

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **24.05.2002**
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **29.05.2001**
(31) Číslo prioritní přihlášky: **2001RM/000293**
(33) Země priority: **IT**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu:
(Věstník č: 6/2004)
(86) PCT číslo: **PCT/IT2002/000336**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2002/096409**

(21) Číslo dokumentu:

2003-3220

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁷ :
A 61 K 31/221
A 61 P 25/02
A 61 P 25/04
A 61 P 25/06

(71) Přihlašovatel:
SIGMA-TAU INDUSTRIE FARMACEUTICHE
RIUNITE S. P. A., Rome, IT

(72) Původce:
Calvani Menotti, Pomezia, IT
Mosconi Luigi, Pomezia, IT

(74) Zástupce:
Vandělková Jana Ing., Hradební 3, Praha, 11000

(54) Název přihlášky vynálezu:
Použití acetyl L-karnitinu k přípravě léčiva pro
preventivní léčbu bolesti

(57) Anotace:
Použití acetyl-L-karnitinu nebo jeho farmaceuticky přijatelné
sole k přípravě léčiva pro preventivní léčbu bolesti.

CZ 2003 - 3220 A3

Použití acetyl-L-karnitinu k přípravě léčiva pro preventivní léčbu bolesti

Oblast techniky

Předložený vynález se týká použití acetyl-L-karnitinu k přípravě léčiva majících analgetické účinky.

Dosavadní stav techniky

Analgezií se míní stav, kdy stimul bolesti v těle není vnímán jako bolest.

Analgetikum je léčivo schopné vytvářet analgezii, tj. zmizení bolesti, interferencí s vjemem vnímaným jako nociceptivní stimul bolesti (vedoucí bolestivé podněty) bez vyvolání anestezie nebo ztráty vědomí.

Podávání přípravku před tím, než bolest nastoupí se nazývá preventivní terapie bolesti nebo preemptivní analgezie (blokování vstupu bolesti).

Preemptivní analgezií je míněna terapeutická strategie zahrnující předběžné podávání látky před událostí způsobující bolest, schopnou blokovat stimul bolesti ještě před tím, než zasáhne centrální nervový systém, a tak v klidu předcházet odezvě pocházející z nociceptivního vstupu do míchy.

Stojí za zmínku, že účinnost preemptivního analgetického léčiva závisí nejen na době, jak dlouho je před bolestivou událostí podáváno,

ale i na skutečné mohutnosti léčiva bránícího vzniku změn v mechanismu citlivostního centra odpovědného za bolest.

Tato představa tedy objasňuje to, že účinnost látky závisí na tom, že je podávána před nástupem nociceptivního stimulu.

Preemptivní analgetická vlastnost L-karnitinu není známa, zatímco antalgické působení na periferní neuropatii různé etiologie již studovány byly. Tyto předpokládané antalgické účinky byly přisuzovány neuropatickému působení látky, tj. její schopnosti chránit periferní nervy a/nebo stimulovat jejich regeneraci.

Takovéto použití acetyl-L-karnitinu je popsáno v Clin. Drug Invest., 10, (6), 317 – 322, 1995. Ve stejné studii je také zmiňován antalgický účinek látky, avšak výsledky nejsou ze statistického hlediska významné. Takovéto použití acetyl-L-karnitinu se tedy liší od použití navrhovaného v předloženém vynálezu, protože předchozí údaje nezjistily jakýkoliv analgetický účinek jmenované látky.

Působení acetyl-L-karnitinu na bolest u pacientů s periferní neuropatií je popsán v Int. J. Clin. Pharm. Res., XV, (1), 9 – 15, 1995, kde již jsou uvedeny statisticky významné výsledky.

Tato studie se také liší od předloženého vynálezu, protože se týká neuropatické bolesti a intervenčního terapeutického přístupu, spíše než preempce (blokování vstupu bolesti) nebo prevence (než bolest nastane), jak to je popisováno ve vynálezu.

V Exp. Gerontol., 29, (5), 569 – 574, 1994 je popisováno použití acetyl-L-karnitinu na krysách vystavených zátěži studenou vodou, ke studiu mechanismu přenášeného hypothalamus-hypofýza-adrenální osou při analgezii, takovou zátěží vyvolanou.

Porovnáváním mladých a starých krys, popisuje tato práce schopnost acetyl-L-karnitinu udržovat účinnou odezvu na zátěž u starých krys pomocí mechanismu vázaného na zpomalování ztráty glukokortikoidových receptorů umístěných v hypokampu v závislosti na stáří, podporujíc tak pozitivně stárnutí buněčných struktur co se týká trvání a funkce.

Výše uvedené práce popisují antalgické a kapacitní zpomalování procesu stárnutí působením acetyl-L-karnitinu, avšak žádná z nich nepopisuje nebo nenavrhuje použití acetyl-L-karnitinu jako analgetické látky, a zvláště jako preemptivního analgetika.

Léčiva k preventivní léčbě bolesti již jsou známa.

Indomethacin je účinný jak k prevenci, tak zmenšení postchirurgické bolesti u pacientů podstupujících chirurgické zásahy. Vedlejší účinky této sloučeniny jsou: lokální nebo četné hnisání horního gastrointestinálního traktu a frontální bolest hlavy (Goodman a Gilman's: The pharmacological basis of therapeutics. Hardman, J. G., Limbird, L. E.; Molinoff, P. B., Ruddon, R. W., editors: McGraw-Hill, 1997).

Klonidin a ketamin, což jsou sloučeniny používané jako preemptivní analgetika, dávají vznik nežádoucím účinkům, jako je například utišení bolesti, anestezie a imobilita (Goodman a Gilman's: The pharmacological basis of therapeutics. Hardman, J. G., Limbird, L. E.; Molinoff, P. B., Ruddon, R. W., editors: McGraw-Hill, 1997).

V oblasti medicíny existuje velká poptávka po léčivech vybavených analgetickými účinky, které mohou být vhodné k preventivní léčbě bolesti a nemající nevýhody výše zmiňovaných léčiv.

Podstata vynálezu

Nyní bylo zjištěno, že acetyl-L-karnitin má analgetické účinky, a lze ho použít jako látky vhodné k preventivní terapii bolesti.

Sloučenina podle předloženého vynálezu může být použita jako preemptivní analgetická medikace, například k preventivní terapii bolesti po chirurgických zákrocích.

Předmětem předloženého vynálezu je tedy použití acetyl-L-karnitinu nebo jeho farmaceuticky přijatelné sole k přípravě léčiva majícího analgetické účinky.

Dalším předmětem předloženého vynálezu je použití acetyl-L-karnitinu nebo jeho farmaceuticky přijatelné sole k přípravě léčiva k preventivní léčbě bolesti.

Dalším předmětem předloženého vynálezu je použití acetyl-L-karnitinu nebo jeho farmaceuticky přijatelné sole k přípravě léčiva s vysoce preemptivním analgetickým působením.

Ještě dalším předmětem předloženého vynálezu je použití acetyl-L-karnitinu nebo jeho farmaceuticky přijatelné sole k přípravě léčiva k preventivní léčbě bolesti po chirurgickém zákroku.

Farmaceuticky přijatelnou solí acetyl-L-karnitinu je míněna jakákoliv sůl s takovou kyselinou, která nedává vznik nežádoucím toxickým účinkům. Tyto kyseliny jsou farmakologům a odborníkům ve farmacii dobře známy.

Takovými nijak vynález neomezujícími příklady jsou: chlorid, bromid, orotan, kyselý aspartan, kyselý citran, citran hořečnatý, kyselý fosforečnan, fumaran a kyselý fumaran, fumaran hořečnatý, mléčnan, maleinan a kyselý maleinan, slizan, kyselý šťavelan, pamoan, kyselý pamoan, kyselý síran, glukofosfát, vínan, kyselý vínan, vínan hořečnatý, 2-aminoethansulfonan, 2-aminoethansulfonan hořečnatý, vínan cholinu a trichloracetát.

