

Винахід стосується способів та композицій, призначених для запобігання та послаблення симптомів та проявів заданих алергічних реакцій та запальних захворювань.

Хронічну астму вважають насамперед запальним захворюванням з супутнім бронхоспазмом. Міра реактивності та бронхостенозу у відповідь на вплив подразників є більшою в астматиків, ніж у здорових людей. Стійкий запальний процес зумовлює гіперреактивність бронхів або надмірну чутливість дихальних шляхів (НЧДШ). Спостерігаються набряк слизової оболонки, закупорювання слизом та його надмірне виділення; паренхіма легенів залишається здоровою. Звуження дихальних шляхів припиняється спонтанно або в результаті лікування, імунні реакції типу I (безпосередні) і можуть відігравати значну роль у розвитку астми у дітей і більшості дорослих; проте у тих випадках, коли початок захворювання спостерігається у дорослому віці, алергічні фактори важко ідентифікувати. Вплив сухого холодного повітря, фізичні навантаження та інші подразнювальні фактори також можуть провокувати астму.

Головною метою терапевтичного лікування астми є запобігання бронхоспазму і тривалий контроль за гіперреактивністю бронхів. Через те, що ні хворий, ні лікар зазвичай не мають можливості спрогнозувати бронхоспазм, хворі на всі типи нападів цього захворювання, крім яскраво виражених епізодичних та/або сезонних, потребують безперервного терапевтичного лікування.

Як бронхолітичні агенти використовують бета-агоністи; вони стимулюють бета₂-адренергічні рецептори, підвищують рівень внутрішньоклітинної цАМФ і здатні інгібувати вивільнювання медіаторів тучних клітин. До інших придатних для використання ліків належать теофілін і зв'язані з ним ксантинові препарати, механізм бронхолітичної дії яких є невідомий; біскромон, кромолін, який запобігає вивільнюванню речовин-посередників (медіаторів) і блокує респіраторні нервові рефлекси; а також кортикостероїди, які перш за все послаблюють запалення та набряк. Антихолінергічні препарати пом'якшують перебіг бронхоспазму шляхом блокування парасимпатичних холінергічних імпульсів на рецепторному рівні. Антигістаміни в окремих випадках запобігають або припиняють алергічні астматичні напади, зокрема в дітей, але вони є лише частково ефективними для лікування астми, оскільки гістамін є лише одним з багатьох посередників.

Сучасні медикаментозні засоби, які використовують для лікування алергенної астми, мають цілу низку недоліків. Загалом, стандартні препарати відзначаються відносно короткою тривалістю дії і є частково або повністю неефективними у разі введення їх після стимулювання антигену. Крім того, через серйозні побічні ефекти, пов'язані з використанням таких агентів, як бета₂-адренергічні агоністи та кортикостероїди, коефіцієнт терапевтичної безпеки лікування такими агентами є відносно низьким, і слід ретельно наглядати за хворими, що їх використовують.

Гіперреактивність бронхів (чи НЧДШ) є ознакою астми і тісно пов'язана з запаленням дихальних шляхів, які спричиняють її. Посилення астми та запалення дихальних шляхів пов'язане з збільшенням гіперреактивності з бронхів, яка може бути спровокованою як антигенними, так і не антигенними подразниками. Бета₂-адренергічні агоністи є ефективними агентами для лікування бронхоспазму, але не впливають на запалення дихальних шляхів або гіперреактивність бронхів. На практиці хронічне вживання лише самих бета₂-адренергічних агентів - через погіршення регулювання бета₂-рецепторів - посилює гіперреактивність бронхів. Останнім часом кортикостероїди є єдиними можливими ефективними агентами, які послаблюють гіперреактивність бронхів. Хоча введені шляхом інгаляції кортикостероїди є доволі безпечними для дорослих астматиків, ці агенти є надто токсичними для дітей, зокрема, пригнічуючи функції надниркової залози та знижуючи щільність та ріст кісток. Таким чином, пошук більш безпечних та ефективних агентів, які послаблюють гіперреактивність бронхів, триває.

У хворих на алергенну астму після контрольної інгаляції специфічного антигену спостерігають принаймні два типи реакції у бронхах. У більшості пацієнтів розвивається гостра реакція бронхостенозу, що розсмоктується за 1-3 год.; таких пацієнтів називають хворими з гострою реакцією. Проте у меншій кількості пацієнтів розвивається як рання, так і пізня реакція. Таких пацієнтів називають хворими з подвійною реакцією. У хворих з подвійною реакцією за гострою реакцією, яка розсмоктується спонтанно, через 4-12 год. слідує вторинне зростання опірності дихальних шляхів (реакція на пізній стадії). Дослідження пізніх реакцій і хворих з подвійною реакцією є важливими з клінічної точки зору, оскільки такі випадки пов'язані з тривалою гіперреактивністю дихальних шляхів або їх надмірною чутливістю (НЧДШ), посиленням симптомів і взагалі тяжкою клінічною формою астми, що потребує інвазивних методів лікування.

Фармакологічні дослідження організму тварин, що страждають на алергію, показали, що не лише реакція бронхостенозу, але й такі характеристики, як зростання запалених клітин та вивільнювання медіатора у хворих з подвійною реакцією є цілком відмінними від аналогічних характеристик у хворих з гострою реакцією. У той час як гістамін є найбільш вірогідним медіатором бронхостенозу під час гострої стадії загострення, активовані продукти ліпоксигеназного шляху (тобто лейкотриєни) є, мабуть, головним медіатором, що бере участь у реакції пізньої стадії. Тучні клітини, однак, відіграють ключову роль у опосередкованих IgE алергенних реакціях дихальних шляхів, а натрій кромолін (стабілізатор мембрани тучної клітини) теоретично повинен запобігати реакціям бронхостенозу як у хворих з гострою реакцією, так і у хворих з подвійною реакцією. Гетерогенність підтипів тучних клітин може відігравати значну роль у дивергентних реакціях і може залежати від різниці у трансдукції сигналу (система другого РНК-посередника).

За останні кілька років виявлено, що введений внутрішньобронхіальним шляхом гепарин є ефективним інгібітором бронхоспазму та бронхостенозу і, таким чином, має велике значення для профілактики астми [див, наприклад, Ahmed et al., New Eng. J. Med. 329:90-95. 1993; Ahmed. Resp. Drug Deliv., 1:55-63, 1994]. Крім того виявлено, що гепарини з низькою молекулярною масою, наприклад, гепарини з середньою молекулярною масою від 4000-5000 дальтон, ефективно запобігають викликаному антигеном бронхостенозу; такі гепарини з низькою молекулярною масою також відзначаються значно меншою антикоагулянтною дією, ніж звичайний фармацевтичний гепарин, що є цінною властивістю у разі використання цих агентів для лікування астми [див. Ashkin et al., Am. Rev. Resp. Dis. 1993 Intl. Conf. Abstracts, p.A660]. Як звичайні фармацевтичні гепарини, так і гепарини з низькою молекулярною масою, однак, не є ефективними, для пригнічення НЧДШ у разі їх введення після контрольного провокувального введення пацієнту антигену.

У вихідній заявці з реєстраційним номером 08/516,786 авторами цього винаходу було виявлено, що

гепарини з наднизькою молекулярною масою (ГНММ) (середня молекулярна маса не більша за 3000 дальтон) є ефективними для пригнічення НЧДШ у астматиків з гострою формою захворювання, навіть коли їх вводять після контрольного провокувального введення антигену в організм пацієнта. Проте експериментальні та клінічні дослідження показали, що у той час як введений шляхом інгаляції звичайний фармацевтичний гепарин на ранній стадії також послаблює викликаний антигеном бронхостеноз у хворих з гострою реакцією (але не після контрольного провокувального введення антигену), він є неефективним у разі лікування хворих з подвійною реакцією. Таким чином, після виконання ранніх досліджень з ГНММ у авторів цього винаходу залишалися сумніви стосовно такого самого ступеня ефективності цих речовин у разі лікування хворих з подвійною або пізньою реакцією, яким вони відзначалися у разі лікування хворих з гострою реакцією.

Сучасні стандартні способи лікування астматиків з подвійною реакцією загалом являють собою більш агресивні та тривалі варіанти терапевтичного лікування, застосовуваного для хворих з гострою реакцією і описаного вище. Проте такі способи лікування не є достатньо ефективними для пригнічення НЧДШ, як вже було зазначено вище, і внаслідок короткої тривалості їхньої дії не можуть запобігати ані реакції на пізній стадії захворювання, ані НЧДШ, що їх спостерігають у хворих з подвійною реакцією.

Слід зазначити, однак, що дихальні шляхи є практично моделлю органів або тканин, вражених реакціями пізньої стадії (РПС). Дані спеціальної медичної літератури свідчать про те, що бронхостеноз на пізній стадії та НЧДШ, виявлені в астматиків з подвійною реакцією, не є окремим явищем, коло проявів якого обмежується лише астмою чи навіть взагалі захворюваннями легенів. Крім симптомів РПС, що проявляються суто у легенях, спостерігаються хворобливі симптоми РПС на шкірі, у носовій порожнині, в очних тканинах і системні симптоми. Вважають, що такі алергенні РПС є тісно взаємопов'язаними з поглядом на їх імунологічні механізми. [Див. Lemanske and Kaliner, "Late Phase Allergic Reactions", опубліковано в Allergies. Principles and Practice (Mosby Yearbook, inc., 4th ed. 1997). Згідно з сучасними уявленнями щодо механізмів утворення РПС, виявляється, що клінічні захворювання (як шкіри, так і легенів, носової порожнини, очей та ін.), стосовно яких визнано участь алергенних механізмів, характеризуються гістологічним запальним складовим елементом, який слідує за безпосередньою алергенною реакцією або надмірною чутливістю, що спостерігається після контрольного провокувального введення антигену. Така послідовність імунної відповіді, очевидно, є пов'язаною з медіаторами тучних клітин і розповсюджується іншими "осідлими" клітинами всередині цільових органів або клітинами, що впроваджуються в сайти тучної клітини або базофільної дегрануляції. Кортикостероїди, які є визнаними цінними препаратами з погляду на лікування різних алергенних захворювань та астми, можуть бути особливо корисними завдяки їхній здатності послаблювати подібний запальний процес. Крім того, існують не пов'язані з легенями захворювання, в яких запальна реакція відіграє головну роль, наприклад, запалення кишечника, ревматоїдний артрит, гломерулонефрит та запальні захворювання шкіри. Такі запальні стани також часто лікують протизапальними препаратами, які діють впродовж короткого періоду часу або які (наприклад, стероїдні та нестероїдні протизапальні препарати) часто викликають побічні шкідливі реакції в імунній системі або у шлунково-кишковому тракті.

існує необхідність у вдосконаленні фармацевтичного лікування задавлених алергічних реакцій та запальних захворювань.

Задачею цього винаходу є створення більш ефективних та безпечних способів та композицій для лікування хворобливих станів, що характеризуються задавленими алергічними реакціями та запальними захворюваннями. Іншою задачею цього винаходу є створення способу та композицій для лікування викликаного антигеном астми на пізній стадії її розвитку та гіперреактивності бронхів, позбавлених недоліків попереднього рівня техніки. Ще однією задачею цього винаходу є створення способу та композицій для лікування астматиків з подвійною реакцією, які є ефективними для запобігання та послаблення проявів астми на пізній стадії.

Ще однією задачею цього винаходу є створення способу та композицій, як описано вище, які є високоефективними для послаблення специфічної та неспецифічної гіперреактивності бронхів, навіть тоді, коли їх вводять після контрольного провокувального введення антигену в організм пацієнта.

З погляду на виконання цих та інших задач, зміст яких буде розкрито далі за текстом, винахід стосується способу лікування свавця у хворобливому стані, що характеризується задавленими алергічними реакціями, включаючи, наприклад, реакції у легенях, носовій порожнині, очних тканинах та системні РПС, або тій, що характеризується запальними реакціями, шляхом внутрішньобронхіального, орального, місцевого, парентерального, інтраназального або внутрішньоочного введення в організм пацієнта фармацевтичної композиції, що містить від близько 0,005 до близько 1,0мг гепаринів з наднизькою молекулярною масою (ГНММ) на один кілограм ваги тіла пацієнта у кожній дозі. Введення цих гепаринів виконують під час загострення, наприклад, після контрольного провокувального введення антигену, або у разі хронічних проявів захворювання для послаблення запальних реакцій, таких як гіперреактивність бронхів у астматиків.

ГНММ, які є ефективними для реалізації способу цього винаходу, мають середні молекулярні маси від близько 1000 до близько 3000 дальтон і відзначаються низьким рівнем антикоагулянтної активності або не мають взагалі антикоагулянтної активності. Пропонуються також нові фармацевтичні композиції, включаючи, наприклад, композиції для інгаляції (внутрішньобронхіальної) у вигляді розпилюваної рідини або порошку, або композиції у вигляді аерозолів, що містять ці ГНММ у відповідних концентраціях.

На Фіг.1 зображено графік, що ілюструє ефект контрольного провокувального введення антигену по двох групах овець з проявами алергічних реакцій, причому одна з груп складається з хворих з гострою реакцією, а друга група - з хворих з подвійною реакцією. Дані для кожної групи відображені як викликане антигеном значення \pm SE% зміни специфічної опірності легенів (СОЛ), яке мало місце до (базове), одразу після (ПА) та через 8год після введення антигену.

*+- = Значно відрізняється від базового значення ($P < 0,05$)

* = Значно відрізняється від хворих з подвійною реакцією ($P < 0,05$)

На Фіг.2А та 2Б показано два графіки, що ілюструють диференціальний вплив призначеного для інгаляції фармацевтичного гепарину на викликаний антигеном бронхостеноз у двох групах овець з

проявами алергічних реакцій, одна з яких складається з хворих з гострою реакцією (n=8), а інша - з хворих з подвійною реакцією (n=13).

+ = Значно відрізняється від базового значення ($P<0,05$)

* = Значно відрізняється від контрольного ($P<0,05$)

На Фіг.3 показано графік, що ілюструє вплив попереднього лікування шляхом інгаляції препарату Fragmin™ (сер. мол. маса. 5030 дальтон) з дозуванням 5,0мг/кг на викликаний антигеном бронхостеноз у овець з проявами подвійних алергічних реакцій. Дані наведено як значення СОЛ (у см $H_2O/L/сек.$) у групі підданих введенню антигену тварин, спочатку без лікування препаратами, а через декілька днів - повторно після попереднього лікування препаратом Fragmin.

На Фіг.4 показано гістограму, що ілюструє вплив попереднього лікування шляхом інгаляції препарату Fragmin™ з дозуванням 5,0мг/кг на НЧДШ у овець з алергічними реакціями. Дані наведено як значення $\pm SE$ ПД₄₀₀ в одиницях дихання на базовому рівні і через 24год. після контрольного провокувального введення антигену у групі підданих введенню антигену тварин, спочатку без лікування препаратами, а через декілька днів - повторно після попереднього лікування препаратом Fragmin.

