

**A METIONÁL VAGY A MALON-DIALDEHID INTRA-
CELLULÁRIS MENNYISÉGÉT BEFOLYÁSOLÓ FAKTORT
TARTALMAZÓ, APOPTÓZIST SZABÁLYOZÓ KÉSZÍTMÉNY**

K I V O N A T

A találmány tárgya egy vegyület, amely lehet a metionál, a malon-dialdehid vagy bármely olyan faktor, amely a metionál vagy a malon-dialdehid intracelluláris mennyiségét befolyásolja, gyógyszerként történő alkalmazásra.

A vegyület gyógyszerként használható apoptózis, vagyis a sejtek programozott halálának modulálására.

A találmány vonatkozik az ilyen vegyületeket tartalmazó gyógyszer- vagy kozmetikai készítményekre és a bőr öregedésének megakadályozására szolgáló eljárásra is a készítmények alkalmazásával.

Jeli. dr. Anna: min. es

Bodai F. dr. es

A METIONÁL VAGY A MALON-DIALDEHID INTRA-CELLULÁRIS MENNYISÉGÉT BEFOLYÁSOLÓ FAKTORT TARTALMAZÓ, APOPTÓZIST SZABÁLYOZÓ KÉSZÍTMÉNY

A találmány tárgya a metionál vagy a malon-dialdehid intracelluláris mennyiségét befolyásoló faktort tartalmazó, apoptózist szabályozó készítmény. A találmány tárgya közelebbről egy vegyület, amely lehet a metionál, a malon-dialdehid vagy bármely olyan faktor, amely a metionál vagy a malon-dialdehid intracelluláris mennyiségét befolyásolja, gyógyszerként történő alkalmazásra. Ez a gyógyszer közelebbről a sejtek programozott halálának (apoptózis) jelenségét modulálja.

A találmány vonatkozik az apoptózist moduláló készítményre is. Végül a találmány tárgya eljárás a bőr fény által kiváltott vagy az idő múlása miatt bekövetkező öregedése megakadályozására és/vagy leküzdésére.

A sejtek halálában két mechanizmus játszik szerepet. Az első klasszikus mechanizmus neve nekrozis. Morfológiailag a nekrozisra az jellemző, hogy a mitokondriumok és a citoplazma felfúvódik és a mag elváltozik, majd a sejt lebomlik, önmagát feloldja, és ezt egy gyulladásos jelenség kíséri. A nekrozis passzív és véletlenszerű módon folyik le. A szövetnekrozis oka általában a sejtek valamilyen fizikai sérülése vagy például valamilyen kémiai mérég.

A sejthalál másik formáját apoptózisnak hívják (lásd Kerr J.F.R. és Wyllie A.H., Br. J. Cancer, 265, 239 (1972)), a nekrozissal ellentétben azonban az apoptózist nem kíséri gyulladásos betegség. Ismeretes, hogy az apoptózis különböző fiziológiai feltételek mellett

valósulhat meg. Ez a sejt-öngyilkosság nagymértékben szelektív formája, amelyre könnyen megfigyelhető morfológiai és biokémiai jelenségek jellemzőek. Így például megfigyelhetjük a kromatin kondenzációját, amelyet adott esetben az endonukleáz aktivitása kísér, megfigyelhető továbbá apoptikus testek képződése, és a dezoxiribonukleinsav (DNS) fragmentációja endonukleázok aktiválódása révén 180-200 bázispárból álló DNS fragmentekké. (Ezek a fragmentek agaróz gélen elektroforézissel figyelhetők meg.)

Az apoptózis úgy tekinthető, mint a szövetek kialakulásában, differenciálódásában és homeosztáziájában szerepet játszó sejtek programozott halála. Úgy véljük tehát, hogy a sejtek differenciálódása, növekedése és érése szoros összefüggésben áll az apoptózissal. Tehát egy jó egészségben lévő embernél egyensúly áll fenn az említett jelenségek együttesében.

Az orvosi területen számos patológiai helyzetben módosított, sőt esetleg szabálytalan apoptózis mechanizmus jelentkezik, vagy olyan apoptózis mechanizmus, amellyel nem jár együtt egy másik biológiai jelenség rendellenessége ahhoz, hogy az egyensúlyt elérje. Így például ismert, hogy az apoptózis szándékos befolyásolásával azt kiváltva vagy azt elfojtva számos betegség kezelhető. Különösen olyan betegségekről van szó, amelyek sejtburjánzással kapcsolatosak, mint például rák, az autoimmunbetegségek, az allergiák, vagy éppen ellenkezőleg, olyan betegségek, amelyek a sejt eltűnésével járnak együtt, mint például az emberi immunhiányt kiváltó vírus immunhiány szindrómája (AIDS), a neurodegeneratív betegségek (például Alzheimer-kór), vagy a szívinfarktusnál vagy az agyi ischémiás sérülésnél fellépő mértéktelen károsodások.

Konkrétan az onkológiában állapították meg, hogy számos rákellenes gyógyszer, például az adriamicin vagy a ciklofoszfamid képes apoptózis kiváltására.

A kozmetikában a bőröregedés jelei elsősorban a bőr főbb biológiai mechanizmusai rendellenes működésének következményei, ezek olyan rendellenességek, amelyeknél az apoptózis mechanizmusa szerepet játszik. Azt gondolhatjuk tehát, hogy minden olyan termék, amely az apoptózis mechanizmusát befolyásolni képes, alkalmas arra, hogy az öregedés megjelenését az öregedés meglévő jeleit, például a ráncokat vagy kisebb ráncokat megelőzze és/vagy megszüntesse.

Nem ismeretes azonban az összefüggés a sejtre exogén vagy endogén termékek és az olyan sejtválaszok között, amelyek az apoptózist kiváltják vagy elfojtják.

Felismertük, hogy az apoptózis kiváltható egy természetes metabolit, a metionál (3-metil-tio-propanál) vagy a malon-dialdehid intracelluláris mennyiségének növelésével. Ugyancsak felismertük, hogy a metionál in vivo malon-dialdehiddé történő átalakulását onkogének, például a bcl_2 gén expresszálasával befolyásolni lehet. Ez a bcl_2 gén arról ismert, hogy a sejtekben, főképp az idegsejtekben a reakcióképes oxigéntartalmú anyagok által kiváltott apoptózist gátolni tudja (lásd Kane D.J. és munkatársai, 1993, Science, 262, 1274-1277).

A találmány tárgya tehát egy vegyület, amely lehet a metionál, a malon-dialdehid vagy bármely olyan faktor, amely a metionál vagy a malon-dialdehid intracelluláris mennyiségét befolyásolni képes, gyógyszerként történő alkalmazásra. Ez a gyógyszer közelebbről a sejtek programozott halála jelenségének befolyásolására szolgál.

A találmány tárgya továbbá apoptózist befolyásoló gyógyszer- vagy kozmetikai készítmény, amelyre jellemző, hatóanyagként metionált, malon-dialdehidet vagy bármely olyan faktort tartalmaz, amely a metionál vagy a malon-dialdehid intracelluláris mennyiségét befolyásolni képes, tartalmaz továbbá gyógyszerészeti vagy kozmetikai szempontból alkalmazható hordozóanyagot.

A metionál, a malon-dialdehid vagy vagy bármely olyan faktor, amely a metionál vagy a malon-dialdehid intracelluláris mennyiségét befolyásolni képes, a találmány szerint alkalmazható önmagában vagy előnyösen keverék formájában. Természetesen a terméket a kívánt cél függvényében választjuk meg, vagyis attól függően, hogy az apoptózist kiváltani akarjuk vagy elfojtani.

A találmány egyik megvalósítási módja szerint tehát az apoptózist kiváltó készítményre az jellemző, hogy hatóanyagként olyan vegyületet tartalmaz, amely lehet metionál, malon-dialdehid vagy vagy bármely olyan faktor, amely a metionál vagy a malon-dialdehid intracelluláris mennyiségét növeli, tartalmaz továbbá gyógyszerészeti vagy kozmetikai szempontból elfogadható vivőanyagot.

A találmány egy másik megvalósítási módja szerint az apoptózist elfojtó készítményre az jellemző, hogy hatóanyagként valamely olyan faktort tartalmaz, amely a metionál vagy a malon-dialdehid intracelluláris mennyiségét csökkenti, tartalmaz továbbá gyógyszerészeti vagy kozmetikai szempontból elfogadható vivőanyagot.

A metionál metabolizmusában ismert, hogy a 4-metil-tio-2-oxo-butánsav in vivo átalakítható a máj, a szív és a vázizmok sejtjeinek mitokondriumaiban jelenlévő elágazó szénláncú oxosav-dehidrogenáz komplex révén, a metionálon keresztül úgy, hogy metil-tio-propionil-CoA keletkezik. [Lásd Wu G. és Yeaman S. J. (1989)]

Biochem. J. 257, 281-284; Haussinger D., Stehle T. és Gerok W. (1985) J. Biol. Chem. 366, 527-536; Jones, S.M.A. & Yeaman S. J. (1986) Biochem. J. 237, 621-623.] Az is ismeretes, hogy a 4-metil-tio-2-oxo-butánsav in vivo átalakítható metioninná történő transzaminálással [lásd Ogier G., Chantepie J., Deshayes C., Chantegrel B., Charlot C., Doutheau A. & Quash G (1993), Biochem. Pharmacol. 45, 1631-1644]. A metionál adott esetben ugyancsak metionollá redukálható reduktáz-aldehiddel illetve metil-tio-propionsavvá oxidálható dehidrogenáz-aldehiddel. A metionál a HO[•] gyökkel együtt végül malon-dialdehidet és metán-tiólt eredményezhet β -hidroxilező reakció révén. A metionál, a malon-dialdehid és az intracelluláris mennyiséget befolyásolni képes faktorok jobb megértése érdekében az 1. ábrán bemutatjuk a metionál metabolizmusát, anélkül azonban, hogy ezzel a találmány oltalmi körét korlátozni kívánnánk.

