

## 1. Галузь винаходу

Винахід стосується способів і фармацевтичних композицій, використаних для попередження токсичного впливу на нирки, що завдається введенням циклоспориноу або такролімусу.

## 2. Рівень техніки

Циклоспорино - це нейтральні, ліпофільні, циклічні ундекапептиди, що мають молекулярну масу приблизно 1200. Вони використовуються внутрішньовенно або орально як імунодепресанти для подовження виживаності алогенних трансплантатів, таких як трансплантати шкіри, кісткового мозку, серця, нирок, підшлункової залози та інших органів, а також при лікуванні аутоімунних хвороб.

Одною з головних побічних реакцій при терапії циклоспорином, з якими доводиться мати справу, є ниркові розлади та токсичність, що обмежує клінічне застосування циклоспорино. Незважаючи на подовження виживаності ниркових алотрансплантатів на один або два роки, середній період напіврозпаду, що становив вісім років для трупного ниркового трансплантата, який функціонує перший рік, трохи змінився протягом останнього часу завдяки використанню пригнічення імунної системи із застосуванням циклоспорино, і становить більш ніж 15 років. Побічний вплив циклоспорино, зокрема найбільш широквикористовуваного циклоспорино - циклоспорино А (СуА), на структуру нирки та її функціонування протягом тривалого часу не був виключений як важливий фактор при синдромі хронічного відторгнення алотрансплантата. Див. Bennett et al., *Kidney Intl.*, 50:1089-1100 (1996).

Було встановлено, що СуА викликає дозозалежне зменшення функціонування нирок у експериментальних тварин і людини, та вважається, що це відбувається за рахунок впливу ліків, результатом чого є звуження артерій, і, зрештою, зменшена швидкість фільтрації в ниркових клубочках. Проте цей сильний вплив на гемодинаміку, що має чітко контролюватися шляхом точного моніторингу і встановленням доз пацієнтам, не є, очевидно, лише побічним наслідком уведення СуА для нирок. Виявилось, що не лише у пацієнтів, які зазнавали терапії СуА для попередження відторгнення трансплантата органа, але й також і у пацієнтів, що страждали на аутоімунні хвороби, з'являються морфологічні ураження, що складаються із зон, у яких смугами розташований тубулоінтерстиціальний фіброз, тубулярна атрофія й аферентна артеріопатія. Ознаками нефропатії СуА є ці ураження судин, що не обов'язково є дозозалежними, і які можна спостерігати у деяких пацієнтів, що отримували дози СуА, які складали від 2 до 4мг/кг. Див. Bennett et al., *ibid*; Pankewycz et al., *Kidney Intl.*, 50:1634-1640 (1996).

У попередньому рівні техніки не було описано жодного ефективного способу хронічного введення СуА й інших циклоспорино в терапевтичних дозах для виключення серйозних наслідків нефротоксичності. Було зроблено припущення, що антагоністи кальцію можуть модифікувати метаболізм СуА, що дозволяє використовувати менші дози для досягнення достатнього пригнічення імунної системи. Було також припущено, що дигідропіридинові блокатори кальцієвих каналів можуть уповільнювати інтерстиціальний фіброз у реципієнтів ниркових трансплантатів без впливу на метаболізм циклоспорино. Переваги цих запропонованих терапій не були виявлені, і, до того ж, може існувати протилежний вплив, викликаний хронічним уведенням антагоністів кальцію або блокаторів кальцієвих каналів, що зробило б корисним їх використання як додаткових агентів до циклоспорино, навіть якщо вони були б ефективними для запобігання пошкодження нирок.

### Короткий опис винаходу

Задачею цього винаходу є створення способу попередження або суттєвого зменшення нефротоксичності, викликаній уведенням циклоспорино пацієнтам-ссавцям.

Також задачею цього винаходу є створення вищезгаданого способу, який не лише зупиняє процес хвороби, але й усуває прояви цього процесу й сприяє регресії ураження.

Іншою задачею винаходу є створення вищезгаданого способу, який дозволяє уводити відносно високі, терапевтично ефективні дози циклоспорино пацієнтам, що потребують терапії циклоспорином, уникаючи нефротоксичності та нефропатії, викликаних циклоспорином.

Також іншою задачею цього винаходу є створення вищезгаданого способу з використанням комерційно доступного фармацевтичного агента, який є нетоксичним і не чинить серйозного побічного впливу.

