PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:
2001 - 2341

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.[7]:
A 61 K 45/06
A 61 P 9/00

(19) ČESKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **17.12.1999**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **23.12.1998 07.07.1999**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/113955 1999/142616**

(33) Země priority: **US US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **12.12.2001**
(Věstník č. 12/2001)

(86) PCT číslo: **PCT/US99/27945**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO00/38724**

(71) Přihlašovatel:
G. D. SEARLE LLC CORPARATE PATENT DEPARTMENT, Chicago, IL, US;

(72) Původce:
Sikorski James A., Des Peres, MO, US;
Glenn Kevin C., Chesterfield, MO, US;

(74) Zástupce:
Čermák Karel Dr., Národní třída 32, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Kombinace inhibitorů transferoního proteinu cholesterylesterů a derivátů kyseliny fibrové pro kardiovaskulární indikace

(57) Anotace:

Předkládaný vynález poskytuje kombinace kardiovaskulárních terapeutických sloučenin pro profylaxi nebo léčbu kardiovaskulárních nemocí, zahrnujících hypercholesterolemii, aterosklerózu nebo hyperlipidemii. Kombinace zahrnují derivát kyseliny fibrové, kombinovaný s inhibitorem transferního proteinu cholesterylesteru (CETP).

CZ 2001 - 2341 A3

10.09.01

2001-2341

Kombinace inhibitorů transferního proteinu cholesterylesteru a derivátů kyseliny fibrové pro kardiovaskulární indikace.

Tato přihláška nárokuje prioritu US prozatímní přihlášky č. 60/142,616 podané 7. července 1999 a US prozatímní přihlášky č. 60/113,955 podané 23. prosince 1998.

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká způsobu léčení kardiovaskulárních nemocí, zejména se týká kombinací sloučenin, prostředků a způsobů pro jejich použití v lékařství, zejména v profylaxi a léčbě hyperlipidemických stavů, jako jsou stavy spojené s aterosklerózou, hypercholesterolémií a ostatních nemocí koronární artérie u savců. Zejména se vynález týká sloučenin inhibujících aktivitu transferního proteinu cholesterylesterů. Vynález se také týká derivátů kyseliny fibrové (fibráty).

Dosavadní stav techniky

Je dobře známé, že hyperlipidemické stavy spojené se zvýšenými koncentracemi celkového cholesterolu a cholesterolu s lipoproteiny o nízké hustotě (LDL cholesterolu) jsou hlavními rizikovými faktory pro koronární srdeční choroby a zejména aterosklerózu. Řada studií uvádí, že nízká koncentrace cholesterolu s lipoproteiny o vysoké hustotě (HDL cholesterolu) v plazmě je silný rizikový faktor pro vývoj aterosklerózy (Barter a Rye, Atherosclerosis, 121, 1-12 (1996). HDL je jednou z hlavních tříd lipoproteinů, které působí při přenosu lipidů v krvi. Bylo zjištěno, že hlavní lipidy, spojené s HDL zahrnují cholesterol, cholesterylester, triglyceridy, fosfolipidy a mastné kyseliny. Další třídy lipoproteinů nalezené v krvi jsou lipoprotein o nízké hustotě

10.09.01

(LDL), lipoprotein o střední hustotě (IDL) a lipoprotein o velmi nízké hustotě (VLDL). Jelikož nízké úrovně HDL cholesterolu zvyšují nebezpečí aterosklerózy, způsoby zvyšující úroveň HDL cholesterolu v plazmě by mohly být terapeuticky příznivé pro léčbu aterosklerózy a ostatních nemocí spojených s akumulací lipidu v krevních cévách. Tyto nemoci zahrnují, nikoliv však s omezením, koronární srdeční nemoc, nemoci periferních cév a mrtvici.

Ateroskleróza je původcem řady nemocí koronárních tepen (CAD) a je hlavní příčinou nemocnosti a úmrtnosti v moderní společnosti. Vysoké úrovně LDL cholesterolu (více než okolo 180 mg/dl) a nízké úrovně HDL cholesterolu (pod 35 mg/dl) jsou důležitými příčinami pro rozvoj aterosklerózy. Další nemoci nebo rizikové faktory, jako jsou nemoci periferních cév, mrtvice a hypercholesterolemie jsou negativně ovlivněny nepříznivými poměry HDL/LDL.

Zabránění recirkulace žlučových kyselin z lumenu intestinálního traktu snižuje hladinu sérového cholesterolu v přímém vztahu. Epidemiologická data, která byla zjištěna naznačují, že taková redukce vede ke zlepšení zdravotního stavu u aterosklerózy. Stedronski v článku „Interaction of bile acids and cholesterol with nonsystemic agents having hypocholesterolemic properties," Biochimica et Biophysica Acta, 1210, 255-287 (1994) diskutuje biochemii, fyziologii a známá aktivní činidla vztahující se ke žlučovým kyselinám a cholesterolu.

Inhibice transferního proteinu cholesterylesteru (CETP) účinně modifikuje poměry HDL/LDL a očekává se, že kontroluje postup a/nebo vznik určitých kardiovaskulárních nemocí. CETP je plazmový protein, který usnadňuje přesun cholesterylesterů a triglyceridů mezi různými lipoproteiny v krvi (Tall, J. Lipid Res., 34, 1255-74 (1993)). Přesun cholesterylesteru z HDL k LDL pomocí CETP má vliv na snížení HDL cholesterolu. Inhibice CETP povede ke zvýšení HDL cholesterolu v plazmě a ke

10.09.01

snížení LDL cholesterolu v plazmě, což má za následek terapeuticky příznivý profil lipidů v plazmě. Důkaz tohoto účinku je popsán v McCarthy, Medicinal Res. Revs., 13, 139-59 (1993). Další důkaz tohoto účinku popsal Sitori, Pharmac. Ther., 67, 443-47 (1995)). Tento fenomén prvně demonstroval Swenson a kol., (J. Biol. Chem., 264, 14318 (1989)) za použití monoklonální protilátky, která specificky inhibuje CETP. U králíků tato protilátka zvýšila HDL cholesterol v plazmě a snížila LDL cholesterol. Son a kol. (Biochim. Biophys. Acta, 795, 743-780 (1984)) popisuje proteiny z lidské plazmy, které inhibují CETP. US patent 5 519 001, uváděný zde jako odkaz, Kushawaha a kol., popisuje peptid o 36 aminokyselinách, který inhibuje aktivitu CETP. Cho a kol. (Biochim. Biophys. Acta 1391, 133-144 (1998) popisují peptid z plazmy vepře, který inhibuje lidský CETP. Bonin a kol. (J. Peptide Res., 51, 216-225 (1998)) popisují dekapeptidový inhibitor CETP. Depsipeptidový fungální metabolit popsal jako inhibitor CETP Hedge a kol., v Bioorg. Med. Chem. Lett., 8, 1277-80 (1998).

Bylo uvedeno několik zpráv o nepeptidových sloučeninách, které působí jako inhibitory CETP. Barrett a kol. (J. Am. Chem. Soc., 188, 7863-63 (1996) popisují inhibitory CETP obsahující cyklopropan. Dále, inhibitory obsahující cyklopropan popsal Kuo a kol. (J. Am. Chem. Soc., 117, 10629-34 (1995)). Pietzonka a kol. (Bioorg. Med. Chem. Lett., 6, 1951-54 (1996) popsal fosfonát obsahující analogy cholesterylesteru jako inhibitory CETP. Coval a kol. (Bioorg. Med. Chem. Lett., 5, 605-610 (1995)) popisují Widediol-A a -B a příbuzné seskviterpenové sloučeniny jako inhibitory CETP. Lee a kol. (J. Antibiotics, 49, 693-96 (1996)) popisují inhibitory CETP odvozené od insekticidních hub. Busch a kol. (Lipids, 25, 216-220, (1990)) popisují cholesterylacetylbromid jako inhibitor CETP. Morton a Zilversmit (J. Lipid Res., 35, 836-47 (1982)) popisují, že p-chlormerkurifenylsulfonát, p-hydroxymerkuribenzoát a ethylmerkurithiosalicylát inhibují

CETP. Connolly a kol. (Biochem. Biophys. Res. Comm., 223, 42-47 (1996)) popisují další cysteinová modifikační činidla jako inhibitory CETP. Xia a kol., popisují 1,3,5-triaziny jako inhibitory CETP (Bioorg. Med. Chem. Lett., 6, 919-22 (1996)). Bisgaier a kol. (Lipids, 29, 811-8 (1994)) popisují 4-fenyl-5--tridecyl-4H-1,2,4-triazolthiol jako inhibitor CETP. Další triazolové inhibitory CETP jsou popsány v US patentové přihlášce 09/153,360, uváděné zde jako odkaz. Sikorski a kol. popisují další nové inhibitory CETP v patentové přihlášce PCT č. WO 99/14204.

Substituované 2-merkaptoanilinamidové sloučeniny se mohou použít jako inhibitory CETP a takové sloučeniny popsal H. Shinkai a kol. v patentové přihlášce PCT č. WO 98/35937.

Jsou známé některé heteroalkylaminové sloučeniny jako inhibitory CETP. V Evropské patentové přihlášce č. 796846, Schmidt a kol., jsou popsány 2-arylsubstituované pyridiny jako inhibitory transferního proteinu cholesterolesteru, které jsou užitečné jako kardiovaskulární činidla. Jeden substituent v poloze C_3 pyridinového kruhu může být hydroxyalkylová skupina. V Evropské patentové přihlášce č. 801060, Dow a Wright popisují heterocyklické deriváty substituované aldehydovým adičním produktem alkylaminu za vzniku 1-hydroxy--1-aminů. Tyto sloučeniny jsou uváděny jako β3-adrenergické receptorové agonisty, které jsou užitečné pro léčbu diabetu a ostatních chorob. V patentové přihlášce GB č. 2305665, Fischer a kol. popisují sekundární aminoalkoholové substituované pyridinové deriváty, které jsou užitečné pro léčbu některých chorob, včetně úrovní cholesterolu a aterosklerotických chorob. V Evropské patentové přihlášce č. 818448 (zde uváděné jako odkaz) Schmidt a kol. popisují tetrahydrochinolinové deriváty jako inhibitory transferního proteinu cholesterolesteru. Evropská patentová přihláška č. 818197, Schmek a kol., popisuje pyridinové deriváty s kondenzovanými heterocykly jako inhibitory transferního proteinu

cholesterolesteru. Brandes a kol. v patentové přihlášce Německa č. 19627430 popisuje bicyklické kondenzované pyridinové deriváty, které jsou užitečné jako inhibitory transferního proteinu cholesterolesteru. V patentové přihlášce PCT č. WO 98/39299, Muller-Gliemann a kol. jsou popsány chinolinové deriváty jako inhibitory transferního proteinu cholesterylesteru.

Polycyklické sloučeniny, které jsou užitečné jako inhibitory CETP také popsal A. Oomura a kol. v japonské patentové přihlášce č. 10287662. Například terapeutické sloučeniny, mající struktury C-1 a C-8 byly připraveny kultivací *Penicillium spp.*

Cykloalkylpyridiny, užitečné jako inhibitory CETP popsal Schmidt a kol. v Evropské patentové přihlášce č. EP 818448. Například terapeutická sloučenina, která má strukturu C-9 je popsána jako sloučenina, která je zejména účinná jako inhibitor CETP.

Substituované tetrahydronaftalenové sloučeniny, užitečné jako inhibitory CETP jsou popsány v patentové přihlášce PCT č. WO 99/14174. Zejména je v této přihlášce popsán jako užitečný inhibitor CETP (8S)-3-cyklopentyl-1-(4-fluorfenyl)-2-[(S)--fluor(4-trifluormethylfenyl)methyl]-8-hydroxy-6--spirocyklobutyl-5,6,7-tetrahydronaftalen.

Některé 4-heteroaryltetrahydrochinoliny, užitečné jako inhibitory CETP jsou popsány v patentové přihlášce PCT č. WO 99/14215. Například je popsán 3-(4-trifluormethylbenzoyl)--5,6,7,8-tetrahydrochinolin-5-on, jako inhibitor CETP.

Deriváty kyseliny fibrové zahrnují další třídu léčiv, které mají účinek na úrovně lipoproteinů. Mezi první z těchto sloučenin patří clofibrát, popsaný v US patentu č. 3 262 850, uváděný zde jako odkaz. Clofibrát je ethylester p-chlorfenoxyizobutanové kyseliny. Široce používané léčivo v této třídě je gemfibrozil, popsaný v US patentu č. 3 674 836, uváděný zde jako odkaz. Gemfibrozil je často používán ke

10.09.01

snížení úrovně triglyceridů nebo ke zvýšení koncentrací HDL cholesterolu (The Pharmacological Basis of Therapeutics, str. 893, zde uváděno jako odkaz). Fenofibrát (US patent č. 4 058 552, uváděný zde jako odkaz) mé podobný účinek jako gemfibrozil, ale navíc snižuje úrovně HDL. Ciprofibrát (US patent č. 3 948 973, uváděný zde jako odkaz) má podobné účinky jako fenofibrát. Další léčivo této třídy je bezafibrát (US patent č. 3 781 328, uváděný zde jako odkaz). Varovné postranní účinky používání derivátů kyseliny fibrové zahrnují nemoci žlučníku (cholelithiáza), rhabdomyolysis a akutní renální selhání. Některé z těchto účinků jsou aktivovány, když se fibráty kombinují s inhibitory HMG CoA reduktázy v důsledku jejich kombinovaných účinků na játra.

Některé kombinační terapie pro léčbu kardiovaskulární nemoci byly v literatuře popsány. Kombinace inhibitorů IBAT s inhibitory HMG CoA reduktázy užitečné pro léčbu kardiovaskulární nemoci jsou popsány v US patentové přihlášce č. 09/037,308, zde uváděné jako odkaz.

