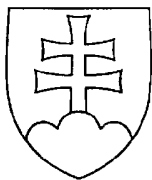


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**



ÚRAD  
PRIEMYSELNÉHO  
VLASTNÍCTVA  
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

**ZVEREJNENÁ  
PATENTOVÁ PRIHLÁŠKA**

- (22) Dátum podania prihlášky: **10. 4. 2002**  
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **P20010301A**  
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **27. 4. 2001**  
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **HR**  
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **5. 10. 2004**  
Vestník ÚPV SR č.: **10/2004**  
(62) Číslo pôvodnej prihlášky  
v prípade vylúčenej prihlášky:  
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky  
podľa PCT: **PCT/EP02/03984**  
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky  
podľa PCT: **WO02/087596**

(11), (21) Číslo dokumentu:

**1335-2003**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.<sup>7</sup> :

**A61K 31/7048,  
A61P 1/00,  
A61P 11/00,  
A61P 17/00,  
A61P 29/00,  
A61P 37/00**

(71) Prihlasovateľ: **PLIVA d. d., Zagreb, HR;**

(72) Pôvodca: **Čulić Ognjen, Zagreb, HR;  
Parnham Michael, Zagreb, HR;  
Eraković Vesna, Rijeka, HR;**

(74) Zástupca: **Filípek Ján, Ing., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Použitie azitromycínu na prípravu liečiva na liečenie neinfekčných zápalových ochorení**

(57) Anotácia:  
Opisuje sa použitie 9-deoxo-9-dihydro-9a-metyl-9a-aza-9a-homoerytromycínu A (generický názov: azitromycín) na prípravu liečiva na liečenie neinfekčných zápalových ochorení s dominanciou neutrofilov. Ďalej je opísaná farmaceutická zmes obsahujúca azitromycín na enterálne alebo parenterálne podanie.

na výrobu liečiv

PP 1335-03

Použitie azitromycínu na liečenie neinfekčných zápalových ochorení

### Oblasť techniky

Vynález sa týka využitia 9-deoxo-9-dihydro-9a-metyl-9a-aza-9a-homoerytromycínu A (generický názov: azitromycín) na liečbu neinfekčných zápalových ochorení s dominanciou neutrofilov, farmaceutických zmesí s obsahom azitromycínu na enterálne a perenterálne podanie a metód na výrobu týchto farmaceutických zmesí.

### Doterajší stav techniky

Väčšina zápalových ochorení je charakterizovaná abnormálnou akumuláciou zápalových buniek vrátane monocytov/makrofágov, granulocytov, plazmatických buniek, lymfocytov a krvných doštičiek. Spolu s tkanivovými endoteliálnymi bunkami a fibroblastami tieto zápalové bunky uvoľňujú komplexný rad lipidov, rastových faktorov, cytokínov a deštrukčných enzýmov, ktoré spôsobujú lokálne poškodenie tkaniva.

Jednou formou zápalovej reakcie je neutrofilový zápal, ktorý je charakterizovaný infiltráciou zapáleného tkaniva pomocou neutrofilových polymorfonukleárnych leukocytov (PMN), ktoré sú hlavnou zložkou obrany hostiteľa. Infekcia tkaniva extracelulárnou baktériou predstavuje prototyp tejto zápalovej reakcie. Rôzne neinfekčné ochorenia sú na druhej strane charakterizované extravaskulárnym zhukovaním neutrofilov. Táto skupina zápalových ochorení zahŕňa chronické obštrukčné pľúcne ochorenie, respiračný tiesňový syndróm u dospelých, niektoré typy imunokomplexných alveolitíd, cystickú fibrózu, bronchitídu, bronchiektázu, emfyzém, glomerulonefritídu, aktívne fázy reumatoidnej artritídy, dnovú artritídu, ulceratívnu kolitídu, určité dermatózy, napríklad psoriázu a vaskulitídu. Predpokladá sa, že za týchto podmienok neutrofily hrajú kľúčovú úlohu pri rozvoji poškodenia tkaniva, ktoré – ak je trvalé – môže viesť k nevratnému poškodeniu normálnej štruktúry tkaniva s následnou dysfunkciou orgánu. Teda poškodenie tkaniva je väčšinou zapríčinené aktiváciou neutrofilov, po ktorej nasleduje uvoľnenie proteináz a zvýšená tvorba kyslíkových foriem.

Chronické obštrukčné pľúcne ochorenie (COPD) je v podstate stav opísaný ako progresívny rozvoj obmedzenia dýchania, ktoré nie je celkom vratné (ATC, 1995). Väčšina pacientov s COPD má tri patologické stavy: bronchitídu, emfyzém a zablokovanie slizníc hlienom. Toto ochorenie je charakterizované pomalým progresívnym a nevratným poklesom núteného expiračného objemu v prvej sekunde expirácie ( $FEV_1$ ) s relatívnym zachovaním nútenej vitálnej kapacity (FVC) (Barnes, N. Engl. J. Med. (2000), 343 (4): 269-280). V prípade astmy a COPD je významné, avšak jednoznačné preformovanie dýchacích ciest. Väčšina dýchacích obštrukcií je zapríčinená dvoma hlavnými faktormi, alveolárnou deštrukciou (emfyzém) a malou obštrukciou dýchacích ciest (chronická obštrukčná bronchitída). V prípade COPD je ochorenie väčšinou charakterizované úplnou hyperpláziou mukózných buniek.

Hlavnými príčinami tohto ochorenia sú cigaretový dym, znečistenie ovzdušia a ďalšie faktory prostredia. Kauzálny mechanizmus v súčasnosti ostáva nedefinovaný, avšak pri rozvoji tohto ochorenia hrá významnú úlohu narušenie oxidantov a antioxidantov. COPD je chronický zápalový proces, ktorý sa značne odlišuje od procesu prebiehajúceho u astmy s rôznymi zápalovými bunkami, mediátormi, zápalovými účinkami a reakciami na liečbu (Keatings et al., Am. J. Respir. Crit. Care Med. (1996), 153: 530-534). Charakteristickým rysom tohto ochorenia je infiltrácia neutrofilov v pľúcach pacienta.

Zdá sa, že pri patogenéze tohto ochorenia hrajú veľmi významnú úlohu zvýšené hladiny prozápalových cytokínov, napríklad  $TNF-\alpha$  a zvlášť chemokínov ako je IL-8 a  $GRO-\alpha$ . U pacientov s COPD je tiež zvýšená tromboxánová syntéza krvných doštičiek (Keatings et al., Am. J. Respir. Crit. Care Med. (1996), 153: 530-534, Stockley and Hill, Thorax (2000), 55(7): 629-630). Väčšina prípadov poškodeného tkaniva je spôsobená aktiváciou neutrofilov, po ktorej nasleduje uvoľnenie (kovových) proteináz a zvýšená tvorba kyslíkových foriem. (Repine et al., Am. J. Respir. Crit. Care Med. (1997), 156: 341-357, Barnes, Chest (2000), 117 (2 Suppl): 10S-14S).

Väčšina terapeutického úsilia je zameraná na kontrolu symptómov (Barnes, Trends Pharm. Sci. (1998), 19 (10): 415-423, Barnes, Am. J. Respir. Crit. Care Med. (1999) 160: S72-S79, Hansel et al., Expert Opin. Investig. Drugs (2000) 9 (1): 3-23). Symptómy sú zvyčajne porovnateľné s obmedzením dýchania a liečba sa zameriava na bronchodilatátory.

Prevenencia a liečba komplikácií, prevencia zhoršenia a zlepšená kvalita a dĺžka života sú prvoradými cieľmi uvedenými v troch kľúčových medzinárodných smerniciach na zvládnutie COPD (Culpitt and Rogers, *Exp. Opin. Pharmacother.* (2000) 1 (5): 1007-1020, Hay, *Curr. Opin. Chem. Biol.* (2000), 4: 412-419). Väčšina súčasného terapeutického výskumu sa v podstate zameriava na mediátory, ktoré sa zúčastňujú na zhlukovaní a aktivácii neutrofilov alebo na oslabenie následkov ich neželanej aktivácie (Stockley et al., *Chest* (2000), 117 (2 Suppl): 58S-62S).

Existuje niekoľko štúdií o imunomodulačnom účinku makrolidových antibiotík in vitro (Labro, *J. Antimicrob. Chemother.* (1998), 41 (Suppl B): 37-46, Labro, *Clin. Microb. Rev.* (2000), 13 (4): 615-650, Wales and Woodhead, *Thorax* (1999), 54 (Suppl 2): S58-S62). Makrolidové antibiotiká sú makrocyclické zlúčeniny obsahujúce napríklad 12-, 14-, 16- alebo 17-členný laktónový kruh a 1 až 3 zvyšky cukru, ktoré sú navzájom viazané alebo sú viazané na aglukón glykozidickými väzbami. Známymi členmi makrolidových antibiotík sú napríklad karbomycín, erytromycín, leukomycín a spiramycín.

Najdôležitejšie zistenia vzhľadom na interakciu makrolidu s fagocytárnymi zápalovými bunkami in vitro sa týkajú inhibičných účinkov na tvorbu oxidantov pomocou stimulovaných buniek (Labro et al., *J. Antimicrob. Chemother.* (1989), 24 (4): 561-572, Umeki, *Chest* (1993), 104: 1191-1193, Wenisch et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* (1996), 40 (9): 2039-2042) a modulácie uvoľňovania prozápalových a protizápalových cytokínov týmito bunkami (Labro et al., *J. Antimicrob. Chemother.* (1989), 24 (4): 561-572, Khan et al, *Internat. J. Antimicrob. Agents.* (1999), 11: 121-132, Morikawa et al., *Antimicrob. Agents and Chemother.* (1996), 40 (6): 1366-1370, Sugiyama et al., *Eur. Respir. J.* (1999), 14: 1113-1116). Okrem toho niektoré makrolidy priamo stimulujú exocytózu (degranuláciu) pomocou ľudských neutrofilov in vitro (Abdelghaffae et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* (1994), 38 (7): 1548-1554, Vazifeh et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* (1998), 42 (8): 1944-1951). V experimentálnom modeli zápalovej karagenínovej pleuritídy u potkanov sa zistilo, že niektoré makrolidové antibiotiká, napríklad roxitromycín, klaritromycín a erytromycín, ale nie azitromycín, prejavili protizápalový účinok, ktorý pravdepodobne závisel od ich schopnosti zabráňovať tvorbe prozápalových mediátorov a cytokínov. V tomto modeli akútneho zápalu boli tvorba NO, hladiny TNF- $\alpha$  alebo PGE<sub>2</sub> významne znížené predbežnou liečbou antibiotikami (Ilanario et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (2000), 292: 156-163).

U peritonitídy potkanov vyvolanej zymosanom malo podanie erytromycínu protizápalový účinok (Agen et al., *Agents Actions* (1993), 38 (1-2): 85-90). Publikovali sa štúdie o vplyve roxitromycínu na zmenšenie akútnej zápalovej reakcie prostredníctvom mechanizmu odlišného od konvenčných protizápalových činidiel, napríklad indometacínu. V ďalšej štúdii sa dokázalo, že roxitromycín je účinný v štandardnom živočíšnom modeli použitom na vyhodnotenie účinkov protizápalových liekov pri edéme labiek vyvolanom karagenínom, zatiaľ čo klaritromycín a azitromycín prejavili miernu aktivitu (Scaglione and Rossini, *J. Antimicrob. Chemother.* (1998), 41, Suppl B: 47-50).