ПД₄₀₀ = Сумарна провокуюча доза карбахолу, що підвищує СОЛ до 400% від базового значення

+ = Значно відрізняється від базового значення ($P<0,05$)

На Фіг.5 показано графік, що ілюструє вплив попереднього лікування шляхом інгаляції препарату CY-216 (сер. мол. маса. 4,270 дальтон) з дозуванням 1,25мг/кг на викликаний антигеном бронхостеноз у овець з проявами подвійних алергічних реакцій. Дані наведено у вигляді викликаного антигеном значення $\pm SE\%$ зміни у СОЛ у групі підданих введенню антигену тварин, спочатку без лікування препаратами, а через декілька днів - повторно після попереднього лікування препаратом CY-216.

На Фіг.6 показано гістограму, що ілюструє вплив попереднього лікування шляхом інгаляції препарату CY-216 з дозуванням 1,25мг/кг на НЧДШ у овець з алергічними реакціями. Дані наведено як значення $\pm SE$ ПД₄₀₀ в одиницях дихання на базовому рівні і через 24год. після контрольного провокувального введення антигену у групі підданих введенню антигену тварин, спочатку без лікування препаратами, а через декілька днів - повторно після попереднього лікування препаратом CY-216.

+ = Значно відрізняється від базового значення ($P<0,05$)

На Фіг.7 показано графік, що ілюструє вплив попереднього лікування шляхом інгаляції препарату ГНММ CY-222 (сер. мол. маса. 2,355 дальтон) з дозуванням 1,0мг/кг на викликаний антигеном бронхостеноз у овець з проявами подвійних алергічних реакцій. Дані наведено у вигляді викликаного антигеном значення $\pm SE\%$ зміни у СОЛ у групі підданих введенню антигену тварин, спочатку без лікування препаратами, а через декілька днів - повторно після попереднього лікування препаратом CY-222.

* = Значно відрізняється від контрольного ($P<0,05$)

На Фіг.8 показано гістограму, що ілюструє вплив попереднього лікування шляхом інгаляції препарату CY-222 з дозуванням 1,0мг/кг на НЧДШ у овець з алергічними реакціями. Дані наведено як значення $\pm SE$ ПД₄₀₀ в одиницях дихання на базовому рівні і через 24год. після контрольного провокувального введення антигену у групі підданих введенню антигену тварин, спочатку без лікування препаратами, а через декілька днів - повторно після попереднього лікування препаратом CY-222.

+ = Значно відрізняється від базового значення ($P<0,05$)

На Фіг.9 показано графік, що ілюструє вплив лікування (після контрольного провокувального введення антигену) шляхом інгаляції препарату CY-222 з дозуванням 1,0мг/кг на викликаний антигеном бронхостеноз у овець з проявами подвійних алергічних реакцій. Дані наведено у вигляді викликаного антигеном значення $\pm SE\%$ зміни у СОЛ (показано вище) одразу після (час "нуль") та через 8год. після введення антигену в групі підданих введенню антигену тварин, спочатку без лікування препаратами і повторно через декілька днів, коли CY-222 вводили одразу після вимірювання СОЛ після введення антигену (стрілка).

* = Значно відрізняється від контрольного ($P<0,05$)

На Фіг.10 показано гістограму, що ілюструє вплив лікування після контрольного провокувального введення антигену (стрілка на Фіг.9) шляхом інгаляції препарату CY-222 з дозуванням 1,0мг/кг на НЧДШ у овець з алергічними реакціями. Дані наведено як значення $\pm SE$ ПД₄₀₀ в одиницях дихання на базовому рівні і через 24год. після контрольного провокувального введення антигену у групі підданих введенню антигену тварин, спочатку без лікування препаратами і повторно через декілька днів, коли CY-222 вводили одразу після контрольного провокувального введення антигену.

+ = Значно відрізняється від базового значення ($P<0,05$)

На Фіг.11 показано графік, що ілюструє вплив попереднього лікування шляхом інгаляції препарату ГНММ FRU-70 (сер. мол. маса. 2500 дальтон) з дозуванням 1,0мг/кг на викликаний антигеном бронхостеноз у овець з проявами подвійних алергічних реакцій. Дані наведено у вигляді викликаного антигеном значення $\pm SE\%$ зміни у СОЛ у групі підданих введенню антигену тварин, спочатку без лікування препаратами, а через декілька днів - повторно після попереднього лікування препаратом FRU-70.

* = Значно відрізняється від контрольного ($P<0,05$)

На Фіг.12 показано гістограму, що ілюструє вплив попереднього лікування шляхом інгаляції препарату FRU-70 з дозуванням 1,0мг/кг на НЧДШ у овець з алергічними реакціями. Дані наведено як значення $\pm SE$ ПД₄₀₀ в одиницях дихання на базовому рівні і через 24год. після контрольного провокувального введення антигену у групі підданих введенню антигену тварин, спочатку без лікування препаратами, а через декілька днів - повторно після попереднього лікування препаратом FRU-70.

+ = Значно відрізняється від базового значення ($P<0,05$)

На Фіг.13 показано графік, що ілюструє вплив лікування (після контрольного провокувального введення антигену) шляхом інгаляції препарату FRU-70 з дозуванням 0,5мг/кг на викликаний антигеном бронхостеноз у овець з проявами подвійних алергічних реакцій. Дані наведено у вигляді викликаного антигеном значення $\pm SE\%$ зміни у СОЛ (показано вище) одразу після (час "нуль") та через 8год. після введення антигену в групі підданих введенню антигену тварин, спочатку без лікування препаратами і повторно через декілька днів, коли FRU-70 вводили одразу після вимірювання СОЛ після введення антигену (стрілка).

* = Значно відрізняється від контрольного ($P<0,05$)

+ = Значно відрізняється від базового значення ($P < 0,05$) На Фіг.15 показано графік, що ілюструє вплив лікування (після контрольного провокувального введення антигену) шляхом інгаляції суміші гексасахариду (сер. мол. маса 1930 дальтон) з дозуванням 0,5мг/кг на викликаний антигеном бронхостеноз у овець з проявами подвійних алергічних реакцій. Дані наведено як викликане антигеном значення $\pm SE\%$ зміни у СОЛ (показано вище) одразу після (час "нуль") та через 8год. після введення антигену у групі підданих введенню антигену тварин, спочатку без лікування препаратами і повторно через декілька днів, коли суміш гексасахариду вводили одразу після вимірювання СОЛ після введення антигену (стрілка).

На Фіг.16 показано гістограму, що ілюструє вплив лікування після контрольного провокувального введення антигену (стрілка на Фіг.15) шляхом інгаляції суміші гексахсахариду з дозуванням 0,5мг/кг на НЧДШ у овець з алергічними реакціями. Дані наведено як значення \pm SE ПД₄₀₀ у одиницях дихання на базовому рівні і через 24год. після контрольного провокувального введення антигену в групі підданих введенню антигену тварин, спочатку без лікування препаратами і повторно через декілька днів, коли суміш гексахсахариду вводили одразу після контрольного провокувального введення антигену.

На Фіг.17 показано графік, що ілюструє вплив лікування (після контрольного провокувального введення антигену) шляхом інгаляції очищеного гексасахариду (сер. мол. маса. 1998 дальтон) з дозуванням 0,062мг/кг на викликаний антигеном бронхостеноз у овець з проявами подвійних алергічних реакцій. Дані наведено у вигляді викликаного антигеном значення \pm SE% зміни у СОЛ (показаного вище) одразу після (час "нуль") та через 8год. після введення антигену у групі підданих введенню антигену тварин, спочатку без лікування препаратами і повторно через декілька днів, коли гексасахарид вводили одразу після вимірювання СОЛ після введення антигену (стрілка).

На Фіг.18 показано гістограму, що ілюструє вплив лікування після контрольного провокувального введення антигену (стрілка на Фіг.17) шляхом інгаляції очищеного гексасахариду з дозуванням 0,062мг/кг на НЧДШ у овець з алергічними реакціями. Дані наведено як значення \pm SE ПД₄₀₀ в одиницях дихання на базовому рівні і через 24год. після контрольного провокувального введення антигену, спочатку без лікування препаратами і повторно через декілька днів, коли гексасахарид вводили одразу після контрольного провокувального введення антигену.

На Фіг.19 показано графік, що ілюструє вплив лікування (після контрольного провокувального введення антигену) шляхом інгаляції очищеного тетрасахариду (сер. мол. маса. 1290 дальтон) з дозуванням 0,062мг/кг на викликаний антигеном бронхостеноз у овець з проявами подвійних алергічних реакцій. Дані наведено у вигляді викликаного антигеном значення \pm SE% зміни у СОЛ (показано вище) одразу після (час "нуль") та через 8год. після введення антигену у групі підданих введенню антигену тварин, спочатку без лікування препаратами і повторно через декілька днів, коли тетрасахарид вводили одразу після вимірювання СОЛ після введення антигену (стрілка).

На Фіг.20 показано гістограму, що ілюструє вплив лікування після контрольного провокувального введення антигену (стрілка на Фіг.19) шляхом інгаляції очищеного тетрасахариду з дозуванням 0,062мг/кг на НЧДШ у овець з алергічними реакціями. Дані наведено як значення \pm SE ПД₄₀₀ в одиницях дихання на базовому рівні і через 24год. після контрольного провокувального введення антигену, спочатку без лікування препаратами і повторно через декілька днів, коли тетрасахарид вводили одразу після контрольного провокувального введення антигену.

На Фіг.21 показано графік, що ілюструє вплив лікування (після контрольного провокувального введення антигену) шляхом інгаляції октасахариду (сер. мол. маса. 2,480 дальтон) з дозуванням 0, мг/кг на викликаний антигеном бронхостеноз у овець з проявами подвійних алергічних реакцій. Дані наведено у вигляді викликаного антигеном значення \pm SE% зміни у СОЛ (показано вище) одразу після (час "нуль") та через 8 год. після введення антигену у групі підданих введенню антигену тварин, спочатку без лікування препаратами і повторно через декілька днів, коли суміш октасахариду вводили одразу після вимірювання СОЛ після введення антигену (стрілка).

На Фіг.22 показано гістограму, що ілюструє вплив лікування після контрольного провокувального введення антигену (стрілка на Фіг.21) шляхом інгаляції октасахариду з дозуванням 0,25мг/кг на НЧДШ у овець з алергічними реакціями. Дані наведено як значення \pm SE ПД₄₀₀ в одиницях дихання на базовому рівні і через 24год. після контрольного провокувального введення антигену у групі підданих введенню антигену тварин, спочатку без лікування препаратами і повторно через декілька днів, коли октасахарид вводили одразу після контрольного провокувального введення антигену.

На Фіг.23 показано графік, що ілюструє вплив попереднього лікування шляхом інгаляції дисахариду (сер. мол. маса. 660 дальтон) з дозуванням 1,0мг/кг на викликаний антигеном бронхостеноз у овець з проявами подвійних алергічних реакцій. Дані наведено у вигляді викликаного антигеном значення \pm SE% зміни у СОЛ (показано вище) одразу після (час "нуль") та через 8год. після введення антигену в групі підданих введенню антигену тварин, спочатку без лікування препаратами, а через декілька днів - повторно після попереднього лікування дисахаридом.

На Фіг.24 показано графік, що ілюструє вплив попереднього лікування введенням оральним шляхом

очищенням гексасахаридом (сер. мол. маса 1998 дальтон) з дозуванням 2,0мг/кг на викликаний антигеном бронхостеноз у овець з подвійною алергічною реакцією. Дані наведено у вигляді викликаного антигеном значення \pm SE% зміни у СОЛ в організмі однієї вівці, яку піддавали впливу антигену, спочатку без лікування препаратами, а через декілька днів - повторно після попереднього лікування препаратом гексасахаридом.

На Фіг.25 показано гістограму, що ілюструє вплив попереднього лікування введенням оральним шляхом очищенням гексасахаридом з дозуванням 2,0мг/кг на НЧДШ в організмі вівці з алергічною реакцією. Дані наведено як значення \pm SE ПД₄₀₀ в одиницях дихання на базовому рівні і через 24год. після контрольного провокувального введення антигену в організмі однієї вівці, яку піддавали впливу антигену, спочатку без лікування препаратами, а через декілька днів - повторно після попереднього лікування препаратом гексасахаридом.

На Фіг.26 показано графік, що ілюструє вплив попереднього лікування введенням внутрішньовенним шляхом очищенням гексасахаридом (сер. мол. маса. 1,998 дальтон) з дозуванням 0,25мг/кг на викликаний антигеном бронхостеноз у овець з подвійною алергічною реакцією. Дані наведено у вигляді викликаного антигеном значення \pm SE% зміни у СОЛ в організмі однієї вівці, яку піддавали впливу антигену, спочатку без лікування препаратами, а через декілька днів - повторно після попереднього лікування препаратом гексасахаридом.

На Фіг.27 показано гістограму, що ілюструє вплив попереднього лікування введенням внутрішньовенним шляхом очищеними гексасахаридами з дозуванням 0,25мг/кг на НЧДШ у овець з алергічними реакціями. Дані наведено як значення \pm SE ПД_{доо} в одиницях дихання на базовому рівні і через 24год. після контрольного провокувального введення антигену в організмі однієї вівці, яку піддавали впливу антигену, спочатку без лікування препаратами, а через декілька днів - повторно після попереднього лікування препаратом гексасахаридом.

На Фіг.28 показано гістограму, що ілюструє порівняння активності щодо запобігання викликаному антигеном еозинофільному притоку бронхоальвеолярної промивальної рідини у трьох групах мишей, яким вводили відповідно інгаляційним, оральним та внутрішньочеревним шляхом очищений гексасахарид.

Цей винахід загалом стосується способу лікування ссавців, що страждають або мають схильність до розвитку хворобливих станів, що відзначаються давніми алергічними реакціями та/або запальними реакціями, а також нових фармацевтичних композицій, що містять гепарини з наднизькою молекулярною масою, які є придатними для використання згаданого способу на практиці.

Гепарин (сульфатований мукополісахарид) синтезується у тучних клітинах у вигляді протеоглікану і у великій кількості накопичується у легенях різних тварин. Гепарин не являє собою специфічну сполуку з фіксованою молекулярною масою, але є гетерогенною сумішшю різних сульфатованих полісахаридних ланцюгів, що складаються з таких елементів, як D-глюкозамін та L-ідуронова або D-глюкуронова кислоти, які повторюються у ланцюгах. Середня молекулярна маса гепарину, виділеного з тваринних тканин, становить від близько 6000 до близько 30000 дальтон.

У фармакології гепарин відомий насамперед як антикоагулянт. Така його дія є наслідком здатності гепарину зв'язуватися з деякими залишками антитромбіну III (AT-III), що прискорює нейтралізацію за участю AT-III активованих факторів системи скипання крові та запобігає перетворенню протромбіну на тромбін. Більші кількості гепарину інактивують тромбін та згадані фактори системи скипання крові, запобігаючи перетворенню фібриногену на фібрин.

