

# PATENTOVÝ SPIS

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **1999-4142**  
(22) Přihlášeno: **20.05.1998**  
(30) Právo přednosti: **23.05.1997 EP 1997/97108384**  
(40) Zveřejněno: **13.03.2002**  
**(Věstník č. 3/2002)**  
(47) Uděleno: **11.06.2008**  
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **23.07.2008**  
**(Věstník č. 30/2008)**  
(86) PCT číslo: **PCT/EP1998/002953**  
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 1998/052973**

(11) Číslo dokumentu:

## 299 423

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:  
*C07K 7/06* (2006.01)  
*C07K 7/08* (2006.01)  
*A61K 38/08* (2006.01)  
*A61K 38/10* (2006.01)  
*A61P 39/00* (2006.01)  
*A61P 43/00* (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:  
WO 94/11394; WO 93/24521.  
Sikirič et al. (1996) Dig. Dis. Sci. 41 (7).

(73) Majitel patentu:  
SIKIRIČ Predrag, Zagreb, HR  
PETEK Marijan, Zagreb, HR  
SEIWERTH Sven, Zagreb, HR  
TURKOVIĆ Branko, Zagreb, HR  
GRABAREVIĆ Željko, Zagreb, HR  
ROTKVIĆ Ivo, Zagreb, HR  
MIŠE Stjepan, Split, HR  
DUVNJAK Marko, Zagreb, HR  
UDOVIČIĆ Ivan, Stans, CH

(72) Původce:  
Sikiric Predrag, Zagreb, HR  
Petek Marijan, Zagreb, HR  
Seiwerth Sven, Zagreb, HR  
Turković Branko, Zagreb, HR  
Grabarević Željko, Zagreb, HR  
Rotkvić Ivo, Zagreb, HR  
Miše Stjepan, Split, HR  
Duvnjak Marko, Zagreb, HR  
Udovičić Ivan, Stans, CH

(74) Zástupce:  
Dr. Karel Čermák, Národní třída 32, Praha 1, 11000

(54) Název vynálezu:  
**Nové BPC peptidové sole s organo-protektivní  
aktivitou, proces jejich přípravy a jejich použití  
v léčbě**

(57) Anotace:  
Řešení se zabývá přípravou solí peptidů s organo-protektivní  
aktivitou. Sůl je tvořena negativně nabitým peptidem BPC  
(Body Protection Compound) o velikosti 8 až  
15 aminokyselinových zbytků a kationem organické nebo  
anorganické báze. Oproti samotnému BPC peptidu vykazují  
tyto sole větší fyzikálně-chemickou stabilitu. Popsáno je také  
použití těchto solí pro přípravu farmaceutických prostředků  
pro léčení různých lidských nebo zvířecích onemocnění.

CZ 299423 B6

## Nové BPC peptidové sole s organo–protektivní aktivitou, proces jejich přípravy a jejich použití v léčbě

### 5 Oblast techniky

Předkládaný vynález se vztahuje k novým aplikačním formám syntetických peptidů BPC (Body Protection Compound – sloučenina chránící orgány), skládající se z 8 až 15 aminokyselinových zbytků s molekulovou hmotností 900 až 1600 daltonů, které mají organo–protektivní aktivitu, k postupu pro jejich přípravu a jejich použití v diagnostice a léčbě.

### Dosavadní stav techniky

15 Jsou známé proteiny a peptidy, které jsou užitečné pro léčbu různých onemocnění lidí a zvířat. Mnoho těchto látek je produkováno in vivo a mohou být pro přípravu farmaceutických směsí extrahovány ze zvířat nebo lidí. Příklady farmaceuticky užitečných proteinů jsou například inzulín, erythropoetin, různé BMP, interferony atd. Jiným příkladem je protein žaludeční šťávy s ochrannou aktivitou vůči sliznicím, který byl nedávno izolován a pojmenován jako BPC. 20 WO 92/04368 se vztahuje k BPC, který vykazuje ochrannou aktivitu pro orgány a má molekulovou hmotnost okolo 40 000 daltonů, k jeho přípravě a použití. WO 93/24521 a WO 94/11394 popisují BPC peptidy s organo–protektivní aktivitou stejného typu, jakou známe u rodičovského proteinu BPC. Sikiric et al. v: Digestive Diseases and Sciences, 41 (1996)7, 1518–1526, popisuje 25 pentadekapeptid BPC 157, který vykazuje (je-li rozpuštěn ve vodě a fyziologickém roztoku) prospěšné a profylaktické účinky na akutní pankreatitidu a průvodní gastroduodenální leze u krys.

BPC peptidy jsou tedy známé pro širokou řadu farmaceutických aplikací. Fyzikálně chemická stabilita těchto peptidů je ale například v normálním fyziologickém roztoku nedostatečná. Kromě 30 toho aplikace BPC peptidů, zejména v injekční formě vodného roztoku nebo fyziologického roztoku, způsobuje bolest a/nebo nekrózy.

Odborníkům jsou sole proteinů a peptidů dobře známé. Například z práce Bertrand, M. et al. v: Journal of Peptide Research, 49 (1997)3, 269–272 je známo, že účinek určitých solí na stabilitu a strukturu peptidů je velmi selektivní. Například přidání jednomocných kationů, jako  $\text{NH}_4^+$  35 k roztoku peptidu (poly(Glu–Leu)) v konečné koncentraci 0,1 M, vyvolá přechod na ve vodě rozpustnou beta–strukturu. Naproti tomu nebyl pozorován žádný přechod při použití  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$  nebo  $\text{Cs}^+$  iontů.

40 Role povrchově přístupných iontových párů na stabilitu proteinu se zkoumala stanovením účinku přidávaných solí ( $\text{KCl}$ ,  $\text{MgCl}_2$  a  $\text{LaCl}_3$ ) při neutrálním a kyselém pH na stabilitu de novo vytvořených dvouřetězcových navzájem ovinutých proteinů s alfa helikální konformací. Výsledky ukazují, že přidaná sůl může mít komplexní vliv na stabilitu proteinu, včetně účinků na stabilizaci a destabilizaci, kde čistý vliv závisí na povaze nabitých zbytků a iontových interakcích přítomných v proteinu (Kohn et al. v: Journal of Molecular Biology, 267 (1997)4, 1039–1052).

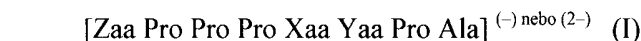
45 Předchozí studie modelových peptidů také ukázaly, že solné můstky rozložené v  $i, i+4$  podél peptidového řetězce stabilizují více než v  $i, i+3$ , přičemž se spíše preferuje uspořádání kyselina–báze než báze–kyselina z N– k C– konci. V současnosti se ale neví, jestli mají povrchové solné můstky stabilizační vliv na přirozené struktury v proteinech (Berger et al. v: Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 14 (1966)3, 285–291).

Vlastnosti peptidových solí s ohledem na jejich stabilitu, strukturu a funkci tak velmi závisí na určitých iontech účastnících se tvorby specifických solí a dále na dalších vnitřních a vnějších faktorech. V současnosti není možné říci předem, jaké vlastnosti by mohla mít určitá sůl nebo 55 určitý peptid.

Podstata vynálezu

5 Zásadní technický úkol předkládaného vynálezu je snaha poskytnout BPC peptidy ve stabilnější formě a diagnostické a/nebo farmaceutické směsi obsahující BPC peptidy, které vykazují zlepšenou stabilitu a alespoň stejné farmaceutické vlastnosti, jako samotné BPC peptidy. Další technický úkol předkládaného vynálezu je snaha poskytnout farmaceutickou směs, která překoná nedostatky zmíněné výše, která umožní zejména bezbolestnou injekci BPC peptidů.

10 Předkládaný vynález řeší tyto problémy přípravou BPC peptidových solí a farmaceutických nebo diagnostických směsí obsahujících farmaceuticky nebo diagnosticky účinné množství solí BPC peptidů, kde je anion soli negativně nabitý peptid složený z 8 až 15 aminokyselin, s molekulovou hmotností 900 až 1600 daltonů a s obecným vzorcem (I)



kde Xaa je neutrální alifatický aminokyselinový zbytek, zejména Ala, bAla, Leu, Ile, Gly, Val, Nle nebo Nva,

20 Yaa je zásaditý aminokyselinový zbytek, zejména Lys, Arg, Orn nebo His a

Zaa je kyselý aminokyselinový zbytek, zejména Glu, Asp, Aad nebo Apm

25 a kde kation soli je kation anorganické nebo organické, netoxické a farmaceuticky přijatelné báze. Kation soli je často alkalický kov nebo kov alkalických zemin, například  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Li^+$ ,  $Cs^+$ ,  $Ca^{2+}$  nebo jiný kov, jako např.  $Zn^{2+}$ , nebo primární, sekundární nebo terciární amin, nebo organická sloučenina jako  $NH_4^+$ , trietanolamin<sup>+</sup>, cyklohexylamin<sup>+</sup>, 2-AMP<sup>+</sup> (2-amino-1-propanol) nebo TRIS<sup>+</sup> (Tris-(hydroxymethyl)-aminometan) za předpokladu, že jsou tyto kationty fyziologicky akceptovatelné.

30 BPC peptidové sole předkládaného vynálezu překvapivě vykazují přinejmenším stejnou farmaceutickou aktivitu jako BPC peptidy a navíc významně zvýšenou fyzikálně chemickou stabilitu ve srovnání s volnými BPC peptidy nebo octany BPC peptidů. Kation použitý podle předkládaného vynálezu neovlivní aktivitu BPC peptidů, ale zvýší jejich stabilitu. BPC peptidové sole předkládaného vynálezu jsou například stabilnější než BPC peptidy nebo BPC peptidové octany  
35 v normálním fyziologickém roztoku nebo ve vodě. Kromě toho jsou sole předkládaného vynálezu vhodné pro perorální podávání a nevykazují žádné nežádoucí vedlejší účinky, jako je bolestivost nebo tvorba nekróz během nebo po aplikaci, zejména injekční aplikaci. BPC peptidové sole předkládaného vynálezu tedy umožňují zlepšenou enterální nebo parenterální aplikaci. Kromě toho jsou sole předkládaného vynálezu velmi vhodné vzhledem k absenci jakýchkoliv příznaků toxicity až do dávek 50 mg/kg tělesné hmotnosti.  
40

Sole vynálezu se můžou získat rozpuštěním volného BPC peptidu ve vodném nebo vodném/alkoholovém rozpouštědle nebo v jiných vhodných rozpouštědlech s vhodnouází a následnou izolací získané sole vynálezu odpařením roztoku, zmražením a lyofilizací nebo přidáním  
45 dalšího rozpouštědla, např. dietyleru k vodnému a/nebo alkoholovému roztoku BPC peptidové sole, čímž se vyvolá separace nerozpustné neupravené sole. Pro tvorbu sole se obvykle používají jeden nebo maximálně dva moly báze tj. kationu a jeden mol volného BPC peptidu. Pro přípravu alkalických peptidových BPC solí se přednostně používají uhličitany alkalických kovů nebo hydrogenuhličitany alkalických kovů. Připravené peptidové sole jsou volně rozpustné ve vodě. Předkládaný vynález se tak vztahuje také k procesu přípravy BPC peptidových solí.  
50

V kontextu předkládaného vynálezu se za bázi pokládá látka schopná tvorby kationu v roztoku, zejména ve vodném a vodném/alkoholovém roztoku.

V kontextu předkládaného vynálezu farmaceutická aktivita zahrnuje profylaktické a terapeutické aktivity. Farmaceutické složení se tedy vztahuje ke směsím vykazujícím profylaktické a/nebo terapeutická působení.

- 5 Vynález se dále vztahuje k farmaceutické nebo diagnostické směsi obsahující BPC peptidové sole předkládaného vynálezu, někdy s jedním nebo více farmaceuticky přijatelnými nosiči a také postupy pro přípravu těchto sloučenin. Tyto směsi jsou vhodné pro místní nebo systémovou aplikaci například ve formě injekčních roztoků, tablet, past, kapslí, mastí, prostředků k omývání, cucacích pastilek atd. Dávkování se pohybuje přednostně v rozsahu od  $10^{-5}$  do  $10^{-2}$  mg/kg tělesné hmotnosti aplikované systémově, nebo místně ve vyšších koncentracích – mezi 0,1 a 0,5%.  
10 Určení optimálního dávkování pro konkrétní léčbu bude na odbornících.

- Předkládaný vynález se také vztahuje k farmaceutické nebo diagnostické směsi jak bylo pojednáno výše, která kromě jedné nebo více BPC peptidových solí předkládaného vynálezu obsahuje trehalózu, zvláště pro perorální použití a/nebo farmaceuticky nebo diagnosticky přijatelné nosiče, rozpouštědla a/nebo přísady.  
15

- Směs vynálezu (přednostně ve vodě rozpustná směs) kromě BPC peptidové sole dále může obsahovat ve vodě rozpustný protein vhodný pro injekci do tělních tekutin bez výraznější farmakologické aktivity v koncentraci použité pro jednu dávkovou jednotku předkládaného vynálezu (dále „ve vodě rozpustný protein“). Jako tento ve vodě rozpustný protein se preferuje sérový albumin, globulin, kolagen a/nebo želatina. Tento protein může být přidán v množstvích obecně používaných pro injekčně aplikované farmaceutické směsi. Pak je váhový poměr mezi ve vodě rozpustným proteinem a BPC peptidovou solí například v rozmezí 0,000:1 do 100:1, přednostně v rozmezí od 0,001:1 do 10:1, nebo ještě lépe v rozmezí od 0,01:1 do 1:1.  
20  
25

- Vynález se také vztahuje k samotným dříve zmíněným BPC peptidovým solím a směsím, které je obsahují, zejména v sušené a/nebo čisté formě nebo ve vodných nebo vodných/alkoholových roztocích. pH roztoku připraveného z ve vodě rozpustné směsi nebo peptidové sole předkládaného vynálezu by mělo být takové, aby dané pH nemělo nepříznivý vliv na aktivitu farmakologicky aktivního peptidu, ale bylo v obecně přijatelném rozsahu pro injekční aplikaci a dále aby dané pH nezpůsobovalo velké změny viskozity roztoku a nedovolovalo tvorbu precipitátů nebo podobných struktur. Roztok by tedy měl mít pH mezi 6 až 9, nejlépe mezi 6,5 a 7,5.  
30

- Když je ve vodě rozpustná směs vynálezu převedena na vodný roztok pro aplikaci, koncentrace farmakologicky aktivní peptidové sole v daném roztoku by měla být v rozsahu od 0,0000001 do 10% (hmotnost/objem), lépe v rozsahu od 0,000001 do 5% a nejlépe v rozsahu od asi 0,00001 do 1% (vždy hmotnost/objem).  
35

- Směs předkládaného vynálezu by měla přednostně mít dávkovou jednotku obsahující farmakologicky aktivní BPC peptidovou sůl vynálezu společně s (je-li to nutné) dalšími přísadami, jako je například výše uvedený ve vodě rozpustný protein. Tak mohou být například v ampuli nebo lahvičce dvě nebo tři výše zmíněné složky (po rozpuštění nebo suspendování ve sterilní vodě nebo sterilním fyziologickém roztoku). V tomto případě může metoda přípravy zahrnovat smísení roztoku farmakologicky aktivní BPC peptidové sole a dále, je-li to nezbytné, roztoku aditiva nebo přidání aditiva v práškové formě k roztoku farmakologicky aktivní BPC sole nebo jakoukoliv kombinaci vhodných postupů. Dávková forma se může také připravit přidáním sterilní vody nebo sterilního fyziologického roztoku k lyofilizovanému nebo pod vakuem sušenému prášku s BPC peptidovou solí a případně i další nezbytnou přísadou. Tato forma dávkové jednotky může obsahovat jednu nebo více dalších vhodných přísad, jako například látky upravující pH (např. glycin, kyselina chlorovodíková, hydroxid sodný), lokální anestetika (například xylokain hydrochlorid, chlorbutanol), osmotické látky (například chlorid sodný, manitol, sorbitol), emulzifikátory, inhibitory adsorpce (např. Tween<sup>®</sup> 60 nebo 80), talek, škrob, laktózu a tragant, stearat hořečnatý, glycerol, propylen glykol, ochranné látky, benzyl alkohol, metylhydroxy benzoát a/nebo  
40  
45  
50

oleum arachid hydrogen. Tato forma dávkové jednotky může dále obsahovat farmakologicky přijatelné inertní substance k přenosu látky jako například polyetylen glykol 400 nebo dextran.

5 Preferuje-li se, jsou-li ve vodě rozpustné směsi předkládaného vynálezu ve formě parenterálních přípravků. Nejlépe tedy jako roztoky pro injekce, roztoky pro transmukozální aplikaci, nasální roztoky a roztoky pro aplikaci do uší.

10 Mezi uvedené roztoky pro injekční aplikaci patří roztoky pro intravenózní aplikaci, subkutánní aplikaci, intraarteriální aplikaci, intramuskulární aplikaci a intraokulární aplikaci. Tyto dlouhodobě působící preparáty se snadno nasají z ampulí nebo lahvíček do injekční stříkačky. Bubliny (dojde-li k jejich vytvoření při nasátí) se snadno odstraní pouhým krátkým ponecháním roztoku v klidu.

15 Směs předkládaného vynálezu může být jednak rozpuštěná ve vodě nebo v lyofilizované formě s krystalizovanou rozpuštěnou látkou, jako je například manitol. Přidáním sterilní vody nebo sterilního fyziologického roztoku k lyofilizátu se získá vodný roztok.

20 Tonicita vodného roztoku ve vodě rozpustné směsi předkládaného vynálezu by měla být při podávání v přijatelných mezích a je možné ji upravit například izotonickými činidly, jako je chlorid sodný nebo manitol. Tonicita má přednostně poloviční až dvojnásobnou hodnotu jako fyziologický roztok, nebo lépe hodnotu odpovídající třem čtvrtinám až jedenapůlnásobku fyziologického roztoku.

25 Viskozita vodného roztoku ve vodě rozpustných sloučenin předkládaného vynálezu by měla být dostatečně nízká pro injekční aplikaci. Je dobré, když je viskozita nižší než 500 cP, nebo ještě lépe nižší než 400 cP. Hodnoty viskozity odpovídají hodnotám měřeným s použitím Cone LD ve viskozimetru typu E (Tokimec, Japonsko) při 25 °C.

30 Je-li směs ve formě lyofilizátu upřednostňuje se, když je viskozita, tonicita a koncentrace komponentů ve vodných roztocích z nich odvozených v mezích uvedených dříve.

