-99

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **29. 07. 97**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **30.07.96**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **96/690476**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **12. 05. 99**
(Věstník č. 5/99)

(86) PCT číslo: **PCT/EP97/04125**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 98/04256**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

A 61 K 31/195

A 23 L 1/305

A 23 L 1/03

// (A 61 K 31/195,

A 61 K 38:13), (A 61 K 31/195,

A 61 K 31:435)

(71) Přihlášovatel:

NOVARTIS NUTRITION AG, Bern, CH;

(72) Původce:

Schneider Heinz, Cordast, CH;

(74) Zástupce:

**Kubát Jan Ing., Přístavní 24, Praha 7,
17000;**

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Léčivo nebo nutriční přípravek na bázi
glycinu k profylaxi nebo/a terapii renální
dysfunkce**

(57) Anotace:

Je popsáno použití glycinu pro přípravu léčiva
nebo nutričního přípravku k profylaxi nebo/a
terapii renální dysfunkce vyvolané cyklospori-
ny nebo askomyciny.

CZ 312-99 A3

176 730/KB

Léčivo nebo nutriční přípravek na bázi glycinu k profylaxi nebo/a terapii renální dysfunkce

Oblast techniky

Vynález se týká použití glycinu pro přípravu léčiva nebo/a nutričního přípravku, který může být aplikován terapeuticky pacientům k profylaxi nebo/a terapii renální dysfunkce vyvolané látkami náležejícími do tříd cyklosporinů nebo/a askomycinů.

Dosavadní stav techniky

Cyklosporiny patří do třídy strukturálně charakteristických, cyklických, poly-N-methylovaných undekapeptidů, které obvykle mají protizánětlivý, protivirový nebo/a protiparazitární účinek, každý ve větším nebo menším stupni. První z identifikovaných cyklosporinů byl fungální metabolit Cyclosporin A nebo Ciclosporin a jeho struktura je uvedena v The Merck Index, 11. vydání, Merck a spol., Inc.: Rahway, New Jersey, USA (1989) pod číslem 2759 seznamu. Později byly identifikovány cyklosporiny B, C, D a G, které jsou rovněž uvedeny v The Merck Index pod číslem 2759 seznamu. Je také znám velký počet syntetických analogů a reprezentativní příklady jsou uvedeny v EP 296 123, EP 484 281 a GB 2222770. Pro účely tohoto popisu jsou cyklosporin A a jeho strukturálně podobné analogy a deriváty, jakož i jeho metabolity obecně uváděny jako "cyklosporiny".

Askomyciny, z nichž FK-506 je nejznámější, tvoří jinou třídu obecně imunosupresivních látek, uváděnou také jako makrolidová imunosupresiva. FK-506 je makrolidové imunosupresivum, které je produkováno *Streptomyces tsukubaensis* č. 9993. Struktura FK-506 je uvedena v dodatku ke shora uvedenému The Merck Index jako položka A5. Je také znám velký počet příbuz-

28.01.99

ných sloučenin, které si zachovávají základní strukturu a imunologické vlastnosti FK-506. Tyto sloučeniny jsou popsány v různých publikacích, například v EP 184162, EP 315973, EP 323042, EP 423714, EP 427680, EP 465426, EP 474126, WO 91/13889, WO 91/19495, EP 484935, EP 532088, EP 532089, WO 93/5059 a podobně. Askomycin, FK-506 a jejich strukturálně podobné analogy a deriváty, jakož i metabolity jsou v tomto popisu souhrně nazývány "askomyciny".

Vzhledem k jejich neobyčejně užitečným vlastnostem mají cyklosporiny (zejména Cyclosporiny A a G) a askomyciny (například FK-506) široké použití, například při prevenci rejekce transplantátu, při léčbě autoimunních chorob jako reumatoidní artritidy a psoriázy a také při léčbě vícelékové rezistence. Cyklosporiny a askomyciny mají také některé vedlejší účinky, přičemž nejzávažnější je renální dysfunkce, zejména nefrotoxicita, zvláště při vyšších dávkách. Nefrotoxicita se vyznačuje snížením renálního průtoku krve a glomerulární filtrace s odpovídajícím zvýšením kreatininu, alkalické fosfatázy a močoviny v séru, jakož i bobtnáním proximálních buněk a nekrózou a infiltrací makrofágů. V některých studiích bylo prokázáno, že hypoxie poškozuje poměrně selektivně proximální kanálky a snížený krevní průtok může vést k hypoxii. Byl uveden důkaz zahrnující intracelulární kalcium do této patologie a blokátory kalciových kanálů jsou účinné při minimalizaci poškození. Avšak blokátory kalciových kanálů nemohou být podány beztržně. V současné době tedy není známá žádná použitelná terapie pro tento důležitý vedlejší účinek na ledviny.

Podstata vynálezu

Nyní bylo neočekávaně zjištěno, že glycin je vhodný pro profylaxi nebo/a terapii renální dysfunkce vyvolané cefalosporiny nebo askomyciny.

Podle vynálezu bylo zejména zjištěno, že dietetický gly-

28.01.99

cin inhibuje nebo/a zlepšuje jeden z hlavních vedlejších účinků chronické aplikace cyklosporinu - nefroxicitu. Glycin zamezuje snížení rychlosti glomerulární filtrace. Glycin také zamezuje zvýšení kreatininu a močoviny v séru a má sklon minimalizovat zvýšení alkalické fosfatázy v důsledku cyklosporinu A. Dietetickým glycinem se také zabrání bobtnání a nekróze proximálních kanálků a infiltraci makrofágů. Je tedy zřejmé, že glycin má velký ochranný účinek na nefrotoxicitu způsobenou cyklosporinem A.

Vzhledem ke shora uvedeným účinkům spadají do rozsahu vynálezu léčiva nebo/a nutriční přípravky obsahující glycin, jakož i způsoby použití glycinu. Pro použití v léčivech, nutričních přípravcích a způsobech podle vynálezu se glycin účelně používá ve formě volné aminokyseliny (na rozdíl od formy soli), ve formě prekurzorů glycinu, zejména alaninu nebo serinu (L-alaninu, L-serinu), též ve formě volné aminokyseliny, ve formě fyziologicky přijatelné soli uvedených aminokyselin nebo ve formě směsí uvedených aminokyselin nebo/a jejich fyziologicky přijatelných solí. Glycin se s výhodou používá ve formě volné aminokyseliny (na rozdíl od formy soli), ve formě fyziologicky přijatelné soli nebo ve formě směsi glycinu ve formě volné aminokyseliny s glycinem ve formě fyziologicky přijatelné soli. Nejvýhodněji je glycin ve formě volné aminokyseliny. Glycin může také být použit podle vynálezu ve formě dipeptidů.

Předmětem vynálezu je tedy použití glycinu pro přípravu léčiva nebo nutričního přípravku k profylaxi nebo/a terapii renální dysfunkce vyvolané cyklosporiny nebo askomyciny.

Předmětem vynálezu je dále způsob profylaxe nebo/a terapie renální dysfunkce vyvolané cyklosporiny nebo askomyciny, který spočívá v tom, že se aplikuje člověku nebo jinému savci před, současně s nebo po léčbě cyklosporinem nebo askomycinem léčivo nebo nutriční přípravek obsahující glycin v množství,

28.01.99

které je schopno inhibovat nebo/a zlepšit renální dysfunkci.

Ještě dále je předmětem vynálezu léčivo nebo nutriční přípravek obsahující glycin pro profylaxi nebo/a terapii renální dysfunkce vyvolané cyklosporiny nebo askomyciny.

Předmětem vynálezu je též léčivo nebo nutriční přípravek obsahující terapeuticky účinné množství cyklosporinu nebo askomycinu v kombinaci s glycinem v množství schopném inhibovat nebo/a zlepšit renální dysfunkci vyvolanou cyklosporinem nebo askomycinem.

