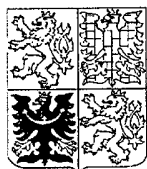


PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(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 1999/143043

(33) Země priority: US US

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

(86) PCT číslo: PCT/US99/27949

(87) PCT číslo zveřejnění: WO00/38728

(21) Číslo dokumentu:

2001 - 2345

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

A 61 K 45/06

A 61 K 31/785

A 61 P 9/00

(71) Přihlašovatel:

G. D. SEARLE LLC CORPORATE PATENT
DEPARTMENT, Chicago, IL, US;

(72) Původce:

Keller Bradley T., Chesterfield, MO, US;
Glenn Kevin C., Chesterfield, MO, US;
Schuh Joseph R., St. Louis, MO, US;

(74) Zástupce:

Čermák Karel Dr., Národní třída 32, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Kombinace inhibitorů transportu kyčelní žlučové
kyseliny a činidel pro sekvenci žlučové kyseliny
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 inhibitor transportu ileální kyseliny
žlučové kombinovaný s čidlem maskujícím kyselinu
žlučovou.

2001 - 2345 A3

Kombinace inhibitorů transportu ileální kyseliny žlučové a maskovacích činidel kyseliny žlučové pro kardiovaskulární indikace

Tato přihláška nárokuje prioritu US prozatímní přihlášky vynálezu č. 60/143,063, podané 7. července 1999 a US prozatímní přihlášky vynálezu 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 transport kyseliny žlučové v ileu (IBAT). Vynález se také týká maskovacích činidel kyseliny žlučové.

Dosavadní stav techniky

Je dobře známé, že hyperlipidemické stavy spojené se zvýšenými koncentracemi celkového cholesterolu a cholesterolu s lipoproteiny o nízké hustotě (LDL cholesterolu) LDL cholesterolu jsou hlavním rizikovým faktorem pro koronární srdeční choroby a zejména aterosklerózu. Jelikož vysoké úrovně LDL cholesterolu zvyšují nebezpečí aterosklerózy, metody pro snížení LDL cholesterolu v plazmě budou terapeuticky cenné pro léčbu aterosklerózy a ostatních nemocí spojených s akumulací lipidů v krevních cévách. Tyto nemoci zahrnují, nikoliv však s omezením, koronární srdeční nemoc, nemoci periferních cév a mrtvici.

Ateroskleróza je původem 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 jsou sbírána 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 o biochemii, fyziologii a známá aktivní činidla vztahující se ke žlučovým kyselinám a cholesterolu.

Přechodné patofyziologické změny jsou spojeny s přerušáním enterohepatálního oběhu žlučových kyselin u člověka se zděděným snížením aktivity IBAT, jak uvádí Heubi, J. E. a kol., „Primary Bile Acid Malabsorption: Defective in Vitro Ileal Active Bile Acid Transport“, Gastroenterology, 83, 804-11 (1982).

V dalším přiblížení k redukci recirkulace žlučových kyselin, ileální transportní systém žlučových kyselin je předpokládán farmaceutický cíl pro léčbu hypercholesterolemie, založený na přerušení enterohepatálního oběhu specifickými transportními inhibitory (Kramer a kol., „Intestinal Bile Acid Absorption“ The Journal of Biological Chemistry, 268 (24), 18035-46 (1993).

V některých patentových přihláškách Hoechst Aktiengesellschaft jsou popisovány polymery různých v přírodě se vyskytujících složek enterohepatálního oběhového systému a

jejich derivátů, zahrnující žlučové kyseliny, které inhibují fyziologický transport s cílem zredukovat dostatečně hladinu LDL cholesterolu, aby byly účinné jako farmaceutické látky, zejména jako hypocholesterolemická činidla. Jednotlivé Hoechstovy patentové přihlášky, které popisují sloučeniny inhibující transport žlučových kyselin jsou uvedené v dále.

- R1. Kanadská patentová přihláška č. 2 025 294.
- R2. Kanadská patentová přihláška č. 2 078 588.
- R3. Kanadská patentová přihláška č. 2 085 782.
- R4. Kanadská patentová přihláška č. 2 085 830.
- R5. Evropská přihláška č. 0379 161.
- R6. Evropská přihláška č. 0549 967.
- R7. Evropská přihláška č. 0559 064.
- R8. Evropská přihláška č. 0563 731.

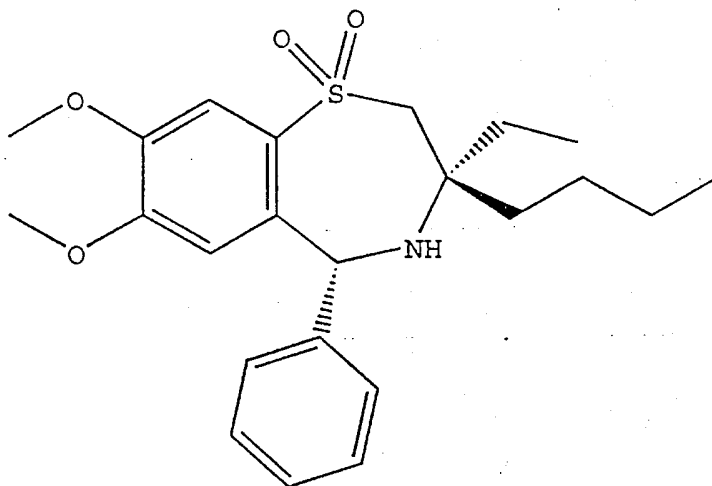
Vybrané benzothiepiny jsou popsány v mezinárodní patentové přihlášce WO 93/321146 pro mnohá použití zahrnující metabolismus mastných kyselin a koronární vaskulární choroby.

Další vybrané benzothiepiny, známé pro použití jako hypolipaemická a hypocholesterolaemická činidla, zejména pro léčbu nebo prevenci aterosklerózy jsou popsány v patentové přihlášce EP 508425. Francouzská patentová přihláška FR 2661676 popisuje další benzothiepiny pro použití jako hypolipaemická a hypocholesterolaemická činidla. Dále, patentová přihláška č. WO 92/18462 uvádí další benzothiepiny pro použití jako hypolipaemická a hypocholesterolaemická činidla. US patent č. 5 994 391 (Lee a kol.). Každé z těchto hypolipaemických a hypocholesterolaemických činidel popsané v těchto individuálních patentových přihláškách je omezeno amidovou vazbou k atomu uhlíku přilehlému k fenylovému kruhu kondenzovaného bicyklobenzothiepinového kruhu.

Další benzothiepiny užitečné pro léčbu hypercholesterolemie a hyperlipidemie jsou popsány v patentové přihlášce č. PCT/US95/10863. Další benzothiepiny užitečné pro

profylaxi a léčbu hypercholesterolemie a hyperlipidemie a rovněž farmaceutické prostředky obsahující takové benzothiepiny jsou popsány v patentové přihlášce č. PCT/US97/04076. Ještě další benzothiepiny a prostředky je obsahující, užitečné pro profylaxi a léčbu hypercholesterolemie a hyperlipidemie jsou popsány v US patentové přihlášce č. 08/816,065.

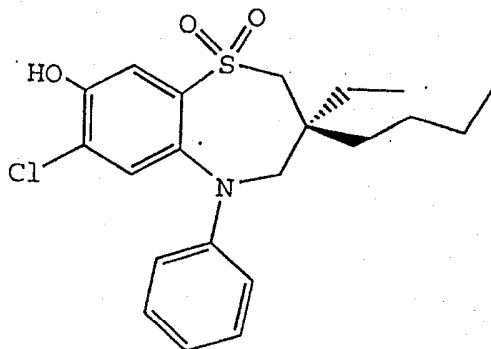
Inhibice transportu žlučových kyselin in vitro je v souladu s hypolipidemickou aktivitou popsanou v patentové přihlášce The Wellcome Foundation Limited č. WO 93/16055 „Hypolipidemic Benzothiazepine Compounds.“ Tato publikace popisuje řadu hypolipidemických benzothiazepinových sloučenin. Další hypolipidemické benzothiazepinové sloučeniny (zejména 2,3,4,5-tetrahydrobenzo-1-thia-4-azepinové sloučeniny) jsou popsány v patentové přihlášce č. WO 96/05188. Zejména užitečný benzothiazepin popsaný ve WO 96/05188 je sloučenina vzorce B-2. Další hypolipidemické benzothiazepinové sloučeniny jsou popsány v patentové přihlášce č. WO 96/16051.



B-2

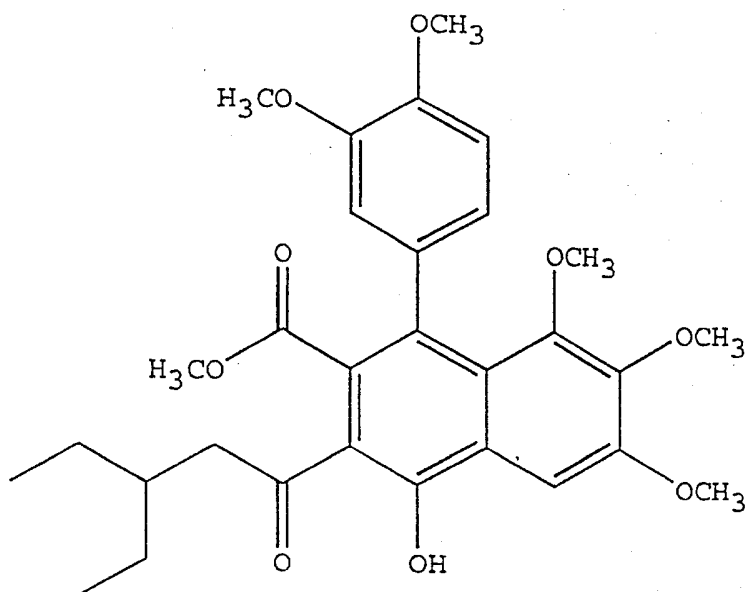
(3R,5R)-3-butyl-3-ethyl-2,3,4,5-tetrahydro-
-7,8-dimethoxy-5-fenyl-1,4-benzothiazepin
1,1-dioxid

Další benzothiazepinové sloučeniny užitečné pro regulaci cholesterolu jsou popsány v přihlášce PCT č. WO 99/35135. Zde se uvádí sloučenina vzorce B-7.



B-7

Další sloučeniny, které jsou inhibitory IBAT zahrnují třídu naftalenových sloučenin, kterou popsal T. Ichihashi a kol. v J. Pharmacol. Exp. Ther., 284(1), 43-50 (1998). V této třídě je zejména užitečný S-8921 (methyl 1-(3,4-dimethoxyfenyl)-3-(3-ethylvaleryl)-4-hydroxy-6,7,8-trimethoxy-2-naftoát). Struktura S-8921 je uvedena vzorcem B-20. Další naftalenové sloučeniny nebo deriváty ligninu, užitečné pro léčbu nebo profylaxi hyperlipidemie nebo aterosklerózy jsou popsány v patentové přihlášce PCT č. 94/24087.



