ČESKÁ REPUBLIKA

(19)

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(21) 1934-95

(13) A3

6(51) A 61 K 31/56

(22) 08.03.94

(32) 09.03.93

(31) 93/029422

(33) US

(40) 17.04.96

(71) UNIVERSITY OF UTAH RESEARCH FOUNDATION, Salt Lake City, UT, US;

(72) Daynes Raymond A., Park City, UT, US;
Araneo Barbara A., Salt Lake City, UT, US;

(54) Použití derivátu dehydroepiandrosterononu pro výrobu farmaceutického prostředku a farmaceutický prostředek obsahující derivát dehydroepiandrosterononu

(57) Použití derivátu dehydroepiandrosterononu (DHEA) příkladně 16.alfa.-brom-DHEA, androstendiolu a derivátů, které mají postranní řetězce v poloze 4' a/nebo 7', nenarušují nativní aktivitu DHEA, a jsou schopné inhibovat sulfotransferasu k předcházení konverze DHEA na DHEA-S, pro výrobu farmaceutického prostředku k prevenci progresivní nekrose tkáně, reperfusního poškození, bakteriální transkolace a syndrom dýchacích potíží dospělých.

1934-9

02 -02- 1996

JUDr. Otakar ŠVORČÍK
advokát

Použití derivátu dehydroepiandrosterononu pro výrobu farmaceutického prostředku a farmaceutický prostředek obsahující derivát dehydroepiandrosterononu

PŘIL. VHASTN.CTVÍ ORIG. PŘEKL. OVĚŘ. 02 II 96 DOŽ.10 00 S 105 č.j.

Oblast techniky

Vynález navazuje na přihlášku vynálezu číslo 08/29,422, podnou 9. března 1993 a týká se způsobu prevence a snižování vlivů ischemie, způsobů prevence nebo snižování bakteriální translokace a syndromu dýchacích potíží dospělých. Podle vynálezu se takovým chorobným stavům předchází podáváním dehydroepiandrosteronu (DHEA) nebo jeho derivátů.

Dosavadní stav techniky

Ischemie může být způsobena příklad infarktem, popáleninami, chirurgickým traumatem a úrazovým traumatem. Ischemii může také předcházet reperfusní poškození.

Zjistilo se, že udržování vaskulární integrity je důležitým faktorem odezvy na taková poškození. Komplex hemostatických mechanismů koagulace, funkce destiček a fibrinolysis minimalizuje nepříznivé následky vaskulárních poruch a urychluje vaskulární opravu. Vaskulární endothelial a buňky hladkého slvalstva aktivně udržují odolnost cévních stěn proti thrombům expresí některých antithrombotických charakteristik. Při porchách vaskulární buňky vykazují expresi thrombogenických charakteristik. Hemostatické charakteristiky normálních a narušených vaskulárních buněk popsal Rodgers G.M. (1988, FASEB J. 2, str. 116 až 123).

Porucha dodávání okysličené krve do tkání se označuje jako ischemie. Je známo, že působením ischemie dochází k postupnému, to znamená v průběhu doby pokračujícímu poškození buněčné vitality a tkáň se nekrotizuje. Celková setrvávající ischemie s omezenou perfusí kyslíku pro tkáně vede ke smrti buněk a případně k nekrosi navozené koagulací vzdor reperfuse arteriální krví. Ischemie je pravděpodobně nejdůležitější příčinou koagulativní nekrosy v lidských nemocech. Významný podíl potíží, spojených s is-

chemií, je výskyt příhod spojených s reperfusí ischemických tkání označevaných jako reperfusní poškození. Z klinického hlediksa jsou tři stupně poškození buněk v závislosti na trvání ischemie:

1) Při krátce trvající ischemii reperfuse (a opětné dodání kyslíku) dokonale obnovuje strukturální a funkční integritu buňky. Ať již došlo k jakémukoliv pooškození buněk, zotavují se buňky reoxygenací dokonale. Například změny membránového potenciálu, metabolismu a ultrastruktury jsou krátkodobé, pokud se rychle obnoví cirkulace.

2) Při dlouhodobější ischemii není reperfuse spojena s obnovením struktury a funkce buňky avšak spíše s poškozením a smrtí buňky. Odezvou na reoxygenaci v tomto případě je rychlý a intenzivní zápal.

3) Smrtelné poškození buňky se může vyvinout při prodlouženém období ischemie, kde reperfuse není faktorem.

Reversibilita poškození buňky jakožto důsledek ischemie je dána nejen typem a trváním poškození, ale také štítovou buňkou. Neurony jsou velmi vysoce citlivé na ischemii, zatím co myokardiální, pulmonární, hepatické a renální tkáně jsou středně citlivé. Fibroblasty, epidermis a skeletální svalstvo má nejnižší citlivost na ischemické poškození a vyžaduje mnoho hodin bez dodání krve, aby došlo k vývoji nezvratitelnému poškození.

Blízkost endothelia k cirkulujícím leukocytům, vytváří důležitý štít pro neutrofilní adherenci a následující poškození vaskulární a parenmchymální tkáně. Interakce aktivovaných endoitheliálních buněk a neutrofilů je bezprostředně časným a nutným případem při ischemickém/reperfusním poškození (Hernandez L.A a kol. 1987, Am. J. Physiol. 253 [Heart Cir. Physiol. 22]:H699 až H703, Luccesi B.R., 1990, Am. J. Cardiology 65, str. 141 až 231). Adhesivní vlastnosti endothelia se rychle navozují zavedením okysličené krve, K odezvě na kyslík se endotheliální buňky aktivují k vytváření určitých produktů vlčeně lukotrienu B4 (LTB4), faktoru aktivujícího destičky (PAF) a P-selektinu. Leukotrien B4 je mocné neutrofilní chemotaktické činidlo (Lehr H.A a kol. J. Clin. Invest 87, str. 2036 až 2041, Entaman M.L. a kol. 1991, FASEB J.

5, str. 2529 až 2537). Po aktivaci endotheliálních buněk se P-selektin tychle translokuje z intracelulárních organel do plasmové membrány, kde působí k omezení cirkulijících neutrofilů a k jejich stabilizaci pro aktivaci endotheliálně vázaným faktorem aktivujícím destičky, cytokiny odvozenými od endothelia a jinými biologicky aktivními mediátory (Weyrich A.S. a kol. 1993, J.Clin. Invest. 91, str. 2620 až 2629). Proto fysiologické vzájemné působení mezi aktivovaným endotheliem a aktivovaným neutrofilem se považuje za rozhodující a benzprostředně časný jev v reperfusním poškození orgánů a tkání. Jiné celulární a biochemické mediátory lzánětlivého poškození jako destičky a komplementní kaskáda a koagulační systém jsou rovněž důležité, uplatňují se však v kaskádě mnohem později, v procese označovaném jakožto koagulativní nekrosa. Konečně monocyty, makrofagy, fibroblasty a infiltrace buněk hladkého svalstva jsou zodpovědné za rekonstrukci a náhradu mrtvé tkáně novou vitální tkání, přičemž se takový proces označuje jako hojení rány.

Všeobecně rozšířená teorie se zaměřuje na částečné redukované a tak aktivované druhy kyslíku v iniciaci poškození membrány v reperfusním poškození. Současné poznatky naznačují, že aktivovaný kyslík (superoxid, peroxid, hydoxylové radikály) se vytváří v průběhu ischemických příhod, a proto reaktivní druhy kyslíku poškozují ischemické buňky. Toxické druhy kyslíku se negenerují v průběhu samotné ichemické periody avšak spíše při obnovení toku krve nebo při reperfusi. Dva zdroje aktivovaných druhů kyslíku jsou zahrnuty jakožto časné případy reperfusního poškození: zdroje produkované intracelulárnně xanthinoxidasovou cestou a zdroje, které se mohou transportovat na extracelulární prostředí aktivovanými neutrofily (Hernandez L.A a kol. 1987, Am. J. Physiol. 253 [Heart Cir. Physiol. 22]:H699 až H703. Luccesi B.R., 1990, Am. J. Cardiology 65, str. 141 až 231, Lefer A.M. a kol.,1991, FASEB J., 5, str. 2029 až 2034, Brown J.M. a kol., 1988, J. Clin.Invest 81, str. 1297 až 1301. "Cellular Injury and Adaptation" v Pathologic Basis of Disease, Cotran a kol. vyd. WB Saunders. Philadelphia, str. 1 až 81, 1989)

V cestě závislé na xanthinoxidase vytvářejí puriny, odvozené od katabolismu ATP v průběhu ischemické periody, substráty pro aktivitu xanthinoxidasy, která vyžaduje kyslík v katalyse vytváření močové kyseliny. Druhy aktivovaného kyslíku jsou vedlejšími produkty této reakce. Druhy kyslíkových radikálů, odvozených od xanthinoxidasové cesty, jsou O_2^- (superoxid s jedním elektronem) a H_2O_2 (peroxid vodíku se dvěma nepárovými elektrony). Superoxidy se generují uvnitř cytosolu xanthinoxidasou (nacházející se v cytosolu). Superoxidy jsou pak katabolisovány na peroxidy v mytochondria superoxidismutasou. Peroxidy se dále převádějí na vodu buď glutathionperoxidasou v cytosolu nebo katalasou v peroxisomes. Jak glutathionperoxidasu tak katalasu zahrnují antioxidantové obranné mechanismy většiny buněk. Hlavním důkazem pro tuto domněku je schopnost allopurinolu, inhibitoru xanthinoxidasy, chránit proti reperfusnímu poškození v případě pokusných modelů.

V případě cesty, závislé na NADPH, se NADPH oxidasa aktivuje ke generování superoxidů prostřednictvímm redukce molekulárního kyslíku v plasmě membrány. Superoxidy se redukují na peroxid vodíku superoxidovou dismutasou v plasmě membrány nebo ve fagolysosomes. Konečně peroxid vodíku ve fagolysosomes se může redukovat v přírомnosti superoxidů mebo železnatých iontů na hydroxylové radikály. Třetí forma kyslíkových metabolitů je zprostředkována myloperoxidasou v přítomnosti chloru k redukci peroxidu vodíku na chlornou kyselinu.

Hydroxylový radikál je mimořádně reaktivní. Mitochondriální membrány poskytují četné vhodné substráty pro atakování hydroxylovými radikály. Konečným výsledkem je nevratné poškození na mitochondria trvající masivním přílivem válenatých iontů. Jinou pravděpodobnou příčinou smrtí buněk v důsledku hydroxylových radikálů je peroxidace fosfolipidů v plasmové membráně. Nenasycené mastné kyseliny jsou vysoce citlivými štíty pro hydroxylové radikály. Odstraněním vodíkového atomu z mastných kyselin buněčných membránových fosfolipidů se vytvářejí volné lipidové radikály. Tyto lipidové radikály fungují podobně jako hydroxylové radikály za vytváření jiných lipidperoxidových radiálů. Destrukce nenasy-

cených mastných kyselin fosfolipidů vede ke ztrátě membránoové fluidity a ke smrti buňky. Někteří výzkumní pracovníci se domnívají, že vlivy oxidativního stresu způsobují programovanou smrt buněk u různých buněčných typů.

Infarkty a traumatické poškození zahrnuje četné tkáně včetně vaskulární tkáně. Jednou odezvou na traumatické poškození je pokles dodávky krve do poškozené tkáně. Účelem této odezvy je chránit jedince od zavlečení infekčních činidel do těla. Závažné snížení dodávky krve je halvním faktorem progresivní ischemie v oblasti traumatického poškození. S progresivní ischemií se rozšiřuje nekrosa tkáně od přímo napadené tkáně k zahrnutí okolní nenapadené tkáně. Tato progresivní ischemie má významný úkol v definování konečné patologie tkáně, pozorované v případě lidí, jako následek traumatického poškození (Robson M.C. a kol., 1979 Plastic and Reconstrictive Surgery 63, str. 781 až 787).

Jednou formou traumatického poškození, která získala velkou pozornost, je tepelné poškození nebo spálenina. Rána, způsobená spáleninou, představuje nerovnoměrné poškození a spektrum poškození je od tkáně, která je dokonale koagulována ve chvíli poškození po tkáň, která je poškozena toliko minimálně. Mezi těmito dvěma extremy je tkáň, která je závažně poškozena a nikoliv plně rozrušena, která je však určena k odumření. Etiologie postupné šířky nekrosy je označována jako stase a thrombosa krve v kožních cévách způsobující ischemii a destrukci epitheliálních prvků. Tato ischemie nastává 24 až 48 hodin po tepelném poškození (Robson M.C. a kol., 1979 Plastic and Reconstrictive Surgery 63, str. 781 až 787 a Robson M.C. a kol., 1980, J.Trauma 20, str. 722 až 725). Byly pozorovány četné jevy po tepelném poškození včetně adhese leukocytů na stěny cév, aglutinace buněk červených krvinek a uvolnění vosoaktivních a nekrotizujících látek (Robson M.C.a kol. 1980, J. Trauma 20, str. 722 až 725).