Kombinační terapii za použití fluvastatinu a niceritrolu popsal J. Sasaki a kol., (Id). Tito výzkumníci uvádějí, že kombinace fluvastatinu s niceritrolem „v dávce 750 mg/den nevykazuje nezvyšuje nebo nesnižuje užitečné účinky fluvastatinu."

L. Cashin-Hemphill a kol. (J. Am. Med. Assoc., 264 (23), 3013-17 (1990), zde uváděné jako odkaz) popisují užitečné účinky kombinační terapie za použití colestipolu a niacinu na koronární aterosklerózu. Popsané účinky zahrnují zastavení postupu a regrese vyskytujících se v nativních koronárních tepenných lézích.

Kombinační terapie za použití acipimoxu a simvastatinu ukazuje příznivé účinky na HDL u pacientů, majících vysoké úrovně triglyceridů (N. Hoogerbrugge a kol., J. Internal Med., 241, 151-55 (1997)).

10.09.01

Kombinační terapii za použití sitostanol ester margarinu a pravastatinu popsali H. Gylling a kol. (J. Lipid Res., 37, 1776-85 (1986), zde uváděné jako odkaz). O této terapii se uvádí, že současně podstatně inhibuje absorpci cholesterolu a snižuje LDL cholesterol u mužů s diabetem nezávislým na inzulinu.

Brown a kol. (New Eng. J. Med., 323 (19), 1289-1339 (1990) zde uváděno jako odkaz, popisují kombinační terapii za použití lovastatinu a colestipolu, která snižuje progres aterosklerotické léze a zvýšení regrese léze vzhledem k samostatnému lovastatinu.

Kombinační terapii za použití apoB sekrečního inhibitoru s inhibitorem CETP popsali Chang a kol. v PCT patentové přihlášce č. WO 98/23593, uváděné zde jako odkaz.

Buch a kol. (patentová přihláška PCT č. WO 99/11263), zde uváděná jako odkaz) popisují kombinační terapii zahrnující amlodipin a statinovou sloučeninu pro léčení subjektů, kteří trpí angínou pectoris, aterosklerózou, kombinovanou hypertenzí a hyperlipidemií a léčbu symptomů srdeční zástavy. Buch a kol. popisují v patentové přihlášce PCT č. WO 99/11259 kombinační terapii zahrnující amlodipin a atorvastatin.

Scott a kol. (patentová přihláška PCT č. WO 99/11260) popisují kombinační terapii zahrnující atorvastatin a antihypertenzivní činidlo.

Dettmar a Gibson (patentová přihláška VB č. 2329334 A) nárokují terapeutický prostředek, použitelný pro snížení úrovně lipoproteinu s nízkou hustotou a cholesterolu v plazmě, kde prostředek obsahuje inhibitor HMG CoA reduktázy a žlučové komplexní činidlo.

Shora uvedené odkazy ukazují na kontinuální potřebu nalézt bezpečná a účinná činidla pro profylaxi nebo léčbu kardiovaskulárních nemocí.

Podstata vynálezu

Vzhledem k existující potřebě nalézt bezpečná a účinná činidla pro profylaxi a léčbu kardiovakulárních nemocí, uvádí se v předkládané přihlášce kombinační terapie kardiovaskulárních léčiv.

Předkládaná přihláška poskytuje kombinační terapii, zahrnující použití prvního množství inhibiční sloučeniny CETP a druhého množství dalšího kardiovaskulárního terapeuticky účinného léčiva k profylaxi a léčbě hyperlipidemie, ateosklerózy nebo hypercholesterolemie, kde množství uvedených látek dohromady zahrnuje antihyperlipidemicky účinné množství, antiatherosklerotický účinné množství nebo antihypercholesterolemicky účinné množství uvedených sloučenin. Například jedno z mnoha provedení vynálezu je kombinační terapie zahrnující terapeutickou dávku sloučeniny inhibující CETP a derivátu kyseliny fibrové.

Dalším provedením předkládaného vynálezu je použití jakékoliv kardiovaskulární kombinační terapie popsané v tomto dokumentu k profylaxi nebo léčbě hypercholesterolemie, aterosklerózy nebo hyperlipidemie. Tak v jednom provedení předkládaný vynález poskytuje způsob profylaxe nebo léčby hyperlipidemického stavu, zahrnující podání pacientovi, v případě potřeby, kombinace v jednotkové dávkové formě, přičemž tato kombinace obsahuje první množství sloučeniny na bázi derivátu kyseliny fibrové a druhé množství inhibiční sloučeniny CETP, kde množství uvedených látek dohromady zahrnuje antihyperlipidemicky účinné množství sloučenin.

V dalším provedení předkládaný vynález poskytuje způsob profylaxe nebo léčby aterosklerotického stavu, zahrnující podání pacientovi, v případě potřeby, kombinace v jednotkové dávkové formě, přičemž tato kombinace obsahuje první množství sloučeniny na bázi derivátu kyseliny fibrové a druhé množství CETP inhibiční sloučeniny, kde množství uvedených látek

dohromady zahrnuje antiaterosklerotický účinné množství sloučenin.

Ještě v dalším provedení předkládaný vynález poskytuje způsob profylaxe nebo léčby hypercholesterolemie, zahrnující podání pacientovi, v případě potřeby, kombinace v jednotkové dávkové formě, přičemž tato kombinace obsahuje první množství sloučeniny na bázi derivátu kyseliny fibrové a druhé množství inhibiční sloučeniny CETP, kde množství uvedených látek dohromady zahrnuje antihypercholesterolemicky účinné množství sloučenin.

Další rozsah aplikovatelnosti předkládaného vynálezu bude zřejmý z detailního popisu uvedeném dále. Nicméně je třeba vzít v úvahu, že následující podrobný popis a příklady, ačkoli uvádějí výhodná provedení vynálezu jsou uvedeny pouze pro ilustraci a odborník může provést řadu změn a modifikací v rámci rozsahu předkládaného vynálezu.

Následující detailní popis vynálezu slouží jako pomoc odborníkům v oblasti při praktickém užívání předkládaného vynálezu. Nicméně, tento detailní popis není konstruován tak, aby příliš omezoval vynález. Odborník může provést řadu modifikací a změn, aniž by došlo k odchýlení od podstaty nebo rozsahu předkládaného vynálezu.

Obsahy každého citovaného odkazu, včetně obsahů odkazů citovaných v rámci primárních odkazů, jsou zde začleněny odkazem ve své úplnosti.

Aby čtenář porozuměl následujícímu detailnímu popisu, platí následující definice:

„Kombinační terapie" znamená podání dvou nebo více terapeutických činidel k léčbě hyperlipidemického stavu, například aterosklerózy a hypercholesterolemie. Takové podání zahrnuje společné podání těchto terapeutických činidel v podstatě současně, jako je jedna kapsle, obsahující fixní poměr aktivních složek nebo více kapslí pro každou inhibiční sloučeninu. Navíc toto podání zahrnuje také využití každého

10.09.01

typu terapeutického činidla v sekvenčním způsobu. V tomto případě bude léčebný režim poskytovat užitečné účinky kombinací léčiv při léčbě hyperlipidemických stavů.

Fráze „terapeuticky účinné" je vztažena k označení kombinovaného množství inhibitorů v kombinační terapii. Toto kombinované množství dosáhne cíle, spočívající v redukci nebo eliminaci hyperlipidemického stavu.

„Terapeutická sloučenina" znamená sloučeninu užitečnou při profylaxi a léčbě hyperlipidemického stavu, včetně aterosklerózy a hypercholesterolemie.

Kombinace

Kombinace podle předkládaného vynálezu budou mít řadu využití. Například úpravou dávky a lékařským dohledem budou jednotlivé dávky použitých terapeutický sloučenin nižší, než jsou typické dávky použité při monoterapii. Snižování dávek přinese výhody, spočívající ve snížení vedlejších účinků ve srovnání s monoterapií. Dále, menší vedlejší účinky kombinační terapie ve srovnání s monoterapií povede k lepším podmínkám pro pacienta při dávkovém režimu.

Další použití předkládaného vynálezu bude v kombinacích, majících doplňující účinky nebo doplňující způsoby působení. Například inhibitory IBAT regulují úrovně cholesterolu v krevním séru inhibicí reabsorpce žlučových kyselin v kyčelníku. Naproti tomu inhibitory CEPT inhibují pohyb cholesterylesterů a triglyceridů mezi různými lipoproteiny v krvi.

Sloučeniny užitečné v předkládaném vynálezu zahrnují široký rozsah terapeutických sloučenin. Některé individuální inhibitorové sloučeniny CETP užitečné v předkládaném vynálezu jsou popsány v následujících patentových přihláškách, přičemž každá je zde uváděna jako odkaz.

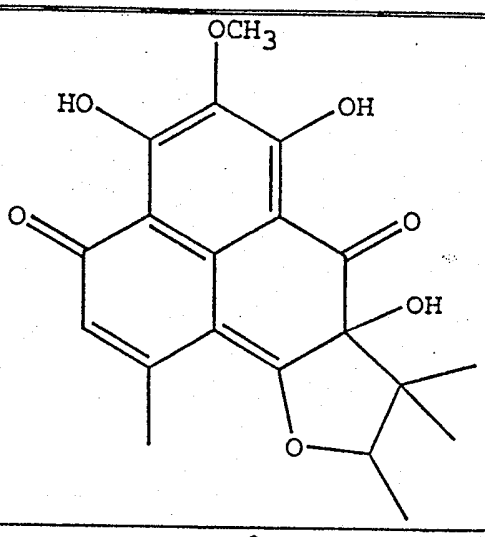
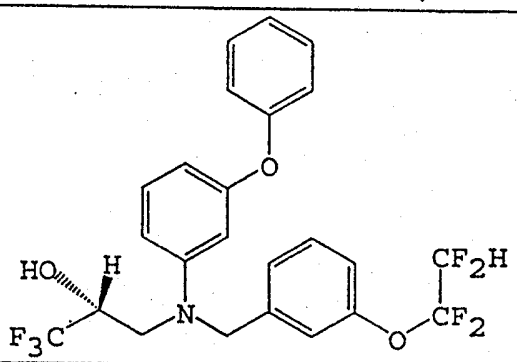
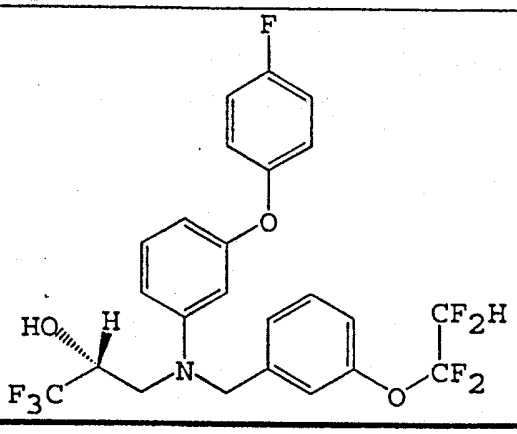
R9. US patentová přihláška pořadového čísla 60/101661.

R10. US patentová přihláška pořadového čísla 60/101711.
R11. US patentová přihláška pořadového čísla 60/101660.
R12. US patentová přihláška pořadového čísla 60/101664.
R13. US patentová přihláška pořadového čísla 60/101668.
R14. US patentová přihláška pořadového čísla 60/101662.
R15. US patentová přihláška pořadového čísla 60/101663.
R16. US patentová přihláška pořadového čísla 60/101669.
R17. US patentová přihláška pořadového čísla 60/101667.
R18. US patentová přihláška pořadového čísla 09/401916.
R19. US patentová přihláška pořadového čísla 09/405524.
R20. US patentová přihláška pořadového čísla 09/404638.
R21. US patentová přihláška pořadového čísla 09/404638.
R22. US patentová přihláška pořadového čísla 09/400915.
R23. US patent číslo 5 932 587.
R23. US patent číslo 5 925 645.

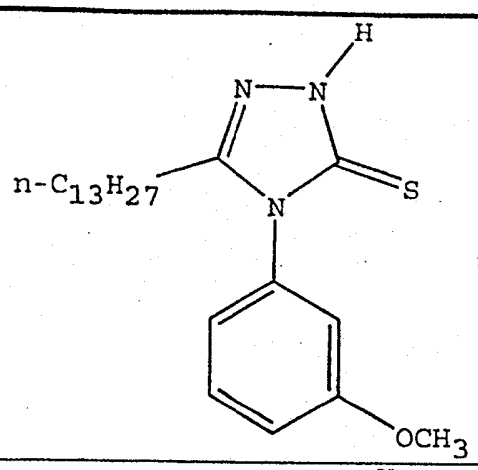
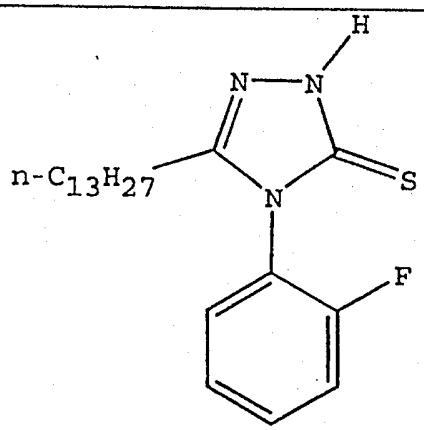
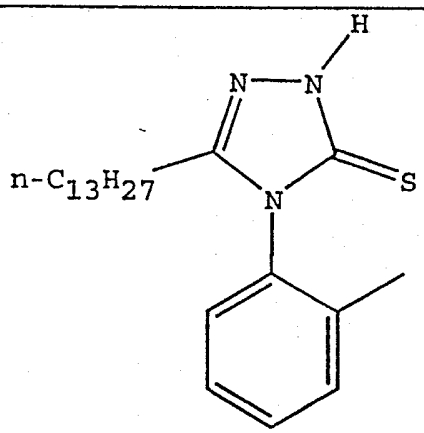
Zvlášť zajímavé sloučeniny jako inhibitory CETP v předkládaném vynálezu jsou uvedeny v tabulce 1, rovněž jejich diastereomery, enantiomery, racemáty, soli a tautomery inhibitorů CETP uvedených v tabulce 1.