Az 1. ábrán lévő jelölések a következők:

- MTOB a 4-metil-tio-2-oxo-butánsavat jelenti,
- MTPA a metil-tio-propionsavat jelenti,
- E1 az elágazó láncú dehidrogenáz oxosav komplex, amelynek CO-faktora a tiamin-pirofoszfát (TPP) dekarboxilázát jelenti,
- E2 az elágazó láncú oxosav-dehidrogenáz komplex, amelynek CO-faktora a tioktinsav (TA), transz-acilázát jelenti,
- ALDR az aldehyd reduktázt jelenti,
- ALDH az aldehyd dehidrogenázt jelenti.

A találmány szerinti a metionál vagy a malon-dialdehyd intracelluláris mennyiségét befolyásoló faktoron azokat a vegyületeket értjük, amelyek lehetnek prekursorok, a metionál vagy malon-dialdehyd termékek, a metionál vagy a malon-dialdehyd metabolizmusában szerepet játszó enzimek aktivátorai. Így az 1. ábrán bemutatott metionál vagy malon-dialdehyd metabolizmusából könnyen érthető,

hogyan módosítják ezek a vegyületek a metionál vagy malon-dialdehid, ha bekerülnek a sejttrendszerbe, a metionál vagy malon-dialdehid intracelluláris mennyiségét átmenetileg vagy tartósan.

A metionál vagy a malon-dialdehid prekursorai vagy termékei lehetnek a metionál intracelluláris metabolizmusa prekursorai vagy termékei, például 4-metil-tio-2-oxo-butánsav, metionin, metionol, metil-tio-propionsav vagy metil-tio-propionil-CoA.

A metionál vagy a malon-dialdehid prekursorai vagy termékei olyan termékek is, amelyek in situ képesek a metionál vagy a malon-dialdehid felszabadítására, vagy egy olyan faktor felszabadítására, amely a metionál vagy a malon-dialdehid intracelluláris mennyiségét befolyásolja, ilyenek például a metionál vagy a malon-dialdehid észterei és tioészterei, amelyek in situ metionált, malon-dialdehidet vagy 4-metil-tio-2-hidroxi-butánsavat szabadítanak fel, amely in situ átalakul 4-metil-tio-2-oxo-butánsavvá. A gyógyszerészet területén az ilyen termékeket általában "prodrug"-nak (gyógyszer-elővegyületnek vagy gyógyszer intermediereknek) nevezzük.

Abban az esetben, amikor az apoptózist kiváltani kívánjuk, a metionált, a malon-dialdehidet, a metionál vagy a malon-dialdehid prekursorait vagy termékeit előnyösen olyan enzim inhibitorokkal együtt alkalmazzuk, amelyek olyan metabolikus reakcióban játszanak szerepet, amelyek a metionál eltávolítását segítik elő a fentebb már említett β -hidroxilező reakción kívül (amelynél a metionál malon-dialdehiddé alakul), vagy a β -hidroxiláz aktivátoraival együtt alkalmazzuk, amely β -hidroxiláz a metionálnak malon-dialdehiddé történő átalakulásában szerepet játszó enzim. Így például megemlíthetjük a 4-metil-tio-2-oxo-butánsav és egy transz-amináz inhibitor együttes alkalmazását, amely transz-amináz a 4-metil-tio-2-oxo-

-butánsav metioninná történő átalakulásában játszik szerepet, ilyenek például a fentebb már említett inhibitorok.

Alkalmazhatjuk a metionált vagy metionál intracelluláris mennyiségét növelő faktort olyan vegyületekkel együtt is, amelyek a HO[•] szabad gyök mennyiségét növelik. Ezek közül példaként megemlíthetjük a BCNU-t (N,N-bisz-(2-klór-etil)-N-nitrozo-karbamid), mivel ez a glutation-reduktáz inhibitora, és így lehetővé válik a reaktív oxigéntartalmú anyagok, például a HO[•] gyök intracelluláris mennyiségének növelése, amely HO[•] gyök a malon-dialdehidet eredményező β -hidroxilező reakció egyik résztvevője.

Az ilyen kombináció különösen előnyös az olyan patológiás esetekben, amelyekre a bcl2 gén túlexpresszállása jellemző. Ilyen patológiás állapot például a méhrák, a B-sejt limfóma, a leukémia, a neuroblasztóma, a prosztata adenokarcinóma, a prolaktinóma és egyéb agyalapi miriggyel kapcsolatos mirigydaganatok. A bcl2 gén túlexpresszállása miatt a sejtek a kémiai anyagoknak ellenállóvá válnak. Az említett kombináció tehát részlegesen, esetleg teljesen is képes ezt a kemorezisztenciát gátolni.

Előnyösen az említett kombinációhoz adagolhatunk egy vagy több transz-amináz inhibitorát, amely a 4-metil-tio-2-oxo-butánsav metioninná történő átalakulásában játszik szerepet; ilyenek például a későbbiekben ismertetett vegyületek, különösen előnyös a (9) képletű vegyület.

A metionál metabolizmusában szerepet játszó enzimek inhibitorai vagy aktivátorai közül példaként a következőket említhetjük: a 4-metil-tio-2-oxo-butánsavnak metionálon keresztül metil-tio-propionil-CoA-vá történő átalakulásában szerepet játszó elágazó láncú dehidrogenáz oxosav komplex inhibitorai vagy aktivátorai, vagy a 4-metil-tio-2-oxo-butánsav metioninná történő átalakulásában szere-

pet játszó transz-amináz inhibitorai vagy aktivátorai, vagy a metionálnak metionollá történő redukálásában szerepet játszó reduktáz aldehyd inhibitorai vagy aktivátorai, vagy a metionálnak metil-tio-propionsavvá történő oxidálásáért felelős aldehyd dehidrogenáz inhibitorai vagy aktivátorai, vagy a β -hidroxiláz aktivátorai vagy inhibitorai, amely β -hidroxiláz a metionálnak malon-dialdehiddé történő átalakulásában szerepet játszó enzim.

Így például az elágazó láncú oxosav-dehidrogenáz komplex inhibitorai közül, vagyis az olyan faktorok közül, amelyek a metionál vagy a malon-dialdehyd intracelluláris mennyiségét csökkentik, példaként a 2-oxo-butirátot említhetjük, amely ennek a komplexnek jól ismert szubsztrátuma [lásd Jones, S.M.A. & Cederbaum, A.I. (1980) Arch. of Biochem. and Biophys., 199, 438-447], megemlíthetjük továbbá a ketoleucint, a ketoizoleucint és a ketovalint, amelyek ugyancsak ennek a komplexnek a szubsztrátumai.

Ugyancsak példaként megemlíthetjük a 4-metil-tio-2-oxo-butánsav metioninná történő átalakulásában szerepet játszó transz-amináz inhibitoraként, vagyis olyan faktorként amely a metionál vagy a malon-dialdehyd intracelluláris mennyiségét növeli, azokat a vegyületeket, amelyek az Ogier G., Chantepie J., Deshayes C., Chantegrel B., Charlot C., Doutheau A. & Quash G. (1993) Biochem. Pharmacol. 45, 1631-1644 irodalmi helyen vannak felsorolva.

Közelebbről a 4-metil-tio-2-oxo-butánsav metioninná történő átalakulásában szerepet játszó transz-amináz inhibitorait az (1)-(9) általános képletű vegyületek közül választjuk, a képletekben X jelentése hidroxilcsoport vagy $-OPO_3H_2$ csoport.

Különösen előnyös az olyan (9) általános képletű vegyület, amelyben X jelentése hidroxilcsoport.

Példaként ugyancsak megemlíthetjük a 4-metil-tio-2-oxo-butánsav metioninná történő átalakulásában szerepet játszó transz-amináz inhibitorai közül, vagyis azon faktorok közül, amelyek a metionál vagy a malon-dialdehid intracelluláris mennyiségét növelik, az amiddá alakított aminosavak hidroxamátjait, például a D-aszparagin hidroxamátját, amelynek képlete $\text{CONHOHCH}_2\text{CHNH}_2\text{COOH}$, vagy az L-glutamin hidroxamátját, amelynek képlete $\text{CONHOHCH}_2\text{CH}_2\text{CHNH}_2\text{COOH}$.

Amikor az apoptózis kiváltására törekszünk, a találmány szerint előnyösen egy a következők közül választott vegyületet alkalmazunk: metionál, malon-dialdehid, az olyan vegyületek, amelyek *in situ* képesek metionált vagy malon-dialdehidet felszabadítani, például ilyenek a metionál vagy a malon-dialdehid észterei és tioészterei, vagy a metionálnak malon-dialdehiddé történő átalakulásában szerepet játszó enzim aktivátorai.