Zjistilo se, že mikrovaskulární okluse a ischemie, související se spáleninou, jsou způsobovány na čase závislém zvrůstu vývoje, mikrothrombi v zóně stase, jehož podmínky popřípadě vedou k celkové oklusi arteriol a mikrocirkulační zástavě. Zatímco mar-

ginace erythrocytů, granulocytů a destiček na cévních stěnách je zjevná v průběhu několika málo hodin po tepelném poškození, vytváření destiček mikrothrombi (ke kterému dochází přibližně 24 hodiny po chirurgickém zásahu) je pravděpodobně zodpovědná za vytváření stavů, které způsobují dokonalé nebo permanentní vaskulární okluse a tkáňovou destrukci (Rockwell W.B. a Ehrlich H.P., 1992, J. Burn Care Rehab 13, str. 403 až 406 a Boykin J.V. a kol. 1980, Plastic Reconstruct. Surgery 66, str. 191 až 198). Vytváření destiček mikrothrombi se jeví na celulární bázi pro rozšiřování zóny dokonalé okluse a ischemické nekrosy, která postupuje do zóny stase po tepelném poškození.

Mnoho úsilí se věnovalo zlepšení péče o spáleniny a o jiná traumatická poškození a byla navržena četná řešení ke snížení progresivní ischemie spojené s takovým poškozením. Zjistilo se, že protizánětlivá činidla jako indomethacin, acetylsalicylová kyselina a methylprednisonacetát chrání před dermální perfusí (Robson M.C. a kol. 1979, Plastic and Reconstrictive Surgery 63, str. 781 až 787). Tři thromboxanové inhibitory, imidazol, methimazol a dipyridamol se osvědčily v předcházení vaskulárních změn v případě ran způsobených popálením, umožňují dermální perfusi a umožňují jinou prastaglandinovou syntesu, která maří nepříznivé působení protizánětlivých činidel (Robson M.C. a kol., 1980, J. Trauma 20, str. 722 až 725). Terapeutické dávky ibuprofenu a imidazolu se osvědčují v předcházení dermální vaskulární okluse tím, že působí jako antagonisty k plasminovému inhibitoru (Ehrlich H.P., 1984, J. Trauma 24, str. 311 až 318). Redukce cirkulace fibrinogenu, vykázaná při podání ancrodu (jed zmije), vede k zachování vaskulární potence v místě poškození (Ehrlich H.P. 1987, J. Trauma 27, str. 420 až 424). Zjistilo se také, že inhibice leukocyt-endotheliální adherence, vykázaná při použití monoklonálních protilátek, předchází rožšíření/progrese spálenin v marginální zóně stase (Mileski W. a kol. 1992, J.Sugg.Res. 52, str. 334 asž 339).

Bakteriální translokace je proces, při kterém vlastní střevní flora penertruje střevní barieru a napadá sterilní tkáně. Tento proces zahrnuje migraci mikrobiálních organismů do drenážních

mesenterických lymfatických uzlin, do sleziny, do jater, do krve a v některých případech do plic (Morehouse J.L a kol. 1986 Garstroenterol 91, str. 673 až 682 a Maejimak a kol. 1984, Arch. Surg. 119, str. 166 až 172). Tento jev byl popsán u lidí po tepelném poškození (Czaja A.J. a kol. 19974 N. Engl. J. Med. 291, str. 925 až 929, Seavitt S. 1967, Br. J.Surg. 54, str. 32 až 41 a Desai M. H. a kol., 1991 Surgery Gyn. Obstet. 8 str. 257 až 261) a po ischemia-reperfusním poškození (Deitch E.A. a R.Berg 1987 J. Burn Rehab 8, str. 475 až 482).

Za normálních podmínek je střevní sliznice nepropustná pro možné škodlivé látky ze střevního lumenu (Morehouse J.L a kol. 1986 Garstroenterol 91, str. 673 až 682, Deitch E.A. a R.Berg 1987 J. Burn Rehab 8, str. 475 až 482 a Edmiston C.E. a R.E. Condon 1991, Surgery, Gyn. Obstet. 173, str. 73 až 83). Současné poznatky potrvzují, že rozrušení integrity/permeability sliznice podporuje bakteriální translokaci, jelikož obnažuje ke stresu, který produkuje hotitelskou odezvu charakterizovanou celulárním poškozením a nekrotická tkáň je v souhlase s vývojem bakteriální translokace (R.E. Condon 1991, Surgery, Gyn. Obstet. 173, str. 73 až 83). Klinicky důležitá reperkuse bakteriální translokace je sepse a multisystémové orgánové selhání (Deitch E.A. a R.Berg 1987 J. Burn Rehab 8, str. 475 až 482 a Edmiston C.E. a R.E. Condon 1991, Surgery, Gyn. Obstet. 173, str. 73 až 83 a Deitch E. A. 1990, Arch. Surgery 125, str. 403 až 404). Výskyt sepse a rozšíření nákazy orgánů po stresu je největší u pacientů, kteří mají také sníženou imunní ochranu (Deitch E.A. a R.Berg 1987 J. Burn Rehab 8, str. 475 až 482 a Edmiston C.E. a R.E. Condon 1991, Surgery, Gyn. Obstet. 173, str. 73 až 83), která se pozoruje u jedinců s popáleninami (Deitch E. A. 1990, Arch. Surgery 125, str. 403 až 404 a Saadia R. a kol., 1990, Br. J. Surg. 77, str. 487 až 492). Proto v odezvě na stres někteří jedinci vykazují bakteriální translokaci za nepřítomnosti závažných následků. Jedinci této skupiny mají zachovanou neporušenou imunologickou odezvu (Deitch E.A. a R.Berg 1987 J. Burn Rehab 8, str. 475 až 482 a Edmiston C.E. a R.E. Condon 1991, Surgery, Gyn.Obstet. 173,str.

73 až 83 a Deitch E. A. 1990, Arch. Surgery 125, str.403 až 404). Pro dobře známou modulaci hostitelovy imunní odezvy po závažných popáleninách je bakteriální translokace jednou z nejzávažnějších následků tepelného poškození lidí (Deitch E. A. 1990, Arch. Surgery 125, str. 403 až 404 a Saadia R. a kol. 1990, Br.J.Surg. 77, str. 487 až 492).

Pokusné modely bakteriální translokace doložily, že k nevratnému poškození střev může docházet až po 24 hodinách po poškození teplem a za 48 hodin po zviditelnění histologických změn střevní vaskulární tkáně (Desai M.H. a kol., 1991 Surgery Gyn. Obstet. str. 257 až 261 a Mainous M.R. a kol. 1991, Arch. Surgery 126, str. 33 až 37). Tyto experimentální systémy jsou užitečné pro definování farmakologických mediátorů, které se jeví jako užitečné k vytvoření kaskády efektorových molekul zodpovědných za nekrosu tkáně. Kromě úlohy, kterou mají katecholaminy, jsou zahrnuty kyslíku prosté radikály a endotoxiny, faktory jako interferon α, interleukin-6, faktor nekrosy nádoru, faktor aktivující destičky a četné vasoaktivní mastné kyseliny, odvozené od metabolismu arašidové kyseliny (Morehouse J.L a kol. 1986 Garstroenterol 91,str. 673 až 682). Příspěvek kyslíku prostých radikálů, endotoxinu, prostaglandinů a thromboxanů při podpoře destrukce tkáně je podporován skutečností, že inhibice bakteriální translokace a mukosálního poškození se dosahuje použitím allopurinolu (Vaughan W.G. a kol. 1992, J. Ped. Surg. 27, str. 968 až 973) (jakožto inhibitoru xanthinoxidasy), endotoxinovou desentizací (Deitch E.A. a kol. 1992, Circ. Schock 36, str. 206 až 216), prostaglandinovými analogy (Fukushima R. a kol. 1992, Ann. Surg. 216, str. 438 až 444) a inhibitory tromboxanové synthetasy (Tokyay R a kol. 1992, J. Trauma 32, str. 704 až 713).

Skutečnost zahrnutí úlohy neutrofilů v syndromu dechových obtíží dospělých ("adult respiratory distress syndrome" = ARDS) je podstatná avšak nepřímá (Simon R.H. a Ward P.A. 1992, Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates 2. vydání, Galin J.I. a kol. vyd. Raven Press. Ltd. New York str. 999 až 1016). Některé z prvních poznatků, že neutrofily mohou způsobovat

obraz podobný jako ARDS, byly zjištěny u závažně neutropenických jedinců, kterým byly dodány intravenozní infuzí donorové neutrofily. Případně v rámci hodiny neutrofilní infuse došlo k odtržení "white-out" plic (rentgenové paprsky) a k nástupu syndromu ARDS. Četné studie ukázaly, že se neutrofily akumulují v plicích v průběhu ARDS. Jejich přítomnost byla dokázána například histologicky. V průběhu časné fáze ARDS počet cirkulujících krevních buněk prudce klesá pravděpodobně pro jejich abnormální pulmonární sekvestraci. Něco neutrifilů, které se akumulují v plicních kapilárách, opouští vaskulární prostor a migruje do interstitia a do alveolárních vzduchových prostor. U normálních zdravých dobrovolníků je počet neutrofilů menší než 3 % buněk, které se mohou získat bronchoalveolárním promytím (BAL). V případě nemocných ARDS procento neutrofilů v promytí je značně zvýšené, 76 až 85 %. Akumulsce neutrofilů je spojena s evidencí jejich aktivace. Vykazují podpořenou chemotaxis a generují abnormálně vysoké hladiny kyslíkového metabolismu po stimulaci in vitro. Zvýšené koncentrace neutrofilních sekretačních produktů, například laktoferrinu, byly zjištěny v plasmě jedinců s ARDS. Další jev, že se neutrofily aktivně podílejí na poškození plic, se získán z klinické studie jedinců s mírným poškozením plic, které je neutropenické pro nesouvisející důvody (například při chemoterapii). Zjistilo se, že poškození plic se často zhorší, když se zlepší hematologický stav a počty cirkulujících neutrofilů se vrátí na normální hladiny.

Jakkoliv je jasné zahrnutí neutrofilů do genese lidské ARDS stále v široké míře nepřímé, jsou hodnoty dokládající význam neutrolifů v případě různých živočiných modelů akutního poškození plic přesvědčivé. Běžný přístup, kterého se používá k doložení neutrofilní nezávislosti, je zbavit živočichy cirkulujících neutrofilů a měřit snížení plicního poškození, ke kterému dojde. Jakkoliv se použilo četných experimentálních modelů pro studium neutrofilní závislosti plicního poškození, bylo jich zde do diskuze zahrnuto jen několik (pro nedostatek místa).

Jedním extensivně studovaným modelem je podání endotoxinu ovci. Jestliže se endotoxin zavádí ovci intravenosně, dochází ke

komplexním jevům, z nichž jedním je vzrůst permeability pulmonárního kapiloárního endothelia. To se projevuje vzrůstem toku plicní lymfy, která obsahuje vyší koncentraci proteinu než normálně. Tyto změny naznačují snížení schopnosti kapilárního endothelia zadržovat proteiny plasmy ve vaskulárním prostoru. Neutrofilní závislost permeabilitního poškození se ustavuje, jestliže se zjistí, že se ovce zbavují neutrofilů před infuzí endotoxinu, který je chrání. Jiný in vivo model akutního poškození plic zahrnuje intravenosní infuzi faktoru jedu kobry krysám, která způsobuje komplementní aktivaci následovanou leukoagregací a sekvestrací neutrofilů v pulmonmární mikrovaskulatuře. Dochází k alveolárnímu poškození stěn vedoucímu k interstitiálnímu a intraalveolárnímu otoku s hemoragií a s ukládáním fibrinu. Opět odstranění neutrofilu předchází vzrůstu pulmonárního kapilárního výtoku.

Isolované perfundované králičí nebo krysí plíce se rovněž použily ke studiu mechanismu alveolárního poškození za okolností, které umožňují zlepšenou kontrolu faktorů které ovlivňují tok kapaliny. Jestliže se přidají neutrofily do perfusátu a pak se stimulují, uvolňuje se albumin z vaskulární oblasti do plicního interstitia a do alveolárních vzduchových prostor. Nestimulované neutrolily nebo samotný stimulus (například forbolmyristátacetát) selhávají při zvyšování alveolární kapilární permeability.

Jak je dále doloženo, stimulované neutrofily mohou nezávisle poškozovat plicní tkáň. Pokusy in vitro se provedly za použití vaskulárních endotheliálních a plicních epitheliálních buněk jakožto štítů. V některých zprávách se neutrolfily ukázaly jako vyčleňující endotheliální buňky nebo alveolární epitheliální buňky z povrchu misky se tkáňovou kulturou. Zřejmě pokud k něčemu takovému dochází in vivo, odkrytý povrch umožňuje podstatné uvolňování plasmových obsahů. Kromě toho mnohé zprávy pokládají za jasné, že stimulované neutrofily jsou schopny usnadňovat lysi kultivovaných vaskulárních endotheliálních buněk a alveolárních epitheliálních buněk.

Dehydroepiandrosteron (DHEA) je endogenní androgenický steroid, který vykazuje nesčetné biologické aktivity. Araneo B.A. a

kol. (1993, Arch. Surgery 128, str. 318 až 325) doložili, že podávání dehydroepiandrosteronu (DHEA) popálené myši v průběhu jedné hodiny po poškození vede k uchování normální imunologické kompetence včetně normální kapacity produkovat od T buněk odvozené lymfokiny, generace buněčné imunní odezvy a schopnosti odolávat navozené infekci. Eich D.M. a kol. (1992, americký patentový spis číslo 5 110810 a 1992, americký patentový spis číslo 5 162198) popisuje použití dehydroepiandrosteronu (DHEA) ke snížení rychlosti agregace destiček a použití dehydroepiandrosteronu (DHEA) nebo dehydroepiandrosteronsulfátu (DHEA-S) ke případnému snížení produkce thromboxanu.

