



(12) PATENTSKRIFT

Patent- og
Varemærkestyrelsen

(51) Int.Cl⁷: A 61 K 31/65

(21) Patentansøgning nr: PA 1986 00622

(22) Indleveringsdag: 1986-02-07

(24) Løbedag: 1986-02-07

(41) Alm. tilgængelig: 1986-08-08

(45) Patentets meddelelse bkg. den: 2004-04-13

(30) Prioritet: 1985-02-07 US 699048

(73) Patenthaver: **The Research Foundation of State University of New York, Broadway, Albany, 12246 New York, USA**

(72) Opfinder: **Thomas F. McNamara, 34 Fairway Drive, Port Jefferson, New York 11777, USA**
Nungavaram S. Ramamurthy, 10 Lyman Court, Smithtown, New York 11787, USA
Lorne M. Golub, 29 Whitney Gate, Smithtown, New York 11787, USA

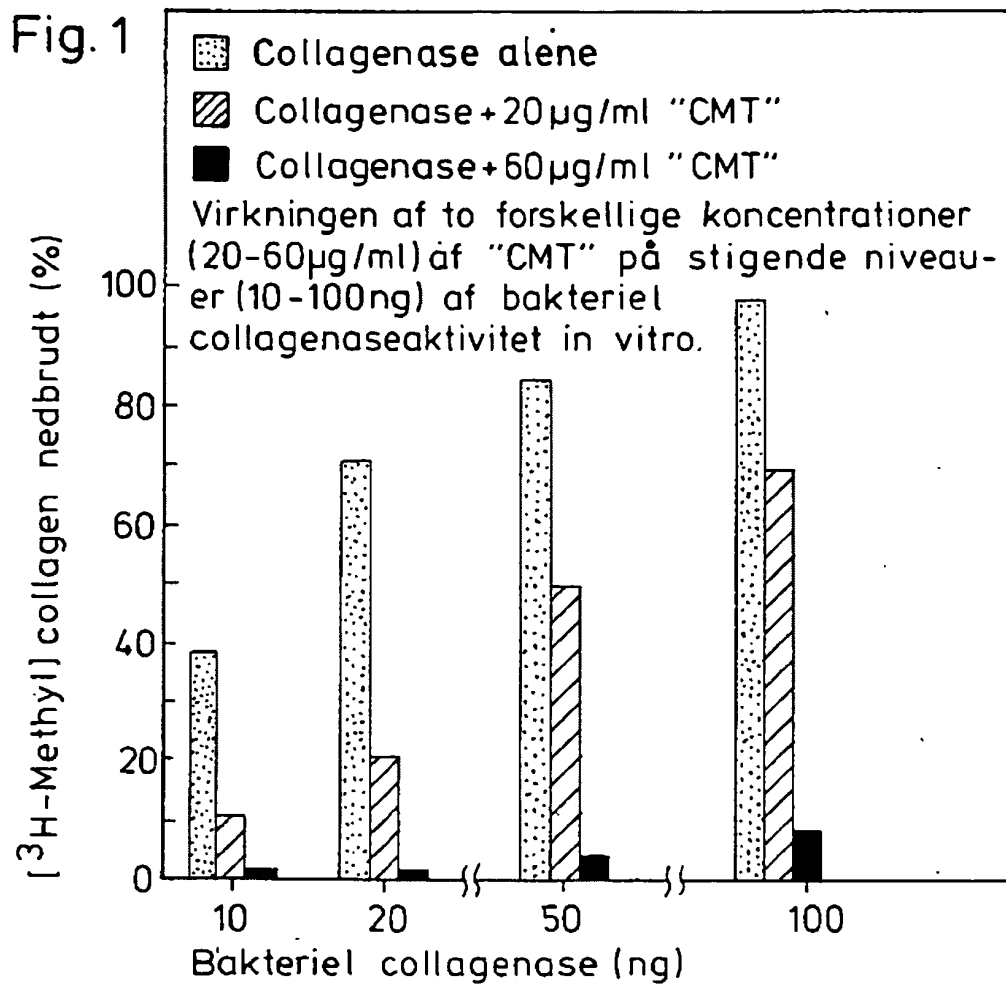
(74) Fuldmægtig: **Chas. Hude A/S, H.C. Andersens Boulevard 33, 1780 København V, Danmark**

(54) Benævnelse: **Ikke-antibakterielle tetracyclinpræparater med anticollagenolytiske egenskaber**

(56) Fremdragne publikationer:
J Periodontal Res 1984 Nov;19(6):651-5

(57) Sammendrag:

Tetracycliner med i det væsentlige ingen effektiv antibiotisk eller antibakteriel virkning og besiddende anti-collagen-nedbrydende enzymaktivitet eller anticollagenase-aktivitet og præparater der indeholder disse har vist sig at være anvendelige som anti-collagenolytiske midler. Sådanne tetracycliner og præparater, der indeholder dem, er nyttige ved behandling af periodontale sygdomme, hornhindeulcerationer, knoglemangelsygdomme og rheumatoid arthritis, der er sygdomme karakteriseret ved overdreven collagennedbrydning. Dyrefoderpræparater der indeholder sådanne tetracycliner giver forbedret dyreernæring, hvilket kan ses ved forhøjet vægtforøgelse.



Tetracycliner er velkendte bredspektrede antibiotika. For nylig har det også vist sig, at antibiotiske tetracycliner inhiberer virkningen af collagennedbrydende enzymer, f.eks. pattedyrs-collagenase, makrofag-elastase og bakterielle collagenaser. F.eks. har tetracycliner for nyligt vist sig at være nyttige ved behandling af periodontale sygdomme, alvorligt fremskreden rodhindebetændelse hos voksne og lokaliseret rodhindebetændelse hos unge mennesker. Antibiotiske tetracycliner er også anvendelige ved behandling af ikke-inficerede hornhindeulcerationer, ved behandling af den lednedbrydning der er involveret under reumatoid arthritis og i almindelighed ved behandling af de sygdomme, der er karakteriseret ved overdreven collagennedbrydning.

- 15 Forsøg in vitro har vist at antibiotiske tetracycliner
- (1) indhiberer leukocyt- og kondrocyt-collagenaseaktivitet,
 - (2) reducerer knogleresorption i organkultur fremkaldt af enten parathyroidhormon, bakteriel endotoxin eller prostagladin E₂, og
 - 20 (3) reducerer makrofag-collagenase- og -elastase-aktivitet i cellekultur.

Desuden har det ved forsøg in vivo vist sig at det antibiotiske tetracyclin, minocyclin, ved behandling af diabetisk rotte

- 25
- (a) reducerer patologisk overdreven collagenase-aktivitet i gingiva og hud,
 - (b) reducerer patologisk hudcollagenresorption, og
 - (c) reducerer patologisk overdrevent alveolarknogletab.

30 Desuden har de antibiotiske tetracycliner (minocin, achromycin og vibramycin) ved regelmæssige og lave dosisniveauer klinisk vist sig at reducere collagenaseaktiviteten i humane periodontallommer og regelmæssige dosisniveauer af tetracyclin medfører

35 helbredelse af hårdnakkede ikke-inficerede hornhindeulcerationer hos mennesker, læsioner der antages at være formidlet af pattedyrscollagenase.

I en rapport af Golub et al. demonstreredes in vivo og in vitro anvendelsen af de antibiotiske tetracycliner, minocyclin, doxycyclin og tetracyclin som effektive inhibitorer for collagenaser fra forskellige pattedyrskilder, herunder fra mennesker (Golub et al., J. of Periodontal Research 19 (1984), 651-655).

- 5 Skønt de i handelen tilgængelige antibiotiske tetracycliner er effektive som anticollagenolytiske midler, er langvarig anvendelse, enten kontinuerligt eller i indskudte perioder, f.eks. 2 ugers behandling - 3 måneder uden behandling - 2 uger med behandling - 3 måneder uden behandling, imidlertid anledning til de sædvanlige komplikationer ved langvarig anvendelse af antibiotika, såsom tarmforstyrrelse, overvækst af gær og svampe,
- 10 udvikling af antibiotisk resistente bakterier.

Det er således et formål med den foreliggende opfindelse at tilvejebringe præparater baseret på tetracycliner med i det væsentlige ingen antibiotisk og antibakteriel aktivitet, og især på udnyttelsen af tetracycliner, der har anticollagenolytisk aktivitet ved behandling af sygdomme eller tilstande karakteriseret ved for stor nedbrydning af collagen, uden

15 samtidigt at give anledning til de sædvanlige komplikationer, der er involveret ved anvendelse af antibiotika i lang tid.

