

Заявка містить матеріал, включений в опис документу No. 377066, поданого до відомства з Патентів і Товарних знаків 23 червня 1995 року.

Винахід стосується способів та композицій, які використовуються для запобігання та послаблення симптомів та загострень астми.

Хронічна астма може вважатися головним чином захворюванням запального характеру, яке супроводжується бронхоспазмом. Ступінь реактивності і звужування просвіту бронхів у відповідь на подразник є більш виразною в астматиків, ніж у здорових людей. Саме через персистентний характер запального процесу має місце підвищена бронхіальна реактивність та чутливість дихальних шляхів. Можуть спостерігатися набряк слизової, утворення слизових пробок та гіперреакція; легенева паренхіма при цьому є здоровою. Спастичне звужування дихальних шляхів може повертатися чи зникати спонтанно або внаслідок терапії. Імунна відповідь моментальна першого типу може відігравати важливу роль в розвитку астми у дітей та багатьох дорослих; однак, якщо захворювання виникає в період статевої зрілості, алергічні фактори встановити буває дуже важко. Вплив холодного сухого повітря, тяжкі фізичні навантаження та інші загострюючі фактори також можуть викликати астму.

Найбільш поширеними симптомами астми є ядуха, відчуття стислості у грудній клітці, а також хрипи, задишка та кашель. Прояви легеневої недостатності зазвичай спостерігаються внаслідок таких хвороб дихальних шляхів, які скоріше перешкоджають легеневій функції, ніж обмежують її. Безсимптомні періоди часто чергуються з раптовими нападами.

З усіх відомих факторів, що провокують астму, найбільш вартими уваги є алергени та фізичні навантаження. Обидва чинники є потужними природними подразниками; навантаження є потенційним провокуючим фактором у повсякденному житті кожного астматика, в той час як алергени впливають лише на певний контингент хворих на астму. Однак значно більше відомо про вплив антигенів.

Головною метою медикаментозної терапії у лікуванні астми є запобігання бронхоспазму, а також тривалий контроль за бронхіальною гіперреактивністю. Через те, що ні хворий, ані лікар не в змозі спрогнозувати, коли може статися бронхоспазм, усі хворі, що страждають на астматичні напади, і, перш за все, ті, в кого напади трапляються періодично і/або в залежності від певних сезонів року, потребують постійного терапевтичного лікування.

Бета-агоністи можуть використовуватися як бронхолітичні засоби; вони стимулюють бета<sub>2</sub>-адренергічні рецептори, підвищують внутрішньоклітинний цАМФ і здатні інгібувати вивільнення нейромедіаторів з тучних клітин. До інших ефективних препаратів належать теофілін і препарати групи ксантину, що створюють бронхолітичний ефект, механізм якого є досі невідомим, біскромон, кромолін, який запобігає вивільнюванню нейромедіаторних речовин та блокує нейродихальні рефлексі, а також кортикостероїди, котрі оперативним послаблюють запальну реакцію та набряк. Антихолінергічні препарати здатні послабити бронхоспазм шляхом блокування парасимпатичних холінергічних імпульсів на рецепторному рівні. Антигістаміни інколи запобігають або припиняють напади астми алергічної природи, особливо у дітей, але вони можуть справляти лише частковий ефект, оскільки гістамін є одним з багатьох медіаторів.

Сучасні засоби медикаментозного впливу, які використовуються для лікування алергенної астми, мають цілу низку недоліків. Загалом, традиційно використовувані препарати відзначаються порівняно короточасним терміном активності і бувають частково або повністю неефективними, коли призначаються після антигенної стимуляції. Крім того, через істотні несприятливі ефекти, що пов'язуються з використанням таких агентів, як бета<sub>2</sub>-адренергічні агоністи і кортикостероїди, терапевтичний коефіцієнт безпеки таких традиційних агентів є порівняно невеликим, внаслідок чого за хворими, яким вони призначаються, потрібно пильно стежити.

Підвищена реактивність бронхів (або підвищена реактивність дихальних шляхів) є характерною ознакою астми і тісно пов'язана зі запаленням дихальних шляхів. Загострення астми та запалення дихальних шляхів пов'язані з підвищенням бронхіальної гіперреактивності, котра буває спричиненою як антигеном, так і неантигеним подразником. Бета<sub>2</sub>-адренергічні агоністи є потужними препаратами для лікування бронхоспазму, але не справляють жодного ефекту на запальні процеси у дихальних шляхах і на бронхіальну гіперреактивність. В реальних умовах хронічне використання лише бета<sub>2</sub>-адренергічних препаратів і, водночас, нехтування регуляцією бета<sub>2</sub>-рецепторів можуть загострити бронхіальну гіперреактивність. Теперішнього часу єдиними доступними ефективними препаратами, які знижують бронхіальну гіперреактивність, є лише кортикостероїди. Хоча кортикостероїди, які використовують шляхом інгаляції, є порівняно безпечними для дорослих хворих на астму, вони є надзвичайно токсичними для дітей, зокрема, впливаючи на функцію надниркової залози і призводячи до зниження щільності кісток та росту. Таким чином, пошук безпечних та ефективних препаратів, які зводять до мінімуму бронхіальну гіперреактивність, триває.

За останні кілька років виявлено, що введений внутрішньобронхіальним шляхом гепарин може бути ефективним інгібітором бронхоспазму і бронхостенозу і тому має вагомe значення для профілактики астми (див., наприклад, Ahmed et al., New Eng J. Med 329:90-95, 1993, Ahmed, Resp. Drug Deliv., IV:55-63, 1994). Пізніше було виявлено, що гепарини з низькою молекулярною вагою, наприклад, гепарини з молекулярною вагою 4000-5000 Да, ефективно запобігають антиген-індукованому бронхостенозу; ці гепарини з низькою молекулярною вагою відрізняються також значно нижчою антикоагулянтною активністю, ніж комерційний гепарин, що є корисною властивістю у разі застосування цих препаратів з метою лікування хворих на астму (див. Ashkin et al., Am. Rev. Resp. Dis. 1993 Intl. Conf. Abstracts, p. A660).

Незважаючи на те, що різні гепарини виявилися корисними як профілактичні препарати для введення їх перед введенням антигенів, вони були описані в попередньому рівні техніки як неефективні при введенні після введення антигену, з метою коригування реакції на бронхостеноз і гіперчутливості дихальних шляхів (Ahmed et al., J. Appl. Physiol, 76:893-901, 1994).

Задача цього дослідження полягає у впровадженні способу та композицій для лікування хворих на астму, яка викликана, антигеном, а також страждаючих на підвищену реактивність бронхів; згадані спосіб та композиції не мають недоліків відомого рівня техніки у цій галузі.

Інша задача цього винаходу полягає у впровадженні способу та композицій для лікування астми, які є

ефективними для запобігання та припинення астматичних нападів.

Ще одна задача цього винаходу полягає у впровадженні згаданих вище способу та композицій, які відзначаються високою ефективністю щодо послаблення специфічної та неспецифічної гіперреактивності бронхів, зокрема, навіть за умов їх введення пацієнтові після введення антигену.

З урахуванням згаданих та інших задач, котрі буде висвітлено далі за текстом, слід зазначити, що цей винахід охоплює спосіб лікування хворих, що страждають на викликану антигеном астму, шляхом ендобронхіального введення пацієнтові фармакологічної композиції, що містить від близько 0,05 до близько 1,0 мг ультранизькомолекулярних гепаринів на кілограм ваги його тіла в кожній дозі.

Гепарини з ультранизькою молекулярною вагою, що використовуються згідно з цим винаходом, в середньому мають молекулярну вагу меншу, ніж 3000 Да, і відзначаються низьким рівнем антикоагулянтної активності, або практично не є антикоагулянтами.

Фіг.1 являє собою гістограму, яка відображає вплив попереднього введення гепарину з ультранизькою молекулярною вагою (CY222) у різних дозах – шляхом інгаляції - на спровокований антигеном бронхостеноз у алергічної вівці. Дані представлено у вигляді величини спровокованої антигеном зміни  $\pm$  SE% в  $SR_L$ , без і після попереднього введення CY222.

