

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 972780 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **972780**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification

A61K 31/11 (2006.01)

A61K 31/44 (2006.01)

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **22.12.1995**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **27.06.1997**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **27.06.1997**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - **22.12.1995** **PCT/FR1995/001715**
Internationell ansökan - International
application

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

29.12.1994 FR 9415884

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Centre International De Recherches Dermatologiques (C.I.R.D), Sophia Antipolis, 06560 Valbonne, RANSKA, (FR)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Quash, Gerard Anthony, France, RANSKA, (FR)

2 •Doutheau, Alain, France, RANSKA, (FR)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Berggren Oy Ab, Antinkatu 3 C, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Apoptoosia muuntava koostumus, joka sisältää tekijän, joka vaikuttaa m etionaalin ja malonidialdehydin solunsisäiseen tasoon

Apoptos modifierande komposition innehållande en faktor som påverkar d en intracellulära halten av metional och malondialdehyd

Apoptoosia muuntava koostumus, joka sisältää tekijän, joka vaikuttaa metionaalin ja malonidialdehydin solunsisäiseen tasoon – Apoptos modifierande komposition innehållande en faktor som påverkar den intracellulära halten av metional och malondialdehyd

5

Keksintö koskee yhdistettä, joka on valittu metionaalin, malonidialdehydin ja minkä tahansa tekijän joukosta, joka vaikuttaa metionaalin ja malonidialdehydin solunsisäiseen tasoon, ja joka on tarkoitettu käytettäväksi lääkkeenä. Tämä lääke on erityisesti tarkoitettu muuntamaan solujen ohjelmoitua kuolemistapahtumaa (apoptoosia).

10

Se koskee myös apoptoosia muuntavaa koostumusta. Lopuksi vielä se koskee menetelmää ihon valon tai iän vaikutuksesta tapahtuvan vanhenemisen ehkäisemiseksi ja/tai torjumiseksi.

15

Solukuolemassa on mukana kaksi mekanismityyppiä. Ensimmäistä klassista tyyppiä nimitetään nekroosiksi. Morfologisesti nekroosille on tunnusomaista mitokondrioiden ja sytoplasman turpoaminen ja tuman muuttuminen, jota seuraa solun tuhoutuminen ja autolyysi, mihin liittyy tulehdusreaktio. Nekroosi on passiivinen ja satunnainen tapahtuma. Kudosnekroosi johtuu yleensä jostakin solujen fyysisestä vauriosta tai esimerkiksi kemiallisesta myrkystä.

20

Toista solukuoleman muotoa nimitetään apoptoosiksi [Kerr, J.F.R. ja Wyllie, A.H., Br. J. Cancer, 265, 239 (1972)], mutta päinvastoin kuin nekroosi, apoptoosi ei aiheuta tulehdusta. Apoptoosia on kuvattu tapahtuvan erilaisissa fysiologisissa olosuhteissa. Se on erittäin selektiivinen solun itsemurhan muoto, jolle ovat tunnusomaisia helposti havaittavat morfologiset ja biokemialliset ilmiöt. Siinä havaitaankin etenkin kromatiinin kondensaatiota, johon liittyy tai ei liity endonukleasiaktiivisuutta, apoptoottisten kappaleiden muodostumista ja deoksiribonukleiinihapon (DNA) pilkkoutumista endonukleasien aktivoimana 180 - 200 emäsparin DNA-palasiksi (näitä palasia voidaan todeta agaroosigeelielektroforeesilla).

25

30

Apoptoosi voidaan katsoa solujen ohjelmoiduksi kuolemaksi, joka on mukana kudosten kehittämisessä, erilaistumisessa ja homeostaasissa. Voidaan siis katsoa, että solujen erilaistuminen, kasvu ja kypsyminen liittyy läheisesti apoptoosiin. Terveellä ihmisellä kaikkien näiden tapahtumien välillä vallitseekin tasapaino.

35

Lääketieteen alalla eräissä patologisissa tilanteissa esiintyy muuttunutta, jopa tasa-

painotonta apoptoosimekanismia tai apoptoosimekanismia, joka ei aiheuta epätasapainoa jossakin muussa biologisessa tapahtumassa tasapainon palauttamiseksi. Onkin kuvattu, että muuntamalla tahallisesti apoptoosia indusoimalla sitä tai estämällä sitä olisi mahdollista hoitaa monia sairauksia, erityisesti tauteja, joihin liittyy solujen

5 hyperproliferaatiota, kuten syöpää, autoimmuunitauteja tai allergioita, tai päinvastoin sairauksia, joihin liittyy solujen häviämistä, kuten ihmisen immuunikatoviruksen (HIV) aiheuttamaa immuunivajavuusoireyhtymää, neurodegeneratiivisia sairauksia (Alzheimerin tauti), sydäninfarktin aiheuttamia laaja-alaisia vaurioita ja aivoiskemian aiheuttamaa vauriota.

10

Onkologiassa onkin todettu varmasti, että monet syöpälääkkeet, kuten esimerkiksi adriamysiini ja syklofosfamidi, voivat aiheuttaa apoptoosia.

15

Kosmetiikan alalla ihon vanhenemisen merkit ovat pääasiassa tulosta ihon tärkeimpien biologisten mekanismien toimintahäiriöistä, mikä nimenomaan saa apoptoosin mekanismin käynnistymään. Voidaankin ajatella, että mikä tahansa tuote, joka saa muunnetuksi apoptoosin mekanismia, on tuote, joka sopii ehkäisemään ja/tai torjumaan vanhenemisen näkymistä ja olemassaolevia vanhenemisen merkkejä, kuten rypyjä ja hiusryppyjä.

20

Solun eksogeenisten ja endogeenisten tuotteiden välistä yhteyttä ei kuitenkaan tunneta eikä niiden solureaktiota, joka indusoi tai estää apoptoosin.

25

Hakija on havainnut, että apoptoosi voidaan indusoida lisäämällä erään luonnollisen aineenvaihduntatuotteen, metionaalin (3-metyyliotiopropanaali) tai malonidialdehydin tasoa solun sisällä. Hakija on myös todennut, että metionaalin muuttumista *in vivo* malonidialdehydiksi voidaan häiritä ilmentämällä onkogeenejä, kuten *bcl₂*-geeniä. Tämän *bcl₂*-geenin on nimittäin kuvattu voivan estää apoptoosia, jonka aiheuttavat reaktiiviset happea sisältävät lajit solussa ja erityisesti hermosoluissa. (Kane. D.J. *et al.*, 1993, Science 262, 1274-1277).

30

Esillä oleva keksintö koskeekin yhdistettä, joka on valittu metionaalin, malonidialdehydin ja minkä tahansa tekijän joukosta, joka vaikuttaa metionaalin tai malonidialdehydin solunsisäiseen tasoon, ja joka on tarkoitettu käytettäväksi lääkkeenä. Tämä

35 lääke on erityisesti tarkoitettu muuntamaan solujen ohjelmoitua kuolemaa.

Esillä olevan keksinnön kohteena on myös apoptoosia muuntava farmaseuttinen tai kosmeettinen koostumus, jolle on tunnusomaista, että se käsittää vaikuttavana ainee-

na yhdisteen, joka on valittu metionaalin, malonidialdehydin ja minkä tahansa tekijän joukosta, joka vaikuttaa metionaalin tai malonidialdehydin solunsisäiseen tasoon, yhdistettynä johonkin farmaseuttisesti tai kosmeettisesti hyväksyttävään kantajaan.

- 5 Metionaalia, malonidialdehydiä ja mitä tahansa tekijää, joka vaikuttaa metionaalin tai malonidialdehydin solunsisäiseen tasoon, voidaan käyttää esillä olevassa keksinnössä yksinään tai mieluiten seoksena. Tuotteet valitaan tietysti tavoitellun tuloksen mukaan, toisin sanoen joko apoptoosin aikaansaamiseksi tai apoptoosin estämiseksi.
- 10 Niinpä keksinnön erään erityistoteutusmuodon mukaan koostumukselle, joka indusoi apoptoosia, on tunnusomaista, että se käsittää vaikuttavana aineena yhdisteen, joka on valittu metionaalin, malonidialdehydin ja minkä tahansa tekijän joukosta, joka nostaa metionaalin tai malonidialdehydin solunsisäistä tasoa, yhdistettynä johonkin farmaseuttisesti tai kosmeettisesti hyväksyttävään kantajaan.
- 15 Ja keksinnön erään toisen erityistoteutusmuodon mukaan apoptoosia estävälle koostumukselle on tunnusomaista, että se käsittää vaikuttavana aineena minkä tahansa tekijän, joka laskee metionaalin tai malonidialdehydin solunsisäistä tasoa, yhdistettynä johonkin farmaseuttisesti tai kosmeettisesti hyväksyttävään kantajaan.
- 20 Metionaalin metaboliasta tiedetään, että haaraketjuinen oksohappo-dehydraasikompleksi, jota on läsnä maksan, sydämen ja poikkijuovaisen lihaskudoksen mitokondrioissa, voi metaboloida *in vivo* 4-metyylitio-2-oksovohappoa, metionaalin kautta, jolloin muodostuu metyylitiopropionyyliCoA:ta [vrt. Wu, G. & Yeaman, S.J. (1989) Biochem. J. 257, 281-284; Haussinger, D., Stehle, T. & Gerok, W. (1985) J. Biol. Chem. 366, 527-536; Jones, S.M.A. & Yeaman, S.J. (1986) Biochem. J. 237, 621-623]. On myös kuvattu, että 4-metyylitio-2-oksovohappo voi metaboloitua *in vivo* transaminoitumalla metioniiniksi [vrt. Ogier, G., Chantepie, J., Deshayes, C., Chantegrel, B., Charlot, C., Doutheau, A. & Quash, G. (1993) Biochem. Pharmacol. 45, 1631-1644]. Metionaali saattaa myös pelkistyä tai hapettua vastaavasti metionoliksi jonkin aldehydireduktaasin tai metyylitiopropionihapoksi jonkin aldehydidehydraasin vaikutuksesta. Metionaalin liittyessä HO[•]-radikaaliin voi vielä muodostua malonidialdehydiä ja metaanitiolia β -hydroksylaatioreaktion kautta. Niinpä metionaalin, malonidialdehydin ja tekijöiden, jotka voivat vaikuttaa niiden solunsisäiseen tasoon, paikantamiseksi paremmin kuvio 1 kuvaa metionaalin metaboliaa, rajoittamatta kuitenkaan keksinnön suoja-alaa.
- 35

Tässä kuviossa 1:

- MTOB tarkoittaa 4-metyylitio-2-oksovohappoa;
- MTPA tarkoittaa metyyliitiopropionihappoa;
- E1 tarkoittaa haaraketjuisen oksohappo-dehydraasikompleksin, jonka kofaktori on tiamiinipyrofosfaatti (TPP), dekarboksylaasia;
- E2 tarkoittaa haaraketjuisen oksohappo-dehydraasikompleksin, jonka kofaktori on tioktaanihappo (TA), transasylaasia;
- ALDR tarkoittaa aldehydireduktaasia;
- ALDH tarkoittaa aldehydidehydraasia.

