P02 01310

3095
A2

Szelektív PDE10-inhibitorok terápiás alkalmazása

Kivonat

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

A találmány tárgyát szelektív PDE10-inhibitorok alkalmazása képezi a központi idegrendszer rendellenességeinek kezelésére, közelebbről neurológiai és pszichiátriai rendellenességek, például szimptómaként pszichózis és deficiens kognitív képességgel járó rendellenességek kezelésére. ~~A találmány tárgyát képezi továbbá a papaverin alkalmazása szelektív PDE10-inhibitorként. A találmány tárgyát képezi ezen felül egy eljárás PDE10 gátlására.~~

PK

Aktaszámunk: 96604-4185/PÁ

P02 01310

A2

Szelektív PDE10-inhibitorok terápiás alkalmazása

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

A találmány tárgyát szelektív PDE10-inhibitorok alkalmazása képezi a központi idegrendszer rendellenességeinek kezelésére, közelebbről neurológiai és pszichiátriai rendellenességek, például szimptómaként pszichózis és deficiens kognitív képességgel járó rendellenességek kezelésére. A találmány tárgyát képezi továbbá a papaverin alkalmazása szelektív PDE10-inhibitorként. A találmány tárgyát képezi ezen felül egy eljárás PDE10 gátlására.

A ciklikus nukleotidok, ciklikus adenozin-monofoszfát (cAMP) és ciklikus guanozin-monofoszfát (cGMP) intracelluláris másodlagos messengerként működik, nagyon sok intracelluláris folyamatot szabályozva, például a központi idegrendszer neuronjaiban végbemenő folyamatokat. cAMP-t egy membránkötött enzimcsalád, az adenilil ciklázok szintetizálnak. A szerpin-családhoz tartozó, igen sokféle receptor szabályozza ezeket az enzimeket, heterotrimer G-fehérjék által mediált, kapcsoló mechanizmuson keresztül. Az intracelluláris cAMP-szint növekedése cAMP-függő fehérje kinázok aktiválódásához vezet, amelyek más jeltovábbító kinázok, transzkripciós faktorok és enzimek aktivitását szabályozzák

foszforilálásukon keresztül. A ciklikus AMP közvetlenül is befolyásolhatja ciklikus nukleotidok által szabályozott ioncsatornák, foszfodiészterázok vagy guanin-nukleotid-anyagcserében szerepet játszó faktorok aktivitását. A közelmúltban végzett kutatások alapján azt is feltételezzük, hogy intracelluláris cAMP az adenozin neuromodulátor prekurzoraként funkcionálhat, sejtből való transzportját követően.

A guanilil cikláz, amely cGMP-t képes szintetizálni, membránkötött és citoplazmikus formákban fordul elő. A membránkötött forma G-protein-kapcsolt receptorokhoz, például ANP-hez („atrial naturetic peptide") képes kötődni, míg a szolubilis guanilil ciklázt nitrogén(II)-oxid aktiválja [Wang, X. és Robinson, P. J., Journal of Neurochemistry 68, 443-456 (1997)]. cAMP-hez hasonlóan, a központi idegrendszerben, cGMP jeltovábbító folyamatsorban szerepet játszó mediátorok közé tartoznak cGMP-kapuzott ioncsatornák, cGMP-szabályzott foszfodiészterázok és cGMP-függő fehérje kinázok. Mivel a ciklikus nukleotidok fontos szerepet töltenek be a központi idegrendszerben folyó szignál-transzdukcióban, jótékony terápiás hatások olyan vegyületek alkalmazásából származhatnak, amelyek hatást képesek kifejteni a ciklikus nukleotidokkal összefüggő jeltovábbítás szabályzására.

