

Koleszteril-észter transzfer protein inhibitorok és fibrinsav-származékok kombinációi szív-érrendszeri indikációkhoz

NYOMDAPÉLDÁNY

KIVONAT

A találmány szív-érrendszeri terápiás vegyületek kombinációit ismerteti szív-érrendszeri betegségek, ezen belül hiperkoleszterinémia, érszűkület vagy hiperlipidémia megelőzésére vagy kezelésére. Az ismertetett kombinációk egy fibrinsav-származékot és egy koleszteril-észter transzfer protein (CETP) inhibitort tartalmaznak.

P04 0886

U. 54. 38

Képviselő:

Danubia Szabadalmi és

Védjegy Iroda Kft.

Budapest

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

**Koleszteril-észter transzfer protein inhibitorok és fib-
rinsav-származékok kombinációi szív-érrendszeri indikáci-
ókhoz**

A jelen találmány szív-érrendszeri betegségek kezelé-
sét teszi lehetővé; konkrétan vegyületek kombinációira,
készítményekre és azok gyógyszerekben való alkalmazási el-
járásaira, közelebbről lipid-túltengéses (a továbbiakban:
hiperlipidémiás) állapotok, így például emlősökben, köze-
külettel, hiperkoleszterinémiával és a koszorúartéria meg-
betegedésével összefüggő állapotok megelőzésében és keze-
lésében való alkalmazására vonatkozik. Konkrétabban, a ta-
lálmány a koleszteril-észter transzfer protein (CETP) ak-
tivitását gátló vegyületekre vonatkozik. A találmány fib-
rinsav-származékokra (fibrátokra) is vonatkozik.

A következőkben ismertetjük a technika állását. Tisz-
tázott, hogy az összkoleszterin és alacsony sűrűségű
lipoprotein (LDL) koleszterin megemelkedett koncentrációi-
val összefüggő hiperlipidémiás állapotok a koszorúér szív-
betegségek, és különösen az érszűkület fő kockázati ténye-
zői. Számos tanulmány bemutatta, hogy a nagy sűrűségű

Aktaszám: 94847-7215A-MOI/KmO

lipoprotein (HDL) koleszterin alacsony vérsavó-koncentrációja komoly kockázati tényezője az érszűkület kialakulásának [Barter és Rye, *Atherosclerosis*, **121**, 1-12 (1996.)]. A HDL a lipoproteinek egyik legfőbb csoportjai, amely a lipidek véren keresztüli transzportjában vesz részt. A HDL-lel összefüggő fő lipidek a koleszterin, a koleszteril-észter, a trigliceridek, a foszfolipidek és a zsírsavak. A vérben talált lipoproteinek további csoportjai az alacsony sűrűségű lipoprotein (LDL), a közepes sűrűségű lipoprotein (az IDL) és az igen alacsony sűrűségű lipoprotein (VLDL). Mivel a HDL koleszterin alacsony szintjei fokozzák az érszűkület kockázatát, a vérsavóban levő HDL koleszterin növelésére irányuló eljárások gyógyászatiilag előnyösek az érszűkület és a lipid véredényekben való felhalmozódásával összefüggő más betegségek kezelésére. Ezen betegségek közé tartozik - korlátozás nélkül - a koszorúér megbetegedés, a perifériás érbetegség és az agyvérzés.

Az érszűkület a legtöbb koszorúartéria betegség (CAD) - a modern társadalomban a megbetegedések és mortalitás fő oka - alapjául szolgál. A magas LDL koleszterin (körülbelül 180 mg/dl felett) és az alacsony HDL koleszterin (35 mg/dl alatt) az érszűkület kialakulásához nagymértékben hozzájáruló tényezők. Más betegségeket vagy kockázati tényezőket, így például a perifériás érbetegséget, az agyvérzést és hiperkoleszterinémiát is negatívan befolyásolja a hátrányos HDL/LDL arány.

Úgy találták, hogy a gyomor-bélrendszer belvilágából az epesavak visszaáramoltatásának befolyásolása okozati összefüggésben van a vérsavó koleszterin szintjének csökkenésével. Járványtani adatok állnak rendelkezésre, amelyek azt mutatják, hogy az ilyen csökkenés az érszűkület fokozódására vezet. Stedronsky az "Interaction of bile acids and cholesterol with nonsystemic agents having hypochlolesterolemic properties" [Biochimica et Biophysica Acta, **1210**, 255-287 (1994.)] szakirodalmi helyen ismerteti a folyamat biokémiáját, fiziológiáját és az ismert, epesavakat és koleszterint övező hatóanyagokat.

A koleszteril észter transzfer protein (CETP) gátlása hatásosan módosítja a plazma HDL/LDL-arányokat és a feltevések szerint szabályozza bizonyos szív-érrendszeri betegségek lefolyását és/vagy kialakulását. A CETP olyan vérsavó protein, amely elősegíti a koleszteril-észterek és trigliceridek mozgását a vérben különböző lipoproteinek között [Tall, J. Lipid Res., **34**, 1255-1274 (1993.)]. A koleszteril észter mozgása a HDL-től az LDL-hez a CETP által a HDL koleszterint csökkentő hatású. Ebből következik, hogy a CETP gátlása a vérsavó HDL koleszterin szintjének emelkedéséhez és a vérsavó LDL koleszterin szintjének csökkenéséhez vezet, ezáltal gyógyászatilag előnyös vérsavó lipid profilt eredményez. Erre a hatásra ismertet bizonyítékot McCarthy a Medicinal Res. Revs., **13**, 139-159 (1993.) szakirodalmi helyen. Erre a hatásra további bizonyítékot ismertet Sitori, a Pharmac. Ther., **67**, 443-447 (1995) szakirodalmi hivatkozásban. Ezt a jelenséget elő-

ször Swenson és munkatársai a J. Biol. Chem., **264**, 14318 (1989.) szakirodalmi helyen ismertették olyan monoklón antitest alkalmazásával, amely specifikusan gátolja a CETP-t. Nyulakban az antitest a vérsavó HDL koleszterin szintjének emelkedését és az LDL koleszterin szintjének csökkenését eredményezi. Son és munkatársai a Biochim. Biophys. Acta, **795**, 743-480 (1984.) szakirodalmi helyen az emberi vérsavóból származó olyan proteineket ismertetnek, amelyek gátolják a CETP-t. Az 5 519 001 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban - amelyre ezúton referenciaként hivatkozunk - Kushwaha és munkatársai a babuin apo C-1-ből származó 36 aminosavból álló peptidet ismertet, amely gátolja a CETP aktivitását. Cho és munkatársai a Biochim. Biophys. Acta, **1391**, 133-144 (1998.) szakirodalmi helyen a sertés vérsavóból származó olyan peptidet ismertetnek, amely gátolja az emberi CETP-t. Bonin és munkatársai a J. Peptide Res., **51**, 216-225 (1998.) szakirodalmi helyen a CETP-1 dekapeptid inhibitorát ismerteti. Hedge és munkatársai a Bioorg. Med. Chem. Lett., **8**, 1277-1280 (1998.) szakirodalmi helyen egy depspeptid gomba metabolitot CETP-gátlóként ismertetnek.

Számos tanulmány létezik olyan nem-peptid vegyületekről, amelyek CETP-inhibitorokként hatnak. Barrett és munkatársai a J. Am. Chem. Soc., **118**, 7863-64 (1996.) szakirodalmi helyen ciklopropán-tartalmú CETP-inhibitorokat ismertetnek. További ciklopropán-tartalmú CETP-inhibitorokat ismertetnek Kuo és munkatársai a J. Am. Chem. Soc., **117**, 10629-34 (1995.) szakirodalmi helyen. Pietzonka és munka-

társai a Bioorg. Med. Chem. Lett., **6**, 1951-1954 (1996.) szakirodalmi helyen foszfonát-tartalmú koleszteril-észter analógokat CETP-inhibitorokként ismertetnek. Coval és munkatársai a Bioorg. Med. Chem. Lett., **5**, 605-610 (1995.) szakirodalmi helyen a Widendiol-A és -B-t és rokon szeszkviterpén vegyületeket CETP-inhibitorokként ismertetnek. Lee és munkatársai a J. Antibiotics., **49**, 693-696 (1996.) szakirodalmi helyen rovar gombából származó CETP-inhibitorokat ismertetnek. Busch és munkatársai a Lipids, **25**, 216-220 (1990.) szakirodalmi helyen a koleszteril-acetil-bromidot CETP-inhibitorokként ismertetik. Morton és Zilversmit a J. Lipid Res., **35**, 836-847 (1982.) szakirodalmi helyen ismerteti, hogy a p-klór-merkurifenil-szulfonát, a p-hidroxi-merkuribenzoát és az etil-merkuritioszalicilát gátolja a CETP-t. Connolly és munkatársai a Biochem Biophys. Res. Comm., **223**, 42-47 (1996.) szakirodalmi helyen más cisztein módosítási reagenseket CETP-inhibitorokként ismertetnek. Xia és munkatársai az 1,3,5-triazinokat CETP-inhibitorokként ismertetik [Bioorg. Med. Chem. Lett., **6**, 919-922 (1996.)]. Bisgaier és munkatársai a Lipids, **29**, 811-818 (1994.) szakirodalmi helyen a 4-fenil-5-tridecil-4H-1,2,4-triazol-tiolt CETP-inhibitorokként ismerteti. További triazol-CETP-inhibitorokat ismertet a 09/153 360 sorozatszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés, amelyre ezúton referenciaként hivatkozunk. Sikorski és munkatársai további új CETP-inhibitorokat ismertetnek a WO 9914204 nemzetközi közzétételi számú PCT szabadalmi bejelentésben.

Helyettesített 2-merkaptoanilin amid-vegyületeket is alkalmazhatunk CETP-inhibitorokként és ilyen gyógyászati vegyületeket ismertetnek H. Shinkai és munkatársai a WO 98/35937 nemzetközi közzétételi számú PCT szabadalmi bejelentésben.

Bizonyos helyettesített heteroalkil-amin-vegyületek ismert CETP-inhibitorok. A 796846 számú európai szabadalmi bejelentésben Schmidt és munkatársai 2-aril-helyettesített piridineket, mint koleszterin-észter transzfer protein inhibitorokat hasznos szív-érrendszeri hatóanyagokként ismertetnek. A piridin gyűrű 3. szénatomján egy helyettesítő lehet hidroxialkil-csoport. A 801 060 számú európai szabadalmi bejelentésben Dow és Wright egy alkilamin egy aldehid addíciós termékkel helyettesített heterociklusos származékait ismerteti 1-hidroxil-1-aminok előállítására. Ezeket cukorbetegség és más rendellenességek kezelésére alkalmas β 3-adrenergiás receptor agonistákként mutatja be. A 2305665 számú nagy-britanniai szabadalmi bejelentésben Fisher és munkatársai különböző rendellenességek, ezen belül a koleszterin szint és érszűkületi betegségek kezelésére alkalmas 3-agonista szekunder aminoalkohol-helyettesített piridin-származékokat ismertetnek. A 818448 számú európai szabadalmi bejelentésben - amelyre ezúttal referenciaként hivatkozunk - Schmidt és munkatársai tetrahidrokinolin-származékokat koleszterin észter transzfer protein inhibitorokként ismertetnek. A 818197 számú európai szabadalmi bejelentésben Schmek és munkatársai piridineket kondenzált heterociklusokkal koleszterin észter

transzfer protein inhibitorokként ismertetnek. Brandes és munkatársai a 19627430 számú német szabadalmi bejelentésben kétgyűrűs kondenzált piridin-származékokat koleszterin észter transzfer protein inhibitorokként ismertetnek. A WO 9839299 nemzetközi közzétételi számú PCT szabadalmi bejelentésben Muller-Gliemann és munkatársai kinolin-származékokat koleszterin észter transzfer protein inhibitorokként ismertetnek.

CETP-inhibitorokként alkalmazható policiklusos vegyületeket A. Oomura és munkatársai is ismertetnek a 10287662 számú japán szabadalmi leírásban. Például a (C-1) és (C-8) képletű terápiás vegyületeket a *Penicillium* spp. tenyésztésével állítottuk elő.

CETP-inhibitorokként alkalmazható cikloalkil-piridineket ismertetnek Schmidt és munkatársai az EP 818448 számú európai szabadalmi leírásban. Például a (C-9) képletű terápiás vegyületet különösen hatásos CETP-inhibitorokként ismertetik.

CETP-inhibitorokként alkalmazható, helyettesített tetrahidronaftalin-vegyületeket ismertet a WO 9914174 nemzetközi közzétételi számú PCT szabadalmi bejelentés. Az említett leírásban hasznos CETP-gátló szerként a (8S)-3-ciklopentil-1-(4-fluorfenil)-2-[(S)-fluor-(4-trifluor-metilfenil)-metil]-hidroxil-6-spiro-ciklobutil-5,6,7,8-tetrahidronaftalint konkrétan ismertetik.

Néhány, CETP-inhibitorokként alkalmazható 4-heteroaril-tetrahidrokinolint ismertet a WO 9914215 nemzetközi közzétételi számú PCT szabadalmi bejelentés. Például az említet-

tett leírás a 3-(4-trifluormetil-benzoil)-5,6,7,8-tetrahidrokinolin-5-on-t hasznos CETP-inhibitorként ismerteti.

A fibrinsav-származékok azon hatóanyagok további csoportját képezik, amelyek a lipoprotein szintre hatással vannak. Ezek közül az elsők között fejlesztették ki a klofibrátot, amelyet a 3 262 850 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás ismertet. A klofibrát a p-klór-fenoxi-izobutírsav etil-észtere. Ebbe a csoportba tartozó, széles körben alkalmazott hatóanyag a gemfibrozil, amelyet a 3 674 836 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás ismertet, amelyre ezúton referenciaként hivatkozunk. A gemfibrozilt gyakran alkalmazzák a triglicerid szint csökkentésére vagy a HDL koleszterin koncentráció növelésére (lásd: The Pharmacological Basis of Therapeutics, 893. oldal, amelyre ezúton referenciaként hivatkozunk). A fenofibrát (4 058 552 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás, amelyre ezúton referenciaként hivatkozunk) hasonló hatású, mint a gemfibrozil, de az LDL szintet is csökkenti. A ciprofibrát (3 948 973 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás, amelyre ezúton referenciaként hivatkozunk) hasonló hatású, mint a fenofibrát. Ebbe a csoportba tartozó, további hatóanyag a bezafibrát (3 781 328 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás, amelyre ezúton referenciaként hivatkozunk). A fibrinsav-származékok alkalmazásától bekövetkező mellékhatások tünetei az epehólyag betegség (cholelitiás), a rhabdomyolysis és az akut ve-

seelégtelenség. E hatások közül néhány súlyosbodik, amikor a fibrátokat HMG CoA reduktáz inhibitorokkal kombinálják.

A szakirodalom ismerteti néhány kombinációs terápiát szív-érrendszeri betegségek kezelésére. Szív-érrendszeri betegségek kezelésére hasznos IBAT-inhibitorok és HMG CoA reduktáz inhibitorok kombinációit ismertetik a 09/037308 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentésben (amelyre ezúton referenciaként hivatkozunk).