Azon elegyek közül, amelyek különösen előnyösek az apoptózis kiváltására, elsősorban a metionál és egy vagy több transz-amináz inhibitor keverékét említjük, amely transz-amináz a 4-metil-tio-2-oxo-butánsav metioninná történő átalakulásában szerepet játszik. Különösen előnyös a (9) általános képletű vegyület.

Amikor az apoptózist vissza kívánjuk szorítani, a találmány szerint olyan enzimek inhibitorait alkalmazzuk, amely enzimek szerepet játszanak a metionál vagy a malon-dialdehid termelésében, például a 2-oxo-butirát, és/vagy olyan enzimek aktivátorait, amelyek szerepet játszanak a metionál eltávolításában a fent említett β -hidroxilező reakció kivételével.

A találmány szerinti készítményt különösen a következő kezelésekre használhatjuk:

1.) A differenciálódásra és a hiperburjánzásra vonatkozó keratinizálódási rendellenességekkel kapcsolatos dermatológiai problémák kezelésére, például a közönséges mitesszeres polimorf és rózsaszerű aknék kezelésére, a csomós-cisztás, gömb alakú aknék kezelésére, az öregkori aknék, valamint a másodlagos aknék, például a nap, valamely gyógyszer vagy szakmai ártalom miatt képződött aknék kezelésére.

2.) Egyéb keratinizálódási zavarok, például ichtiózis, ichtiózis-szerű állapotok, Darier-kór, tenyér- és talp-keratodermiák, leukopláziák és leukoplázia-szerű állapotok, bőr- vagy nyálkahártya- (száj) lichen kezelésére.

3.) Egyéb dermakológiai betegségek kezelésére, amelyek gyulladásos és/vagy immunoallergiás komponenset is tartalmazó keratinizálódási zavarokkal kapcsolatosak, például mindenféle psoriasis, akár bőr, akár nyálkahártya, akár köröm psoriasisról van szó, sőt a psoriasisos reuma vagy a bőratópia, például ekcéma vagy légzésatópia vagy ínyhipertrófia kezelésére.

4.) Mindenféle bőr és epidermisz burjánzás - akár jóindulatú, akár rosszindulatú - kezelésére, akár vírusos eredetűek ezek, akár nem, például a közönséges, szemölcs, a lapos szemölcs és a szemölcsszerű epidermodiplázia, az orális vagy élénkvörös papillomatózis kezelésére, továbbá az olyan burjánzások kezelésére, amelyeket ultraibolya sugárzás tud kiváltani, például a bazofil sejtes és tövissejtes epitelióma esetében.

5.) Egyéb dermatológiai rendellenességek, például hólyagos dermatózisok vagy kollagénbetegségek kezelésére.

6.) Bizonyos szemészeti betegségek, például korneopátiák kezelésére.

7.) A bőröregedés javítására vagy megelőzésére, akár fény okozta, akár az idő miatt bekövetkező öregedésről van szó, vagy az aktinikus pigmentálódás és keratózis csökkentésére, vagy bármely olyan betegség gyógyítására, amely kronológiai vagy aktinikus öregedéssel kapcsolatos.

8. Helyi vagy szisztémikus kortikoszteroidok által kiváltott epidermisz és/vagy dermisz atrófia vagy bármely más bőratrófia sebhe-lyeinek megelőzésére vagy gyógyítására.

9. A hegesezési zavarok megelőzésére vagy kezelésére vagy a terhességi csíkok megelőzésére vagy gyógyítására.

10. Faggyúműködési zavarok elleni harcra, például akné hiperseborrhea vagy egyszerű seborrhea kezelésére.

11.) Rákos vagy rák előtti állapotok kezelésében vagy megelőzésében.

12.) Gyulladásos betegségek, például arthritis kezelésében.

13.) Bármely vírusos eredetű bőr vagy általános betegség, például hepatitis kezelésében.

14.) Alopécia megelőzésében vagy kezelésében.

15. Olyan dermatológiai vagy általános megbetegedések kezelésében, amelyek immunológiai tényezőt is tartalmaznak.

16. Szív-érrendszeri betegségek, például arteriosclerosis vagy trombocitopénia kezelésében.

17. Neurodegeneratív betegség, például Alzheimer-kór kezelésében.

Az említett gyógyászati területeken a találmány szerinti készítmény előnyösen egyéb hatóanyagot is tartalmazhat, például retinoidot, szabad gyök ellenes szert, D-vitamin-származékokat, kortikoszteroidokat vagy ösztrogének, antioxidánsokat, α -hidroxi- vagy α -ketosavakat vagy ezek származékait, vagy káliumcsatorna blokkolókat.

A találmány tárgya továbbá a találmány szerinti készítmény alkalmazása olyan kozmetikai vagy gyógyszerkészítményben vagy ilyen készítmény előállítására, amely az apoptózis modulálására hat, közelebbről az előzőekben ismertetett preventív és/vagy gyógyító kezelésekhez való.

A retinoidok lehetnek természetes vagy szintetikus eredetűek. A retinoidok közül példaként a 9-cisz-retinoinsavat és a mindenhol transz-retinoinsavat említjük.

A D-vitaminok és származékaik közül példaként megemlíthetjük a D₂ vagy D₃ vitamint, és különösen az 1,25-dihidroxi-D₃ vitamint.

A szabad gyök ellenes szerek közül példaként az α -tokoferolt, a dizmutáz-szuperoxidot, az ubikvinolt és néhány fémkelátképzőt említhetünk.

Az α -hidroxi- vagy α -ketosavak és származékaik közül példaként a ketoleucint, a ketoizoleucint, a ketovalint, a ketooxo-butirátot, a 4-metil-tio-2-oxo-butánsavat, a tejsavat, maleinsavat, citromsavat, glikolsavat, mandulasavat, borkősavat, glicerinsavat, aszkorbinsavat, valamint a szalicilsav-származékokat és ezek sóit, amidjait vagy észtereit említhetjük.

A káliumcsatorna blokkolók közül példaként a minoxidilt (2,4-diamino-6-piperidino-pirimidin-3-oxid) és származékait említhetjük.

A találmány szerinti vegyület adagolása történhet enterális, parenterális, helyi vagy okuláris úton. Előnyösen a vegyületet olyan formában szereljük ki, amely alkalmas a szisztémikus úton történő adagolásra (vagyis injekcióval vagy infúzióval).

Amikor enterálisan adagoljuk, a találmány szerinti készítmény közelebbről a gyógyszerkészítmény lehet tablettá, kapszula, szuszpenzió, oldat, por, granulátum, emulzió, mikrogömb vagy nanogömb, vagy lipid-vezikula, vagy olyan polimer vezikula, amely a szabályo-

zott hatóanyagleadást biztosítja. Parenterális adagolás esetén a készítmény lehet oldat vagy szuszpenzió alakú, amely infúzióra vagy injekcióra alkalmas.

A találmány szerinti gyógyszert kb. napi 0,001 mg/kg és 100 mg/kg testtömeg dózisban adagoljuk 1-3 alkalommal.

Helyi adagolás esetén a találmány szerinti készítmény főként a bőr és a nyálkahártya kezelésére való, formája lehet balzsam, krém, tej, kenőcs, por, átitatott tampon, oldat, gél, spray, lemosószer vagy szuszpenzió. Előfordulhat ezen kívül mikrogömb vagy nanogömb formában, vagy lipid vagy polimer vezikula formájában, vagy polimer tapasz formában, és hidrogél formában, amely lehetővé teszi a szabályozott hatóanyagleadást. A helyileg adagolandó készítmény előfordulhat vízmentes vagy vizes formában.

Szemen át adagolva a készítmény főként kollírium.

A helyileg vagy szemén át adagolandó gyógyszerkészítmény tartalmaz metionált, malon-dialdehidet, vagy bármely más olyan faktort, amely a metionál vagy a malon-dialdehid intracelluláris mennyiségét befolyásolja, ennek koncentrációja előnyösen 0,001 és 5 tömeg% a készítmény összes tömegére vonatkoztatva.

A találmány szerinti készítmény felhasználható a kozmetikai területen is, főként a test és haj higiéniában, főleg az aknére hajlamos bőr kezelésére, a haj növekedésének elősegítésére, hajhullás ellen, a nap káros hatásai elleni védelemre, és a fiziológiailag száraz bőr kezelésére, a fény által kiváltott vagy a kronológiai öregedés megelőzésére és/vagy kezelésére.

A találmány tárgya végül eljárás a bőr fény által kiváltott vagy az idő múlása miatt bekövetkező öregedése megelőzésére és/vagy leküzdésére, amelyre jellemző, hogy a bőrre egy a fentiekben definiált apoptózist kiváltó kozmetikai készítményt viszünk fel.

A kozmetikában a találmány szerinti készítmény előnyösen tartalmazhat retinoidokat, D-vitaminokat vagy származékait, kortikoszteroidokat, szabad gyök ellenes szereket, α -hidroxi- vagy α -ketosavakat és származékaikat, vagy ioncsatorna blokkolókat. Ezek a találmány szerinti készítményben felhasznált különféle termékek megegyeznek a fentebb már definiáltakkal.

A találmány szerinti készítmény előfordulhat például krém, tej, lemosószer, gél, mikrogömb vagy nanogömb, vagy lipides vagy polimer vezikula, szappan vagy sampon formájában.