$SR_L$  = (Специфічна резистентність легенів - Specific lung resistance)

+ = Значно відрізняється від контрольного введення антигену ( $P < 0,05$ )

Фіг.2 являє собою гістограму, яка відображає вплив попереднього введення шляхом інгаляції гепарину з низькою молекулярною вагою (CY216) на спровоковане антигеном загострення бронхостенозу в у алергічної вівці. Дані представлено у вигляді величини спровокованої антигеном зміни  $\pm$  SE% в  $SR_L$ , без і після попереднього введення CY216.

Фіг.3 являє собою гістограму, яка відображає вплив попереднього введення шляхом інгаляції гепарину зі середньою молекулярною вагою (Фрагміну) на спровоковане антигеном загострення бронхостенозу у алергічної вівці. Дані

представлено у вигляді величини спровокованої антигеном зміни  $\pm$  SE% в  $SR_L$ , без і після попереднього введення Фрагміну.

Фіг.4 являє собою гістограму, яка відображає вплив попереднього введення шляхом інгаляції гепарину з ультранизькою молекулярною вагою (Фрагміну) на спровоковану антигеном гіперчутливість дихальних шляхів у алергічної вівці. Дані представлено у вигляді пост-антигенового значення  $\pm$  SE  $PD_4$ , в процентах до базового рівня, без і після попереднього контрольного введення CY222.

$PD_4$  = Сукупна провокуюча доза карбахолу, яка підвищує

$SR$ , до 400% від базового рівня

+ = Значно відрізняється лише від антигену ( $P < 0,05$ ).

Фіг.5 являє собою гістограму, яка відображає вплив попереднього введення шляхом інгаляції гепарину з низькою молекулярною вагою (CY216) на спровоковану антигеном гіперчутливість дихальних шляхів у алергічної вівці. Дані відображено у вигляді пост-антигенового значення, у процентах від базового рівня, без і після попереднього введення препарату з CY216.

Фіг.6 являє собою гістограму, яка відображає вплив попереднього введення - шляхом інгаляції - гепарину зі середньою молекулярною вагою (Фрагміну) на спровоковану антигеном гіперчутливість дихальних шляхів у алергічної вівці. Дані відображено у вигляді пост-антигенового значення, у процентах від базового рівня, без і після попереднього введення препарату з Фрагміном.

Фіг.7 являє собою графік, який відображає - у порівнянні - захисний вплив призначених шляхом інгаляції гепаринів CY222, CY216 і Фрагміну на спровоковану антигеном реакцію (acute bronchoconstrictor response (ABR)), яка полягає у загостренні бронхостенозу в організмі барана, який знаходиться в алергічному стані. Дані зображено у вигляді пост-антигенового значення  $\pm$  SE% захисту спровокованої антигеном ABR.

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

\* = Значно відрізняється від CY216 ( $P < 0,05$ ).

Фіг.8 являє собою графік, на який відображає - у порівнянні - захисний вплив призначених шляхом інгаляції гепаринів CY222, CY216 та Фрагміну на спровоковану антигеном гіперчутливість дихальних шляхів (AHR) в організмі барана, що знаходиться в алергічному стані. Дані зображено у вигляді пост-антигенового значення  $\pm$  SE% захисту спровокованих антигеном змін  $PD_4$ .

Фіг.9 являє собою гістограму, яка відображає вплив CY222 на спровоковану антигеном гіперчутливість дихальних шляхів, у разі, якщо CY222 вводять у вигляді аерозолі одразу ж після введення антигену.

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

Фіг.10 являє собою гістограму, яка відображає вплив комерційного гепарину на спровоковану антигеном гіперчутливість дихальних шляхів у разі, якщо згаданий комерційний гепарин вводиться у вигляді аерозолі одразу ж після введення антигену.

Фіг.11 являє собою гістограму, яка відображає вплив Фрагміну на спровоковану гепарином гіперчутливість дихальних шляхів у разі, якщо Фрагмін вводять у вигляді аерозолі одразу ж після контрольного введення антигену.

Гепарин, тобто сульфатований мукополісахарид, синтезується в тучних клітинах як протеоглікан, і в особливо великих кількостях знаходиться в легенях різних тварин. Гепарин не є конкретною композицією з фіксованою молекулярною вагою, і, фактично, являє собою гетерогенну композицію в різній мірі сульфатованих полісахаридних ланцюжків, які складаються з блоків D-глюкозаміну і L-ідуранової або D-глюкуронової кислот, що повторюються. Середня молекулярна вага виділеного з тканин тварин гепарину змінюється в діапазоні значень від близько 6000 до близько 30000 Да.

У фармакологічному аспекті гепарин є відомим перш за все як антикоагулянт. Такий його ефект є наслідком властивості гепарину приєднуватися до залишків антитромбіну III (AT-III), каталізуючи (прискорюючи) нейтралізацію антитромбіном AT-III активованих факторів згортання крові та запобігаючи перетворенню протромбіну (фактора II) в тромбін. Збільшення Вмісту гепарину може інактивувати тромбін і

початкові фактори згортання крові, запобігаючи перетворенню фібриногену у фібрин.

Антикоагулянтна активність гепарину залежить від молекулярної ваги його полісахаридних фрагментів; фрагменти або компоненти з низькою молекулярною вагою (наприклад, такі, що мають молекулярну вагу, нижчу за 6000Да), помірковано понижують антитромбінний та геморагічний ефекти. Аналогічно, гепарини з низькою молекулярною вагою, що вивільнюються з тваринних тканин, мають знижені антикоагулянтні властивості, оскільки в їхньому складі є перш за все фрагменти або фракції з більш низькою молекулярною вагою.

Комерційний гепарин, який у більшості випадків одержують з коров'ячої легені чи свинячої кишкової мукози, має середню молекулярну вагу близько 15000-17500Да.

Досліджено, що гепарин діє як специфічний блокатор внутрішньочеревних рецепторів  $IP_3$  та інгібує опосередковане рецепторами  $IP_3$  вивільнювання кальцію. Авторами на базі попередніх досліджень зроблено припущення, що гепарин здатний блокувати рецептори  $IP_3$  в тучних клітинах, і, таким чином, шляхом сигнальної трансдукції може модулювати дегрануляцію тучних клітин і вивільнення (секрецію) нейромедіаторів. Дослідження *in vivo* та *in vitro* підтвердили цю концепцію та продемонстрували, що введення гепарину пом'якшує (послаблює) алергічний бронхостеноз в організмі барана запобігає викликаній фізичними навантаженнями астмі, а також інгібує вивільнювання в тучних клітинах гістаміну, що-викликається анти-IgE. Виявлено, що введення гепарину шляхом інгаляції у дозах до 1000 одиниць/кг не справляє впливу на парціальний час утворення тромбопластину (тромбокінази), РТТ, що, таким чином, підтверджує "антикоагулянтний" ефект.

Також повідомлялося, що гепарини з низькою молекулярною вагою (середня молекулярна вага близько 4500Да), що відзначаються пониженою АРТТ-активністю, виявилися ефективними під час дослідження запобігання спровокованому антигеном загостренню бронхостенозу (ABR) та підвищеній реактивності бронхів, яка має також назву гіперчутливості дихальних шляхів (AHR). Однак, згідно з більш детальним описом та ілюстраціями, що подаються нижче, ні комерційний гепарин, ані гепарини з середньою та низькою молекулярною вагою, навіть ті, що відзначаються дуже низькою антикоагулянтною активністю, не є ефективними для пониження інтенсивності АHR, яка спровокована введенням антигену в організм об'єктів дослідження.

Ці гепарини, очевидно, справляють лише профілактичний ефект запобігання, але не варті уваги як засоби лікування збуджуваної антигенами хронічної астми.

Як це не дивно, останнім часом виявлено, що фракції гепаринів з ультранизькою молекулярною вагою (ultra-low molecular weight heparin - ULMWH) є не лише ефективними інгібіторами анафілаксії, але є також високоефективними для пониження АHR, якщо їх призначають навіть після введення антигену. Постійне та регулярне використання ULMWH також має понижувати АHR, і таким чином, ULMWH може застосовуватись для лікування хронічної астми, спричиненої як специфічними (тобто антигенними), так і неспецифічними факторами.