Виходячи з вищенаведених задач та інших, які стануть очевидними нижче, винахід стосується способу попередження, зменшення або усунення проявів нефротоксичності й, ниркового розладу, викликаних циклоспорином, у пацієнтів-ссавців, що отримували терапію циклоспорином, яка складається з уведення таким пацієнтам ефективної кількості полісульфату пентозану (PPS) або його фармацевтично прийнятної солі для зменшення нефротоксичності.

Оральне уведення PPS є кращим шляхом уведення.

В іншому аспекті цей винахід стосується способу лікування пацієнтів-ссавців, що потребують імунопригнічуючої терапії для попередження відторгнення алотрансплантата або для лікування аутоімунної хвороби через спільне уведення ефективної кількості циклоспорино для пригнічення імунної системи та ефективної кількості PPS для зменшення нефротоксичності його фармацевтично прийнятної солі. Як альтернатива, ефективна кількість PPS може бути введена разом з FK-506 (Fujisawa), також відомим як такролімус, який використовується для створення пригнічення імунної системи у пацієнтів з трансплантатами органів, зокрема у випадку печінкових трансплантатів.

### Короткий опис малюнків

Фіг.1А Мікрофотографія нирки щура, що протягом двох тижнів знаходився на дієті з низьким вмістом натрію й потім піддавався добовим ін'єкціям СуА протягом 45 днів.

Фіг.1Б Мікрофотографія нирки щура, що протягом двох тижнів знаходився на дієті з низьким вмістом натрію й потім піддавався добовим ін'єкціям СуА і PPS (ELMIRON®) протягом 45 днів.

Фіг.2 Стовбчаста діаграма, що відображає кількісне порівняння кількості інтерстиціальних фіброзів (що виражені у відносних одиницях), які були виявлені при морфометричному обстеженні нирок щурів та описані відповідно до Фіг.1А і 1Б.

Фіг.3 Стовбчаста діаграма, яка відображає кількісне порівняння об'єму клубочків, що був виявлений при морфометричному обстеженні нирок щурів та описаний відповідно до Фіг.1А і 1Б.

Фіг.4А Мікрофотографія нирки щура, що протягом двох тижнів знаходився на дієті з низьким вмістом натрію й потім піддавався добовим ін'єкціям СуА протягом 15 днів.

Фіг.4Б Мікрофотографія нирки щура, що протягом двох тижнів знаходився на дієті з низьким вмістом натрію й потім піддавався добовим ін'єкціям СуА і PPS (ELMIRON®) протягом 15 днів.

Фіг.5 Стовбчаста діаграма, що відображає кількісне порівняння кількості фібринових уражень, що були виявлені в нирках щурів, описаних відповідно до Фіг.4А (контроль) і 4Б (ELMIRON®), і групи щурів, яких не піддавали лікуванню, відповідно.

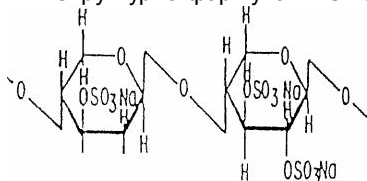
Фіг.6А Стовбчаста діаграма, що відображає кількість СуА в крові, визначену через 24-годинний термін часу, у групи щурів, яким вводили СуА в оливковій олії внутрішньошлунково.

Фіг.6Б Стовбчаста діаграма, що відображає кількість СуА в крові, визначену через 24-годинний термін часу, у групи щурів, яким вводили СуА в оливковій олії і PPS (ELMIRON®) у воді внутрішньошлунково.

Опис винаходу

Полісульфат пентозану (PPS) - це високосульфатований, напівсинтетичний полісахарид з молекулярною масою від приблизно 1500 до 6000 Да залежно від способу виділення. PPS знаходиться в тому ж загальному класі, що й гепарини та гепариноїди, але існує деяка різниця у хімічній структурі, способах утворення похідних і фізико-хімічних властивостях між PPS і гепарином. Якщо гепарин зазвичай виділяють з тканин ссавців, таких як м'язи великої рогатої худоби й свиней, печінки та кишок, PPS є напівсинтетичною сполукою, полісахаридну основу якої, ксилан, екстрагують з кори букового дерева або інших рослинних джерел і потім обробляють сульфатуючими агентами, такими як хлорсульфонова кислота або трихлорид сульфурилу з кислотою. Після сульфатування PPS зазвичай обробляють гідроксидом натрію для одержання натрієвої солі.

Структурна формула PPS наведена нижче:



H OSO<sub>3</sub>Na

Як показано, PPS - це сульфатований лінійний полімер, що складається з одиничних мономерів, що повторюються, (D)-ксілози - 5-вуглецевого пентозного цукру в його піранозній кільцевій формі. Якщо гепарин повертає плоскополяризоване світло праворуч, то PPS повертає світло ліворуч.