Det er endvidere formålet med den foreliggende opfindelse at tilvejebringe præparater indeholdende disse ikke-antibiotiske tetracycliner og anvendelse af sådanne præparater som anticollagenase-midler, mens der samtidig tilvejebringes hidtil ukendte præparater

20 og anvendelser for sådanne præparater ved behandlingen af forskellige sygdomme og tilstande karakteriseret ved for stor nedbrydning af collagen.

Det er et særligt formål eller træk ved den foreliggende opfindelse at anvise ikke-antibiotiske tetracyclinpræparater med forbedrede egenskaber, såsom dyrefoderpræparater eller -sammensætninger, der indeholder tetracycliner, der er effektive, når de leveres eller

25 indgives til dyr, ikke blot som anticollagenolytiske midler, men også til tilvejebringelse af forbedret dyreernæring.

Den for tiden benyttede anvendelse af antibiotisk tetracyclin som et additiv til dyrefoder for at fremme forbedret fødeomdannelselse og vægtforøgelse har vist sig at have den skadelige virkning, at den fremkalder overvækst af resistente organismer, hvilket snart vil blive betragtet som risikabelt for menneskets helbred. Ved udøvelse af den foreliggende opfindelse elimineres denne skadelige virkning mens dyrevægtforøgelsen samtidigt fremmes.

Hvorledes disse og andre formål ved den foreliggende opfindelse opnås vil stå klart i lyset af medfølgende beskrivelse og tegning, hvor

fig. 1 grafisk illustrerer effektiviteten hos et tetracyclin ifølge opfindelsen til reduktion af bakteriel collagenaseaktivitet in vitro,

fig. 2 grafisk illustrerer virkningen af forøgede koncentrationer af et tetracyclin ifølge opfindelsen med hensyn til bakteriel collagenaseaktivitet in vitro,

fig. 3 grafisk illustrerer virkningen af forøgede koncentrationer af et tetracyclin ifølge opfindelsen på rotte-polymorfonuklear-leukocyt-collagenase-aktivitet in vitro,

fig. 4 grafisk viser forøgelsen i legemsvægt hos diabetiske rotter underkastet oral indgift af et tetracyclin ifølge opfindelsen sammenlignet med andre rotter, hvortil der var indgivet andre midler,

fig. 5 grafisk viser virkningen på hud-vægten hos diabetiske rotter, der har fået indgivet et tetracyclin ifølge opfindelsen, og

fig. 6 grafisk viser virkningen hos rotter på collagenaseaktiviteten i gingival-væv efter indgift af et tetracyclin ifølge opfindelsen.

Det har vist sig at tetracycliner, der har i det væsentlige ingen effektiv antibiotisk eller antibakteriel virkning, har anticollagen-nedbrydende enzymvirkning eller anticollagenasevirkning. Nærmere bestemt har det vist sig, at tetracycliner, der har i det væsentlige ingen effektiv antibiotisk eller antibakteriel virkning, har evnen til at inhibere collagenolytisk enzymaktivitet og collagenresorption.

Tetracycliner er karakteriseret ved fire carbocycliske ringe og er velkendte antimikrobielle midler eller antibiotika.

Imidlertid har ikke alle tetracycliner antimikrobielle eller antibiotiske egenskaber. Et antal tetracycliner udviser i det væsentlige ingen antimikrobiel eller antibakteriel virkning, mens andre tetracycliner, skønt de udviser en vis antimikrobiel eller antibiotisk virkning, ikke har en sådan antimikrobiel eller antibakteriel aktivitet i et sådant omfang, at de er anvendelige som kemoterapeutiske midler eller som antibiotika ved behandling af sygdomme. Disse tetracycliner der udviser ingen eller i det væsentlige ingen eller utilstrækkelig antimikrobiel eller antibiotisk virkning anvendes på nyttig måde ved udøvelse af den foreliggende opfindelse. Særligt nyttig ved udøvelse af den foreliggende opfindelse er tetracyclinet, dedimethylaminotetracyclin. Som angivet er imidlertid også andre tetracycliner, der ikke har tilstrækkelig antimikrobiel aktivitet eller slet ingen, anvendelige ved udøvelse af den foreliggende opfindelse.

Som det nu har vist sig, har tetracycliner generelt, uanset om de har antimikrobiel eller antibiotisk virkning eller ikke, alle anti-collagennedbrydende-enzym-aktivitet eller anticollagenase-aktivitet. Denne anticollagenaseaktivitet ses at kunne tilskrives tetracyclinernes unikke struktur, dvs. den specielle struktur med fire carbocycliske ringe, som tetracyclinerne har og som er karakteristisk for dem.

Som en iagttagelse antages det, at carbonylgrupperne i tetracyclinets carbocykliske ringkerne er vigtig for disse forbindelsers anticollagenolytiske virkning, idet de chelaterer metalionerne calcium og zink. Dette er en vigtig egenskab da de
5 nævnte collagenolytiske enzymer er metalafhængige.

Tetracyclinernes virkning, når de anvendes i overensstemmelse med udøvelsen af den foreliggende opfindelse som anticollagenolytiske midler, ses at være systemisk, skønt tetracyclinerne
10 kan anvendes fokalt, såsom direkte påføring til gingivalvævet, såsom i tilfælde af behandling af rodhindebetændelse, hvor der er involveret for stor collagenaseaktivitet, og på huden, såsom ved behandling af ulcerøse læsioner, såsom liggesår, diabetiske ulcerationer og epidermolysis bullosa. Ved udøvelse af
15 den foreliggende opfindelse kan tetracyclinerne anvendes på en hvilken som helst af de kendte anvendelsesmåder, der er passende til behandling af den involverede tilstand. Den anvendte dosis af ikke-antimikrobielle eller ikke-biotiske tetracycliner ifølge opfindelsen til reduktion af collagenaseaktivitet
20 eller når de anvendes som et anticollagenolytisk middel vil kunne være den samme som eller en smule større end den anvendte dosis af konventionelle tetracycliner, når disse anvendes som antimikrobielle eller antibiotiske midler. Den anvendte dosis kan imidlertid også være væsentligt under eller kun en
25 brøkdel eller en mindre mængde af en sådan standarddosis eller et sådant standardniveau, hvori konventionelle antimikrobielle tetracycliner anvendes, såsom ca. 5-50% af en standardterapeutisk dosis med hensyn til udnyttelsen af antimikrobielle eller antibiotiske tetracycliner, når disse anvendes til behandling
30 af sygdomme.

Et kommercielt vigtigt træk ved udøvelsen af den foreliggende opfindelse indebærer udnyttelsen af de specielle ikke-mikrobielle eller ikke-antibiotiske tetracycliner, såsom det dedimethylaminotetracyclin, som et additiv til dyrefoder. Dyrefoder
35 til drøvtyggere, ikke-drøvtyggere og drøvtygger-beslægtede dyr omfatter sædvanligvis en blanding af korn, proteiner, aminosyrer, mineraler, vitaminer og tilsætningsstoffer, såsom konserveringsmidler, (antioxidanter, bakteriostatisk midler, fungi-

statiske midler) og tilskud, som hjælper til at beskytte dyret mod parasitter og sygdomme. Fordelen ved anvendelsen af de specielle tetracycliner i overensstemmelse med den foreliggende opfindelse som en komponent eller et tilsætningsstof i dyrefoder er, at en sådan anvendelse sandsynligvis ikke giver nogen anledning til antibiotisk resistente bakteriestammer. Det primære formål med inkorporering af den specielle type tetracycliner ifølge opfindelsen i dyrefoder er at det som et anti-collagenolytisk middel vil forbedre dyrets ernæring og legemsvægt.

Som et eksempel på den koncentration eller mængde af de specielle tetracycliner ifølge opfindelsen der, inkorporeres i dyrefodere til fjerkræsfodere til kyllinger, kalkuner og slagtekyllinger, vil mængden af tetracyclin inkorporeret i foderet være i området fra ca. 10 g til ca. 200 g pr. ton foder. Med hensyn til foder til kødkvæg for unge kalve op til en alder på ca. 12 uger bør mængden af tetracyclin i foderet være således at kalven ved konsumering af foderet vil optage ca. 0,1 mg til ca. 1,0 mg pr. pound af kalvens legemsvægt pr. døgn. Med hensyn til kødkvæg bør mængden af tilstedeværende tetracyclin i foderet være således at dyret optager eller konsumerer fra ca. 75 mg til ca. 300 mg pr. pound pr. dag fra det tetracyclinholdige foder.

Fremstilling af stamopløsninger af tetracyclin, minocyclin og dedimethylaminotetracyclin (CMT).