Následující příklady vynález objasní.

Příklady provedení

Příklad 1

Antinociceptivní profil acetyl-L-karnitinu byl zkoumán na myších prováděním jak tradičních zkoušek na analgezii, tak zkouškou na teplé desce (teplotní stimul) a zkouškou abdominální konstriktce (chemický stimul) a některými pokusnými modely hyperalgezie vyvolanými:

- intraperitoneálním podáváním (IP) 0,3 % a 0,6 % roztoku kyseliny octové;
- abstinenčním syndromem na morfium;
- podáváním kyseliny kainové (20 mg.kg^{-1} , IP)
- podáváním N-methyl-D-aspartátu ($1,64 \mu\text{g}$ jedné myši intratekálně).

Prvním pokusem byla zkouška na teplé desce.

Použity byly myši Swiss Webster vážící mezi 22 a 30 g.

Zkouška byla provedena podle publikace O'Callaghana a Holzmana z J. Pharmacol. Exp. Ther., 197, 533 – 537, 1976.

Podle této zkoušky se nerezový zásobník o teplotě $52,5^\circ\text{C}$ se umístí do vodní lázně.

Myš se z teplé desky sejme ihned při první známce bolestivého stimulu. Maximální latentní doba zaznamenaná na teplé desce byla 45 sekund.

Hodnoty analgezie byly stanoveny v 15 minutových odstupech.

Údaje v tabulce 1(A) ukazují, že akutní subkutání podávání (SC) acetyl-L-karnitinu v dávce 100 mg.kg^{-1} nevyvolává žádný ochranný účinek.

Tabulka 1(A)

Akutní SC podávání

Teplá deska				
Latentní doba (sec)				
	před zkouškou	po zkoušce		
		15 min.	30 min.	45 min.
fysiologický roztok (FR)	13,6±1,2 (20)	14,7±1,5 (20)	13,1±1,8 (20)	14,5±1,6 (20)
acetyl-L-karnitin 100 mg.kg ⁻¹	13,9±0,7 (30)	17,3±1,7 (30)	16,8±1,2 (30)	15,2±1,7 (30)

Údaje jsou střední hodnotou ± standardní odchylka.

V závorkách je uveden počet zvířat.

Hodnoty v tabulce 1(B), odkazující na zvířata, která dostávala acetyl-L-karnitin v dávce 100 mg.kg⁻¹ dvakrát denně (BID) SC po dobu 7 dní vykazují statisticky významné antinociceptivní účinky.

Tabulka 1(B)

Sedmidenní subchronické podávání (SC)

Teplá deska				
Latentní doba (sec)				
	před zkouškou	po zkoušce		
		15 min.	30 min.	45 min.
fysiologický roztok	16,4±1,6 (20)	17,5±1,5 (20)	15,3±1,9 (20)	14,9±2,1 (20)
acetyl-L-karnitin 100 mg.kg ⁻¹ BID	21,8±1,1 [^] (41)	22,1±1,8 [^] (41)	22,5±1,9 [^] (41)	22,2±1,7 [^] (41)

Údaje jsou střední hodnotou ± standardní odchylka.

V závorkách je uveden počet zvířat.

[^]p<0,05 porovnání se skupinou, která obdržela FR.

Pokud byl acetyl-L-karnitin podáván po dobu 14 dní, neovlivnilo to intenzitu antinociceptivního účinku, který byl stejný jako po 7 dnech, avšak zkouška zklamala jako statisticky nevýznamná, protože stres

způsobený opakovaným podáváním (dvě injekce denně po dobu 14 dní) vyvolaly vzrůst prahu tolerance u kontrolních krys v několika sekundách. Tabulka 1 (C).

Tabulka 1(C)

14 denní subchronické podávání (SC)

Teplá deska				
Latentní doba (sec)				
	před zkouškou	po zkoušce		
		15 min.	30 min.	45 min.
fysiologický roztok	18,7±1,7 (7)	19,1±2,2 (7)	17,9±2,4 (7)	18,0±2,0 (7)
acetyl-L-karnitin 100 mg.kg ⁻¹ BID	22,4±1,4 (27)	22,1±2,7 (27)	22,5±2,1 (27)	23,4±2,9 (27)

Údaje jsou střední hodnotou ± standardní odchylka.

V závorkách je uveden počet zvířat.

Antinoniceptivní účinky acetyl-L-karnitinu přetrvávaly i 7 dní po poslední 14 denní sérii injekcí v dávce 100 mg.kg⁻¹ BID, SC, Tabulka 1(D).

Tabulka 1(D)

7 dní po ukončení 14 denního působení

Teplá deska				
Latentní doba (sec)				
	před zkouškou	po zkoušce		
		15 min.	30 min.	45 min.
fysiologický roztok	14,0±1,2 (7)	15,1±2,0 (7)	13,8±2,5 (7)	13,0±2,1 (7)
acetyl-L-karnitin 100 mg.kg ⁻¹ BID	19,2±1,6 [^] (12)	21,1±1,9 [^] (12)	18,5±1,8 (12)	19,0±2,3 (12)

Údaje jsou střední hodnotou ± standardní odchylka.

V závorkách je uveden počet zvířat.

[^]p<0,05 porovnání se skupinou, která obdržela FR.

V tomto případě se práh bolesti kontrolních zvířat vrátil na počáteční hodnotu a ukázalo se tedy, že zvýšení latentní doby je opět statisticky významné.

Při stejné zkoušce neovlivnil acetyl-L-karnitin práh bolesti po 1 až 8 hodinách od podání jednotlivé dávky 100 mg.kg^{-1} SC, tabulka 2.

Tabulka 2

Působení SC

Teplá deska							
Latentní doba (sec)							
	před zkouškou	po zkoušce					
		1 h	2 h	3 h	4 h	6 h	8 h
fysiologický roztok	$14,1 \pm 1,0$ (8)	$14,9 \pm 1,7$ (8)	$13,7 \pm 1,9$ (8)	$13,8 \pm 1,4$ (8)	$14,0 \pm 1,6$ (8)	$13,3 \pm 1,5$ (8)	$14,6 \pm 2,1$ (8)
acetyl-L-karnitin 100 mg.kg^{-1}	$14,5 \pm 0,9$ (12)	$15,8 \pm 2,2$ (12)	$14,7 \pm 1,5$ (12)	$15,6 \pm 1,9$ (12)	$14,1 \pm 2,0$ (12)	$15,2 \pm 1,9$ (12)	$14,9 \pm 1,6$ (12)

Údaje jsou střední hodnotou $\pm$ standardní odchylka.

V závorkách je uveden počet zvířat.

Acetyl-L-karnitin v dávce 30 mg.kg^{-1} SC neměl během zkoušky na teplé desce na myši žádný analgetický účinek ani po akutním podání (tabulka 3(A)), ani po podávání 30 mg.kg^{-1} BID SC po dobu 7 dní (tabulka 3(B)).

Tabulka 3(A)

SC akutní podávání

Teplá deska				
Latentní doba (sec)				
	před zkouškou	po zkoušce		
		15 min.	30 min.	45 min.
fysiologický roztok	13,4±1,1 (10)	14,3±1,3 (10)	14,1±1,7 (10)	15,1±1,9 (10)
acetyl-L-karnitin 30 mg.kg ⁻¹	14,2±0,9 (15)	15,8±1,8 (15)	16,5±2,0 (15)	15,0±2,1 (15)

Údaje jsou střední hodnotou ± standardní odchylka.

V závorkách je uveden počet zvířat.