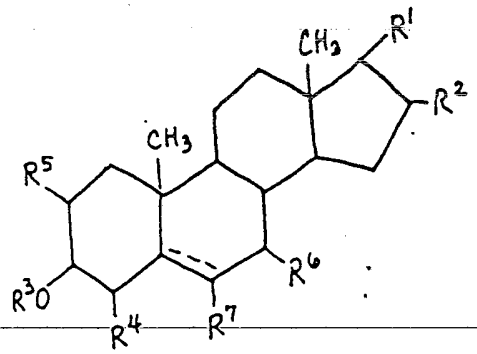
Nestler S. (1990, americký patentový spis číslo 4 920115) uvádí, že podáváním dehydroepiandrosteronu (DHEA) je možno u lidí snížit hmotu tuku, zvýšit svalovou hmotu, snížit hladinu LDL cholesterolu bez ovlivnění hladiny HDL cholesterolu, snížit hladiny serového apolipoproteinu B a neovlivnit citlivost tkáně k inzulinu. Kent S. (1982 Geriatrics 37, str. 157 až 159) popisuje dehydroepiandrosteron (DHEA) jakožto "zázračnou drogu", kterou se může předcházet obezitě, stárnutí, diabetes mellitus a onemocnění srdce. Dehydroepiandrosteron (DHEA) se v široké míře předepisuje jakožto účinná látka po mnoho let. Avšak organizace Food and Drug Administration nejnověji omezila jeho používání. Dehydroepiandrosteron (DHEA) je ochotně interkonvertibilní se svým sulfátovým esterem DHEA-S prostřednictvím působení intracelulárních sulfatas a sulfotransferas.

Nehledě na shora uvedené objevy, zaměřené na působení různých sloučenin na spáleniny, je potřebva identifikovat další sloučeniny, které by byly schopné předcházet nebo snižovat reperfusní poškození jakožto důsledek ischemie, působení ischemie spojené s infarkty nebo s traumatickým poškozením a identifikovat sloučeniny, které jsou schopné předcházet nebo snižovat bakteriální translokaci a ARDS. Proto se vynález týká předcházení nebo snižování progresivní nekrosy tkáně, předcházení nebo snižování reperfusního poškození, předcházení nebo snižování bakteriální translokace a předcházení nebo snižování syndromu dýchacích potíží do-

spělých (ARDS).

Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu je použití derivátu dehydroepiandrosteronu obecného vzorce I



(I)

kde znamená

R^1 atom kyslíku nebo hydroxylovou skupinu,

R^2 atom vodíku, methylovou skupinu, hydroxylovou skupinu nebo atom halogenu, pokud R^1 znamená atom kyslíku a atom vodíku, pokud R^1 znamená hydroxylovou skupinu,

R^3 atom vodíku, zbytek mastné kyseliny se 4 až 22 atomy uhlíku, skupinu alkylovou s 1 až 10 atomy uhlíku, alkenylovou s 1 až 10 atomy uhlíku, acetylenickou s 1 až 10 atomy uhlíku, $(X)_n$-fenylalkylovou s 1 až 5 atomy uhlíku v alkylovém podílu, $(X)_n$-fenylalkenylovou s 1 až 5 atomy uhlíku v alkenylovém podílu, nebo skupinu obecného vzorce $-CO-R^8$

R^4 a/nebo R^5 atom vodíku, hydroxylovou skupinu nebo atom halogenu,

R^7 atom vodíku, když čárkovaná čárka znamená dvojnou vazbu, atom kyslíku nebo vodíku a halogenu, když čárkovaná čárka znamená jednoduchou vazbu,

R^8 atom vodíku, zbytek mastné kyseliny s 4 až 22 atomy uhlíku, skupinu alkylovou s 1 až 10 atomy uhlíku, alkenylovou s 1 až 10 atomy uhlíku, acetylenickou s 1 až 10 atomy uhlíku, $(X)_n$-fenylalkylovou s 1 až 5 atomy uhlíku v alkylovém podílu,

$(X)_n$-fenylalkenylovou s 1 až 5 atomy uhlíku v alkenylovém podílu,

X na sobě nezávisle atom halogenu, skupinu alkylovou s 1 až 5 atomy uhlíku, alkenylovou s 1 až 4 atomy uhlíku, alkoxyskupinu s 1 až 5 atomy uhlíku, karboxyskupinu, nitroskupinu, sulfátovou skupinu, slufonylovou skupinu, skupinu karboxylového esteru s 1 až 6 atomy uhlíku nebo skupinu sulfátového esteru s 1 až 6 atomy uhlíku a

n 0, 1, 2 nebo 3,

pro výrobu farmaceutických prostředků k prevenci progresivní nekrose tkáně, reperfusního poškození, bakteriální translokace a syndromu dýchacích potíží dospělých, pro prevenci nebo snižování bakteriální translokace.

Farmaceutický prostředek podle vynálezu je tedy vhodný pro prevence nebo redukce reperfusního poškození po ischemii, po poškození buněk spojeném s ischemickou příhodou, jako jsou infarkt nebo traumatické poškození a tak prevence nebo snížení následné postupné nekrosy tkáně spojené s takovou ischemií. Tohoto efektu se dosahuje podáváním dehydroepiandrosteronu (DHEA) nebo derivátů DHEA jedincům. Podstatou vynálezu je také prevence nebo snížení bakteriální translokace a způsobu prevence nebo snížení ARDS. Podobně se bakteriální translokace a ARDS předcházejí nebo snižují podáváním dehydroepiandrosteronu (DHEA) nebo derivátů DHEA. Jakožto takové vhodné deriváty DHEA se uvádějí příkladně 16α-brom-DHEA, androstendiol a deriváty, které mají postranní řetězce v polohách 2', 4', 6' nebo 7'. Takové postranní řetězce nenarušují nativní aktivitu DHEA. jsou však schopné inhibovat sulfotransferasu k předcházení konverze dehydroepiandrosteronu (DHEA) na DHEA-S. S překvapení se zjistilo, že DHEA-S je užitečný k předcházení nebo ke snižování ischemie.

Vynález blíže objasňuje následující podrobný popis s připojenými obrázky:

Na obr. 1 jsou výsledky analyzy vytváření edema (otoku ucha) a jeho rozrušení v případě spálených uší myši kontrolní a ošetřené dehydroepiandrosteronem (DHEA).

Na ose x je počet hodin po tepelném poškození, na ose y otok ucha (v 0,001 palců), čára se čtverečky je pro samotný nosič, s kolečky pro ošetření dehydroepiandrosteronem.

Na obr. 2 je analyza vytváření otoku (otok ucha) a jeho rozrušení v případě spálených uší myši kontrolní a ošetřené dehydroepiandrosteron (DHEA), androstendiolem, 16α-brom-DHEA nebo známým antiglukortikoidem RU486.

Na ose x je ošetřování myši (denní) vždy v prvním sloupci stav před spálením, ve druhém sloupci 12 hodin po spálení a ve třetím sloupci 24 hodiny po spálení, přičemž v první sadě sloupců jde o ošetření samotným nosičem, ve druhé sadě o ošetření dehydroepiandrosteronem, ve třetí sadě o ošetření androstendiolem, ve čtvrté sadě o ošetření antiglukortikoidem RU486 a páté sadě sloupců o ošetření 16α-brom-DHEA, a na ose y je otok ucha (v 0,001 palců)

Na obr.3A je schopnost dehydroepiandrosteronu (DHEA) chránit proti většině progresivních následků ischemie nebo proti tepelné mu poškození ucha.

Na obr. 3B je schopnost androstendiolu chránit proti většině progresivních následků ischemia nebo proti tepelnému poškození ucha.

Na obr. 3C je schopnost 16α-brom-DHEA chránit proti většině progresivních následků ischemia nebo proti tepelnému poškození ucha.

Na obr. 3D jsou progresivní ischemické následky tepelného poškození ucha při podání samotného nosiče.

Na obr. 3E jsou progresivní ischemické následky tepelného poškození ucha při podání samotného androstendiolu.

Na obr. 3F jsou progresivní ischemické následky tepelného poškození ucha při podání samotného RU486.

Na obr. 4 je vliv ošetření dehydroepiandrosteronem (DHEA) na progresivní ischemii při podání 0 až 6 hodin po tepelného poškození.

Na ose x je doba ošetření po spáleni, přičemž v prvním sloupci jde o ošetření pouhým nosičem v následujících sloupcích jde vždy o ošetření dehydroepiandrosteronem, a to ve druhém sloupci bezprostředně po spálení, ve třetím jednu hodinu, ve čtvrtém dvě hodiny, v pátém 4 hodiny a v šestém šest hodin po spálení. Na ose y je střední stupeň ztráty tkáně.

Na obr. 5A je počet volných kapilár v blízkosti postkapilárních žilek v zoně 1 v průběhu reperfusního poškození.

Na obr. 5B je počet volných kapilár v blízkosti postkapilárních žilek v zoně 2 v průběhu reperfusního poškození.

Na obr. 5C je počet volných kapilár v blízkosti postkapilárních žilek v zoně 3 v průběhu reperfusního poškození.

Na ose x je vždy doba po reperfuzi, na ose y kumulativní skore, čára se čtverečky je pro samotný nosič, s kolečky pro předběžné ošetření dehydroepiandrosteronem.

Na obr. 6A je počet leukocytů procházejících lumenem postkapilárních žilek ve dvouminutové periodě.

Na obr. 6B je počet leukocytů přilínajících nebo nalepujících se na lumen postkapilárních žilek ve dvouminutové periodě.

Na obr. 6C je počet leukocytů migrujících přes endothelium ve dvouminutové periodě.

Osa x a y je pro stejné hodnoty jako podle obrázků 5, čárkovaný sloupec je pro samotný nosič, tečkovaný pro předběžné ošetření dehydroepiandrosteronem.

Na obr. 7A je rychlost červených krvinek v žilní krvi po reperfusi.

Na obr. 7B je rychlost červených krvinek arteriální krve po reperfusi.

Osa x a y je pro stejné hodnoty jako podle obrázků 5, čárkovaný sloupec je pro samotný nosič, tečkovaný pro předběžné ošetření dehydroepiandrosteronem.

Vynález se tedy týká způsobu prevence nebo snížení reperfusního poškození v důsledku ischemie a buněčného trauma, spojeného s ischemickými příhodami, jako je infarkt nebo traumatické poškození. Příkladně se jako infarkt uvádí infarkt myokardu. Příkladně se jako traumatické poškození uvádí poškození popálením, chirurgií, chemickým popálením a tržnými ranami. Při prevenci nebo snížení reperfusního poškození v důsledku ischemie a buněčného trauma, spojeného s ischemickými příhodami, se také předchází nebo se snižuje následující postupné odumírání tkáně, spojené s takovým infarktem nebo poškozením. Podle vynálezu se reperfusnímu poškození nebo buněčnému poškození, spojenému s ischemickými příhodami, jako je infarkt nebo traumatické poškození, předchází nebo se snižuje podáváním dehydroepiandrosteronu (DHEA) nebo derivátů dehydroepiandrosteronu ošetřovaným jedincům tak brzy, jak je to jen možné, s výhodou v průběhu čtyr hodin a nejvýhodněji v průběhu dvou hodin ischemie, infarktu nebo traumatického poškození.

Vynález se rovněž týká způsobu prevence nebo snižování bakteriální translokace. Podle vynálezu se bakteriální translokaci předchází nebo se snižuje shora popsaným podáváním dehydroepiandrosteronu (DHEA) nebo derivátů dehydroepiandrosteronu ošetřovaným jedincům. Dehydroepiandrosteron (DHEA) nebo deriváty dehydroepiandrosteronu se ošetřovaným jedincům podávají v průběhu 24 hodin po poškození, které má za následek bakteriální dislokaci.

Vynález se rovněž týká způsobu prevence nebo snižování syndromu dýchacích potíží dospělých (ARDS). Podle vynálezu se ARDS předchází nebo se snižuje shora popsaným podáváním dehydroepiandrosteronu (DHEA) nebo derivátů dehydroepiandrosteronu ošetřovaným jedincům. Dehydroepiandrosteron (DHEA) nebo deriváty dehydroepiandrosteronu se ošetřovaným jedincům podávají před klinickými symtomy ARDS, hlavně jedincům, u nichž je nebezpoečí ARDS.

V obecném vzorci I jsou atomy halogenu atom bromu, chloru, fluoru a jodu. Jakožto výhodné významy symbolů R^4, R^5 a R^6 se uvádějí hydroxylová skupina a atom bromu. Jiné vhodné substituenty je možno stanovit (a) podáním derivátů dehydroepiandrosteronu popáleným jedincům a určováním jejich protiischemického působení

a (b) stanovením množství sulfátovaného derivátu.

