

901 5058

22

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY



12

Kivonat

Perifériás benzodiazepin receptorhoz kötődő anyag alkalmazása után stressz kezelésére

A találmány speciálisan a perifériás benzodiazepin receptorhoz (PBR) kötődő anyagok után stressz megelőzésére vagy kezelésére használható készítmény előállítására való alkalmazására, ilyen anyagok előállítására alkalmas törzsekre és ilyen anyagokat tartalmazó kozmetikai és bőrgyógyászati készítményekre vonatkozik.

5

701 5058

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY



A2

Perifériás benzodiazepin receptorhoz kötődő anyag alkalmazása után stressz kezelésére

Bejelentő: SANOFI-SYNTHELABO
174, avenue de France
F-75013 Paris
France

Feltalálók: CASELLAS, Pierre, F-34090 Montpellier (FR)
DEROCQ, Jean-Marie, F-34570 Murviel Les Montpellier (FR)

Unió elsőbbség: 1998. november 17. (1998.11.17.)
98/14387 (FR)

Nemzetközi bejelentés: PCT/FR99/02761 (1999.11.10.)
közzététel: WO/00/28947 (2000.05.25.)

Képviselő: Mármárosi Tamásné
CHINOIN Gyógyszer és Vegyészeti Termékek Gyára Rt., Budapest
(a Szabadalmi Ügyvivői törvény 12 § (1) bekezdése alapján)

SSY-18/MK



A jelen találmány tárgya a perifériás benzodiazepin receptorok ligandumát tartalmazó topikális készítmény.

A találmány további tárgya speciálisan a perifériás benzodiazepin receptorhoz (PBR) kötődő anyagok alkalmazása után stressz megelőzésére vagy kezelésére használható készítmény előállítására.

A találmány ilyen anyagokat tartalmazó készítményekre is vonatkozik. Ezek a készítmények kozmetikai vagy gyógyászati készítmények, és különösen topikális bőrgyógyászati készítmények lehetnek.

A "után stressz" azokat a különböző helyzeteket jelenti, amelyek különösen az epidermisz károsodását okozhatják, tekintet nélkül a károsodást okozó szerre. Ez a szer lehet a testen belül és/vagy kívül, például egy gyógyszer vagy egy szabad-gyökös szer vagy más esetben külső szer, például ultraibolya sugárzás.

A találmány szerinti készítmény így a bőr-irritáció, száraz foltok, bőrpírosság, tapintási túlérzékenység, hőérzet, a bőr és/vagy nyálkahártya viszketésének és az öregedésnek a megelőzésére és leküzdésére szolgál, és bőrrendellenességek, például pszoriázis, prurigót okozó betegségek, herpesz, fotodermatitisz, atópiás dermatitisz, kontakt dermatitisz, sömörök, prurigó, viszketés, rovarcsípés esetében, fibrózisban és a kollagén öregedés más rendellenességeiben, immunológiai rendellenességekben vagy bőrgyógyászati állapotokban, például ekcéma esetében is használható.

A PBR ligandum, amelyre "anyagként" is utalunk, és amelyet a készítmény tartalmaz, nem-peptid vegyület, peptid vegyület, állati vagy növényi eredetű sejtkivonat vagy szövetkivonat vagy mikroorganizmus, például baktérium vagy gomba fermentálásával kapott termék lehet.

Az irodalomban már számos PBR ligandumot leírtak. Ezekre példaként az Ro 5-4864 jelű vegyületet vagy klórdiazepamot, az Ro 5-2807 jelű vegyületet vagy diazepamot és a PK 11195 jelű vegyületet említhetjük, vagy a "Peripheral



Benzodiazepine Receptors" (Perifériás benzodiazepin receptorok) című cikkre utalhunk (Ch. III, J. U. Bourguignon, Ed. E. Giesen - Crouse, Academic Press).

A PBR egy 18-kD nagyságú fehérje, amely a perifériás szövetek mitokondriumának külső membránján helyezkedik el. Öt transzmembrán doménből és egy karboxi-terminális részből áll, amely a citoszol felé irányul. Több funkciót tulajdonítanak a PBR-nek a szóban forgó szövet természetétől függően, ezek a következők: a szteroidgenézisnek, a hem bioszintézisének, a sejt differenciálódásának és növekedésének a szabályozása, valamint a mito-kondriális légzés ellenőrzése (Krueger K. E., *Biochimica and Biophysica Acta* 1995, *1241*, 453-470). Noha a pontos funkcióját még teljesen nem derítették fel, több újabb kísérleti adat azt feltételezi, hogy a PBR alapvető szerepet játszhat a programozott sejtelhalás folyamatainak szabályozásában és a szabad gyökök elleni védelemben.

Kimutatták, hogy a PBR valójában szoros kapcsolatban áll a mitokondriális szinten az apoptozist szabályozó fehérjékkel, így a Bcl2-vel, amely megakadályozza a mitokondriális membrán potenciál meg bomlását, és így megakadályozza különösen a reakcióképes oxigénezett gyökök termelése által indukált apoptozist (Marchetti P. et al., *J. Exp. Med.* 1996, *184*, 1155-1160; Marchetti P. et al., *J. Immunol.* 1996, *157*, 4830-4836).

A jelen találmánnyal összefüggésben a PBR szabad gyökökkel szembeni védő szerepét közvetlenül hematopoietikus eredetű sejteken figyelték meg, amelyek esetében szoros kapcsolatot mutattak ki a PBR sűrűsége és a szabad gyökökkel szembeni védelem között. Emellett, ugyanezen vizsgálat során, azt is megállapították, hogy a PBR olyan sejtekbe történő transzfektálása, amelyekben ilyen receptor nincs, védelmet nyújt az oxigénezett anyagok által okozott károsodással szemben (Carayon P. et al., *Blood* 1996, *87*, 3170-3178).



Néhány irodalmi adat arra utal, hogy a PBR fontos szerepet játszhat az apoptózis-folyamatok szabályozásában és a szabad gyökök által okozott károsodással szembeni védelemben.

Újabb filogén vizsgálatok megerősítik ezt az új elképzelést, hogy a PBR apoptózis-modulátorként vesz részt az anti-oxidáns funkciókban. Ennek az oka, hogy jelentős a hasonlóság a PBR és a *Rhodobacter sphaeroides*, egy fotoszintetikus baktérium CrtK fehérjeje között. Ez a bakteriális fehérje, amely fotoszenzitív oxigén-detektorként működik, szabályozza a fotoszintézisben résztvevő gének kifejeződését válaszként a környezetben az oxigén nyomásában és a fény intenzitásában bekövetkező változásokra. A PBR és a CrtK összehasonlítása 35% azonosságot mutat és egy szekvencia-konzerválást ezen két fehérje között, amelyek a törzsfajlás során két billió évvel ezelőtt váltak szét. Ez a homológia egy nagyon specializált és konzervált PBR-működést feltételez, amely hasonlóan mutatkozik a baktériumban a CrtK működéséhez. Egész pontosan nemrég kimutatták, hogy az emlős PBR-nek *Rhodobacter* CrtK mutánsokba való transzfektálása kioltja a CrTK oxigén-detektáló funkcióját. Ily módon ez a vizsgálat feltételezi, hogy a PBR kulcsszerepet játszik az oxigén-függő szignálok transzdukciójában (Yliseev A. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 1997, 94, 5101-5106).