A kozmetikai készítményben a metionál, a malon-dialdehid és az egyéb olyan faktor koncentrációja, amely a metionál vagy a malon-dialdehid intracelluláris mennyiségét befolyásolja, előnyösen 0,0001 és 3 tömeg% közötti a készítmény összes tömegére vonatkoztatva.

A találmány szerinti gyógyszer- vagy kozmetikai készítmény a fentiekén kívül tartalmazhat inert adalékokat vagy olyanokat, amelyek farmakodinamikai vagy kozmetikai szempontból hatékonyak, vagy ilyen adalékok keverékét, főleg a következő adalékokat: nedvesítőszereket, depigmentáló szereket, például hidrokinont, azelainsavat, koffeinsavat, vagy kojiksavat, lágyítókat, hidratálószereket, például glicerint, PEG 400-at, tiamorfolinont és származékai vagy karbamidot; seborrhea-ellenes vagy aknéellenes szereket, például S-karboxi-metil-ciszteint, S-benzil-ciszteamint, ezek sóit és származékai, vagy benzoil-peroxidot; antibiotikumokat, például eritromicint, és észtereit, neomicint, klindamicint és észtereit, tetraciklineket; gombaellenes szereket, például ketokonazolt vagy 4,5-polimetilén-3-izotiazolinonokat; a hajnövekedést elősegítő szereket, például a minoxidilt (2,4-diamino-6-piperidino-pirimidin-3-oxid) és származékait, vagy a diazoxidot (7-klór-3-metil-1,2,4-benzotiadiazin-1,1-di-

oxid), vagy a fenitoint (5,4-difenil-imidazolidin-2,4-dion); nem szteroid gyulladásgátló szereket, karotenoidokat, főként a β -karotint, psoriasis ellenes szereket, például antralint és származékait, végül az eikosa-5,8,11,14-tetrainsavakat és az eikosa-5,6,11-triinsavakat, ezek észtereit és amidjait.

A találmány szerinti készítmény tartalmazhat ezen kívül illatjavító szereket, konzerválószeret, például parahidroxi-benzoésztereket, stabilizátorokat, nedvességszabályozó szereket, pH-szabályozó szereket, ozmózisnyomás-módosító szereket, emulgeálószeret, UV-A vagy UV-B szűrőket, antioxidánsokat, például α -tokoferolt, butil-hidroxi-anizolt vagy butil-hidroxi-toluolt.

A találmányt a következőkben példákkal illusztráljuk, de nem kívánjuk ezekre korlátozni.

1. példa

Metabolitok hatása HeLa sejtek növekedésére

HeLa sejteket ($0,5 \times 10^6$ Petri csészénként) 3 ml Eagle minimum eszenciális közegben tenyésztünk, amely 10 tömeg% dializált borjúembrió-szérumot tartalmaz. 4 óra elteltével mindhárom Petri csészéhez metionált ($10 \mu\text{mol}$ - 1 mmol), metionolt ($10 \mu\text{mol}$ - 20 mmol), metil-tio-propionsavat (MTPA) ($1 \mu\text{mol}$ - 20 mmol), L-metionint ($1 \mu\text{mol}$ - 20 mmol) vagy 4-metil-tio-2-oxo-butánsavat (MTOB) ($1 \mu\text{mol}$ - 20 mmol) adunk. A Petri csészéket 3 napig 37°C -on inkubáljuk, majd a sejteket kétszer mossuk $\text{pH} = 7,5$ -re pufferolt sóoldattal és foszfát oldattal (PBS közeg), majd ugyanolyan típusú pufferban kinyerjük.

A sejtnövekedést úgy határozzuk meg, hogy megmérjük a fehérjetartalmat (lásd a Lowry, O.H., Rosebrouh, N.J., Farr, A.L. és Randall, R.J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275 irodalmi helyen is-

mertetett módszert), vagy megmérjük a DNS-tartalmat a lizátumban biszbenzimid-trihidroklorid oldat alkalmazásával (Hoechst 33258) (lásd Jarvis, W.D., Kolesnick R.N., Fornari F.A., Traylor R.S., Gewirtz D.A. és Grant S (1994) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91, 73-77), vagy meghatározzuk a tejsav-dehidrogenáz aktivitását 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium-bromid (MTT) felhasználásával (lásd Mosmann T. (1983) J. of Immunology. Methods 65, 55-63).

Az eredményeket az 1. táblázatban adjuk meg. Az egyes értékek 3 vagy 4 fehérjetartalom meghatározó vizsgálat átlagát jelentik.

1. táblázat

Termék	IC ₅₀ (mmól)
L-metionin	>20
MTOB	1,6
metionál	0,10
metionol	>20
MTPA	10

Az IC₅₀ az a termékkoncentráció, amely 50%-os sejtnövekedés-gátlás eléréséhez szükséges.

Azok az eredmények, amelyekkel a DNS-tartalmat mértük vagy a tejsav-dehidrogenáz aktivitását határoztuk meg, összemérhetők az 1. táblázatban feltüntetett eredményekkel.

A táblázatban a metionál IC₅₀ értéke és termékeinek vagy prekurzorainak IC₅₀ értéke közötti különbség látható.

2. példa

HeLa sejteket ($0,5 \times 10^6$ Petri csészénként) tenyésztünk 3 ml Eagle-féle eszenciális minimumközegben, amely metionin-mentes

(Met) és 10 tömeg% dializált borjúembrió-szérumot tartalmaz. Négy órával később hozzáadunk 2-oxo-butirátot (10 mmól és 40 mmól között) 2 mmól 4-metil-tio-2-oxo-butánsav (MTOB) jelenlétében. A sejteket 3 napig 37 °C-on tartjuk, majd kétszer mossuk pH = 7,5-re puffert és foszfáttartalmú sóoldattal (PBS közeg), majd ugyanolyan puffertben kinyerjük. A sejtnövekedést ugyanúgy mérjük, mint az előző példában.

A 2-oxo-butirát jól ismert szubsztrátum dehidrogenáz-oxosav komplex számára, amely elágazó szénláncú (BCOADC) (Km 18 μ mól). Az MTOB önmagában 2 mmól koncentrációnál 72 %-os növekedésgátlást okoz. Az eredmények azt mutatják, hogy a 2-oxo-butirát képes ezt a növekedésgátlást megszüntetni. A gátlás 10 mmól 2-oxo-butirátnál már 2-3-szor kisebb. Így azt tapasztaljuk, hogy a BCOADC aktivitása az MTOB metionállá történő átalakítására egy másik szubsztrátum irányába eltolódik, ilyen például a 2-oxo-butirát, és ez csökkenti a növekedés gátlását.

3. példa

Metionál hatása DNS fragmentációra BAF3 sejtekben

A felhasznált sejtek BAF3 egér limfocita sejtvonalnak felelnek meg, amelynek a növekedéshez interleukin 3-ra (IL3) van szüksége, és amely IL3 hiányában 16 órán belül apoptózist szenved (a sejtek több, mint 80%-ában) (lásd Collins M.K.L., Marvel J., Malde P. és Lopez-Rivas A. (1992) J. Exp. Med. 176, 1043-1051).

3×10^6 sejt BAF3-at tenyésztünk 6 ml olyan tápközegben, amely IL3-at tartalmaz Petri csészében, különböző koncentrációjú (200-800 μ mól) metionál vagy propanál jelenlétében, amely az aldehid dehidrogenáz szubsztrátuma. 8 óráig tartó érintkezés után a sejteket háromszor mossuk sóoldattal, amelynek pH-ját pufferral 7,5-re

állítjuk be és foszfátot tartalmaz (PBS közeg). A sejteket 2 ml 0,1 %-os Triton X-100-ban, amely 20 mmól EDTA-t (etilén-diamin-tetraecetsav), 5 mmól Trisz puffert pH= 8-nál tartalmaz, majd 30000 g-val centrifugáljuk 4 °C-on 30 percig. A felülúszót dekantáljuk és analizáljuk.

Összehasonlításként ugyanilyen tenyészetet végzünk egyrészt olyan közegben, amely kizárólag IL3-at tartalmaz (+IL3), másrészt olyan közegben, amely nem tartalmaz IL3-at (-IL3).

A kapott DNS fragmentek kvalitatív analízisét a Jarvis W.D., Kolesnick R.N., Fornari F.A., Traylor R.S. Gawirtz D.A. és Grant S. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 73-77 irodalmi helyen ismertetett eljárás szerint végezzük. A felülúszót ribonukleáz A-val kezeljük (20 µg/ml), majd egy órán keresztül 37 °C-on tartjuk és K-proteinázal (100 µg/ml) kezeljük. A DNS-t fenolos extrakcióval tisztítjuk és etanollal kicsapatjuk.

A végső extraktumban a kis molekulatömegű DNS fragmenteket gél-elektroforézissel analizáljuk 1%-os agarózon. Az elektroforézis után (60 V, 3 óra) a géleket etidin-bromiddal festjük.

Az eredményekből világosan látható, hogy a metionál kiváltotta az apoptózist, a kapott gélen 180-200 alappárból álló többszörös DNS fragmentek látható, és ez jellemző az apoptózis megindulására. A propanál esetében a gél nem mutatja ezt a jellemzőt.