Glycin je zejména užitečný pro profylaxi nebo/a terapii renální dysfunkce - nefrotoxicity.

Glycin je dále zejména užitečný pro terapii nebo/a profylaxi renální dysfunkce vyvolané cyklosporiny cyklosporinem A (Ciclosporin) a PSC 833 ((3'-desoxy-3'-oxo-MeBmt)¹(Val)²-Ciclosporin, např. jak je popsán v EP 296 122), zejména cyklosporinem A.

Glycin je také zvláště užitečný pro terapii nebo/a profylaxi renální dysfunkce vyvolané askomyciny FK-506 a ASM (33-epi-chlor-33-desoxyaskomycin, např., jaký je popsán v příkladu 66a EP 427 680), zejména FK-506.

Dále je glycin zejména užitečný pro profylaxi nebo/a terapii renální dysfunkce vyvolané imunosupresivními cyklosporiny nebo askomyciny.

Nutriční přípravek nebo léčivo se může pacientovi aplikovat enterálně nebo parenterálně. Výhodná je cesta enterální aplikace. Zejména výhodné aplikační cesty jsou orální aplikace nebo/a aplikace žaludeční sondou. Léčivo nebo přípravek se účelně aplikuje ve formě vodné kapaliny. Léčivo nebo přípravek ve formě vhodné pro enterální aplikaci je tedy s výhodou

28.01.99

vodný nebo ve formě prášku, přičemž se prášek účelně před použitím přidá k vodě. Pro použití aplikací žaludeční sondou bude množství vody, která má být přidána, záviset mimo jiné na pacientově potřebě vody a jeho stavu. Je zřejmé, že pro akutní léčbu je cesta parenterální aplikace nejvýhodnější.

Léčivo nebo přípravek může být tak sestaven, aby poskytl pacientovi 1 až 80 g, s výhodou 10 až 60 g, zejména výhodně 15 až 30 g glycinu za 24 hodin. Množství léčiva nebo přípravku, které má být aplikováno, závisí ve značné míře na pacientových specifických potřebách. Taková denní množství glycinu jsou vhodná pro léčbu požadovaných účinků, jakož i pro profylaxi/předléčbu. Léčivo nebo přípravek obsahující glycin může být aplikován pacientovi v takovém množství, aby se koncentrace glycinu v pacientově plazmě zvýšila na hodnotu mezi 0,5 a 2,0 mM, s výhodou mezi 1,0 a 2,0 mM. I když jsou anticipován vyšší koncentrace než uvedené, očekává se, že se dosáhne významných klinických účinků, jestliže se koncentrace kyseliny zvýší jako důsledek aplikace přípravku nebo léčiva, takže je v rozmezí od 1,2 do 1,5 mM. U traumatických, hyperkatabolických pacientů může být dokonce výhodné zvýšit hladiny glycinu, serinu nebo alaninu v plazmě asi na 0,2 až 0,3 mM, což odpovídá hladinám glycinu v plazmě zdravých jedinců.

Léčivo nebo nutriční přípravek obsahuje s výhodou pouze glycin a popřípadě L-arginin nebo L-ornithin jako volné aminokyseliny (na rozdíl od aminokyselin vázaných na protein nebo peptid).

Když se glycin aplikuje ve formě léčiva, bude takové léčivo obsahovat od 0,1 do 99 g glycinu na 100 g.

Obecně se dosáhne příznivých účinků, když se glycin aplikuje ve formě nutričního přípravku, který může podle okolností být kompletně sestavenou výživou (tj. výživou dodávající v zásadě všechnu potřebnou energii, aminokyseliny, vitaminy

28.01.99

ny, minerály a stopové prvky) nebo doplňkem výživy. Doplňěk výživy typicky zajišťuje 5 až 20 % celkové denní kalorické potřeby, s výhodou asi 10 %. Nutriční přípravek bude s výhodou přijímán ve vodné kapalně formě. Nutriční přípravek tedy může obsahovat zdroj sacharidů, tuk lipidů (zdroj tuku) nebo/a protein (zdroj dusíku) a glycin, který se vyznačuje tím, že glycin je přítomen v kompletní výživě v množství asi 0,2 až 60 g na 100 g suché hmotnosti přípravku, s výhodou 5 až 45 g, zejména výhodně 7,5 až 30 g na 100 g suché hmotnosti. Nutriční přípravek bude s výhodou dále obsahovat jiné nutričně výhodné komponenty jako vitaminy, minerály, stopové prvky, vlákna (s výhodou rozpustná vlákna). Množství sacharidů je v rozmezí od 0 do 85 % hmotnostních, s výhodou od 25 do 75 % hmotnostních, množství tuku je v rozmezí od 0 do 30 % hmotnostních a množství proteinu v rozmezí od 0 do 75 % hmotnostních, s výhodou 15 až 65 %. Výhodné nutriční přípravky zahrnují následující: doplněk výživy sestávající v podstatě z glycinu a sacharidů, doplněk výživy sestávající v podstatě z glycinu, sacharidů a proteinu nebo/a kompletní výživu sestávající v podstatě z glycinu, sacharidu, proteinu, tuku, vitaminů, minerálů, stopových prvků a popřípadě vláken. Takové doplňky výživy nebo kompletní výživy s výhodou dále obsahují L-arginin nebo jinou fyziologicky přijatelnou sloučeninu spojenou se syntézou oxidů dusíku, jako L-ornithin nebo glycerol, přičemž přednost se dává L-argininu.

Jako příklady vhodných zdrojů dusíku je možno uvést nutričně přijatelné proteiny, jako proteiny sojových bobů nebo proteiny odvozené od mléka, jako syrovátku, kaseináty nebo práškové odstředěné mléko nebo/a jejich proteinové hydrolyzáty. Vhodnými zdroji sacharidů jsou všechny cukry, maltodextriny a škroby. Jako vhodné zdroje tuků lze uvést triglyceridy jakož i di- a monoglyceridy.

Příklady vitaminů vhodných k inkorporaci do léčiva nebo přípravku podle vynálezu zahrnují vitamin E, vitamin A, vita-

28.01.99

min D, vitamin K, kyselinu listovou, thiamin, riboflavin, vitamin B₁, B₂, B₆ a B₁₂, niacin, biotin a pantotenovou kyselinu v nutričně přijatelné formě.

Příklady minerálních prvků a stopových prvků, vhodných k inkorporaci do léčiva nebo přípravku, zahrnují sodík, draslík, vápník, fosfor, hořčík, mangan, měď, zinek, železo, selen, chrom a molybden v nutričně přijatelné formě.

Výraz "rozpustná vlákna", jak je zde používán, se týká vláken, která jsou schopna podléhat podstatnou fermentaci v tlustém střevě, aby se nakonec vytvořily mastné kyseliny s krátkým řetězcem. Příklady vhodných rozpustných vláken zahrnují pektin, gumu guar, gumu z lasku rohovníku, xanthanovou gumu, které popřípadě mohou být hydrolyzovány. Pro dospělé je celkové množství rozpustných vláken za den účelně v rozmezí od 3 do 30 g.

Je třeba uvést, že glycin může být použit v kombinaci s jednou nebo více následujícími komponentami:

- (i) s omega-3-polynenasycenými mastnými kyselinami (PUFA), popřípadě ve směsi s omega-6-polynenasycenými mastnými kyselinami,
- (ii) s L-argininem nebo s jinou fyziologicky přijatelnou sloučeninou spojenou se syntézou oxidu dusíku nebo s jejich směsmi a
- (iii) se zdrojem nukleobáze.

Přitom se dává přednost použití léčiva nebo nutričního přípravku obsahujícího glycin v kombinaci s argininem nebo s jinou fyziologicky přijatelnou sloučeninou spojenou se syntézou polyaminů, jako s ornithinem. Výhodné je také použití léčiva nebo nutričního přípravku obsahujícího glycin, arginin

28.01.99

nebo ornithin a omega-3-polynenasycené mastné kyseliny (PUFA).