35 Směs předkládaného vynálezu se připraví smísením těchto složek podle obecných metod. Cílem smíchání těchto složek předkládané směsi by mělo být zachování aktivity farmakologicky aktivní BPC sole a minimalizace tvorby bublin během celého procesu. Složky se dají do nádoby (například do lahve nebo do válce), buď společně, nebo postupně v libovolném pořadí. Atmosféra v nádobě může být tvořena například sterilním čistým vzduchem nebo sterilním čistým dusíkem. Výsledný roztok může být přenesen do menších nádob nebo ampulí a lyofilizován.

40 Tekutá forma nebo lyofilizovaná prášková forma směsi předkládaného vynálezu může být rozpuštěna nebo rozptýlena v roztoku polymeru schopného biodegradace, jako je například kopolymer kyseliny poly (mléčné-glykolové), poly (hydroxymáselné kyseliny), polymeru kyseliny poly (hydroxymáselné-glykolové) nebo jejich směsí a může se připravit například ve formě filmů, mikrokapsulí (mikrokuliček) nebo nanokapsulí (nanokuliček), a zejména ve formě měkkých nebo tvrdých kapslí.

45 Směs předkládaného vynálezu se může také obalit lipozómy obsahující fosfolipidy, cholesterol nebo jejich deriváty a pak rozptýlit ve fyziologickém roztoku nebo v roztoku kyseliny hyaluronové rozpuštěné ve fyziologickém roztoku.

50 Měkké kapsle se mohou plnit tekutou formou směsi předkládaného vynálezu. Tvrdé kapsle se mohou plnit lyofilizovaným práškem směsi předkládaného vynálezu nebo může být lyofilizovaný prášek směsi předkládaného vynálezu slisován do tablet pro rektální aplikaci nebo orální podávání.

Směs předkládaného vynálezu se může pochopitelně také dodávat v předplněných injekčních stříkačkách pro vlastní aplikaci.

- 5 Směs předkládaného vynálezu se může uchovávat při normálních teplotách například mezi +10 a 30 °C nebo při teplotách běžných v lednici, nejlépe mezi +2 a +8 °C.

Vynález se také vztahuje k novému použití a metodám aplikace, které využívají výše uvedené sole a/nebo směsi zejména pokud jde o léčbu poruch spojených buď s tvorbou oxidu dusnatého (NO), nebo s narušenými funkcemi NO-systému, zejména hypertenzí, angínou, impotencí, oběhovým a septickým šokem, mrtvicí, zánětem, syndromem respirační tísně, adhezí a agregací krevních destiček a leukocytů, endoteliální dysfunkcí, gastrointestinálními lézemi, porušením peristaltiky, diabetem, pankreatitidou, hypotenzí a Parkinsonovou nemocí; disfunkcí nebo hyperfunkcí somatosenzorických nervů, zejména sensorické neuropatie, postherpetické neuralgie, atopické dermatitidy, zhoršenou léčbou poraněných pletiv, získanou chladnou a teplou kopřivkou, lupénkou, bulózním pemfigoidem, ekzémem, fotodermatózou, chronickou artritidou, gastrointestinálními lézemi a specifickou nebo nespecifickou hyperaktivitou horní a dolní části respiračního traktu (astma, rinitida); poškozením endotelu; poraněních, vředech; pro léčbu stavů vztahujících se k akutním a/nebo chronickým zánětům, zejména chronické artritidy a poruch spojených s opožděnými typy hypersenzitivity a gastrointestinálními lézemi; pro léčbu jaterních poškození, orgánových lézí vyvolaných volnými radikály jako výsledek ozáření; potíží spojených s poruchami katecholaminergního systému, zejména schizofrenie, vliv amfetaminů, zneužití léčiv; stavů vyvolaných stresem; akutní pankreatitidy s dodatečným pozitivním dopadem na průvodní gastroduodenální patologii; srdečních poruch (zejména antiaritmická, antianginová a kardioprotektivní léčba); depresivních chorob; Parkinsonovy choroby a patologie chorob podobných Parkinsonově chorobě; poruch teploty; kostních defektů; poškození různých orgánů vyvolané hypertenzí; poruch koagulace; bolestivých poruch; křečovitých poruch; poranění míchy; poškození alkoholem vyvolané jeho zneužitím nebo zvýšeným příjmem; mozkových ischemických potíží; poškození periferních nervů, kataleptických a neuroleptických poruch; poruch spojených s nenormálními nebo mutovanými lymfocyty; poruch plodů; vaginální atrofie a vývoje osteoporózy vyvolané podmínkami ovariektomie; tumorů; virových onemocnění, zejména AIDS nebo ARC; gastrointestinálních lézí; poruch rozpoznání; abstinčních poruch; poruch ledvin a poruch buněčné imunitní odpovědi.

35 Předkládaný vynález se dále vztahuje k BPC peptidové soli nebo farmaceutické či diagnostické směsi podle předchozího výkladu, kde je obecný vzorec (II)

Xaa Zaa Pro Pro Pro Xaa Yaa Pro Ala Asp Zaa Ala Xaa Xaa Xaa (II).

40 Předkládaný vynález se vztahuje zejména k BPC peptidové soli nebo farmaceutické nebo diagnostické směsi obsahující sůl BPC peptidu podle výše uvedeného vzorce (I), kde je peptid vybrán ze skupiny skládající se z:

Leu Glu Pro Pro Pro Gly Lys Pro Ala Asp Asp Ala  
Leu Gly Val;

Gly Glu Pro Pro Pro Gly Lys Pro Ala Asp Asp Ala Gly Leu  
Val  
(také nazývaný BPC157);

Leu Glu Pro Pro Pro Leu Lys Pro Ala Asp Asp Ala  
Leu Gly Val;

Leu Glu Pro Pro Pro Leu Lys Pro Ala Asp Ala Leu  
Gly Val;

Gly Glu Pro Pro Pro Gly Lys Pro Ala Asp Ala Gly  
Leu Val;

Glu Pro Pro Pro Leu Lys Pro Ala;

Asp Pro Pro Pro Ile Arg Pro Ala Asp;

Glu Pro Pro Pro Leu Lys Pro Ala Asp;

Leu Glu Pro Pro Pro Leu Lys Pro Ala Asp Ala Leu  
Gly Val;

Gly Glu Pro Pro Pro Gly Arg Pro Ala Asp

a

Glu Pro Pro Pro Leu Lys Pro Ala Asn.

Tyto peptidy jsou známé z WO 94/11394 a WO 93/124521, jejichž obsahy jsou, pokud jde o přípravu a použití BPC peptidů, zahrnuté v předkládaném popisu.

5

Kromě toho mohou být peptidy připojeny k dalším funkčním a/nebo strukturním částem, jako jsou glycidy, tuky, proteiny nebo peptidy, protilátky, receptory, hormony, cytotoxické substance, značící substance, barviva, radioaktivní značky, imunomodulační činidla, léčiva, nosiče, cílové nebo signální substance atd.

10

Vynález se dále vztahuje k výše uvedeným BPC peptidovým solím a směsím, kde je peptid v lineární nebo cyklizované formě, zejména cyklizované amidovou vazbou mezi prvním a posledním aminokyselinovým zbytkem.

15

Přehled obrázků na výkresech

Vynález bude nyní vysvětlen podrobněji pomocí ilustrativních příkladů a doprovodných obrázků. Obrázky ukazují:

Obrázek 1 ukazuje IR spektrum NaBPC157.

Obrázek 2 ukazuje IR spektrum Na<sub>2</sub>BPC157.

Obrázek 3 ukazuje IR spektrum dicesiové sole BPC157 (Cs<sub>2</sub>BPC157).

Obrázek 4 ukazuje IR spektrum TRIS sole BPC157 (TRIS–BPC157).

5 Obrázek 5 ukazuje IR spektrum di–TRIS sole BPC157 ((TRIS)<sub>2</sub>BPC157).

Obrázek 6 ukazuje IR spektrum 2–aminopropanolové sole BPC157 (2–AMP–BPC157).

Obrázek 7 ukazuje IR spektrum triethanolaminové sole BPC157 (TEAM–BPC157).

10 Příklady provedení vynálezu

Příklad 1: Příprava monosodné sole BPC157 (NaBPC157).

15 0,5 g (0,35 mmol) pentadekapeptidu se sekvencí Gly Glu Pro Pro Pro Gly Lys Pro Ala Asp Asp Ala Gly Leu Val (BPC157) se rozpustilo v 10 ml vody s 29,6 mg hydrouhlíčitanu sodného (0,35 mmol), sterilizovalo filtrací přes 0,2 μ filtr a sublimace vysušilo, čímž vzniklo 0,48 g našedlé sušiny.

Čistota získané sole: 99,4% (HPLC).

20 Hmotnostní spektrum (FAB): 1419, vyšší ionty při 1441 (M<sup>+</sup>Na<sup>+</sup>).

Analýza aminokyselin získané peptidové sole po 72 hodinách hydrolyzy pomocí 6N–HCl v uzavřených zkumavkách při 110 °C dala hodnoty odpovídající složení: 3Gly, 4Pro; 2Ala, 2Asp, Glu, Leu, Val, Lys.

IR spectrum (KBr): Obrázek 1.

25 UV spectrum (H<sub>2</sub>O): lambda max=190 nm, žádné jiné maximum.

Teplota tání: 288 až 290 °C (dekompozice).

Příklad 2: Příprava disodné sole BPC157 (Na<sub>2</sub>BPC157)

30

0,5 g (0,35 mmol) BPC157 se rozpustilo v 10 ml etanolu. Za mírného míchání se přidalo 1,4 ml 0,5 mol/l metanolového roztoku hydroxidu sodného. Tento roztok se sterilizoval filtrací přes filtr 0,2 μ a pak se pomalu přidával za současného pomalého míchání k dietyleru (50 ml). Oddělená bílá tuhá látka dvojsodné sole po přefiltrování a promytí dietylerem měla hmotnost 0,52 g.

35 Čistota získané sole: 99,4% (HPLC).

Hmotnostní spektrum (FAB): 1419, vyšší ionty při 1441 (M<sup>+</sup>Na<sup>+</sup>), 1464 (M<sup>+</sup>Na<sub>2</sub><sup>+</sup>).

Analýza aminokyselin získané peptidové sole odpovídá složení: 3Gly, 4Pro, 2Ala, 2Asp, Glu, Leu, Val, Lys.

IR spektrum (KBr): Obrázek 2.

40 UV spektrum (H<sub>2</sub>O): lambda max=190 nm, žádné jiné maximum.

Teplota tání: 275 až 277 °C.

Příklad 3: Příprava dicesné sole BPC157 (Cs<sub>2</sub>BPC157)

45

0,5 g (0,35 mmol) BPC157 se rozpustilo v 8 ml vody obsahující 114 mg uhličitanu cesného (0,70 mmol), sterilizovalo filtrací přes 0,2 μ filtr a zlyofilizovalo, čímž vzniklo 0,55 g šedobílé sušiny.

Čistota získané soli: 99,3% (HPLC).



Hmotnostní spektrum (FAB): 1419, vyšší ionty při 1551 ( $M^+Cs^+$ ), 1684 ( $M^+Cs_2^+$ ).

Analýza aminokyselin u získané peptidové sole odpovídá složení: 3Gly, 4Pro, 2Ala, 2Asp, Glu, Leu, Val, Lys.

IR spektrum (KBr): Obrázek 3.

5 UV spektrum ( $H_2O$ ):  $\lambda_{max}=190$  nm.

Teplota tání: 268 °C

Příklad 4: Příprava TRIS sole BPC157 (TRIS–BPC157)

10

0,5 g (0,35 mmol) BPC157 se rozpustilo v 10 ml metanolu s 42,6 mg (0,35 mmol) tris–(hydroxymethyl)aminometanu (TRIS), sterilizovalo filtrací přes 0,2  $\mu$  filtr a vysušilo odpařením metanolu pod vakuem při 40 °C. Tak se získalo 0,56 g bílé pevné látky.

Čistota získané soli: 99,5% (HPLC)

15 Hmotnostní spektrum (FAB): 1419 ( $MH^+$ ).

Analýza aminokyselin u získané peptidové sole odpovídá složení: 3Gly, 4Pro, 2Ala, 2Asp, Glu, Leu, Val, Lys.

IR spektrum (KBr): Obrázek 4.

UV spektrum ( $H_2O$ ):  $\lambda_{max}=190$  nm.

20 Teplota tání: 250 °C (dekompozice).

Příklad 5: Příprava di–TRIS sole BPC157 ( $(TRIS)_2BPC157$ )

25 Sloučenina se připravila stejným postupem jako v Příkladu 1 s tím rozdílem, že se použilo 85,2 mg (0,70 mmol) TRISu.

Čistota získané soli: 99,5% (HPLC)

Hmotnostní spektrum (FAB): 1419 ( $MH^+$ ).

30 Analýza aminokyselin u získané peptidové sole odpovídá složení: 3Gly, 4Pro, 2Ala, 2Asp, Glu, Leu, Val, Lys.

IR spektrum (KBr): Obrázek 5.

UV spektrum ( $H_2O$ ):  $\lambda_{max}=190$  nm.

Teplota tání: 188 až 193 °C.

35

Příklad 6: Příprava 2–aminopropanolové sole BPC157 (2–AMP–BPC157)

Sloučenina se připravila postupem popsaným v Příkladu 1. Jako báze se použil 2–aminopropanol (2–AMP).

40 Čistota získané soli: 99,6% (HPLC)

Hmotnostní spektrum (FAB): 1419 ( $MH^+$ ).

Analýza aminokyselin u získané peptidové sole odpovídá složení: 3Gly, 4Pro, 2Ala, 2Asp, Glu, Leu, Val, Lys.

IR spektrum (KBr): Obrázek 6.

45 UV spektrum ( $H_2O$ ):  $\lambda_{max}=190$  nm.

Teplota tání: 158 °C (dekompozice).

## Příklad 7: Příprava trietanolaminové sole BPC157 (TEAM–BPC157)

Sloučenina se připravila postupem popsaným v Příkladě 1. Jako báze se použil Trietanolamin (TEAM).

5 Čistota získané soli: 99,2% (HPLC)

Hmotnostní spektrum (FAB): 1419 (MH<sup>+</sup>).

Analýza aminokyselin u získané peptidové sole odpovídá složení: 3Gly, 4Pro, 2Ala, 2Asp, Glu, Leu, Val, Lys.

IR spektrum (KBr): Obrázek 7.

10 UV spektrum (H<sub>2</sub>O): lambda max=190 nm.

Teplota tání: 202 až 205 °C.

## Příklad 8: Příprava tablet obsahujících TRIS–BPC157

15

Složení	mg/tabletu
TRIS–BPC157	0,5
trehalóza	20,0
laktóza	17,0
škrob	6,5
talek	3,0
tragant	2,5
magnesium stearát	0,5
	50,0 mg

TRIS–BPC157 (0,5 mg) a trehalóza (20 mg) se rozpustily v 1 ml vody a vysušily odpařením. Po vysušení byl zůstatek pro přípravu tablet smíchán s ostatními složkami.

20

## Příklad 9: Příprava kapslí obsahujících NaBPC157.

Složení	mg/kapsli
NaBPC157	0,5
trehalóza	60,0
laktóza	39,0
magnesium stearát	0,5
	100,0 mg

25

NaBPC157 (0,5 mg) a trehalóza (60 mg) se rozpustily v 1 ml vody a vysušily odpařením. Po vysušení byl zůstatek pro přípravu kapslí smíchán s ostatními složkami.

Příklad 10: Příprava roztoku obsahujícího NaBPC157

Složení	g/25 ml
NaBPC157	0,05
glycerol	15,00
benzyl alkohol	0,01
pufr o pH 7,0 do	25 ml

5

Příklad 11: Příprava krému s TRIS-BPC157.

Složení	g/25 g
TRIS-BPC157	0,05
emulsifikační látka	2,80
oleum arachid hydrogen	7,08
Tween® 60	12,08
propylen glykol	3,00
methylhydroxy benzoát	0,07
	25,0 g

10

Příklad 12: Testy stability

Stabilita BPC peptidových solí se testovala inkubací solí po dobu 76 a 120 dní při teplotě 40 °C. Koncentrace BPC peptidových solí ve vodném roztoku byla 0,2% (hmotnost/objem). Stabilita se měřila pomocí HPLC: kolona Kromasil 100, 5 $\mu$ , 150x4,6 mm, mobilní fáze 0,1 % kyselina tri-fluoroctová ve vodě/acetonitrilu (od 0 do 50 obj.%), eluční gradient v 25 minutách, průtok 1 ml/min, detekce: UV při 214 nm.

20

Pro srovnání se použily volné BPC peptidy a jejich monoacetáty.

Tabulka 1. Stabilita BPC peptidových solí při 40 °C ve dnech 0, 76 a 120; % plochy v pokusu (HPLC).

Směs	pH-hodnota; 0,2% ve vodě	0 den	76 den	120 den
volný peptid BPC157	4,46	99,3	98,1	97,4
monoacetát peptidu BPC157	4,53	99,2	97,8	95,3
sodná sůl BPC157	6,51	99,4	99,5	99,4
dvojsodná sůl BPC157	7,64	99,4	99,7	99,4
TRIS sůl BPC157	6,31	99,5	99,5	99,4
diTRIS sůl BPC157	8,24	99,5	99,5	99,5
2-AMP sůl BPC157	8,20	99,6	99,4	99,5
TEAM sůl BPC157	7,61	99,2	99,3	99,1

5 Data předkládaná v této tabulce zřetelně dokazují zvýšenou stabilitu BPC peptidových solí vynálezu ve srovnání s volnými BPC peptidy nebo jejich monoacetáty. Kromě toho injekce těchto roztoků nejsou bolestivé a nezpůsobují nekrózy – pravděpodobně díky vysoké hodnotě pH roztoku BPC peptidové sole.

10 V jiném samostatném experimentu se pozorovalo po přidání trehalózy další zvýšení stability BPC peptidových solí předkládaného vynálezu v surové formě a v roztocích. Proto přidání trehalózy, jako farmaceuticky přijatelné přísady pro přípravu farmaceutických směsí, zejména ve formě tablet nebo kapslí, je další důležitou stránkou předkládaného vynálezu.

15 Následující příklady popisují experimenty demonstrující farmaceutické aktivity BPC peptidových solí předkládaného vynálezu. Tyto experimenty se uskutečnily s použitím různých modelů „in vitro“ a „in vivo“. Pokud není uvedeno jinak, použila se pro tyto experimenty (mono) sodná sůl BPC peptidu 157 (zkratka: NaBPC157). Ve všech experimentech se použili (není-li uvedeno jinak) samci krysy Wistar, vážící 250 až 28 g.