10.09.01

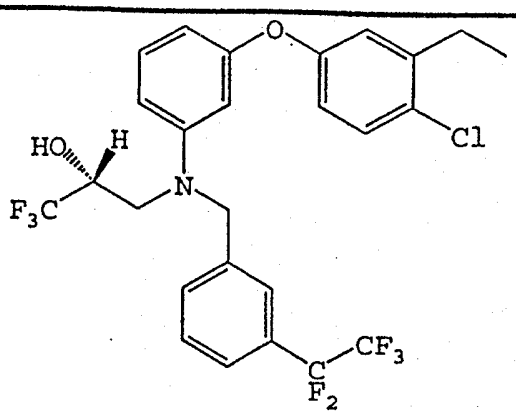
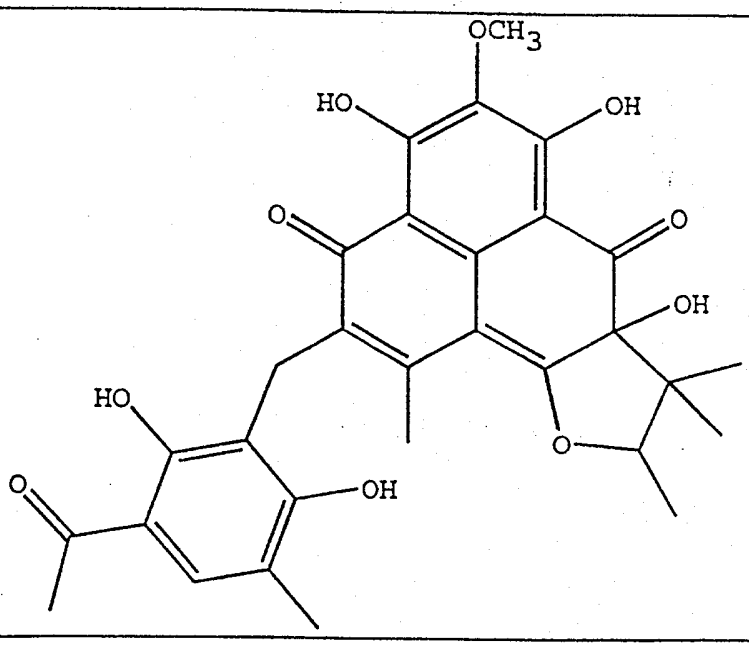
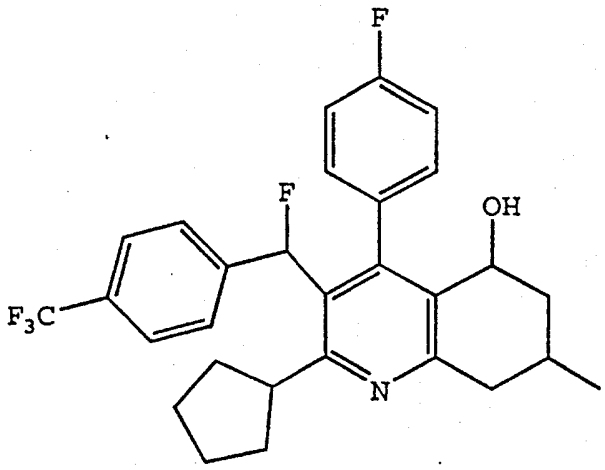
Tabulka 1

Sloučenina číslo	Struktura
C-1	
C-2	
C-3	

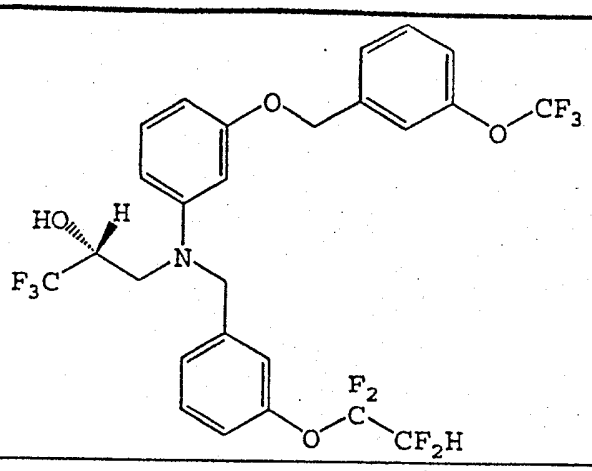
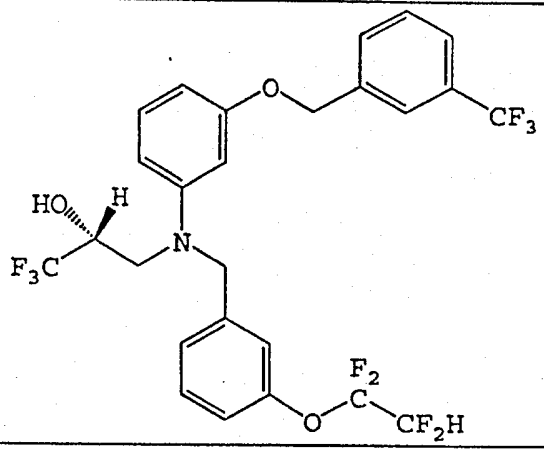
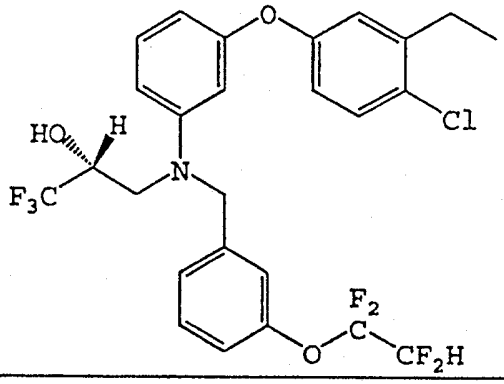
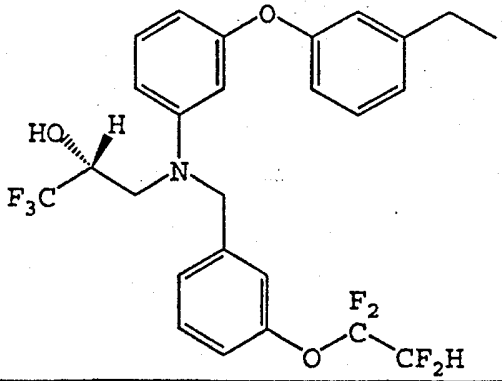
10.09.01

C-4	
C-5	
C-6	
C-7	

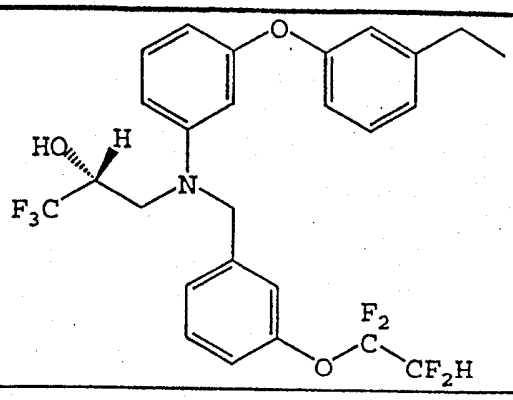
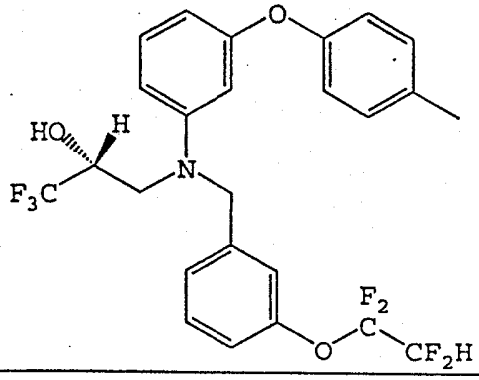
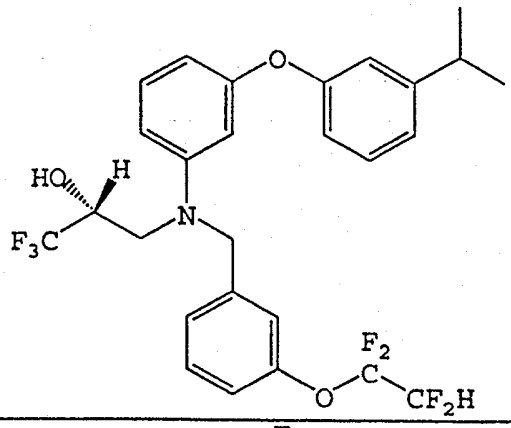
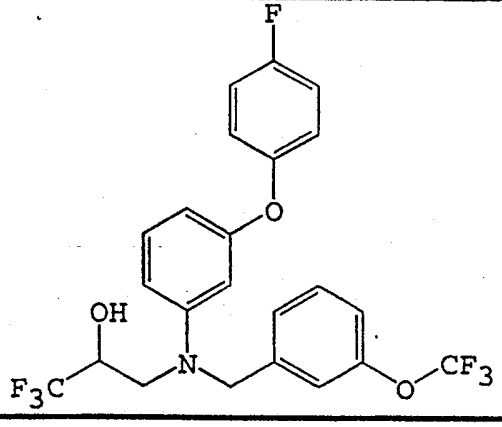
10.09.01

	
C-8	
C-9	

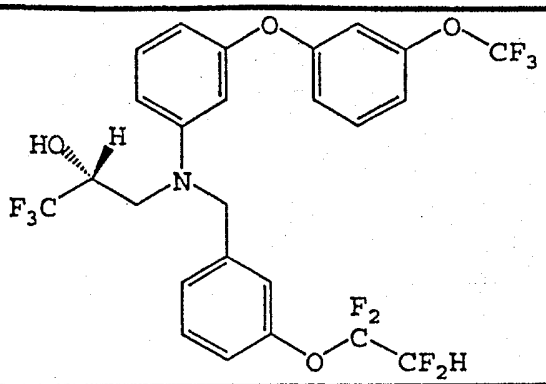
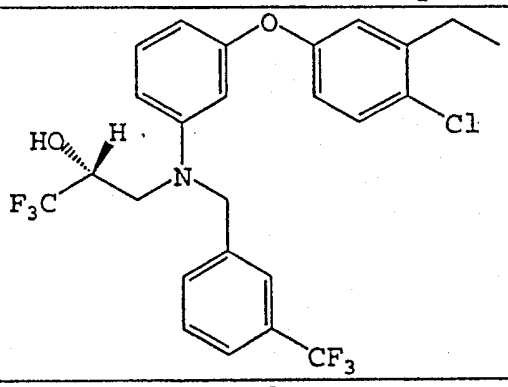
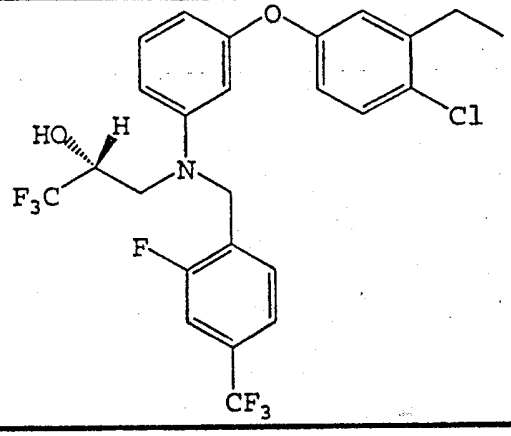
10-09-01

C-10	
C-11	
C-12	
C-13	

10.09.01

C-14	
C-15	
C-16	
C-17	

10.09.01

C-18	
C-19	
C-20	

Deriváty kyseliny fibrové užitečné v kombinacích a metodách podle předkládaného vynálezu zahrnují řadu struktur a funkčních skupin. Výhodné deriváty kyseliny fibrové podle vynálezu jsou popsány v tabulce 2. Terapeutické sloučeniny tabulky 2 se mohou použít v předkládaném vynálezu v řadě

forem, zahrnující formu kyseliny, formu soli, racemáty, enantiomery, obojetná činidla a tautomery. Individuální US patenty uváděné v tabulce 2 jsou zde uváděny jako odkaz.

Tabulka 2

Sloučenina č	Obecný název	Registrační číslo CAS	Odkaz na patent
G-41	Clofibrát	637-07-0	U.S. 3 262 850
G-70	Fenofibrát	49562-28-9	U.S. 4 058 552
G-38	Ciprofibrát	52214-84-3	U.S. 3 948 973
G-20	Bezafibrát	41859-67-0	U.S. 3 781 328
G-78	Gemfibrozil	25182-30-1	U.S. 3 674 836
G-40	Clinofibrát	69047-39-8	U.S. 3 716 583
6-24	Binifibrát	30299-08-2	BE 884 722

Sloučeniny (například deriváty kyseliny fibrové nebo sloučeniny inhibující CETP) užitečné podle předkládaného vynálezu nemusí mít žádný asymetrický atom uhlíku nebo alternativně, užitečné sloučeniny mohou obsahovat jeden nebo více asymetrických atomů uhlíku. Jestliže užitečné sloučeniny mají jeden nebo více asymetrických atomů uhlíku, zahrnují tak racemáty a stereoizomery, například diastereomery a enantiomery, jak v čisté formě, tak ve směsi. Tyto stereoizomery se mohou připravit za použití konvenčních technik, buď rekcí enantiomerních výchozích látek nebo separací izomerů sloučenin podle vynálezu.