10

Tekijällä, joka vaikuttaa metionaaalin tai malonidialdehydin solunsisäiseen tasoon, tarkoitetaan keksinnön mukaan yhdistettä, jotka on valittu metionaaalin tai malonidialdehydin esiasteista ja tuotteista, ja metionaaalin tai malonidialdehydin metaboliassa mukana olevien entsyymien estäjistä ja aktivaattoreista. Niinpä kuviossa 1 esitettyä metionaaalin tai malonidialdehydin metaboliaa katseltaessa onkin helppo ymmärtää, kuinka nämä yhdisteet, metionaali tai malonidialdehydi, solusysteemiin jouduttuaan muuttavat metionaaalin tai malonidialdehydin solunsisäistä tasoa, joko väliaikaisesti tai pitkäaikaisesti.

15

20

Metionaaalin tai malonidialdehydin esiasteet tai tuotteet voivat olla metionaaalin solunsisäisen metabolian esiasteita tai tuotteita, kuten 4-metyylitio-2-oksovohappoa, metioniinia, metionolia, metyyliitiopropionihappoa ja metyyliitiopropionyyliCoA:ta.

25

Metionaaalin tai malonidialdehydin esiasteet tai tuotteet voivat myös olla tuotteita, jotka pystyvät *in situ* vapauttamaan metionaaalia tai malonidialdehydiä tai vapauttamaan jotakin tekijää, joka vaikuttaa metionaaalin tai malonidialdehydin solunsisäiseen tasoon, kuten metionaaalin tai malonidialdehydin estereitä tai tioestereitä, jotka vapauttavat *in situ* metionaaalia tai malonidialdehydiä, tai 4-metyylitio-2-hydroksivohappoa, joka metaboloituu *in situ* 4-metyylitio-2-oksovohapoksi. Farmasiassa näitä tuotteita nimitetään yhteisesti ”aihiolääkkeiksi” (prodrugs).

30

35

Kun apoptoosi halutaan indusoida, metionaaalia, malonidialdehydiä, metionaaalin tai malonidialdehydin esiasteita tai tuotteita käytetään edullisesti yhdessä entsyymien, jotka ovat mukana muissa metionaaalin eliminoitumista edistävissä metabolisissa reaktioissa, kuin edellä mainitussa β -hydroksylaatioreaktiossa (joka muuttaa metionaaalin malonidialdehydiksi), estäjien kanssa tai β -hydroksylaasin, joka on mukana metionaaalin muuttumisessa malonidialdehydiksi, aktivaattorien kanssa. Esimerkkeinä voidaankin mainita 4-metyylitio-2-oksovohapon ja transaminaasin, joka on mukana

4-metyylitio-2-oksovohapon muuttumisessa metioniiniksi, jonkin estäjän, kuten alla mainittujen estäjien, yhdistelmä.

5 Voidaan myös ajatella metionaalin tai metionaalin solunsisäistä tasoa nostavan tekijän yhdistämistä yhdisteisiin, jotka nostavat vapaan radikaalin HO[•] tasoa. Mainittakoonkin BCNU [N,N-bis(2-kloorietyyli)-N-nitrosourea], sillä se on eräs glutathionireduktaasin estäjä, jolloin reaktiivisten happea sisältävien yhdisteiden, kuten esimerkiksi HO[•]-radikaalin, joka on eräs malonidialdehydiä synnyttävän β-hydroksylaatio-reaktion substraatti, solunsisäinen taso saadaan nousemaan.

10

Tällainen yhdistäminen on erityisen mielenkiintoista patologisissa tapauksissa, joille on luonteenomaista geenin bcl2:n yli-ilmentyminen. Sellaisia tauteja ovat etenkin rintasyövät, B-solulymfoomat, leukemiat, neuroblastoomat, eturauhasen adenokarsinoomat, prolaktinoomat ja muut aivolisäkkeen adenoomat. Geenin bcl2 yli-
15 ilmentyminen antaa soluille kemiallisten aineiden kestävyuden. Tällainen yhdistäminen saattaa siis estää osaksi ja jopa kokonaan tämän kemiallisten aineiden kestävyuden.

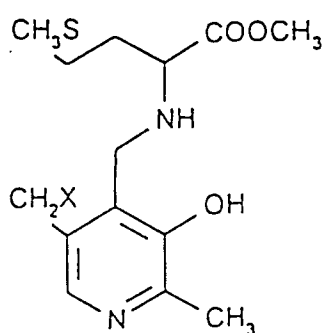
20 Tähän yhdistelmään voidaan edullisesti lisätä ainakin yksi transaminaasin, joka on mukana 4-metyylitio-2-oksovohapon muuttumisessa metioniiniksi, estäjä, kuten jokin tuonnempana kuvatuista ja erityisesti kaavan (9) mukainen yhdiste.

Metionaalin metaboliassa mukana olevien entsyymien estäjistä tai aktivaattoreista mainittakoon etenkin haaraketjuisen oksohappo-dehydraasikompleksin, joka on mu-
25 kana 4-metyylitio-2-oksovohapon muuttumisessa metyylitiopropionyyliCoA:ksi metionaalin kautta, estäjät tai aktivaattorit tai transaminaasin, joka on mukana 4-metyylitio-2-oksovohapon muuttumisessa metioniiniksi, estäjät tai aktivaattorit tai aldehydireduktaasin, joka on vastuussa metionaalin pelkistämisestä metionoliksi, tai aldehydidehydraasin, joka on vastuussa metionaalin hapettamisesta metyylitiopropionihapoksi, estäjät tai aktivaattorit tai vielä β-hydroksylaasin, joka on metionaalin
30 muuttumisessa malonidialdehydiksi mukana oleva entsyymi, aktivaattorit tai estäjät.

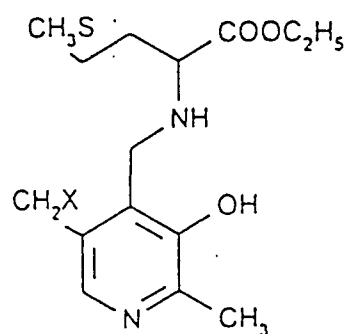
Haaraketjuisen oksohappo-dehydraasikompleksin estäjänä eli siis tekijänä, joka vähentää metionaalin tai malonidialdehydin solunsisäistä tasoa, voidaankin mainita 2-
35 oksobutyraatti, joka on eräs tämän kompleksin tunnettu substraatti [vrt. Jones, S.M.A. & Cederbaum, A.I. (1980) Arch. of Biochem. and Biophys., 199, 438-447], sekä ketoleusiini, ketoisoleusiini ja ketovaliini, jotka ovat muita tämän kompleksin substraatteja.

- Transaminaasin, joka on mukana 4-metyylitio-2-oksovoihapon muuttumisessa metioniiniksi, estäjinä ja siis tekijöinä, jotka nostavat metionaalin tai malonidialdehydin solunsisäistä tasoa, voidaan myös mainita tuotteet, joita kuvataan viitteessä Ogier, G., Chantepie, J., Deshayes, C., Chantegrel, B., Charlot, C., Doutheau, A. & Quash, G. (1993) *Biochem. Pharmacol.* 45, 1631-1644.

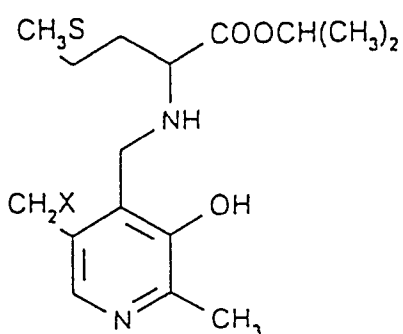
Erityisesti transaminaasin, joka on mukana 4-metyylitio-2-oksovoihapon muuttumisessa metioniiniksi, estäjät valitaan tuotteista, joilla on seuraavat kaavat (1) - (9):



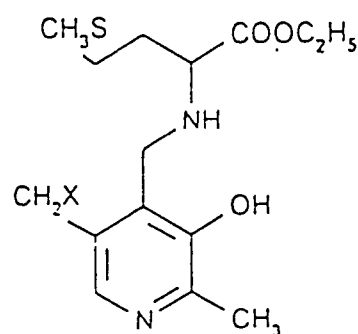
(1)



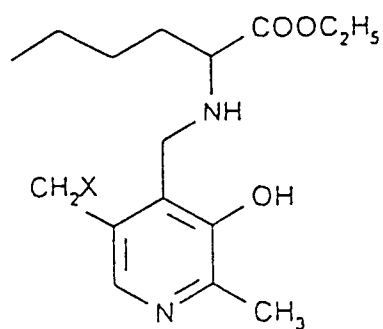
(2)



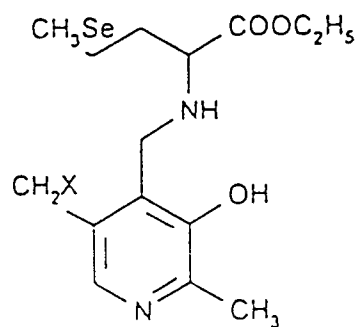
(3)