A ciklikus nukleotidokkal összefüggő jeltovábbítás szabályzásának alapvető mechanizmusa ciklikus nukleotidok katabolizmusa, melyet foszfodiészteráz katalizál. A foszfodiészterázok (PDE) 11 családja ismeretes, melyeket 21 kü-

lönféle gén kódol. Minden génből tipikusan több splicing-variáns keletkezik, ami később az izoenzim-diverzitás kialakulását biztosítja. A PDE-családokat funkcionálisan meg lehet különböztetni ciklikus nukleotid szubsztrát-specifitás, a szabályzás mechanizmusa(i) és inhibitorokra való érzékenység alapján. Továbbá PDE-k eltérő mértékben expresszálódnak az organizmusban, például a központi idegrendszerben. Az említett eltérő enzimaktivitások és lokalizáció eredményeként, a különböző PDE-izoenzimek jól megkülönböztethető fiziológiás funkciókat szolgálhatnak. Tovább olyan vegyületek, amelyek képesek szelektíven gátolni jól elhatárolható PDE-családokat vagy izoenzimeket, speciális terápiás hatásokat, kevesebb mellékhatást, vagy mindkettőt biztosíthatják.

PDE10-et egyedi családként azonosítjuk primer aminosav-szekvenciája és jellegzetes enzimaktivitása alapján. EST-adatbázisok homológiára való szkrínelésével az egéreredetű PDE10A-t foszfodiészterázok PDE10-családjának első tagjaként azonosították [Fujishige és mtsai., J. Biol. Chem. 274, 18438-18445 (1999); Loughney, K. és mtsai., Gene 234, 109-117 (1999)]. A rágcsálóban előforduló homológot szintén klónozták [Soderling, S. és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 7071-7076 (1999)], és mind patkányeredetű, mind humán génekből azonosították az N-terminális splicing-variánsokat [Kotera, J. és mtsai., Biochem. Biophys. Res. Comm. 261, 551-557 (1999); Fujishige, K. és mtsai., Eur. J. Biochem. 266, 1118-1127 (1999)]. A fajok között nagymértékű a homológia. Az egérből származó PDE10A1

779 aminosavból álló fehérje, amely cAMP-t és cGMP-t egyaránt képes hidrolizálni AMP-vé, illetve GMP-vé. A PDE10 affinitása cAMP-re (K_m = 0,05 μM) nagyobb, mint cGMP-re (K_m = 3 μM). Azonban a V_{max} cGMP-re körülbelül 5-ször nagyobb, mint cAMP-re, ami arra a feltételezésre vezetett, hogy PDE10 egyedi cAMP-gátolt cGMPáz [Fujihige és mtsai., J. Biol. Chem. 274, 18438-18445 (1999)].

PDE10 lokalizációja is egyedi jellegű emlősszervezetekben a többi PDE-családhoz viszonyítva. PDE10-mRNS csak herékben és agyban expresszálódik nagymértékben [Fujihige, K. és mtsai., Eur. J. Biochem. 266, 1118-1127 (1999); Soderling, S. és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. 96, 7071-7076 (1999); Loughney, K. és mtsai., Gene 234, 109-117 (1999)]. Ezek a kezdeti vizsgálatok azt mutatták, hogy PDE10 expressziója az agyban a striatumban (caudate és putamen), n. accumbensben és a tuber olfactoriumban a legnagyobb mértékű. A közelmúltban részletesen analizálták rágcsálók agyában előforduló PDE10-mRNS expressziós mintázatát [Seeger, T. F. és mtsai., Abst. Soc. Neurosci. 26, 345.10, (2000)].

A találmány tárgyát képezi eljárás szorongás vagy pszichotikus rendellenesség kezelésére emlősszervezetben, például emberben, amelyben az emlősszervezetnek beadunk szelektív PDE10-inhibitor akkora mennyiségét, amely hatásos szorongás vagy pszichotikus rendellenesség kezelésére.

Szintén a találmány tárgyát képezi eljárás szorongás vagy pszichotikus rendellenesség kezelésére emlősszervezetben, például emberben, amelyben az emlősszervezetnek be-

adunk szelektív PDE10-inhibitor akkora mennyiségét, amely hatásos PDE10 gátlására.

A találmány szerinti eljárás alkalmazásával kezelhető pszichotikus rendellenességek például: schizophrenia, például paranoid, dezorganizált, katatóniás, differenciálatlan vagy reziduális típus; schizophreniform rendellenesség; schizoaffektív rendellenesség, például érzékcsalódással járó típus vagy depresszív típus; vegyi anyag által indukált pszichotikus rendellenesség, például alkohol, amfetamin, cannabis, kokain, hallucinogének, inhalációs anyagok, opioidok vagy fenciklidin által indukált pszichózis; paranoid típusú személyiségzavar; és schizoid típusú személyiségzavar.

