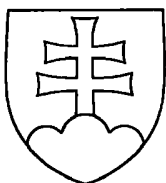


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU

- (22) Dátum podania prihlášky: **29. 7. 1999**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **RM98A000516**
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **3. 8. 1998**
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **IT**
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **6. 8. 2001**
Vestník ÚPV SR č.: **08/2001**
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky.
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **PCT/IT99/00251**
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **WO00/07581**

(11), (21) Číslo dokumentu

125-2001

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.7 :

A61K 31/22,
A61K 35/78
/(A61K 31:01,
A61K 31:05,
A61K 31:22)

(71) Prihlasovateľ: **SIGMA-TAU HEALTHSCIENCE S. P. A., Pomezia, IT;**

(72) Pôvodca: **Cavazza Claudio, Roma, IT;**

(74) Zástupca: **PATENTSERVIS BRATISLAVA, a. s., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Antioxidačná, antiproliferačná kompozícia obsahujúca karnitín a karotenoid**

(57) Anotácia:

Opísaná je kompozícia, ktorá zahrnuje ako vyznačujúce sa aktívne zložky propionyl-L-karnitín a aspoň jeden karotenoid, typicky lykopén extrahovaný z paradajky na prevenciu a/alebo terapeutickú liečbu rôznych zmien a patologických stavov vyvolaných voľnými radikálmi a lipoperoxidačným fenoménom, a môže mať formu diétného doplnku, dietetickej podpornej látky alebo vlastného lieku.

SK 125-2001 A3

Antioxidačná, antiproliferačná kompozícia obsahujúca karnitín a karotenoid

Oblasť techniky

Tento vynález sa týka kompozície na prevenciu a / alebo liečbu ochorení spôsobených prítomnosťou voľných radikálov v dôsledku znečistenia životného prostredia a lipoperoxidačného fenoménu aterosklerotického, vaskulárneho, kardiotického alebo cerebrálneho druhu; proliferčných zmien tkanív zahrňujúcich tkanivá prostaty, maternice, prsníkov a hrubého čreva; zmien zraku a sietnice zahrňujúcich sivý zákal a škvrnitú degeneráciu sietnice.

Doterajší stav techniky

Podľa toho kompozícia môže mať formu a pôsobiť ako diétny doplnok alebo ako vlastný liek, v závislosti na podpornom alebo preventívnom účinku, alebo mať striktné terapeutické pôsobenie, pričom pôsobenie kompozície je zamerané vo vzťahu ku konkrétnym pacientom, pre ktorých je použitá.

Konkrétnejšie sa tento vynález týka kompozície, ktorá môže byť podávaná orálne, parenterálne, rektálne, transdermálne alebo nakvapkaním do očí, a ktorá v kombinácii zahrňuje:

- a) propionyl-L-karnitín alebo jeho farmakologicky prijateľnú soľ, podľa možnosti v kombinácii s ďalším „karnitínom“, pričom pojem „karnitín“ znamená L-karnitín alebo alkanoyl-L-karnitín vybraný zo skupiny zahrňujúcej acetyl-L-karnitín, valeryl-L-karnitín a izovaleryl-L-karnitín alebo ich farmakologicky prijateľné soli; a
- b) karotenoid, prednostne vybraný zo skupiny zahrňujúcej lykopén, α -karotén, β -karotén, zeaxantín, kryptoxantín, luteín alebo ich zmesi alebo extrakty prírodných rastlinných produktov obsahujúcich napríklad také karotenoidy, ako sú typicky paradajkové extrakty (*Lycopersion esculentum*).

Karotenoidy sú skupina rastlinných pigmentov s dlhým reťazcom terpénovej povahy (tetraterpény) obsahujúca do 40 atómov uhlíka s konjugovaným systémom dvojitých väzieb. Karotenoidy sú prítomné vo vyšších rastlinách, v chloroplastoch a v tých plastidoch, ktoré sa nachádzajú v častiach rastliny, kde nie je prítomný chlorofyl (niektoré korene a veľký počet kvetov a ovocia, ako sú napríklad paradajky, v ktorých sa zvyšujú pri dozrievaní); tiež boli zistené v modrých riasach,

v niektorých fotosyntéznych baktériách a v niektorých hubách. Karotenoidy zohrávajú pri fotosyntéze doplnkovú úlohu k chlorofylu absorbovaním svetelných lúčov a prenášaním energie k samotnému chlorofylu.

Hoci v rastlinnom svete sa nachádza viac než šesťsto karotenoidov, iba štyridsať z nich je prítomných v ľudskej strave a iba štrnásť je absorbovaných v črevách, zvyšok tvoria neabsorbovatelné epoxidy. Najznámejšími z týchto štrnástich sú lykopén, α -karotén, β -karotén, luteín, zeaxantín a β -kryptoxantíny.

V lykopéne je jedenásť lineárne konjugovaných dvojitych väzieb (pričom v β -karoténe ich je deväť) a je karotenoidom s najdlhším reťazcom s lineárne konjugovanými dvojitymi väzbami. Tiež bol nárokován vzťah medzi touto výraznou štruktúrou a jej väčšou schopnosťou ako oxidačného činidla.

Hoci existujú metabolické interakcie medzi lykopénom a β -karoténom, lykopén sa nemôže transformovať na β -karotén, ktorý sa vyznačuje trimetylcyklohexanylovým kruhom na dvoch krajoch uhlíkového reťazca.

Na druhej strane β -karotén je schopný transformovania prostredníctvom redukcie reťazca na trans-retinol a retínovú kyselinu a pôsobiť ako provitamín A.