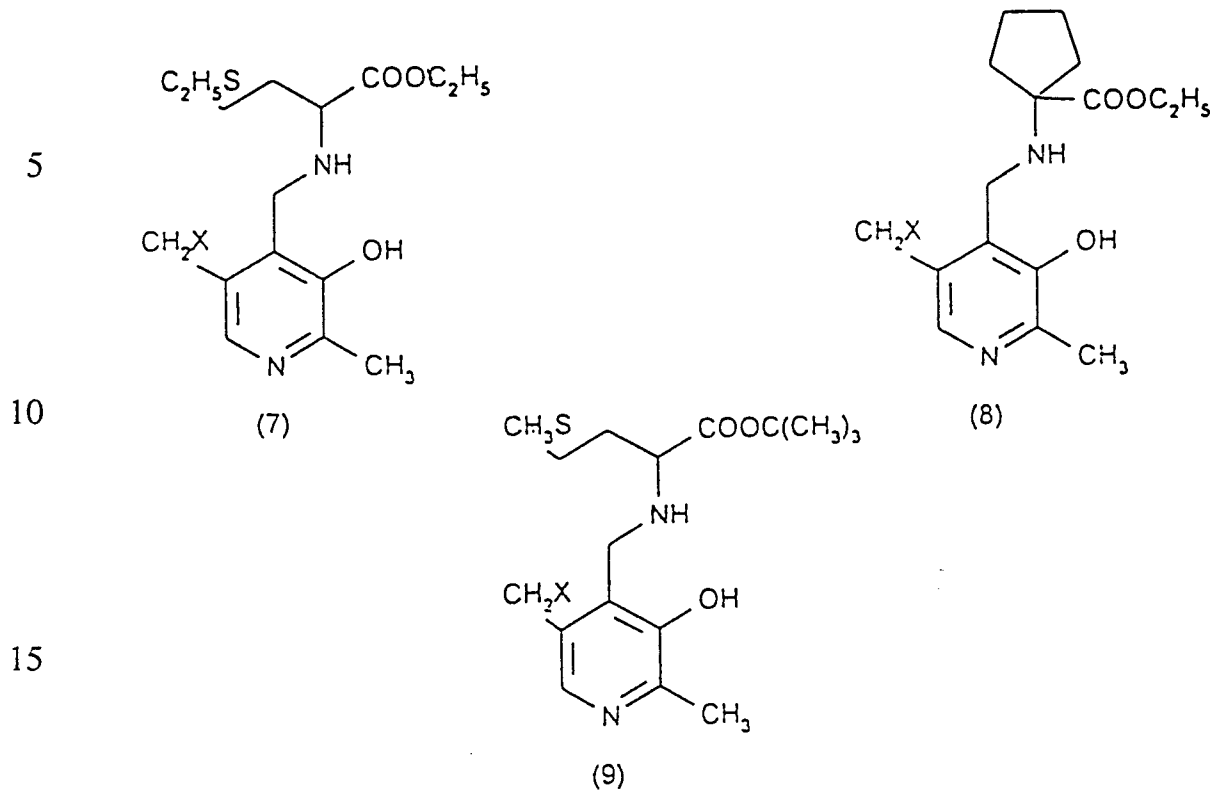
(4)



(5)



(6)



joissa kaavoissa X tarkoittaa radikaalia -OH tai radikaalia -OPO₃H₂.

Kaavan (9) mukainen yhdiste, kun X on radikaali -OH, on erityisen edullinen.

25 Transaminaasin, joka on mukana 4-metyylitio-2-oksovohapon muuttumisessa metioniiniksi, estäjinä ja siis tekijöinä, jotka nostavat metionaalin tai malonidialdehydin solunsisäistä tasoa, voidaan mainita vielä amidoaminohappojen hydroksamaatit, kuten D-asparagiinin hydroksamaatti, jolla on kaava CONHOHCH₂CHNH₂COOH, ja L-glutamiinin hydroksamaatti, jolla on kaava CONHOHCH₂CH₂CHNH₂COOH.

30 Kun halutaan indusoida apoptoosia, keksinnön mukaan käytetään edullisesti jotakin yhdistettä, joka on valittu metionaalin, malonidialdehydin, tuotteiden, jotka pystyvät *in situ* vapauttamaan metionaalia tai malonidialdehydiä, kuten metionaalin tai malonidialdehydin esterit tai tioesterit, tai metionaalin malonidialdehydiksi muuttumises-

35 sa mukana olevan entsyymien aktivaattorien joukosta.

Erityisen mielenkiintoisista seoksista apoptoosin indusoimiseksi voidaan erityisesti mainita metionaalin ja ainakin yhden transaminaasin, joka on mukana 4-metyylitio-

2-oksovohapon muuttumisessa metioniiniksi, estäjän ja edullisesti kaavan (9) mukaisen yhdisteen yhdistelmä.

5 Kun apoptoosi halutaan estää, keksinnön mukaan käytetään edullisesti metionaalin tai malonidialdehydin tuotannossa mukana olevien entsyymien estäjiä, kuten 2-okso-butyraattia, ja/tai muussa kuin β -hydroksylaatioreaktion kautta tapahtuvassa metionaalin eliminoitumisessa mukana olevien entsyymien aktivaattoreita.

10 Keksinnön mukainen koostumus on erityisesti tarkoitettu seuraaviin käsittelyihin:

- 1) Dermatologisten vaivojen, jotka liittyvät johonkin keratinisaatiohäiriöön, joka vaikuttaa solujen erilaistumiseen ja epänormaalin voimakkaaseen proliferaatioon, hoitamiseen, etenkin tavallisen aknen, komedoaknen, polymorfisen aknen, ruusu-
15 finnin, nodulokystisen aknen, acne conglobatan, vanhuuden aiheuttaman aknen, sekundaaristen aknetilojen, kuten aurinkoaknen, lääkeaknen tai työperäisen aknen, hoitamiseen.
- 2) Muuntyyppisten keratinisaatiohäiriöiden, etenkin iktyoosien, iktyoosiformisten tilojen, Darierin taudin, keratoderma palmoplantaren, leukoplasoiden ja leukoplasi-
an kaltaisten tilojen, ihon tai limakalvon (suun) jäkälätaudin hoitamiseen.
- 20 3) Muiden dermatologisten vaivojen, jotka liittyvät johonkin keratinisaatiohäiriöön, jossa on mukana tulehdus- ja/tai immunoallerginen komponentti, ja erityisesti kaikkien psoriaasin muotojen, olivatpa ne ihon, limakalvon tai kynsien psoriaasia, tai myös psoriaattisen nivelreuman tai atooppisen ihon, kuten ekseeman tai hengitystieatopian tai ienten liikakasvun hoitamiseen.
- 25 4) Kaikenlaisten ihon tai epidermin hyperproliferaatioiden, olivatpa ne hyvänlaatuisia tai pahanlaatuisia, virusperäisiä tai ei virusperäisiä, kuten tavallisten syylien, litteiden syylien ja syylämäisen orvaskeden muodostumishäiriön, suun tai voimak-
kain oirein ilmenevien syylätautien ja hyperproliferaatioiden, jotka voivat johtua ult-
ravioletisäteilystä, varsinkin kun kysymyksessä on tyvisolusyöpä tai okasolusyöpä,
30 hoitamiseen.
- 5) Muiden dermatologisten häiriöiden, kuten suurirakkulaisten ihotautilien ja kollageenitautien hoitamiseen.
- 6) Eräiden oftalmologisten häiriöiden, etenkin korneopatioiden, hoitamiseen.
- 7) Ihon vanhenemisen korjaamiseen tai torjumiseen, olipa se sitten valoperäistä tai
35 ikään liittyvää, ja auringonvaloon liittyvien pigmentaatioiden ja keratoosien vähen-
tämiseen tai kaikkien tautitilojen, jotka liittyvät iästä tai auringonvalosta johtuvaan
vanhenemiseen, korjaamiseen tai torjumiseen.
- 8) Paikallisten tai systeemisten kortikosteroidien aiheuttaman orvaskeden tai ihon

atrofian tai minkä tahansa muun ihoatrofian jättämien arprien estämiseen tai parantamiseen.

9) Arpeutumishäiriöiden estämiseen tai hoitamiseen tai arpijuovien estämiseen tai korjaamiseen.

5 10) Talirauhasten toimintahäiriöiden, kuten hyperseborrooisen aknen tai tavallisen taliköhnän torjumiseen.

11) Syöpätilojen tai syövän esiasteiden hoitamiseen tai ehkäisemiseen.

12) Tulehdustautien kuten artriitin hoitamiseen.

10 13) Kaikkien virusperäisten ihon tasolla tai yleisesti esiintyvien tautien, kuten hepatiitin hoitamiseen.

14) Kaljuuden ehkäisemiseen tai hoitamiseen.

15) Dermatologisten tai yleistautien, joissa on mukana immunologinen komponentti, hoitamiseen.

15 16) Sydän-verisuonisysteemin sairauksien, kuten arterioskleroosin ja trombosytopenian, hoitamiseen.

17 Neurodegeneratiivisten tautien, kuten Alzheimerin taudin, hoitamiseen.

20 Edellä mainituilla hoitoaloilla keksinnön mukainen koostumus voi edullisesti käsittää muita vaikuttavia aineita, kuten retinoideja, vapaiden radikaalien estäjiä, D-vitamiinijohdoksia, kortikosteroideja tai estrogeeneja, antioksidantteja, α -hydroksi- tai α -ketohappoja tai niiden johdoksia tai myös kaliumkanavien salpaajia.

25 Esillä oleva keksintö koskee vielä keksinnön mukaisen koostumuksen käyttöä kosmettisessa tai farmaseuttisessa seoksessa tai sen valmistuksessa, joka seos on tarkoitettu apoptoosin muuntamiseen ja joka on erityisesti tarkoitettu edellä kuvattuihin ennaltaehkäiseviin tai parantaviin käsittelyihin.

30 Retinoidit voivat olla luonnon tai synteettisiä retinoideja. Retinoideista voidaan mainita 9-cis-retinoiinihappo tai täys-trans-retinoiinihappo.

D-vitamiineista tai niiden johdoksista voidaan mainita erityisesti D₂- tai D₃-vitamiinin johdokset ja erityisesti 1,25-dihydroksivitamiini D₃.

35 Vapaiden radikaalien estäjistä voidaan mainita etenkin α - tokoferoli, superoksididismutaasi, ubikinoli tai eräät metallikelatointiaineet.

α -hydroksi- tai α -ketohapoista ja niiden johdoksista voidaan mainita ketoleusiini, ketoisoleusiini, ketovaliini, 2-oksobutyyraatti, 4-metyylitio-2-oksovohihappo, maito-

happo, omenahappo, sitruunahappo, glykoli happo, manteli happo, viini happo, glyse-
riini happo, askorbiini happo tai salisyylili happojohdokset tai niiden suolat, amidit tai
esterit.

- 5 Kaliumkanavien salpaajista voidaan mainita etenkin minoksideili (2,4-diamino-6-
piperidinopyrimidiini-3-oksidi) ja sen johdokset.