20 Příklad 13: NO SYSTÉM

Úvod:

25 Oxid dusnatý (NO) slouží jednak jako signální molekula v endoteliálních a nervových buňkách a jednak jako zabíječská molekula (killer molecule) aktivovaná imunitními buňkami. Nedávné výzkumy ukázaly, že se může využít jako lék při inhalaci. Obecně se zdá, že jak nadbytek, tak nedostatek NO způsobuje, nebo se účastní na řadě poruch, zejména hypertensi, angíně, impo-

tenci, oběhovém šoku, septickém šoku, mrtvici, zánětu, syndromu respiračních potíží, plicní hypertenzi, adhesi a agregaci krevních destiček a leukocytů, diabetu, hypotenzi a Parkinsonově chorobě.

5 Materiál a metody:

U krys se testovaly některé z účinků NaBPC157 (10 µg nebo 10 ng/kg), jako například prospěšné aktivity proti žaludečním lézím a aktivita NaBPC157 týkající se udržení krevního tlaku. Léze se vyvolaly jednodůdinnou aplikací etanolu (96%, i.g. (intragastrikálně – nitrožaludečně)).  
10 Současně se aplikoval NaBPC157 (i.p. (intraperitoneálně)). Při experimentech s udržením krevního tlaku byl NaBPC157 podáván intravenózně (i.v.).

Také se zkoumala kombinovaná aplikace N<sup>G</sup>-nitro-L-arginin metylesteru (L-NAME) (5mg/kg i.v.), kompetitivního inhibitoru tvorby endoteliálního oxidu dusnatého (NO), a NO prekurzoru L-argininu (200 mg/kg i.v.) (D-arginin byl neúčinný). V pokusech s gastrickými lézemi se NO  
15 látky aplikovaly 5 minut před etanolovým poškozením a aplikací NaBPC157.

Výsledky:

20 V etanolovém modelu měl samostatně podávaný NaBPC157 protivředový účinek stejně jako L-arginin. NaBPC157 zabránil jinak vážným žaludečním lézím, které vznikly po působení etanolu u kontrolních krys. L-NAME neměl žádný vliv. L-NAME zcela potlačil aktivitu L-argininu, ale pouze zeslabil aktivitu NaBPC157. Po aplikaci kombinace L-NAME + L-argininu se aktivita NaBPC157 dále zhoršila.

25 Ve studiích s krevním tlakem má NaBPC157 (bez vlivu na základní normální hodnoty) ve srovnání s L-argininem jak maskující účinek (na porušený zvýšený krevní tlak působením L-NAME, je-li aplikován preventivně a snižuje hodnoty už zvýšené po aplikaci L-NAME, je-li podávaný v čase maximálního zvýšení krevního tlaku působením L-NAME (tj. 10 minut po L-NAME))  
30 tak preventivní účinek (předběžným podáním NaBPC157 se zabránilo nevelkému poklesu krevního tlaku vyvolaného L-argininem). Když se podal NaBPC157 10 minut po aplikaci kombinace L-NAME + L-arginin (kombinace stále vedoucí ke zvýšení krevního tlaku), jeho jasný účinek (pozorovaný u krys, na které se působilo L-NAME) zmizel. V podmínkách in vitro (v homogenátu pletiva ze žaludeční sliznice krys) NaBPC157 podaný ve stejné dávce (100 µM) jako L-  
35 arginin indukoval srovnatelnou tvorbu NO. Ale vliv NaBPC157 nemohl být inhibován L-NAME dokonce ani desetinasobně (100 proti 1000 µM) vyšší dávkou než tou, která je nezbytná pro inhibici účinku L-argininu. Na druhé straně byla syntéza NO snížena při kombinaci NaBPC157 a L-argininu. Shrnutí, NaBPC157 mohl určitým způsobem interferovat s účinkem NO jak na integritu žaludeční sliznice, tak na udržení krevního tlaku zejména v kombinaci s L-argininem, s tím,  
40 že má význačnější a/nebo zvlášť odlišný účinek na NO.

Díky tomu, že má NaBPC157 významnější účinek na NO než L-arginin, mohl by zabránit vedlejším účinkům spojeným s nadměrným tvořením NO (narušený účinek L-argininu (např. hypotense)). Tyto vedlejší účinky se vrátily k normálním hodnotám in vivo a zabránilo se nadměrné  
45 tvorbě NO in vitro. Navíc se odstranily negativní důsledky inhibice NO-systému (např. prevence zvýšení krevního tlaku po působení L-NAME a navrácení již zvýšeného tlaku po aplikaci L-NAME).

Na základě blízké podobnosti NO testů v dalších pletivech (např. plíce, játra, cévy atd.) a rozmanitosti užitých modelů (žaludeční léze a udržení krevního tlaku) jsou uvedené prospěšné účinky NaBPC157 zřejmé jak pokud jde o nadměrnou tvorbu NO, tak i narušené funkce NO systému. BPC peptidové sole předkládaného vynálezu jsou zejména užitečné pro léčení hypertenze, anginy, impotence, oběhového šoku, septického šoku, mrtvice, zánětů, syndromu respirační tísně, plicní hypertenze, pankreatitidy, adheze a agregace krevních destiček a leukocytů, endoteliálních  
55 disfunkcí a Parkinsonovy choroby.

## Příklad 14: Somatosenzorické neurony

## Úvod:

5 Somatosenzorické neurony se obecně účastní řízení homeostáze, zejména u reakcí, které narušují homeostázi. Tyto neurony mohou detekovat potenciální nebezpečí. Neurony jsou (skrve sebe, per se) schopné okamžitě iniciovat příslušné opatření pro zmírnění nebezpečí. Vazoaktivní aferentní neurony tedy představují systém první obrany proti traumatu. Obecně byly jejich ochranné schopnosti doloženy experimentálním poškozením kůže a gastrointestinální sliznice. Při 10 řadě potíží hrají roli buď disfunkce, nebo hyperfunkce, zejména u vrozené senzorycké neuropatie, senzorycké neuropatie vyvolané diabetem, herpes zooster, postherpetické neuralgie, atopické dermatitidy, zhoršeného hojení poraněných pletiv (např. přetrvávající poranění kůže, zhoršení kožních lézí vyvolaných kyselinami a tvorbě keratitidě podobných lézí na rohovce), získané chladné a teplé kopřivky, lupénky, ekzému, bulózního pemfigoidu fotodermatózy, poruch horních a dolních dýchacích cest, specifické a nespecifické hyperreakivity, vázomotorické rýmy, 15 astmatu, chronické artritidy a gastrointestinálních lézí.

## Materiály a metody:

20 Zjišťoval se gastroprotektivní účinek NaBPC157 na žaludeční léze (vyvolané u krys působením 96% etanolu, kontrolovaným stresem a aplikací indometacinu (indomethacin). Možný vliv smyslových neuronů na prospěšné účinky NaBPC157 (10 µg/kg, 10 ng/kg i.p.) se studoval s kapsaicinem, který má velmi zřetelné účinky na smyslové neurony: vysoká dávka podávaná 25 dospělým zvířatům (125 mg/kg s.c., (subkutánně), stáří tři měsíce), nebo podávání (50 mg/kg s.c.) novorozeným zvířatům (sedm dní starým) zničí smyslová vlákna, zatímco nízká dávka (500 µg/kg i.p.) aktivuje uvolnění neurotransmiteru a ochranné účinky na sliznice.

## Výsledky:

- (i) Při nepřítomnosti kapsaicinu NaBPC157 ochraňoval žaludeční sliznice proti etanolu, kontrolovanému stresu a aplikaci indometacinu. 30
- (ii) Při neurotoxických dávkách kapsaicinu je negativní účinek kapsaicinu na kontrolovaným stresem vyvolané, etanolové nebo indometacinové léze vždy ovlivněný prospěšnou aktivitou NaBPC157. Ochranný vliv NaBPC157 byl stále zřejmý u modelů ve všech pokusech, kde se použil kapsaicin (buď použitý u dospělých jedinců, nebo nově narozených mláďat). Po působení kapsaicinu na nově narozená mláďata se dosáhlo úplného zrušení gastroprotektivního 35 účinku NaBPC157, jestliže byl tento aplikován jednotlivým ng-způsobem. Ochrana sliznic se plně obnovila, když se stejná dávka aplikovala denně.
- (iii) Ve spojení s excitační dávkou kapsaicinu se prospěšný účinek NaBPC157 dále zvyšuje.
- 40 Celkově tyto údaje demonstrují komplexní synergickou interakci mezi prospěšnou aktivitou NaBPC157 a peptidergickou senzoryckou aferentní neuronovou aktivitou. Vezme-li se v úvahu značná podobnost účinku kapsaicinu u zvířat a lidí, může být NaBPC157 použit (ve světle výše uvedených experimentů) pro léčení výše uvedených poruch.

## Příklad 15: Ochrana endotelu

## Úvod:

50 Je známé, že poranění cévního endotelu předchází vývoji a je nutným předpokladem pro vážná poškození orgánů. Ochrana endotelu by mohla omezit škodlivé následky ischemie na integritu sliznic. Jako užitečný model se široce používá aplikace Monastral Blue krysám krátce před aplikací nekrotizujícího činidla (např. do žaludku aplikovaný etanol) o kterém se ví, že vytváří velké léze.

## Materiál a metody:

Všem kryšám byl aplikován intravenózně (i.v.) Monastral Blue (MB) (Sigma Company, USA) (1 ml/kg tělesné hmotnosti) 3 minuty před působením etanolu. Krysy se pak usmrtily za 1 minutu po působení etanolu. NaBPC157 (10,0 µg/kg i.p.) nebo fyziologický roztok (5,0 ml/kg i.p.) se aplikovaly 1 hodinu před působením etanolu. Ihned po usmrcení se vyjmul žaludek a nezávislí pozorovatelé zhodnotili léze. Pro histologickou analýzu se dále zpracovaly reprezentativní části žaludku a dvanácterníku.

Cévní poškození se hodnotilo také technikou využívající Monastral Blue (MB) v časných fázích experimentu (1 minutu po působení etanolu). Plošná hustota obarvené sliznice se hodnotila pomocí TEM.

## Výsledky:

Opakovaně se pozorovala značná redukce obarvení MB u skupin, kde se aplikoval NaBPC157. Blízká podobnost použitých modelů s lidskými ukazuje možnost použít NaBPC157 pro léčení stavů spojených s poškozením endotelu při léčbě lidí.

Příklad 16: Angiogeneze

## Úvod:

Angiogeneze má zásadní význam pro tvorbu granulační tkáně a léčbu zranění a/nebo vředů. S použitím všeobecně známých metod se studovaly angiogenní vlastnosti.

## Materiál a metody:

Každé kryse byly implantovány subkutánně v oblasti beder dva sterilní tampóny (1 x 1 x 0,25 cm (V=0,25 ml)) se stejným množstvím NaBPC157 (roztok 50 µg, 10 µg a 10 ng/ml) nebo referenčních látek – cimetidin (10 mg, 100 mg, 500 mg/ml), ranitidin (2,5 mg, 25 mg, 250 mg/ml), famotidin (10 mg, 50 mg, 100 mg/ml) a sukralfát (1 mg, 5 mg, 10 mg/ml). Tampóny se odstranily za tři a za sedm dní. Po jejich fixaci ve formalinu následovalo zpracování pro histologické a histochemické zhodnocení a morfometrickou analýzu. Používal se mikroskop DIAPLAN firmy Leitz, pro morfometrickou analýzu se použil program „SFORM“ vytvořený firmou VAMS (Záhřeb, Chorvatsko).

## Výsledky:

Jako cenné kvantitativní měřítko reakce hostitele na cizí těleso (body) se běžně používá hodnocení nově vytvořeného granulačního pletiva okolo implantovaného tampónu. Experimenty s kryšami usmrcenými tři dny po implantaci ukázaly toto: ve skupině zvířat ošetřených NaBPC157 bylo možné pozorovat podstatně více granulačního pletiva než v kontrolní skupině. Podobné výsledky se pozorovaly u kryš ošetřených sukralfátem, a to u všech použitých koncentrací. Naproti tomu nebyl rozdíl mezi kontrolními a pokusnými hodnotami u všech tří skupin, kde se aplikovaly H<sub>2</sub>-blokátory. U zvířat analyzovaných sedm dní po implantaci se od kontrolní skupiny významně lišily jednak ty, kde byly aplikovány všechny tři koncentrace sukralfátu a pak ty, kde se použila nejvyšší koncentrace NaBPC157 (50 µg). Kontrolní hodnoty u obou zkoušených termínů se významně nelišily.

Uvnitř nově vytvořeného granulačního pletiva se počítaly endoteliální prostory. V porovnání s kontrolními hodnotami (počet nově vytvořených endoteliálních prostorů u kontrolní skupiny tři dny po implantaci byl 7,94±1,23 a sedm dní po implantaci 14,8±3,12) všechny použité substance způsobily významné zvýšení hodnot u obou intervalů (třetí a sedmý den). Kromě důkazu, že

různé protivředové látky mají stejné angiogenní vlastnosti, NaBPC157 také stimuluje (stejně jako sukralfát) granulaci. NaBPC157 se tak může použít pro vyvolání a podporu procesu hojení zejména poranění a/nebo při léčení vředů.

5

#### Příklad 17: Zánět

##### Úvod:

10 V současnosti používané protizánětlivé látky jsou většinou hodnocené pomocí mnoha vhodných modelů, které věrně představují akutní a/nebo chronické zánětlivé poruchy u lidí. Jako vážný vedlejší efekt těchto látek se ale objevují vážné gastrointestinální léze.

15 U NaBPC157 byla zaznamenána akutní protizánětlivá a analgetická aktivita (např. terpentýnem, karaginem, kyselinou octovou nebo  $MgSO_4$  vyvolané kroucení v ((prostaglandin–dependentních nebo prostaglandin nedependentních) testech bodnutí do ocasu) společně s antipiretickým účinkem (pokles kvasinkami indukované horečky (4000 mg/kg s.c.)). Následovně byly současně sledovány u krys jeho známé prospěšné účinky na gastrointestinální léze, jeho vliv na chronické zánětlivé léze jako je adjuvanční artritida a jeho vliv jako nesteroidního protizánětlivého činidla u  
20 NSAIA indukovaných gastrointestinálních lézí.

##### Materiál a metody:

25 U studií gastrointestinálních lézí (indometacin (30 mg/kg s.c.), aspirin (400 mg/kg i.g.) a diklofenak (125 mg/kg i.p.)) byl NaBPC157 (10  $\mu$ g nebo 10 ng/kg i.p.) podáván pravidelně buď současně s a/nebo jednu hodinu před podáním látky (indometacin). U studií adjuvanční artritidy (aplikace 0,2 ml Freundova adjuvans do ocasu) (14 dní, 30 dní, 1 rok) se NaBPC157 (10  $\mu$ g nebo 10 ng/kg i.p.) podal při jedné aplikaci (buď 1 hodinu před nebo po aplikaci Freundova adjuvans) nebo v režimu jedenkrát denně (0 až 14 den, 14 až 30 den a 14 den až 1 rok).

30

##### Výsledky:

35 Byl-li podáván společně se zkoumaným NSAIA, omezil NaBPC157 pravidelně jinak významné léze v žaludku u kontrolních krys a také léze v tenkém střevě u indometacinových skupin. Při studiích artritidy vyvolané adjuvans byl vývoj lézí značně omezen po jedné aplikaci NaBPC157 a ještě více omeze nu krys, kterým byl NaBPC157 podáván denně. Při terapii již vzniklé adjuvanční artritidy se prospěšný vliv NaBPC157 trvale objevoval po pouhých 2 týdnech léčení a byl zcela zřejmý po jednom roce aplikace. Tato data ukazují protizánětlivý a ochranný účinek NaBPC157 na integritu sliznice.

40

45 Je známo, že se na zprostředkování adjuvanční artritidy podílí dva odlišné mechanismy – zánět a opožděná hypersenzitivita. NaBPC157 má pozitivní vliv na oba dva. Při porovnání s referenčními standardy (např. aspirin, indometacin) byl NaBPC157 účinný ve značně nižších dávkách ( $\mu$ g a ng/kg oproti mg/kg). Tato počáteční účinnost v prevenci adjuvanční artritidy je ještě výraznější při denním podávání. Vyšší dávka (10  $\mu$ g/kg) byla účinná jak při jednorázovém tak při denním podávání, zatímco nižší dávky (10 ng/kg), které byly neúčinné při jednorázové aplikaci, se ukázaly jako účinné při denním podávání. Toto zjištění (ve spojení s terapeutickým účinkem NaBPC157 na plně rozvinutou artritidou) ukazuje na užitečnost aplikace během celého průběhu adjuvanční artritidy. Zaznamenaná účinnost NaBPC157 na adjuvanční artritidu (profylaktický/terapeutický účinek, rozvinutá/nerozvinutá adjuvanční artritida) nebyla pozorována u  
50 v současnosti používaných terapeutických látek. Glukokortikoidy jsou účinné pro prevenci adjuvanční artritidy jenom jsou-li aplikované denně, ale ne při krátkodobém léčení. Imunosupresanty (ve vysokých dávkách) a nesteroidní analgetika jsou účinné pouze při předběžném podávání nebo následném podávání.

55



Je tedy zřejmé (na základě blízké příbuznosti mezi použitým modelem a odpovídajícími lidskými poruchami), že NaBPC157 se svým ochranným účinkem na sliznici se může použít pro působení při situacích vztahujících se k akutnímu zánětu a chronické artritidě. Navíc se NaBPC157 může použít pro léčení potíží spojených s zpožděným typem hypersenzitivních poruch a gastrointestinálními lézemi indukovanými v různých částech gastrointestinálního traktu, zejména takových, jaké indukují činidla jako například NSAIA.

#### Příklad 18: Efekt akceptoru volného radikálu

##### Materiál a metody:

Hodnotil se hepatoprotektivní účinek NaBPC157 v porovnání s referenčními standardy, jako je například bromokriptin, amantadin a somatostatin v různých experimentálních modelech poškození jater u krys: 24-hodinové podvázání žlučovodu a jaterní tepny, 48 hodinový kontrolovaný stres a aplikace  $\text{CCl}_4$  (látka indukující volné radikály). NaBPC157 se aplikoval buď do žaludku (intragastricky), nebo intraperitoneálně.

##### Výsledky:

NaBPC157 významně zabraňoval vývoji nekrózy jater nebo tukovým změnám u krys, kterým byl podvázán na 24 hodin žlučovod nebo jaterní tepna, nebo které se podrobily 48 hodinovému kontrolovanému stresu nebo aplikaci  $\text{CCl}_4$  (1 ml/kg i.p., usmrcení po 48 hodinách). Ostatní referenční látky měly v těchto pokusech buďto malý, nebo žádný protektivní účinek. Laboratorní testy bilirubinu ukázaly, že se SGOT a SGPT plně shodovaly s makro/mikroskopickými nálezy. NaBPC157 se tedy může použít pro léčení jaterních onemocnění. Kromě toho je reprodukovatelným modelem pro studium dynamiky normalizace hematopoetických elementů myelosuprese způsobené ozářením. NaBPC157 vykazuje prospěšné vlivy na poškození kostní dřeně indukované subletálním ozářením. NaBPC157 se tak může použít k léčení kostní dřeně poškozené radiací. Vzhledem k obecně známému vlivu  $\text{CCl}_4$  na vznik volných radikálů a tvorbou lézí, lze také očekávat přínosný efekt aplikace NaBPC157 na léze na orgánech vyvolané dalšími volnými radikály, zvláště ozářením.