Tabulka 3(B)

Subchronické podávání po dobu 7 dní (SC)

Teplá deska				
Latentní doba (sec)				
	před zkouškou	po zkoušce		
		15 min.	30 min.	45 min.
fysiologický roztok	17,1±1,2 (10)	17,5±1,9 (10)	16,6±1,8 (10)	15,9±2,1 (10)
acetyl-L-karnitin 30 mg.kg ⁻¹ BID	15,8±1,3 (16)	16,3±2,1 (16)	17,3±1,9 (16)	15,2±1,5 (16)

Údaje jsou střední hodnotou ± standardní odchylka.

V závorkách je uveden počet zvířat.

Příklad 2

Druhým pokusem byla zkouška abdominální konstriktce.

Byly použity myši Swiss Webster o hmotnosti mezi 22 g a 30 g.

Zkouška abdominální konstriktce byla provedena podle Koster, et al., Fed. Proc., 18, 412, 1959.

Podle této zkoušky byl 5 minut před započítáním pozorování IP nastříknut roztok 0,6 % kyseliny octové; pozorování trvalo 10 minut. U některých pokusů byla koncentrace kyseliny octové snížena na polovinu (0,3 %).

Když byla zkouška abdominální konstriktce prováděna za použití 0,6 % roztoku kyseliny octové, trvalo to 14 dní před touto zkouškou, než byl acetyl-L-karnitinem (100 mg.kg^{-1} BID, SC a IP) vyvoláván antinociceptivní účinek, zatímco jak akutní podání (SC nebo IP), tak podávání opakované po dobu 7 dní vždy se stejnou dávkou nemělo vcelku žádný účinek (obrázek 1).

K získání analgezie v tomto zvláštním případě zkoušky týkající se intenzivní abdominální bolesti bylo tudíž nutné 14 denní podávání.

Pokud byly abdominální kontrakce vyvolány 0,3 % kyselinou octovou, bylo dosaženo statisticky významných hodnot u acetyl-L-karnitinu (100 mg.kg^{-1} BID, IP nebo SC) po 7 denním působení (obrázek 2).

Podobně jako u výsledků pozorovaných u zkoušky s teplou deskou, nemá acetyl-L-karnitin v dávce 30 mg.kg^{-1} IP (nebo SC) v přítomnosti 0,6 % kyseliny octové žádný účinek ani po 18 denním působení (obrázek 3). Naproti tomu, co se dělo u zkoušky s teplou deskou, statisticky významných výsledků bylo dosaženo po 14 dnech v přítomnosti malé koncentrace kyseliny (obrázek 4).

Jak u zkoušky s teplou deskou (tabulka 4(A)), tak u zkoušky abdominální konstriktce (0,3 a 0,6 %) (tabulka 4(B)) a (C), nebylo pozorováno žádné zvýšení prahu bolesti u těch myší, které dostávaly po dobu 7 a 14 dní roztok acetyl-L-karnitinu (3 mg.l^{-1}) rozpuštěný v lahvi.

Tabulka 4(A)

7 až 14 denní subchronické podávání

Teplá deska			
Latentní doba (sec)			
	před zkouškou	po zkoušce	
		7 dní	14 dní
fyziologický roztok	$14,4 \pm 1,0$ (15)	$16,6 \pm 1,9$ (15)	$17,2 \pm 2,2$ (15)
acetyl-L-karnitin 3 mg.ml^{-1} v pitné vodě	$13,8 \pm 0,8$ (15)	$17,8 \pm 2,3$ (15)	$18,8 \pm 2,5$ (15)

Údaje jsou střední hodnotou $\pm$ standardní odchylka.

V závorkách je uveden počet zvířat.

Tabulka 4(B)

Počet konstriktí (0,6 % kyselina octová)		
subchronické podávání		
	7 dní	14 dní
fyziologický roztok	$33,1 \pm 3,6$ (10)	$25,8 \pm 4,8$ (10)
acetyl-L-karnitin 3 mg.ml^{-1} v pitné vodě	$31,5 \pm 4,0$ (6)	$28,3 \pm 5,1$ (6)

Údaje jsou střední hodnotou $\pm$ standardní odchylka.

V závorkách je uveden počet zvířat.

Tabulka 4(C)

Počet konstrikcí (0,3 % kyselina octová) subchronické podávání		
	7 dní	14 dní
fyziologický roztok	14,5±2,6 (10)	12,7±3,4 (10)
acetyl-L-karnitin 3 mg.ml ⁻¹ v pitné vodě	12,7±3,5 (6)	11,9±2,2 (6)

Údaje jsou střední hodnotou ± standardní odchylka.

V závorkách je uveden počet zvířat.

V tomto případě musí být bráno v úvahu, že množství roztoku vypitého zkoumanou myší byla přibližně polovina normálního množství pitné vody vypité myší o stejné hmotnosti.

Příklad 3

Analgesie vyvolaná acetyl-L-karnitinem (100 mg.kg⁻¹ BID, SC po dobu 7 dní) byla stanovena v přítomnosti antagonistů některých neurotransmisních systémů silně zasahujících do regulace prahu bolesti a to zvláště naloxonu (antagonista opioidu), CGP-35348 (antagonista GABA_B) a alfa-methyl-p-tyrosinu (inhibitor syntézy katecholaminů).

Tyto sloučeniny nebyly schopné antagonizovat analgezii vyvolanou acetyl-L-karnitinem (tabulka 5).

V souhlase se standardním postupem známým osobám zkušeným v oboru, byly použité dávky pro kteréhokoliv antagonistu dávkami minimálně požadovanými k zamezení analgezie vyvolané morfinem (7

mg.kg⁻¹ SC) (1, 100 a 200 mg.kg⁻¹ IP), baklofenem (4 mg.kg⁻¹ SC) a amfetaminem (1 mg.kg⁻¹ SC) (nezveřejněné hodnoty).

Podle těchto pokusů bylo možno vyloučit, že opioidový, GABAergický a katecholaminergický/serotonergický systém se týkal analgezie vyvolané odpovídající sloučeninou.

Naproti tomu bylo zjištěno, že působení takovými sloučeninami majícími anticholinergické účinky, jako je atropin (neselektivní antagonist muskarinu), S-(-)-ET-126 (0,1 µg na jednu myš ICV) (M₁ selektivní antagonist), pirenzepin (0,1 µg na jednu myš ICV) (M₁ selektivní antagonist) a hemicholinium-3 (HC-3) (1 µg na jednu myš ICV) (depletor acetylcholinu blokováním reabsorbce cholinu) je schopno antagonizovat vzrůst prahu bolesti vyvolané acetyl-L-karnitinem (tabulka 5).

Tabulka 5

Teplá deska					
Latentní doba (sec)					
		před působením	po působení	po působení	po působení
předběžné působení	působení		15 min.	30 min.	45 min.
fyziologický roztok 10 ml.kg ⁻¹	fyziologický roztok (FR)	15,6±0,9	14,7±1,5	14,9±0,8	14,8±0,8
fyziologický roztok 10 ml.kg ⁻¹	acetyl-L-karnitin	21,8±1,1*	22,6±1,3*	22,5±1,3*	22,9±1,6^
naloxon 1 mg.kg ⁻¹	FR	14,0±0,7	13,3±1,3	13,1±1,1	14,2±1,3
naloxon 1 mg.kg ⁻¹	acetyl-L-karnitin	22,6±0,6*	22,3±1,9*	22,1±2,0*	20,6±1,2^
CGP 35348 100 mg.kg ⁻¹	FR	14,4±0,8	12,4±1,0	12,6±1,3	12,2±1,6
CGP 35348 100 mg.kg ⁻¹	acetyl-L-karnitin	22,1±0,7*	21,1±1,2^	21,0±2,1^	20,3±1,9^
alfa-M-p-T 200 mg.kg ⁻¹	FR	14,6±0,9	15,4±1,6	16,1±1,8	13,6±1,5
alfa-M-p-T 200 mg.kg ⁻¹	acetyl-L-karnitin	22,0±1,3*	22,5±2,0*	21,5±1,7*	21,6±1,5^
atropin 5 mg.kg ⁻¹	FR	14,1±0,9	13,7±1,1	15,4±1,2	13,1±1,9
atropin 5 mg.kg ⁻¹	acetyl-L-karnitin	21,2±1,0^	11,4±1,7°	12,6±1,9°	12,8±1,3°
HC-3 1 µg ICV	FR	14,1±0,9	13,7±1,1	15,4±1,2	13,1±1,9
HC-3 1 µg ICV	acetyl-L-karnitin	22,0±1,1^	14,6±1,3°	14,0±1,8°	15,5±1,9°
pirenzepin 0,1 µg ICV	FR	13,6±0,8	13,9±1,5	14,5±1,8	15,5±1,5
pirenzepin 0,1 µg ICV	acetyl-L-karnitin	21,6±1,3^	16,5±1,8°	14,3±2,0°	17,1±1,6°
S-(-)-ET-126 0,1 µg ICV	FR	15,0±1,0	15,3±1,8	16,2±1,9	16,1±2,0
S-(-)-ET-126 0,1 µg ICV	acetyl-L-karnitin	22,9±1,3^	15,8±2,2°	16,9±2,3°	15,8±1,8°