Stamopløsninger af minocyclin, dedimethylaminotetracyclin (CMT) og tetracyclin fremstilledes som vandige opløsninger. Disse opløsninger var beregnet til anvendelse til bestemmelse af hver af disse tetracycliners antibakterielle aktivitet. Minocyclinet leveredes fra Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, Lot nr. 60F-0048. Tetracyclin leveredes også fra Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, Lot nr. 103F0350 og det dedimethylaminotetracyclin fremstilledes syntetisk i overensstemmelse med den fremgangsmåde der er angivet af J.H. Boothe et al, J. Am. Chem. Soc., bind 80, side 1654 (1958) og J.R.D. McCormick et al, J. Am. Chem. Soc., bind 79, side 2849

(1957). Stamopløsningerne fremstilledes som vandige opløsninger indeholdende 100 mikrogram pr. ml af hver af forbindelserne. Til 10,00 mg af enten minocyclin, tetracyclin eller dedimethylaminotetracyclin sættes 10 ml destilleret vand og suspensionen omrystedes i en 100,0 ml volumetrisk kolbe. Til hver 10 ml suspension af forbindelsen sættes 1,0 ml 1,0 N natriumhydroxid til dannelse af en klar opløsning af hver forbindelse. Ca. 70 ml destilleret vand sættes til hver opløsning og pH indstilledes til 8,0 - 8,3 ved tilsætning af den nødvendige mængde 1,0 N saltsyre. Hver opløsning suppleredes derefter op til 100,00 ml i den volumetriske kolbe ved tilsætning af destilleret vand. Slutkoncentrationen af hver af disse forbindelser var 100 mikrogram pr. ml. Stamopløsningerne opbevarede i køleskab indtil de blev anvendt. Der blev fremstillet friske stamopløsninger dagligt.

Bevis for mangelfulde antimikrobiel virkning.

Godtgørelse in vitro:

For at vise at dedimethylaminotetracyclin (CMT) har reduceret antimikrobiel aktivitet, blev der foretaget en sammenligning af den mindste inhiberende koncentration (MIC) for hver af forbindelserne. En sammenligning af MIC for minocyclin, tetracyclin og dedimethylaminotetracyclin gennemførtes på følgende måde. Til en række reagensglas indeholdende 3,0 ml steril hjerne-hjerte-infusions-(BHI)-suppe (DIFCO) tilsattes passende mængder af stamopløsningerne af minocyclin, dedimethylaminotetracyclin og tetracyclin til opnåelse af de koncentrationer, der er vist i tabel 1. Hvert reagensglas indstilledes derpå med steril BHI-suppe til et slutrumfang på 4,0 ml. Hvert reagensglas i rækken podedes derpå med 0,1 ml af en 24 timers suppekultur af *Bacillus cereus* som havde været inkuberet ved 37°C. Reagensglassene blev derefter vortexet og inkuberet ved 37°C i 24 timer. Reagensglassene blev derefter aflæst for tilstedeværelse eller fraværelse af vækst, hvilket bestemtes ved uklarhed. Resultaterne fra disse sammenlignende bestemmelser

for antimikrobiel aktivitet er opstillet i tabel 1. Det blev godtgjort at dedimethylamino-tetracyclinet ikke har nogen efterviselig antibakteriel virkning mod *Bacillus cereus*. Det var mere end 100 gange mindre aktivt end tetracyclin og mere end 1.000 gange mindre aktivt end minocyclin. *Bacillus cereus* anvendtes som prøveorganismen fordi den anvendes rutinemæssigt til tetracyclinbestemmelser som følge af dens ekstreme følsomhed overfor disse antibiotika. Organismen var opnået fra The American Type Culture Collection (ATCC nr. 11778).

Godtgørelse in vivo:

5 Konventionelle forsøgsdyr og forsøgsdyr der var gjort diabetiske blev enten ikke behandlet eller behandlet med metronidazol eller dedimethylaminotetracyclin ved en sammenlignende undersøgelse til bestemmelse af virkningen in vivo af dedimethylaminotetracyclin.

10 Til denne undersøgelse anvendtes fire forskellige grupper af rotter. Gruppe I var en ubehandlet kontrolgruppe af normale rotter, som rummede en normal oral flora; Gruppe II var en ubehandlet kontrolgruppe af diabetiske rotter, der var gjort diabetiske ved indgift af streptozocin; Gruppe III var en diabetisk gruppe behandlet oralt med metronidazol og gruppe IV
15 var en diabetisk gruppe af forsøgsdyr behandlet oralt med dedimethylaminotetracyclin.

Ved forsøgets afslutning blev rotterne aflivet og der blev udtaget prøver med sterile curetter fra kindtændernes gingival-
20 kant hos rotter fra hver af disse grupper af dyr og prøverne overførtes til en suppe og inkuberedes i 72 timer ved 37°C. De isolerede organismer sammenlignedes for at fastslå om der var nogen stor forandring i sammensætningen af floraen efter ind-
25 giften af enten metronidazol eller dedimethylaminotetracyclin.

Resultaterne for isoleringen og identifikationen af organismerne vundet fra gingivalprøver viste at: (1) de ubehandlede normale kontroldyr havde lidt flere organismer til stede end
30 dyrene i nogen som helst af de øvrige grupper og kunne let identificeres ved mængden af vækst og ved de bakterielle sammensætninger, (2) de diabetiske dyr der modtog metronidazol fremkaldte mindre vækst fra gingivalprøverne end nogen af de øvrige grupper og havde overvejende grampositive kokker; (3) de
35 ubehandlede diabetiske kontroldyr og de diabetiske dyr der modtog dedimethylaminotetracyclin var i det væsentlige ikke til at skelne fra hinanden med hensyn til mængden af vækst vundet fra gingivalprøverne og i den bakterielle sammensætning for hver prøve. Disse resultater er opstillet i tabel 2.

Disse undersøgelser in vivo demonstrerede tydeligt at metronidazol som forventet fortrinsvis undertrykkede de gramnegative anaerobe organismer i den creviculære mikroflora, mens dedimethylaminotetracyclin eller CMC ikke havde nogen påviselig virkning på den creviculære mikroflora i modsætning til virkningen af antibiotiske tetracycliner.

Golub et al, J. Periodontal Res. 18: 516, 1983 viste at et antibiotisk tetracyclin undertrykkede de gramnegative anaerobe organismer i den creviculære flora hos den diabetiske rotte, ligesom den virkning der er beskrevet ovenfor for metronidazol.

15

20

25

30

35

TABEL II

Oversigt over resultaterne for organismer isoleret fra ubehandlede dyr (normal/
diabetiske) og dyr behandlet med enten metronidazol eller minocyclin (diabetiske)

Organismer	Normale			Diabetiske		
	Ubehandlede	Behandlede	CMII*	Ubehandlede	Metronidazol	CMII*
<u>E. coli</u>	+	+	+	+	+	+
Bacteroides	+	-	-	-	-	-
Fusobacterium	+	+	+	+	-	+
Proteus	+	-	-	-	-	-
Veillonella	+	+	+	+	-	+
Leptotrichia	+	-	-	-	-	-
Streptococcus alpha-hæmolytiske	-	-	-	-	+	-
beta-hæmolytiske	-	-	-	-	+	-
gamma-hæmolytiske	+	+	+	+	+	+
Actinomyces	+	+	+	+	+	+
Lactobacillus	+	-	-	-	-	+
Staphylococcus	-	+	+	+	+	+
Bifidobacterium	+	-	-	-	-	-
Candida	-	(+)	(+)	(+)	-	-

* Kemisk modificeret tetracyclin

+ = til stede

- = ikke til stede

Bevis for anticollagenolytisk enzymvirkning.

Godtgørelse in vitro:

5

Bakteriel collagenase (fra *C. histolyticum*), der ligesom pattedyrscollagenase er en calcium afhængig metallo-protease, inkuberedes i 18 timer ved 27°C med [³H-methyl]-collagen i nærværelse af 0, 20 eller 60 µg/ml CMT og resultaterne er vist på fig. 1. I fravær af CMT gav forøgelse af niveauet af bakteriel collagenase i den inkuberede blanding fra 10 til 100 ng som forventet forøget nedbrydning af det radioaktivt mærkede collagensubstrat (fra 40-90%). Et tilsvarende mønster sås, når der tilsattes 20 µg/ml CMT, men ved alle niveauer af bakteriel collagenase (10-100 ng) var nedbrydningen af collagen lavere end det der blev iagttaget i fravær af CMT. Forøgelse af koncentration af CMT til 60 µg/ml inhiberede i det væsentlige fuldstændigt collagenaseaktiviteten ved alle de afprøvede enzymniveauer.