Геморагічна дія гепарину пов'язана з молекулярною масою його полісахаридних фрагментів; компоненти або фрагменти з низькою молекулярною масою (наприклад, фрагменти з молекулярною масою менше 6000 дальтон) пом'якшують вплив антитромбіну та геморагічний ефект. Аналогічним чином гепарини з низькою молекулярною масою, що їх виділяють з тваринних тканин, загалом послаблюють геморагічні властивості у порівнянні з використовуваним у фармацевтиці гепарином, але відзначаються-таки значною антикоагулянтною активністю.

Використовуваний у фармацевтиці гепарин, який що його зазвичай одержують з коров'ячих легенів або зі слизової оболонки свиней, має середню молекулярну масу близько 15000-17500 дальтон.

Гепарин проявив здатність діяти як специфічний блокатор рецепторів IP₃, інгібуючи опосередковане IP₃ вивільнювання кальцію. Автори попередньо припускають, що гепарин блокує рецептори IP₃ у тучних клітинах і, таким чином, інтерферує з трансдукцією сигналу, модулює дегрануляцію тучних клітин та вивільнювання медіатора. Дослідження *in vivo* та *in vitro* підтверджують цю концепцію і чітко свідчать про те, що введений шляхом інгаляції гепарин пом'якшує алергічний бронхостеноз у овець, запобігає викликаній фізичними навантаженнями астмі, а також інгібуює викликане IgE вивільнювання гістаміну у тучних клітинах. Виявлено, що введений шляхом інгаляції гепарин у дозах до 1000один./кг не впливає на час часткової тромбінази (ЧЧТ), отже, настановує на думку про "неантикоагулянтну" дію.

Було зроблено також доповіді про те, що гепарини з низькою молекулярною масою (середня молекулярна маса близько 4500 дальтон), які послабили активність АРТТ, виявилися ефективними у дослідженнях тварин стосовно запобігання викликаній антигеном реакції бронхостенозу (АРБ) і гіперреактивності бронхів, яку також називають надмірною чутливістю дихальних шляхів (НЧДШ). Однак - і це більше детально розглянуто і проілюстровано нижче - ні використовуваний у фармацевтиці гепарин, ані гепарини з середньою або низькою молекулярною масою (навіть ті, що мають дуже низьку антикоагулянтну активність) не є ефективними для послаблення НЧДШ одразу після контрольного провокувального введення антигену в організм досліджуваних тварин. Такі гепарини чітко забезпечують лише дію профілактичного, превентивного характеру, але не є придатними для лікування хворих під час збудженого антигеном нападу астми.

Автори виявили і опублікували у патентній заявці реєстр. №08/516,786 повідомлення про те, що фракції гепарину з наднизькою молекулярною масою (ГНММ) є не лише ефективними інгібіторами анафілаксії дихальних шляхів, але й високоефективними сполуками для послаблення НЧДШ, навіть коли їх вводять після контрольного провокувального введення антигену. Постійне регулярне використання ГНММ також послаблює НЧДШ, і ГНММ, таким чином, використовують для лікування хронічної астми, спричиненої або специфічними (тобто антигенними), або неспецифічними факторами.

Попередня заявка авторів лише стосувалася і розкрила ті дані досліджень, які свідчили про

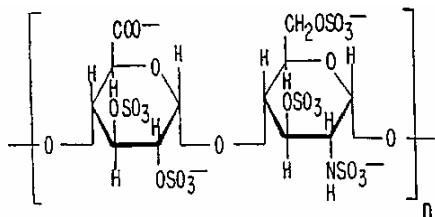
ефективність ГНММ у разі лікування задавленої астми у хворих з гострою реакцією, але не у разі лікування хворих з подвійною реакцією, які зазнають як ранньої, так і пізньої стадії бронхостенозу, а також тривалої НЧДШ. Як було розглянуто вище, на підставі раніше проведених авторами досліджень не можна точно спрогнозувати те, що ГНММ - введені чи до контрольного провокувального введення антигену, чи після нього - виявляться ефективними з погляду на інгібування бронхостенозу (як на ранній, так і на пізній стадії) та НЧДШ у хворих з подвійною реакцією. Така низька прогнозованість підтверджується тим фактом, що використовуваний у фармацевтиці гепарином та гепарини з середньою або низькою молекулярною масою (мол. маса >3000) інгібують НЧДШ у хворих з гострою реакцією у разі введення їх перед контрольним введенням антигену, але не справляють суттєвого впливу на послаблення реакції у пізній стадії і НЧДШ, що їх виявляють у хворих з подвійною реакцією.

Після проведення додаткових контрольованих досліджень з застосуванням ГНММ, автори несподівано виявили, що фракції гепарину з низькими молекулярними масами від близько 1000 до близько 3000 є ефективними (у разі введення шляхом інгаляції хворими з подвійною реакцією перед або навіть після контрольного провокувального введення антигену) для послаблення бронхостенозу на ранній або пізній стадії і НЧДШ.

Ще більш несподіваним було виявлення авторами того факту, що оральне та внутрішньовенне (або інше парентеральне) введення ГНММ перед контрольним введенням антигену ефективно інгібувало бронхостеноз і НЧДШ у хворих з подвійною реакцією.

Таким чином, цей винахід в одному з аспектів охоплює спосіб лікування ссавця з подвійною реакцією, який хворіє на викликану антигеном задавленою астму, включаючи внутрішньобронхіальне введення в організм пацієнта (до або після контрольного провокувального введення антигену) фармацевтичної композиції, що містить від близько 0,005 до близько 1,0 мг однієї чи декількох ефективних фракцій ГНММ на один кілограм ваги тіла пацієнта у кожній дозі згаданої композиції, в оптимальному варіанті від близько 0,075 до близько 0,75 мг/кг на одну дозу. Для такого застосування "ефективні ГНММ" визначають як фракції гепарину з середньою молекулярною масою близько 1000-3000 дальтон. ГНММ з середньою молекулярною масою близько 1000-2500 дальтон є особливо ефективними у разі застосування згідно способу цього винаходу. Кожна фракція ГНММ містить тетрасахариди, пентасакхариди, гексасакхариди, септасакхариди, октасакхариди та декасахариди, а також молекули з більшою довжиною ланцюга.

Фракції ГНММ, що їх використовують у цьому винаході, являють собою олігомери сульфатованих сахаридних структурних одиниць, які мають, наприклад, таку загальну структурну формулу:



Незважаючи на відому активність N-десульфатованих гепаринів в інших біологічних системах, наприклад, як інгібіторів росту клітин, виявлено, що всі сахаридні одиниці у фракціях ГНММ, ефективних для реалізації задач цього винаходу, є N-сульфатованими; N-десульфатовані фракції є неефективними.

У той час як під сульфатованими полісахаридами, що їх використовують у способах і композиціях цього винаходу, у цьому тексті загалом розуміють гепарини з наднизькою молекулярною масою, тобто фракції з наднизькою молекулярною масою, одержані з природного гепарину (або синтетичні варіанти таких ГНММ), винахід також охоплює використання сульфатованих полісахаридів, що їх одержують з сульфату гепарину, дерматансульфату, хондроїтинсульфату, пентозанполісульфату та/або інших глікозаміногліканів та мукополісахаридів. Сульфатовані полісахаридні фракції повинні, однак, мати середню молекулярну масу близько 1000-3000 дальтон. Фармацевтично прийнятними солями ефективних ГНММ або будь-яких інших сульфатованих полісахаридів (з перелічених вище) також можуть бути, наприклад, солі натрію, калію та кальцію.

Згідно з першим аспектом цього винаходу, хворій людині або іншому ссавцю з подвійною реакцією, в організм якого шляхом інгаляції, всмоктування або іншим шляхом потрапляє антиген (тобто якому зроблено провокаційне контрольне введення антигену) такого типу, який явно провокує напади астми в організмі цього пацієнта, або ж хворому, який у майбутньому може бути підданий контрольному введенню антигену, шляхом інгаляції вводять принаймні одну дозу фармацевтичної композиції, що містить один чи декілька ефективних ГНММ, сумарно наявних у концентраціях описаних вище порядків. Після контрольного провокувального введення за необхідністю вводять додаткові дози антигену доти, поки хворий не видужає або в його організмі не буде підтримуватися нормальний рівень опірності до потоку повітря.

Винахід у своєму другому аспекті також включає постійне введення ефективних ГНММ хворим з подвійною астматичною реакцією з метою послаблення та пом'якшення НЧДШ на ранній та пізній стадії розвитку. "Постійне введення" у цьому описі означає введення фармацевтичної композиції, що містить ефективні ГНММ, принаймні один раз на добу впродовж принаймні десяти днів поспіль. Постійне введення композиції, що містить від близько 0,005 до близько 1,0 мг/кг на одну дозу, в оптимальному варіанті близько 0,0075-0,75 мг/кг на одну дозу, можна продовжувати протягом необмеженого часу, забезпечуючи рівень лікування з метою послаблення НЧДШ, принаймні порівняний з рівнем лікування кортикостероїдами, але практично без побічних ефектів.

До композицій ГНММ для введення шляхом інгаляції (внутрішньобронхіальним шляхом), що їх використовують у цьому винаході для лікування астми на пізній стадії її розвитку та інших легеневих захворювань, належать рідкі або порошкоподібні композиції, що містять ефективні фракції ГНММ і є придатними для розпилювання та внутрішньобронхіального застосування, або композиції у вигляді аерозолів, що їх вводять за допомогою пристрою для розпилення аерозолів, що виділяє речовину

вимірюваними дозами.

До придатних рідких композицій належать, наприклад, ефективні ГНММ у водному, фармацевтично прийнятному розчині для інгаляцій, наприклад, ізотонічному розчині або бактеріостатичній воді. Розчини вводять за допомогою помповального пристрою, або приведеного в дію шляхом натискання пристрою для розпилювання аерозолів, або за допомогою інших стандартних засобів, з використанням або за допомогою яких потрібну дозу рідкою композиції шляхом інгаляції можна вводити в легені хворого ссавця.

До придатних порошкоподібних композицій належать, як варіант, порошкоподібні препарати гепарину, добре перемішані з лактозою або іншими інертними порошками, придатними для внутрішньобронхіального введення. Порошкоподібні композиції вводять за допомогою пристрою для розпилення аерозолів або поміщають у крихку капсулу, яку пацієнт вводить у пристрій, що проколює капсулу і видуває порошок у вигляді рівномірного потоку, придатного для інгаляції.

До аерозольних композицій для використання за способом цього винаходу зазвичай належать газ-витискувачі з фторованих алканів, поверхнево-активні речовини та співрозчинники, якими наповнюють алюмінієві або інші стандартні балончики для аерозолів, які після цього закупорюють відповідним дозувальним клапаном і які піддають дії тиску з використанням газу-витискувача, створюючи інгалятор з контрольованою дозою (ІКД).

Сумарна концентрація ефективних ГНММ у будь-якому носії з газом-витискувачем, придатному для використання у пристрої для дозування аерозолів під тиском, наприклад, ІКД, повинна бути достатньо високою для забезпечення дози близько 0,005-0,1мг (5-100мкг) ефективних ГНММ на 1 кілограм ваги тіла пацієнта за 1 введення. Таким чином, наприклад, якщо ІКД подає 85мкл носія з газом-витискувачем і лікувальним препаратом за 1 спрацювання, концентрація ефективних ГНММ у носії при вазі ссавця 75кг становить приблизно 0,0045-0,088мг/мкл (4,5-88мкг/мкл), що забезпечує введення від 0,375 до 7,5мг (375-7500мкг) ГНММ за 1 спрацювання, якщо потрібно ввести цілу дозу за одне спрацювання. Якщо треба ввести дозу за два спрацювання, відповідний діапазон концентрацій становить приблизно 0,0022-0,044мг/мкл (2,2-44мкг/мкл), що забезпечує введення від 0,188 до 3,75мг (188-3,750мкг) ГНММ за 1 спрацювання.

Сумарна концентрація ефективних ГНММ у будь-якому рідкому розпилюваному розчині повинна бути достатньо високою для забезпечення дози близько 0,05-1,0мг (50-1000мкг) ефективних ГНММ на 1 кілограм ваги тіла пацієнта за 1 введення. Таким чином, наприклад, якщо застосовуваний розпилювач подає 5мл розчину за 1 спрацювання, концентрація ефективних ГНММ при вазі ссавця 75кг повинна становити приблизно 0,75-15,0мг/мл.

У ще одному аспекті цього винаходу ефективні композиції з вмістом ГНММ оральним або парентеральним (наприклад, внутрішньовенним або внутрішньом'язовим) шляхом вводять в організм пацієнтів-ссавців, хворих на викликану антигеном астму на пізній стадії її розвитку, тобто хворих з подвійною реакцією, перед тим, як піддати пацієнта контрольному введенню антигену. Композиції для введення оральним або парентеральним шляхом містять від близько 0,005 до близько 1,0мг ефективних ГНММ на 1кг ваги тіла пацієнта у кожній дозі. Композиції для введення оральним або парентеральним шляхом вводять не більше як за 8год. (але в оптимальному варіанті не більше як за 4год.) до контрольного провокувального введення антигену, і вони є ефективними для послаблення бронхостенозу на ранній та пізній стадіях його розвитку і для пригнічення НЧДШ.

Як це добре відомо фахівцям-фармацевтам, існує багато стандартних способів та пристроїв для введення точно виміряних доз препаратів внутрішньобронхіального призначення і для регулювання потрібної величини дози відповідно до ваги тіла хворого та тяжкості стану його здоров'я. Крім того, існує багато визнаних у галузі рідких, порошкоподібних та аерозольних носіїв, придатних для внутрішньобронхіальних композицій з вмістом ГНММ цього винаходу, а також багато фармацевтично прийнятних носіїв для введення оральним та парентеральним шляхом, що їх застосовують для композицій з вмістом ГНММ, призначених для введення оральним та парентеральним шляхом. Винахід не обмежується будь-якими конкретними інертними носіями, розчинниками, наповнювачами або лікарськими формами і будь-якими способами або пристроями для внутрішньобронхіального введення.

Фармацевтичні композиції також можуть бути лікарськими формами, що містять ефективні ГНММ як активні компоненти у будь-яких фармацевтично прийнятних дозованих носіях для введення оральним шляхом, шляхом ін'єкції або внутрішньовенним шляхом, або у носіях для поверхневого або внутрішньоочного введення. Кожна лікарська форма включає близько 0,005-1,0мг/кг середньої ваги пацієнта ефективних ГНММ (одного ГНММ або комбінації ГНММ) та фармацевтично прийнятні інертні компонентні, наприклад, стандартні наповнювачі, носії, зв'язувальні агенти, розщеплювачі, розчинники, розчинники, підсолоджувачі, забарвлювачі та будь-які інші неактивні компоненти, що їх зазвичай включають у фармацевтичні лікарські форми для введення оральним шляхом. До придатних лікарських форм, призначених для введення оральним шляхом, належать таблетки, капсули, капсулоподібні таблетки, желатинові капсули, пілюлі, рідкі розчини, суспензії або еліксири, порошки, коржики, тонкоподрібнені частинки та системи для осмотичного введення. Придатних для ін'єкцій та внутрішньовенного введення лікарські форми включають ізотонічні сольові розчини або розчини декстрази, що містять відповідні буфери та консерванти. Багато придатних лікарських форм та носіїв, а також цілий ряд призначених для них неактивних компонентів є добре відомими у галузі, і їх наведено у Стандартних публікаціях, таких як [Remington's Pharmaceutical Sciences, 17-е видання (1985)].