Spektrofluorometriával is végeztünk analízist a kapott DNS fragmentek mennyiségének meghatározására (<3 kilobázis). 2 ml felülúszóhoz hozzáadunk 1 ml bisz-benzimid-trihidrokloridot (Hoechst 33258), amely 1 µg/ml koncentrációban 3 mmól-os nátrium-kloridban van, és hozzáadunk 1 mmól d4EDTA-t, 10 mmól Triszt pH= 8-nál. A kapott oldatot fluorometriáson analizáljuk (gerjesztési λ = 365 nm, emissziós λ = 460 nm). A DNS mennyiségét a nagyon

erősen tisztított DNS-hez viszonyítva számítjuk ki (0,1-1 μg 2 ml lizáló pufferban), amelyet a fentiek szerint kezelünk és 10^{-9} g DNS-ben fejezünk ki és 3×10^6 sejtől nyerünk.

A kapott eredményeket a 2. táblázatban adjuk meg.

2. táblázat

Példa	10^{-9} g ADN/ 3×10^6 sejt
+IL3	63
+IL3 + metionál	127
-IL3	150

Látható tehát, hogy a DNS fragmentek mennyiségének növekedése az IL3-mal és metionállal kezelt sejtekben hasonló azzal, amit akkor kapunk, amikor a sejteket IL3 mentes közegbe helyezzük.

4. példa

BCNU és a 4-metil-tio-2-oxo-butánsav metioninná történő átalakulásában szerepet játszó transz-amináz inhibitor hatása reakcióképes oxigéntartalmú anyagok (H_2O_2 és $\text{HO}\cdot$) képződésére

$1,5 \times 10^5$ BAF3 sejthez (a fentiekben ismertetett sejtvonal), amelyet 3 ml olyan tápközegbe ojtottunk, amely IL3-at tartalmaz (Dulbecco-féle módosított Eagle közeg, amely 6% borjúembrió-szérumot és 5% IL3 forrásként használt Wehi-3B sejttel kondicionált közeget tartalmaz, amely közeg a Collins és munkatársai (1992) J. Exp. Med. 176, 1043-1051 irodalmi helyről ismert, hozzáadunk $10 \mu\text{mol}$ 2',7'-diklór-fluoreszcein-diacetátot, amelyet a továbbiakban DCFH-DA-nak nevezünk, és a Molecular Probes Inc. cég terméke. A sejteket egy órán keresztül 37°C -on inkubáljuk, majd PBS pufferral mossuk. Tíz perccel a diklór-fluoreszcein (DCF) fluoreszcenciás analízise előtt, amelyet áramlásos citometriával végzünk, hozzáadunk 3

$\mu\text{g/ml}$ propidinium-jodidot. Az inkubálást különböző koncentrációjú BCNU jelenlétében és az A vegyület $50 \mu\text{mólos}$ jelenlétében vagy anélkül (az A vegyület olyan (9) általános képletű vegyületnek felel meg, ahol X jelentése hidroxilcsoport) végezzük. Az eljárással azt a fluoreszcencia százalékot kapjuk meg, amely a reakcióképes oxigéntartalmú anyagok (H_2O és $\text{HO}^\bullet$) és a DCFH-DA közötti reakcióban keletkezik. Az áramlásos citometriát FACScan áramlásos citométer segítségével végezzük (gyártó: Becton Dickinson, San José, CA, USA).

A kapott eredményeket a 3. táblázatban adjuk meg.

3. táblázat

BCNU koncentráció $\mu\text{g/ml}$	A vegyület koncentráció ($\mu\text{mól}$)	fluoreszcencia/ 10^6 sejt (%-ban)
10	0	4
20	0	4
40	0	10
10	50	2,5
20	50	1,5
40	50	1,75

Az eredményekből látható, hogy az A vegyület, amely lehetővé teszi metionál koncentráció növekedését, csökkenti a $\text{HO}^\bullet$ növekedést, mert nő a BCNU koncentráció. Így valószínű, hogy reakció megy végbe a metionál és a jelenlévő $\text{HO}^\bullet$ gyökök között, amelynek során malon-dialdehid keletkezik, ez pedig az apoptózist váltja ki.

5. példa

A BCNU és a 4-metil-tio-2-oxo-butánsav metioninná történő átalakulásában szerepet játszó transz-amináz inhibitorának hatása az apoptózisra

Feldarabolt DNS-szálakat jelzünk biotinilizett dUTP-vel (amelyet avidin-fluoreszceinnel detektálunk) in situ a permeabilissá tett sejtekben, és ezeket fixáljuk a terminális DNS dezoxi-nukleotidil transzferáz teszt alkalmazásával, amely a Gorczyca és munkatársai, (1993) Cancer Res. 53, 1945-1951) irodalmi helyről ismert.

$1,5 \times 10^6$ BAF3 sejtet (amely a fenteikben ismertetett sejtvonal) beojtunk 3 ml olyan tápközegben, amely IL3-at tartalmaz (Dulbecco-féle módosított Eagle közeg), amely 6% borjúembrió-szérumot és 5% olyan közeget tartalmaz, amelyet IL3 forrásként használt Wehi-3D sejtekkel kondicionáltunk. A sejteket $50 \mu\text{mol}$ A vegyület, $40 \mu\text{g/ml}$ BCNU, az említett két termék keveréke ($50 \mu\text{mol}$ A vegyület + $40 \mu\text{g/ml}$ BCNU) jelenlétében, illetve összehasonlításként az említett két vegyület nélkül inkubálunk. 24 órás inkubálás után a sejteket PBS pufferral mossuk és formaldehiddel, majd etanollal fixáljuk, majd -20°C -on 3 napig állni hagyjuk. Ezután a sejteket $50 \mu\text{l}$ olyan oldatban, amely $0,1 \mu\text{mol}$ nátrium-kakodilátot tartalmaz, pH-ja 7,5, tartalmaz továbbá 1 mmol CoCl_2 -t, $0,1 \text{ mmol}$ ditiotreitet, $0,05 \text{ mg/ml}$ BSA-t (szarvasmarha szérumalbumin), 10 egység TdT-t (Boehringer féle borjútimusz), $0,5 \text{ nmol}$ biotin-16dUTP-t (Boehringer-féle borjútimuszból), $0,5 \text{ nmol}$ dATP-t, $0,5 \text{ nmol}$ dCTP-t és $0,5 \text{ nmol}$ dGTP-t, szuszpendáljuk és egy órán keresztül 37°C -on inkubáljuk. PBS-sel való mosás után a sejteket újra szuszpendáljuk $100 \mu\text{mol}$ négyszer SSC pufferban ($0,5 \text{ mol}$ NaCl, $0,015 \text{ mol}$ nátrium-citrát), amely $2,5 \mu\text{g/ml}$ avidin-fluoreszcein izotiocianátot (Sigma), $0,1 \text{ tömeg/térfogat}\%$

RNAase A-t, 0,1 % Triton X 100-at és 5 tömeg/térfogat% fölözött tejet tartalmaz, és az elegyet 30 percig szobahőmérsékleten sötétben állni hagyjuk. A sejteket mossuk, majd 1 ml PDS-ben szuszpendáljuk, amely 3 µg/ml propidium-jodidot is tartalmaz. Az áramlásos citometriát FACScan áramlásos citométerrel végezzük, amelynek gyártója Becton Dickinson, San José, CA, USA.

Az eredményeket a 4. táblázatban adjuk meg.

4. táblázat

Teszt	Apoptózisos sejtek %-ban
összehasonlító	0,2
A vegyület	0,3
BCNU	2,3
A vegyület + BCNU	41,1

A megadott dózisban a vegyületek önmagukban csak igen kis mértékben váltanak ki apoptózist, ezzel szemben keverékül erősen apoptózis-kiváltó (szinergismus figyelhető meg). Az eredmény igazolja a 3. táblázatban megadott eredményeket és az abból levont következtetéseket.

6. példa

A leghatásosabb gyógyászati kombináció meghatározása melanomasejtekkel beoltott egerek kezelésére

t=0. napon 10^5 B16 F1 patkány melanoma sejtet injektálunk B6D2F1 egerekbe (amelyet az IFFA CREDO, FR cégtől szerzünk be). A t=1. napon, majd ezt követően 15 napon keresztül naponta egyszer különböző gyógyászati kombinációkat injektálunk az egereknek. Ezeket a vegyületeket a 3. táblázatban soroljuk fel. Összehasonlításul olyan egereket használunk, amelyeknek gyógyhatású

anyagot nem adunk. Az 5. táblázatban adjuk meg az eredményeket, amelyek három kezelt egérrel kapott eredmény átlagának felelnek meg.

5. táblázat

Gyógyhatású anyag mg/kg	Átlagos túlélési idő napokban
összehasonlító	20,5
BCNU (0,1 mg/kg)	24,5
A vegyület (25 mg/kg)	21,9
metionál (25 mg/kg)	27
BCNU + metionál	26
A vegyület + metionál	27
BCNU + A vegyület	40,5
BCNU + A vegyület + metionál	57

Amikor több vegyületet adagolunk együtt, minden vegyület dózisa azonos azzal, amelyet akkor adagolunk, amikor a vegyületet önmagában adjuk.

A túlélési időt a fentiekben definiált 0. napon kezdjük számolni és azon egerek átlagának felel meg, amelyek nem éltek 60 napnál tovább.

A BCNU az N,N-bisz(2-klór-etil)-N-nitrozó-karbamidnak felel meg. Az A vegyület olyan (9) általános képletű vegyület, ahol X jelentése hidroxilcsoport.

