

FEDERÁLNY ÚRAD
PRE VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENIU

274 378

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁵
A 61 K 31/44
A 61 K 33/34

(21) PV 1609-89.S
(22) Prihlášené 15 03 89

(40) Zverejnené 12 09 90
(45) Vydané 31 07 92

(75) Autor vynálezu

MELNÍK MILAN RNDr. CSc.,
ROVENSKÝ JOZEF MUDr. CSc., BRATISLAVA,
KORČÁKOVÁ LIDKA RNDr. CSc., PRAHA,
SZABOVÁ ELENA RNDr.,
JAKUBOVSKÝ IVAN MUDr. DrSc.,
ZELJENKOVÁ DAGMAR MUDr. CSc.,
MACÁŠKOVÁ CUBOV RNDr. CSc., BRATISLAVA

(54)

Prípravok na inhibovanie rozvoja spontánnej
autoimunitnej choroby NZB/W F₁ myši

(57) Riešenie sa týka prípravku, ktorý za-
braňuje rozvoju spontánneho autoimunitného
ochorenia u NZB/W F₁ myši. Spontánna auto-
imunitná choroba NZB/W F₁ myši má svoje a-
nalogické ochorenie v ľudskej patológii,
ktoré postihuje hlavne ženskú populáciu a
nazýva sa systémový lupus erythematosus SLE.
Podstatou riešenia je, že prípravok ako
účinnú látku obsahuje 3-pyridylkarbinolový
adukt niflumátu meďnatého, zloženia
 $\text{Cu}/\text{C}_{12}\text{H}_8\text{F}_3\text{N}_2\text{COO}/_2 / \text{C}_5\text{H}_4\text{NCH}_2\text{OH}/_2$, kde
 $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{F}_3\text{N}_2\text{COO}^-$ je anión kyseliny 2-, 4, 6-
trifluoro-m-toluidino/nikotínovej podľa
vzorca a $\text{C}_5\text{H}_4\text{NCH}_2\text{OH}$ je 3-pyridylkarbinol
podľa vzorca.

Vynález sa týka prípravku, ktorý zabraňuje rozvoju spontánneho autoimunitného ochorenia u NZB/W F_1 myši.

Charakteristickým klinickým príznakom ochorenia je rýchlo sa rozvíjajúca imunokomplexová glomerulonefritída. Glomerulonefritída býva príčinou zvýšenej mortality týchto myši.

V ostatnom čase sa hľadajú látky, ktoré zabraňujú vývoju imunokomplexovej glomerulonefritídy, resp. ju potláčajú. Spontánna autoimunitná choroba NZB/W F_1 myši má svoje analogické ochorenie v ľudskej patológii, ktoré postihuje hlavne ženskú populáciu a nazýva sa systémový lupus erythematosus SLE. Väčšina liečebných prostriedkov používaných v terapii ľudského SLE sa pred zavedením liečby ukázala ako osvedčená aj v terapii myšieho SLE. Z tohoto dôvodu sa zvolil model spontánnej autoimunitnej choroby.

Rozvoj autoimunitného ochorenia u myši NZB/W F_1 je obyčajne sprevádzaný zvýšeným počtom lymfocytov s nukleolami syntetizujúcimi RNA /Korčáková L. aspôl., Immunology 30/1976/475 a 31 /1976/ 803/. Podobná situácia je aj u ľudského SLE /Korčáková L. Smetana L. a spol., Acta rheumatol. balneol. pistiniiana 10, 1981, 7-53/. Zlepšenie klinického stavu u myši aj u ľudí so SLE, najmä lupusovej glomerulonefritídy navodené liečbou je obvykle spojené s poklesom aktívnych lymfocytov v periférnej krvi - to znamená, lymfocytov s nukleolami syntetizujúcimi RNA. Z tohoto dôvodu sa vybral a previedol test lymfocytárnej aktivity podľa Smetanu a spol. /Procházková, J., John C. a spol., Vybrané diagnostické metódy lekárskej imunologie, Avicenum, 1986, s. 273/, aby sa overilo, či prípravok podľa vynálezu má schopnosť zabrániť rozvoju spontánneho autoimunitného ochorenia. Súčasne po ukončení pokusu sa u myši NZB/W F_1 sledoval aj histopatologický nález na obličkách.