Fluvasztatin és niceritrol kombinációs terápiát ismertetnek Sasaki J. és munkatársai (Id.). Az említett kutatók arra a következtetésre jutottak, hogy a fluvasztatin és a niceritrol kombinációja "750 mg/nap dózisban úgy tűnik, hogy nem növeli vagy csökkenti a fluvasztatin előnyös hatásait".

L. Cashin-Hemphill és munkatársai a J. Am. Med. Assoc., **264** (23), 3013-3017 (1990.) szakirodalmi helyen (amelyre ezúton referenciaként hivatkozunk) a kolesztipol és niacin koszorúér-szűkületre alkalmazott kombinációs terápia előnyös hatásait ismertetik. Az ismertetett hatások közé tartozik a természetes koszorúér-artéria károsodások előrehaladásának megszűnése vagy visszaszorulása.

Az acipimox és szimvasztatin kombinációs terápia magas triglicerid szintű betegekben előnyös HDL hatásokat mutat [lásd: N. Hogerbruge és munkatársai, J. Internal Med., **241**, 151-155 (1997.)]; amelyre ezúton referenciaként hivatkozunk].

Szitosztanol-észter-margarin és pravasztatin kombinációs terápiát ismertetik H. Gylling és munkatársai a J.

Lipid Res., **37**, 1776-1785 (1996.) szakirodalmi helyen (amelyre ezúton referenciaként hivatkozunk). Erről a terápiáról azt állítják, hogy egyidejűleg gátolja a koleszterin felszívódást és jelentősen csökkenti az LDA koleszterint nem inzulinfüggő cukorbeteg férfiakban.

Brown és munkatársai [New Eng. J. Med., **323** (19), 1289-1339 (1990.) (amelyre ezúton referenciaként hivatkozunk)] lovasztatin és kolesztipol kombinációs terápiáját ismertetik, amely csökkenti a érszűkületi károsodás előrehaladását és elősegíti a károsodás csökkenését az önmagában alkalmazott lovasztatinhoz képest.

Egy apo-B szekréció inhibitor és egy CETP-inhibitor kombinációs terápiáját ismertetik Chang és munkatársai a WO 9823593 nemzetközi közzétételi számú PCT szabadalmi bejelentésben, amelyre ezúton referenciaként hivatkozunk.

Buch és munkatársai (WO 9911263 nemzetközi közzétételi számú PCT szabadalmi bejelentés, amelyre ezúton referenciaként hivatkozunk) kombinációs terápiát ismertetnek, amely amlipidinből és egy sztatin-vegyületből áll angina pectorisban, érszűkületben, kombinált magas vérnyomásban és hiperlipidémiában szenvedő betegek kezelésére és a szívszorítás tüneteinek kezelésére. Buch és munkatársai a WO 9911259 nemzetközi közzétételi számú PCT szabadalmi bejelentésben amlodipinből és atorvasztatinból álló kombinációs terápiát ismertetnek.

Scott és munkatársai (WO 9911260 nemzetközi közzétételi számú PCT szabadalmi bejelentés) atorvasztatinból és

magas vérnyomás elleni szerből álló kombinációs terápiát ismertetnek.

Dettmar és Gibson (GB 2329334A számú Egyesült Királyságbeli szabadalmi bejelentés) terápiás készítményt ismeretnek a vérsavó alacsony sűrűségű lipoprotein és koleszterin szintjeinek csökkentésére, amelyben a készítmény egy HMG CoA reduktáz inhibitort és egy epesav komplexáló szert tartalmaz.

A fenti hivatkozások mutatják, hogy folyamatos igény van biztonságos, hatásos szerek iránt szív-érrendszeri betegségek megelőzésére vagy kezelésére.

A következőkben röviden ismertetjük a találmány lényegét.

Azon folyamatos igény kielégítésére, hogy biztonságos és hatásos szereket találjunk szív-érrendszeri betegségek megelőzésére és kezelésére, ezúton szív-érrendszeri hatóanyagok kombinációs terápiáit ismertetjük.

A jelen találmány annak sokféle kiviteli alakjában kombinációs terápiát tesz lehetővé, amely szerint egy CETP-inhibitor első mennyiségét és a hiperlipidémia, érszűkület vagy hiperkoleszterolémia megelőzésére vagy kezelésére alkalmas más szív-érrendszeri terápiás szer második mennyiségét alkalmazzuk, ahol az első és második mennyiségek együtt a vegyületek hiperlipidémiás állapot ellen hatásos mennyiségét, egy érszűkület ellen hatásos mennyiségét vagy hiperkoleszterolémia ellen hatásos mennyiségét képezik. Például a találmány nagyszámú kiviteli alakja közül egy kombinációs terápiát ismertet, amely egy CETP gát-

ló vegyület és egy fibrinsav-származék vegyület terápiás dózisait tartalmazza.

A találmány egy további kiviteli alakja az itt ismertetett bármely szív-érrendszeri kombinációs terápia hiperkoleszterinémia, érszűkület vagy hiperlipidémia megelőzésére vagy kezelésére való alkalmazásra vonatkozik. Ezért a találmány egy kiviteli alakjában eljárást tesz lehetővé egy hiperlipidémiás állapot megelőzésére vagy kezelésére, amely szerint az arra szoruló betegnek egységdózis kiszerezésben lévő kombinációt adagolunk, amelyben a kombináció egy fibrinsav-származék első mennyiségét és egy CETP-inhibitor második mennyiségét tartalmazza, ahol az első mennyiség és a második mennyiség együtt a szóban forgó vegyületek hiperlipidémiás állapot ellen hatásos mennyiségét képi.

Egy másik kiviteli alakjában, a találmány eljárást tesz lehetővé érszűkület megelőzésére vagy kezelésére, amely szerint az arra szoruló betegnek egységdózis kiszerezésben lévő kombinációt adagolunk, amelyben a kombináció egy fibrinsav-származék első mennyiségét és egy CETP inhibitor második mennyiségét tartalmazza, ahol az első mennyiség és a második mennyiség együtt a szóban forgó vegyületek érszűkület ellen hatásos mennyiségét képi.

Egy további kiviteli alakjában a találmány eljárást tesz lehetővé hiperkoleszterinémia megelőzésére vagy kezelésére, amely szerint az arra szoruló betegnek egységdózis kiszerezésben lévő kombinációt adagolunk, amelyben a kom-

bináció egy fibrinsav-származék első mennyiségét és egy CETP-inhibitor második mennyiségét tartalmazza, ahol az első mennyiség és második mennyiség együtt a szóban forgó vegyületek hiperkoleszterinémiás állapot ellen hatásos mennyiségét képi.

A találmány alkalmazhatóságának további területei nyilvánvalóak az alábbi részletes leírásból. Nyilvánvaló azonban, hogy a következő részletes leírás és a találmány előnyös kiviteli alakjait ismertető példák csak szemléltető jellegűek, mivel számos változtatás és módosítás a találmány értelmén és tárgyán belül maradva a szakember számára nyilvánvaló a részletes leírás alapján.

Az alábbi részletes leírás célja a szakember számára segítségnyújtás a találmány megvalósításában. Ennek ellenére a részletes leírás nem tekintendő a találmány tárgyát megalapozatlanul korlátozónak, mivel az itt ismertetett kiviteli alakok módosításai és változtatásai a szakember által megvalósíthatók a találmányi felismerés értelmétől és tárgyától való eltérés nélkül.

Az itt idézett hivatkozások tartalmára - ideértve az elsődleges hivatkozásokban idézett hivatkozások tartalmát - a maga egészében referenciaként hivatkozunk.

A következőkben ismertetjük a jelen leírásban alkalmazott szakkifejezések meghatározásait. Az alábbi meghatározásokat abból a célból ismertetjük, hogy az olvasót segítjük a találmány részletes leírásának megértésében.

A "kombinációs terápia" kifejezés jelentése két vagy több terápiás szer adagolása hiperlipidémiás állapot, pél-

dául érszűkület és hiperkoleszterinémia kezelésére. Az ilyen adagolás magában foglalja ezen terápiás szerek együtt adagolását lényegében szimultán módon, így például a hatóanyagok rögzített arányát tartalmazó, minden egyes inhibitorra elkülönült kapszulák formájában. Továbbá az ilyen adagolás magában foglalja minden egyes terápiás szer típus alkalmazását egymást követően. Bármelyik esetben a kezelési mód biztosítja a hatóanyag kombináció előnyös hatásait a hiperlipidémiás állapot kezelésében.

A "gyógyászatilag hatásos" kifejezés jelentése a kombinációs terápiában a inhibitorok kombinált mennyiségének minősítésére irányul. Ez a kombinált mennyiség biztosítja a hiperlipidémiás állapot csökkentésének vagy kiküszöbölésének elérését.

A "terápiás vegyület" kifejezés jelentése a hiperlipidémiás állapot, ezen belül érszűkület vagy hiperkoleszterinémia megelőzésében vagy kezelésében hasznos vegyület.

A következőkben ismertetjük a találmány szerinti kombinációkat. A találmány szerinti kombinációk számos alkalmazási területtel rendelkeznek. Például a dózis beállítással és orvosi megfigyelés segítségével a találmány szerinti kombinációkban alkalmazott terápiás vegyületek egyedi dózisa alacsonyabbak, mint a terápiás vegyületekre monoterápiában alkalmazásuk esetén tipikus dózisok. A dóziscsökkenés előnyei közé tartozik a monoterápiához képest az egyes terápiás vegyületek mellékhatásainak csökkenése. Továbbá a kombinációs terápia - a monoterápiákhoz ké-

pest - kevesebb mellékhatása a terápia rendjének nagyobb beteg általi megfeleléshez vezet.

A találmány további hasznosítása a komplementer hatásokkal vagy komplementer hatásmódokkal rendelkező kombinációkban van. Például az IBAT-inhibitorok a vérsavó koleszterinszintjét szabályozzák a csípőbélben az epesavak újrafelszívódásának gátlásával. Ezzel szemben a CETP-inhibitorok a koleszterin-észterek és trigliceridek különböző lipoproteinek közötti mozgását gátolják a vérben.

A találmányban alkalmazható vegyületek közé sokféle terápiás vegyület tartozik. Egyes konkrét CETP-inhibitor vegyületeket, amelyek a jelen találmányban alkalmazhatók, a következő szabadalmi bejelentések külön-külön ismertetnek, ezek mindegyikének tartalmára ezúton referenciaként hivatkozunk.

R9. 60/101661 sorozatszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés.

R10. 60/101711 sorozatszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés.

R11. 60/101660 sorozatszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés.

R12. 60/101664 sorozatszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés.

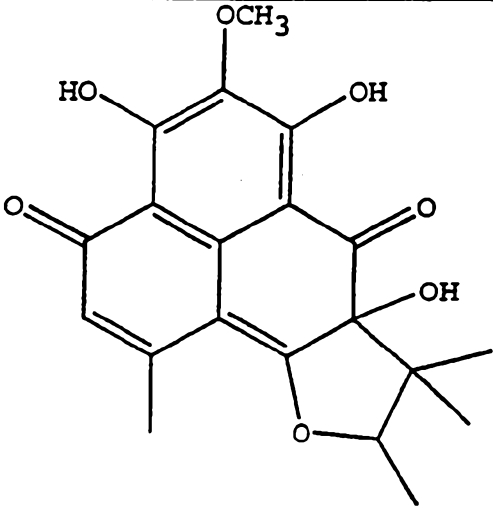
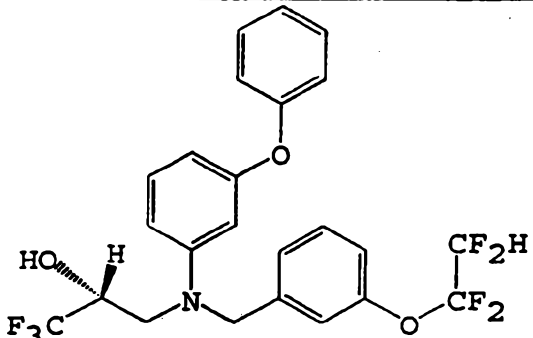
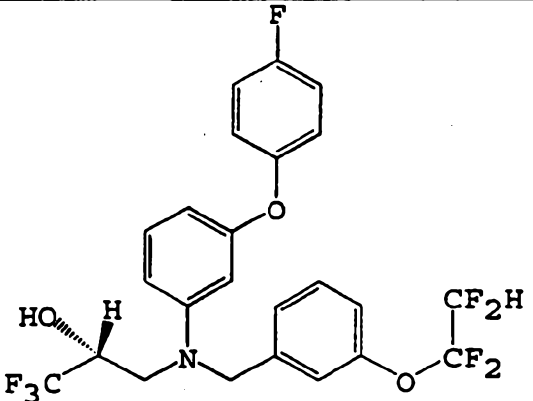
R13. 60/101668 sorozatszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés.

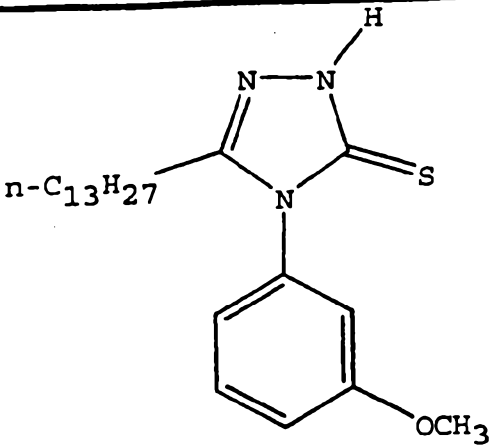
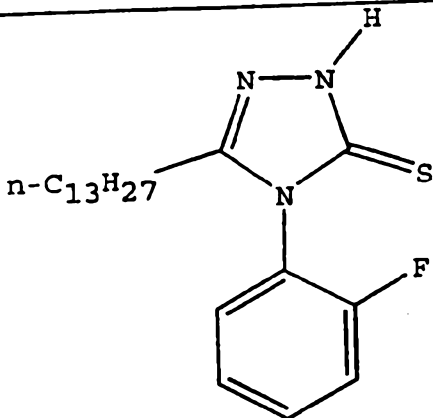
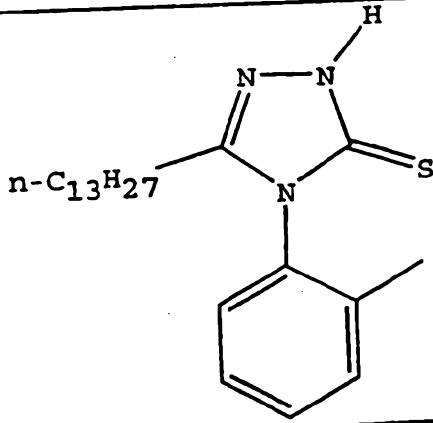
R14. 60/101662 sorozatszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés.