Стосовно біологічних властивостей PPS подовжує частковий час дії тромбопластину й використовувався для попередження важкого тромбозу вен, але він має лише приблизно одну п'ятнадцяту антикоагулянтної активності гепарину (див. Wardle, J. Int Med. Res., 20:361-370, 1992). PPS був також описаний, між іншим, як корисний при лікуванні інфекцій сечового каналу "та інтерстиціального циститу (патент США №5180715); разом з ангіостатичним стероїдом, для затримки розвитку судин і капілярів, текучості клітин або мембран (патент США №4820693); і для лікування хронічних прогресуючих хвороби судин (патент США №5643892), до яких належать фібротичні хвороби нирок, такі як гломерулосклероз.

Деякі дослідники показали, що PPS інгібує проліферацію гладеньком'язових клітин і зменшує гіперліпемію, і завдяки цьому припустили, що PPS міг би бути корисним для профілактики утворення атеросклеротичних бляшок, для інгібування проліферації мезангіальних клітин і запобігання утворення колагену і гломерулосклерозу (Paul et al., Thromb. Res., 46:793-80, 1987; Wardle, у цьому ж джерелі.). Проте жодне дослідження не було спрямоване на нирковий інтерстицій чи малі кров'яні судини (порівняно з інгібуванням проліферації клітин) або показало, що можна зупинити і/або усунути всі прояви гострого ушкодження судин і появи рубців у нирках, тобто PPS не розглядався у цьому контексті. Крім того, жодне можливе використання PPS при цих хворобах не було підтримано будь-якими ефективними науковими даними у інтактних тварин, але замість цього були основані на дослідженнях *in vitro* клітин, виділених з тканини(нин) тварини.

Хоча останнім часом і було описано використання PPS в інгібуванні фіброзу і утворення рубців (див., наприклад, Roufa et al., патент США №5605938), ці дослідження пов'язані з пригніченням проникнення фіброblastів у зони шкіри і споріднених тканин, але не з гострими або хронічними хворобами, внаслідок яких утворюються рубці, гладеньком'язовими клітинами і/або інтерстицією нирок, які є дуже різними з погляду етіології та патології.

Цей винахід стосується, в одному аспекті або втіленні, способу попередження, зменшення або усунення проявів нефротоксичності, викликаній циклоспорином або такролімусом у пацієнтів-ссавців, що отримували терапію циклоспорином або такролімусом, вищезгаданий спосіб складається з введення таким пацієнтам ефективної кількості полісульфату пентозану (PPS) або його фармацевтично прийнятної солі для зменшення нефротоксичності. У другому аспекті або втіленні винахід стосується способу лікування пацієнтів, що потребують терапії циклоспорином, наприклад, пацієнтів, що потребують пригнічення імунної системи для попередження відторгнення трансплантату або для лікування імунної хвороби, шляхом спільного введення принаймні однієї кількості циклоспоринової й ефективної для зменшення нефротоксичності кількості PPS.

Зараз циклоспорино використовуються або були описані як клінічно корисні для профілактики відторгнення органів у алогенних трансплантатах, наприклад, нирок, печінки, підшлункової залози, кісткового мозку й серця; лікування аутоімунної хвороби, наприклад, ревматоїдного артриту, системного червоного вовчака, чисельних склерозів, міастеній, хвороби Крона й первинного жовчного цирозу (див., наприклад, патент США №5,204,329); і імунозапальних хвороб шкіри, таких як псоріаз, atopічний дерматит, контактний дерматит, екзематозний дерматит, себорейний дерматит, звичайний лишай, пухирчатка, булозна пухирчатка, булосний епідермолізіс, кропивниця, ангіоедеми, васкуліти, еритеми та шкірні еозинофілії) (див., наприклад, патент США №5286730).

Згідно з винаходом пацієнтам-савцям, що вже отримували або збираються отримувати терапію циклоспорином для лікування будь-яких з вищеперелічених хвороб або будь-яких інших клінічних проявів, уводять ефективну кількість PPS або його фармацевтично прийнятної солі для зменшення нефротоксичності. Вираз "ефективна кількість для зменшення нефротоксичності", що використовується тут, стосується кількості PPS або його солі, що включена у фармацевтичну композицію, яка є ефективною при прийомі один або кілька разів на добу протягом призначеного терміну часу (цей термін може починатися перед, одночасно з або після початку терапії циклоспорином) для попередження або суттєвого зменшення нефротоксичного впливу уведеного циклоспориноу.