Отже, цим винаходом передбачається спосіб лікування хворих, що страждають на спровоковану антигеном астму, в організм яких потрапив антиген, що викликає таку астму; цей спосіб полягає у ендобронхіальному призначенні хворому фармацевтичної композиції, що містить від близько 0,005 до близько 1,0мг однієї чи більшого числа фракцій ULMWH на один кілограм ваги тіла хворого в кожній дозі згаданої композиції; оптимальним є вміст від близько 0,075 до близько 0,75мг/кг згаданих фракцій в кожній дозі.

З погляду на задачу, поставлену у заявці цього винаходу, аббревіатура ULMWH розкривається як "фракції гепарину, що мають середню молекулярну вагу не більш як 3000Да". ULMWH з молекулярною вагою не більш як 2500Да є навіть ефективнішими для використання згідно зі способом цим винаходом. Кожна з фракцій ULMWH містить дисахариди, трисахариди, тетрасахариди і/або пентасахариди, а також молекули з більш довгими ланцюжками.

Згідно з винаходом, пацієнтові, який страждає на викликану антигеном астму і вдихнув, ковтнув чи іншим шляхом контактував з антигеном (наприклад, якщо було здійснено "контрольне введення" антигену) такого типу, який провокує напади астми, незважаючи на те, чи вже виявлялися в організмі пацієнта симптоми АBR і/або АHR, чи ні, негайно вводиться шляхом інгаляції одна доза фармацевтичної композиції, що містить одну чи більше фракцій ULMWH, сумарно присутніх в межах наведеного вище діапазону значень концентрації. Далі - за потребою - можуть призначатися додаткові дози, доти, поки опір поточкові повітря з боку дихальних шляхів пацієнта не стане нормальним або не зберігатиметься на нормальному рівні.

Цей винахід також охоплює введення ULMWH пацієнтам з хронічною астмою з метою послаблення та повного лікування АHR. "Хронічне введення" в контексті цього опису означає введення ULMWH-вміщуючих композицій принаймні один раз на добу протягом принаймні десяти діб поспіль.

Хронічне введення композиції, що містить близько 0,005-1,0мг/кг в одній дозі, оптимально близько 0,075-0,75мг/кг в одній дозі, може продовжуватися протягом невизначеного часу, з метою запровадження АHR-понижуючого терапевтичного лікування, яке за своєю ефективністю співставляється принаймні з лікуванням кортикостероїдами, але практично не справляє побічних ефектів.

Незважаючи на відому активність N-десульфатованих гепаринів в інших біологічних системах, наприклад, як інгібіторів росту клітини, виявлено, що всі типи фракцій ULMWH, які є активними і можуть застосовуватись згідно цим винаходом лікуванні хворих на астму, є N-сульфатованими; N-десульфатовані фракції для розв'язання задач цього винаходу є неефективними.

Інгаляційні ULMWH-композиції, що використовуються згідно з цим винаходом, можуть являти собою рідкі або порошкоподібні композиції, котрі містять ULMWH і є придатними для розпилювання та ендобронхіального введення, або композиції у вигляді аерозолі, які призначаються з використанням спеціального пристрою для введення аерозолей дозованими порціями.

Відповідні рідкі композиції містять ULMWH в водному розчині з фармацевтично прийнятним інгаляційним розчинником, наприклад, в ізотонічному розчині або бактеріостатичній воді. Розчини вводяться за допомогою розпилювачів точно спрямованої дії, яка базується на використанні помпоподібних пристроїв чи натискувачів,

або за допомогою інших пристроїв, які дозволяють забезпечити надходження певного необхідного точно дозованого об'єму рідкої композиції до легеневої хворого.

Відповідні порошкоподібні композиції включають, згідно винаходу, порошкові гепаринові препарати, добре перемішані з лактозою чи іншими інертними порошками, прийнятними для ендобронхіального введення. Порошкоподібні композиції вводяться за допомогою аерозольного розпилювача з дозатором, або упаковуються в крижку капсулу, котра вставляється пацієнтом в пристрій, який пробиває згадану капсулу та створює стійкий рівномірний потік насиченого згаданим порошковим препаратом повітря, придатний для інгаляції.

Фармацевтичні прописи аерозолів для застосування згідно з цим способом зазвичай включають фторовані алканові пропеланти, поверхнево-активні речовини та співрозчинники, і можуть бути поміщеними в алюмінієві та інші традиційні резервуари, які закриваються відповідним дозуючим клапаном і герметизуються з пропелантом.

Сумарна концентрація фракцій ULMWU у будь-якому транспортуючому агенті (носії), придатному для виконання задач цього винаходу, має бути достатньо високою для того, щоб забезпечити необхідну дозу лікувального препарату в межах від близько 0,05 до близько 1,0 мг ULMWU на кілограм ваги тіла пацієнта. Отже, наприклад, якщо розпилювач дозволяє вводити 4 мл розчину в одній дозі, концентрація ULMWU в розчині для лікування хворого з вагою тіла 75 кг повинна становити близько 1,0-20,0 мг/мл.

Як відомо фахівцям-фармацевтам, існує багато стандартних способів та пристроїв, придатних для введення точно визначених доз ендобронхіальних препаратів та для регулювання потрібного об'єму дозування в залежності від ваги тіла пацієнта та серйозності стану його здоров'я. Крім того, існує багато визнаних фахівцями рідких, порошкоподібних та аерозольних транспортуючих агентів, придатних для ендобронхіального введення композицій з ULMWU, що розкриваються у цьому винаході. Об'єм винаходу не обмежує застосування будь-яких окремих інертних транспортуючих агентів (носіїв), розчинників чи наповнювачів, а також не лімітує використання будь-яких окремих способів, чи пристроїв, чи способів ендобронхіального введення препаратів.

Застосування композицій з ULMWU, опис яких наведено в цьому документі, забезпечує високу ефективність лікування хворих на спровоковану антигеном астму навіть після того, як антиген потрапив в організм шляхом контрольованого введення.

З метою демонстрування несподіваних переваг фракцій ULMWU - у порівнянні з високомолекулярними гепаринами - для лікування спровокованої антигеном астми після контрольованого введення антигену було запроваджено кілька експериментів, метою яких було саме порівняння впливу різних типів гепарину на організм барана, що знаходився в алергічному стані, як перед, так і після контрольованого введення антигену. Детальний опис цих експериментів та одержаних результатів надається у прикладах нижче за текстом, а також відображається на фігурах, які ілюструють ці приклади.

Наступні приклади, які ілюструють спосіб застосування препарату згідно з цим винаходом і демонструють його ефективність, не стосуються згаданих специфічних речовин, процедур або схем приймання лікарських засобів, які повинні використовуватися виключно з метою реалізації винаходу.

#### ПРИКЛАД I

Введення гепаринів перед „введенням антигену

Методика

Легеневий, „опір ящику повітря

Для всіх дослідів використовували шістьнадцять алергічних овець, лише з попередньо задокументованим загостренням бронхостенозної реакції на антиген у вигляді кишкових нематод виду *Ascaris suum*. Вівцям вводили закріплену манжеткою назотрахеальну трубку і вимірювали легеневий опір потоку ( $R_L$ ) повітря за допомогою езофагеального катетер-балону, в той час як об'єм грудного (торакального) газу вимірювали за допомогою плетизмографа, який, загалом, використовують для визначення зміни об'єму всього тіла. Дані було відображено у вигляді конкретних величин  $R_L$  ( $SR_L$ , визначених як  $R_L$  разів об'єму торакального газу ( $V_T$ )).

Чутливість, дихальних шляхів

Для оцінки чутливості дихальних шляхів складалися кумулятивні криві залежності доза-реакція на інгаляційний карбахол, за допомогою вимірювання  $SR_L$  до і після інгаляції буферного розчину солей, а також після 10 вдихів карбахолу, концентрація якого поступово збільшувалася (0,25, 0,5, 1,0, 2,0 і 4,0% ваги/об'єм розчину). Чутливість дихальних шляхів вимірювали шляхом визначення сукупної провокуючої дози ( $PD_{50}$ ) карбахолу (в одиницях вдихання), що підвищувала  $SR_L$  до 400% від базового рівня значень. За одиницю вдихання приймалося один вдих 1%-го розчину карбахолу.