Zdroje nukleobáze vhodné pro použití v kombinaci s glycinem jsou tvořeny nebo sestávají z přírodních nukleobází, nukleosidů, nukleotidů, ribonukleové kyseliny (RNA), deoxyribonukleové kyseliny (DNA), jejich ekvivalentů nebo/a směsí obsahujících jednu nebo několik těchto sloučenin.

Přírodní nukleobáze zahrnují puriny adenin a guanin jakož i pyrimidiny cytosin, thymin a uracil. Když zdroj nukleobáze je ve formě volných nukleobází, je výhodný uracil.

Přírodní nukleosidy zahrnují nukleosidy ribosy adenosin, guanosin, uridin a cytidin a nukleosidy deoxyribosy deoxyadenosin, deoxyguanosin, deoxythymidin a deoxycytidin.

Přírodní nukleotidy zahrnují fosfátové estery přírodních nukleosidů, jako monofosfáty adenylátu (AMP), guanylátu (GMP), uridylátu (UMP), citidylátu (CMP), deoxythymidylátu (dTMP), deoxycytidylátu (dCMP) a difosfáty a trifosfáty přírodních nukleosidů jako adenosindifosfát (ADP) a adenosintrifosfát (ATP).

Přednost se dává vyčištěnému zdroji nukleobáze, jako droždí. Mohou však být použity jiné zdroje, jako maso a podobně. Zdrojem nukleobáze je s výhodou RNA.

Předmětem vynálezu jsou tedy léčiva nebo nutriční přípravky obsahující účinná množství:

- (a) glycinu (komponenta (a))
ve spojení s jednou nebo více komponentami zvolenými z
- (b) omega-3-polynenasycených mastných kyselin, popřípadě ve směsi s omega-6-polynenasycenými mastnými kyselinami (komponenta (b)),

28.01.99

- (c) L-argininu nebo jiné fyziologicky přijatelné sloučeniny spojené se syntézou oxidu dusíku nebo jejich směsi (komponenta (c)) a
- (d) zdroje nukleobáze (komponenta (d)).

Dávkování by mělo být takové, aby léčiva nebo nutriční přípravky byly účinné při prevenci nebo/a léčbě nefrotoxicity vyvolané makrolidovými imunosupresivními léky.

Jednotlivá dávka takového léčiva nebo nutričního přípravku obsahuje s výhodou 1,5 až 80 hmotnostních dílů komponenty (a) ve spojení s následujícími množstvími jedné nebo více komponent zvolených z (b) až (d): 0,1 až 20 hmotnostních dílů komponenty (b), 3 až 40 hmotnostních dílů komponenty (c) a 0,1 až 4,0 hmotnostních dílů komponenty (d). Zejména výhodná jednotlivá dávka obsahuje 1,5 až 80 hmotnostních dílů komponenty (a) ve spojení s následujícími množstvími jedné nebo více komponent zvolených z (b) až (d): 2 až 5 hmotnostních dílů komponenty (b), 7,5 až 20 hmotnostních dílů komponenty (c) a 1,7 až 2,0 hmotnostních dílů komponenty (d).

Množství komponent (a) až (d) aplikované denně bude účelně odpovídat 1,5 až 80 g pro komponentu (a), 0,1 až 20 g, s výhodou 2 až 5 g, pro komponentu (b), 3 až 40 g, s výhodou 7,5 až 20 g, pro komponentu (c) a 0,1 až 4,0 g, s výhodou 1,7 až 2,0 g, pro komponentu (d).

Pokud se týká komponenty (d), shora uvedené dávkování je uvedeno pro RNA, DNA, nukleosidy nebo nukleotidy. Pro nukleobáze je jedna hmotnostní jednotka nukleobází považována za ekvivalentní 2,5 až 3,0 hmotnostním jednotkám RNA, DNA, nukleosidů nebo nukleotidů.

Kde je glycin v léčivech nebo nutričních přípravcích použit v kombinaci s jednou nebo více shora uvedenými komponentami (b), (c) a (d), budou tato léčiva nebo nutriční pří-

28.01.99

ravky obsahovat účelně v jednotlivé dávce

- (a) 1,5 až 80 hmotnostních dílů glycinu,
v kombinaci s jednou nebo více sloučeninami
zvolenými ze skupiny sestávající z
- (b) 2 až 5 hmotnostních dílů omega-3-polynenasyce-
ných mastných kyselin,
- (c) 7,5 až 20 hmotnostních dílů L-argininu,
L-ornithinu nebo glycerolu nebo jejich směsí a
- (d) 1,7 až 2,0 hmotnostních dílů RNA.

Výhodná léčiva nebo nutriční přípravky obsahují v jed-
notlivé dávce:

- (a) 1,5 až 80 hmotnostních dílů glycinu ve spojení s
- (c) 3 až 40 hmotnostními díly, s výhodou 7,5 až 20
hmotnostními díly, argininu nebo ekvivalentního
množství jedné nebo více jiných fyziologicky při-
jatelných sloučenin spojených se syntézou polyami-
nů nebo ekvivalentního množství směsi argininu
s takovou sloučeninou.

Výhodněji obsahují léčiva nebo nutriční přípravky podle
vynálezu komponentu (a) v kombinaci s komponentou (c) v hmot-
nostním poměru od 1:2 do 4:1, zejména s výhodou v hmotnostním
poměru od 1:1 do 2:1.

Dále obsahují léčiva nebo nutriční přípravky s výhodou
v jednotlivé dávce:

- (a) 1,5 až 80 hmotnostních dílů glycinu v kombinaci s
- (b) 0,1 až 20 hmotnostními díly, s výhodou 2 až 5
hmotnostními díly, omega-3-polynenasycenými mast-
nými kyselinami a
- (c) 3 až 40 hmotnostními díly, s výhodou 7,5 až 20
hmotnostními díly, argininu nebo s ekvivalentními
množstvím jedné nebo více jiných fyziologicky při-

28.01.99

jatelných sloučenin spojených se syntézou polyaminů nebo s ekvivalentním množstvím směsi argininu s takovou sloučeninou.

Omega-3-polynenasycené mastné kyseliny jsou účelně chráněny proti peroxidaci během skladování přípravku.

Fyziologicky přijatelné cesty ochrany omega-3-polynenasycených mastných kyselin proti peroxidaci během skladování jsou v oboru známy. Zahrnují fyziologicky přijatelnou mikroenkapsulaci omega-3-polynenasycených mastných kyselin a použití fyziologicky přijatelných antioxidantů v množstvích dostatečných k ochraně mastných kyselin.

Typickým příkladem vhodným k použití jako fyziologicky přijatelné mikroenkapsulační činidlo je škrob. Mikroenkapsulace může být provedena o sobě známým způsobem. Mikro kapsle mohou být povlečeny o sobě známým způsobem fyziologicky přijatelnými obalovými prostředky, jako je arabská guma.

Jako typické příklady antioxidantů vhodných k ochraně mastných kyselin proti peroxidaci je možno uvést antioxidační vitamíny, jako vitamin C, vitamin E nebo jejich směsi.

Množství přidaného antioxidantu by mělo dostačovat k zabránění peroxidaci omega-3-polynenasycených mastných kyselin. Tato množství mohou být snadno vypočtena. Obecně budou jakékoliv antioxidanty pro zjednodušení použity v přebytku. Je třeba vzít v úvahu, že přítomnost jakéhokoliv jiného prostředku aplikovaného v kombinaci s omega-3-polynenasycenými mastnými kyselinami může vyžadovat přizpůsobení množství použitého antioxidantu.