Якщо пацієнт - людина, загальна добова доза PPS або солі PPS становить від приблизно 2 до приблизно 50 мг/кг, а краще приблизно від 5 до приблизно 30мг/кг маси тіла пацієнта або приблизно від 140 до приблизно 3500мг на день у дорослих пацієнтів (і краще приблизно від 350 до приблизно 2000мг), уведена в кількості від одної до чотирьох доз на добу, є ефективною в досягненні терапевтичної мети попередження, зменшення або усунення проявів нефротоксичності й нефропатії, викликаних циклоспорином. У менших за розмірами ссавців доза має бути збільшена або зменшена відповідно до маси тіла, роду і та походження хвороби.

Кращим втіленням нового способу лікування є введення пацієнту фармацевтичної композиції, що складається з ефективною кількістю PPS або солі PPS і принаймні однієї фармацевтично прийнятної інертної складової. Композиція може бути в будь-який звичайній фармацевтичній дозованій формі, але краще, якщо дозована форма вводиться орально.

До дозованих форм для орального введення можуть належати загальноприйнятні таблетки, таблетки, капсули або каплетти (пігулки) з покриттям, таблетки, капсули або каплетти з тривалим вивільненням, ромбічні таблетки, рідини, еліксири або будь-які інші оральні дозовані форми, відомі у фармацевтиці.

Фармацевтично прийнятними інертними складовими можуть бути наповнювачі, зв'язувачі, розчинники і т. ін., які не заважають бажаній активності PPS. Наповнювачі, такі як глини або кремнеземи, можуть бути використані за бажанням для регулювання розміру дозованої форми.

Наступні складові, такі як наповнювачі та носії, можуть бути необхідними для створення бажаних фізичних властивостей дозованої форми. Такими фізичними властивостями є, наприклад, швидкість вивільнення, структура та розмір. Прикладами наповнювачів та носіїв, корисних для оральних дозованих форм, є воски, такі як бджолиний віск, касторовий віск, гліковіск і карнаубський віск, сполуки целюлози, такі як метилцелюлоза, етилцелюлоза, карбоксиметилцелюлоза, фталат целюлозоацетату, гідроксипропілцелюлоза й гідроксипропілметилцелюлоза, полівінілхлорид, полівінілпіролідон, стеариловий спирт, гліцерин моностеарат, метакрилатні сполуки, такі як поліметакрилат, метилметакрилат і етиленгліколь диметакрилат, поліетиленгліколь і гідрофільні смоли.

У композиціях цього винаходу бажано, щоб PPS - активна складова, була присутня в кількості між приблизно 50 і приблизно 300мг на дозовану одиницю. Точна доза, уведена кожному пацієнтові, буде функцією стану, що піддають лікуванню, і фізичних показників пацієнта, такі як вік і маса тіла.

Активними фармацевтичними складовими можуть бути PPS або його фармацевтично прийнятна сіль, наприклад, натрієва сіль. Однією з кращих оральних дозованих форм для використання в способі винаходу є Elmiron® желатинові капсули (Baker Norton Pharmaceuticals, Inc., Miami, Florida), які містять 100мг PPS натрію і, як наповнювачі, мікрокристалічну целюлозу та стеарат магнію.

Хоча оральний шлях введення є кращим, цей спосіб лікування також стосується введення PPS або його солі парентеральним, кризьшкірним шляхом та кризь слизові оболонки чи будь-якими іншими шляхами введення, що є відомими й загалом використовуються у медичній та фармацевтичній галузі. Окрім цього, композиції винаходу можуть містити PPS у фармацевтично прийнятній парентеральній, кризьшкірній формі та формі, придатній для застосування кризь слизові оболонки, або у інших загальноприйнятих носіях і дозованих формах разом з придатними інертними розчинниками, наповнювачами і додатками. Багато прикладів таких фармацевтично прийнятних носіїв можна знайти у Remington's Pharmaceutical Sciences (17 видання, 1985) й інших звичайних посібниках. Яким би шляхом не вводили або тип фармацевтичної дозованої форми не використовували, добова доза активної складової PPS становить від приблизно 2 до приблизно 50мг/кг маси тіла пацієнта або приблизно від 140 до приблизно 3500мг у дорослих людей-пацієнтів, і краще приблизно від 5 до приблизно 30мг/кг або приблизно 350 до приблизно 2000мг, хоча доза, зменшена до нижчої границі даного діапазону, може бути використана для парентерального введення.

Фармацевтичні композиції, що використовуються у способі винаходу, можуть містити інші активні складові, ніж PPS або сіль PPS, наприклад, інші агенти, які можуть бути корисними в попередженні викликаного циклоспорином ушкодження нирок або токсичності.