Niektoré makrolidové antibiotiká, napríklad erytromycín, klaritromycín a roxitromycín už boli používané ako protizápalové lieky, zvlášť pri liečbe difúznej panbronchiolitídy. Sú dostupné aj správy o využití makrolidov pri liečbe takých chorôb ako je reumatoidná artritída a cystická fibróza (Arayssi et al., *Program a súhrn zo 4. Medzinárodnej konferencie o makrolidoch, azalidoch, streptogramínoch and ketolidoch*, 21.-23. január 1998, Barcelona, Španielsko, Súhrn 6, Singh, J. *Assoc. Phys. India* (1989), 37: 547, Jaffe et al., *Lancet* (1998), 351: 420). Vzhľadom na príslušné farmakologické účinky makrolidov bolo publikované, že erytromycín inhibuje hypersekréciu spôsobenú inhibíciou hlienu a sekréciu vody z epiteliálnych buniek. Tiež inhibuje akumuláciu neutrofilov v zapálenej oblasti spôsobenú inhibíciou ich prichytenia na kapilárne cievy, IL-8 sekréciu z epiteliálnych buniek a sekréciu IL-8 a LTB<sub>4</sub> zo samotného neutrofilu. Jeho užitočný účinok pri difúznej panbronchiolitíde tiež zahŕňa redukciu tvorby superoxidov a zníženie hladín proteolytických enzýmov v pľúcach.

Dokázalo sa, že azitromycín významne zlepšuje funkciu pľúc, avšak mechanizmus účinku nie je jasný (Jaffe et al., *Lancet* (1998), 351: 420), zatiaľ čo roxitromycín potláča rast fibroblastov nazálnych polypov (Nonaka et al., *Am. J. Rhinol.* (1999), 13: 267-272, Yamada et al., *Am. J. Rhinol.* (2000), 14: 143-148).

Hoci je v literatúre veľa dôkazov, že makrolidy s 14-členným kruhom, napríklad erytromycín, klaritromycín a roxitromycín inhibujú in vivo IL-8 tvorbu a chemotaxis neutrofilov, dokonca aj dôkaz in vitro je obmedzený na poznatok, že makrolidy s 15-členným kruhom, napríklad azitromycín, majú podobný protizápalový účinok (Criqui et al., *Eur. Respir. J.* (2000), 15: 856-862).

V US 4, 886, 792 boli opísané inhibičné účinky na degranuláciu neutrofilov 15-členných makrolaktónov, ktoré avšak neobsahovali cukornaté substituenty azitromycínu. Azitromycín indukuje apoptózu v ľudských neutrofiloch in vitro, avšak nemá vplyv na oxidatívny metabolizmus alebo tvorbu IL-8 (Koch et al., J. Antimicrob. Chemother. (2000), 46: 19-26). Len v jednej štúdii sa prejavil inhibičný účinok azitromycínu na chemotaxis neutrofilov a na tvorbu aktívneho kyslíka in vitro (Sugihara, Kansenshogaku Zasshi J. Jpn. Assoc. Infec. Dis. (1997), 71: 329-336). Tiež sa dokázalo, že azitromycín nemení hladiny TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  alebo IL-6 u alveolárnych makrofágov alebo v krvi (Aubert et al., Pul. Pharmacol. Ther. (1998), 11: 263-269).

Bola naznačená možnosť, že azitromycín v dôsledku svojho 15-členného kruhu postráda štruktúru nevyhnutnú pre protizápalový účinok 14-členných makrolidov, čo je pravdepodobnejšie na základe pozorovania, že 16-členné makrolidy, napríklad josamycín, neredukujú tvorbu IL-8 (Takizawa et al., Am. J. Respir. Crit. Care Med. (1997), 156: 266-271, Criqui et al., Eur. Respir. J. (2000), 15: 856-862).

V porovnaní s makrolidovými antibiotikami, ktoré majú 14-členný kruh, makrolidové zlúčeniny s 15-členným kruhom majú niekoľko výhod. Napríklad erytromycín, ktorého stavba je charakterizovaná 14-členným aglukónovým kruhom, je v kyslom prostredí ľahko konvertovaný na anhydroerytromycín, ktorý je inaktívnym metabolitom C-6/C-12 spiroketálnej štruktúry. (Kurath et al., Experienta (1971), 27: 362). Azitromycín na rozdiel od svojho predchodcu antibiotika erytromycínu prejavuje v kyslom prostredí zlepšenú stabilitu. Okrem toho azitromycín má v tkanivách významne vyššiu koncentráciu. Vzhľadom na zlepšený účinok na gramnegatívne mikroorganizmy in vitro sa testovala aj možnosť jednodennej dávky (RatsHEMA et al., Antimicrob. Agents Chemother. (1987), 31: 1939).

Teda technickým problémom, ktorý súvisí s týmto vynálezom, je vytvorenie zdokonalených prostriedkov, najmä zdokonalených procesov a aplikácií užitočných pri liečbe neinfekčných zápalových ochorení s dominanciou neutrofilov, kde aktívna zložka prejavuje výhodný protizápalový účinok makrolidových zlúčenín s 14-členným laktónovým kruhom, ako aj zdokonalenú stabilitu a vysokú tkanivovú koncentráciu makrolidových zlúčenín s 15-členným kruhom.

## Podstata vynálezu

Tento vynález rieši vyššie uvedený problém využitím aktívnej zložky vybranej zo skupiny pozostávajúcej z azitromycínu, jeho farmaceuticky prijateľného derivátu, jeho farmaceuticky prijateľného hydrátu, jeho farmaceuticky prijateľného komplexu alebo chelátu a jeho farmaceuticky prijateľnej soli pri výrobe farmaceutických zmesí na liečbu neinfekčných zápalových ochorení s dominanciou neutrofilov u ľudí i u zvierat.

Na rozdiel od obmedzeného účinku azitromycínu na funkciu neutrofilov in vitro opísaného podľa tohto vynálezu, bolo prekvapujúce zistenie, že azitromycín podávaný ľuďom in vivo mal široké spektrum protizápalových účinkov a je veľmi užitočný pri liečbe zápalových ochorení charakterizovaných infiltráciou neutrofilov a poškodením tkaniva v súvislosti s neutrofilmi.

V štúdii zameranej na zdravých dobrovoľníkov sa sledoval vplyv azitromycínu na vybrané protizápalové parametre. Zistilo sa, že podávanie azitromycínu stimuluje degranuláciu ľudských neutrofilov, na čo poukazuje veľká zmena koncentrácie primárnych azurofilných granulárnych enzýmov, napríklad myeloperoxidázy (MPO), N-acetyl- $\beta$ -D-glukozaminidázy (NAGA) a  $\beta$ -glukuronidázy.

Biologický význam aktivity MPO na granulocyty spočíva v silnej antimikrobiálnej aktivite závislej od kyslíka spojenej s mobilizáciou všetkých granúl v zápalových granulocytoch pri zápalovom procese, zvlášť po fagocytárnom stimule imunitnými komplexami. Po aplikácii azitromycínu aktivity MPO v krvnom roztere neutrofilov silno poklesli a vrátili sa na východiskovú úroveň až po 28 dňoch. Tak sa zistilo, že degranulácia prezentovaná nižšou MPO denzitou neutrofilov, ktorá bola určená cytochemicky, bola spojená s nižšími koncentraciami MPO ELISA v lyzátoch neutrofilov.

N-acetyl- $\beta$ -D-glukozaminidáza (NAGA) a  $\beta$ -glukuronidáza sú lyzozomálne enzýmy, ktoré sa nachádzajú v azurofilných (primárnych alebo peroxidáza-pozitívnych) granulách neutrofilov. Keďže počas zápalu sa pozoruje degranulácia neutrofilov, oba enzýmy sú markermi degranulácie a môžu sa využiť pri odhade reaktivity neutrofilov. Štúdie o azitromycíne dokázali, že po aplikácii azitromycínu sa značne zvýšila aktivita NAGA v sére. Dokonca 28 dní po poslednej dávke azitromycínu hodnoty NAGA v sére boli stále o 70 % vyššie ako počiatočné hodnoty. Zvýšenie hladiny NAGA v sére bolo sprevádzané poklesom enzymatickej aktivity

PMN. Aktivita  $\beta$ -glukuronidázy v sére počas prvého dňa po poslednej dávke azitromycínu nevykázala žiadne zmeny, ale potom sa zvýšila. 28 dní po poslednej dávke azitromycínu aktivita  $\beta$ -glukuronidázy bola o 40 % vyššia ako na začiatku. Aktivity  $\beta$ -glukuronidázy v PMN v ďalších hodinách po poslednej dávke azitromycínu klesali, ale potom sa zvýšili. 28 dní po poslednej dávke azitromycínu aktivita  $\beta$ -glukuronidázy v PMN bola oveľa vyššia ako na začiatku.

Na základe vynálezu sa dokázalo, že azitromycín inhibuje tvorbu reaktívnych kyslíkových foriem zo stimulovaných neutrofilov, ako bolo ukázané v prípade inhibície chemiluminiscencie zo stimulovaných neutrofilov. Ďalej sa pomocou testovacieho systému s cytochrómom c dokázalo, že azitromycín je inhibítorom oxidatívneho impulzu neutrofilov. Štúdie tiež odhalili, že azitromycín má dlhodobý účinok na koncentráciu celulárnej glutatiónpoxidázy (GSHPx) a glutatiónereduktázy, dvoch enzýmov, ktoré riadia biologické účinky voľných radikálov podieľajúcich sa na patogenéze veľkého množstva chorôb. Tvorba voľných radikálov a narušenie redoxného stavu môže modulovať expresiu množstva zápalových molekúl, čo ovplyvňuje určité bunkové procesy vedúce k zápalovým procesom. Teda azitromycín predstavuje základ pre liečbu mnohých ochorení, napríklad COPD, pri ktorých je tvorba neutrofilných radikálov nadmerná.

Tieto štúdie tiež potvrdili, že azitromycín indukuje apoptózu, t. j. programovanú bunkovú smrť určitých bunkových typov. Apoptóza je dôležitým mechanizmom na dokončenie imunitnej odpovede. Trojdňové podávanie azitromycínu malo vplyv na spomalenie proapoptického účinku na granulocyty ako naznačuje morfológia krvného rozteru. Množstvo apoptických buniek dosiahlo maximum 28 dní po poslednej dávke azitromycínu, čo naznačuje zníženie počtu aktívnych, potenciálne škodlivých neutrofilov.

V štúdií boli tiež odhalené ďalšie protizápalové účinky azitromycínu. Na rozdiel od predchádzajúcich štúdií (Koch et al., J. Antimicrob. Chemother. (2000), 46: 19-26) sa na základe vynálezu zistilo, že azitromycín má značný inhibičný vplyv na uvoľňovanie IL-8 a tiež GRO- $\alpha$ . Interleukín-8 (IL-8) je členom špecifickej neutrofilovej podrodiny CXC chemokínov. Je účinným chemotaktickým a aktivačným faktorom neutrofilov (Oppenheim, Ann. Rev. Immunol. (1999), 9: 617). IL-8 je vyjadrený v odpovedi na zápalové stimuly. IL-8 spomaľuje spontánnu a TNF- $\alpha$ -sprostredkovanú apoptózu ľudských neutrofilov. Na rozdiel od účinku na IL-8 hladina azitromycínu sa postupne zvyšuje so sérovou koncentráciou cytokínu IL-1, pričom

najvyššie koncentrácie IL-1 sa zistili 24 hodín po poslednej dávke azitromycínu. Avšak sérová koncentrácia ďalšieho cytokínu IL-6 nepretržite klesala.

Na rozdiel od skorších štúdií (Semaan et al., J. Cardiovasc. Pharmacol. (2000), 36: 533-537), na základe ktorých liečba azitromycínom významne neovplyvnila plazmatické hladiny rozpustného VCAM, štúdie vykonané podľa tohto vynálezu jasne ukázali značný pokles plazmatických hladín VCAM už 24 hodín po liečbe azitromycínom.