Фракції гепарину

У експерименті, що порівнює ефективність різних препаратів гепарину при введенні алергічним вівцям до введення антигену, використовували: один гепарин із ультранизькою молекулярною вагою, або ULMWU (CY222, виробництва "Санофі", Париж, Франція), один гепарин із низькою молекулярною вагою (CY216, "Санофі") і один гепарин із середньою молекулярною вагою (Фрагмін, "Кабівітрум",

Стокгольм, Швеція). Молекулярна вага та інші характеристики цих фракцій гепарину представлені у Таблиці 1.

Таблиця 1

Молекулярна вага і характеристики фракцій гепарину

	CY222 (ULMWU)	CY216 (LMWU)	ФРАГМІН (MMWU)
Молекулярна вага	2355Да	4270Да	6400Да
Анти-Ха-активність	70 IU./мг	112 IU./мг	158 IU./мг

Анти-ІІа активність	12 I.U./мг	29 I.U./мг	—
APTT	28 I.U./мг	45 I.U./мг	58 I.U./мг
Віднош. Анти-Ха/APTT	2.5	2.5	2.72
% вмісту GAG	70%	60%	65%
% ланцюжків з ультранизькою мол. вагою (ULMW) (мол.вага. < 2500 Да)	88%	27%	11%

[Прим, перекл.: (LMWH) - гепарин із низькою молекулярною вагою, (MMWH) - гепарин із середньою молекулярною вагою, I.U. - міжнародна одиниця].

Як видно з таблиці, фракція ULMWH, що її використовували для цього експерименту, відзначається не лише молекулярною вагою нижче від 3000Да, але і ще і тим, що близько 88% гепаринових ланцюжків мають молекулярну вагу, нижчу від 2500Да.

Протокол експерименту

Дослідження дихальних шляхів

Був визначений базовий рівень чутливості кожної піддослідної тварини (PD<sub>4</sub>), після чого в різні дні проведення експерименту баранам через дихальні шляхи вводили антиген *Ascaris suum*. Вимірювали SR<sub>L</sub> перед і одразу ж після згаданого контрольного введення антигену, і далі щогодини протягом 2 годин, доки SR<sub>L</sub> не повернулася до базового рівня. Після цього вимірювали пост-антигенний PD<sub>4</sub>. Дослід повторювали через 14 діб, після попереднього введення CY222, CY216 і Фрагміну в дозах 0,31, 0,62, 1,25, 2,5 і 5,0мг/кг.

Аналіз даних;

Дані було відображено таким чином:

(а) значення  $\pm$  SE% зміни SR<sub>L</sub>;

(б) PD<sub>4</sub> у % від базового рівня;

(в) % захисту реакції бронхостенозного загострення (ABR) і

(г) % захисту гіперчутливості (AHR).

(а) SR<sub>L</sub> (% зміни) = пост-антиген SR<sub>L</sub> - базов, SR<sub>L</sub> x 100 базов. SR<sub>L</sub>

(б) PD<sub>4</sub> (% від баз. рівня) = пост-антиген PD<sub>4</sub> x 100 базов. PD<sub>4</sub>

(в) % захисту ABR = контр.  $\Delta$ SR<sub>L</sub> % SB<sub>L</sub> % . x 100 контр.  $\Delta$ SR<sub>L</sub> %

(г) % захисту AHR = LMWHF – PD<sub>4</sub> КОНТР. АНТИГЕН. PD<sub>4</sub> x 100 базов. PD<sub>4</sub> - контр, антиген PD<sub>4</sub>

Порівняння впливу попереднього введення досліджуваних фракцій гепарину на ABR та AHR відображено в Таблицях 2-6 та графічно проілюстровано на Фігурах 1-8.

Дані свідчать про те, що попереднє введення - у вигляді аерозолей - фракцій CY222, CY216 і Фрагміну послаблювало спровоковану антигеном реакцію загострення бронхостенозу в залежності від дозування; мінімальні ефективні дози становили 0,62мг/кг, 1,25мг/кг та 2,5мг/кг, відповідно.

Попереднє введення CY222, CY216 і Фрагміну також послаблювало спровоковану антигеном AHR в залежності від дозування; мінімальні ефективні дози становили 0,62мг/кг, 1,25мг/кг та 5,0мг/кг, відповідно.

Аналіз порівняння препаратів виявив, що захисні ефекти є обернено пропорційними молекулярній вазі фракцій гепарину. Фракція ULMWH (CY222) виявилася найпотужнішим агентом, про що свідчить значне інгібування спровокованих антигеном бронхостенозу та AHR у дозі 0,6 мг/кг, причому CY216 та Фрагмін виявилися неефективними у таких дозах. Групові середні значення I.D.<sub>50</sub> для CY222, CY216 та Фрагміну щодо алергічного бронхостенозу становили 0,5, 1,3 і 1,8мг/кг, відповідно. Групові середні значення I.D.<sub>50</sub> для CY222, CY216 та Фрагміну щодо AHR становили 0,51, 2,5 і 4,7мг/кг, відповідно.

Таблиця 2

Ефект впливу попереднього введення препарату  
з CY222 на спровокований антигеном бронхостеноз

АНТИГЕН – КОНТРОЛЬ Y222					
Доза (мг/кг)	Баз. рівень	Пост- введення	Баз. рівень	Пост- CY222	Пост- введення
0.31	1.15	3.27*	1.17	1.08	2.66*
(n=7)	(.04)	(.33)	(.05)	(.06)	(-35)
0.62	1.15	3.27*	1.15	1.21	1.65+
(n=7)	(.04)	(.33)	(.05)	(.06)	(.06)
1.25	1.16	3.43*	1.08	1.17	1.71 +
(n=6)	(.04)	(-32)	(.06)	(.05)	(.19)
2.5	1.13	3.31*	1.04	1.06	1.33+
(n=6)	(.04)	(.39)	(.05)	(.10)	(.09)
5.0	1.13	3.31*	1.16	1.12	1.56+
(n=6)	(.04)	(.39)	(.05)	(.02)	(.12)

Дані відображено у вигляді  $\pm$ SE SR<sub>L</sub> (специфічна легенева резистентність), без і після попереднього інгаляційного введення дозами, що підвищуються, препарату CY222.

\* Значно відрізняється від базового рівня (P<.05)

+ Значно відрізняється від антигену-контролю (P<.05)

Таблиця 3

Ефект впливу попереднього введення препарату  
з CY216 на спровокований антигеном бронхостеноз

АНТИГЕН-КОНТРОЛЬ СУ216					
Доза (мг/кг)	Баз. рівень	Пост-введення	Баз. рівень	Після СУ216	Пост-введення
0.31	0.92	2.64*	1.12	1.08	3.21*
(n=7)	(.04)	(.23)	(.07)	(.04)	(.09)
0.62	0.92	2.64*	1.04	1.07	2.54*
(n=7)	(.04)	(.23)	(.06)	(.03)	(.31)
1.25	1.12	3.24*	1.04	1.20	2.03+
(n=8)	(.04)	(.29)	(.07)	(.13)	(.36)
2.5 (n=5)	1.14	3.36*	1.05	1.04	1.76+
	(.05)	(.48)	(.07)	(.11)	(.32)
5.0 (n=6)	1.09	3.35*	1.09	1.18	1.75+
	(.04)	(.14)	(.03)	(.08)	(.20)

Дані відображено у вигляді  $\pm SE SR_L$  (специфічна легенева резистентність), без і після попереднього інгаляційного введення дозами, що підвищуються, препарату СУ216.

\* Значно відрізняється від базового рівня ( $P < .05$ )

+ Значно відрізняється від антигену-контролю ( $P < .05$ )

Таблиця 4

Ефект практичного введення препарату з фрагміном на викликаний антигеном бронхостеноз

АНТИГЕН - КОНТРОЛЬ			ФРАГМІН		
Доза (мг/кг)	Баз. рівень	Пост-введення	Баз. рівень	Після фрагміну	Пост-введення
1.25	1.04	3.37*	1.11	1.07	2.71*
(n=7)	(.06)	(.32)	(.05)	(.08)	(.42)
2.5	0.96	3.19*	1.07	1.16	1.56+
(n=6)	(.04)	(.30)	(.08)	(.12)	(.25)
5.0	1.00	3.39*	0.98	0.98	1.47+
(n=7)	(.01)	(.39)	(.03)	(.03)	(.21)

Дані відображено у вигляді  $\pm SE SR_L$  (специфічна легенева резистентність), без і після попереднього інгаляційного введення препарату з Фрагміном.