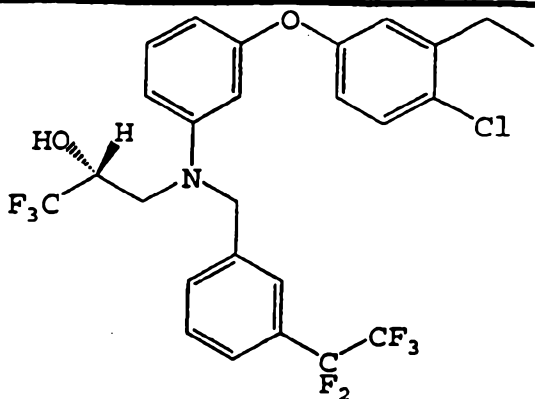
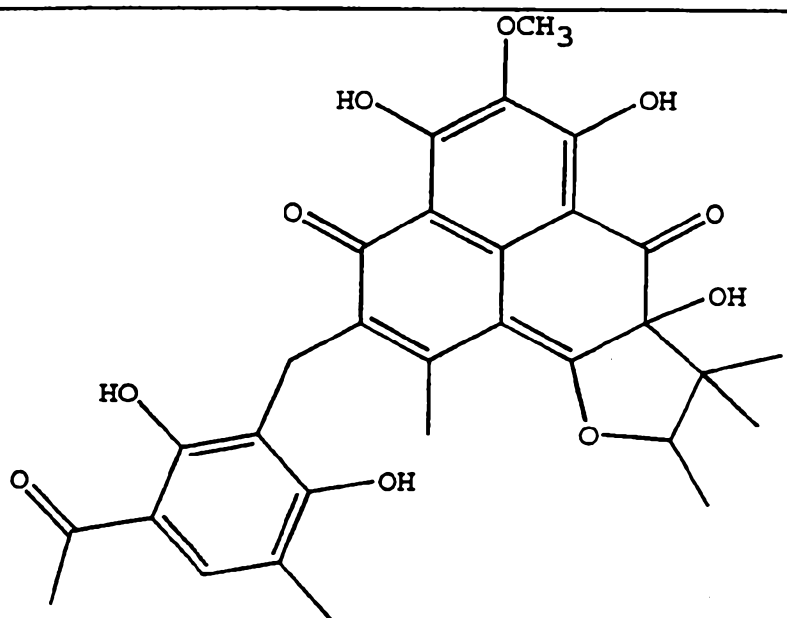
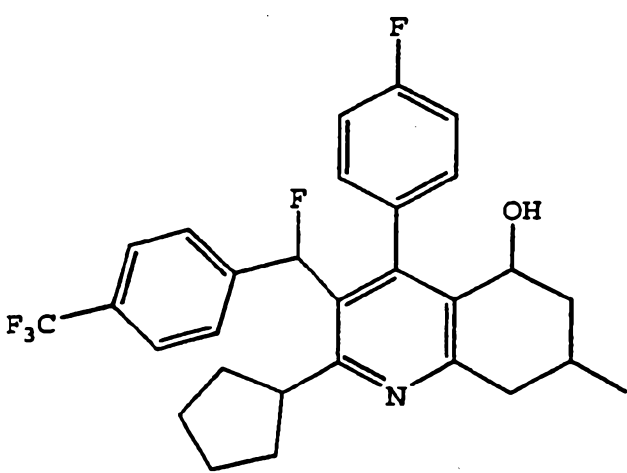
- R15. 60/101663 sorozatszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés.
- R16. 60/101669 sorozatszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés.
- R17. 60/101667 sorozatszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés.
- R18. 09/401 916 sorozatszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés.
- R19. 09/405 524 sorozatszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés.
- R20. 09/404 638 sorozatszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés.
- R21. 09/404 638 sorozatszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés. [sic]
- R22. 09/400 915 sorozatszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés.
- R23. 5 932 587 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás.
- R24. 5 925 645 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás.

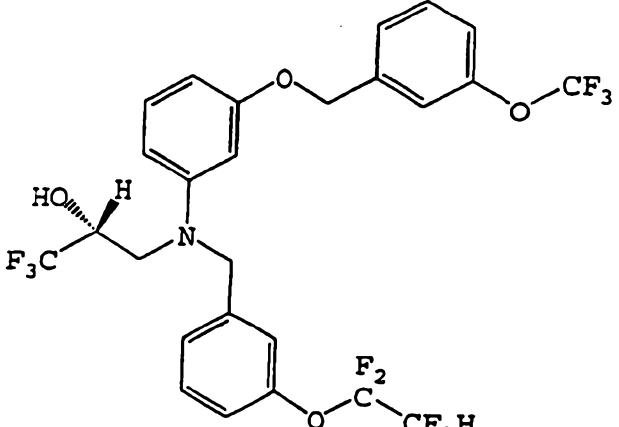
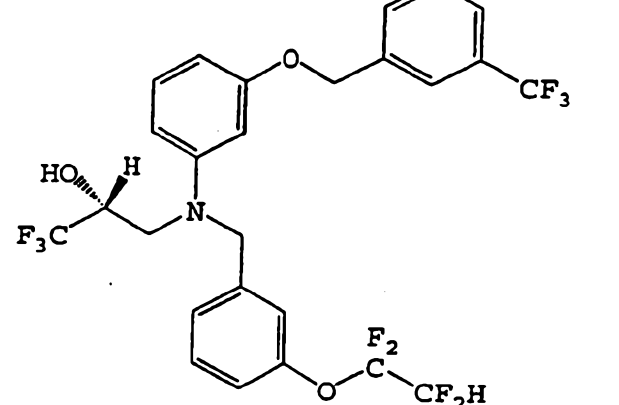
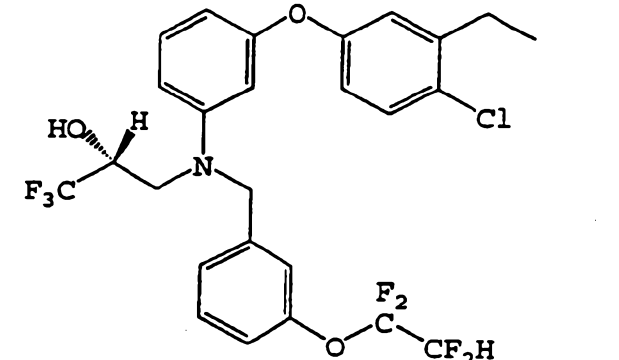
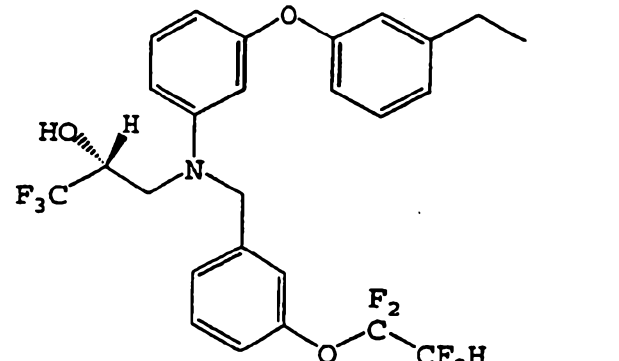
A találmány szempontjából különös érdeklődésre számot tartó CETP-inhibitorok az 1. táblázatban ismertetett vegyületek, továbbá az 1. táblázatban bemutatott CETP-inhibitorok diasztereomerei, enantiomerei, racemátjai, sói és tautomerei.

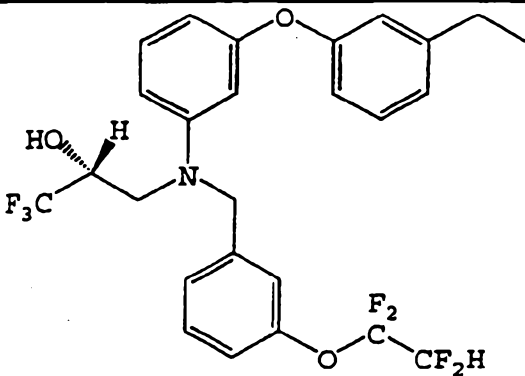
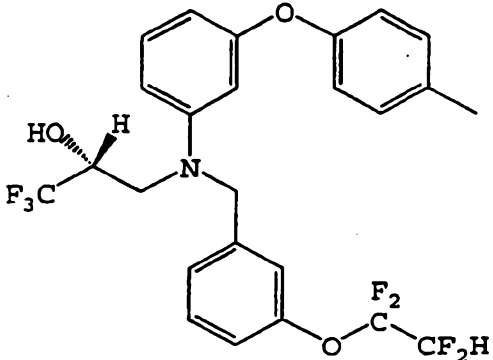
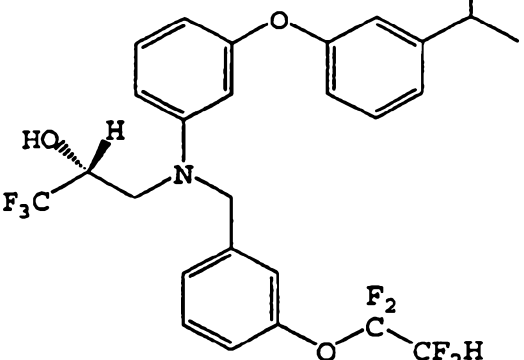
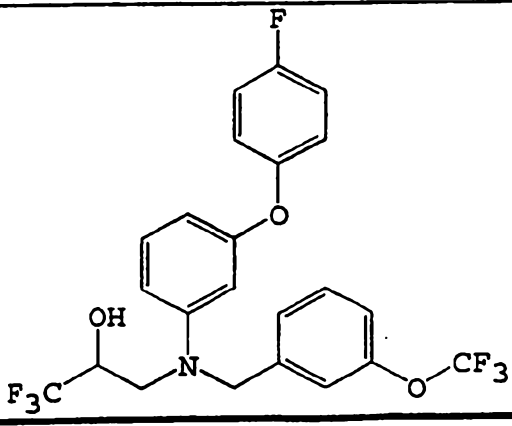
1. táblázat

A vegyület száma	Molekulaszerkezet
C-1	
C-2	
C-3	

C-4	 <chem>CCCCCCCCCCCCCc1nc([NH])c(=S)n1-c2cccc(OC)c2</chem>
C-5	 <chem>CCCCCCCCCCCCCc1nc([NH])c(=S)n1-c2ccccc2F</chem>
C-6	 <chem>CCCCCCCCCCCCCc1nc([NH])c(=S)n1-c2ccccc2C</chem>
C-7	

	
C-8	
C-9	

C-10	
C-11	
C-12	
C-13	

C-14	
C-15	
C-16	
C-17	

C-18	
C-19	
C-20	

A találmány szerinti kombinációkban és eljárásokban alkalmazható fibrinsav-származékok közé nagyszámú szerkezetű és funkciós csoporttal rendelkező vegyület tartozik. A találmányban előnyös fibrinsav-származékok a 2. táblázatban szerepelnek. A 2. táblázat terápiás vegyületei a találmányban sokféle formában, ezen belül sav formában, só formában, racémátok, enantiomerek, ikerionok és tautomerek

formájában alkalmazhatók. A 2. táblázatban ismertetett egyes amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásokra ezúton referenciaként hivatkozunk.

2. táblázat

A vegyület száma	Közönséges név	CAS Regisztrációs szám	A vegyületre vonatkozó szabadalmi leírás
G-41	Klofibrát	637-07-0	US 3 262 850
G-70	Fenofibrát	49562-28-9	US 4 058 552
G-38	Ciprofibrát	52214-84-3	US 3 948 973
G-20	Bezafibrát	41859-67-0	US 3 781 328
G-78	Gemfibrozil	25183-30-1	US 3 674 836
G-40	Klinofibrát	69047-39-8	US 3 716 583
G-24	Binifibrát	30299-08-02	BE 884722

A találmányban alkalmazható vegyületek (például fibrinsav-származékok vagy CETP-inhibitorok) lehetnek aszimmetriás szénatom nélküliek vagy rendelkezhetnek egy vagy több aszimmetriás szénatommal. Ezért amikor a találmány szerint alkalmazható vegyületek egy vagy több aszimmetriás szénatommal rendelkeznek, akkor közéjük tartoznak racématok és sztereoizomerek, így például diasztereomerek és enantiomerek, mind tiszta formában, mind keverék formájában. Az ilyen sztereoizomerek előállíthatók hagyományos eljárásokkal, akár enantiomer kiindulási anyagok reagáltatásával, akár a találmány szerinti vegyületek izomerjeinek elválasztásával.

Az izomerek lehetnek geometriai izomerek, így például cisz-izomerek vagy egy kettős kötésen keresztül transz-izomerek. Minden ilyen izomer a találmányban alkalmazható vegyületek közé tartozik.

A találmányban alkalmazható vegyületek lehetnek tautomerek is.

A találmányban alkalmazható vegyületek az alábbiak szerint magukban foglalják azok sóit, szolvátjait és prodrugjait.

A következőkben ismertetjük a találmány szerinti dózisokat, kiszerezéseket és adagolási módokat.

A találmány szerinti készítmények adagolhatók hiperlipidémiás betegségek vagy állapotok megelőzésére és kezelésére bármely módon - előnyösen orális úton - amely e vegyületek érintkezését biztosítja azok hatáshelyével a testben, így például egy emlős, például ember csípőbelében, vérsavójában vagy májában.

A fent hivatkozott állapotok megelőzésére vagy kezelésére a találmány szerinti készítményekben és eljárásokban alkalmazható vegyületek alkalmazhatók eredeti formájukban. Gyógyászati alkalmazásokra különösen megfelelőek a gyógyászatilag elfogadható sók, azok az anyavegyülethez képest nagyobb vízbéli oldékonysága miatt. Az ilyen sóknak minden körülmények között gyógyászatilag elfogadható aniont vagy kationt kell tartalmazniuk. A találmány szerinti vegyületek megfelelő gyógyászatilag elfogadható savaddíciós sói alkalmazhatóságuk esetén azok, amelyek szervesetlen savakból, így például sósavból, hidrogén-bromidból, foszforsav-

ból, metafoszforsavból, salétromsavból, szulfonsavból és kénsavból származnak, és azok, amelyek szerves savakból, így például ecetsavból, benzolszulfonsavból, benzoesavból, citromsavból, etánszulfonsavból, fumársavból, glükonsavból, glikolsavból, izotionsavból, tejsavból, laktobionsavból, maleinsavból, almasavból, metánszulfonsavból, borostyánkősavból, toluolszulfonsavból, borkősavból és trifluor-ecetsavból származnak. A kloridsó különösen előnyös gyógyászati célokra. Megfelelő gyógyászatilag elfogadható bázis sók az ammóniumsók, az alkálifémsók, így például nátrium- vagy káliumsók és alkáliföldfémsók, így például magnézium- és kalciumsók.

A találmányban alkalmazható anionoknak természetesen szintén gyógyászatilag elfogadhatónak kell lenniük, és azok szintén kiválaszthatók a fenti felsorolásból.