#### Příklad 19: Katecholaminergní systém

##### Úvod:

Nepřímo působící sympatomimetické látky, jako amfetaminy, mají společné vlastnosti, mezi které patří jak indukce zvýšené produkce katecholaminu, tak inhibice nového příjmu katecholaminu (především dopaminu) v nervových zakončeních centrální nervové soustavy (CNS). Zdá se, že výsledkem aktivace dopaminergického systému v corpus striatum je stereotypní chování. Obecně se předpokládá, že zvýšené šplhavé chování vyvolané amfetaminem je důsledkem zvýšené hladiny receptoru striatálního dopaminu po aplikaci haloperidolu, který je antagonistou dopaminu. To následně vyvolává zvýšenou citlivost na amfetamin. Aplikace NaBPC157 neovlivňuje základní chování ani nevyvolává stereotypy.

##### Materiál a metody:

Studoval se vliv NaBPC157 na doplňkové působení dopaminu na amfetaminové (10 mg/kg) stereotypy a dráždivost. NaBPC157 se aplikoval buď v rámci společného profylaktického ošetření, nebo v prospěšném terapeutickém režimu (10  $\mu\text{g}$  nebo 10 ng/kg i.p.). Stereotypní chování a dráždivost byly vyvolávány u krys.

Výsledky:

Pravidelně se zaznamenalo zmírnění a změna (aplikace při maximálním amfetaminovém rozrušení) stereotypního chování a zvýšené dráždivosti (např. náhlé silné záškuby, panické vyskakování a útěk).

Pozornost se dále zaměřila na sledování účinků NaBPC157 na zvýšené šplhavé chování myši. Myši byly předem ošetřeny, antagonistou dopaminu, haloperidolem (5,0 mg/kg i.p.) a následně se aplikoval amfetamin (20 mg/kg i.p. 1, 2, 4 a 10 dní po aplikaci haloperidolu), což je běžný postup při studiu stimulačního účinku amfetaminu na supersenzitivitu v chování. Pokud by se tedy ukázalo, že potlačení amfetaminového stereotypního chování je způsobeno antagonní aktivitou (přímou nebo nepřímou) testovaného NaBPC157 na dopamin, bylo by možné očekávat, že haloperidol vyvolá zvýšené amfetaminové šplhání. Když však byl NaBPC157 podán společně s haloperidolem, bylo zaznamenáno téměř úplné potlačení. Uvedené výsledky dokazují interakci NaBPC157 s dopaminovým systémem. Navíc interakce NaBPC157 s centrálním dopaminovým systémem se prokázala i u dalších experimentálních modelů (např. při ochraně proti stresovým vředům). Interakce s dopaminovým systémem byla zjištěna již dříve u mnoha známých peptidů (neurotensin, CCK, atd.). Aplikace NaBPC157 také ruší změny v chování vyvolané LSD (např. 0,3 mg/kg i.p.). NaBPC157 má schopnost vyvolávat změny dopaminového systému. V podmínkách zvýšeného uvolňování a syntetizování dopaminu indukovaném amfetaminem, by NaBPC157 mohl jak předcházet, tak bránit následnému rozrušení změnám chování (např. stereotypnímu chování). NaBPC157 by také mohl výrazně oslabit následky blokace receptorů dopaminu haloperidolem. To svědčí o tom, že účinek NaBPC157 zahrnuje také nahrazení jinak zcela nedostatečného dopaminového systému. Tím je zabráněno následné supersenzitivě dopaminových receptorů a zvýšenému amfetaminovému rozrušení.

NaBPC157 je tedy užitečný prostředek pro léčení schizofrenie, vlivu amfetaminu (schizofrenních forem psychózy) a zneužívání drog.

Příklad 20: Stres

Úvod:

Stres je definován jako nespecifický jev, který vede k poškození různých orgánů. Stresová reakce je definována jako odezva namířená proti různým poškozujícím vlivům. Jedním z nejčastěji používaných zvířecích stresových modelů je stres způsobený omezením vedoucí k závažným stresovým gastritickým lézím u krys. Poškozeny mohou být i další orgány.

Materiál, metody a výsledky:

Pokud byl NaBPC157 aplikován v dávce 10 µg nebo 10 ng/kg těl.hm., i.p. nebo i.g. 1 hodinu před vyvoláním stresu, bránil NaBPC157 výrazně jinak nevyhnutelné tvorbě těžkých gastritických lézí. Byla-li doba mezi aplikací látky snižující stres a indukci stresu (dále jen „perioda“) prodloužena, byly standardně používané protivředové látky prakticky neúčinné, narozdíl od jasného pozitivního účinku testovaného NaBPC157. NaBPC157 si zachoval tuto léčebnou aktivitu i při extrémně prodloužené periodě na 48 hodin. Ochranný účinek NaBPC157 zahrnoval zeslabení lézí, které se jinak pravidelně objevují na dalších orgánech (např. játrech, nadledvinkách, ledvinách, varlately, srdci, slinivce, slezině). Protože i další obecně známé stresové parametry jsou méně narušeny (tj. thymolymfatická involuce a kortikální hypertrofie nadledvinek), je zjevné, že NaBPC157 by mohl být aplikován při různých stresových podmínkách. NaBPC157 má pozitivní léčivý účinek na léze objevující se na různých orgánech souvisejících s nespecifickou stresovou patologií. Vzhledem k podobným řetězovým událostem u lidí jako u použitého modelu, je efekt ještě mnohem výraznější, protože NaBPC157 má léčebný účinek dokonce je-li aplikován při pokročilé stresové patologii (např. 24 hodin po indukci stresu).

## Příklad 21: Ukázka cytoprotektivního účinku

## Úvod:

5 Cytoprotekce byla původně definována jako schopnost chránit buňky před různými škodlivými látkami, tento efekt nezávislý na žaludeční kyselině byl zjištěn u žaludeční sliznice. Později byla tato definice rozšířena o ochranný účinek mimo gastrointestinální trakt zahrnující léze na různých orgánech (cytoprotekce–organoprotekce). Pro hodnocení pozitivního cytoprotektivního účinku NaBPC157 byl zvolen původní Robertsův model používaný při testování cytoprotektivních látek na gastritických lézích vyvolaných etanolem.

## Materiál, metody a výsledky:

15 NaBPC157 (10 µg nebo 10 ng/kg i.p.) měl profylaktický účinek (pokud byl aplikován 1 hodinu před nebo současně s 96 % etanolem (1 ml/krysa i.g.) a léčebný efekt (byl-li aplikován 1 hodinu po aplikaci etanolu v době maximální tvorby lézí).

20 Aby bylo vytvořeno prostředí prosté kyselin pro cytoprotektivní studie, byla provedena celková gastrektomie 24 hodin před indukci vředů. Škodlivé účinky cysteaminu (400 mg/kg s.c., usmrčení po 24 hodinách), který je dosud považován za kyselý duodenální ulcerogen, a cytoprotektivní účinek NaBPC157 (10 µg nebo 10 ng/kg i.p.) a dalších referenčních cytoprotektivních látek (citi-  
25 medin (50), ranitidin (10), omeprazol (10), bromocriptin (10) a atropin (10) (hodnoty uvádějí mg/kg i.p., 1 hodinu před cysteaminem), byly hodnoceny za nepřítomnosti žaludku a žaludečních kyselin. U neošetřených krych s intaktním žaludkem měly všechny použité látky přínosný efekt. U zvířat s odstraněným žaludkem aplikace sledovaných látek (např. NaBPC157 nebo referenční látky použité před aplikací cysteaminu) významně bránily vývoji jinak těžkých duodenálních lézí, které byly zaznamenány u kontrolních cysteaminových krych s odstraněným žaludkem. U skupin, kterým nebyl podán cysteamin, nebyl výskyt lézí zjištěn (laparotomie a gasterotomie pouze 24 hodin nebo 48 hodin po chirurgickém zákroku), ani nebyl zjištěn sklon k tvorbě lézí u laparotomických zvířat, kterým byl cysteamin aplikován. Tyto výsledky (stejně poškození cysteaminem, stejný ochranný účinek NaBPC157 a referenčních látek u krych po gastrektomii s intaktním žaludkem a bez žaludku, poškozující nebo ochranný účinek nezávisí na sekreci žaludečních kyselin) svědčí o cytoprotektivním účinku. Lze předpokládat analogii (léze nesouvisějící se žaludeční kyselinou) mezi gastritickými (např. etanol) a cysteaminovými duodenálními poškozeními. Vysoká „cytoprotektivní kapacita“, zjevně nezávislá na kyselině, byla společná pro všechny testované látky, ale nejmarkantněji se projevila u NaBPC157.

40 Protože se účinek NaBPC157 projevil už při mnohem nižších dávkách než u ostatních látek (např. µg nebo ng/kg vs. mg/kg), jeho účinnost (a terapeutické použití) může být rozšířeno i na léze na dalších orgánech. Účinnost jiných látek v jiných orgánech je způsobena taktéž jejich cytoprotektivním účinkem (např. somatostatin: léze na nadledvinkách, slinivce, játrech, plicích a gastrointestinálním traktu).

## 45 Příklad 22: Ukázka organoprotektivního účinku

## Úvod:

50 Pro rozšíření „cytoprotektivního“ účinku na účinek „organoprotektivní“ je obecně akceptováno hodnocení ochrany endotelu. Jasným indikátorem poškození žaludeční sliznice způsobeného etanolem u krych je studium pomocí Monastral Blue. Toto poškození je dobře rozpoznatelné díky schopnosti Monastral Blue vázat se na poškozený endotel.

## Materiál a metody:

Všem krysám byl podán Monastral Blue (MB) (Sigma Company, USA) (1,0 ml/kg těl.hm., i.v.) 3 minuty před etanolem a zvířata byla usmrcena 1 min po podání etanolu. 1 hodinu před aplikací etanolu byl zvířatům podán NaBPC157 (10 µg/kg i.p.) nebo fyziologický roztok (5,0 ml/kg i.p.). Ihned po usmrcení byl žaludek vyjmut a tvorba lézí hodnocena nezávislým pozorovatelem, jak již bylo dříve popsáno. Reprezentativní části žaludku a dvanácterníku byly připraveny pro další histologickou analýzu. Vaskulární poranění v časném období (1 minutu po aplikaci etanolu) bylo stanoveno pomocí Monastral Blue. Plocha obarvené sliznice byla zjištěna pomocí TEM.

## Výsledky:

U skupin ošetřených NaBPC157 byla shodně zaznamenána silná redukce MB-obarvení. Navíc při aplikaci NaBPC157 nebyly zaznamenány žádné negativní účinky, žádný vliv na různé základní parametry ani toxicita, a to ani při vysokých dávkách (např. g/kg těl. hm., i.p.).

Vzhledem k velkému rozšíření endotelových vaskulárních tkání v těle a zásadnímu významu ochrany endotelu při organoprotekci, může být NaBPC157 použit jako organoprotektivní látka u různých orgánových lézí.

## Příklad 23: Akutní pankreatitida

## Materiál a metody:

NaBPC157 byl testován na krysách jako ochranná nebo terapeutická látka při akutní pankreatitidě (vyvolané podvázáním žlučovodu). Ve stejnou dobu byl sledován efekt NaBPC157 na vznik průvodních žaludečních a dvanácterníkových lézí.

NaBPC157 (10 µg nebo 10 ng/kg b.w., i.p., i.g.) byl podáván profylakticky 1 hodinu před podvázáním, zatímco terapie byla prováděna denní aplikací 1 den po podvázání (poslední aplikace 24 hodin před usmrcením). Účinek byl hodnocen v denních intervalech až do konce pátého dne po podvázání.

## Výsledky:

Při předběžném ošetření bylo docíleno silné ochrany pankreatu. Zjevný léčebný efekt byl opakovaně zaznamenán, byla-li látka aplikována již v době silně rozvinuté pankreatitidy. U krys ošetřených NaBPC157 se hodnotil vznik nekrózy, otoku, neutrofilů a monocytů. Bylo zjištěno zjevně méně nekrózy, otoku a neutrofilů, ale více monocytů. Při hodnocení obsahu amylasu v séru byl zjištěn jejich výrazně nižší nárůst (při předběžné aplikaci NaBPC157) v porovnání s kontrolou nebo pokles původně zvýšených hodnot (při terapii pomocí NaBPC157). Současně s příznivým působením na pankreatitidu, byl u krys s podvázaným žlučovodem zaznamenán pozitivní vliv NaBPC157 na průběh tvorby žaludečních a dvanácterníkových lézí, jak při předběžné tak při následné aplikaci látky. Celkově vzato může být NaBPC157 použit pro ošetření akutní pankreatitidy se současným pozitivním účinkem na gastroduodenální patologii.

## Příklad 24: Účinek na kardiotoxicitu

## Materiál a metody:

Experimenty byly prováděny na krysách Albino Wistar a morčatech Hartley. Kardiotoxicita byla vyvolána pomocí roztoku chloridu barnatého (10 mg/kg těl. hm.), desipraminu (10 mg/kg), digitalis (celková dávka 6,5 mg/kg) a isoprenalinu (15 mg/kg) aplikovaného kanylou do krční žíly.

Navíc byla u zvířat indukována kardiomyopatie podáním doxorubicinu v několika dávkách (3 mg/kg, i.v., jednou týdně po dobu 13 týdnů) a jednorázově (7 mg/kg). Kardiotoxicita byla také vyvolána imobilizačním stresem jako nefarmakologické poškození myokardu. NaBPC157 byl aplikován, jak je níže popsáno:

5

1. Chlorid barnatý

a) předběžné ošetření (1 hodinu předem): NaBPC157 50 µg/kg, 10 µg/kg a 10 ng/kg, intraperitoneálně;

b) následné ošetření (po 60 sekundách): NaBPC157 10 µg/kg a 10 ng/kg, intravenózně;

10

2. Desipramin: NaBPC157 50 µg/kg a 50 ng/kg, intraperitoneálně 1 hodinu předem;

3. Digitalis: NaBPC157 50 µg/kg a 50 ng/kg, intravenózně v intervalech 15 minut;

4. Isoprenalin: NaBPC157 50 µg/kg a 50 ng/kg intravenózně 15 minut předem;

5. Imobilizační stres: NaBPC157 10 µg/kg a 10 ng/kg, intraperitoneálně, jednu hodinu před a bezprostředně po spoutání a po 24 a 48 hodinách imobilizace;

15

6. (a) chronická doxorubicinová toxicita: NaBPC157 10 µg/kg a 10 ng/kg, intraperitoneálně současně s doxorubicinem;

(b) akutní doxorubicinová toxicita: NaBPC157 10 µg/kg a 10 ng/kg, intraperitoneálně, 1 hodinu před doxorubicinem.

20

Při sledování arytmie byl u zvířat pod anestézií průběžně zaznamenáván elektrokardiogram. Každých 15 sekund nebo při poruchách rytmu, byly prováděny rozsáhlé záznamy při 50 mm/s nebo 100 mm/s. U dalších modelů byl zaznamenáván elektrokardiogram jednorázově nebo opakovaně se zvířaty pod krátkodobou anestézií při rychlosti posunu papíru 50 mm/s. Toxicita doxorubicinu byla hodnocena u srdce a dalších orgánů makroskopickým a mikroskopickým pozorováním a biochemickými metodami. Podobný postup byl použit při hodnocení imobilizačních testů.

25

Výsledky:

30

V modelových studiích sledujících vliv NaBPC157 na arytmie vyvolané chloridem barnatým, byl zaznamenán protiaritmický efekt látky. Byl-li NaBPC157 aplikován předem, zpomaloval a bránil vzniku arytmií a také snižoval nebo bránil vzniku ischemie. V experimentech, ve kterých byl NaBPC157 aplikován až po indukci, způsoboval NaBPC157 rychlý návrat k sinusovému rytmu a bránil vzniku arytmie.

35

NaBPC157 úplně zabránil poklesu tepové frekvence a poruchám vodivosti indukovaných desipraminem (PQ prodloužení a QRS rozšíření). NaBPC157 také bránil ventrikulární tachykardii související s proarytmickým účinkem desipraminu a těžkou atrioventrikulární blokací. Tento účinek závisí na použité dávce.

40

NaBPC157 má navíc selektivní účinek u kardiotoxicity indukované digitalis. NaBPC157 pozitivně působil při náhlé změně tepové frekvence a poruchách rytmu (ventrikulární extrasystola, ventrikulární tachykardie a atrioventrikulární blokace) tím, že těmto projevům předcházel nebo je oslaboval. Vliv NaBPC157 v ng dávkách na zpomalení vodivosti vyvolané toxickými dávkami digitalis, nebyl významný. Účinek byl více patrný při mikrogramových dávkách NaBPC157.

45

NaBPC157 jasně bránil vzniku ischemie a infarktu myokardu. Účinek byl více patrný při mikrogramových dávkách. Jednorázová intraperitoneální aplikace NaBPC157 formou předběžného ošetření zamezovala vzniku elektrokardiograficky prokazatelné ischemie a histologickému poškození myokardu v imobilizačních testech. Ischémii mírnili i následné podání NaBPC157 při zjevných elektrokardiografických změnách. Mikrogramové dávky NaBPC157 zvyšovaly napětí QRS komplexu, a to zvláště byly-li podány předem.

50

Aplikace NaBPC157 vede k významnému snížení patomorfologického nálezu při kardiomyopatii (těžké poškození myocytů a cévních stěn, a vakuolizace) vyvolané antracyklinem při jednorázové a, ve větším rozsahu, opakované, aplikaci doxorubicinu. Aktivita LDH je významně snížena, přestože jsou výrazně zvýšeny absolutní hodnoty.

5

Uvedené výsledky indikují, že NaBPC157 je prospěšnou antiarytmickou, antianginální a kardioprotektivní látkou.

#### 10 Příklad 25: Antidepresivní aktivita

Materiál a metody:

Různé antidepresivní látky mají také antiulcerózní aktivitu a modely, běžně používané při výzkumu vředů a depresí, jsou do značné míry shodné. Možnost účinného ovlivnění depresivního poškození primárně antiulcerózní látkou s cyto-/organo-protektivním účinkem jako je NaBPC157 byla sledována u dvou způsobů indukce depresí: test nuceného plavání (postup podle Porsolta) a metoda chronického nepředvídatelného stresu (po pěti dnech nepředvídatelného stresu podle protokolu, jednorázová denní aplikace látky během stresovacího postupu a vyhodnocení pomocí imobilizačního testu v otevřeném poli čtvrtý a šestý den medikace).