Описані у цьому тексті композиції з вмістом ГНММ забезпечують високоефективне лікування викликаного антигеном астми на ранній та пізній стадіях її розвитку навіть після контрольного провокувального введення антигену, а також лікування інших хворобливих станів, що відзначаються заданими алергічними реакціями.

Для наочного підтвердження несподіваних переваг ефективних ГНММ (порівняно до гепаринів з високою молекулярною масою) щодо лікування астматиків з подвійною реакцією проводили експерименти, які надали змогу порівняти вплив різних типів гепаринів на овець з подвійною алергічною реакцією, як до, так і після контрольного провокувального введення антигену. Докладні описи цих експериментів і одержані результати наведено у прикладах нижче за текстом, а також за допомогою показаних на рисунках графіків.

Наведені нижче приклади, незважаючи на те, що вони ілюструють способи та композиції цього винаходу і підтверджують їх ефективність, не призначені для окреслення конкретних композицій, речовин, процедур або схем приймання лікувальних засобів, що їх мають використовувати виключно з метою практичної реалізації цього винаходу.

Приклад 1

Введення ГНМ шляхом інгаляції вівцям з подвійною алергічною реакцією

Способи

Опірність легенів до потоку повітря:

У всіх дослідах використовували овець з попередньо задокументованою подвійною реакцією у формі бронхостенозу на антиген *Ascaris suum*. Овець інтубували за допомогою спеціально приготованої назотрахеальної трубки, і опірність легенів до потоку повітря (R_L) вимірювали за допомогою спеціальної технології з використанням стравохідного балонного катетера, а об'єм торакального повітря вимірювали за допомогою плетизмографії для реєстрації об'єму цілого тіла. Дані виражали у вигляді специфічної R_L (СОЛ, визначену як R_L -разовий об'єм торакального повітря (V_{tg})).

Чутливість дихальних шляхів:

Для оцінки чутливості дихальних шляхів будували сумарні криві залежності "доза-відповідь" у разі інгаляції кабахолу, вимірюючи для цього СОЛ до і після інгаляції забуференого сольового розчину і після кожного введення 10 вдихів карбахолу у підвищених концентраціях (0,25, 0,5, 1,0, 2,0 та 4,0%-ий (вага/об'єм) розчин). Чутливість дихальних шляхів вимірювали за допомогою визначення сумарної провокувальної дози (ПД₄₀₀) карбахолу (в одиницях дихання), що підвищувала СОЛ до 400% від базового значення. Одну одиницю дихання визначали як один вдих 1%-го розчину карбахолу.

Фракції гепарину:

У описаних тут дослідженнях різні типи гепарину вводили вівцям з подвійною алергічною реакцією до та/або після контрольного провокувального введення антигену. Деякі з цих гепаринів являли собою фракції ГНМ з середньою молекулярною масою від 1000 до 3000 дальтон, деякі мали більш високу середню молекулярну масу, а один мав меншу молекулярну масу. Досліджені фракції гепарину наведено нижче у Таблиці.

Таблиця

Фракції гепарину та їхні молекулярні маси

Фракція	Сер. мол. маса	Клас
Використовуваний у фармацевтиці	15000д	Гепарин
Fragmin™	5030д	Низька мол. маса
CY-216	4270д	Низька мол. маса
CY-222 ¹ (Sanofi)	2355д	ГНММ
FRU-70 ² (Kabivitrum)	2500д	ГНММ
Суміш гексасахаридів ³	1930д	ГНММ
Октасахарид ⁴	2480д	ГНММ
Очищений гексасахарид ⁵	1998д	ГНММ
Очищений тетрасахарид ⁶	1290д	ГНММ
Дисахарид ⁷	660д	Суб-ГНММ

¹ Антикоагулянтна суміш октасахаридів.

² Неантикоагулянтна суміш октасахаридів.

³ Олігосахарид, одержаний з використовуваного у фармацевтиці свинячого гепарину, що містить головним чином фракції тетрасахариду, гексасахариду, октасахариду та декасахариду.

⁴ Одержаний з суміші гексасахариду за допомогою колонкової хроматографії на силікагелі, містить приблизно 70% фракцій октасахариду та 30% фракцій декасахарид.

⁵ Одержаний з суміші гексасахариду за допомогою колонкової хроматографії на силікагелі.

⁶ Одержаний з суміші гексасахариду за допомогою колонкової хроматографії на силікагелі

⁷ Дисахарид був трисупфатований, але його молекулярна маса була настільки низькою, що він не міг вважатися фракцією ГНММ з притаманними гепарину властивостями.

Протокол проведення експерименту

Дослідження дихальних шляхів

Визначали базову чутливість дихальних шляхів кожної тварини (ПД₄₀₀), після чого у різні дні проведення експерименту піддавали контрольному введенню у дихальні шляхи антигену *Ascaris suum*. СОЛ виміряли до і одразу після контрольного введення, після чого щогодини впродовж 8год. Постконтрольну величину ПД₄₀₀ виміряли через 24год. після контрольного провокувального введення антигену при з'явленні НЧДШ. Протокол повторювали принаймні через 14 днів, але кожній тварині вводили дозу однієї з тестованих фракцій гепарину або приблизно за 30 хвилин до контрольного провокувального введення антигену, або одразу після вимірювання постконтрольного СОЛ.

Аналіз даних

Дані виражали як:

(а) СОЛ (% зміни) = $\frac{\text{постконтрольна СОЛ} - \text{базова СОЛ}}{\text{базова СОЛ}} \times 100$

(б) ПД₄₀₀ (в одиницях дихання)

Результати

На Фіг.1 показано диференціальні реакції на контрольне введення антигену у двох групах овець з проявами алергічних реакцій, одна з яких складається з хворих з гострою реакцією, а інша - з хворих з

подвійною реакцією. СОЛ у хворих з гострою реакцією поверталася майже до базових рівнів приблизно через три години після введення антигену і залишалася такою. У хворих з подвійною реакцією, однак, спостерігається пік пізньої фази у значенні СОЛ приблизно на шосту годину, причому рівні залишаються значно вищими від базового значення на кінцевий момент (вісім годин) дослідження. Саме цей другий пік пізньої фази характеризує хворих з подвійною реакцією. На Фіг.2А та 2Б зображено вплив передконтрольного лікування шляхом інгаляції використовуваного у фармацевтиці гепарину на СОЛ у хворих з гострою реакцією (Фіг.2А) та у хворих з подвійною реакцією (Фіг.2Б). У той час як СОЛ у хворих з гострою реакцією залишалася на приблизно базових рівнях навіть після контрольного провокувального введення антигену, СОЛ як на ранній, так і на пізній стадіях у хворих з подвійною реакцією не послаблювалася від попереднього лікування гепарином, навіть у хворих з подвійною реакцією, яким вводили цілих 2000 одиниць на 1 кілограм ваги.

На Фіг.3-6 показано брак ефективності фракцій гепарину з низькою молекулярною масою, препарату Fragmin та CY-216 з погляду на пом'якшення або бронхостеноз, або НЧДШ у хворих з подвійною реакцією у разі їх введення перед контрольним введенням антигену.

На Фіг.7-10 показано, що як попереднє лікування, так і лікування шляхом інгаляції ГНММ CY-222 після контрольного провокувального введення антигену (сер. мол. маса. 2355д, у межах діапазону ефективних ГНММ згідно з цим винаходом) виявилися ефективними з погляду на значне пом'якшення викликаного антигеном бронхостенозу (як на ранній, так і на пізній стадіях його розвитку) та НЧДШ у хворих з подвійною реакцією.

На Фіг.11-14 показано ефективність як попереднього лікування, так і лікування з використанням ГНММ FRU-70 після контрольного провокувального введення антигену (сер. мол. маса. 2500д) у разі лікування астми на ранній та пізній стадії її розвитку.

На Фіг.15-22 відображено ефективність різних ефективних фракцій ГНММ, навіть коли їх вводять після контрольного провокувального введення антигену, з погляду на значне послаблення бронхостенозу та НЧДШ у хворих з подвійною реакцією.

На Фіг.23 показано, що фракція дисахариду з середньою молекулярною масою лише близько 660д (значно нижчою від порядку мас, необхідних для ефективних фракцій ГНММ) виявилася неефективною з погляду на послаблення викликаного антигеном бронхостенозу у овець з подвійною алергічною реакцією.

У експериментах, дані яких відображено на Фіг.7-14 та 17-22, дозування ефективних ГНММ, введених вівцям з алергічною реакцією, відповідало найнижчій ефективній дозі (визначеній шляхом пробного дослідження доз) для кожної фракції ГНММ. Виявлено, що різні ГНММ мали різні рівні мінімальної ефективної дози під час лікування хворих з подвійною реакцією. Мінімальна ефективна доза становила близько 1,0мг/кг для CY-222 та для FRU-70, введених перед контрольним введенням антигену, проте близько 0,5мг/кг для FRU-70, введеного після контрольного провокувального введення антигену, а також для введеної шляхом інгаляції суміші гексасахаридів. Очищений тетрасахарид з найнижчою середньою молекулярною масою будь-яких ефективних досліджених ГНММ, мав мінімальну ефективну дозу під час його введення (після введення антигену) 0,062мг/кг, як і очищений гексасахарид. Ці дані дозволяють зробити припущення, що очищені фракції з середньою молекулярною масою приблизно з нижнім граничним значенням 1000д є найбільш ефективними ГНММ, принаймні у разі лікування хворих з подвійною реакцією. Очевидно, що оптимальним структурним доменом та/або послідовністю щодо дослідженої протиалергічної та/або протизапальної активності є тетрасахарид.

Приклад 2

Введення ГНММ оральним шляхом вівцям з подвійною алергічною реакцією

Процедуру Прикладу 1, з погляду на тестованих тварин та способів оцінки, продовжували у цьому експерименті.

Одній вівці з подвійною алергічною реакцією оральним шляхом вводили 2мг/кг очищеного гексасахариду (сер. мол. маса 1998 дальтон) за 90 хвилин до контрольного провокувального введення антигену *Ascaris Suum*. Вплив попереднього лікування гексасахаридом на СОЛ стосовно базового рівня (час введення гексасахариду) протягом 8год. після контрольного провокувального введення антигену відображено на Фіг.24. На Фіг.24 з метою порівняння також показано (у відсотках) зміни у СОЛ у тієї ж самої вівці з подвійною реакцією (у експерименті, проведеному кількома днями раніше), яку піддавали контрольному введенню антигену, але без попереднього лікування ГНММ.

На Фіг.25 показано відносні значення ПД₄₀₀, виміряні на базовому рівні та після введення антигену при введенні контрольного провокувального введення антигену з попереднім лікуванням гексасахаридом і без попереднього лікування (контрольне).

Приклад 3

Внутрішньовенне введення ГНММ вівцям з подвійною алергічною реакцією

Процедуру Прикладу 2 продовжували на іншій вівці з подвійною алергічною реакцією, за винятком того, що 0,25мг/кг очищеного гексасахариду вводили внутрішньовенно за одну годину до контрольного провокувального введення антигену в одному експерименті, у той час як антиген вводили без попереднього лікування у другому (контрольному) експерименті. Зміну у СОЛ (у відсотках) для попереднього лікування та контрольних експериментів показано на Фіг.26, а значення ПД₄₀₀ для цих експериментів на базовому рівні та після введення антигену показано на Фіг.27.

Приклад 4

Запобігання викликаному антигеном еозинофільному притоку у мишей

У чотирьох групах лабораторних мишей з підвищеною чутливістю (n=3 у кожній групі) робили бронхоальвеолярний лаваж через 24год. після контрольного провокувального введення антигену з метою визначення значень еозинофільного притоку у кожній групі. Мишам вводили або сольовий розчин у вигляді аерозолі (плацебо), або очищений гексасахарид, що його вводили відповідно через наведені нижче шляхи та у наведених нижче дозах: інгаляція аерозолем,⁸ (8 Мишей (n=3) поміщали камеру, що містила 10мг гексасахариду у 9мл бактеріостатичної води для ін'єкцій, яку перетворювали на аерозоль. Мишам вводили аерозоль шляхом інгаляції впродовж 30 хвилин) оральне введення (100мкг) та внутрішньочеревне введення (40мкг).

Інгібування (у відсотках) еозинофільного притоку, що виникає у тварин кожної групи, визначали шляхом зіставлення рівня такого потоку, вимірюваного у бронхоальвеолярній промивній рідині після введення гексасахариду, з рівнем, що спостерігався в групі тварин, яким вводили сольовий розчин.

Середні значення інгібування (у відсотках) для трьох підданих лікуванню груп мишей відображено на фіг.28. У мишей, які одержували гексасахарид шляхом інгаляції та оральним шляхом, спостерігали 40-50%-е послаблення еозинофільного потоку, у той час як у мишей, які одержували гексасахарид внутрішньочеревним шляхом, спостерігали приблизно 20%-е послаблення цього потоку.

Різний вплив використовуваного у фармацевтиці гепарину, який спостерігали у хворих з гострою і подвійною реакцією (показано на Фіг.2А та 2Б) вказував на залучення різних сигнальних шляхів під час анафілаксії дихальних шляхів. Стосовно цього можна зробити припущення, що під час відбування імунологічно опосередкованої реакції тучних клітин у дихальних шляхах, IP_3 є найактивнішим шляхом у хворих з гострою реакцією, у той час як не пов'язані з IP_3 шляхи (наприклад, шляхи, пов'язані з діацилгліцеролом/протеїнкіназою C, або інші шляхи) є активними у хворих з подвійною реакцією.

Реакція на пізній стадії розвитку астми та НЧДШ пов'язані з явним запаленням дихальних шляхів. Дослідження патології слизової дихальних шляхів та бронхоальвеолярного лаважу (БАЛ) свідчать про потік еозинофілів, нейтрофілів та активованих Т-лімфоцитів під час перебігу цієї стадії. Збільшення рівнів створюваних через наявність еозинофілів медіаторів запального процесу у плазмі та БАЛ, включаючи еозинофільний катіонний білок та головний основний білок, спостерігали під час перебігу реакції пізньої стадії. Надрегулювання цитокінів типу TH_2 (IL_4 та IL_5) після контрольного провокувального введення антигену також спостерігали під час пізньої стадії. Таким чином, запальна реакція клітин, у комбінації з вивільнюванням медіаторів запального процесу (таких як лейкотриєни, PAF, еозинофільні білки тощо) і локальним утворенням цитокінів у слизовій бронхів, відіграють вирішальну роль у алергенному запаленні та у звуженні бронхів на пізній стадії їх розвитку.