- Keksinnön mukainen koostumus voidaan antaa enteraalisesti, parenteraalisesti, ul-
konaisesti tai silmään. Koostumus pakataan edullisesti muotoon, joka soveltuu sen
10 käyttämiseen systeemisesti (ruiskeena tai perfuusiona).

- Enteraalista antoa varten koostumus, erityisesti farmaseuttinen koostumus, voi olla
tabletteina, gelatiinikapseleina, sokeripäälysteisinä tabletteina, siirappeina, suspen-
sioina, liuoksina, jauheina, rakeina, emulsioina, mikropallosina tai nanopallosina tai
15 lipidi- tai polymeerirakkuloina, jotka mahdollistavat säädellyn vapautumisen. Paren-
teraalista antoa varten koostumus voi olla perfuusiona tai injektiona annettavina liu-
oksina tai suspensioina.

- Keksinnön mukaista lääkettä annetaan yleensä noin 0,001 mg:n - 100 mg:n vuoro-
20 kausiannoksena painokiloa kohti jaettuna 1 - 3 kertaan vuorokaudessa.

- Ulkonaisesti käytettäväksi keksinnön mukainen koostumus on erityisesti tarkoitettu
ihon ja limakalvojen hoitoon ja se voi olla voiteina, emulsiovoiteina, emulsioina, sal-
voina, puutereina, kostutettuina vanutuppoina, liuoksina, geeleinä suihkeina, lotio-
25 neina tai suspensioina. Se voi olla myös mikropallosina tai nanopallosina tai lipidi-
tai polymeerirakkuloina tai polymeerilaastareina ja hydrogeeleinä, jotka mahdollista-
vat säädellyn vapautumisen. Tämä paikallisesti käytettävä koostumus voi olla vedet-
tömässä tai vesipitoisessa muodossa.

- 30 Silmään pantaviksi tarkoitettuna ne ovat pääasiassa silmätippoina.

- Paikallisesti tai silmään tiputettava farmaseuttinen koostumus sisältää metionaalia,
malonidialdehydiä tai mitä tahansa tekijää, joka vaikuttaa metionaalin tai malonidi-
aldehydin solunsisäiseen tasoon, edullisesti pitoisuutena 0,001 - 5 % koostumuksen
35 kokonaispainosta.

Keksinnön mukaista koostumusta voidaan käyttää myös kosmetiikassa, erityisesti
kehon ja hiusten hygieniaan ja etenkin akneen taipuvaisen ihon hoitoon, hiusten

kasvun edistämiseen, hiustenlähdön ehkäisemiseen, auringon haitallisilta vaikutuksilta suojaamiseen tai fysiologisesti kuivan ihon hoitoon, valosta tai iästä johtuvan vanhenemisen ehkäisemiseen ja/tai torjumiseen.

- 5 Esillä olevan keksinnön kohteena on vielä menetelmä ihon valon tai iän aiheuttaman vanhenemisen ehkäisemiseksi ja/tai torjumiseksi, jolle menetelmälle on tunnusomaisesti, että iholle levitetään edellä kuvatulla tavalla apoptoosia indusoivaa kosmeettista koostumusta.
- 10 Kosmetiikassa keksinnön mukainen koostumus voi edullisesti sisältää retinoideja, D-vitamiineja tai niiden johdoksia, kortikosteroideja, vapaiden radikaalien estäjinä, α -hydroksi- tai α -ketohappoja tai niiden johdoksia tai vielä ionikanavien salpaajia. Kaikki nämä esillä olevan keksinnön mukaisissa koostumuksissa käytetyt eri tuotteet ovat edellä kuvattujen kaltaisia.
- 15 Keksinnön mukainen kosmeettinen koostumus voi olla etenkin emulsiovoiteen, emulsion, lotionin, geelin, mikropallosten tai nanopallosten tai lipidi- tai polymeerirakkuloiden, saippuan tai hiustenpesuaineen muodossa.
- 20 Metionaalin, malonidialdehydin tai minkä tahansa tekijän, joka vaikuttaa metionaalin tai malonidialdehydin solunsisäiseen tasoon, pitoisuus kosmeettisessa koostumuksessa on edullisesti 0,0001 - 3 % koostumuksen painosta.
- 25 Keksinnön mukainen farmaseuttinen tai kosmeettinen koostumus voi lisäksi sisältää inerttejä apuaineita tai vielä farmakodynaamisesti tai kosmeettisesti aktiivisia apuaineita tai näiden apuaineiden yhdistelmiä ja etenkin: kostutusaineita, depigmentoivia aineita, kuten hydrokinonia, atselaiinihappoa, kofeiinihappoa tai kojihappoa; pehmenysaineita; hydratoivia aineita, kuten glyserolia, PEG 400:a, tiamorfolinonia ja sen johdoksia tai ureaa; talineritystä tai finnejä ehkäiseviä aineita, kuten S-karboksimetyylikysteiniä, S-bentsyylikysteamiinia, niiden suoloja ja johdoksia, tai bentsoyyliperoksidia; antibiootteja, kuten erytromysiiniä ja sen estereitä, neomysiiniä, klindamysiiniä ja sen estereitä, tetrasykliinejä; sieniä tuhoavia aineita, kuten ketokonatsolia tai 4,5-polymetyyleeni-3-isotiatsolinoneja; hiusten kasvua edistäviä aineita, kuten minoksidiilia (2,4-diamino-6-piperidinopyrimidiini-3-oksidia) ja sen johdoksia.
- 30 diatsoksidia (7-kloori-3-metyyli-1,2,4-bentsotiadiatsiini-1,1-dioksidia) ja fenytoiinia (5,4-difenyylimidatsolidiini-2,4-dionia); tulehdusta ehkäiseviä ei-steroidiaineita; karotenoideja ja etenkin beetakatoteenia; psoriaasinvastaisia aineita, kuten antraliinia ja sen johdoksia ja lopuksi vielä eikosa-5,8,11,14-tetrainihappoa ja eikosa-

5,8,11-tryiinihappoa, niiden estereitä ja amideja.

- Keksinnön mukainen koostumus voi sisältää myös hajunparannusaineita, säilytysaineita, kuten parahydroksibentsoehapon estereitä, stabilaattoreita, kosteudensäästöaineita, pH:n säätelyaineita, osmoottista painetta muuttavia aineita, emulgaattoreita, UV-A- ja UV-B-suodattimia, antioksidantteja, kuten α -tokoferolia, butyylihydroksianisolia tai butyylihydroksitolueenia.

- Seuraavassa esitetään esimerkkejä keksinnön valaisemiseksi ja mitenkään keksintöä rajoittamatta.

Esimerkit

Esimerkki 1

- 15 Metaboliittien vaikutus HeLa-solujen kasvuun

HeLa-soluja ($0,5 \times 10^6$ petrimaljaa kohti) viljellään 3 ml:ssa Eaglen essentiaalisessa minimielatusliuoksessa, joka sisältää 10 paino-% dialysoitua vasikansikiönseerumia. Kuhunkin kolmeen maljaan lisätään 4 tunnin kuluttua metionaalia ($10 \mu\text{M}$ - 1 mM), metionolia ($10 \mu\text{M}$ - 20 mM), metyyliitiopropionihappoa (MTPA) ($1 \mu\text{M}$ - 20 mM),

20 L-metioniinia ($1 \mu\text{M}$ - 20 mM) tai 4-metyylitio-2-oksovohappoa (MTOB) ($1 \mu\text{M}$ - 20 mM). Kolmen vuorokauden 37°C :ssa pitämisen jälkeen solut huuhdotaan kahteen kertaan fosfaattipuskuroidussa keittosuolaliuoksessa (PBS-liuos), pH 7,5, ja otetaan talteen samantyyppisessä puskurissa.

- 25 Solujen kasvu arvioidaan mittaamalla proteiinipitoisuus [vrt. menetelmä, joka on kuvattu viitteessä Lowry, O.H., Rosebrouh, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951), J. Biol. Chem. 193, 265-275] tai lysaattien DNA-pitoisuus käyttämällä bisbentsimiditrihydrokloridiliuosta (Hoechst 33258) [vrt. Jarvis, W.D., Kolesnick, R.N., Fornari, F.A., Traylor, R.S., Gewirtz, D.A. & Grant, S. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A. 91, 73-77]. tai määrittämällä laktaattidehydraasin aktiivisuus käyttämällä 3-(4-dime-
- 30 tyylitiatsol-2-yyli)-2,5-difenyylitetratsoliumia (MTT) [vrt. Mosmann, T. (1983) J. of Immunology, Methods 65, 55-63].

- Tulokset on koottu taulukkoon 1. Jokainen ilmoitettu arvo on 3 tai 4 kokeen keskiarvo proteiinipitoisuudella arvioituna.
- 35

Taulukko 1

Tuote	IC50 (mM)
L-metioniini	>20
MTOB	1,6
metionaali	0,10
metionoli	>20
MTPA	10

IC50 tarkoittaa tuotepitoisuutta, joka tarvitaan estämään 50 % solujen kasvusta.

5 Tulokset, jotka saatiin mittaamalla DNA-pitoisuus tai määrittämällä laktaattidehydraasin aktiivisuus, ovat vertailukelpoisia tässä taulukossa saatujen kanssa.

Tämä taulukko osoittaa metionaalin IC50:n ja sen tuotteiden tai esiasteiden IC50:n eron.

10 Esimerkki 2

HeLa-soluja ($0,5 \times 10^6$ /petrimalja) kasvatetaan Eaglen essentiaalisessa minimielatusliuoksessa ilman metioniinia (Met⁻), joka sisältää 10 paino-% dialysoitua vasikansi-
 15 kionseerumia. 4 tunnin kuluttua lisätään 2-oksobutyraattia (10 mM - 40 mM) siten, että läsnä on 2 mM 4-metyylitio-2-oksovohappoa (MTOB). Kolmen vuorokauden 37°C:ssa pitämisen jälkeen solut huuhdotaan kaksi kertaa fosfaattipuskuroidussa keittosuolaliuoksessa, pH 7,5, (PBS) ja otetaan talteen samantyyppisessä puskurissa. Solujen kasvu mitataan samalla tavalla kuin edellisessä esimerkissä.