Výsledky získané na základe vynálezu demonštrujú, že trojdňová liečba zdravých ľudí štandardnými antibakteriálnymi dávkami azitromycínu má akútny vplyv na granulárne enzýmy neutrofilov, na oxidačný impulz, na oxidatívne ochranné mechanizmy, na chemokíny neutrofilov a na cirkulujúci IL-1, IL-6, IL-8, ako aj na spomalenie účinku na apoptózu neutrofilov a rozpustné adhezívne molekuly.

Podľa tohto vynálezu sa azitromycín môže využiť ako hodnotné profylaktické a/alebo terapeutické činidlo pri neinfekčných zápalových ochoreniach s dominanciou neutrofilov.

Ďalšie definície sú uvedené pre ilustráciu a definovanie významu a rozsahu rôznych výrazov použitých pri opise tohto vynálezu.

Výraz „neinfekčné zápalové ochorenie s dominanciou neutrofilov“ sa vzťahuje na zápalové ochorenia, poruchy alebo stavy, ktoré sú výsledkom poškodenia tkaniva, chemického ožiarenia alebo imunitných procesov, ktoré však nie sú zapríčinené inváziou mikroorganizmov, napríklad vírusov, baktérií, húb, prvokov, atď., charakterizované infiltráciou zapáleného tkaniva prostredníctvom neutrofilov, ktoré sú prvými zápalovými bunkami vstupujúcimi do tkaniva a ktoré zväčšujú zápalovú reakciu. U niektorých neinfekčných zápalových ochorení neutrofily ostávajú dominantnými bunkami v zapálenej oblasti, dokonca aj keď sa reakcia predĺži kvôli nepretržitej prítomnosti stimulov infiltrácie a aktivácie neutrofilov. Príkladom je chronické obštrukčné pľúcne ochorenie (COPD), respiračný tiesňový syndróm u dospelých (ARDS) a neutrofilné dermatózy. K ďalším neinfekčným zápalovým ochoreniam s dominanciou neutrofilov patria ochorenia s príslušným stimulom chronicity patológie, ktorý nie je závislý od neutrofilov. Napríklad autoimunitné ochorenia sú väčšinou zapríčinené rozvinutím imunitnej odpovede na normálne štrukturálne zložky tela a zahŕňajú aktiváciu T-lymfocytov s možnou tvorbou autoprotlátok pomocou B-lymfocytov. Napríklad u reumatoidnej artritídy (RA) sú imunitné reakcie nasmerované proti štrukturálnym zložkám kĺbov. Avšak u RA a

ďalších autoimunitných ochorení sa pozorujú akútne vzplanutia, ktoré sú charakterizované intenzívnou infiltráciou a aktiváciou neutrofilov. Tieto aktívne fázy chronického autoimunitného zápalu sú charakterizované dominanciou neutrofilov a majú za následok napríklad vyslovenú akumuláciu neutrofilov v synoviálnej tekutine pacientov s RA. U niektorých autoimunitných ochorení vzniká tvorba autoprotílátok, čo vedie k ukladaniu imunitných komplexov antigénu a autoprotílátky v tkanive a k aktivácii komplementu. Neutrofily vstupujú do tkaniva v snahe pohltiť imunitné komplexy a infiltrácia a aktivácia neutrofilov je opäť vyvolaná faktormi aktivovaného komplementu. Príkladom tohto typu ochorenia je renálne ochorenie, najmä glomerulonefritída, ktorá má za následok výslovné poškodenie obličiek.

Preto výraz „neinfekčné zápalové ochorenie s dominanciou neutrofilov“ zahŕňa bez obmedzenia chronické obštrukčné pľúcne ochorenie (COPD), respiračný tiesňový syndróm dospelých (ARDS), bronchitídu, bronchiektázu, emfyzém, cystickú fibrózu, zápalové ochorenie čriev, dnovú artritídu, autoimunitné ochorenia charakterizované akútnymi fázami s dominanciou neutrofilov, napríklad reumatoidná artritída, autoimunitné ochorenia, pri ktorých je infiltrácia neutrofilov opäť vyvolaná faktormi aktivovaného komplexu, napríklad glomerulonefritída a ochorenia kože, najmä všetky druhy neutrofilových dermatóz vrátane psoriáziformných dermatóz, napríklad psoriáza a Reiterov syndróm, autoimunitné dermatózy, cievne neutrofilové dermatózy, napríklad leukocytoklastická vaskulitída, Sweetov syndróm, pustulárna vaskulitída, erythema nodosum, dedičná maltská horúčka a pyoderma gangrenosum.

Výraz „neinfekčné zápalové ochorenie s dominanciou neutrofilov“ zahŕňa tiež všetky sprievodné ochorenia, poruchy alebo stavy, ktoré sa objavujú ako následok neinfekčného zápalového ochorenia s dominanciou neutrofilov a ktoré môžu ovplyvniť telesné tkanivá alebo orgány inak ako samotné zápalové ochorenie. Príkladom sú extraintestinálne ochorenia, napríklad uveitída a chronická hepatitída, ktoré môžu vzniknúť na základe zápalového ochorenia čriev.

Výraz „aktívna zložka“ alebo „aktívne činidlo“ sa vzťahuje na akékoľvek látky, ktoré môžu ovplyvniť alebo rozpoznať biologické bunky alebo ich časti, najmä bunkové organely alebo bunkové komponenty. Také aktívne zložky alebo činidlá majú chemickú povahu. Také aktívne zložky alebo činidlá slúžia predovšetkým pre diagnostiku alebo liečbu. Výraz „aktívne zložky“ alebo „aktívne činidlá“ sa v kontexte tohto vynálezu vzťahuje najmä na lieky, teda látky, ktoré môžu byť podávané na

prevenciu alebo počas priebehu ochorenia, poruchy alebo stavu organizmov, ktoré takú liečbu potrebujú kvôli prevencii, zmierneniu alebo odstráneniu ochorenia, poruche alebo stavu, najmä neinfekčného zápalového ochorenia s dominanciou neutrofilov.

Výraz „liečba“ sa v kontexte tohto vynálezu vzťahuje na profylaktický a/alebo terapeutický účinok lieku, ktorý je definovaný ako farmaceutická zmes obsahujúca farmaceuticky alebo diagnosticky účinnú zlúčeninu v kombinácii s najmenej jednou prídavnou látkou, napríklad nosičom.

„Azitromycín“ sa vzťahuje na makrolidovú zlúčeninu N-metyl-11-aza-10-deoxo-10-dihydroerytromycín A (9-deoxo-9-dihydro-9a-metyl-9a-aza-9a-homoerytromycín A) s 15-členným azalaktónovým kruhom, ktorá sa dá získať pomocou Beckmannovho preskupenia oximu erytromycínu A, po ktorom nasleduje Escheimer-Clarkova reduktívna N-metylácia, ktorá je opísaná v US 4, 517, 359, US 4, 328, 334 a BE 892, 357, kde obsah týchto dokumentov vzhľadom na metódy na výrobu azitromycínu sú úplne zahrnuté v obsahu tejto aplikácie.

Výraz „jeho farmaceuticky prijateľný derivát“ sa vzťahuje na netoxické funkčné ekvivalenty alebo deriváty azitromycínu, ktoré je možné získať substitúciou atómov alebo skupín molekúl alebo väzieb molekuly azitromycínu, kde sa základná štruktúra azitromycínu nemení a odlišuje sa od štruktúry azitromycínu najmenej v jednej pozícii. Výraz „farmaceuticky prijateľný derivát“ napríklad zahŕňa O-metylderiváty azitromycínu, ktoré sa v podstate dajú získať podľa opisu v US 5, 250, 518, kde obsah tohto dokumentu vzhľadom na metódy na výrobu O-metylderivátov je úplne zahrnutý v obsahu tejto aplikácie.

Výraz „farmaceuticky prijateľný derivát“ zahŕňa tiež estery azitromycínu, ktoré si po hydrolýze esterovej väzby zachovávajú biologickú účinnosť a vlastnosti azitromycínu a ktoré nie sú biologicky alebo inak nežiaduce. Techniky na prípravu farmaceuticky prijateľných esterov obsahuje napríklad March Advanced Organic Chemistry, 3. vyd., John Wiley & Sons, New York (1985), s. 1152. O farmaceuticky prijateľných esteroch, ktoré sú užitočné ako prekursori liekov, sa hovorí v práci: Bundgaard, H., ed., (1985) Design of Prodrugs, Elsevier Science Publishers, Amsterdam.

Výraz „jeho farmaceuticky prijateľný hydrát“ sa vzťahuje na netoxické pevné alebo tekuté zlúčeniny azitromycínu, ktoré si zachovávajú biologický účinok azitromycínu a sú vytvorené v procese hydratácie, kde sa jedna alebo viac molekúl

vody spája s molekulou azitromycínu v dôsledku dipólových síl. Výraz zahŕňa napríklad mono a dihydráty azitromycínu.

Výraz „farmaceuticky prijateľné soli“ sa vzťahuje na netoxický alkalický kov, kov alkalických zemín a amóniové soli, ktoré sa bežne používajú vrátane amóniových, báriových, vápenatých, lítiových, horčíkových, draslíkových, protamínových zinkových solí a sodíka, ktoré sú pripravené dobre známymi metódami. Výraz tiež zahŕňa netoxické, t. j. farmaceuticky prijateľné kyslé adičné soli, ktoré sa vo všeobecnosti pripravujú reakciou azitromycínu s vhodnou organickou alebo anorganickou kyselinou, napríklad s acetátom, benzoátom, bisulfátom, borátom, citrátom, fumarátom, hydrobromidom, hydrochloridom, laktátom, laurátom, maleátom, napsylátom, oleátom, oxalátom, fosfátom, sukcinátom, síranom, tartrátom, tosylátom, valerátom, atď.

Výraz „farmaceuticky prijateľná kyslá adičná soľ“ sa vzťahuje na soli, ktoré si zachovávajú biologickú účinnosť a vlastnosti voľných báz a ktoré nie sú biologicky alebo inak nežiaduce, vytvorené pomocou anorganických kyselín, napríklad kyseliny brómovodíkovej, kyseliny chlorovodíkovej, kyseliny dusičnej, kyseliny fosforečnej, kyseliny sírovej a organických kyselín, napríklad kyseliny octovej, kyseliny benzóovej, kyseliny škoricovej, kyseliny citrónovej, kyseliny etánsulfónovej, kyseliny fumarovej, kyseliny glykolovej, kyseliny maleínovej, kyseliny jablčnej, kyseliny propándiovej, kyseliny mandľovej, kyseliny metánsulfónovej, kyseliny oxalovej, kyseliny propiónovej, kyseliny p-toluénsulfónovej, kyseliny pyruvovej, kyseliny salicylovej, kyseliny jantárovej, kyseliny vínnej, atď.

Soli vynálezu sa môžu získať rozpustením azitromycínu vo vodnom alebo vodno/alkoholovom rozpúšťadle alebo v iných vhodných rozpúšťadlách s príslušnou bázou a následnou izoláciou získanej soli vynálezu odparením roztoku, zmrazením a lyofilizáciou alebo pridaním ďalšieho rozpúšťadla, napr. dietyléteru k vodnému a/alebo alkoholovému roztoku azitromycínovej soli vrátane separácie nerozpustnej surovej soli. Na prípravu alkalických azitromycínových solí sa prednostne využívajú uhličitany alebo hydrogénuhličitany alkalických kovov. Pripravené soli sú voľne rozpustné vo vode.