НЧДШ та, отже, запалення дихальних шляхів можна послабити або шляхом запобігання вивільнюванню медіаторів тучних клітин за допомогою протиалергенних агентів (наприклад, кромоліновий натрій), або шляхом використання дії протизапальних агентів, таких як глюкокортикостероїди. Протиалергенні агенти є лише ефективними як профілактичні засоби і можуть запобігати вивільнюванню медіаторів та НЧДШ. Оскільки ці агенти не відзначаються протизапальною активністю, вони є загалом неефективними у разі їх введення після контрольного впливу антигену. На відміну від них, протизапальні агенти послаблюють НЧДШ після введення антигену і запалення дихальних шляхів, або коли їх вводять до контрольного провокувального введення антигену, або коли їх вводять після нього. Одержані авторами дані дають підставу припустити, що дія ГНММ є аналогічною протизапальній дії глюкокортикостероїдів.

Оскільки ефективні ГНММ послаблюють НЧДШ навіть коли їх вводять після контрольного провокувального введення антигену, вони також повинні бути корисними у разі лікування не спричинених астмою хворобливих станів, пов'язаних з НЧДШ, наприклад, хронічного бронхіту, емфіземи та фіброзу сечового міхура.

Крім того, враховуючи відкриття авторів стосовно ефективності деяких ГНММ щодо інгібування астматичної РПС подібно протизапальному впливу кортикостероїдів, ефективні ГНММ повинні бути корисними у разі лікування наведених нижче хворобливих станів із застосуванням наведених нижче шляхів введення:

1. Реакції пізньої стадії та запальна реакція у позалегенових ділянках:
 - (а) алергічний риніт
 - (б) алергічний дерматит
 - (в) алергічний кон'юнктивіт
2. Позалегенові захворювання, в яких запальна реакція відіграє вирішальну роль:
 - (і) запалення кишечника
 - (ii) ревматоїдний артрит та інші колагенозні захворювання судинної системи
 - (iii) гломерулонефрит
 - (iv) запальні захворювання шкіри
 - (v) саркоїдоз
3. Шляхи введення
 - (і) внутрішньо бронхіальний
 - (ii) інтраназальний
 - (iii) внутрішньо очний
 - (iv) поверхневий
 - (v) оральний
 - (vi) парентеральний (внутрішньом'язовий або внутрішньовенний)

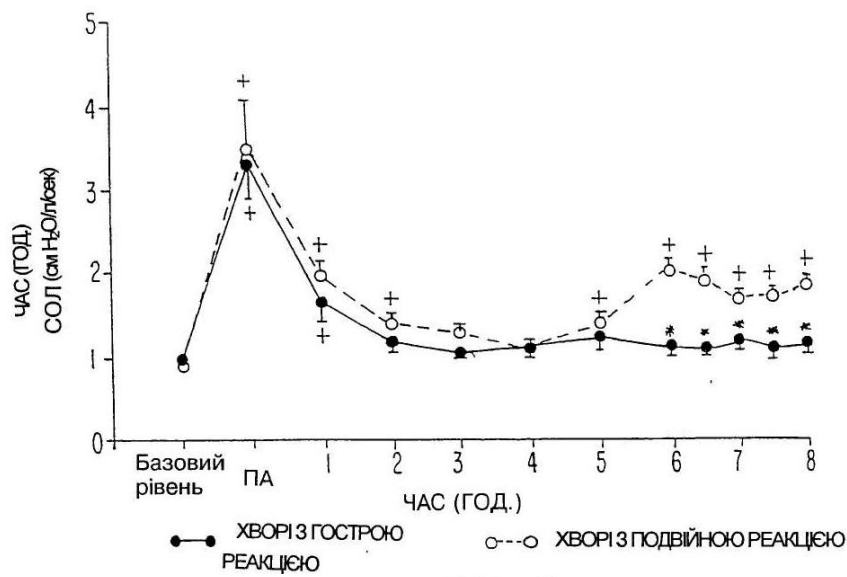
Слід зауважити, однак, що цей винахід жодний чином не обмежується будь-якими теоретичними або практичними фізіологічними або біохімічними механізмами або шляхами метаболізму чи сигнальної системи, але охоплює способи лікування хворобливих станів, які відзначаються задавненими алергічними реакціями, або лікування хворих ссавців з подвійною реакцією, а також композиції, призначені для використання у описаних вище способах, незалежно від залучених реальних механізмів дії.

Таким чином, показано, що авторами запропоновано способи та композиції, які дозволяють досягти розв'язання різних задач цього винаходу і які є добре пристосованими для виконання умов щодо практичного їх використання.

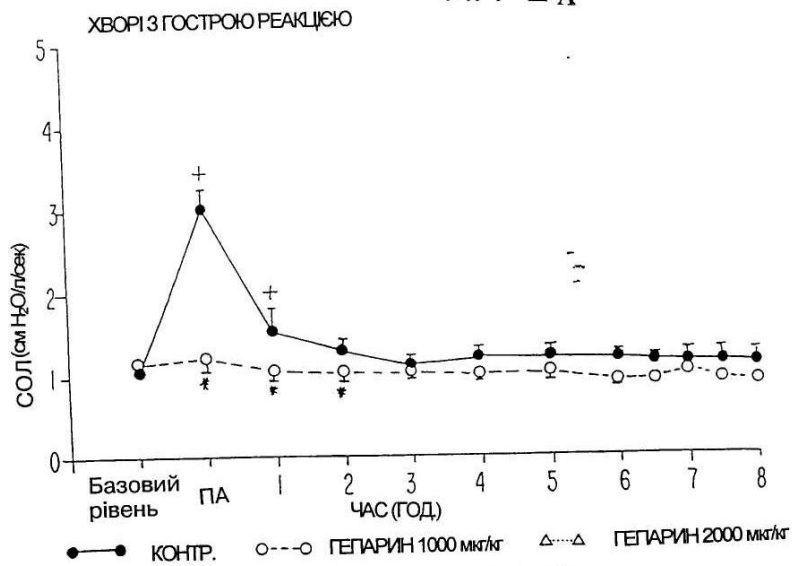
Оскільки можливі різні варіанти реалізації описаного вище винаходу і оскільки у згаданих варіантах реалізації можливі різні зміни, необхідно розуміти, що всі наведені у цьому описі матеріали слід сприймати як матеріали ілюстративного характеру, які не обмежують змісту цього винаходу.

Матеріали, які складають новизну і підлягають захисту патентною грамотою, наведено нижче за текстом у пунктах формули винаходу.