acetyl-L-karnitin: 100 mg.kg⁻¹ BID, SC po dobu 7 dní

Údaje jsou střední hodnotou ± standardní odchylka nejméně pro 12 zvířat.

^p<0,05; * p<0,01 porovnání se skupinou, která obdržela FR.

° p<0,01 porovnání se skupinou, která obdržela acetyl-L-karnitin.

Pozorování, že analgezie vyvolaná acetyl-L-karnitinem je zprostředkována subtypem muskarinového receptoru M_1 , je potvrzena aplikací nonsensové (antisense) strategie.

Bylo zjištěno, že podávání oligonukleotidů proti kódování genů pro M_1 (aODN-anti M_1) receptor v dávce 3 nanomoly v každé jednotlivé intracerebroventrikulární injekci (ICV) je schopno zabránit vzniku antinocicepce vyvolané opakovaným podáváním acetyl-L-karnitinu (100 mg.kg^{-1} BID, SC po dobu 7 dní) (tabulka 6).

Idea provedení této řady pokusů s aODN v přítomnosti acetyl-L-karnitinu pochází od Ghelardiniho, et al. (Br. J. Pharmacol., 128, 1633 – 1640, 2000), který prokázal, že jak analgezii vyvolané fysostigminem, tak analgezii vyvolané přímými cholinomimetiky, se zcela zamezí předcházejícím podáním aODN-anti- M_1 v dávce 3 nanomoly v každé jednotlivé dávce ICV injekce.

Za stejných pokusných podmínek bylo zjištěno, že předběžné podávání vehikulu aODN (DOTAP) zvířatům, zrovna tak jako nonsensního oligonukleotidu (dODN) (směs $3 \cdot 10^{14}$ různých oligonukleotidů, přítomných v místě působení v koncentraci nižší než 10^{-18} M), nemá žádný účinek na analgezii vyvolanou acetyl-L-karnitinem (tabulka 6).

Z hodnot týkajících se antagonismu vyvolanému hemicholiniem-3 je možno dedukovat, že acetyl-L-karnitin nepůsobí jako přímý

muskarinový antagonist, ale zlepšuje funkčnost cholinergického systému.

Tabulka 6

Teplá deska					
Latentní doba (sec)					
		před působením	po působení	po působení	po působení
předběžné působení (jednotlivá ICV injekce)	působení		15 min.	30 min.	45 min.
aODN 3 nmol	fyziologický roztok	14,3±1,2	15,5±2,3	15,4±1,6	16,0±2,2
aODN 3 nmol	acetyl-L-karnitin	13,5±0,8*	16,6±1,9*	15,8±1,8*	15,8±1,5*
dODN 3 mmol	fyziologický roztok	13,3±1,4	12,9±2,4	14,1±2,5	15,3±2,1
dODN 3 mmol	acetyl-L-karnitin	23,6±1,1	22,6±2,3	21,9±1,5	22,3±1,7

acetyl-L-karnitin: 100 mg.kg⁻¹ BID, SC po dobu 7 dní

aODN byl injikován cestou ICV v 1., 4. a 7. dni;

Nociceptivní odezva byla zaznamenávána 24 hodin po poslední injekci acetyl-L-karnitinu.

Údaje jsou střední hodnotou ± standardní odchylka nejméně pro 10 zvířat.

* p<0,01 porovnáno se skupinou, na kterou se působilo dODN + acetyl-L-karnitinem.

Příklad 4

Následující zkoušky byly provedeny pro stanovení účinků, které může mít acetyl-L-karnitin na nervový systém: zkouška na otáčející se plošině (rota-rod test), zkouška s děrovanou deskou (hole board test) a zkouška vyvolání spánku (sleep induction).

Použity byly myši Swiss Webster o hmotnosti mezi 22 g a 30 g:

Zkouška stability na otáčející se plošině (rota-rod test) byla prováděna pomocí přístroje skládajícího se z plošinky a otáčející se tyče o průměru 3 cm (16 až 20 l.min^{-1}) s neklouzavým povrchem.

Integrita motorické koordinace zvířat byla stanovena podle schopnosti myši udržet rovnováhu na otáčející se tyči.

Sledovaným parametrem byl počet pádů zvířete během 30 sekundového pozorování odečítaný v různých intervalech po podání látky (Vaught, et al., Neuropharmacol., 24, 211, 1985).

Při zkoušce s děrovanou deskou (hole board test) byly zaznamenávány pohyby krys dvěma oddělenými systémy s fotobuňkami, které zaznamenávaly jak pohyby na desce (spontánní pohyblivost), tak četnost vkládání hlavy do děr na povrchu (průzkumnická činnost).

Myši byly po jedné umísťovány na desku a ponechány po dobu 5 minut volně zkoumat jak povrch, tak otvory.

Ve zkoušce s vyvoláním spánku (sleep induction test) s pentobarbitalem bylo měřeno trvání ztráty reflexu svinutí na myších, které dostaly pentobarbital (60 mg.kg^{-1} IP).

Motorická koordinace myši u kterých byl použit acetyl-L-karnitin (100 mg.kg^{-1} BID, SC nebo IP po 7 a 14 dní) se nelišil od motorické koordinace kontrolních myši, které dostávaly fyziologický roztok. Počet pádů během 30 sekundového pozorování se progresivně snižoval tak,

jak byly jednotlivé zkoušky opakovány, což prokazuje, že se zkoumaná myš naučila držet rovnováhu na otáčející se tyči.

Tabulka 7(A)

7 denní subchronické podávání (IP)

otáčivá plošina				
počet pádů během 30 sekund				
	před působením	po působení		
		15 min.	30 min.	45 min.
fysiologický roztok	3,8±0,4 (5)	2,0±0,2 (5)	1,8±0,3 (5)	0,8±0,2 (5)
acetyl-L-karnitin 100 mg.kg ⁻¹ BID	3,6±0,5 (5)	2,2±0,4 (5)	1,5±0,3 (5)	1,1±0,3 (5)

Údaje jsou střední hodnotou ± standardní odchylka.

V závorkách je uveden počet zvířat.

Tabulka 7(B)

14 denní subchronické podávání (IP)

otáčivá plošina				
počet pádů během 30 sekund				
	před působením	po působení		
		15 min.	30 min.	45 min.
fysiologický roztok	4,2±0,4 (5)	3,1±0,4 (5)	2,2±0,2 (5)	1,6±0,3 (5)
acetyl-L-karnitin 100 mg.kg ⁻¹ BID	3,9±0,5 (5)	2,9±0,3 (5)	1,7±0,4 (5)	1,0±0,3 (5)

Údaje jsou střední hodnotou ± standardní odchylka.