Podstatou vynálezu je prípravok na inhibovanie rozvoja spontánnej autoimunitnej choroby NZB/W F_1 , kde účinnou látkou je 3-pyridylkarbinolový adukt niflumátu meďnatého, 3-pyridylkarbinolový adukt niflumátu meďnatého, zloženia: $Cu/C_{12}H_8F_3N_2COO/2/C_5H_4NCH_2OH/$, kde $C_{12}H_8F_3N_2COO^-$ je anión kyseliny niflumovej /2- (2, 4, 6-trifluoro-m-toluidino) nikotínovej kyseliny/ a $C_5H_4NCH_2OH$ je 3-pyridylkarbinol/rovník/. Na pripojenom výkrese je znázornená lymfocytárna aktivácia u samcov /stĺpca A/ a samic /stĺpca B/ u myši NZB/W F_1 bez liečby /prázdne stĺpce/ a pri liečbe prípravkom podľa vynálezu plné stĺpce.

Príklad 1

Prípravok bol pripravený reakciou niflumátu meďnatého, $Cu/C H F N COO/$ a 3-pyridylkarbinolu v metanolovom prostredí, v molárnom pomere 1 : 2 v prospech 3-pyridylkarbinolu. Vzniknutý tmavozelený produkt byl filtráciou oddelený, na filtru premývaný studeným metanolom a voľne sušený na vzduchu.

Zloženie izolovaného produktu sa určilo na základe výsledkov analýzy medi, dusíka, uhlíka a vodíka. Rozborom infračerveného spektra v Nujol suspenzii sa zistilo, že tak anióny kyseliny niflumovej ako aj 3-pyridylkarbinolu sú viazané cez svoje O resp. N donorové atómy na centrálny atóm medi. Spektrá elektrónovej paramagnetickej rezonancie, merané pri laboratórnej teplote a teplote kvapalného dusíka, sú typické pre komplexy $Cu/II/$ s hodnotou efektívneho spinu $S = 1/2$. Z hľadiska magnetického patrí tento komplex medzi magneticky zriadené meďnaté komplexy.

Vplyv testovacieho prípravku $Cu/nif_{2,2}ren/2$ na lymfocytárnu aktiváciu bol študovaný na 2-mesačných myšiach NZB/W F_1 - 9 samcoch a 6 samic. Pokusná skupina zvierat dostávala 3-krát týždenne dávku 20 mg.kg^{-1} testovanej látky per os /p.o./ spôsobom o objeme 0,2 ml, 10 g. Látka $Cu/nif_{2,2}ren/2$ bola zmiešaná so suspenziou 0,1 % hmot. metylcelulózy. Kontrolná skupina zvierat dostávala 3-krát týždenne tým istým spôsobom suspenziu 0,1 % hmot. metylcelulózy o objeme 0,2 ml/10 g. Doba aplikácie u NZB/W F_1 myši bola 4 mesiace. Zvieratá pochádzali z chovu Virologického ústavu SAV v Bratislave a boli 2 týždne pred pokusom i počas pokusu držané za štandardných podmienok. Potrava - peletované krmivo DOS-2B a voda ad libitum. 12 h pred aplikáciou testovacieho prípravku bola zvieratám odobraná potrava a znovu im bola podaná 3 h po aplikácii.

Lymfocytárna aktivácia sa sledovala nukleolárnym testom podľa Smetanu a spo. /cit. vyššie/. Na nefixované suché nátery periférnej krvi, nie staršie ako 24 h sa nakvapkal na dobu 10 minút farbiaci roztok toluidínovej modrej, rozpustenej v 10 % hmot. etanole a zriedenom 10-krát Mc Ilvainovým pufrom o pH 5,4. Preparáty boli sušené vo vertikálnej polohe bez oplachovania farbiva. Za aktívne lymfocyty sme považovali tie, ktoré mali kompaktné nukleoly s nukleonematami, svedčiace pre novotvorbu RNA. Výsledky boli štatisticky zhodnotené IKEM Mann-Whitneyovým U-testom.