Izomery mohou zahrnovat geometrické izomery, například izomery cis nebo trans přes dvojnou vazbu. Všechny tyto izomery jsou uvažovány jako sloučeniny podle předkládaného vynálezu vynálezu.

Sloučeniny užitečné podle vynálezu také zahrnují tautomery.

Sloučeniny užitečné podle předkládaného vynálezu, jak jsou uvedeny dále, také zahrnují jejich soli, solváty a proléčiva.

Dávkování, formulace a způsoby podávání

Prostředky podle vynálezu mohou být podávány při profylaxi nebo léčbě hyperlipidemických chorob nebo chorobných stavů jakýmkoliv způsobem, výhodně orálně, tak se zajistí kontakt těchto sloučenin s místem jejich účinku v těle, například v ileu, plazmě nebo játrech savců, například člověka.

Pro profylaxi nebo léčbu stavů popsaných výše mohou být sloučeniny užitečné v prostředcích a způsobech předkládaného vynálezu jako takové. Farmaceuticky přijatelné soli jsou zvláště vhodné pro léčebnou aplikaci, díky jejich větší rozpustnosti ve vodě vzhledem ke sloučeninám z nichž vznikly. Takové soli musí obsahovat farmaceuticky přijatelný anion nebo kation. Vhodné farmaceuticky přijatelné soli sloučenin podle vynálezu vznikající přidáním kyseliny, pokud je to možné, zahrnují soli anorganických kyselin jako je kyselina chlorovodíková, bromovodíková, fosforečná, metafosforečná, dusičná, sulfonová, sírová a organických kyselin jako octová, benzensulfonová, benzoová, citrónová, etansulfonová, fumarová, glukonová, glykolová, isothionová, mléčná, laktobionová, maleinová, jablečná, methansulfonová, jantarová, toluensulfonová, vinná a trifluoroctová. Chloridy jsou zvlášť výhodné pro léčebné účely. Vhodné farmaceuticky přijatelné bazické soli mohou zahrnovat amoniové soli, soli alkalických kovů jako sodné a draselné soli, soli kovů alkalických zemin jako hořečnaté a vápenaté soli.

Anionty podle vynálezu musí být samozřejmě také farmaceuticky přijatelné a jsou také vybrány z těch uvedených shora.

Sloučeniny podle vynálezu mohou být spolu s vhodným nosičem ve formě farmaceutické kompozice. Nosič musí být

samozřejmě vhodný ve smyslu kompatibility s dalšími složkami kompozice a nesmí být škodlivý pro příjemce. Nosič může být pevný nebo tekutý nebo oboje a je s výhodou formulován se sloučeninou jako jednotková dávková kompozice například tableta, která obsahuje od 0,05 hmotn. % do 95 % aktivní látky. Další farmaceuticky aktivní substance mohou být také přítomny, včetně ostatních sloučenin podle vynálezu. Farmaceutické prostředky podle vynálezu mohou být připraveny jakoukoliv známou farmaceutickou technikou zahrnující v podstatě přimíchání komponent.

Případně, kombinace podle předkládaného vynálezu může zahrnovat kompozici, obsahující sloučeninu na bázi derivátu kyseliny fibrové a sloučeninu inhibující CETP. V takové kompozici mohou být sloučenina na bázi kyseliny fibrové a sloučenina inhibující CETP přítomné v jednotkové dávkové formě, například jako pilulka, kapsle nebo kapalina, obsahující obě sloučeniny.

Tyto sloučeniny mohou být podávány jakýmkoliv běžným způsobem vhodným pro použití, ve spojení s farmaceutiky a to nejen jako individuální terapeutická sloučenina, ale i jako kombinace terapeutických sloučenin.

Množství sloučeniny, které je potřebné k dosažení požadovaného biologického účinku bude samozřejmě záležet na množství faktorů jako je výběr specifické sloučeniny, užití, pro jaké je zamýšlena, způsob podávání a klinický stav pacienta.

Celková denní dávka derivátu kyseliny fibrové může být obecně v rozsahu od okolo 1000 do okolo 3000 mg/den v jedné nebo rozdělených dávkách. Gemfibrozil nebo clinofibrát jsou například často podávány odděleně v dávce 1200 mg/den. Clofibrát se podává často v dávce 2000 mg/den. Binifibrát se podává často v dávce 1800 mg/kg.

U inhibitoru CETP činí celková denní dávka od okolo 0,01 do okolo 100 mg/kg tělesné hmotnosti/den, výhodně je mezi okolo 0,5 do okolo 20 mg/kg tělesné hmotnosti/den.

Denní dávka popsaná v předchozích odstavcích pro různé terapeutické sloučeniny může být podána pacientovi v jedné dávce nebo ve více přiměřených dávkách. Tyto menší dávky mohou být podávány 2 až 6-krát denně. Dávky mohou být ve formě nepřetržitého uvolňování účinné k získání požadovaných výsledků.

V případě farmaceuticky přijatelné soli, výše uvedená hmotnost se vztahuje k hmotnosti ekvivalentu kyseliny nebo ekvivalentu báze terapeutické sloučeniny odvozené ze soli.

Orální podávání kombinací podle vynálezu může zahrnovat formulace, dobře známé v oboru, k zajištění prodloužení nepřetržitého podávání léku do gastrointestinálního traktu za využití řady mechanizmů. Mezi takové mechanizmy patří, ale bez omezení, uvolňování z dávkové formy závislé na pH založené na změně pH v tenkém střevě, pomalá erose tablety nebo kapsle, retence v žaludku založená na fyzikálních vlastnostech formulace, bioadheze dávkové formy na mukózní vrstvu intenstinálního traktu, enzymatické uvolňování aktivního léku z dávkové formy. Pro některé terapeutické sloučeniny užitečné podle předkládaného vynálezu (například derivát kyseliny fibrové nebo inhibitor CETP) zamýšleným efektem je prodloužení periody o kterou je aktivní složka léku dopravena na místo účinku manipulací s lékovou formou. Enterosolventní formulace a enterosolventní formulace s řízeným uvolňováním spadají do rozsahu předkládaného vynálezu. Vhodné enterické povlaky jsou ftalát acetátcelulózy, ftalát polyvinylacetátu, ftalát hydroxypropylmetylcelulózy a aniontové polymery methakrylové kyseliny a metylester methakrylové kyseliny.

Kombinace podle předkládaného vynálezu se mohou dodávat orálně, jako pevné látky, polopevné látky nebo v kapalné formě. Pokud jsou v kapalné nebo polotuhé formě, mohou být

kombinace podle předkládaného vynálezu například ve formě kapaliny, sirupu nebo v želatinových tobolkách. V jednom provedení, kdy se použije inhibitor CETP v kombinaci podle předkládaného vynálezu, může být inhibitor CETP ve formě kapaliny, sirupu nebo v želatinové kapsli. V jiném provedení, kdy se použije derivát kyseliny fibrové v kombinaci podle předkládaného vynálezu, může být derivát kyseliny fibrové ve formě kapaliny, sirupu nebo může být obsažen v želatinové kapsli.

Pro inhibitor CETP může být intravenózně podaná dávka například v rozsahu od okolo 0,003 mg/kg tělesné hmotnosti do okolo 1,0 mg/kg tělesné hmotnosti, výhodně od okolo 0,01 mg/kg tělesné hmotnosti do okolo 0,75 mg/kg tělesné hmotnosti, výhodněji od 0,1 mg/kg tělesné hmotnosti do okolo 0,6 mg/kg tělesné hmotnosti.

Pokud se lék podává intravenózně, dávka může být například v rozmezí od okolo 100 mg/kg tělesné hmotnosti do okolo 2000 mg/kg tělesné hmotnosti, výhodně v rozsahu od okolo 300 mg/kg tělesné hmotnosti do okolo 1000 mg/kg tělesné hmotnosti, výhodněji od 400 mg/kg tělesné hmotnosti do okolo 750 mg/kg tělesné hmotnosti.

Dávka kterékoliv terapeutické sloučeniny může být obvykle podávána jako infuze od okolo 10 ng/kg tělesné hmotnosti do okolo 100 ng/kg tělesné hmotnosti za minutu. Infúzní kapaliny vhodné pro tyto účely mohou obsahovat například okolo od 0,1 ng do okolo 10 mg, s výhodou od okolo 1 ng do okolo 10 mg na mililitr. Dávková jednotka může obsahovat například od okolo 1 mg do 10 g sloučeniny podle předkládaného vynálezu. Ampule pro injekce mohou obsahovat například asi od 1 mg, do 100 mg.

Farmaceutické kompozice podle vynálezu zahrnují kompozice vhodné k orální, rektální, topické, bukální (například sublinguální) a parenterální (například subkutánní, intramuskulární, intradermální nebo intravenózní) aplikaci, nejvhodnější způsob podávání záleží na původu a vážnosti

chorobného stavu, který je léčen a na konkrétní sloučenině, která je použita. Ve většině případů je výhodné orální podávání.

Farmaceutické kompozice vhodné pro orální podávání mohou být jako diskrétní jednotky jako kapsle, oplatky, pastilky nebo tablety, kde každá obsahuje určené množství minimálně jedné sloučeniny podle vynálezu; jako je prášek nebo granule; jako roztoky nebo suspenze ve vodném nebo nevodném rozpouštědle; nebo jako emulze oleje ve vodě nebo vody v oleji. Jak je naznačeno, tyto kompozice mohou být vyrobeny jakoukoliv vhodnou farmaceutickou metodou, obsahující krok smísení aktivní látky nebo látek a nosiče (ten může být tvořen jednou nebo více přídavnými látkami). Obecně, kompozice jsou připraveny jednotným a bezprostředním přimísením aktivní sloučeniny k tekutému nebo jemné rozmělněnému pevnému nosiči nebo k oběma a poté, pokud je to nutné, vytvarováním produktu. Například tablety mohou být připraveny lisováním prášku nebo granulí sloučeniny, případně s jednou nebo více přídavnými látkami. Lisované tablety mohou být připraveny lisováním pomocí vhodného přístroje, kdy se sloučeniny ve volně tekoucí formě jako je prášek nebo granule případně smíchají s pojivem, mazadlem inertním rozpouštědlem a nebo povrchově aktivními či dispergujícími látkami. Tvarované tablety mohou být připraveny tvarováním pomocí vhodného přístroje, práškové sloučeniny zvlhčené inertním tekutým rozpouštědlem.

Farmaceutické kompozice vhodné pro bukální (sublinguální) podávání zahrnují pastilky obsahující sloučeninu podle vynálezu v chuťovém základu, obvykle sacharóze a arabské gumě nebo tragantu a pastilky obsahující sloučeninu v inertní matrici jako je želatina a glycerin nebo sacharóza a arabská guma.

Farmaceutické kompozice vhodné pro parenterální podávání vhodně zahrnují sterilní vodné přípravky sloučeniny podle vynálezu. Tyto přídavky jsou výhodně podávány intravenózně,

ačkoliv podání může být provedeno také jako subkutánní, intramuskulární nebo transdermální injekce. Takové přípravky mohou být pohodlně připraveny smísením sloučeniny s vodou a přípravou roztoku který je sterilní a isotonický s krví. Injektovatelné kompozice podle vynálezu obecně obsahují od 0,1 do 5 % hmot./hmot. sloučenin popsaných v tomto dokumentu.

Farmaceutické kompozice vhodné pro rektální podávání jsou výhodně připravovány jako čípky s jednotkou dávky. Ty mohou být připraveny smísením sloučeniny podle vynálezu s jedním nebo více vhodnými pevnými nosiči, jako je například kakaové máslo, a tvarováním vznikající směsi.

Farmaceutické kompozice vhodné pro topickou aplikaci na kůži jsou výhodně ve formě mastí, krémů, mlék, past, gelů, sprejů, aerosolů nebo olejů. Použité nosiče mohou obsahovat vaselinu z ropy, lanolin, polyetylén glykoly, alkoholy a kombinace dvou nebo více těchto látek. Aktivní sloučenina je obecně přítomna v koncentraci od 0,1 do 50 % hmotn./hmotn., například od 0,5 do 2 hmotn. %.

Možná je také transdermální aplikace. Farmaceutické kompozice vhodné pro transdermální aplikaci mohou být přítomny ve formě jednotlivých náplastí přizpůsobených k zajištění těsného kontaktu s epidermem příjemce po delší dobu. Tyto náplasti vhodně obsahují sloučeninu podle vynálezu, případně pufrovanou v jejím vodném roztoku, rozpuštěnou nebo dispergovanou v lepidle nebo dispergovanou v polymeru. Vhodná koncentrace aktivní sloučeniny je v rozmezí od okolo 1 % do okolo 35 % hmotnost/hmotnost, výhodně od okolo 3 do 15 %. Jako zvláštní možnost zůstává elektrotransport sloučeniny nebo iontoforéza, například jak je popsáno v Pharmaceutical Research, 3(6), 319 (1996).

Ve všech případech množství aktivní složky, která může být kombinována s nosiči za vzniku jednotkové dávkové formy k podávání, bude různé v závislosti na léčeném hostiteli a zvláště způsobu podávání.