20

Výsledky:

V testu nuceného plavání byla doba imobilizace krys ošetřených NaBPC157 (10 µg, 10 ng, 10 pg/kg, i.p.) srovnatelná s aktivitou zvířat ošetřených 15 mg nebo 40 mg (i.p.) konvenčních antidepresiv, imipraminem nebo nialamidem. Po dalším ztížení experimentálních podmínek při testu chronického nepředvídatelného stresu nebyl imipramin účinný, zatímco NaBPC157 (10 µg, 10 ng) zlepšoval mobilitu chronicky stresovaných krys v závislosti na výši podané dávky.

30

#### Příklad 26: Model Parkinsonovy choroby

Materiál a metody:

V experimentu byly aplikovány látky vyvolávající Parkinsonovu chorobu, 1-methyl-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) (známý destrukcí dopamin nigrostriatálního systému produkcí volných radikálů) (30,0 mg/kg těl. hm., i.p. jednou denně po dobu šesti dnů a dále čtyři dny jedenkrát 50,0 mg/kg těl. hm., i.p.) nebo reserpin (látko vyčerpávající katecholaminové vezikula) (5,0 mg/kg těl. hm., i.p.). NaBPC157 (1,50 µg nebo 15 ng/kg těl. hm., i.p.) byl aplikován 15 minut před nebo 15 minut po podání MPTP. V pokusech s reserpinem byl NaBPC157 (10 µg nebo 10 ng/kg těl. hm., i.p.) podán 15 minut před reserpinem nebo, v případě již vzniklé úplné katalepsie, 24 hodin poté.

40

Výsledky:

45

NaBPC157 výrazně zlepšoval narušenou somatosenzorickou orientaci vyvolanou pomocí MPTP a snižoval hyperaktivitu indukovanou MPTP. Dále také NaBPC157 snižoval motorické abnormality (třes, akinezii, katalepsii, které byly jinak zcela nápadné u kontrol ošetřených pouze fyziologickým roztokem), které téměř zcela odstranil, zatímco u kontrol mělo ošetření MPTP letální průběh. V experimentech s reserpinem bránil NaBPC157 silně rozvoji jinak velmi výrazných projevů katalepsie. Pokud byl NaBPC157 aplikován 24 hodin poté, zvrátil průběh již vzniklé katalepsie. Kromě těchto hlavních účinků NaBPC157, bylo také zaznamenáno snížení reserpinové hypotermie (při předběžném ošetření NaBPC157) a zabránění dalšímu teplotnímu poklesu (při následné aplikaci NaBPC157).

55

Je známo, že oba výše zmíněné běžně používané zvířecí modely odpovídají lidským poruchám a jejich léčeni. NaBPC157 prokázal vysokou účinnost byl-li aplikován jak předběžně tak následně v  $\mu\text{g}$  a  $\text{ng}$  dávkách, a proto se zdá být vhodnou látkou pro léčeni Parkinsonovy choroby a dalších patologií podobných Parkinsonově chorobě. Navíc, pozorovaný účinek na reserpinovou hypotermii opravňuje k závěru, že NaBPC157 je vhodnou látkou pro léčeni poruch teploty.

#### Příklad 27: Působení na hojení kostních defektů

##### Materiál a metody:

Osteogenní působení kostní dřevě a TRIS-BPC157 na hojení segmentálních kostních narušení, byl sledován u 42 králíků po dobu šesti týdnů po operaci. Po poranění (byl vytvořen 0,8 cm osteoperiosteální defekt uprostřed obou radií) byl experiment s použitím kostní dřevě a TRIS-BPC157 (6 králíků v každé skupině) proveden následujícím způsobem: jako kontrola byla použita zvířata ošetřená pouze fyziologickým roztokem (2 ml intramuskulárně a 2 ml lokálně do každého kostního defektu) (skupina 1). U druhé a třetí skupiny byl každý kostní defekt ošetřen lokálně buď 2 ml vlastní kostní dřevě (7. den po operaci), nebo TRIS-BPC157 (10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  těl. hm., 7. a 14. den po operaci). U čtvrté, páté a šesté skupiny byl TRIS-BPC157 aplikován intramuskulárně (i.m.) buď 7., 9., 14. a 16. den po operaci (10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  těl. hm.), nebo jednou denně 7. až 21. den po operaci (10  $\mu\text{g}$  nebo 10  $\text{ng}/\text{kg}$  těl. hm.). Jako standardní ošetření bylo v sedmé skupině použito vyplnění kostního defektu autologním kortikálním transplantátem ihned po jeho vzniku.

Všechna experimentální zvířata byla usmrcena šestý týden po operaci. Hojení segmentálních kostních defektů bylo hodnoceno dvakrát týdně radiograficky a histologickými zkouškami.

##### Výsledky:

Paralelní porovnávání radiografií provedených ve čtyřech časových obdobích (povrch kalusu, mikrofotodensitometrie kostního defektu) a kvantitativní histomorfometrie ukázaly, že kostní dřevě injikovaná do kostního defektu a intramuskulární aplikace TRIS-BPC157 (zvláště při denní dávce 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  těl. hm. v průběhu 14 dní) významně zvyšovala hojení kostí ( $p < 0,001$ ). Tento účinek se shodoval s efektem autologního kortikálního transplantátu.

Z klinického hlediska je závažné, že kostní dřevě a TRIS-BPC157 (zvláště při denní dávce 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  těl. hm. v průběhu 14 dní) vyvolávaly hojení kostních defektů. Vzhledem k jednoduché aplikaci a nízkému riziku komplikací je lokálně aplikovaná autologní kostní dřevě a zvláště intramuskulárně podaná osteogenní látka, jako např. TRIS-BPC157, mnohem výhodnější, než jiné komplexnější chirurgické metody (např. kostní transplantáty, vaskularizované kostní transplantáty, Ilizarova metoda) používané k ošetření takových poškození u lidí.

#### Příklad 28: Působení na hojení zranění

##### Materiál a metody:

NaBPC157 byl použit pro hodnocení jeho vlivu na různé prvky procesu hojení. Za prvky důležité v procesu hojení jsou vznik granulovaných tkání, angiogeneze a produkce kolagenu. Působení NaBPC157 na vznik granulované tkáně, tvorba kolagenu a angiogeneze, stejně jako síla v tahu, byl testován u tří krysích modelů: 1) kožní řezná poranění, 2) anastomóza tračníku a 3) esofago-duodenální anastomóza. Ve vzorcích byl histologicky testován kolagen, reticulin a krevní vlásečnice pomocí počítání a morfometrickými metodami.

## Výsledky:

5 Ve všech experimentech byl zjištěn významný rozdíl mezi krysami ošetřenými NaBPC157 a kontrolami. Experimenty ukazují velmi přínosný účinek NaBPC157 v procesu hojení. Tohoto účinku bylo docíleno při různých způsobech aplikace, včetně aplikace ingastrické a lokální. U krys ošetřených NaBPC157 byla také zjištěna větší síla v tahu.

10 Vzhledem k blízké příbuznosti zvířecího modelu s odpovídajícími poškozeními u člověka a vysokému stupni podobnosti hojivého procesu u krys a u lidí, může být NaBPC157 použit při hojení poranění u lidí.

## Příklad 29: Působení na respirační poškození

## 15 Materiál a metody:

20 V experimentech byla použita morčata (Hartley, obou pohlaví, 500–700 g těl. hm.), u kterých byla prováděna pletizmografie celého těla při anestezii urethanem (1,5 g/kg i.p.), řízeném dýchání pod konstantním tlakem (0,98 kPa) a při uvolnění kosterní muskulatury suxamethoniem (0,2 mg/kg i.v.). Celkový objem vdechnutého vzduchu (mm, průměr ± SD) byl stanoven před a po aplikaci spasmogenních látek (histaminu, serotoninu, acetylcholinu, bradykininu, i.v.) nebo NaBPC157 (10 minut před opakovanou aplikací spasmogenu, i.v.).

## 25 Výsledky:

NaBPC157 inhiboval pokles objemu vdechnutého vzduchu vyvolaný serotoninem, histaminem, acetylcholinem, a bradykininem (10 µg/kg těl. hm., i.v. nebo 10 ng/kg těl. hm., i.v.).

30 Na základě zjištěného léčivého účinku NaBPC157 na bronchokonstrikci indukovanou spasmogenními látkami a známé podobnosti mezi použitým modelem a těmito stavy u člověka, je možné usoudit, že aplikace NaBPC157 bude úspěšná při léčení různých poškození souvisejících s bronchokonstrikcí a poškozeními dýchacího traktu.

## 35 Příklad 30: Vliv na syndrom plicní hypertenze

## Materiál a metody:

40 Současné pokusy popisují působení agonistů a antagonistů oxidu dusnatého (NO) a působení NaBPC157 na rozvoj syndromu plicní hypertenze a vznik tkáňových lézí u kuřat. Byly provedeny experimenty sledující akutní toxicitu. V těchto pokusech bylo jednorázovou aplikací podáno: fyziologický roztok (1 ml/kg, i.p.), NaBPC157 (10 µg/kg těl. hm.), L-NAME (NE – antagonistická / v dávkách 50, 100, 150 mg/kg těl. hm.) a L-arginin (NE – agonistická / 100 mg/kg těl. hm.) s jejich kombinací (L-NAME + NaBPC157, L-NAME + L-arginin)). Byl proveden histopatologický rozbor sleziny, srdce, jater a ledvin a hematologická analýza. Dále byly provedeny experimenty sledující chronickou toxicitu. Zvířata byla ošetřena denně po dobu pěti týdnů pomocí L-NAME (10 mg/kg těl. hm.), L-argininem (100 mg/kg těl. hm.), NaBPC157 (10 µg/kg těl. hm.) a jejich kombinací (L-NAME + NaBPC157, L-NAME + L-arginin) intraperitoneálně. Z každé skupiny, včetně kontrol (fyziologický roztok 1 ml i.p.), bylo každý týden usmrceno sedm 50 zvířat.

## Výsledky:

55 Aplikace L-NAME vyvolala u ošetřených kuřat PHS. Tomuto efektu bylo zabráněno při současné aplikaci L-argininu a NaBPC157. Při histopatologickém vyšetření jak akutní tak chronické



toxicity bylo zjištěno, že L-NAME působil těžké poškození tkání (nekrózy srdečních a jaterních buněk, nekrózy lymfatických buněk sleziny) zatímco L-arginin vyvolával převážně kongesce, otoky a hemoragii ve všech orgánech. Hematologická analýza prokázala významné snížení množství hemoglobinu a počtu leukocytů ve skupinách kuřat ošetřených L-NAME. Účinky L-NAME byly úspěšně inhibovány aplikací L-argininu a NaBPC157. NaBPC157 nevyvolával žádná poškození tkání ani orgánů.

Vezmeme-li v úvahu podobnost výše použitého zvířecího modelu s obdobnými poškozeními u člověka, může být NaBPC157 použit při léčení syndromu plicní hypertenze. Navíc je zřejmé, že jej lze s výhodou použít v komerčních chovech.

#### Příklad 31: Experimentální hypertenze

##### Materiál, metody a výsledky:

U hypertonických (Goldblattova hypertenze) zvířat se dvěma ledvinami (2K1C) nebo jednou ledvinou (1K1C), snižoval NaBPC157 rychle krevní tlak (např. 5 nebo 10 minut po injekci). Tento účinek trval 20 minut u 1K1C krys nebo 12 hodin u zvířat 2K1C. Tento účinek byl opakovaně zjištěn po druhé nebo třetí aplikaci po 24 až 48 hodinách. Podobně také u krys krmených delší dobu stravou s vysokým obsahem fruktózy (80 %) nebo soli (15 %), NaBPC157 výrazně snižoval krevní tlak na normální hodnotu. Tento terapeutický účinek je dlouhodobý a nevytvorila se k němu tolerance ani po šestiměsíčním užívání. Nebyl zaznamenán žádný vliv NaBPC157 na hodnotu bazálního krevního tlaku.

Kromě snížení jinak zvýšeného krevního tlaku, NaBPC157 výrazně zeslaboval nebo dokonce odstranil léze a poškození, které se za normálních podmínek objevují na různých orgánech, jako byly (po třítydenním krmení zvířat stravou se zvýšeným obsahem soli): velmi těžká hyalinní degenerace s výraznými parenchymovými hemoragiemi, degenerace stěn artérií, vakuolizace srdečních buněk, těžké kongesce (zvláště medulární) v nadledvinkách, těžké kongesce, parenchymatické hemoragie s hematurii v ledvinách a hemosideróza a erytrocytofagie ve slezině. U krys ošetřených NaBPC157 byly cévy mnohem méně poškozeny a také byla zjištěna menší vakuolizace stěn a nepřítomnost hemoragii. Navíc byla také u krys ošetřených NaBPC157 jasně potvrzena ochrana proti poškození fundu.

Při použití různých modelů hypertenze u zvířat byly v případě NaBPC157 (v dávce 10 µg nebo 10 ng/kg těl. hm., i.v., i.p. nebo i.g.) dosaženy shodné výsledky v různých režimech.

Vezmeme-li v úvahu podobnost výše použitého zvířecího modelu s obdobnými poškozeními u člověka, může být NaBPC157 použit při léčení hypertenze a různých poškození orgánů způsobených hypertenzí.

#### Příklad 32: Vliv na délku krvácení

##### Materiál a metody:

Byl hodnocen efekt 2-AMP-BPC157 na délku krvácení u myši a krys (s nebo bez předběžného ošetření heparinem) v souvislosti s jeho in vitro aktivitou na parametry krevní srážlivosti lidské krve.

##### Výsledky:

V základních podmínkách (2-AMP-BPC157, 10 µg, 10 ng, 10 pg, 1 pg, 10 fg/kg těl. hm., i.p. současně s ustrižením ocasu) byla jasně prokázána redukce délky krvácení u myši a krys a její

úroveň závisela na použité dávce látky. V experimentech, ve kterých byl použit heparin (1000 IU/kg i.p.) (2 hodiny před začátkem krvácení) k předběžnému ošetření, bylo pravidelně zjišťováno výrazné snížení doby krvácení u zvířat, jimž byl podán 2-AMP-BPC157 (10 µg nebo 10 ng/kg těl. hm., i.p.). V in vitro experimentech s lidskou krví nebyl zaznamenán žádný vliv látky (2-AMP-BPC157 v koncentraci 10 µg/ml, inkubace 1 hodinu) na parametry krevní srážlivosti. Lze tudíž očekávat působení na vrstvu endotelu.

Vezmeme-li v úvahu blízkou podobnost mechanismů krvácení u lidí a zvířat a obecně uznávaný význam modelů použitých pro testování látky, může být 2-AMP-BPC157 použit k ošetření poruch koagulace (např. heparinizace).

### Příklad 33: Působení na experimentální diabetes

Materiál, metody a výsledky:

Experimenty na krysách prokázaly, že intraperitoneálně podaný NaBPC157 (i.e. 10 µg/kg těl. hm.) bránil rozvoji diabetu indukovaného alloxanem nebo streptozotocinem. V průběhu čtrnácti dní byla zjištěna snížená glykosurie a méně ostrůvkových lézí. V našich předběžných pokusech jsme zjistili, že byl NaBPC157 účinný i v případě, byl-li aplikován v době již vzniklých čtrnáctidenních lézí vyvolaných alloxanem. V dalších experimentech bylo studium antidiabetického účinku NaBPC157 změřeno na aktivitu látky při intragastrické aplikaci. NaBPC157 (v dávkách 10 µg a 10 ng/kg těl. hm.) byl kombinován s aplikací alloxanu v dávce 300 mg/kg s.c. nebo 200 mg/kg těl. hm., s.c., předem (24 hodin nebo 1 hodinu před alloxanem, současně nebo po (48 hodin po aplikaci alloxanu). NaBPC157 obecně snižoval zvýšený obsah glukózy v séru a významně zvyšoval přežívání zvířat ošetřených alloxanem (tento efekt byl zvláště patrný při vyšších dávkách alloxanu). Je zajímavé, že kromě zvýšené hladiny glukózy v séru u zvířat, kterým byl aplikován alloxan, byl zaznamenán zvýšený výskyt lézí v žaludku u kontrolních diabetických krys. NaBPC157 významně snižoval u všech variant závažnost vředů nezávisle na způsobu ošetření. U myši byly získány v podstatě stejné výsledky.

Vzhledem k podobnosti lidské patologie a uvedených modelů a jejich širokému použití při testování aktivity látek, může být NaBPC157 použit při léčení diabetu.

Příklad 34: Působení proti bolesti

Materiál a hodnoty:

Působení NaBPC157 proti bolesti bylo hodnoceno porovnáním s referenčními standardy aspirinem a morfinem u různých experimentálních modelů přímé nebo nepřímé bolesti a neurotoxicity: svíjení zvířat (kyselina octová/síran manganatý), štípnutí do ocasu, horká deska a aplikace kapsaicinu.

Výsledky:

NaBPC157 (v dávce pohybující se v ng nebo µg/kg, i.p.) významně redukoval svíjení (zánětlivé a nezánětlivé), závislé a nezávislé na prostaglandinu) a na testování štípáním do ocasu. Při testech na horké desce, neměl NaBPC157, narozdíl od morfinu, žádný vliv u normálních zvířat. NaBPC157 byl podáván formou předběžného ošetření nebo jednou denně po dobu 14 dní po injekci kapsaicinu. V těchto experimentech NaBPC157 silně snižoval capsaicin-allodynia. Toto snížení účinku kapsaicinu nenastalo, pokud byl NaBPC157 aplikován po vznik somatosenzorické degeneraci neuronů způsobené kapsaicinem (aplikace pouze 14. den po kapsaicinu). Pokud tedy lze denní aplikací NaBPC157 zcela zamezit, jinak nevyhnutelnému somatoneuron depletion vyvolanému kapsaicinem, je také možné, že by účinky NaBPC157 mohly specificky souviset

s celistvostí somatosenzorických neuronů citlivých na kapsaicin a jejich ochranou (tj. primárně aferentní neurony s malým průměrem a unmyelinated (C-) nebo slabě myelinated (A-8) vlákny.

5 Vzhledem k tomu, že kapsaicin může vyvolávat v podstatě stejná poškození jak u lidí, tak u zvířat, může být NaBPC157 použit při léčení různých bolestivých stavů a také v případech provázených oslabením somatosenzorické funkce neuronů.

10 Příklad 35: Působení na křeče

Materiál a metody:

15 Účinek KBPC157 byl sledován při křečích vyvolaných bicculinem, picrotoxinem, strychninem a isoniazidem. KBPC157 (100 µg, 10 µg nebo 10 ng/kg těl. hm.) byl aplikován (i.p.) současně nebo 15 minut před aplikací látek vyvolávajících křeče (mg/kg těl. hm., i.p.): picrotoxinu (3), strychninu (6, 3 nebo 1,5), bicucullinu (2,5) a isoniazidu (800 mg).