Výraz „jeho farmaceuticky prijateľný komplex alebo chelát“ sa vzťahuje na netoxické komplexy a cheláty azitromycínu s bivalentnými a/alebo trivalentnými kovmi, ktoré sa môžu získať podľa opisu v US 5, 498, 699, kde obsah tohto dokumentu vzhľadom na metódy výroby komplexov a chelátov azitromycínu sú úplne

zahrnuté v obsahu tejto aplikácie. Ako komplexotvorné a chelátotvorné kovy sa môžu využiť kovy 2. a 3. skupiny, ktoré môžu tvoriť fyziologicky tolerované zlúčeniny, najmä  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Rh}^{3+}$ ,  $\text{La}^{3+}$  a  $\text{Bi}^{3+}$ . Pomer azitromycínu ku kovu je v rozsahu 1 : 1 až 1 : 4. Na získanie komplexov a chelátov azitromycínu antibiotikum reaguje vo forme voľnej bázy alebo soli, najmä ako hydrochlorid, so soľou bivalentného a/alebo trivalentného kovu v pomere 2 : 1 pri teplote okolitého vzduchu vo vodnom roztoku alebo v zmesi vody/alkoholu pri pH 8,0 až 11,0 s hydroxidom kovu a/alebo uhličitanom, subsalicylátom alebo gélom. Prednostným príkladom môžu byť cheláty azitromycínu s antacidami vybranými zo skupiny solí Al, Mg a Bi, cheláty azitromycínu so sukralfátom a cheláty azitromycínu so subsalicylátom bizmutu, ktoré sú vo forme gélu.

Výraz „farmaceuticky alebo terapeuticky prijateľný nosič“ sa vzťahuje na nosič, ktorý neinterferuje s účinnosťou biologickej aktivity aktívnych zložiek a ktorý nie je toxický voči hostiteľovi alebo pacientovi.

Aktívna zložka vybraná zo skupiny pozostávajúcej z azitromycínu, jeho farmaceuticky prijateľného derivátu, jeho farmaceuticky prijateľného hydrátu, jeho farmaceuticky prijateľného komplexu alebo chelátu a farmaceuticky prijateľnej soli sa môže podávať tiež zvieratám vrátane cicavcov, napríklad hlodavcom a primátom vrátane ľudí na prevenciu alebo zmiernenie či odstránenie neinfekčných zápalových ochorení s dominanciou neutrofilov. Teda tento vynález obsahuje metódy na liečbu takých ochorení alebo porúch, ktoré zahŕňajú podávanie aktívnej zložky vynálezu v množstvách dostatočných na dosiahnutie želaného účinku azitromycínu in vivo. Napríklad aktívne činidlo alebo zložka tohto vynálezu môže byť podaná v terapeuticky alebo farmaceuticky účinnom množstve na liečbu mnohých neinfekčných zápalových ochorení vrátane COPD, ARDS a neutrofilových dermatóz.

„Terapeuticky alebo farmaceuticky účinné množstvo“ vzhľadom na azitromycín alebo zlúčeniny obsahujúce azitromycín a zmesi tohto vynálezu sa vzťahuje na množstvo zlúčeniny alebo zmesi dostatočné na vyvolanie želaného biologického výsledku. Tým výsledkom môže byť zmiernenie príznakov, symptómov alebo príčin ochorenia alebo akákoľvek žiaduca zmena biologického systému. V tomto vynáleze je výsledkom napríklad prevencia, odstránenie a/alebo zmiernenie symptómov alebo príčin neinfekčného zápalového stavu s dominanciou neutrofilov pomocou akútnych účinkov na granulárne enzýmy neutrofilov a oxidatívny impulz, na oxidatívne ochranné mechanizmy a na chemokíny neutrofilov a na cirkulujúci IL-1, IL-6, IL-8,

ako aj účinok na oneskorenie apoptózy a rozpustné adhezívne molekuly. Aktívne zložky tohto vynálezu sa budú podávať profylakticky pred vypuknutím neinfekčného zápalového ochorenia s dominanciou neutrofilov.

Teda tento vynález tiež predstavuje farmaceutické zmesi obsahujúce ako aktívnu zložku azitromycín, jeho farmaceuticky prijateľný derivát, jeho farmaceuticky prijateľný hydrát, jeho farmaceuticky prijateľný komplex alebo chelát a farmaceutiky prijateľnú soľ v spojení s farmaceutickým nosičom alebo rozpúšťadlom. Zmesi tohto vynálezu sa môžu podávať systematicky alebo lokálne, intravaskulárne, perorálne, pulmonárne, parenterálne, t. j. intramuskulárne, intraperitoneálne, intravenózne (IV) alebo subkutánne injekčne alebo inhalačne, t. j. prostredníctvom jemného prášku, transdermálne, nazálne, vaginálne, rektálne alebo sublinguálne v dávkových formách vhodných pre každý spôsob podania. Aktívne činidlo alebo zložka sa podáva vo farmaceuticky účinnom množstve.

Pevné dávkové formy na perorálne podanie zahŕňajú kapsuly, tablety pod jazyk, tablety, pilulky, prášky, lipozómy, náplaste, filmy s postupným uvoľňovaním účinnej látky a granule. Aktívna zlúčenina je v takej pevnej dávkovacej forme zmiešaná najmenej s jedným inertným farmaceuticky prijateľným nosičom, napríklad laktózou, sacharózou alebo škrobom. Také dávkové formy môžu tiež zahŕňať ďalšie látky iné ako inertné riedidlá, napríklad lubrikačné činidlá, napríklad stearát horečnatý. V prípade kapsúl, tabliet a piluliek dávkové formy môžu tiež obsahovať objemotvorné a/alebo pufrovacie činidlá, ako aj príchute. Tablety a pilulky sa môžu pripraviť s filmom odolným voči žalúdočnej kyseline.

Tekuté dávkové formy na perorálne podanie obsahujú farmaceuticky prijateľné emulzie, roztoky, suspenzie, sirupy s tinktúrami obsahujúcimi inertné bežne používané riedidlá, napríklad vodu. Okrem takých inertných riedidiel zmesi môžu tiež obsahovať pomocné látky, napríklad soli na zmenu osmotického tlaku, zlúčeniny na úpravu pH, činidlá na zlepšenie penetrácie do pokožky, zvlhčovacie činidlá, emulzifikačné a suspenzačné činidlá, sladidlá, príchute a vône.

Farmaceutické zmesi na parenterálne podanie podľa tohto vynálezu zahŕňajú sterilné vodné alebo nevodné roztoky, suspenzie alebo emulzie. Príkladmi nevodných rozpúšťadiel alebo nosičov sú propylénglykol, polyetylénglykol, rastlinné oleje, napríklad olivový olej a kukuričný olej, želatína a injekovateľné organické estery, napríklad etyloléat. Také dávkové formy môžu tiež obsahovať pomocné látky, napríklad konzervačné, zvlhčovacie, emulzifikačné a dispergačné činidlá. Môžu byť

sterilizované napríklad filtráciou cez bakteriálny filter, inkorporáciou sterilizačných činidiel do týchto zmesí, ožiarení zmesí alebo zohriatím zmesí. Môžu byť tiež vyrobené s použitím sterilnej vody alebo iných sterilných injekovateľných prostriedkov bezprostredne pred použitím.

Formulácie pre injekcie budú obsahovať fyziologicky prijateľný prostriedok, napríklad vodu, solný roztok, PBS, vodný etanol, vodné etylénglykoly, atď. Vo vode rozpustné konzervačné látky, ktoré môžu byť použité, obsahujú hydrogénsiričitan sodný, sírnatan sodný, askorbát, benzalkoniumchlorid, chlórbutanol, timerozal, borát fenylortuťnatý, parabény, benzylalkohol a fenyletanol. Tieto činidlá môžu byť prítomné v individuálnych množstvách od približne 0,001 do 5 hmotnostných %, najmä však od 0,01 do 2 %. Vhodnými vo vode rozpustnými puľrovacími činidlami, ktoré môžu byť použité, sú uhličitany alkálií alebo alkalických zemín, fosfáty, bikarbonáty, citráty, boráty, acetáty, sukcináty, atď., napríklad fosforečnan, citrát, borát, acetát, bikarbonát a uhličitan sodný. Prídavné látky, napríklad karbometylcelulóza, môžu byť použité ako nosič v množstvách od 0,01 do 5 hmotnostných %. Formulácia sa bude meniť v závislosti od účelu formulácie, od konkrétneho použitého režimu na liečbu ochorenia, od plánovanej liečby, atď.

Zmesi na rektálne alebo vaginálne podanie sú predovšetkým čapíky, ktoré môžu okrem aktívnej látky obsahovať masťový základ, napríklad kakaové maslo alebo čapíkový vosk. Zmesi na nazálne alebo sublinguálne podanie sa tiež pripravujú s dobre známym štandardným masťovým základom.

Zmesi obsahujúce aktívne činidlo alebo zložku tohto vynálezu sa môžu podávať na prevenciu a/alebo liečbu. Pri terapeutických aplikáciách sa zmesi podávajú pacientovi, ktorý trpí vyššie uvedeným ochorením v množstve dostatočnom na vyliečenie alebo prinajmenšom na čiastočné zastavenie symptómov ochorenia a s tým súvisiacich komplikácií, t. j. v terapeuticky účinnom množstve.

Pri profylaktických aplikáciách sa zmesi obsahujúce aktívne činidlo alebo zložku tohto vynálezu podávajú pacientovi, ktorý je náchylný na príslušné ochorenie. Také množstvo je definované ako „profylakticky účinná dávka.“ Pri tomto použití presné množstvá opäť závisia od pacientovho zdravotného stavu a hmotnosti.

Farmaceutické zmesi tohto vynálezu sa môžu tiež podávať vo forme depotu, napríklad zmesi s pomalým uvoľňovaním. Také zmesi s pomalým uvoľňovaním môžu obsahovať častice aktívneho činidla alebo zložky v matrixe, ktorá môže byť vyrobená napríklad z kolagénu.

Množstvá aktívneho činidla alebo zložky potrebné na účinnú liečbu budú závisieť od mnohých rôznych faktorov vrátane spôsobov podávania, cieľového miesta, fyziologického stavu pacienta a ďalších podávaných liekov.

Aktívne činidlo alebo zložka tohto vynálezu vybraná zo skupiny pozostávajúcej z azitromycínu, jeho farmaceuticky prijateľného derivátu, jeho farmaceuticky prijateľného hydrátu, jeho farmaceuticky prijateľného komplexu alebo chelátu a jeho farmaceuticky prijateľnej soli sú účinné pri liečbe neinfekčných zápalových ochorení s dominanciou neutrofilov, keď sa podávajú v rozsahu od 10 mg do približne 2 000 mg denne, najmä od 30 do 1 500 mg. Špecifická použitá dávka je regulovaná stavom, ktorý sa lieči, spôsobom podávania ako aj posúdením lekára v závislosti od takých faktorov ako je závažnosť stavu, vek a všeobecný stav pacienta.

Aktívne činidlá alebo zložky tohto vynálezu sa môžu podávať samostatne alebo spolu s inými súčasne užívanými liekmi na liečbu neinfekčných zápalových ochorení s dominanciou neutrofilov, ako sú napríklad nesteroidné protizápalové činidlá, napríklad metylxantínové nesteroidné protizápalové činidlá, steroidné protizápalové činidlá, imunomodulačné činidlá, imunosupresívne činidlá, bronchodilatačné činidlá, antireumatické činidlá, kortikosteroidy,  $\beta$ 2-agonisti, cholinergickí antagonisti, atď, pričom dávka posledného činidla sa môže znížiť o 50 % alebo 25 % v dôsledku protizápalových účinkov aktívnych zložiek tohto vynálezu.

Zmes, prednostne vo vode rozpustná zmes tohto vynálezu môže ďalej obsahovať vo vode rozpustný proteín injekovateľný do telesných tekutín bez akejkoľvek podstatnej farmakologickej aktivity pri použitej koncentrácii v jednorazovej dávke tohto vynálezu (ďalej „vo vode rozpustný proteín“). Vo vode rozpustný proteín je napríklad sérový albumín, globulín, kolagén a/alebo želatína. Tento proteín môže byť pridaný k množstvu použitému v injekovateľných farmaceutických zmesiach. Teda hmotnostný pomer medzi proteínom rozpustným vo vode a aktívnym činidlom alebo zložkou tohto vynálezu je napríklad 0,0001 : 1 až 100 : 1, najmä 0,001 : 1 do približne 10 : 1 alebo ešte lepšie 0,01 : 1 do približne 1 : 1.