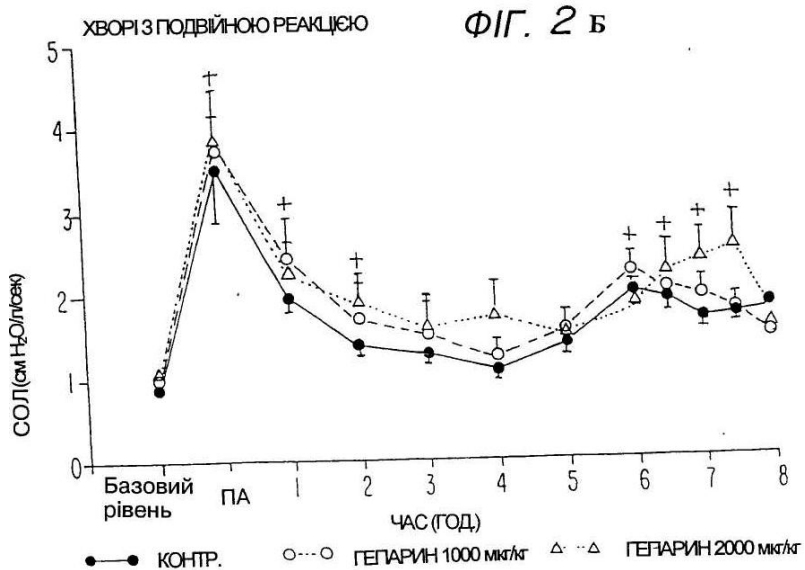
ФІГ. 1



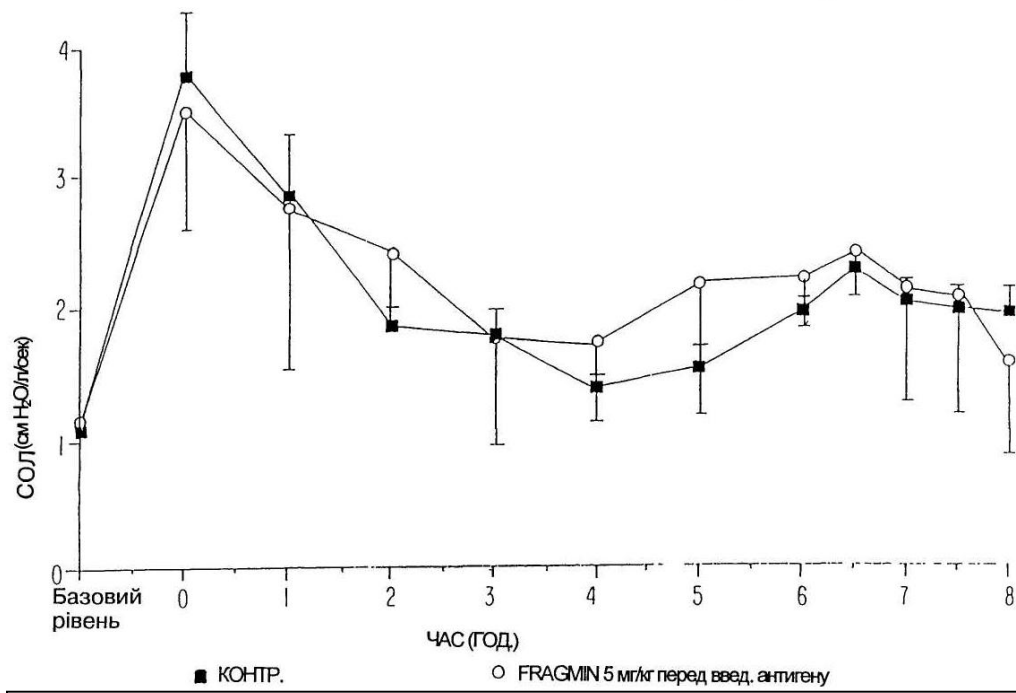
ФІГ. 2 А



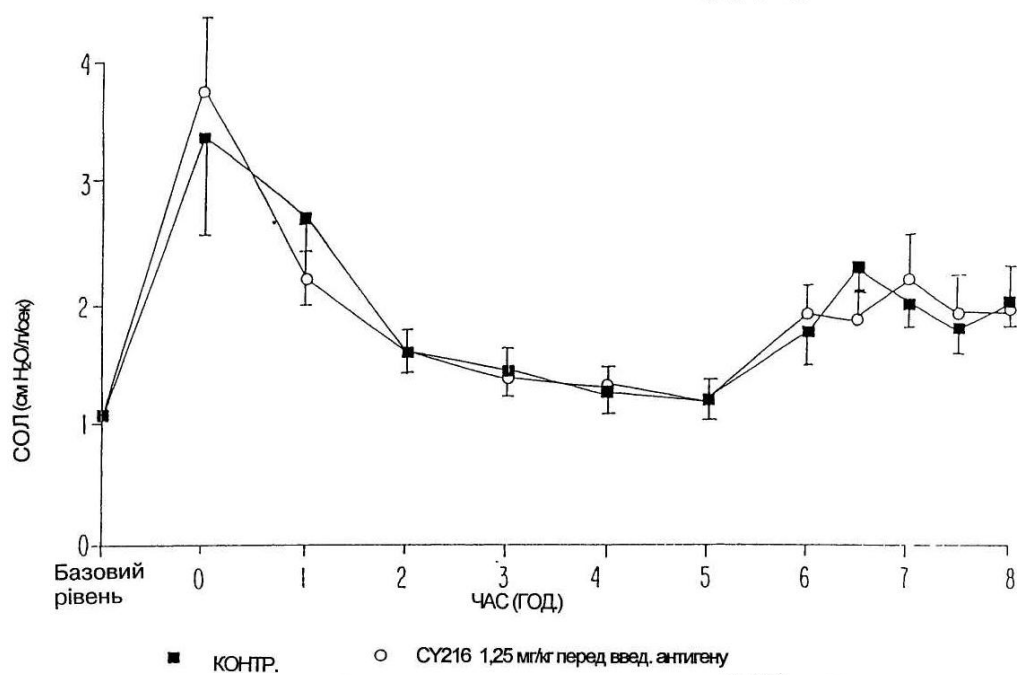
ФІГ. 2 Б



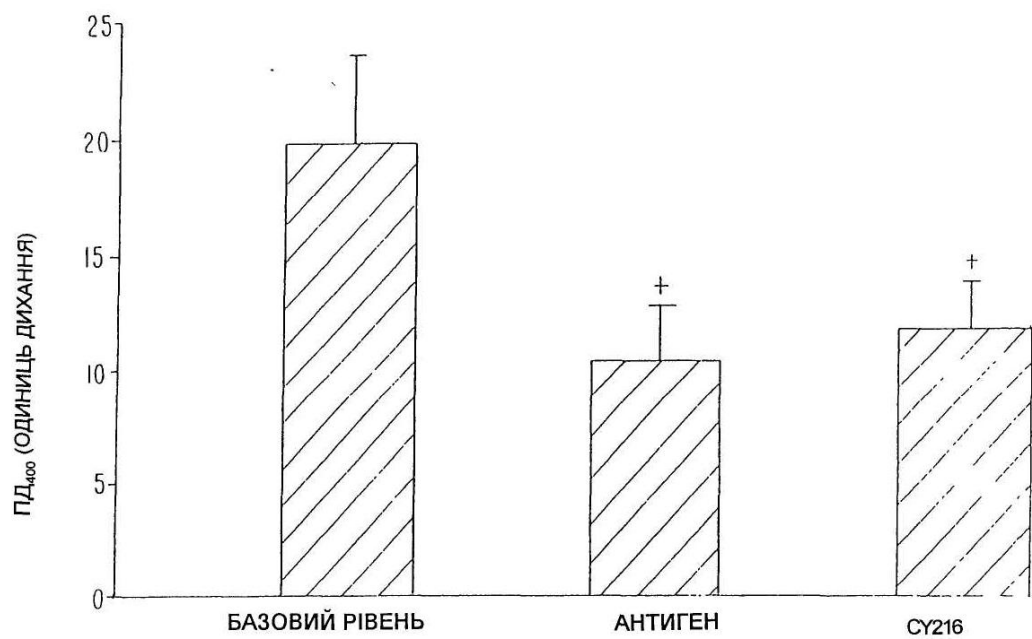
ФІГ. 3



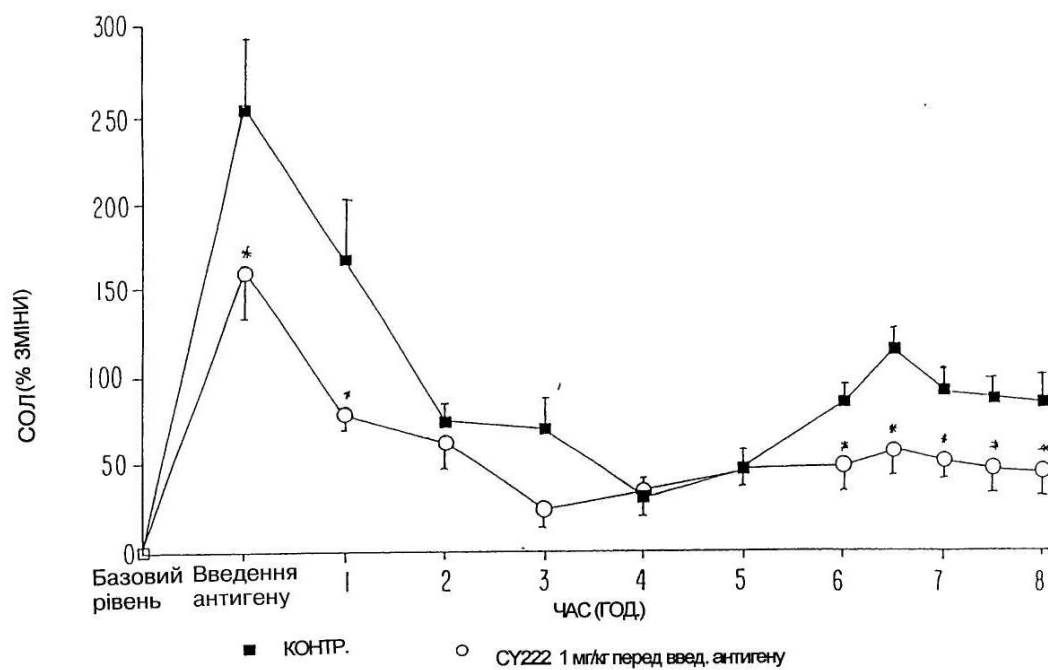
ФІГ. 5



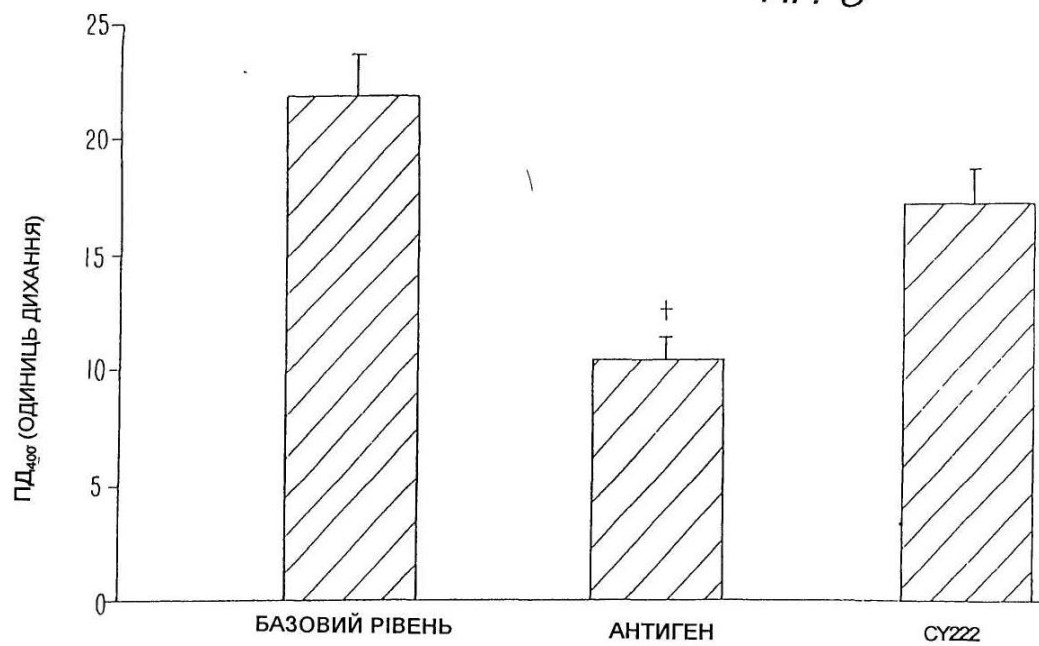
ФІГ. 6



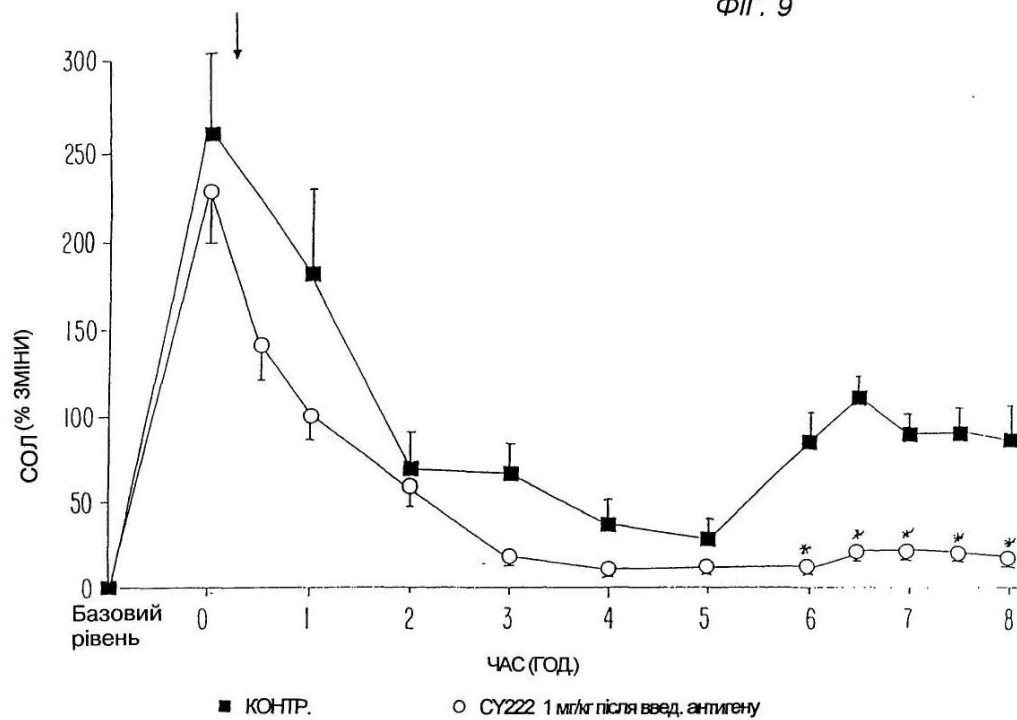
ФІГ. 7



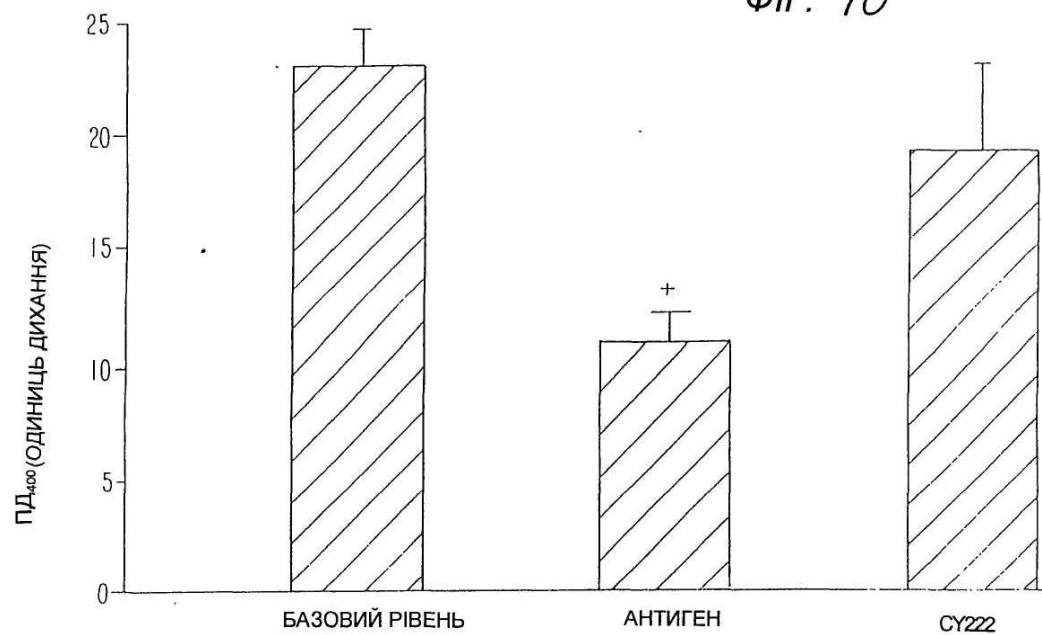
ФІГ. 8

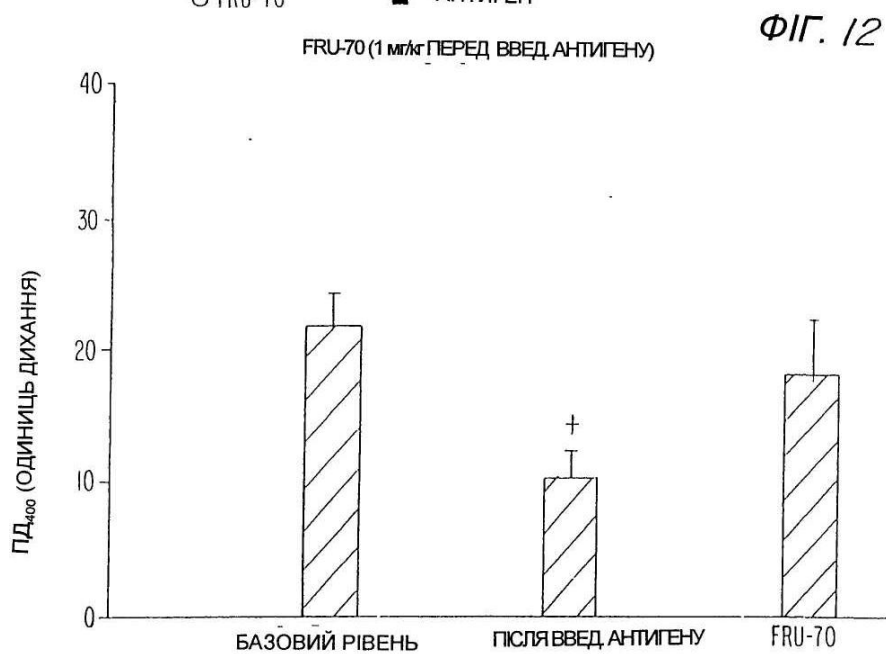
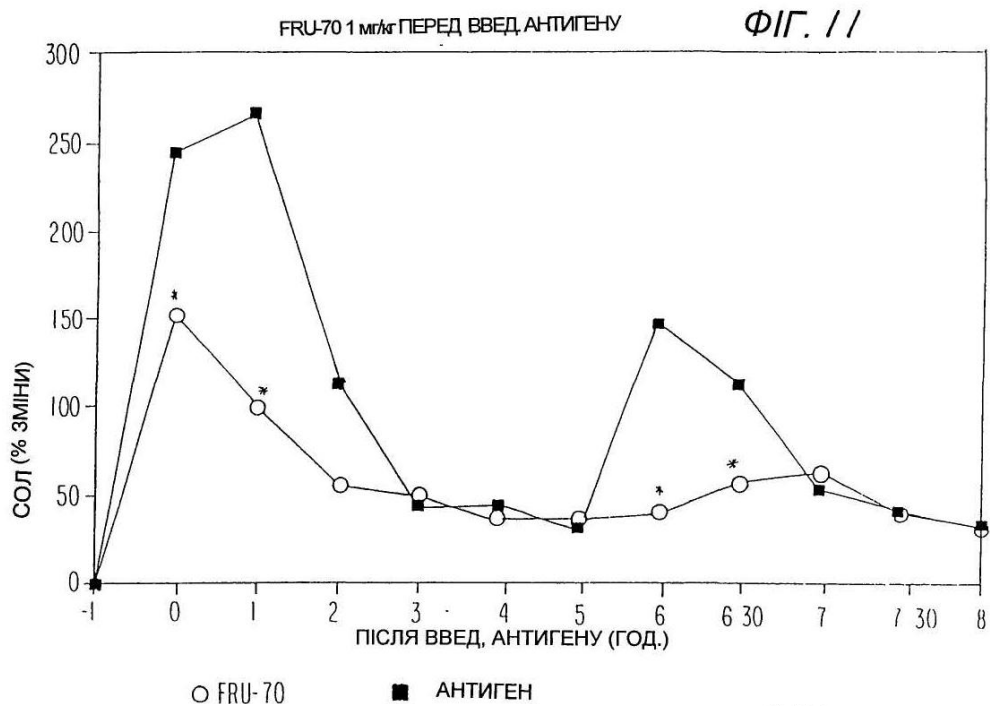


