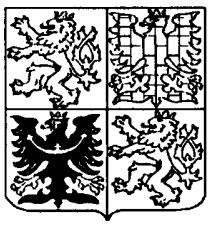
ČESKÁ REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(21) 2325-93

(13) A3

5(51) A 61 K 31/725

(22) 01.05.92

(32) 01.05.92, 02.05.91, 28.05.91

(31) 92US/9203626, 91/98020, 91/98298

(33) WO, IL, IL

(40) 13.07.94

(71) YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD., Rehovot, IL;

(72) Cohen Irun R., Rehovot, IL;
Lider Ofer, Rehovot, IL;
Hershkoviz Rami, Herzliyya, IL;

(54) Farmaceutický prostředek pro prevenci a/nebo léčení pathologických stavů

(57) Řešení se týká farmaceutického prostředku pro prevenci a/nebo léčení pathologických stavů, souvisejících s indukcí sekrece TNF-alfa, prostředek obsahuje farmaceuticky přijatelný nosiš a heparin s nízkou molekulovou hmotností LMWH. Ve farmaceutickém prostředku je LMWH přítomen v nízké účinné dávce, prostředek se podává v intervalech 5 až 8 dnů. LMWH s uvedenou nízkou molekulovou hmotností je mimoto schopen způsobit inhibici sekrece TNF-alfa in vitro T-buňkami v klidovém stavu a/nebo makrofágy jako odpovědi na antigeny, specifické pro T-buňky, mitogeny, aktivátory makrofágů, rozrušenou extracelulární matrici dECM, laminin, fibronectin apod.

Farmaceutický prostředek pro prevenci a/nebo léčení pathologických stavů

1. Oblast techniky

Vynález se týká farmaceutických prostředků pro prevenci a/nebo léčení pathologických stavů, při nichž dochází k indukci sekrece faktoru alfa nekrosy nádorů (TNF-alfa). Farmaceutické prostředky obsahují v nízké, avšak účinné dávce heparin s nízkou molekulovou hmotností (LMWH) a podávají se v intervalech 5 až 8 dnů.

LMWH, užívaný v prostředku podle vynálezu má střední molekulovou hmotnost v rozmezí přibližně 3000 až 6000 . Tato látka způsobuje inhibici sekrece TNF-alfa T-buňkami v klidovém stavu nebo makrofágy při aktivaci antigeny, specifickými pro T-buňky, mitogeny pro T-buňky, aktivátory makrofágů, rozrušenou extracelulární matricí (dECM), fibronectinem, lamininem nebo jinými složkami ECM.

2. Dosavadní stav techniky

TNF-alfa, cytokin, produkovaný monocyty (makrofágy) a T-lymfocyty, je klíčovým prvkem v kaskádě faktorů, kteé vyvolávají zánětlivou odpověď a v důsledku jeho různorodých účinků dochází ke vzniku chrobných stavů, jak bylo popsáno v publikaci B. Beutler a A. Cerami, Ann. Rev. Immunol., 1989, 7:625-655.

Biologické účinky TNF-alfa závisejí na jeho koncentraci a na místě jeho produkce. Při nízkých koncentracích může TNF-alfa vyvolat žádoucí homeostatické a obranné funkce, avšak ve vysokých koncentracích, systemicky nebo v některých tkáních může TNF-alfa mít účinek, synergní s účinkem dalších

cytokinů, zejména interleukinu-1 (IL-1), čímž dochází ke zhoršeí mnoha zánětlivých odpovědí.

Bylo prokázáno, že působením TNF-alfa (spolu s IL-1) může dojít ke zhoršení následujících stavů: horečka, spánek, charakterizovaný na EEG pomalými vlnami, hemodynamický šok, zvýšená produkce bílkovin v akutní fázi, snížená produkce albuminu, aktivace endotheliálních buněk cév, zvýšená exprese molekul hlavního komplexu histokompatibility (MHC), snížení lipoproteinlipázy, snížení cytochromu P450, snížené množství zinku a železa v plasmě, proliferace fibroblastů, zvýšení kolagenázy v synoviálních buňkách, zvýšení účinnosti cyklooxygenázy, aktivace T-buněk a B-buněk a indukce sekrece cytokinů, a to samotného TNF-alfa, IL-1 a IL-6.

Způsob, jakým k vyvolání účinků TNF-alfa dochází, není ještě do všech podrobností znám, avšak řada účinků je patrně spojena se schopností TNF-alfa stimulovat buňky k produkci prostaglandinů a leukotrienů z arachidonové kyseliny buněčné mebrány.

TNF-alfa se v důsledku svých mnohostranných účinků pravděpodobně účastní při vzniku různých pathologickcýh stavů v řadě různých orgánů. V krevních cévách podporuje TNF-alfa vznik hemorhagického šoku, snižuje hladinu thrombomodulinu v endotheliálních buňkách a podporuje účinnost prokoagulačních faktorů. Způsobuje adhesi leukocytů a pravděpodobně také krevních destiček na stěny cév a tak může vyvolat pochody, vedoucí ke vzniku arteriosklerózy a vaskulitidy.

TNF-alfa aktivuje krevní buňky a působí adhesi neutrofilních buněk, eosinofilních buněk, monocytů/makrofágů a T- a B- lymfocytů. Indukcí produkce IL-1 a IL-6 zvyčuje TNF-alfa chemotaxi zánětlivých buněk a jejich pronikání do tkání.

Tímto způsobem napomáhá TNF-alfa poškození tkáně při autoimunologických chorobách, při alergiích a také při odmítání tkáňových štěpů.

V některých případech byl TNF-alfa označován také jeko kachektin vzhledem k tomu, že mění metabolickou aktivitu tukových buněk a přispívá k hubnutí a kachexii, která doprovází zhoubné nádory, chronické infekce, chronické selhání srdce a chronické zánětlivé stavy. TNF-alfa může také hrát svou úlohu při vzniku anorexia nervosa tak, že snižuje chuť k jídlu a současně urychluje spotřebovávání tukové tkáně.

TNF-alfa má metbolické účinky i na kosterní svaly a na srdeční sval. Má také význačné účinky na jaterní tkáň: snižuje metabolismus albuminu a cytochromu P450 a zvyšuje produkci fibrinogenu, alfa-1-kyselého glykoproteinu a dalších bílkovin akutní fáze. Může také způsobit nekrózu močového měchýře nebo tlustého střeva.

V centrálním nervovém systému proniká TNF-alfa mozkomíšní bariérou a vyvolává zvýšení teploty, spavost a nechuť k jídlu. Koncentrace TNF-alfa je zvýšena také u roztroušené sklerózy. Dále může TNF-alfa způsobit krvácení do nadledvinek a ovlivnit produkci steroidních hormonů, dále zvyšuje účinnost kolagenázy a PGE-2 v kůži a způsobuje odbourávání kostní a chrupavkové tkáně aktivací osteoklastů.

Je tedy možno shrnout, že TNF-alfa se účastní při pathogenezi řady nežádoucích zánětlivých stavů při autoimunologických onemocněních, odmítnutí transplantátů, vaskulitidě a atheroskleróze. Může hrát svou úlohu i při srdečním selhání, při reakci na zhoubný nádor a při anorexia nervosa. Z uvedených důvodů byly hledány způsoby řízení sekrece TNF-alfa jeko cesta k léčení uvedených onemocnění.

Primární funkcí imunologického systému je ochrana jedince před infekcí cizorodými organismy, například mikroorganismy. Imunologický systém však může napadnout i vlastní tkáně a pak dochází k pathologickým stavům, označovaným jako autoimunologická onemocnění. Agresivní reakce imunologického systému proti tkáním z jiného jedince jsou pak příčinou nežádoucího odmítnutí transplantovaných orgánů. Hyperreaktivita systému proti cizorodým látkám způsobuje příznaky alergie, jako jsou stma, alergická rýma a ekzémy.

Buňkami, které tuto reakci uskutečňují jsou lymfocyty, primárně aktivované T-lymfocyty a pathologická zánětlivá odpověď, která vzniká, závisí na jejich schopnosti putovat stěnami krevních cév a vycestovat z nich k cílovým tkáním. To znamená, že v případě, že se sníží schopnost lymfocytů lnout k cévním stěnám a těmito stěnami pronikat, bude možno zabránit také autoimunologickým onemocněním, odmítnutí transplantátů a alergiím. Znamená to nový léčebný přístup, jímž by mohlo být dosaženo vyššího účinku a sníženého množství nežádoucích vedlejších reakcí ve srovnání s dosud užívanými léčebnými postupy.

Atheroskleróza a vaskulitida jsou příkladem akutního a chronického zánětu cév. Při atheroskleróze dochází k postupnému ztluštění tunica intima tepen a ke ztrátě její pružnosti, což vede ke koronárním onemocněním, infarktu myokardu, mozkovému infarktu a onemocněním periferních cév, jde o nejčastější příčinu nemocnosti a úmrtnosti ve vyvinuté části světa v současné době. Atheroskleróza se vyvíjí pomalu jako poškození, vyvolávané ukládáním tukového materílu a vápenatých usazenin. Proliferace fibrosních tkání pak nakonec vede k akutnímu stavu, při němž dochází ke vzniku náhlých uzávěrů krevních cév.

Bylo prokázáno, že TNF-alfa usnadňuje a zvyšuje replikaci viru lidské imunodeficience HIV in vitro, podle Matsuyama T a další, J. Virol., 1989, 63(6):2504-2509, Michihiko S. a další, Lancet, 1989, 1(8648):1206-1207) a také stimuluje expresi genu HIV-1 a tím pravděpodobně vyvolává vznik klinického syndromu AIDS u jednotlivců s latentní infekcí HIV-1 podle Okamoto T. a další, AIDS Res. Hum. Retroviruses, 1989, 5(2):131-138.

Heparin je glykosaminoglykan, to znamená polyaniontový sulfatovaný polysacharid, který se klinicky užívá k zábraně srážení krve, jako antithrombotická látka. Na živočišném modelu bylo prokázáno, že heparin snižuje schopnost autoimunologických T-lymfocytů dosáhnout jejich cílových orgánů podle Lider O. a další, Eur. J. Immunol 1990, 20:493-499. Bylo rovněž prokázáno, že heparin je schopen potlačit experimentální autoimunologické onemocnění u krys a prodloužit přežívání cizorodých štěpů na modelu transplantace kůže u myši v případě použití v nízkých dávkách (5 /ug pro myš a 20 /ug pro krysu) při injekčním podání jednou denně podle Lider O. a další, J. Clin. Invest. 1989, 83:752-756.