A találmányban alkalmazható vegyületek lehetnek egy megfelelő vivőanyaggal gyógyászati készítmény formájában. A vivőanyagnak természetesen elfogadhatónak kell lennie abban az értelemben, hogy kompatibilisnek kell lennie a készítmény többi összetevőjével és nem lehet káros a kezelt személyre. A vivőanyag lehet szilárd vagy folyadék vagy mindkét halmazállapotú, és előnyösen kiszerelhető a vegyülettel egységdózis készítményként, így például 0,05-95 tömeg% hatóanyagot tartalmazó tabletta formájában. Más gyógyászatilag hatásos anyagok, ezen belül a jelen találmány szerinti más vegyületek is jelen lehetnek. A találmány szerinti gyógyászati készítmények előállíthatók a

gyógyszerészet területén jól ismert, lényegében az összetevők összekeveréséből álló eljárásokkal.

Adott esetben a találmány szerinti kombináció egy fibrinsav-származékot és egy CETP-inhibítort tartalmazó készítményből állhat. Egy ilyen készítményben a fibrinsav-származék és a CETP-inhibitor jelen lehet egységdózis kiszerelésben, például pirula, kapszula kiszerelésben vagy olyan folyadék kiszerelésben, amely mindkét vegyületet tartalmazza.

Ezen vegyületek adagolhatók bármely hagyományos, a gyógyszerkészítmények esetében alkalmazható eljárással, akár önálló terápiás vegyületekként, akár terápiás vegyületek kombinációjaként.

A kívánt biológiai hatás elérését biztosító vegyület mennyisége természetesen számos tényezőtől, így például a kiválasztott konkrét vegyülettől, a szándékolt alkalmazástól, az adagolás módjától és a kezelt személy klinikai állapotától függ.

Általában egy fibrinsav-származék teljes napi dózisa lehet körülbelül 1000-3000 mg/nap egységes vagy osztott dózisokban. Mind a gemfibrozilt, mind a klinofibrátot például gyakran adagolják külön, 1200 mg/nap dózisban. A klinofibrátot gyakran adagolják 2000 mg/nap dózisban. A bifibrinátot gyakran adagolják 1800 mg/nap dózisban.

Általában egy CETP-inhibitorra megfelelő lehet a körülbelül 0,01-100 mg/testsúly kg/nap, előnyösen körülbelül 0,5-20 mg/testsúly kg/nap napi dózis.

Az előző bekezdésekben meghatározott napi dózisok a különböző terápiás vegyületekre adagolhatók a betegnek egységdózisban vagy felosztott, sok aldózisban. Az aldózisok adagolhatók 2-6 alkalommal naponta. A dózisok lehetnek késleltetett felszabadítású formában a kívánt eredmények hatékony elérése érdekében.

A gyógyászatilag elfogadható sók esetében a fent meghatározott tömegek a sóból származó terápiás vegyület savekvivalensének vagy bázis-ekvivalensének tömegére vonatkoznak.

A találmány szerinti kombinációk orális eljuttatása magában foglalja a szakterületen jól ismert kiszerezéseket, amelyek bármely mechanizmus útján a hatóanyag elnyújtott vagy késleltetett eljuttatását biztosítják a gyomorbél rendszerbe. Ezek közé tartoznak a dózisformából való pH-érzékeny felszabadítások, amelyek - korlátozás nélkül - a vékonybél pH-jának változásán, a tabletta vagy a kapszula lassú szétesésén, a kiszerezés fizikai tulajdonságán alapuló gyomorbéli retención, a dózisformának a bélrendszer nyálkabevonatához való bioadhézióján vagy a hatóanyagnak a dózisformából való enzimatis felszabadulásán alapulnak. A találmányban hasznosítható néhány terápiás vegyületre (fibrinsav-származéokra vagy CETP-inhibitorokra) a célzott hatás a dózisforma módosításával azon időtartam kiterjesztése, amely alatt a hatóanyag molekula a hatás helyre eljut. Ezért a találmány tárgyához tartoznak a bélben oldódó bevonattal ellátott és a bélben oldódó bevonattal ellátott, szabályozott hatóanyag felszabadítású kisse-

relések. Megfelelő bélben oldódó bevonatok a cellulóz-acetát ftalát, a polivinil-acetát-ftalát, a hidroxipropil-metil-cellulóz-ftalát és a metakrilsav és metakrilsav-metil-észter anionos polimerjei.

A találmány szerinti kombinációk orálisan eljuttathatók akár szilárd, félszilárd vagy folyékony formában. Folyékony vagy félszilárd formában a találmány szerinti kombinációk lehetnek például folyadék, szirup formában vagy tárolhatók gél kapszulába (például zselatin kapszulába) foglalva. Egy másik kiviteli alakban, amikor a találmány szerinti kombinációban fibrinsav-származékot alkalmazunk, a fibrinsav-származék adagolható folyadék, szirup készítésben vagy tárolható zselatin kapszulában.

A CETP-inhibitor esetében az intravénásan adagolt dózis lehet például körülbelül 0,003-1,0 mg/testsúly kg, előnyösen körülbelül 0,01-0,75 mg/testsúly kg, előnyösebben körülbelül 0,1-0,6 mg/testsúly kg.

Intravénás adagolás esetén a fibrinsav-származék dózisa lehet például körülbelül 100-2000 mg/testsúly kg, előnyösen körülbelül 300-1000 mg/testsúly kg, előnyösebben körülbelül 400-750 mg/testsúly kg.

Ezen terápiás vegyületek bármelyikének dózisa könnyen adagolható infúzióként körülbelül 10-100 ng/testsúly kg/perc dózisban. Az erre a célra megfelelő infúziós folyadékok tartalmazhatják például milliliterenként körülbelül 0,1 ng-tól körülbelül 10 mg-ig, előnyösen körülbelül 1 ng-tól körülbelül 10 mg-ig terjedő mennyiségben a találmány szerinti vegyületeket. Az egységdózisok a találmány

szerinti vegyületet tartalmazhatják például körülbelül 1 mg-tól körülbelül 10 g-ig terjedő mennyiségben. Ezáltal az injekciós ampullák tartalmazhatják körülbelül 1-100 mg mennyiségű találmány szerinti vegyületet.

A találmány szerinti gyógyászati készítmények lehetnek megfelelő orális, végbélen keresztüli, helyi, szájüregi adagolású (például nyelv alatti adagolású) és parenterális adagolású (például bőr alá történő, intramuszkuláris, bőrbe történő vagy intravénás adagolású), bár a legmegfelelőbb mód minden esetben függ a kezelt állapot természetétől és súlyosságától és az alkalmazott konkrét vegyület tulajdonságaitól. A legtöbb esetben az előnyös adagolási mód orális.

Orális adagolásra megfelelő gyógyászati készítmények előállíthatók diszkrét egységekben, így például kapszulák, ostyák, szögletes tabletták vagy tabletták formájában, amelyek mindegyike a találmány szerint alkalmazható, legalább egyféle terápiás vegyület előre meghatározott mennyiségét tartalmazza; por vagy granulátum formájában; egy vizes vagy nemvizes folyadékban oldat vagy szuszpenzió formájában; vagy olaj-a-vízben vagy víz-az-olajban típusú emulzió formájában. Amint azt jeleztük, az ilyen készítmények előállíthatók bármely, a gyógyszerészeti szakterületen elfogadható eljárással, amely tartalmazza a hatóanyag(ok) és a vivőanyag (amely állhat egy vagy több segédanyagból) egybefoglalását. Általában a készítményeket úgy állítjuk elő, hogy a hatóanyagot egy folyadékkal vagy finoman eloszlatott szilárd vivőanyaggal vagy mindkettővel

egyenletesen és alaposan összekeverjük, majd szükség esetén a terméket formázzuk. Például egy tablettá előállítható a vegyület pora vagy granulátuma adott esetben egy vagy több segédanyaggal való préselésével vagy öntésével. Préselt tabletták előállíthatók a találmány szerinti vegyület ömlesztett formájának, így például porának vagy granulátumának adott esetben kötőanyaggal, kenőanyaggal, közömbös hígítóanyaggal és/vagy felületaktív anyaggal/diszpergálószer(ek)kel, megfelelő gépben való préselésével. Öntött tabletták előállíthatók a por formájú, egy közömbös folyékony hígítószerrel megnedvesített vegyület megfelelő gépben történő öntésével.

Szájüregi adagolású (nyelv alá adagolt) gyógyászati készítmények a szögletes tabletták, amelyek a találmány szerinti vegyületet ízesített bázisban, általában szacharózban és gumiarábikumban vagy tragakantban tartalmazzák, és pasztillák, amelyek a vegyületet egy közömbös bázisban, így például zselatinban és glicerinben vagy szacharózban és gumiarábikumban tartalmazzák.

Parenterális adagolásra megfelelő gyógyászati készítmények hagyományosan a találmány szerinti vegyület steril vizes preparátumai. Ezek a preparátumok előnyösen intravénás adagolásúak, bár az adagolás megvalósítható bőr alá történő, intramuszkuláris vagy bőrbe történő injektlás segítségével is. Az ilyen preparátumok könnyen előállíthatók a vegyület vízzel való keverésével, a keletkező oldat sterilizálásával és a vérrel izotónná tételével. A talál-

mány szerinti injektálható vegyületek általában 0,1-5 tömeg% mennyiségű itt ismertetett vegyületet tartalmaznak.

Végbélen keresztüli adagolásra megfelelő gyógyászati készítmények előnyösen egységdózis kiszerezésű kúpok formájában állíthatók elő. Ezek előállíthatók a találmány szerinti vegyület egy vagy több hagyományosan szilárd vivőanyaggal, így például kakaóvajjal való összekeverésével, és a keletkező elegy formázásával.

A bőrre történő helyi adagolásra megfelelő gyógyászati készítmények előnyösen kenőcs, krém, lemosó, paszta, gél, spray, aeroszol vagy olaj formában vannak. Az alkalmazható vivőanyagok közé tartozik a petróleum zselé (például a vazelin), a lanolin, polietilén-glikolok, alkoholok és ezek közül kettő vagy több kombinációi. A hatóanyag általában a készítmény tömegére számított 0,1-50 tömeg%, például 0,5-2 tömeg% koncentrációban van jelen.

Lehetséges a bőrön keresztüli adagolás is. Bőrön keresztüli adagolásra megfelelő gyógyászati készítmények előállíthatók olyan különálló tapaszok formájában, amelyek a kezelt személy epidermiszével hosszabb időtartamon keresztül érintkezésben maradnak. Ilyen tapaszok megfelelően tartalmazzák az adott esetben puffert, vizes oldatban lévő, egy ragasztóanyagban feloldott és/vagy diszpergált vagy egy polimerben diszpergált találmány szerinti vegyületet. A hatóanyag megfelelő koncentrációja körülbelül 1-35 %, előnyösen körülbelül 3-15 %. Egy konkrét lehetőségként a vegyület eljuttatható a tapaszból elektron transzporttal vagy iontoforézissel, amelyet például a Pharmaceu-

tical Research, **3** (6), 318 (1986.) szakirodalmi helyen ismertetnek.

Bármely esetben, az egységdózis kiszerelés előállítása érdekében a vivőanyagokkal kombinálható hatóanyag mennyisége a kezelt személytől és az adagolás konkrét módjától függően változó.

Az orális adagolásra alkalmas szilárd dózisformák, így a fent említett kapszulák, tabletták, pirulák, porok, zselatin kapszulák és granulátumok egy vagy több találmány szerint alkalmazható vegyületet legalább egy közömbös hígítóanyaggal, így például szacharózzal, laktózzal vagy keményítővel keverve tartalmaznak. Ilyen dózisformák az általános gyakorlat szerint további, a közömbös hígítóanyagoktól eltérő anyagokat, így például kenőanyagokat, például magnézium-sztearátot vagy oldódást elősegítő anyagokat, így például ciklodextrineket is tartalmazhatnak. A kapszulák, tabletták, porok, granulátumok, zselatin kapszulák és pirulák esetében a dózisforma pufferanyagokat is tartalmazhat. A tabletták és pirulák elláthatók továbbá bélben oldódó bevonatokkal.

Az orális adagolású folyékony dózisformák lehetnek gyógyászatilag elfogadható emulziók, oldatok, szuszpenziók, szirupok és elixírek, amelyek a szakterületen általában alkalmazott közömbös hígítószerkeket, így például vizet tartalmaznak. Ilyen készítmények tartalmazhatnak adjuván-sokat, így például nedvesítőszerkeket, emulgeálószerkeket és szuszpendálószerkeket, édesítőszerkeket, ízesítőszerkeket és illatanyagokat is.

Injektálható készítmények, például steril injektálható vizes vagy olajos szuszpenziók kisserelhetők a szakterületen ismert eljárások szerint, megfelelő diszpergáló- vagy fixáló- és szuszpendálószer alkalmazásával. A megfelelő injektálható készítmény lehet egy nemtoxikus parenterális adagolásra elfogadható hígítóanyagban vagy oldószerben levő steril injektálható oldat vagy szuszpenzió, például 1,3-butándiolban képzett oldat formájában is. Az alkalmazható vivőanyagok és oldószer a víz, a Ringer-féle oldat és az izotón nátrium-klorid-oldat. Továbbá, általában alkalmaznak steril, rögzített olajokat oldószerként vagy szuszpendáló közegként. Erre a célra bármely fertőtlenített, rögzített olaj alkalmazható, ezen belül szintetikus mono- és digliceridek. Továbbá injektálható készítmények előállításában zsírsavak, így például oleinsav alkalmazhatók.

A gyógyászati lag elfogadható vivőanyagként az összes előbb említett anyag (és az azokhoz hasonló természetű anyagok) alkalmazható.

Kombinációs terápiában a találmányban alkalmazható terápiás szerek közül két vagy több adagolása történhet egymást követően különálló kisserelésekben vagy végrehajtható egyidejű adagolással egységes kisserelésben vagy különálló kisserelésekben. Az adagolás történhet orális úton vagy intravénás, izomba adott vagy bőr alá adott injekcióval. A kisserelés lehet nagy (bolus) injekció formájában vagy vizes vagy nem-vizes izotón steril injekció oldatok vagy szuszpenziók formájában. Ezek az oldatok és szuszpenziók

előállíthatók egy vagy több gyógyászatiilag elfogadható vivőanyagot, hígítóanyagot vagy kötőanyagot, így például zselatint vagy hidroxipropilmetilcellulózt egy vagy több kenőanyaggal, tartósítószerrel, felületaktív anyaggal vagy diszpergálószerrel együtt tartalmazó steril porokból vagy granulátumokból.

Orális adagolás esetében a gyógyászati készítmény lehet például tabletták, kapszula, szuszpenzió vagy folyadék formájú. A kapszulák, tabletták, stb. a szakterületen jól ismert, hagyományos eljárásokkal állíthatók elő. A gyógyászati készítményt előnyösen a hatóanyag vagy hatóanyagok meghatározott mennyiségét tartalmazó dózisegység formájában állítjuk elő. A dózisegységekre példák a tabletták vagy a kapszulák. Ezek előnyösen a fent leírt mennyiségben egy vagy több terápiás vegyületet tartalmaznak. Például egy CETP-inhibitor esetében a dózistartomány lehet körülbelül 0,01-500 mg/nap vagy - a specifikus inhibitortól függően - bármely más dózis, amint az a szakterületen ismert.