A találmány szerinti eljárás alkalmazásával kezelhető szorongásos rendellenesség, például pánikbetegség, agorafóbia; specifikus fóbia; szociális fóbia; obszesszív-kompulzív rendellenesség; poszttraumás stresszt kísérő rendellenesség; akut stresszt kísérő rendellenesség és általános szorongásos rendellenesség.

Szintén a találmány tárgyát képezi eljárás mozgásrendellenesség, például Huntington-betegség és dopamin-agonistát alkalmazó terápiával asszociált diszkinézia kezelésére emlősszervezetben, például emberben, amelyben az emlősszervezetnek beadunk szelektív PDE10-inhibitor akkora mennyiségét, amely hatásos a rendellenesség kezelésére.

Szintén a találmány tárgyát képezi eljárás mozgásrendellenesség, például Huntington-betegség és dopamin-agonistát alkalmazó terápiával asszociált diszkinézia keze-

lésére emlősszervezetben, például emberben, amelyben az emlősszervezetnek beadunk szelektív PDE10-inhibitor akkora mennyiségét, amely hatásos PDE10 gátlására.

A találmány tárgyát képezi továbbá eljárás mozgásrendellenesség, például Parkinson-kór és „nyugtalan láb" szindróma kezelésére emlősszervezetben, például emberben, amelyben az emlősszervezetnek beadunk szelektív PDE10-inhibitor akkora mennyiségét, amely hatásos a rendellenesség kezelésére.

Szintén a találmány tárgyát képezi eljárás mozgásrendellenesség, például Parkinson-kór és „nyugtalan láb" szindróma kezelésére emlősszervezetben, például emberben, amelyben az emlősszervezetnek beadunk szelektív PDE10-inhibitor akkora mennyiségét, amely hatásos PDE10 gátlására.

A találmány tárgyát képezi továbbá eljárás kábítószerélvezet, például alkohol-, amfetamin-, kokain- vagy ópiátélvezet kezelésére emlősszervezetben, például emberben, amelyben az emlősszervezetnek beadunk szelektív PDE10-inhibitor akkora mennyiségét, amely hatásos kábítószer-élvezet kezelésére.

A találmány tárgyát képezi továbbá eljárás kábítószerélvezet, például alkohol-, amfetamin-, kokain- vagy ópiátélvezet kezelésére emlősszervezetben, például emberben, amelyben az emlősszervezetnek beadunk szelektív PDE10-inhibitor akkora mennyiségét, amely hatásos PDE10 gátlására.

A „kábítószer-élvezet" kifejezésen a leírásban drog abnormális kívánását értjük, amelyet általában motivációs zavar jellemez, kényszer a kívánt drog fogyasztására és

epizódok, amelyben intenzív, kielégíthetetlen a vágy drog után.

A találmány tárgyát képezi továbbá eljárás szimptómaként deficiens kognitív képességgel járó rendellenességek kezelésére emlősszervezetben, például emberben, amelyben az emlősszervezetnek beadunk szelektív PDE10-inhibitor akkora mennyiségét, amely hatásos kognitív deficiencia kezelésére.

A találmány tárgyát képezi továbbá eljárás szimptómaként deficiens kognitív képességgel járó rendellenességek kezelésére emlősszervezetben, például emberben, amelyben az emlősszervezetnek beadunk szelektív PDE10-inhibitor akkora mennyiségét, amely hatásos PDE10 gátlására.

A „deficiencia kognitív képességben" kifejezésen, melyet a leírásban „szimptómaként deficiens kognitív képességgel járó rendellenesség" kifejezésként említünk, egy vagy több, kognitív vonatkozású képesség, például memória, értelem vagy tanulás és logikai képesség szubnormális működésére utal egy konkrét egyedben más egyedekhez viszonyítva, ugyanolyan általános korú populációban. A „deficiencia a kognitív képességben" kifejezésen bármilyen konkrét egyedben, egy vagy több, kognitív vonatkozású képesség működésében bekövetkezett csökkenést is értünk, például a kognitív képességek öregedéssel összefüggő hanyatlását.