B-20

Skupina látek, která působí jiným mechanismem na snížení LDL cholesterolu zahrnuje maskovací činidla žlučových kyselin „maskovací činidla žlučových kyselin“ nebo „sloučeniny maskující žlučové kyseliny“). Taková činidla jsou typické měniče aniontů podávané pacientovi orálně. Jak činidlo prochází střevem, anionty žlučových kyselin jsou činidlem maskovány a vyměšovány. Předpokládá se, že takové maskování zabraňuje reabsorpci střevem, například kyčelníkem a tím je zvýšena v těle konverze cholesterolu na žlučové kyseliny, což se projeví ve snížení úrovně cholesterolu v séru. Jedno takové maskovací činidlo žlučových kyselin je cholestyramin, styren-divinylbenzenový kopolymer, obsahující kvartérní amoniové kationtové skupiny, schopné vázat žlučové kyseliny. Má se za to, že cholestyramin váže žlučové kyseliny v intestinálním traktu, čímž interferuje jejich normální enterohepatický oběh. Tento účinek popsal Reihner a kol. v „Regulation of hepatic cholesterol metabolism in humans: stimulatory effects of cholestyramine on HMG-CoA reductase activity and low density lipoprotein receptor expression in gallstone patients“, Journal of Lipid Research, 31, 2219-2226 (1990). Další popis tohoto účinku lze nalézt v Suckling a kol., „Cholesterol lowering and bile acid excretion in the hamster with cholestyramine treatment“, Atherosclerosis, 89, 183-190 (1991). To vede ke zvýšení syntézy jaterních žlučových kyselin, poněvadž játra užívají cholesterol za současného zvýšení aktivity jaterních LDL receptorů, což vede ke zvýšení klearance cholesterolu a snížení úrovně LDL cholesterolu v séru.

Další maskovací činidlo žlučových kyselin je colestipol, kopolymer diethylentriaminu a 1-chlor-2,3-epoxypropanu. Cloestipol je popsán v US patentu č. 3 692 895. Častý vedlejší účinek colestipolu a cholestyraminu je gastrický stres.

Další maskovací činidla žlučových kyselin jsou popsána v US patentu č. 5 703 188, Geltex Pharmaceuticals Inc.

Například jedno takové maskovací činidlo je 3-methakryl-amidopropyltrimethylamoniumchlorid, kopolymerovaný s ethylenglylkoldimethakrylátem za získání kopolymeru.

Příklad maskovacího činidla žlučových kyselin je CholestaGel, registrační číslo CAS 182815-44-7. CholestaGel je N,N,N-trimethyl-6-(2-propenylamino)-1-hexanaminium chloridový polymer s chlormethyloxiranem, 2-propen-1-aminem a N-2-propenyl-1-dekanaminhydrochloridem.

Ještě další třída materiálů navrhovaných jako maskovací činidla žlučových kyselin zahrnuje částice, obsahující amfifilní kopolymery, mající síťovanou vrstvu a vnitřní jádro (patentová přihláška PCT/US 97/11610). Struktury a příprava takových síťovaných amfifilních kopolymerů jsou popsány v PCT/US97/11345. Takové částice jsou obecně pojmenovány „knedels“ (K. B. Thurmond a kol., J. Am. Chem. Soc., 118 (30), 7239-40 (1996)).

Některé kombinační terapie pro léčbu kardiovaskulárních chorob jsou popsány v literatuře. Kombinace inhibitorů IBAT s inhibitory HMG CoA reduktázy užitečná pro léčbu kardiovaskulárních nemocí jsou popsány v US. patentové přihlášce č. 09/037,308

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

L. Cashin-Hemphill a kol. (J. Am. Med. Assoc., 264 (23), 3013-17 (1990), 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)).

Kombinační terapii za použití sitostanol ester margarinu a pravastatinu popsali H. Gylling a kol. (J. Lipid Res., 37, 1776-85 (1986)). 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)) popisují kombinační terapii za použití lovastatinu a colestipolu, která snižuje progres aterosklerotické léze a zvýšení regrese léze vzhledem k samostatnému lovastatinu.

Buch a kol. (patentová přihláška PCT č. WO 99/11263), 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) nárokuje 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 kardiovaskulárních nemocí, uvádí se v předkládané přihlášce kombinační terapie kardiovaskulárních léčiv.

Předkládaná přihláška poskytuje kombinační terapii, zahrnující použití prvního množství inhibitoru IBAT a druhého množství dalšího kardiovaskulárního terapeuticky účinného léčiva k profylaxi a léčbě hyperlipidemie, aterosklerózy nebo hypercholesterolemie, kde množství uvedených látek dohromady zahrnuje antihyperlipidemicky účinné množství, antiatheroskleroticky účinné množství nebo antihypercholesterolemicky účinné množství uvedených sloučenin. Například jedno z mnoha provedení vynálezu je kombinační terapie zahrnující terapeutickou dávku inhibitoru IBAT a maskovacího činidla kyseliny žlučové. Výhodné provedení podle vynálezu je kombinační terapie, zahrnující terapeutickou dávku inhibitoru IBAT na bázi benzothiepinu a maskovacího činidla kyseliny žlučové.

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 inhibující transport ileální kyseliny žlučové a druhé množství sloučeniny, maskující kyselinu žlučovou, 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 inhibující transport ileální kyseliny žlučové a druhé množství sloučeniny maskující kyselinu žlučovou, kde množství uvedených látek dohromady zahrnuje antiatheroskleroticky 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 inhibující transport ileální kyseliny žlučové a druhé množství sloučeniny maskující kyselinu žlučovou, 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:

„Transportér ileálních žlučových kyselin“ nebo „IBAT“ je synonymum s apikálním transportérem žlučových kyselin závislým také na sodíku.

„Benzothiepinový inhibitor IBAT“ znamená inhibitor transportu žlučových kyselin, který obsahuje terapeutickou sloučeninu zahrnující 2,3,4,5-tetrahydro-1-benzothiepin 1,1-dioxidovou strukturu.

„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 dávková forma, obsahující pevně určený poměr aktivních složek nebo více oddělených dávkových forem pro každou inhibiční sloučeninu. Navíc toto podání zahrnuje také využití každého 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

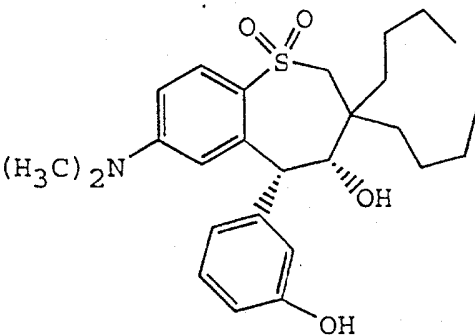
Kombinace podle předkládaného vynálezu budou mít řadu využití. Například úpravou dávky a lékařským dohledem budou jednotlivé dávky použitých terapeutických sloučenin nižší, než jsou typické dávky použité při monoterapii. Snižování dávek přinese výhody, spočívající ve snížení vedlejších účinků ve srovnání 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 účinek nebo doplňující způsoby podání. Například inhibitory IBAT snižují reabsorpci žlučových kyselin v ileu inhibicí transportérů kyseliny žlučové v ileu. Naproti tomu maskovací činidla kyseliny žlučové působí v intestinálním traktu a maskují žlučové kyseliny a někdy cholesterol. Terapeutická kombinace inhibitoru IBAT a maskovacího činidla

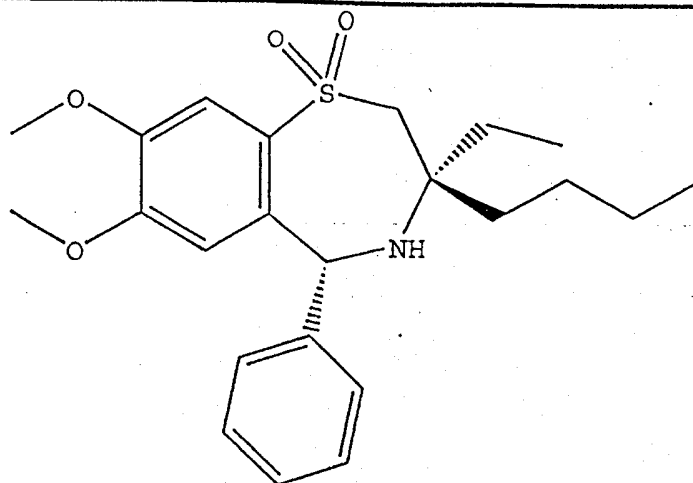
kyseliny žlučové, upraví při optimálních dávkách, další snížení celkové reabsorbce žlučových kyselin a cholesterolu v zažívacím traktu ve větší míře, než kterákoliv složka kombinace při monoterapii.

Sloučeniny užitečné v předkládaném vynálezu zahrnují široký rozsah terapeutických sloučenin. Některé inhibitory IBAT užitečné v předkládaném vynálezu jsou popsány v patentové přihlášce č. PCT/US95/10863, zde uváděné jako odkaz. Další inhibitory IBAT jsou popsány v PCT/US97/04076, zde uváděné jako odkaz. Ještě další inhibitory IBAT, užitečné v předkládaném vynálezu jsou popsány v US patentové přihlášce č. 08/816,065, zde uváděné jako odkaz. Další sloučeniny užitečné jako inhibitory IBAT v předkládaném vynálezu jsou popsány ve WO 98/40375, zde uváděné jako odkaz. Další sloučeniny užitečné jako inhibitory IBAT v předkládaném vynálezu jsou popsány v US patentové přihlášce č. 08/816,065, zde uváděné jako odkaz. Další sloučeniny užitečné jako inhibitory IBAT v předkládaném vynálezu jsou popsány v US patentu č. 5 994 391, zde uváděné jako odkaz. Zvláště zajímavé inhibitory IBAT podle vynálezu zahrnují inhibitory uvedené v tabulce 1 a rovněž diastereomery, enantiomery, racemáty, soli a tautomery inhibitorů IBAT tabulky 1.