Egy fibrinsav-származék esetében a dózis lehet körülbelül 0,01-500 mg vagy - a specifikus inhibitortól függően - bármely más dózis, amint az a szakterületen ismert.

A hatóanyagok adagolhatók injekcióval olyan készítményként, amelyben megfelelő vivőanyagként például sóoldat, dextróz vagy víz alkalmazható. Minden terápiás hatóanyagra megfelelő napi dózis az a mennyiség, amellyel azonos vérsavó hatóanyag-koncentráció érhető el, mint a fentebb ismertetett orális adagolás útján.

A terápiás vegyületek adagolhatók továbbá az orális-orális, az orális-parenterális vagy a parenterális-parenterális adagolási módok bármely kombinációjaként.

A gyógyászati készítmények adagolhatók orális formában vagy intravénás adagolással a találmány szerinti kezelési eljárásokban való alkalmazásra. Előnyös az orális adagolású kombinációs terápia. Az orális adagolás dózisa megvalósítható olyan adagolási renddel, amely egyszeri napi dózist, vagy minden másnap egyszeri dózist igényel, vagy napközben több, szétosztott dózist igényel. A kombinációs terápiát alkotó terápiás vegyületek adagolhatók egyidejűleg, akár kombinált dózisformában, akár elkülönült, lényegében egyidejű orális adagolásra szánt dózisformákban. A kombinációs terápiát alkotó terápiás vegyületek adagolhatók egymást követően, együtt valamely kétlépéses lebomlást igénylő adagolási rend szerint adagolt terápiás vegyülettel. Ezáltal az adagolási rend a terápiás vegyületek egymást követő adagolását követelheti meg a különálló hatóanyagok szétosztott lebontásával. A több lebontási lépés közötti időtartam néhány perctől több óráig terjedhet, az egyes terápiás vegyületek tulajdonságaitól, így például erősségtől, oldhatóságtól, biológiai hozzáférhetőségtől, vérsavó felezési időtől és a terápiás vegyület kinetikai profiljától, továbbá az étel emésztésének hatásától és a kezelt személy életkorától és állapotától függően. A célmolekula koncentrációjának 24 órás változása szintén meghatározhatja az optimális dózis adagolási időközt. A kombinált terápia terápiás vegyületei attól függően, hogy

egyidejűleg, lényegében egyidejűleg vagy egymást követően kerülnek adagolásra olyan adagolási rendet eredményezhetnek, amely egy terápiás vegyület orális úton történő adagolását és egy másik terápiás vegyület intravénás adagolását teszi szükségessé. Attól függően, hogy a kombinált terápia terápiás vegyületeit orális vagy intravénás úton, külön vagy együtt adagoljuk, minden ilyen terápiás vegyület gyógyászatilag elfogadható töltőanyagokból, hígítóanyagokból vagy más kisserelési összetevőkből álló, megfelelő gyógyászati kisserelésben van. A terápiás vegyületeket tartalmazó, megfelelő, gyógyászatilag elfogadható kissereléseket fent ismertettük.

A következőkben ismertetjük a találmány szerinti kezelési rendet. Számos tényező szerint választható ki az az adagolási rend, amely megakadályozza, megszünteti vagy enyhíti a hiperlipémiás rendellenes állapotot, mint például az érszűkület egy elemét vagy amely védelmet nyújt a koleszterin magas plazma- vagy vér-koncentrációja ellen vagy a találmány szerinti vegyületek és/vagy készítmények alkalmazásával azokat kezeli. Ezen tényezők közé tartozik a kezelt személy típusa, életkora, testtömege, neme, étrendje és egészségi állapota, a betegség súlyossága, az adagolási mód, farmakológiai megfontolások, így például a konkrét alkalmazott vegyület aktivitása, hatásossága, farmakokinetikai és toxikológiai profilja, az, hogy hatóanyag szállítási rendszert alkalmazunk-e és hogy az adagolt vegyület egy hatóanyag kombináció része-e. Ezért a konkrétan alkalmazott adagolási rend széles körben változ-

tatható, és a fent meghatározott előnyös adagolási rendtől eltérhet.

Hiperlipidémiás állapottól szenvedő beteg kezdeti kezelése a fentiekben ismertetett dózisokkal kezdődhet. A kezelésnek általában szükség szerint több hetes - több hónapos vagy éves időtartamon keresztül kell tartania, amíg a hiperlipidémiás állapot csökken vagy megszűnik. Az itt ismertetett vegyületekkel vagy készítményekkel kezelt személyeket rendszeresen ellenőrizhetjük, például a vérsavó LDL és az összkoleszterin szintek a szakterületen ismert bármely eljárással való mérésével, a kombinációs terápia hatásosságának meghatározása érdekében. Az ilyen adatok folyamatos elemzése lehetővé teszi a kezelési rend módosítását a terápia alatt annak érdekében, hogy minden időpontban minden terápiás vegyület optimális mennyiségét adagoljuk, és annak érdekében, hogy a kezelés időtartama is megállapítható legyen. Így a kezelési rend/adagolási beosztás ésszerűen módosítható a terápia alatt annak érdekében, hogy a terápiás vegyületek azon legalacsonyabb mennyiségét adagoljuk, amelyek kielégítő hatásosságot mutatnak és annak érdekében, hogy az adagolás csak addig tartson, amíg az a hiperlipidémiás állapot sikeres kezelése érdekében szükséges.

Az itt ismertetett kombináció jelentős előnye lehet a hiperlipidémiás állapotok, így például érszűkület és hiperkoleszterinémia kezelésében hatásos egyes terápiás vegyületek vagy az összes terápiás vegyület mennyiségének csökkentése.

A találmány egy kiviteli alakja kombinációs terápiát ismertet, amelyben egy CETP-inhibitor első mennyiségét és egy más, hiperlipidémia vagy érszűkület megelőzésében vagy kezelésében alkalmazható, szív-érrendszeri terápiás vegyület második mennyiségét alkalmazzuk, ahol az első és a második mennyiségek együtt a szóban forgó vegyületek hiperlipidémiás állapot ellen hatásos mennyiségét vagy érszűkület ellen hatásos mennyiségét képzik. A találmány számos kiviteli alakja közül egy példa egy fibrinsav-származék és egy CETP-inhibitor terápiás dózisait tartalmazó kombinációs terápia.

A találmány szerinti kiviteli alakok magukban foglalhatnak két vagy több, itt ismertetett vagy a találmány tárgyi körébe utalt terápiás vegyületet alkalmazó kombinációs terápiát. A kombinációs terápia szerint két vagy több, különböző kémiai vegyületcsoportból származó terápiás vegyületből állhat, például fibrinsav-származékokból és CETP-inhibitorokból terápiás kombináció hozható létre. A terápiás kombinációk kettőnél több terápiás vegyületet tartalmazhatnak. Például a terápia állhat egy fibrinsav-származék, egy CETP-inhibitor és egy HMG CoA reduktáz inhibitor alkalmazásából. Alternatív megoldásként a terápia két vagy több, azonos kémiai csoportba tartozó terápiás vegyületből állhat, ilyen a két vagy több fibrinsav-származékot vagy két vagy több CETP-inhibitort tartalmazó kombinációs terápia.

A találmány egy további kiviteli alakja az itt ismertetett szív-érrendszeri kombinációs terápiák bármelyikének

alkalmazása hiperkoleszterinémia, érszűkület vagy hiperlipidémia megelőzésére vagy kezelésére.

A következő, nem korlátozó értelmű példák a találmány számos vonatkozásának szemléltetésére szolgálnak.

Példák

A 3. táblázat a találmány azon nagyszámú kombinációi közül ismerteti néhányat, amelyben a kombinációs készítmény egy CETP-inhibitor első mennyiségét és egy fibrinsav-származék második mennyiségét tartalmazza, ahol az első és második mennyiségek együtt a szóban forgó vegyületek hiperlipidémiás állapot ellen hatásos mennyiségét vagy érszűkület ellen hatásos mennyiségét képezik.

3. táblázat

A példa sorszáma	1. komponens	2. komponens
1.	C-1	klofibrát
2.	C-2	klofibrát
3.	C-3	klofibrát
4.	C-4	klofibrát
5.	C-5	klofibrát
6.	C-6	klofibrát
7.	C-7	klofibrát
8.	C-8	klofibrát
9.	C-9	klofibrát
10.	C-10	klofibrát
11.	C-11	klofibrát
12.	C-12	klofibrát
13.	C-13	klofibrát
14.	C-14	klofibrát
15.	C-15	klofibrát
16.	C-16	klofibrát
17.	C-17	klofibrát
18.	C-18	klofibrát
19.	C-19	klofibrát
20.	C-20	klofibrát
21.	C-1	fenofibrát
22.	C-2	fenofibrát

A példa sorszáma	1. komponens	2. komponens
23.	C-3	fenofibrát
24.	C-4	fenofibrát
25.	C-5	fenofibrát
26.	C-6	fenofibrát
27.	C-7	fenofibrát
28.	C-8	fenofibrát
29.	C-9	fenofibrát
30.	C-10	fenofibrát
31.	C-11	fenofibrát
32.	C-12	fenofibrát
33.	C-13	fenofibrát
34.	C-14	fenofibrát
35.	C-15	fenofibrát
36.	C-16	fenofibrát
37.	C-17	fenofibrát
38.	C-18	fenofibrát
39.	C-19	fenofibrát
40.	C-20	fenofibrát
41.	C-1	ciprofibrát
42.	C-2	ciprofibrát
43.	C-3	ciprofibrát
44.	C-4	ciprofibrát
45.	C-5	ciprofibrát
46.	C-6	ciprofibrát
47.	C-7	ciprofibrát
48.	C-8	ciprofibrát
49.	C-9	ciprofibrát
50.	C-10	ciprofibrát
51.	C-11	ciprofibrát
52.	C-12	ciprofibrát
53.	C-13	ciprofibrát
54.	C-14	ciprofibrát
55.	C-15	ciprofibrát
56.	C-16	ciprofibrát
57.	C-17	ciprofibrát
58.	C-18	ciprofibrát
59.	C-19	ciprofibrát
60.	C-20	ciprofibrát
61.	C-1	bezafibrát
62.	C-2	bezafibrát
63.	C-3	bezafibrát
64.	C-4	bezafibrát
65.	C-5	bezafibrát
66.	C-6	bezafibrát
67.	C-7	bezafibrát
68.	C-8	bezafibrát
69.	C-9	bezafibrát
70.	C-10	bezafibrát
71.	C-11	bezafibrát
72.	C-12	bezafibrát
73.	C-13	bezafibrát
74.	C-14	bezafibrát
75.	C-15	bezafibrát



A példa sorszama	1. komponens	2. komponens
76.	C-16	bezafibrát
77.	C-17	bezafibrát
78.	C-18	bezafibrát
79.	C-19	bezafibrát
80.	C-20	bezafibrát
81.	C-1	gemfibrozil
82.	C-2	gemfibrozil
83.	C-3	gemfibrozil
84.	C-4	gemfibrozil
85.	C-5	gemfibrozil
86.	C-6	gemfibrozil
87.	C-7	gemfibrozil
88.	C-8	gemfibrozil
89.	C-9	gemfibrozil
90.	C-10	gemfibrozil
91.	C-11	gemfibrozil
92.	C-12	gemfibrozil
93.	C-13	gemfibrozil
94.	C-14	gemfibrozil
95.	C-15	gemfibrozil
96.	C-16	gemfibrozil
97.	C-17	gemfibrozil
98.	C-18	gemfibrozil
99.	C-19	gemfibrozil
100.	C-20	gemfibrozil
101.	C-1	klinofibrát
102.	C-2	klinofibrát
103.	C-3	klinofibrát
104.	C-4	klinofibrát
105.	C-5	klinofibrát
106.	C-6	klinofibrát
107.	C-7	klinofibrát
108.	C-8	klinofibrát
109.	C-9	klinofibrát
110.	C-10	klinofibrát
111.	C-11	klinofibrát
112.	C-12	klinofibrát
113.	C-13	klinofibrát
114.	C-14	klinofibrát
115.	C-15	klinofibrát
116.	C-16	klinofibrát
117.	C-17	klinofibrát
118.	C-18	klinofibrát
119.	C-19	klinofibrát
120.	C-20	klinofibrát
121.	C-1	binifibrát
122.	C-2	binifibrát
123.	C-3	binifibrát
124.	C-4	binifibrát
125.	C-5	binifibrát
126.	C-6	binifibrát

A példa sorszáma	1. komponens	2. komponens
127.	C-7	binifibrát
128.	C-8	binifibrát
129.	C-9	binifibrát
130.	C-10	binifibrát
131.	C-11	binifibrát
132.	C-12	binifibrát
133.	C-13	binifibrát
134.	C-14	binifibrát
135.	C-15	binifibrát
136.	C-16	binifibrát
137.	C-17	binifibrát
138.	C-18	binifibrát
139.	C-19	binifibrát
140.	C-20	binifibrát

Biológiai vizsgálatok

A találmány szerinti kombinációk alkalmazhatóságát a következő vizsgálatok segítségével mutathatjuk be. Ezeket a vizsgálatokat *in vitro* és állatmodellekben hajtjuk végre, lényegében a találmány alkalmazhatóságának bemutatására alkalmasként elfogadott eljárások segítségével.

H14 sejtekben IBAT-közvetített ¹⁴C-taurokolát (TC) felvételt gátló vegyületek *in vitro* vizsgálata

Emberi IBAT cDNS-sel (H14 sejtekkel) keresztfertőzött (a továbbiakban: transzfektált) újszülött hörcsög vesesejteket (BHK) 96-üregű Top-Count szövettenyészet tálcákon beoltunk 60000 sejt/üreg mennyiségben a beoltástól számított 24 órán belüli vizsgálatokhoz, 30 000 sejt/üreg mennyiségben 48 órán belüli vizsgálatokhoz és 10 000 sejt/üreg mennyiségben 72 órán belüli vizsgálatokhoz.

A vizsgálat napján a sejt monoréteget 100 µl vizsgálati pufferrel (Dulbecco-féle módosított Eagle-közeg, 4,5 g/liter glükózzal és 0,2 vegyes% zsírsavmentes szarvasmarha szérum albuminnal (FAF)BSA kíméletesen egyszer mossuk.

Minden titráló üreghez 50 μ l kétszeres koncentrációjú, vizsgálati pufferben lévő tesztvegyületet és 50 μ l vizsgálati pufferben lévő 6 μ M [14 C]-taurokolátot (a [14 C]-taurokolát végső koncentrációja 3 μ M) adunk. A sejttenyészet tálcákat 2 óráig 37 °C hőmérsékleten inkubáljuk, majd minden titráló üreget 100 μ l 4 °C hőmérsékletű, 0,2 vgyes% (FAF)BSA-t tartalmazó Dulbecco-féle foszfát-puffert tartalmazó sóoldattal (PBS) kétszer mosunk. A titráló üregeket még egyszer 100 μ l 4 °C hőmérsékletű (FAF)BSA-mentes PBS-tal mossuk. Mindegyikhez 200 μ l folyadék szcintillációs számláló folyadékot adunk, a tálcákat hegesztőzárral lezárjuk és 30 percig szobahőmérsékleten rázzuk, majd a radioaktivitást minden titráló üregben Packard Top-Count számláló készülékkel mérjük.