2-oksobutyraatti on hyvin tunnettu haaraketjuisen oksohappo-dehydraasikompleksin (BCOADC) (Km 18 μ M) substraatti. MTOB yksinään 2 mM:n määränä aikaansaa kasvun estämisen 72-prosenttisesti. Tulokset osoittavat, että 2-oksobutyraatti pystyy estämään tätä kasvun inhibitiota. Inhibitio vähenee 10 mM:sta 2-oksobutyraattia läh-
 20 tien 2 - 3 kertaisesti. Niinpä todetaankin, että BCOADC:n aktiivisuus MTOB:n muuttamisessa metionaaliksi siirtyä eri substraatin, kuten 2-oksobutyraatin, suun-
 25 taan alentaen siten kasvunestoa.

Esimerkki 3

Metionaalin vaikutus DNA-fragmentoitumiseen BAF3-soluissa

Käytetyt solut vastaavat hiiren lymfosyyttistä solulinjaa BAF3, joka vaatii interleukiini 3:a (IL3) kasvaakseen ja joissa tapahtuu apoptoosia (yli 80 % soluista) IL3:n puuttuessa 16 tunnissa [vrt. Collins, M.K.L., Marvel, J., Malde, P. & Lopez-Rivas, A. (1992) J. Exp. Med. 176, 1043-1051].

3 x 10⁶ BAF3-soluja viljellään 6 ml:ssa kasvatusliuosta, joka sisältää IL3:a, petrimaljoissa erilaisten metionaalin tai propaalin, joka on eräs aldehydidehydraasin substraatti, konsentraatioiden (200 - 800 µM) läsnäollessa. 8 tunnin kontaktiajan jälkeen solut huuhdotaan kolme kertaa fosfaattipuskuroidussa keittosuolaliuoksessa (PBS), pH 7,5. Solut lysoidaan 2 ml:ssa liuosta, jossa on 0,1 % Triton X-100, 20 mM EDTA (etyleenidiamiinitetraetikkahappo), 5 mM Tris pH 8, ja sentrifugoidaan sitten 30 000 g:n voimalla 4°C:ssa 30 minuuttia. Supernatantit dekantoidaan ja analysoidaan seuraavasti.

Verrokiksi samat viljelyt toteutetaan kasvatusliuoksessa, jossa on joko yksinomaan IL3:a (+IL3) tai jossa ei ole IL3:a (-IL3).

Saatujen DNA-palasten kvalitatiivinen analyysi suoritetaan menetelmällä, jota on kuvattu etenkin viitejulkaisussa Jarvis, W.D., Kolesnick, R.N., Fornari, F.A., Traylor, R.S., Gawirtz, D.A. & Grant, S. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 73-77. Supernatantteja käsitellään ribonukleaasi A:lla (20 µg/ml) 1 tunti 37°C:ssa ja proteiinaasi K:lla (100 µg/ml). DNA puhdistetaan fenoliuutolla ja saostetaan etanolilla.

Lopullisessa uutuksessa DNA-palaset, joilla on pieni molekyylipaino, analysoidaan elektroforeesilla 1-prosenttisella agarosigeelillä. Elektroforeesin jälkeen (60 V, 3 tuntia) geelit värjätään etidiumbromidilla.

Tulokset osoittavat selvästi, että apoptoosi on indusoitunut metionaalilla, saadussa geelissä näkyy monien 180 - 200 emäsparin DNA-palasten tikapuurakenne, joka on tyypillinen apoptoosin indusoitumiselle. Kun kysymyksessä on propaali, geelissä ei näy tätä ominaisuutta.

Suoritetaan spektrofotometrinen analyysi saatujen DNA-palasten (< 3 kiloemästä) määrän mittaamiseksi. 2 ml:aan supernatanttia lisätään 1 ml bisbentsamiditrihydrokloridiliuosta (Hoechst 33258) (1 µg/ml) 3 mM:ssa natriumkloridia, 1 mM:ssa EDTA:a, 10 mM:ssa Trisia, pH 8. Saadut liuokset analysoidaan fluorometrialla

(eksitaatio- λ = 365 nm, emissio- λ = 460 nm) DNA-määrät lasketaan suhteessa erittäin puhtaaseen DNA:han (0,1 - 1 μ g 2 ml:ssa lysointipuskuria), joka on käsitelty edellä kuvatulla tavalla, ja ilmoitetaan 10^{-9} g:na DNA:ta, joka on otettu talteen 3×10^6 solusta.

5

Saadaan seuraavaan taulukkoon 2 kootut tulokset.

Taulukko 2

Esimerkit	10^{-9} g DNA:ta/ 3×10^6 solua
+IL3	63
+IL3 + metionaali	127
-IL3	150

- 10 DNA-palasten lukumäärän kasvu soluissa, jotka on käsitelty IL3:lla ja metionaalilla, on samanlainen kuin mikä todettiin, kun solut pantiin elatusnesteeseen, jossa ei ollut IL3:a.

Esimerkki 4

- 15 BCNU:n ja transaminaasin, joka on mukana 4-metyylitio-2-oksovohapon muuttamisessa metioniiniksi, estäjän vaikutus reaktiivisten happea sisältävien lajien (H_2O_2 ja $HO^\cdot$) tuotantoon
- 1,5 $\times 10^5$ BAF3-solua (edellä kuvattu solulinja), joka on siirrostettu 3 ml:aan viljelynestettä, joka sisältää IL3:a [Dulbeccon muuntama Eaglen väliaine, joka sisältää 6 % vasikansikiönseerumia ja 5 % elatusnestettä, jota on käytetty Wehi-3B-soluihin ja jota käytetään IL3:n lähteenä, elatusneste, jota ovat kuvanneet Collins *et al.* (1992) J. Exp. Med. 176, 1043-1051], käsitellään 10 μ M:lla 2',7'-dikloorifluoreseiinidiasetaattia (jota nimitetään tästedes DCFH-DA:ksi ja joka saatiin Molecular Probes Inc.:ltä). Yhden tunnin 37°C:ssa inkuboinnin jälkeen solut huuhdotaan PBS-puskurilla.
- 25 10 minuuttia ennen analysointia dikloorifluoreseiinin (DCF) fluoresenssilla virtaus-sytometrialla lisätään propidiumjodidia 3 μ g/ml. Inkubointi suoritetaan erilaisten BCNU-konsentraatioiden läsnäollessa ja siten että läsnä joko on yhdistettä A 50 μ M tai ei ole [mikä vastaa kaavan (9) mukaista yhdistettä, kun X on -OH-radikaali]. Tällä menetelmällä voidaan määrittää fluoresenssiprosentti, joka saadaan reaktiivisten

happea sisältävien lajien (H_2O_2 ja $\text{HO}^\cdot$) reagoidessa DCFH-DA:n kanssa. Virtaussytometria toteutetaan FACScan-virtaussytometrillä (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA).

- 5 Tulokset on koottu seuraavaan taulukkoon 3.

Taulukko 3

BCNU-konsentraatio ($\mu\text{g/ml}$)	Yhdiste A:n konsentraatio (μM)	Fluoresenssi/ 10^6 solua
10	0	4
20	0	4
40	0	10
10	50	2,5
20	50	1,5
10	50	1,75

- 10 Tulokset siis osoittavat, että yhdiste A, jolla metionaalin taso saadaan nousemaan, estää $\text{HO}^\cdot$:n lisääntymisen, mikä johtuu BCNU:n konsentraation kasvusta. On siis todennäköistä, että metionaali reagoi läsnäolevien $\text{HO}^\cdot$ -radikaalien kanssa, jolloin syntyy malonidialdehydiä, joka käynnistää tällöin apoptoosin.

Esimerkki 5

- 15 BCNU:n ja transaminaasin, joka on mukana 4-metyylitio-2-oksovohapon muuttamisessa metioniiniksi, estäjän vaikutus apoptoosiin
- 20 DNA-säikeiden pätkät leimataan biotinyyli-dUTP:llä (osoitetaan avidiinfluoreseiinillä) *in situ* läpäiseviksi tehdyissä ja kiinnitetyissä soluissa käyttäen terminaalista deoksinukleotidinyyli-DNA-transferaasikoetta (TdT), kuten ovat kuvanneet Gorczyca *et al.* (1993) Cancer Res. 53, 1945-1951.

$1,5 \times 10^6$ BAF3-solua (edellä kuvattu solulinja) siirrostetaan 3 ml:aan elatusnestettä, joka sisältää IL3:a (Dulbeccon muuntama Eaglen väliaine, joka sisältää 6 % vasi-

- kansikiönseerumia ja 5 % elatusnestettä, jota on käytetty Wehi-3B-soluihin ja jota käytetään IL3:n lähteenä). Soluja inkuboidaan siten, että läsnä on 50 μM yhdistettä A, 40 μg BCNU:ta/ml, näiden kahden tuotteen seosta (50 μM yhdistettä A + 40 μg BCNU:ta/ml) tai ilman näitä kahta tuotetta (verrokki). 24 tunnin inkuboinnin jälkeen
- 5 solut huuhdotaan PBS-puskurissa ja kiinnitetään formaldehydissä, sitten etanolissa ja annetaan olla -20°C :ssa 3 vuorokautta. Sitten solut lietetään uudelleen 50 μl :aan liuosta, joka sisältää 0,1 μM natriumkakodylaattia, pH 7,5, 1 mM CoCl_2 , 0,1 mM ditio-treitolia, 0,05 mg/ml BSA:ta (naudan seerumialbumiinia), 10 yksikköä TdT:tä (vasikan kateenkorvaa Boehringeriltä), 0,5 nmol biotiini-16dUTP:tä (vasikan ka-
- 10 teenkorvaa Boehringeriltä), 0,5 nmol dATP:tä, 0,5 nmol dCTP:tä ja 0,5 nmol dGTP:tä 1 tunniksi 37°C :ssa. PBS:llä huuhtelun jälkeen solut lietetään uudelleen 100 μl :aan puskuria 4xSSC (0,15 M NaCl, 0,015 M natriumsitraattia), joka sisältää 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ avidiinifluoresiini-isotiosyanaattia (Sigma), 0,1 % (paino/tilavuus) RNAasi A:ta, 0,1 % Triton X 100:a ja 5 % (paino/tilavuus) kuorittua maitoa, 30 mi-
- 15 nuutiksi huoneenlämpötilassa pimeässä. Nämä solut huuhdotaan ja lietetään sitten 1 ml:aan PBS:ää, joka sisältää propidiumjodidia 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Virtaussytometria suoritetaan FACScan-virtaussytometrillä (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA).

Tulokset on koottu seuraavaan taulukkoon 4.