Mindeddig azonban nem volt olyan anyag, amelyet pontosan javallottak volna a kután PBR receptorok specifikus ligandumaként, és leginkább ez az oka annak, hogy miért nem írtak le az irodalomban olyan topikálisan hatásos anyagot, amely specifikusan a PBR receptorokhoz kötődik.

Az előzőekben tehát megmutattuk, a jelen találmánnyal összefüggésben, hogy a PBR bőségesen kifejeződik a bőrt alkotó különféle sejtekben, a keratinocitákban, a Langerhans sejtekben, a szőrtüszőkben és a bőr érrendszerének endoteliális sejteiben. A bőrben a PBR kifejeződése a bazális rétegtől a szarurétegig növekvő gradienst követ. Ez a figyelemreméltó szerveződés, amely az epidermisz differenciált sejteinek kedvez, amely sejtek a leginkább ki vannak téve a külső stresszhatásoknak, az epidermisz le g-



sebezhetőbb területeinek védelme szempontjából kétségtelenül elsőrendű fiziológiai fontosságú. A szubcelluláris vizsgálatok, amelyeket konfokális mikroszkóppal végeztek, a várakozásnak megfelelően a mitokondriumban a PBR-nek a Bcl2-vel való kolokalizációját mutatták. A bőrmetszeteken végzett hisztológiai vizsgálatok a PBR meglepő eloszlását derítették fel (1. és 2. ábra).

Ennek a receptornak a kifejeződése az epidermiszben a bazális rétegtől a keratinociták által alkotott legdifferenciáltabb rétegig növekvő sűrűségi gradienst követ. Ez a nagyon szervezett térbeli eloszlás, amely a sűrűség tekintetében az epidermisz legkülső és így a leginkább exponált sejtjeinek kedvez, ahhoz a feltételezéshez vezet, hogy a PBR a bőrben egy természetes védelmi rendszert képviselhet az ultraibolya sugárzás hatására generálódott szabad gyökökkel szemben. Az a kísérő megfigyelés, hogy a Bcl2 anti-apoptózisos fehérje egy szigorúan fordított gradienst követ, azt feltételezi, hogy a PBR kompenzáló szerepet játszik a leginkább differenciált sejtek megővésében.

Ezek az adatok, amelyek a PBR védő szerepét feltételezik, különösen az epidermiszben, olyan természetes vagy szintetikus ligandumok felfedezéséhez vezettek, amelyeknek a PBR-rel való kölcsönhatása jótékony lehet a vegyszerek vagy szabad gyökös szerek vagy más esetben az UV fény hatását követő kután stressz különböző helyzeteiben.

A fentieknek megfelelően tehát a találmány a PBR-re specifikus ligandum, a Ro 5-4864 alkalmazására vonatkozik kután stresszben. Ez a ligandum PBR agonista.

A találmány egy másik vonatkozásának megfelelően és ezen megfigyelések alapján természetes PBR ligandumok felderítése érdekében szűrést végeztünk, ami lehetővé tette ezzel a receptorral kölcsönhatásba lépni képes néhány frakció elkülönítését. Ezeknek a természetes ligandumoknak a potenciális védőhatását azután különböző olyan tesztekben, amelyek kután stresszt indukálnak, és különösen UV sugárzás által



okozott kútán-bőрпиrosság tesztekben értékeltük. A gyökbefogó tulajdonságokat és a bőr-reparáló képességeket szintén vizsgáltuk.

Biokémiai és farmakológiai tesztekkel mutattuk ki az anyagok aktivitását és előnyét a kútán stressz különféle helyzeteiben.

A PBR-rel végzett tesztek célja annak kimutatása volt, hogy a PBR potenciálisan részt vesz az apoptózis folyamatok szabályozásában és a bőrsejtek megőrzésében a különféle káros stressz helyzetekkel szemben.

1. példa

A PBR kútán lokalizációjának immunhisztológiai vizsgálatai

Egy Western-féle átitatásos (blot) analízis tette lehetővé a PBR nagy mennyiségben való jelenlétének kimutatását humán keratinociták hat különböző sejtvonalán és normális humán bőrön (1. ábra), amihez specifikus anti-PBR antitesteket, Ac 8D7-et (anti-PBR egér mAb, izotípus IgG1, Dussossoy et al., Cytometry, 1996, 24:39-48) használtunk. Szubcelluláris szinten az analíziseket konfokális mikroszkóp segítségével végeztük, amelyek bizonyították a PBR kolokalizációját a mitokondriális szinten a keratinocitákban (2. ábra).

Egy immunhisztológiai vizsgálat, amelyet egy normális humán epidermális met-szeten ugyanazon antitest alkalmazásával végeztünk, nagyon különös szerveződést mutatott, mivel a PBR kifejeződése a "*stratum basale*"-tól a "*stratum corneum*"-ig nő. Ez a receptor tehát nagy mennyiségben van jelen a keratinocitákon, amelyek a legdifferenciáltabbak, és közvetlenül a *stratum corneum* alatt helyezkednek el (3. ábra).

2. példa

Kötődési és fajlagossági vizsgálatok

A kötődési vizsgálatokat az A-431 (humán epidermoid karcinóma, ATCC, CRL-1555) keratinocita vonalon végeztük a [³H]-PK11195 referencia-ligandum helyettesítésével. A Scatchard-analízis egyetlen kötőhelyet mutat, amelynek a sűrűsége kb. 470 000 receptor per sejt, és amelynek nagy a ligandum-affinitása (KD = 1,5 nM)



(4. ábra). A keratinociták által hordozott perifériás receptorhoz való kötődés fajlagosságát farmakológiai vizsgálatok bizonyították, amelyek azt mutatták, hogy a referencia perifériás ligandumot (PK 11195) a következő ligandumok csökkenő hatékonysággal helyettesítették: Ro 5-4864 = ($IC_{50} \approx 25 \text{ nM}$) > diazepam ($IC_{50} \approx 100 \text{ nM}$) >>> klonazepam (3 200 nM koncentrációban inaktív). Emlékeztetünk arra, hogy ez az utolsó vegyület a centrális benzodiazepin receptorok liganduma, a diazepam vegyes és az Ro 5-4864 a PBR-re specifikus ligandum (5. ábra).

3. példa

A PBR részvétele az oxigénezett gyökökkel szembeni védelemben

Két típusú kísérletet írunk le a 6. ábrán. Az első abból áll, hogy limfoid vagy mieloid eredetű különböző vonalakat hasonlítunk össze az oxigénezett gyökök toxicitásával szembeni ellenálló képesség szempontjából a PBR-t kifejező szintjükkel összefüggésben. Az eredmények azt mutatják, hogy nagyon szoros az összefüggés a sejt-kénti PBR helyek száma és a H_2O_2 által indukált toxicitással szembeni rezisztencia között. Hasonló összefüggés figyelhető meg akkor is, amikor a Bcl2-nek, egy olyan fehérjének a kifejeződési szintjét tekintjük, amelyről ismert, hogy védi a sejteket az oxidatív károsodással szemben. Ezek az adatok azzal a ténnyel együtt, hogy a Bcl2 és a PBR a külső mitokondriális membránon elhelyezkedő fehérje, azt sugallják, hogy közös feladataik lehetnek a sejtvédelemben. Érdekes módon, noha a PBR kifejeződése a bazális rétegtől a szaruréteg határáig növekvő sűrűségi gradienst mutat, az irodalmi adatok fordított jelenséget említenek a Bcl2 kifejeződése esetében, ami azt jelentheti, hogy a keratinociták differenciálódása alatt a PBR átveheti a Bcl2-től a szabad gyökökkel szembeni védelmi funkciókat.