A táblázatból látható, hogy a két utolsó kombináció különösen hatékony, mivel jelentősen megnöveli az egerek túlélési idejét. A két kombináció közül az utolsó, amelynél metionált is alkalmazunk, segítségével az egerek egyharmada 60 napnál tovább is életben marad.

7. példa

Az előző példában leírtak szerint járunk el, változtatjuk a kezelt egerek számát és az alkalmazott vegyületek kombinációját. A 6. táblázatban adjuk meg az alkalmazott vegyületeket és a kapott eredményeket.

6. táblázat

Gyógyhatású anyag mg/kg	Kezelt egerek száma	Átlagos túlélési idő napokban	Túlélők százalé- ka hosszú távon
összehasonlító	6	23,7	0
BCNU 0,1 mg/kg	6	32,5	0
A vegyület (25mg/kg) + metionál (50 mg/kg)	10	33,1	10
BCNU + A vegyület + metionál	10	36	50

A túlélési időt a 0. naptól kezdjük és olyan egerek átlagának felel meg, amelyek nem éltek tovább, mint 60 napig. Az utolsó kombinációnál a dózisok ugyanazok, mint amikor a vegyületeket egyedül adagoljuk.

A hosszú távú túlélők százaléka azon egerek százalékanak felel meg, amelyek 60 napnál tovább életben maradtak.

A táblázatból látható, hogy a két utolsó kombináció, különösen pedig a legutolsó nagyon hatékony.

8. példa

Metionál hatása apoptózis kiváltására BAF3-b0 és BAF3-bcl2 sejtekben

Az alkalmazott sejtek a fentiekben ismertetett BAF3 limfocita sejtvonálnak felelnek meg. A BAF3-bcl2 sejtek olyan BAF3 sejteknek felelnek meg, amelyek a bcl2 génnel át vannak fertőzve, a BAF3-b0 sejtek pedig olyan BAF3 sejteknek felelnek meg, amelyek nincsenek átfertőzve bcl2 génnel. Amint korábban már említettük, a BAF3-b0 sejtek (a sejtek több, mint 80 %-ában) IL3 hiányában 16 órán belül apoptózist szenvednek. Ezzel szemben a BAF3-bcl2 sejtek, amelyek tehát bcl2 génnel transzfektálva vannak, az apoptózis jelét nem mutatják IL3 nélkül. Ezért jó kísérleti modellként szolgálhatnak a blokkolt apoptózis meghatározására a sejtekben, és az apoptózis esetleges korrelációjára a malon-dialdehid szintézis gátlásával.

A BAF3-b0 vagy BAF3-bcl2 sejteket jelezzük a Wriht S. és munkatársai (1992), J. of Cell. Biochem. 48, 344-355 irodalmi helyen ismertetett eljárás egy változatával úgy, hogy $2,5 \times 10^5$ sejtet ml-enként $0,5 \mu\text{Ci}$ $[3\text{H}]$ -timidinnel inkubálunk 40 órán keresztül 37°C -on. A sejteket kétszer mossuk tápközeggel, majd $2,5 \times 10^6$ sejtet metionál jelenlétében tenyésztünk. 8 órás inkubálás után ezeket a sejteket 400 g -vel 5 percig centrifugálva és háromszor PBS pufferral mosva kinyerjük. A maradékból kinyert sejteket 2 ml $0,1 \%$ -os Triton X100-at, 20 mmol EDTA-t, 5 mmol Triszt $\text{pH}=8$ -nál tartalmazó oldatban elbontjuk, majd 30000 g -vel 4°C -on 30 percig centrifugáljuk. A felülúszókat kinyerjük és a maradékokat feloldjuk $0,3 \text{ ml}$ $0,5 \text{ n}$ nátrium-hidroxidban. Egy ml-es alikvot mennyiségeket a tápközegből, $0,3 \text{ ml}$ -es mennyiségeket a felülúszóból, és $0,1 \text{ ml}$ -eseket a feloldott

maradékból a szcintillációs számlálóberendezésben meghatározunk. A DNS fragmentek százalékát a következő módon számítjuk ki.

$$\% \text{ DNS fragment} = \frac{\text{tápközeg dpm} + \text{felülúszó dpm}}{\text{tápközeg dpm} + \text{felülúszó dpm} + \text{feloldott maradék dpm}}$$

A következő eredményeket kapjuk: növekvő metionál koncentráció hozzáadásával (0, 50, 100, 200, 300, 400 μmol) az inkubáló közeghez növekszik a DNS fragmentek százaléka egy maximum eléréséig. Ez 400 μmol metionálnál van, 26 %-kal, míg a metionállal nem kezelt összehasonlító BAF3-b0 sejteknél ez csak 7%. Az ekvivalens metionál koncentrációkkal kezelt BAF3-bcl2 sejteknél a DNS fragmentek 7 %-os maximumot érnek el 400 μmol metionálnál, míg az összehasonlító mintánál 3%-ot.

Ezekből az eredményekből világosan látható, hogy a metionál hozzáadásával nem lehet a BAF3-bcl2 sejtekben a bcl2 gén miatti apoptózis gátlását megszüntetni.

Az IL3 hiánya miatti apoptózis kiváltása során megfigyelhető, hogy a metionál malon-dialdehiddé alakul β -hidroxilező reakcióval, $\text{HO}^\bullet$ segítségével. Meghatároztuk tehát a BAF3-b0 és BAF3-bcl2 sejtekben a H_2O_2 és a $\text{HO}^\bullet$ mennyiségét.

9. példa

Reakcióképes oxigéntartalmú anyagok (H_2O_2 és $\text{HO}^\bullet$) mérése áramlásos citometria eljárással

Az alkalmazott sejtek fentiekben ismertetett BAF3 limfocita sejtvonalnak felelnek meg. A BAF3-bcl2 sejtek bcl2 génnel transzfektált BAF3 sejteknek felelnek meg, a BAF3-b0 sejtek bcl2 génnel nem transzfektált BAF3 sejteknek felelnek meg.

1,5x10⁶ sejt BAF3-b0 vagy BAF3-bcl2 sejtet 3 ml tápközegbe ojtunk, amely IL3-at tartalmaz, és hozzáadunk 10 µmol diklór-fluoreszcein-diacetátot (DCFH-DA). Egy órát inkubáljuk 37 °C-on, majd a sejteket PBS pufferral mossuk. 10 perccel az áramlásos citometriával végzett diklór-fluoreszcein (DCF) fluoreszcenciájának mérése előtt hozzáadunk 3 µg/ml propidinium-jodidot a 4. példában leírtak szerint. Az áramlásos citometriát FACScan áramlásos citométer segítségével végezzük (gyártó: Becton Dickinson, San José, CA, USA).

A kapott eredményeket a 7. táblázatban adjuk meg.

7. táblázat

Sejttípus	Választott fluoreszcencia egység átlaga
BAF3-b0	154 ± 32
BAF3-bcl2	211 ± 52

A táblázatból látható, hogy bár bizonyos tendencia van arra, hogy a BAF3-bcl2 sejtekben több reakcióképes oxigéntartalmú anyag legyen, mint a BAF3-b0-ban, a különbség nem szignifikáns.

Lehetséges tehát, hogy a BAF3-bcl2 sejtek valamilyen hibával rendelkeznek a metionál és/vagy a malon-dialdehid szintézisében.

10. példa

[¹⁴C]MTOB [¹⁴C]-származékaival jelzett termékek analízise BAF3-b0 és BAF3-bcl2 sejtekben

A sejtek az előző példában alkalmazott sejtekkel azonosak.

A [¹⁴C]MTOB-t [¹⁴C]-metionin oxidatív dezaminálásával állítjuk elő az Ogier és munkatársai, (1993), Biochem. Pharmacol. 45, 1631-1644 irodalmi helyen ismertetett eljárással. 5x10⁶ dpm, vagyis 38,2

nmól [^{14}C]MTOB-t adunk $2,4 \times 10^5$ sejt/ml BAF3-b0 vagy BAF3-bcl2 sejtuszuspenzióhoz DMEM-ben, amely 6% borjúembrió-szérumot és 5% IL3-at tartalmaz. 39 órával később a sejteket kétszer mossuk PBS-sel és 9×10^5 sejt/ml koncentrációban újra szuszpendáljuk. 10^8 sejthez hozzáadunk [^{14}C]MTOB-t ($1,9 \times 10^6$ DPM, amely 14,5 nmól-nak felel meg), és 8 órával később a sejteket 5 percig 400 g-vel centrifugálva kinyerjük. A sejteket tartalmazó maradékot 1,5 ml 0,5 n nátrium-hidroxiddal 30 percig 30 °C-on oldatba visszük. A sejtekben jelen lévő összes rádióaktivitást 10 ml-es alikvot mennyiségen mérjük. Ezután a kapott lúgos hidrolizátumhoz perklórsavat adunk 0,5 n végső koncentrációban, majd hozzáadunk 200 μmol 2,4-DNPH-t (2,4-dinitro-fenil-hidrazin, a MERCK cég terméke). Az elegyet 30 percig 70 °C-on melegítjük, majd 400 g-vel 5 percig centrifugáljuk. A csapadékot 1 ml 0,5 n nátrium-hidroxidban feloldjuk és meghatározzuk a rádióaktivitását és a fehérjetartalmat. A felülúszóhoz pH=10-nél nátrium-hidroxidot adagolunk. A jelzett metabolitokat etilén-acetáttal extraháljuk, a szerves fázist megszáritjuk, savanyítjuk és diklór-metánnal extraháljuk. A szerves fázisban lévő jelzett metabolitokat elválasztjuk és HP-TLC eljárással (nagyteljesítményű vékonyrétegekromatográfiás eljárás) azonosítjuk, majd a referenciavegyületek 2,4-DNPH-származékaival összevetjük és pásztázásos rádiókromatográfiás eljárással meghatározzuk a mennyiségüket. A kapott eredményeket a 8. táblázatban adjuk meg.