Vynález sa ďalej vzťahuje na vyššie uvedené aktívne činidlá alebo zložky a zmesi, ktoré ich obsahujú v suchej a/alebo čistej forme alebo vo vodnom alebo vodno/alkoholovom roztoku. pH roztoku pripraveného zo zmesi rozpustnej vo vode alebo aktívneho činidla tohto vynálezu by malo byť také, aby nemalo žiadny nepriaznivý účinok na aktivitu farmakologicky aktívneho peptidu, ale má byť v prijateľnom rozsahu pre injekcie a toto pH nemá zapríčiniť ani veľkú zmenu

viskozity roztoku ani nemá umožniť tvorbu precipitátu, a podobne. Teda roztok má mať hodnotu pH asi 4 až 7, lepšie 5 až 6, ešte lepšie 5,3 až 5,5.

Keď sa vo vode rozpustná zmes vynálezu zmení na vodný roztok vhodný na podanie, koncentrácia farmakologicky aktívneho činidla alebo zložky alebo jeho soli v uvedenom roztoku by mala byť od 0,0000001 do 10 % (w/v), lepšie od 0,000001 do 5 % (w/v) alebo ešte lepšie od 0,00001 do 1 % (w/v).

Zmes tohto vynálezu by mala mať špecifickú formu dávkovania s obsahom farmakologicky aktívneho činidla alebo zložky vynálezu a ak je to potrebné, mala by sa podávať spolu s ďalšími aditívami, napríklad s vyššie uvedeným proteínom rozpustným vo vode. Teda napríklad dve alebo tri vyššie uvedené zložky sa plnia do ampuliek alebo liekoviek po rozpustení alebo suspendovaní v sterilnej vode alebo v sterilnom fyziologickom roztoku. V tomto prípade metóda prípravy môže zahŕňať pridanie roztoku farmakologicky aktívneho činidla alebo zložky a ak je to potrebné, k farmakologicky aktívnemu činidlu alebo zložke sa pridá prídavný roztok alebo aditívum v práškovej forme alebo sa využije akákoľvek ďalšia kombinácia potrebných postupov. Dávková forma sa môže tiež pripraviť pridaním sterilnej vody alebo sterilného fyziologického roztoku k lyofilizátu alebo k prášku vysušenému vo vákuu, v ktorom je farmakologicky aktívne činidlo a ak je to potrebné, aj aditívum. Táto špecifická dávková forma môže obsahovať jedno alebo viac bežných aditív, napríklad činidlá na úpravu pH (napr. glycín, kyselina chlorovodíková, hydroxid sodný), lokálne anestetiká (napr. hydrochlorid xylokaínu, chlórbutanol), izotonizačné činidlá (napr. chlorid sodný, manitol, sorbitol), emulzifikátory, inhibitory adsorpcie (napr. Tween® 60 alebo 80), mastencový prášok, škrob, laktózu a tragant, stearát horečnatý, glycerol, propylénglykol, konzervačné činidlá, benzylalkohol, metylhydroxybenzoát a/alebo oleumarašidhydrogén. Táto špecifická forma dávkovania môže ďalej obsahovať farmaceuticky prijateľné pomocné látky, napríklad polyetylénglykol 400 alebo dextrán.

Zmes tohto vynálezu je vyrobená pridaním týchto zložiek podľa bežných metód. Cieľom pridávania zložiek tejto zmesi by malo byť udržanie aktivity farmakologicky aktívneho činidla a minimalizovanie tvorby bublín počas tohto procesu. Jednotlivé zložky sa dajú do nádoby (napríklad do fľaše alebo valca) súčasne alebo v ľubovoľnom poradí. Atmosféra v nádobe môže byť napríklad sterilný čistý vzduch alebo sterilný čistý dusík. Výsledný roztok sa môže preniesť do malých liekoviek alebo ampuliek a poslať na lyofilizáciu.

Tekutá forma práškoveho lyofilizátu zmesi tohto vynálezu sa môže rozpustiť alebo dispergovať v roztoku biodegradovateľného polyméru, napríklad kopolyméru kyseliny poly(lakto-glykolovej), kyseliny poly(hydroxymaslovej), kopolyméru kyseliny poly(hydroxymaslovo-glykolovej) alebo ich zmesi a potom môže byť plnená napríklad do filmov, mikrokapsúl (mikrosfér) alebo nanokapsúl (nanosfér), ktoré môžu byť vo forme mäkkých alebo tvrdých kapsúl.

Zmes tohto vynálezu uzavretá v lipozómoch s obsahom fosfolipidov, cholesterolu alebo ich derivátov môže byť ďalej dispergovaná vo fyziologickom roztoku alebo v roztoku kyseliny hyalurónovej zriedenej vo fyziologickom roztoku.

Mäkká kapsula môže byť naplnená tekutou formou zmesi tohto vynálezu. Tvrdá kapsula môže byť naplnená práškovým lyofilizátom zmesi tohto vynálezu alebo práškový lyofilizát tejto zmesi môže byť lisovaný do tabliet na rektálne alebo perorálne podanie.

Zmes tohto vynálezu sa samozrejme môže dodávať v predplnených striekačkách na priame podanie.

Hoci vyššie sú špecificky opísané len preferované formy vynálezu, bolo by cenné, keby sa vytvorili modifikácie a variácie vynálezu bez odklonu od ducha a plánovanej pôsobnosti vynálezu. Ďalšie preferované formy tohto vynálezu sú uvedené v nárokoch.

### Príklady uskutočnenia vynálezu

#### Príklad

Vykonal sa pokus na zdravých dobrovoľníkoch, pričom sa sledoval vplyv azitromycínu podávaného v dávke 3 x 500 mg pri vybraných parametroch týkajúcich sa zápalu.

#### Podávanie lieku, odoberanie vzoriek krvi a plazmy

Každý pacient dostal dve štandardné kapsuly s obsahom 250 mg azitromycínu (Sumamed®, PLIVA Zagreb) počas troch po sebe idúcich dní. Bezprostredne pred liečbou, po 2 hodinách a 30 minútach, po 24 hodinách a 28 dní po tretej a poslednej dávke azitromycínu sa z laktovej žily odoberala krv do skúmaviek s obsahom EDTA.

Alikvótna časť sa odobrala na krvný obraz, na prípravu krvného rozteru a na izoláciu polymorfonukleárných buniek a séra.

#### Analýza primárnych azurofilných granulárnych enzýmov

Leukocytárne granule sú organely ohraničené membránou, ktoré obsahujú množstvo antimikrobiálnych proteínov. Odhliadnuc od obsahu degradačných enzýmov, ktoré môžu neutrofily vylučovať extracelulárne alebo ktoré sú inak uvoľnené do fagocytárnych vezikúl, membrány mnohých typov týchto granúl a vezikúl obsahujú dôležité molekuly, napríklad určité receptory (napríklad fMLP receptor) a cytochróm b NADPH-oxidázy.

##### a) Analýza myeloperoxidázy

Enzým myeloperoxidáza (MPO) je 135 000-daltonový proteín obsahujúci dva ťažké a dva ľahké reťazce s hmotnosťou 55 000 a 15 000 Daltonov. MPO sa nachádza v primárnych alebo azurofilných granulách granulocytových buniek. Úlohou MPO je zabezpečiť metabolity reaktívneho kyslíka, ktoré sú veľmi dôležité pre mikrobicídnu aktivitu neutrofilov. Tvorba kyslíkových metabolitov je závislá od zložiek MPO-negatívnych granúl (ktoré uchovávajú flavocytochróm  $b_{558}$ , veľmi dôležitú zložku NADPH-oxidázy) a od zložiek azurofilných MPO-pozitívnych granúl. MPO transformuje relatívne neškodný produkt NADPH-oxidázy  $H_2O_2$  na kyselinu chlórnu. Biologický význam aktivity MPO v granulocytoch spočíva v silnej antimikrobiálnej aktivite závislej od kyslíka spojenej s mobilizáciou všetkých granúl v zápalových granulocytoch pri zápalovom procese, najmä po fagocytárnom stimule imunitných komplexov.

Aktivita MPO bola určená na základe intenzity zafarbenia neutrofilov v krvných rozteroch v bunkových lyzátoch pomocou testu ELISA. Roztery boli po fixácii v etanolformaldehyde inkubované v roztoku substrátu s obsahom peroxidu vodíka a benzidínu (SIGMA). Roztery boli po inkubácii zafarbené kontrastným farbivom pomocou Giemsovho roztoku. Bola vyhodnotená pozitivita MPO-hodnôt 100 granulocytov a bolo určené skóre od 0 do 4+ na základe intenzity vyzrážaného farbiva v cytoplazme. Teda hodnota skóre mala byť od 0 do 400. Normálne hodnoty rozsahu skóre (290-390) boli z tejto štúdie odobraté pred podaním azitromycínu.

MPO-aktivita bola vyhodnotená na digitálnom obraze rozteru pomocou digitálnej kamery pri veľkom zväčšení ( $\times 1000$ ) svetelného mikroskopu. Aktivity MPO v neutrofiloch krvného rozteru klesali od 2 hod. a 30 min. do 24 hodín po poslednej dávke azitromycínu a vrátili sa na východiskovú úroveň po 28 dňoch (Tabuľka 1). Koncentrácia proteínu enzýmu MPO určená pomocou testu ELISA v lyzátoch neutrofilov je uvedená v Tabuľke 1. Zmena proteínu neutrofilového enzýmu sledovala rovnaký vzor ako zmena aktivity intracelulárneho enzýmu, klesajúc od 2 hod. a 30 min. do 24 hodín po poslednej dávke azitromycínu a vrátila sa na východiskovú úroveň po 28 dňoch. Oba metodologické prístupy určenia MPO sa navzájom potvrdili. Degranulácia prezentovaná nižšou MPO denzitou neutrofilov určenou cytochemicky bola spojená s nižšími koncentraciami MPO v neutrofilových lyzátoch určených testom ELISA.

#### b) Analýza N-acetyl- $\beta$ -D-glukozaminidázy (NAGA) a $\beta$ -glukuronidázy

Glykozidázy sú enzýmy, ktoré katalyzujú hydrolýzu glykozidických väzieb oligosacharidov a ďalších glykozidov. Sú špecifické pre glykozidickú časť molekuly substrátu. Medzi také enzýmy patrí N-acetyl- $\beta$ -D-glukozaminidáza (NAGA) a  $\beta$ -glukuronidáza. Sú to lyzozomálne enzýmy, lokalizované v azurofilných (primárnych, peroxidáza-pozitívnych) granulách neutrofilov. Keďže degranulácia neutrofilov prebieha počas zápalu, mnohí autori si zvolili tieto enzýmy za markery degranulácie a pre odhad reaktivity neutrofilov. Katalytická koncentrácia oboch enzýmov v sére a v neutrofilových lyzátoch bola určená využitím fluorometrickej metódy opísanej O'Brienom et al. (New Engl. J. Med. (1970) 283: 15-20) pre NAGA a Glaserom a Slyom (J. Lab. Clin. Med. (1973) 82: 969) pre  $\beta$ -glukuronidázu.