Omega-3-polynenasycené mastné kyseliny mohou být použity ve formě vhodné pro fyziologické dodání omega-3-polynenasycených mastných kyselin, např. ve formě volné kyseliny, ve

28.01.99

formě triglyceridu nebo ve formě fyziologicky přijatelných přírodních zdrojů omega-3-polynenasycených mastných kyselin. Tyto přírodní zdroje zahrnují lněný olej a rybí oleje jako menhadenový olej, lososí olej, makrelový olej, olej z tuňáka, tuk z tresčích jater a olej ze sardelí. Tyto přírodní zdroje, zejména rybí oleje, obsahují značná množství omega-3-mastných kyselin. Pokud se používají omega-3-polynenasycené mastné kyseliny v triglyceridové formě, tyto triglyceridy mohou zahrnovat estery s jinými fyziologicky přijatelnými mastnými kyselinami. Výhodné omega-3-polynenasycené mastné kyseliny zahrnují eikosapentaenovou kyselinu (EPA) a dokosahexaenovou kyselinu (DHA) ve formě volné kyseliny, v triglyceridové formě nebo ve formě přírodních zdrojů s vysokým obsahem EPA nebo/a DHA.

Je zřejmé, že omega-3-polynenasycené mastné kyseliny mohou být aplikovány ve vyšších množstvích, než jaká jsou shora uvedena, a že tato vyšší množství obvykle nezhorší požadovaný účinek nebo nevyvolá nežádoucí vedlejší účinky.

K sloučeninám zvláště vhodným pro použití jako komponenta (c) v přípravku podle vynálezu patří L-arginin, glycerol a L-ornithin, nejvýhodněji L-arginin. Komponenta (c) může být použita ve volné formě, ve formě fyziologicky přijatelné soli, například ve formě soli s kyselinou fosforečnou, s citronovou kyselinou, s vinnou kyselinou, s fumarovou kyselinou, s adipovou kyselinou nebo s mléčnou kyselinou, nebo ve formě malého peptidu. S výhodou se používá L-arginin ve volné formě.

Výraz malé peptidy, jak je zde používán, se týká peptidů obsahujících 2 až 6, s výhodou 2 až 4 aminokyseliny.

Jak již bylo uvedeno, budou omega-3-polynenasycené mastné kyseliny účelně aplikovány ve formě rybích olejů, chráněných nebo ne proti peroxidaci. Takové rybí oleje obsahují ta-

28.01.99

ké omega-6-polynenasycené mastné kyseliny.

Omega-6-polynenasycené mastné kyseliny mají také příznivý účinek na imunitní odpověď a na odolnost vůči infekci po operaci. Výživy podle vynálezu budou proto účelně dále obsahovat omega-6-polynenasycené mastné kyseliny.

Pro účely vynálezu budou omega-6-polynenasycené mastné kyseliny ve formě volné kyseliny nebo ve formě vhodné pro fyziologické dodání omega-6-polynenasycených mastných kyselin, např. v triglyceridové formě. Jako příklady omega-6-polynenasycených mastných kyselin zejména vhodných pro použití podle vynálezu, je možno jmenovat linoleovou kyselinu a arachidonovou kyselinu, přičemž linoleová kyselina je nejvýhodnější. Příklady vhodných zdrojů omega-6-polynenasycených mastných kyselin jsou v oboru známé. Patří k nim rybí oleje a rostlinné oleje. Jako příklady zdrojů omega-6-polynenasycených mastných kyselin s vysokým obsahem linoleové kyseliny je možno uvést saflorový olej, slunečnicový olej, sojový olej, bavlníkový olej a kukuřičný olej.

Aplikace denního množství omega-6-polynenasycených mastných kyselin v rozsahu od 1,5 do 5,0 g obvykle postačí k dosažení příznivého účinku. Jednotlivá dávka léčiva nebo nutričního přípravku definovaného shora může tedy dále obsahovat 1,5 až 5 hmotnostních dílů omega-6-polynenasycených mastných kyselin.

Kromě komponent (b), (c) a (d) a omega-6-polynenasycených mastných kyselin mohou být k výživám podle vynálezu přidány další komponenty, které mohou mít příznivý účinek na aktivitu glycinu. Jako příklad takových příznivých komponent je možno uvést omega-9-polynenasycené mastné kyseliny. Výhodným přírodním zdrojem pro takové směsi mastných kyselin jsou rybí oleje. Vzhledem k jejich chuti a jiným důvodům budou rybí oleje v orálních aplikačních formách použity s výhodou v en-

28.01.99

kapsulované formě.

V případě, že nutriční přípravek je určen pro použití jako doplněk výživy, množství jím dodané energie by nemělo být příliš velké, aby se zbytečně nepotlačila pacientova chuť k jídlu. Doplněk by měl účelně obsahovat zdroje energie v množství dodávajícím 628 až 4186,8 KJ/den, s výhodou 1046,7 až 2093,4 KJ/den. Příspěvek zdroje dusíku, zdroje sacharidů a zdroje lipidů k celkové denní kalorické potřebě se pohybuje v širokých mezích. Pro použití jako doplněk může být aplikace v práškové nebo kapalně formě.

Doba léčby bude souhlasit s léčbou imunosupresivním lékem.

Doplněk výživy bude účelně aplikován ve formě jednotlivých dávek vhodných pro aplikaci doplňku 1 až 4 krát za den. Pokud nutriční přípravky obsahují zdroje energie, je vhodné nedodávat více než 4186,8 KJ/den. Kromě tohoto vymezení pokud se jedná o přívod energie mohou a budou nutriční přípravky pro prevenci nebo/a léčbu nefrotoxicity vyvolané makrolidovými imunosupresivními léčivy účelně dodány ve formě kompletní výživy nebo doplňků výživy, jak shora popsáno.

Typické farmakologicky přijatelné formy přípravků (léčiv) pro orální aplikaci budou dále obsahovat farmakologicky přijatelná ředidla, nosiče, vitaminy, koření, pigmenty nebo/a jiné přísady, o nichž je odborníkovi dobře známo, že jsou vhodné pro inkorporaci do takového přípravku a popřípadě makrolidového imunosupresivního léčiva.

Výživy a přípravky podle vynálezu se mohou získat o sobě známým způsobem, například smísením ingrediencí.

28.01.99

Příklady provedení vynálezu

Vynález je dále ilustrován následujícími příklady, jejichž účelem však není jakkoliv omezovat rozsah nárokovaného vynálezu.

Příklad 1

Zvíře a výživy

Samci krys Sprague - Dawkey (Sasco) o hmotnosti přibližně 200 g byli po dobu 3 dnů před zahájením léčby cyklosporinem A krmeni syntetickou práškovou výživou obsahující 5 % glycinu a 15 % kaseinu (glycinu) nebo 20 % kaseinu (kontrola). Komponenty práškové výživy jsou uvedeny v tabulce 1. Všem zvířatům byla poskytnuta lidská péče ve shodě s institucionálními směrnici. Po období předběžného krmení byl denně podáván přibližně po dobu 4 týdnů žaludeční sondou cyklosporin A (25 mg/kg rozpuštěný jako 2,5 mg/ml v olivovém oleji) nebo vehikulum. Byly studovány čtyři skupiny po 6 až 8 krysách (kontrola, glycin, cyklosporin + kontrola, cyklosporin + glycin). Denně byla zjišťována u zvířat hmotnost a strávení výživy.