Tabulka 1

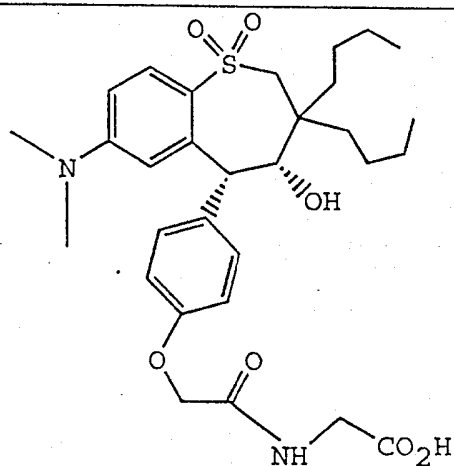
Sloučenina číslo	Struktura
B-1	

B-2

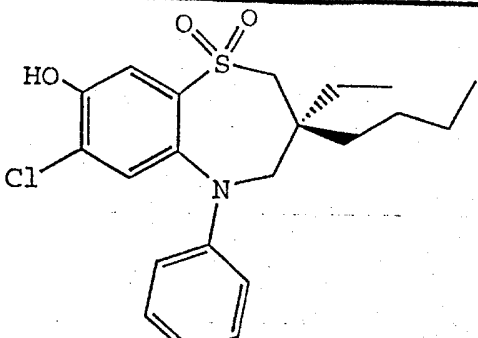
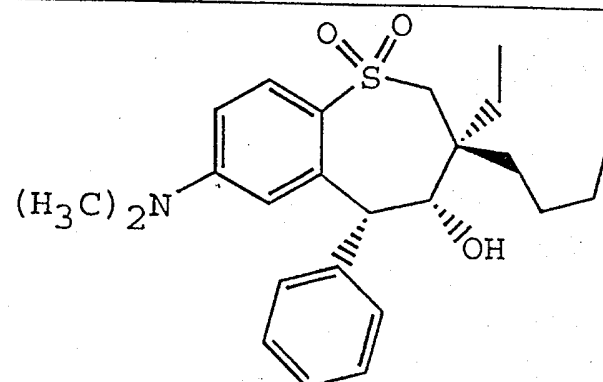
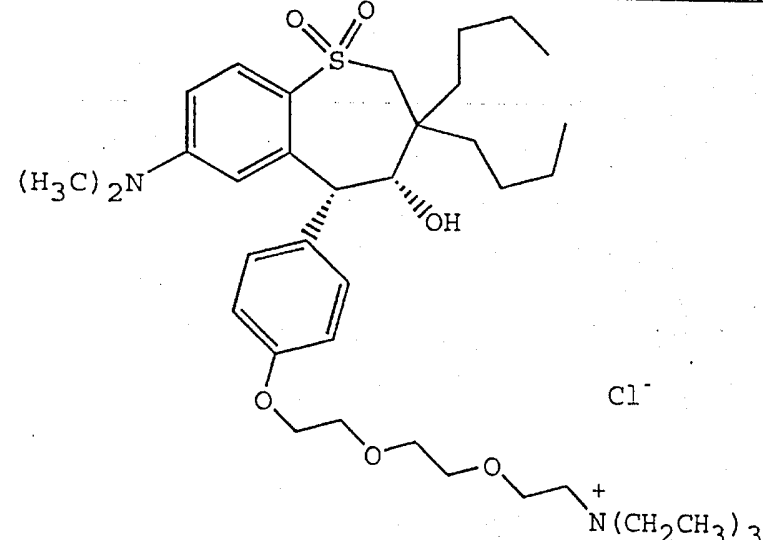


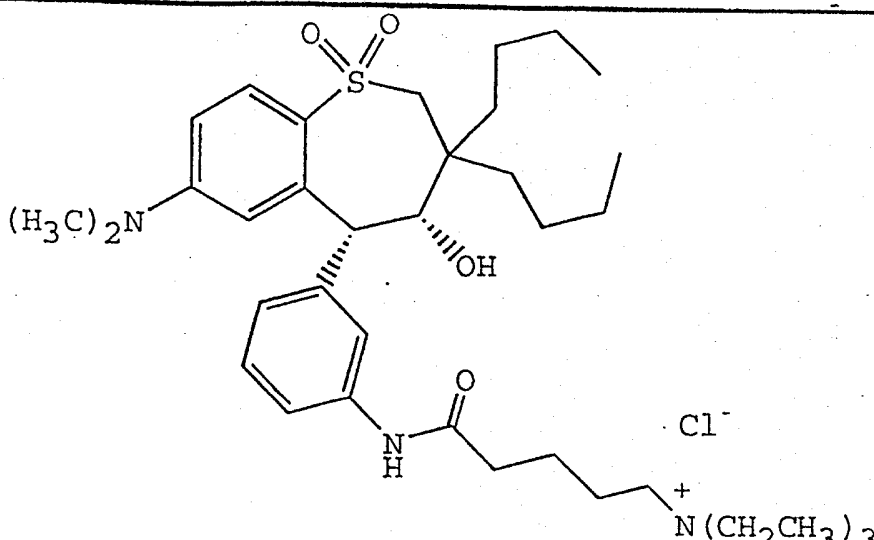
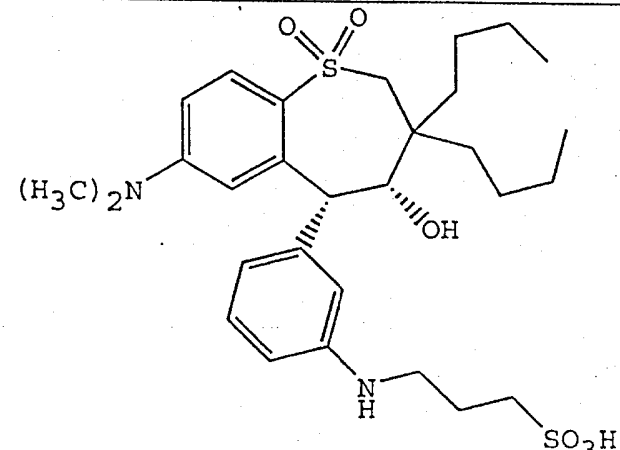
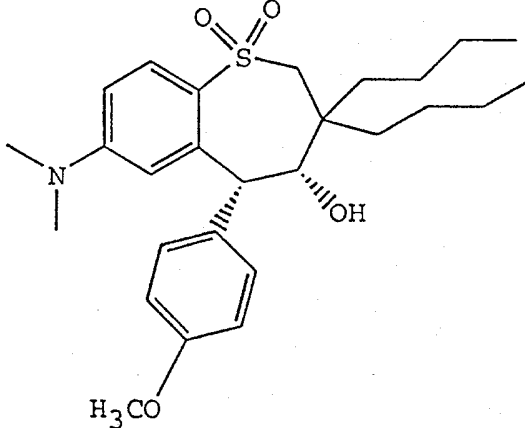
(3R,5R)-3-butyl-3-ethyl-2,3,4,5-tetrahydro-
-7,8-dimethoxy-5-phenyl-1,4-benzothiazepin
1,1-dioxid

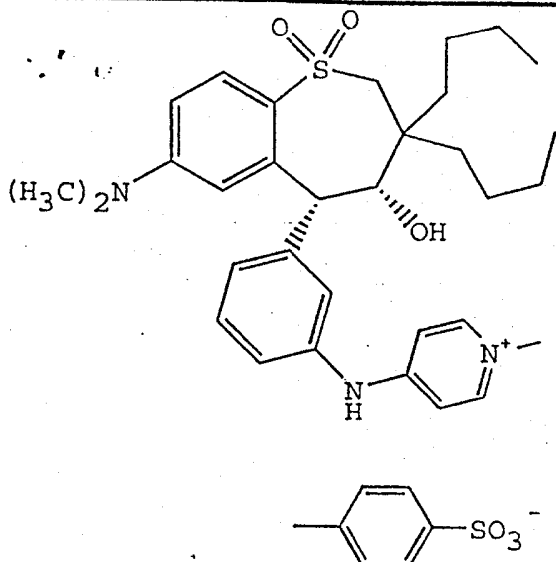
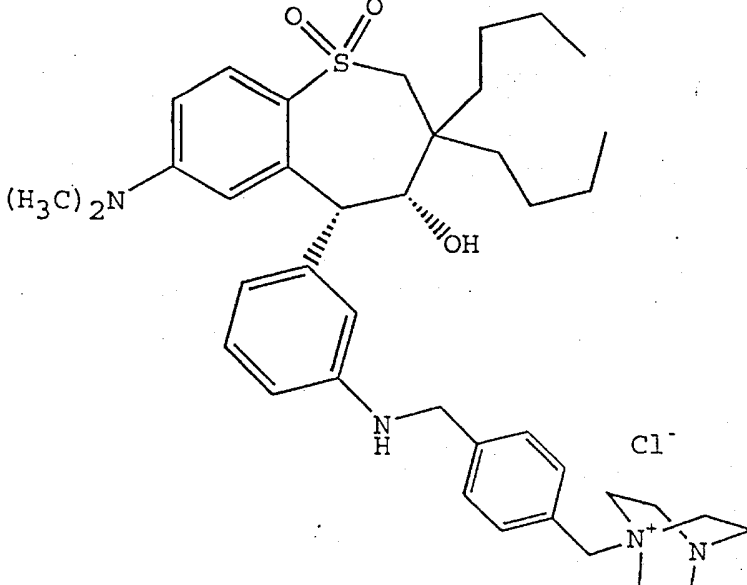
B-3

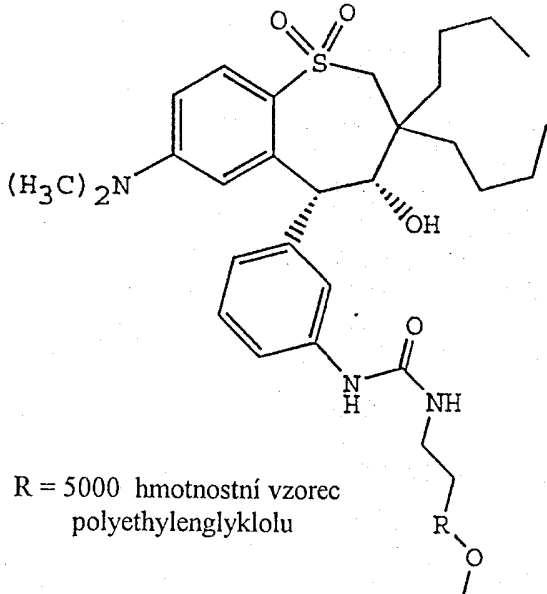
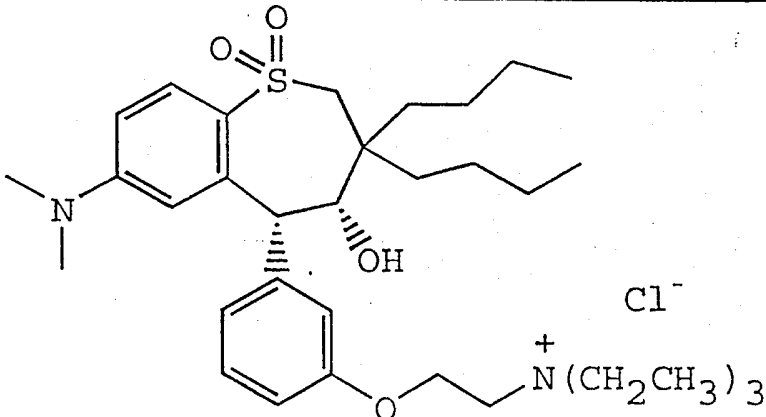
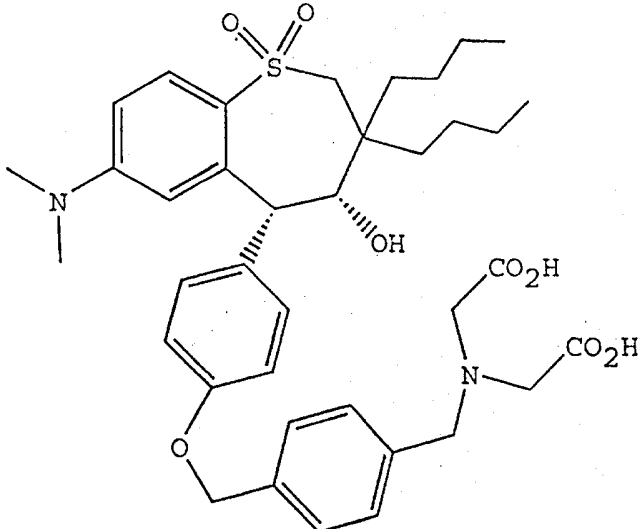