Згідно з різними втіленнями способу цього винаходу PPS (або сіль PPS), що містить композицію, може бути введений пацієнту перед початком терапії циклоспорином або такролімусом (наприклад, починаючи за кілька днів перед), разом з терапією циклоспорином або такролімусом і/або протягом придатного терміну часу після закінчення терапії циклоспорином або такролімусом. У кращому втіленні принаймні одну дозу PPS або солі PPS уводять пацієнту протягом 24 годин перед, разом з або протягом 24 годин після введення циклоспориноу або такролімусу. Композиція PPS може бути введена пацієнту водночас з композицією циклоспориноу або такролімусу, але в окремій дозованій формі, або вона може бути введена пацієнту в інший час протягом дня, а не одночасно з композицією циклоспориноу або такролімусу.

Як альтернатива, у ще одному втіленні цього винаходу комбінація P-BS (або солі PPS) і дозованих форм циклоспориноу (або такролімусу) може бути введена пацієнтам-савцям, що потребують імунопригнічуючої терапії. Така комбінація дозованих форм містить ефективну для пригнічення імунної системи кількість циклоспориноу або такролімусу, наприклад, приблизно від 25 до приблизно 200мг циклоспориноу, краще СуА. Комбінація дозованих форм також містить ефективну для зменшення нефротоксичності кількість, наприклад, приблизно від 50 до приблизно 500мг PPS або солі PPS.

Такі дозовані форми можуть бути в будь-який придатній формі для оральної або парентеральної доставки або введення, як описано вище, і можуть містити будь-які фармацевтично прийнятні наповнювачі, зв'язувачі,

розчинники, носії та інші наповнювачі або інертні складові, які вважаються придатними з точки зору фахівців у фармацевтичній галузі.

Циклоспорином, який зараз є найбільш широквикористовуваним в клінічному застосуванні для створення пригнічення імунної системи або для лікування аутоімунної або імунотоксичної хвороби, CyA, також відомий як циклоспорин. Проте введення композиції PPS згідно з цим винаходом спільно з циклоспорином для попередження нефротоксичності може бути виконано з будь-яким циклоспорином, наприклад, циклоспорином A—Z і їх похідними. Крім того, будь-який з циклоспоринів A—Z або будь-який інший циклоспорин може бути використаний в комбінації з дозованою формою разом з PPS або сіллю PPS у новій комбінації дозованих форм винаходу. Також, завдяки тому, що внутрішньоклітинні шляхи сигналізації і тип ниркової токсичності FK-506 або такролімусу нагадує такі самі ж шляхи для CyA, ймовірно, що токсичність завдяки введенню такролімусу має також бути знижена спільним введенням PPS або солі PPS.

Структури циклоспоринів A—Z (усі є циклічними ундекапептидами) показані в Таблиці.

Таблиця

Циклоспори́ни A-Z

Циклоспорин	Амінокислоти										
Cy-	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
CyA	Mebmt	Abu	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeL'eu	MeLeu	MeVal
CyB	Mebmt	Ala	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal
CyC	Mebmt	Thr	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal
CyD	Mebmt	Val	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal
CyE	Mebmt	Abu	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	Val
CyF	Desoxy - Mebmt	Abu	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal
CyG	Mebmt	Nva	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal
CyH	Mebmt	Abu	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	D-Mev
CyI	Mebmt	Val	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	Leu	MeVal
CyK	Desoxy	Val	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal
CyL	Bmt	Abu	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal
CyM	Mebmt	Nva	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal
CyN	Mebmt	Nva	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	Leu	MeVal
CyO	MeLeu	Nva	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal
CyP	Bmt	Thr	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal
CyQ	Mebmt	Abu	Sar	Val	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal
CyR	Mebmt	Abu	Sar	MeLeu	Val	Leu	Ala	D-Ala	MeLeu	Leu	MeVal
CyS	Mebmt	Thr	Sar	Val	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal
CyT	Mebmt	Abu	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	Leu	MeVal
CyU	Mebmt	Abu	Sar	MeLeu	Val	Leu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal
CyV	Mebmt	Abu	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal
CyW	Mebmt	Thr	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	Val
CyX	Mebmt	Nva	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	Leu	MeLeu	MeVal
CyY	Mebmt	Nva	Sar	MeLeu	Val	Leu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal
CyZ	MeAmi ноктилова к-та	Abu	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal

Наступні приклади показують ефективність нового способу попередження або суттєвого зменшення й усунення проявів викликані циклоспорином нефротоксичності, зокрема артеріольних некрозних уражень в нирках. Ці приклади є лише ілюстративними і не мають наміру визначити матеріали, композиції або діапазон доз як такі, що мають бути використані виключно для того, щоб здійснити цей винахід.