Mechanismus uvedených účinků spočívá pravděpodobně v tom, že u T-lymfocytů dochází k inhibici uvolňování enzymů, nezbytných pro průnik cévní stěnou, v první řadě enzymu heparanázy, která specificky napadá glykosaminoglykanovou skupinu subendotheliální extracelulární matrice (ECM), která lemuje krevní cévy podle Naparstek Y. a další. Nature, 1984, 310: 241-243. Exprese enzymu haparanázy je spojena se schopností autoimunologických T-lymfocytů pronikat stěnou krevních cév a poskozovat mozkovou tkáň na experimentálním modelu autoimunologické encephalomyelitidy (EAE).

Evropský patentový spis EP 114 589 (Folkman a další) popisuje farmaceutický prostředek pro inhibici angiogenese

u savců, účinná složka tohoto prostředku je tvořena v podstatě 1) heparinem nebo fragmentem heparinu, a to hexasacharidem nebo větším fragmentem a 2) kortisonem nebo hydrokortisonem nebo 11-alfa-isomerem hydrokortisonu. Podle uvedeného patentového spisu je heparin jako takový nebo hydrokortison jako takový neúčinný a pouze kombinací obou těchto látek je možno dosáhnout požadovaného účinku. Přestože v literatuře nebyl podán žádný důkaz existence spojení mezi angiogenezí a autoimunologickými onemocněními, spojuje se na str. 5 popisné části uvedeného spisu angiogeneze s psoriázou a s arthritidou a uvádí se v tomto případě použití vysokých dávek, 25 000 až 47 000 jednotek heparinu denně.

Horváth J.E. a další, Aust. N.Z.J.Med., 1975, 5(6): 537-539 popisují účinek subantikoagulačních dávek heparinu při podkožním podání na časnou funkcitransplantované ledviny. Denní dávka je vysoká, 5 00 jednotek a práce uvádí, že heparin v subantikoagulačních dávkách nemá žádný vliv na časnou funkci transplantátu, navíc může dojít ke zvýšenému výskytu hemorrhagických komplikací.

Tivanen M.L. a další, Meth. and Find. Exp. Clin. Pharmacol., 1982, 4(6):359-363 sledovali účinek heparinu ve vysokých dávkách 1 000 jednotek na krysu při inhibici vzniku adjuvantní arthitidy u krys a pozorovali, že heparin zvýšil závažnost tohoto onemocnění u krys.

PCT patentová přihláška PCT/AU88/00017, zveřejněná pod č. WO88/05301 (Parish a další) popisuje sulfatované polysacharidy, které blokují nebo inhibují účinnost endoglykosylázy, například pro použití jako antimetastatické a protizánětlivé látka. Heparin a některé deriváty heparinu, například hepariny, oxidované jodistanem nebo redukované hepariny které měly jen zanedbatelnou antikoagulační účinnost, měly

antimetastatickou a protizánětlivou účinnost při použití v dávkách 1,6 až 6,6 mg na krysu a den při podání ve formě infuse (což odpovídá dávce v rozmezí 75 až 308 mg denně u dospělého člověka).

3. Podstata vanálezu

Podstatu vynálezu tvoří farmaceutické prostředky pro prevenci a/nebo léčení pathologických stavů, při nichž dochází k indukci sekrece faktoru alfa nekrózy nádorů, TFN-alfa, tyto farmaceutické prostředky obsahují farmaceuticky přijatelný nosič a heparin s nízkou molekulovou hmotností, LMWH, přítomný v nízké účinné dávce pro podání v intervalech 5-8 dnů, LMWH je in vitro schopen způsobit inhibici sekrece TNF-alfa T-buňkami v klidovém stavu a/nebo makrofágy jako odpověd na antigeny, specifické pro T-Buňky, mitogeny, aktivátory makrofágů, rozrušenou extracelulární matrici (dECM), laminin, fibronectin nebo jiné složky ECM.

Ve zvláštním provedení má LMWH ve farmaceutickém prostředku střední molekulovou hmotnost v rozmezí 3 000 až 6 000 a prostředek je možno podávat každý pátý den.

Podstatu vynálezu tvoří rovněž farmaceutický prostředek, podávaný v inervalech 5 až 8 dnů pro prevenci a/nebo léčení pathologických stavů, při nichž dochází k indukci sekrece TFN-alfa a který obsahuje farmaceuticky přijatelný nosič a heparin s nízkou molekulovou hmotností LMWH v nízké účinné dávce, přičemž LMWH je schopen způsobit inhibici experimentálně vyvolané hypersensitivity opožděného typu (DTH) jako reakce na podaný antigen, jak je možno prokázat zmenšením zatvrdnutí, k němuž dochází po aplikaci antigenu na kůži pět až sedm dnů po podání farmaceutického prostředku ve srovnání se zatvrdnutím, pozorovaným po podání antigenu na kůži v nepřítomnosti nebo po odeznění účinku farmaceutického pro-

středku. Příkladem použitého antigenu může být například antigen tetanu, basický myelin, čištěné deriváty bílkoviny, oxazolon a podobně.

Mimoto tvoří podstatu vynálezu také farmaceutické prostředky, které je možno podávat v závislosti na okolnostech například enterálně (včetně perorálního podání) nebo parenterálně (včetně místního podání nebo podání inhalací ve formě aerosolu). Ve výhodných provedeních se farmaceutické prostředky podle vynálezu podávají podkožně nebo nitrožilně.

Farmaceutické prostředky podle vynálezu je tedy možno použít například pro oddálení nebo k zábraně odmítnutí transplantátu a k léčení nebo k prevenci celé řady pathologických pochodů, jako jsou pochody, související s autoimunologickými chorobami, alergie, zánětlivá onemocnění, zejména zánětlivá onemocnění tlustého střeva nebo získaný syndrom imunodeficience AIDS. Vynález je rovněž možno využít v případě diabetu typu I, onemocnění peirodontu, při uveitidě, u revmativkých onemocnění, zejména v případě rheumatoidní strhritidy, u atherosklerózy, vaskulitidy nebo roztroušené sklerózy.

Farmaceutické prostředky podle vynálezu obsahují nízkou účinnou dávku LMWH a typicky obsahují dávku pro jedno podání, která je nižší než 5 mg LMWH, s výhodou v rozmezí 0,3 až 3 mg, zvláště 1 až 1,5 mg.

Vynález je založen na poznatku, že heparin s nízkou molekulovou hmotností LMWH je schopen in vitro způsobit inhibici sekrece THF-alfa T-buňkami v klidovém stavu a/nebo makrofágy jako odpovědi na antigeny, specifické pro T-buňky, mitogeny, aktivátory makrofágů, rozrušenou extracelulární matrici (dECM), laminin, fibronectin nebo jiné složky ECM.

Je tedy možno jej použít pro výrobu farmaceutických prostředků, určených pro podávání v intervalech 5 až 8 dnů pro prevenci a/nebo léčení pathologických stavů, zahrnujících indukci sekrece TNF-alfa. Farmaceutický prostředek uvedeného typu obsahuje nízkou účinnou dávku LMWH a farmaceuticky přijatelný nosič.

Další znaky vynálezu budou zřejmé z následujícího popisu včetně popisu specifických provedení vynálezu ve formě příkladů.

4. Podrobný popis vynálezu

Podle vynálezu bylo zjištěno, že při léčení podáváním heparinu s nízkou molekulovou hmotností (LMWH) je možno způsobit inhibici sekrece TNF-alfa T-buňkami a makrofágy. Funkčním výrazem tohoto účinku je u myší a u lidí potlačení hypersensitivity opožděného typu (DTH), jde o zánětlivou reakci, spouštěnou buňkami typu makrofágů a dalšími zánětlivými buňkami. Léčením LMWH v dávkách, které mohou ovlivnit produkci TFN-alfa je rovněž možno dosáhnout inhibice vzniku modelu autoimunní arthritidy, označované jako adjuvantní arthritida (AA). Léčení LMWH rovněž prodlužuje přežívání cizorodých transplantátů srdce u krys a zlepšuje na insulinu závislý diabetes mellitus (IDDM) u myší NOD. Mimoto je možno léčením LMWH zabránit indukce produkce TNF-alfa T-buňkami a makrofágy jako odpovědi na podněty, vycházející s poškozených částí subendotheliální extracelulární matrice (ECM). Vzhledem k tomu, že TFN-alfa má v místě poškození cév patrně svou úlohu při vývoji atherosklerózy, bude možno inhibicí produkce TNF-alfa v místě poškození subendotheliální ECM patrně zlepšit atherosklerotické stavy. Při léčení pomocí LMWH je nejvíce překvapující skutečnost, že takové léčení je nejúčinnější v případě, že se heparin podává v nízkých dávkách v týdenních intervalech. Vysoké dávky LMWH nebo denně podáva-

né dávky LMWH nejsou při inhibici sekrece THF-alfa nebo imunologických reakcí účinné.

Heparíny s nízkou molekulovou hmotností, produkované frakcionací nbeo řízenou depolymerací heparinu mají výhodnější antithrombotické vlastnosti, avšak také odlišné farmakokinetické vlastnosti ve srovnání s heparinem. Poločas je dvojnásobný a biologická dostupnost je vyšší s ohledem na antikoagulační účinek po podkožní injekci, jak bylo popsáno v publikaci Bratt G. a další, Thrombosis and Haemostasis, 1985, 53:208 a Bone B.a další, Thrombosis Research, 1987, 46:845.

Podle vynálezu bylo nyní zjištěno, žr LMWH, podaný v subsantikoagulačních dávkách v intervalech 7 dnů je účinný při prevenci a/nebo léčení pathologických stavů, při jejichž vzniku se účastní indukce TFN-alfa.

LMWH, užívaný pro účely vynálezu má střední molekulovou hmotnost 3 000 až 6 000, jde například o látku, popsanou v EP 14 184. Některé typy LMWH se běžně dodávají pod různými obchodními názvy, například Fragmin^{R}, Fraxiparin^{R}, Fraxiparine^{R}, Lovenox^{R} nebo Clexane^{R}.