Výsledky:

20 KBPC157 opakovaně pozitivně působil proti křečím, vyvolaným všemi použitými látkami (v závislosti na čase a dávce). Vzhledem k podobnosti těchto použitých modelů s podmínkami u člověka, může být KBPC157 použit při ošetření křečových stavů.

25 Příklad 36: Poškození páteře

Materiál a metody:

30 Poškození páteře bylo způsobeno u samců krys Albino Wistar řízeným tlakem (vaskulárním klipsem Aesulap 0,10–0,15 N) na odkryté páteři (na úrovni Th12) po dobu 30 sekund. Zvířata byla ošetřena pomocí KBPC157 (10 µg, 10 ng/kg těl. hm., i.p.) nebo fyziologickým roztokem ihned po poranění a pak jednou denně až do desátého dne po poranění. Zvířata byla usmrcena 24 hodin po poslední dávce.

35 Výsledky:

40 Experimenty byly hodnoceny pomocí podrobné klinické (hodnoceny denně, bodovým hodnocením 1 až 5) a mikroskopické analýzy. Při vyhodnocení bylo zjištěno výrazné zeslabení jinak přetrvávající paralýzy (u kontrolních krys) u krys ošetřených NaBPC157. Uvážíme-li podobnost těchto použitých modelů s podmínkami u člověka, může být NaBPC157 použit při terapii poškození páteře.

45 Příklad 37: Chronická intoxikace alkoholem

Materiál a metody:

50 Byl zkoumán vliv NaBPC157 na chronickou intoxikaci alkoholem. V pokusech byli použiti krysí samci Albino Wistar. Krysám byl podáván po tři měsíce alkohol, a to buď komerční whisky, nebo etanol (10 až 20% vodný roztok). Podávání NaBPC157 (10 µg, 10ng/kg brutto váhy), propranololu (10mg/kg brutto váhy) a ranitidinu (10 mg/kg brutto váhy), (kontrolním krysám byl podáván stejný objem fyziologického roztoku (5.0 ml/kg)), se dělo buď přímo do žaludku, nebo intraperitoneálně. Podávání přípravků sloužilo buď jako profylaxe (bylo podáno 10 dní před začátkem podávání alkoholu), nebo jako léčivo současně s podáváním alkoholu, či jako léčivo,

kdy podávání začalo po skončení dvouměsíční periody, to znamená v průběhu posledního měsíce pokusu.

Výsledky:

5  
 10  
 15  
 20  
 25  
 30  
 35  
 40  
 45  
 50  
 55

Přímé stanovení krevního tlaku ve vrátnici jasně ukázalo, že NaBPC157, stejně tak propranolol (podávané v jakémkoli výše zmíněném uspořádání) prokazatelně zabraňují, nebo dokonce snižují zvýšení krevního tlaku, který se zvýšil u kontrolních kryš. Naopak ranitidinová terapie vedla dokonce k většímu zvýšení krevního tlaku v žilách, než tomu bylo u kontrolních zvířat. Mimoto, podávání NaBPC157, více než tomu bylo u propranololu, je schopno značně zmírnit výskyt vývinu poškození žaludku u kryš, kterým byl podáván alkohol. Podobný prospěšný vliv byl pozorován také u poškození dalších orgánů, to je například u ledvin a srdce.

Vezmeme-li v úvahu tyto existující pozitivní vlivy a všeobecně známý fakt, že zvýšený příjem alkoholu se projevuje podobnými změnami také u lidí, je zřejmé, že podávání NaBPC157 je užitečné v léčení poškození vyvolaných příjmem alkoholu.

Příklad 38: Vlivy na mozkové ischemické poruchy

Materiál a metody.

Aplikovalo se NaBPC157 (10 µg nebo 10ng/kg brutto váhy, i.p.) nebo fyziologický roztok (5.0 ml/kg, brutto váhy, i.p.), a to jednu hodinu před nebo jednu hodinu po tom, co byly obě arterie (karotidy) u kryš podvázány na dobu 3 až 6 hodin.

Výsledky:

Byl patrný silný pozitivní vliv podávání NaBPC157, a to u obou uspořádání pokusu, to znamená jak při podávání u kryš jednu hodinu před podvázáním, tak u podávání jednu hodinu po podvázání. Toto pozitivní působení bylo patrné ve všech uspořádáních pokusu, jak u µg tak ng množství, jak u tříhodinové, tak i šestihodinové studie. Bez použití daných preparátů, byly nejčastějšími charakteristickými pozorováními vážné perivaskulární a mozkové tkáňové otoky s mozkovými kongescemi. Také byly pozorovány oblasti s demyelinizací, obzvláště v oblasti malého mozku. Všechny tyto projevy se vyskytovaly ve značně menší míře u skupin zvířat ošetřených NaBPC157, a to bez ohledu na podmínky léčení.

Co se týká vážných ischemických poškození, které byly zaznamenány u kontrol a dále zjevných podobností mezi ischemickými poruchami vyskytujícími se u kryš a lidí, není pochyb o výhodách aplikace NaBPC157 pro léčení poškození mozku u lidí.

Příklad 39: Vliv na poranění nervu

Materiál a metody:

Zkoumal se vliv NaBPC157 na regeneraci periferních nervů. U kryších samců Wistar (225 až 250g) v anestezii byl odhalen pravý sedací nerv, očištěn od zbytků vodivého pletiva a přerušen 5 cm distálně od ischiatické incizury. K anastomóze byly použity tři perineurální stehy (10.0 Ethilon, Ethicon), tak aby byla obnovena správná funkce svalu. Zvířata byla ošetřena dávkou 1 ml (2 µg/ml nebo 2 ng/ml) NaBPC157, buď lokálně v místě anastomózy, nebo do žaludku či intraperitoneálně (10 µg nebo 10 ng/kg brutto váhy) ihned po provedení anastomózy. Kontroly obdržely stejný objem fyziologického roztoku. V určený den po provedení chirurgického zákroku (3, 6, 9, 12 a 30 den) byly provedeny testy na funkčnost. Testy obsahovaly test na horkou vodu (60 °C), studenou vodu (2 °C), analýzu dráhy, kterou krysy ušly, EMG–distální latenci a ampli-

tudu CMAP. Také byly zahrnuty histologické a morfometrické analýzy. V dalších pokusech za použití stejných chirurgických metod a toho samého nervu, bylo způsobeno zranění mačkáním pomocí chirurgických pinzet po dobu 60 sekund a NaBPC157 bylo aplikováno lokálně. Posouzení výsledků bylo provedeno po 2, 7, 10, 50 a 100 dnech.

5

Výsledky:

Aplikace NaBPC157 byla posouzena buď klinicky, nebo mikroskopicky a zvláště aplikace v raném stadiu se projevila zlepšením zdravotního stavu krys.

10

Z dokázané podobnosti mezi poškozením zvířat a lidí se ukazuje, že léčení aplikací NaBPC157 se jeví být použitelné pro poranění periferních nervů.

15

Příklad 40: Vliv na neuroleptické poruchy

Byl zkoumán vliv NaBPC157 na poruchy vyvolané neuroleptiky.

Materiál, metody a výsledky:

20

Aplikace NaBPC157 (10 µg nebo 10ng/kg brutto váhy, i.p.) zásadně zeslabila chorobnou strnulost svalů (katalepsii) vyvolanou oběma neuroleptiky podávanými v malých následných dávkách, to je haloperidolu a fluphenazinu (haloperidol 0.625, 1.25, 2.5, 5.0 a 10.0 mg/kg brutto váhy, i.p.; fluphenazin 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5 a 5.0 mg/kg brutto váhy, i.p. (4ml/kg). Kromě tohoto blahodárného působení při nízkých dávkách neuroleptik, se projevil silný prospěšný antikataleptický efekt NaBPC157 také s vyššími dávkami obou neuroleptik, a to jak u µg, tak u ng dávek NaBPC157. Tento blahodárny vliv byl zaznamenán také na somatosenzorickou orientaci u zvířat, kterým byl podáván sulpirid v dávkách (20, 40, 80 a 160 mg/kg brutto váhy, i.p.), avšak u kontrolní skupiny myši, kterým byl podáván sulpirid, nebyla pozorována katalepsie.

30

Je zřejmé, že aplikace NaBPC157 má velmi blahodárny vliv na léčení potíží spojených s dopaminovými systémy, kataleptickými potížemi a neuroleptickými poruchami.

35

Příklad 41: Aplikace při léčení šoku

Materiál a metody:

Byl zkoumán hemoragický šok u uspaných krys (kanyla byla zavedena do krkavice a krční žíly). Byly prováděny kontrolní odběry krve buď až do smrti zvířete, nebo až bylo dosaženo stabilizované nízké hodnoty tlaku krve (30 až 35mm Hg). V těchto pokusech byl podáván CaBPC157 (10 µg nebo 10ng/kg brutto váhy) nebo u kontrol intraperitoneálně fyziologický roztok (5.0 ml/kg brutto váhy), a to 15 minut před vykrcením nebo intravenózně (3.0 ml/kg) v pětiminutových intervalech od dosažení nízké stabilní hodnoty tlaku krve.

45

Výsledky:

V porovnání s kontrolami, u krys ošetřených CaBPC157 mohly být odsáty podstatně vyšší objemy krve (které byly závislé na dávce podaného preparátu) než nastala smrt zvířete. U zvířat, kterým byl odsát určitý objem krve a také u zvířat s nízkým krevním tlakem, kterým byl podán CaBPC157, se ihned projevilo trvalé podstatné zvýšení tlaku krve a nedošlo k smrti zvířete. Tento poznatek je v rozporu s pozorováním krátkodobého zvýšení slabého krevního tlaku v experimentální periodě 45 minut před smrtí u 75 % krys z kontrolní skupiny.

50

U kryš, které byly podrobeny pouze chirurgickému výkonu v narkóze a nebyla jim odebírána krev, podání CaBPC157 (i.p. nebo i.v.) nemělo po 65 minutové stabilizační periodě významný vliv na hodnoty tepenného krevního tlaku, který byl měřen po stejnou dobu po podání. Získané výsledky naznačují, že CaBPC157 by mohl být účinný při zlepšení následků ztráty krve.

5

Z dokázané podobnosti mezi použitým zvířecím modelem a poškozením u lidí se ukazuje, že aplikace CaBPC157 se jeví být použitelná pro léčení šokových stavů.

#### 10 Příklad 42: Vliv na abnormální lymfocyty

Materiál, metody a výsledky:

Byly zkoumány imunologické nálezy u dvou pacientek ženského pohlaví trpících vzácně se vyskytující klinickou formou dědičné eosinofilie spojené s intraepidermální puchýřkovou dermatitidou a subakutní sklerotizující panencefalitidou. Byl zkoumán vliv NaBPC157 (in vitro) na chromozomové aberace lymfocytů a proliferaci T buněk. NaBPC157 významně snižuje vážné chromozomové aberace (to znamená, že lymfocytové nálezy se normalizují) a je prokázán stimulační vliv na mitotické cykly

20

#### Příklad 43: Vliv na malformace

Materiál a metody:

25

Byl zkoumán vliv NaBPC157 na malformace vyvolané u myši vitamínem A.

Byl podáván NaBPC157 (10 µg nebo 10ng/kg brutto váhy, i.p.) nebo fyziologický roztok (5ml/kg brutto váhy, i.p.) společně s vitamínem A (15,700 IU/kg, brutto váhy, i.m.) desátý den těhotenství. Jako kontroly sloužily myši, kterým nebyl podáván vitamín A, ale které obdržely stejnou dávku fyziologického roztoku ve stejnou dobu.

30

Výsledky:

Vitamínem A se indukoval určitý počet malformací. Toto množství bylo výrazně sníženo ve skupině myši, kterým byl podán NaBPC157. Je zřejmé, že aplikace NaBPC157 má blahodárny vliv na léčení poškození plodu.

35

#### 40 Příklad 44: Chirurgické odnětí vaječníku

Materiál a metody:

Ovariektomie byla provedena obvyklým způsobem. NaBPC157 byl aplikován v dávkách 10 µg nebo 10ng/kg brutto váhy, i.p., a to buď jednou denně po dobu 28 dnů, či jednou denně po dobu 14 dnů; začátek podávání přípravku byl v tomto případě 15 den po ovariektomii. V těchto dlouhých pokusech byla poslední dávka podána 24 hodin před usmrcením. Další skupina obdržela jednu µg dávku 15 den po ovariektomii. Jako kontrola bylo použito pět skupin zvířat: 2 skupiny byly podrobeny ovariektomii, byl jim podán fyziologický roztok. Zvířata byla usmrcena buď 15, nebo 28 den po ovariektomii. Jedna skupina nebyla podrobena ovariektomii, ale byla ošetřena fyziologickým roztokem, dvě skupiny nebyly podrobeny ovariektomii, ale byly ošetřeny NaBPC157 (10 µg nebo 10ng/kg brutto váhy, i.p.) po dobu 28 dní. Každému zvířeti byly 5 minut před chirurgickým zákrokem odebrány vaginální stěry, a to 9, 14 a 28 den pokusu a tyto byly obarveny Pap na histologické ohodnocení. Stupeň zralosti vaginálního epitelu byl vyjádřen

50

pomocí hodnot maturace. Po usmrcení se z každého zvířete odebralo maximální množství kostí, které sloužilo k biomechanickému testování, které je popsáno dále.

#### Biomechanické testování:

5

Všechny kosti byly zkontrolovány z hlediska různých momentů ohýbání (jednobodový ohyb) (moment ohybu= $Nm$ ) v různých směrech, dopředu, dozadu a do stran. K těmto pokusům byly použity kosti stehenní a holenní. Tyto kosti byly upevněny kostním cementem (Palacos) do 1 cm dlouhých kovových trubiček. Kovové trubičky byly upevněny v zatěžovacím zařízení. Kostí byly kontinuuálně udržovány ve vlhkém stavu. Měřila se délka volných částí kostí, to znamená délka od bodu uchycení k bodu natažení. Pokus byl prováděn podle principu ohybu kostí upevněných v jednom bodě až do bodu hraniční elasticity. Zatížen bylo 0.1, 0.2, 0.5, 0.7 a 1.0 N. Deformita, neboli úhel ohybu byl měřen jako úhel ohybu laserového paprsku, který byl odražen malým zrcadlem upevněným na konci kosti. Váha zrcadla byla připočtena k aplikované ohybové síle. Milimetrový papír, na který byl laserový paprsek naměřen, byl vzdálen asi 1.5 až 1.8 m od kosti s upevněným malým zrcadlem. Úhel ohybu byl stanoven pomocí trigonometrických metod, a to během každého jednotlivého zatížení, následné deformace (a následného vrácení do původní polohy). Po přerušení zatížení se kost vrátila do své původní startovní polohy, což je důkaz, že nenastaly žádné strukturální změny kosti a že zatížení se provádí v rozsahu limitu elasticity daném Hookovým diagramem. Pozorování prokázala, že každou kost můžeme natáhnout dvakrát v různém směru, aniž by se změnila její struktura. Nebyla-li během dvou následujících minut sledována další deformace, nebo nebylo-li dosaženo vrácení do původního stavu, byl tento bod považován za konečný (obecně se časy měření pohybovaly v rozmezí 30 sekund u kontrol po ovariektomii nebo 16 minut u zdravých zvířat). Úhlová deformita kosti (zatížení a návratnost po zatížení) byla vyjádřena v mm/sec.

25

#### Výsledky:

Denní podávání dvou dávek NaBPC157 se projevilo významným zvýšením hodnoty maturace v porovnání s atroficky sníženou hodnotou maturace u neléčených krys. Z tohoto pozorování vyplývá, že Na BPC157 je schopen zabránit vaginální atrofii způsobené kastrací u krys.

30

U kontrolních skupin krys podrobených ovariektomii byla pozorována nejnižší amplituda ohýbání v nejkratším čase, stejně tak nejnižší amplituda navrácení do původního stavu. Stejně nízké hodnoty byly získány u obou kontrolních skupin usmrcených buď 15, nebo 28 den. Toto pozorování bylo uskutečněno u obou krys podrobených ovariektomii, kterým byl podáván fyziologický roztok, které byly usmrceny buď 15, nebo 28 den po odejmutí vaječnicků. Pozitivní tendence byla pozorována ve skupině, která obdržela jednu dávku NaBPC157 (mikrogramové množství) 15 den po odejmutí vaječnicků. Srovnatelně lepších výsledků bylo dosaženo ve všech dalších skupinách ošetřených NaBPC157, a to jak v nano, tak mikrogramových množstvích. Nejlepších výsledků bylo dosaženo ve skupině, která obdržela denně NaBPC157 v mikrogramových množstvích po dobu 28 dnů. Všechny parametry sledované u krys podrobených ovariektomii byly výrazně lepší a hladiny zlepšení měly tendenci dosáhnout parametrů získaných u skupiny zdravých zvířat. Žádné rozdíly nebyly zaznamenány mezi skupinami zdravých krys bez ohledu na to, zda byly ošetřeny fyziologickým roztokem, nebo NaBPC157 ( $\mu g$  nebo ng dávky).

45

Vezmeme-li v úvahu obecně přijímaný význam tohoto zvířecího modelu pro podmínky provedení ovariektomie u lidí, obě pozorování, která mají vliv na atrofii pochvy a vývoj osteoporosy, dokazují, že NaBPC157 by mohl být prospěšný v léčení stavů spojených s odejmutím vaječnicků.

50

#### Příklad 45: Nádory

#### Materiál, metody a výsledky:

55

Jeden z běžně používaných modelů experimentálních tumorů zahrnuje určení počtu metastáz karcinomu a melanomu B-16 u myši. Stejně jako je tomu u dalších experimentálních nádorů, tyto tumory sdílejí mnoho podobností svých projevů s projevy poškození u lidských pacientů. Byl-li podle různých protokolů podáván NaBPC157, došlo u léčených myší v porovnání s odpovídajícími kontrolami ke snížení počtu metastáz. Ehrlichův ascitický tumor (EAT) je nádor, který může růst ve všech kmenech myši. Může růst v ascitické nebo pevné formě, což záleží na způsobu podání nádorových buněk. Ačkoli obecně řečeno, zvířecí nádory sdílejí jen některé rysy s nádory lidskými, použití tohoto modelu našlo velkou odezvu díky snadnému aplikování v protinádorovém výzkumu.