#### Приклад 1

Дві групи щурів лінії Sprague-Dawley знаходились на дієті з низьким вмістом солі протягом двох тижнів перед початком цього експериментального дослідження, і утримувались на цій дієті протягом дослідження. Першій групі (контрольній) вводили 15мг/кг/день CyA за допомогою ін'єкцій протягом 45 днів. Другій групі вводили таку саму дозу CyA, як і першій групі, але також вони отримували добові ін'єкції 10мг/кг PPS (ELMIRON®) протягом 45 днів. Наприкінці дослідження тварин забивали й їхні нирки досліджували за допомогою мікроскопу і шляхом морфометричних досліджень.

Як зображено на мікрофотографіях Фіг.1А і 1Б, у нирках контрольної групи щурів виявили великі зони інтерстиціального фіброзу. Спостерігали малу кількість запальних клітин, що знаходились всередині зон фіброзу. Нирки щурів, що отримували CyA і ELMIRON®, виявили, що більшість каналців були щільно розташовані поруч, як за нормальних умов, і виявили чітке зменшення кількості фіброзів або клітинного інфільтрату між каналцями.

Кількість інтерстиціального фіброзу в кожній з тестових груп перевіряли кількісно морфометричним обстеженням нирок. Як показано на Фіг.2, приблизно 50% зменшення інтерстиціального фіброзу спостерігали у щурів, яким вводили ELMIRON®.

Розмір клубочків у нирках щурів у контрольній групі й групі, що отримувала ELMIRON®, вимірювали візуальним аналізом. П'ятдесят клубочків послідовно досліджували звичайним морфометричним способом. Як

зображено на Фіг.3, середній об'єм клубочків у групі, що отримувала ін'єкції СуА і ELMIRON® був значно більше, ніж об'єм клубочків у контрольній групі, що отримувала лише СуА. Це вказує на те, що PPS захищав клубочки щурів у групі, яку піддавали лікуванню від ішемічного звуження, викликаного СуА.

#### Приклад 2

Дві групи щурів лінії Sprague-Dawley знаходились на дієті з низьким вмістом солі протягом двох тижнів перед початком цього експериментального дослідження і утримувались на цій дієті протягом дослідження. Першій групі (контрольній) вводили 15мг/кг/день СуА за допомогою ін'єкцій протягом 15 днів. Другій групі вводили таку саму дозу СуА, як і першій групі, але вони також отримували добові ін'єкції 10мг/кг PPS (ELMIRON®) протягом 15 тижнів. Наприкінці дослідження тварин забивали й їхні нирки досліджували за допомогою мікроскопу.

На Фіг.4А і 4Б зображені мікрофотографії зрізів клубочків нирок щура з контрольної групи (Фіг.4А) і з групи, де вводили ELMIRON® (Фіг.4Б), відповідно. На Фіг.4А можна побачити (привідну) артеріолу, яка має "фібриновий" некроз разом з повною стінкою праворуч від клубочка (у центрі знімка).

Для порівняння, жодних уражень немає в привідних та відвідних артеріолах у клубочковій судинній ніжці, що показано на Фіг.4Б.

Кількість "фібринових" уражень у привідних артеріолах перевіряли в нирках контрольної групи та груп, яким вводили ELMIRON®, а також у групі нормальних щурів Sprague-Dawley, яких не піддавали жодній процедурі.

П'ятдесят послідовних ділянок судинних ніжок перевіряли в кожній нирці. Як зображено на Фіг.5, кількість уражень, виявлених у групі, який вводили ELMIRON®, була значно меншою, ніж у групі тварин, що отримували лише СуА.

#### Приклад 3

Це дослідження виконували для визначення того, чи мав PPS вплив на шлунково-кишкове поглинання СуА, яке впливало на вміст у крові кількості СуА.

Одна група з 10 щурів лінії Sprague-Dawley отримувала СуА (10мг/кг) в оливковій олії внутрішньошлунково. Повну кількість крові збирали з кожної тварини на 30 хвилині, 1 годині, 2 годині, 3 годині, 4 годині, 5 годині, 6 годині, 8 годині, 12 годині та 24 годині після уведення СуА. Кількість СуА у зразках вимірювали методом ELISA.

Середня кількість СуА для цієї групи відображена на Фіг.6А. Пік кількості в крові досягався на 5-8 годині після введення і повертався на вихідний рівень до 24 години. Значна різниця спостерігалась між тваринами, що є звичайним для цієї форми СуА.