LMWH je možno získat několika různými způsoby: obohacením frakcionací ethanolem a/nebo při použití molekulového síta, například filtrací na gelu nebo s použitím membrány pro dělení standardního heparinu a materiálu, získaného řízenou chemickou (působením kyseliny dusité, beta-eliminací nebo oxidací jodistanem) nebo enzymatickou (působením heparináz) depolymerací. Podmínky depolymerace je možno pečlivě řídit tak, aby byl získán produkt s požadovanou molekulovou hmotností. Obvykle se užívá depolymerace působením kyseliny dusité. Také se provádí depolymerace benzylesteru heparinu

beta-eliminací, což poskytuje tenýž typ fragmentů jako enzymatická depolymerace s použitím heparináz. LMWH s nízkou antikoagulační účinností a se zachovanou základní strukturou je možno připravit depolymerací s využitím oxidace působením jodistanu nebo odstraněním frakce LMWH, která váže antithrombin a připravené jiným způsobem, při použití imobilizovaného antithrombinu k adsorpci.

Fragmin^{R} je nízkomolekulární heparin se střední molekulovou hmotností v oblasti 4 000 až 6 000, získaný řízenou depolymerací sodné soli heparinu ze střevní sliznice vepře působením kyseliny dusité. Výrobcem je Kabi Pharmacia, Švédsko, Fragmin^{R} je určen jsko antithrombotický prostředek ve formě roztoku v roztocích chlorisu sodného a dodává se v injekčních stříkačkách pro jedno použití v dávkách 2500 IU (mezinárodních jednotek)/0,2 ml a 5 000 IU/0,2 ml, což odpovídá dávce 16 a 32 mg účinné látky.

Fraxiparin^{R} a Fraxiparine^{R} jsou LMWH se střední molekulovou hmotností přibližně 4500 a je možno je získat frakcionací nebo řízenou depolymerací kyselinou dusitou, výchozím materiálem je vápenatá sůl heparinu ze střevní sliznice vepře. Výrobcem je Sanofi (Choay Laboratories) a látky jsou určeny pro použití jako antithrombotické látky v jednotlivé dávce přibližně 36 mg, což odpovídá 3 075 IU/0,3 ml vody.

Lovenox^{R} (Enoxaparin/e) je fragment LMWH, který lze získat depolymerací sodné soli heparinu ze střevní sliznice vepře s použitím beta-eliminace. Výrobcem je Pharmuka SF, Francie, distribuuje Rhône-Poulenc pod názvem Clexane^{R} a Lovenox^{R} pro použití jako antithrombotické látky po jednotlivých dávkách v injekčních stříkačkách s obsahem 20 mg/0,2 ml a 40 mg/0,4 ml vody.

Jak je v průběhu přihlášky prokázáno, jsou nové vlastnosti LMWh, které jsou popisovány, společnými vlastnostmi LMWH bez ohledu na způsob výroby, na strukturní odlišnosti (vzniklé depolymerací nebo v závislosti na variacích heparinu, užitého jako výchozí látka) i na antikoagulační účinnosti za předpokladu, že použitý LMWH je schopný inhibice sekrece TNF-alfa in vitro T-buňkami v klidovém stavu a/nebo makrofágy jako odpověď na aktivaci stykem se specifickými antigeny, mitogeny, rozrušenou ECM nebo jejími bílkovinnými složkami, jako je fibronectin nebo laminin.

Dalším testem, který je možno použít k identifikaci LMWH, který je účinný ve smyslu vynálezu je inhibice experimentálně vyvolané kožní reakce typu opožděné hypersensitivity (DTH), reakce, závislé na T-lymfocytech, na různých antigenech (například tetanovém antigenu, basické bílkovině myelinu (MBP), čištěných derivátech bílkovin (PPD) nebo oxazolonu). LMWH také působí inhibici adhese T-buněk k ECM a jejím bílkovinným složkám.

LMWH s účinností podle vynálezu je možno použít pro výrobu farmaceutických prostředků, na příklad ve formě vodných roztoků, které mohou obsahovat chlorid sodný, stabilizátory a další vhodné složky bez specifického účinku. Výhodným způsobem podání je injekční podání, zejména podkožní nebo nitrožilní, účinnou látku je však možno podávat jakýmkoliv jiným vhodným způsobem.

Podle vynálezu se LMWh podává v intervalech pět až osm dnů, s výhodou jednou za týden.

Poruchami, které je možno léčit nebo kterým je možno předcházet jsou všechny poruchy, které jsou spojeny s pathologickými pochody, zahrnujícími indukce sekrece THF-alfa, včetně atherosklerózy a vaskulitidy a příbuzných pathologic-

kých pochodů, dále může jít o autoimunní onemocnění, například rheumatoidní arthritis, diabetes typu I (IDDM), alergii, odmítnutí transplantátu, akutní a chronická zánětlivá onemocnění, jako uveitis, zánět tračníku, anorexia nervosa, hemorhagický šok, způsobený septikemií a také o onemocnění AIDS. V případě AIDS může LMWH potlačit replikaci viru HIV a/nebo podpořit odolnost proti běžným infekcím a tím také zabránit vzniku komplexu, spojeného s AIDS (ARC).

Bylo pozorováno, že LMWH může mít úzké rozmezí účinnosti dávek a že různé přípravky s obsahem LMWH mohou mít různé optimální biologické účinky. Bylo proto nezbytné vytvořit jednotku pro přípravky s obsahem LMWH, založenou na biologické zkoušce na inhibici sekrece TNF-alfa buňkami myší sleziny u myší, léčených LMWH nebo na biologické zkoušce na inhibici DTH reaktivity působením LMWH. Bylo prokázáno, že schopnost určité dávky LMWH způsobit inhibici sekrece TFN-alfa je v positivní korelaci se schopností způsobit inhibici reakce typu opožděné hypersensitivity (DTH). Tato buněčně zprostředkovaná zánětlivá reakce in vivo je důležitá vzhledem k tomu, že je vyjádřením pochodu, který se účastní vzniku autoimunních onemocnění, odmítnutí transplantátu, některých typů zánětlivých onemocnění krevních cév a vzniku některých alergií.

Bylo proto stanoveno, že pro účely vynálezu se nejnižší dávka LMWH na kg hmotnosti, která způsobuje inhibici produkce TNF-alfa nebo inhibici reaktivity typu DTH alespoň na 50 % považuje za dávku, obsahující 12 myších inhibičních jednotek/kg (12 u/kg). Vzhledem k rozdílům mezi povrchem těla a metabolismem u myší a u člověka by u lidí mělo být použito nižších dávek LMWH a 12 u/kg pro myš tedy odpovídá 1 u/kg pro člověka. Například dávka prostředku Fragmin^{R}, šarže 38609, účinná při inhibici sekrece TFN-alfa i reaktivity typu DTH je 5 /ug na myš jednou týdně. Vzhledem k tomu že

každá myš váží přibližně 25 g, dávka Fragminu^{R} 38 609 12 jednotek na kg odpovídá 200 /ug/kg myši. Dávka, vhodná pro člověka je tedy 200 /ug/kg : 12 = 16,67 /ug/kg. Člověku s hmotností 70 kg by tedy mělo být podáno 1,2 mg v jediné dávce podkožně každých 7 dnů. Vzhledem k tomu, že se jednotlivci biologicky značně od sebe liší, může se optimální dávka lišit od uvedené dávky 1,2 mg a bude se pohybovat pod 5 mg, zvláště v rozmezí 0,3 až 3 mg.

Dávka LMWH, která by měla být účinná u krys může být odvozena na základě skutečnosti, že dávka pro krysu je polovinou dávky pro myš, to znamená 6 jednotek/kg. Například v případě, že 12 jednotek Fragminu^{R} šarže 38 609 je 200 /ug/kg, pak dávka 6 jednotek, vhodná pro krysu je 100 /ug/kg nebo 20 /ug pro krysu s hmotností 200 g, tato dávka se opět podává jednou týdně.

Praktické provedení vynálezu dude dále osvětleno následujícími příklady.

5. Příklady provedení vynálezu

5.1. Příklad 1: Biologická zkouška na inhibici sekrece TNF-alfa

Supernatanty slezinných buněk, pěstovaných v přítomnosti nebo v nepřítomnosti LMWH nebo slezinné buňky, získané z myší, které byly nebo nebyly in vivo léčeny LMWH byly analyzovány na svou schopnost vylučovat TNF-alfa. Biologická zkouška na TNF-alfa je založena na cytotoxickém účinku TNF-alfa na cykloheximidem (CHI)-sensitizované buňky a je možno ji provádět kvantitativně na základě příjmu neutrální červeni způsobem podle publikace Wallach D., J. Immunology, 1984, 132:2464-2469. Postupuje se tak, že se stanoví počet CHI-sensitizovaných HeLa buněk, které uhynuly působením TFN-alfa,

přítomného v supernatantu ve srovnání s titračními křivkami pro exogenně přidávaný TFN-alfa. Životnost buněk se stanoví jejich schopností přijímat neutrální červeň tak, že se buňky s tímto barvivem inkubují dvě hodiny, pak se přebytečné barvivo vymyje, neutrální červeň, přijatá buňkami se extrahuje směsí Sorensonova citrátového pufru a ethanolu a výsledek se měří kolorimetricky při 570 nm pomocí automatického zařízení Microelisa Autoreader.

Buňky z myší, jimž byl podáván LMWH byly získány následujícím způsobem: Myší samice kmene Balb/c (25 gramů, ve stáří 2 měsíce), alespoň 5 myší ve skupině byly ošetřeny podkožním podáním různých dávek LMWH, obvykle v rozmezí 0,5 až 20 /ug/myš. Po dalších pěti dnech byly myši usmrceny oddělením hlavy, sleziny byly vyjmuty, zbaveny červených krvinek a analyzovány na produkci TNF-alfa jako odpovědi na indukci dECM, Concavalinem A (Con A) nebo lipopolysacharid (LPS).