Pevné dávkové formy pro orální podávání zahrnující kapsle, tablety, dražé, prášek a granule zmíněné výše obsahují jednu nebo více sloučenin podle vynálezu smíchanou s minimálně jedním inertním rozpouštědlem jako je sacharóza, laktóza nebo škrob. Tyto dávkové formy mohu také obsahovat, jak je v praxi normální, přídavné substance jiné než inertní ředidla, například lubrikační činidla jako je stearát hořečnatý nebo solubilizační činidla, jako jsou cyklodextriny. V případě kapslí, tablet, prášků, granulí, želatinových kapslí a dražé, dávková forma může také obsahovat pufrační činidla. Tablety a dražé mohou být navíc připraveny s enterickými povlaky.

Tekuté dávkové formy určené pro orální podání mohou zahrnovat farmaceuticky přijatelné emulze, roztoky, suspenze, sirupy a elixíry obsahující inertní rozpouštědla běžně používaná v oboru, jako je voda. Tyto kompozice mohou obsahovat také adjuvanty, jako zvlhčující činidla, emulgátory a suspenzní činidla, také sladidla, ochucovadla a parfémy.

Injektovatelné přípravky, například sterilní injektovatelné vodné nebo olejovité suspenze, mohou být formulovány podle znalostí v oboru s využitím vhodných dispergujících nebo přídavných činidel a suspendačních činidel. Sterilní injektovatelné preparáty mohou být sterilní injektovatelné roztoky nebo suspenze v netoxických a parenterálně přijatelných rozpouštědlech nebo ředidlech, například roztok v 1,3-butandiolu. Mezi přijatelné vehikuly a rozpouštědla patří voda, Ringerův roztok a izotonický roztok chloridu sodného. Navíc, sterilní, stálé oleje jsou běžně využívány jako rozpouštědla nebo suspenzní médium. Pro tyto účely může být použit jakýkoliv stálý nedráždivý olej, včetně mono - nebo diglyceridů. Využití při přípravě injekcí nalézají také mastné kyseliny jako kyselina olejová.

Farmaceuticky přijatelné nosiče zahrnují všechny zmíněné látky a podobně.

V kombinované terapii může být podávání dvou nebo více terapeutických činidel užitečných podle vynálezu postupné v jednotlivých formulacích nebo může být podáváno simultáně, podáváním jednotlivých nebo oddělených formulací. Podávání může·být prováděno orálně, intravenózně, intramuskulárně, nebo subkutánně injekcí. Formulace může být ve formě bolusu nebo ve formě vodného nebo nevodného isotonického sterilního injekčního roztoku nebo suspenze. Tyto roztoky a suspenze mohou být připraveny ze sterilního prášku nebo granulí obsahujících jeden nebo více farmaceuticky přijatelných nosičů nebo ředidel nebo pojidlo jako je želatina nebo hydroxypropylmethylcelulóza, společně s jedním nebo více lubrikačními, konzervačními, povrchově aktivními nebo dispergujícími činidly.

Farmaceutická kompozice pro orální aplikaci může být ve formě například tablet, kapslí, suspenzí nebo tekutin. Kapsle, tablety atd. mohou být připraveny konvenčními metodami dobře známými v oboru. Farmaceutické kompozice jsou výhodně vyráběny ve formě dávkových jednotek obsahujících specifické množství aktivní složky nebo složek. Příklady dávkových jednotek jsou tablety nebo kapsle. Ty mohou s výhodou obsahovat jednu nebo více terapeutických sloučenin v množství uvedeném shora. V případě inhibitoru CETP, dávka se může pohybovat v rozmezí od okolo 0,01 mg do okolo 500 mg nebo i jinak, záleží na specifickém inhibitoru, jak je v oboru známo. V případě derivátu kyseliny fibrové, dávka může být v rozsahu od okolo 0,01 mg do okolo 500 mg nebo i jinak, záleží na specifickém inhibitoru, jak je v oboru známo.

Aktivní složky mohou být také podávány injekcí, jako kompozice, kde jako vhodný nosič je použit například chlorid sodný, dextróza nebo voda. Vhodná denní dávka všech aktivních terapeutických sloučenin je taková, aby způsobila stejnou hladinu v krevním séru jako při orální aplikaci, jak je popsáno shora.

Terapeutické sloučeniny mohou být také podávány jakoukoliv kombinací aplikačních cest jako orálně/orálně, orálně/parenterálně nebo parenterálně/parenterálně.

Farmaceutické kompozice pro použití v léčebných metodách podle vynálezu mohou být podávány orálně nebo intravenózně. Výhodné je při kombinované terapii orální podávání. Dávkování pro orální podávání může být v režimu jedné denní dávky nebo jedné dávky za několik dnů nebo násobných rozdělených dávek během jednoho dne. Terapeutické sloučeniny, které jsou podstatou kombinované terapie mohou být podávány simultánně, nejen v kombinované dávkové formě, ale i ve formě jednotlivých dávkových formách zamýšlených hlavně pro simultánní orální podávání. Terapeutické sloučeniny, které jsou podstatou kombinované terapie mohou být podávány také následně, s každou terapeutickou sloučeninou podávanou v režimu nazvaném užívání ve dvou krocích. Režim podávání se může nazývat s následným podáváním, kdy jsou terapeutické sloučeniny užívány odděleně jako samostatné aktivní látky. Časový úsek mezi násobnými užívacími kroky může být v rozmezí několika minut do několika hodin., v závislosti na vlastnostech každé terapeutické sloučeniny, jako je síla, rozpustnost, biologická dostupnost, plasmatický poločas a kinetický profil terapeutické sloučeniny, účinek požité potravy a věk a stav pacienta. Optimální dávkový interval může být také ovlivněn změnou koncentrace cílové molekuly během dne. Terapeutické sloučeniny kombinované terapie, pokud jsou podávány simultánně, hlavně simultánně nebo následně, mohou zahrnovat režimy podávání jedné terapeutické sloučeniny orální cestou a druhé terapeutické sloučeniny intravenózně. Pokud jsou terapeutické sloučeniny kombinované terapie podávány orálně nebo intravenózně, odděleně nebo společně, každá taková sloučenina bude obsažena ve vhodné farmaceutické formulaci farmaceuticky přijatelných excipientů, ředidel nebo jiných formulačních komponent. Příklady vhodných farmaceuticky

přijatelných formulací obsahujících terapeutické sloučeniny pro orální podávání jsou uvedeny shora.

Léčebné režimy

Dávkovací režimy sloučenin a nebo kompozic podle vynálezu pro prevenci, ulehčení nebo zlepšení chorobných stavů s hyperlipidémií jako část choroby, například ateroskleróza, nebo pro zabránění nebo léčbu vysoké hladiny plazmového nebo krevního cholesterolu, jsou vybrány s ohlédnutím na řadu faktorů. Ty zahrnují typ, věk, hmotnost, pohlaví, životosprávu a lékařský stav pacienta, stupeň choroby, cestu podávání, farmakologická hlediska jako je aktivita, účinnost, farmakokinetika a toxikologický profil konkrétní použité sloučeniny, jestli je využít systém dodání léku a zde je sloučenina podávána jako část kombinace léků. Tak se použitý dávkovací režim může velice lišit od výhodných dávkovacích režimů uvedených shora.

Počáteční léčba pacienta s hyperlipidémií může začít režimem uvedeným výše. Léčba by měla obecně trvat jak je nutné po dobu několika týdnů až měsíců nebo roků dokud není hyperlipidemický stav kontrolován nebo eliminován. Pacienti léčení sloučeninami nebo kompozicemi popsanými v tomto dokumentu mohou být, za účelem určení účinnosti kombinované terapie, rutinně sledováni například měřením hladin sérového LDL a celkového cholesterolu jakoukoliv metodou známou v oboru. Kontinuální analýza takových dat dovoluje modifikaci léčebného režimu v průběhu terapie tak, aby bylo podáváno účinné množství každého typu inhibitoru v jakékoliv době a aby byla správně určena délka trvání léčby. V tomto případě, léčebný režim či dávkovací rozvrh může být rozumně modifikován v průběhu terapie tak, aby bylo podáváno minimální množství terapeutických sloučenin, které společně vykáží uspokojující

účinnost, a aby toto podávání trvalo pouze dobu nezbytně nutnou k léčbě hyperlipidemických stavů.

Potenciální výhodou kombinační terapie popsané v tomto dokumentu může být snížení množství jakékoliv individuální terapeutické sloučeniny nebo všech terapeutických sloučenin, účinných v léčbě hyperlipidemických stavů jako je ateroskleróza a hypercholesterolémie.

Jedno z několika provedení předkládaného vynálezu zahrnuje kombinační terapii, zahrnující použití prvního množství inhibitoru CETP a druhého množství dalšího kardiovaskulárního terapeuticky účinného léčiva k profylaxi a léčbě hyperlipidemie nebo aterosklerózy, kde množství uvedených látek dohromady zahrnuje antihyperlipidemicky účinné množství a antiatherosklerotický účinné množství uvedených sloučenin. Například jedno z mnoha provedení vynálezu je kombinační terapie zahrnující terapeutické dávky sloučeniny derivátu kyseliny fibrové a inhibitoru CETP.

Provedení podle předkládaného vynálezu může zahrnovat kombinační terapii užívající dvě nebo více sloučenin popsaných v tomto dokumentu. Kombinační terapie může zahrnovat dvě nebo více terapeutických sloučenin z různých chemických tříd, například deriváty kyseliny fibrové mohou být terapeuticky kombinovány s inhibitory CETP. Terapeutické kombinace mohou zahrnovat více než dvě terapeutické sloučeniny. Například terapie může zahrnovat použití derivátu kyseliny fibrové, inhibitor CETP a inhibitor HMG CoA reduktázy. Alternativně mohou dvě nebo více terapeutických sloučenin ze stejné chemické třídy zahrnovat terapii, například kombinační terapii zahrnující dva nebo více derivátů kyseliny fibrové nebo dva nebo více inhibitorů CETP.

Další provedení předkládaného vynálezu zahrnuje použití kterékoliv kombinační terapie popsané v tomto dokumentu pro profylaxi nebo léčbu hypercholesterolemie, aterosklerózy nebo hiperlipidemie.

10.09.01

Následující příklady jsou uvedeny pouze pro ilustraci a v žádném případě neomezují rozsah předkládaného vynálezu.

Příklady provedení vynálezu

Tabulka 3 ilustruje příklady některých kombinací předkládaného vynálezu, kde kombinace zahrnuje první množství inhibitoru CETP a druhé množství derivátu kyseliny fibrové, kde množství uvedených látek dohromady zahrnuje antihyperlipidemicky účinné množství nebo antiaterosklerotický účinné množství uvedených sloučenin.

Tabulka 3

Příklad číslo	Složka 1	Složka 2
1	C-1	clofibrát
2	C-2	clofibrát
3	C-3	clofibrát
4	C-4	clofibrát
5	C-5	clofibrát
6	C-6	clofibrát
7	C-7	clofibrát
8	C-8	clofibrát
9	C-9	clofibrát
10	C-10	clofibrát
11	C-11	clofibrát
12	C-12	clofibrát
13	C-13	clofibrát
14	C-14	clofibrát
15	C-15	clofibrát
16	C-16	clofibrát
17	C-17	clofibrát
18	C-18	clofibrát

10.09.01

19	C-19	clofibrát
20	C-20	clofibrát
21	C-1	fenofibrát
22	C-2	fenofibrát
23	C-3	fenofibrát
24	C-4	fenofibrát
25	C-5	fenofibrát
26	C-6	fenofibrát
27	C-7	fenofibrát
28	C-8	fenofibrát
29	C-9	fenofibrát
30	C-10	fenofibrát
31	C-11	fenofibrát
32	C-12	fenofibrát
33	C-13	fenofibrát
34	C-14	fenofibrát
35	C-15	fenofibrát
36	C-16	fenofibrát
37	C-17	fenofibrát
38	C-18	fenofibrát
39	C-19	fenofibrát
40	C-20	fenofibrát
41	C-1	ciprofibrát
42	C-2	ciprofibrát
43	C-3	ciprofibrát
44	C-4	ciprofibrát
45	C-5	ciprofibrát
46	C-6	ciprofibrát
47	C-7	ciprofibrát
48	C-8	ciprofibrát
49	C-9	ciprofibrát
50	C-10	ciprofibrát
51	C-11	ciprofibrát

10.09.01

52	C-12	ciprofibrát
53	C-13	ciprofibrát
54	C-14	ciprofibrát
55	C-15	ciprofibrát
56	C-16	ciprofibrát
57	C-17	ciprofibrát
58	C-18	ciprofibrát
59	C-19	ciprofibrát
60	C-20	ciprofibrát
51	C-1	bezafibrát
62	C-2	bezafibrát
63	C-3	bezafibrát
64	C-4	bezafibrát
65	C-5	bezafibrát
66	C-6	bezafibrát
67	C-7	bezafibrát
68	C-8	bezafibrát
69	C-9	bezafibrát
70	C-10	bezafibrát
71	C-11	bezafibrát
72	C-12	bezafibrát
73	C-13	bezafibrát
74	C-14	bezafibrát
75	C-15	bezafibrát
76	C-16	bezafibrát
77	C-17	bezafibrát
78	C-18	bezafibrát
79	C-19	bezafibrát
80	C-20	bezafibrát
81	C-1	gemfibrozil
82	C-2	gemfibrozil
83	C-3	gemfibrozil
84	C-4	gemfibrozil

10.09.01

85	C-5	gemfibrozil
86	C-6	gemfibrozil
87	C-7	gemfibrozil
88	C-8	gemfibrozil
89	C-9	gemfibrozil
90	C-10	gemfibrozil
91	C-11	gemfibrozil
92	C-12	gemfibrozil
93	C-13	gemfibrozil
94	C-14	gemfibrozil
95	C-15	gemfibrozil
96	C-16	gemfibrozil
97	C-17	gemfibrozil
98	C-18	gemfibrozil
99	C-19	gemfibrozil
100	C-20	gemfibrozil
101	C-1	clinofibrát
102	C-2	clinofibrát
103	C-3	clinofibrát
104	C-4	clinofibrát
105	C-5	clinofibrát
106	C-6	clinofibrát
107	C-7	clinofibrát
108	C-8	clinofibrát
109	C-9	clinofibrát
110	C-10	clinofibrát
111	C-11	clinofibrát
112	C-12	clinofibrát
113	C-13	clinofibrát
114	C-14	clinofibrát
115	C-15	clinofibrát
116	C-16	clinofibrát
117	C-17	clinofibrát

10.09.01

118	C-18	clinofibrát
119	C-19	clinofibrát
120	C-20	clinofibrát
121	C-1	binifibrát
122	C-2	binifibrát
123	C-3	binifibrát
124	C-4	binifibrát
125	C-5	binifibrát
126	C-6	binifibrát
127	C-7	binifibrát
128	C-8	binifibrát
129	C-9	binifibrát
130	C-10	binifibrát
131	C-11	binifibrát
132	C-12	binifibrát
133	C-13	binifibrát
134	C-14	binifibrát
135	C-15	binifibrát
136	C-16	binifibrát
137	C-17	binifibrát
138	C-18	binifibrát
139	C-19	binifibrát
140	C-20	binifibrát

Biologické testy

Užitečnost kombinací podle vynálezu je ukázána v následujících testech. Tyto testy jsou prováděny in vitro a na zvířecích modelech hlavně využívající postupy určené k ukázání užitečnost sloučenin podle vynálezu.

