



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **327959**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.

A61K 31/5685 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 25/02 (2006.01)

A61P 25/16 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20026243	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2001.06.29 PCT/GB01/02937
(22)	Inng.dag	2002.12.27	(85)	Videreføringsdag	2002.12.27
(24)	Løpedag	2001.06.29	(30)	Prioritet	2000.06.29, GB, 0016022
(41)	Alm.tilgj	2003.02.27			
(45)	Meddelt	2009.10.26			
(73)	Innehaver	Hunter-Fleming Ltd, Lamb House, Ludwell, SP79ND SHAFTESBURY, DORSET , GB			
(72)	Oppfinner	Ernst Wülfert, Avenue des Aubepines 52, 1180 BRUSSEL, BE			
		Ashley Ker Pringle, 7 Chine Avenue, Bitterne, Southampton, Hampshire SO19 7JF, England, GB			
		Lars Eric Sundstrom, Malt House, Kiln Lane, Old Alresford, Hampshire SO24 9DU, England, GB			
(74)	Fullmektig	Tandbergs Patentkontor AS, Postboks 1570 Vika, 0118 OSLO			
(54)	Benevnelse	Anvendelse av 7-hydroksyepiandrosteron for fremstilling av et medikament for beskyttelse mot akutt eller kronisk nevronskade			
(56)	Anførte publikasjoner	WO 9737664 A2			
(57)	Sammendrag	WO 9952532 A1			

7-hydroksyepiandrosteron kan anvendes for beskyttelse mot akutt eller kronisk nevronskade.

Foreliggende oppfinnelse gjelder anvendelse av 7-hydroksyepiandrosteron for fremstilling av et medikament for beskyttelse mot akutt eller kronisk nevronskade. Forbindelsene er derfor anvendbare for behandling og forebyggelse av tilstander, eller følger av tilstander, som Alzheimers sykdom, Parkinsons sykdom, kognitiv svekkelse uten dementia (CIND), slag, hjernetraume og skader på ryggmarg og perifere nerver og også anvendbare for å fremme den kognitive funksjon.

Dannelse av 7 α -hydroksylerte metabolitter av dehydroepiandrosteron (DHEA) *in vivo* er kjent siden 1959, med påvisning av 7 α -hydroksy-DHEA i urin [J. J. Schneider, M. L. Lewbart, Recent Progr. Horm. Res. 15 (1959) 201 – 230, L. Starka et al., Clin. Chim. Acta. 7 (1961) 309 – 316]. Siden da har omfattende 7 α -hydroksylering av 3 β -hydroksysteroids substrater (innbefattet DHEA og epiandrosteron – EPIA) blitt rapportert i vevspreparater fra mange humane organer, innbefattet voksen og føtal lever, testis, bitestikkel, hud, brystvev, prostata, adipøse stromaceller og tonsiller. Hydroksylering av DHEA i 7-posisjon har også blitt påvist i rottelever og i en rekke vev og organer fra mus. I alle disse undersøkelser var 7 α -hydroksy-DHEA absolutt den metabolitt det ble dannet mest av. Faktisk rapporterte Doostzadeh et al. [Steroids 63 (1998) 608 – 614] at hastigheten for dannelse av 7 α -hydroksy-DHEA i mikrosomer fra muselever var mer enn 15 ganger høyere enn hastigheten for dannelse av 7 β -hydroksy-DHEA.

EPIA, DHEA og pregnenolon har også blitt vist å overføres hurtig og omfattende til de tilsvarende 7 α -hydroksymetabolitter i rottehjerne [J. M. Guiraud et al., Steroids 34 (1979) 241 – 248, M. Warner et al., Endocrinology 124 (1989) 2699 – 2706, Y. Akwa et al., Biochem. J. 288 (1992) 959 – 964].

WO97/37664 beskriver anvendelse av visse spesifikke forbindelser, innbefattet 7 α -hydroksysubstituerte steroider, for behandling av nevropsykiatriske forstyrrelser, immunforstyrrelser og endokrine forstyrrelser. Blant forstyrrelsene, som det i WO97/37664 foreslås at disse forbindelsene kan anvendes for å behandle, omfattes Alzheimers sykdom. Den foreslåtte mekanisme for denne virkningen er imidlertid at det antas at forstyrrelsen skyldes mangel på det 7 α -hydroksysubstituerte steroid i hjernen, og behandlingen som foreslås i WO97/37664 retter således opp denne mangelen ved tilførsel av et 7 α -hydroksysubstituert steroid for å erstatte den manglende forbindelse. Fremgangsmåten som beskrives i WO97/37664 behandler således en foreliggende tilstand, snarere enn å forebygge tilstanden, eller forebygge en forverring av tilstanden, ved å forhindre ytterligere nevronskader. WO97/37664 beskriver følgelig ikke en nevrobeskyttende virkning. Patentskriftet foreslår heller ikke at forbindelsene kan anvendes for å forebygge skaden som oppstår ved plutselige og traumatiske begivenheter, for eksempel slag.

Oppfinnerne har nå overraskende oppdaget at 7-hydroksyepiandrosteron, både α , β eller blanding av disse, kan anvendes for å beskytte mot akutt og kronisk nevronskade

grunnet begivenheter som slag, hjernetraume og cerebral iskemi, for eksempel induisert ved subaraknoid blødning eller opptredende under hjerte-”bypass”-operasjoner osv.