5.2. Příklad 2: Biologická zkouška na inhibici reaktivity typu DTH

Skupiny myší byly sensitizovány na vyholenou pokožku břicha při použití 100 /ul 3% oxazolonu (OX) ve směsi acetonu a olivového oleje v objemovém poměru 4:1. Sensitivita typu DTH byla vyvolána po 5 dnech tak, že myším bylo aplikováno na každou stranu ucha 10 /ul 0,5% OX ve směsi acetonu a olivového oleje, celkem 20 /ul této látky. Oblast ucha byla změřena těsně před podáním a pak 24 a 48 hodin po podání Mitutoyovým technickým mikrometrem. Měření otoku ucha se pak vyjadřuje jako přírůstek (delta) otoku v průměrné hodnotě pro skupinu v jednotkách 10^{-2}mm nebo 10^{-4} palce (± standardní chyba) v závislosti na použitém mikrometru. Inhibice v % se vypočítá podle následujícícho vztahu:

$$\text{inhibice v \%} = \frac{\text{positivní kontrola - pokusná skupina}}{\text{positivní kontrola - negativní kontrola}} \times 100$$

Myším se podává LMWH stejným způsobem jako v příkladu 1 injekčně 1 den před primární sensitizací k OX. Pátého dne po sensitizaci k OX se stejným způsobe jako svrchu podá OX k vyvolání DTH-reakce.

Positivní kontrolou je DTH-reakce, vyvolaná u imunizovaných myší, jimž nebyl podáván LMWH. Negativní kontrolou je otok, vyvolaný antigenem u imunizovaných myší.

5.3. Příklad 3: Indukce sekrece TNF-alfa T-buňkami a makrofágy in vitro

Mikrotitrační plotny byly připraveny následujícím způsobem: fibronectin (FN) nebo laminin (LN)(Sigma) byly uloženy na ploché dno vyhloubení ploten s 96 vyhloubeními (Costar) při koncentraci 1 /ug/50 /ul PBS v jednom vyhloubení a po 16 hodinách byl materiál odstraněn. Zbývající vazná místa byla blokována BSA/PBS (10 mg/ml), roztok byl přidán do vyhloubení na 2 hodiny a pak byl vymyt. Vyhloubení, opatřená povlakem ECM byla připravena následujícím způsobem: endotheliální buňky rohovky skotu byly pěstovány na plochých dnech ploten s 96 vyhloubeními. Souvislá vrstva endotheliálních buněk bvla rozpuštěna, zůstal neporušený materiál ECM, prostý buněčné drti (Gospodarowicz D. a další, J. Biol. Chem. 1978, 253:3736). Rozrušená extracelulární matrice (dECM) byla připravena trojím jemným oškrábáním ECM injekční jehlou 27G a takto upravený povrch byl opatřen povlakem BSA/PBS. Krysí klonované buňky $CD4^+T$ v klidovém stavu, označené K1, které rozpoznávají basickou bílkovinu myelinu (MBP) byly namnoženy a udržovány v kultuře a pak přidány do vyhloubení v množství 10^5 na jedno vyhloubení za přidání nebo bez přidání 3 x 10^5 syngenických slezinných makrofágů ve 100 /ul prostředí RPMI 1640 (Gibco) na jedno vyhloubení, prostředí

je doplněno 1 % BSA a antibiotiky. Slezinné makrofágy byly čištěny odstraněním buněk T a B při použití specifických monoklonálních protilátek (mAb). Tam, kde to bylo označeno, byly do vyhloubení přidány protilátky TNF-alfa-mAb proti myším tkáním v ředění 1/300 (Genzyme). Tam, kde je to rovněž uvedeno, byly do vyhloubení přidány MBP (100 /ug/ml), ConA (2,5 /ug/ml) nebo LPS (1 /ug/ml). Pak byly plotny inkubovány při teplotě 37 °C ve vlhké atmosféře v inkubátoru celkem 3 hodiny. Obsah vyhloubení (4 vyhloubení na 1 pokusnou skupinu) byl pak odebrá, materiál byl odstředěn a prostředí bylo podrobeno zkouškám na sekreci TNF-alfa stejně jako v příkladu 1. Supernatanty pěstovaných makrofágů a lymfocytů byly přidány ke kulturám HeLa buněk, které jsou na TNF-alfa citlivé a uhynutí buněk v přítomnoati zkoumaného prostředí bylo kalibrováno srovnáním s titrační křivkou, získanou při použití exogenně přidávaného TNF-alfa. Uhynutí buněk bylo sledováno na základě uvolnění neutrální červeni z předem inkubovaných HeLa buněk. Uváděné výsledky representují údaje, získané v průběhu šesti pokusů, při nichž byly dosaženy v podstatě stejné výsledky.

Tabulka 1 prokazuje, že u T-buněk a u makrofágů je možno indukovat sekreci TNF-alfa stykem se specifickým antigenem MBP (skupina 4), mitogenem ConA (skupina 6) nebo LPS (skupina 8). Avšak v nepřítomnosti antigenního nebo mitogenního stimulu je možno indukovat sekreci TNF-alfa také rozrušenou extracelulární matricí (dECM, skupina 10) nebo složkami ECM fibronectinem (FN, skupina 12) nebo lamininem (LN, skupina 14). Neporušená ECM indukovala produkci TNF-alfa jen slabě (skupina 16).

T a b u l k a 1

Sekrece TNF-alfa buňkami T a makrofágy po indukci specifickými antigeny MBP, Con A, LPS nebo složkami dECM

Skupina	Induktor sekrece TNF-alfa	Buňky Kl,pěstované spolu s (ano) nebo bez (ne) makrofágů	Sekrece TNF-alfa v pg/ml
1	žádný	ne	50
2		ano	65
3	antigen MBP	ne	30
4		ano	950
5	Con A	ne	120
6		ano	1300
7	LPS	ne	50
8		ano	1500
9	dECM	ne	30
10		ano	900
11	FN	ne	20
12		ano	650
13	LN	ne	50
14		ano	500
15	ECM	ne	30
16		ano	120

5.4. Příklad 4: řízení sekrece TNF-alfa pomocí LMWH

T-buňky a další buněčné kultury byly připraveny způsobem podle příkladu 3. LMWH byl přidán do vyhloubení na

Subsequently, the contents of the wells (4 wells per experimental group) were collected, centrifuged, and the media were assayed for TNF-α secretion as in Example 1: supernatants of cultured macrophages and lymphocytes were added to cultures of HeLa cells, which are sensitive to killing by TNF-α, and death of these cells in the presence of the test media was calibrated in comparison to titration curves of exogenous added TNF-α. Cell death is examined by the release of neutral red dye from the preincubated HeLa cells. The results shown here represent data obtained from a total of six experiments that produced essentially similar results.

Table 1 shows that T cells and macrophages cultured together can be induced to secrete TNF-α by contact with specific antigen MBP (group 4), the mitogen Con A (group 6) or LPS (group 8). However, in the absence of antigenic or mitogenic stimulus, TNF-α was also induced to be secreted by disrupted extracellular matrix (dECM; group 10) or by the ECM components fibronectin (FN; group 12) or laminin (LN group 14). Intact ECM was a weak inducer of TNF-α (group 16).

Table 1. TNF-α secretion by T cells and macrophages is induced by specific antigen MBP, Con A, LPS or dECM components.

Group	TNF-α inducer	K1 cells cultured together with (yes) or without (no) macrophages	Secreted TNF-α (pg/ml)
1	none	no	50
2		yes	65
3	MBP antigen	no	30
4		yes	950
5	Con A	no	120
6		yes	1300

počátku pěstování buněčné kultury. Úroveň TFN-alfa byla sledovány po 3 hodinách inkubace.

B tabulce 2 je prokázáno, že přítomnost LMWH (Fragmin^{R}, šarže 38609) in vitro působí inhibici indukce sekrece TNF-alfa specifickými antigeny (MBP, skupina 4), mitogeny (Con A a LPS, skupina 6 a 8), dECM nebo složkami ECM (skupiny 10, 12 a 14). Vzhledem k tomu, že sekrece TNF-alfa, indukovaná ECM se patrně účastní vzniku atherosklerózy, bylo by žádoucí v tomto případě dosáhnout inhibice TNF-alfa působením LMWH.

T a b u l k a 2

Indukce TNF-alfa in vitro může být inhibována působením LMWH (Fragmin^{R}, šarže 38609)

Skupina	induktor sekrece TNF-alfa	LMWH 1 /ug/ml	Sekrece TNF-alfa kulturou T-buněk a makrofágů (pg/ml)
1	žádný	ne	65
2		ano	30
3	antigen MPB	ne	950
4		ano	60
5	Con A	ne	1300
6		ano	80
7	LPS	ne	1500
8		ano	80
9	dECM	ne	900
10		ano	90
11	FN	ne	650
12		ano	90
13	LN	ne	500
14		ano	70

3	MPB antigen	none	950
4		yes	60
5	Con A	none	1300
6		yes	80
7	LPS	none	1500
8		yes	80
9	dECM	none	900
10		yes	90
11	FN	none	650
12		yes	90
13	LN	none	500
14		none	70

5.5. Example 5

To examine the effect of LMWH administered to mice in vivo on the secretion of TNF-α by spleen cells in vitro, the following experiment was conducted. BALB/c mice, 5 per group, were treated with various doses of LMWH (Fragmin® batch 38609) diluted in saline, injected subcutaneously. After one week, the animals were killed and their spleen cells, devoid of red blood cells, were examined for their ability to secrete TNF-α in response to control wells without dECM (A) or to wells coated with dECM (B). Measuring the levels of TNF-α secretion was done as described in Example 1. Table 3 shows the results which indicate that an injection of 5 μg of LMWH given once, 7 days earlier, inhibited TNF-α secretion induced by dECM. Higher or lower doses of LMWH were less effective. Thus, an optimal dose of LMWH administered in vivo a week earlier was effective.

5.5. Příklad 5

Aby bylo možno prokázat vliv LMWH, podávaný myším in vivo na sekreci TFN-alfa slezinnými buňkami in vitro, byl proveden následující pokus. Myším BALB/c ve skupinách po pěti byly podávány různé dávky LMWH (Fragmin^{R}, šarže 38 609) podkožně ve fysiologickém roztoku chloridu sodného. Po jednom týdku byla zvířata usmrcen a a jejich slezinné buňky, zbavené červených krvinek, byly sledovány na schopnost vylučovat TNF-alfa jako odpověď na kontrolní vyhloubení bez obsahu dECM (A) nebo na vyhloubení, opatřená povlakem dECM (B). Měření sekrece TNF-alfa bylo prováděno způsobem, uvedeným v příkladu 1. V tabulce 3 jsou uvedeny výsledky, které ukazují, že injekce 5 /ug LMWH, podaná jednou, a to před 7 dny, způsobí inhibici sekrece TNF-alfa po indukce dECM. Vyšší nebo nižší dávky LMWH byly méně účinné. To znamená, že účinná byla optimální dávka LMWH, podaná in vivo týden před zkouškou.