Výsledky ukázali (Tabuľka 1), že aktivita NAGA v sére sa zvýšila asi o 30 % po 2 hod. a 30 min. po poslednej dávke. 24 hodín po poslednej dávke bola jej hodnota asi o 50 % vyššia ako počiatočné hodnoty. Po 28 dňoch boli hodnoty sérovej NAGA stále o 70 % vyššie ako počiatočné hodnoty. Zvýšenie hladín NAGA v sére bolo sprevádzané poklesom enzymatickej aktivity PMN. Zistil sa približne 70 %-ný pokles NAGA v granulocytoch po 2 hod. a 30 min. po poslednej dávke. Po 24 hodinách sa aktivita NAGA u PMN zvýšila asi o 30 %, ale bola stále o 40 % nižšia v porovnaní v počiatočnými hodnotami. Po 28 dňoch sa aktivita NAGA zvýšila o 40 % v porovnaní s počiatočnými hodnotami (Tabuľka 1).

Aktivita  $\beta$ -glukuronidázy v sére nepreukázala žiadne zmeny počas prvých 24 hodín po poslednej dávke. Po 28 dňoch boli sérové hladiny o 40 % vyššie ako počiatočné hodnoty. Aktivita  $\beta$ -glukuronidázy u PMN klesla asi o 20 % po 2 hod. a 30 min. a asi o 50 % po 24 hodinách v porovnaní s počiatočnými hodnotami. Avšak po 28 dňoch aktivita  $\beta$ -glukuronidázy u PMN bola oveľa vyššia (asi 300 %) v porovnaní s počiatočnými hodnotami (Tabuľka 1).

Po analýze aktivít glykozidád je zrejmé, že azitromycín u zdravých dobrovoľníkov vyvolal uvoľnenie 40 – 50 % enzýmov z azurofilových granúl do 24 hodín po poslednej dávke. Pokles aktivity NAGA u PMN bol sprevádzaný zvýšením hladiny v sére. Sérové aktivity týchto dvoch enzýmov preukázali slabé zvýšenie oproti východiskovému bodu (pred podaním azitromycínu) po 2 hod. a 30 min. a po 24 hodinách po poslednej dávke lieku a po ďalších 28 dňoch sa pozorovalo zvýšenie (Tabuľka 1).

Aktivity týchto dvoch enzýmov v lyzátoch neutrofilov naproti tomu klesali v hodinách po poslednej dávke azitromycínu a pokles aktivity NAGA bol maximálny po 2 hod. a 30 min. a vrátil sa na východiskovú úroveň po 28 dňoch. Bunková aktivita  $\beta$ -glukuronidázy 24 hodín po poslednej dávke azitromycínu stále klesala a značne sa zvýšila nad východiskovú úroveň po 28 dňoch (Tabuľka 1).

Teda enzýmy uvoľnené z neutrofilových primárnych azurofilných granúl boli prítomné v sére pri trochu vyšších aktivitách po 2 hod. a 30 min. do 24 hodín po podaní azitromycínu, zatiaľ čo ich aktivity počas rovnakého časového obdobia boli nižšie v neutrofiloch periférnej krvi, čo naznačuje, že boli uvoľnené degranuláciou. NAGA bola uvoľnená skoro po podaní azitromycínu, zatiaľ čo MPO a  $\beta$ -glukuronidáza sa uvoľnila neskôr. Obnova aktivít týchto enzýmov sa tiež menila.

### Štúdie o oxidatívnom impulze neutrofilov

Všetky aeróbne organizmy využívajú kyslík na tvorbu energie. Avšak je veľa náznakov, že výhody využitia kyslíka sú spojené s rizikom, že oxidatívny proces môže tiež spôsobiť poškodenie tkaniva. Počas fagocytózy sú stimulované neutrofily, ktoré podliehajú oxidatívnejmu impulzu s tvorbou a uvoľnením reaktívnych metabolitov kyslíka. Tieto reaktívne formy kyslíka slúžia ako hlavný mechanizmus, pomocou ktorého fagocytóza sprostredkuje ich antimikrobiálny účinok. Tieto reakcie

sú charakterizované rýchlym príjmom kyslíka, po ktorom nasleduje redukcia kyslíka na superoxid ( $O_2^-$ ). Táto reakcia je katalyzovaná NADPH-oxidázou s využitím NADPH alebo NADH ako donora elektrónov. Keď sú tieto obranné mechanizmy zamerané nesprávnym smerom, vzniká poškodenie tkaniva.

#### a) Určenie tvorby chemiluminiscencie

Tvorba reaktívnych foriem kyslíka aktivovanými bunkami sa často určuje meraním chemiluminiscencie (CL). Typy vytvorených radikálov reagujú s látkou vytvárajúcou fotóny (napr. Luminol) a výsledná svetelná emisia sa meria pomocou fotobunky. Chemiluminiscencia je detekovateľná ako výsledok stimulácie (napr. fMLP) leukocytov a je mierou ich oxidatívnej cytotoxickéj aktivity (Allen et al., Biochem. Biophys. Res. Commun.(1972), 47: 679).

Výsledky tejto štúdie uvedené v Tabuľke 1 ukazujú, že azitromycín inhibuje chemiluminiscenciu vytvorenú stimulovanými neutrofilmi izolovanými z krvi ľudí liečených azitromycínom.

#### b) Testovací systém cytochrómu c

Neutrofily boli inkubované s cytochrómom c a stimulované fMLP (Cohen and Chovaniec, 1978, J. Clin. Invest. 61: 1081-1087). Boli zaznamenané absorbancie pri 550 nm a 540 nm a výsledky boli vyjadrené ako delta A.

Oxidatívny impulz neutrofilov ako odpoveď na bakteriálny peptid fMLP bol inhibovaný trojdňovou dávkou azitromycínu (Tabuľka 1). S využitím cytochrómu c a luminolu ako testovacích systémov bola inhibícia detekovateľná už 2 hod. a 30 min. po poslednej dávke azitromycínu, po 24 hodinách bola vyššia a po 28 dňoch sa nevrátila na normálnu úroveň.

Teda azitromycín sa považuje za inhibítora oxidatívneho impulzu. Azitromycín preto predstavuje základ pre množstvo ochorení, napríklad pre COPD, pri ktorých sa tvorba neutrofilových radikálov (oxidatívny impulz) stáva nadmernou.

#### Analýza glutatiónperoxidázy a glutatiónreduktázy

Voľné radikály kyslíka a peroxidy lipidov sa podieľajú na patogenéze veľkého množstva ochorení. Biologické účinky voľných radikálov sú riadené in vivo širokým spektrom antioxidantov, napríklad  $\alpha$ -tokoferolom (vitamín E), kyselinou askorbovou (vitamín C),  $\beta$ -karoténom, redukovaným glutatiónom (GSH) a enzýmami antioxidantov (superoxiddismutáza, SOD, glutatiónpoxidáza GSHPx, kataláza, CAT) (Benabdeslam et al., Clin. Chem. Lab. Med. (1999), 37: 511-516, Mates et al., Blood Cells Mol. (1999), 25: 103-109). Nedávno boli funkcie antioxidantov definitívne spojené s protizápalovými a/alebo imunosupresívnymi vlastnosťami (Mates et al., Blood Cells Mol. (1999), 25: 103-109). Tvorba voľných radikálov a narušenie redoxného stavu môže modulovať expresiu množstva zápalových molekúl (Sundaresan et al., Science (1995), 270: 296-299, Kaouass et al., Endocrine (1997), 6: 187-194), čo ovplyvňuje určité bunkové procesy, vedúce k zápalovým procesom, a ktoré opätovne vyvolávajú zápal a spôsobujú poškodenie tkaniva (Tsai et al., FEBS Lett. (1997), 436: 411-414).

Bunková glutatiónpoxidáza (GSHPx) je tetramérny proteín, v ktorom každá zo štyroch identických podjednotiek obsahuje jeden atóm selénu (Se) vo forme seléncysteínu na aktívnom mieste (Misso et al., J. Leukoc. Biol. (1998), 63: 124-130). GSHPx hrá úlohu pri detoxikácii  $H_2O_2$  a mení lipidové hydroperoxidy na netoxické alkoholy (Akkus et al., Clin. Chim. Acta (1996), 244: 221-227, Urban et al., Biomed. and Pharmacother. (1997), 51: 388-390). V tejto štúdii u zdravých dobrovoľníkov liečených azitromycínom zmeny intracelulárnej aktivity GSHPx v PMN boli určené využitím komerčne dostupnej súpravy RANSEL (Randox Laboratories). GSHPx katalyzuje oxidáciu glutatiónu pomocou kumenhydroperoxidu. Oxidovaný glutatión v prítomnosti glutatiónreduktázy a NADPH sa ihneď zmení na redukovanú formu so sprievodnou oxidáciou NADPH na  $NADP^+$ . Meria sa pokles absorbancie pri 340 nm.

Glutatiónreduktáza je všadeprítomný enzým, ktorý katalyzuje redukciu oxidovaného glutatiónu (GSSG) na glutatión (GSH). Glutatiónreduktáza je veľmi dôležitá pre redoxný cyklus glutatiónu, ktorý udržiava primerané hladiny redukovaného bunkového GSH. GSH slúži ako antioxidant a reaguje s voľnými radikálmi a organickými peroxidmi pri transporte aminokyselín a ako substrát pre GSHPx a glutatión-S-transferázy pri detoxikácii organických peroxidov a metabolizme xenobiotík. Glutatiónreduktáza bola určená využitím BIOXYTECH® GR-340™ kolorimetrického testu pre glutatiónreduktázu (OXIS International, Inc.).

Oxidácia NADPH na  $\text{NADP}^+$  je katalyzovaná limitujúcou koncentráciou glutatiónreduktázy.

GSHPx aktivita v neutrofilových lyzátoch (vyjadrená na počet buniek) bola nezmenená po 2 hod. a 30 min. po poslednej dávke azitromycínu, ale významne klesla 24 hod. po tejto poslednej dávke (Tabuľka 1). Aktivita sa vrátila na východiskovú úroveň po 28 dňoch. Aktivita glutatiónreduktázy v bunkových lyzátoch (vyjadrená na počet buniek) prejavila podobnú tendenciu a významne klesla po 2 hod. a 30 min. a po 24 hod. po poslednej dávke azitromycínu, vrátila sa k normálnym hodnotám a potom dosiahla vyššie hladiny oproti normálu 28 dní po liečbe (Tabuľka 1).

#### Analýza apoptózy

Trojdnové podávanie azitromycínu malo účinok na spomalenie pro-apoptózy granulocytov, čo naznačuje morfológia krvných rozterov. Výsledky sú uvedené v Tabuľke 1. Počet apoptických buniek po troch dňoch podávania azitromycínu sa stále zvyšoval a 28 dní po poslednej dávke dosiahol štatistickú významnosť. Zvýšený počet apoptických buniek naznačuje znížený počet aktívnych, potenciálne škodlivých neutrofilov.

#### Analýza cytokínov a chemokínov

V tejto štúdii sa zistili ďalšie akútne, ale potenciálne protizápalové účinky azitromycínu.