Друга група з 10 щурів лінії Sprague-Dawley отримували СуА (10мг/кг) в оливковій олії, а також PPS (ELMIRON®) 5мг/кг у воді внутрішньошлунково. Повні зразки крові збирали у тварин у ті ж терміни часу, що й в контрольній групі, і вимірювали кількість СуА. Середні значення для групи в кожному проміжку часу зображені на Фіг.6Б.

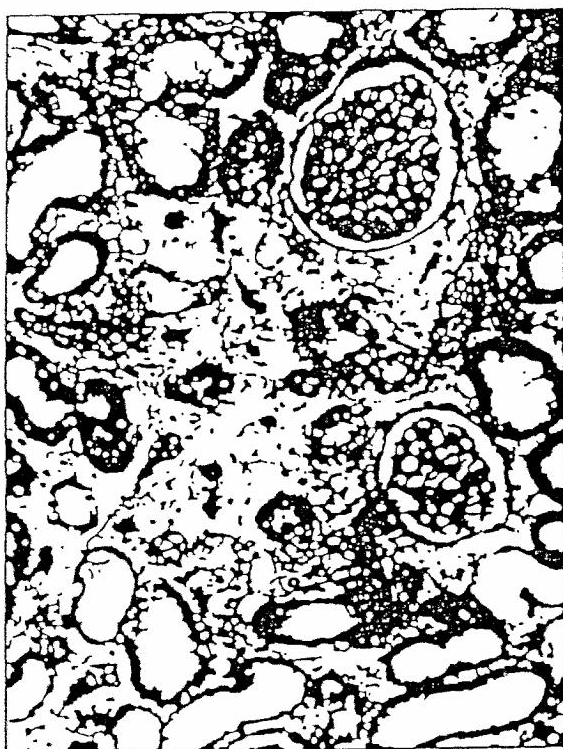
Треба відмітити, що крива, показана на Фіг.6Б нагадує ту, що зображена на Фіг.6А, хоча різниця між тваринами була значно зменшена. Ці результати показують, що спільне введення орально PPS з оральним СуА не порушує

поглинання СуА в кишках або зменшує кількість в крові. Таким же чином, спільне введення PPS не вплинуло на зникнення СуА з плазми крові.

Таким чином було показано, що були створені способи та композиції, які досягають різних цілей винаходу, і які добре пристосовані до задоволення умов практичного використання.

Оскільки можливі різні втілення вищезгаданого винаходу і оскільки різні зміни можуть бути внесені у вищезгадані втілення, є зрозумілим те, що усе, що тут описано, розглядається як ілюстративний матеріал, а не з метою обмеження.

Усе, що вважається новим і має бути захищеним патентним законодавством, наведено в наступній формулі.