Tabulka 1

Složení kontrolní a glycinové výživy
%

Komponenta	Kontrola	Glycin
Kasein	20,0	15,0
Glycin	0,0	5,0
Sacharosa	50,0	50,0
Kukuřičný olej	5,0	5,0
Celulosa	5,0	5,0

28.01.99

Směs minerálů	3,5	3,5
Směs vitaminů	1,0	1,0
DL-methionin	0,3	0,3
Bitartrát cholinu	0,2	0,2
Kukuřičný škrob	15,0	15,0

Rychlost glomerulární filtrace a klinická chemie

Zvířata byla umístěna na 48 až 72 hodin před uhubením do metabolických klíček, byly odebrány vzorky moči za 24 hodin a z ocasní žíly bylo odebráno 0,5 ml krve pro změření kreatininu v krvi. V den uhubení byl odebrán další 1 ml krve z vena cava a nahrazen stejným objemem Ringersova laktátového roztoku. Močovina (Coulombe, J.J. a L. Favreau. 1963. A new simple semimicro method for colorimetric determination of urea. Clin. Chem. 9:102-108) a kreatinin v séru (Heinegard, D. a G.Tiderstrom. Determination of serum creatinin by a direct colorimetric method. Clin. Chim. Acta. 43: 305-310) jakož i kreatinin v moči byly změřeny za použití Sigma souprav, kdežto alkalická fosfatáza v séru byla změřena enzymaticky (vzorky krve byly odebrány asi po 4 týdnech léčby cyklosporinem A). Rychlost glomerulární filtrace byla vypočtena z poměru kreatininu v moč/krev (Laiken, N.D. a D.D. Fanestil. 1985. Filtration and Blood Flow. In Physiological basis of medical practice. J.B. West and Wilkins, Baltimore/London, 461-471), vzorky moči byly odebrány asi po 4 týdnech léčby cyklosporinem A.

Histologie

V den uhubení byla zvířata anestetizována pentobarbitolem (50 mg/1g), břišní dutina byla otevřena a aorta byla kanylována i.v. kanylou French 24 s koncem blízko odstupu ledviných tepen. Na aortu byla naložena svorka a zašila se pod odstupem ledvinných tepen a levá ledvina se propláchla 5 ml normálního fyziologického roztoku a následovně byla fixována

28.01.99

perfuzí 4% roztokem paraformaldehydu ve fyziologickém roztoku pufrovaném fosfátem. Ledvina byla vyjmuta, rozkrájena na 0,5 tlusté plátky a umístěna do 10% formalinu. Plátky se obarvily hematoxylin-eosinem a analyzovaly se mikroskopicky. Dilatované kanálky se spočítaly v 5 různých snímcích s malým zvětšením (100 x), spočítaly se nekrotické buňky a infiltrující makrofágy v 5 různých kanálcích při vysokém zvětšení (400 x) a vypočetly se průměry $\pm$ standardní chyba měření.

Kvantifikace neutrofilů

Druhý den po uhubení se připravily krevní nátěry ze vzorků duté žíly a obarvily se s barvivem Wright Giemsa. Pro 200 bílých krvinek byly provedeny při vysokém zvětšení (400 x) diferenciální odečty bílých krvinek a vypočetla se procenta.

Statistika

Pro všechny statistické přehledy byla použita jednocestná analýza rozptylu a Boferonniho test post-hoc. Bylo zvoleno $p < 0,05$ před studií k označení významnosti.

Výsledky

Klinická chemie a rychlost glomerulační filtrace

Je známo, že cyklosporin A zvyšuje močovinu v séru. Opravdu se v této studii močovina zvýšila přes 70 % (Tabulka 2). Zatímco glycin má tendenci minimalizovat toto zvýšení, účinek nebyl statisticky významný. Cyklosporin A také zvýšil alkalickou fosfatázu (tabulka 2) a glycin měl sklon k zamezení zvýšení. Kreatinin v séru měl hodnotu v rozmezí od 0,4 do 0,6 mg/dl v kontrolní skupině a v glycinem upravené skupině (obr. 1), ale byl významně dvojnásobně zvýšen cyklosporinem A. Tomuto zvýšení se úplně zabránilo glycinovou výživou. Hod-

28.01.99

noty jsou střední $\pm$ standardní chyba měření ($P < 0,01$ analýzou rozptylu, $n=5-6$ v každé skupině). $a, p < 0,05$ ve srovnání s kontrolou, $b, p < 0,05$ ve srovnání se skupinou s cyklosporinem A.

Je též známo, že cyklosporin A zmenšuje rychlost glomerulární filtrace. Při této studii činily ve skupině s cyklosporinem A hodnoty 30 % hodnot v kontrolní skupině nebo ve skupině se samotným glycinem (obr. 2). Toto snížení rychlosti glomerulární filtrace bylo také zcela zamezeno glycinem ve výživě. Výživa obsahující 1 % celkového kalorického obsahu jako glycin již byla dostatečná k tomu, aby se dosáhlo tohoto účinku (výsledky nejsou znázorněny). Hodnoty jsou střední $\pm$ standardní odchylka měření. ($P < 0,01$ analýzou rozptylu, $n=5-6$ v každé skupině). $a, p < 0,05$ ve srovnání s kontrolou, $b, p < 0,05$ ve srovnání se skupinou s cyklosporinem A. Byly také pozorovány významné změny v objemu moči (kontrola, $9,1 \pm 1,6$ ml/24h, glycin, $6,7 \pm 0,8$, cyklosporin A, $14,4 \pm 2,3$, glycin + cyklosporin A, $11,8 \pm 2,1$).

Tabulka 2

Účinky cyklosporinu A a glycinové výživy na močovinu v séru a hladiny alkalické fosfatázy

	Močovina (mg/dl)	Alkalická fosfa- táza (j./l)
Kontrola	$21,8 \pm 1,8$	$46,5 \pm 4,4$
Glycin	$20,6 \pm 2,4$	$33,1 \pm 5,6$
Cyklosporin A (CsA)	$34,9 \pm 3,7^a$	$65,9 \pm 12,6$
Cyklosporin A + glycin	$31,2 \pm 0,6^a$	$47,7 \pm 8,8$

Hodnoty jsou průměrné $\pm$ standardní chyba měření, $a, p < 0,05$ ve srovnání s kontrolami analýzou rozptylu a Student-Newman-Keulsovým testem ($n=5-6$ v každé skupině).

28.01.99

Histologie a bílé krvinky

Je zřejmé, že cyklosporin A způsobuje bobtnání a nekrózu proximálních kanálek spojené s infiltrací bílých krvinek, jak bylo dříve uvedeno. Těmto jevům bylo zcela zabráněno výživou obsahující glycin. V průměru bylo cyklosporinem A (CsA) značně zvýšeno proximální bobtnání a nekróza buněk, jakož i infiltrace makrofágů (obrázky 3,4). Byly spočítány po sklíčku proximální dilatované kanálky (panel A z obr. 3) ve třech různých polích při nízkém zvětšení (zvětšení 100 x) a byl vypočítán průměr $\pm$ standardní chyba měření. Na pěti různých kanálkách byly při vysokém zvětšení (400 x) spočítány nekrotické buňky (panel B z obr. 3) (průměr $\pm$ standardní chyba měření $*p < 0,05$ analýzou rozptylu). V obr. 4 byly spočítány po sklíčko při vysokém zvětšení (400 x) v řezech obarvených hematoxylinem-eosinem makrofágy kolem 5 různých kanálek a byly vypočteny průměry $\pm$ standardní chyba měření ($*p < 0,05$ analýzou rozptylu).

Dále došlo téměř k 3-násobnému zvýšení počtu neutrofilů v krevních nátěrech z krys léčených cyklosporinem A (obr. 5). Krevní nátěry byly obarveny Wright Giemsovým barvivem a byly provedeny diferenciální odečty buněk ($*p < 0,05$ analýzou rozptylu).