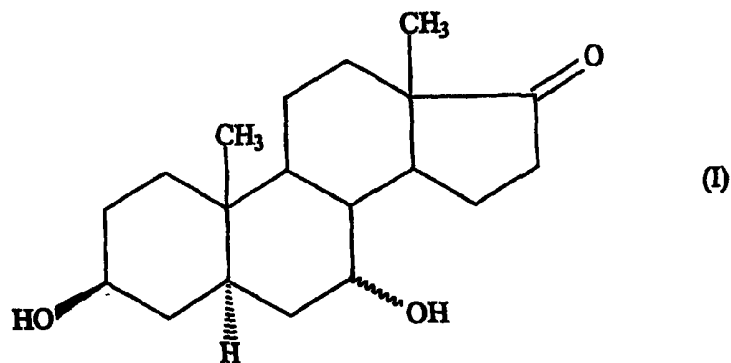
Under begivenheter som vedvarende hypoksi og iskemi, forbundet med hypoglykemi eller ikke, opptrer nevronskader i varierende grad.

5 Iskemi opptrer typisk under hjerteattakk, men skaden som opptrer i disse tilfeller er i det vesentlige begrenset til hjertevev, og visse behandlingsformer har blitt utviklet. Når det gjelder foreliggende oppfinnelse, er oppfinnerne opptatt av virkningene av iskemi over lengre tid på hjernen, for eksempel hos slagpasienter eller som en følge av hodeskader. Omfanget av iskemien avhenger av slaget eller skadens natur, men det vil uten unntak
10 forekomme hjerneskade, og det er denne som er av særlig interesse.

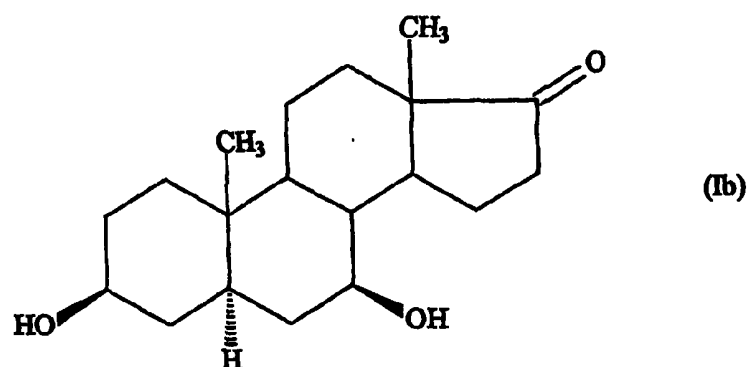
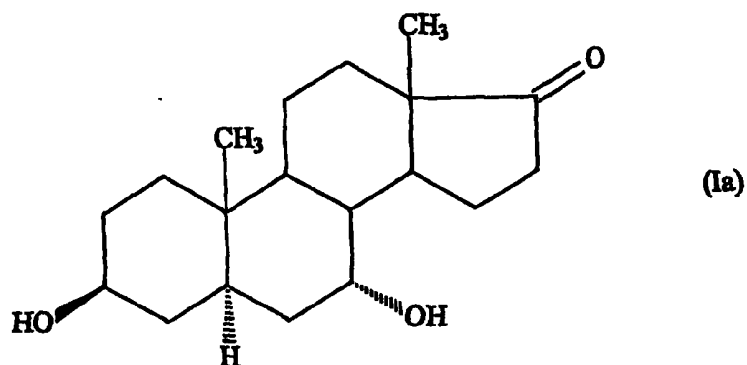
Disse nevrobeskyttende midler som er kjente innen faget, prøver å lindre problemet med hjerneskade, men alle midlene som til nå er kjent, er forbundet med uheldige bivirkninger. For eksempel er MK801 (dizocilpinmaleat) et temmelig enkelt molekyl som vites å gi et visst nivå av nevrobeskyttelse hos iskemiske pasienter. MK801 er imidlertid
15 også forbundet med ”alarmerende psykotropiske virkninger” (Martindale), så vel som uheldige motoriske virkninger. De nevrobeskyttende virkninger beskrives i detalj i Brain Research 755 (1997) 36 – 46 (Pringle, A. K., et al.) som inkorporeres heri ved referanse. De samme forfattere beskriver også de nevrobeskyttende virkninger av konotoksin i en tidligere artikkel, men trass i de nevrobeskyttende virkninger av denne forbindelse, observeres
20 uheldige bivirkninger *in vivo*.

Foreliggende oppfinnelse består således i anvendelse av 7-hydroksyepiandrosteron (7-hydroksy-EPIA) for fremstilling av et medikament for beskyttelse mot akutt eller kronisk nervecelleskade.

Denne forbindelsen kan representeres ved formel (I):



og 7α - og 7β -isomerene er henholdsvis:



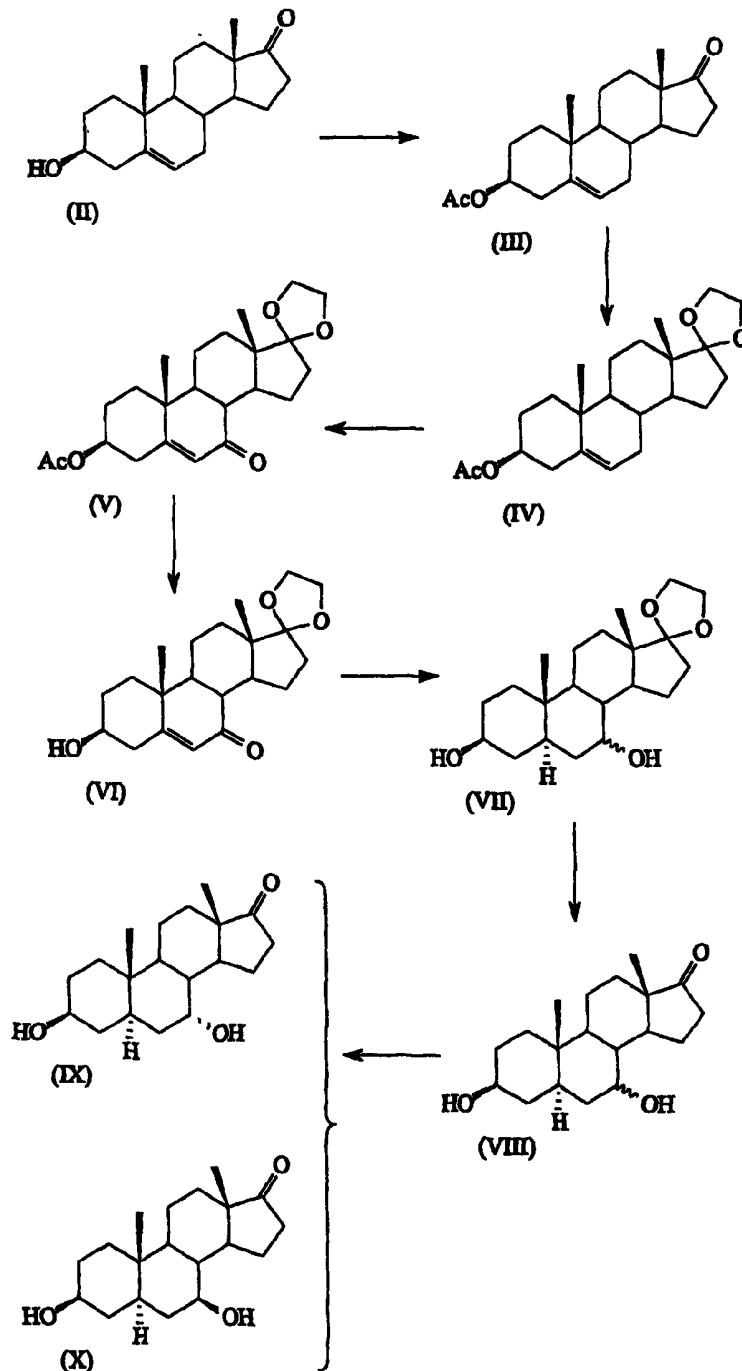
Også forløpere for disse forbindelser og forbindelser som *in vivo* metaboliseres slik
 25 at disse forbindelsene dannes, kan anvendes.

α - og β -isomerene kan anvendes hver for seg eller i blanding og kan, dersom de foreligger i en blanding, foreligge i hvilke som helst relative mengder. 7β -isomerene ser imidlertid ut til å ha høyere aktivitet og foretrekkes derfor for tiden.

Forbindelsene kan fremstilles ved en rekke fremgangsmåter som er velkjente i seg selv, med utgangspunkt i utgangsteroidene. De kan for eksempel fremstilles ved fremgangsmåtene som beskrives i litteraturen det vises til ovenfor, som vil gi en blanding av 7β -forbindelser og de tilsvarende 7α -forbindelser, som så kan separeres ved velkjente teknikker.

Som et eksempel kan 7α - og/eller 7β -hydroksy-EPIA erholdes fra DHEA ved allyloksidasjon etter beskyttelse av 3β -hydroksygruppen og 17-ketongruppen ved
 35 anvendelse av konvensjonelle fremgangsmåter. Produktet reduseres så med en egnet metallforbindelseskatalysator (slik som natriumhydrid), og 3β -hydroksygruppen og 17-ketongruppen avbeskyttes. 7α -hydroksy- og 7β -hydroksyepimerene kan så, om ønskelig, separeres ved konvensjonelle midler, for eksempel kolonnekromatografi, og 7α - og 7β -hydroksy-EPIA kan krystalliseres til renhet.

Alternativt kan 7α - og 7β -hydroksey-EPIA fremstilles som illustrert i det påfølgende reaksjonsskjema:



I dette reaksjonsskjema acetyleres DHEA (II) for dannelsen av det tilsvarende acetat med formel (III), som så får reagere med etylenglykol for dannelsen av ketalet med formel (IV). Ketalet (IV) oksideres så som beskrevet i eksempel 3 for dannelsen av den tilsvarende 7-ketoforbindelse (V), som så deacetyleres for dannelsen av forbindelsen med formel (VI).

- 5 Denne reduseres for dannelsen av 7-hydroksy-17-ketal-EPIA med formel (VII) som så behandles med en syre for fjerning av ketalgruppen og dannelsen av 7-hydroksy-EPIA, som til slutt separeres i 7 β - og 7 α -isomeren ved kromatografi for erholdelse av 7 α -hydroksy-EPIA (IX) og 7 β -hydroksy-EPIA (X).

- Forbindelsene kan tilføres til pasienter som antas å være i fare for et iskemisk angrep, fortrinnsvis et slag eller en hodeskade, eller dersom de antas å utvikle en kronisk nevrodegenerativ sykdom, for eksempel Alzheimers sykdom, eller CIND, noe som kan fremmes ved kronisk hjerneiskemi under terskelverdien, eller ved redusert energiproduksjon i nervecellene, noe som hyppig observeres i hjernen hos eldre. Slik profylaktisk tilførsel kan være uhyre nyttig. Det har imidlertid også blitt vist at forbindelsene har anvendbar aktivitet
- 15 også ved tilførsel etter en iskemisk hendelse, men det vil forstås at det foretrekkes å tilføre forbindelsene så snart som mulig for i størst mulig grad å unngå nevrond degenerering. Under noen omstendigheter kan det være ønskelig å tilføre gjentatte doser, særlig dersom pasienten forblir i fare for en iskemisk hendelse.