КОНТРОЛЬ

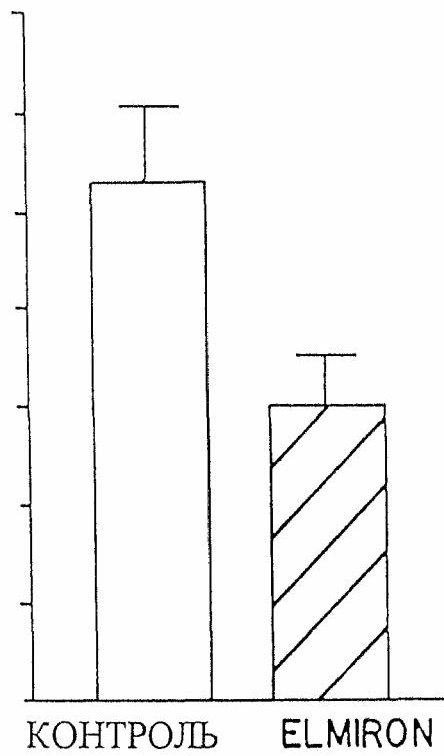
Фиг. 1А



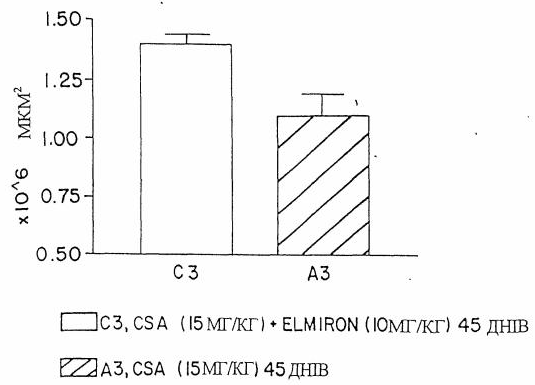
ELMIRON

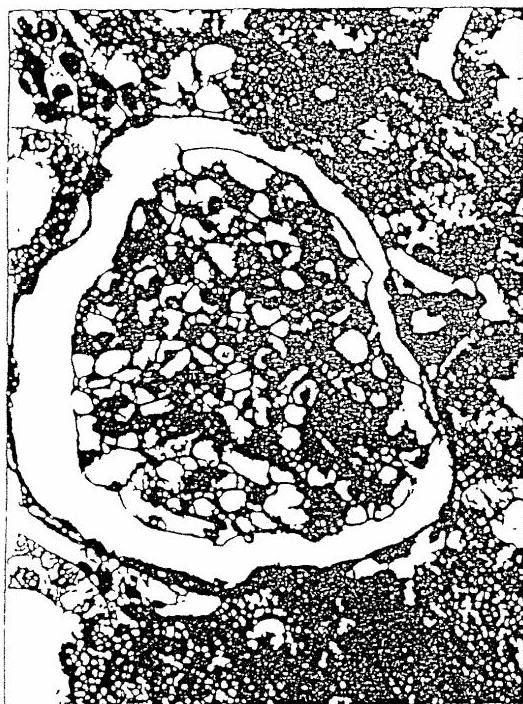
Фиг. 1Б

Фиг. 2



Фиг. 3

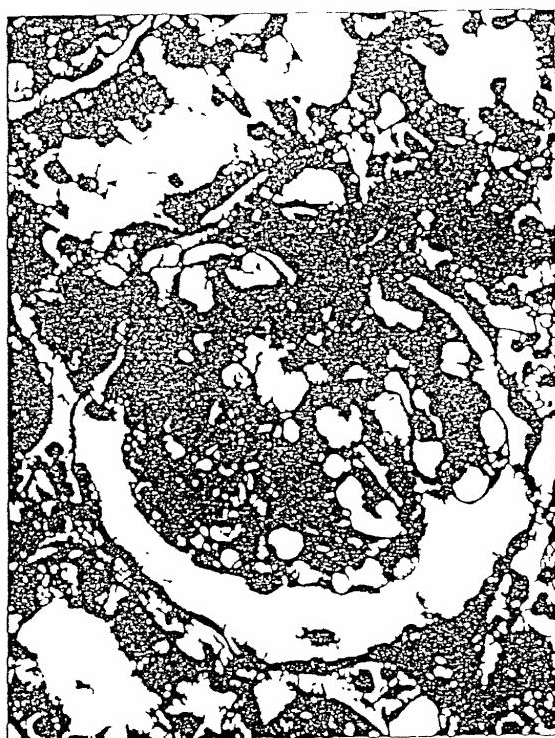




CyA

15 ДНІВ

ФІГ. 4А



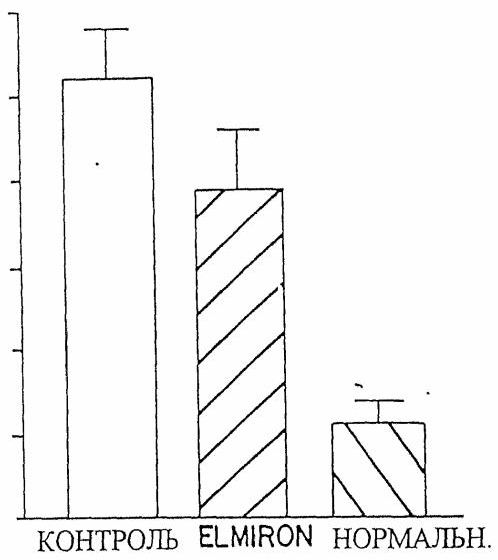
CyA+E

15 ДНІВ

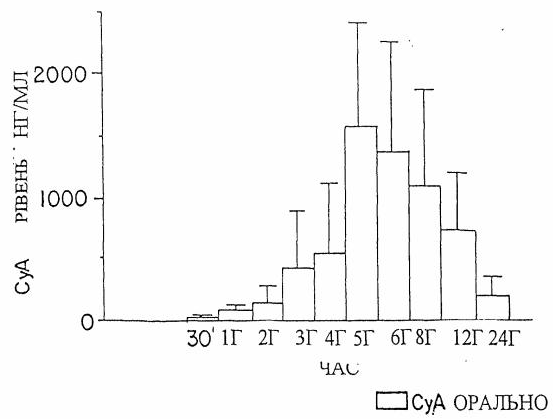
ФІГ. 4Б



ФІГ. 5



ФІГ. 6А



ФІГ. 6Б