V závorkách je uveden počet zvířat.

Spontánní pohyblivost a průzkumnická činnost zkoumaných myší, které byly zjištěny zkouškou s děrovanou deskou nevykazovaly v porovnání s kontrolní skupinou žádné rozdíly.

Tabulka 8

14 denní subchronické podávání (SC)

	průzkumnická činnost	lokomotorická činnost
	počet pohybů	počet průzkumů
fysiologický roztok	59,4±7,7 (7)	21,3±5,6 (7)
acetyl-L-karnitin 100 mg.kg ⁻¹ BID	52,3±6,5 (10)	24,0±5,1 (10)

V závorkách je uveden počet zvířat.

Podobně jako u dvou výše uvedených zkoušek, též u zkoušky vyvolání spánku (sleep induction test) pentobarbitalem (60 mg.kg⁻¹ IP) (podávaný 24 hodin po ukončení podávání) neovlivnil acetyl-L-karnitin (100 mg.kg⁻¹ BID, SC po dobu 7 dní) ani trvání spánku, ani indukční dobu oproti tomu, jak se to dělo u piracetamu (30 mg.kg⁻¹, IP).

Tabulka 9

	spánek	
	indukční doba (min.)	trvání (min.)
fysiologický roztok	3,3±1,8 (16)	24,2±6,0 (16)
acetyl-L-karnitin	3,3±2,1 (10)	23,5±3,4 (10)
piracetam (30 mg.kg ⁻¹ IP)	4,5±2,1 (10)	12,5±5,3* (10)

Acetyl-L-karnitin: 100 mg.kg⁻¹ BID, SC po dobu 7 dní.

V závorkách je uveden počet zvířat.

* p<0,01 porovnáno se skupinou, která obdržela fysiologický roztok.

Příklad 5

Byla hodnocena hyperalgesie vyvolaná abstinenčním syndromem na morfin. Byly použity samci myši Swiss Webster o hmotnosti mezi 22 g a 30 g a samci krys.

K vyvolání závislosti byl morfin rozpuštěn v lahvích na pití; dávka morfinu byla zvyšována každých 48 hodin.

Roztok morfinu byl oslazen 5 % sacharosou k překrytí hořké chuti a připravován podle následujícího schématu: 1. a 2. den $0,1 \text{ mg.ml}^{-1}$; 3. a 4. den $0,2 \text{ mg.ml}^{-1}$; 5. a 6. den $0,3 \text{ mg.ml}^{-1}$; 7. až 14. den $0,4 \text{ mg.ml}^{-1}$.

7 denní podávání acetyl-L-karnitinu započalo od 7. dne podávání morfinu.

Morfinový roztok obsažený v lahvi byl zaměněn za vodu ráno 15. dne. Čtyři hodiny po záměně roztoku vykazovaly myši během zkoušky na teplé desce významné snížení prahu bolestivosti, které dosáhlo vrcholu po 6 hodinách (latentní doba $11,8 \pm 0,8$ sekund v porovnání s $15,7 \pm 1,1$ sekundami zaznamenanými u kontrolní skupiny).

Motorická koordinace a spontánní činnost zkoušená na otáčející se tyči a zkouška animex (Active 8 open field Activity System – Harvard Apparatus) nevykázaly rozdíly mezi myšmi s abstinenčním syndromem na morfin a myšmi, kterým byl podáván roztok sacharozy používaný jako vehikulum.

Bylo zjištěno, že acetyl-L-karnitin je při opakovaném podávání (100 mg.kg^{-1} BID, IP a SC po 7 dní) (obrázek 5) schopný zvrátit hyperalgesii vyvolanou abstinčním syndromem na morfin, avšak ne po jediném podání (5 hodin a 30 minut od záměny morfinu za vodu) (obrázek 5bis).

Příklad 6

Pro zkoušku hyperalgesie vyvolané kyselinou kainovou byli použiti samci myši Swiss Webster o hmotnosti mezi 22 g a 30 g a zkouška byla provedena v souladu s metodou popisovanou Giovengo, et al., v Pain, 83, 347 – 358, 1999.

Podle této zkoušky je hyperalgesie – stanoveno na myších na teplé desce – vyvolána roztokem kyseliny kainové (20 mg.kg^{-1} , IP).

Snížený práh bolestivosti, který dosahuje vrcholu 24 hodin po injekci, přetrvává nezměněn po mnoho dnů.

Při této zkoušce bylo zjištěno, že 7 denní opakované podávání acetyl-L-karnitinu (které začalo 48 hodin po podání kyseliny kainové) je schopno zvrátit hyperalgesii (obrázek 6), zatímco jednorázové podání nemělo žádný antihyperalgetický účinek (obrázek 6bis).

Příklad 7

Při zkoušce hyperalgesie vyvolané NMDA (N-methyl-D-aspartan) byly použity samci myši Swiss Webster o hmotnosti mezi 22 g a 30 g.

Tato zkouška byla prováděna v souladu s popisem podle Davies a Inturrisi v J. Pharmacol. Exp. Ther., 289, 1048 – 1053, 1999 pro krysy, avšak námi to bylo použito pro myši.

Při této zkoušce byla hyperalgesie hodnocena zkouškou na teplé desce s jejím vyvoláním pomocí intratekálně podávaného roztoku NMDA (1,64 μg pro jednu myš; podáváno přibližně 15 minut po posledním podání acetyl-L-karnitinu).

Snížení prahu bolestivosti, jehož vrcholu je dosaženo 15 minut po injikování NMDA, vymizí během 30 minut od podání. Obrázek 7 znázorňuje antinociceptivní účinek vyvolaný acetyl-L-karnitinem (100 mg.kg^{-1} , BID, SC nebo IP po 7 dní) při sníženém prahu bolestivosti vyvolaným MNDA.

Bylo zjištěno, že za stejných pokusných podmínek dávka 30 mg.kg^{-1} BID, IP nebo SC po dobu 7 dní nebyla shledána účinnou (obrázek 7), podobně jako to lze pozorovat na obrázku 6.