Medián percenta aktívnych lymfocytov u NZB/W F₁ myši /2-mesačných/, t.j. pred začiatkom pokusu a liečbou komplexom medi, bol u samcov 5,0 /minimálnou hodnotou 4 a maximálnou 8,0/ u samic 7,0 /6,0 až 8,0/. Po 2 mesiacoch pokusu, teda u zvierat vo veku 4 mesiacov, sa medián percenta aktívnych lymfocytov u neliečených / n = 4 - samcov zvýšil z dôvodu rozvoja autoimunitnej choroby na 18,5 /13,5 až 29,0/ zatiaľ čo u liečených samcov / n = 4, doba liečby 2 mesiace/ zostal na signifikantne /P 0,01/ nižšej hodnote 7,0 /6,0 až 8,0/. Podobný rozdiel /P 0,08/ množstva aktívnych lymfocytov 19,5 /17,5 až 26,0/ oproti 8,5 /6,0 až 11,5/ bol pozorovaný u neliečených / n = 3/ a liečených / n = 3/ samic. Znížené množstvo aktívnych lymfocytov sme našli i po treťom a štvrtom mesiaci liečby, kedy u samcov bola významnosť rozdielov medzi lymfocytárnou aktiváciou u neliečených a liečených zvierat na 0,02 percentnej hladine, u samic na 0,08 percentnej hladine /obr. č. 1/

Histologické vyšetrenia s hematoxylínom a eozínom farebných rezov ukazujú u NZB/W F₁ myši, že v porovnaní s kontrolnou neliečenou skupinou dochádza v skupine zvierat, ktorým bolo podávané 20 mg.kg⁻¹ testovanej látky vyššie opísaným spôsobom ku zreteľnému zmenšeniu postihnutia zvierat glomerulonefritídou.

U neliečených zvierat sa tieto zmeny pohybujú od najťažších zmien vo forme membránovej proliferatívnej glomerulonefritídy po zmeny charakteru mezangioproliferatívnej, neraz iba fokálnej glomerulonefritídy. U liečených zvierat sú glomeruly na tejto úrovni vyšetrenia nepostihnuté, resp. majú len ľahký charakter miernej celulárnej proliferácie mezangiálnych buniek.

Stanovenie akútnej orálnej toxicity

Testovaný prípravok Cu/nif/2/ron/2, kde nif je C₁₂H₈F₃N₂COO⁻ a ron je ronikol, bol p.o. spôsobom podaný jednorázovo myšiam samcom kmeňa ICR o hmotnosti 18 až 22 g v objeme 0,2 ml/10 g. Prípravok bol zmiešaný so suspenziou 0,1 % hmot. metylcelulózy a podávaný v dávkach 300, 400, 600, 800, 900 a 1000 mg.kg⁻¹. /Prípravok nie je dobre rozpustný vo vode a preto sa aplikoval vo forme suspenzie. Dobré sa rozpúšťa v etanole alebo DMSO-dimetylsulfoxid./ V každej skupine /podľa uvedených dávok/ bolo testovaných 10 zvierat. Skúška toxicity sa robila podľa Československého liekopisu 4. Kontrolnej skupine zvierat bola podaná suspenzia 0,1 % hmot. metylcelulózy v objeme 0,2 ml/10 g p.o. spôsobom. Laboratórne zvieratá pochádzali z SPF chovu n.p. Velaz Praha a boli 2 týždne pred pokusom i počas pokusu chované za štandardných podmienok. Zvieratá boli kŕmené peletovanou diétou DOS-2B, potrava a voda ad libitum. 12 h pred aplikovaním testovaného prípravku bola zvieratám odobraná potrava a znovu im bola podaná 3 h po aplikácii. Hodnota strednej smrteľnej dávky LD₅₀ = 540 mg.kg⁻¹ /446 až 653/ sa vypočítala podľa Rozha /Cs. fyziologie 10, 1961, 108/. U zvierat, ktoré preživali neboli zaznamenané výrazné zmeny správania sa ani úbytok hmotnosti

Testovanie mutagenity in vivo v bunkách kostnej drene hlodavcov

Testovaný prípravok Cu/nif/2/ron/2 sa aplikoval per os spôsobom 8-týždňovým samcom a samicám myši kmeňa ICR o hmotnosti 25 až 30 g jednorázovo o objeme 0,2 ml/10 g. Pri stanovení dávok sa vychádzalo z predpokladanej terapeutickkej dávky /5 až 20 mg.kg⁻¹/ testovaného prípravku a strednej smrteľnej dávky LD₅₀, vyššie uvedenej. Testovací prípravok sa aplikoval v dávkach 20, 100, 300 a 600 mg.kg⁻¹. V každej skupine /podľa uvedených dávok/ bolo testovaných 10 zvierat, 5 samcov a 5 samiciek. Kontrolnej skupine zvierat

bola podaná per os suspenzie 0,1 % hmot. metylcelulózy o objeme 0,2 ml/10 g.