A [14 C]-alanin felvételt gátló vegyületek in vitro vizsgálata

Az alanin-felvétel vizsgálatot azonos módon hajthatjuk végre, mint a taurokolát-vizsgálatot, azzal az eltéréssel, hogy a jelzett taurokolátot jelzett alaninra cseréljük.

A patkány csípőbél [14 C]-taurokolát epébe történő felvételét gátló vegyületek in vivo vizsgálata

(Lásd: "Metabolism of 3 α ,7 β -dihidroxy-7 α -methyl-5 β -cholanoic acid and 3 α ,7 β -dihidroxy-7 α -methyl-5 β -cholanoic acid in hamsters" in Biochimica et Biophysica Acta, **833**, 196-202 (1985) by Une et al. szakirodalmi hivatkozást, amelyre ezúton referenciaként hivatkozunk.)

Hím Wistar patkányokat (testtömegük: 200-300 g) inaktin 100 mg/kg dóziséval altatjuk. Az epevezetéseket 10"

hosszúságú PE10-csővel kanülezzük. A vékonybelet kihelyez-
zük és fátýolszövet párnára kífektetjük. A kanült (1/8"
luer zár, kúpos belső csavarmenetes adapter) a vékonybél
és a cecum kapcsolódásától számított 12 cm-nél beilleszt-
jük. Hasadékot metszünk 4 cm-re ettől a csatlakozástól (a
csípőbél 8 cm hosszúságú darabját alkalmazzuk). 20 ml pH =
6,5 kémhatású Dulbecco-féle foszfát-pufferolt sóoldatot
(PBS) alkalmazunk a bél-szegmens kiöblítésére. A távoli
nyílást 20 cm hosszúságú szilikoncsővel (0,02" belső átmé-
rő x 0,037" külső átmérő) kanülezzük. A közeli kanült pe-
risztaltikus szivattyúra akasztjuk, és a belet 20 percig
0,25 ml/perc áramlási sebességű meleg PBS-tal mossuk. A
bél-szegmens hőmérsékletét folyamatosan figyelemmel kísér-
jük. A kísérlet kezdetekor 3 ml ürtartalmú fecskendővel
2,0 ml kontroll mintát ($[^{14}\text{C}]$ -taurokolát 0,05 mCi/ml és 5 mM
nem-radiojelzett taurokolát) töltünk a bél-szegmensbe és
az epeminta gyűjtést elkezdjük. A kontroll mintát 0,25
ml/perc áramlási sebességgel 21 percig infúzióval adagol-
juk. Az epeminta frakciókat minden 3 percben gyűjtjük az
eljárás első 27 percére. A minta infúzió 21. perce után a
csípőbél hurkot 20 ml meleg PBS-tal kimossuk (30 ml-es
fecskendő alkalmazásával), majd a hurkot 21 percig meleg
PBS-tal 0,25 ml/perc áramlási sebességgel kimossuk. A má-
sodik perfúziót a fentiek szerint kezdjük, de tesztvegyü-
letet is adagolunk (21 perc adagolás, majd 21 perc kimo-
sás), és az epét minden 3 percben gyűjtjük az első 27
percre. Szükség esetén harmadik perfúziót is végrehajtunk

a fentiek szerint, amely tipikusan a kontroll mintát tartalmazza.

**A májbeli (hepatikus) koleszterin koncentráció
(HEPATIC CHOL) mérése**

A májszövet tömegét megmérjük, és 2:1 arányú kloroform-metanol elegyében homogenizáljuk. Homogenizáció és centrifugálás után a felülúszót elválasztjuk és nitrogén-gáz alatt szárítjuk. A maradékot izopropanolban feloldjuk, és a koleszterin tartalmat enzimatikusan mérjük, a koleszterin oxidáz és peroxidáz kombinációjának alkalmazásával, amint azt Allain, C. A. és munkatársai a Clin. Chem., **20**, 470 (1974.) szakirodalmi helyen ismertetik (amelyre ezúton referenciaként hivatkozunk).

Máj HMG CoA-reduktáz aktivitás (HMG COPA) mérése

Máj mikroszómákat állítunk elő májminták foszfát-szacharóz pufferben való homogenizálásával, majd centrifugális elválasztással. A végső centrifugált anyagot pufferben újra szuszpendáljuk, és egy alikvotot vizsgálunk HMG-CoA reduktáz aktivitásra 60 percig 37 °C hőmérsékleten ¹⁴C-HMG-CoA (Dupont-NEN) jelenlétében való inkubálással. A reakciót 6 N-os HCl hozzáadásával leállítjuk, majd az elegyet centrifugáljuk. A felülúszó egy alikvotját vékonyréteg-kromatográfiás eljárással elválasztjuk, és az enzimterméknek megfelelő terméket a lapról lekaparjuk, extraháljuk és a radioaktivitást szcintillációs számláló segítségével meghatározzuk [Hivatkozás: Akerlund, J. és Bjorkhem, I., J. Lipid Res., **31**, 2159 (1990.)].

A vérsavó koleszterin meghatározása (SER.CHOL, HDL-CHOL, TGI és VLDL + LDL)

A vérsavó-összkoleszterint (SER.CHOL) enzimatis úton mérjük, a Wako fine Chemicals vállalat (Richmond, VA) által forgalmazott kereskedelmi forgalomban levő készlet alkalmazásával (Cholesterol C11, katalógusszám 276-64909). A VLDL és LDL kicsapása után a HDL-koleszterint (HDL-CHOL) ugyanezen készlet alkalmazásával mérjük a Sigma Chemical vállalat által forgalmazott HDL koleszterin reagens (katalógusszám: 352-3) alkalmazásával (dextrán-szulfát eljárás). A vérsavó-össz-triglicerideket (kontroll nélküli vizsgálat) (TGI) enzimatis úton a Sigma Chemical vállalat által forgalmazott GPO-Trinder alkalmazásával (katalógusszám: 337-B) mérjük. A VLDL és LDL (VLDL + LDL) koleszterin koncentrációkat az össz- és a HLD koleszterin koncentrációja különbségeként számítjuk.

A májbeli koleszterin 7 α -hidroxiláz aktivitás (7 α -OHase) mérése

Máj mikroszómákat állítunk elő májminták foszfát-szacharóz pufferben történő homogenizálásával, majd centrifugálás elválasztással. A végső centrifugált anyagot pufferben újrasszuszpendáljuk és egy alikvotot 5 percig 37 °C hőmérsékleten NADPH jelenlétében történő inkubálással vizsgálunk koleszterin 7 α -hidroxiláz aktivitásra. Petróleum-éterbe történő extrakció után a szerves oldószert bepároljuk, és a maradékot acetonitril-metanol elegyében feloldjuk. Az enzimatis terméket az extraktum egy alikvotjának C-18 fordított fázisú HPLC oszlopra történő injektá-

lásával és az eluált anyag 240 nm hullámhossznál UV detektorral végrehajtott kvantitatív elemzésével elválasztjuk. [Hivatkozás: Horton, J. D. és munkatársai: J. Clin. Invest. **93**, 2084 (1994.)].

Az ürülékben lévő epesav koncentráció (FBA) mérése

Egyenként elhelyezett patkányokból származó ürülék teljes mennyiségét 24 vagy 48 óra időtartamban összegyűjtjük, nitrogéngáz áramban szárítjuk, porítjuk és tömegét mérjük. Körülbelül 0,1 g-ot kimérünk és szerves oldószerbe (butanol-víz) extraháljuk. Elválasztás és szárítás után a maradékot metanolban feloldjuk és a jelenlévő epesav mennyiségét enzimatis úton mérjük, az epesav 3 α -hidroxiszteroid szteroid-dehidrogenázsal a NAD redukálását eredményező reakciójának alkalmazásával [lásd: Mashige, F. és munkatársai: Clin. Chem., **27**, 1352 (1981.), amelyre ezúton referenciaként hivatkozunk].

[³H]-taurokolát felvétel nyúl kefeszegély membrán vezikulumokban (BBMV)

Nyúl csípőből kefeszegély membránokat állítunk elő fagyasztott csípőből nyálkahártyából a Malathi és munkatársai által a Biochimica Biophysica Acta, **554**, 259 (1979.) szakirodalmi helyen (amelyre ezúton referenciaként hivatkozunk) ismertetett kalcium kicsapásos eljárással. A taurokolát mérésére irányuló eljárás lényegében megegyezik a Kramer és munkatársai által Biochimica Biophysica Acta, **1111**, 93 (1992.) szakirodalmi helyen (amelyre ezúton referenciaként hivatkozunk) ismertetett eljárással, azzal az eltéréssel, hogy a vizsgálati mennyiség 200 μ l 100 μ l he-

lyett. Röviden, szobahőmérsékleten 190 μ l, 2 μ M [3 H]-taurokolátot (0,75 μ Ci), 20 mM trisz-puffert, 100 mM NaCl-ot, 100 mM pH=7,4 kémhatású mannitot tartalmazó oldatot 5 másodpercig 10 μ l kefeszegély membrán vezikulumokkal (60-120 μ g protein) inkubálunk. Az inkubációt a BBMV hozzáadásával kezdjük keverés közben, és a reakciót 5 ml jéghideg puffer (20 mM HEPES-trisz, 150 mM KCl) hozzáadásával, majd azonnal nylon szűrő (pórusméret: 0,2 μ m) alkalmazásával való szűréssel és további 5 ml leállító pufferrel való mosással állítjuk le.

Acyl-CoA; Koleszterin acil transzferáz (ACAT)

Hörcsög máj és patkány bél mikroszómákat állítunk elő szövetekből, korábban a J. Biol. Chem., **255**, 9098 (1980.) szakirodalmi helyen (amelyre ezúton referenciaként hivatkozunk) ismertetett eljárással, és ACAT-enzim forrásként alkalmazzuk azokat. A vizsgálat 50 mM-os nátrium-foszfátban lévő, 24 μ M oleoil-CoA-t (0,05 μ Ci), 2 mM pH=7,4 kémhatású, 0,25 BSA-t és (200 μ g mikroszómás proteint tartalmazó) DTT-puffert tartalmazó 2 ml vizsgálati folyadék inkubálásából áll. A vizsgálatot az oleoil-CoA hozzáadásával kezdjük. A reakció 5 percig 37 °C hőmérsékleten tart, és 8,0 ml 2:1 arányú kloroform - metanol hozzáadásával állítjuk le azt. Az extraktumhoz 125 μ g kloroform - metanol elegyében képzett koleszterin-oleátot adunk vivőanyagként, és az extraktum szerves és vizes fázisait alapos örvénykeverés (vortex) utáni centrifugálással elválasztjuk. A kloroformos fázist szárítjuk, szilikagél-60-TLC lapra csepentjük és 9:1 arányú hexán - etil-éter alkalmazásával

kromatografáljuk. A keletkező koleszterin-észter mennyiségét a TLC-lapon lévő koleszterin-oleát folt radioaktivitása Packard Instaimager alkalmazásával történő mérésével határozzuk meg.

Kutya-modell lipidcsökkentő hatóanyagok értékelésére

Hím vadászkopó fajtájú kutyaakat (amelyeket a Marshall farmoktól szereztünk be és testtömegük 6-12 kg) naponta 2 óráig táplálunk és vízzel igény szerint látjuk el. A kutyaakat véletlenszerűen sorolhatjuk adagolási csoportokba, amelyek mindegyike 6-12 kutyából áll a következők szerint: vivőanyag gyomorszájba adagolással; 1 mg/kg hatóanyag gyomorszájba adagolással; 2 mg/kg hatóanyag gyomorszájba adagolással; 4 mg/kg hatóanyag gyomorszájba adagolással; 2 mg/kg hatóanyag kapszulában lévő por adagolásával. Vizes oldatban (például 0,2 % Tween 80 oldat, polioxietilén-monooleát, Sigma Chemical vállalat, St. Louis, MO) oldott terápiás anyag gyomorba adagolását kivitelezhetjük gyomorszájon át tápláló cső alkalmazásával. Az adagolás megkezdése előtt, reggel etetés előtt vérmintát vehetünk a fej-erőérből a vérsavó koleszterin (össz- és HDL) és trigliceridszint mérése érdekében. Több egymást követő napon a hatóanyagokat reggel, etetés előtt adagoljuk az állatoknak. Az állatokat 2 óráig engedjük táplálkozni, mielőtt minden maradék ételt elvonunk. Az ürüléket a vizsgálat végén 2 nap alatt összegyűjtjük és epesav- vagy lipid-tartalomra elemezhetjük. A kezelési periódus végén vérmintákat is veszünk a vérsavó lipidszintek előzetes vizsgálatával való összehasonlításra. A statisztikai szignifikancia ér-

téket az általános Student-féle T-próba alkalmazásával határozzuk meg, $p < 0,05$ szignifikancia értékkel.

Kutya vérsavó-lipid mérés

Koplaltatott kutyák fejverőeréből vérmintát gyűjtünk vérsavó-elválasztó csövekbe (Vacutainer SST, Becton Dickonson and Co., Franklun Lakes, NJ). A vért 2000 fordulat/perc fordulatszám mellett 20 percig centrifugáljuk és a vérsavót dekantáljuk.

Az összkoleszterint 96 üregű titrálótálcán mérhetjük Wako enzimatikus diagnózis készlet (Koleszterin-CII) (Wako Chemicals Vállalat, Richmond, VA) alkalmazásával, koleszterin oxidáz reakció alkalmazásával, amely hidrogén-peroxidot termel, amelyet kolorimetriásan mérünk. A tálca első két oszlopáról 0,05-10 ng koleszterin értékek között standard görbét állítunk elő. Megkettőzve a vérsavó mintákat (20-40 μ l a várt lipid koncentrációtól függően) vagy ismert vérsavó kontroll mintákat adunk hozzá az üregek elválasztására. Vizet adunk hozzá, így minden egyes üreg térfogatát 100 μ l-re állítjuk be. A színreagens 100 μ l-es alikvotját adjuk minden üreghez, és a tálcákat 500 nm hullámhossznál 37 °C hőmérsékleten történő 15 perc inkubáció után mérjük.

A HDL koleszterint a Sigma-készlet (sorozatszám: 352-3; Sigma Chemical vállalat, St. Louis, MO) alkalmazásával vizsgálhatjuk, amely dextrán-szulfát és magnézium-ionokat alkalmaz, az LDL és a VLDL szelektív kicsapására. Minden egyes vérsavó minta 150 μ l-ét adunk az egyes mikrotitráló csövekhez, majd 15 μ l HDL koleszterin-reagenst (Sigma, so-

rozatszám: 352-3) adunk hozzájuk. A mintákat keverjük és 5000 fordulat/perc fordulatszám mellett 5 percig centrifugáljuk. A felülúszó 50 μ l alikvotját 200 μ l sóoldattal keverjük és az összkoleszterin mérésére alkalmazott eljárással azonos eljárás szerint vizsgáljuk.