T a b u l k a 3

Inhibice sekrece TNF-alfa T-buňkami ex vivo po vyvolání této sekrece působením dECM

	léčení myší BALB/c LMWH (týdně)	sekrece TNF-alfa in vitro v pg/ml, pěstovaných na prostředí s přidáním A) -	B) dECM (inhibice v %)
1	-	30	400
2	0,5 /ug	50	380 (5)
3	1,0 /ug	25	90 (78)
4	5,0 /ug	25	60 (85)
5	10,0 /ug	30	140 (65)
6	20,0 /ug	40	320 (20)

V následující tabulce 4 je prokázáno, že dávka 5 /ug LMWH (Fragmin^{R}, šarže 38609) byla rovněž účinná při inhibici sekrece TNF-alfa po její indukce LPS. Myším BALB/c (4 myši v pokusné skupině) bylo podáno uvedené množství LMWH v roztoku ve fysiologickém roztoku chloridu sodného podkožní injekcí. Po jednom týdnu bylo myším intraperitoneálně podáno 10 mg LPS, po 4 hodinách byly myši usmrceny a jejich slezinné buňky, zbavené červených krvinek pak byly pěstovány ve vyhloubeních, opatřených povlakem dECM 3 hodiny v inkubátoru s vysokou vlhkostí. Množství TNF-alfa, vylučovaného jako odpověď na dECM bylo pak měřeno v supernatantech kultury. Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce 4.

T a b u l k a 4

Podání LMWH myším způsobí inhibici sekrece TNF-alfa makrofágy po jejím vyvolání působením LPS

léčení myší podáním LMWH (/ug)	Sekrece TNF-alfa in vitro makrofágy (pg/ml) po působení LPS	Inhibice v %
0	690	-
0,1	500	28
1	350	50
5	120	82
20	550	20

5.6. Příklad 6

Aby bylo možno sledovat vliv různých typů LMWH na inhibici sekrece TNF-alfa a na odpověď typu DTH, byly myším podkožně podávány v různé koncentraci uvedené typy LMWH.

Po jednom týdnu byly některé myši usmrceny a byla měřena indukce sekrece TNF-alfa jako odpověď na aktivaci pomocí Con A in vitro. Zbývající myši byly sledovány na svou schopnost reagovat na podání antigenu oxazolonu. Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce 5 jako procentuální inhibice ve srovnání s odpovědí myší, kterým nebyl podáván LMWH.

Při analyze výsledků uvedených v tabulce 5 je možno učinit následující závěry:

1) Pro různé šarže LMWH, z nichž každá je kalibrována pro dosažení srovnatelného antithrombotického účinku (zkoušky s faktorem X) je možno pozorovat různé optimální dávky v případě, že tyzo šarže jsou užity k inhibici sekrece TNF-alfa. Existují však typy LMWH, například Clexane^{R}, šarže 4096, které nemají vůbec žádný inhibiční účinek na TNF-alfa a jeho sekreci v jakékoliv podané dávce. Je proto možno uzavřít, že antithrombotický účinek různých typů LMWH nijak nesouvisí se schopností tohoto typu LMWH způsobit inhibici TNF-alfa. Obě od sebe odlišné biologické zkoušky se tedy týkají jevů, zprostředkovaných odlišnými faktory, které jsou v těchto typech látek přítomné.

2) Schopnost určité dávky LMWH způsobit inhibici sekrece TNF-alfa je v positivní korelaci se schopností vyvolat inhibici reakce typu DTH a dávka, která je optimální pro inhibici sekrece TNF-alfa je rovně optimální v případě inhibice reakce typu DTH.

T a b u l k a 5

Při podání různých typů LMWH myším dochází k inhibici sekrece TNF-alfa a odpovědi typu DTH ex vivo

Typ LMWH podávaný myším	Koncentrace /ug/myš	Sekrece TNF-alfa vyvolaná Con A ex vivo		Reakce typu DTH	
		pg/ml	inhibice %	DTH	inhibice %
Fragmin					
š. 38609	-	450	-	25	-
	0,5	425	5	21	12
	1	400	12	23	10
	5	68	85	6	73
	10	350	22	20	20
	50	435	8	26	0
š. 45389	-	320	-	28	-
	0,1	280	13	26	6
	1	70	78	4	89
	5	260	18	24	13
	10	290	10	26	6
	50	310	4	29	0
Clexane					
š. 2088	-	400	-	22	-
	0,1	360	10	17	23
	1	64	84	3	87
	5	152	38	13	0
	10	380	4	23	0
š. 2066	-	350	-	23	-
	0,1	338	6	20	13
	1	185	54	8	65
	5	192	57	7	70
	10	186	55	7	70
š. 4096	-	320	-	24	-
	1	335	0	27	0
	5	325	0	26	0
	10	330	0	24	0

5.7. Příklad 7: Léčení adjuvantní arthritidy (AA) u krys nízkými dávkami LMWH

Adjuvantní arthritis je pokusné onemocnění, které je možno u některých kmenů krys vyvolat imunizací antigeny Mycobacterium tuberculosis podle publikace Pearson C.M., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1956, 91:91. Toto experimentální onemocnění je považováno za model lidské rheumatoidní arthritidy podle publikace Pearson C.M., Athritis Rheum., 1964, 7:80. Arthritida je pravděpodobně vyvolána T-lymfocyty, které rozpoznávají antigen M. tuberculosis se zkříženou reaktivitou se strukturami pojivové tkáně (Cohen I.R. a další, Arthritis Rheum., 1985, 28:841).

Lewisovy krysy byly imunizovány M. tuberculosis (1 mg) v oleji k vyvolání adjuvantní athritidy podle Pearson C.M., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1956, 91:91. Po pěti dnech byla krysám podkožně podána dávka LMWH a/nebo heparinu a byl pozorován vznik athritidy při použití stupnice 0 až 16, tak jak bylo popsáno v publikaci Holoshitz Y. a další, Science, 1983, 219:56. Všechny pokusy byly provedeny s prostředkem Fragmin^{R}, šarže 38609.

Možnost praktického použití farmaceutického prostředku podle vynálezu bude dále osvětlena v souvislosti s výsledky biologických pokusů, které jsou shrnuty na přiložených výkresech.

Přehled obrázků na výkresech

Na obr. 1 je znázorněn vliv LMWH na vznik experimentální arthritidy.

Na obr. 2 je znázorněn účinek dávky 20 /ug Fragminu^{R} na průběh experimentální arthritidy (adjuvantní arthritidy AA).

Na obr. 3 je znázorněno srovnání účinku 20 /ug Fragminu^{R} nebo heparinu jednou týdně na AA.

Na obr. 4 je znázorněn účinek dávky 20 /ug Fragminu^{R} nebo heparinu na AA při denním podávání.

Na obr. 5 je znázorněn účinek podávání různých typů LMWH na AA v dávce 20 /ug v různých intervalech.

Na obr. 6 je znázorněn vliv 20 /ug Fragminu^{R} na odmítnutí transplantátu u krys.

Na obr. 7 je znázorněn účinek LMWH u myší na diabetes typu I (IDDM) závislý na insulinu.

Na obr. 8 je znázorněn účinek LMWH na reaktivitu typu DTH u lidského dobrovolníka.

Aby bylo možno stanovit závislost odpovědi na dávce Fragminu^{R} (Obr.1), bylo krysám, imunizovaným k vyvolání AA podkožně jednou týdně podáno, počínaje pátým dnem po injekci 0,5 /ug (o), 1 /ug (◆), 2 /ug (●), 10 /ug (◇), 15 /ug (△), 20 /ug (■), 30 /ug (▲), 40 /ug (x), jako kontrola sloužilo podání PBS (□). Podávání velmi účinně bránilo vzniku experimentální athritidy.

Účinek dávky 20 /ug Fragminu^{R} na průběh AA je znázorněn na obr. 2, kde jednotlivé křivky mají následující význam: Kontrola PBS (□), jediné podání 5. den (▲), denní podávání

(●), podávání každý pátý den (o), podávání jednou týdně (■). Je zřejmé, že k inhibici arthritidy dochází při podávání Fragminu^{R} v intervalu 5 dnů a 7 dnů.

Na obr. 3 je znázorněn účinek podávání Fragminu^{R} (šarže 38609) jednou týdně ve srovnání s podáváním standardního heparinu na AA. Lewisovy krysy bylv imunizovány k vyvolání AA. Od 5. dne byla podkožně v týdenních intervalech krysám podávána dávka 20 /ug Fragminu^{R} (●), heparinu (o) nebo fysiologického roztoku chloridu sodného s fosfátovým pufrem (PBS)(□) jako kontrola. Výsledky prokazují dramatický rozdíl v účinnosti mezi Fragminem^{R} a běžným heparinem. Při podávání Fragminu^{R} došlo k úplné inhibici vzniku arthritidy, kdežto heparin neměl žádný inhibiční účinek.

Žádný inhibiční účinek nebylo možno pozorovat při každodenním podávání dávky 20 /ug LMWH, přestože při tomto způsobu podávání byl účinek běžného heparinu silnější než účinek Fragminu^{R}, jak je zřejmé z obr. 4. Jednotlivé křivky: Fragmin^{R}(šarže 38609) (●), heparin (o), PBS jako kontrola (□).

Podobný inhibiční účinek bylo možno pozorovat při použití několika jiných typů LMWH při jejich podávání Lewisovým krysám, imunizovaným k vyvolání AA. Na obr. 5 jsou uvedeny výsledky injekčního podání dávky 20 /ug Fraxiparinu^{R}, a to denně (□), jednou týdně (■), mimoto byl podáván Fraxiparine^{R}, a to rovněž denně (△) a jednou týdně (▲), Lovenox^{R}/ Clexane^{R} denně (●) a jednou týdně (o) a jako kontrola PBS (x). Při podávání všech tří typů LMWH, navzájem od sebe odlišných bylo možno pozorovat výraznou inhibici vzniku arthritidy při podávání jednou týdně, avšak nikoliv při podávání jednou denně.