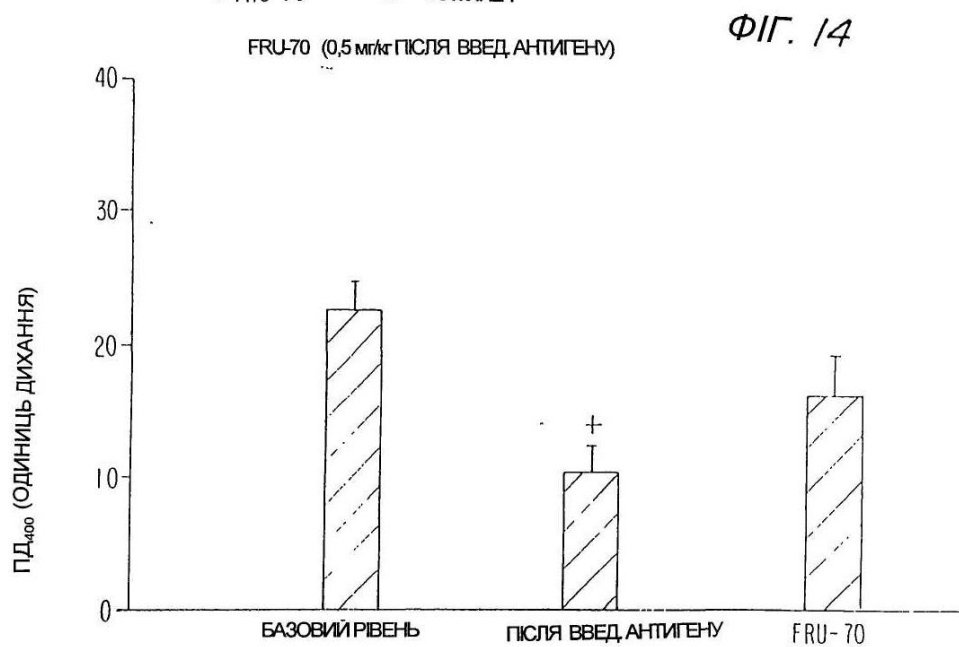
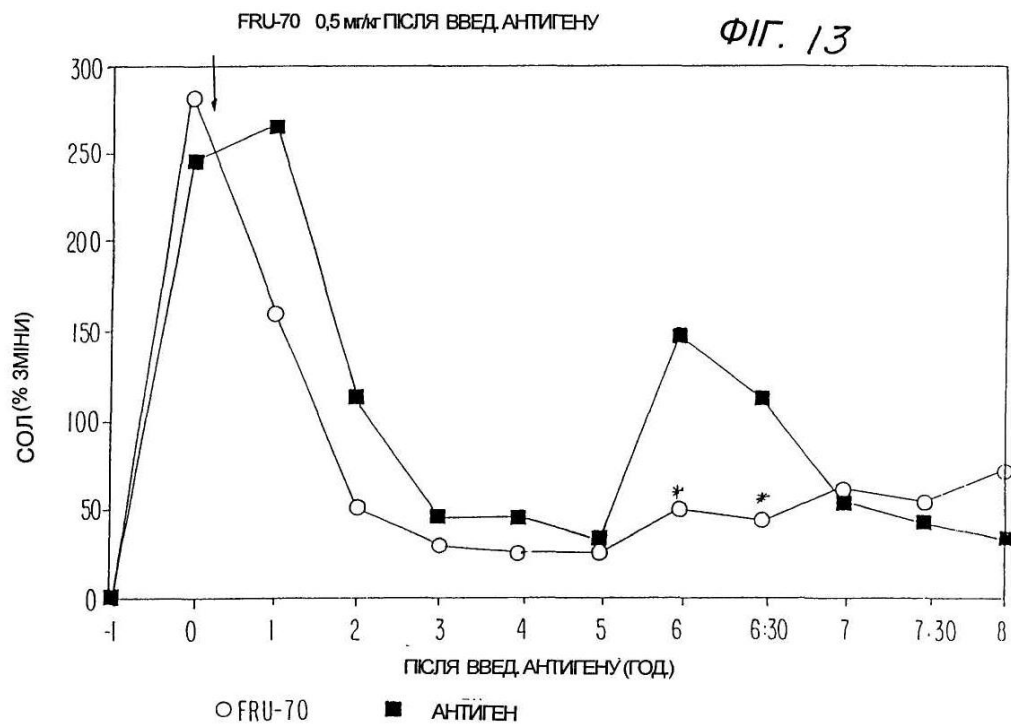
ФІГ. 9

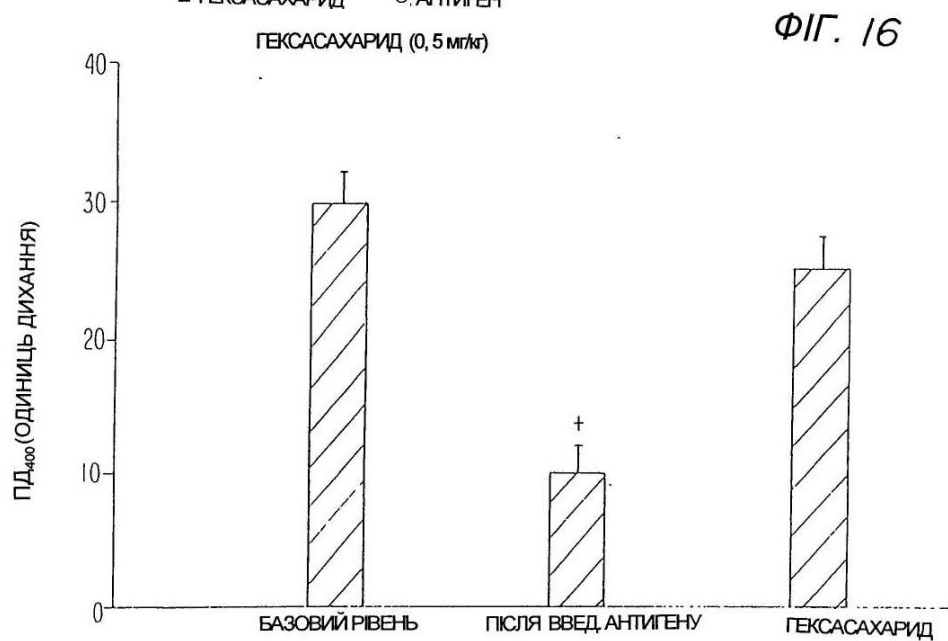
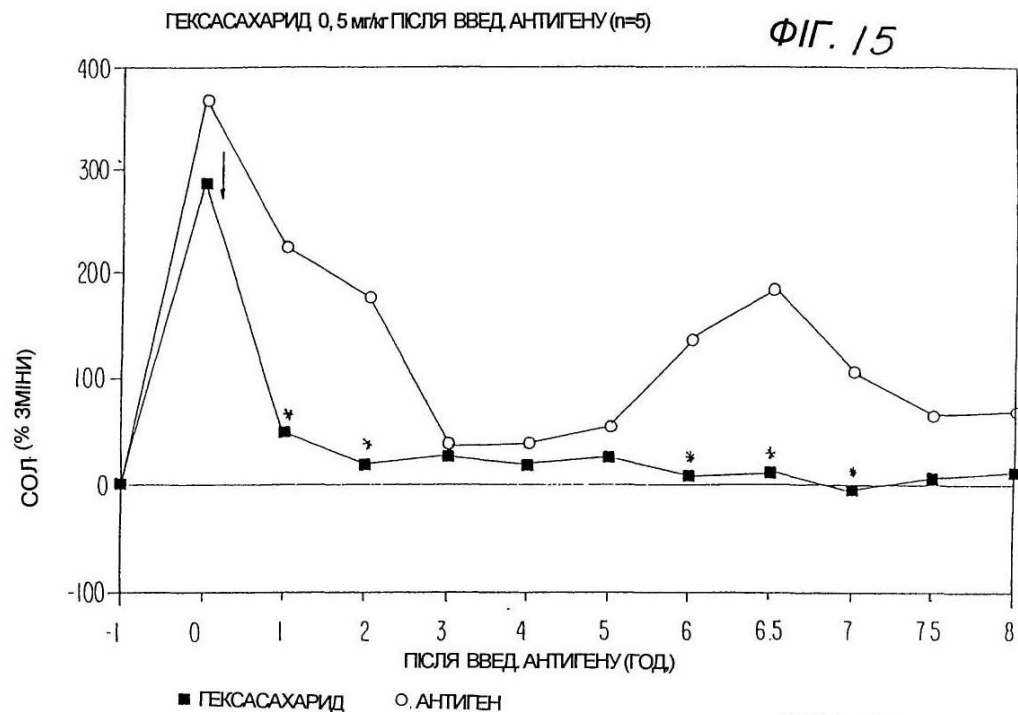


ФІГ. 10

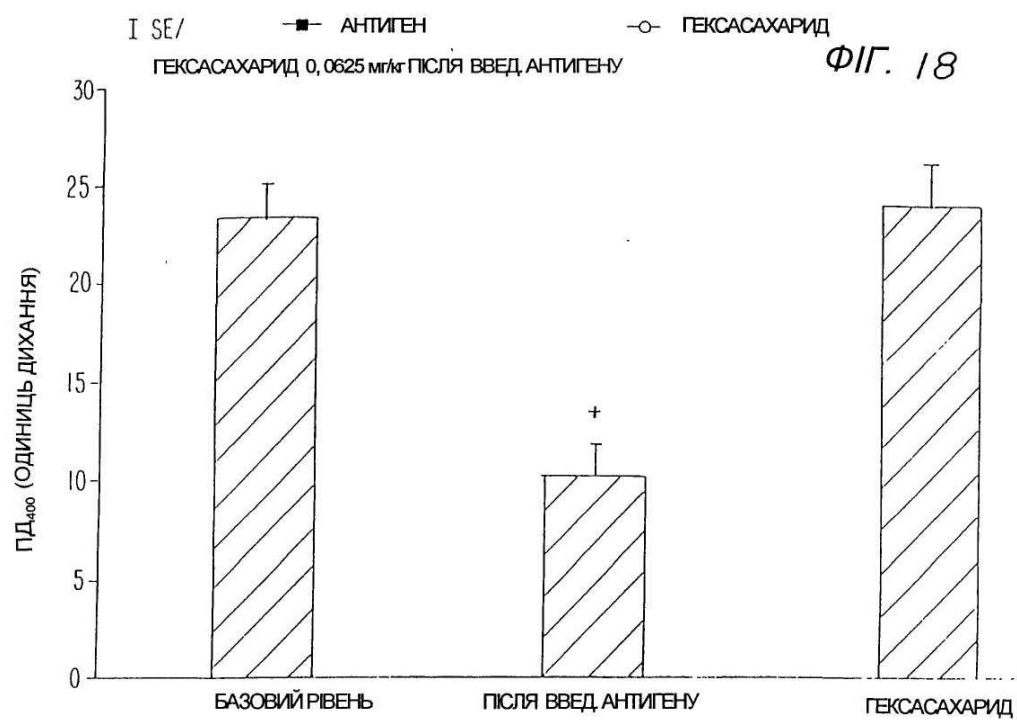
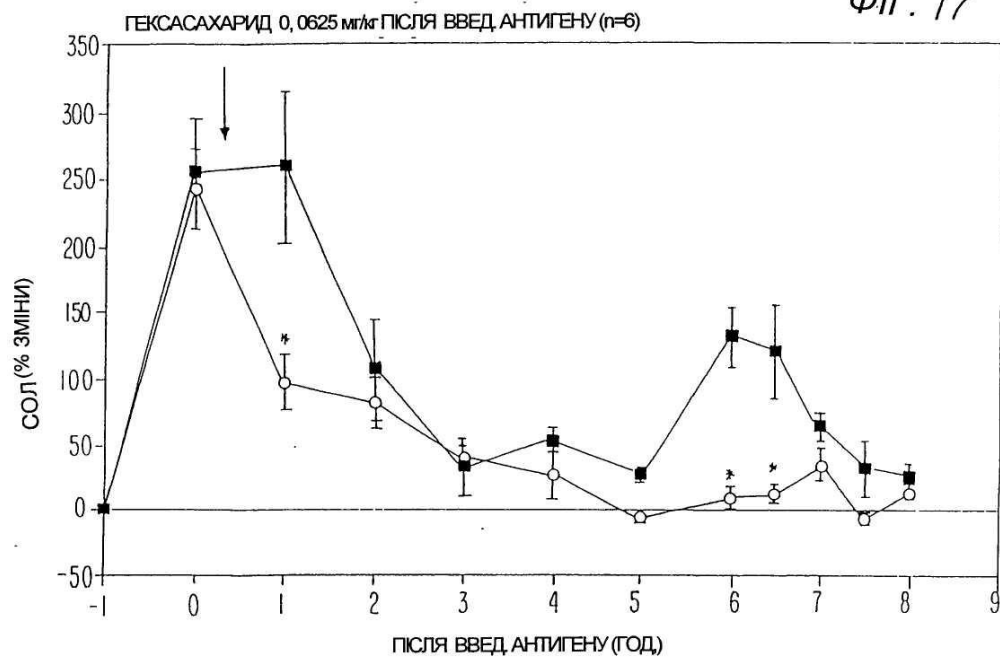




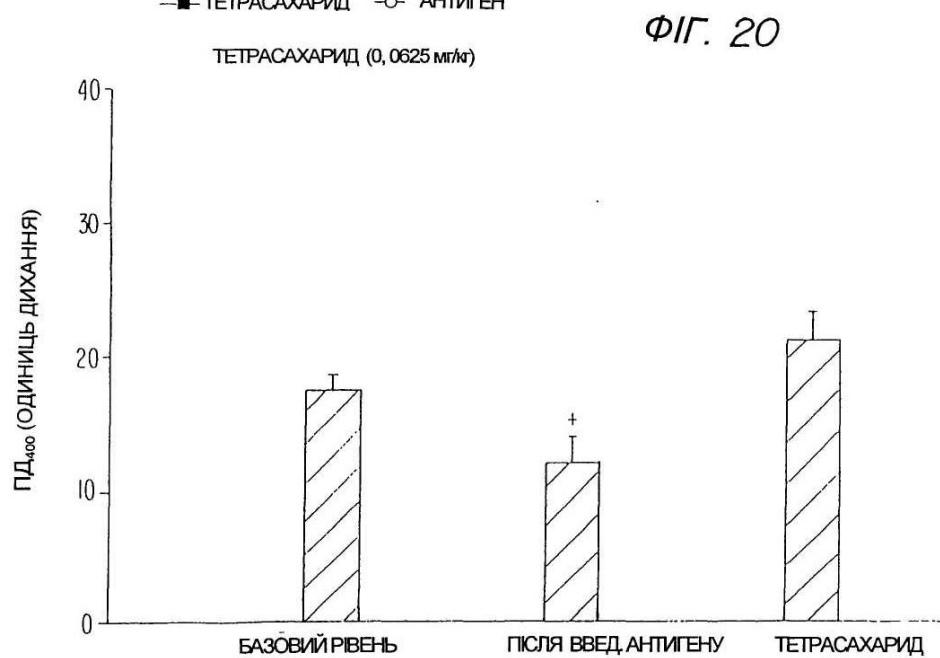
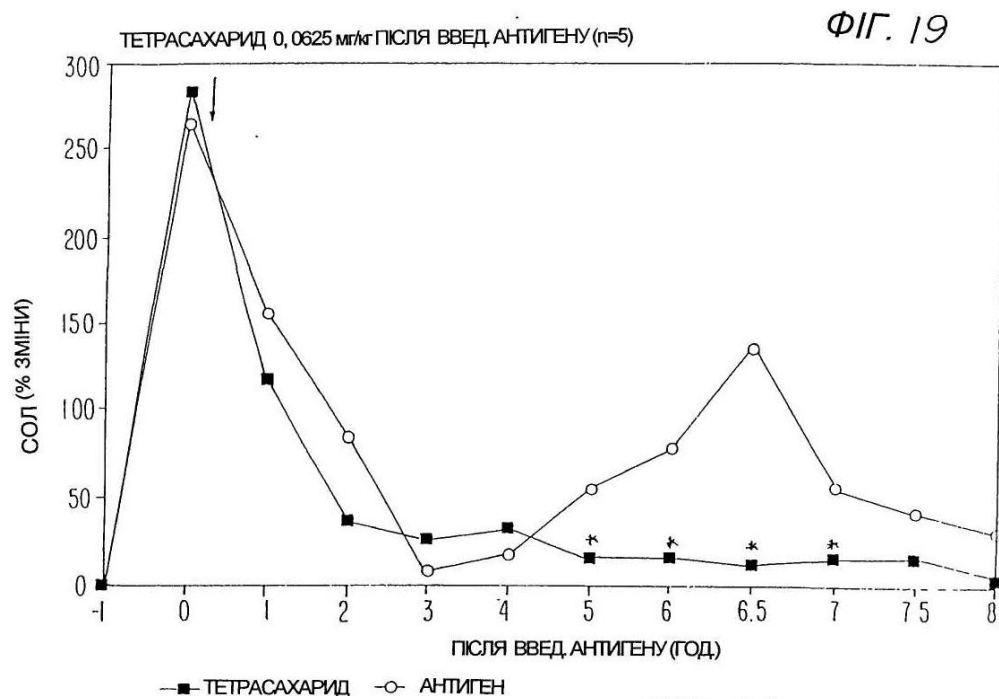