A triglicerideket a 337. sorozatszámú Sigma-készlet alkalmazásával, 96-üregű titráló tálcán mérjük. Az eljárás a glicerint méri a trigliceridek lipoprotein-lipázzal való reakciójának következtében felszabadulása után. A standard görbe előállítására a glicerint 1-24 ng-ig terjedő standard oldatait (Sigma, sorozatszám: 339-11) alkalmazzuk. Vérsavó mintákat (20-40 μ l a várt lipidkoncentrációtól függően) adunk az üregekhez (duplikálva). Vizet adunk az üregekhez, így azok térfogatát 100 μ l-re állítjuk be, és 100 μ l szín reagenst is adunk minden üreghez. Keverés és 15 perc inkubáció után a tálcákat 540 nm hullámhosszon mérjük és a triglicerid-értékeket a standard görbéből számítjuk. Ismétlési tálcát is reagáltatunk vak enzim reagens alkalmazásával, így a vérsavó mintákban az endogén glicerint korrigáljuk.

Kutya ürülék-epesav mérés

Ürülékmintákat gyűjtünk az állatok ürülék-epesav (FBA) koncentrációjának meghatározására. Az ürülékmintákat a vizsgálat utolsó 48 órájában gyűjtjük 2 egymást követő 24 órás időtartamra, mindkét napon reggel 9 és 10 óra között, a hatóanyag adagolását és az etetést megelőzően. Az elválasztott, 2 napra vonatkozó állatonként gyűjtött minták tömegét mérjük, a mintákat egyesítjük és feldolgozó készü-

lékben (Cuisinart) desztillált vízzel homogenizáljuk, így homogén zagyot állítunk elő. A homogenizátum körülbelül 1,4 g mennyiségét 50 %-os végső koncentrációjú 2:0,6 arányú tercier-butanol - desztillált víz elegyben 45 percig 37 °C-os vízfürdőben extraháljuk és 13 percig 2000 g érték mellett centrifugáljuk. Az epesavak koncentrációját (mmol/nap) meghatározhatjuk 96 üregű enzimatikus vizsgálati rendszer (1,2) alkalmazásával. Az ürülék extraktum 20 µl alikvotját adjuk két sorozathoz, amelyek mindegyike háromszorozott üregekben van 96-üregű vizsgálati tálcán. Standardizált nátrium-tauroklorát-oldatot és standardizált ürülék extraktum-oldatot (amelyet előzőleg összegyűjtött mintákból állítottunk elő és annak epesav koncentrációjára nézve elemeztünk) szintén elemzünk a vizsgálat minőségi ellenőrzése érdekében. Standard görbe előállítása érdekében sorozatban hígított, 20 µl nátrium-tauroklorát alikvotokat hasonlóan adunk a háromszorozott üregek két sorozatához. Minden titráló üreghez 1 M-os hidrazin-hidrátot, 0,1 M-os pirofoszfátot és 0,46 mg/ml NAD-ot tartalmazó 230 µl reakcióelegyet adunk. Ezután 50 µl 3α-hidroxiszteroid dehidrogenáz enzim (HSD; 0,8 egység/ml) alikvotot vagy vizsgálati puffert (0,1 M-os nátrium-pirofoszfát) adunk a megháromszorozott minták két sorozata közül az egyikhez. Minden reagenst a Sigma Chemical vállalattól (St. Louis, MO) szerezhethünk be. 60 perc szobahőmérsékleten végrehajtott inkubáció után az optikai sűrűséget 340 nm-nél mérjük és minden egyes megháromszorozott mintasorozat középértékét számítjuk. AZ optikai sűrűség ± HSD enzim különbségét

alkalmazzuk az epesav koncentráció (mM) meghatározására minden egyes minta esetében a nátrium-tauroklorát standard görbe alapján. Minden állatra az extraktum epesav-koncentrációját, az ürülék-homogenizátum tömegét (gramm) és az állat testtömegét használjuk a megfelelő FBA koncentráció (mmol/kg/nap) számítására. A kontroll csoport (vivőanyag-gal kezelt) FBA-koncentrációjának (mmol/kg/nap) középértékét kivonjuk minden kezelési csoport FBA-koncentrációjából a kezelés eredményekénti FBA-koncentráció-növekedés (delta-érték) meghatározására.

CETP aktivitás vizsgálat emberi vérsavóban (trícium-tartalmú koleszteril-észter)

Vérmintát gyűjtünk egészséges önként jelentkezőktől. A vért EDTA-t tartalmazó csövekbe gyűjtjük (EDTA vérsavó gyűjtő). A korábban -20 °C hőmérsékleten tárolt EDTA emberi vérsavó gyűjtőt szobahőmérsékletre melegítjük és 5 percig centrifugáljuk (a makrorészecskés anyag eltávolítása érdekében). A koleszteril-észter-csoportban radioaktív jelzéssel ellátott, trícium-tartalmú HDL-t ($[^3\text{H}]$ CE-HDL) Morton és Zilversmit által a J. Biol. Chem., **256**, 11992-11995 (1981.) szakirodalmi helyen ismertetett módon adunk a vérsavóhoz 25 $\mu\text{g/ml}$ koleszterin végső koncentrációig. Az inhibitorokat a következők szerint adjuk a vérsavóhoz: a $[^3\text{H}]$ CE-HDL-t tartalmazó vérsavó egyenlő térfogatait (396 μl) pipettával adjuk mikrocövekhez (Titertube[®], Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Az általában 20-50 mM koncentrációjú törzsoldatokként, DMSO-ban feloldott vegyületeket sorozatszerűen DMSO-ban vagy bizonyos esetekben más

oldószerben (így például dimetil-formamidban vagy etanolban) hígítjuk. Az inhibitorok sorozatban hígított oldatait mindegyikéből 4 μ l-t vagy önmagában DMSO-t adunk minden vérsavót tartalmazó kémcsőhöz. A kémcsöveket azonnal keverjük. Minden vérsavó tároló csőből háromszorozott alikvotokat (100 μ l) viszünk át 96-üregű gömb-aljú polisztirol mikrotitráló tálcák (Corning, Corning, NY) üregeibe. A tálcákat műanyag filmmel lezárjuk és 37 °C hőmérsékleten 4 óráig inkubáljuk. A vizsgálati üregek a vérsavót és az inhibitor vegyületek hígításait tartalmazzák. A kontroll üregek vérsavót és csak DMSO-t tartalmaznak. A vak üregek vérsavót és olyan önmagában alkalmazott DMSO-t tartalmaznak, amelyet a mikrocsővekben 4 °C hőmérsékleten hagytunk a 4 órás inkubáció céljából, és az inkubációs időszak végén mértük a mikrotitráló üregekbe. A VLDL-t és LDL-t minden üregben 10 μ l csapadékképző reagens (1 vegyes% dextránszulfát (Dextralip50)/0,5 M magnézium-klorid, pH=7,4) hozzáadásával kicsapjuk. Az üregeket a tálcakeverőn elegyítjük, majd szobahőmérsékleten 10 percig inkubáljuk. A tálcákat 30 percig 10 °C hőmérsékleten 1000 g mellett centrifugáljuk. A felülúszókat (50 μ l) minden üregből Picoplate™ 96-üregű titráló tálcára (Packard, Meriden, CT) helyezzük, amely 250:1 Microscint™-40 (Packard, Meriden, CT) reagenst tartalmaz. A tálcákat hegesztőzárral látjuk el (TopSeal™-P, Packard, Meriden, CT) a gyártó utasításai szerint és 30 percig keverjük. A radioaktivitást mikrotálca szcintillációs számlálón mérjük (TopCount, Packard, Meriden, CT). Az IC₅₀ értékeket az in-

hibitor vegyület azon koncentrációjaként határozzuk meg, amely 50 %-kal gátolja a [³H]CE átvitelét a felülúszó [³H]CE-HDL-ből a kicsapott VLDL-hez és LDL-hez a kontroll üregekben kapott átvitelhez képest. A maximális százalékban kifejezett átvitelt (a kontroll üregekben) a következő egyenlet alkalmazásával határozzuk meg:

$$\% \text{-os átvitel} = \frac{[\text{dpm}_{\text{vak}} - \text{dpm}_{\text{kontroll}}] \times 100}{\text{dpm}_{\text{vak}}}$$

Az inhibitor vegyületeket tartalmazó üregekben meghatározott kontroll átvitel százalékos értékét a következők szerint határozzuk meg:

$$\% \text{-os kontroll} = \frac{[\text{dpm}_{\text{vak}} - \text{dpm}_{\text{teszt}}] \times 100}{\text{dpm}_{\text{vak}} - \text{dpm}_{\text{kontroll}}}$$

AZ IC₅₀ értékeket a kontroll (%) pontsoraiból számítjuk az inhibitor vegyület koncentrációjával szemben.

In vitro CETP-aktivitás

A vegyületek képességét a CETP-aktivitás gátlására olyan in vitro vizsgálattal mérjük, amely a radioaktív jelzéssel ellátott koleszteril-észter ([³H]CE) átviteli sebességét méri HDL donor részecskéktől HDL akceptor részecskékig. A vizsgálat részleteit Glenn és munkatársai a Glenn és Melton, "Quantification of Cholesteryl Ester Transfer Protein (CETP) : A) CETP Activity and B) Immunochemical Assay of CETP Protein", Meth. Enzymol., **263**, 339-

-351 (1996.) szakirodalmi helyen ismertetik. CETP-t cDNA-ból CETP-re transzfektált CHO-sejtek vérsavómentes kondicionált közegéből kaphatunk [lásd: Wang, S. és munkatársai: J. Biol. Chem., **267**, 17487-17490 (1992.)]. A CETP aktivitás mérésére [³H]CE-jelzett HDL-t, LDL-t, CETP-t és vizsgálati puffert (50 mM trisz-hidroximetil-aminometán, pH=7,4, 150 mM nátrium-klorid, 2 mM etiléndiamin-tetraecetsav; 1 % szarvasmarha vérsavó albumin) inkubálunk 200 µl térfogatban 2 óráig 37 °C hőmérsékleten, 96 üregű titráló tálcán. AZ LDL-t 50 µl 1 vegyes%-os dextrán-szulfát/0,5 M magnézium-klorid hozzáadásával differenciáltan kicsapjuk, örvénykeverő (Vortex) alkalmazásával keverjük és szobahőmérsékleten 10 percig inkubáljuk. 200 µl oldatot Millipore szűrőlapra helyezünk. Szűrés után a kicsapott LDL-ben levő radioaktivitást folyadék szcintillációs számlálóval mérjük. A nem specifikus transzferre vagy kicsapásra korrekciót hajtunk végre olyan mintákkal, amelyek nem tartalmaznak CETP-t. A [³H]CE átvitel sebessége e vizsgálatnak alkalmazásával időben és a CETP-koncentrációkra nézve lineáris legfeljebb 25-30 % átvitt [³H]CE mennyiségig.

A tesztvegyületek erősségét meghatározhatjuk a fent ismertetett vizsgálat végrehajtásával a tesztvegyületek különböző koncentrációinak jelenlétében és a [³H]CE HDL-ből az LDL-be történő átvitelének 50 %-os gátlásához szükséges koncentráció meghatározásával. Ezt az értéket IC₅₀-ként definiáljuk. Ezzel a vizsgálattal meghatározott IC₅₀ értékek pontosak, amikor az IC₅₀ nagyobb mint 10 nM.

Abban az esetben, amikor a vegyületek nagyobb gátló hatással rendelkeznek, az IC_{50} pontos mérései meghatározhatók a hosszabb inkubációs idők (legfeljebb 18 óra) és alacsonyabb CEPT-koncentrációk (<50 nM) alkalmazásával.

A CETP-aktivitás in vivo gátlása

A CETP-aktivitás tesztvegyület általi gátlását meghatározhatjuk a vegyület intravénás injekcióval vagy orális adagolásával egy állatnak, a trícium jelzéssel ellátott koleszteril-észter ($[^3H]CE$) HDL-től a VLDL és LDL részecskékhez történő átvitt mennyiségének mérésével és ennek az átvitt mennyiségnek a kontroll állatokban mért átviteli mennyiséghez hasonlításával.

Hím szíriai aranyhörcsögöket táplálunk a vizsgálat előtt legalább 2 hétig 0,24 % koleszterint tartalmazó patkány eledellel. Intravénás dózissal kezelt állatok esetében közvetlenül a kísérlet előtt az állatokat pentobarbitállal altatjuk. Az altatást a kísérlet során végig fenntartjuk. Bennmaradó katétereket helyezünk a nyakér vénába és a nyaki verőérbe. A kísérlet kezdetekor minden állat 0,2 ml $[^3H]CE$ -HDL-t tartalmazó oldatot kap a nyakér vénába. A $[^3H]CE$ -HDL trícium jelzéssel ellátott koleszteril-észtert tartalmazó emberi HDL preparátum, amelyet Glenn és munkatársai által a Meth. Enzymol., **263**, 339-351 (1996.) szakirodalmi helyen ismertetett eljárás szerint állítunk elő. A tesztvegyületet 80 mM törzsoldatként a vivőanyagban feloldjuk (2 % etanol és 98 % PEG 400, Sigma Chemical Vállalat, St. Louis, Missouri, USA) és akár bólus injekció, akár folyamatos infúzió alkalmazásával adagoljuk. 2 perc-

cel a [³H]CE-HDL dózis adagolása után az állatok 0,1 ml tesztoldatot kapnak a nyakér vénába való fecskendezéssel. A kontroll állatok 0,1 ml intravénás vivőanyag-oldatot kapnak tesztvegyület nélkül. 5 perc múlva vesszük az első vérmintákat (0,5 ml) a nyaki verőérből és etilén-diamin-tetraecetsavat tartalmazó standard mikrotároló csövekben gyűjtjük azokat. 0,5 ml sóoldatot injektálunk a katéter kiöblítésére és a vér térfogatának helyettesítésére. Azonos eljárással újabb vérmintákat veszünk 2 óránál és 4 óránál. A vérmintákat jól elkeverjük és jégen tartjuk a kísérlet befejezéséig. A vérsavót a vérminták 4 °C hőmérsékleten való centrifugálásával kapjuk. 50 µl vérsavót 5 µl csapadékképző reagenssel (dextrán-szulfát, 10 g/l; 0,5 M magnézium-klorid) kezeljük, így a VLDL/LDL-t eltávolítjuk. Centrifugálás után a HDL-t tartalmazó felülúszó (25 µl) radioaktivitását folyadékszintillációs számláló alkalmazásával elemezzük.

A HDL-től az LDL-hez és VLDL-hez átvitt [³H]CE százalékos értékét (%-os átvitel) a csapadékképzés előtt egyenértékű vérsavó mintákban a teljes radioaktivitás alapul vételével számítjuk. Tipikusan az átvitel mennyisége a HDL-ből az LDL-hez és VLDL-hez a kontroll állatokban 4 óra múlva 20-35 %.