Tieto zlúčeniny sa vyznačujú podstatnou antioxidačnou kapacitou, ale medzi nimi je lykopén jediným, ktorý má väčšiu schopnosť blokovať singlet kyslíka, ktorá je napríklad dvakrát väčšia než u β -karoténu.

Lykopén je absorbovaný v organizme, najmä v prítomnosti tukov, a nachádza sa vo svojich dvoch izomérnych formách, ako cis- a trans-lykopén, v krvi a tkanivách.

Podobne ako všetky karotenoidy, lykopén nemôže byť syntetizovaný v organizme, ale musí byť prijímaný v strave.

Je veľa potravín obsahujúcich karotenoidy, vrátane papáji, červeného grapefruitu, špenátu, marhúľ, mlieka a vajec, ale predovšetkým sú to paradajky, ktoré obsahujú najväčšie množstvo lykopénu.

Popri svojej podstatnej antioxidačnej schopnosti je záujem o lykopén v dôsledku veľkého počtu epidemiologických štúdií, ktoré ukázali, že pôsobenie karotenoidu s provitamínom A môže vykazovať ochranný účinok u niektorých foriem tumorov bez toho, aby bol transformovaný na retinol. Množstvo perspektívnych a retrospektívnych skúmaní odhalilo inverzný vzťah medzi spotrebou zeleniny a ovocia bohatých na karotén alebo vysokými koncentráciami karoténu v plazme a rizikom tumoru, najmä u tumorov pľúc. Tieto výsledky pokladali karotenoidy iba

za prekursorov vitamínu A. Avšak nedávne klinické testy ukázali, že prijímanie samotného β -karoténu v diéte neposkytuje žiadny prínos pri znížení rizika tumoru v porovnaní s obyvateľstvom, ktorého diéty neobsahujú tento vitamín.

Tie isté negatívne výsledky boli získané v skupinách fajčiarov alebo jednotlivcov s rizikom azbestózy. Dôkladnejšie spracovanie týchto údajov odhalilo, že iné karotenoidy než je β -karotén môžu prispievať k dosiahnutiu ochranného účinku zistenému ďalšími testami.

Čo výrazne charakterizuje lykopén a čo sa pokladá za podklad pre získanie priaznivých biologických účinkov je to, že je schopný vykazovať v organizme svoje možné antioxidačné pôsobenie najvýraznejšie proti singletu kyslíka, ktorý je jedným z najreaktívnejších kyslíkových produktov pri produkcii voľných radikálov. Popri tomto svojom pôsobení proti singletu kyslíka je lykopén tiež mimoriadne aktívny pri chránení buniek a tkanív pred inými reaktívnymi druhmi kyslíka, ako je peroxid vodíka a oxid dusný.

Tieto významné pôsobenia lykopénu, ktoré ho zaraďujú medzi všetky ostatné prírodné antioxidanty možno čiastočne pripočítať k prínosovým, zdravie podporujúcim účinkom, ktoré je schopný lykopén s diétou vykazovať.

V skutočnosti bolo zistené, že pacienti trpiaci myokardiálnym infarktom, ako aj tí, ktorí majú potenciálne riziko v dôsledku vysokých koncentrácií cholesterolu a triglyceridov v krvi, majú veľmi nízke koncentrácie β -karoténu v krvi, a najmä lykopénu, v porovnaní s kontrolnými pacientami. Toto môže byť vo vzťahu s antilipoperoxidačným účinkom vykazovaným lykopénom a tiež to vyplýva z výskumov ukazujúcich, že lykopén je prítomný v LDL a môže zabraňovať ich oxidácii.

Bolo potvrdené, že antilipoperoxidačný účinok lykopénu je tiež výraznejší než účinok β -karoténu a α -karoténu, keď bol meraný na bunkových kultúrach (C3H/10T1/2 bunky), kde zabraňuje ich neoplastickej transformácii. Antiproliferačné pôsobenie lykopénu tiež vysvetľuje jeho schopnosť zabrániť ateroskleróze a aterosklerotickým vaskulárnym ochoreniam, a tiež, v spojení s IGF-inhibujúcim a spojovacím vnútrobunkovým prenosom zvýšenej aktivity, tumorovej bunkovej proliferácii.

Lykopén je najsilnejším z karotenoidov pri inhibovaní spontánneho rozvoja hrudníkových tumorov v potkanov a pri raste leukemických buniek (H1-60

promyelocytická leukémia bunkového radu), ako aj gliómu C-6 buniek *in vitro* u potkanov alebo neoplastových transformáciách vyvolaných chemickými činidlami.

Epidemiologické štúdie ukázali inverznú koreláciu medzi príjmom lykopénu v diéte a rizikom rozvoja tumoru prostaty až tak, že lykopén môže byť identifikovaný ako prostriedky prevencie pri tomto konkrétnom ochorení. To isté platí aj pre riziko hrudníkových a pľúcnych tumorov.

Ďalšie ochorenie, pri ktorom lykopén, podobne ako luteín a zeaxantín, môže vykazovať preventívne pôsobenie, je vekom vznikajúca škvrnitá degenerácia sietnice (AMD).

L-karnitín a jeho alkanoylové deriváty sú dobre známe pre ich dôležitú úlohu pri metabolizme, najmä pri oxidácii a využití mastných kyselín prostredníctvom β -oxidácie.

V skutočnosti L-karnitín, či už prijímaný v diéte alebo syntetizovaný v organizme, je koncentrovaný krvou v orgánoch, ktoré sú metabolicky najaktívnejšie pri využívaní mastných kyselín, ako je kostrové svalstvo a srdce.