10.09.01

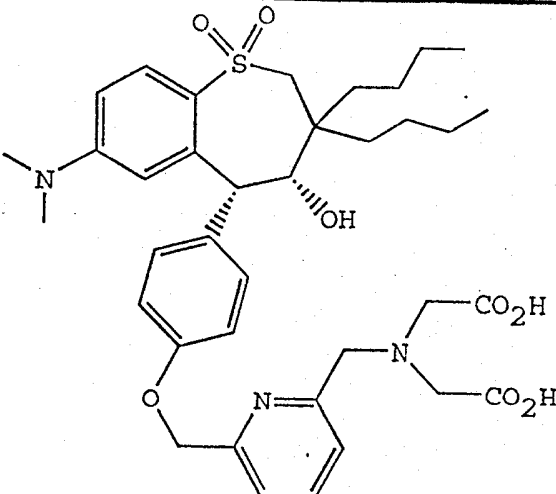
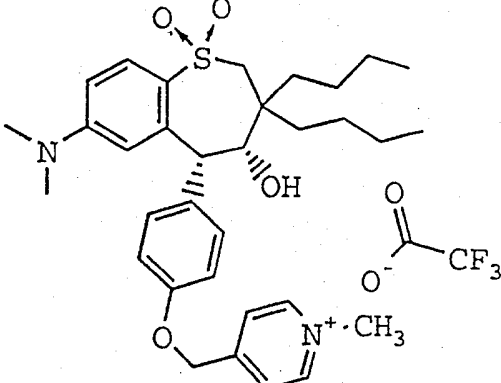
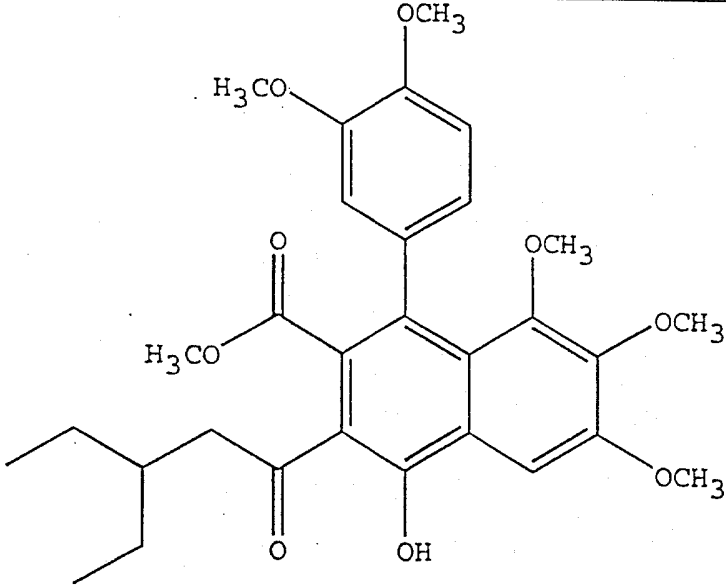
B-7	
B-8	
B-9	

B-10	 <chem>CN(C)c1ccc(cc1)[C@H]2C[C@@H](C[C@H](C2)C(=O)NCCCC[N+]([CH2CH3])([CH2CH3])[CH2CH3])[C@@H](C3CCCCC3)S(=O)(=O)c4ccc(cc4)C5=CC=CC=C5</chem>
B-11	 <chem>CN(C)c1ccc(cc1)[C@H]2C[C@@H](C[C@H](C2)S(=O)(=O)c3ccc(cc3)C4=CC=CC=C4)C(=O)NCCCCS(=O)(=O)O)[C@@H](C5CCCCC5)S(=O)(=O)c6ccc(cc6)C7=CC=CC=C7</chem>
B-12	 <chem>CN(C)c1ccc(cc1)[C@H]2C[C@@H](C[C@H](C2)C(=O)NCCCCOC)[C@@H](C3CCCCC3)S(=O)(=O)c4ccc(cc4)C5=CC=CC=C5</chem>

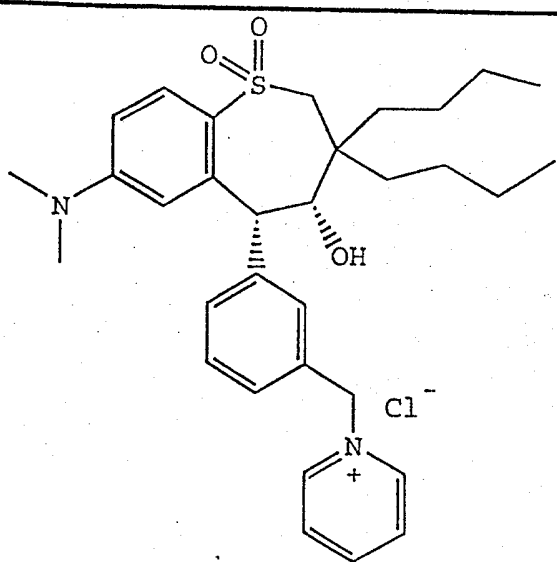
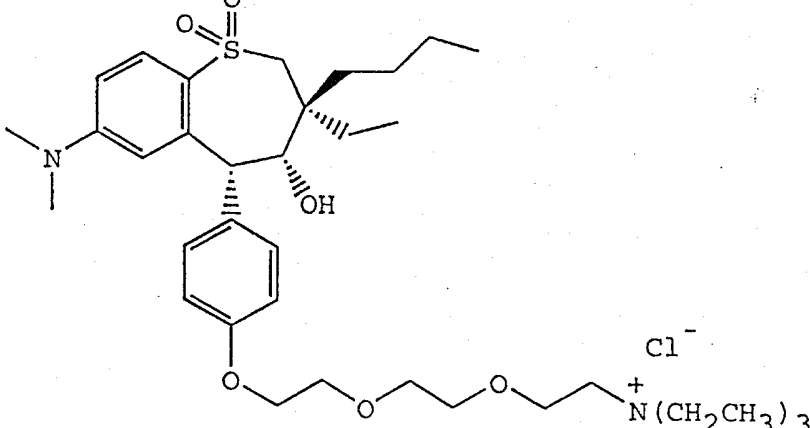
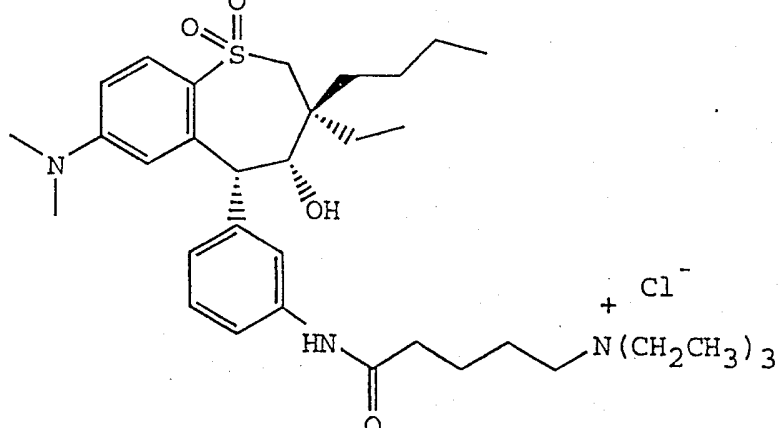
B-13	 Chemical structure of compound B-13. It features a central 1,4-dioxane ring with a sulfone group (SO_2) at position 1 and a diethylamino group ($(\text{H}_3\text{C})_2\text{N}$) at position 4. At position 2, there is a chiral center with a hydroxyl group (OH) and a phenyl ring. The phenyl ring is substituted with a 4-(pyridinium-2-yl)amino group. A separate structure shows a phenyl ring with a sulfonate group (SO_3^-).
B-14	 Chemical structure of compound B-14. It features a central 1,4-dioxane ring with a sulfone group (SO_2) at position 1 and a diethylamino group ($(\text{H}_3\text{C})_2\text{N}$) at position 4. At position 2, there is a chiral center with a hydroxyl group (OH) and a phenyl ring. The phenyl ring is substituted with a 4-(1-(4-(1,4-diazabicyclo[2.2.2]oct-5-yl)phenyl)ethyl)amino group. A separate structure shows a chloride ion (Cl^-).