Interleukín-8, člen špecifickej neutrofilovej CXC-podrodiny chemokínov je potenciálnym chemotaktickým a aktivačným faktorom neutrofilov (Oppenheim, J. J. Ann. Rev. Immunol. (1999), 9: 617). Viaže sa najmenej na dva receptory (IL-8R1 a IL-8R2) viazané G-proteínom. Tieto receptory sú funkčne odlišné. Odpovede, napríklad zmeny cytosolických voľných  $\text{Ca}^{2+}$  a uvoľnenie granulárnych enzýmov, sú sprostredkované oboma receptormi, zatiaľ čo respiračný impulz a aktivácia fosfolipázy D závisí výlučne od stimulácie pomocou IL-8R1 (Johnes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1996), 93: 6682-6686). IL-8 je kľúčovým mediátorom pri zhlukovaní cirkulujúcich neutrofilov. Tento chemokín je vyjadrený v reakcii na zápalové stimuly a vylučujú ho rôzne bunkové typy vrátane lymfocytov, epiteliálnych buniek,

keratinocytov, fibroblastov, endoteliálnych buniek, buniek hladkého svalstva a neutrofilov. V poslednom prípade IL-8 je jedným z najhojnejšie vylučovaných (a najrozšírenejších) študovaných cytokínov vytvorených neutrofilmi. Je zaujímavé, že neutrofily predstavujú primárny bunkový cieľ pre IL-8, na ktoré odpovedajú chemotaxou, uvoľnením obsahu granúl, respiračným impulzom, reguláciou receptorov bunkových povrchov, zvýšenou adherenciou k nestimulovaným endoteliálnym bunkám a transmigráciou cez endotelium. Činidlá, ktoré sú schopné stimulovať tvorbu IL-8 pomocou ľudských neutrofilov sú: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , GM-CSF, leukotrién B<sub>4</sub>, PAF, fMLP, laktoferín, LPs a mnoho ďalších (Cassatella, M.A., Adv. Immunol. (1999), 73: 369-509). IL-8 spomaľuje spontánnu a TNF- $\alpha$ -sprostredkovanú apoptózu ľudských neutrofilov. (Kettritz et al., Kidney Int. (1998), 53: 84-91). IL-8 je predominantný C-X-C chemokín a dominantný neutrofilový chemoatraktant, ktorý sa akumuluje v supernatante LPS-stimulovaných ľudských alveolárnych makrofágov (Goodmann et al., Am. J. Physiol. (1998), 275: L87-L95).

Zistilo sa, že erytromycín má inhibičný účinok na expresiu IL-8 v ľudských epiteliálnych bunkách a tento spôsob účinku má pravdepodobne význam pre jeho klinickú účinnosť (Takizawa et al., Am. J. Respir. Crit. Care Med. (1997), 156: 266-271).

Roxitromycín je tiež schopný redukovať tvorbu IL-8 u fibroblastov nazálnych polypov (Nonaka et al., Acta Otolaryngol. (1998) Suppl. 539: 71-75). V synoviocytoch pri reumatoidnej artritíde tvorba IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-8, GM-CSF by mohla byť inhibovaná klaritromycínom (Matsuoka et al., Clin. Exp. Immunol. (1996), 104 (3): 501 – 8). Určenie tvorby IL-8 ex vivo v celkovej krvi tiež potvrdilo potenciál erytromycínu pri inhibícii tvorby IL-8 (Schultz et al., J. Antimicrob. Chemother. (2000), 46: 235-240). Podobné zistenie bolo nedávno publikované v prípade ľudských bronchiálnych epiteliálnych buniek (Desaki M. et al., Biochim. Biophys Res. Commun. (2000) 267: 124-128). Nedávna štúdia však dokázala, že azitromycín nemá modulačný účinok na tvorbu IL-8 u PMN in vitro (Koch et al., J. Antimicrob. Chemother. (2000), 46: 19-26).

Koncentrácie cytokínov a chemokínov boli určené pomocou súprav ELISA. Po trojdňovom podávaní azitromycínu sa pozorovalo niekoľko odlišných schém reakcií v koncentráciách sérových cytokínov a chemokínov. Rýchly pokles plazmatických koncentrácií chemokínu stimulujúceho neutrofily, IL-8 a GRO- $\alpha$  sa pozoroval po 2 hod. a 30 min. a po 24 hod. po poslednej dávke azitromycínu (Tabuľka 1).

Koncentrácia IL-8 sa v podstate vrátila na východiskovú úroveň po 28 dňoch, zatiaľ čo hladina GRO- $\alpha$  v tomto čase poklesla.

Tieto údaje jasne demonštrujú akútny inhibičný účinok azitromycínu na uvoľnenie IL-8 ex vivo, pričom sa táto vlastnosť rozšírila aj na inhibíciu uvoľnenia chemokínu GRO- $\alpha$ . Mohlo by sa však konštatovať, že bola zameraná koncentrácia sérových chemokínov. Preto nie je možné vyvodiť žiadny záver o bunkovom zdroji(och) chemokínov.

Nízka východisková sérová koncentrácia IL-1 po poslednej dávke azitromycínu postupne vzrastala, až dosiahla po 24 hod. štatistickú významnosť (Tabuľka 1). Koncentrácia sa vrátila na východiskovú úroveň 28 dní po podávaní azitromycínu. Na rozdiel od toho sérová koncentrácia IL-6 prejavila nepretržitý pokles, až dosiahla štatistickú významnosť 28 dní po poslednej dávke azitromycínu (Tabuľka 1).

#### Analýza adhezívnych molekúl

Na rozdiel od skoršie publikovaných údajov (Semaan et al., J. Cardiovasc. Pharmacol. (2000), 36: 533-537), na základe ktorých liečba azitromycínom neovplyvnila významne plazmatické hladiny rozpustného VCAM, v tejto štúdii sa pozoroval pokles sérových hladín VCAM 24 hod. po poslednej dávke azitromycínu, ktoré ostali významne znížené po 28 dňoch, čo naznačuje, že azitromycín má potenciál inhibovať tvorbu neutrofilových chemotaktických peptidov a expresiu a uvoľnenie adhezívnych molekúl pre aktivované leukocyty (Tabuľka 1). Na kvantitatívne učenie sérovej koncentrácie ľudských VCAM bola použitá testovacia súprava ELISA (R&D systems, Veľká Británia).

Proteíny vo vzorkách PMN boli určené podľa metódy Bradforda (Anal. Biochem. (1976) 72: 248-254) s využitím bovinneho sérového albumínu ako štandardu.

## Patentové nároky

1. Použitie aktívnej látky vybranej zo skupiny obsahujúcej azitromycín, jeho farmaceuticky prijateľného derivátu, jeho farmaceuticky prijateľného hydrátu, jeho farmaceuticky prijateľného komplexu alebo chelátu a jeho farmaceuticky prijateľnej soli pri výrobe farmaceutických zmesí na liečbu neinfekčných zápalových ochorení s dominanciou neutrofilov u ľudí i zvierat vybraných zo skupiny zahŕňajúcej respiračný tiesňový syndróm dospelých (ARDS), emfyzém, neutrofilnú dermatózu vrátane psoriázoformnej dermatózy, napríklad psoriázu a Reiterov syndróm, autoimunitné dermatózy, cievne neutrofilné dermatózy, napríklad leukocytoklastická vaskulitída, Sweetov syndróm, pustulárna vaskulitída, erythema nodosum a dedičná maltská horúčka, pyoderma gangrenosum, autoimunitné ochorenie, pri ktorom je infiltrácia neutrofilov opätovne vyvolaná faktormi aktivovaného komplementu, najmä renálne ochorenie vrátane glomerulonefritídy a autoimunitné ochorenie charakterizované akútnymi fázami s dominanciou neutrofilov, napríklad reumatoidná artritída.
2. Použitie podľa nároku 1, kde aktívnou zložkou je 0-metylderivát azitromycínu.
3. Použitie podľa nároku 1, kde aktívnou zložkou je ester azitromycínu.
4. Použitie podľa nároku 1, kde aktívnou zložkou je monohydrát azitromycínu.
5. Použitie podľa nároku 1, kde aktívnou zložkou je dihydrát azitromycínu.
6. Použitie podľa nároku 1, kde aktívnou zložkou je komplex alebo chelát azitromycínu s kovovými iónmi.
7. Použitie podľa nároku 6, kde pomer medzi azitromycínom a kovom je 1 : 1 až 1 : 4.
8. Použitie podľa nároku 6 alebo 7, kde kovové ióny sú bivalentné.

9. Použitie podľa nároku 6 alebo 7, kde kovové ióny sú trivalentné.
10. Použitie podľa nároku 1, kde aktívnou zložkou je alkalický kov, kov alkalických zemín alebo amóniová soľ azitromycínu.
11. Použitie podľa nároku 1, kde aktívnou zložkou je kyslá adičná soľ azitromycínu.
12. Použitie podľa nároku 11, kde kyslá adičná soľ je vytvorená pomocou anorganickej kyseliny.
13. Použitie podľa nároku 11 alebo 12, kde anorganickou kyselinou je kyselina brómovodíková, kyselina dusičná, kyselina fosforečná alebo kyselina sírová.
14. Použitie podľa nároku 11, kde je kyslá adičná soľ vytvorená pomocou organickej kyseliny.
15. Použitie podľa nároku 14, kde organická kyselina je kyselina octová, kyselina benzóová, kyselina škoricová, kyselina citrónová, kyselina etánsulfónová, kyselina fumarová, kyselina glykolová, kyselina maleínová, kyselina jablčná, kyselina propándiová, kyselina mandľová, kyselina metánsulfónová, kyselina oxalová, kyselina p-toluénsulfónová, kyselina pyruvová, kyselina salicylová, kyselina jantárová alebo kyselina vínna.
16. Použitie podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 15, kde farmaceutické zmesi obsahujú aktívnu zložku v množstve dostatočnom na odstránenie alebo zmiernenie ochorenia alebo na zastavenie jeho postupu.
17. Použitie podľa nároku 16, kde sa farmaceutické zmesi podávajú raz až trikrát denne v dávke 10 mg až 2 000 mg aktívnej zložky.
18. Použitie podľa nároku 17, kde sa farmaceutické zmesi podávajú raz až trikrát denne v dávke 30 mg až 1 500 mg aktívnej zložky.

19. Použitie podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 18, kde sa farmaceutické zmesi podávajú perorálne vo forme pevných alebo tekutých dávok.
20. Použitie podľa nároku 19, kde pevné farmaceutické zmesi na perorálne podanie sú tablety, tablety pod jazyk, kapsule, pilulky, prášky, lipozómy, náplaste, filmy s postupným uvoľňovaním účinnej látky a granule.
21. Použitie podľa nároku 19 alebo 20, kde pevné farmaceutické zmesi na perorálne podanie obsahujú najmenej jeden inertný farmaceuticky prijateľný nosič.
22. Použitie podľa nároku 21, kde inertným farmaceutickým nosičom je laktóza, sacharóza alebo škrob.
23. Použitie podľa ktoréhokoľvek z nárokov 19 až 22, kde pevné farmaceutické zmesi na perorálne podanie obsahujú prídavné látky vybrané zo skupiny pozostávajúcej z lubrikačných činidiel, napríklad stearát horečnatý, z objemotvorných a/alebo pufrovacích činidiel a príchuť.
24. Použitie podľa ktoréhokoľvek z nárokov 19 až 23, kde sa pevné farmaceutické zmesi na perorálne podanie pripravujú s obalom odolným voči žalúdočnej kyseline.
25. Použitie podľa nároku 19, kde tekutými farmaceutickými zmesami na perorálne podanie sú farmaceuticky prijateľné emulzie, roztoky, suspenzie alebo sirupy.
26. Použitie podľa nároku 25, kde tekuté farmaceutické zmesi na perorálne podanie obsahujú najmenej jeden inertný farmaceutický nosič.
27. Použitie podľa nároku 26, kde inertný farmaceutický nosič je voda alebo fyziologický roztok.
28. Použitie podľa ktoréhokoľvek z nárokov 25 až 27, kde tekutá farmaceutická zmes na perorálne podanie obsahuje prídavné látky vybrané zo skupiny pozostávajúcej z pomocných látok, solí na zmenu osmotického tlaku, zlúčenín na úpravu pH,

činidiel na uľahčenie penetrácie do pokožky, zvlhčovacích činidiel, emulzifikačných a suspenlačných činidiel.