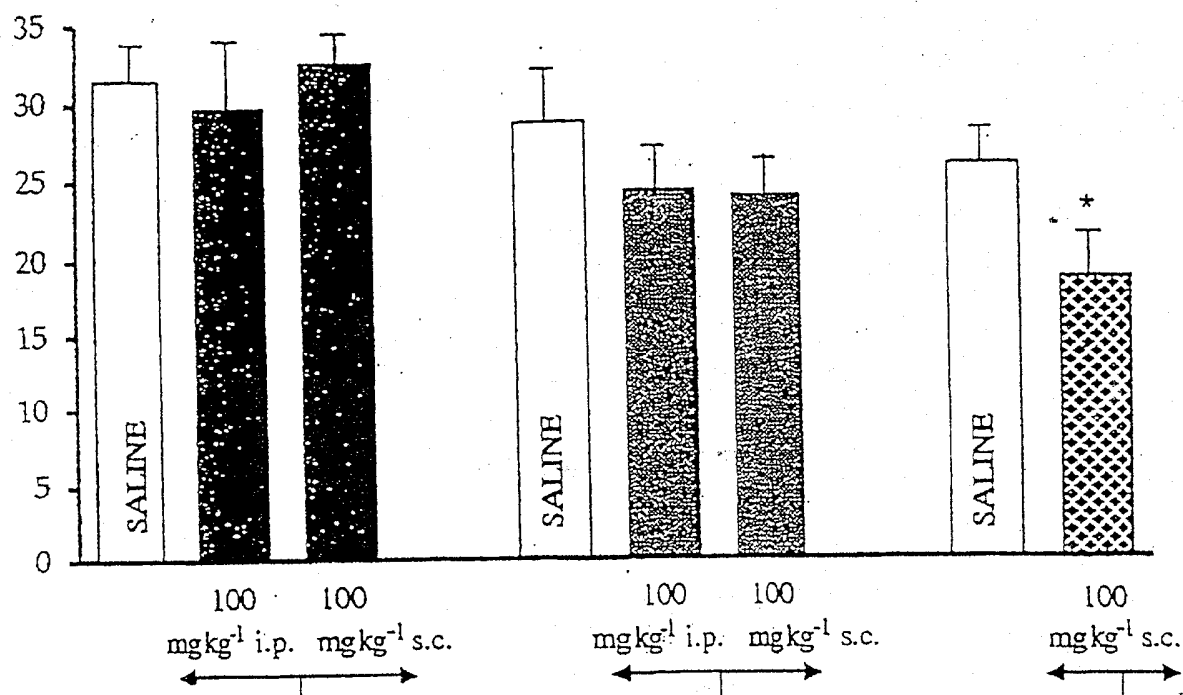
Patentové nároky

1. Použití acetyl-L-karnitinu nebo jeho farmaceuticky přijatelné sole k přípravě léčiva s analgetickými účinky.
2. Použití acetyl-L-karnitinu nebo jeho farmaceuticky přijatelné sole k přípravě léčiva pro preventivní léčbu bolesti.
3. Použití podle nároku 2 k přípravě léčiva majícího preemptivní analgetické účinky.
4. Použití podle nároku 2 nebo 3 pro preventivní léčbu bolesti nastávající po chirurgických zákrocích.
5. Použití podle nároků 1, 2 nebo 3, kdy se farmaceuticky přijatelná sůl acetyl-L-karnitinu vybírá ze skupiny obsahující: chlorid, bromid, orotan, kyselý aspartan, kyselý citran, citran hořečnatý, kyselý fosforečnan, fumaran a kyselý fumaran, fumaran hořečnatý, mléčnan, maleinan a kyselý maleinan, slizan, kyselý šťavelan, pamoan, kyselý pamoan, kyselý síran, glukofosfát, vínan, kyselý vínan, vínan hořečnatý, 2-aminoethansulfonan, 2-aminoethansulfonan hořečnatý, vínan cholinu a trichloracetát.

Obrázek 1

Počet abdominálních konstrikcí

SALINE = fyziologický roztok



acetyl-L-karnitin	acetyl-L-karnitin	acetyl-L-karnitin
akutní podávání	subchronické podávání (7 dní)	subchronické podávání (14 dní)

Účinek acetyl-L-karnitinu na abdominální konstriktci vyvolanou roztokem 0,6 % kyseliny octové.

Odpověď na stimul bolesti byl zaznamenán 30 minut po akutním podání acetyl-L-karnitinu.

Subchronické podávání acetyl-L-karnitinu: 100 mg.kg⁻¹ ip nebo sc dvakrát denně po 7 nebo 14 dní.

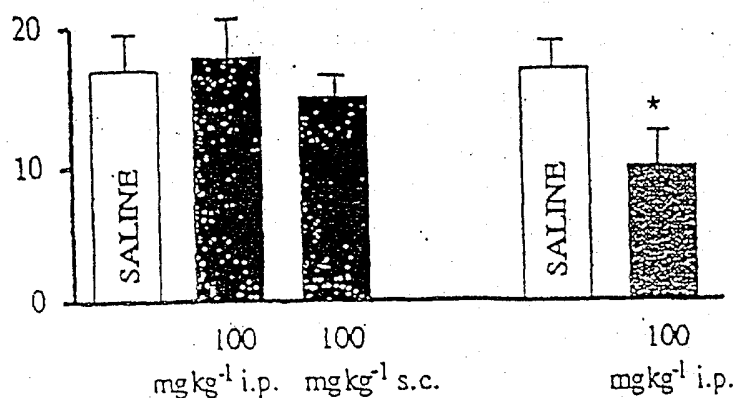
Každý údaj představuje střední hodnotu ± standardní odchylku pro 12 zvířat.

* p < 0,05

Obrázek 2

Počet abdominálních konstrikcí

SALINE = fyziologický roztok



acetyl-L-karnitin	acetyl-L-karnitin
akutní podávání	subchronické podávání (7 dní)

Účinek acetyl-L-karnitinu na abdominální konstriktci vyvolanou roztokem 0,3 % kyseliny octové.

Odpověď na stimul bolesti byl zaznamenán 30 minut po akutním podání acetyl-L-karnitinu.

Subchronické podávání acetyl-L-karnitinu: 100 mg.kg⁻¹ ip dvakrát denně po dobu 7 dní.

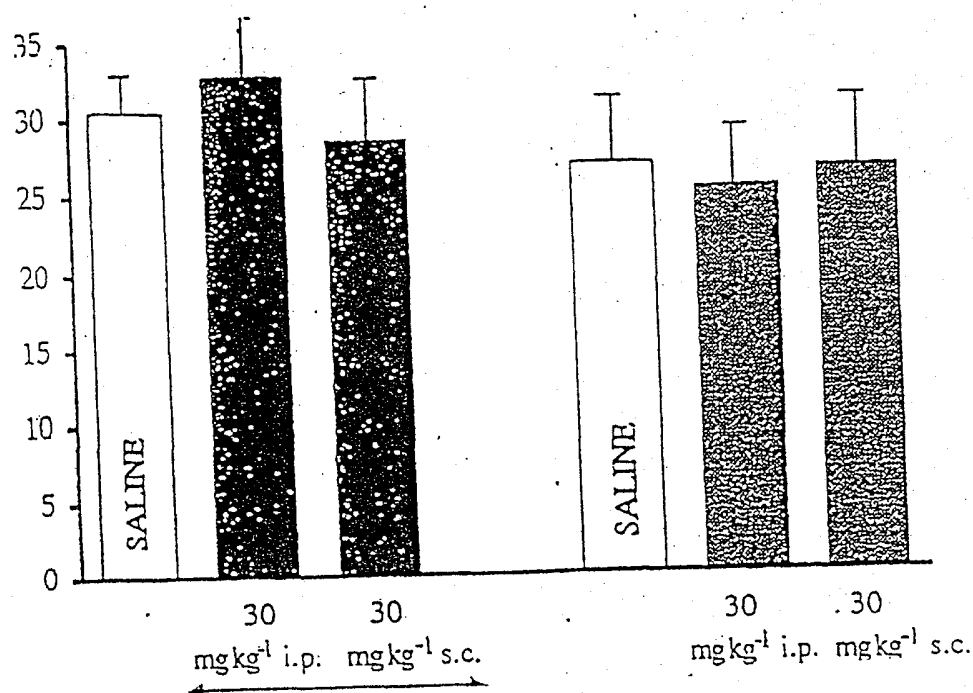
Každý údaj představuje střední hodnotu ± standardní odchylku pro 12 zvířat.

* $p < 0,05$

Obrázek 3

Počet abdominálních konstrikcí

SALINE = fyziologický roztok



acetyl-L-karnitin	acetyl-L-karnitin
subchronické podávání (14 dní)	subchronické podávání (18 dní)

Účinek acetyl-L-karnitinu na abdominální konstrikcí vyvolanou roztokem 0,6 % kyseliny octové.

Odpověď na stimul bolesti byl zaznamenán 30 minut po akutním podání acetyl-L-karnitinu a 24 hodin po posledním podání během subchronického podávání acetyl-L-karnitinu.