- Egnede tilførselsfremgangsmåter er generelt ved injeksjon, for å oppnå det ønskede resultat så hurtig som mulig. Således foretrekkes spesielt intravenøs injeksjon, men det kan i noen tilfeller foretrekkes å tilføre forbindelsen direkte inn i cerebrospinalvæsken.

- Dosen av forbindelsen vil variere avhengig av mange faktorer, innbefattet pasientens alder, kroppsvekt og generell helsetilstand, så vel som tilførselsmåte, tilførsels-
hyppighet og tilførselsvei. Imidlertid anbefales generelt en dose på mellom 0,01 og
- 25 50 mg/kg kroppsvekt, hvor en dose på mellom 0,05 og 20 mg/kg kroppsvekt foretrekkes ytterligere. Dette kan tilføres i en enkelt dose eller oppdelt på flere doser.

- Oppfinnelsen illustreres ytterligere ved de påfølgende eksempler, hvorav eksemplene 1 til 7 illustrerer fremstilling av forbindelsene og eksemplene 8 og 9 illustrerer deres aktivitet. I eksemplene 1 til 7 viser romertallene til formlene i reaksjonsskjemaene vist
- 30 ovenfor.

Eksempel 1

DHEA-3-acetat (III)

- 35 En løsning av 50 ml pyridin og 50 ml eddiksyreanhydrid tilsatt 10 g DHEA (II) (34,72 mmol) ble oppvarmet til reflux i 4 timer. Reaksjonsløsningen ble avkjølt, uthelt i vann og ekstrahert med etylacetat. Den organiske fase ble tørket over vannfritt natriumsulfat og inndampet til tørrhet. Det ble erholdt 11,0 g DHEA-3-acetat (III) (33,33 mmol, 96 %), som ble rekrystallisert fra etanol.

Eksempel 2**17-ketal-DHEA-3-acetat (IV)**

En løsning av 100 ml toluen tilsatt 5 g DHEA-3-acetat (III) (15,15 mmol), 5 ml
 5 etylenglykol og en katalytisk mengde p-toluensulfonsyre ble oppvarmet til reflux under
 dampdestillering ved anvendelse av et Dean-Stark-apparat i 24 timer. Reaksjonsløsningen
 ble uthelt i 100 ml 10 % (vekt/vol) vandig kaliumkarbonatløsning. Den organiske fase ble
 dekantert. Vannfasen ble ekstrahert med etylacetat. De organiske faser ble slått sammen og
 inndampet til tørrhet. Det ble erholdt 5,10 g 17-ketal-3-DHEA-acetat (IV) (13,64 mmol,
 10 90 %) som ble rekrystallisert fra etanol.

Eksempel 3**7-keto-17-ketal-DHEA-3-acetat (V)**

15 En løsning av 70 ml pyridin tilsatt 5 g 17-ketal-DHEA-3-acetat (IV) (13,37 mmol)
 og en katalytisk mengde bengalrosa ble bestrålt med en kvikksølvdamplampe med middels
 trykk ved gjennombobling med oksygen. En katalytisk mengde kopperacetat ble tilsatt til
 reaksjonsblandingen etter 24 timer. Etter 24 timer ble reaksjonsløsningen inndampet til
 tørrhet. Restmaterialet ble renset ved "flash"-kromatografi (SiO₂/etylacetat : sykloheksan
 20 3/7). 3,11 g 7-keto-17-ketal-DHEA-3-acetat (V) (8,02 mmol, 60 %) ble erholdt.

Eksempel 4**7-keto-17-ketal-DHEA (VI)**

25 En løsning av 50 ml metanol tilsatt 1 % kaliumhydroksid og 1 g 7-keto-17-ketal-
 DHEA-3-acetat (V) (2,58 mmol) ble oppvarmet til reflux i 2 timer. Reaksjonsblandingen
 ble så avkjølt og nøytralisert, og så ekstrahert med etylacetat. Den organiske fase ble tørket
 over vannfritt natriumsulfat og så inndampet til tørrhet. Det ble erholdt 802 mg 7-keto-17-
 ketal-DHEA 5 (2,32 mmol, 90 %) som ble rekrystallisert fra metanol.

30

Eksempel 5**7-hydroksy-17-ketal-EPIA (VII)**

10 g 7-keto-17-ketal-DHEA (VI) (28,90 mmol) ble tilsatt til en flytende
 35 ammoniakkløsning ved – 33 °C tilsatt 2,65 g natrium. Etter 4 timer ble ammoniumklorid
 tilsatt inntil blåfargen forsvant. 2,65 g natrium ble så tilsatt. Etter 4 timer ble ammonium-
 klorid igjen tilsatt inntil blåfargen forsvant. Vann ble tilsatt og ammoniakken avdampet.
 Reaksjonsblandingen ble ekstrahert med etylacetat. Den organiske fase ble tørket over

vannfritt natriumsulfat og så inndampet til tørrhet. 6,07 g 7-hydroksy-17-ketal-EPIA (VII) (17,34 mmol, 60 %) ble erholdt.

Eksempel 6

5

7-hydroksy-EPIA (VIII)

En løsning av 100 ml aceton tilsatt 5 ml vann, 10 g 7-hydroksy-17-ketal-EPIA (VIII) (28,57 mmol, 50 %) og en katalytisk mengde p-toluensulfonsyre ble oppvarmet til reflux i 4 timer. Reaksjonsblandingen ble avkjølt, uthelt i 100 ml 10 % (vekt/vol) vandig
 10 natriumkarbonatløsning og så ekstrahert med etylacetat. Den organiske fase ble tørket over vannfritt natriumsulfat og så inndampet til tørrhet. Restmaterialet ble renset ved "flash"-kromatografi (SiO₂/etylacetat). 5,24 g 7-hydroksy-EPIA (VIII) (17,14 mmol, 60 %) ble erholdt.