Alternatív megoldásként, az eszméletüknél lévő, nem elaltatott állatok az orálisan gyomorba adagolt tesztvegyületet 0,1 % metil-cellulóz vízben képzett szuszpenziójában kapják. Annál, a minden egyes vegyületre meghatározott időpontnál, amelynél a tesztanyag vérsavó-szintje el-

éri annak csúcsértékét ($C_{\max}$), az orális adagolás után az állatokat pentobarbitállal elaltatjuk, és 0,2 ml, [^3H]CE-HDL-t tartalmazó oldatnak a nyakéri vénába a fentiek szerint történő adagolásával kezeljük. A kontroll állatok tesztvegyület nélkül, 0,25 ml vivőanyag-oldatot a gyomorba történő orális adagolás útján kapnak. 4 óra múlva az állatokat leöljük, vérmintákat gyűjtünk és a HDL-ből az LDL-hez és VLDL-hez átvitt [^3H]CE százalékos értékét (%-os átvitel) a fentiek szerint meghatározzuk.

Alternatív megoldásként a tesztvegyület CETP-aktivitás gátlását meghatározhatjuk olyan egereknek való adagolással, amelyeket emberi CETP (hCETP) expresszáására transzgenikus manipuláció segítségével szelektáltunk (hCETP-egerek). A tesztvegyületeket adagolhatjuk intravénás injekcióval vagy orális adagolással. A HDL-től a VLDL és LDL részecskékhez a trícium-jelzéssel ellátott koleszteril-észter ([^3H]CE) átvitel mennyiségét meghatározzuk és a kontroll állatoknál mért transzfer mennyiségéhez hasonlítjuk. A hCETP génre homozigóta C57Bl/6 egereket a vizsgálat előtt legalább 2 hétig magas zsírtartalmú egéreledellel, így például TD 88051-lel táplálunk, amint azt Nishina és munkatársai a J. Lipid Res., **31**, 859-869 (1990) szakirodalmi helyen ismertetik. Az egerek a tesztvegyület orálisan adagolt dózisát 0,1 % metil-cellulóz vízben képzett szuszpenziójaként vagy a tesztvegyület 10 % etanolban és 90 % polietilén-glikolban képzett intravénás bólus injekciója formájában kapják. A kontroll állatok a vivőanyag-oldatot tesztvegyület nélkül orálisan adagolva vagy int-

ravénás bólus injekció formájában kapják. A kísérlet kezdetekor minden állat 0,05 ml [³H]CE-HDL-t tartalmazó oldatot a farokvénába kap. A [³H]CE-HDL trícium jelzéssel ellátott koleszteril-észtert tartalmazó emberi HDL preparátum, amelyet a Glenn és munkatársai által a Meth. Enzymol., **263**, 339-351 (1996.) szakirodalmi helyen ismertetett eljárással állítunk elő. 30 perc múlva az állatokat vértelenítjük, és a vért standard, etiléndiamin-tetraecetsavat tartalmazó mikrotároló csövekben gyűjtjük. A vérmintákat jól elkeverjük és a kísérlet befejezéséig jégen tároljuk. A vérsavót a vérminták 4 °C hőmérsékleten való centrifugálásával kapjuk. A vérsavót elválasztjuk, gél-szűrési-kromatográfiával elemezzük és a [³H]CE relatív arányát a VLDL, LDL és HDL régiókban meghatározzuk.

A HDL-től az LDL-hez és VLDL-hez átvitt [³H]CE százalékos arányát (%-os átvitel) a csapadékképzés előtt azonos vérsavó mintákban a teljes radioaktivitás alapján számítjuk. Tipikusan az átvitel mennyisége a HDL-től az LDL-hez és a VLDL-hez a kontroll állatokban 20-35 % 30 perc múlva.

Bélrendszeri koleszterin felszívódás vizsgálat

Számos vegyületről kimutatták, hogy gátolja a koleszterin felszívódását a bélrendszerből. Ezek a vegyületek csökkentik a vérsavó koleszterinszintjét, csökkentve mind az exogén forrásokból származó koleszterin (étkezési koleszterin), mind az endogén koleszterin (az epehólyag által a bélrendszerbe kiválasztott koleszterin) bélrendszeri felszívódásának csökkentésével.

Hörcsögökben a duál-izotóp vérsavó arány eljárás alkalmazását a bélrendszeri koleszterin felszívódás mérésére finomítottuk és a Turley és munkatársai által a J. Lipid Res., **35**, 329-339 (1994.) szakirodalmi helyen (amelyre ezúton referenciaként hivatkozunk) ismertetett eljárással értékeljük.

80-100 g tömegű, hím hörcsögöket eledellel és vízzel kívánság szerint látunk el 12 óránként váltakozó világos és sötét időtartam szerint megvilágított ketrecben. A világos periódus 4 órájánál minden hörcsög először 2,5 µCi Intralipidben (20 %) szuszpendált [1,2-³H]koleszterin intravénás dózisát, majd közepes lánchosszúságú trigliceridek (MCT) olajában oldott [4-¹⁴C]koleszterin orális dózisát kapja. Az intravénás dózist az Intralipid-elegy 0,4 ml térfogatának a távoli combcsonti vénába történő injektálásával adjuk. Az orális dózist az MCT-olaj elegy 0,6 ml térfogatának polietilén csövön keresztüli gyomorba táplálásával adjuk. 72 óra múlva a hörcsögöktől vért veszünk, és a ³H és ¹⁴C vérsavóbeli mennyiségét és az adagolt jelzés eredeti mennyiségét folyadékszintillációs spektrometriás eljárással meghatározzuk. A koleszterin felszívódását a következő egyenlet alapján számítjuk:

%-os felszívódott koleszterin =

$$\frac{\% \text{-os orális dózis} / 72 \text{ órás plazma minta ml}}{\% \text{-os intravénás dózis} / 72 \text{ órás plazma minta ml}} \times 100$$

Mikroszómás triglicerid transzfer protein (MTP) vizsgálat

Az MTP tisztítható májszövetből vagy tenyésztett sejtekből (például HepG2-sejtekből) az Ohringer és munkatársai által az Acta Crystallogr. D52, 224-225 (1996.) szakirodalmi helyen (amelyre ezúton referenciaként hivatkozunk) ismertetett általános eljárások alkalmazásával.

Az MTP-aktivitás ezt követő elemzése végrehajtható a Jamil és munkatársai által a Proc. Natl. Acad. Sci., **93**, 11991-11995 (1996.) szakirodalmi helyen (amelyre ezúton referenciaként hivatkozunk) ismerttetettek szerint.

E vizsgálat alapja a jelzéssel ellátott trigliceridek átvitelének mérése a donor vezikulumok populációjától az akceptor vezikulumok populációjához MTP jelenlétében. Az MTP-inhibitorok értékelhetők azoknak az elegyhez adásával az MTP bevezetése előtt. A donor vezikulumokat sejtmag-foszfolipidek, kardiolin, ^3H -jelzéssel ellátott foszfolipid és ^{14}C -jelzéssel trigliceridek vizes elegyének ultrahang kezelésével állítjuk elő. Az akceptor vezikulumokat sejtmag-foszfolipidek vizes elegyének ultrahang-kezelésével állítjuk elő. A vezikulum-oldatokat hozzáadott MTP-inhibitorokkal vagy azok nélkül keverjük, és az MTP-t hozzáadjuk a transzfer reakció iniciálására. A vizsgálatot 60 perc múlva 0,5 ml DE-52 cellulóz hozzáadásával, majd a donor molekulák centrifugálásával leállítjuk, utóbbiak így labdacst képeznek. A ^3H és ^{14}C mennyiségét a labdacstban és az elegyben a radioaktív jelzés eredeti mennyiségét folyadékszintillációs számláló spektrometria segítségével

vel határozzuk meg. A lipid átviteli sebességet elsőrendű reakció kinetikán alapulva, a következő kifejezés alkalmazásával számítjuk:

$$[S] = [S]_0 e^{-kt}$$

ahol $[S]_0$ és $[S]$ jelentése a ^{14}C jelzés frakciói a donor membrán labdacspan sorrendben a 0 és t időpontokban, és a k kifejezés jelentése az időegység alatt átvitt jelzés aránya.

Vérsavó-lipid vizsgálat nyulakban

A vérsavó lipideket a J. R. Schuh és munkatársai által a J. Clin. Invest, **91**, 1453-1458 (1993.) szakirodalmi helyen (amelyre ezúton referenciaként hivatkozunk) ismertett általános eljárások alkalmazásával mérhetjük. Him, újjélandi fehér nyulak egy csoportját általános étrenddel táplálunk (100 g/nap), amelyet 0,3 % koleszterinnel és 2 % kukoricaolajjal (Zeigler Bothers, Inc., Gardners, PA) egészítettünk ki. A víz kívánság szerint hozzáférhető. A kontroll csoportot és a kezelt állatok csoportját a kezelés után 1 és 3 hónappal öljük le. A szöveteket érszűkületi károsodások jellemzése érdekében eltávolítjuk. Vérmin-tákat veszünk a vérsavó lipid-koncentrációk meghatározására.

Vérsavó lipidek

A lipid analízishez vérsavót a vérnek a fülvénából való vételével, EDTA-tartalmú kémcsövekbe helyezésével (Vacutainer; Becton Dickenson & Co., Rutherford, NJ), majd

a sejtek centrifugás elválasztásával kapunk. Az összkoleszterint enzimátikus úton, a koleszterin-oxidáz reakció [lásd: C. A. Allain és munkatársai: Clin. Chem. **20**, 470-475 (1974.), amelyre ezúton referenciaként hivatkozunk] alkalmazásával határozzuk meg. A HDL koleszterint szintén enzimátikusan mérjük az LDL és a VLDL dextrán-szulfát és magnézium általi szelektív kicsapása után [lásd: G. R. Warnick és munkatársai, Clin. Chem., **28**, 1379-1388 (1982.), amelyre ezúton referenciaként hivatkozunk]. A vérsavó triglicerid szinteket a lipoprotein-lipáz által enzim-kötött vizsgálat során felszabadított glicerinnel mérjük [lásd: G. Bucolo és munkatársai, Clin. Chem., **19**, 476-482 (1973.), amelyre ezúton referenciaként hivatkozunk].

Érszűkület

Az állatokat pentobarbitál injekcióval megöljük. A mellkasi aortákat gyorsan eltávolítjuk, 10 %-os semlegesre pufferolt formalinban bemeztéssel fixáljuk, majd olajvörös O-val (0,3 %) színezzük. Az artériás ostiával szemközti fal mentén egyszeres longitudinális bemeztés után az edényeket tüvel felnyitjuk a beteg terület értékelése céljából. A beteg felület százalékos értékét a vizsgált teljes felületre kapott értékekből és színezett területből határozzuk meg küszöb analízissel, egy preparáló mikroszkópra felszerelt színes kamerához (Toshiba 3CCD) kapcsolt valódi színeképelemző készülék (Videometric 150; American Innovision, Incl, San Diego, CA) alkalmazásával. A szövet-koleszterint ismertetett módon, enzimátikus eljárás

rással mérjük a Folch és munkatársai által a J. Biol. Chem., **226**, 497-509 (1957.) szakirodalmi helyen (amelyre ezúton referenciaként hivatkozunk) ismertetett eljárás szerint 2:1 arányú kloroform-metanol elegy extrakciója után.

***In vitro* vaszkuláris reakció**

Nátrium-pentobarbitál injekció után a hasüregi aortákat gyorsan kimetsszük és oxigénezett Krebs-bikarbonát pufferbe helyezzük. A perivaszkuláris szövet eltávolítása után 3 mm-es gyűrű-szegmenseket vágunk, azokat 37 °C hőmérsékletű, Krebs-bikarbonát oldatot tartalmazó izomfürdőbe helyezzük és két rozsdamentes acél drót között felfüggesztjük, a drótok közül egyiket egy erő-transzduktorhoz (Grass Instrument Co., Quincy, MA) kapcsoljuk. A fürdőhöz adott angiotenzin II hatására történő erőváltozásokat diagram felvevőn rögzítjük.

Az itt ismertetett példák megvalósíthatók az általánosan vagy konkrétan ismertetett terápiás vegyületek vagy közömbös összetevők a korábbi példákban alkalmazott összetevőkkel való helyettesítésével.

Miután a találmányt ismertettük, nyilvánvaló, hogy az sokféle módon változtatható. Az ilyen variációk nem tekintendők a találmány értelmétől és tárgyától eltérőnek, és minden ilyen módosítás és ekvivalens a szakember számára nyilvánvalóként, a következő igénypontok körébe tartozónak tekintendő.

Szabadalmi igénypontok

1. Terápiás kombináció, amely egy fibrinsav-származék első mennyiségét és egy koleszterin észter transzfer protein inhibitor második mennyiségét tartalmazza, ahol az első mennyiség és a második mennyiség együtt a szóban forgó vegyületek hiperlipidémiás állapot ellen hatásos mennyiségét, érszűkület ellen hatásos mennyiségét vagy hiperkoleszterinémiás állapot ellen hatásos mennyiségét képzí.

2. Az 1. igénypont szerinti terápiás kombináció, amelyben a fibrinsav-származék vegyület klofibrát.

3. Az 1. igénypont szerinti terápiás kombináció, amelyben a fibrinsav-származék vegyület fenofibrát.

4. Az 1. igénypont szerinti terápiás kombináció, amelyben a fibrinsav-származék vegyület ciprofibrát.

5. Az 1. igénypont szerinti terápiás kombináció, amelyben a fibrinsav-származék vegyület bezafibrát.

6. Az 1. igénypont szerinti terápiás kombináció, amelyben a fibrinsav-származék vegyület gemfibrozil.

7. Az 1. igénypont szerinti terápiás kombináció, amelyben a fibrinsav-származék vegyület klinofibrát.

8. Az 1. igénypont szerinti terápiás kombináció, amelyben a fibrinsav-származék vegyület binifibrát.

9. Az 1. igénypont szerinti terápiás kombináció, amelyben a kombináció a fibrinsav-származék vegyületet és a koleszterin-észter transzfer protein inhibitort tartalmazó készítményből áll.

10. Egy fibrinsav-származék és egy koleszteril-észter transzfer protein inhibitor alkalmazása hiperlipidémiás állapot megelőzésére vagy kezelésére szolgáló, egységdózis kiszerezésű kombinációs gyógyszerkészítmény előállítására.

11. Egy fibrinsav-származék és egy koleszteril-észter transzfer protein inhibitor alkalmazása érszűkület megelőzésére vagy kezelésére szolgáló, egységdózis kiszerezésű kombinációs gyógyszerkészítmény előállítására.

12. Egy fibrinsav-származék és egy koleszteril-észter transzfer protein inhibitor alkalmazása hiperkoleszteri-némia megelőzésére vagy kezelésére szolgáló, egységdózis kiszerezésű kombinációs gyógyszerkészítmény előállítására.

A meghatalmazott:

Danubia Szabadalmi és

Védjegy Iroda Kft.


dr. Molnár István

szabadalmi ügyvivőjelölt

rajz nélkül

2004. 05. 19.

PK