Nedostatok L-karnitínu môže podmieniť rôzne myopatie, pričom orálne podávanie L-karnitínu zlepšuje klinický stav takých myopatií. U mitochondriálnej oxidácie glukózy vykonáva L-karnitín tiež dôležitú funkciu pri produkcii energie s výsledkom, že príslušné hladiny L-karnitínu sú potrebné pre normálny energetický metabolizmus v srdci a svaloch.

Jeho podávanie zlepšuje odolnosť proti stresu u pacientov trpiacich koronárnou nedostatočnosťou, ako aj samotný koronárny prietok a klinické účinky srdcovej dekompenzácie.

Ďalšími biologickými vlastnosťami L-karnitínu a jeho derivátov, najmä propionyl-L-karnitínu, je jeho schopnosť stabilizovať bunkové membrány a chrániť ich pred léziami vyvolanými oxidačnými procesmi.

Podstata vynálezu

Prekvapujúco bolo teraz zistené, že kompozícia obsahujúca ako svoje charakterizujúce zložky kombináciu:

- a) propionyl-L-karnitínu alebo jeho farmakologicky prijateľnej soli, a
- b) karotenoidu vybraného zo skupiny zloženej z lykopénu, α -karoténu, β -karoténu, zeaxantínu, kryptoxantínu, luteínu alebo ich zmesí,

je mimoriadne účinná pri prevencii a / alebo liečbe poškodení vyvolaných prítomnosťou voľných radikálov v dôsledku znečistenia životného prostredia a lipoperoxidačného fenoménu aterosklerotickej, vaskulárnej, kardiotickej alebo cerebrálnej povahy; proliferačných anomálií tkanív zahrňujúcich tkanivá prostaty, maternice, prsníkov a hrubého čreva; a zrakových a sietnicových ochorení zahrňujúcich sivý zákal a škvŕnitú degeneráciu sietnice, ako výsledok silného synergického efektu vykazovaného týmito zložkami.

Tiež bolo zistené, že zložka a) môže výhodne ďalej zahrňovať „karnitín“ vybraný zo skupiny zahrňujúcej L-karnitín, acetyl-L-karnitín, valeryl-L-karnitín a izovaleryl-L-karnitín, alebo ich farmakologicky prijateľné soli, alebo ich zmesi, a zložka b) môže byť zložená z extraktu rastlinných produktov obsahujúceho túto zložku, ako je napríklad extrakt z paradajky (*Lycopersicon esculentum*, rod Solanaceae).

Hmotnostný pomer a) : b) je v rozmedzí od 1 : 0,1 do 1 : 10.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Toxikologické testy

Karnitín a jeho deriváty, ako aj lykopén a iné karotenoidy, ako je luteín, zeaxantín a kryptoxantín, ako aj β -karotén, majú nízku toxicitu a sú dobre tolerované, najmä pri orálnom podávaní.

Tieto priaznivé charakteristiky boli potvrdené v testoch vykonaných na potkanoch podávaním vysokých dávok buď L-karnitínu (1 g/kg), alebo propionyl-L-karnitínu (1 g/kg), alebo L-karnitínu (250 mg/kg) plus propionyl-L-karnitínu (250 mg/kg) plus acetyl-L-karnitínu (250 mg/kg) plus izovaleryl-L-karnitínu (250 mg/kg), a tiež podávaním 50 mg/kg lykopénu, alebo 1 g/kg prírodného extraktu z paradajok obsahujúceho 5 % lykopénu.

Tiež kombinácia 1 g/kg propionyl-L-karnitínu a 50 mg/kg lykopénu podávaných potkanom orálne dokázala veľmi dobrú toleranciu a nespôsobila žiadnu úmrtnosť zvierat takto liečených.

Rovnaké sú výsledky pri podávaní zmesi karnitínu (L-karnitín 250 mg/kg plus acetyl-L-karnitín 250 mg/kg plus propionyl-L-karnitín 250 mg/kg plus izovaleryl-L-karnitín 250 mg/kg) v kombinácii s lykopénom v dávke 50 mg/kg.

Podobné priaznivé výsledky boli získané s denným orálnym podávaním potkanom po predĺženú dobu (30 dní) buď propionyl-L-karnitínu (500 mg/kg), alebo

zmesi rôznych karnitínov (L-karnitín 150 mg/kg plus acetyl-L-karnitín 150 mg/kg plus propionyl-L-karnitín 150 mg/kg plus izovaleryl-L-karnitín 150 mg/kg) v kombinácii s 25 mg/kg lykopénu

Ku koncu tridsiateho dňa nebola u potkanov takto liečených žiadna úmrtnosť alebo známky toxicity. Chemicko-fyzikálne testy, počty červených krviniek a bielych krviniek boli u liečených zvierat normálne, ako aj výsledky histologických testov vykonaných na hlavných orgánoch ku koncu liečby.

Testy na izolovaných pečenej bunkách intoxikovaných tetrachlórmetánom

Na stanovenie antioxidačného a ochranného pôsobenia proti voľným radikálom vykázaného kompozíciami podľa tu popísaného vynálezu boli ich účinky na intoxikáciu vyvolanú tetrachlórmetánom analyzované na izolovaných kultúrach pečenej buniek.

Je dobre známe, že tetrachlórmetán (CCl_4) vyvoláva lipoperoxidáciu bunkových membrán, ktorá môže viesť k nekróze buniek.