A második kísérletben a szabad gyökök toxicitásával szembeni védelemben a PBR lehetséges szerepét megerősítette annak kimutatása, hogy a PBR+-szal transzfektált Jurkat sejtek H_2O_2 jelenlétében nagyobb életképességet mutattak a homológ PBR- sejtekhez viszonyítva.

4. példa

Az aktív szerek anti-apoptózis hatását humán keratinocitákon és fibroblasztokon (ATCC) mértük, amelyeket 35 mm-es Petri-csészékben levő (5×10^5 sejt/üreg) 10% foetalis marhaszérummal kiegészített DMEM táptalajba (Dubelco's Mode Eagle Medium) inokuláltunk, és összefolyásig hagytunk proliferálódni. Ezt a tenyészközeget azután leszívtuk, a sejteket leöblítettük és 0,1 % foetalis marhaszérumot adtunk hozzájuk nátrium-klorid-oldat jelenlétében. A sejtekhez a vizsgálandó anyag növekvő koncentrációit adtuk. 24 órával később az apoptózist ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) vizsgálati kit segítségével mértük.

A keratinocitákat B típusú UV sugárzás (UVB) hatásának tettük ki 250 J/m^2 dózisban 16 órán át (J. Invest. Dermatol. 1995, 104: 922-927). Az Ro 5-4864 jelű PBR ligandum jelenlétében kimutattuk, hogy a besugárzással kiváltott sejtkárosító folyamatokat a ligandum a 10 nM és 10 μM közötti koncentráció-tartományban megakadályozza.

5. példa

A ligandum fényvédő hatását albínó tengerimalacokon kután alkalmazás segítségével értékeltük.

A kután topikális adagolási módot az emberen való alkalmazás körülményeinek reprodukálása érdekében használtuk.

A kísérlethez Harley tengerimalacokat (Charles River France, Saint Aubin les Elbeuf, 76410 Cléon, France) alkalmaztunk.

Az állatokat leborotváltuk, és a jobb és bal hátsó oldalon a kezelés megkezdése előtt 24 órával a szőröket kiszedtük.

Az állatokat közvetlenül az első kezelés előtt besugároztuk. A jobb és a bal oldalon végzett minden besugárzás előtt az energiát ellenőriztük az UVB spektrumban 4000 mJ/cm^2 dózissnál.



Az állatok jobb oldalát 0,2 ml ligandum-oldattal kezeltük közvetlenül, majd 2 és 5 órával a besugárzás után. A bal horpaszt nem kezeltük.

Egy Xeron nagynyomású gőzlámpa (IDEM 300) szolgáltatta a sugárzást.

A helyi reakciókat a kezelés előtt és a besugárzás után 5 és 24 órával figyeltük meg.

A bőрпиrosság és ödéma értékelése

Bőрпиrosság

0 nincs bőрпиrosság; 1 nagyon enyhe, alig észlelhető bőрпиrosság; 2 elhatárolható halvány rózsaszín bőрпиrosság; 3 elhatárolható élénk vörös bőрпиrosság; 4 különösen intenzív bőрпиrosság

Ödéma

0 nincs ödéma; 1 nagyon enyhe ödéma (alig látható); 2 enyhe ödéma (a körvonalak jól kivehetők és a duzzadás nyilvánvaló); 3 mérsékelt ödéma (kb. 1 mm-es vastagság); 4 súlyos ödéma (1 mm-nél nagyobb vastagság és a terület nagyobb az alkalmazás területénél).

A PBR receptor természetes ligandumaira olyan példákat, amelyeket fermentációval állítunk elő, a következőkben írunk le hatásukkal együtt.

Szilárd vagy folyékony táptalajon végeztük a mikroorganizmus-kivonatok szűrését, ezzel ki tudtunk választani három mikroorganizmus törzset (mikroszkopikus gombát és baktériumot).

A három törzset különféle vizsgálatok után választottuk ki, amelyeket azért végeztünk, hogy optimalizáljuk a körülményeket a PBR receptorral való kölcsönhatás mérésére szolgáló tesztben jó hatást mutató tenyészetkivonatok jelentős mennyiségben való termeléséhez, a törzsek jele SRL 4988, SRL 5186 és SRL 5189.

A fenti három törzset a Pasteur Intézet gyűjteményében (Collection Nationale de Cultures et Microorganismes) 1999. augusztus 27-én deponáltuk az I-2305, az I-2306 és az I-2307 sorszám alatt.



A *Nocardia* fajhoz tartozó SRL 4988 jelű törzs, amelyet egy talaj mintából különítettünk el, a következő ökológiai-fiziológiai tulajdonságokkal rendelkezik 2 héten át 28°C-on ISP2 közegben való tenyésztés után meghatározva: negatív fototrof, kemo-organotrof, mezofil és negatív halofil. Immobilis és nyitott nem-spirális örvei vannak.

A *Streptomyces* fajhoz tartozó SRL 5186 jelű törzs, amelyet talajmintából különítettünk el, a következő ökológiai-fiziológiai tulajdonságokkal rendelkezik két héten át 28 °C-on ISP2 közegben történő tenyésztés után meghatározva: negatív fototrof, kemo-organotrof, mezofil és negatív halofil. Immobilis és flexibilis, két spirálból álló hifái vannak.

A *Actinosynnema* fajhoz tartozó SRL 5189 jelű törzs a következő ökológiai-fiziológiai tulajdonságokkal rendelkezik két héten át 28 °C-on ISP2 táptalajon végzett tenyésztés után meghatározva: negatív fototrof, kemo-organotrof, mezofil, negatív halofil. Immobilis, és flexibilis, egy spirálból álló hifái vannak.

Ezek a törzsek és ezek termelőképes mutánsai a találmány további tárgyát képezik.

Tápláló agar talajon való tenyésztés és néhány azt követő szubtenyésztés után, amivel bőséges és tiszta tenyészetet állítottunk elő, a törzs (stock) törzsből egy 0 tárolási adagot és azután primer és szekunder inokuláló adagokat készítettünk.

Ehhez a tenyészetből tápláló agar közegen Petri-csészében és egy felvevő közegben spóraszuszpenziót készítettünk; ez a közeg egy krioprotektív szert tartalmazott a fagyasztással történő tárolás alatt a spórák jó életképességének a biztosítása érdekében.

A kapott spóraszuszpenziót kriocsövekbe osztottuk szét, amelyeket -80°C-on tároltunk: ezek a csövek képezték a 0 adagot.

Ugyanezt az eljárást követve, azonban egy 0 adaghoz tartozó csövet használva, primer inokuláló adagot készítettünk. Ezután ismét az előbbi eljárásnak megfelelően a primer inokuláló kriocsőből egy szekunder inokuláló adagot készítettünk. A 0, 1 és 2 inokuláló adagok előállítása biztosítja a törzs és így a kívánt aktivitás hosszantartó hozzáférhetőségét. Ennek a három törzsnek a PBR természetes ligandumainak előállí-

tása érdekében való tenyésztését hasonlóképpen, az aerob tenyésztés szokásos eszközeivel, azaz folyékony közegben, bármilyen térfogatú fermentorban, a pH és a levegőzés in-line követésével is megvalósíthatjuk.