20

Taulukko 4

Koe	% soluista apoptoottisia
Verrokki	0,2
Yhdiste A	0,3
BCNU	2,3
Yhdiste A + BCNU	41,1

25

Näillä annoksilla tuotteet yksinään käynnistävät heikosti apoptoosia, sitä vastoin niiden seos indusoi voimakkaasti apoptoosia (synergia). Tämä tulos vahvistaa taulukon 3 tulokset ja niihin liittyvät päätelmät.

Esimerkki 6

Tehokkaimman terapeuttisen yhdistelmän määrittäminen hiirien, joihin on ympätty melanoomasoluja, hoitamiseksi

- 5 Ajassa $t = 0$ päivä, 10^5 muriinimelanoomasolua B16 F1 ruiskutetaan hiiriin B6D2F1 (firmalta IFFA CREDO, Ranska). Ajassa $t = 1$ päivä ja näin jatkuvasti 15 päivän ajan näihin hiiriin ruiskutetaan kerran päivässä eri hoito-ohjelmat, jotka on spesifioitu alla taulukossa 5. Verrokkina on hiiriä, joita ei ole hoidettu.

10 Taulukkoon 5 on koottu tulokset, jotka ovat 3 hoidetun hiiren tulosten keskiarvoja.

Taulukko 5

Hoito-ohjelma (mg/kg)	Keskimääräinen elinaika (vuorokausia)
Verrokki	20,5
BCNU (0,1 mg/kg)	24,5
Yhdiste A (25 mg/kg)	21,9
Metionaali (25 mg/kg)	27
BCNU + Metionaali	26
Yhdiste A + Metionaali	27
BCNU + yhdiste A	40,5
BCNU + Yhdiste A + metionaali	57

15 Ohjelmissa, joissa käytettiin useampaa yhdistettä, kunkin yhdisteen käytetyt annokset ovat samat kuin ohjelmissa, joissa käytetään näitä yhdisteitä yksinään.

Elinaika lasketaan edellä mainitusta lähtien ajasta $t = 0$ päivä ja se on hiirien, jotka eivät eläneet 60 vuorokautta kauemmin, keskiarvo.

BCNU on N,N-bis(2-kloorietyyli)-N-nitroso-urea. Yhdiste A on kaavan (9) mukainen yhdiste, kun X on radikaali -OH.

- 5 Todetaan, että viimeiset kaksi hoito-ohjelmaa ovat erityisen tehokkaita, koska ne lisäävät merkittävästi näiden hiirien elinaikaa. Näistä kahdesta hoito-ohjelmasta viimeksi mainittu ohjelma (lisätty metionaalia) saadaan kolmasosa hiiristä elämään yli 60 vuorokautta.

Esimerkki 7

- 10 Menetellään kuten edellisessä esimerkissä vaihdellen ohjelmia ja käsiteltyjen hiirien lukumäärää. Taulukkoon 6 on koottu nämä tiedot ja saadut tulokset.

Taulukko 6

Hoito-ohjelma (mg/kg)	Hoidettujen hiirien lukumäärä	Keskimääräinen elinaika (vuorokausia)	Pitkän aikavälin eloonjääneet %
Verrokki	6	23,7	0
BCNU (0,1 mg/kg)	6	32,5	0
Yhdiste A (25 mg/kg) + Metionaali (50 mg/kg)	10	33,1	10
BCNU + Yhdiste A + Metionaali	10	36	50

- 15 Elinaika lasketaan lähtien edellä mainitusta $t = 0$ päivä ja se on hiirien, jotka eivät eläneet yli 60 vuorokautta, keskiarvo. Viimeisessä hoito-ohjelmassa annokset ovat samat kuin yksinään käytettyjen yhdisteiden annokset. Pitkän aikavälin eloonjääneiden prosenttiosuus on hiirien, jotka elivät yli 60 vuorokautta, prosenttiosuus.
- 20 Todetaan siis, että kaksi viimeistä hoito-ohjelmaa ja ennen kaikkea viimeinen ohjelma ovat erityisen tehokkaat.

Esimerkki 8**Metionaalin vaikutus apoptoosin indusointiin BAF3-b0- ja BAF3-bcl2-soluissa**

Käytetyt solut vastaavat edellä kuvattua lymfosyyttisolulinjaa BAF3. Solut BAF3-bcl2 ovat BAF3-soluja, jotka on transfektoitu geenillä bcl2, solut BAF3-b0 ovat BAF3-soluja, joita ei ole transfektoitu geenillä bcl2. Kuten edellä täsmennettiin, BAF3-b0-soluissa (yli 80 %:ssa soluista) tapahtuu apoptoosi, jos ne eivät saa IL3:a, 16 tunnin kuluessa. Sitävastoin BAF3-bcl2-soluissa, jotka on transfektoitu geenillä bcl2, ei näy merkkiäkään apoptoosista IL3:n puuttuessa. Tästä syystä ne ovat hyvä malli näihin soluihin blokeeratun apoptoosivaiheen ja sen mahdollisen korrelaation malonidialdehydin synteesin eston kanssa määrittämiseksi.

BAF3-b0- ja BAF3-bcl2-solut merkitään soveltamalla menetelmää, jonka ovat kuvanneet Wright, S. *et al.* (1992) J. of Cell. Biochem. 48, 344-355, inkuboimalla $2,5 \times 10^5$ solua/ml $0,5 \mu\text{Ci}$ kanssa $[^3\text{H}]$ -tymidiiniä 40 tuntia 37°C :ssa. Kahden huuhtelun jälkeen kasvatusliuoksella $2,5 \times 10^5$ solua viljellään metionaalin läsnäollessa. 8 tunnin inkuboinnin jälkeen solut otetaan talteen sentrifugoimalla niitä 400 g :n voimalla 5 minuuttia ja ne pestään 3 kertaa PBS-puskurissa. Pelletissä talteenotetut solut liuotetaan 2 ml :aan liuosta, joka sisältää $0,1 \%$ Triton X-100, 20 mM EDTA, 5 mM Tris, $\text{pH } 8$, ja sentrifugoidaan voimalla $30\,000 \text{ g}$ 4°C :ssa 30 minuuttia. Supernatantit otetaan talteen ja pelletit liuotetaan $0,3 \text{ ml}$:aan $0,5 \text{ N}$ NaOH:ta. Alikvootteja kasvatusliuoksesta (1 ml), supernatantista ($0,3 \text{ ml}$) ja solubilisoidusta pelletistä ($0,1 \text{ ml}$) pannaan tuikelaskimeen analyysiä varten. DNA-palasten prosenttiosuus lasketaan seuraavasti:

$$\text{DNA-palasten } \% = \frac{\text{kasvatusliuoksen dpm} + \text{supernatantin dpm}}{\text{kasvatusliuoksen dpm} + \text{supernatantin dpm} + \text{solubilisoidun pelletin dpm}}$$

(dpm = radioaktiivisten hajoamisten lukumäärä per minuutti).

Tulokset: kasvavan metionaalipitoisuuden ($0, 50, 100, 200, 300, 400 \mu\text{M}$) lisääminen inkubointiväliaineeseen nostaa DNA-palasten prosenttiosuutta käytettäessä $400 \mu\text{M}$ metionaalia 26% :n maksimiarvoon verrattuna 7% :iin, kun kysymyksessä ovat BAF3-b0-solut, joita ei ole käsitelty metionaalilla (verrokki). Solujen BAF3-bcl2, joita on käsitelty vastaavilla pitoisuuksilla metionaalia, kohdalla DNA-palasten maksimiosuus on 7% käytettäessä $400 \mu\text{M}$ metionaalia, verrattuna verrokin 3% :iin.

Nämä tulokset osoittavat selvästi, että metionaalia lisäämällä ei ole mahdollista estää apoptoosin geenistä bcl2 johtuvaa inhibitiota BAF3-bcl2-soluissa.

Indusoidaessa apoptoosia IL3:n puuttumisen avulla todettiin, että metionaali muuttuu malonidialdehydiksi HO:n avulla tapahtuvan β -hydroksylaatioreaktion kautta. Niinpä ryhdyimmekin kokeilemaan H_2O_2 :ta ja HO:ta BAF3-b0- ja BAF3-bcl2-soluissa.

5 Esimerkki 9

Reaktiivisten happea sisältävien lajien (H_2O_2 ja OH) mittaaminen virtausytometrial-

Käytetyt solut vastaavat edellä kuvattua lymfosyyttisolulinjaa BAF3. Solut BAF3-bcl2 ovat BAF3-soluja, jotka on transfektoitu geenillä bcl2, solut BAF3-b0 ovat BAF3-soluja, joita ei ole transfektoitu geenillä bcl2.

$1,5 \times 10^6$ BAF3-b0- tai BAF3-bcl2-solua, jotka on siirrostettu 3 ml:aan kasvatusliuosta, joka sisältää IL3:a, käsitellään $10 \mu M$:lla dikloorifluoreseiini-diasetaattia (DCFH-DA). Yhden tunnin $37^\circ C$:ssa inkuboinnin jälkeen solut huuhdotaan PBS-puskurilla.

Kymmenen minuuttia ennen analyysiä dikloorifluoreseiinin (DCF) fluoresenssilla virtausytometrialla lisätään $3 \mu g/ml$ propidiumjodidia, kuten esimerkissä 4. Virtausytometria suoritetaan FACScan-virtausytometrillä (Becton Dickinson, San Jose, Ca, USA).

Tulokset on koottu seuraavaan taulukkoon 7.

Taulukko 7

Solutyyppi	Mielivaltaisen fluoresenssiyksikön keskiarvo
BAF3-b0	154 ± 32
BAF3-bcl2	211 ± 52

Niinpä siis vaikka BAF3-bcl2-soluilla on taipumus sisältää enemmän reaktiivisia happea sisältäviä lajeja kuin BAF3-b0-soluilla, tämä ero ei ole merkitsevä.

On siis mahdollista, että BAF3-bcl2-soluilla on puutteita metionaali- ja/tai malonidialdehydisynteesissä.

Esimerkki 10

^{14}C -merkittyjen tuotteiden, jotka on johdettu ^{14}C]MTOB:stä BAF3-b0- ja BAF3-bcl2-soluissa, analyysi

Käytetyt solut ovat siis samanlaisia kuin edellisessä esimerkissä.