Eksempel 7

7 α -hydroksy-EPIA (IX) & 7 β -hydroksy-EPIA (X)

7-hydroksy-EPIA (VIII) (5 g) tilsatt 7 α - og 7 β -epimer i forholdet 65/35 ble renset ved "flash"-kromatografi (Al₂O₃/CHCl₃). 7 β -hydroksy-EPIA (X) (2,5 g) ble erholdt først,
 20 foran 7 α -hydroksy-EPIA (IX) (1,34 g). 7 β -hydroksy-EPIA (X) og 7 α -hydroksy-EPIA (IX) ble rekrySTALLISERT fra etylacetat.

Eksempel 8

25 Fremgangsmåte for undersøkelse av hypoksisk nevronskade

Organotypiske snittkulturer fra hippocampus ble fremstilt ved anvendelse av fremgangsmåten til Pringle et al. (1996, 1997), modifisert som følger:

Wistar-rotteunger (8 – 11 dager gamle) ble dekapitert, og hippocampus ble hurtig dissekert ut i iskald Geys balanserte saltløsning tilsatt 4,5 mg/ml glukose. Snitt ble fremstilt
 30 og utsådd i Millicell CM dyrkningsholdere (4 pr brønn) og inkubert ved 37 °C/ 5 % CO₂ i 14 dager. Vedlikeholdsmediet besto av 25 % varmeinaktivert hesteserum, 25 % Hanks balanserte saltløsning (HBSS) og 50 % minimalt essensielt medium med Earls salter (MEM) tilsatt 1 mM glutamin og 4,5 mg/ml glukose. Mediet ble byttet hver 3 – 4 dag.

Eksperimentell hypoksi ble utført som beskrevet tidligere (Pringle et al. 1996,
 35 1997). Kort beskrevet ble kulturene overført til serumfritt medium (SFM – 75 % MEM, 25 % HBSS tilsatt 1 mM glutamin og 4,5 mg/ml glukose) tilsatt 5 μ g/ml av det fluorescerende eksklusjonsfargestoff propidiumjodid (PI). Kulturene ble ekvilibert i SFM i 60 minutter før billeddannelsen. PI-fluorescens ble påvist ved anvendelse av et invertert Leica-mikroskop utstyrt med et rhodaminfiltersett. Kulturer hvori PI-fluorescens ble påvist i dette

stadium ble ikke undersøkt videre. Hypoksi ble induisert ved å overføre kulturer til SFM (+PI) som på forhånd var mettet med 95 % N₂/5 % CO₂. Dyrkningsskåler (uten lokk) ble så forsegle i et lufttett kammer hvori atmosfæren var mettet med 95 % N₂/5 % CO₂ ved kontinuerlig gjennomblåsing av gass ved 10 l/min i 10 minutter før forseglingen, og plassert i inkubatoren i 170 minutter (den totale hypoksitid var derfor 180 minutter). Etter dette tidsrom med hypoksi ble kulturene overført til SFM tilsatt PI med normalt oksygeninnhold og plassert i inkubatoren i 24 timer.

Nevronskaden ble målt som beskrevet tidligere (Pringle et al., 1996, 1997) ved anvendelse av enten NIH Image 1,60 og en Apple IIsi-datamaskin eller OpenLab 2,1 (Improvision) og en Macintosh G4/400. Bilder ble innfanget ved anvendelse av et monokromt kamera og lagret i et optisk platelager for senere analyse. Lystransmisjonsbilder ble innfanget før tilsetning av medikamenter, og PI-fluorescensbilder ble lagret etter gjenvinningstiden på 24 timer etter hypoksien. Arealet av CA1-cellelaget ble bestemt ut fra transmisjonsbildet. PI-fluorescensarealet i CA1 ble målt ved anvendelse av tetthetsnittfunksjonen i NIH Image eller OpenLab, og nevronskaden uttrykt som prosentandelen av CA1 hvori PI-fluorescens ble påvist over bakgrunnsnivå.

Steroide forbindelser ble fremstilt ved å lage en 1 mg/ml løsning i etanol og videre fortynning med SFM. Forbindelsene ble tilsatt kulturene 45 minutter før hypoksibehandlingen, under den hypoksiske periode og under gjenvinningstiden etter hypoksien. Kontroll-eksperimentene besto av kulturer som kun ble behandlet med bærerstoff.

Resultater

Eksperiment 1:

Et innledende eksperiment ble utført for å fastslå hvorvidt 7 α OH-EPIA og 7 β OH-EPIA var nevrobekyttende ved en høy konsentrasjon på 100 nM. Hypoksien ga en skade i 25,5 $\pm$ 6,4 % av CA1. Denne skaden ble i signifikant grad redusert ved nærvær av både 7 α OH-EPIA og 7 β OH-EPIA før, under og etter hypoksien, som vist i tabell I nedenfor.

Tabell 1

Forbindelser	N	% skade i CA1
Kontrollhypoksi	17	25,5 $\pm$ 6,4
Hypoksi + 100 nM 7 α OH-EPIA	16	4,0 $\pm$ 2,9**
Hypoksi + 100 nM 7 β OH-EPIA	16	9,0 $\pm$ 4,7*

Eksperiment 2:

Etter å ha fastslått at både α - og β -isomeren av 7OH-EPIA var nevrobekyttende, anslo vi konsentrasjonsavhengigheten av denne virkingen. Kontrollhypoksi førte til en nevronskade på 31,9 $\pm$ 4,7 % i CA1. 7 α OH-EPIA var signifikant beskyttende ved 100 nM.