Je známo, že při reperfusním poškození, infarktech a při traumatickém poskození, jako jsou například infarkt myokardu, spáleniny, velká chirurgie, chemické popáleniny a řezné rány, může docházet k poškození, při kterém postupuje odumírání tkání a k přímému ovlivnění obklopující nenapadené tkáně. Tato progresivní ischemie má významný úkol v definování konečné patologie tkáně, pozorované v případě lidí, jako následek traumatického poškození (Robson M.C. a kol., 1979 Plastic and Reconstrictive Surgery 63, str. 781 až 787). Je rovněž známo, že důsledkem tepelného poškození je bakteriální translokace. Tepelné poškození, například popálením, je nejvhodnější pro studium traumatického poškození, při kterém dochází k progresivní ischemii.

Ztráta živoucí pokožky v důsledku procesu postupné ischemické nekrosy přispívá významně k velké ztrátě pokožku, která vyžaduje chirurgické naroubování po spáleninách (Jackson, 1953, British J. Surg 40, str. 588 až 593). Byly zkoumány četné zvířecí modely velmi napodobující vzhled klinických popálenin. Například po experimentálním opaření více než 20 % celkového povrchu těla hlodavce (například působením vody o teplotě 72 °C po dobu 7 sekund) se bezprostředně opařená tkáň chová zcela obdobně jako extensivně poškozená a okolní pokožková tkáň vyvinutá v následujících 24 až 72 hodinách. Pozorované jak klinické tak experimentální spáleniny dokládají, že celková ztráta pokožky při závažném tepelném poškození je sumou bezprostředně rozrušené tkáně a latentního poškození, ke kterému dochází na epidermis, dermis a na struktuře pokožky napadené a obklopující napadené místo.

Počáteční výzkumy, používající zádové části kůže hlodavců, vedly k některým dramatickým poznatkům. Zjistilo se, že opařením poškozená myš, která se ošetří v průběhu jedné hodiny po tepelném poškození mírnýr androgenním steroidovým hormonem dehydroepiandrosteron (DHEA), vykazuje vývoj poranění zcela odlišný od neošetřené nebo simulovaně ošetřené, stejně poškozené myši. Tři až čtyři dny po tepelném poškození vykazují všechna kontrolní poškozená zvířata třetí až čtvrtý stupeň poškození rozlehlé většiny

pokožkové tkáně v místě poškození. Skutečně veškerá kůže v napadené oblasti je definitivně ztracena jako následek postupné ischemické nekrosy. Míra poškození tkáně u těchto zvířat se spojuje s velkou ztrátou struktury kůže (vlasových folikl, krévních cév, neuronů a mazových žláz), s infiltrací fibroblastů, s extensivní kontrakcí rány a s vytvářením četných fibrozních adhezí pod napadenou oblastí kůže. Zvířata ošetřená dehydroepiandrosteronem (přibližně 2 mg/kg/den po počáteční dávce 4 mg/kg) však vykazují podstatnou ztrátu patologických jevů s mnohem menším progresivním poškezením dermis, subdermis a spojené struktury kůže. Zatímco je epithelializace aktivní jak u kontrolních tak u dehydroepiandrosteronem ošetřených myší, myši ošetřené dehydroepiandrosteronem vykazují mnohem menší kontrakci rány s výrazně menším vytvářením fibrosních adhesí pod místem rány.

Na modelu zádového poškození kůže je jasně doloženo. že ošetření dehydroepiandrosteronem vykazuje velmi kladné působení na progresi rány. Tento poznatek dokládá, že ošetření tepelně poškozených zvířat dehydroepiandrosteronem může ovlivnit hojení rány na základě zásadní schopnosti předcházet ischemii. Proto modifikace způsobu, který popsal Boykin J.V. a kol. (1990, Plastic Recontruct. Surgery 66, str.191 až 198) a Ericksson E. a kol.(1980, Microvascular Res. 19, str. 374 až 379) byla vyvinuta k umožnění kinetického hodnocení ke kvantifikaci progresivní kožní ischemie v průběhu bezprostředně a v pozdějších fázích po tepelném poškození ucha myši. Technika, použitá v těchto studiích, usnadňuje přesné a postupné monitorování na čase závislém postupu poškození kůže a ischemické nekrosy ucha myši opařené horkou vodou (o teplotě 52 °C v průběhu 24 sekund) a pokytuje dobrý živočišný model pro výzkum progresivní ischemie spálením poškozené tkáně.

Myší ucho sestává ze dvou vrstev pokožky, z chrupavky, z řídkých svalových buněk a ze spojovací tkáně. Organizace vaskulatury ucha je dobře organizována, zahrnuje arterioly, prekapilární arterioly, postkapilární žilky a žilky. Použitím aparatury, vhodné pro aplikaci řízeného tepelného poškození na celou plochu ucha myši, je možný výzkum bezprostředních změn v toku krve. Jako

výsledek přesných morfologických studií hemodynamických změn po poškození spálením myšího ucha jsou popsány tři oddělené zóny, snadno oddělitelné podle stupně patologie. Tři zóny zahrnují zonu kompletní kapilární okluze, zónu parciální okluse (stasis) a zónu kapilární hyperemia. Použitím aparatury, vhodné pro aplikaci řízeného tepelného poškození na celou plochu ucha myši (Boykin J.V. a kol.,1980, Plastic Recontruct.Surgery 66, str.191 až 198). Jednu hodinu po poškození se plocha celkové kapilární okluse omezí na vzdálený okraj myšího ucha. Zóna parciální okluse nebo stasis je umístěna bezprostředněji do této nejokrajovější a bezprostředně citlivé oblasti. Je to hlavní oblast ušní tkáně, která vykazuje postupnou ischemii v průběhu 24 až 72 hodin po tepelném poškození a která nakonec podléhá nekrose. Konečně nejbezprostřednější oblast napadeného ucha je zóna hyperemia. Tato oblast je téměř odolná progresivní pospáleninové ischemii.

Zjistilo se, že výsledkem podávání terapeuticky účinného množství dehydroepiandrosteronu nebo jeho derivátů obecného vzorce I ve fysiologicky vhodném nosiči tak brzy, jak je jen možné, s výhodou v průběhu čtyr hodin reperfusního poškození, infarktu nebo traumatického poškození je prevence nebo snížení ischemie, související s reperfusním poškozením, s infarktem nebo s traumatickým poškozením. Prevencí nebo snížením ischemie se dosáhne prevence nebo snížení následující nekrosy tkáně, spojené s takovou ischemií. Toto snížení ischemie je následkem snížení přilnavosti neutrofilů k endotheliálním buňkám, jak dokládá příklad. Následkem snížené neutrofilní přilnavosti se neutrofily neaktivují a neprodukují buněčné faktory, které vedou k agregaci destiček. Je nejvýhodnější, aby se dehydroepiandrosteron nebo jeho deriváty obecného vzorce I podávaly v průběhu dvou hodin, kdy jedinec podléhá reperfusi, infarktu nebo traumatickému poškození. Dehydroepiandrosteron nebo jeho deriváty obecného vzorce I se podávají jedincům ve formě esteru nebo v jiné farmaceuticky vhodné formě a v pojidlech, elixírech nebo v jiných farmaceuticky vhodných směsích nebo s jinými farmaceuticky vhodnými nosiči.

Farmaceutické prostředky, obsahující dehydroepiandrosteron

obecného vzorce I podle vynálezu jakožto účinnou látku v těsné směsi s farmaceutickým nosičem se mohou připravovat způsoby o sobě známými pro přípravu farmaceutických prostředků. Nosič může mít nejrůznější formu v závislosti na formě podání žádoucího farmaceutického prostředku například pro případ inravenosního, orálního nebo paranterálního podání. Pro přípravu farmaceutických prostředků pro orální podání se může používat jakéhokoliv běžného farmaceutického prostředí, jako jsou například voda, glykoly, oleje, alkoholy, ochucovací přísady, konservační přísady a barviva pro orální kapalné prostředky (jako jsou například suspenze, elixíry a roztoky). Nebo se může používat nosičů, jako jsou například škroby, cukry, ředidla, granulační přísady, mazadla, pojidla, rozptylovací činidla pro orální pevné prostředky (jako jsou například prášky, kapsle a tablety). Popřípadě se tablety mohou povlékat cukrem nebo enterickým povlak o sobě známými způsoby. Pro parenterální podání je nosičem zpravidla sterilní voda, přičemž v úvahu přicházejí také jiné složky, například napomáhající rozpouštění nebo konservování. Vstřikovatelné suspenze se rovněž mohou připravovat ve vhodném kapalném nosiči za použití suspenzačního činidla.

Dávka dehydroepiandrosteronu nebo jeho derivátu obecného vzorce I podle vynálezu se řídí o sobě známými farmaceutickými zásadami, to znamená, že se podává účinné látky 1 až 200 mg/kg, s výhodou 2 až 50 mg/kg. Dávka se může podávat denně nebo ob den ve formě jedné dávky nebo ve formě rozdělených dávek k dosažení vhodné denní dávky. V případě nechráněných sloučenin, to znamená sloučenin, které mohou být sulfatovány lidskými sulfotransferasami nebo sulfatasami, je výhodné podávat dávku v nadbytku k zajištění podání dostatečného množství účinné látky, zvláště v případech, kdy jsou sulfatasy neaktivní v místě poškození tkáně. Je výhodné, aby byly nechráněné sloučeniny podávány denně, zatímco chráněné sloučeniny se mohou podávat buď denně nebo ob den. Jedinec se ošetřuje dehydroepiandrosteronem nebo jeho derivátem obecného vzorce I po dobu 3 až 30 dní, s výhodou 7 až 14 dní po in- f arktu nebo po traumatickém poškození.

V případě jedinců, u kterých je nebezpečí infarktu myokardu nebo nebezpečí reperfusního poškození, je možné předcházet nebo snižovat progresivní ischemii, spojenou s takovým infarktem nebo reperfusním poškozením, podáním dehydroepiandrosteronu nebo jeho derivátu obecného vzorce I současně a/nebo po infarktu nebo po reperfusním poškození ve shora uvedené dávce. Ošetření po infarktu myokardu je shora popsáno. Dehydroepiandrosteron nebo jeho deriváty obecného vzorce I se jedincům s klasickými známkami hrozícího infarktu myokardu mohou podávat stejně, jako shora popsáno pro ošetřování stavu po infarktu.

V případě jedinců, u kterých je nebezpečí bakteriální translokace se takové bakteriální translokaci předchází nebo se snižuje podáváním dehydroepiandrosteronu nebo jeho derivátů obecného vzorce I jako shora popsáno a ve shora uvedených dávkách. Podávání pro předcházení nebo snižování bakteriální translokace pokračuje tak dlouho, dokud u jedince trvá nebezpečí bakteriální translokace.

Zjistilo se, že je rozhodující, aby dehydroepiandrosteron nebo jeho deriváty obecného vzorce I byl podáván brzy po reperfusním poškození, po infarktu nebo po traumatickém poškození k předcházení nebo ke snížení jakékoliv poškození buněk. Pokud k podávání těchto sloučenin dojde příliš pozdě, krevní žíly okludují (zpočátku s neutrofily přilehajícími na endotheliální buňky), přičemž v takovém případě je podávání těchto sloučenin k předcházení nebo k redukci ischemie nevhodné. Chvíle, ve které se má začít s podáváním, může záviset na typu reperfusního poškození, infarktu nebo traumatického poškození a může se snadno stanovit na vhodných zvířecích modelech. Je však výhodné, aby se s podáváním dehydroepiandrosteronu nebo jeho derivátů obecného vzorce I započalo v průběhu čtyr hodin a především v průběhu dvou hodin ischemie, infarktu nebo traumatického poškození. Podávání dehydroepiandrosteronu nebo jeho derivátů k předcházení nebo k redukci bakteriální translokace má začínat v průběhu 24 hodin poškození nebo příhody způsobující stres. Je výhodné, aby podávání těchto sloučenin k předcházení nebo k redukci bakteriální translokace začalo

v průběhu čtyr hodin a především v průběhu dvou hodin. Podávání dehydroepiandrosteronu nebo jeho derivátů k předcházení nebo k redukci ARDS má začít před nastoupením klinických symptomů. Obecně se sloučeniny mají podávat jedincům s nebezpečím ARDS.

Vynález blíže objasňují, nijak však neomezují následující příklady praktického provedení. Používá se o sobě známých způsobů v oboru nebo specificky popsaných způsobů.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Experimentální model tepelného poškození

Byl vyvinut experimentální model tepelného poškození používající myších uší, přičemž teplota a doba vystavení působení teploty se stanovují empiricky. Podmínky představují minimální poškození spálením s až celkovou nekrosou tkáně vystaveného ucha neošetřené myši 24 až 72 hodin po spálení. Skupiny myši Balb/c ve věku přibližně devět týdnů, označené identifikačními značkami, se rozdělí na kontrolní a ošetřené podskupiny. Zaznamenává se tloušťka ucha ponořovaného do horké vody a pak se celé ucho anestetizované myši ponoří do vody o teplotě 52 °C přesně na 24 sekundy. Každá myš se pak vrátí do své klece po vstříknutí buď propylenglykolového nosiče (kontrola) nebo 100 µg zkoušené látky, rozpuštěné v propylenglykolu. Zaznamenávají se změny otoku ucha jednotlivé myši před spálením a v různých hodinách po tepelném poškození.