20

Der gennemførtes et andet forsøg. Ved dette forsøg blev et enkelt niveau af bakteriel collagenase inkuberet (a) med et bredt område af koncentrationer af CMT (0, 2, 10, 20 og 60 µg/ml) og (b) med kendte inhibitorer for metallo-proteaser, EDTA og phenanthrolin. Som i det første forsøg nedbrød 10 ng collagenase ca. halvdelen af det tilgængelige radioaktivt mærkede collagensubstrat efter en 18 timers inkubering ved 27°C i fravær af CMT, fig. 2. Den meget lave koncentration på 2 µg/ml CMT inhiberede collagenaseaktiviteten med ca. 20% mens koncentrationerne på 10-60 µg/ml CMT reducerede aktiviteten ca. 90%. Disse højere koncentrationer af CMT inhiberede collagenaseaktiviteten i samme grad som chelateringsmidlerne EDTA og phenanthrolin, hvilket stemmer overens med den hypotese, at de metalbindende egenskaber hos tetracycliner (indbefattet CMT) er ansvarlige, i det mindste delvis, for deres anti-collagenolytisk-enzym-egenskaber.

30

35

Et tredje forsøg blev gennemført og resultaterne er vist på fig. 3. I dette forsøg blev radioaktivt mærkede collagenmole-

kyler inkuberet (18 timer, 37°C) med en ekstrakt af rotteleukocyter, der vides at indeholde collagenolytisk-enzymaktivitet. Dette pattedyrscollagenase-præparat inkuberedes med 0-60 µg/ml CMT eller med collagenase-inhibitorerne, EDTA eller phenanthrolin. Selve collagenasen nedbrød ca. 55% af det tilgængelige collagensubstrat. I dette forsøg reducerede 2-10 µg/ml CMT collagenaseaktiviteten med ca. 20% mens 20 og 60 µg/ml reducerede aktiviteten ca. 85%. EDTA og phenanthrolin, to metalchelateringsmidler, inhiberede fuldstændigt aktiviteten af dette pattedyrscollagenase, hvilket var forventet, eftersom leukocyt-collagenase vides at afhænge af tilstedeværelsen af metalionerne, calcium og zink, for normal aktivitet. Det antages at grunden til at dette pattedyrscollagenase-præparat krævede en højere koncentration af CMT end det bakterielle collagenasepræparat til opnåelse af samme grad af inhibering var tofoldig: For det første var pattedyrscollagenasen et forholdsvist urent enzym sammenlignet med det i høj grad rensede bakterielle enzym. Således kunne CMT have reageret med andre metallo-proteaser (f.eks. gelatinase) i leukocyt-præparatet ved siden af reaktion med collagenase, hvilket således effektivt reducerer forholdet inhibitor CMT/collagenase. For det andet indeholder leukocyter et højt niveau af calciumioner og tidligere forsøg har vist at tilsætning af calcium til en collagenase/tetracyclin-blanding kunne overvinde inhiberingen af enzymaktiviteten.

Godtgørelse in vivo:

Der blev opstillet fire separate grupper rotter, en gruppe (kontrolgruppe) blev efterladt ubehandlet under hele forsøget, den anden (den diabetiske gruppe eller D-gruppen) blev gjort diabetisk ved intravenøs injection af streptozotocin som tidligere beskrevet, den tredje gruppe blev gjort diabetisk og fik derefter indgivet ad oral vej 75 mg pr. dag af antibiotiket metronidazol (D + metronidazol-gruppe), og den fjerde gruppe blev gjort diabetisk og fik oral indgivet på daglig basis 20 mg pr. dag "CMT" (D + "CMT"-gruppe). Disse doser er

1/10 af de daglige doser af hver af disse lægemidler når de indgives af terapeutiske grunde til mennesker. 1/10-værdien er den samme dosis som blev indgivet til diabetiske rotter i tidligere undersøgelser under anvendelse af minocyclin og som viste sig at fremkalde kunstige forandringer i rotters bindevæv. På forskellige tidspunkter under forsøget blev rotterne vejede. På forsøgets sidste dag (dag 37) blev der taget en blodprøve fra hver rotte til glucoseanalyse, dyrene vejedes og aflivedes. Hele huden fra hver rotte (bortset fra den over hovedet, poterne og genitalerne) og den buccale gingiva blev dissekeret, vejede, hakket (eng: minced), ekstraheret (alle procedurer ved 4°C) og ekstrakterne blev partielt rensede ved ammoniumsulfat-udfældning. Collagenaseaktiviteten i hud- og gingival-ekstrakterne målte efter inkubering med radioaktivt mærket collagen som substratet. (Hudekstrakter inkuberedes ved 35°C, 48 timer, med ¹⁴C-glycinmærket collagenfribiller, mens gingivalekstrakter inkuberedes ved 27°C, 18 timer, med [³H-methyl]-collagenmolekyler.

Netop før aflivning af rotterne blev der taget en subgingival plaqueprøve fra hvert dyr fra de maxillære områder. Prøverne anbragtes øjeblikkeligt i præ-reduceret suppe (for at beskytte de anaerobe mikroorganismer), inkuberedes under anaerobe betingelser og det relative antal af de grampositive, gramnegative og bevægelige mikroorganismer blev bestemt.

Som vist på fig. 4 tog kontrolrotterne på i vægt i løbet af forsøgsperioden på 37 dage mens de ubehandlede diabetiske rotter (D-gruppe) tabte mere og mere i vægt. Daglig metronidazol-terapi havde ingen virkning til forsinkelse af vægttabet hos D-rotterne, mens daglig behandling af D-rotterne med CMT fuldstændigt inhiberede tabet i legemsvægt. Desuden begyndte "D"-rotterne behandlet med CMT hen mod slutningen af forsøget efter [dag 30] at tage på i vægt på en måde der lå parallelt med de ikke-diabetiske kontrol dyr mens de ubehandlede "D"-rotter under den samme periode fortsatte med at tabe i vægt.

Resultaterne på fig. 5 viser et tilsvarende mønster af forandringer. D-gruppen og D+metronidazol-gruppen tabte mere end

50% af hudmassen ved afslutningen af forsøgsperioden på 37 dage, mens behandlingen af D-rotter med CMT på daglig basis inhiberede tabet af hudmasse (hudtab er en komplikation ved den diabetiske tilstand).

5

Resultaterne i tabel 3 viser at alle de diabetiske grupper (D-gruppe, D+metronidazol-gruppe, D+CMT-gruppe) var alvorligt hyperglycæmiske (638-850 mg % blodglucoseniveauer) sammenlignet med de normoglycæmiske (104 mg%) kontrolrotter. Behandling af de diabetiske rotter med metronidazol havde absolut ingen virkning på den patologisk overdrevne collagenaseaktivitet i de diabetiske dyrs huder, tabel 3, eller i de diabetiske dyrs gingiva, fig. 6, til trods for at blodglucosen i de metronidazolbehandlede (antimikrobielt behandlede) rotter var svagt nedsat som vist i tabel 3. I udtalt kontrast hertil, skønt CMT-behandlingen ses at have en mindre virkning end metronidazol på blodglucosekoncentrationen, inhiberede dette modificerede tetracyclin på dramatisk måde hud- og gingival-collagenase-aktiviteten med ca. 50%, tabel 3 og fig. 6. Disse resultater viser at CMT inhiberer pattedyrscollagenase-aktivitet (og collagenresorption) in vivo, ligesom antibiotiske standard-tetracycliner, men kan udøve denne terapeutiske virkning uden signifikant at påvirke den creviculære mikroflora.