Значно відрізняється від базового рівня ( $P < .05$ )

+ Значно відрізняється від антигену-контролю ( $P < .05$ ).

Таблиця 5

Ефект впливу попереднього інгаляційного введення препарату з СУ222, СУ216 і фрагміном на викликану антигеном гіперчутливість дихальних шляхів

Доза (мг/кг)	СУ222			СУ216			ФРАГМІН		
	Баз. рівень	Контр.	Препар.	Баз. рівень	Контр.	Препар.	Баз. рівень	Контр.	Препар.
0.31	15.3	*6.7	*8.4 (1.9)	19.4	*7.3	10.3 (2.8)	-	-	-
(n=7)	(0.7)	(0.6)		(2.6)	(1.4)		-	-	-
0.62	15.7	*6.5	13.0+	19.2	*8.3	*11.3	-	-	-
(n=6)	(0.7)	(0.7)	(1.5)	(2.2)	(1.5)	(2.1)			
1.25	15.4	*6.7	15.6+	15.3	*6.7	*10.6+	16.7	*6.4	*8.7 (1.8)
(n=7)	(0.6)	(0.6)	(1.6)	(0.7)	(0.6)	(1.3)	(1.8)	(0.7)	
2.5	15.7	*6.5	18.1 +	15.4	*6.1	*10.7+	19.3	*7.8	*11.0
(n=6)	(0.7)	(0.7)	(2.5)	(0.7)	(0.7)	(1.7)	(3.0)	(1.6)	(1.2)
5.0	15.7	*6.5	15.9+	15.7	*8.5	16.4+	19.4	*10.5	16.6+
(n=6)	(0.7)	(0.7)	(0.5)	(1.0)	(0.7)	(1.4)	(2.7)	(2.1)	(2.9)

Дані відображено у вигляді величини  $\pm SE PD_4$  карбахолу в одиницях вдихання, для базового рівня та рівня після введення, без (контр.) і після попереднього введення (препар.), з різними фракціями гепарину.

$PD_4$  = Сукупна провокуюча доза карбахолу, яка підвищувала  $SR_L$  до 400% від базового рівня. Одна одиниця вдихання являє собою один вдих 1мг/мл карбахолу.

\* Значно відрізняється від базового рівня ( $P < .05$ )

+ Значно відрізняється від антигену-контролю ( $P < .05$ )

ТАБЛИЦЯ 6  
ПОРІВНЯННЯ „ЗАХИСНОГО ВПЛИВУ ВВЕДЕНИХ ШЛЯХОМ ІНГАЛЯЦІЇ СУ222 (УЛЬТРАНИЗЬКА МОЛЕКУЛЯРНА ВАГА), СУ2Ж(НИЗЬКА „МОЛЕКУЛЯРНА ВАГА) І ФРАГМІНУ (СЕРЕДНЯ МОЛЕКУЛЯРНА ВАГА) НА СПРОВОКОВАНИЙ АНТИГЕНОМ БРОНХОСТЕНОЗ І ПЕРЧУТЛИВІСТЬ ДИХАЛЬНИХ „ШЛЯХІВ

Алергічний		Бронхостеноз		Гіперчутливість дихальних шляхів			
Доза (мг/кг)	СУ222	СУ216	Фрагмін	Доза (мг/кг)	СУ222	СУ216	Фрагмін
0.31	11% (21%)	16% (14%)	-	0.31	18% (21%)	32% (17%)	-
0.62	75%+* (8%)	25% (15%)	-	0.62	68%+ (18%)	30% (11%)	-
1.25	78%++ (8%)	50%+ (20%)	24% (20%)	1.25	*107%++ (26%)	48%+ (12%)	21% (12%)
2.5	79%+ (9%)	60%+ (11%)	84%+ (9%)	2.5	*131%++ (35%)	49%+ (12%)	30% (11%)
5.0	79%+ (3%)	79%+ (6%)	82%+ (7%)	5.0	102%++ (8%)	108%++ (15%)	53%+ (16%)
I.D. <sub>50</sub>	0,5мг/кг	1.3мг/кг	1,8мг/кг	I.D. <sub>50</sub>	0,5мг/кг	2,5мг/кг	4,7мг/кг

Дані відображено у вигляді значення  $\pm SE\%$  захисту для кожної дози. Для кожної групи також подається розрахована групова середня

I.D.<sub>50</sub> (доза інгібування, яка забезпечує 5-% захисту).

+ Значний захист ( $P < .05$ )

+ Значно відрізняється від Фрагміну ( $P < .05$ )

\* Значно відрізняється від СУ216 ( $P < .05$ )

ПРИКЛАД II

Введення гепаринів після введення „антигену

Протокол проведення експерименту був аналогічним Прикладу I, за винятком: (а) три гепаринові композиції, які було призначено піддослідним тваринам, являли собою СУ222, комерційний гепарин (молекулярна вага близько 15000Да), і Фрагмін, (б) гепарини вводилося в організм тварин у вигляді аерозолі одразу ж після введення антигену.

Дані експерименту представлені в Таблиці 7 і графічно проілюстровані на Фігурах 9-11.

Таблиця 7

Порівняння-ефективності впливу введених шляхом інгаляції комерційного гепарину (8мг/кг), фракції гепарину із середньою молекулярною вагою (фрагмін, 5мг/кг) і фракції гепарину з ультранизькомолекулярною вагою (СУ222, 0,6мг/кг) на викликану антигеном гіперчутливість дихальних шляхів.

	Базов. рівень	Пост-введ. (контрол.)	Пост-введ. (гепарин)
Гепарин	18.9 $\pm$ 2.1	10.5 $\pm$ 0.2*	8.9 $\pm$ 2.2*
Фрагмін	22.7 $\pm$ 3.2	13.3 $\pm$ 2.0*	9.5 $\pm$ 2.6*
СУ222	20.4 $\pm$ 1.7	11.7 $\pm$ 2.1*	25.1 $\pm$ 1.1*

Дані відображено у вигляді значення  $\pm SE$  PD<sub>400</sub> карбахолу в одиницях вдихання (одна одиниця вдихання являє собою один вдих 1мг/мл карбахолу). Всі агенти було розпилено одразу ж "після" введення антигену.

\* Значно відрізняється від базового рівня ( $p < .05$ )

+ , Значно відрізняється від антигену-контролю ( $p < .05$ )

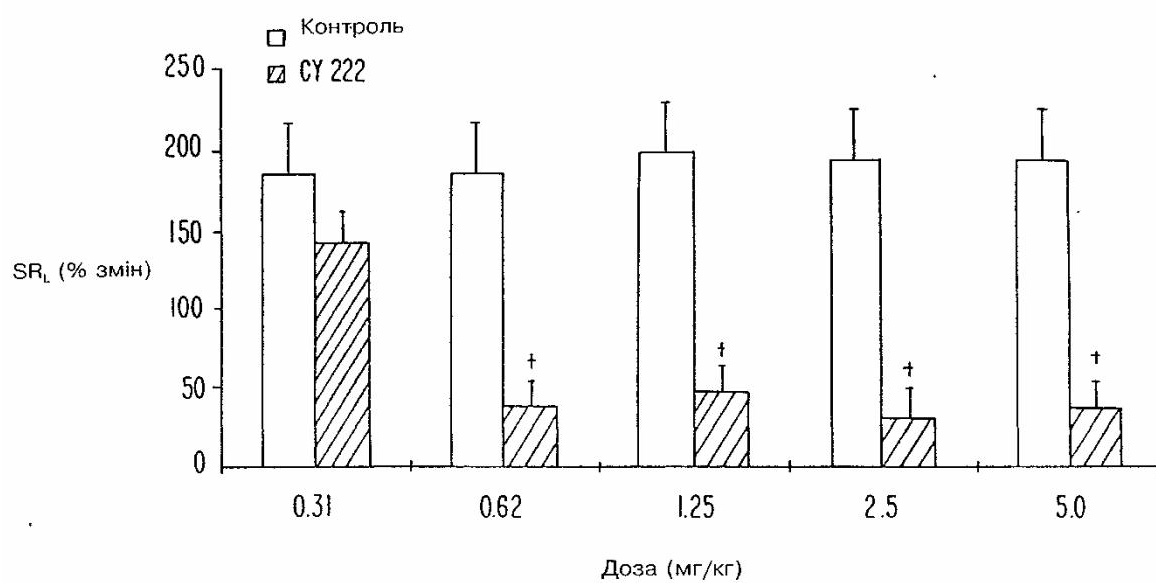
Лише застосування СУ222 забезпечує істотний захист. Як видно з Таблиці 7 та Фігур 9-11, інгаляційне введення СУ222 після контрольного введення антигену суттєво впливає на АНР, відновлюючи його рівні в організмі піддослідних тварин до базових або більш високих значень. Цей ефект не досліджували для комерційного гепарину та Фрагміну, оскільки покращення рівнів АНР внаслідок постконтрольного введення цих гепаринів не відбувалося.