Přežití (dny) myši, kterým byly injekčně aplikovány buňky Ehrlichova ascitického nádoru, se pohybovalo ve většině případů pod hranicí méně než 25 dnů. Předcházející inkubace nádorových buněk s NaBPC157 (2 µg/ml) vedla k prodloužení života zvířat, kterým byly tyto buňky injekčně aplikovány. Více než 90 % zvířat se dožilo konce sledovaného období 45 dnů. Navíc, většina cytostatických léčiv indukuje, jak u pokusných zvířat, tak u lidských pacientů neutropenii. K vyvolání neutropenie se běžně používá cyklofosamid. Při aplikaci fosfamidu v dávce 180mg/kg, i.p. bylo nalezeno prokazatelné poškození. NaBPC157 chrání před neutropenií, a to tím, že snižuje hladinu retikulocytů a zlepšuje hladiny hemoglobinu.

Lze tedy dojít k závěru, že proti nádorová aktivita NaBPC157 je zřejmá. Vezmeme-li v úvahu podobnosti mezi zvířecím modelem a lidským organizmem a dále prospěšný vliv přípravku v podmínkách in vivo, ale také in vitro, ukazuje se možné použití NaBPC157 v proti nádorové terapii. NaBPC157 je vhodný pro zeslabení škodlivých projevů cytostatik.

#### Příklad 46: Protivirová aktivita

##### Materiál a metody:

ARBO viry (virus encefalitidy přenášené klíšťaty (TBE), Bhanja virus, Dengue 1,2,3,4, Sinbis, west Nile, Éalovo), virus hepatitidy A, lymfatické choriomeningitidy (LCM) a Herpes virus 1 byly aplikovány buď i.c., nebo p.o. (post operačně) – virus hepatitidy A jako virová suspenze, v ředění  $10^{-2}$  (0.02ml/myš). NaBPC157 (20 µg/kg brutto váhy) nebo 0.9% NaCl (0.02ml/myš) byly aplikovány buď i.c., nebo i.p., a to následovně:

před aplikací viru

současně s aplikací viru

4 dny po projevení infekčních příznaků odpovídajících dané nemoci.

##### Výsledky:

Při simultánní aplikaci NaBPC157 a virů se projevilo zpoždění příznaků nemoci a z nich vyplývající smrti (u kontrolních zvířat se příznaky projeví 4 až 5 den po infekci). Byl-li přípravek podán až při projevu vážných příznaků infekce, výsledky potvrdily prodloužení času přežití. Prokazatelné bylo při a aplikaci NaBPC157 před infekcí kompletní neprojevení se příznaků nebo úmrtí.

K potvrzení získaných výsledků se zkoumala virulence použitých virových suspenzí (ARBO virů) testováním pomocí ošetřeny NaBPC157 nebo roztokem soli a přežily pokus (NaBPC157) (i přes aplikaci virů) nebo spontánně zemřely (i když byly ošetřeny fyziologickým roztokem). Na rozdíl od mozkových suspenzí z myši ošetřeny fyziologickým roztokem (které se nelišily od virových suspenzí myši inokulovaných fyziologickým roztokem), ve skupině myši inokulovaných mozkovými suspenzemi připravenými z myši ošetřeny NaBPC157 se neprojeví žádné příznaky nemoci ani úmrtí. Myši byly sledovány 50 dní po provedení inokulace mozkovými suspenzemi.



Prospěšný vliv NaBPC157 byl nezávislý na zvýšení teploty během inkubace (56 °C po dobu 30 minut).

5 Vezmeme-li v úvahu, že tyto viry vyvolávají podobné příznaky i u lidí, NaBPC157 by mohl být použit v léčbě těchto virových onemocnění, zejména v těch terapiích, kdy je obecně kondice pacienta oslabena (to znamená při AIDS nebo AIDS– podobných podmínkách).

#### 10 Příklad 47: Zažívací poruchy

##### Materiál a metody:

15 U krys byl zkoumán vliv NaBPC157 (10 µg nebo 10ng/kg brutto váhy, i.p., i.g.) v porovnání s referenčními standardy v experimentálních modelech žaludečních vředů: (48 hodin trvající stres, cysteamin subkutánně, intragastrické testy na žaludeční vředy využívající 96% alkoholu, NAIA–léze, DNFB (dinitrofluorbenzén), jícnový reflux následující po spojení jícnu a lačnicku pomocí anastomózy) (vše při podání přípravku před, společně a po zákrocích).

##### 20 Výsledky:

Jen u testovaných modelů, které zahrnovaly aplikaci NaBPC157, se projevil kladný vliv na průběh nemoci.

25 Přípravky bromocriptin, amatidin, cimetidin a somatostatin byly zcela neúčinné (odstranění stresu) nebo jen částečně účinné (bromocriptin, DNFB– intestiální léze; sucralfát, ranitidin, cholestyramin– jícnový reflux). Co se týká referenčních peptidů, ochrana nastala v závislosti na dávkování (cysteamin) a částečný pozitivní vliv (závisející na podmínkách léčení) (etanol) byl získán s glukagonem, NPY a sekretinem, zatímco CCK/26–30/ byl neaktivní.

30 Vzhledem k tomu, že se všechny tyto modely běžně používají pro výzkum léčení gastrointestinálních poruch, tak se aplikace NaBPC157 jeví prospěšná pro léčení poruch celého intestinálního traktu.

#### 35 Příklad 48: Vliv na poruchy vnímání

##### Materiál a metody:

40 Aplikace anticholinergních přípravků (scopolamin, atropin, 11mg/kg brutto váhy, i.p.) vedla k průkaznému deficitu vnímání u krys, pozorování úspěšně reprodukovala odhad chování zvířat po delší dobu uzavřených ve vodním T–labyrintu.

##### Výsledky:

45 V porovnání s kontrolou, vedla aplikace scopolaminu a atropinu k pozorování zvýšeného počtu chyb u pozorovaných krys. Tento deficit ve vnímání byl zcela zrušen (získané hodnoty byly rovny kontrolním hodnotám) pomocí následného podávání NaBPC157 (10 µg nebo 10ng/kg brutto váhy, i.p.).

50 Vzhledem k významu těchto velmi hojně používaných modelů pro výzkum poruch funkcí vnímání u lidí se jeví terapie pomocí NaBPC157 použitelná pro léčbu poruch vnímání.

## Příklad 49: Vliv na abstinenční poruchy

## Materiál, metody a výsledky:

- 5 NaBPC157 vykazuje protikřečové účinky interakcí s GABAergickým systémem a zlepšuje účinnost diazepam, je-li podáván v dávkách (10 µg nebo 10mg/kg brutto váhy, i.p.) současně s diazepamem (5.0mg/kg, i.p., dvakrát denně po 10 dní). NaBPC157 zeslabuje toleranci diazepam a oddaluje abstinenční poruchy a fyzickou závislost. V kvalitativních rozbořech tolerance měřených 42 hodin byla po navykací životosprávě při léčbě isoniazidem (800mg/kg i.p.) pozorována kratší prekonvulzivní latence než u zdravých myší, byl-li myším dříve léčeným pouze diazepamem znovu podáván diazepam (5.0mg/kg i.p.). Tento stav nenastal u zvířat léčených NaBPC157 (obě dávky) a diazepamem. V měřeních fyzické závislosti (prováděných 6,14,42 a 72 hodin po navykacím ošetření) byly pozorovány kratší prekonvulzivní latence u myší navyklých na diazepam, kterým byl následně podán isoniazid, a to 24 a 72 hodin po zvykací léčbě, než u nenavyklých zdravých myší. Léčba NaBPC157 (dávka 10 µg/kg) kombinovaná s diazepamem oddaluje tento vliv až do konce sledovaného intervalu. V této skupině po šestihodinových intervalech, na rozdíl od myší, kterým byl podáván diazepam, isoniazidové prekonvulzivní latence byly dokonce delší než u odpovídajících kontrol. NaBPC157 nevyvolává žádný návykový efekt.
- 20 Vezmeme-li v úvahu význam těchto modelů pro výzkum v oblasti lidské medicíny, je jasné že NaBPC157 je použitelný v léčení abstinenčních poruch.

## Příklad 50: Vliv na poruchy ledvin

25

## Materiál a metody:

- Podávání chloridu rtuťnatého (1mg/ml i.v.) nebo cysplatinu (10mg/kg s.c.) vyvolává u pokusných zvířat akutní selhání ledvin. Je-li toto selhání ledvin indukováno u zvířat tímto způsobem, silně koreluje s odpovídajícím lidským poškozením. Následkem toho, poškození indukované u krys vykazuje velký stupeň podobnosti s odpovídajícím poškozením u lidských pacientů.

## Výsledky:

- 35 NaBPC157 významně zeslabuje poškození krys, a to jak při podání před i po léčbě. Unilaterální nefrektomie (chirurgické odnětí ledviny) se projevuje funkčním přetížením a funkční hypertrofií zbylé ledviny. Léčení NaBPC157 zvyšuje vylučování moči ledvinou u zvířat s odňatou ledvinou a snižuje hypertrofii zbývající ledviny. Tudíž vyjádřeno pomocí termínů funkční teorie kompenzační renální hypertrofie, tyto nálezy zdůrazňují zlepšenou funkci zbylé ledviny. Je to také potvrzeno dodatečnými biochemickými výsledky. Co více, tato data jsou v úplném souladu s vlivy pozorovanými u hypertenzních krys s renálním chorobným zúžením arterie nebo s unilaterální nefrektomií. Je zřejmé, že aplikace NaBPC157 v léčení poruch ledvin je prospěšná

## 45 Příklad 51: Buněčná imunitní odpověď periferních leukocytů v krvi

- Sledovala se buněčná imunitní odpověď periferních leukocytů v krvi na BPC u kontrol a u pacientů s různými nemocemi vyjmenovanými v tabulce 2. Odpověď periferních T buněk na BPC byla testována metodou popsanou deSmetem a dalšími (deSmet MD a další: v .Cellular immune responses of patients with uveitis to retinal antigens and their fragments. Am. J. Ophthalmol., 110:135–142,990) v sedmidenních kulturách. Buňky byly inkubovány bez antigenu a s antigenem (BPC157 pentadekapeptid) v koncentraci 20 µg/ml. pro každého pacienta byl vypočítán stimulační index dělením průměrného počtu antigenem stimulovaných kultur a průměrného počtu kontrolních buněčných kultur bez přidaného antigenu, to znamená BPC157 pentadekapeptidu.
- 55 Tyto výsledky jsou uvedeny v tabulce 2.

Kontrolní hodnoty menší než 2 měřené u kontrolních subjektů (tabulka 2) odpovídají hodnotám naměřeným jinými pracovníky pro peptidy s odpovídající molekulovou hmotností, to znamená, že nebyla shledána žádná citlivost periferních lymfocytů v krvi k BPC157 pentadekapeptidu. U pacientů trpících různými nemocemi je patrná buněčná odpověď vyvolaná BPC (tabulka 2), která se projevuje senzibilizací systémových lymfocytů vyvolanou tímto peptidem z žaludeční šťávy. Získaná data jasně demonstrují přítomnost BPC-podobných poškození u pacientů trpících různými nemocemi. Z těchto poznatků vyplývá možnost aplikace BPC-podobných látek (to znamená například solí pentadekapeptidu BPC157) v imunomodulační terapii odpovídajících poruch.

Tabulka 2:

Zvýšená stimulace indexu periferních krevních T buněk u 11 pacientů trpících různými nemocemi

NEMOC	POHLAVÍ	INDEX STIMULACE kontrol. hodnoty <2
PEPTICKÝ VŘED	Ž	26.82
ROZTROUŠENÁ SKLEROSA	Ž	13.80
SUBAKUTNÍ SKLEROTIZACE	Ž	2.54
PANENCEFALITIDA		
OPTICKÁ NEURITIDA	M	3.54
OPTICKÁ NEURITIDA	Ž	9.53
UVEITIDA	Ž	16.87
UVEITIDA	M	15.21
UVEITIDA	Ž	22.30
SERONEGATIVNÍ	Ž	4.99
SPONDYLOARTHROPATIE		
DĚDIČNÁ EOSINOFILIE A	Ž	2.70
PUCHÝŘUJÍCÍ DERMATITIDA		
UVEITIDA	Ž	4.75

Výsledky výše popsaných farmakologických výzkumů ukazují výhodnou aktivitu solí BPC peptidů při ochraně organismu proti stresu a nemocím, obecně v normalizaci funkce organismu. Soli peptidů podle vynálezu jsou také účinné v prevenci a terapii několika lidských či zvířecích chorob a poruch.

## PATENTOVÉ NÁROKY

5

1. Sůl peptidu BPC, Body Protection Compound, skládající se z 8 až 15 aminokyselinových zbytků, kde je anion této soli negativně nabitý peptid obsahující sekvenci osmi aminokyselinových zbytků obecného vzorce

10 [Zaa Pro Pro Pro Xaa Yaa Pro Ala]<sup>(-)</sup> nebo (2-),

kde

Xaa je neutrální zbytek alifatické aminokyseliny,

15

Yaa je zbytek bazické aminokyseliny a

Zaa je zbytek kyselých aminokyseliny

20

a kde kation sole je kation anorganické nebo organické netoxické báze.

2. Sůl podle nároku 1, kde je kation vybrán ze skupiny sestávající se z alkalických kovů, kovů alkalických zemin,  $Zn^{2+}$ , primárních, sekundárních a terciárních aminů, zvláště pak  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Li^+$ ,  $Cs^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $NH_4^+$ , triethanolaminu<sup>+</sup>, cyklohexylaminu<sup>+</sup>, 2-AMP<sup>+</sup> (což je 2-amino-1-propanol) a TRIS<sup>+</sup> (což je Tris-(hydroxymetyl)-aminometan).

25

3. Sůl podle nároků 1 a 2, ve které

Xaa je Ala, bAla, Leu, Ile, Gly, Val, Nle nebo Nva,

30

Yaa je Lys, Arg, Orn nebo His a

Zaa je Glu, Asp, Aad nebo Apm.

35

4. Sůl podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3 s peptidovou sekvencí obecného vzorce

Xaa Zaa Pro Pro Pro Xaa Yaa Pro Ala Asp Zaa

5

10

Ala Xaa Xaa Xaa

15

40

5. Sůl podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, kde peptid je vybrán ze skupiny skládající se z

Leu Glu Pro Pro Pro Gly Lys Pro Ala Asp Asp  
5 10

Ala Leu Gly Val;  
15

Gly Glu Pro Pro Pro Gly Lys Pro Ala Asp Asp  
5 10

Ala Gly Leu Val;  
15

Leu Glu Pro Pro Pro Leu Lys Pro Ala Asp Asp  
5 10

Ala Leu Gly Val;  
15

Leu Glu Pro Pro Pro Leu Lys Pro Ala Asp Ala  
5 10

Leu Gly Val;  
14

Gly Glu Pro Pro Pro Gly Lys Pro Ala Asp Ala  
5 10

Gly Leu Val;  
14

Glu Pro Pro Pro Leu Lys Pro Ala;

5

8

Asp Pro Pro Pro Ile Arg Pro Ala Asp;

5

9

Glu Pro Pro Pro Leu Lys Pro Ala Asp;

5

9

Leu Glu Pro Pro Pro Leu Lys Pro Ala Asp Ala

5

10

Leu Gly Val;

14

Gly Glu Pro Pro Pro Gly Arg Pro Ala Asp a

5

10

Glu Pro Pro Pro Leu Lys Pro Ala Asn.

5

9

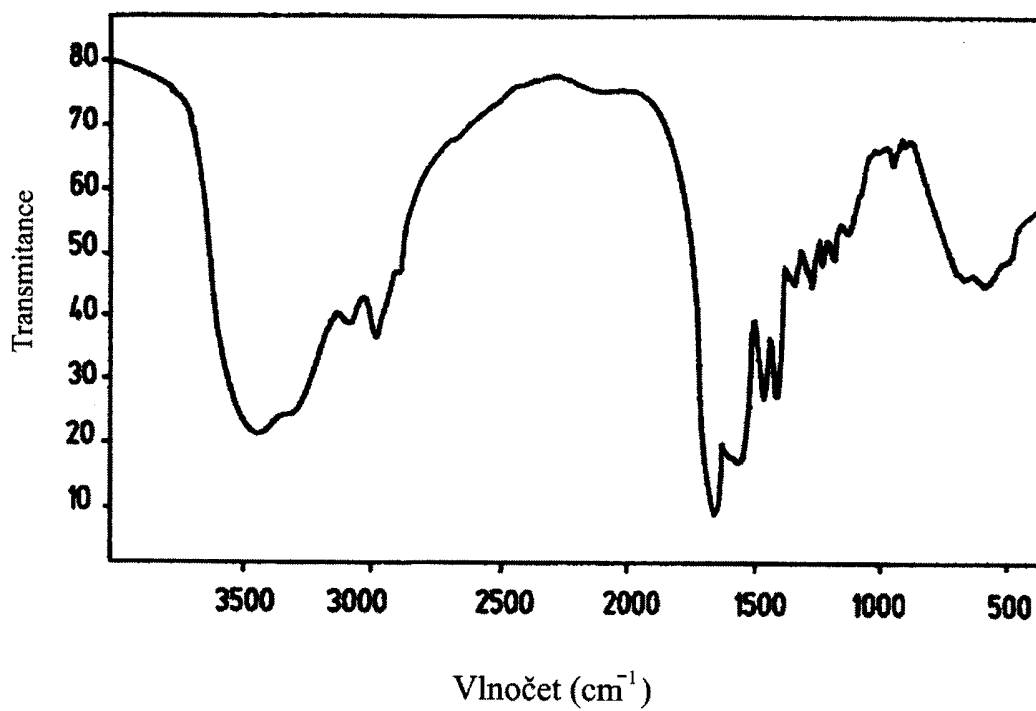
6. Sůl podle kteréhokoli z předchozích nároků, kde je peptid cyklizován, zvláště pak amidickou vazbou mezi prvním a posledním aminokyselinovým zbytkem.
- 5 7. Sůl podle kteréhokoliv z předchozích nároků, která je rozpuštěná ve vodném roztoku, nebo v roztoku voda/alkohol, nejlépe s pH v rozmezí od 6,0 do 8,5.
8. Farmaceutická směs, stabilní při skladování, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že obsahuje farmaceuticky účinné množství soli BPC peptidu podle kteréhokoliv z předchozích nároků a případně fyziologicky přijatelný nosič.
- 10 9. Farmaceutická směs podle nároku 8 pro perorální podávání, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že jako fyziologicky přijatelný nosič obsahuje trehalózu.
- 15 10. Diagnostická směs, stabilní při skladování, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že obsahuje diagnosticky účinné množství soli BPC peptidu podle kteréhokoliv z předchozích nároků.
11. Použití soli BPC peptidu podle kteréhokoli z nároků 1 až 7 pro přípravu farmaceutické směsi, stabilní při skladování, podle nároku 8, pro léčení:
- 20 poruch spojených buď s tvorbou oxidu dusnatého (NO), nebo s narušením funkcí systému NO, zvláště pak hypertenze, angíny, impotence, oběhového a septického šoku, mrtvice, zánětu, syndromu respirační tísně, adheze a agregace krevních destiček a leukocytů, endotelové dysfunkce, gastrointestinálních lézí, poruch peristaltiky, pankreatické cukrovky, hypotenze a Parkinsonovy nemoci;
- 25 dysfunkce či hyperfunkce somatosenzorických nervů, zvláště pak senzorní neuropatie, postherpetické neuralgie, atopické dermatitidy, k zhoršenému hojení poraněných pletiv, získané chladné či teplé kopřivky, lupénky, bulózního pemfigoidu, ekzémů, fotodermatózy, chronické artritidy,

- gastrointestinálních poškození a specifické a nespecifické hyperreaktivity horních a dolních cest dýchacích, astma, rýma;  
poškození endotelu;  
poranění, vředů;
- 5 podmíněk vztahujících se k akutnímu či chronickému zánětu, zvláště pak chronické artritidy a poškození vyskytujících se u opožděného typu hypersenzitivity a gastrointestinálních lézí;  
poškození jater, orgánové léze způsobené volnými radikály specificky vyvolanými zářeními;  
poškození spojená s poruchou katecholaminergního systému, zvláště pak schizofrenie, vlivů vyvolaných amfetaminem, při zneužívání léků;
- 10 podmíněk souvisejících se stresem;  
akutní pankreatitidy; zvláště pak s průvodními gastroduodenální patologií;  
srdečních poruch;  
depreseivních stavů;  
Parkinsonovy nemoci a patologických projevů podobných Parkinsonově nemoci;
- 15 poruch teploty;  
poškození kosti;  
poškození různých orgánů vyvolaného hypertenzí;  
poruch koagulace;  
bolestivých poruch;
- 20 křečovitých poruch;  
zranění míchy;  
poškození alkoholem, která jsou způsobena zneužitím alkoholu, nebo jeho zvýšeným příjmem;  
mozkových ischemických poruch;  
poškození periferních nervů;
- 25 kataleptických potíží a neuroleptických poruch;  
poruch spojených s abnormálními či mutantními lymfocyty;  
poškození plodu;  
vaginální atrofie a vývoj osteoporózy způsobené ovariectomií;  
tumorů;
- 30 virových onemocnění, zvláště pak AIDS nebo ARC;  
gastrointestinálních lézí;  
poruch vnímání;  
abstinenčních poruch;  
poškození ledvin a
- 35 poškození buněčné imunitní odpovědi.