5.8. Příklad 8: Podáváním LMWH je možno zabránit odmítnutí transplantátů

Krysám kmene Wistar byly voperovány allogenní BN transplantáty srdce (Ono K. a Linsay E.S., J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 1969, 45:225-229). Ode dne před transplantací byla krysám podkožně v intervalech 7 dnů podávána dávka 20 /ug Fragminu^{R} nebo PBS jako kontroly (obr. 6. křivky ■ a □). Pak bylo zaznamenáváno přežívání krys. Den odmítnutí transplantátu byl stanoven jako den, v němž transplantované srdce přestalo tlouci podle hmatového vyšetření přes břišní stěnu. Z obr. 6 je zřejmé, že krysy, jimž byla v intervalu jeden týden podávána dávka LMWH měly význačně delší dobu přežívání transplantátů.

5.9. Příklad 9: Biologické účinky LMWH u myší NOD na diabetes mellitus, závislý na insulinu (IDDM)

U myší kmene NOD se spontánně vyvíjí diabetes mellitus typu I, závislý na insulinu (IDDM), jde o uznávaný model pro lidské onemocnění IDDM podle Castano L. a Eisenbarth G.S., Annu. Rev. Immunol. 1990, 8:647-679. Onemocnění začíná ve stáří 4 až 5 týdnů zánětlivými změnami na ostrůvcích, tj. jako insulitis. Tato insulitis postupně ničí beta-buňky, produkující insulin, které jsou citlivé na poškození TNF-alfa. Ve stáří přibližně 4 až 5 měsíců je již rozrušeno dostatečné množství beta-buněk k tomu, aby došlo k projevům diabetu.

Aby bylo možno zjistit, zda je možno podáváním LMWH ovlivnit průběh IDDM, byla skupině 10 myších samic NOD jednou týdně podkožně podávána dávka 5 /ug Fragminu^{R} (šarže 38609) na myš, což odpovídá dávce 12 myších jednotek/kg. Skupině 10 kontrolních myší byl podkožně podáván fysiologický roztok chloridu sodného. Ve stáří 5 měsíců byla všem myším odebrána krev ke stanovení vývoje IDDM při použití stan-

dardního postupu podle publikace Elias D. a další, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, 87:1576-1580. Z obr. 7 je zřejmé, že kontrolní myši bez podání účinné látky měly abnormální koncentraci glukózy v krvi (400 mg/dl). Naproti tomu byla u myší, léčených LMWH naměřena normální koncentrace glukózy v krvi (100 mg/dl). Je tedy zřejmé, že podáváním LMWH je možno příznivě ovlivnit průběh IDDM.

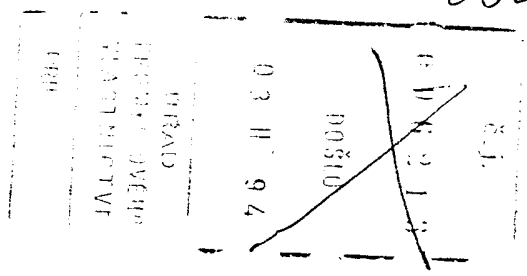
5.10. Příklad 10: Léčení DTH u člověka podáváním LMWH

Na obr. 8 je znázorněn výsledek pokusu, v němž byl sledován dobrovolník, muž ve věku 40 let s hmotností 85 kg na reaktivitu typu DTH při použití tetanového antigenu (Merieux skin test applicator). Po 24 a 48 hodinách bylo možno pozorovat zatvrdnutí s průměrem 18 mm. Pak byl dobrovolník léčen podáváním Fragminu^{R} (šarže 38609), byly podány 3 mg této látky ve formě podkožní unjekce. Po dalších pěti dnech byla opět provedena zkouška na odpověď typu DTH proti tetanu, bylo možno pozorovat inhibici tvorby zatvrdnutí, které v tomto případě mělo průměr pouze 5 mm. Další zkouška byla provedena po dalších třech týdnech, v tomto případě se reaktivita navrátila na původní úroveň, po 24 a 48 hodinách se vytvořilo zatvrdnutí s průměrem 23 mm. Pak byl podán Fragmin^{R} stejným způsobem jako poprvé a po dalších sedmi dnech byla znovu měřena reaktivita typu DTH. V tomto případě došlo opět k inhibici tvorby zatvrdnutí až na průměr 5 mm. Návrat reaktivity typu DTH pak bylo opět možno pozorovat po dalších třech týdnech. Výsledek uvedené zkoušky prokazuje, že LMWH v dávce nižší než 5 mg může u člověka vyvolat inhibici reaktivity typu DTH v případě, že tato dávka se podává v intervalech 5 nebo 7 dnů.

Je zřejmé, že by bylo možno navrhnout ještě řadu modifikací, rovněž spadajících do oboru vynálezu, takže rozsah vynálezu není omezen na uvedená specifická provedení.

Zastupuje:

2825-93



P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Farmaceutický prostředek pro léčení a/nebo prevenci pathologických stavů, spojených s indukcí sekrece TNF-alfa, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje farmaceuticky přijatelný nosič a jako účinnou složku heparin s nízkou molekulovou hmotností LMWH v nízké účinné dávce pro podání v intervalech 5 až 8 dnů, přičemž LMWH působí in vitro inhibici sekrece TNF-alfa T-buňkami v klidovém stavu a/nebo makrofágy při odpovědi na antigeny, specifické pro T-buňky, mitogeny, aktivátory makrofágů, rozrušenou extracelulární matrici dECM, laminin, fibronectin nebo jiné složky ECM.

2. Farmaceutický prostředek podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje LMWH se střední molekulovou hmotností 3 000 až 6 000.

3. Farmaceutický prostředek podle nároků 1 nebo 2, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je určen pro podání každý pátý den.

4. Farmaceutický prostředek podle nároků 1 nebo 2, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je určen pro podání každý sedmý den.

5. Farmaceutický prostředek podle nároků 1, nebo 2 v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje LMWH, schopný způsobit inhibici experimentálně vyvolaných hypersensitivních reakcí opožděného typu DTH.

6. Farmaceutický prostředek podle nároků 1, nebo 2, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je určen pro podkožní nebo nitrožilní podání.

7. Farmaceutický prostředek podle nároku 1 nebo 2, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je určen k oddálení nebo prevenci odmítnutí transplantátu.

8. Farmaceutický prostředek podle nároku 1 nebo 2, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je určen pro léčení autoimunních onemocnění, alergií, zánětlivých onemocnění a dalších příbuzných pathologických stavů.

9. Farmaceutický prostředek podle nároků 1 nebo 2, v y z n a č u j í c í s e t í m, žeje určen k léčení pathologických stavů, souvisejících s AIDS.

10. Farmaceutický prostředek podle nároků 1 nebo 2, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je určen pro léčení diabetu typu I, periodontálních onemocnění, zánětlivých onemocnění tračníku, uveitidy, rheumatických onemocnění nebo roztroušené sklerózy.

11. Farmaceutický prostředek podle nároku 10, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je určen pro léčení rheumatoidní arthritidy.

12. Farmaceutický prostředek podle nároků 8, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je určen k léčení chronických zánětlivých stavů.

13. Farmaceutický prostředek podle nároku 8, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je určen pro léčení a/nebo prevenci atherosklerózy, vaskulitidy a příbuzných parhologických pochodů.

14. Farmaceutický prostředek podle nároku 2, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje LMWH v jednotlivé nízké dávce nižší než 5 mg.

15. Farmaceutický prostředek podle nároku 2 , v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje LMWH v jediné nízké dávce nižší než 3 mg.

16. Farmaceutický prostředek podle nároku 2, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje LMWH v jediné nízké dávce v rozmezí 0,3 až 3 mg.

17. Farmaceutický prostředek podle nároku 2 , v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje LMWH v jediné nízké dávce v rozmezí 1 až 1,5 mg.

18. Použití heparinu s nízkou molekulovou hmotností LMWH, schopného způsobit inhibici sekrece TNF-alfa T-buňkami v klidovém stavu a/nebo makrofágy jako odpovědi na antigeny, specifické pro T-buňky, mitogeny, aktivátory makrofágů, rozrušenou extracelulární matrici dECM, laminin, fibronectin nebo jiné složky ECM pro výrobu farmaceutických prostředků pro podání v intervalech 5 až 8 dnů k prevenci a/nebo léčení pathologických stavů, při nichž dochází k indukci sekrece TNF-alfa, obsahujících nízkou účinnou dávku LMWH spolu s farmaceuticky přijatelným nosičem.

19. Použití podle nároku 17 pro výrobu farmaceutického prostředku, určeného pro podání každých sedm dnů.

20. Použití podle nároku 17 pro výrobu farmaceutického prostředku s obsahem LMWH se střední molekulovou hmotností 3 000 až 6 000.

21. Použití podle nároku 17 pro výrobu farmaceutického prostředku s obsahem účinné dávky, nižší než 5 mg LMWH.

22. Použití podle nároku 17 pro výrobu farmaceutického prostředku, určeného k prevenci a/nebo léčení odmítnutí

transplantátů, alergie, autoimunních onemocnění a zánětlivých onemocnění.

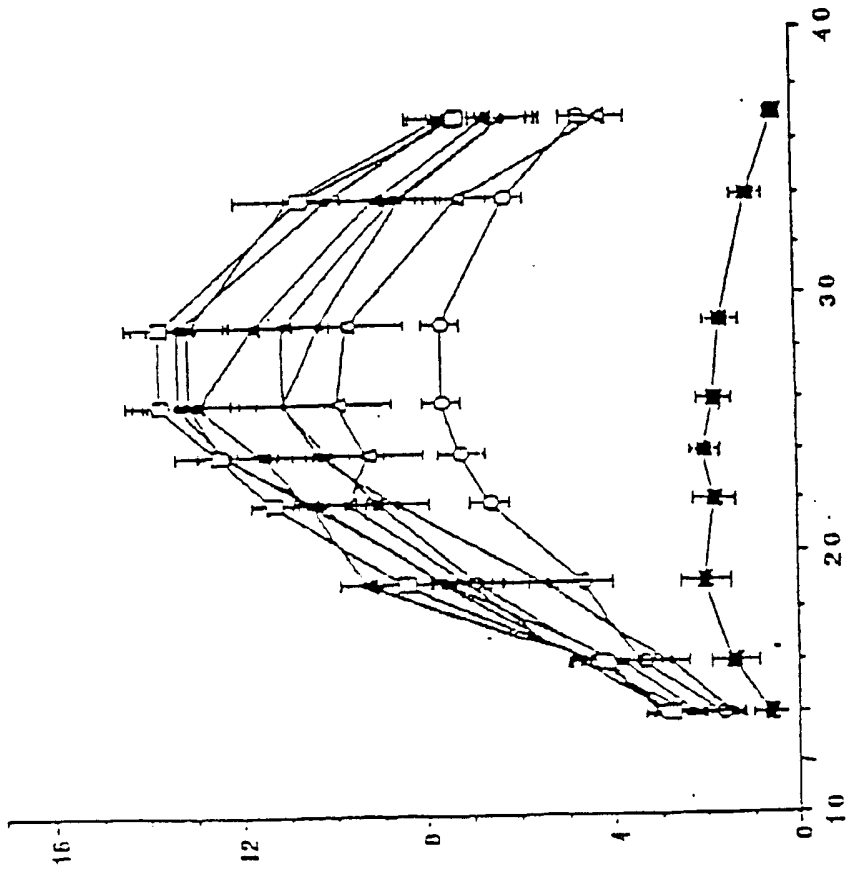
23. Použití podle nároku 17 pro výrobu farmaceutického prostředku k léčení stavů, spojených s AIDS.