Таким чином, у цьому описі розкрито способи і композиції, які розроблено з метою виконання задач винаходу і які є добре адаптованими для того, щоб задовольняти умовам практичного використання.

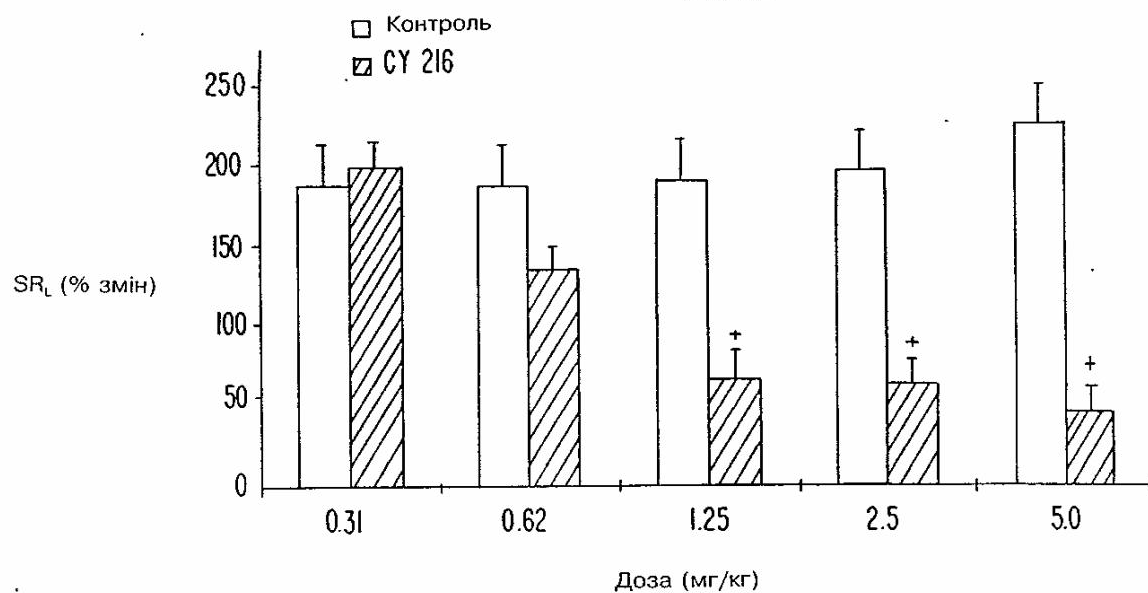
Оскільки можуть існувати різноманітні варіанти реалізації розкритого вище винаходу, а також є можливими різні зміни у згаданих варіантах реалізації, слід усвідомлювати, що всі описані вище речовини розглянуто як ілюстративні приклади, і суть винаходу ними не обмежується.

Інформація, що формулюється як нова і потребує захисту згідно з патентною грамотою, надається у Формулі винаходу.

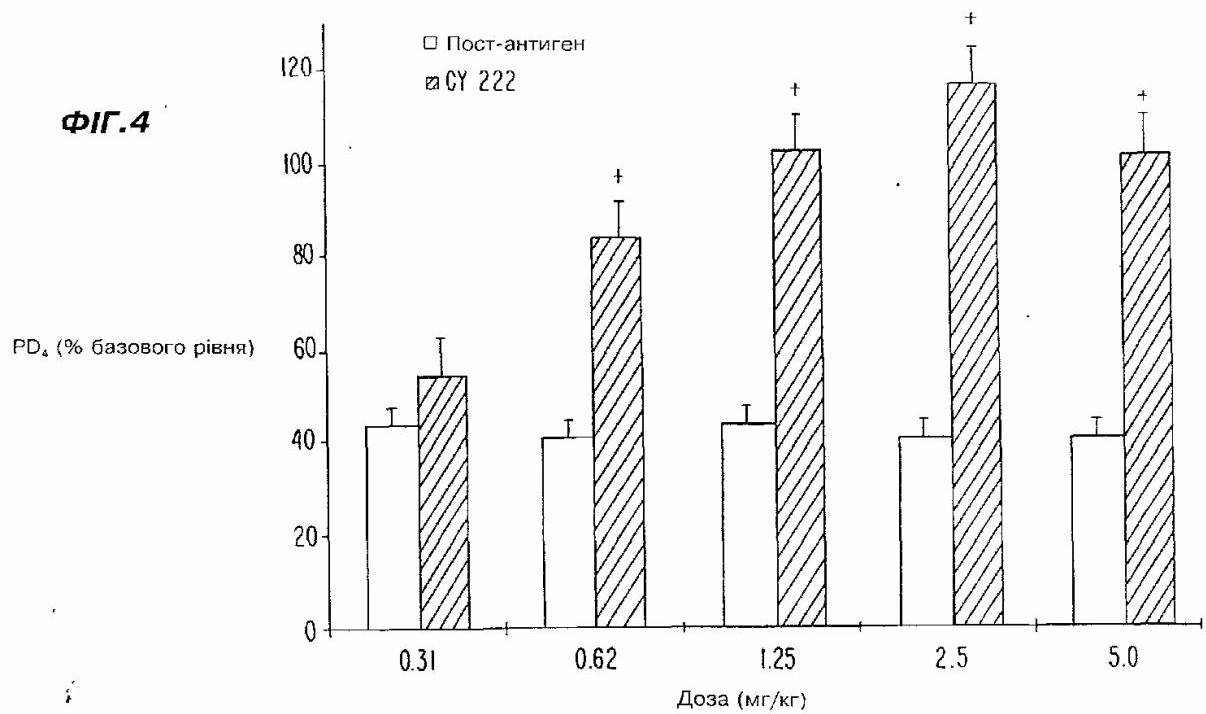
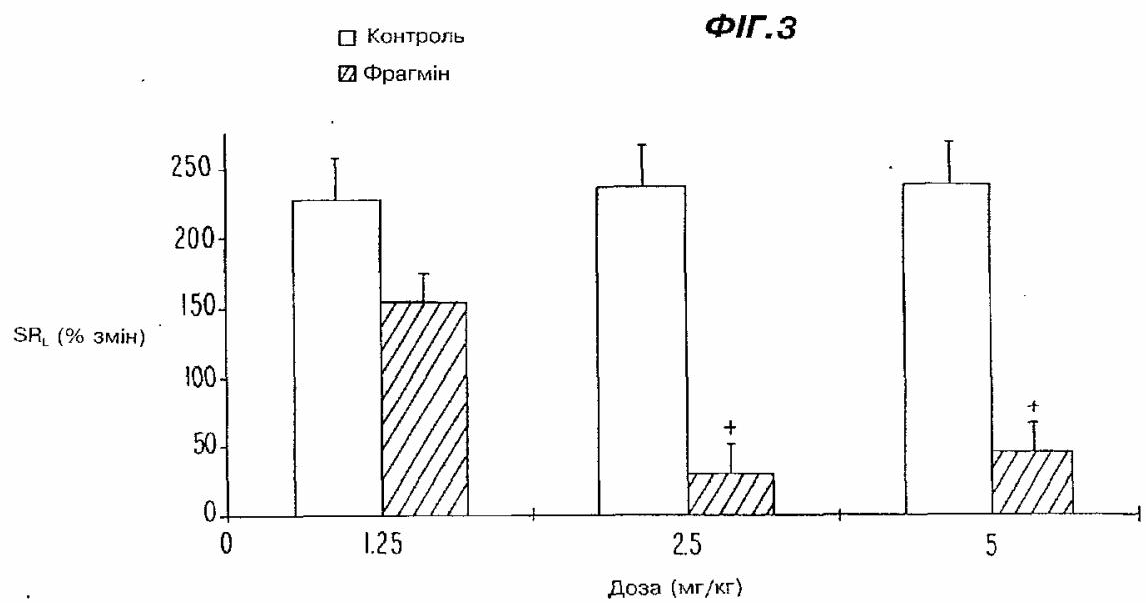
**ФІГ.1**