Tieto testy vykonané na kultúrach potkaních pečenej buniek ukázali, že lipoperoxidačné a toxické účinky CCl_4 týkajúce sa uvoľňovania voľných radikálov môžu byť v kultúrach redukované prítomnosťou zmesi karnitínu (100 mg.l^{-1}), zloženej z L-karnitínu, acetyl-L-karnitínu, propionyl-L-karnitínu a izovaleryl-L-karnitínu v hmotnostnom pomere každého k ďalšiemu 1 : 1, alebo propionyl-L-karnitínu (100 mg.l^{-1}), najmä pri kombinovaní s lykopénom (20 mg.l^{-1}), alebo extraktom z paradajok s obsahom 5 % lykopénu.

Na účely vykonania týchto testov boli pečenej bunky odobraté z potkanej pečene izolované použitím spôsobu popísaného Seglenom (Seglen F.O., Meth. Cell. Biol. Chem., 264, 4747, 1989).

Lézie na bunkovej membráne vyvolané CCl_4 a ochranný účinok vykázaný zmesou karnitínu alebo propionyl-L-karnitínom alebo lykopénom, ako aj ich kombináciou, boli vyhodnotené analyzovaním alanín aminotransferázy (AlaAT) a aspartát aminotransferázy (AspaAT) na tekutom supernatante bunkových kultúr (Beckman 700-Encore 2 Auto-Biochemistry Assay System).

Na stanovenie ochrany poskytovanej proti lipoperoxidačnému účinku CCl_4 bol meraný malonylaldehyd použitím spôsobu kyseliny tiobarbiturovej (Ohkawa H., Anal. Biochem., 95, 351, 1979).

Cytológia pečeňových buniek ku koncu liečby bola skúmaná po fixácii vo formalíne alebo v glutaraldehyde pod svetelným a elektrónovým mikroskopom. Prešetrenie výsledkov týchto testov odhalilo, že tu bol prekvapujúci stupeň synergizmu medzi zmesou karnitínu a lykopénom, ako aj propionyl-L-karnitínom a lykopénom pri ochraňovaní pečeňových buniek proti léziám membrány a proti CCl_4 -vyvolanej lipoperoxidácii.

Tento synergizmus medzi karnitínmi, najmä propionyl-L-karnitínom, a lykopénom je tiež evidentný z meraní malonylaldehydu, markera lipoperoxidačného účinku.

Cytologické vyšetrenia pečeňových buniek potvrdili redukciu nekrotických buniek po liečbe s propionyl-L-karnitínom a lykopénom; avšak najmä pri ultraštruktúrálnej vyšetrení, zatiaľ čo bunky v kontrolnej skupine (CCl_4) mali anomálie hemochrómu, nepravidelné jadrové membrány, zmiznutie mitochondriálnych špičiek v mitochondriách a redukciu počtu ribozómov, tieto bunky, ktoré boli vystavené nielen CCl_4 , ale aj karnitínu a lykopénu mali neočakávane neporušené bunkové membrány a jadrá, a pravidelné heterochromatíny, ako aj pravidelné mitochondrie a počet ribozómov.

Normalizácia cytologických nálezov bola prekvapujúco výrazná v pečeňových bunkách vystavených kombinovanému pôsobeniu zmesi karnitínu a lykopénu, zatiaľ čo účinky jednotlivých zlúčenín samostatne, nie v kombinácii, boli bezvýznamné, takto ukazujúc výrazný synergizmus medzi karnitínom a lykopénom.

Tabuľka 1

Koncentrácie alanín transferázy (AlaAT nmol.mol⁻¹) v supernatante kultúr pečeneňových buniek vystavených CCl₄ (kontrolné) a zmesi karnitínu alebo propionyl-L-karnitínu alebo prírodnému extraktu karotenoidu z paradajok alebo lykopénu samotnému alebo rôznym kombináciám (C= zmes karnitínu; P=propionyl-L-karnitín; TE= prírodný extrakt z paradajok; L=lykopén)

Čas v hodinách	4	8	16
Kontrolné	26,4 ± 2,1	26,8 ± 2,3	30,5 ± 4,5
C	20,6 ± 3,2	21,9 ± 3,3	26,4 ± 2,8
P	19,4 ± 2,1	22,3 ± 3,1	25,7 ± 3,7
TE	22,3 ± 1,8	24,3 ± 2,7	24,7 ± 2,9
L	22,1 ± 2,1	20,6 ± 2,4	23,6 ± 2,1
C + TE	11,9 ± 1,9	8,6 ± 1,1	5,1 ± 1,7
C + L	12,2 ± 1,8	10,5 ± 1,5	5,4 ± 1,9
P + L	11,5 ± 2,1	9,9 ± 2,4	6,2 ± 1,5

Tabuľka 2

Koncentrácie aspartát transferázy (AspaAT nmol.mol⁻¹) v supernatante kultúr pečeneňových buniek vystavených CCl₄ (kontrolné) a zmesi karnitínu alebo propionyl-L-karnitínu alebo prírodnému extraktu karotenoidu z paradajok alebo lykopénu samotnému alebo rôznym kombináciám (C= zmes karnitínu; P=propionyl-L-karnitín; TE= prírodný extrakt z paradajok; L=lykopén)