En liten, men ikke statistisk signifikant, reduksjon av nevronskaden ble observert ved 10 nM, og det var ingen virkning ved 1 nM. I motsetning til dette var 7 β OH-EPIA signifikant nevroseskyttende ved 10 nM og 100 nM, men aktiviteten forsvant dersom konsentrasjonen ble redusert til 1 nM (Se tabell 2).

5

Tabell 2

Forbindelse	N	% skade i CA1
Kontrollhypoksi	29	31,9 $\pm$ 4,7
Hypoksi + 1 nM 7 α OH-EPIA	14	28,8 $\pm$ 5,8
Hypoksi + 10 nM 7 α OH-EPIA	15	21,9 $\pm$ 8,1
Hypoksi + 100 nM 7 α OH-EPIA	16	11,8 $\pm$ 2,8**
Hypoksi + 1 nM 7 β OH-EPIA	15	20,6 $\pm$ 7,2
Hypoksi + 10 nM 7 β OH-EPIA	12	11,9 $\pm$ 4,7*
Hypoksi + 100 nM 7 β OH-EPIA	13	14,3 $\pm$ 5,0*

Eksempel 9

10

Global cerebral iskemi hos rotter (okklusjon av 4 kar)

Cerebral iskemi ble indusert ved okklusjon av 4 kar (4VO) hos Wistar-hannrotter (250 – 280 g). Begge vertebralarterier ble okkludert ved elektrokauterisering under bedøvelse med pentobarbital (60 mg/kg intraperitonealt). Dyrene fikk gjenvinne seg i 24 timer med fri tilgang på vann, men uten fôr. Neste dag ble halsarteriene eksponert under bedøvelse med 2 % halotan i 30 % oksygen/70 % dinitrogenoksid og okkludert i 10 minutter ved anvendelse av mikrovaskulære klyper. Deretter ble de to klypene fjernet, og begge arterier ble inspisert for umiddelbar reperfusjon. Under operasjonen, og i de påfølgende 3 timer, ble normal temperatur (37,5 $\pm$ 0,5 °C) opprettholdt hos dyrene ved anvendelse av et termostatkontrollert varmeteppe koblet til et rektalt termometer. Som kontroll ble begge vertebralarteriene kauterisert hos narreopererte dyr under pentobarbital-bedøvelse, og de to halsarteriene ble eksponert, men ikke sammenkløpet, under bedøvelse med 2 % halotan i 30 % oksygen/70 % dinitrogenoksid neste dag. Såret ble behandlet med lidokaingel og så gjensydd. Dyrene ble holdt under en varmelampe ved en temperatur på 30 °C i omgivelsene inntil de ble bevisste.

25

Syv grupper av dyr ble undersøkt:

1. (n = 8) steroidforbindelse: 7 β -OH-EPIA (0,1 mg/kg intravenøst via halevenen, tre injeksjoner: 15 minutter før induisert iskemi, under iskemien og 5 minutter etter reperfusjon),
- 5 2. (n = 8) steroidforbindelse: 7 β -OH-EPIA (0,3 mg/kg intravenøst, tre injeksjoner som beskrevet i 1.),
3. (n = 8) steroidforbindelse: 7 β -OH-EPIA (1 mg/kg intravenøst, tre injeksjoner som beskrevet i 1.),
- 10 4. (n = 8) NBQX (dinatriumsaltet, siden dette er mer vannløselig) som referanseforbindelse og positiv kontroll (TOCRIS, Tyskland, 30 mg/kg intraperitonealt, tre injeksjoner som beskrevet i 1.),
5. (n = 8) ble tilført bærerstoff (0,9 % NaCl tilsatt 100 μ l etanol), tre injeksjoner som beskrevet i 1.)
6. (n = 8) kun iskemi,
- 15 7. (n = 8) narreopererte kontrolldyr.

NBQX er 2,3-dihydroksy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo(F)kinoksalin og vites å ha nevrobeskyttende aktivitet. [Gill, R. Nordholm, L., Lodge D.: The neuroprotective action of 2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo(F)quinoxaline (NBQX) in a rat focal ischaemia
20 model. Brain Res. 580, 35 – 43, 1992].

7 β -OH-EPIA er 7 β -hydroksyepiandrosteron, en forbindelse ifølge foreliggende oppfinnelse.

Forbindelsene ble løst i 100 μ l etanol og så fortynnet med 0,9 % NaCl.

Etter en overlevelsestid på 7 dager etter iskemien ble alle dyr perfusjonsfiksert
25 transkardialt med 4 % paraformaldehyd. Hjernen ble forsiktig fjernet og postfiksert i samme fikseringsmiddel i 2 timer. Etter kryobeskyttelse i 30 % sukrose ble hjernen hurtig nedfrosset i isopentan og lagret ved – 80 °C. Kryostatsnitt på 20 mikrometer, som omfattet hippocampusstrukturen, var Nissl-farget med toluidin blue eller Neuro Trace-fluorescens.

30 Analyse av måleverdiene:

Omfanget av nevronskade i hippocampusområdet CA1 etter iskemien ble evaluert ut fra antall overlevende nevroner ved anvendelse av Nissl-farging. Det gjennomsnittlige antall morfologisk intakte nevroner pr 400 μ m lengde ble beregnet i CA1-området for hver gruppe. Celletellingen ble utført i 3 – 5 seriesnitt pr dyr og 6 ganger 400 μ m CA1-område pr
35 snitt ved anvendelse av et lysmikroskop utstyrt med 20x objektiv. Resultatene ble analysert statistisk ved paret Students t-test. Resultatene ble angitt som middelverdi $\pm$ standard målefeil.