Příklad 2

Skupiny myši Balb/c ve věku přibližně devět týdnů, označené identifikačními značkami, se rozdělí na kontrolní a ošetřené podskupiny. Zaznamenává se tloušťka ucha ponořovaného do horké vody a pak se celé ucho anestetizované myši ponoří do vody o teplotě 52 °C přesně na 24 sekundy. Každá myš se pak vrátí do své klece

po vstříknutí buď propylenglykolového nosiče (kontrola) nebo 100 µg dehydroepiandrosteronu rozpuštěného v propylenglykolu. Zaznamenávají se změny otoku ucha jednotlivé myši před spálením a 1, 3, 6, 9, 12, 18, 24 a 48 hodin po tepelném poškození.

Výsledky analyzy vytváření otoku a rozlišení uší kontrolních myší a myší ošetřených dehydroepiandrosteronem jsou na obr. 1. Zbobtnání uší, jako míra otoku, dosahuje vrcholu jak u myší ošetřených dehydroepiandrosteronem tak u kontrolních spálených myší šest hodin po tepelném poškození. U neošetřených myší míra otoku začíná klesat po 12 hodinách a rychlý pokles pokračuje v následujících 12 hodinách. Mezi 24 a 48 hodinou po spálení se měření ucha přerušuje v případě neošetřené skupiny pro naprostou ztrátu tkáně v důsledku kompletní mikrovaskulární okluse původní zóny stase. Kinetická analyza otoku neošetřené myši a myši ošetřené dehydroepiandrosteronem dokládá po tepelném poškození, že příhody v průběhu prvních 24 hodin po tepelném poškození jsou rozhodující pro život tepelně poškozené tkáně, přičemž případné zachování živé tkáně ucha ve 48. hodině je nepřímo úměrné rychlosti, se kterou otok ustupuje mezi pikem v šesté hodině a konečnými 48 hodinami.

Kromě analyzy otoku myši tepelně poškozené neošetřené a myši ošetřené dehydroepiandrosteronem se fotograficky dokumentují změny životnosti samotné ušní tkáně. Poškození ušní tkáně myši, které se podal toliko nosič, je extensivní s větší než 70% nekrotizací ušní tkáně a s destrukcí ve 48 hodinách. Celkově napadená plocha se jeví zahrnovat jak zónu kompletní vaskulární okluse tak původní zónu stase. Tato další zóna se poškozuje jako sekundární důsledek tepelného poškození, přičemž se tento stav definuje jako progresivní dermální ischemie po spálení. Avšak myš ošetřená dehydroepiandrosteronem vykazuje nepatrné poškození a zachování ušní spálené tkáně. Jediná oblast ušní tkáně, která byla zjevně ovlivněna, nikoliv však ztracená tepelným poškozením, odpovídá pouze původní zóně kompletní vaskulární okluse.

Příklad 3

Vliv různých sloučenin na tepelně poškozený model

Skupiny myši Balb/c ve věku přibližně devět týdnů, se rozdělí na podskupiny, kterým se podává buď samotný nosič, dehydroepiandrosteron (DHEA), adrostendiol, 16-α-brom-DHEA, androstendion nebo potentní anti-glukokortikoid, RU486. Jednotlivé myši se podává 100 µg uvedených steroidů nebo samotný nosič bezprostředně po spálení (den 0) a další dávky 50 µg každých 24 hodin po dobu trvání pokusu. Odezva otoku uší každé jednotlivé označené myši se zaznamenává před spálením a 12, 24 a 48 hodin po spálení.,

Spálené uši myši ošetřené terapeuticky adrostendiolem, dehydroepiandrosteronem nebo nemetabolizovaným syntetickým derivátem dehydroepiandrosteronu, 16-α-brom-DHEA, vyvíjejí vždy významný otok ucha jako odezvu na poškození teplem (obr. 2) a vykazují pomalou a konstantní rychlost vymizení otoku. Tato pomalá ztráta otoku po tepelném poškození ucha je paralelní s toliko minimální dermální ischemií a nekrosou oblasti. Výsledky této studie také potvrzují, že vývoj otoku spáleného ucha neošetřené myši dosahuje píku a pak se ztrácí poněkud rychleji takže 24 až 48 hodin po spálení dochází k výraznému rozsahu ischemie tkáně a nekrosy. Obdobný obraz otoku po postupné ischemické nekrose se pozoruje u myši ošetřené androstendionem. Podobně obdobný obraz otoku po postupné ischemické nekrose se pozoruje u skupiny myší tepelně poškozených ošetřených RU486, což znamená, že dehydroepiandrosteron nepůsobí pouze svými antiglukokortikoidními vlivy.

Obr. 3A až 3C dokládají schopnost dehydroepiandrosteronu, androstendiolu a 16-α-brom-DHEA chránit proti většině ischemických důsledků tepelného poškození ucha. Myš, ošetřená jedním z těchto steroidních hormonů, vykazuje časné změny ušní tkáně s mírnou ztrátou nebo bez ztráty ušní tkáně několik dní po tepelném poškození. Zdá se, že napadená oblast odpovídá zóně kompletní okluse definované Boykinem J.V. a kol. (1980, Plastic Recontruct. Surgery 66, str.191 až 198). Myš, které se podal samotný nosič, androstendion nebo RU486 (obr. 3D až 3F) ztrácí po tepelném

poškození více než 70 % tkáně vystavené tepelnému poškození v prvních 48 hodinách po tepelném poškození v důsledku postupné popáleninové ischemické nekrosy. Bez účinného ošetření nekrotizovaná oblast ucha po tepelném poškození odpovídá zóně kompletní okluse plus zóně stase. Tak je doloženo, že ošetření tepelně poškozené myši buď samotným dehydroepiandrosteronem, androstendiolem nebo 16-α-brom-DHEA nejen mění přirozený průběh vytvořeného otoku ucha, ale také poněkud chrání napadenou tkáň od postupného poškození inhibicí vývoje ischemie v zóně stase a konečného vývoje nekrosy této oblasti.

Při podobné zkoušce se zjistilo, že 16α-hydroxy-DHEA méně chrání, to znamená snižuje rozsah avšak nepředchází totálně postupné ischemii a 16α-chlor-DHEA mírně chrání proti postupné ischemii.

Příklad 4

Načasování počátečního podání dehydroepiandrosteronu

Provádí se zkouška pro stanovení, zdali podání dehydroepiandrosteronu musí být bezprostředně nebo až za několik hodin po tepelném poškození. Myši se anestetizují, popálí se v anestetizovaném stavu, čtyřem myším se podá samotný nosič, čtyřem se podá 100 µg dehydroepiandrosteronu a zbylé myši se rozdělí na další skupiny po čtyřech. Všem myším v jednotlivé skupině se podá 100 µg dehydroepiandrosteronu jednu, dvě, čtyři nebo šest hodin po tepelném poškození. Ztráta tkáně v případě každé myši se hodnotí 72 hodin po tepelném poškození a výsledky jsou uvedeny na obr. 4.

Obr. 4 dokládá, že použití dehydroepiandrosteronu se může odložit na dobu až dvou hodin bez výrazného rozdílu chránícího působení dehydroepiandrosteronu, které se hodnotí stupněm 1,24 ± 0,25 (p je menší než 0,001). I za při prodlevě čtyř hodin před podáním dehydroepiandrosteronu je střední hodnotící stupeň 2,75 ± 0,479 (p je menší než 0,016). Při prodlevě šesti hodin před podáním dehydroepiandrosteronu je střední hodnotící stupeň ztráty tkáně 4,00 ± 0,408 a to je značný rozdíl od skupiny, které se po-

dal dehydroepiandrosteron bezprostředně po tepelném poškození (p je menší než 0,05). Skutečnosti, vedoucí k nekrose, jsou obráceně úměrné podání dehydroepiandrosteronu až po několik hodin po tepelném poškození.

Shora popsané příklady dokládají, že mírně intenzivní tepelné poškození myšího ucha je směrodatným a reprodukovatelným modelem pro zkoušení postupné ischemické nekrosy kůže. Z výsledků je zřejmé, že bezprostřední použití dehydroepiandrosteronu po spálení má ochranné působení na dermální ischemii, navozenou tepelným poškozením. Kromě dehydroepiandrosteronu se zkoušely se zřetelem na terapeutické působní některé jiné steroidní hormony. Výsledky jsou uvedeny v tabulce I.

Tebulka I

Výsledky zkoušky steroidních hormonů (100 µg/myš)	Analyza ischemie (na modelu myšího ucha)
DHEA-S	nechrání
DHEA	chrání
16α-brom-DHEA	chrání
androstendiol	chrání
androstendion	nechrání
RU 486	nechrání

Spolu s DHEA androstendiol a 16α-brom-DHEA výrazně chrání tím, že 90 až 100 % ušní tkáně zůstává neporušen, pokud se pokus ukončí za dva týdny, kdy je proces hojení ukončen. 16α-Hydroxy-DHEA má méně chráníci působení a 16α-chlor-DHEA chrání mírně. Avšak DHEA-S, androstendion a RU 486 je zcela neúčinný, přičemž poškození ucha a ztráta tkáně je stejná jako u neošetřených kontrolních myší v případě všech zvířat v průběhu 48 hodin po tepelném poškození. Schopnost oddělit chráníci steroidy od nechráních steroidů u modelů tepelně poškozených je nejpravděpodobněji usnadněna skutečností, že je přímé nebo bezprostřední poškození spálením ušní tkáně minimální a že většina poškození, ke kterému dochází, je způsobena postupnou ischemií a nekrosou, způsobenou odezvou jedince na spáleninu opařením.

Výsledky dokládají, že dehydroepiandrosteron, nikoliv jeden

z jeho přirozených metabolitů, je činidlem zprostředkujícím ochranu proti postupné ischemické nekrose. Podklad pro tonto závěr je jasný. 16α-Brom-DHEA je analog dehydroepiandrosteronu, který se nemůže účinně metabolizovat na androgenové steroidy a jeho chránící působení je stejné jako dehydroepiandrosteronu. Androstendiol má také stejné biologické působení jako dehydroepiandrosteron v případě modlu ucha tepelně poškozeného. Tento steroid je přírodním metabolitem dehydroepiandrosteronu, který se může převádět zpět na dehydroepiandrosteron modifikací závislou na enzymu. Také se může dále metabolizovat na testosteron. Androstendion, rovněž sekundární metabolit dehydroepiandrosteronu, se může metabolizovat pouze na produkty (například testosteron a estrogeny) bez známé konverze na dehydroepiandrosteron. Proto androstendion nemůže chránit proti postupné dermální ischemii v tomto modelu, přičemž nedostatek tohoto působení podpírá závěr, že aktivním steroidem je dehydroepiandrosteron a nikoliv androgen nebo estrogen. Kromě toho se zjistilo, že sulfatovaný dehydroepiandrosteron, který se v lidském těle přirozeně vyskytuje, je neschopný chránit proti postupující ischemii.

Dehydroepiandrosteron má zveřejněnou schopnost předcházet některým biologickým jevům, způsobeným glukokortikoidy. Možnost, že dehydroepiandrosteron působí jako antiglukokortikoid v případě modelu dermální ischemie myšího ucha poškozeného teplem se zkoušela podáním známého anti-glukokortikoidu, RU 486, myši bezprostředně po tepelném poškození. Jak tento model doložil a za zkušebních podmínek, látky s anti-glukokortikoidní účinností neposkytly příznivé působení.

Příklad 5

Vliv dehydroepiandrosteronu na reperfusní poškození

Sameční krysy Sprague-Dawley o hmotnosti 130 až 170 g se náhodně určí k neošetření, k předběžnému ošetření samotným nosičem nebo k předběžnému ošetření dehydroepiandrosteronem (4 mg/kg). Myši se ošetřují nosičem nebo dehydroepiandrosteronem den před

chirurgickým zásahem a v den chirurgického zásahu. Anestesie se navodí intraperitoneálním podáním pentobarbitalu (60 až 70 mg/kg). Krysy se umístí na vyhřívanou podložku a tělesná teplota (měřená rektální sondou) se udržuje na 35 až 37 °C. Detekce kremasterového svalu na jeho neurovaskulárním pedunkulu se provádí o sobě známými způsoby (Anderson G.L. a kol. 1988, Microvascular Res. 36, str. 56 až 63; Siemionow M. a kol. 1991, Microcirc. Endoth. Lymphatics 7, str. 183 až 197; Siemionow M. a kol. 1993 J. Hand Surgery 18A, str. 963 až 971). Vyřízne se kůže z předního kyčelního hřbetu k vytipování skrota. Testicl s nedotčeným kremasterovým svalem se odřízně od skrota. Vytvoří se 1 cm otvor na břišním povrchu kremasteru a odstraní se testicl a odstraní se spermový provazec. Pod mikroskopem se dokonale izoluje neurovaskulární pendikulus, sestávající z pubicko epigastrických arterií, z žíly a z genitofemorálního nervu, vyříznutím k začátku žil od vnější kyčelní arteria a žíly. Nakonec se čelní stěna kremasterového svalového váčku otevře a ostrůvek kremasterového svalového plátku se připraví pro intravitální videomikroskopii. Krysa se vloží do speciálně určené tkáňové lázně a kremasterový plátek se rozprostře na krycí sklíčko v otvoru ve dnu lázně a fixuje se s 5 - O hedvábnými stehy. Pak se ze spodu prosvítí wolframovou lampou s optickým vláknem. Sval se udržuje vlhký a pokrytý nepropustným plastovým filmem. Tkáňová lázeň, určená speciálně pro řízení teploty, se naplní 0.9% solankou a teplota se udržuje na 35 až 36 °C. Mikroskop se vybaví barevnou videokamerou. Videoobraz mikrocirkulace je na monitoru 482,6 mm, přičemž je konečné zvětšení 1800. Měření mikrovaskulární aktivity se zaznamenává po izolaci svalu k nastavení preischemické základní hodnoty (baseline). Po správném umístění svorek k dokonalému vyloučení toku krve do svalového transplantátu je ischemická perioda šest hodin. Po odstranění svorek k navození reperfusního poškození se měří aktivita mikrovaskulatury 30, 60 a 90 minut po reperfusi. V případě všech zkoušených subjektů následuje ischemie po obnovení toku krve a pak v počáteční periodě toku krve mikrocirkulací. Tento průlom cirkulační aktivity je následován reperfusním poškozením, které na-

vozuje ztrátu toku.