A) példa

SRL 4988

Az SRL 4988 törzs kónuszos lombikokban való tenyésztésre példa: egy második leoltó csövet használtunk a Petri-csészében levő olyan közeg beoltására, amely segíti az actinomycetes sporulációját és összetétele a következő:

Glükóz	20 g
Soyoptim (SIO)	10 g
CaCO ₃ (OMYA)	3 g
E típusú agar	20 g
Desztillált víz qs	1 literig

A tenyészeteket a csészékben 5 napon át 28 °C-on inkubáltuk. Ezután 10 ml folyékony közeget adtunk mindegyik Petri-csészébe, amelynek az összetétele a következő volt:

Glükóz	30 g
Soyoptim (SIO)	10 g
Tryptone U.S.P. (Biokar)	4 g
Élesztőkivonat (Difco)	8 g
NaCl	2,5 g
CaCO ₃ (OMYA)	5 g
Kazein-hidrolizátum	5 g
Szója papain pepton	5 g

és amelynek a pH-ját sterilizálás előtt 7,0-ra állítottuk, így spóraszuszpenziót kaptunk.

A spóra-szuspenzióból 5 ml-t használtunk steril 250 ml-es lombikok oltására, amelyek 50 ml ugyanilyen táptalajt tartalmaztak, ezek voltak az előtenyészetek, amelyeket meleg kamrában 28°C-on polcos rázógépen vagy autonóm inkubátorban inkubáltunk, bármelyik rendszer alkalmazása esetén a forgás sebességét 210-es percenkénti fordulatszámra állítottuk.

Két napon át történő rázás után az előtenyszetet tartalmazó lombikokat használtuk a tényleges tenyészlombikok beoltására 5 ml előtenyésztési táptalaj/100 ml táptalajt tartalmazó 500 ml-es kónuszos lombik arányban, a tenyésztéshez használt táptalaj összetétele a következő volt:

Glicerín	10 g
Oldódó keményítő	30 g
Soyoptim	15 g
Trypton	2 g
Élesztőkivonat	5 g
CaCO ₃	5 g
Nyomelem-oldat	10 ml
Víz qs	1 literig
pH 7	

Az alkalmazott nyomelem-oldat összetétele az alábbi volt:

FeSO ₄ · 7 H ₂ O	1,0 g
MnSO ₄ · 4 H ₂ O	1,0 g
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,025 g
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,10 g
H ₃ BO ₃	0,56 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4 H ₂ O	0,002 g
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	0,20 g
Víz qs.	1 literig



Így ebben a speciális esetben öt előtenyésztő lombikot használtunk 40 tenyészlombik beoltására, amelyek 500 ml-es kónuszos lombikok voltak és 100-100 ml táptalajt tartalmaztak, majd a lombikokat 6 napon át 28 °C-os meleg kamrában 210-es fordulatszámra állított rotációs rázógépen rázatva tenyésztettük, és 4 liter baktérium-szuszpenziót kaptunk.

A 4 liter fermentlevet több alkalommal 4 °C-on és 13 500 fordulatszámmal (azaz 27 500 x g-n) centrifugáltuk a biomassza, azaz a sejteket tartalmazó pellet elkülönítésére, a felülúszó főként az alkalmazott táptalajból származó vízből állt és a táptalaj megmaradt komponenseinek oldatát, valamint a baktériumsejtek által a növekedésük különböző fázisában termelt és kiválasztott metabolitokat tartalmazta.

A biomasszákat és a felülúszókat ezután -20 °C-on megfagyasztottuk.

A PBR RECEPTOR TERMÉSZETES LIGANDUMAINAK EXTRAKCIÓJA

A 4 liter felengedett felülúszót egy 10 literes edénybe tettük. Az oldathoz 400 g Amberlite XAD 16 polisztirol-divinilbenzol gyantát (Rohm & Haas) adtunk. A szuszpenziót 15 órán át 20-as fordulatszám mellett lapátos keverővel felszerelt motorral ráztuk. Ezután az oldatot szűrtük, a szűrletet eltávolítottuk, és a leszívatott gyantát 1 liter metanolban felvettük. Ezt az elegyet 1 órán át enyhén kevertük. A gyantát ismét kiszűrtük és azonos módon 1 liter metanollal kezeltük. A harmadik művelet alatt a gyantát ismét kevertük, ez alkalommal azonban 1 liter acetonnal. A leszívatott gyantát ezután eltávolítottuk, és a 3 liter szerves oldószert egyesítettük, majd forgó készülékben vákuumban szárazra pároltuk.

A 17,7 g párlási maradékot 50 ml metanollal eldolgoztuk, a kapott szuszpenziót 15 percen át 3 000-es fordulatszám mellett centrifugáltuk, és a kapott megtisztított felülúszó alkotta a tenyészet felülúszójának kivonatát.

Ezt a kivonatot hígításban vizsgáltuk a PBR receptorhoz való kötődés gátlása szempontjából, és 1/200-nál 50%-os gátló hatást mutatott.



A 199 g egyesített biomasszához egy 2 literes edényben keverés közben 750 ml diklórmétán és 750 ml metanol elegyét adtuk. A keverést szobahőmérsékleten 15 órán át folytattuk. Ezután a szuszpenziót szűrtük, és tiszta oldatot kaptunk, amelyet forgó készülékben vákuumban bepároltunk. Az 5,4 g párlási maradékot ezután 50 ml metanollal feliszapoltuk, ez alkotta a biomassza extraktumot.

Ezt az extraktumot vizsgáltuk a PBR receptorhoz való kötődés gátlása szempontjából és 1/2200 hígításnál 50%-os aktivitást mutatott ($ID_{50} = 2200^{-1}$).

B) példa

SRL 5186

A fentebb leírt eljárást követtük, és

- a Petri-csészékben való szubtenyészet előállításához agar táptalajt,
- folyékony előtenyésztési táptalajt,
- folyékony termelő táptalajt és

14 darab 500 ml-es kónuszos lombikot alkalmaztunk, amelyek mindegyike 100 ml termelő táptalajt tartalmazott, ezeket 5%-ra oltottuk és 28°C-os meleg kamrában 210-es fordulatszámú rotációs készüléken 6 napon át rázattuk.

A termelő felülúszókat és biomasszákat centrifugáltuk, és 1-2 napon át -20°C-on fagyasztóban tároltuk, majd ezeket a termékeket az extrakciójukat megelőzően felengettük.

Az 54,9 g biomasszát egy edényben 250 ml diklórmétán és 250 ml metanol elegyével 10 órán át kevertük. Ezután a szuszpenziót szűrtük, és a kapott tiszta oldatot forgó készülékben szárazra pároltuk.

Az 1,4 g száraz maradékot 17,5 ml metanollal feliszapoltuk, és a kapott szuszpenziót 3000-es fordulatszámmal 15 percen át centrifugáltuk. A centrifugáláskor kapott felülúszót összegyűjtöttük, ez alkotta a biomassza extraktumot.

Ezt az extraktumot hígításban vizsgáltuk a PBR receptorhoz való kötődés gátlása szempontjából, és az 1/3750-es hígításnál 50%-os gátlást kaptunk ($ID_{50} = 3750^{-1}$).



A felengedett felülúszó 1400 ml-éhez 160 g XAD 16 polisztirol-divinilbenzol gyantát (Rohm & Haas) adtunk, és a szuszpenziót 15 órán át kevertük. Ezután a gyantát kiszűrtük, a szűrletet eltávolítottuk, és a gyantát 3 órán át 200 ml oldattal kezeltük, amely 25% metanolt tartalmazott vízben.