A találmány szerinti eljárással kezelhető, szimptómaként deficiens kognitív képességgel járó rendellenesség, például dementia, például Alzheimer-kór, multi-infarktusos dementia, alkoholos dementia vagy más, droggal kapcsolatos dementia, intrakraniális tumorokkal vagy agytraumával asszo-

ciált dementia, Huntington-betegséggel vagy Parkinson-kórral asszociált dementia vagy AIDS-el kapcsolatos demencia; delírium; amnéziás rendellenesség; poszttraumás stressz betegség; mentális visszamaradottság; tanulási rendellenesség, például olvasási készség rendellenessége, matematikai készség rendellenessége vagy írásbeli kifejezőkészség rendellenessége; figyelemzavar/hiperaktivitás rendellenessége; és kognitív képességek öregedéssel összefüggő hanyatlása.

Szintén a találmány tárgyát képezi eljárás kedélybetegség vagy kedélybeteg epizód kezelésére emlősszervezetben, például emberben, amelyben az emlősszervezetnek beadunk szelektív PDE10-inhibitor akkora mennyiségét, amely hatásos a rendellenesség vagy epizód kezelésére.

Szintén a találmány tárgyát képezi eljárás kedélybetegség vagy kedélybeteg epizód kezelésére emlősszervezetben, például emberben, amelyben az emlősszervezetnek beadunk szelektív PDE10-inhibitor akkora mennyiségét, amely hatásos PDE10 gátlására.

A találmány szerinti eljárással kezelhető kedélybetegségek vagy kedélybeteg epizódok lehetnek például enyhe, mérsékelt vagy súlyos típusú, jelentős depresszív kedélybeteg epizód, mániás vagy kevert kedélybeteg epizód, hipomániás kedélybeteg epizód; atípusos jellemzőkkel rendelkező, depresszív kedélybeteg epizód; melankólikus jellemzőkkel rendelkező, depresszív kedélybeteg epizód; katatóniás jellemzőkkel rendelkező, depresszív kedélybeteg epizód; szülés után kialakuló kedélybeteg epizód; szélütés utáni dep-

resszió; jelentős depressziós rendellenesség; disztímiás rendellenesség (kóros lehangoltság); kismértékű depressziós rendellenesség; menstruáció előtti depressziós rendellenesség; poszt-pszichotikus depressziós rendellenesség schizophreniában; jelentős depressziós rendellenesség, amely pszichotikus rendellenességhez, például érzékcsalódáshoz vagy schizophreniához hozzáadódik; bipoláris rendellenesség, például bipoláris I. betegség, bipoláris II. betegség és ciklotímiás betegség.

A leírásban a „szelektív PDE10-inhibitor" kifejezésen egy vegyi anyagot értünk, amely például olyan szerves molekula, amely PDE10-családhoz tartozó enzimet nagyobb mértékben képes hatékonyan gátolni, mint bármilyen más PDE-enzimet, különösen a PDE 1-9. családokhoz tartozó, bármelyik enzimet, vagy bármelyik PDE11-enzimet. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, egy szelektív PDE10-inhibitor olyan vegyi anyag, például szerves molekula, amelynek K_i-értéke PDE10-gátlásra kisebb vagy körülbelül akkora, mint az anyag bármelyik másik PDE-enzim gátlására vonatkozó K_i-értékének egy tizede. Más szavakkal kifejezve, az anyag körülbelül 1/10 koncentrációban gátol ugyanakkora mértékben PDE10-aktivitást, mint amely koncentrációban bármilyen más PDE-enzimet gátol.

Egy anyagot általában akkor tekintünk PDE10-aktivitás hatékony inhibitorának, ha IC_{50}-értéke kisebb vagy körülbelül 10 μM, előnyösen kisebb vagy körülbelül 0,1 μM.

„Szelektív PDE10-inhibitort" például úgy lehet azonosítani, hogy összehasonlítjuk egy anyag PDE10-aktivitást

gátló képességét más PDE-családhoz tartozó PDE-enzimeket gátló képességével. Például egy anyagot vizsgálni lehet arra vonatkozóan, hogy milyen mértékben képes PDE10-aktivitást, valamint PDE1-, PDE2-, PDE3A-, PDE4A-, PDE4B-, PDE4C-, PDE4D-, PDE5-, PDE6-, PDE7-, PDE8-, PDE9- és PDE11-aktivitást gátolni.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány szerinti, fentebb leírt terápiás eljárásban szelektív PDE10-inhibitorként papaverint alkalmazunk.