Pro hodnocení stavu mikrovaskulatorního systému kremasterového svalu před ischemií a po reperfusi se používá následujících parametrů:

1) Hustota perfundovaných kapilár

Hustota perfundovaných kapilár v každé ze tří oblastí plátku (zóna 1, 2 a 3) se měří počítáním protékaných kapilár v blízkosti předem vybrané postkapilární žilky. Počítá se devět viditelných polí kapilár v případě každé postkapilární žilky pro celkem 27 podílů na kremasterovém plátku. Výsledky jsou na obr. 5A, 5B a 5C pro zóny 1, 2 a 3.

2) Počet leukocytů v postkapilárních žilkách

Videozáznam tří preselektovaných postkapilárních žilek se snímá v blízké střední a vzdálené oblasti plátku. Zaznamenává se pro každou žilku počet leukocytů protékajících lumen, počet přiléhajících k endotheliu a počet migrovaných přes endothelium v průběhu dvou minut. Výsledky jsou uvedeny na obr. 6A, 6B a 6C.

3) Rychlosti buněk červených krvinek v A1 (prvního řádu) a A2 (druhého řádu) arteriolách

Rychlosti buněk červených krvinek se zaznamenávají v hlavních arteriolách kremasterového plátku za použití obvyklého optického velocimetru Doppler. Výsledky jsou uvedeny na obr. 7A a 7B pro rychlost žilní a arteriální krve.

A. Reperfusní poškození neošetřených a nosičem ošetřených krys

Šest krys se neošetřuje a šest krys se ošetřuje nosičem. Za podmínek šestihodinové ischemie a 90 minutové reperfuse dramaticky vzrůstá počet válečkovitých, přilnutých a transmigrovaných leukocytů v průběhu 60 minutové reperfuse a vykazuje další vzrůst v 90 minutách (obr. 67A až 6C). Pozoruje se dramatický pokles absolutního počtu perfundovaných kapilár na vysoce silové pole, které se podrobuje 30 a 60 minutové postreperfusi s pokračujícím poklesem počtu protékaných kapilár 90 minut po reperfusi (obr. 5A až 5C). Podobně rychlosti červených krvinek v nádobách rozměru A2 je podstatně nižší v 60 a 90 minutách po reperfusi (obr. 7A a 7B).

B. Reperfusní poškození krys ošetřených dehydroepiandrosteronem

Za podmínek, kdy se krysy předběžně ošetřují podkožním vstřiknutím 4 mg/kg dehydroepiandrosteronu den před a v den chirurgického zásahu se měří výrazné a vysoce významné ochranné působení terapie. Všechny tři parametry vykazují hodnoty, které se těsně blíží nebo jsou identické s normálními hodnotami. Hlavního významu je skutečnost, že ve všechn časových bodech jsou endoteliální adhesivní charakteristiky nezměněny od základních hodnot. Tento závěr je založen na skutečnosti, že četné válečkovité, ulpívající a transmigrační leukocyty se jeví výrazně podobné základním hodnotám (obr. 6A až 6C). Rychlosti červených krvivek ve A2 arteriolách se pomaleji vracejí k normálním rychlostem toku s rychlostmi v některých oblastech měření 75 % normálu v 90 minutách po reperfusi (obr. 7A a 7B). V čase 90 minut počet kapilár v mikrovaskulatuře není podstatně rodílný od základních hodnot, dosažených před ischemií (obr. 5A až 5C).

Bez snahy vázat na nějakou teorii fysiologické a biochemické operace dehydroepiandrosteronu a jeho derivátů obecného vzorce I se zdá, že antiischemické působení těchto sloučenin souvisí s jejich působením na přilnavost neutrofilů na endotheliální buňky. Proto působení těchto sloučenin při prevenci nebo snižování ischemie, která může být důsledkem různých typů poškození tkáně, může založeno na ovlivňování přilnavosti endotheliálních buněk. Proto inhibice přilnavosti neutrofilů předchází aktivaci neutrofilů a transmigraci do tkáňové strany endothelia. Jelikož se transmigrace neutrofilů inhibuje, předchází se neutrofily navozenému masivnímu poškození endotheliálních buněk a parenchymálních buněk. Jelikož se předchází neutrofilkní aktivaci produkce buněčných faktorů (neutrofily), předchází se rovněž agregaci destiček. Tím se předchází a snižje se progresivní nekrosa tkáně. Kromě toho progresivní ischemie střevní tkáně (vedoucí k bakteriální translokaci) a epidermis a srdečního svalu a ischemie alveolární stěny (vedoucí k ARDS) se zprostředkovává podobným mechanismem. Proto jsou tyto sloučeniny účinné při předcházení nebo při snižování bakteriální translokace a ARDS.

Připomíná se, že způsoby a sloučeniny podle vynálezu se mohou vnášet do formy nejrůznějšího provedení, přičemž je zde pojednáno toliko o několika takových formách. Pracovníkům v oboru je zřejmé, že v rámci vynálezu jsou možná i další provedení. Proto jsou shora uvedená provedení míněna toliko jako objasňující a neomezující příklady.

Průmyslová využitelnost

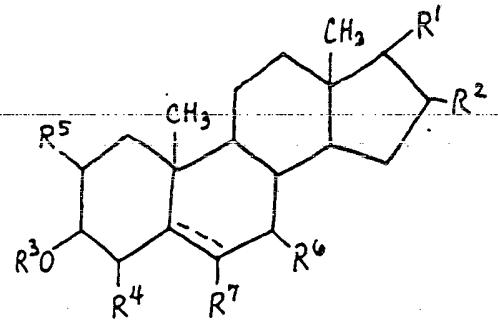
Použití dehydroepiandrosteronu (DHEA) nebo jeho derivátů pro výrobu farmaceutických prostředků k prevenci progresivní nekrose tkáně, reperfusního poškození, bakteriální translokace a syndromu dýchacích potíží dospělých. Jakožto vhodné deriváty DHEA se uvádějí příkladně 16α-brom-DHEA, androstendiol a deriváty které mají postranní řetězce v poloze 4´ a/nebo 7´, které nenarušují nativní aktivitu DHEA, a jsou schopné inhibovat sulfotransferasu k předcházení konverze DHEA na DHEA-S.

1934-95

96 11 20

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Použití derivátu dehydroepiandrosteronu obecného vzorce I



(I)

kde znamená

R^1 atom kyslíku nebo hydroxylovou skupinu,

R^2 atom vodíku, methylovou skupinu, hydroxylovou skupinu nebo atom halogenu, pokud R^1 znamená atom kyslíku a atom vodíku, pokud R^1 znamená hydroxylovou skupinu,

R^3 atom vodíku, zbytek mastné kyseliny se 4 až 22 atomy uhlíku, skupinu alkylovou s 1 až 10 atomy uhlíku, alkenylovou s 1 až 10 atomy uhlíku, acetylenickou s 1 až 10 atomy uhlíku, $(X)_n$-fenylalkylovou s 1 až 5 atomy uhlíku v alkylovém podílu, $(X)_n$-fenylalkenylovou s 1 až 5 atomy uhlíku v alkenylovém podílu, nebo skupinu obecného vzorce $-CO-R^8$

R^4 a/nebo R^5 atom vodíku, hydroxylovou skupinu nebo atom halogenu,

R^7 atom vodíku, když čárkovaná čárka znamená dvojnou vazbu, atom kyslíku nebo vodíku a halogenu, když čárkovaná čárka znamená jednoduchou vazbu,

R^8 atom vodíku, zbytek mastné kyseliny s 4 až 22 atomy uhlíku, skupinu alkylovou s 1 až 10 atomy uhlíku, alkenylovou s 1 až 10 atomy uhlíku, acetylenickou s 1 až 10 atomy uhlíku, $(X)_n$-fenylalkylovou s 1 až 5 atomy uhlíku v alkylovém podílu, $(X)_n$-fenylalkenylovou s 1 až 5 atomy uhlíku v alkenylovém podílu,

X na sobě nezávisle atom halogenu, skupinu alkylovou s 1 až 5

atomy uhlíku, alkenylovou s 1 až 4 atomy uhlíku, alkoxyskupinu s 1 až 5 atomy uhlíku, karboxyskupinu, nitroskupinu, sulfátovou skupinu, slufonylovou skupinu, skupinu karboxylového esteru s 1 až 6 atomy uhlíku nebo skupinu sulfátového esteru s 1 až 6 atomy uhlíku a

n 0, 1, 2 nebo 3,

pro výrobu farmaceutických prostředků k prevenci progresivní nekrose tkáně, reperfusního poškození, bakteriální translokace a syndromu dýchacích potíží dospělých, pro prevenci nebo snižování bakteriální translokace,

2. Použití podle nároku 1 derivátu dehydroepiandrosteronu obecného vzorce I, kde znamená R^3 atom vodíku nebo zbytek mastné kyseliny se 4 až 22 atomy uhlíku a ostatní symboly mají v nároku 1 uvedený význam.

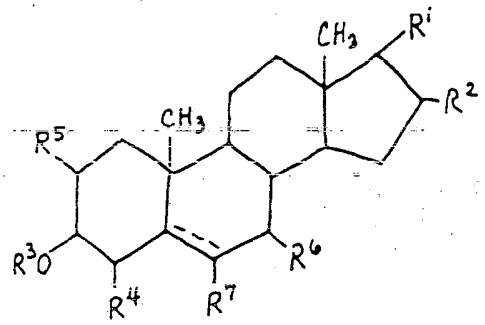
3. Použití podle nároku 1 derivátu dehydroepiandrosteronu obecného vzorce I, kde znamená R^1 atom kyslíku a R^2, R^3, R^4, R^5, R^6 a R^7 atom vodíku.

4. Použití podle nároku 1 derivátu dehydroepiandrosteronu obecného vzorce I, kde znamená R^1 hydroxylovou skupinu a R^2, R^3, R^4, R^5, R^6 a R^7 atom vodíku.

5. Použití podle nároku 1 derivátu dehydroepiandrosteronu obecného vzorce I, kde znamená R^1 atom kyslíku, R^2 atom bromu a R^3, R^4, R^5, R^6 a R^7 atom vodíku.

6. Použití podle nároku 1 derivátu dehydroepiandrosteronu obecného vzorce I, kde znamená R^1 atom kyslíku, R^2 hydroxylovou skupinu a R^3, R^4, R^5, R^6 a R^7 atom vodíku.

7. Farmaceutický prostředek k prevenci progresivní nekrose tkáně, reperfusního poškození, bakteriální translokace a syndromu dýchacích potíží dospělých a pro prevenci nebo snižování bakte-



(I)

kde znamená

R^1 atom kyslíku nebo hydroxylovou skupinu,

R^2 atom vodíku, methylovou skupinu, hydroxylovou skupinu nebo atom halogenu, pokud R^1 znamená atom kyslíku a atom vodíku, pokud R^1 znamená hydroxylovou skupinu,

R^3 atom vodíku, zbytek mastné kyseliny se 4 až 22 atomy uhlíku, skupinu alkylovou s 1 až 10 atomy uhlíku, alkenylovou s 1 až 10 atomy uhlíku, acetylenickou s 1 až 10 atomy uhlíku, $(X)_n$-fenylalkylovou s 1 až 5 atomy uhlíku v alkylovém podílu, $(X)_n$-fenylalkenylovou s 1 až 5 atomy uhlíku v alkenylovém podílu, nebo skupinu obecného vzorce $-CO-R^8$

R^4 a/nebo R^5 atom vodíku, hydroxylovou skupinu nebo atom halogenu,

R^7 atom vodíku, když čárkovaná čárka znamená dvojnou vazbu, atom kyslíku nebo vodíku a halogenu, když čárkovaná čárka znamená jednoduchou vazbu,

R^8 atom vodíku, zbytek mastné kyseliny s 4 až 22 atomy uhlíku, skupinu alkylovou s 1 až 10 atomy uhlíku, alkenylovou s 1 až 10 atomy uhlíku, acetylenickou s 1 až 10 atomy uhlíku, $(X)_n$-fenylalkylovou s 1 až 5 atomy uhlíku v alkylovém podílu, $(X)_n$-fenylalkenylovou s 1 až 5 atomy uhlíku v alkenylovém podílu,

X na sobě nezávisle atom halogenu, skupinu alkylovou s 1 až 5 atomy uhlíku, alkenylovou s 1 až 4 atomy uhlíku, alkoxyskupinu s 1 až 5 atomy uhlíku, karboxyskupinu, nitroskupinu, sulfátovou skupinu, slufonylovou skupinu, skupinu karboxylového esteru s 1 až 6 atomy uhlíku nebo skupinu sulfátového esteru s 1 až 6 atomy uhlíku a

n 0, 1, 2 nebo 3,

atomy uhlíku, alkenylovou s 1 až 4 atomy uhlíku, alkoxyskupinu s 1 až 5 atomy uhlíku, karboxyskupinu, nitroskupinu, sulfátovou skupinu, slufonylovou skupinu, skupinu karboxylového esteru s 1 až 6 atomy uhlíku nebo skupinu sulfátového esteru s 1 až 6 atomy uhlíku a

n 0, 1, 2 nebo 3,

8. Farmaceutický prostředek podle nároku 7, v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje jakožto účinnou látku derivát dehydroepiandrosteronu obecného vzorce I, kde znamená R^3 atom vodíku nebo zbytek mastné kyseliny a ostatní symboly mají v nároku 1 uvedený význam.