Příklad 2

Enterální prostředky

V následujících prostředcích znamená MM "směs minerálů", SM "směs stopových prvků" a VM "směs vitaminů". Obsah těchto tří směsí je následující:

28.01.99

MM

Ingredience g/100 g

Maltodextriny	34,40
Citrát/fosfát draselný	34,60
Dicitrát hořečnatý	8,20
Chlorid vápenatý	8,00
Citrát/chlorid sodný	9,00
Kyselina citronová	3,50
Vinan cholinu	2,30

SM

Ingredience g/100 g

Maltodextriny	47,79
Droždí s molybdenem	18,00
Droždí s chromem	9,20
Síran zinečnatý	7,00
Droždí se selenem	7,00
Síran železnatý	6,92
Glukonát měďnatý	2,24
Síran manganatý	1,12
Fluorid sodný	0,70
Jodid draselný	0,03

28.01.99

VM

Ingredience	g/100 g
Maltodextriny	43,44
Askorbát sodný	35,00
Vitamin E-ac.50%	16,00
Niacinamid	1,55
Vitamin A-acetát	1,20
Ca-D-panthotenát	0,98
Vitamin K ₁ 1%	0,71
Vitamin B ₁₂ 0,1%	0,30
Vitamin D ₃	0,28
Vitamin B ₆	0,20
Vitamin B ₁	0,17
Vitamin B ₂	0,15
Kyselina listová	0,02
Biotin	0,01

Prostředek I obsahující glycin

Ingredience	g/100 g
Voda	77,40
Maltodextriny	12,28
Kaseináty Na/Ca	4,60
Glycin	3,00
Lipidy:	
Palmový olej	2,33
Slunečnicový olej	0,26
Emulgátor Nathin E	<u>0,13</u>
	100,00

28.01.99

Prostředek II obsahující glycin

Ingredience g/100 g

Voda	77,40
Maltodextriny	10,10
Kaseináty Na/Ca	4,60
Glycin	3,00
MM	2,00
SM	0,05
VM	0,10
beta-karoten	0,03
Lipidy:	
Palmový olej	2,33
Slunečnicový olej	0,26
Emulgátor Nathin E	0,13
	100,00

Prostředek obsahující glycin a arginin

Ingredience g/100 g

Voda	77,40
Maltodextriny	8,93
Kaseináty Na/Ca	4,60
Glycin	3,00
Arginin	1,17
MM	2,00
SM	0,05
VM	0,10
beta-karoten	0,03
Lipidy:	
Palmový olej	2,36
Slunečnicový olej	0,23
Emulgátor Nathin E	<u>0,13</u>
	100,00

28.01.99

Prostředek obsahující glycin a rybí olej (omega-3-mastné kyseliny)

Ingredience g/100 g

Voda	77,40
Maltodextriny	10,10
Kaseináty Na/Ca	4,60
Glycin	3,00
MM	2,00
SM	0,05
VM	0,10
beta-karoten	0,03
Lipidy:	
Palmový olej	1,32
Slunečnicový olej	0,23
Emulgátor Nathin E	0,13
Rybí olej EPAX 3000 TG	<u>1,04</u>
	100,00

Prostředek obsahující glycin a ribonukleovou kyselinu (RNA)

Ingredience g/100 g

Voda	77,40
Maltodextriny	9,96
Kaseináty Na/Ca	4,60
Glycin	3,00
RNA z droždového extraktu	0,14
MM	2,00
SM	0,05
VM	0,10
beta-karoten	0,03
Lipidy:	
Palmový olej	2,33
Slunečnicový olej	0,26
Emulgátor Nathin E	<u>0,13</u>
	100,00

28.01.99

Prostředek obsahující glycin, arginin a rybí olej (omega-3-mastné kyseliny)

<u>Ingredience</u>	<u>g/100 g</u>
Voda	77,40
Maltodextriny	8,93
Kaseináty Na/Ca	4,60
Glycin	3,00
Arginin	1,17
MM	2,00
SM	0,05
VM	0,10
beta-karoten	0,03
Lipidy:	
Palmový olej	1,32
Slunečnicový olej	0,23
Emulgátor Nathin E	0,13
Rybí olej EPAX 3000 TG	<u>1,04</u>
	100,00

Prostředek obsahující glycin, arginin a RNA

<u>Ingredience</u>	<u>g/100 g</u>
Voda	77,40
Maltodextriny	8,79
Kaseináty Na/Ca	4,60
Glycin	3,00
Arginin	1,17
RNA z droždového extraktu	0,14
MM	2,00
SM	0,05
VM	0,10
beta-karoten	0,03
Lipidy:	
Palmový olej	2,33
Slunečnicový olej	0,26
Emulgátor Nathin E	<u>0,13</u>
	100,00

28.01.99

Prostředek obsahující glycin, RNA a rybí olej (omega-3-mastné kyseliny)

<u>Ingredience</u>	<u>g/100 g</u>
Voda	77,40
Maltodextriny	9,96
Kaseináty Na/Ca	4,60
Glycin	3,00
RNA z droždového extraktu	0,14
MM	2,00
SM	0,05
VM	0,10
beta-karoten	0,03
Lipidy:	
Palmový olej	1,32
Slunečnicový olej	0,23
Emulgátor Nathin E	0,13
Rybí olej EOAX 3000 TG	<u>1,04</u>
	100,00

28.01.99

Prostředek obsahující glycin, arginin, RNA a rybí olej
(omega-3-mastné kyseliny)

Ingredience	g/100 g
Voda	77,40
Maltodextriny	8,79
Kaseináty Na/Ca	4,60
Glycin	3,00
Arginin	1,17
RNA z droždového extraktu	0,14
MM	2,00
SM	0,05
VM	0,10
beta-karoten	0,03
Lipidy:	
Palmový olej	1,32
Slunečnicový olej	0,23
Emulgátor Nathin E	0,13
Rybí olej EOAX 3000 TG	<u>1,04</u>
	100,00

Jak již bylo shora uvedeno, je olej přírodním zdrojem omega-3-polynenasycených mastných kyselin, zatímco slunečnicový olej je přírodním zdrojem omega-6-polynenasycených mastných kyselin.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Použití glycinu pro přípravu léčiva nebo nutričního přípravku k profylaxi nebo/a terapii renální dysfunkce vyvolané cyklosporiny nebo askomyciny.

2. Použití podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že léčivo nebo nutriční přípravek obsahuje dále komponentu (c) sestávající z L-argininu nebo jiné fyziologicky přijatelné sloučeniny spojené, se syntézou oxidu dusíku, nebo z jejich směsí.

3. Použití podle nároků 1 nebo 2, v y z n a č u j í c í s e t í m , že nutriční přípravek je doplněk výživy.

4. Použití podle nároků 3, v y z n a č u j í c í s e t í m , že doplněk výživy sestává hlavně z glycinu a zdroje sacharidu.

5. Použití podle nároků 4, v y z n a č u j í c í s e t í m , že doplněk výživy obsahuje dále zdroj proteinu.

6. Použití podle nároků 1 nebo 2, v y z n a č u j í c í s e t í m , že nutriční přípravek je kompletně sestavená výživa.

7. Použití podle nároků 1 nebo 2, v y z n a č u j í c í s e t í m , že léčivo dále obsahuje cyklosporin nebo askomycin.

8. Léčivo nebo nutriční přípravek, v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje terapeuticky účinné množství cyklosporinu nebo askomycinu v kombinaci s glycinem v množství účinném pro inhibici nebo/a zlepšení renální dysfunkce vyvolané uvedeným cyklosporinem nebo askomycinem,

28.01.99

přičemž glycin a popřípadě L-arginin nebo L-ornithin jsou jediné volné aminokyseliny v uvedeném léčivu nebo nutričním přípravku.