24. Použití podle nároku 17 pro výrobu farmaceutického prostředku, určeného k prevenci a/nebo léčení diabetu typu I, periodontálních onemocnění zánětlivých onemocnění tračníku, uveitidy, rheumatických onemocnění, chronických zánětů, roztroušené sklerózy, atherosklerózy a vaskulitidy.

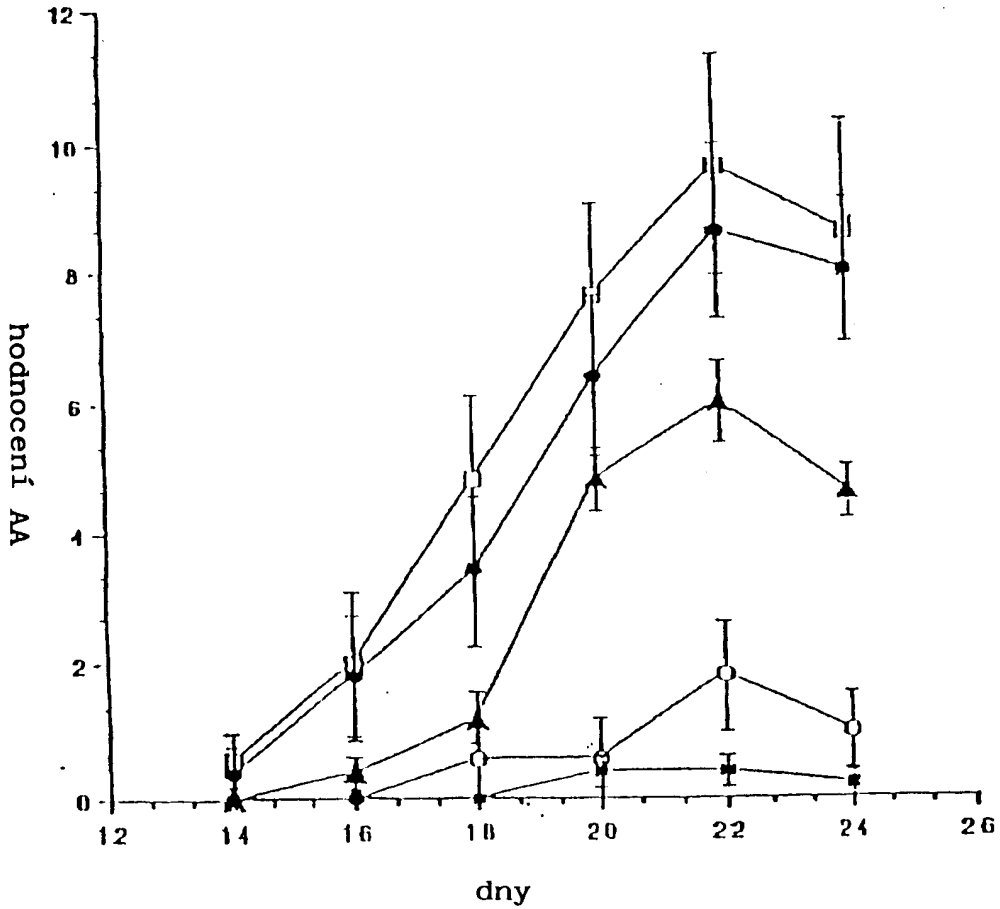
25. Farmaceutický prostředek pro podání v intervalech 5 až 8 dnů pro prevenci a/nebo léčení pathologických stavů, spojených s indukcí sekrece TNF-alfa, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje farmaceuticky přijatelný nosič a heparin s nízkou molekulovou hmotností LMWH, schopný vyvolat inhibici experimentálních hypersensitivních reakcí opožděného typu DTH na podaný antigen při průkazu redukce zatvrdnutí po aplikaci uvedeného antigenu na kůži pět až sedm dnů po podání farmaceutického prostředku ve srovnání se zatvrdnutím po podání antigenu na kůži bez předchozího podání farmaceutického prostředku nebo po odeznění jeho účinku přičemž farmaceutický prostředk obsahuje LMWH v nízké účinné dávce.

26. Farmaceutický prostředek podle nároku 25, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje LMWH se střední molekulovou hmotností 3 000 až 6 000.

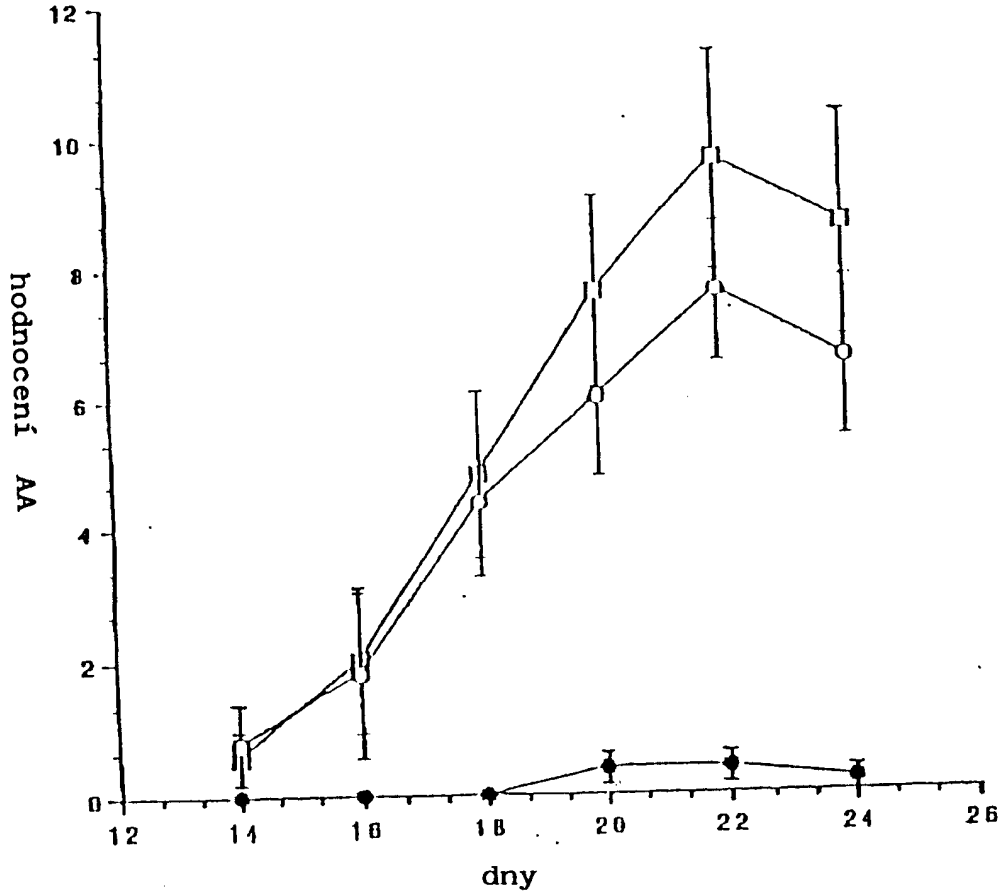
27. Farmaceutický prostředek podle nároku 25, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje LMWH, účinný proti působení antigenu ze skupiny tetanus, basická bílkovina myelinu, čištěné deriváty bílkovin a oxazolon.