B-15	 R = 5000 hmotnostní vzorec polyethylenglykolu
B-16	 Cl⁻
B-17	

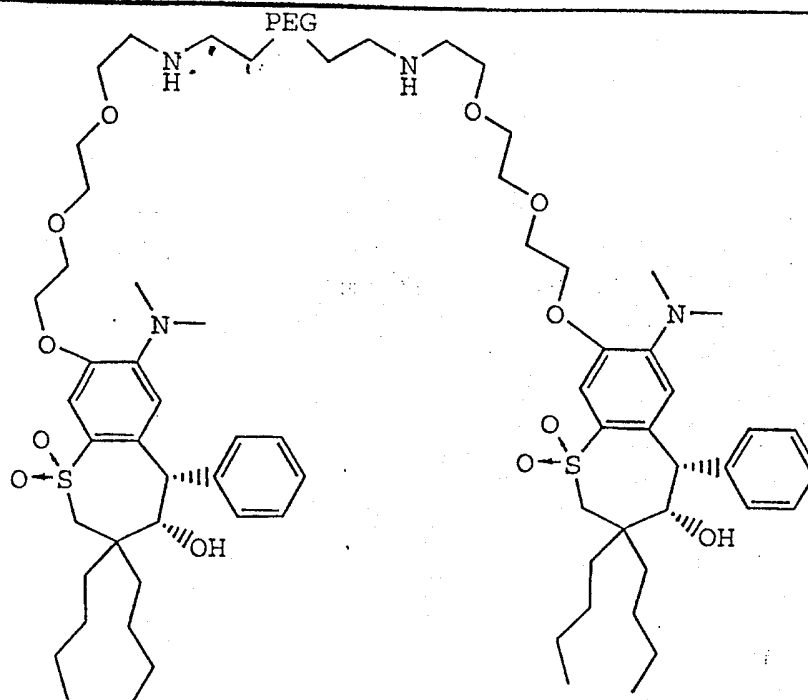
10.09.01

B-18	
B-19	
B-20	

10.09.01

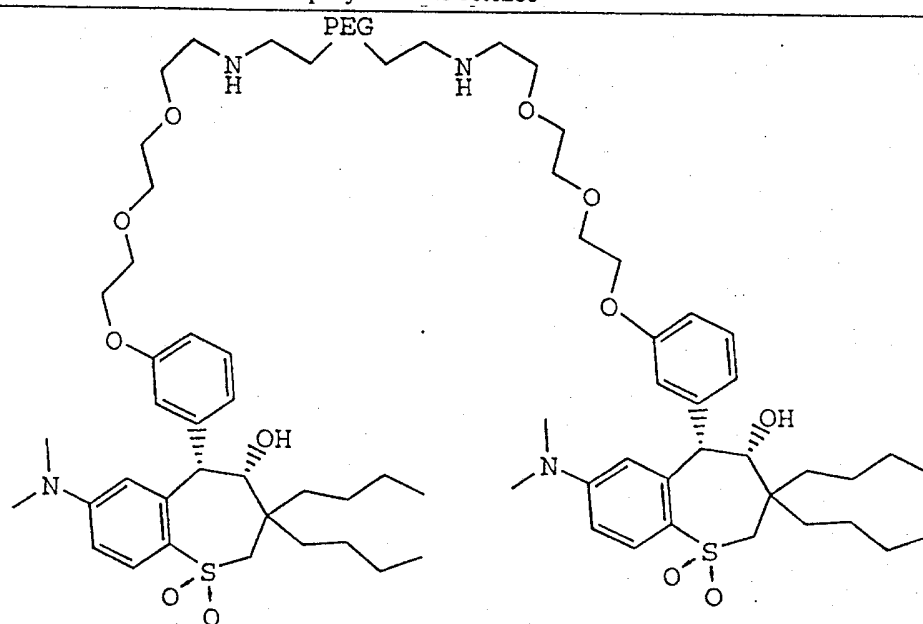
B-21	
B-22	
B-23	

B-28

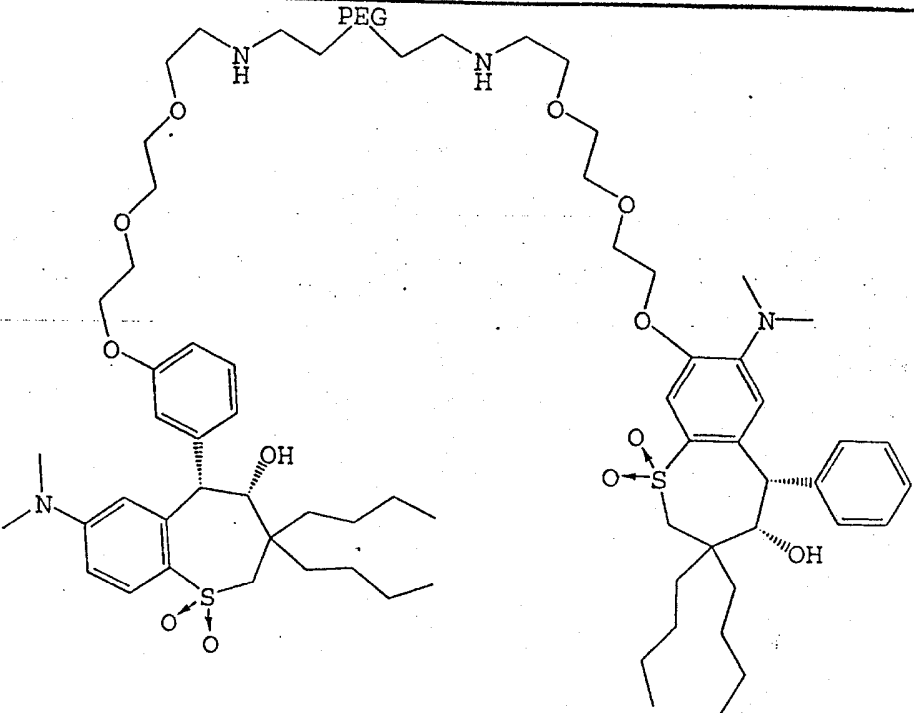
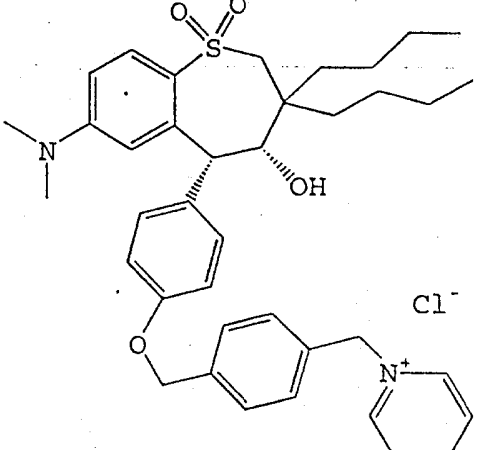
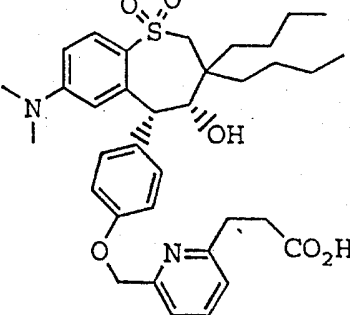


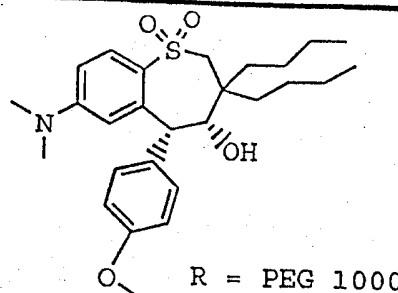
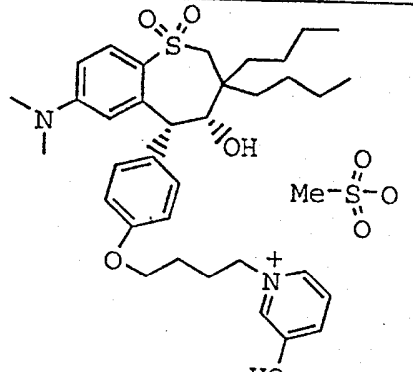
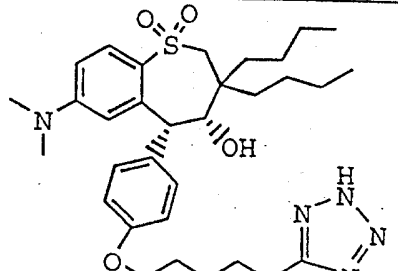
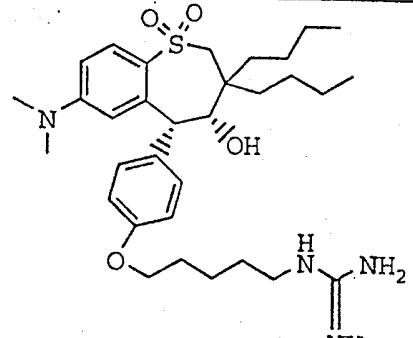
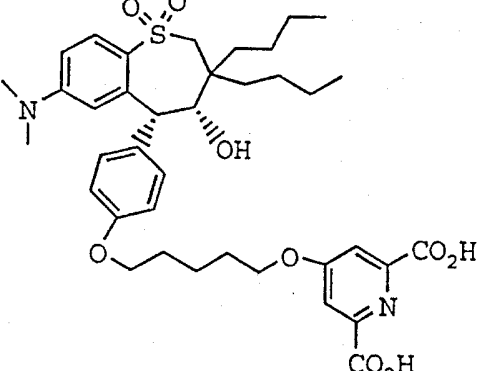
PEG = 3400 molekulární hmotnost polyethylenglykolového
polymerního řetězce

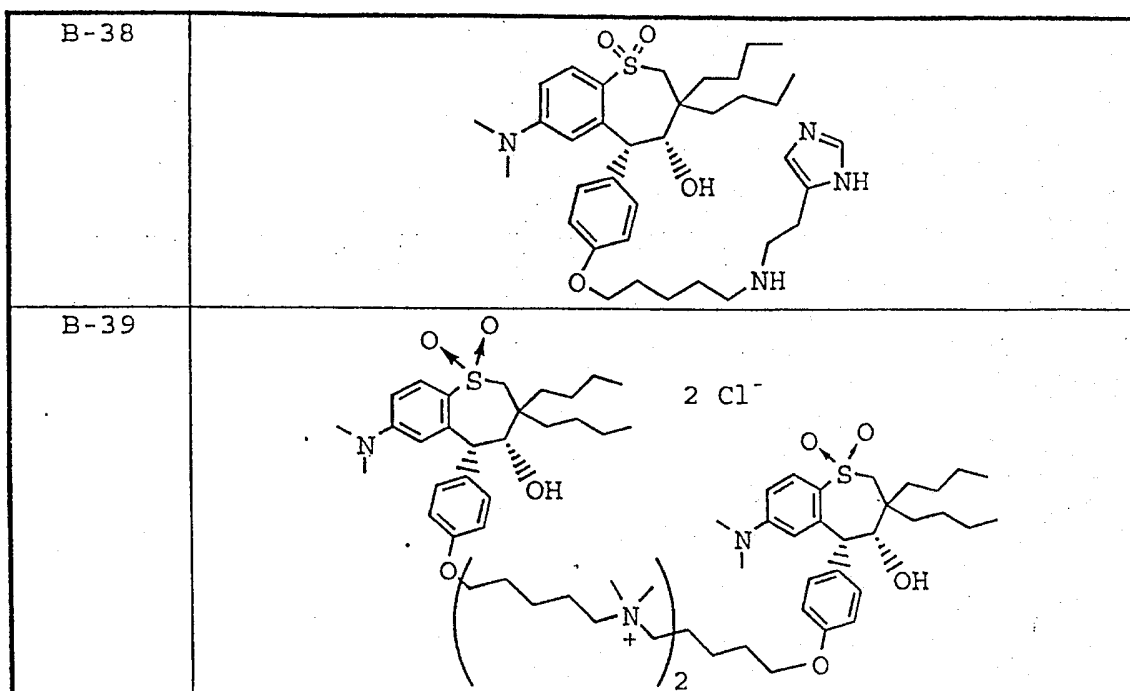
B-29



PEG = 3400 molekulární hmotnost polyethylenglykolového
polymerního řetězce

B-30	 PEG = 3400 molekulární hmotnost polyethylenglykolového polymerního řetězce
B-31	
B-32	