25

30

35

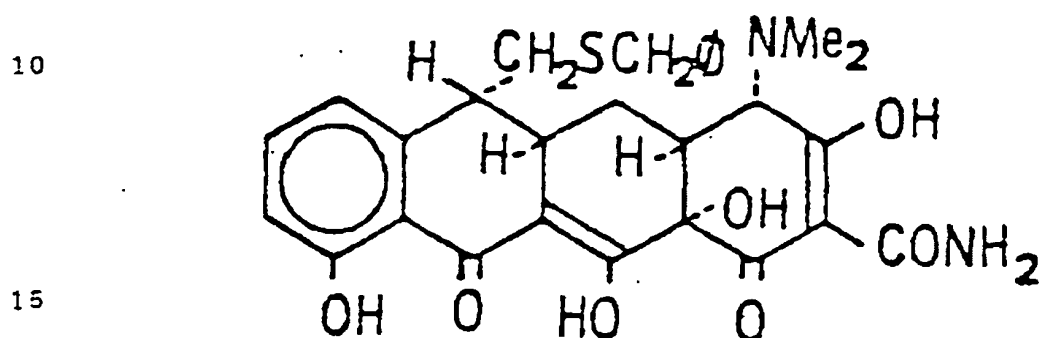
TABEL 3

Diabetes stimulerer collagenaseaktiviteten i rottehud:
virkning af oralt indgivet metronidazol og "CMT"

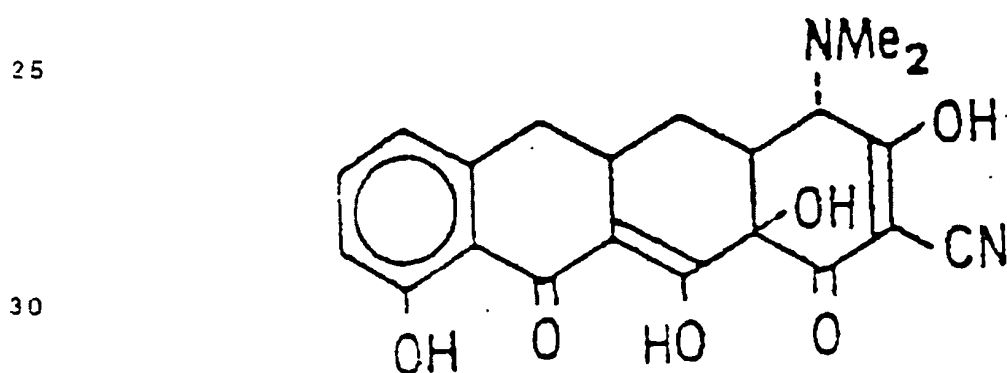
Rotteforsøgs- gruppe	Antal rot- ter pr. gruppe	Blodglucose koncentra- tion (mg%)*	Collagenaseaktivitet i hudekstrakter:	
			% ¹⁴ C-collagen nedbrudt	% reduktion i D-gruppe på grund af læge- middelbehandling
Kontrol dyr	4	103 ± 8	5.2 ± 0.9	--
Diabetiske (D)	3	850 ± 35	47.3 ± 0.3	--
D + Metronid.	5	638 ± 22	46.0 ± 3.0	2.7
D + "CMT"	4	713 ± 31	20.9 ± 3.2	55.8

* hver værdi repræsenterer middelværdi ± S.E.M.

Skønt der i nærværende beskrivelse og udøvelse af opfindelsen er lagt vægt på dedimethylaminotetracyclin som det ikke-antimikrobielle eller ikke-antibakterielle tetracyclin kan der også anvendes andre i det væsentlige ikke-antimikrobielle eller ikke-antibakterielle tetracycliner, såsom 6 α -benzylthiomethylen-tetracyclin med den strukturelle formel:



20 Anvendelig er også nitrilanalogen til tetracyclin med den strukturelle formel:

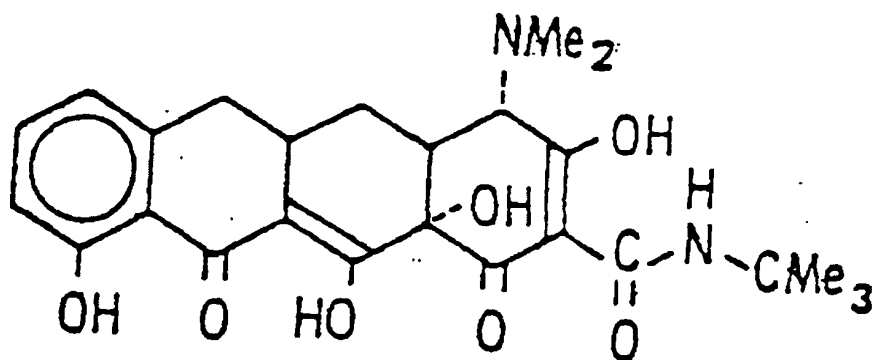


35

Anvendelig er også det mono N-alkylerede amid af tetracyclin med den strukturelle formel:

5

10

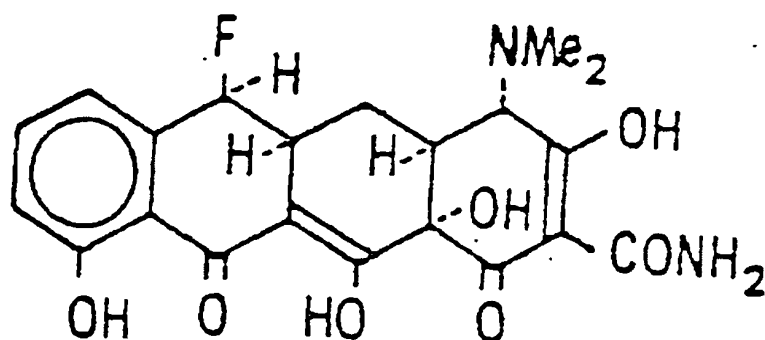


15

Anvendelig er også 6-flour-demethyltetracyclin med den strukturelle formel:

20

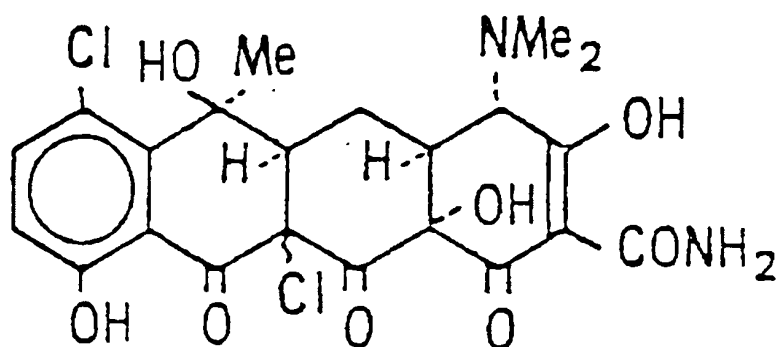
25



30

og endvidere 11 α -chlortetracyclin med den strukturelle formel:

35



De specielle ikke-antimikrobielle eller ikke-antibakterielle tetracycliner ifølge opfindelsen anvendes hensigtsmæssigt i sig selv eller i form af salte deraf, såsom hydrochloridsaltene. Andre vandopløselige salte, såsom natrium- eller kaliumsaltene, kan også anvendes.

Tetracyclinerne ifølge opfindelsen kan også indkapsles til oral indgift da, som nævnt ovenfor, tetracyclinerne ifølge opfindelsen ses at være systemisk effektive som anticollagenolytiske midler. Tetracyclinerne ifølge opfindelsen kan også formuleres i form af tabletter, kapsler, eleksirer og lignende. Tetracyclinerne ifølge opfindelsen kan formuleres til opløsninger eller suspensioner til intramuskulær eller peritoneal indgift. Desuden kan tetracyclinerne også inkorporeres eller formuleres i et polymært bærestof eller udleveringssystem til fokal eller lokal anvendelse såsom i tilfælde af behandlingen af peridontale sygdomme, såsom til udlevering direkte i den peridontale lomme.

Velegnede polymere materialer der kan anvendes til at inkorporere tetracyclinerne ifølge opfindelsen deri indbefatter ethylenvinylacetat, polycaprolacton, polyurethan og ethylencellulose som efter at tetracyclinerne er inkorporeret eller dispergeret deri er hensigtsmæssigt formgivet eller formet til fibre, ark, film eller partikler eller granulært materiale, der er i stand til at blive udformet eller formet til en hensigtsmæssig form til behandling af periodontale sygdomme og lignende eller til direkte påføring til en læsion der viser patologisk collagenedbrydning eller collagenresorption.

Som det vil være klart for fagmanden i lyset af de ovenfor angivne oplysninger er mange modifikationer, ændringer og substitueringer mulige ved udøvelsen af den foreliggende opfindelse uden at man derved går uden for opfindelsens ide eller rammer.

P A T E N T K R A V

1. Præparat omfattende et tetracyclin med i det væsentlige ingen antibakteriel aktivitet og som udviser anti-collagenaseaktivitet samt en bærer for tetracyclinet til anvendelse ved
5 behandlingen af mennesker eller dyr, som lider under en tilstand eller af en sygdom, som er karakteriseret ved overdreven collagenedbrydning.
2. Præparat ifølge krav 1, hvori tetracyclinet er dedimethylaminotetracyclin.
3. Præparat ifølge krav 1 eller 2 til anvendelse ved behandlingen af hornhindeulcerationer.
- 10 4. Præparat ifølge krav 1 eller 2 til anvendelse ved behandlingen af periodontale sygdomme.
5. Præparat ifølge krav 1 eller 2 til anvendelse ved behandlingen af rheumatoid arthritis.
6. Præparat ifølge krav 1 eller 2 til anvendelse ved behandlingen af periodontale sygdomme, hudlæsioner og/eller andre sygdomme, idet tetracyclinet foreligger i en topisk
15 indgivelsesbar form.
7. Præparat ifølge krav 6, hvor tetracyclinet er inkorporeret frigivelsesbart i en polymer bærer eller matrix.
8. Præparat ifølge et hvilket som helst af kravene 1 til 7, hvor tetracyclinet skal indgi-
20 ves systemisk.