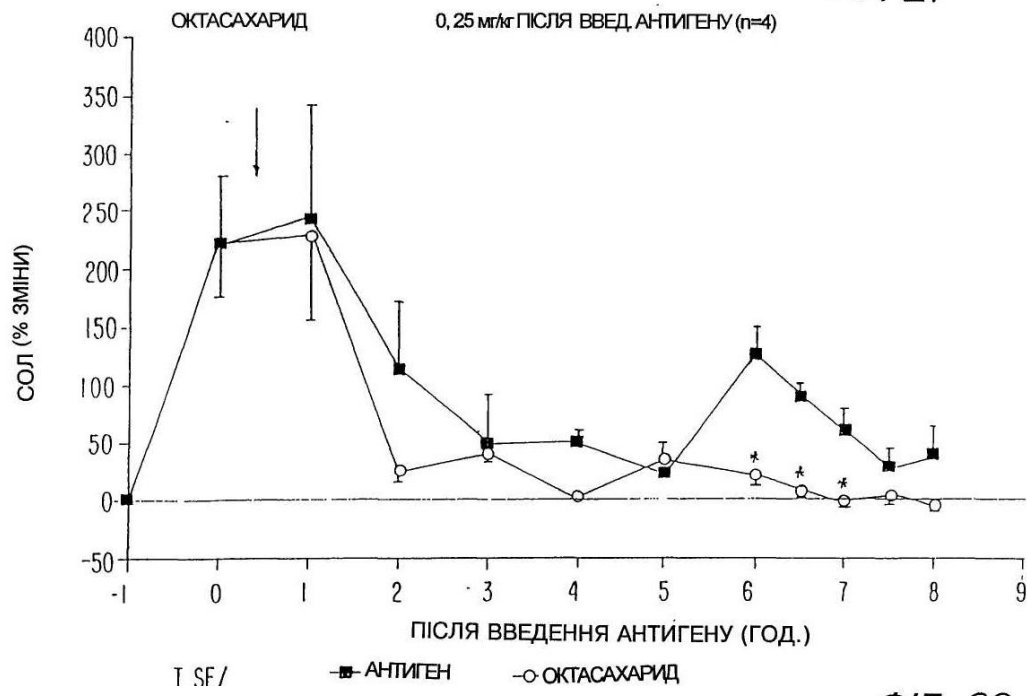
ФІГ. 17



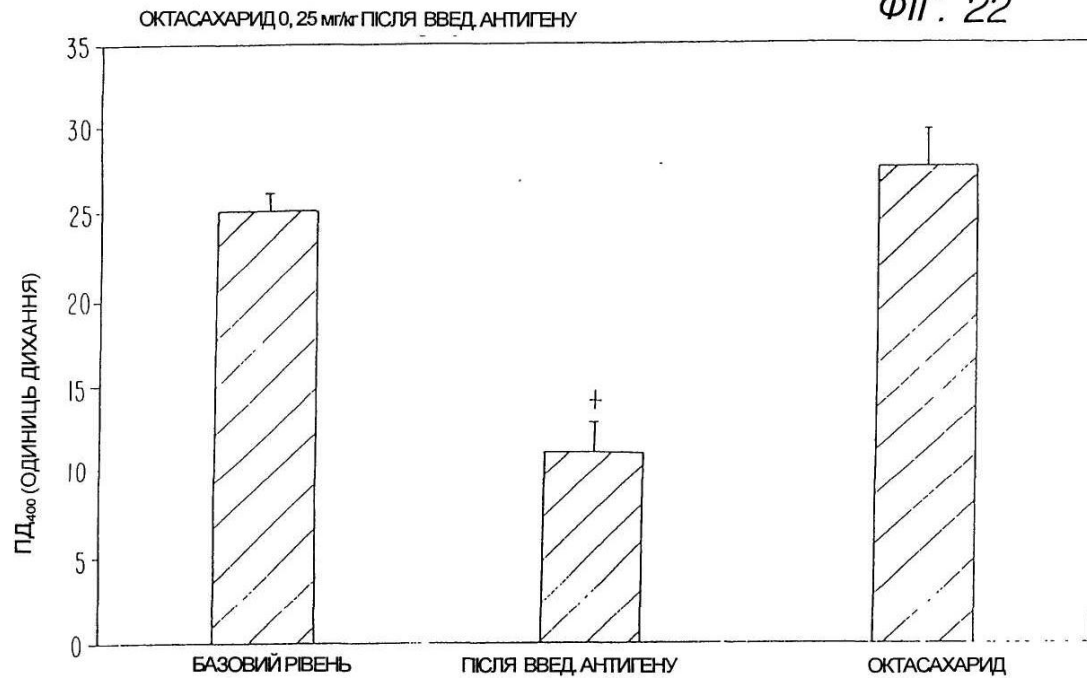
ФІГ. 18



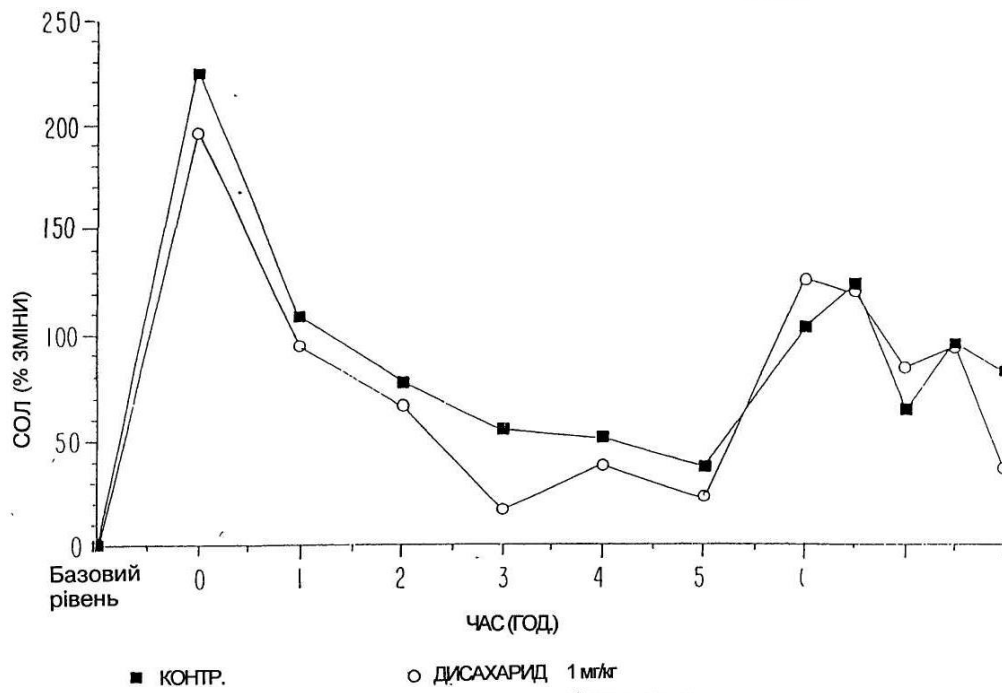
ФІГ. 21



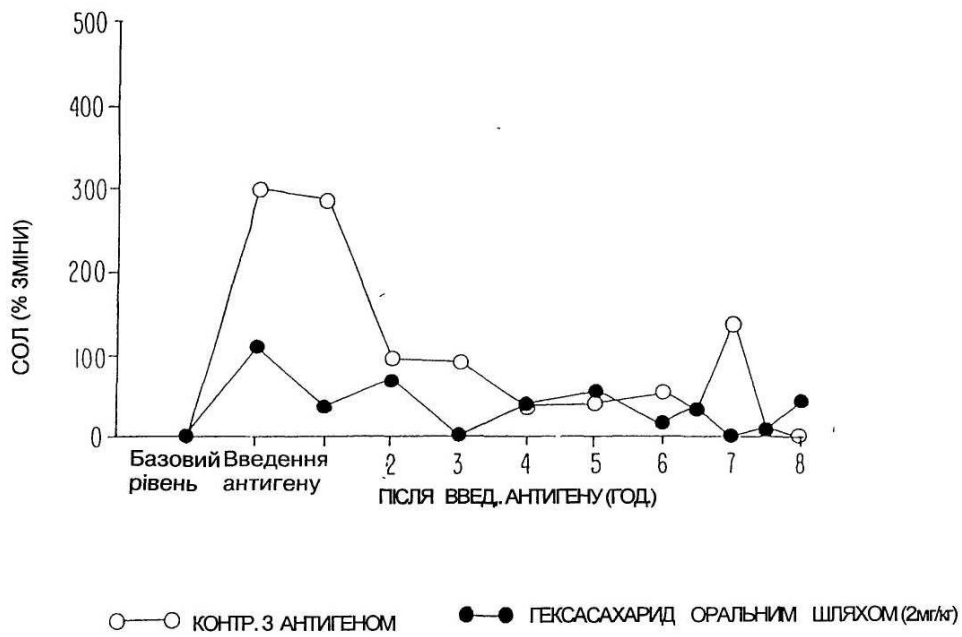
ФІГ. 22



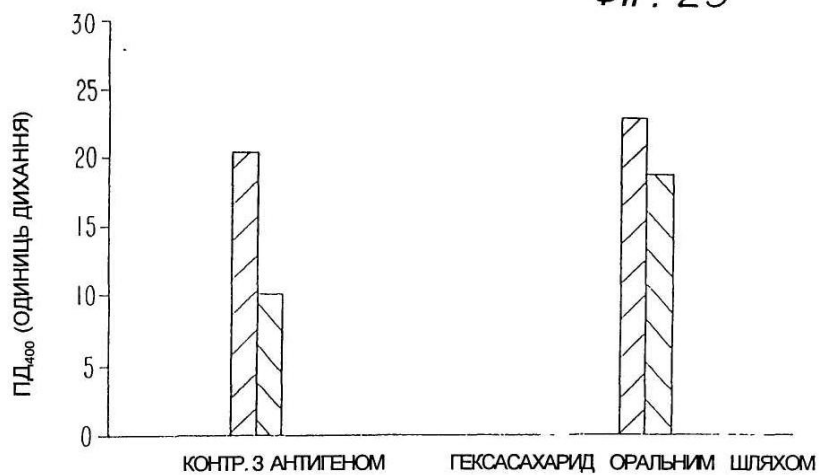
ФІГ. 23



ФІГ. 24

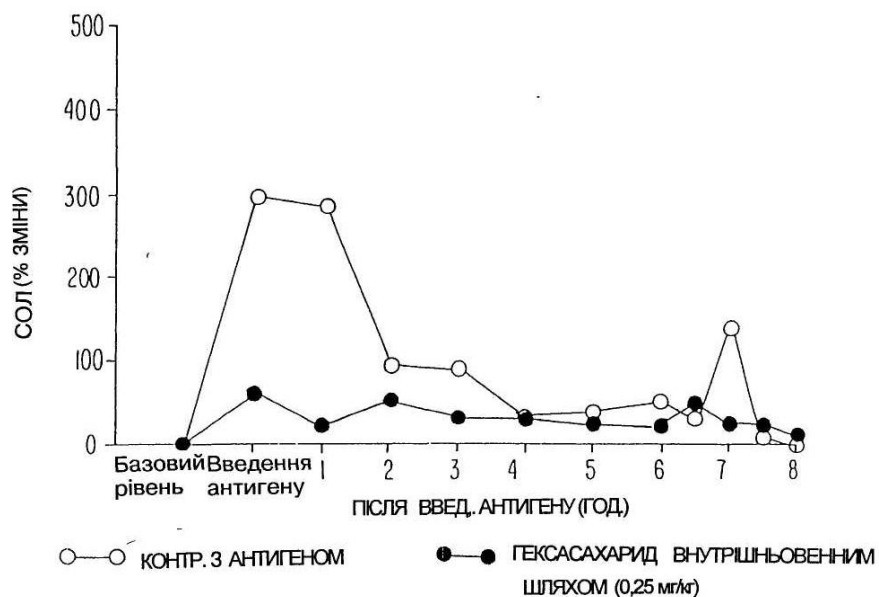


ФІГ. 25



БАЗОВИЙ РІВЕНЬ
 ПІСЛЯ ВВЕД. АНТИГЕНУ

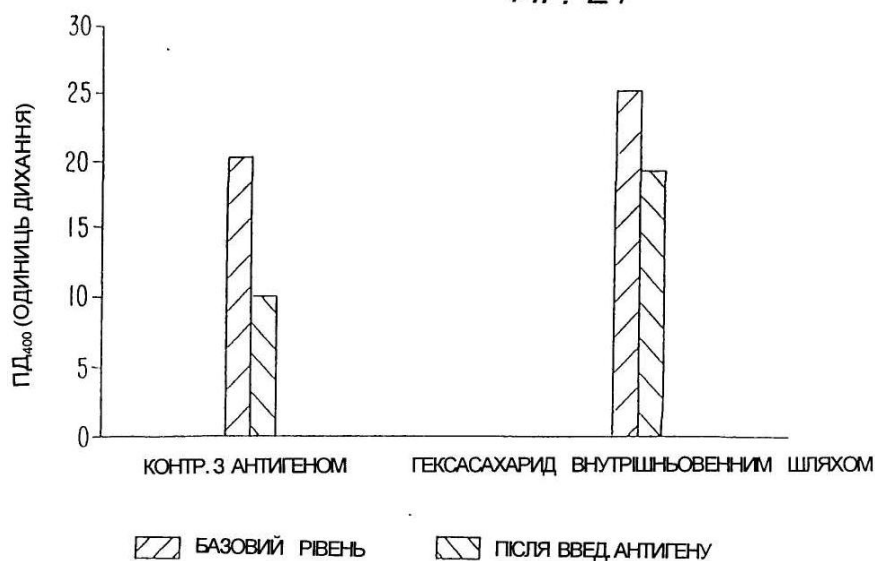
ФІГ. 26



○—○ КОНТР. з АНТИГЕНОМ

●—● ГЕКСАСАХАРИД ВНУТРІШНЬОВЕННИМ ШЛЯХОМ (0,25 мг/кг)

ФІГ. 27



БАЗОВИЙ РІВЕНЬ

ПІСЛЯ ВВЕД. АНТИГЕНУ