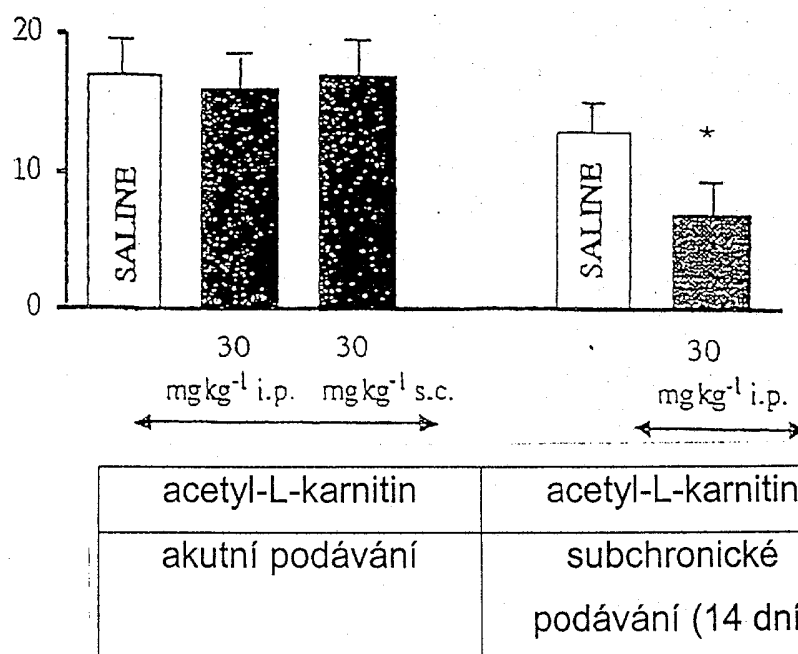
Subchronické podávání acetyl-L-karnitinu: 30 mg.kg⁻¹ ip nebo sc dvakrát denně po dobu 14 nebo 18 dní.

Každý údaj představuje střední hodnotu ± standardní odchylku pro 8 až 9 zvířat

Obrázek 4

Počet abdominálních konstrikcí

SALINE = fyziologický roztok



Účinek acetyl-L-karnitinu na abdominální konstrikcí vyvolanou roztokem 0,3 % kyseliny octové.

Odpověď na stimul bolesti byl zaznamenán 30 minut po akutním podání acetyl-L-karnitinu.

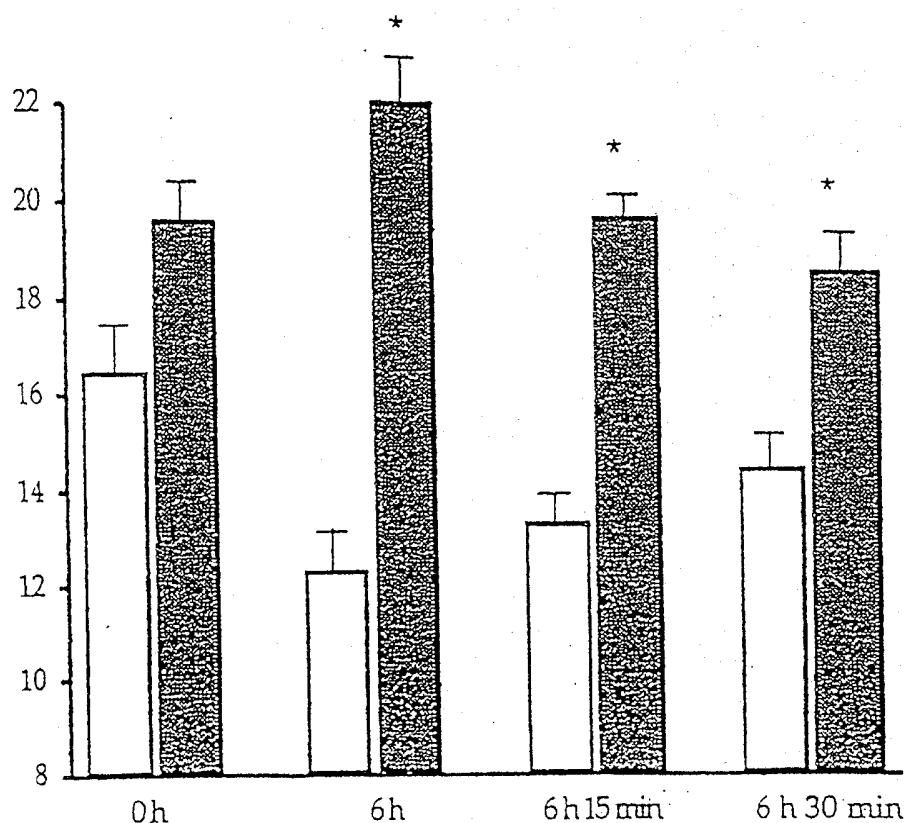
Subchronické podávání acetyl-L-karnitinu: 30 mg.kg⁻¹ ip dvakrát denně po dobu 14 dní.

Každý údaj představuje střední hodnotu ± standardní odchylku pro 12 zvířat.

* $p < 0,05$

Obrázek 5

Latentní doba (sek)



Doba přerušení podávání morfinu

□ fysiologický roztok ■ acetyl-L-karnitin

Účinek acetyl-L-karnitinu na hyperalgesii vyvolanou krizí odebráním morfinu (zkouška na teplé desce).

Roztok morfinu obsažený v lahvi byl nahrazen vodou ráno 15. dne (0 h).

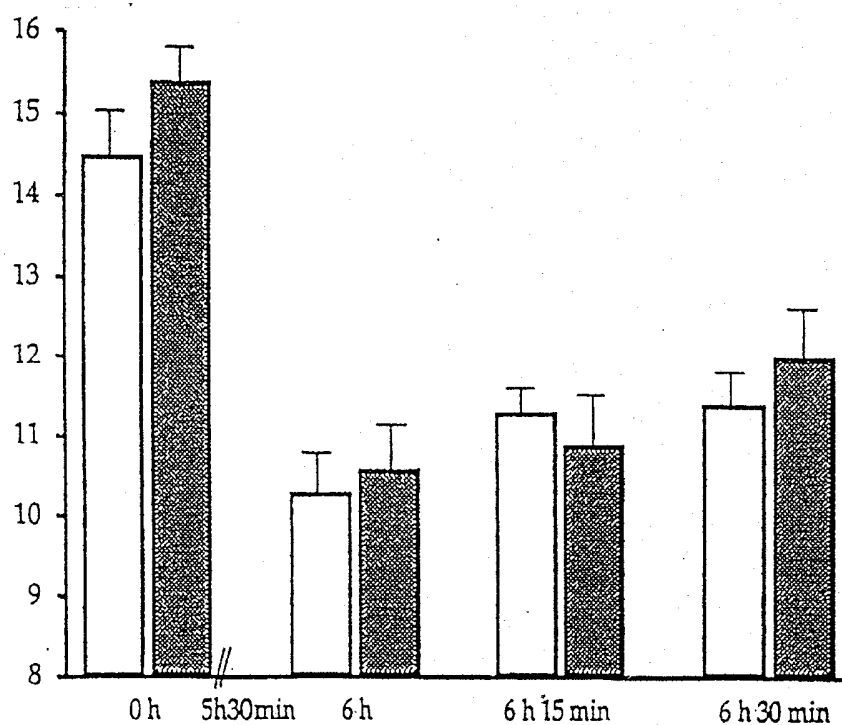
Subchronické podávání acetyl-L-karnitinu: 100 mg.kg^{-1} ip dvakrát denně po dobu 7 dní.

Každý údaj představuje střední hodnotu $\pm$ standardní odchylku pro 12 zvířat.

* $p < 0,05$ vzhledem ke skupině, která dostávala fysiologický roztok.

Obrázek 5bis

Látentní doba (sek)



↑ Doba přerušení podávání morfinu
Podávání acetyl-L-karnitinu

□ fysiologický roztok ■ acetyl-L-karnitin

Účinek acetyl-L-karnitinu na hyperalgesii vyvolanou krizí odebráním morfinu (zkouška na teplé desce).