In vitro test sloučenin, které inhibují IBAT-zprostředkované vstřebávání (^{14}C)-taurocholátu (TC) H14 buňkami

Buňky ledvin mladých křečků transfektované cDNA lidských IBAT (H14 buňky) jsou naočkovány v počtu 60 000 buněk na jamku do 96 jamkových Top-Count destiček tkáňových kultur pro testy prováděné 24 hodin po naočkování, 30 000 buněk na jamku pro testy prováděny během 48 hodin a 10 000 buněk na jamku pro testy prováděné během 72 hodin.

V den testu se monovrstva buněk jemně promyje jednou 100 µl testovacího pufru (Dulbeccovo Modifikované Eagleovo médium s 4,5 g na litr glukózy + 0,2 % (hmotn./obj.) albuminu z hovězího séra prostého mastných kyselin (FAF)BSA). Do každé jamky se přidá 50 µl dvojnásobného koncentrátu testované sloučeniny v testovacím pufru a 50 µl 6 mM (^{14}C)-taurocholátu v testovacím pufru (konečná koncentrace (^{14}C)-taurocholátu je 3 mM). Buněčné kultury jsou inkubovány dvě hodiny při teplotě 37 °C, potom se každá jamka dvakrát jemně promyje 100 µl Dulbeccova fosfátového fyziologického roztoku (PBS) vychlazeným na teplotu 4 °C, obsahujícím 0,2 %, (hmotn./obj.) (FAF)BSA. Jamky jsou potom jemně promyty jedenkrát 100 µl PBS o teplotě 4 °C bez (FAF)BSA. Do každé jamky se přidá 200 µl tekutého scintilačního média, plotny jsou tepelně uzavřeny a míchány po dobu 30 minut při teplotě okolí a potom se měří množství radioaktivity v každé jamce s využitím přístroje Packard Top-Count.

In vitro test sloučenin, které inhibují vstřebávání (^{14}C)-alaninu

Test pro vstřebávání alaninu je prováděn stejným způsobem jako taurocholátový test, s výjimkou, že označený taurocholát nahrazuje označený alanin.

In vivo test sloučenin, které u krys inhibují ileální vstřebávání (^{14}C)-taurocholátu do žluči

(viz. „Meatabolism of 3α, 7β-dihydroxy-7α-methyl-5β-cholanoic acid and 3α, 7β-dihydroxy-7α-metyl-5β-cholanoic acid in hamsters" in Biochimica et Biophysica Acta 833 (1985) 196-202 by Une a kol.)

Samci krys wistar (200-300 g) jsou podrobeny anestézii látkou inactin 100 mg/kg. Do žlučovodů se zavede kanyla PE10, délka 10". Tenké střevo je vyjmuto a položeno na gázovou podložku. Kanyla (1/8" uzávěr, kuželovitý vnější adaptor) je vložena 12 cm od spojení tenkého střeva se slepým střevem. Řez je veden 4 cm od toho stejného spoje (využívá se 8 cm střeva). Střevní segment se propláchne 20 ml teplého Dulbeccova fosfátového pufrovaného solného roztoku (PBS), pH 6,5. Do distálního otevření je zavedena kanyla se silikonovou trubičkou o délce 20 cm (0,02" I.D. x 0,037" O.D.). Proximální kanyla je připojena k peristaltické pumpě a střevo se promývá 20 minut teplým PBS průtokem 0,25 ml/min. Teplota střevního segmentu se kontinuálně monitoruje. Na začátku experimentu se do střevního segmentu nadávkují 2,0 ml kontrolního vzorku ((^{14}C)-taurocholátu @ 0,05 mCi/ml s 5 mM studeným taurocholátem) injekční stříkačkou o obsahu 3 ml a začnou se odebírat vzorky žluči. Kontrolní vzorek se zavádí infúzí rychlostí 0,25 ml/min po dobu 21 minut. Vzorky frakcí žluči jsou odebírány každé tři minuty po dobu prvních 27 minut procedury. Po 21 minutách infúze vzorku se ileální smyčka vymyje 20 ml teplého PBS (s použitím stříkačky 30 ml), potom se smyčka promývá 21 minut teplým PBS průtokem 0,25 ml/min. Druhá perfuze se provede způsobem uvedeným výše, ale tentokrát s testovanou sloučeninou, která je podávána společně (21 minut podávání následované 21 minutou promývání), a odebírají se vzorky žluči každé 3 minuty po dobu prvních 27 minut. Pokud je

10.09.01

to nutné, provede se třetí perfuze stejným způsobem, ta obvykle obsahuje kontrolní vzorek.

Měření koncentrace jaterního cholesterolu (HEPATIC CHOL)

Jaterní tkáň se zváží a zhomogenizuje ve směsi chlorform:metanol (2:1). Po homogenizaci a odstředění se supernatant oddělí a pod proudem dusíku se suší. Zbytek se rozpustí izopropanolu a obsah cholesterolu se stanoví enzymaticky s využitím kombinace cholesteroloxidázy a peroxidázy, viz. Allain, C. A., a kol. (1974) Clin. Chem. 20, 470.

Měření aktivity jaterní HMG Co-A reduktázy (HMG COA)

Homogenizací jaterních vzorků v pufru fosfát/sacharóza a následným odstředěním se získají jaterní mikrozómy. Konečný sediment se resuspenduje v pufru a alikvot se testuje na HMG Co-A reduktázovou aktivitu inkubací 60 minut při 37 °C za přítomnosti ^{14}C-HMG Co-A reduktázových-CoA (Dupont-NEN). Reakce se ukončí přidáním 6N HCl a následným odstředěním. Alikvot supernatantu se separuje TLC a skvrna odpovídající produktu se vyškrábne z plátu, extrahuje se a změří se radioaktivita na scintilačním čítači. (viz. Akerlund, J. and Bjorkhem, I. (1990) J. Lipid Res. 31, 2159).

Stanovení sérového cholesterolu (SER. CHOL., HDL-CHOL, TGI a VLDL + LDL)

Celkový sérový cholesterol (SER. CHOL.) se stanovuje enzymaticky s využitím komerční soupravy od firmy Wako Fine Chemicals (Richmond, VA); Cholesterol C11, č. katalogu 276-64909. HDL cholesterol (HDL-CHOL) se stanovuje použitím stejné soupravy po vysrážení VLDL a LDL s reagentem Sigma Chemical

10.09.01

Co. HDL Cholesterol katalog č. 352-3 (dextransulfátová metoda). Celkové sérové triglyceridy (TGI) jsou stanoveny enzymaticky použitím Sigma Chemical Co. GPO-Trinder, katalog č. 337-B. VLDL a LDL (VLDL + LDL) cholesterolové koncentrace jsou vypočítány jako rozdíl mezi celkovým a HDL cholesterolem.

Stanovení jaterní cholesterol 7-α-hydroxylázové aktivity (7α-Ohase)

Homogenizací jaterních vzorků v pufru fosfát/sacharóza a následným odstředěním se získají jaterní mikrozómy. Konečný peletovaný materiál se resuspenduje v pufru a alikvot se testuje na cholesterol 7-α-hydroxylázovou aktivitu, inkubací 5 minut při teplotě 37 °C v přítomnosti NADPH. Suspenze se potom extrahuje petroleum etherem, organické rozpouštědlo se odpaří a zbytek se znovu rozpustí ve směsi acetonitril/metanol. Enzymatický produkt se separuje injekcí alikvotu extraktu do C18 HPLC kolony s obrácenými fázemi a měří se eluovaný materiál za použití UV detekce při 240 nm. (viz. Horton, J. D., a kol. (1994) J. Clin. Invest. 93, 2084).

Stanovení koncentrace fekálních žlučových kyselin (FBA)

Fekálie samostatně chovaných křečků se sbíraly každých 24 nebo 48 hodin, vysušily se pod proudem dusíku, rozdrtily se na prášek a zvážily. Bylo odváženo přibližně 0,1 g a extrahováno do organického rozpouštědla (butanol/voda). Po separaci a sušení byl zbytek rozpuštěn v metanolu a množství žlučových kyselin bylo stanovováno enzymaticky s využitím 3α-hydroxysteroid steroid dehydrogenázy reakcí se žlučovými kyselinami redukujícími NAD. (viz. Mashige, F., a kol. (1981) Clin. Chem. 27, 1352).

10.09.01

Vstřebávání (^{3}H)taurocholátu v králičích membránových vezikulech kartáčového lemu (BBMV)

Králičí ileální membrány kartáčového lemu byly připraveny ze zmrzlé ileální mukózy pomocí vápníkové precipitace popsané Malathi a kol. (Biochimica Biophysica Acta, 554, 259 (1979)). Metoda pro měření taurocholátu se v podstatě převzala z práce Kramer a kol. (Biochimica Biophysica Acta, 1111,93 (1992)) mimoto, že bylo použito 200 µl testovaného vzorku místo uváděných 100 µl. Stručně, při pokojové teplotě se 190 µl roztoku obsahujícího 2 µM (^{3}H)taurocholátu (0,75 µCi), 20 mM tris, 100 mM NaCl, 100 mM manitol pH 7,4 inkubovalo 5 sekund s 10 µl membránových vezikulů kartáčového lemu (60-120 µg proteinu). Inkubace začala přídavkem BBMV za víření a reakce se ukončila přídavkem 5 ml ledem vychlazeného pufru (20 mM Hepes-tris, 150 mM KCl) a bezprostředně následovanou filtrací přes nylonový filtr (póry 0,2 µm) a dalším promytím 5 ml ukončovacího pufru.

Acyl-CoA; cholesterol acyl transferáza (ACAT)

Křeččí jaterní a krysí intenstinální mikrozómy byly připraveny z tkání postupem popsaným výše (J. Biol. Chem. 255, 9098, (1980)) a využily jako zdroj ACAT enzymu. Test se sestával z inkubace 2 ml obsahujících 24 µM Oleoyl-CoA (0,05 µCi) v 50 mM fosforečnanu sodném, 2 mM DTT pH 7,4 pufru obsahujícím 0,25 % BSA a 200 µg mikrozomálního proteinu. Test byl inicializován přídavkem Oleoyl-CoA. Reakce probíhala 5 minut při 37 °C a byla ukončena přídavkem 8,0 ml směsi chloroform/metanol (2:1). K extrakci bylo přidáno 125 µg cholesteroloeátu ve směsi chloroform/metanol jako nosiče, organická a vodná fáze byly odděleny odstředěním emulze vzniklé intenzívním promícháváním vířením. Chloroformová fáze

10.09.01

byla vysušena, nanesena na silikagelovou destičku 60 TLC a vyvolána ve směsi hexan/ethylether (9:1). Množství vytvořeného cholesterol esteru bylo kvantifikováno měřením množství radioaktivity zainkorporované do skvrny odpovídající cholesteroloeátu na TLC destičce pomocí Packard Instaimager.

Hodnocení léčiv na snížení lipidů u psů

Samcům psů beagle, získaných z Marshallových farem o hmotnosti 6 až 12 kg se podává strava jednou denně po dobu dvou hodin, přičemž vodu mají k dispozici dle libosti. Psi se náhodně rozdělí do skupin obsahující 6 až 12 psů a dávkuje se: vehikulum i.g.; 1 mg/kg, i.g.; 2 mg/kg, i.g.; 4 mg/kg, i.g.; 2 mg/kg p.o. (prášek v kapsli). Intragastrická dávka terapeutického materiálu je rozpuštěna ve vodném roztoku (například 0,2% Tween 80 [polyoxyethylenmonooleát, Sigma Chemical Co., St. Lois, MO]) se může podat za použití žaludeční sondy. Před začátkem dávkování se odeberou ráno před podáním stravy z cefalické vény vzorky krve, aby se stanovila úroveň cholesterolu v séru (celkový a HDL) a triglyceridy. Po několik po sobě jdoucích dnů je ráno podána zvířatům před krmením dávka sloučeniny. Zvířata mají k dispozici potravu 2 hodiny. Po dobu 2 dnů kdy zkouška končí se sbírají výkaly, aby mohla být provedena analýza kyseliny žlučové a stanoven obsah lipidů. Ke konci léčebné periody se také odeberou vzorky krve k porovnání k úrovním lipidů před zkouškou. Statistická hodnota bude určena za použití standardního Studentova T-testu s $p < 0,05$.