Resultater og diskusjon

Resultatene vises i figurene 1A til 1C av de vedlagte figurer.

Morfologisk intakte nevroner i hippocampus CA1 ble kjennetegnet ved Nissl-farging (toluidinblått og Neuro Trace) ut fra følgende kriterier: tydelig form av en nevronal perikarya, stor kjerne med positivt farget nukleolus, en liten cytoplasmatiske sone rundt kjernen med positiv nissl-farging, som viser det intakte rough endoplasmatiske retikulum med ribosomer og derfor et intakt proteinsyntesemaskineri.

10 minutter med global iskemi (mild iskemi) og en overlevelsestid på 7 dager fører til nevrodegenerering av pyramideceller selektivt i hippocampus CA1-området (fig. 1A-1C).

Gjennomsnittlig antall pyramideceller i CA1 hos narreopererte dyr var $121,5 \pm 4,3$ (satt til 100 %). Følgelig døde 60 % av CA1-nevronene etter 10 minutter med global iskemi (fig. 1B). Antall nevroner hos dyregruppen med iskemi og intravenøs injeksjon av bærerstoff (NaCl plus 100 μ l etanol), tilført som beskrevet i eksperimentet, tilsvarte antallet hos gruppen med iskemi alene (fig. 1A, 1B). NBQX (30 mg/kg intravenøst, tre injeksjoner som beskrevet i eksperimentet) viste signifikant ($p = 0,03$) nevrobeskyttelse av CA1-pyramideceller, sammenlignet med iskemigruppen. Sammenlignet med iskemi alene fører NBQX til 47,5 % nevrobeskyttelse, mens den beskyttende virkning var 68,5 % sammenlignet med de narreopererte dyr. Nevrobeskyttelsen oppnådd med NBQX var i samsvar med Gill et al., 1992 og Gill, 1994, noe som viste gyldigheten av den globale iskemimodell oppfinnerne anvendte i sine eksperimenter. 7 β -OH-EPIA fører til en konsentrasjonsavhengig nevrobeskyttelse av pyramideceller i hippocampus CA1 etter 10 minutter med global iskemi og en overlevelsestid på 7 dager (fig. 1A). T-testanalyse viste en svært signifikant nevrobeskyttende virkning av 7 β -OH-EPIA i konsentrasjoner på 0,1 mg/kg ($p = 0,01$) og 0,3 mg/kg ($p = 0,0008$). Sammenlignet med den narreopererte gruppe, viste 7 β -OH-EPIA en nevrobeskyttende virkning på 74,8 % (0,1 mg/kg) og 83,9 % (0,3 mg/kg) på CA1-pyramideceller (fig. 1C). 7 β -OH-EPIA i en konsentrasjon på 1,0 mg/kg viste kun en tendens til nevrobeskyttelse, men virkningen var ikke signifikant.

I eksperimentene med 7 β -OH-EPIA injisert intravenøst, før, under og etter iskemien observerte vi aldri atferdsmessige unormaliteter hos dyrene.

Figurtekst:

Antall morfologisk intakte pyramideceller i hippocampus CA1 hos rotter 7 dager etter global cerebral iskemi og under påvirkning av forskjellige forbindelser.

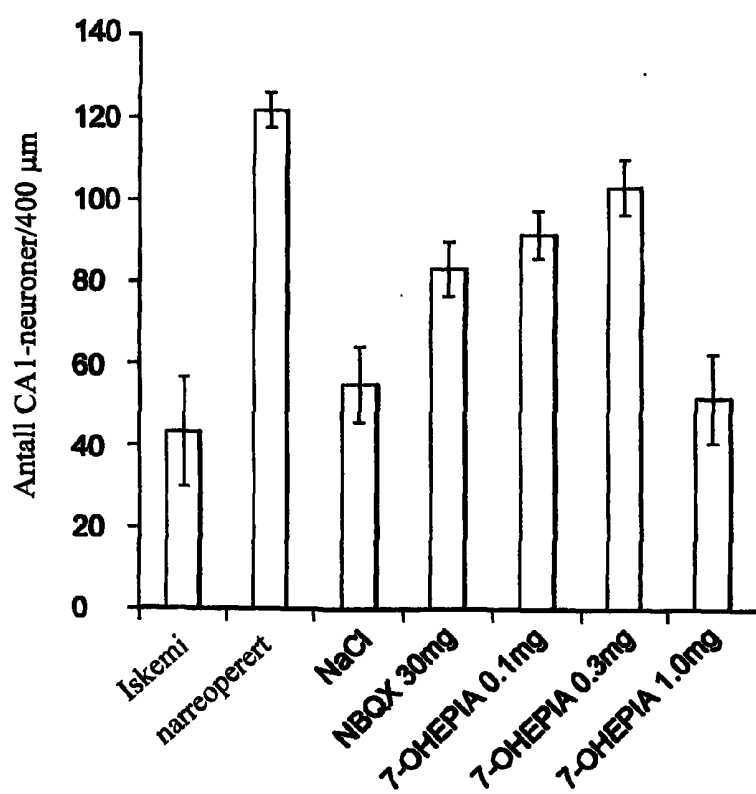
Resultatene ble angitt som gjennomsnittsansall intakte nevroner $\pm$ SEM pr 400 μ m lengde av CA1-området.