A gyantát kiszűrtük, és ezt a második szűrletet eltávolítottuk. A gyantát ezután három hasonló kezelésnek vetettük alá, két alkalommal 200-200 ml metanollal és végül 200 ml acetonnal. Ezt az utolsó három szűrletet egy gömblombikban egyesítettük és forgó készülékben vákuumban bepároltuk. A 2,2 g száraz maradékot 17,5 ml metanollal feliszapoltuk, és a kapott oldat képezte a felülúszó extraktumát.

Ezt az extraktumot hígításban vizsgáltuk a PBR receptorhoz való kötődés gátlása szempontjából, és 1/940-es hígításnál 50%-os gátlást kaptunk ($ID_{50} = 940^{-1}$).

C) példa

SRL 5189

A fenti eljárást követtük, és

- a Petri-csészékben való szubtenyésztéshez agar táptalajt,
- folyékony előtenyésztési táptalajt,
- folyékony termelő táptalajt és

10 darab 500 ml-es kónuszos lombikot alkalmaztunk, amelyek mindegyike 100 ml termelő táptalajt tartalmazott, ezeket 5%-ra oltottuk és 28 °C-os meleg kamrában 210-es fordulatszámú rotációs készüléken 8 napon át rázattuk.

A termelő felülúszókat és biomasszákat centrifugáltuk, majd 1-2 napon át - 20°C-on fagyasztóban tároltuk, végül ezeket a termékeket az extrakciójuk elvégzése előtt felengedtük.

A 69,5 g biomasszát egy edényben 150 ml diklórmétán és 150 ml metanol elegyével kevertük 10 órán át. A szuszpenziót ezután szűrtük, és a kapott tiszta oldatot forgó készülékben szárazra pároltuk. Az 1,5 g száraz maradékot 12,5 ml metanollal feliszapoltuk, és a kapott oldatot 3000-es fordulatszám mellett 15 percig centrifugáltuk.



A centrifugálás során kapott felülúszót összegyűjtöttük, ez alkotta a biomassza-extraktumot. Ezt az extraktumot hígításban értékeltük a PBR receptorhoz való kötődés gátlása szempontjából, és 1/2600-as hígításnál 50%-os gátlást kaptunk ($ID_{50} = 2600^{-1}$).

A felengedett felülúszó 1000 ml-éhez 100 g XAD 16 polisztirol-divinilbenzol gyantát (Rohm & Haas) adtunk, és a szuszpenziót 15 órán át kevertük. A gyantát ezután kiszűrtük, a szűrletet eltávolítottuk, és a gyantát 150 ml 25%-os vizes metanol-oldattal kezeltük 3 órán át. A gyantát ezután kiszűrtük, és ezt a második szűrletet eltávolítottuk. A gyantát ezt követően három hasonló kezelésnek vetettük alá, két alkalommal 150-150 ml metanol és végül 150 ml aceton alkalmazásával. Ezt a három utolsó szűrletet egy gömblombikban egyesítettük és forgó készülékben vákuumban bepároltuk. Az 1,7 g száraz maradékot 12,5 ml metanollal feliszapoltuk, és a kapott oldat alkotta a felülúszó extraktumát.

Ezt az extraktumot hígításban értékeltük a PBR receptorhoz való kötődés gátlása szempontjából, és 1/600-as hígításnál 50%-os gátlást kaptunk ($ID_{50} = 500^{-1}$).

A találmány szerinti készítményekben azt az anyagot, amely a PBR-hez kötődik, előnyösen 0,00001-20 tömeg% mennyiségben alkalmazzuk a készítmény teljes tömegére vonatkoztatva, és különösen 0,001-10 tömeg% mennyiségben a készítmény teljes tömegére vonatkoztatva.

A találmány szerinti készítmények a topikális alkalmazáshoz rendszerint használt bármely formában megjelenhetnek.

A találmány szerinti készítményekben a különféle alkotórészek mennyisége összhangban van az adott területen hagyományosan alkalmazottal és megfelel az adott megjelenési formának.

A találmány szerinti készítmények a topikális alkalmazáshoz egy a bőrrel kompatibilis közeget tartalmaznak. Ezek a készítmények különösen vizes, alkoholos vagy vizes-alkoholos oldatok, gélek, víz-az-olajban vagy olaj-a-vízben emulziók lehetnek, amelyek krém vagy gél, mikroemulzió vagy aeroszol vagy ionos és/vagy nemionos



lipideket tartalmazó vezikuláris diszperziók formájában jelenhetnek meg. Ezeket a kiszerezési formákat az adott területen szokásos módszereknek megfelelően állítjuk elő.

Ezek a topikálisan alkalmazható készítmények különösen kozmetikai vagy bőrgyógyászati védőkészítmények, arc, nyak, kéz vagy test kezelésére vagy ápolására alkalmas készítmények (például nappali krémek, éjszakai krémek, napelleni krémek vagy olajok vagy testápoló tejek), make-up készítmények (például alapozók) vagy mesterséges barnító készítmények lehetnek.

Amikor a találmány szerinti készítmény emulzió, a benne levő zsíros anyagok aránya 5 és 80 tömeg% közötti és előnyösen 5 és 50 tömeg% közötti a készítmény teljes tömegére vonatkoztatva. Az emulzió formájú készítményekben használt zsíros anyagokat és emulgeálószerket a kozmetikában vagy bőrgyógyászatban hagyományosan alkalmazottak közül választjuk.

A találmány szerinti készítményben használható zsíros a-nyagokra példaként az ásványi olajokat (vazelin), növényi olajokat (a karitvaj folyékony frakciója) és ezek hidrogénezett származékait, állati olajokat, szintetikus olajokat (perhidro-szkvalén), szilikonolajokat (polidimetilsziloxán) és a fluorolajokat említjük. További számításba jöhető zsíros anyagok többek között a zsíralkoholok (cetil-alkohol vagy sztearil-alkohol), a zsírsavak (sztearinsav) és a viaszok.

A készítményben az emulgeálószer 0,3 és 30 tömeg% közötti, előnyösen 0,5 és 30 tömeg% közötti mennyiségben lehetnek jelen a készítmény teljes tömegére vonatkoztatva.

A találmány szerinti kozmetikai vagy bőrgyógyászati készítmények ismert módon olyan adjuvánsokat is tartalmazhatnak, amelyek a megfelelő területeken szokásosak, például hidrofil vagy lipofil zselésítő szereket, tartósítószerket, antioxidánsokat, oldószerket, illatanyagokat, töltőanyagokat, szűrőket és színezőanyagokat. Emellett ezek a készítmények hidrofil vagy lipofil hatóanyagokat is magukban foglalhatnak. Ezeknek a különféle adjuvánsoknak vagy hatóanyagoknak a mennyisége megfelel a



kozmetikában vagy bőrgyógyászatban hagyományosan alkalmazottnak, és például 0,01 és 20 tömeg% közötti a készítmény teljes tömegére vonatkoztatva. A természetüktől függően ezeket a hatóanyagokat a zsíros fázisba, a vizes fázisba és/vagy a lipid vezikulumokba vezethetjük be.

A találmány szerinti készítmények hatóanyagaina példaként különösen az olyan hatóanyagokat említjük, amelyekkel a ráncok vagy finom vonalak kezelhetők, különösen a keratolitikus hatóanyagokat. A "keratolitikus" megfogalmazás olyan hatóanyagra utal, amely hámlasztó vagy dörzsölő tulajdonságokkal rendelkezik, vagy olyan hatóanyagra, amely képes a szarus réteget megpuhítani.