9. Farmaceutický prostředek podle nároku 7, v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje jakožto účinnou látku derivát dehydroepiandrosteronu obecného vzorce I, kde znamená R^1 atom kyslíku a R^2, R^3, R^4, R^5, R^6 a R^7 atom vodíku.

10. Farmaceutický prostředek podle nároku 7, v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje jakožto účinnou látku derivát dehydroepiandrosteronu obecného vzorce I, kde znamená R^1 hydroxylovou skupinu a R^2, R^3, R^4, R^5, R^6 a R^7 atom vodíku.

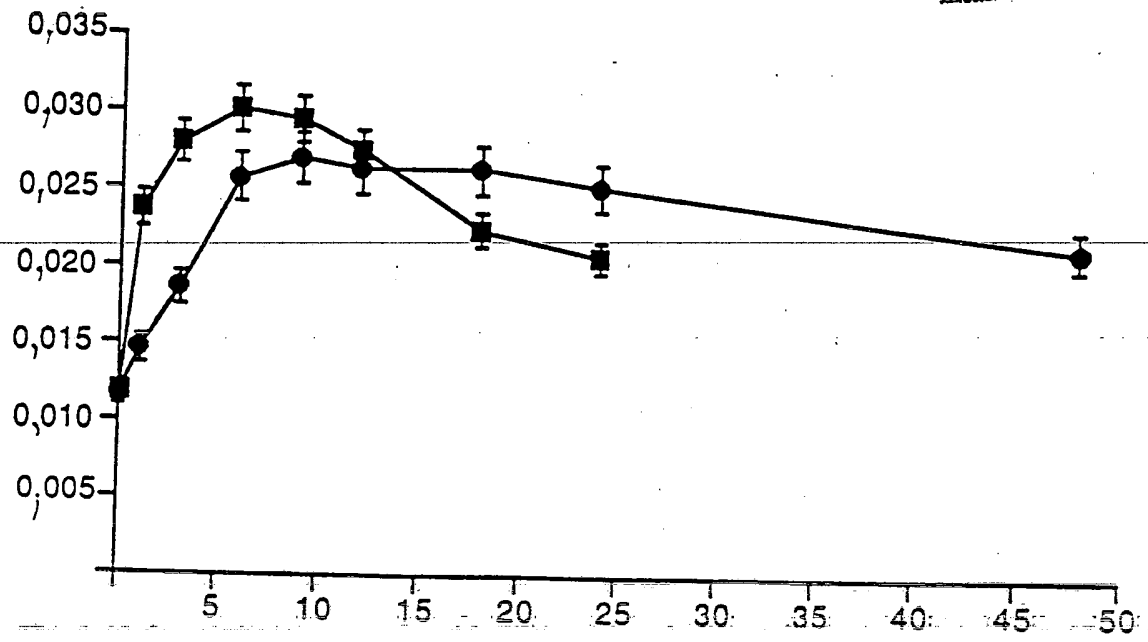
11. Farmaceutický prostředek podle nároku 7, v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje jakožto účinnou látku derivát dehydroepiandrosteronu obecného vzorce I, kde znamená R^1 atom kyslíku, R^2 atom bromu a R^3, R^4, R^5, R^6 a R^7 atom vodíku.

12. Farmaceutický prostředek podle nároku 7, v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje jakožto účinnou látku derivát dehydroepiandrosteronu obecného vzorce I, kde znamená R^1 atom kyslíku, R^2 hydroxylovou skupinu a R^3, R^4, R^5, R^6 a R^7 atom vodíku.

JUDr. Otakar ŠVORČÍK
advokát

1934-95

Došlo
26 9 95

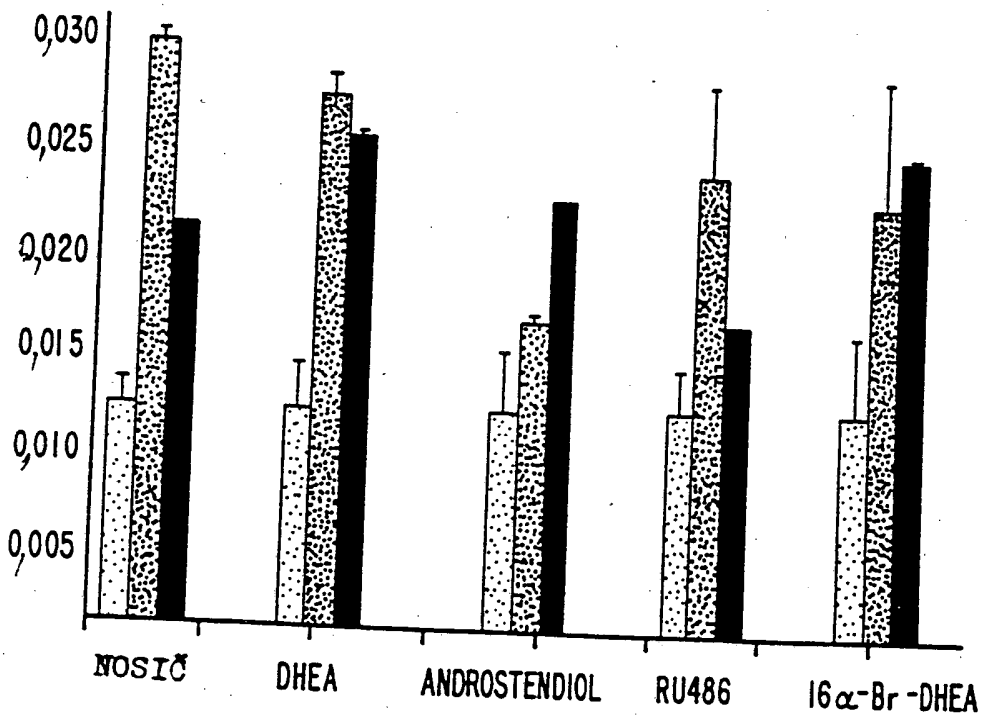


OBR.