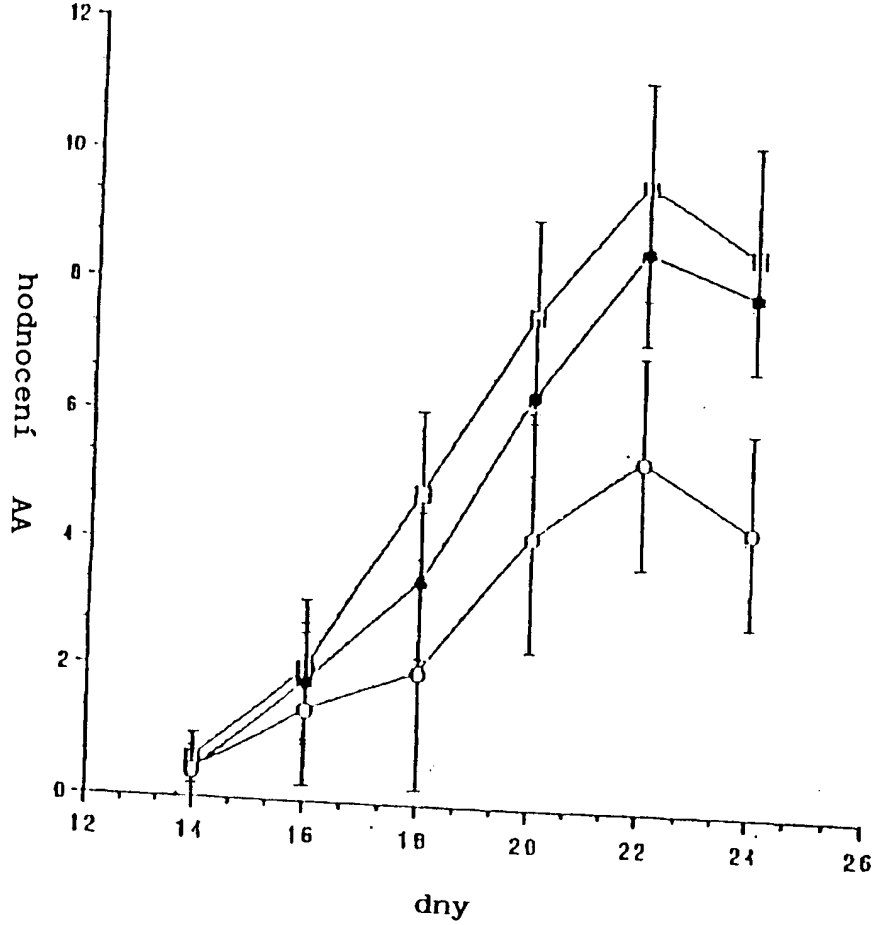
OBR. 1



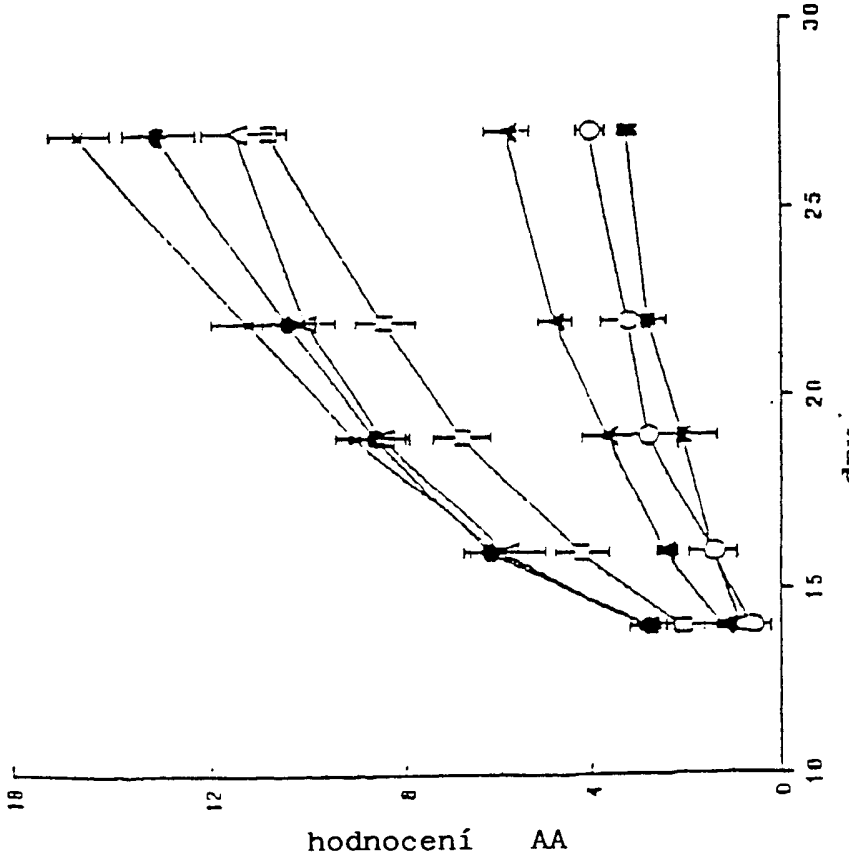
OBR. 2



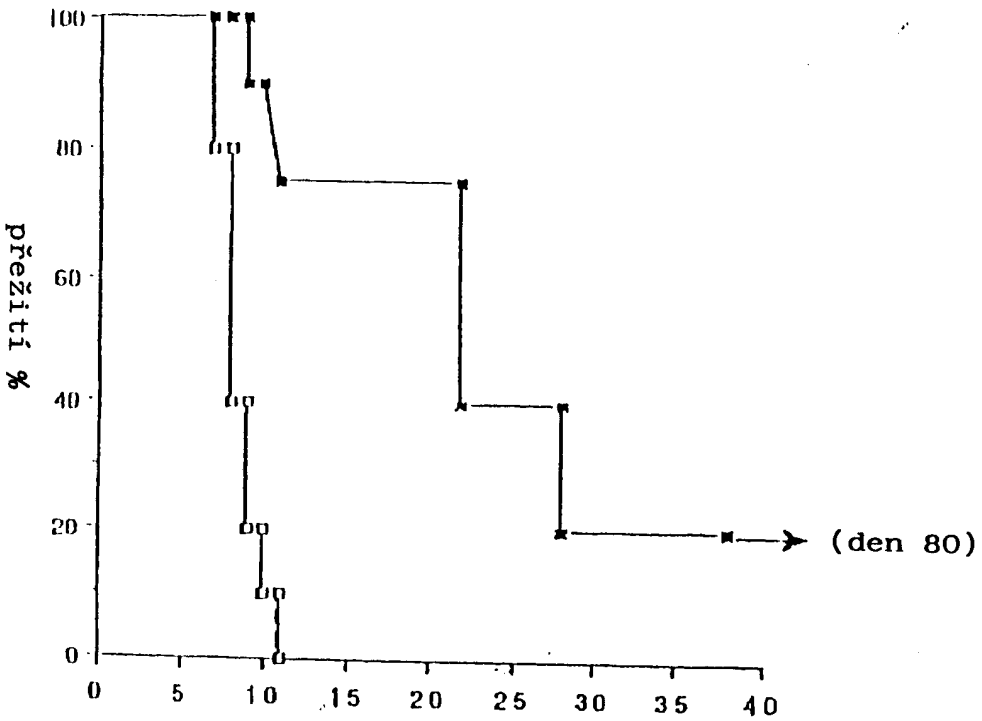
OBR. 3



OBR. 4

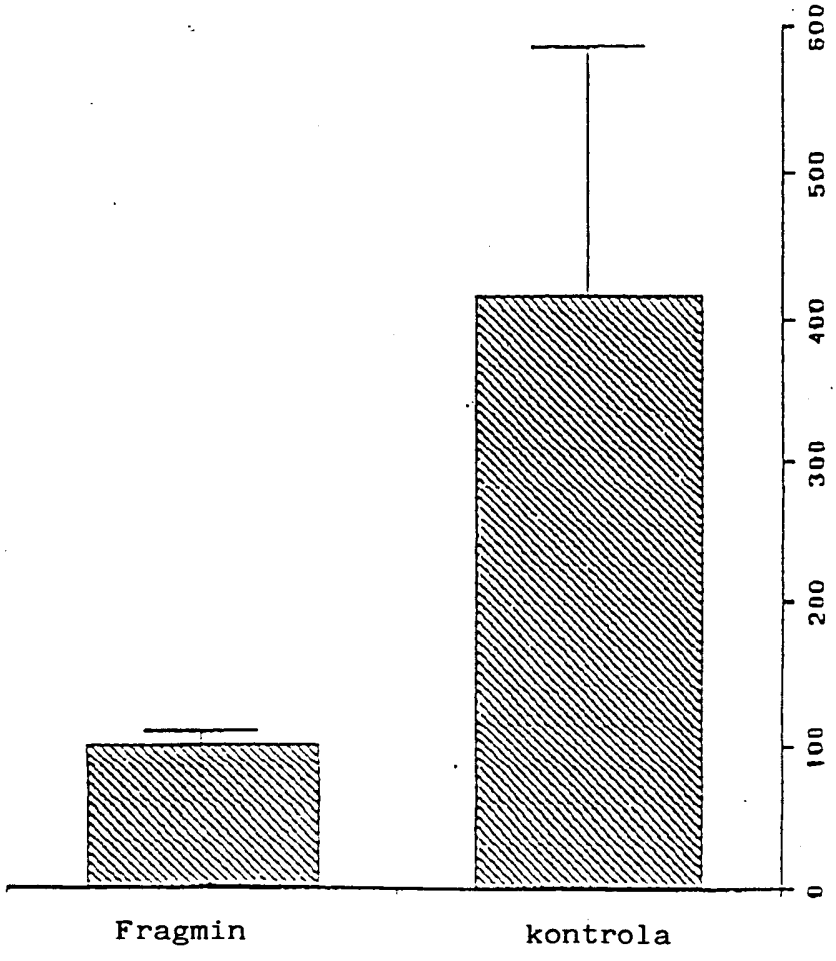


OBR. 5

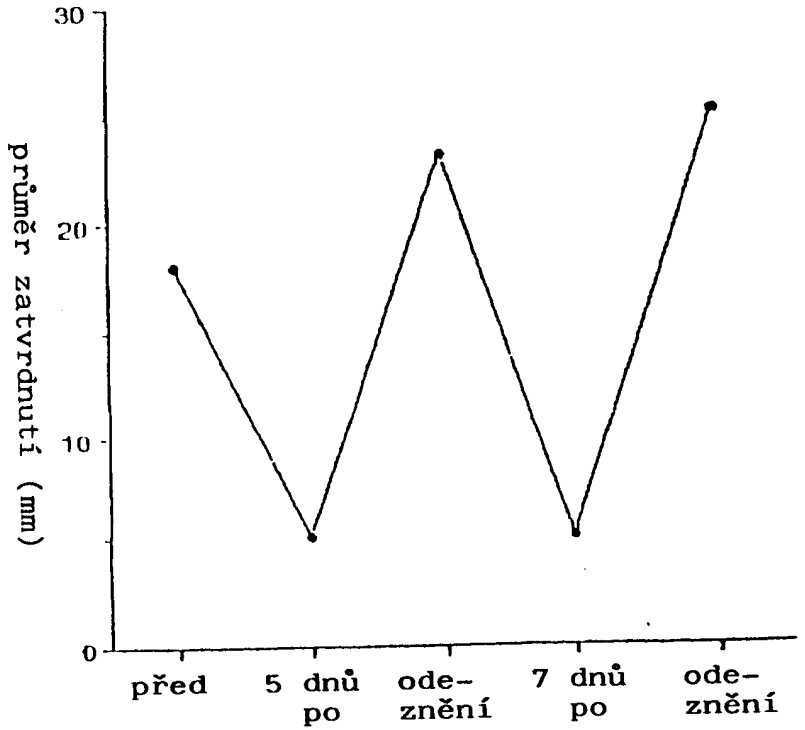


OBR. 6

PŘÍL.


glukóza v krvi (mg/dl)
0
100
200
300
400
500
600
Fragmin
kontrola

OBR. 7


30
20
10
0
průměr zatvrdnutí (mm)
před
5 dnů po odeznění
7 dnů po odeznění

OBR. 8