Szintén találmány tárgyát képezi eljárás PDE10 szelektív gátlására emlősszervezetben, például emberben, amelyben az emlősszervezetnek beadunk papaverin akkora mennyiségét, amely hatásos PDE10 gátlására.

A „kezelés" jelentése „eljárás egy rendellenesség kezelésére" kifejezés vonatkozásában olyan rendellenesség, vagy a rendellenesség egy vagy több szimptómájának visszafordítására, enyhítésére vagy súlyosbodásának gátlására utal, amelyre a kifejezést alkalmazzuk. A leírásban a kifejezésen, a páciens állapotától függően, a rendellenesség prevencióját is értjük, beleértve a betegség vagy bármilyen asszociált szimptóma kialakulásának prevencióját, valamint a rendellenesség vagy bármilyen asszociált szimptóma súlyosságának csökkentését a kialakulás előtt. A „kezelés" kifejezést alkalmazzuk egy rendellenesség kiújulásának prevenciójára is.

Például „schizophrenia vagy schizophreniform vagy schizoaffektív rendellenesség kezelése" kifejezésen a leírásban az említett rendellenességek egy vagy több szimptó-

májának (pozitív, negatív és más asszociált jelenség) kezelését értjük, például ezekkel asszociált érzékcsalódás és/vagy hallucináció kezelését. Schizophrenia vagy schizophreniform vagy schizoaffektív rendellenesség más szimptómája lehet dezintegrált beszéd, mánia, alogia, anhedonia, nem megfelelő affektus (érzelmi állapot), depressziós kedélybetegség (például depresszió, szorongás vagy düh), és kognitív képességek rendellenes működésének néhány indikációja.

Az „emlősszervezet" kifejezésen a leírásban az „emlősök" osztályának bármelyik tagját értjük, például embereket, kutyákat és macskákat.

Ábrák rövid leírása:

1. ábra: Az ábrán lévő oszlopdiagram segítségével bemutatjuk kísérleti állatokban kialakult katalepsziát növekvő papaverin-dózis függvényében. A szürke oszlopok megfelelnek papaverin és haloperidol kombinációjának, és amely hatékonyabb haloperidol-indukált katalepsziát tett lehetővé papaverin alkalmazásával. A fekete oszlopok papaverin egyedüli alkalmazásának felelnek meg. Ezek a fekete oszlopok azt mutatják, hogy a papaverin egymagában nem indukált katalepsziát egészen 32 mg/kg dózisig. Konkrétabban, beadtunk papaverint a megjelölt dózisokban egymagában vagy haloperidollal (0,32 mg/kg), 30 perccel a tesztelés előtt. Az egyes oszlopok megfelelnek hat, hasonlóan kezelt állathoz tartozó latenciaidő középértékének arra vonatkozóan, hogy az állatok mennyi idő alatt veszik le mindkét első lábukat az emelvényről. Kruskall-Wallace-féle variancianalízist alkal-

maztunk a sorba állított latenciaidők összehasonlítására, amelyekben papaverint egymagában alkalmaztunk azzal szemben, hogy haloperidollal együtt alkalmaztuk. Post hoc analízis azt mutatta, hogy 3,2, 10 és 32 mg/kg papaverin-dózist plusz haloperidolt kapott állatok szignifikánsan (**) hosszabb latenciaidőkkel rendelkeztek, mint a haloperidollal egymagában kezelt állatok.

2. ábra: Az ábrán lévő két oszlopdiagramot találhatunk, amelyen bemutatjuk kísérleti állatok által végzett helycserés mozgások számát, melyet mozgatható boxokban határoztunk meg az anyag beadását követő első 60 percben. A felső diagramon papaverin mozgásra kifejtett hatásait hasonlítjuk papaverin amfetamin-indukált mozgásra kifejtett hatásaihoz. Az alsó diagramon papaverin egymagában kifejtett hatásait hasonlítjuk papaverin PCP-indukált mozgásra kifejtett hatásaihoz. 1 mg/kg i.p. amfetamint adtunk be. 3,2 mg/kg i.p. PCP-t adtunk be. A papaverint mindkét ágenssel együtt 32 mg/kg i.p. dózisban adtuk be. A adatok a helycserés mozgások számának középértékét jelentik + SEM, a drog beadását követő első 60 percben, n=8 patkány/csoport.