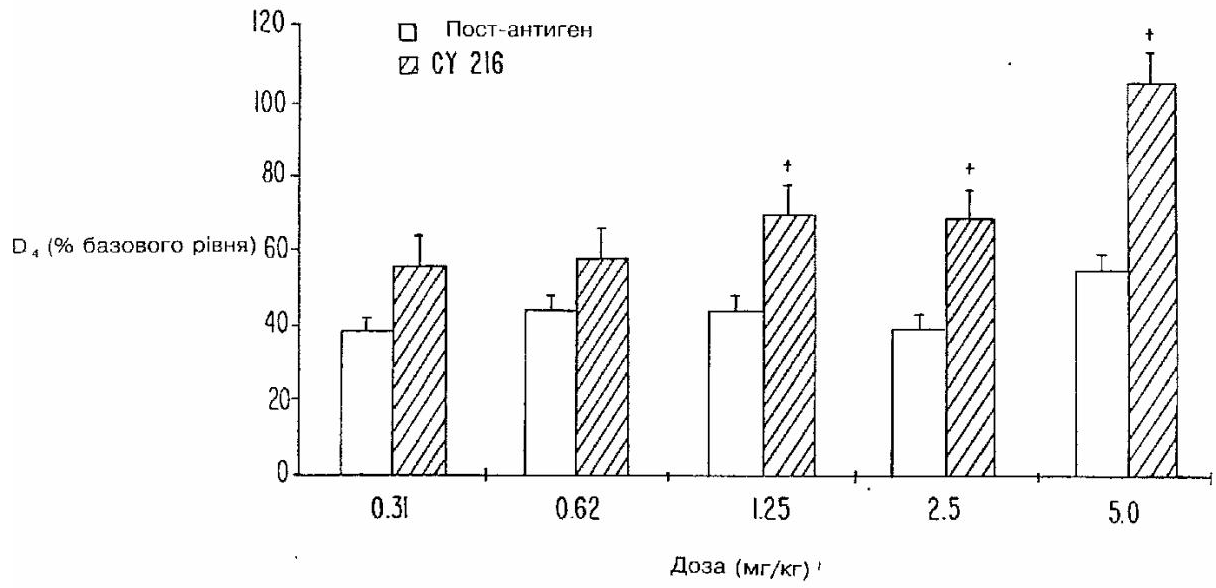
**ФІГ.2**



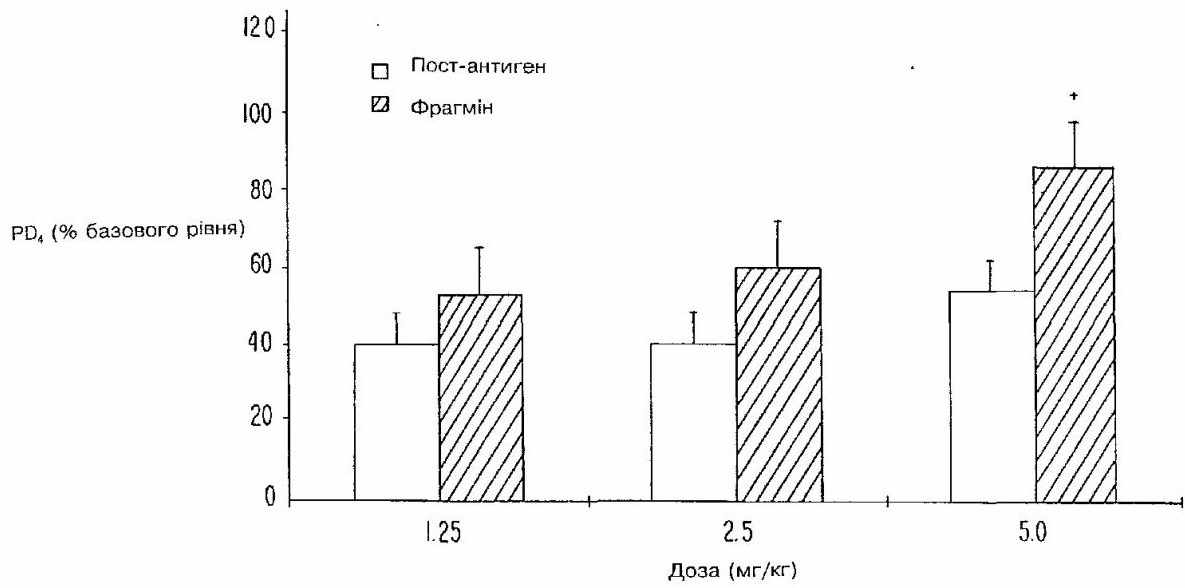




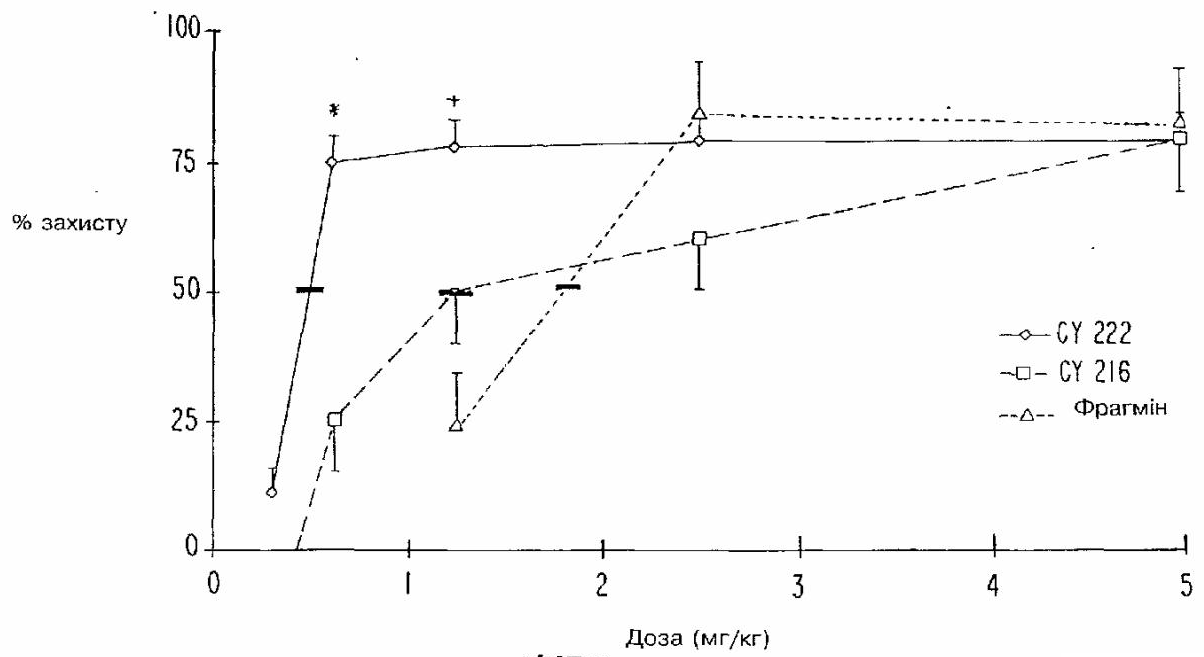
**ФІГ.5**



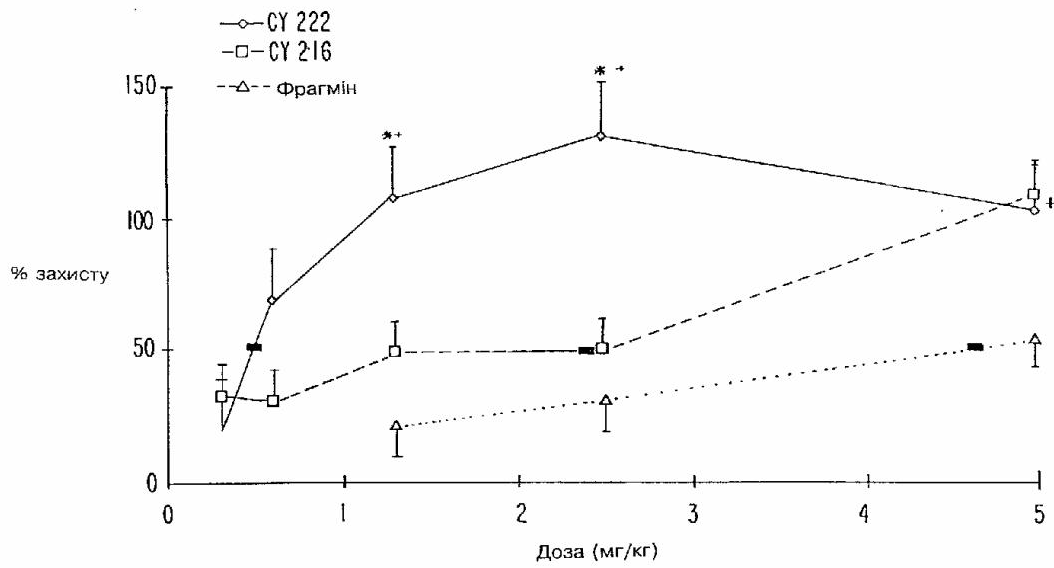
**ФІГ.6**



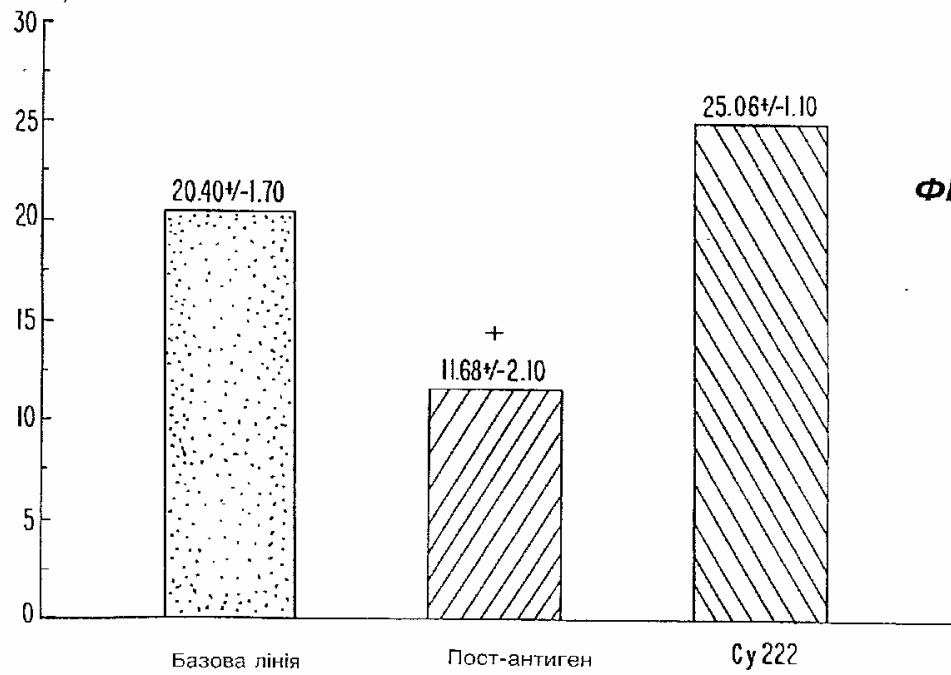