B-33	 R = PEG 1000
B-34	 Me-SO₃⁻
B-35	
B-36	
B-37	



Maskovací činidla kyseliny žlučové užitečná v kombinacích a metodách podle předkládaného vynálezu zahrnují řadu struktur a funkčních skupin. Výhodná maskovací činidla kyseliny žlučové 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, obojetné ionty a tautomery. Individuální patenty uváděné v tabulce 2 jsou zde uváděny jako odkaz. Další maskovací činidla kyseliny žlučové užitečná v tomto dokumentu jsou částice obsahující amfifilní kopolymery mající síťovanou vrstvu a vnitřní jádro („knedels“, patentová přihláška č. PCT/US 97/11610, zde uváděná jako odkaz). Knedels zvláštního zájmu v předkládaném vynálezu zahrnují polystyren-b-poly(akrylová kyselina) (PS-b-PAA), síťované s jedním nebo více polyaminy. Zvláště výhodné knedels zahrnují PS-b-PAA, síťovaná s 1-(3-dimethylamino-propyl)-3-ethylkarbodiimid methiodidem a triethylentetraminem („knedel A“) nebo 1,7-diaza-4,10-diazonium-4,4,10,10-tetramethylundekandijodid („knedel B“). Další užitečné maskovací

činidlo je DMP-505, které popsal Gilles a kol., Drug Dev. Res. (1997), 41 (2), 65-75. Ještě další užitečné maskovací činidlo kyseliny žlučové je MCI-196, které popsal Mitsubishi Chemical Corp.

Tabulka 2

Sloučenina č.	Obecný název	Registrační číslo CAS	Odkaz na patent
G-35	cholestyramin	11041-12-6	
G-46	colestipol	50925-79-6	US 3 692 895
S-1	knedel A		PCT/US97/11345
S-2	knedel B		PCT/US97/11345
S-3	3-methakrylamidopro- pyltrimethylammonium chlorid kopolymerovaný s ethylenglykol dimethylakrylátem		US 5 703 188
S-4	CholestaGel	152751-57-0	WO 98/57652
S-5	OmegaGel		WO 98/57652
S-6	MCI-196	95522-45-5	JP 04013627 JP 02124819 JP 59138228 JP 59155421
G-54	DMP-504	196823-66-2	

Sloučeniny (například sloučeniny inhibující transport ileálních žlučových kyselin nebo sloučeniny maskující kyselinu žlučovou) 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 reakcí 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.

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 zvláště 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 inhibující transport žlučových kyselin a sloučeninu maskující kyselinu žlučovou. V takové kompozici mohou být sloučenina inhibující transport žlučových kyselin a sloučenina maskující kyselinu žlučovou 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 inhibitoru IBAT může být v rozsahu od okolo 0,01 do okolo 1000 mg/den, výhodně od okolo 0,1 mg do okolo 50 mg/den, výhodněji od okolo 1 do 10 mg/den.

Celková denní dávka maskovacího činidla kyseliny žlučové může být obecně v rozsahu od okolo 250 do okolo 30000 mg/den, výhodně okolo 500 do okolo 15000 mg/den, výhodněji od okolo 500 do okolo 5000 mg/den v jedné nebo rozdělených dávkách.

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 mechanismů. Mezi takové mechanismy 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 intestinálního traktu, enzymatické uvolňování aktivního léku z dávkové formy. Pro některé terapeutické sloučeniny užitečné podle předkládaného vynálezu (například inhibitor IBAT nebo inhibitor CETP) zamýšleným efektem je prodloužení periody o kterou je aktivní složka léku dopravena na místo účinku (například ileum) 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 hydroxypropylmethylcelulózy a aniontové polymery methakrylové kyseliny a metylester methakrylové kyseliny.

Kombinace podle předkládaného vynálezu se mohou dodávat orálně, jako pevné látky, polopevné látky nebo v kapalně formě. Pokud jsou v kapalně nebo polotuhé formě, mohou být kombinace podle předkládaného vynálezu například ve formě kapaliny, sirupu nebo v želatinových tobolkách. V jednom provedení, když se inhibitor IBAT použije v kombinaci podle předkládaného vynálezu, může být IBAT inhibitor ve formě kapaliny, sirupu nebo v želatinové kapsli. V jiném provedení, když se použije maskovací činidlo kyseliny žlučové podle předkládaného vynálezu, může se použít maskovací činidlo použít ve formě kapaliny, sirupu nebo v želatinové kapsli.

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. Nejčastěji se maskovací činidlo kyseliny žlučové podá orálně.

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 přídatnými 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 bukalní (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 mohou také obsahovat, jak je v praxi normální, přídatné 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 suspenzačních 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 postupně v jednotlivých formulacích nebo může být podáváno simultánně, 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 IBAT, dávka se může pohybovat v rozmezí od okolo 0,01 mg/den do okolo 500 mg/den nebo i jinak, záleží na specifickém inhibitoru, jak je v oboru známo. V případě maskovacího činidla kyseliny žlučové dávka může být v rozsahu od okolo 1000 mg do okolo 30000 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 požití 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 sloučeninami a/nebo kompozicemi podle vynálezu jsou vybrány s ohlednutím 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 hyperlipidemií 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 popsány 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. Snížení dávky poskytne výhodu spočívající ve snížení vedlejších účinků jednotlivých terapeutických sloučenin v porovnání s monoterapií.

Jedno z několika provedení předkládaného vynálezu zahrnuje kombinační terapii, zahrnující použití prvního množství inhibitoru IBAT 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 antiatheroskleroticky účinné množství uvedených sloučenin. Například jedno z mnoha provedení vynálezu je kombinační terapie zahrnující terapeutické dávky inhibitoru IBAT a maskovacího činidla kyseliny žlučové. Výhodné provedení podle předkládaného vynálezu zahrnuje kombinační terapii zahrnující terapeutické dávky benzothiepinového inhibitoru IBAT a maskovacího činidla kyseliny žlučové.

Ještě v dalším provedení předkládaný vynález zahrnuje kardiovaskulární terapii, která zahrnuje terapeutické dávky amfifilního kopolymeru majícího síťovanou vrstvu a vnitřní jádro v kombinaci s dalším činidlem maskujícím kyselinu žlučovou. Další činidlo, maskující kyselinu žlučovou může být například cholestyramin nebo colestipol.

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

Příklady provedení vynálezu

Tabulka 7 ilustruje příklady některých kombinací předkládaného vynálezu, kde kombinace zahrnuje první množství inhibitoru IBAT a druhé množství maskovacího činidla kyseliny žlučové, kde množství uvedených látek dohromady zahrnuje antihyperlipidemicky účinné množství nebo antiateroskleroticky účinné množství uvedených sloučenin.

Tabulka 3

Číslo příkladu	Složka 1	Složka 2
1	B-1	cholestyramin
2	B-2	cholestyramin
3	B-3	cholestyramin
4	B-4	cholestyramin
5	B-5	cholestyramin

10.09.01

6	B-6	cholestyramin
7	B-7	cholestyramin
8	B-8	cholestyramin
9	B-9	cholestyramin
10	B-10	cholestyramin
11	B-11	cholestyramin
12	B-12	cholestyramin
13	B-13	cholestyramin
14	B-14	cholestyramin
15	B-15	cholestyramin
16	B-16	cholestyramin
17	B-17	cholestyramin
18	B-18	cholestyramin
19	B-19	cholestyramin
20	B-20	cholestyramin
21	B-21	cholestyramin
22	B-22	cholestyramin
23	B-23	cholestyramin
24	B-24	cholestyramin
25	B-25	cholestyramin
26	B-26	cholestyramin
27	B-27	cholestyramin
28	B-28	cholestyramin
29	B-29	cholestyramin
30	B-30	cholestyramin
31	B-31	cholestyramin
32	B-32	cholestyramin
33	B-33	cholestyramin
34	B-34	cholestyramin
35	B-35	cholestyramin
36	B-36	cholestyramin
37	B-37	cholestyramin
38	B-38	cholestyramin

10.09.01

39	B-39	cholestyramin
40	B-1	colestipol
41	B-2	colestipol
42	B-3	colestipol
43	B-4	colestipol
44	B-5	colestipol
45	B-6	colestipol
46	B-7	colestipol
47	B-8	colestipol
48	B-9	colestipol
49	B-10	colestipol
50	B-11	colestipol
51	B-12	colestipol
52	B-13	colestipol
53	B-14	colestipol
54	B-15	colestipol
55	B-16	colestipol
56	B-17	colestipol
57	B-18	colestipol
58	B-19	colestipol
59	B-20	colestipol
60	B-21	colestipol
61	B-22	colestipol
62	B-23	colestipol
63	B-24	colestipol
64	B-25	colestipol
65	B-26	colestipol
66	B-27	colestipol
67	B-28	colestipol
68	B-29	colestipol
69	B-30	colestipol
70	B-31	colestipol
71	B-32	colestipol

10.09.01

72	B-33	colestipol
73	B-34	colestipol
74	B-35	colestipol
75	B-36	colestipol
76	B-37	colestipol
77	B-38	colestipol
78	B-39	colestipol
79	B-1	knedel A
80	B-2	knedel A
81	B-3	knedel A
82	B-4	knedel A
83	B-5	knedel A
84	B-6	knedel A
85	B-7	knedel A
86	B-8	knedel A
87	B-9	knedel A
88	B-10	knedel A
89	B-11	knedel A
90	B-12	knedel A
91	B-13	knedel A
92	B-14	knedel A
93	B-15	knedel A
94	B-16	knedel A
95	B-17	knedel A
96	B-18	knedel A
97	B-19	knedel A
98	B-20	knedel A
99	B-21	knedel A
100	B-22	knedel A
101	B-23	knedel A
102	B-24	knedel A
103	B-25	knedel A
104	B-26	knedel A