**p<0,01 vivőanyaggal szemben/vivőanyag kontroll; *p<0,05 vivőanyaggal szemben/PCP Student-féle t-próbával.

PDE-2, -3 és -5, izoenzimeket, beleértve humán PDE-ket corpus cavernosumból; PDE1-et, izoenzimeket, beleértve humánt, szívkamrából; és PDE4-et, izoenzimeket, beleértve humánt, vázizomból lehet preparálni. PDE6-t például kutyák retinájából lehet preparálni. Natív szövetből kiinduló enzimpreparálás leírása céljából lásd például: Boolell, M. és

munkatársai, Int. J. Impotence Research 8, 7-52 (1996), melyet a kitanítás részének tekintünk.

PDE 7-11-eket hasonlóan lehet preparálni natív szövetből. A PDE 7-9. és 11. családok izoenzimjeit ezzel alternatív módon, olyan teljes hosszúságú, humán rekombináns klónokból lehet előállítani, amelyek például SF9-sejtekbe vannak transzfektálva [Fisher, D. A. és mtsai., Biochem. Biophys. Res. Commun. 246, 570-577 (1998); Soderling, S. H. és mtsai., Biochem. Biophys. Res. Comm. 96, 7071-7076 (1999); Fisher, D. A. és mtsai., J. Biol. Chem. 273, 15559-15564 (1998b); és Fawcett, L. és mtsai., PNAS 97, 3702-3707 (2000)]. PDE10-et patkányeredetű rekombináns klónból is elő lehet állítani, amely SF9-sejtekbe van transzfektálva [Fujishige és mtsai., European Journal of Biochemistry 266, 1118-1127 (1999)]. Az enzimeket azután FPLC-vel lehet preparálni sejtlizátumok szolubilis frakciójából, PDE6-ra leírtak szerint. A fentebb idézett hivatkozásokat teljes egészükben a kitanítás részének tekintjük.

Az egyik vizsgálati eljárásban egy anyagot arra szkrínelünk, hogy milyen mértékben képes gátolni ciklikus nukleotid hidrolízisét, melyet PDE10 és más géncsaládokból származó PDE-k katalizálnak. A vizsgálati eljárásban, az egyes PDE-k esetén alkalmazott ciklikus nukleotid-szubsztrát koncentrációja a Km-koncentráció 1/3-a volt, ami lehetővé tette a különböző enzimekhez tartozó IC_{50}-értékek összehasonlítását. PDE-aktivitást szcintillációs közelségi vizsgálati eljáráson (*„Scintillation Proximity Assay"*; SPA) alapuló módszerrel mértük, korábban leírtak szerint

(Fawcett és mtsai., 2000). PDE-inhibitorok hatását rögzített mennyiségű enzim (PDE 1-11) vizsgálatával határoztuk meg, változtatott anyagkoncentráció és alacsony szubsztrátkoncentráció jelenlétében, így az IC_{50}-érték közelíti a K_i-értéket (jelöletlen és [^{3}H]-val jelölt cGMP-t vagy cAMP-t 3:1-arányban alkalmaztunk, 1/3 Km-koncentrációban). A vizsgálati eljárásban alkalmazott végtérfogat 100 µl volt, melyet a vizsgálati eljárásban alkalmazott pufferrel (20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 5 mM $MgCl_2$, 1 mg/ml marhaszérum-albumin) állítottunk be. A reakciókat az enzim hozzáadásával indítottuk, 30-60 percig inkubáltuk 30°C-on, ez 30%-nál kisebb szubsztrát-átvitelt eredményezett, és 50 µl ittrium-szilikát-SPA-gyöngyökkel (Amersham) állítottuk le (amely 3 mM-t tartalmazott a PDE-9 és -11-nek megfelelő jelöletlen ciklikus nukleotidból). A tálcákat újra lezártuk és 20 percig rázattuk, azután a gyöngyöket sötétben hagytuk leülepedni, és azt követően TopCount tálcaleovasóban (Packard, Meriden, CT) számláltuk a radioaktivitást. A radioaktivitás egységeit a nem gátolt aktivitás (100%) százalékaira konvertáltuk, az inhibitorkoncentráció függvényében ábrázolva, és az IC_{50}-értékekhez Microsoft Excel „Fit Curve" alkalmazásával jutottunk.