9. Præparat ifølge et hvilket som helst af kravene 1 til 7, hvor tetracyclinet skal indgives oralt.
10. Præparat ifølge et hvilket som helst af kravene 1 til 9, hvor præparatet er i form af en tablet, et granulat, en pastil eller en kapsel.
- 5 11. Præparat ifølge et hvilket som helst af kravene 1 til 9, hvor bæreren er en vandig bærer.
12. Præparat ifølge et hvilket som helst af kravene 1 til 10, hvor bæreren er en fast, fysiologisk acceptabel matrix.
13. Præparat ifølge et hvilket som helst af kravene 1 til 12, som er et dyrefoderpræparat,
10 og som indeholder tetracyclinet i en effektiv anti-collagenasevirkende mængde.
14. Anvendelse af et tetracyclin med i det væsentlige ingen antibakteriel aktivitet, som udviser anti-collagenase-aktivitet samt en bærer for tetracyclinet til fremstillingen af et farmaceutisk præparat til behandlingen af mennesker eller dyr, som lider under en tilstand eller af en sygdom karakteriseret ved overdreven collagenedbrydning.

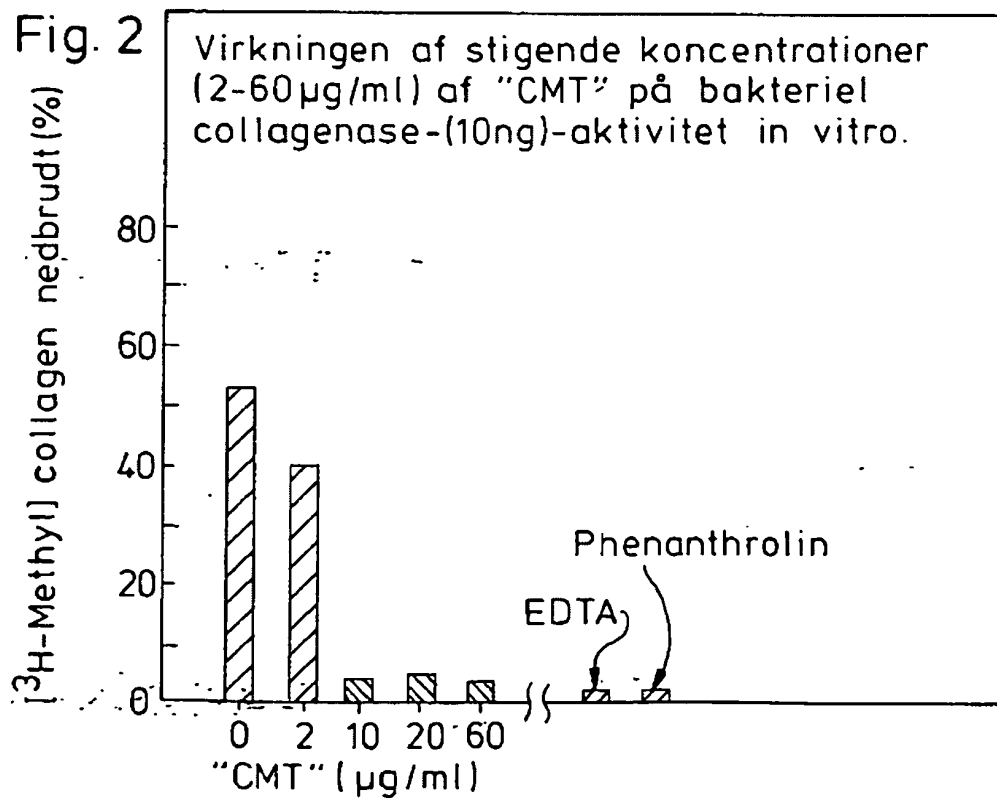
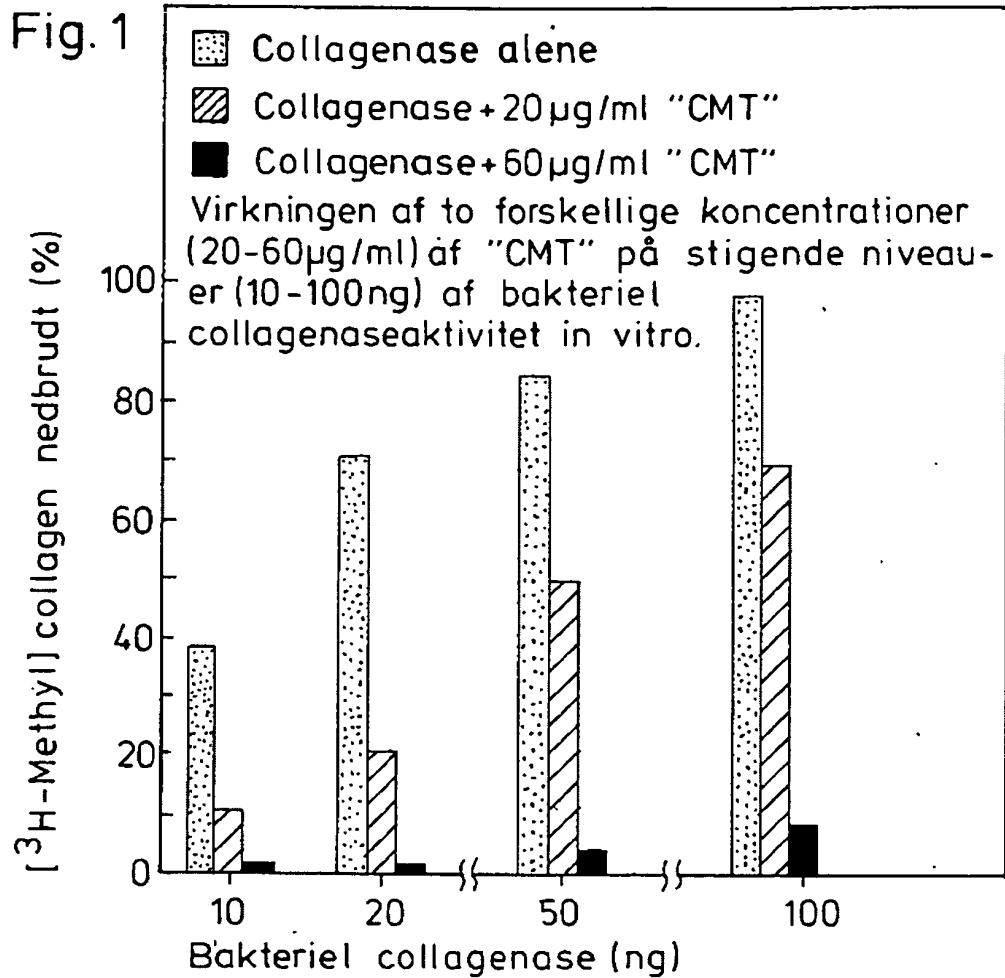