Ako pozitívna kontrola sa použila skupina 5 myších samcov, ktorým sa aplikoval intra-peritoneálne cyclophosphamid /látka, ktorá vyvoláva chromozómové aberácie v tomto teste in vivo/ v dávke 40 mg.kg^{-1} a objeme 0,1 ml/10 g. Preparáty kostnej drene boli spracované podľa modifikovanej metódy Tjio a Whanga /J.H.Tjio a J.H.Whang, Stain. Technol. 37 /1962/ 17/ 24 h po aplikovaní testovacieho preparátu $\text{Cu/nif/}_2/\text{ron/}_2$. Zvieratám 2 h pred spracovaním bol intraperitoneálne podaný kolchicín na zastavenie mitózy - bunčného delenia v dávke $2,5 \text{ mg.kg}^{-1}$, o objeme 0,1 ml/10 g. Hodnotilo sa 50 mitóz s dobre rozloženými chromozómami a do hodnotenia sa započítali i bunky s gepami. Výsledky sa spracovali štatistickou metódou chí-kvadrát /L. Sachs, Angewandte Statistik, J. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1978/. Chromozómové aberácie sa pozorovali a odčítavali na mikroskope NU 2 /NDR/ pri 1 250 násobnom zväčšení.

Počas dlhodobej aplikácie /10 týždňov/ bol testovaný prípravok podávaný pokusným zvieratám per os spôsobom v dávke 100 mg.kg^{-1} o objeme 0,2 ml/10 g a to 3-krát v týždni. Kontrolnej skupine zvierat v tých istých intervaloch po dobu 10 týždňov bola aplikovaná suspenzia 0,1 % hmot. metylcelulózy o objeme 0,2 ml/10 g. Pokusné zvieratá boli z SPF chovu n.p. Velaz Praha, kmeňa ICR a hmotnosti 20 g na začiatku pokusu. V každej testovacej a kontrolnej skupine bolo 10 zvierat, 5 samcov a 5 samičiek. Počas pokusu boli zvieratá chované za štandardných podmienok, potrava a voda ad libitum.

Pred odberom kostnej drene boli zvieratá 12 h odstatené od potravy a zaznamenávané ich hmotnosť. Po skončení pokusu sa urobila patologicko-anatomická pitva a boli odobrané orgány - pľuca, pečeň, slezina, obličky, srdce, kostrový sval, žaludok, predžalúdok a tenké a hrubé črevo na histologické vyšetrenie.

Mikroskopické vyšetrenie jednotlivých orgánov experimentálnych zvierat sa robilo po fixácii 4 % hmot. formalínom z parafínových bločkov, farbených hematoxylínom a eozínom.

Výsledky:

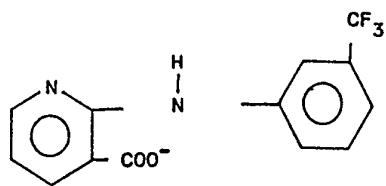
Jednorázové podanie ani dlhodobá aplikácia testovacieho prípravku neovplyvnila štatisticky významne výskyt chromozómových aberácií oproti kontrolnej skupine. V oboch prípadoch sa pozoroval výskyt chromatidových zlomov a gepov v norme. Iný druh chromozómových aberácií nebol pozorovaný.