8. táblázat

	BAF3-b0	BAF3-bcl2
radio (dpm/mg DNS)	1 252 000	1 111 000
sejtfehérje fajlagos aktivitása dpm/mg prot.	23 500	20 860
szabad metionin (dpm/mg DNS)	36 820	51 440
2,4-DNPH metionál (dpm/mg DNS)	14 050	7 650
2,4-DNPH MDA (2,4-DNPH pirazol) (dpm/mg DNS)	800	0

A radio a táblázatban a sejtekben jelenlévő összes rádióaktivitást jelenti. DMA malon-dialdehidet jelent.

A táblázatból látható, hogy azonos mennyiségű DNS-re vonatkoztatott összes rádióaktivitás hasonló 47 órás inkubálás után a két sejttypusban. Ugyanez a helyzet a sejtfehérjékben lévő metionin aktivitásával. A szabad metioninnál a rádióaktivitás 40 %-os növekedését figyelhetjük meg a BAF3-bcl2 sejtekben a BAF3-b0 sejtekhez viszonyítva. A metionálban jelen lévő rádióaktivitás 80 %-kal nagyobb a BAF3-b0 sejtekben, mint a BAF3-bcl2 sejtekben. Ezzel tehát kimutatható, hogy a BAF3-bcl2 sejtekben az MTOB-ból történő metionál képződés csökkenésével egyidejűleg együtt jár a metionin képződés növekedése. Amikor megmérjük a jelzett MDA képződést, ez megfelel 800 dpm/mg DNS-nek a BAF3-b0 sejtekben, míg az MDA esetére semmilyen rádióaktivitást nem találunk a BAF3-bcl2 sejtek kivonatában. A BAF3-bcl2 sejtekben tehát szintén csökken a metionálból az MDA képződés. A 8. példa világosan megmutatja, hogy ez a csökkenés nem azért van, mert a BAF3-bcl2 sejtekben kevesebb a reakcióképes oxigéntartalmú a BAF3-b0 sejtekhez képest. Arra a következ-

tetésre juthatunk tehát, hogy a bcl2 gén azon kívül, hogy csökkenti az MTOB metionállá történő átalakulását, negatív módon hat a β -hidroxilező reakcióra is, amellyel a metionál malon-dialdehiddé alakul. Tehát minden olyan termék, amely a metionál vagy annak metabolizmusából keletkező termék a malon-dialdehid intracelluláris mennyiségét változtatja, az apoptózis változtatására alkalmas terméknek tekinthető.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Egy vegyület, amely lehet a metionál, a malon-dialdehid vagy bármely olyan faktor, amely a metionál vagy a malon-dialdehid intracelluláris mennyiségét befolyásolja, gyógyszerként történő alkalmazásra.

2. Apoptózist befolyásoló gyógyszer- vagy kozmetikai készítmény, **azzal jellemezve, hogy** hatóanyagként metionált, malon-dialdehidet vagy bármely olyan faktort tartalmaz, amely a metionál vagy a malon-dialdehid intracelluláris mennyiségét befolyásolni képes, tartalmaz továbbá gyógyszerészeti vagy kozmetikai szempontból alkalmazható hordozóanyagot.

3. A 2. igénypont szerinti készítmény, **azzal jellemezve, hogy** a metionált, a malon-dialdehidet vagy bármely olyan faktort, amely a metionál vagy a malon-dialdehid intracelluláris mennyiségét befolyásolja, keverékben alkalmazzuk.

4. A 2. vagy 3. igénypont szerinti készítmény, **azzal jellemezve, hogy** a metionál vagy a malon-dialdehid intracelluláris mennyiségét befolyásoló faktort a metionál prekursorai, termékei és a metionál metabolizmusában szerepet játszó enzimek inhibitorai és aktivátorai közül választjuk.

5. A 4. igénypont szerinti készítmény, **azzal jellemezve, hogy** a metionál vagy a malon-dialdehid prekursorai és termékei a metionál vagy a malon-dialdehid intracelluláris metabolizmusának prekursorai vagy termékei, például 4-metil-tio-2-oxo-butánsav, metionin, metionol, metil-tio-propionsav, vagy metil-tio-propionil-CoA.

6. A 4. igénypont szerinti készítmény, **azzal jellemezve, hogy** a metionál vagy a malon-dialdehid prekursorai vagy termékei olyan

termékek, amelyek in situ képesek metionált vagy malon-dialdehidet felszabadítani, vagy olyan faktort felszabadítani, amely a metionál vagy a malon-dialdehid intracelluláris mennyiségét befolyásolja, például a metionál vagy malon-dialdehid észterei és tioészterei.

7. A 4. igénypont szerinti készítmény, **azzal jellemezve, hogy** a metionál metabolizmusában szerepet játszó enzimek inhibitorait vagy aktivátorait a következők közül választjuk: a 4-metil-tio-2-oxo-butánsavnak metionálon keresztül metil-tio-propionil-CoA-vá történő átalakulásában szerepet játszó elágazó láncú dehidrogenáz oxosav komplex inhibitorai vagy aktivátorai, vagy a 4-metil-tio-2-oxo-butánsav metioninná történő átalakulásában szerepet játszó transz-amináz inhibitorai vagy aktivátorai, vagy a metionálnak metionollá történő redukálásában szerepet játszó reduktáz aldehid inhibitorai vagy aktivátorai, vagy a metionálnak metil-tio-propionsavvá történő oxidálásáért felelős aldehid dehidrogenáz inhibitorai vagy aktivátorai, vagy a β -hidroxiláz aktivátorai vagy inhibitorai.

8. A 2-7. igénypontok bármelyike szerinti apoptózist kiváltó készítmény, **azzal jellemezve, hogy** hatóanyagként olyan vegyületet tartalmaz, amely lehet metionál, malon-dialdehid vagy vagy bármely olyan faktor, amely a metionál vagy a malon-dialdehid intracelluláris mennyiségét növeli, tartalmaz továbbá gyógyszerészetileg vagy kozmetikai szempontból elfogadható vivőanyagot.

9. A 8. igénypont szerinti készítmény, **azzal jellemezve, hogy** a metionál vagy a malon-dialdehid intracelluláris mennyiségét növelő faktorok a 4-metil-tio-2-oxo-butánsav metioninná történő átalakulásában szerepet játszó transz-amináz inhibitorait az (1)-(9) általános képletű vegyületek közül választjuk, a képletekben X jelentése hidroxilcsoport vagy $-OPO_3H_2$ csoport.

10. A 9. igénypont szerinti készítmény, **azzal jellemezve, hogy** a 4-metil-tio-2-oxo-butánsav metioninná történő átalakulásában szerepet játszó transz-amináz inhibitora olyan (9) általános képletű vegyület, ahol X jelentése hidroxilcsoport.

11. A 8. igénypont szerinti készítmény, **azzal jellemezve, hogy** a metionál vagy a malon-dialdehid intracelluláris mennyiségét növelő faktorok a 4-metil-tio-2-oxo-butánsav metioninná történő átalakulásában szereplő transz-amináz inhibitorai, és ezeket amidált aminosavak hidroxamátjai közül választjuk.

12. A 8. igénypont szerinti készítmény, **azzal jellemezve, hogy** a metionál, a malon-dialdehid a metionál vagy a malon-dialdehid prekursorai és termékei közül választott vegyületet és ezen kívül a metionál eliminálódását elősegítő metabolikus reakciókban szereplő enzimek inhibitorait vagy a β -hidroxiláz aktivátorait tartalmazza.

13. A 12. igénypont szerinti készítmény, **azzal jellemezve, hogy** a keverék megfelel a 4-metil-tio-2-oxo-butánsavnak egy a 4-metil-tio-2-oxo-butánsav metioninná történő átalakulásában szerepet játszó transz-amináz inhibitorral, ilyenek például a 9-11. igénypontok bármelyikében szereplő termékek.

14. A 8. igénypont szerinti készítmény, **azzal jellemezve, hogy** a keverék megfelel a metionálnal vagy egy a metionál intracelluláris mennyiségét növelő faktornak és egy vagy több olyan vegyületnek, amely a $\text{HO}^\bullet$ szabad gyök mennyiségét növeli, ez a vegyület előnyösen a BCNU.

15. A 14. igénypont szerinti készítmény, **azzal jellemezve, hogy** tartalmaz egy vagy több transz-amináz inhibitor, amely a 4-metil-tio-2-oxo-butánsav metioninná történő átalakulásában szerepet játszik, például a 9-11. igénypontok bármelyike szerinti vegyületet.

16. A 2-7. igénypontok bármelyike szerinti készítmény, **azzal jellemezve, hogy** hatóanyagként valamely olyan faktort tartalmaz, amely a metionál vagy a malon-dialdehid intracelluláris mennyiségét csökkenti, tartalmaz továbbá gyógyszerészetileg vagy kozmetikai szempontból elfogadható vivőanyagot.