Fig. 3

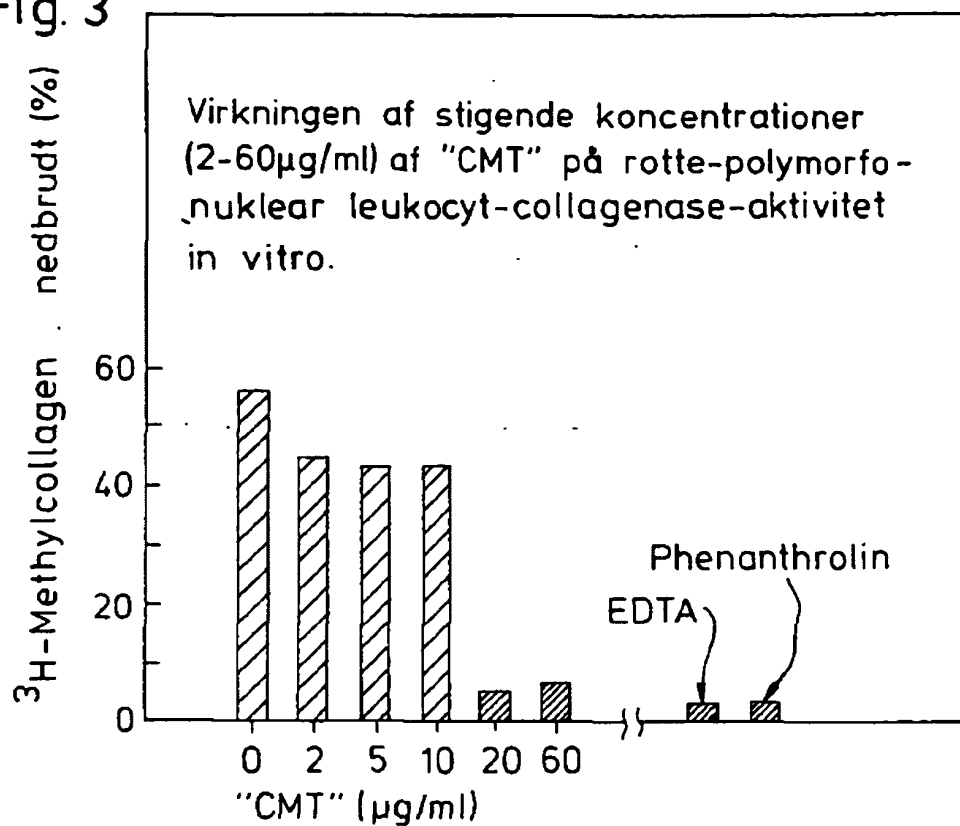
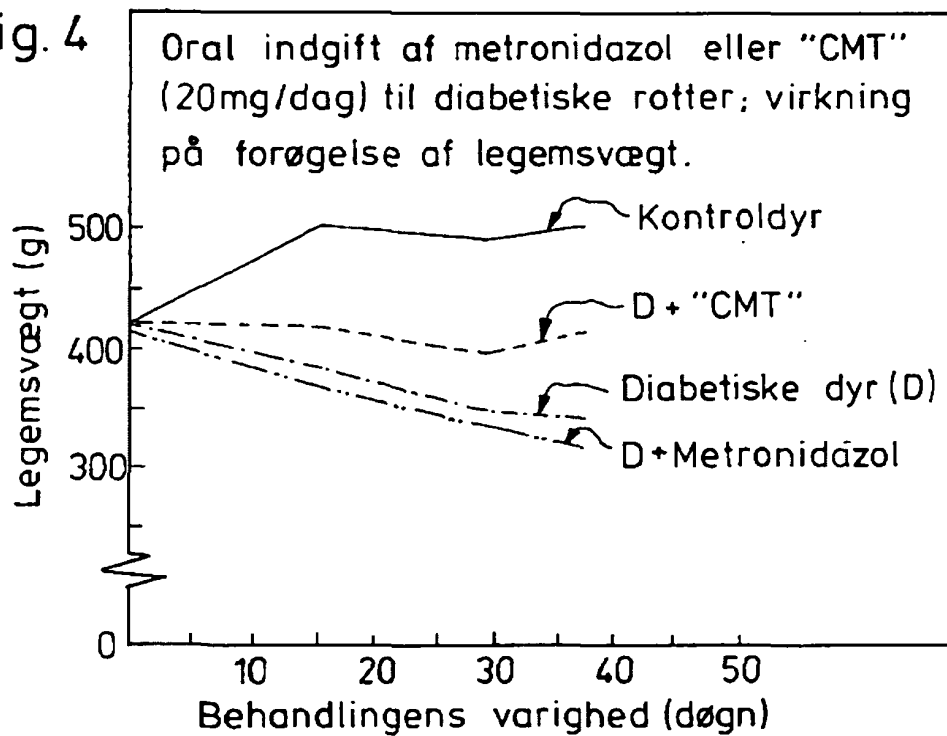


Fig. 4



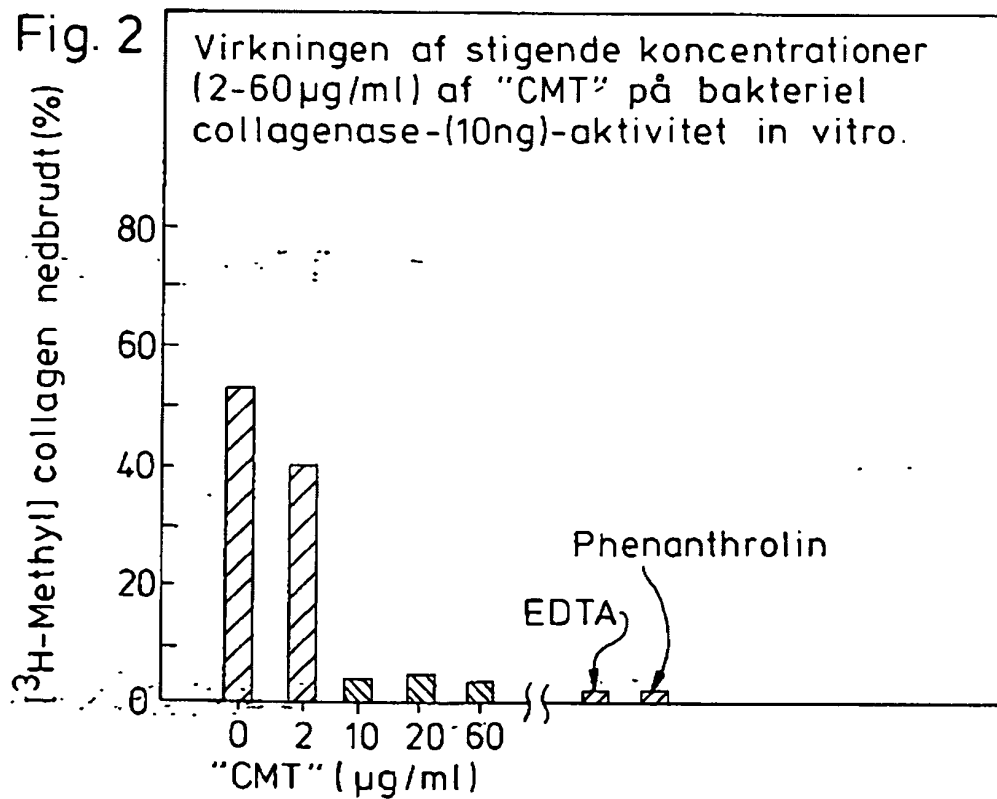
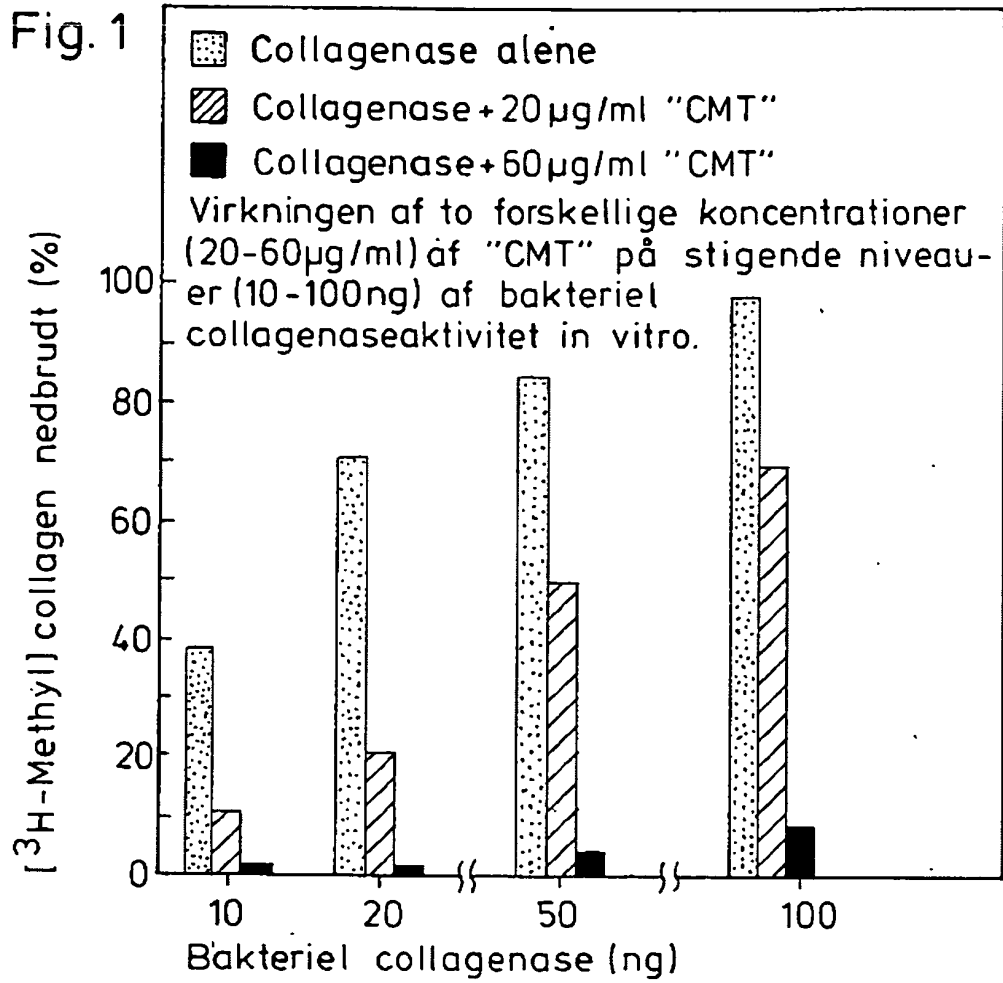