Měření obsahu lipidů v séru u psů

Krev se sebere z cefalické vény hladových psů do sérových separačních zkumavek (Vacutainer SST, Becton Dickinson a Co.,

Franklin Lakes, NJ). Krev se odstřeďuje při 2000 ot./min po dobu 20 minut a sérum se dekantuje.

Celkový cholesterol se může měřit v 96 jamkové enzymatické diagnostické soupravě Wako (Cholesterol CII) (Wako Chemicals, Richmond, VA) za využití cholesterol oxidázové reakce k produkci peroxidu vodíku, který se měří kolorimetricky. V prvních dvou sloupcích plotny se připraví standardní křivka od 0,5 do 10 µg cholesterolu. Do oddělených jamek se duplikátně přidají vzorky séra (20 až 40 µl, v závislosti na očekávané koncentraci lipidů) nebo vzorky kontrolního séra. Do každé jamky se přidá voda k doplnění objemu na 100 µl. Do každé jamky se přidá 100 µl alikvotu barviva a provede se odečet při 500 nm po 15 minutách inkubace při 37 °C.

HDL cholesterol se může zkoumat za použití soupravy Sigma č. 352-3 (Sigma Chemical Co., St Louis, MO), která využívá ke srážení LDL a VLDL dextransulfátu a iontů Mg. Do jednotlivých zkumavek se přidá 150 µl vzorku séra a poté 15 µl reakčního činidla na cholesterol HDL (Sigma 352-3). Vzorky se smísí a odstředí se při 5000 ot./min po dobu 5 minut. Potom se 50 µl alikvotu supernatantu smísí s 200 µl fyziologického roztoku a provede se analýza stejným způsobem jako při měření celkového cholesterolu.

Triglyceridy se měří za použití soupravy Sigma č. 337 v 96 jamkové plotně. Změří se glycerol uvolněný reakcí triglyceridů s lipoproteinovou lipázou. K získání standardní křivky se použijí standardní roztoky glycerolu (Sigma 339-11) v rozsahu 1 až 24 µg. Do každé jamky se duplikátně přidají vzorky séra (20 až 40 µl, v závislosti na očekávané koncentraci lipidů). K doplnění objemů jamky na 100 µl se přidá voda a potom 100 µl barviva. Po smísení a 15 minutové inkubaci se hodnoty odečtou při 540 nm a ze standardní křivky se vypočtou triglyceridy. Pro případnou korekci na endogenní glycerol ve vzorcích séra se provede slepý pokus s enzymovým činidlem.

10.09.01

Měření kyseliny žlučové ve výkalech u psa

Za účelem měření koncentrací fekální žlučové kyseliny FBA) se seberou od každého živočicha výkaly. Vzorky se odebírají během posledních 48 hodin pokusu po dvě po sobě jdoucí 24 hodinové periody mezi 9,00 a 10,00 dopoledne, před dávkováním a krmením. Oddělené dvoudenní odběry od každého zvířete se zváží, spojí a homogenizují se s destilovanou vodou v zařízení (Cuisinart) k vytvoření homogenní kaše. Přibližně 1,4 g homogenátu se extrahuje ve směsi 50% terciární butanol/destilovaná voda (2:0,6) po dobu 45 minut ve vodní lázni 37 °C a odstřeďuje se 13 minut při 2000xg. Koncentrace žlučových kyselin (mol/den) se může stanovit za použití 96-jamkového enzymatického zkušebního systému (1,2). 20 µl alikvotu fekálního extraktu se přidá do dvou oddělených sad, přičemž každá obsahuje trojnásobné jamky v 96-jamkové plotně. Za účelem kontroly kvality zkoušky se provede analýza standardního taurocholátu sodného a standardního fekálního extrakčního roztoku (předem připraven ze spojených vzorků charakterizovaných koncentrací kyseliny žlučové). Dvacetimikrolitrové alikvoty taurochlorátu sodného, postupně ředěné k vytvoření standardní křivky se přidají ke dvěma sadám trojnásobných jamek. Do každé jamky se přidá 230 µl reakční směsi obsahující 1M hydrazinhydrát, 0,1M pyrofosforečnan a 0,46 mg/ml NAD. Potom se do jedné ze dvou sad trojnásobků přidá 50 µl alikvotu 3α-hydroxysteroidního dehydrogenázového enzymu (HSD; 0,8 jednotek/ml) nebo zkušební pufr (0,1 M pyrofosforečnan sodný). Všechny reakční složky se mohou získat od Sigma Chemical Co., St. Louis, MO. Po 60 minutách inkubace při teplotě místnosti se měří optická hustota při 340 nm a vypočte se průměr každé sady trojnásobných vzorků. Rozdíl v optické hustotě ± HSD enzym se použije ke stanovení koncentrace kyseliny žlučové (mM) každého vzorku vzhledem ke standardní křivce taurocholátu sodného. Pro každé zvíře se

10.09.01

použije koncentrace kyseliny žlučové v extraktu, hmotnost fekálního homogenátu (gramy) a tělesná hmotnost zvířete k výpočtu odpovídající koncentrace FBA v mmol/kg/den. Střední koncentrace FBA (mmol/kg/den) skupiny s vehikulem se odečte z koncentrací léčené skupiny, aby se stanovilo zvýšení (hodnota delta) v koncentraci FBA jako výsledek léčby.

Zkouška na aktivitu CETP v lidské plazmě (tritiovaný cholesterylester)

Krev se získá od zdravých dobrovolníků. Krev se sebere do zkumavek, obsahujících EDTA (rezerva plazmy EDTA). Rezerva lidské plazmy EDTA, skladovaná při -20 °C se roztaví při teplotě místnosti a odstřeďuje se 5 minut k odstranění pevných částic. K plazmě se přidá tritiovaný HDL, radioznačený v cholesterylové esterové části ([^{3}H]CE-HDL) jak popsali Morton a Zilversmit (J. Biol. Chem., 256, 11992-95 (1981)) na finální koncentraci 25 µg /ml cholesterolu. K plazmě se přidají inhibitorové sloučeniny: Stejné objemy plazmy obsahující ([^{3}H]CE-HDL (396 µl) se přidají pipetou do mikrozkumavek (Titertube®, Bio-Rad laboratories, Hercules, CA)). Sloučeniny, obvykle rozpuštěné jako 20-50 mM zásobní roztoky v DMSO se postupně zředí v DMSO (nebo v některých případech alternativním rozpouštědle, jako je dimethylformamid nebo ethanol). Do každé zkumavky s plazmou se přidají 4 µl každého ředění inhibitorových sloučenin nebo samotný DMSO. Zkumavky se ihned promíchají. Trojnásobné alikvoty (100 µl) z každé zkumavky se potom přenesou do 96-jamkových polystyrenových mikrotitračních ploten s kulatým dnem (Corning, Corning, NY). Plotny se utěsní plastickým filmem a inkubují se při 37 °C po dobu 4 hodin. Testované jamky obsahují plazmu s příslušným naředěním inhibitorové sloučeniny. Kontrolní jamky obsahují plazmu se samotným DMSO. Slepé jamky obsahují plazmu se samotným DMSO, které se nechají inkubovat v mirozkumavkách při

10.09.91

4 °C po dobu 4 hodin a přidají se do mikrotitračních jamek ke konci inkubační periody. VLDL a LDL se vysráží přidáním 10 µl srážecího činidla (1% (hmotnost/objem) dextransulfát (Dextralip50)/0,5 M chlorid hořečnatý, pH 7,4). Obsah jamek se smísí plotnovým mixérem a potom se inkubuje při teplotě okolí po dobu 10 minut. Plotny se potom odstředí při 1000 x g po dobu 30 minut při teplotě 10 °C. Supernatanty (50 µl) z každé jamky se potom přenesou do Picoplate™ (plotny s 96 jamkami, Packard, Meriden, CT) obsahující 250:1 Microscint™-40 (Packard, Meriden, CT). Plotny se potom za tepla utěsní (TopSeal™-P, Packard, Meriden, CT) podle návodu výrobce a míchají se 30 minut. Radioaktivita se měří na scintilačním čítači pro plotny (TopCount, Packard, Meriden, CT). Hodnoty IC_{50} jsou koncentrace inhibitorové sloučeniny inhibující přenos [^{3}H]CE ze supernatantu [^{3}H]CE-HDL do sraženého VLDL a LDL na 50 % ve srovnání s přenosem získaným v kontrolních jamkách. Maximální procentový přenos (v kontrolních jamkách) se určí podle následující rovnice:

$$\% \text{ přenosu} = \frac{[dpm_{\text{slepý pokus}} - dpm_{\text{kontrola}}] \times 100}{dpm_{\text{slepý pokus}}}$$

Procenta přenosu v jamkách obsahujících inhibitorové sloučeniny se stanoví následovně:

$$\% \text{ kontroly} = \frac{[dpm_{\text{slepý pokus}} - dpm_{\text{test}}] \times 100}{dpm_{\text{slepý pokus}} - dpm_{\text{kontrola}}}$$

Hodnoty IC_{50} se určí z grafů % kontroly vůči koncentraci inhibitorové sloučeniny.

CETP aktivita in vitro

Schopnost sloučenin inhibovat aktivitu CETP se zjišťuje za použití in vitro zkoušky, při které se měří rychlost přenosu radioznačeného cholesterylového esteru ([^{3}H]CE) z HDL donorových částic k LDL akceptorovým částicím. Podrobnosti této zkoušky popsali Glenn a kol. (Glenn a Melton, „Quantification of Cholesteryl Ester Transfer Protein (CETP): A) CETP Activity and B) Immunochemical Assay of CETP Protein," Meth. Enzymol., 263, 339-351 (1996)). CETP se může získat z bezsérového upraveného prostředí CHO buněk transfektovaných s cDNA na CETP (Wang, S. a kol., J. Biol. Chem. 267, 17487-17490 (1992)). K měření aktivity CETP se [^{3}H]CE-značený HDL, LDL, CETP a zkušební pufr (50 mM tris(hydroxymethyl)aminomethan, pH 7,4; 150 mM chlorid sodný; 2 mM ethylendiamintetraoctová kyselina; 1% hovězí sérum albumin) inkubují v objemu 200 µl, po dobu 2 hodin při 37 °C v 96 jamkových plotnách. Potom se sráží LDL postupným srážením přidáním 50 µl 1% (hmotnost/objem) dextransulfátu/0,5 M chlorid hořečnatý, mícháním a inkubováním při teplotě místnosti 10 minut. Roztok (200 µl) se přenese na filtrační desku (Millipore). Po filtraci se měří radioaktivita ve vysráženém LDL za pomoci scintilačního čítače. Korekce na nespecifický přenos nebo srážení se provede za použití vzorků, které neobsahují CETP. Rychlost přenosu [^{3}H]CE za použití této zkoušky je lineární s ohledem na dobu a koncentraci CETP do 25 až 30 % přeneseného [^{3}H]CE.

Síla testovaných sloučenin se může stanovit provedením shora uvedené zkoušky v přítomnosti různých koncentrací testovaných sloučenin a stanovením koncentrace, požadované pro 50% inhibici přenosu [^{3}H]CE z HDL do LDL. Tato hodnota se definuje jako IC_{50}. Hodnoty IC_{50} stanovené v této zkoušce budou přesné, když je IC_{50} větší než 10 nM. V případě, že sloučeniny mají větší inhibiční sílu, přesné měření IC_{50} může být určeno za použití delších inkubačních časů (do 18 hodin) a nižších finálních koncentrací CETP (< 50 nM).

Inhibice CETP aktivity in vivo

Inhibice aktivity CETP testovanou sloučeninou se může určit podáním sloučeniny zvířeti intravenózní injekcí nebo žaludeční sondou, měřením množství přenosu tritiem značeného cholesterylového esteru ([^{3}H]CE) z HDL do částic VLDL a LDL a porovnáním tohoto přeneseného množství s množstvím přeneseným u kontrolních zvířat.

Samci zlatých syrských křečků se udržují při dietě, kdy potrava obsahuje 0,24 % cholesterolu, alespoň dva týdny před provedením studie. Zvířata, která dostala intravenózní dávku bezprostředně před pokusem se anestezují pentobarbitalem. Anestezie se udržuje v průběhu celého pokusu. Do jugulární vény a karotické artérie se zavedou katetry. Na začátku pokusu obdrží všechna zvířata do jugulární vény 0,2 ml roztoku obsahujícího [^{3}H]CE-HDL. [^{3}H]CE-HDL je preparát lidského HDL, obsahující tritiem značený cholesterylester a připraví se podle postupu, který popsal Glenn a kol. (Met. Enzymol., 263, 339-351 (1996)). Testovaná sloučenina se rozpustí jako 80 mM zásobní roztok ve vehikulu (2 % ethanol : 98 % PEG 400, Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, USA) a podá se buď bolusovou injekcí nebo kontinuální infuzí. Dvě minuty poté se podá dávka [^{3}H]CE-HDL, zvířatům se injektuje do jugulární vény 0,1 ml testovaného roztoku. Kontrolní zvířata dostanou 0,1 ml vehikulového roztoku bez testované sloučeniny. Po 5 minutách se z karotické artérie odebere 1. vzorek krve (0,5 ml) a přenese se do mikrozkumavek obsahujících ethylendiamintetraoctovou kyselinu. Do katetru se injektuje k propláchnutí fyziologický roztok, který nahradí objem krve. Následné vzorky krve se odeberou stejným způsobem po dvou a čtyřech hodinách stejným způsobem. Krevní vzorky se dobře promíchají a udržují se na ledu, do skončení pokusu. Plazma se získá odstředěním vzorků krve při 4 °C. Na plazmu (50 µl) se

působí 5 µl srážecího činidla (dextransulfát, 10 g/l; 0,5 M chlorid hořečnatý) k odstranění VLDL/LDL. Po odstředění se vzniklý supernatant (25 µl) obsahující HDL analyzuje na radioaktivitu za použití kapalného scintilačního čítače.