5

^{14}C]MTOB valmistetaan ^{14}C]metioniinin hapettavalla deaminoinnilla, kuten ovat kuvanneet Ogier, G. *et al.* (1993) Biochem. Pharmacol. 45, 1631-1644. ^{14}C]MTOB (5×10^6 dpm vastaa 38,2 nmol) lisätään BAF3-b0- tai BAF3-bcl2-solususpensioon ($2,4 \times 10^5$ solua/ml) DMEM:ssä, joka sisältää 6 % vasikansikiönseerumia ja 5 %

10

IL3:a. 39 tuntia myöhemmin solut huuhdotaan kaksi kertaa PBS:ssä ja lietetään uudelleen pitoisuutena 9×10^5 solua/ml. ^{14}C]MTOB:tä ($1,9 \times 10^6$ dpm vastaa 14,5 nmol) lisätään 10^8 soluun ja 8 tuntia myöhemmin solut otetaan talteen sentrifugoimalla niitä 400 g:n voimalla 5 minuuttia. Solupellettejä solubilisoidaan 1,5 ml:ssa

15

0,5 N NaOH:ta 30 minuutin ajan 60°C :ssa. Soluissa läsnäoleva radioaktiivisuus mitataan 10 μl :n alikvooteista. Tämän jälkeen saatuun emäksiseen hydrolysaattiin lisätään perkloorihappoa 0,5 N:n lopulliseksi pitoisuudeksi, sitten 200 μmol 2,4-DNPH:ta (2,4-dinitrofenyylihydratsiinia, saatu Merckiltä). Seosta kuumennetaan 70°C :ssa 30 minuuttia, sitten sitä sentrifugoidaan 400 g:n voimalla 5 minuuttia. Sa-

20

ostumaa solubilisoidaan 1 ml:ssa 0,5 N NaOH:ta, radioaktiivisuus ja proteiinipitoisuus määritetään. Supernatanttiin lisätään NaOH:ta, pH 10. Merkityt metaboliitit uutetaan etyyliasetaattiin ja orgaaninen faasi kuivataan, hapotetaan ja uutetaan dikloorimetaaniin. Orgaanisessa faasissa olevat merkityt metaboliitit erotetaan ja identifioidaan hptlc:llä (suuren erotuskyvyn ohutkerroskromatografialla) ja verrataan vertailuyhdisteiden 2,4-DNPH-johdoksiin ja kvantitoidaan sitten pyyhkäisyradio-

25

kromatografialla.

Tulokset on koottu seuraavaan taulukkoon 8:

Taulukko 8

	BAF3-b0	BAF3-bcl2
radio. (dpm/mg DNA:ta)	1 252 000	1 111 000
soluproteiinien spesifinen aktiivisuus (dpm/mg proteiinia)	23 500	20 860
vapaa metioniini (dpm/mg DNA:ta)	36 820	51 440
2,4-DNPH-metionaali (dpm/mg DNA:ta)	14 050	7 650
2,4-DNPH-MDA (2,4DNPH-pyratsoli) (dpm/mg DNA:ta)	800	0

Radio. tarkoittaa soluissa olevaa kokonaisradioaktiivisuutta.

MDA tarkoittaa malonidialdehydiä.

(dpm/mg tarkoittaa radioaktiivisten hajoamisten määrää minuutissa milligrammaa kohti.)

- 5
- Näyttää siis siltä, että samaan DNA-määrään liittyvä kokonaisradioaktiivisuus on samanlainen molemmissa solutyypeissä 47 tunnin inkuboinnin jälkeen. Sama pätee soluproteiinien metioniinin aktiivisuuteen. Mitä taas tulee vapaaseen metioniiniin,
- 10 soluissa BAF3-bcl2 todetaan 40 %:n radioaktiivisuuden kasvu verrattuna solujen BAF3-b0 radioaktiivisuuteen. Metionaalissa läsnäoleva radioaktiivisuus on 80 % suurempi BAF3-b0-soluissa kuin BAF3-bcl2-soluissa. Tämä tekee mahdolliseksi osoittaa, että BAF3-bcl2-soluissa esiintyvään metionaalin muodostumisen MTOB:sta vähenemiseen liittyy samanaikainen metioniinin muodostumisen kasvu. Kun merkit-
- 15 tyn MDA:n muodostuminen mitataan, se on 800 dpm/mg DNA:ta BAF3-b0-soluissa, kun sen sijaan mitään radioaktiivisuutta ei paljastu MDA:n osalta BAF3-bcl2-soluu-
- 20 teissa. BAF3-bcl2-soluissa tapahtuu siis myös MDA:n muodostumisen vähenemistä metionaalista. Esimerkki 8 osoittaa selvästi, että tämä väheneminen ei johdu reaktiivisten happea sisältävien lajien vähenemisestä BAF3-bcl2-soluissa verrattuna BAF3-b0-soluihin. Voidaan siis päätellä, että geeni bcl2, sen lisäksi, että se vähentää MTOB:n muuttumista metionaaliksi, vaikuttaa negatiivisesti myös β -hydroksylaa-
- tioreaktioon, joka muuttaa metionaalin malonidialdehydiksi. Mikä tahansa tuote, jo-

ka muuttaa metionaalin tai sen metaboliatuoteen, malonidialdehydin, solunsisäistä tasoa, voidaan katsoa apoptoosin muuntajaksi.



Patenttivaatimukset

1. Yhdiste, **tunnettu** siitä, että se on valittu metionaalin, malonidialdehydin tai minkä tahansa tekijän joukosta, joka vaikuttaa metionaalin tai malonidialdehydin solunsisäiseen tasoon, ja on tarkoitettu käytettäväksi lääkkeenä.

5

2. Farmaseuttinen tai kosmeettinen koostumus, joka muuntaa apoptoosia, **tunnettu** siitä, että se käsittää vaikuttavana aineena vähintään yhden yhdisteen, joka on valittu metionaalin, malonidialdehydin ja minkä tahansa tekijän joukosta, joka vaikuttaa metionaalin tai malonidialdehydin solunsisäiseen tasoon, yhdistettynä johonkin farmaseuttisesti tai kosmeettisesti hyväksyttävään kantajaan.

10

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen koostumus, **tunnettu** siitä, että metionaalia, malonidialdehydiä ja mitä tahansa tekijää, joka vaikuttaa metionaalin tai malonidialdehydin solunsisäiseen tasoon, käytetään seoksena.

15

4. Patenttivaatimuksen 2 tai 3 mukainen koostumus, **tunnettu** siitä, että tekijät, jotka vaikuttavat metionaalin tai malonidialdehydin solunsisäiseen tasoon, on valittu metionaalin esiasteista tai tuotteista, metionaalin metaboliassa mukana olevien entsyymien estäjistä ja aktivaattoreista.

20

5. Edellä olevan patenttivaatimuksen mukainen koostumus, **tunnettu** siitä, että metionaalin tai malonidialdehydin esiasteet tai tuotteet ovat metionaalin tai malonidialdehydin solunsisäisen metabolian esiasteita tai tuotteita, kuten 4-metyylitio-2-oksovoihappoa, metioniinia, metionolia, metyyliiopropionihappoa ja metyyliiopropionyyliCoA:ta.

25

6. Patenttivaatimuksen 4 mukainen koostumus, **tunnettu** siitä, että metionaalin tai malonidialdehydin esiasteet tai tuotteet ovat tuotteita, jotka *in situ* pystyvät vapauttamaan metionaalia tai malonidialdehydiä tai vapauttamaan jonkin tekijän, joka vaikuttaa metionaalin tai malonidialdehydin solunsisäiseen tasoon, kuten metionaalin tai malonidialdehydin estereitä ja tioestereitä.

30

7. Patenttivaatimuksen 4 mukainen koostumus, **tunnettu** siitä, että metionaalin metaboliassa mukana olevien entsyymien estäjät tai aktivaattorit on valittu haarakettijaisen oksohappo-dehydraasikompleksin, joka on mukana 4-metyylitio-2-oksovoihapon muuntamisessa metyyliiopropionyyliCoA:ksi metionaalin kautta, estäjistä tai aktivaattoreista, transaminaasin, joka on mukana 4-metyylitio-2-oksovoihapon muuntamisessa metioniiniksi, estäjistä tai aktivaattoreista, aldehydireduktaasin, joka

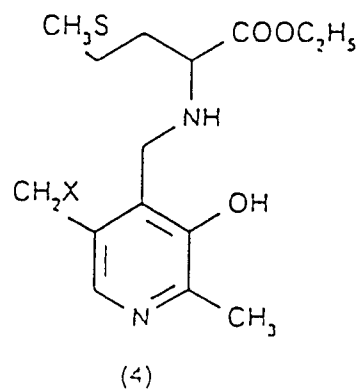
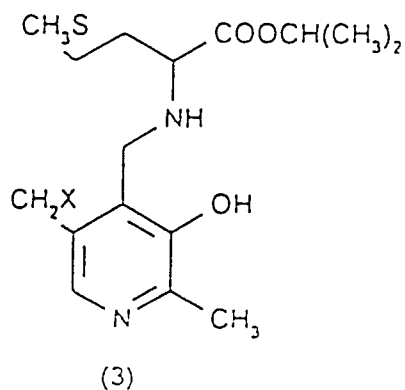
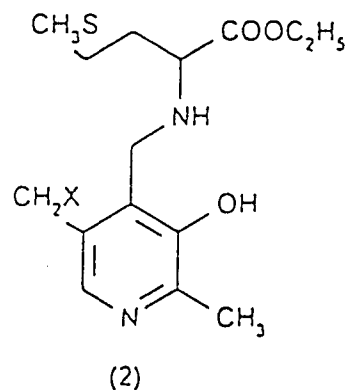
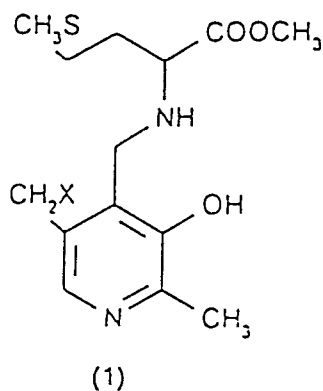
35