Čas v hodinách	4	8	16
Kontrolné	8,5 ± 0,6	10,9 ± 1,1	12,1 ± 1,5
C	8,1 ± 0,9	9,9 ± 0,8	9,8 ± 1,1
P	8,8 ± 0,9	9,2 ± 1,2	9,1 ± 1,7
TE	8,2 ± 0,8	9,1 ± 0,9	9,0 ± 1,2
L	8,8 ± 1,8	8,9 ± 0,9	9,0 ± 1,2
C + TE	5,4 ± 0,7	3,2 ± 0,9	3,0 ± 0,5
C + L	5,6 ± 1,1	3,1 ± 0,8	3,5 ± 1,2
P + L	5,5 ± 0,9	3,5 ± 1,2	3,2 ± 0,8

Experimentálne vyvolané testy sivého zákalu

Keďže medzi činiteľmi zodpovednými za očný sivý zákal je nielen porušený metabolizmus glukózy, ale tiež voľné radikály a lipoperoxidácia lipidov, v pohľade ich patogenetického významu spolu s dysfunkciami dodávania krvi do sietnice,

experimentálne sme vyvolali u potkanov výskyt očných sivých zákalov prostredníctvom diéty bohatej na galaktózu podľa spôsobu popísaného Gabbayom (Gabbay K. H., N. Engl. J. Med., 288, 831, 1973).

Po asi ôsmich dňoch tejto liečby bola u potkanov získaná nepriepustnosť lúčov šošovkami, ktorá podľa stavu ich vážnosti je klasifikovaná zvyšujúcim sa číslovaním ako stupeň I, II a III podľa spôsobu popísaného Sippelom (Sippel T. O., Invest. Ophthalmol., 5, 568, 1966). Výsledky získané v týchto testoch ukazujú, že podávanie po dobu ôsmich dní zmesi karnitínu (400 mg/kg orálne kombinácie L-karnitínu, acetyl-L-karnitínu, propionyl-L-karnitínu a izovaleryl-L-karnitínu v rovnakých hmotnostných množstvách každého) alebo propionyl-L-karnitínu (400 mg/kg) alebo lykopénu (5 mg/kg) alebo prírodného extraktu z paradajok obsahujúceho 5 % lykopénu (100 mg/kg) alebo týchto produktov v kombinácii, spolu s galaktózou, redukovalo vážnosť očných lézií vyvolaných galaktózou. Ale výskyt nepriepustnosti lúčov šošovkami bol inhibovaný takmer úplne, keď pri osem dňovej liečebnej dobe s galaktózou, bola experimentálne liečeným potkanom simultánne podávaná zmes karnitínu a lykopén alebo propionyl-L-karnitín a lykopén.

Tabuľka 3

Testy inhibície nepriepustnosti lúčov šošovkou u galaktózaémických potkanov liečených zmesou karnitínu, propionyl-L-karnitínom, prírodným extraktom karotenoidu z paradajok, lykopénom, alebo ich rôznymi kombináciami (skupiny 20 potkanov)

Liečba mg/kg	Stupeň nepriepustnosti lúčov očnými šošovkami (počet skúmaných šošoviek)		
	I	II	III
Kontrolné	0	10	10
Zmes karnitínu (400 mg/kg)	0	15	5
Propionyl-L-karnitín (400 mg/kg)	0	12	8
Prírodný extrakt karotenoidu z paradajok (100 mg/kg)	8	8	4
Lykopén (5 mg/kg)	6	4	10
Zmes karnitínu (400 mg/kg) + prírodný extrakt karotenoidu z paradajok (100 mg/kg)	12	8	0

Zmes karnitínu (400 mg/kg) + lykopén (5 mg/kg)	12	6	2
Propionyl-L-karnitín (400 mg/kg) + prírodný extrakt karotenoidu z paradajok (100 mg /kg)	14	6	0
Propionyl-L-karnitín (400 mg/kg) + lykopen (5 mg/kg)	15	6	0

Experimentálne aterosklerotické testy u králikov

V týchto testoch boli vyhodnotené účinky zmesi karnitínu, propionyl-L-karnitínu, lykopénu a prírodného extraktu z paradajok obsahujúceho 5 % lykopénu, samostatne alebo v kombináciách, na experimentálne vyvolanú aterosklerózu u králikov

Pre tieto testy bola použitá skupina novozélandských králikov s priemernou hmotnosťou 2,9 kg, ktorým bolo so štandardnou diétou pridávané 0,5 hmotn. % cholesterolu po dobu 30 za sebou nasledujúcich dní. Každý deň tie isté zvieratá dostali so svojou o cholesterol obohatenou diétou dávku zodpovedajúcu 400 mg/kg zmesi karnitínu (kombinácia L-karnitínu, acetyl-L-karnitínu, propionyl-L-karnitínu a izovaleryl-L-karnitínu v rovnakých hmotnostných množstvách každého), alebo 400 mg/kg propionyl-L-karnitínu, alebo 5 mg/kg lykopénu, alebo 100 mg/kg prírodného extraktu z paradajok obsahujúceho 5 % lykopénu, alebo rovnakých produktov v rôznych kombináciách. Ku koncu tridsiateho dňa liečby boli odobraté krvné vzorky z hlavnej artérie z ucha každého zvierat'a a použité pre analyzovanie prítomných lipoproteínov podľa spôsobu Hatcha (Hatch F. T., Adv. Lipid Res., 6, 1, 1968).

Zvieratá boli potom usmrtené a z každého bola vybratá pečeň a použitá pre analyzovanie celkového cholesterolu a triglyceridov podľa spôsobu Dehoffa resp. Levyho [Dehoff J. L., Clin. Chem., 24, 433, 1978; Levy A., Advances in Automated Analysis (Technicon Corp.) 497, Thurman, Miami 1972]. Aorta a srdce boli izolované a použité na vyhodnotenie prítomnosti aterosklerotických lézií podľa spôsobu Klurfelda (Klurfeld D. M., J. Med., 10, 35, 1979) stúpajúcich lézií od I do IV podľa vážnosti.