29. Použitie podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 18, kde farmaceutické zmesi sú podávané parenterálne.
30. Použitie podľa nároku 29, kde farmaceutické zmesi na parenterálne podanie sú infúzie alebo injekcie.
31. Použitie podľa nároku 29 alebo 30, kde farmaceutickými zmesami na parenterálne podanie sú sterilné vodné alebo nevodné roztoky, suspenzie alebo emulzie.
32. Použitie podľa ktoréhokoľvek z nárokov 29 až 31, kde farmaceutické zmesi na parenterálne podanie obsahujú nevodné rozpúšťadlá alebo nosiče.
33. Použitie podľa nároku 32, kde nevodné rozpúšťadlá alebo nosiče sú propylénglykol, polyetylénglykol, rastlinné oleje, napríklad olivový olej a kukuričný olej, želatina a injekovateľné organické estery, napríklad etyloléat.
34. Použitie podľa ktoréhokoľvek z nárokov 29 až 33, kde farmaceutické zmesi na parenterálne podanie obsahujú pomocné látky, napríklad konzervačné, zvlhčovacie, emulzifikačné a dispergačné činidlá.
35. Použitie podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 18, kde farmaceutické zmesi sa podávajú rektálne alebo vaginálne.
36. Použitie podľa nároku 35, kde farmaceutické zmesi na rektálne alebo vaginálne podanie sú vo forme čapíkov, klystírov alebo pien.
37. Použitie podľa nároku 35 alebo 36, kde farmaceutické zmesi na rektálne alebo vaginálne podanie obsahujú masťový základ, napríklad kakaové maslo alebo čapíkový vosk.

38. Použitie podľa ktoréhokolvek z nárokov 1 až 37, kde farmaceutické zmesi na liečbu neinfekčných zápalových ochorení s dominanciou neutrofilov obsahujú jednu alebo viac prídavných aktívnych zložiek užitočných pri liečbe takých ochorení, vybraných zo skupiny pozostávajúcej z nesteroidných protizápalových činidiel, steroidných protizápalových činidiel, bronchodilatačných činidiel, antireumatických činidiel, imunomodulačných činidiel, imunosupresívnych činidiel, kortikosteroidov, beta 2-agonistov a cholínergných antagonistov.
39. Použitie podľa nároku 38, kde dávka prídavných aktívnych zložiek je znížená v porovnaní s farmaceutickými zmesami, obsahujúc len jednu z prídavných aktívnych zložiek.
40. Farmaceutická zmes na liečbu neinfekčných zápalových ochorení s dominanciou neutrofilov u ľudí i u zvierat, vybraných zo skupiny zahŕňajúcej respiračný tiesňový syndróm u dospelých (ARDS), emfyzém, neutrofilnú dermatózu vrátane psoriazoformných dermatóz, napríklad psoriázu a Reiterov syndróm, autoimunitné dermatózy, cievne neutrofilné dermatózy, napríklad leukocytoklastická vaskulitída, Sweetov syndróm, pustulárna vaskulitída, erythema nodosum a dedičná maltská horúčka, pyoderma gangrenosum, autoimunitné ochorenie, pri ktorom je infiltrácia neutrofilov opätovne vyvolaná faktormi aktivovaného komplementu, najmä renálne ochorenie vrátane glomerulonefritídy a autoimunitné ochorenie charakterizované akútnymi fázami s dominanciou neutrofilov, napríklad reumatoidná artritída, obsahujúca aktívnu zložku azitromycín, jeho farmaceuticky prijateľný derivát, jeho farmaceuticky prijateľný hydrát, jeho farmaceuticky prijateľný komplex alebo chelát a jeho farmaceuticky prijateľnú soľ.
41. Farmaceutická zmes podľa nároku 40, kde je aktívnou zložkou O-metylderivát alebo ester azitromycínu.
42. Farmaceutická zmes podľa nároku 40, kde je aktívnou zložkou monohydrát alebo dihydrát azitromycínu.
43. Farmaceutická zmes podľa nároku 40, kde je aktívnou zložkou komplex alebo chelát azitromycínu s bivalentnými alebo trivalentnými kovovými iónmi.

44. Farmaceutická zmes podľa nároku 43, kde je pomer medzi azitromycínom a kovovými iónmi 1 : 1 až 1 : 4.
45. Farmaceutická zmes podľa nároku 40, kde je aktívnou zložkou alkalický kov, kov alkalických zemín alebo amóniová soľ azitromycínu.
46. Farmaceutická zmes podľa nároku 40, kde je aktívnou zložkou kyslá adičná soľ azitromycínu.
47. Farmaceutická zmes podľa nároku 46, kde je kyslá adičná soľ vytvorená pomocou anorganickej kyseliny, napríklad kyseliny brómovodíkovej, kyseliny dusičnej, kyseliny fosforečnej alebo kyseliny sírovej.
48. Farmaceutická zmes podľa nároku 46, kde je kyslá adičná soľ vytvorená pomocou organickej kyseliny, napríklad kyseliny octovej, kyseliny benzóovej, kyseliny škoricovej, kyseliny citrónovej, kyseliny etánsulfónovej, kyseliny fumarovej, kyseliny glykolovej, kyseliny maleínovej, kyseliny jablčnej, kyseliny propándiovej, kyseliny mandľovej, kyseliny metánsulfónovej, kyseliny oxalovej, kyseliny p-toluénsulfónovej, kyseliny pyruvovej, kyseliny salicylovej, kyseliny jantárovej alebo kyseliny vínnej.
49. Farmaceutická zmes podľa ktoréhokolvek z nárokov 40 až 48, kde je aktívna zložka obsiahnutá v množstve dostatočnom na odstránenie alebo zmiernenie ochorenia alebo na zastavenie jeho postupu.
50. Farmaceutická zmes podľa ktoréhokolvek z nárokov 40 až 49, obsahujúca jednu alebo viac prídavných aktívnych zložiek užitočných pri liečbe takých ochorení, vybraných zo skupiny pozostávajúcej z nesteroidných protizápalových činidiel, steroidných protizápalových činidiel, bronchodilatačných činidiel, antireumatických činidiel, imunomodulačných činidiel, imunosupresívnych činidiel, kortikosteroidov, beta 2-agonistov a cholínergných antagonistov.

51. Farmaceutická zmes podľa nároku 50, kde dávka prídavných aktívnych zložiek je znížená v porovnaní s farmaceutickými zmesami, obsahujúc len jednu z prídavných aktívnych zložiek.
52. Metóda na výrobu farmaceutickej zmesi na liečbu neinfekčných zápalových ochorení s dominanciou neutrofilov u ľudí i u zvierat, vybraných zo skupiny zahŕňajúcej respiračný tiesňový syndróm u dospelých (ARDS), emfyzém, neutrofilnú dermatózu vrátane psoriazoformných dermatóz, napríklad psoriázu a Reiterov syndróm, autoimunitné dermatózy, cievne neutrofilné dermatózy, napríklad leukocytoklastická vaskulitída, Sweetov syndróm, pustulárna vaskulitída, erythema nodosum a dedičná maltská horúčka, pyoderma gangrenosum, autoimunitné ochorenie, pri ktorom je infiltrácia neutrofilov opätovne vyvolaná faktormi aktivovaného komplementu, najmä renálne ochorenie vrátane glomerulonefritídy a autoimunitné ochorenie charakterizované akútnymi fázami s dominanciou neutrofilov, napríklad reumatoidná artritída, obsahujúcej aktívnu zložku azitromycín, jeho farmaceuticky prijateľný derivát, jeho farmaceuticky prijateľný hydrát, jeho farmaceuticky prijateľný komplex alebo chelát a jeho farmaceuticky prijateľnú soľ, obsahujúc prísadu aktívnej zložky s prísadami a s ľubovoľnými prídavnými aktívnymi zložkami užitočnými pri liečbe takých ochorení, rozpustením alebo suspendovaním výslednej prímesi v sterilnom vodnom alebo vodno/alkoholovom roztoku s úpravou pH roztoku na hodnotu 4 až 7 použitím činidiel na úpravu pH a naplnením do liekoviek alebo ampuliek.
53. Metóda podľa nároku 52, kde prídavné aktívne zložky sú vybrané zo skupiny pozostávajúcej z nesteroidných protizápalových činidiel, steroidných protizápalových činidiel, bronchodilatačných činidiel, antireumatických činidiel, imunomodulačných činidiel, imunosupresívnych činidiel, kortikosteroidov, beta-2-agonistov a cholínergických antagonistov.

Tabuľka 1

|                                  | JEDNOTKY                                           | Východiskový bod | 2 h. a 30 min. | 24 hodín     | 28 dní         |
|----------------------------------|----------------------------------------------------|------------------|----------------|--------------|----------------|
| <b>DEGRANULÁCIA</b>              |                                                    |                  |                |              |                |
| myeloperoxidáza (skóre)          |                                                    | 337±29           | 326±26         | 315±22*      | 347±18         |
| myeloperoxidáza (hustota)        |                                                    | 105±13           | 130±16*        | 131±17*      | 115±19         |
| myeloperoxidáza (PMN)            | µg/mg proteínu                                     | 54,22±12,61      | 70,85±19,91    | 26,74±2,51*  | 70,01±17,62    |
| NAGA (PMN)                       | nmol x 10 <sup>-6</sup> buniek x min <sup>-1</sup> | 4,15±0,16        | 1,13±0,72*     | 2,62±1,6*    | 5,95±3,7       |
| β-glukuronidáza (PMN)            | nmol x 10 <sup>-6</sup> buniek x min <sup>-1</sup> | 4,12±2,7         |                | 1,58±0,4*    | 15,37±11,4*    |
| NAGA (sérum)                     | µmol x l <sup>-1</sup> x min <sup>-1</sup>         | 9,16±1,6         | 3,21±2,3       | 13,7±1,5*    | 14,87±1,9*     |
| β-glukuronidáza (sérum)          | µmol x l <sup>-1</sup> x min <sup>-1</sup>         | 2,88±0,7         | 11,52±2,2      | 2,95±0,5     | 3,93±1,2*      |
| <b>CYTOKINY (sérum)</b>          |                                                    |                  |                |              |                |
| IL-1                             | pg/ml                                              | 0,291±0,11       | 0,533±0,15     | 1,07±0,19*   | 0,29±0,20      |
| IL-6                             | pg/ml                                              | 3,4±1,05         | 2,7±1,49       | 2,5±1,48     | 1,15±0,61*     |
| <b>CHEMOKINY (sérum)</b>         |                                                    |                  |                |              |                |
| IL-8                             | pg/ml                                              | 29,47±15,44      | 10,61±3,81*    | 14,60±10,75* | 23,03±19,72    |
| GRO-α                            | pg/ml                                              | 124,1±33,02      | 109,6±30,35*   | 107,9±27,83* | 90,4±22,32*    |
| <b>APOPTÓZA (WBC)</b>            | apoptické bunky/100 WBC                            | 0,333±0,655      | 0,833±1,029    | 1,417±1,240  | 2,583±2,02*    |
| <b>ADHEZÍVNE MOLEKULY</b>        | ng/ml                                              | 13,59±2,90       | 12,21±4,12     | 10,29±2,12*  | 10,74±2,05*    |
| <b>OXIDATÍVNY IMPULZ (PMN)</b>   | A.U. ΔA                                            | 29335±1957       | 14774±1175*    | 5053±3804*   | 9879±13880*    |
| fMLP-luminol                     |                                                    | 0,020±0,014      | 0,007±0,015*   | -            | -              |
| fMLP-cytochróm c                 |                                                    |                  |                | 0,018±0,010* | 0,0011±0,0010* |
| <b>GLUTATIONPEROXIDÁZA (PMN)</b> | mU/10 <sup>6</sup> PMN                             | 5,3±2,0          | 5,3±2,9        | 1,6±1,3*     | 8,0±5,2        |
| <b>GLUTATIONREDUKTÁZA (PMN)</b>  | mU/10 <sup>6</sup> PMN                             | 9,63±1,16        | 7,39±1,23*     | 7,91±0,87*   | 11,27±2,24*    |

\*p&lt;0,01 oproti východiskovému bodu (Wilcoxon).