12. Použití BPC peptidové sole podle kteréhokoli z nároků 1 až 7 pro přípravu farmaceutické směsi stabilní při skladování, podle nároku 8 jako ochranného činidla pro buňky a orgány.

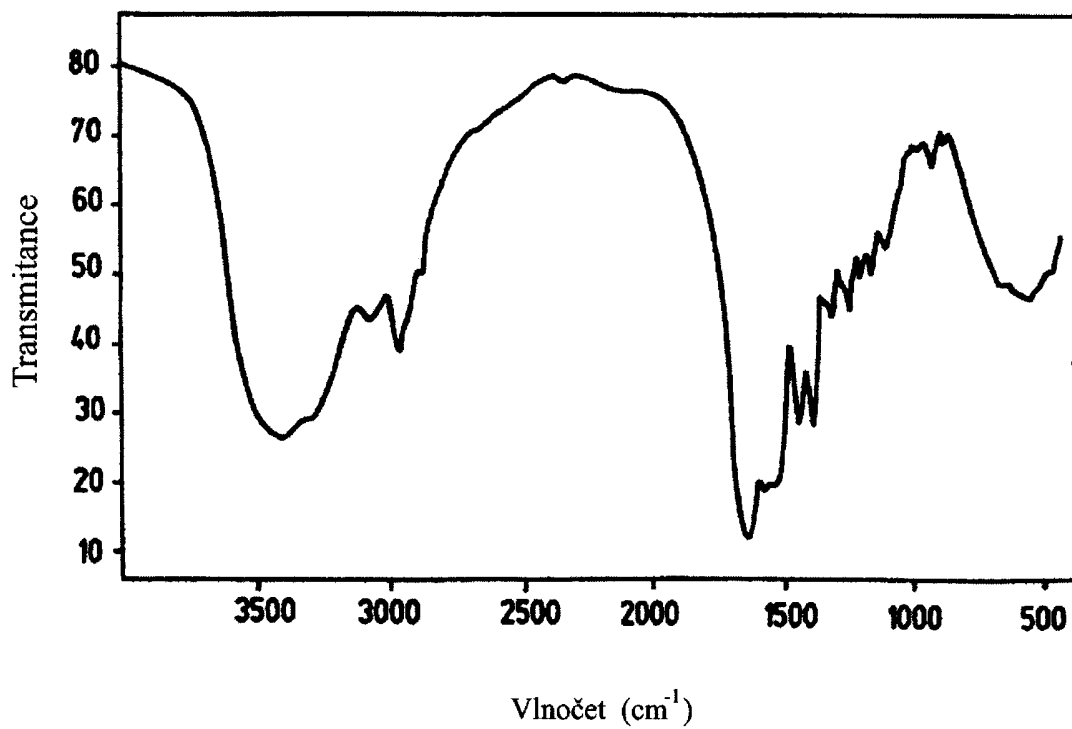
- 40 13. Způsob přípravy soli BPC peptidu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 7, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že se alespoň jeden BPC peptid smíchá ve vodném rozpouštědle nebo v rozpouštědle voda/alkohol s jednou nebo více bázemi za vzniku soli peptidu BPC, kde kationtem soli je kation anorganické nebo organické netoxické báze.

45

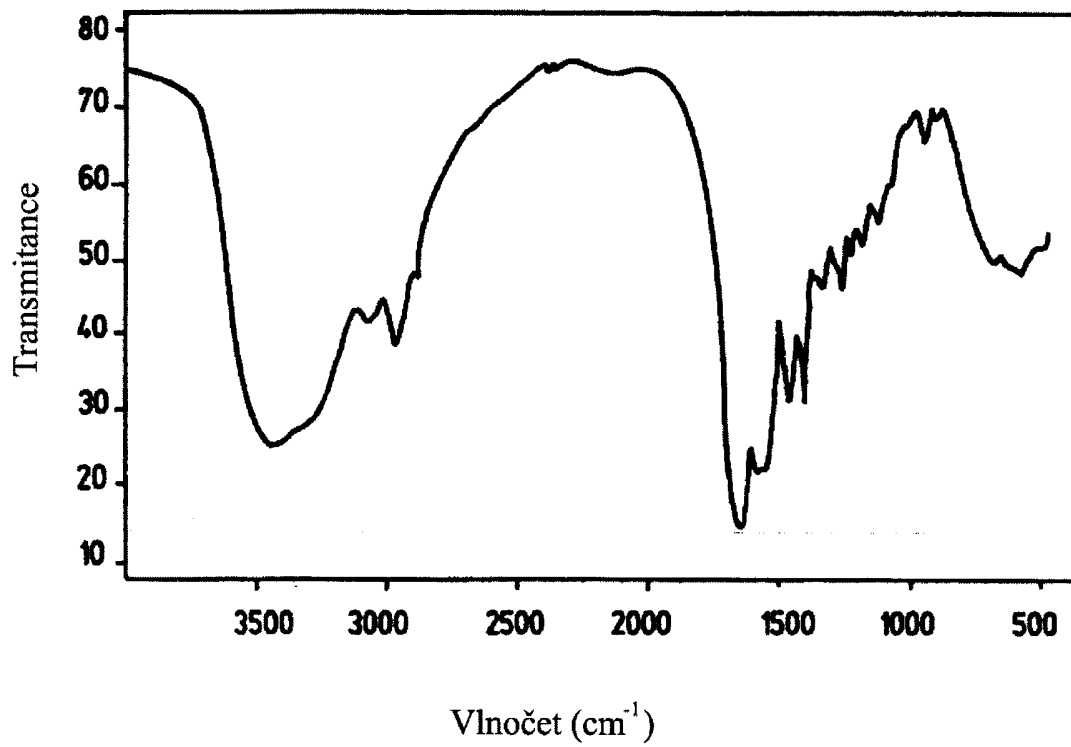


Obr. 1

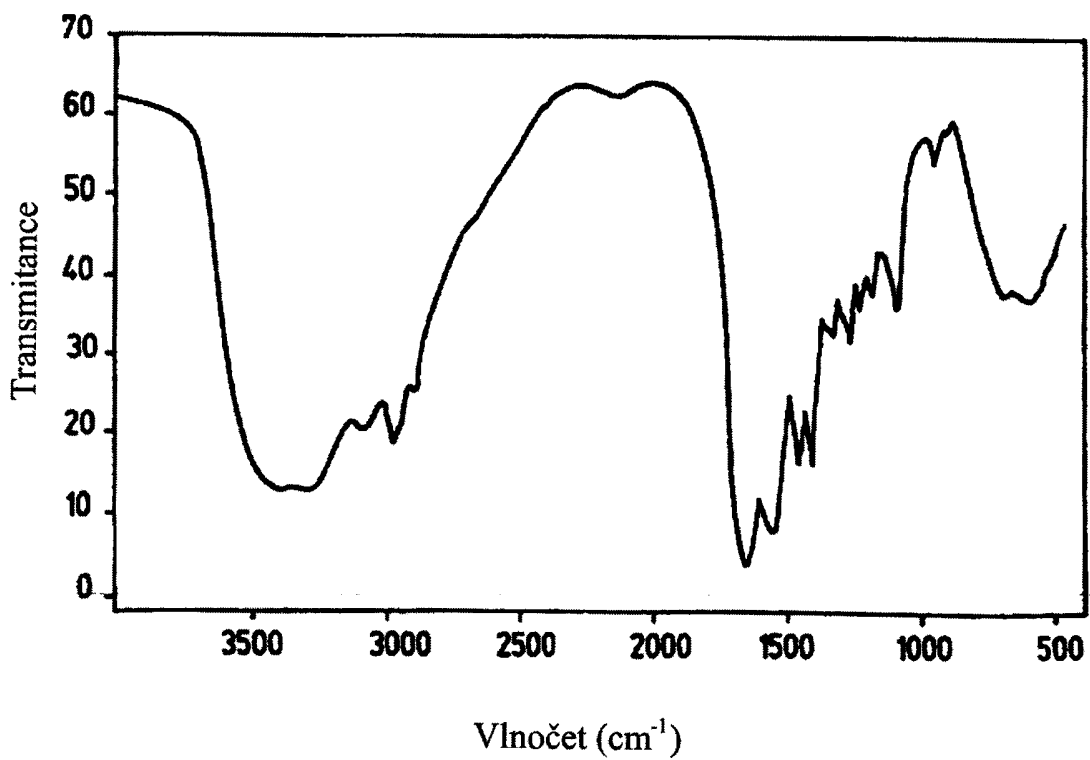




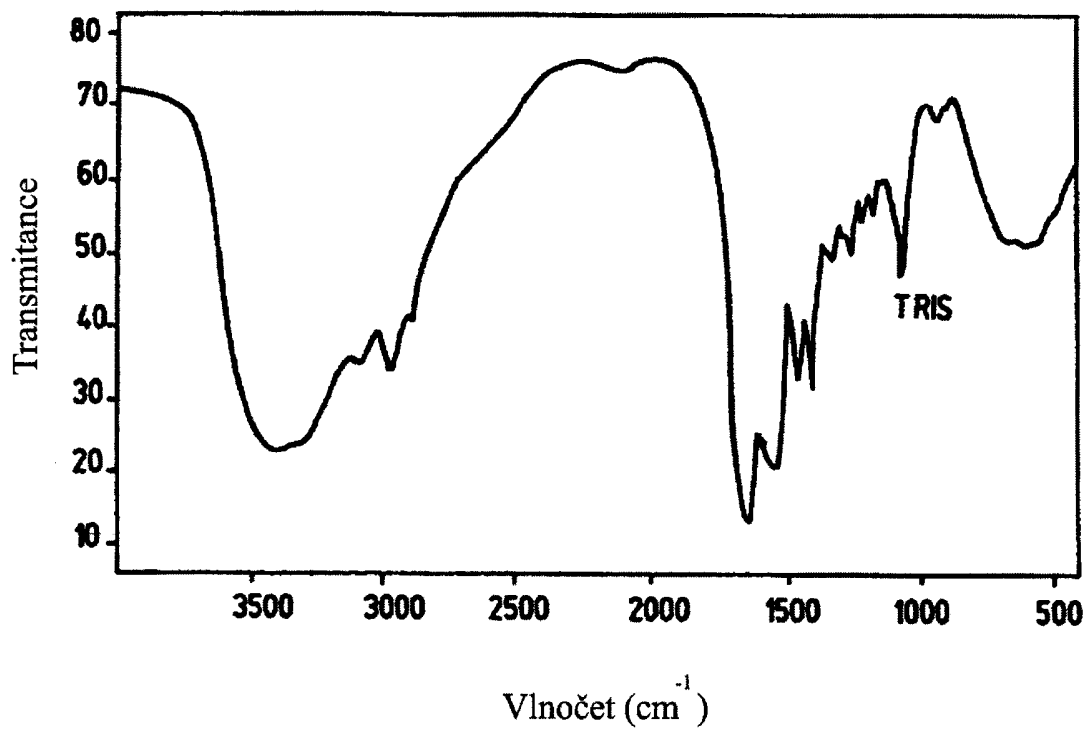
Obr. 2



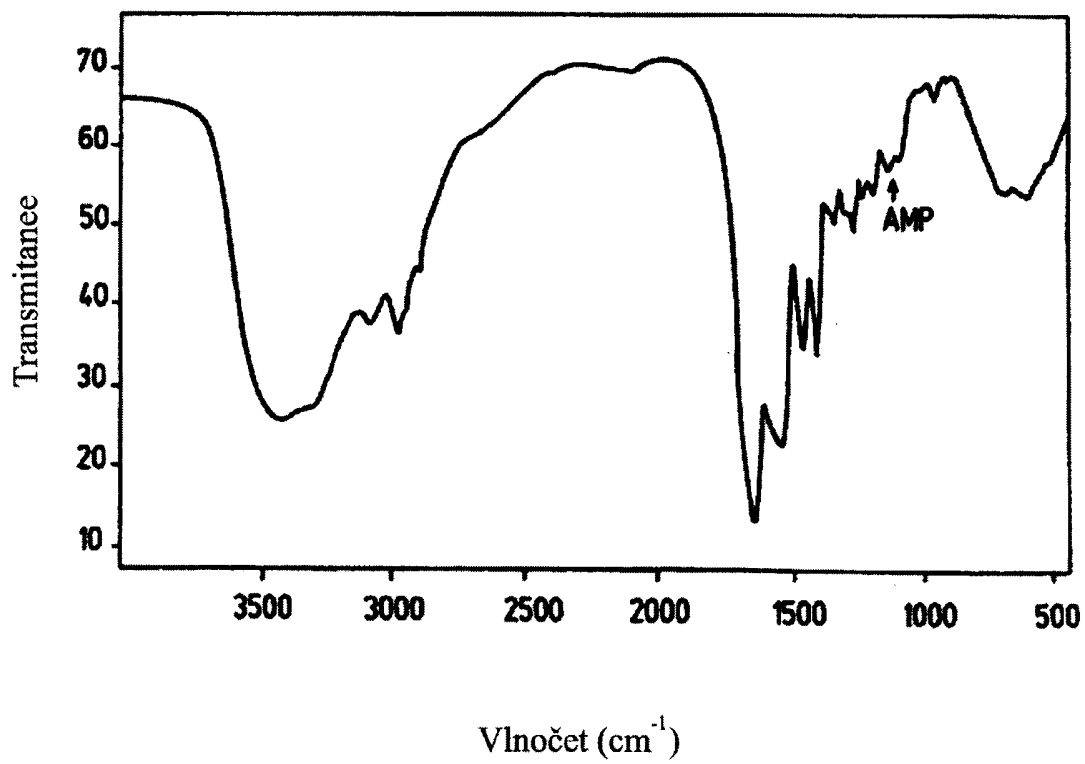
Obr. 3



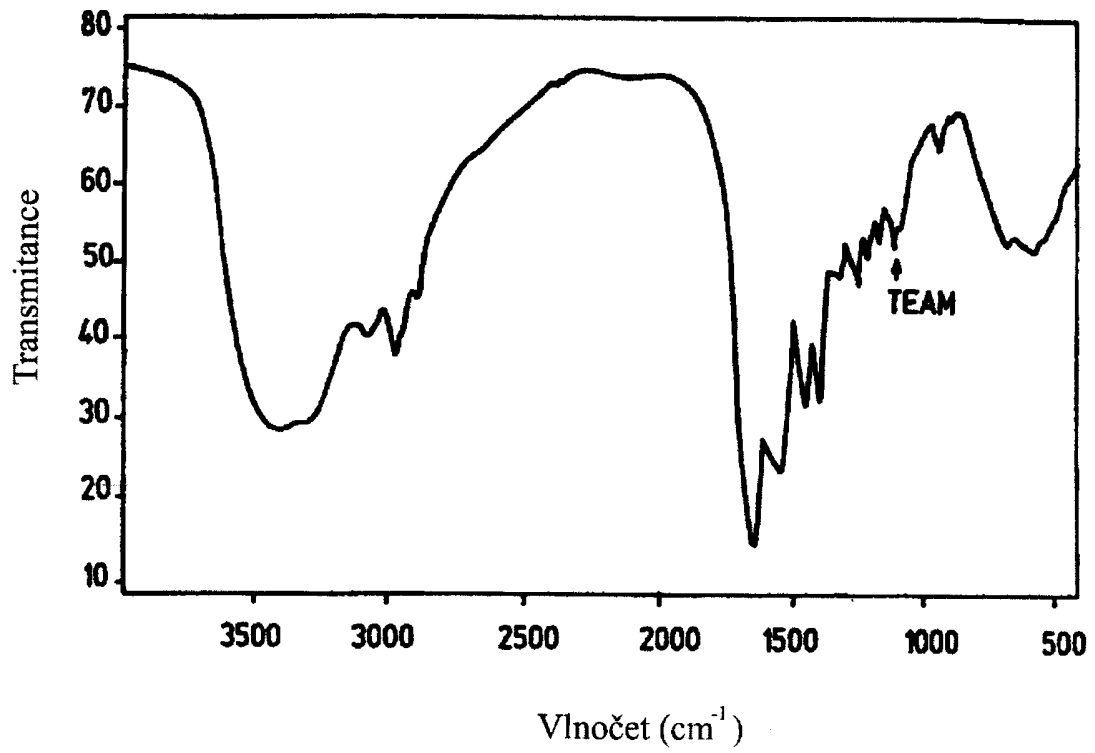
Obr. 4



Obr. 5



Obr. 6



Obr. 7

---

Konec dokumentu

---