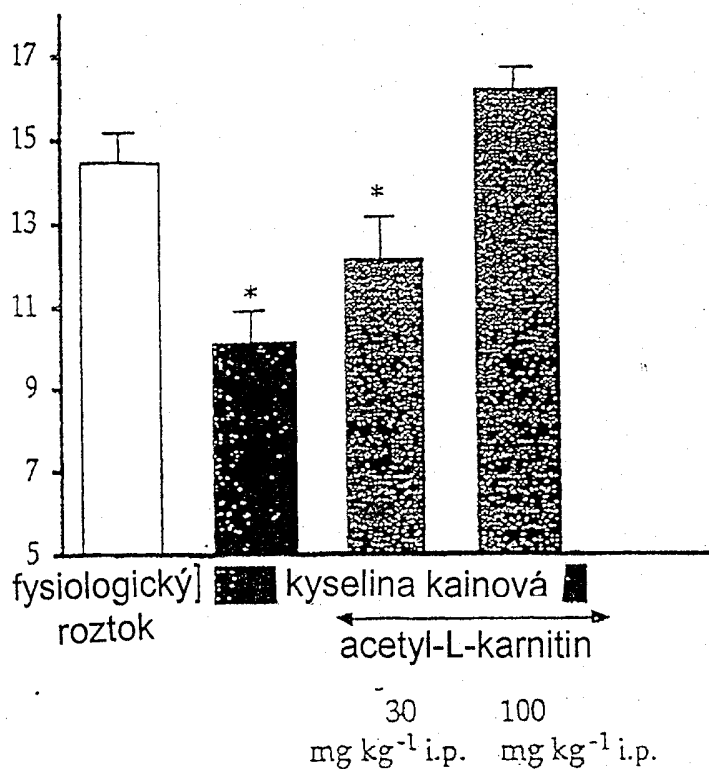
Roztok morfinu obsažený v lahvi byl nahrazen vodou ráno 15. dne (0 h).

Subchronické podávání acetyl-L-karnitinu: 100 mg.kg^{-1} ip dvakrát denně po dobu 7 dní.

Každý údaj představuje střední hodnotu $\pm$ standardní odchylku pro 10 zvířat.

Obrázek 6

Latentní doba (sek)



Účinek acetyl-L-karnitinu na hyperalgesii vyvolanou kyselinou kainovou (zkouška na teplé desce).

Stimul bolesti byl zaznamenáván 30 minut po posledním podání acetyl-L-karnitinu.

Kyselina kainová byla podávána 48 hodin před podáváním acetyl-L-karnitinu.

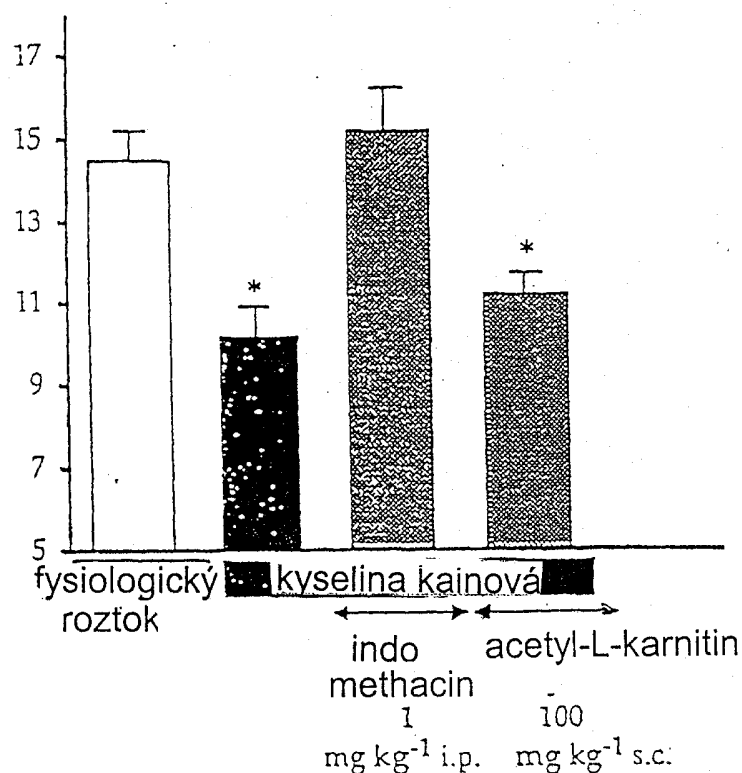
Subchronické podávání acetyl-L-karnitinu: 30 nebo 100 mg.kg⁻¹ ip dvakrát denně po dobu 7 dní.

Každý údaj představuje střední hodnotu $\pm$ standardní odchylku pro 12 zvířat.

* $p < 0,01$ vzhledem ke skupině, která dostávala fysiologický roztok.

Obrázek 6bis

Latentní doba (sek)



Účinek acetyl-L-karnitinu na hyperalgesii vyvolanou krizí po odebrání morfinu (zkouška na teplé desce). Porovnání s indomethacinem.

Stimul bolesti byl zaznamenáván 30 minut po posledním podání acetyl-L-karnitinu.

Kyselina kainová byla podávána 48 hodin před podáváním acetyl-L-karnitinu.

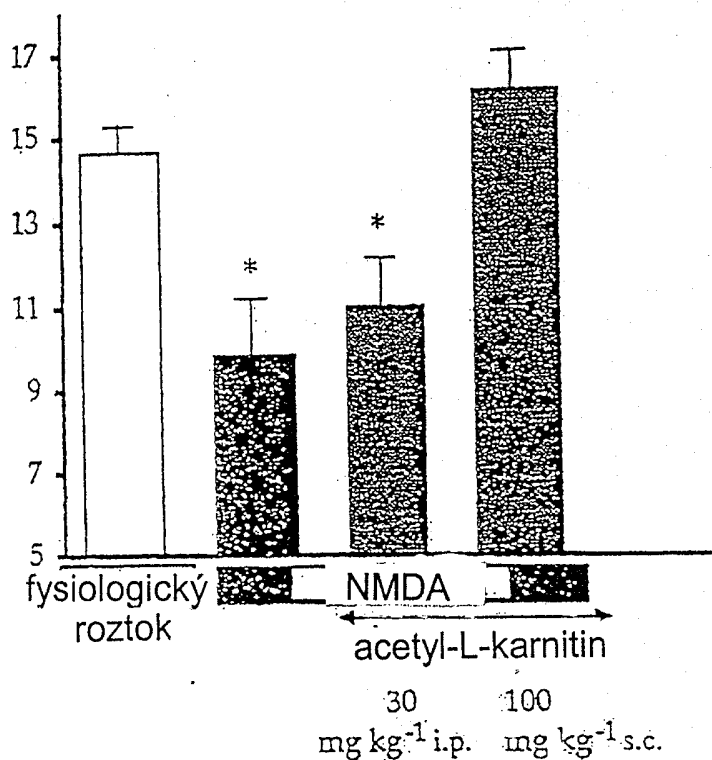
Subchronické podávání acetyl-L-karnitinu: 100 mg.kg⁻¹ sc.

Každý údaj představuje střední hodnotu ± standardní odchylku pro 12 zvířat.

* $p < 0,05$ vzhledem ke skupině, která dostávala fysiologický roztok.

Obrázek 7

Latentní doba (sek)



Účinek acetyl-L-karnitinu na hyperalgesii vyvolanou N-methyl-D-aspartanem (NMD) (zkouška na teplé desce).

Stimul bolesti byl zaznamenáván 30 minut po posledním podání acetyl-L-karnitinu.

NMDA byla podávána 15 hodin před zkouškou na teplé desce.

Subchronické podávání acetyl-L-karnitinu: 30 mg.kg⁻¹ ip nebo 100 mg.kg⁻¹ sc dvakrát denně po dobu 7 dní.

Každý údaj představuje střední hodnotu $\pm$ standardní odchylku pro 12 zvířat.

* $p < 0,01$ vzhledem ke skupině, která dostávala fysiologický roztok.