JUDr.
advokát

1934-95

ÚŘAD VĚTNÝ
Došlo
26 95



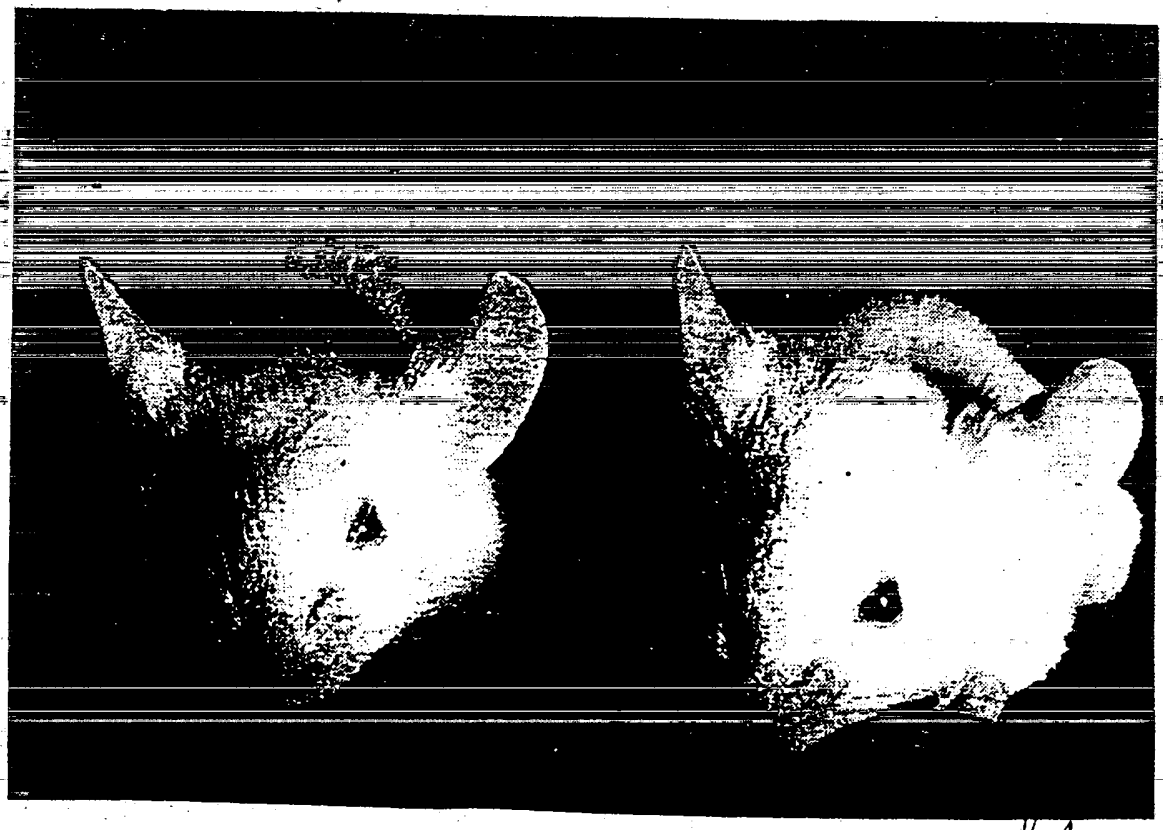
OBR. 2

JUDr. [illegible]
advokát

1934-95
Dosio
ÚŘAD VĚHO



OBR. 3A



OBR. 3B

JUDr.
advokát

1934-95
ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ
Došlo 26. 1. 95

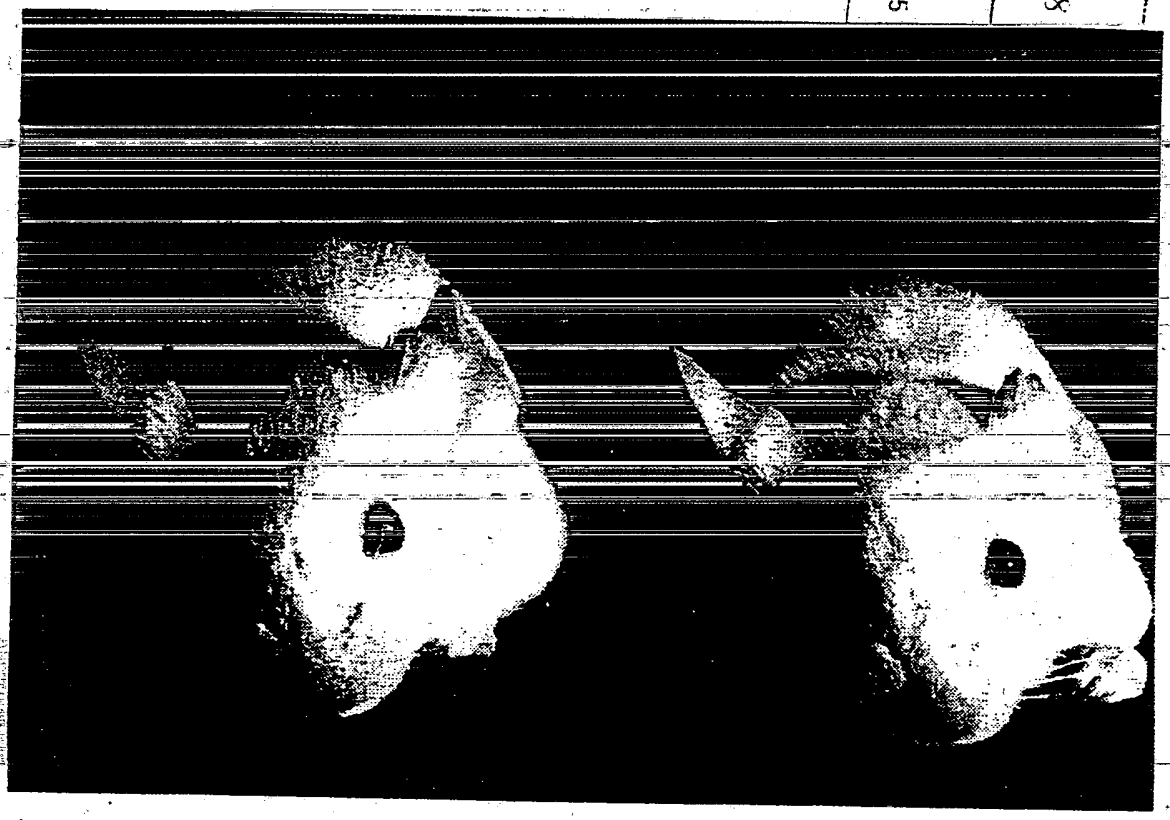


OBR. 3C

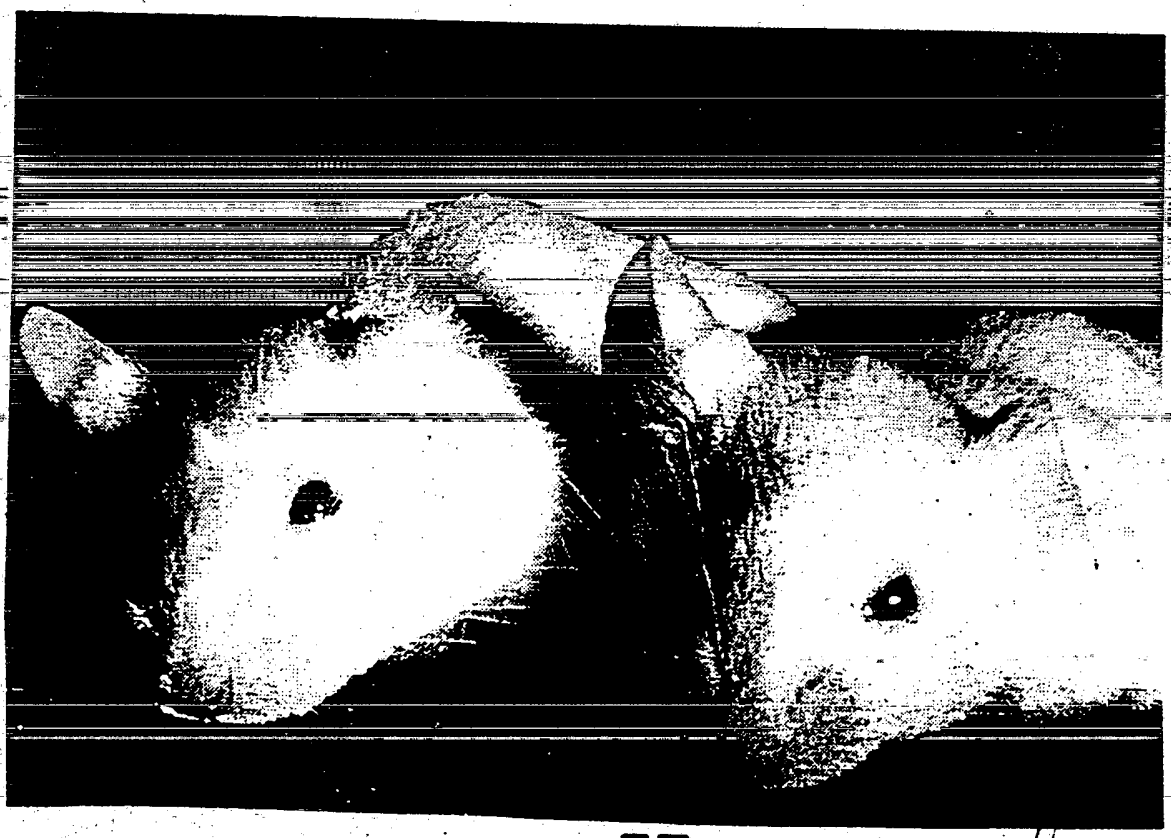


OBR. 3D

-1934-95
ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ
Došlo 26. 1. 95
Cl. 4 - 18



OBR. 3E

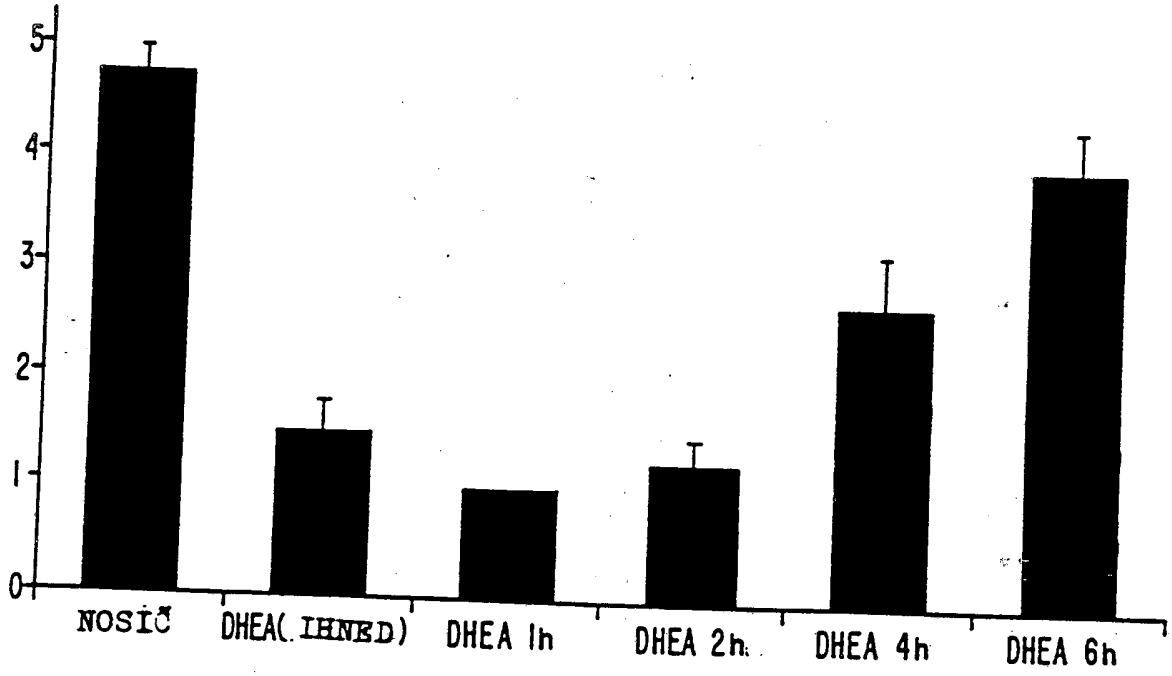


OBR. 3F

JUDr.
a.

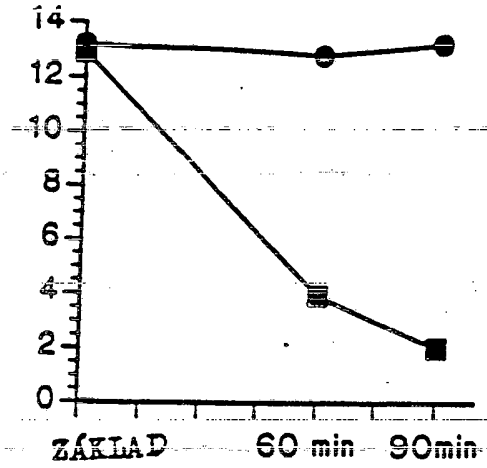
1934-95

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ
Došlo
26 9 95
Čj. 4 - 1831

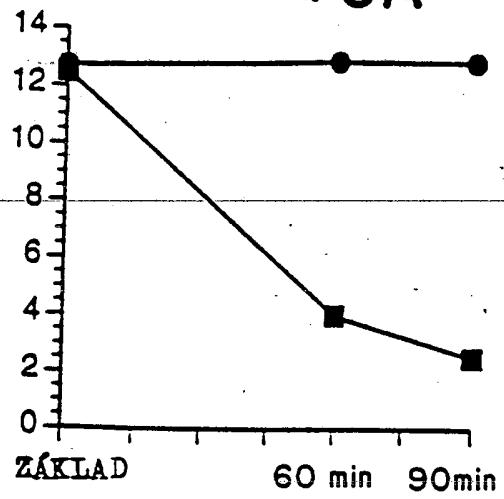


OBR. 4

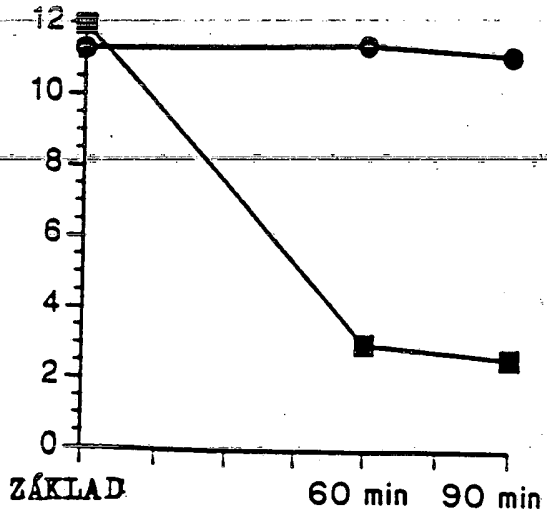
1934-9J



OBR. 5A



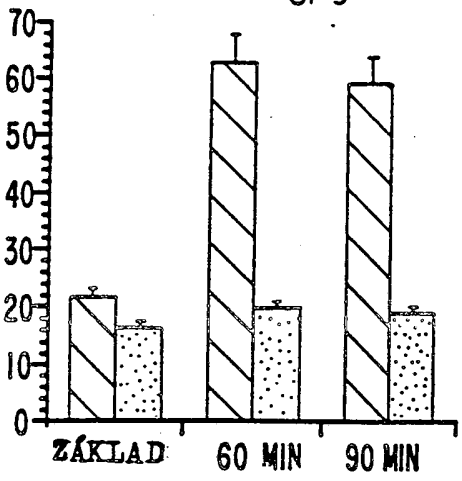
OBR. 5B



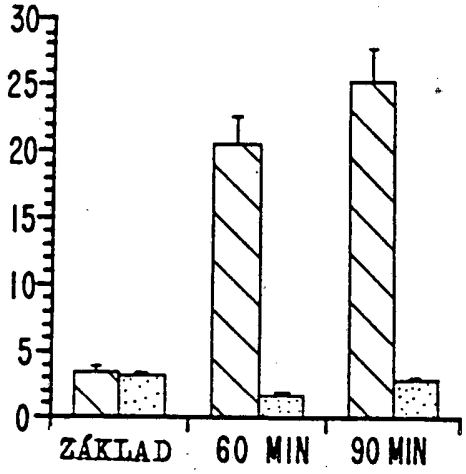
OBR. 5C

Došlo
26 . 95

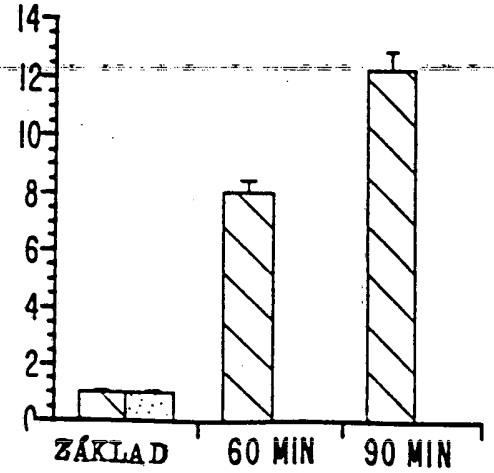
1934-95



OBR. 6A

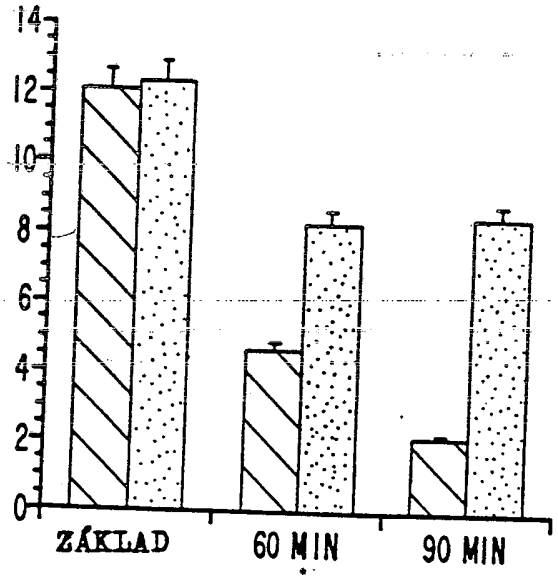


OBR. 6B

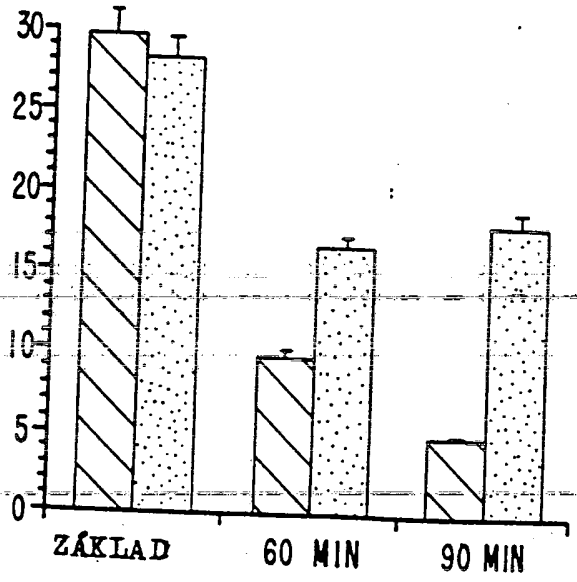


OBR. 6C

1934-95



OBR. 7A



OBR. 7B