**ФІГ.7**



**ФІГ.8**

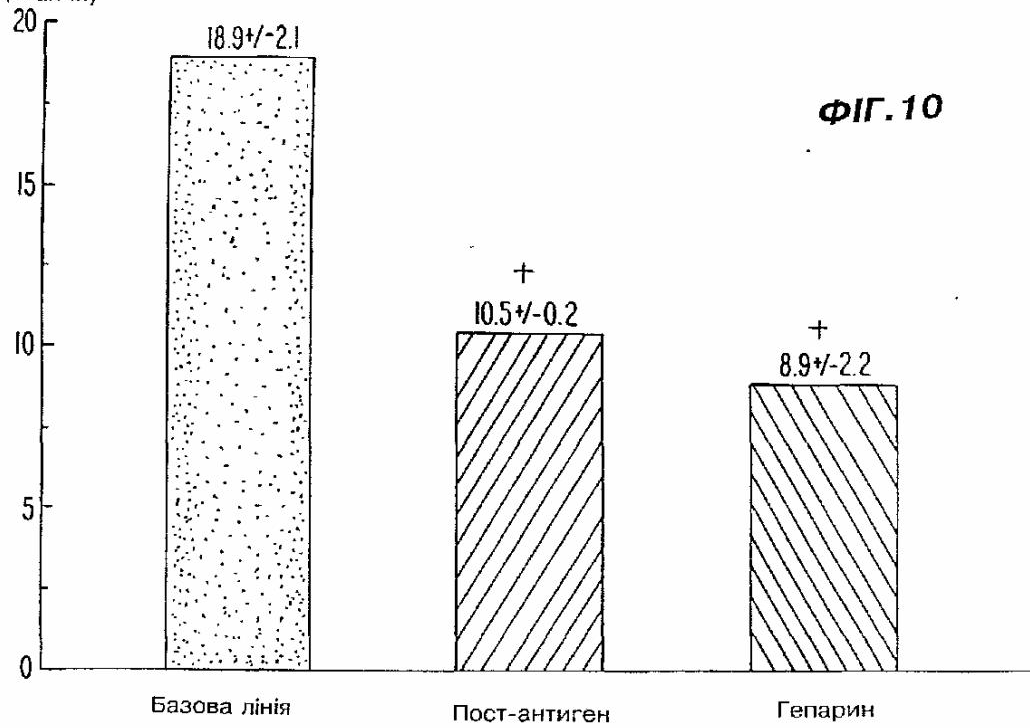


PD<sub>4</sub> (одиниці дихання)



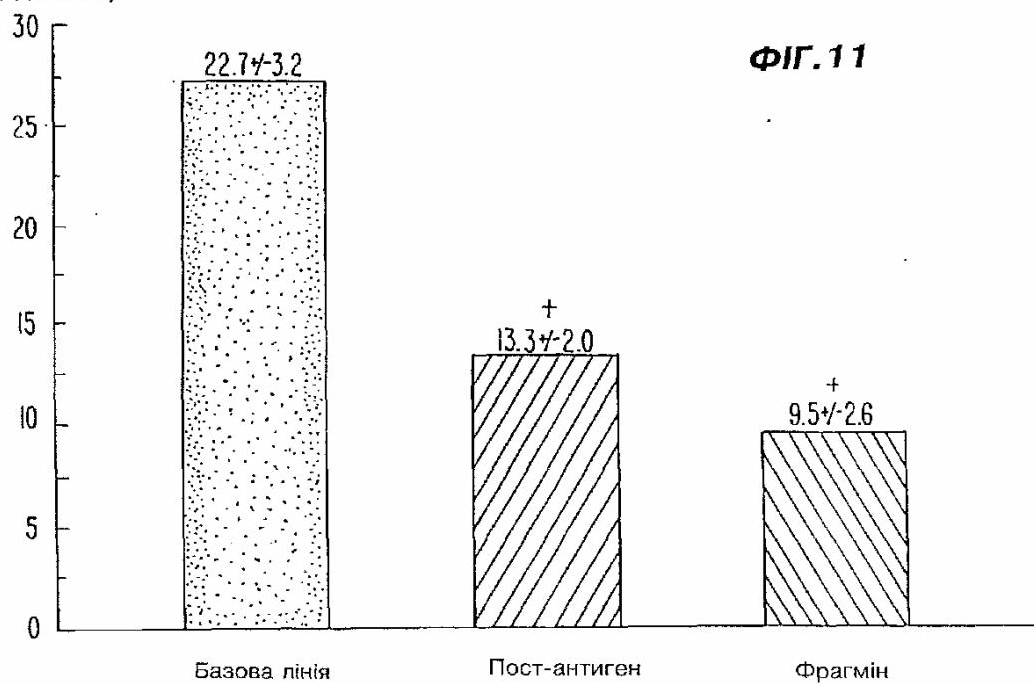
ФІГ.9

PD<sub>4</sub> (одиниці дихання)



ФІГ.10

PD<sub>4</sub> (одиниці дихання)



ФІГ. 11