Ezek közül az aktív anyagok közül, amelyekkel a ráncok és finom vonalak kezelhetők, és amelyeket a jelen találmány szerinti készítmények tartalmazhatnak, különösen a hidroxisavakat és a retinoidokat említhetjük.

A hidroxisavak lehetnek például α -hidroxisavak vagy β -hidroxisavak, amelyek egyenes vagy elágazó láncúak vagy gyűrűsek, és telítettek vagy telítetlenek lehetnek. A szénlánc hidrogénatomjai halogénatomokkal, 2-18 szénatomos alkil-, acil-, aciloxi-, alkoxikarbonil- vagy alkoxicsoportokkal lehetnek helyettesítve.

A találmány szerint alkalmazható hidroxisavak közül különösen említésre méltó a glikolsav, a tejsav, az almasav, a borkósav, a citromsav, a 2-hidroxialkánsav, a mandulasav, a szalicilsav és annak alkil-származékai, például az 5-(n-oktanoil)-szalicilsav, az 5-(n-dodekanoil)szalicilsav, az 5-(n-dekanoil)-szalicilsav, az 5-(n-oktil)szalicilsav, az 5-(n-heptiloxi)-szalicilsav vagy a 4-(n-heptiloxi)szalicilsav, és a 2-hidroxi-3-metilbenzoészav vagy annak alkoxilezett származékai, például a 2-hidroxi-3-metoxibenzoészav.

A retinoidok közelebből a retinsav és származékai, a retinol (A vitamin) és annak észterei, így a retinil-palmitát, a retinil-acetát vagy a retinil-propionát és sói lehetnek.

Ezeket a hatóanyagokat különösen 0,0001 és 5 tömeg% közötti mennyiségben alkalmazhatjuk a készítmény teljes tömegére vonatkoztatva.



Szabadalmi igénypontok:

1. Legalább egy a perifériás benzodiazepin receptorhoz vagy a PBR-hez kötődő anyag alkalmazása kozmetikai, gyógyászati vagy bőrgyógyászati topikális készítmények előállítására után stressz kezelésére.

2. Legalább egy a PBR-hez kötődő anyag alkalmazása kozmetikai és/vagy bőrgyógyászati, a ráncokat csökkentő, a nap által okozott bőrpírosságot csökkentő vagy szabad gyökökkel szemben védő topikális készítmény előállítására.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti alkalmazás, azzal jellemezve, hogy a PBR-hez kötődő anyag egy PBR agonista, amelyet szintetikus molekulák, természetes extrakciós anyagok és fermentációval kapott anyagok közül választunk.

4. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás, azzal jellemezve, hogy az PBR-hez kötődő anyag az Ro 5-4864.

5. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás, azzal jellemezve, hogy a PBR-hez kötődő anyag egy fermentációval kapott anyag.

6. Az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás, azzal jellemezve, hogy az anyag a kozmetikai vagy bőrgyógyászati készítményben 0,00001 és 20 tömeg% közötti mennyiségben van jelen a készítmény teljes tömegére vonatkoztatva.

7. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás, azzal jellemezve, hogy az agonista anyag a kozmetikai vagy bőrgyógyászati készítményben 0,001 és 10 tömeg% közötti mennyiségben van jelen a készítmény teljes tömegére vonatkoztatva.

8. Az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás, azzal jellemezve, hogy a készítmény hidroxisavat és/vagy egy retinoidot is tartalmaz.

9. A 8. igénypont szerinti alkalmazás, azzal jellemezve, hogy a hidroxisavat α -hidroxisavak és β -hidroxisavak közül választjuk, amelyek egyenes vagy elágazó láncúak, gyűrűsek, és telítettek vagy telítetlenek lehetnek.

10. A 9. igénypont szerinti alkalmazás, azzal jellemezve, hogy a retinoidot a retinsav és annak származékai, valamint a retinol és annak észterei közül választjuk.

11. Kozmetikai és/vagy bőrgyógyászati topikális készítmény, azzal jellemezve, hogy hatóanyagként egy a PBR-hez kötődő anyagot tartalmaz.

12. A *Nocardia* fajhoz tartozó SRL 4988 jelű törzs, amely a Pasteur Intézet C.N.C.M. (Collection Nationale de Cultures et Microorganismes) gyűjteményében I-2305 szám alatt van deponálva, és annak termelő mutánsai.

13. A *Streptomyces* fajhoz tartozó SRL 5186 jelű törzs, amely a Pasteur Intézet C.N.C.M. gyűjteményében I-2306 szám alatt van deponálva, és annak termelő mutánsai.

14. Az *Actinosynnema* fajhoz tartozó SRL 5189 jelű törzs, amely a Pasteur Intézet C.N.C.M. gyűjteményében I-2307 szám alatt van deponálva, és annak termelő mutánsai.

15. Kozmetikai és/vagy bőrgyógyászati topikális készítmény, azzal jellemezve, hogy hatóanyagként egy a 12-14. igénypontok szerinti törzsek fermentálásával kapott anyagot tartalmaz.

Actinosynnema

INTELLIGENCE
BUREAU

lokális mikroszkóppal, 8D7 anti-

A high-contrast, black and white image of a single, irregularly shaped, textured object, possibly a seed or a small rock, centered against a dark background. The object has a rough, granular surface and a darker, more solid-looking center. The lighting is dramatic, highlighting the texture and shape of the object.