10.09.01

105	B-27	knedel A
106	B-28	knedel A
107	B-29	knedel A
108	B-30	knedel A
109	B-31	knedel A
110	B-32	knedel A
111	B-33	knedel A
112	B-34	knedel A
113	B-35	knedel A
114	B-36	knedel A
115	B-37	knedel A
116	B-38	knedel A
117	B-39	knedel A
118	B-1	knedel B
119	B-2	knedel B
120	B-3	knedel B
121	B-4	knedel B
122	B-5	knedel B
123	B-6	knedel B
124	B-7	knedel B
125	B-8	knedel B
126	B-9	knedel B
127	B-10	knedel B
128	B-11	knedel B
129	B-12	knedel B
130	B-13	knedel B
131	B-14	knedel B
132	B-15	knedel B
133	B-16	knedel B
134	B-17	knedel B
135	B-18	knedel B
136	B-19	knedel B
137	B-20	knedel B

10.09.01

138	B-21	knedel B
139	B-22	knedel B
140	B-23	knedel B
141	B-24	knedel B
142	B-25	knedel B
143	B-26	knedel B
144	B-27	knedel B
145	B-28	knedel B
146	B-29	knedel B
147	B-30	knedel B
148	B-31	knedel B
149	B-32	knedel B
150	B-33	knedel B
151	B-34	knedel B
152	B-35	knedel B
153	B-36	knedel B
154	B-37	knedel B
155	B-38	knedel B
156	B-39	knedel B
157	B-1	S-3
158	B-2	S-3
159	B-3	S-3
160	B-4	S-3
161	B-5	S-3
162	B-6	S-3
163	B-7	S-3
164	B-8	S-3
165	B-9	S-3
166	B-10	S-3
167	B-11	S-3
168	B-12	S-3
169	B-13	S-3
170	B-14	S-3

10.09.01

171	B-15	S-3
172	B-16	S-3
173	B-17	S-3
174	B-18	S-3
175	B-19	S-3
176	B-20	S-3
177	B-21	S-3
178	B-22	S-3
176	B-23	S-3
180	B-24	S-3
181	B-25	S-3
182	B-26	S-3
183	B-27	S-3
184	B-28	S-3
185	B-29	S-3
186	B-30	S-3
187	B-31	S-3
188	B-32	S-3
189	B-33	S-3
190	B-34	S-3
191	B-35	S-3
192	B-36	S-3
193	B-37	S-3
194	B-38	S-3
195	B-39	S-3
196	B-1	CholestaGel
197	B-2	CholestaGel
198	B-3	CholestaGel
199	B-4	CholestaGel
200	B-5	CholestaGel
201	B-6	CholestaGel
202	B-7	CholestaGel
203	B-8	CholestaGel

10.09.01

204	B-9	CholestaGel
205	B-10	CholestaGel
206	B-11	CholestaGel
207	B-12	CholestaGel
208	B-13	CholestaGel
209	B-14	CholestaGel
210	B-15	CholestaGel
211	B-16	CholestaGel
212	B-17	CholestaGel
213	B-18	CholestaGel
214	B-19	CholestaGel
215	B-20	CholestaGel
216	B-21	CholestaGel
217	B-22	CholestaGel
218	B-23	CholestaGel
219	B-24	CholestaGel
220	B-25	CholestaGel
221	B-26	CholestaGel
222	B-27	CholestaGel
223	B-28	CholestaGel
224	B-29	CholestaGel
225	B-30	CholestaGel
226	B-31	CholestaGel
227	B-32	CholestaGel
228	B-33	CholestaGel
229	B-34	CholestaGel
230	B-35	CholestaGel
231	B-36	CholestaGel
232	B-37	CholestaGel
233	B-38	CholestaGel
234	B-39	CholestaGel
235	B-1	OmegaGel
236	B-2	OmegaGel

10.09.01

237	B-3	OmegaGel
238	B-4	OmegaGel
239	B-5	OmegaGel
240	B-6	OmegaGel
241	B-7	OmegaGel
242	B-8	OmegaGel
243	B-9	OmegaGel
244	B-10	OmegaGel
245	B-11	OmegaGel
246	B-12	OmegaGel
247	B-13	OmegaGel
248	B-14	OmegaGel
249	B-15	OmegaGel
250	B-16	OmegaGel
251	B-17	OmegaGel
252	B-18	OmegaGel
253	B-19	OmegaGel
254	B-20	OmegaGel
255	B-21	OmegaGel
256	B-22	OmegaGel
257	B-23	OmegaGel
258	B-24	OmegaGel
259	B-25	OmegaGel
260	B-26	OmegaGel
261	B-27	OmegaGel
262	B-28	OmegaGel
263	B-29	OmegaGel
264	B-30	OmegaGel
265	B-31	OmegaGel
266	B-32	OmegaGel
267	B-33	OmegaGel
268	B-34	OmegaGel
269	B-35	OmegaGel

10.09.01

270	B-36	OmegaGel
271	B-37	OmegaGel
272	B-38	OmegaGel
273	B-39	OmegaGel
274	B-1	MCI-196
275	B-2	MCI-196
276	B-3	MCI-196
277	B-4	MCI-196
278	B-5	MCI-196
279	B-6	MCI-196
280	B-7	MCI-196
27817	B-8	MCI-196
282	B-9	MCI-196
283	B-10	MCI-196
284	B-11	MCI-196
285	B-12	MCI-196
286	B-13	MCI-196
287	B-14	MCI-196
288	B-15	MCI-196
289	B-16	MCI-196
290	B-17	MCI-196
291	B-18	MCI-196
292	B-19	MCI-196
293	B-20	MCI-196
294	B-21	MCI-196
295	B-22	MCI-196
296	B-23	MCI-196
297	B-24	MCI-196
298	B-25	MCI-196
299	B-26	MCI-196
300	B-27	MCI-196
301	B-28	MCI-196
302	B-29	MCI-196

10.09.01

303	B-30	MCI-196
304	B-31	MCI-196
305	B-32	MCI-196
306	B-33	MCI-196
307	B-34	MCI-196
308	B-35	MCI-196
309	B-36	MCI-196
310	B-37	MCI-196
311	B-38	MCI-196
312	B-39	MCI-196
313	B-1	DMP-504
314	B-2	DMP-504
315	B-3	DMP-504
316	B-4	DMP-504
317	B-5	DMP-504
318	B-6	DMP-504
319	B-7	DMP-504
320	B-8	DMP-504
321	B-9	DMP-504
322	B-10	DMP-504
323	B-11	DMP-504
324	B-12	DMP-504
325	B-13	DMP-504
326	B-14	DMP-504
327	B-15	DMP-504
328	B-16	DMP-504
329	B-17	DMP-504
330	B-18	DMP-504
331	B-19	DMP-504
332	B-20	DMP-504
333	B-21	DMP-504
334	B-22	DMP-504
335	B-23	DMP-504

336	B-24	DMP-504
337	B-25	DMP-504
338	B-26	DMP-504
339	B-27	DMP-504
340	B-28	DMP-504
341	B-29	DMP-504
342	B-30	DMP-504
343	B-31	DMP-504
344	B-32	DMP-504
345	B-33	DMP-504
346	B-34	DMP-504
347	B-35	DMP-504
348	B-36	DMP-504
349	B-37	DMP-504
350	B-38	DMP-504
351	B-39	DMP-504

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 užitečnosti 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 prováděné 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 μ l 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 μ l dvojnásobného koncentráту testované sloučeniny v testovacím pufru a 50 μ l 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 μ l Dulbeccova fosfátového fyziologického roztoku (PBS) vychlazeným na teplotu 4 °C, obsahujícím 0,2 %, (hmotn./obj.) (FAF)BSA. Jamky jsou potom jemně promyty jedenkrát 100 μ l PBS o teplotě 4 °C bez (FAF)BSA. Do každé jamky se přidá 200 μ l 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. „Metabolism of 3 α , 7 β -dihydroxy-7 α -methyl-5 β -cholanoic acid and 3 α , 7 β -dihydroxy-7 α -methyl-5 β -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 pufovaného 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 nadávají 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 to nutné, provede se třetí perfuze stejným způsobem, ta obvykle obsahuje kontrolní vzorek.

Stanovení koncentrace fekálních žlučových kyselin u krys (FBA)

Fekálie samostatně chovaných krys se sbíraly každých 24 nebo 48 hodin, vysušily se pod proudem dusíku, rozdrtily se na prášek a zvažily. 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 -hydroxysteroiddehydrogenázy reakcí se žlučovými kyselinami redukujícími NAD. (viz. Mashige, F., a kol. (1981) Clin. Chem. 27, 1352).

Zkouška na výživu žaludeční sondou u krys

Samcům krys Wistar (275-300 g) se podávají inhibitory IBAT za použití žaludeční sondy. Léčivo nebo vehikulum (0,2% TWEEN 80 ve vodě) se podává jednou denně (9,00 až 10,00 dopoledne po dobu 4 dnů v různých dávkách v celkovém objemu 2 ml na kg tělesné hmotnosti (TWEEN 80 je 20 molární polyethylenoxidsorbitanmonooleátová povrchově aktivní látka, vyráběná ICI Speciality Chemicals, Wilmington, Delaware, USA). Vzorky fekálií se sbírají během posledních 48 hodin léčebné periody a analyzují se na obsah žlučových kyselin, za použití enzymové zkoušky popsané dále. Účinnost sloučenin se stanoví porovnáním zvýšení koncentrací žlučových kyselin (FBA) u léčených krys k středním koncentracím FBA krys, které dostávaly vehikulum.

Vstřebávání (^3H)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 (^3H)taurocholátu (0,75 μCi), 20 mM

tris, 100 mM NaCl, 100 mM manitol pH 7,4 inkubovalo 5 sekund s 10 μ l membránových vezikulů kartáčového lemu (60-120 μ g proteinu). Inkubace začala přidavkem BBMV za víření a reakce se ukončila přidavkem 5 ml ledem vychlazeného pufru (20 mM Hepes-tris, 150 mM KCl) a bezprostředně následovanou filtrací přes nylonový filtr (póry 0,2 μ m) a dalším promytím 5 ml ukončovacího pufru.

Acyl-CoA; cholesterol acyl transferáza (ACAT)

Křeččí jaterní a krysí intestinální 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 μ M Oleoyl-CoA (0,05 μ Ci) v 50 mM fosforečnanu sodném, 2 mM DTT pH 7,4 pufru obsahujícím 0,25 % BSA a 200 μ g mikrozomálního proteinu. Test byl inicializován přidavkem Oleoyl-CoA. Reakce probíhala 5 minut při 37 °C a byla ukončena přidavkem 8,0 ml směsi chloroform/metanol (2:1). K extrakci bylo přidáno 125 μ g cholesterololeátu ve směsi chloroform/metanol jako nosiče, organická a vodná fáze byly odděleny odstředěním emulze vzniklé intenzivním promícháváním vířením. Chloroformová fáze byla vysušena, nanесena 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 cholesterololeátu na TLC destičce pomocí Packard Instaimager.