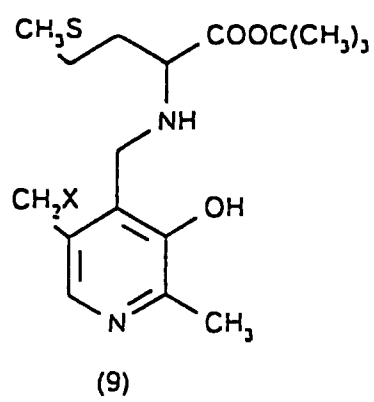
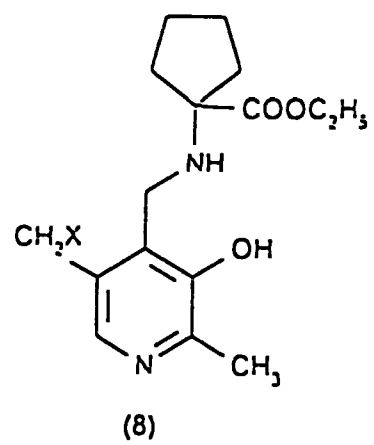
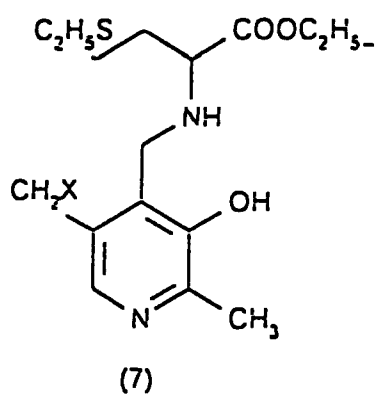
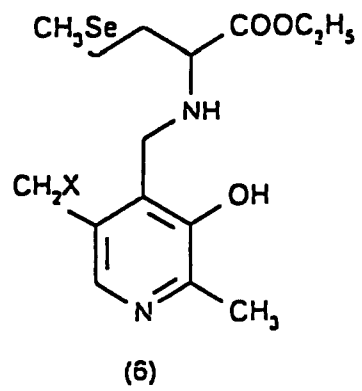
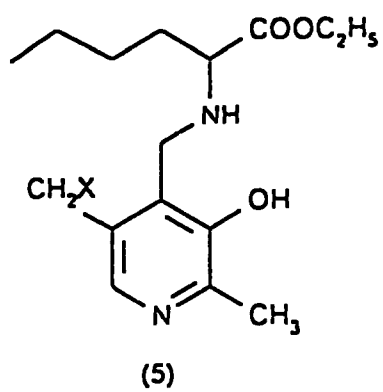
on vastuussa metionaalin pelkistämisestä metionoliksi, tai aldehydidehydraasin, joka on vastuussa metionaalin hapettamisesta metyylitiopropionihapoksi, estäjistä tai aktivaattoreista ja β -hydroksylaasin estäjistä tai aktivaattoreista.

- 5 8. Jonkin patenttivaatimuksen 2 - 7 mukainen koostumus, joka indusoi apoptoosia, **tunnettu** siitä, että se käsittää vaikuttavana aineena vähintään yhden yhdisteen, joka on valittu metionaalin, malonidialdehydin ja minkä tahansa tekijän joukosta, joka vaikuttaa metionaalin tai malonidialdehydin solunsisäiseen tasoon, yhdistettynä johonkin farmaseuttisesti tai kosmeettisesti hyväksyttävään kantajaan.

10

9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen koostumus, **tunnettu** siitä, että tekijät, jotka nostavat metionaalin tai malonidialdehydin solunsisäistä tasoa, ovat transaminaasin, joka on mukana 4-metyylitio-2-oksovaihapon muuttumisessa metioniiniksi, estäjiä, jotka on valittu tuotteista, joilla on seuraavat kaavat (1) - (9):





joissa kaavoissa X on -OH tai -OPO₃H₂.

10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen koostumus, **tunnettu** siitä, että transaminaasin, joka on mukana 4-metyylitio-2-oksovohapon muuttumisessa metioniiniksi, estäjä on yhdiste, jolla on kaava (9), jossa X on radikaali -OH.

11. Patenttivaatimuksen 8 mukainen koostumus, **tunnettu** siitä, että tekijät, jotka lisäävät metionaalin tai malonidialdehydin solunsisäistä tasoa, ovat transaminaasin, joka on mukana 4-metyylitio-2-oksovohapon muuttumisessa metioniiniksi, estäjiä, jotka on valittu amidoaminohappojen hydroksamaateista.

12. Patenttivaatimuksen 8 mukainen koostumus, **tunnettu** siitä, että se käsittää jonkin yhdisteen, joka on valittu metionaalin, malonidialdehydin, metionaalin tai malonidialdehydin esiasteiden ja tuotteiden joukosta, ja entsyymien, jotka ovat mukana metionaalin eliminoitumista edistävässä metaboliareaktioissa, estäjien tai β-hydroksylaasin aktivaattoreiden yhdistelmän.

13. Edellä olevan patenttivaatimuksen mukainen koostumus, **tunnettu** siitä, että yhdistelmä on 4-metyylitio-2-oksovohapon ja transaminaasin, joka on mukana 4-metyylitio-2-oksovohapon muuttumisessa metioniiniksi, jonkin estäjän, kuten jonkin jossakin patenttivaatimuksista 9 - 11 mainitun tuotteen, yhdistelmä.

14. Patenttivaatimuksen 8 mukainen koostumus, **tunnettu** siitä, että yhdistelmä on metionaalin tai jonkin tekijän, joka lisää metionaalin solunsisäistä tasoa, ja vähintään yhden yhdisteen, joka lisää vapaan radikaalin HO[•] tasoa ja joka yhdiste on edullisesti BCNU, yhdistelmä.

15. Edellisen patenttivaatimuksen mukainen koostumus, **tunnettu** siitä, että se käsittää vähintään yhden transaminaasin, joka on mukana 4-metyylitio-2-oksovohapon muuttumisessa metioniiniksi, estäjän, kuten jonkin tuotteista, jotka on mainittu jossakin patenttivaatimuksista 9 - 11.

16. Jonkin patenttivaatimuksista 2 - 7 mukainen koostumus, **tunnettu** siitä, että se käsittää vaikuttavana aineena minkä tahansa tekijän, joka vähentää metionaalin tai malonidialdehydin solunsisäistä tasoa, yhdistettynä johonkin farmaseuttisesti tai kosmeettisesti hyväksyttävään kantajaan.

17. Edellisen patenttivaatimuksen mukainen koostumus, **tunnettu** siitä, että tekijä,

joka vähentää metionaalin solunsisäistä tasoa, on jokin haaraketjuisen oksohappo-dehydraasikompleksin estäjä, kuten 2-oksobutyraatti, ketoleusiini, ketoisoleusiini ja ketovaliini.

- 5 18. Patenttivaatimuksen 16 mukainen koostumus, **tunnettu** siitä, että se käsittää metionaalin tuottamisessa mukana olevien entsyymien estäjiä ja/tai metionaalin eliminoitumisessa mukana olevien entsyymien aktivaattoreita.
- 10 19. Jonkin patenttivaatimuksista 2 - 18 mukaisen koostumuksen käyttö kosmeettisessa koostumuksessa tai farmaseuttisen koostumuksen, joka on tarkoitettu muuntaamaan apoptoosia, valmistuksessa.
- 15 20. Menetelmä ihon valon tai iän vaikutuksesta tapahtuvan vanhenemisen ehkäisemiseksi ja/tai torjumiseksi, **tunnettu** siitä, että iholle levitetään jonkin patenttivaatimuksista 2 - 15 mukaista kosmeettista koostumusta, joka indusoi apoptoosia.

370847

372888

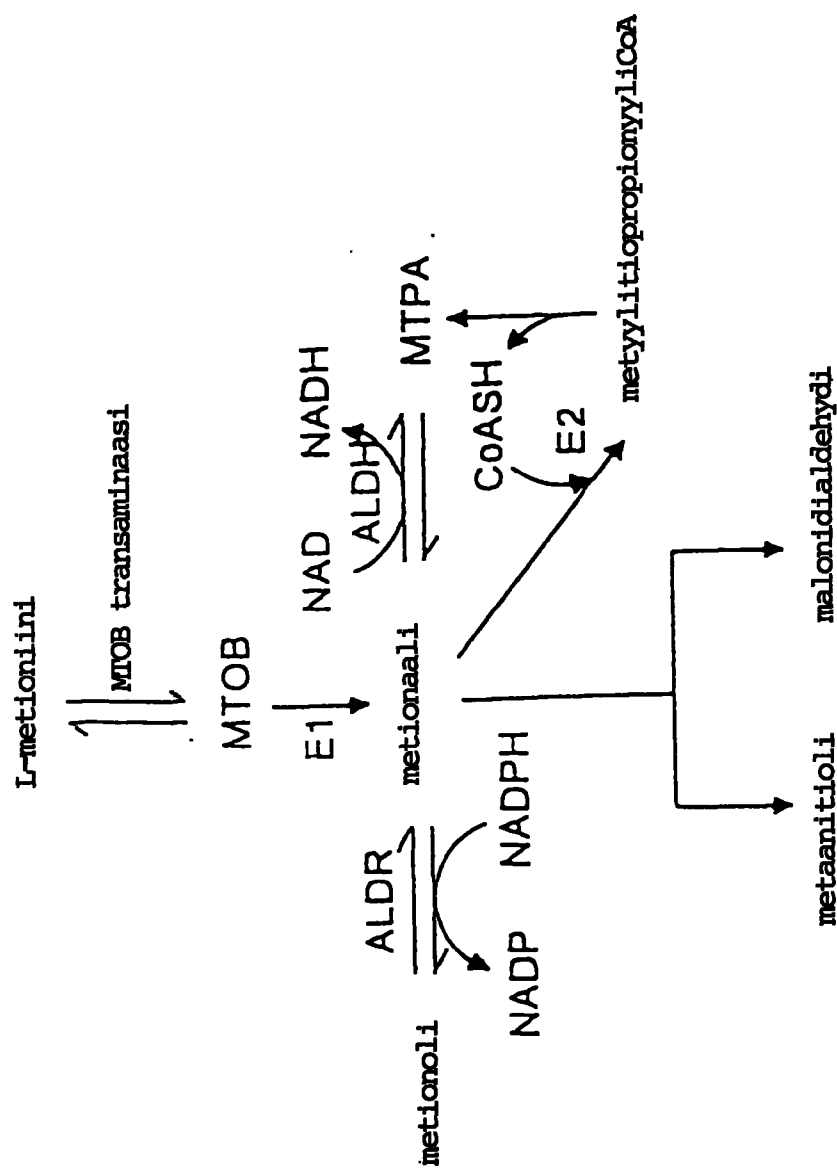


FIGURE 1