Fig. 3

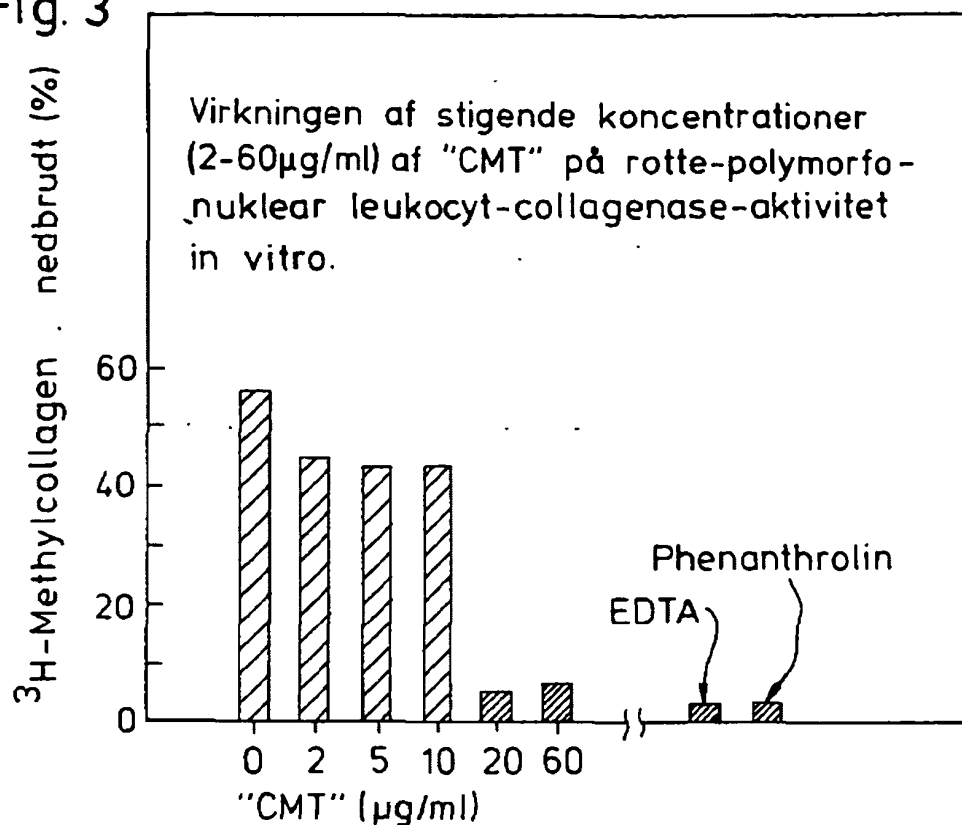


Fig. 4

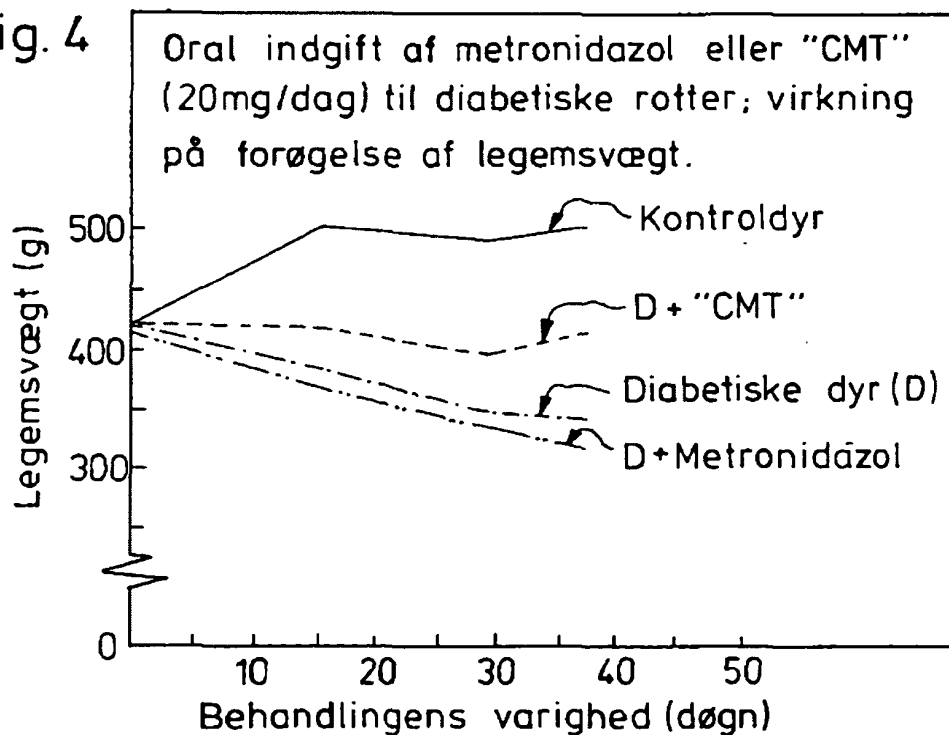


Fig. 5

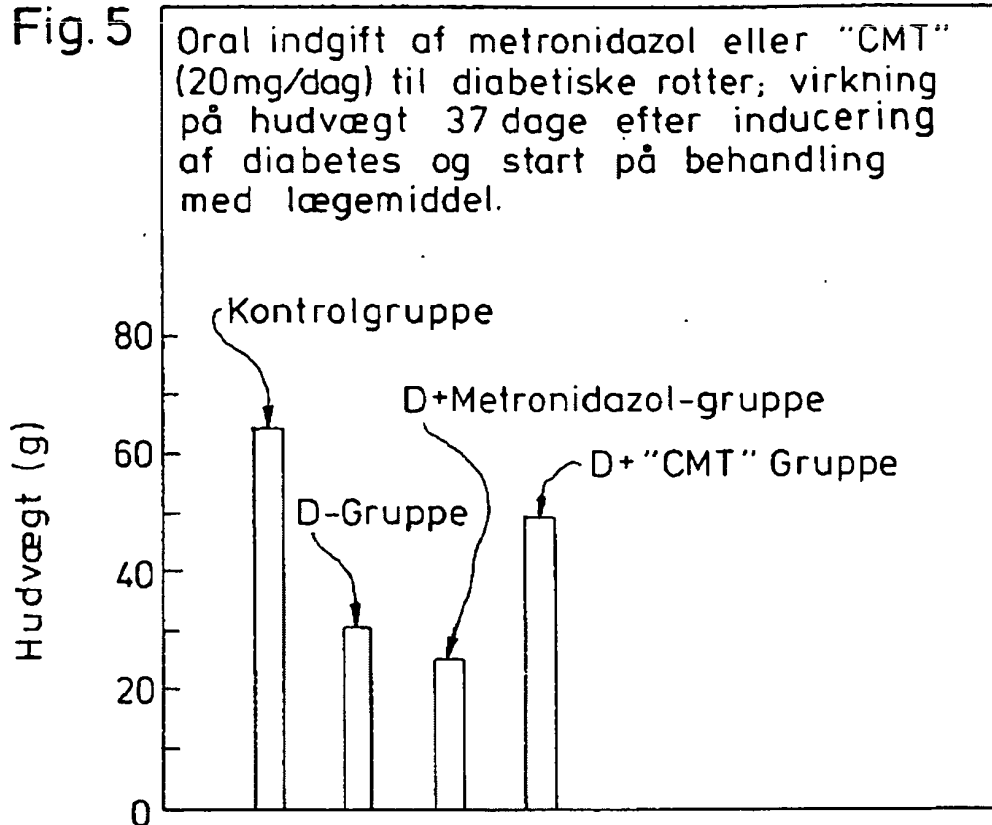


Fig. 6