17. A 16. igénypont szerinti készítmény, **azzal jellemezve, hogy** a metionál intracelluláris mennyiségét csökkentő faktor valamely elágazó szénláncú dehidrogenáz oxosav komplex inhibitor, például a 2-oxo-butirát, a ketoleucin, a ketoizoleucin vagy ketovalin.

18. A 16. igénypont szerinti készítmény, **azzal jellemezve, hogy** tartalmaz a metionál termelésben szerepet játszó enzim inhibítorát és/vagy a metionál eltávolításában szerepet játszó enzim aktivátorát.

19. A 2-18. igénypontok bármelyike szerinti készítmény alkalmazása kozmetikai készítményben vagy gyógyszerkészítmény előállítására, amely készítmény az apoptózis modulálására használható.

20. Eljárás a bőr fény által kiváltott vagy az idő múlása miatt bekövetkező öregedése megakadályozására és/vagy leküzdésére, **azzal jellemezve, hogy** a bőrre egy a 2-15. igénypontok bármelyike szerinti apoptózist kiváltó kozmetikai készítményt viszünk fel.

34 oldal
+ 3 sz. pap.

37 oldal
Jmel

A meghatalmazott:

DANUBIA

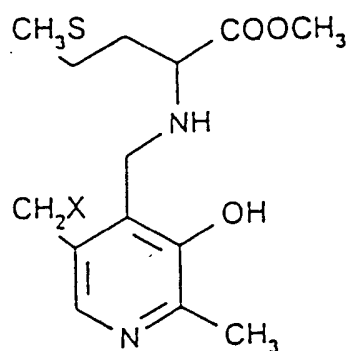
Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

Baranyi Éva

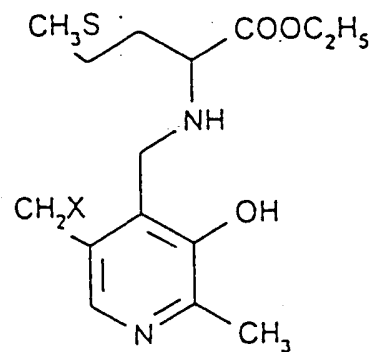
szabadalmi ügyvivő

Beállítási F. Működ.

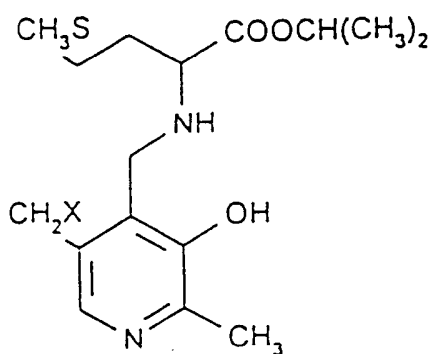
KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



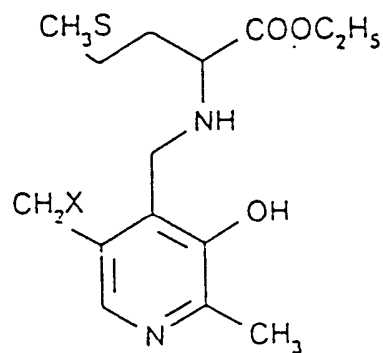
(1)



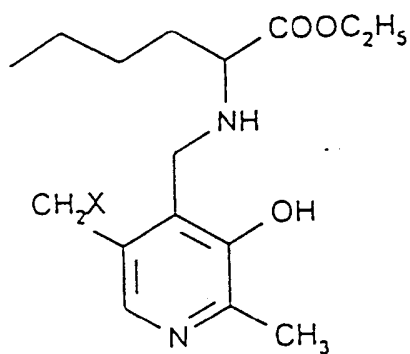
(2)



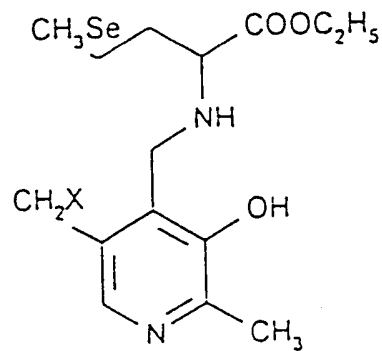
(3)



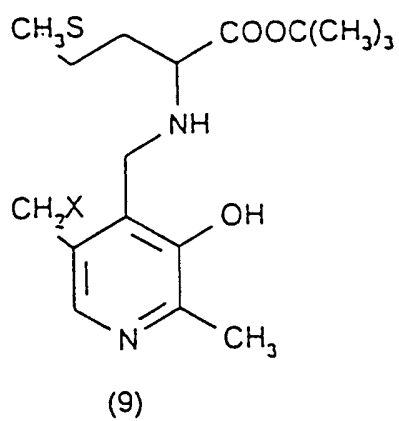
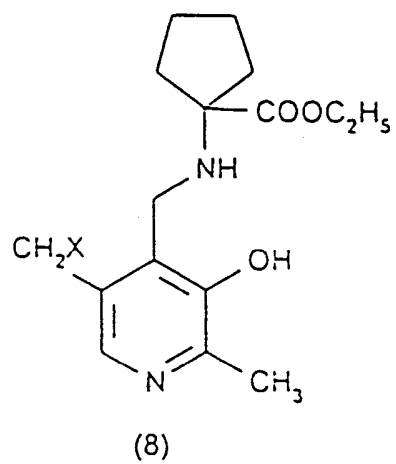
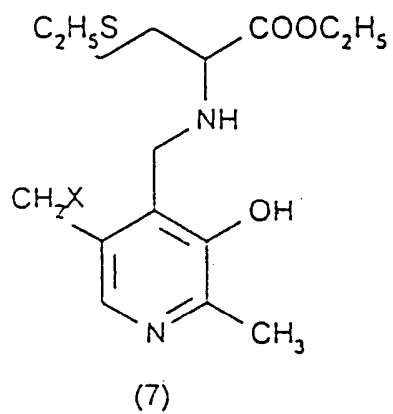
(4)

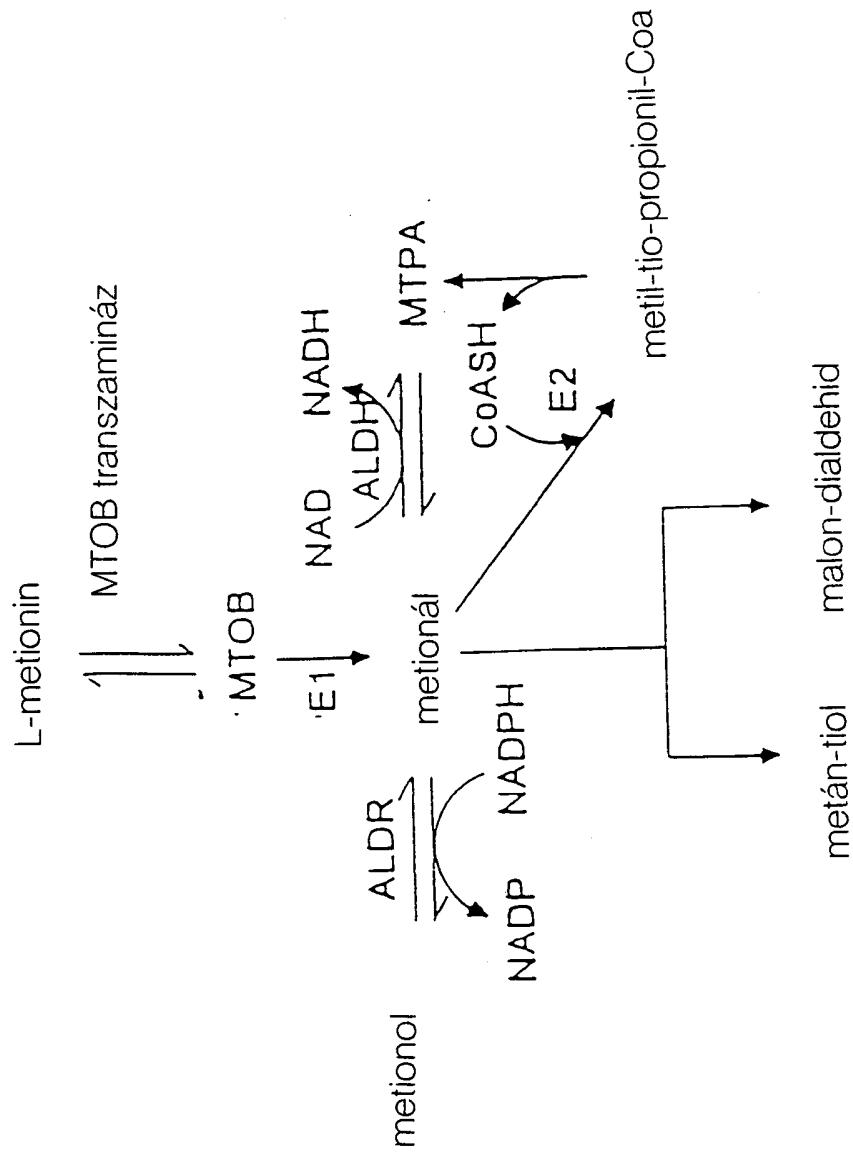


(5)



(6)





1. ábra