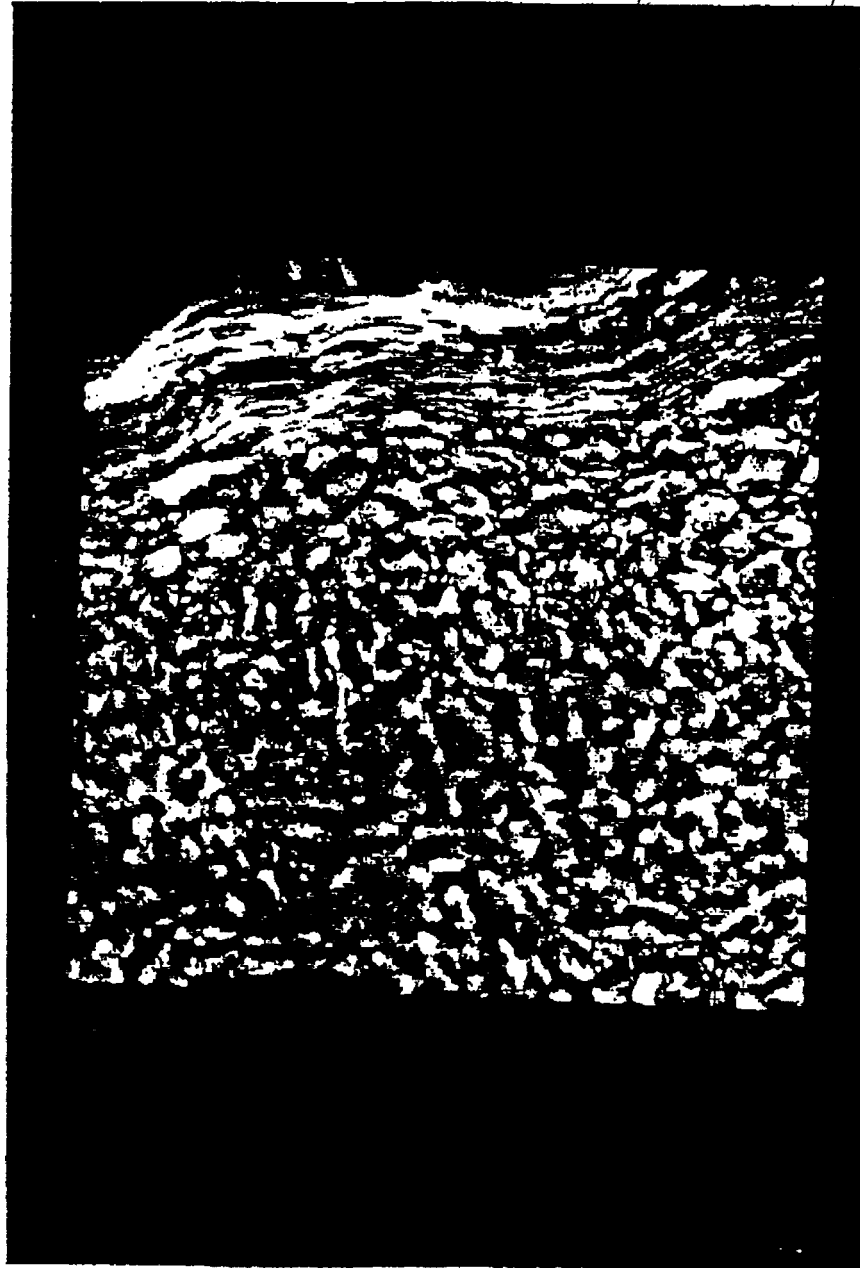
901 5058

24
KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

4.8.2.4.4.

Normál humán epidermisz egy metszetén végzett immunhisztológiai analízis a PBR kifejeződését mutatja, amely a *stratum basale*-től a *stratum corneum*-ig nő (vörös szín-
zódás)

Ukalmassony

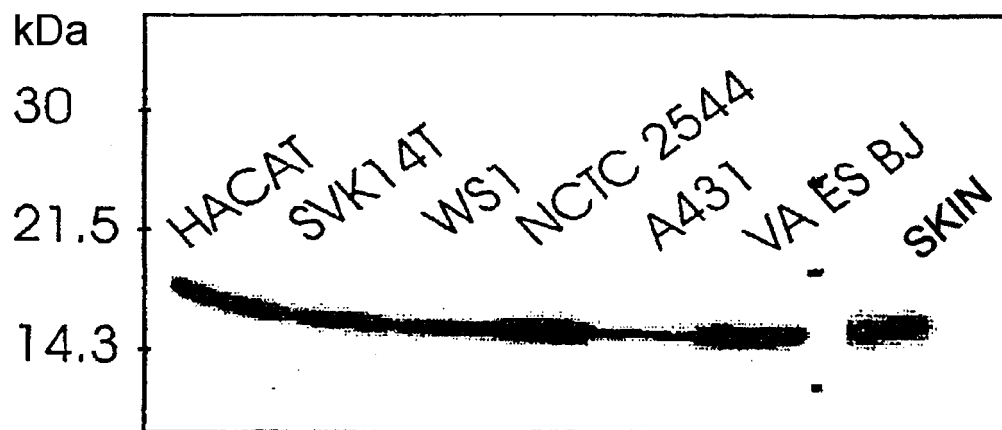


2. Ábra

KÖZZÉTÉTELI

A PBR kifejeződése keratinocita vonalakon és normál humán bőrvonalakon:

Western-féle blot analízis



[kDa] [BŐR]

8D7 antitest jelzés (1 μ g/ml végkoncentráció)

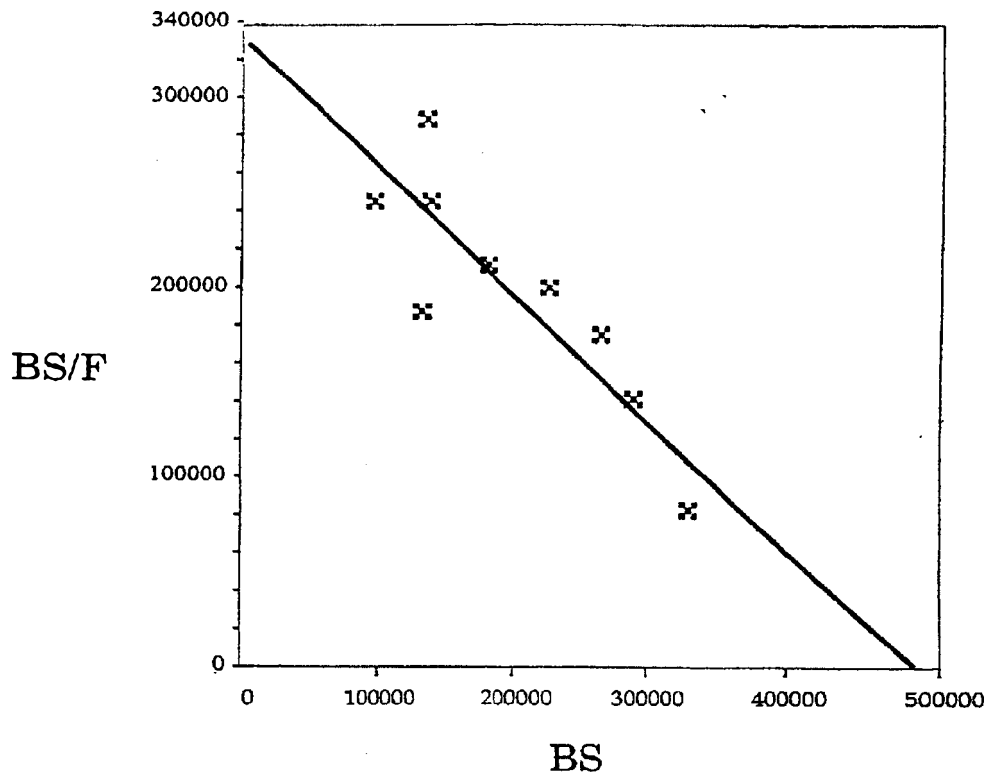
A lerakódások normalizálva vannak a lizátum összes fehérjéjének meghatározásával:
a lerakódás mindegyik vonalra 30 μ g