Mikroskopické vyšetrenie jednotlivých orgánov neukázalo závažnejšie patomorfologické zmeny. V najvyššej dávkovej skupine bola kôra nadobličiek tvorená bunkami s opticky značne prejasnenou cytoplazmou v porovnaní s nižšími dávkovými skupinami. Vo všetkých vyšetrovaných skupinách dochádzalo k výraznej hyperémii na hranici kôry a drene nadobličiek, miestami prechádzajúce do krvácaní mikroskopických rozmerov. Z ostatných nálezov sa v minimálnej miere vyskytovali v pľúcach, pečeni a obličkách v intersticiu mononukleárne infiltráty mikroskopických rozmerov, čo je v našich chovoch laboratórnych zvierat vcelku bežný jav. Nepozorovala sa žiadna dávková závislosť ich výskytu. Podobne tomu bolo s výskytom monocelulárnych nekróz hepatocytov v pečeni, s odlupovaním epitelovej výstelky kanálikov kôry obličiek s eozinofilnými homogénnymi svalovými vláknami v myokarde a kostrovom svali. Pri hodnotení vzoriek sleziny sa nezistili žiadne kvalitatívne zmeny.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

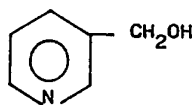
Prípravok na inhibovanie rozvoja spontánnej autoimunitnej choroby NZB/W F_1 myši vyznačujúci sa tým, že ako účinnú látku obsahuje 3-pyridylkarbinolový adukt niflumátu meďnatého, zloženia $\text{Cu/C}_{12}\text{H}_8\text{F}_3\text{N}_2\text{COO/}_2/\text{C}_5\text{H}_4\text{NCH}_2\text{OH/}_2$, kde $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{F}_3\text{N}_2\text{COO}^-$ je anión kyseliny

2-/L, L, L-trifluoro-m-toluidino/ nikotinovej vzorca /I/



/I/

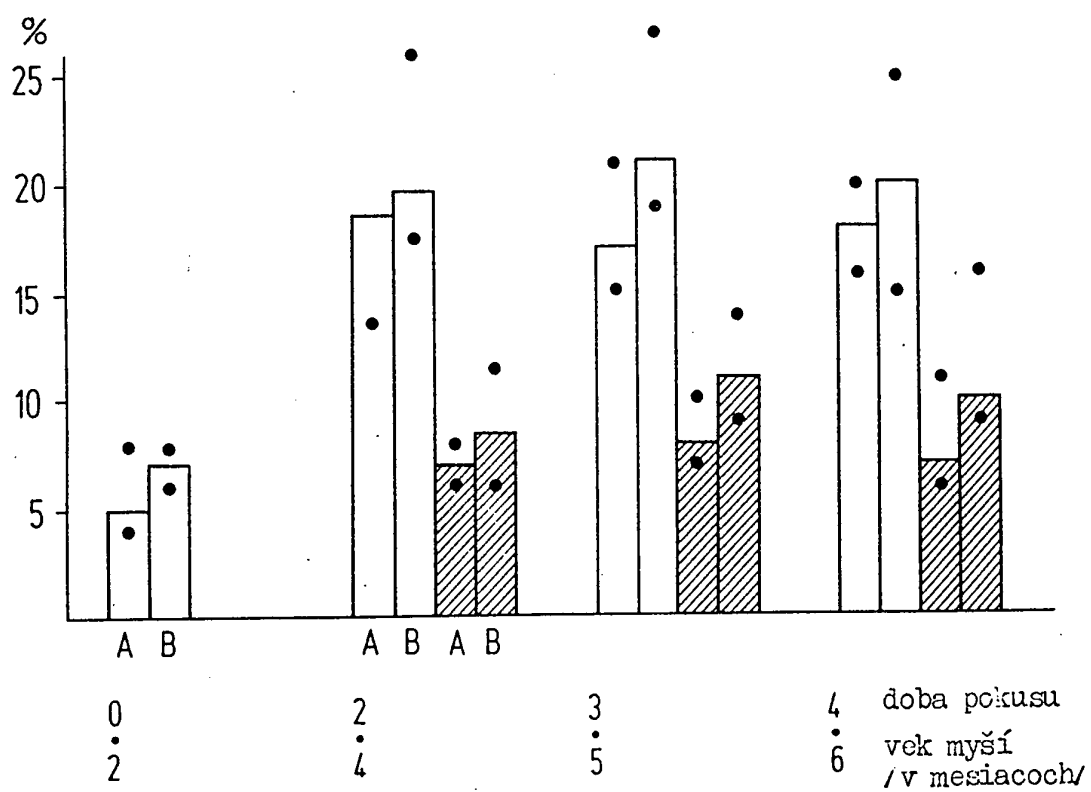
a C₅H₄NCH₂OH je 3-pyridylkarbinol podľa vzorca /II/



/II/

1 výkres

aktívne lymfocyty



Obr. 1