Výsledky týchto testov indikujú, že karnitíny a tiež, v menšej miere, lykopén vykazujú ochranný účinok proti zvyšovaniu cholesterolu a triglyceridov vyvolanému u králikov hyperlipidickou diétou, ale to je len pri ich kombinovanom použití, pri ktorom bol dosiahnutý zreteľný výsledok prakticky úplnej ochrany.

Zvieratá liečené kombináciou karitínov a lykopénu v skutočnosti ukázali stupeň ochrany nedosiahnuteľný sumarizovaním účinkov vytvorených jednotlivými produktami oddelene. Výsledky týchto testov tiež ukazujú výrazný synergizmus účinkov vykazovaných kompozíciami podľa tu popísaného vynálezu.

Tabuľka 4

Testy hypercholesterolémických králikov

Koncentrácie lipoproteínu v plazme

	VLDL (mg/dl)	LDL (mg/dl)	HDL (mg/dl)
HC	1 119 ± 295	485 ± 19,9	23,1 ± 6,5
CM	755 ± 10,9	306 ± 15,5	28,5 ± 5,5
TE	880 ± 105	295 ± 20,7	30,1 ± 4,2
P	805 ± 95	280 ± 22,5	29,5 ± 6,2
L	715 ± 80	260 ± 28,5	29,3 ± 5,5
CM + TE	290 ± 45	155 ± 16,5	35,5 ± 3,9
CM + L	240 ± 25	96 ± 9,4	31,2 ± 2,9
P + TE	250 ± 30	105 ± 15,5	36,9 ± 3,5
P + L	220 ± 20	90 ± 10,5	32,1 ± 3,1

HC = hypercholesterolémické kontrolné zvieratá

CM = zmes karnitínu

TE = prírodný extrakt karotenoidu z paradajok

P = propionyl-L-karnitín

L = lykopén

Tabuľka 5

Testy hypercholesterolémických zajacov

Koncentrácie celkového cholesterolu a triglyceridov v pečeni

	Celkový cholesterol (mg/dl)	Triglyceridy (mg/dl)
HC	1 885 ± 315	180 ± 15,5
CM	1 420 ± 10,9	155 ± 12,7
TE	1 475 ± 195	139 ± 11,5
P	1 250 ± 145	142 ± 12,8
L	1 200 ± 180	135 ± 13,8
CM + TE	985 ± 85	115 ± 11,6
CM + L	780 ± 98	105 ± 11,6
P + TE	750 ± 64	110 ± 10,7
P + L	655 ± 90	90 ± 8,5

HC = hypercholesterolémické kontrolné zvieratá

CM = zmes karnitínu

TE = prírodný extrakt karotenoidu z paradajok

P = propionyl-L-karnitín

L = lykopén

Testy antiproliferačného pôsobenia s vyhodnotením pôsobenia ornitín dekarboxylázy

Ako je známe, podobne ako forbolmyristáty, teleocidín podávaný potkanom subkutánne spôsobuje proliferačné anomálie na koži zvierat takto liečených, ktoré môžu viesť k vytvoreniu kožných procesov tumorového typu.

Proliferačná anomália je sprevádzaná zvýšením enzýmu ornitín dekarboxyláza a, ako vo všeobecnosti u všetkých prípadoch patologickej proliferačnej aktivity, zvýšenie pôsobenia ornitín dekarboxylázy je úmerné vážnosti vyvolaných lézií. V týchto testoch bol teleocidín rozpustený v 0,2 cm³ vodného toztoku injektovaný subkutánne do depilovaného chrbáta myši v dávke 5 µg/myš. Počas siedmich dní pred touto liečbou dostali testované zvieratá buď orálne podanú zmes karnitínu samostatnú (400 mg/kg) zloženú z kombinácie L-karnitínu, acetyl-L-karnitínu, propionyl-L-karnitínu a izovaleryl-L-karnitínu v rovnakých hmotnostných množstvách každého, alebo propionyl-L-karnitín samostatný (400 mg/kg), alebo prírodný extrakt karotenoidu z paradajok (100 mg/kg s obsahom 5% lykopénu) samostatný, alebo lykopén samostatný (5 mg/kg), alebo kombinácie zmesi karnitínu s lykopénom, alebo lykopén obsahujúcimi extraktami. V ďalšej sérii testov boli tieto produkty aplikované do kože myši polhodinu pred injektovaním teleocidínu po vhodnej disperzii produktov najprv v dimetylsulfoxide a potom v l'anolíne, pokiaľ bola dosiahnutá koncentrácia zmesi karnitínu 200 mg/cm³, alebo koncentrácia extraktu karotenoidu obsahujúceho 5 % lykopénu 200 mg/ cm³, alebo koncentrácia lykopénu 5 mg/ cm³.

Na oblasť kože, kde bol teleocidín injektovaný, boli použité rôzne preparácie v dávke 0,3 cm³ a oblasti injektovania boli chránené oklúznou bandážou.