3. ábra

KÖZZÉTÉTELI
FÉLDÁNY

Scatchard vizsgálat
A431 keratinocitákon

Dr. Halász



$B_{max} = 472\,000 \pm 68\,000$ receptor/sejt

$KD = 1,5 \pm 0,3$ mM

4. ábra

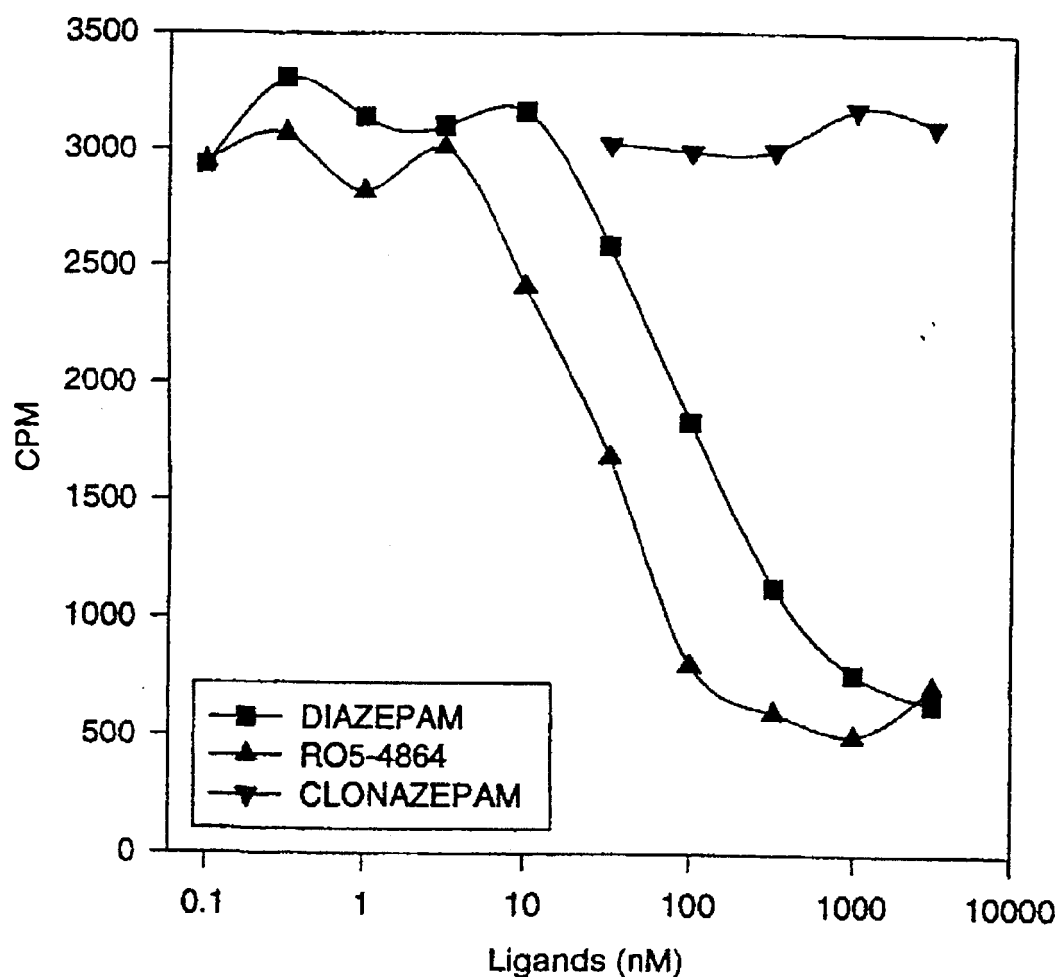
KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

PBR ligandumok farmakológiai profilja
A431 keratinocitákon

Handwritten signature

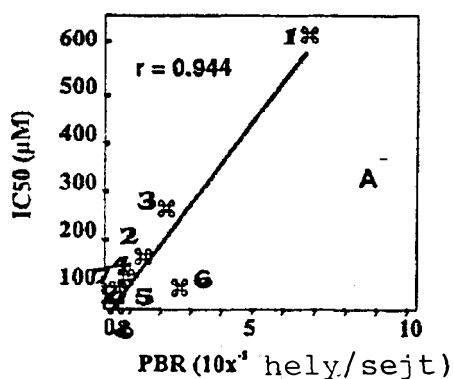
Ligandumok (nM)

A referencia ligandumnak, a [^3H]-PK11195-nek a
Ro 5-4864 (perifériás ligandum), a klonazepam
(centrális ligandum) és a diazepam (vegyes
ligandum) általi helyettesítési görbéje

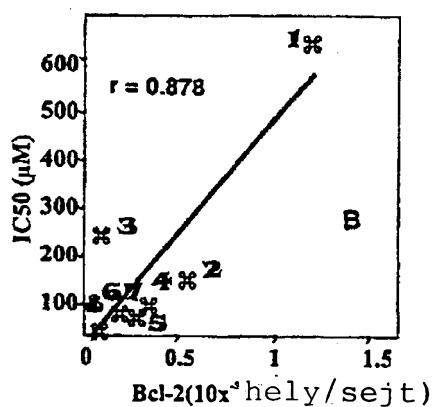


5. ábra

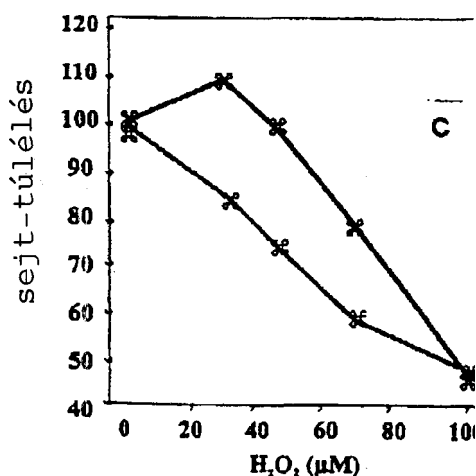
A PBR részvétele a hematopoietikus sejteknek az oxigénezett gyökök által okozott
károsodással szembeni védelmében



Összefüggés a PBR [A] és
a Bcl-2 [B] kifejeződési
szintje és a H_2O_2 toxici-
tásával szembeni rezisz-
tencia között



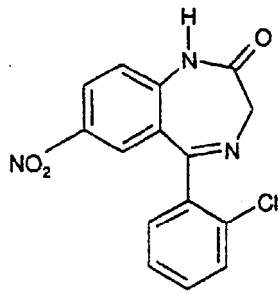
A H_2O_2 azon koncentrációi,
amelyek 24 órás inkubálás
után 50%-os toxicitást in-
dukálnak [IC_{50}], a PBR vagy
a Bcl-2 helyek számának
függvényében vannak kifejeve.



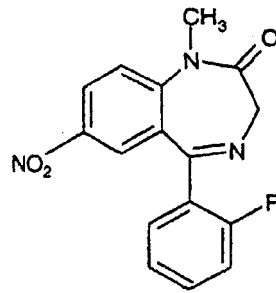
A vad-típusú Jurkat sejtek
és a PBR-rel transzfektált
sejtek életképessége a H_2O_2 -
toxicitás vonatkozásában 24
órás inkubálás után

6. ábra

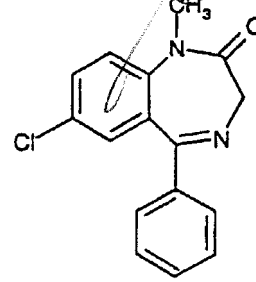
KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY



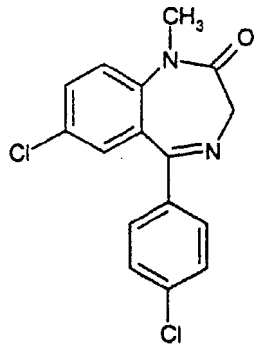
KLONAZEPAM



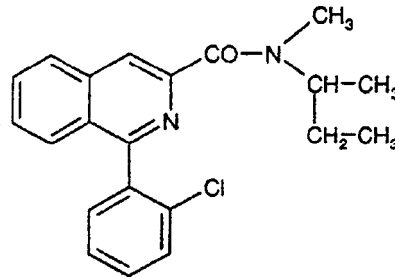
FLUNITRAZEPAM



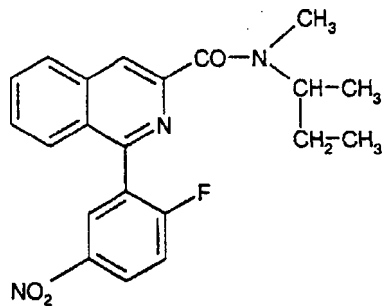
DIAZEPAM
Ro 5-2807



KLÓRDIAZEPAM
Ro 5-4864



PK 11195



PK 14105

A centrális és a perifériás benzodiazepin receptorok

fő ligandumai

7. ábra