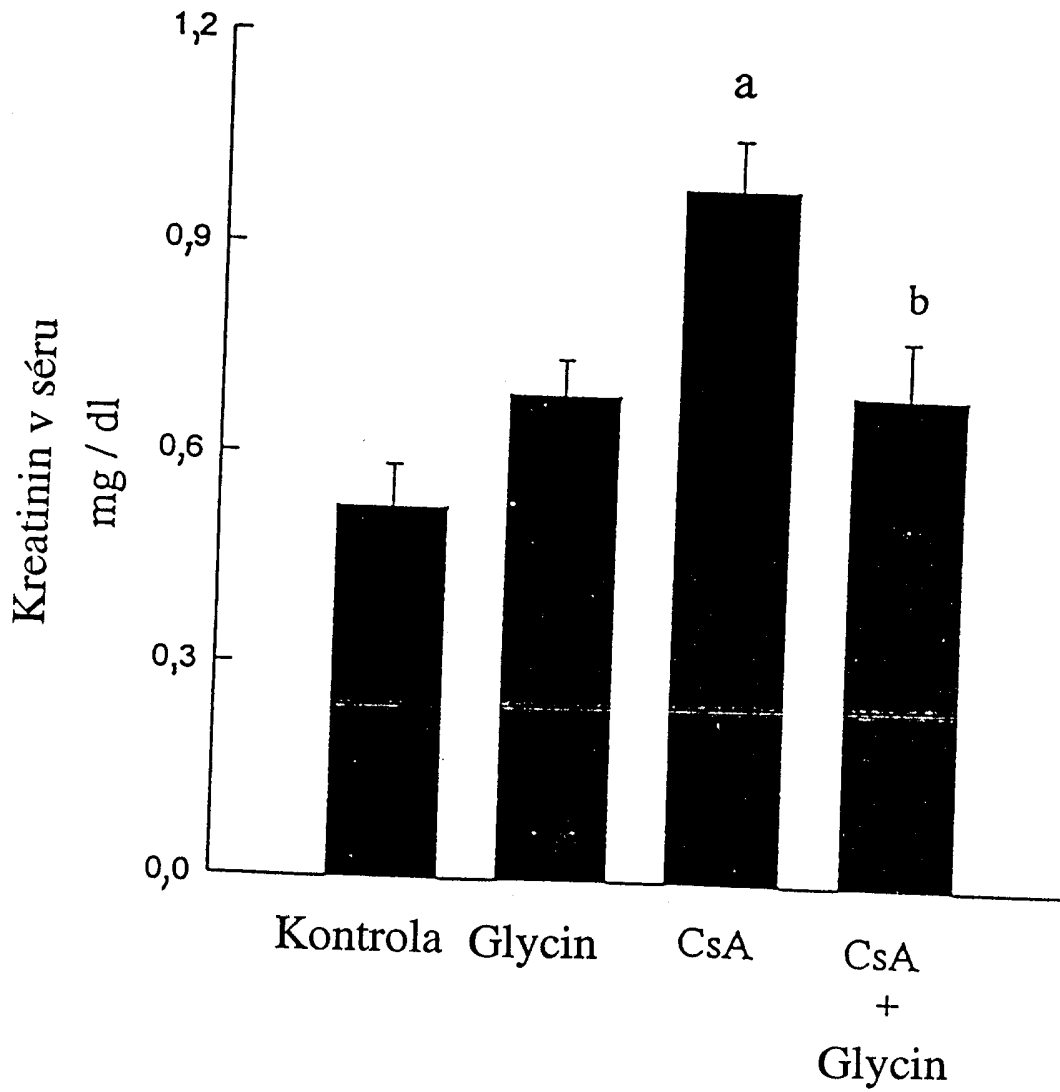
9. Způsob profylaktické nebo a terapeutické léčby renální dysfunkce vyvolané cyklosporiny nebo askomyciny, v y z n a č u j í c í s e t í m ž e se člověku nebo jinému savci aplikuje před, současně s nebo po léčbě cyklosporinem léčivo nebo nutriční přípravek obsahující glycin v množství účinném pro inhibici nebo/a zlepšení renální dysfunkce.

10. Léčivo nebo nutriční přípravek, v y z n a č u j í - s e t í m , ž e obsahuje glycin pro profylaxi nebo/a terapii renální dysfunkce vyvolané cyklosporiny nebo askomyciny.