Na účely analýzy ornitín dekarboxylázy na oblastiach kože, kde bol injektovaný teleocidín, bol po štyroch hodinách po injektovaní prijatý postup skladajúci sa zo spôsobu popísaného O'Brienom a Nakadatem (O'Brien T. G., Cancer Res., **35**, 1662, 1975; Nakadate T., Cancer Res., **42**, 2841, 1982). Koncentrácia proteínu epidermálneho extraktu bola meraná použitím Lowryho spôsobu (Lowry O. H., J

Biol. Chem., 193, 265, 1951). Výsledky týchto testov indikujú, že zmes karnitínu aj karotenoidy v prírodnom extrakte z paradajok, ako aj propionyl-L-karnitín samostatný a lykopén samostatný vykazujú len mierny ochranný účinok proti proliferačnému fenoménu a proti zvýšeniu pôsobenia ornitín dekarboxylázy, ale naopak, prekvapujúco bol dokázaný ochranný účinok, keď boli tieto produkty použité v kombinácii, takto ukazujúc neočakávaný a prekvapujúci synergický efekt.

Tabuľka 6

Pôsobenie ornitín dekarboxylázy

Liečba	Pôsobenie ornitín dekarboxylázy (nmol CO ₂ /60 min/mg proteínu)	
	orálne podávanie	kutánne podávanie
Kontrolné	0,05 ± 0,002	0,03 ± 0,001
Teleocidín	2,4 ± 0,3	2,6 ± 0,2
Zmes karnitínu	1,92 ± 0,4	1,75 ± 0,3
Propionyl-L-karnitín	1,90 ± 0,2	1,60 ± 0,1
Prírodný extrakt z paradajok	1,85 ± 0,3	1,80 ± 0,2
Lykopén	1,70 ± 0,1	1,65 ± 0,1
Zmes karnitínu +		
prír. extrakt z paradajok	0,35 ± 0,005	0,40 ± 0,06
Zmes karnitínu + lykopén	0,30 ± 0,03	0,45 ± 0,05
Propionyl-L-karnitín +		
prír. extrakt z paradajok	0,36 ± 0,06	0,30 ± 0,04
Propionyl-L-karnitín + lykopén	0,33 ± 0,05	0,31 ± 0,03

Niektoré neobmedzujúce príklady kompozície podľa vynálezu sú zaznamenané ďalej.

- 1) Zmes karnitínu 500 mg
(L-karnitín 125 mg, acetyl-L-karnitín 125 mg,
propionyl-L-karnitín 125 mg, izovaleryl-L-karnitín 125 mg)
Prírodný extrakt z paradajok (nazvaný 5% lykopén) 100 mg
- 2) Zmes karnitínu 300 mg
(L-karnitín 75 mg, acetyl-L-karnitín 75 mg,
propionyl-L-karnitín 75 mg, izovaleryl-L-karnitín 75 mg)
Prírodný extrakt z paradajok (nazvaný 5% lykopén) 50 mg

3) Propionyl L-karnitín	500 mg
Přírodní extrakt z paradajok (nazvaný 5% lykopén)	100 mg
4) Propionyl L-karnitín	250 mg
Přírodní extrakt z paradajok (nazvaný 5% lykopén)	50 mg
5) Propionyl L-karnitín	500 mg
Lykopén	5 mg
6) Propionyl L-karnitín	250 mg
Lykopén	2,5 mg
7) Zmes karnitínu	300 mg
(L-karnitín 75 mg, acetyl-L-karnitín 75 mg, propionyl-L-karnitín 75 mg, izovaleryl-L-karnitín 75 mg)	
Lykopén	5 mg
8) Zmes karnitínu	300 mg
(L-karnitín 75 mg, acetyl-L-karnitín 75 mg, propionyl-L-karnitín 75 mg, izovaleryl-L-karnitín 75 mg)	
Lykopén	2,5 mg
9) Zmes karnitínu	300 mg
(L-karnitín 75 mg, acetyl-L-karnitín 75 mg, propionyl-L-karnitín 75 mg, izovaleryl-L-karnitín 75 mg)	
Karotenoidový komplex	
(přírodní extrakty z paradajok, červeného grapefruita, karotky, kvetu pomarančovníka)	300 mg
10) Propionyl-L-karnitín	400 mg
Lykopén	2,5 mg
β-karotén	5 mg
α-karotén	2 mg
Luteín	5 mg
Zeaxantín	1 mg
11) Propionyl-L-karnitín	350 mg
Lykopén	5 mg
Zakrslá vejárovitá palma (<i>Serenoa repens</i>)	50 mg
Extrakt z <i>Pygeum africanum</i>	50 mg

12) Zmes karnitínu	300 mg
(L-karnitín 75 mg, acetyl-L-karnitín 75 mg, propionyl-L-karnitín 75 mg, izovaleryl-L-karnitín 75 mg)	
Prírodný extrakt z paradajok (označený 5% lykopén)	100 mg
Extrakt zo zakrslej vejárovitej palmy (<i>Serenoa repens</i>)	50 mg
Extrakt z <i>Pygeum africanum</i>	50 mg
Extrakt z kvetu kaktusu (<i>Opuntia ficus indica</i>)	50 mg
Glycinát zinku	50 mg
Selén (1-selén-metionín)	50 µg
Vitámín E	10 mg
Koenzým Q ₁₀	10 mg
13) Zmes karnitínu	400 mg
(L-karnitín 100 mg, acetyl-L-karnitín 100 mg, propionyl-L-karnitín 100 mg, izovaleryl-L-karnitín 100 mg)	
Prírodný extrakt z paradajok (označený 5% lykopén)	100 mg
Antokyaníny extrahované z brusnice	50 mg
Polyfenoly extrahované z hrozna	10 mg
Vitámín E	10 mg
Metionín selénu	50 µg
14) Propionyl-L-karnitín	300 mg
β-karotén	5 mg
Lykopén	5 mg
Luteín	3 mg
Katechín	5 mg
Kyselina lipoová	5 mg
Koenzým Q ₁₀	10 mg
Vitámín C	100 mg
Vitámín PP	25 mg
Vitámín B ₆	25 mg
Vitámín B ₁₂	250 µg
Taurín	100 mg

Pojem farmakologicky prijateľná soľ L-karnitínu alebo alkanoyl-L-karnitínu znamená akúkoľvek soľ týchto aktívnych zložiek s kyselinou, ktorou nevznikajú nežiadúce toxické alebo vedľajšie účinky. Tieto kyseliny sú dobre známe farmaceutom.