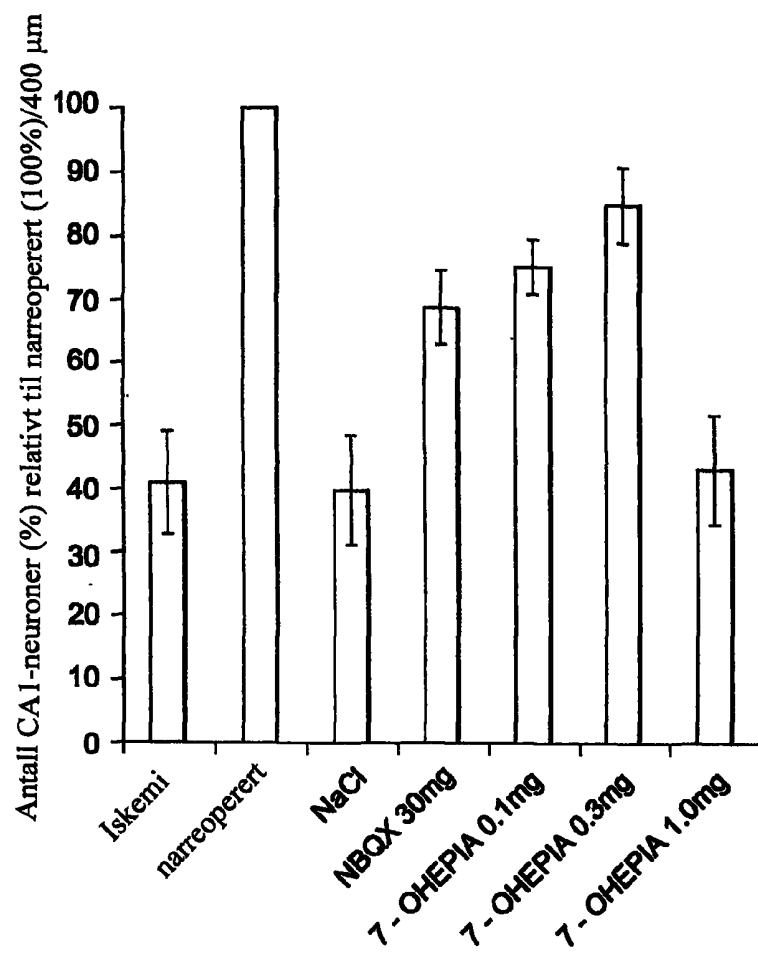
Resultatene ble uttrykt som prosentantall intakte nevroner pr 400 μ m lengde av CA1-området, sammenlignet med narreopererte dyr satt til 100 %.

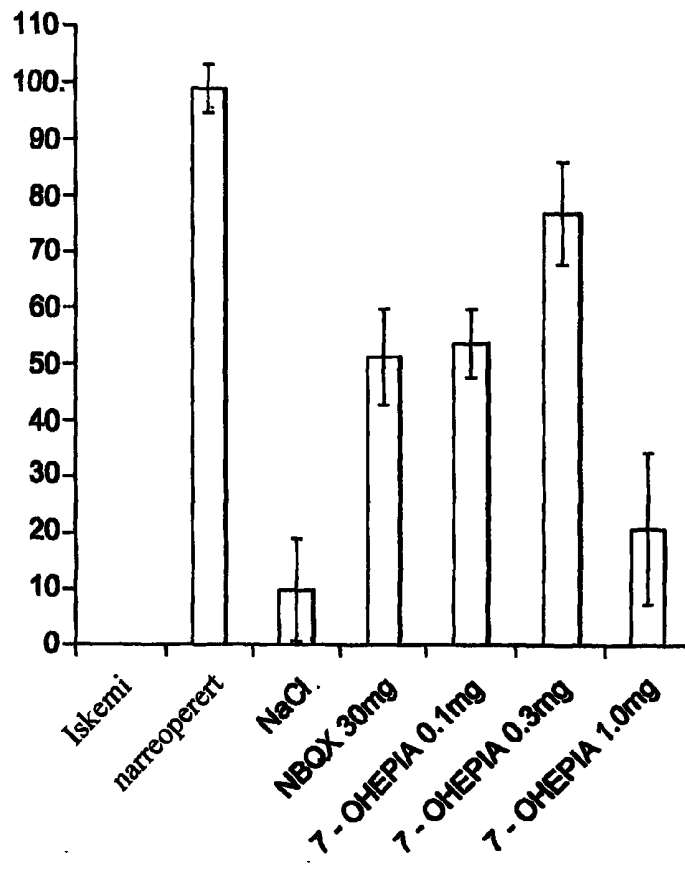
Resultatene ble angitt som absolutt prosent nevrobeskyttelse hvor antall overlevende nevroner i iskemi-gruppen ble satt til null og antall overlevende nevroner i den narreopererte gruppe til 100 %.

P a t e n t k r a v

- 5 1. Anvendelse av 7-hydroksyepiandrosteron for fremstilling av et medikament for beskyttelse mot akutt eller kronisk nevronskade.
2. Anvendelse ifølge krav 1, hvori 7-hydroksyepiandrosteronet er 7 α -hydroksyepiandrosteron.
- 10 3. Anvendelse ifølge krav 1, hvori 7-hydroksyepiandrosteronet er 7 β -hydroksyepiandrosteron.
4. Anvendelse ifølge krav 1, hvori 7-hydroksyepiandrosteronet er en blanding av
15 7 α -hydroksyepiandrosteron og 7 β -hydroksyepiandrosteron.
5. Anvendelse ifølge ethvert av de foregående krav, hvori nevronskaden skyldes slag eller hjernetraume.
- 20 6. Anvendelse ifølge ethvert av de foregående krav, hvori nevronskaden skyldes Alzheimers sykdom, Parkinsons sykdom, kognitiv svekkelse uten dementia eller skader på ryggmarg eller perifere nerver.

**Fig. 1A**

**Fig. 1B**

**Fig. 1C**