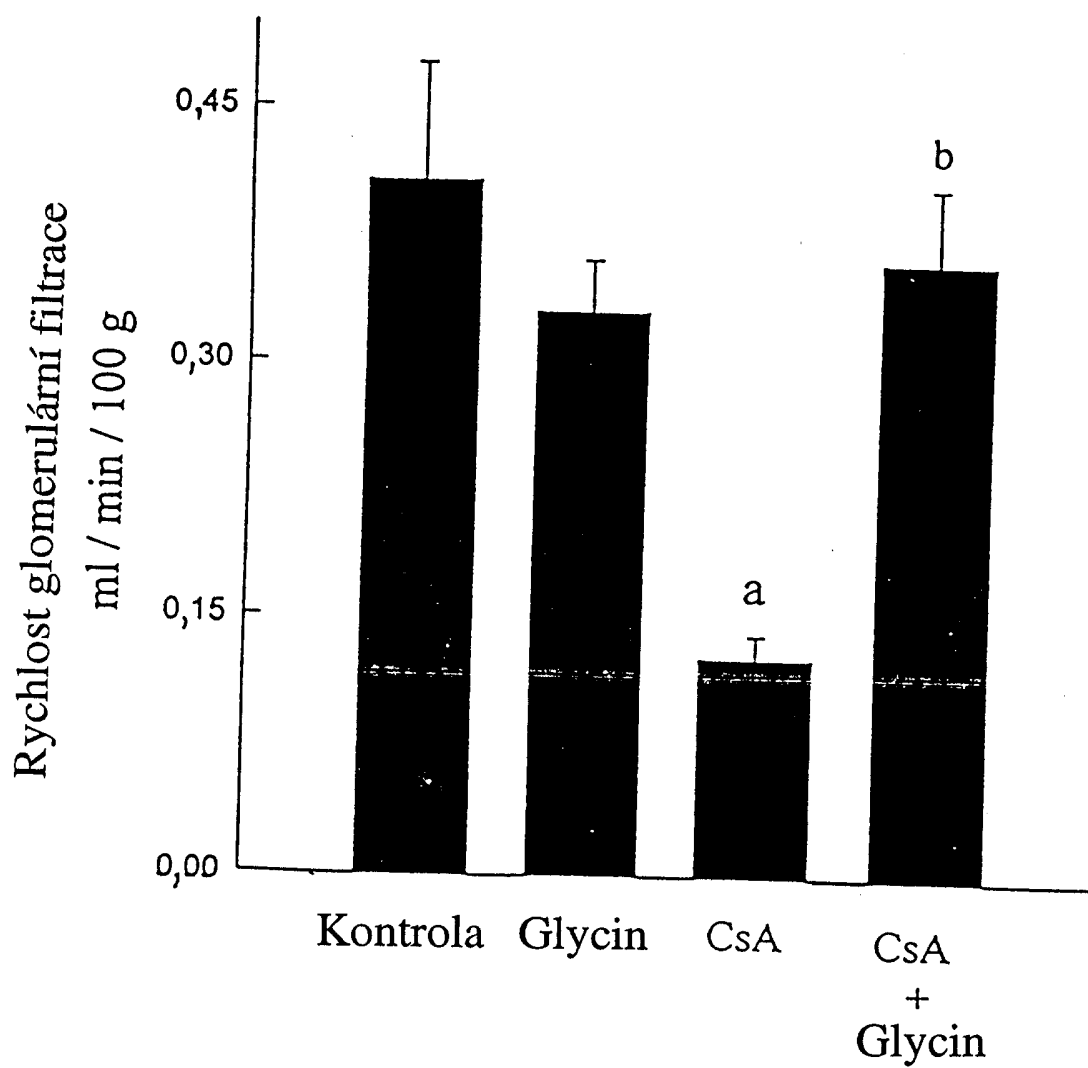
Zastupuje

1/5

Obr. 1

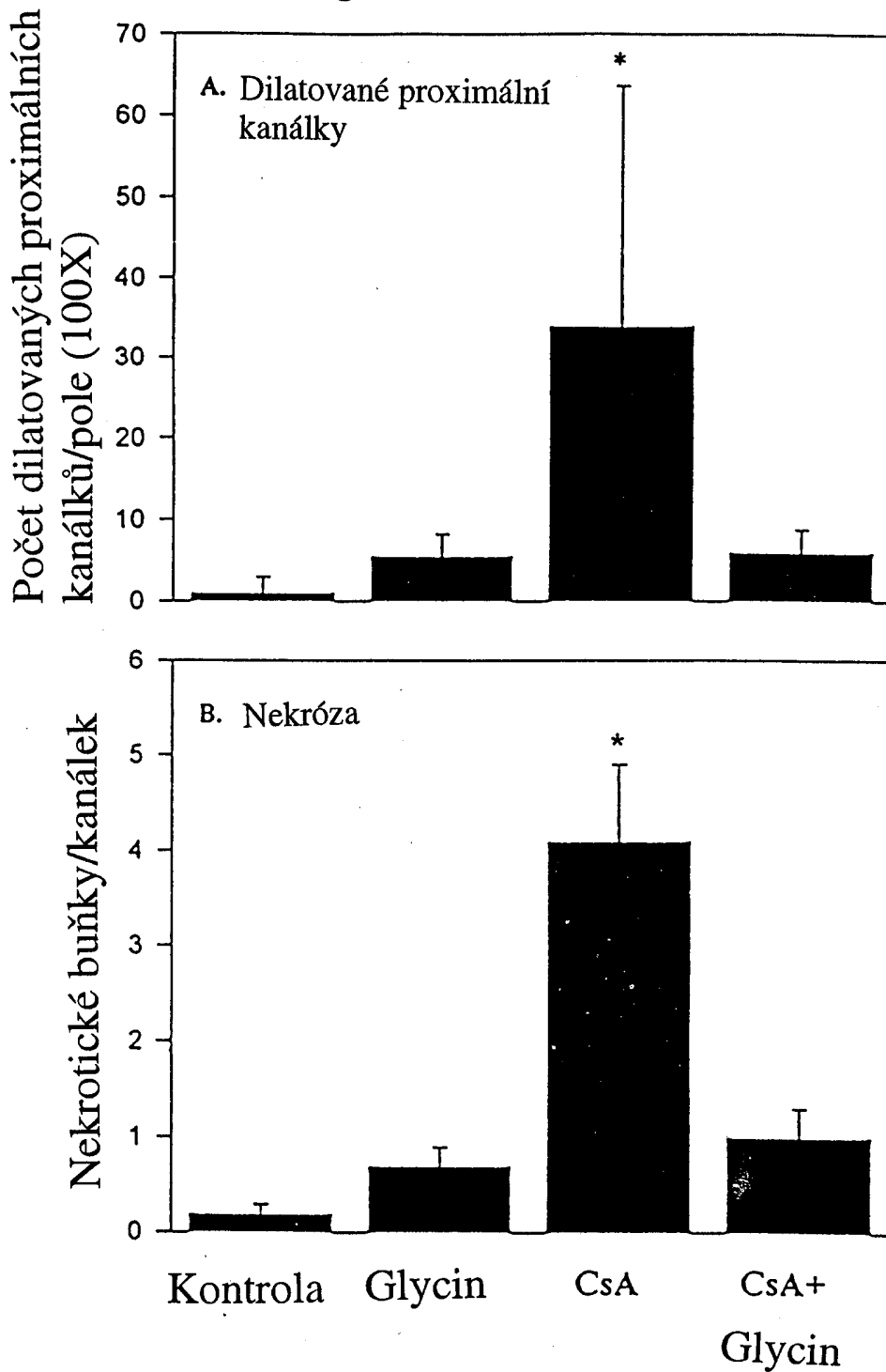


Obr. 2



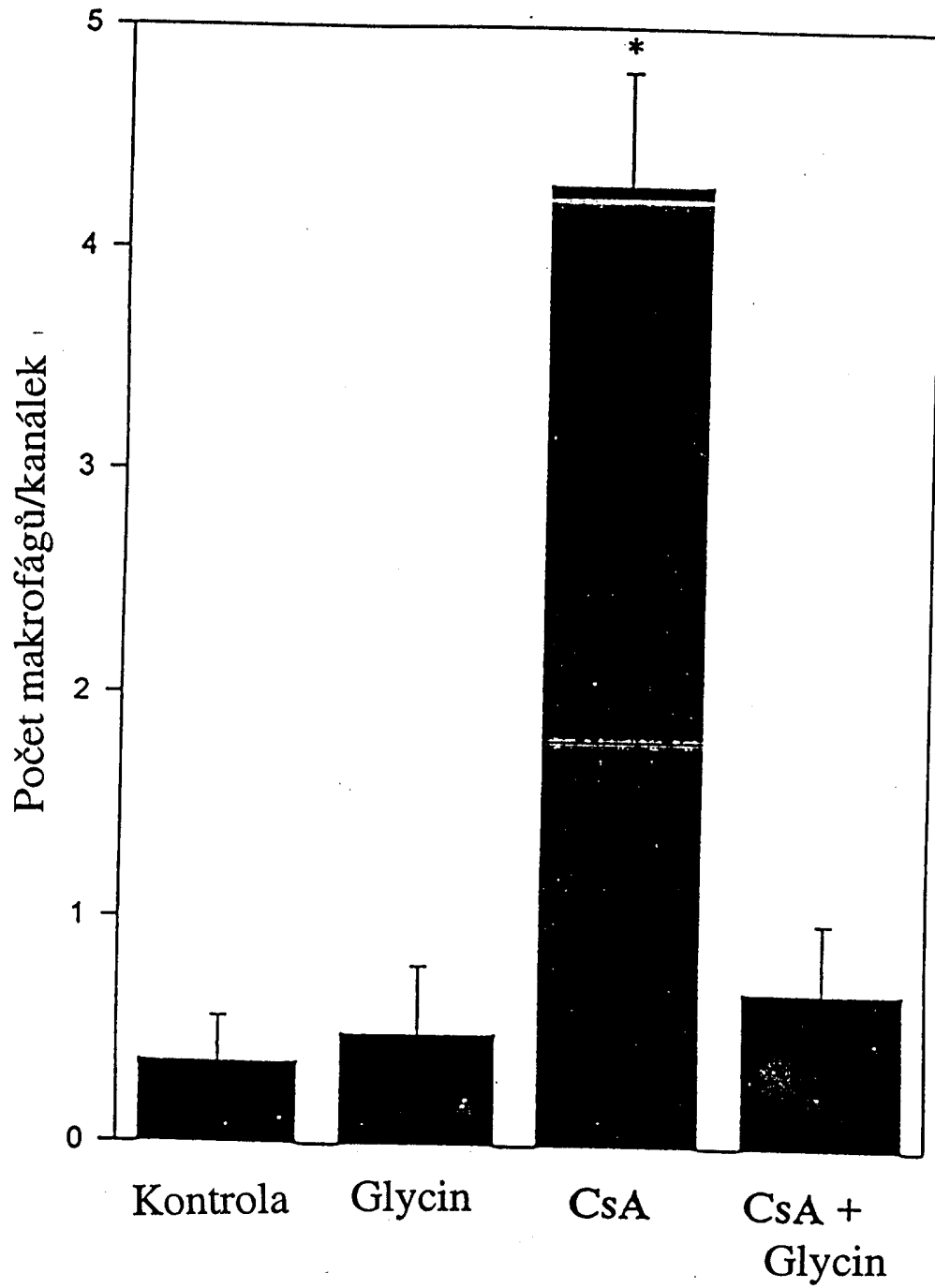
Obr. 3

Patologie proximálních kanálků



Obr. 4

Makrofágy



5/5

Obr. 5

Neutrofilly