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 CoA-reduktázy (HMG CoA)

Homogenizací jaterních vzorků v pufru fosfát/sacharóza a následným odstředěním se získají jaterní mikrozómy. Konečný peletový materiál se resuspenduje v pufru a alikvot se testuje na HMG CoA reduktázovou aktivitu inkubací 60 minut při 37 °C za přítomnosti ^{14}C -HMG 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. a Bjorkhem, I. (1990) J. Lipid Res. 31, 2159).

Stanovení jaterní cholesterol 7- α -hydroxylázové aktivity (7 α -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 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 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 koncentrace žlučových kyselin ve fekáliích u křečků (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 3 α -hydroxysteroid steroid dehydrogenázy reakcí se žlučovými kyselinami redukujícími NAD. (viz. Mashige, F., a kol. (1981) Clin. Chem. 27, 1352).

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 dává 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 μ l vzorku séra a poté 15 μ l 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 μ l alikvotu supernatantu smísí s 200 μ l 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 μ g. Do každé jamky se duplikátně přidají vzorky séra (20 až 40 μ l, v závislosti na očekávané koncentraci lipidů). K doplnění objemů jamky na 100 μ l se přidá voda a potom 100 μ l 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.

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 odstředí se 13 minut při 2000 x g. Koncentrace žlučových kyselin (mol/den) se může stanovit za

použití 96-jamkového enzymatického zkušebního systému (1,2). 20 μ l 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 μ l reakční směsi obsahující 1M hydrazinhydrát, 0,1M pyrofosforečnan a 0,46 mg/ml NAD. Potom se do jedné ze dvou sad trojnásobků přidá 50 μ l alikvotu 3 α -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 $\pm$ HSD enzym se použije ke stanovení koncentrace kyseliny žlučové (mM) každého vzorku vzhledem ke standardní křivce taurocholátu sodného. Pro každé zvíře se 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 absorpci cholesterolu ze střeva

Je známa řada sloučenin, které inhibují absorpci cholesterolu z intestinálního traktu. Tyto sloučeniny snižují úroveň 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 $[1,2-^3\text{H}]$ cholesterolu suspendovaném v Intralipidu (20 %) a potom orální dávka $[4-^{14}\text{C}]$ 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 trubicí. Po 72 hodinách se křečkům odebere krev a kapalnou scintilační spektroskopií se stanoví množství ^3H a ^{14}C v plazmě a v původním množství podané dávky. Absorpce cholesterolu se vypočte na základě následující rovnice:

Procento absorbované cholesterolu =

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

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 akceptorových vezikulů v přítomnosti MTP. Inhibitory MTP se mohou hodnotit jejich přidáním do směsi před zavedením MTP. Dárcovské vezikuly se připraví sonifikací vodné směsi vaječných fosfolipidů, kardiolipinu, ^3H -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 ^3H 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 cholesteroxidázové 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 dextranulfátem 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 pufového 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 analyzáru (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 přidáný do lázně se zanesou do grafu.

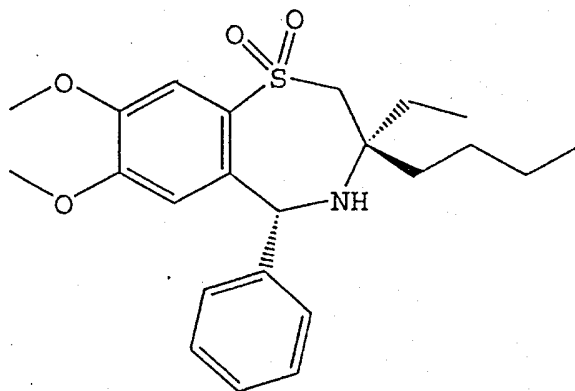
Příklady uvedené v tomto dokumentu mohou být provedeny náhradou genericky nebo specificky popsáných terapeutických sloučenin nebo inertních nosičů za ty, které se použily v předchozích příkladech.

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.

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 inhibující
transport ileální kyseliny žlučové a druhé množství
sloučeniny maskující kyselinu žlučovou, kde první množství a
druhé množství dohromady zahrnuje antihyperlipidemicky účinné
množství, antiatheroskleroticky účinné množství nebo
antihypercholesterolemicky účinné množství uvedených
sloučenin.

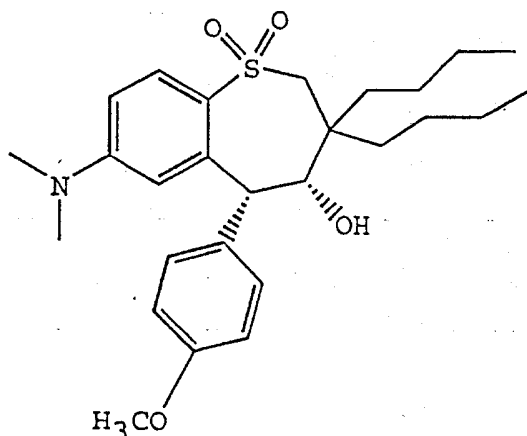
2. Terapeutická kombinace podle nároku 1,
v y z n a č u j í c í s e t í m, že sloučenina inhibující
transport ileální kyseliny žlučové má vzorec B-2:



B-2

nebo její enantiomer nebo racemát.

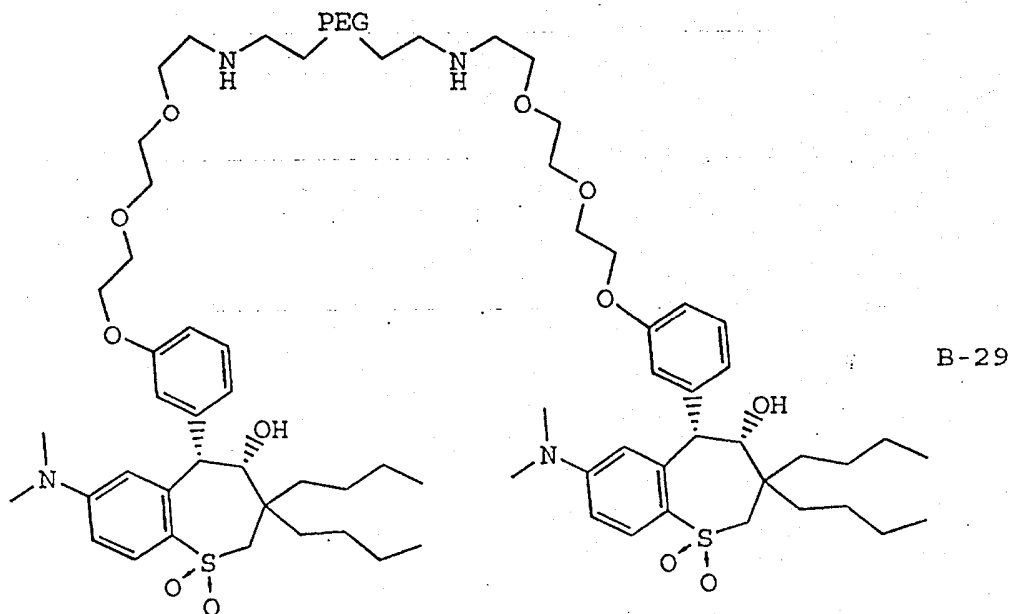
3. Terapeutická kombinace podle nároku 1,
v y z n a č u j í c í s e t í m, že sloučenina inhibující
transport ileální kyseliny žlučové má vzorec B-12:



B-12

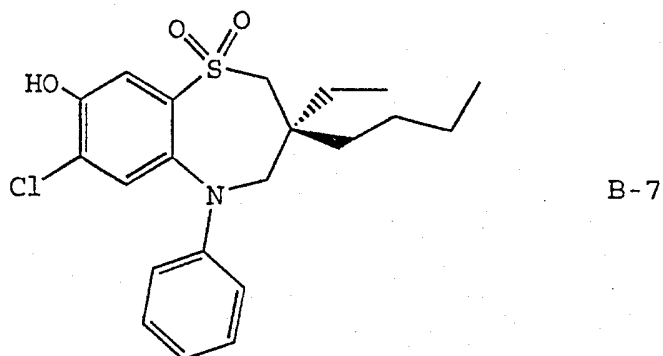
nebo její enantiomer nebo racemát.

4. Terapeutická kombinace podle nároku 1,
v y z n a č u j í c í s e t í m, že sloučenina inhibující
transport ileální kyseliny žlučové má vzorec B-29:



nebo její enantiomer nebo racemát, kde PEG je
polyethylenglykolový polymerní řetězec molekulové hmotnosti
od okolo 3000 do okolo 4000.

5. Terapeutická kombinace podle nároku 1,
v y z n a č u j í c í s e t í m, že sloučenina inhibující
transport ileální kyseliny žlučové má vzorec B-7 :



nebo její enantiomer nebo racemát.

6. Terapeutická kombinace podle nároku 1,
v y z n a č u j í c í s e t í m, že sloučeninou maskující
kyselinu žlučovou je cholestyramin.

7. Terapeutická kombinace podle nároku 1,
v y z n a č u j í c í s e t í m, že sloučeninou maskující
kyselinu žlučovou je colestipol.

8. Terapeutická kombinace podle nároku 1,
v y z n a č u j í c í s e t í m, že sloučeninou maskující
kyselinu žlučovou je amfifilní kopolymer mající síťovanou
vrstevnou doménu a vnitřní jádrovou doménu.

9. Terapeutická kombinace podle nároku 1,
v y z n a č u j í c í s e t í m, že sloučeninou maskující
kyselinu žlučovou je polyallylaminový polymer.

10. Terapeutická kombinace podle nároku 9,
v y z n a č u j í c í s e t í m, že polyallylaminový
polymer zahrnuje CholestaGel.

11. Terapeutická kombinace podle nároku 9,
v y z n a č u j í c í s e t í m, že polyallylaminový
polymer zahrnuje OmegaGel.

12. Terapeutická kombinace podle nároku 1,
v y z n a č u j í c í s e t í m, že kombinace obsahuje
kompozici obsahující sloučeninu inhibující transport ileální
kyseliny žlučové a sloučeninu maskující kyselinu žlučovou.

13. 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 sloučeniny inhibující transport ileální kyseliny žlučové a druhé množství sloučeniny maskující kyselinu žlučovou, kde první a druhé množství dohromady zahrnuje antihyperlipidemicky účinné množství uvedených sloučenin.

14. 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 inhibující transport ileální kyseliny žlučové a druhé množství derivátu sloučeniny inhibující kyselinu žlučovou, kde první a druhé množství dohromady zahrnuje antiateroskleroticky účinné množství uvedených sloučenin.

15. 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 množství sloučeniny inhibující transport ileální kyseliny žlučové a druhé množství sloučeniny inhibující kyselinu žlučovou, kde první a druhé množství dohromady zahrnuje antihypercholesterolemicky účinné množství uvedených sloučenin.