Procenta [^{3}H]CE převedená z HDL do LDL a VLDL (% přenosu) se vypočítají na základě celkové radioaktivity v ekvivalentních vzorcích plazmy před sražením. Typicky je množství přenosu z HDL do LDL a VLDL u kontrolních zvířat 20 až 35 % po 4 hodinách.

Alternativně, při vědomí, anestezovaná zvířata mohou dostat orálně žaludeční sondou dávku testované sloučeniny jako suspenzi v 0,1% methylcelulóze ve vodě. V době, určené pro každou sloučeninu, při které úrovně plazmy testované sloučeniny dosáhnou svého vrcholu (C_{max}) po orální dávce, zvířata jsou anestezována pentobarbitalem a do jugulární vény se dávkuje 0,2 ml roztoku obsahujícího [^{3}H]CE-HDL jak bylo popsáno shora. Kontrolní zvířata dostanou žaludeční sondou 0,25 ml roztoku vehikula bez testované sloučeniny. Po 4 hodinách se zvířata usmrtí, vzorky krve se seberou a procenta [^{3}H]CE přenesená z HDL do LDL a VLDL (% přenosu) se zjišťují jak je popsáno shora.

Alternativně, inhibice aktivity CETP testovanou sloučeninou se může určit podáním sloučeniny myši, která byla vybrána pro expresi lidské CETP (hCETP) transgenní manipulací (hCETP myš). Testovaná sloučenina může být podána intravenózní injekcí nebo orálně žaludeční sondou a množství přenosu tritiem značeného cholesterylesteru ([^{3}H]CE) z HDL a LDL se stanoví a porovná se s množstvím přenosu zjištěným u kontrolních zvířat. Myši C57B1/D, které jsou homozygotní vůči hCETP genu jsou udržovány při dietě, s vysokým obsahem tuku, jako je TD 88051, jak popsal Nishina a kol. (J Lipid Res., 31, 859-869 (1990)) po dobu alespoň dvou týdnů předcházející studii. Myši obdrží orální sondou dávku testované sloučeniny jako suspenzi v 0,1% methylcelulóze ve vodě nebo intravenózní

bolusovou injekcí testovanou sloučeninu v 10% ethanolu a 90% polyethylenglykolu. Kontrolní zvířata dostanou roztok vehikula bez testované sloučeniny orální žaludeční sondou nebo intravenózní bolusovou injekcí. Na začátku pokusu všechna zvířata dostanou 0,05 ml roztoku obsahujícího [^{3}H]CE-HDL do ocasní vény. [^{3}H]CE-HDL je preparát lidského HDL obsahující tritiem značený cholesterylester, a připraví se podle metody, kterou popsal Glenn a kol. (Meth. Enzymol., 263, 339-351 (1996)). Po 30 minutách se zvířata nechají vykrvácet a krev se sebere do standardních mikrozkumavek obsahujících ethylendiamintetraoctovou kyselinu. Vzorky krve se dobře promíchají a udržují se na ledu do skončení pokusu. Plazma se získá odstředěním vzorků krve při 4 °C. Plazma se oddělí a analyzuje gelovou filtrační chromatografií a určí se relativní poměry [^{3}H]CE v VLDL, LDL a HDL.

Procenta [^{3}H]CE přenesená z HDL do LDL a VLDL (% přenosu) se vypočítají na základě celkové radioaktivity v ekvivalentních vzorcích plasmy před srážením. Typicky, množství přenosu z LDL a VLDL u kontrolních zvířat bude 20 % až 35 % po 30 minutách.

Zkouška na absorpci cholesterolu ze střeva

Je známa řada sloučenin, které inhibují absorpci cholesterolu z intestinálního traktu. Tyto sloučeniny snižují úrovně cholesterolu v seru snížením intestinální absorpce cholesterolu jak z exogenních zdrojů (dietní cholesterol) tak endogenní cholesterol (vylučovaný močovým měchýřem do intestinálního traktu).

U křečků byla použita zlepšená metoda pro měření absorpce cholesterolu do střev, při které se měří poměr dvou odlišných radioaktivních izotopů v plazmě, jak popsal Turley a kol. (J. Lipid Res. 35, 329-339 (1994), zde uváděné jako odkaz).

Samcům křečků o hmotnosti 80 až 100 g se podává potrava a voda dle libosti v místnosti, kde se ve 12 hodinových periodách střídá světlo a tma. Čtyři hodiny do světlé periody se nejprve podá intravenózní dávka 2,5 μCi [1,2-^{3}H] cholesterolu suspendovaném v Intralipidu (20 %) a potom orální dávka [4-^{14}C]cholesterolu v oleji triglyceridů se středním řetězcem (MCT). I.v. dávka se podá injektováním 0,4 ml Intralipidové směsi do distální femorální vény. Orální dávka se podá žaludeční sondou podáním 0,6 ml MCT olejové směsi zavedené intragastrikálně polyethylenovou trubkou. Po 72 hodinách se křečkům odebere krev a kapalnou scintilační spektroskopií se stanoví množství ^{3}H a ^{14}C v plazmě a v původním množství podané dávky. Absorpce cholesterolu se vypočte na základě následující rovnice:

Procento absorbované cholesterolu =

$$\frac{\text{\% orální dávky na ml ve vzorku plazmy po 72 hodinách x 100}}{\text{\% i.v. dávky na ml ve vzorku plazmy po 72 hodinách}}$$

Zkouška na mikrosomální triglyceridový transferní protein (MTP)

MTP se může čistit z jaterní tkáně nebo kulturních buněk (například buněk HepG2) za použití standardních metod jak popsal Ohringer a kol. (Acta Crystallogr. D52, 224-225 (1996), zde uváděno jako odkaz).

Následná analýza aktivity MTP se může provést jak popsal Jamil a kol. (Proc. Natl. Acad. Sci. 93, 11991-11995 (1996) zde uváděno jako odkaz).

Základem této zkoušky je měření přenosu značených triglyceridů z dárcovských vezikulů do akcepotorových vezikulů v přítomnosti MTP. Inhibitory MTP se mohou hodnotit jejich přidáním do směsi před zavedením MTP. Dárcovské vezikuly se

10.09.01

připraví sonifikací vodné směsi vaječných fosfolipidů, kardiolipinu, ^{3}H-značeného fosfolipidu a ^{14}C-značených triglyceridů. Akceptorové vezikuly se připraví sonifikací vodné směsi vaječných fosfolipidů. Vezikulové roztoky se spolu smísí, s nebo bez přidání MTP inhibitorů a k vyvolání přenosové reakce se přidá MTP. Zkouška se zakončí po 60 minutách přidáním 0,5 ml celulózy DE-52 a následuje odstředění na pelety donorových molekul. Množství ^{3}H a ^{14}C v peletě a v původním množství směsi se stanoví kapalinovou scintilační spektrometrií. Rychlost přenosu lipidu se vypočte na základě kinetiky prvního řádu za použití výrazu

$$[S] = [S]_0 \, e^{-kt}$$

kde $[S]_0$ a $[S]$ jsou frakce ^{14}C značené v donorové membránové peletě v době 0 a t, a výraz k je frakce značeného materiálu přeneseného za jednotku času.

Zkouška na lipidy v plazmě u králíků

Lipidy v plazmě se mohou zkoušet za použití metod, které popsali J. R. Schuh a kol., J. Clin. Invest., 91, 1453-1458 (1993), zde uváděné jako odkaz. Skupiny samců bílých králíků z Nového Zelandu se podrobí standardní dietě (100 g/den) obohacené 0,3 % cholesterolu a 2 % kukuřičného oleje (Zeigler Bothers, Inc., Gardners, PA). Voda je k dispozici dle libosti. Skupiny ošetřených zvířat se usmrtí po 1 a 3 měsících léčby. Pro charakterizaci aterosklerotických lézí se odeberou tkáně. Pro určení koncentrace lipidů v plazmě se odeberou krevní vzorky.

Lipidy v plazmě

Plazma pro analýzu lipidů se získá odebráním krve z ušní vény do zkumavek obsahujících EDTA (Vacutainer; Becton Dickenson & Co, Rutherford, NJ), a poté separací buněk odstředěním. Celkový cholesterol se stanoví enzymaticky, za použití cholesteroloxidázové reakce (C.A. Allain a kol., Clin. Chem., 20, 470-475 (1994), zde uváděné jako odkaz). HDL cholesterol se také měří enzymaticky, po srážení LDL a VLDL dextransulfátem s hořčíkem (G. R. Warnick a kol., Clin. Chem., 28, 1379-1388 (1982), zde uváděné jako odkaz). Úrovně triglyceridů v plazmě se stanoví měřením množství glycerolu uvolněného lipoproteinlipázou zkouškou vazby na enzym (G. Bucolo a kol., Clin. Chem., 19, 476-482 (1973), zde uváděné jako odkaz).

Ateroskleróza

Zvířata se usmrtí pentobarbitalovou injekcí. Torakální aorty se rychle vyjmou, ponoří se do 10% neutrálního pufrového formalinu a obarví se olejovou červení O (0,3 %). Po jednoduché podélné incizi podél stěny naproti arteriálnímu ústí se cévy otevřou pro hodnocení plochy plátů. Procento pokrytí plátem se určí z hodnot celkové zkoumané plochy prahovou analýzou, za použití barevného zobrazovacího analyzéru (Videometric 150; American Innovision, Inc., San Diego, CA) propojeného s barevnou kamerou (Toshiba 3CCD) upevněnou na mikroskop. Tkáňový cholesterol se měří enzymaticky, jak je popsáno, po extrakci směsí chloroform/methanol (2:1) podle metody kterou popsal Folch a kol. (J. Biol. Chem., 226, 497-509 (1957), zde uváděné jako odkaz.

In vitro vaskulární odezva.

Abdominální aorty se rychle excisují po injekci pentobarbitalem sodným a umístí se do okysličeného Krebs-bikarbonátového pufru. Po odstranění perivaskulární tkáně se nařežou 3 mm kroužky, které se vloží do 37 °C svalové lázně obsahující Krebs-bikarbonátový roztok a zavěsí se mezi dva nerezavějící ocelové dráty, přičemž jeden z nich je připojen k silovému převodníku (Grass Instrument Co., Quincy, MA). Změny síly jako odezva na angiotensin II přidaný do lázně se zanesou do grafu.

Příklady uvedené v tomto dokumentu mohou být provedeny náhradou genericky nebo specificky popsaných terapeutických sloučenin nebo inertních nosičů za ty, které se použily v předchozích příkladech.

Z výše uvedeného vynálezu vyplývá, že stejného účinku může být dosaženo různými cestami. Takové variace nejsou na závadu myšlenky a rozsahu předkládaného vynálezu a všechny takové modifikace a ekvivalenty, které jsou pro odborníka zřejmé spadají do rozsahu následujících nároků.

10.09.01 2001-2341

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Terapeutická kombinace, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje první množství sloučeniny derivátu kyseliny fibrové a druhé množství sloučeniny inhibující transferní protein cholesterylesteru, kde první množství a druhé množství dohromady zahrnuje antihyperlipidemicky účinné množství, antiatherosklerotický účinné množství nebo antihypercholesterolemicky účinné množství uvedených sloučenin.

2. Terapeutická kombinace podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že derivátem kyseliny fibrové je clofibrát.

3. Terapeutická kombinace podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že derivátem kyseliny fibrové je fenofibrát.

4. Terapeutická kombinace podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že derivátem kyseliny fibrové je ciprofibrát.

5. Terapeutická kombinace podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že derivátem kyseliny fibrové je bezafibrát.

6. Terapeutická kombinace podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že derivátem kyseliny fibrové je gemfibrozil.

7. Terapeutická kombinace podle nároku 1,

v y z n a č u j í c í s e t í m, že derivátem kyseliny fibrové je clinofibrát.

8. Terapeutická kombinace podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že derivátem kyseliny fibrové je binifibrát.

9. Terapeutická kombinace podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že kombinace obsahuje prostředek obsahující sloučeninu derivátu kyseliny fibrové a sloučeninu inhibující transferní protein cholesterylesteru.

10. Způsob profylaxe nebo léčby hyperlipidemického stavu, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se podá pacientovi v případě potřeby takové profylaxe nebo léčby kombinace v jednotkové dávkové formě, kde kombinace obsahuje první množství derivátu kyseliny fibrové, a druhé množství sloučeniny inhibující transferní protein cholesterylesteru, kde první a druhé množství dohromady zahrnuje antihyperlipidemicky účinné množství uvedených sloučenin.

11. Způsob profylaxe nebo léčby aterosklerotického stavu, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se podá pacientovi v případě potřeby takové profylaxe nebo léčby kombinace v jednotkové dávkové formě, kde kombinace obsahuje první množství sloučeniny kyseliny fibrové, a druhé množství sloučeniny inhibující transferní protein cholesterylesteru, kde první a druhé množství dohromady zahrnuje antiaterosklerotický účinné množství uvedených sloučenin.

12. Způsob profylaxe nebo léčby hypercholesterolemie, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se podá pacientovi v případě potřeby takové profylaxe nebo léčby kombinace v jednotkové dávkové formě, kde kombinace obsahuje první

10.09.01

množství sloučeniny derivátu kyseliny fibrové, a druhé množství sloučeniny inhibující transferní protein cholesterylesteru, kde první a druhé množství dohromady zahrnuje antihypercholesterolemicky účinné množství uvedených sloučenin.