Neobmedzujúce príklady vhodných solí sú nasledujúce: chlorid, bromid, jodid, aspartát, kyselina aspartámová, citrát, kyselina citrónová, vínan, fosfát, kyselina fosforečná, fumarát, kyselina fumárová, glycerofosfát, glukózafosfát, laktát, maleát, kyselina maleinová, orotát, oxalát, kyselina šťavelová, sulfát, kyselina sírová, trichlóracetát, trifluóracetát a metánsulfonát.

Zoznam farmakologicky prijateľných solí schválených FDA je daný v Int. J. of Pharm., 33, (1986), 201-217, táto posledná publikácia je tu zahrnutá referenciou.

Kompozícia podľa vynálezu môže tiež zahrňovať vitamíny, koenzýmy, minerály, a antioxidanty.

Príslušné excipienty pre použitie na prípravu kompozícií vzhľadom na špecifickú cestu podávania budú zrejmé farmakológom a odborníkom v oblasti potravinárskeho priemyslu.

zmenené
PATENTOVÉ NÁROKY

1. Kombinovaná kompozícia, ktorá zahrňuje:
 - a) propionyl-L-karnitín alebo jeho farmakologicky prijateľnú soľ; a
 - b) karotenoid vybraný zo skupiny zloženej z lykopénu, α -karoténu, β -karoténu, zeaxantínu, kryptoxantínu, luteínu alebo ich zmesí.
2. Kompozícia podľa nároku 1, vyznačujúca sa tým, že zložka a) ďalej zahrňuje „karnitín“ vybraný zo skupiny zahrňujúcej L-karnitín, acetyl-L-karnitín, valeryl-L-karnitín, izovaleryl-L-karnitín, alebo ich farmakologicky prijateľné soli, alebo ich zmesi.
3. Kompozícia podľa nároku 1 alebo 2, vyznačujúca sa tým, že karotenoid je lykopén
4. Kompozícia podľa nárokov 1 až 3, vyznačujúca sa tým, že hmotnostný pomer a) : b) je od 1 : 0,1 do 1 : 10.
5. Kompozícia podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, vyznačujúca sa tým, že zložka b) je vo forme rastlinných extraktov, ktoré obsahujú samotnú zložku.
6. Kompozícia podľa nároku 5, vyznačujúca sa tým, že rastlinným extraktom je extrakt z paradajky (*Lycopersicon esculentum*).
7. Kompozícia podľa nároku 6, vyznačujúca sa tým, že extrakt z paradajky zahrňuje asi 2 hmotn. % až 20 hmotn. % lykopénu.
8. Kompozícia podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, vyznačujúca sa tým, že farmakologicky prijateľná soľ L-karnitínu alebo alkanoyl-L-karnitínu je vybraná zo skupiny obsahujúcej: chlorid, bromid, jodid, aspartát, kyselinu aspartámovú, citrát, kyselinu citrónovú, vínan, fosfát, kyselinu fosforečnú, fumarát, kyselinu fumárovú, glycerofosfát,

glukózofosfát, laktát, maleát, kyselinu maleinová, orotát, oxalát, kyselinu šťavelovú, sulfát, kyselinu sírovú, trichlóracetát, trifluóracetát a metánsulfonát.

- 9 Kompozícia podľa ktoréhokolvek z predchádzajúcich nárokov, ktorá ďalej zahŕňa vitamíny, koenzýmy, minerálne látky a antioxidanty.
10. Kompozícia podľa ktoréhokolvek z predchádzajúcich nárokov, podávaná orálne vo forme diétného doplnku.
11. Kompozícia podľa ktoréhokolvek z predchádzajúcich nárokov, ktorá môže byť podávaná orálne, parenterálne, rektálne, transdermálne alebo nakvapkaním do oka, vo forme lieku.
12. Použitie kompozície podľa nároku 1, na prípravu diétného doplnku na prevenciu ochorení spôsobených prítomnosťou voľných radikálov v dôsledku znečistenia životného prostredia a lipoperoxidačného fenoménu aterosklerotického, vaskulárneho, kardiotického alebo cerebrálneho druhu; proliferačných zmien tkanív zahrňujúcich tkanivá prostaty, maternice, prsníkov a hrubého čreva; zmien zraku a sietnice zahrňujúcich sivý zákal a škvrnitú degeneráciu sietnice.
13. Použitie kompozície podľa nároku 1, na prípravu lieku na terapeutickú liečbu ochorení spôsobených prítomnosťou voľných radikálov v dôsledku znečistenia životného prostredia a lipoperoxidačného fenoménu atero-sklerotického, vaskulárneho, kardiotického alebo cerebrálneho druhu; proliferačných zmien tkanív zahrňujúcich tkanivá prostaty, maternice, prsníkov a hrubého čreva; zmien zraku a sietnice zahrňujúcich sivý zákal a škvrnitú degeneráciu sietnice.