Szelektív PDE10-inhibitor például papaverin, azaz 1-[(3,4-dimetoxi-fenil)-metil]-6,7-dimetoxi-izokinolin. Ismeretes, hogy a papaverin hatékony simaizom-lazító, melyet agyi érgörcs és szívkoszorú-érgörcs, valamint erekció rendellenes működésének kezelésére alkalmaznak. Bár az említett terápiás aktivitások alapja nem jól ismert, a papaverin-

aktivitást általában nem-szelektív foszfodiészteráz-inhibitorként írják le ("The Pharmacological Basis of Therapeutics", 6. kiadás, szerk. A. G. Gilman, L. S. Goodman, A. Gilman, Macmillan Publishing Co., New York, 1980, 830. old.). Bár a papaverin természetesen előforduló növényi alkaloid, leírták teljes bioszintézisét [például Brochmann-Hanssen és mtsai., J. Pharm. Sci. 60, 1672 (1971), melyet a kitanítás részének tekintünk].

Szelektív PDE10-inhibitort a találmány szerint be lehet adni egymagában vagy kombinációban gyógyászatilag elfogadható hordozókkal, egy vagy több dózist tartalmazó formaként. Alkalmas gyógyászatilag elfogadható hordozók lehetnek inert szilárd hígítószerek vagy töltőanyagok, steril vizes oldatok és különböző szerves oldószerek. Az így előállított gyógyászati készítményeket azután könnyen be lehet adni különböző dózisegységeket tartalmazó formákban, például tabletták, porok, szögletes cukorkák, szirupok, injektálható oldatok és hasonlók formájában. Ezek a gyógyászati készítmények kívánt esetben tartalmazhatnak további alkotórészeket, például ízesítőszereket, kötőanyagokat, segédanyagokat és hasonlókat. Tehát orális beadás céljára szolgáló tabletták tartalmazhatnak különböző segédanyagokat, például nátrium-citrátot, kalcium-karbonátot vagy kalcium-foszfátot alkalmazhatunk különböző dezintegránsokkal (mállasztószerekkel), például keményítővel, metil-cellulózzal, alginsavval és bizonyos komplex szilikátokkal, kötőágensekkel, például polivinil-pirrolidonnal, szacharózzal, zselatinnal és akáciával együtt. Tablettázási célokra gyakran alkalmaznak

továbbá síkosítószereket, például megnézium-sztearátot, nátrium-lauril-szulfátot és talkumot. Hasonló típusú szilárd készítményeket is alkalmazhatunk kötőanyagként lágy és kemény, töltött zselatinkapszulákban. Erre a célra előnyösen alkalmazott anyag lehet laktóz vagy tejcukor, és nagy molekulatömegű polietilén-glikolok. Ha vizes szuszpenziókat vagy elixireket alkalmazunk orális beadás céljára, az általa tartalmazott hatóanyagot különböző édesítőszerekkel vagy ízesítő anyagokkal, színezékekkel vagy festékekkel, és kívánt esetben emulgeálószerekkel vagy szuszpendáló ágensekkel lehet kombinálni, hígítószerekkel, például vízzel, etanollal, propilén-glikollal, glicerinnel vagy ezek kombinációjával együtt.

Parenterális beadásra olyan oldatot alkalmazunk, amely szelektív PDE10-inhibitort szézám- vagy mogyoróolajban vagy vizes propilén-glikolban tartalmaz, vagy steril vizes oldatot lehet alkalmazni. Ilyen vizes oldatokat szükséges esetben pufferelni kell, és a folyékony hígítószert először izotóniássá tesszük elegendő nátrium-klorid-oldattal vagy glükózzal. Ezek a konkrét vizes oldatok különösen alkalmasak intravénás, intramuszkuláris, szubkután és intraperitoneális beadásra. Az alkalmazott steril vizes tápközegek mind könnyen előállíthatók szakember által ismert, standard technikák alkalmazásával.

Szelektív PDE10-inhibitort a találmány szerinti terápiás eljárásokban beadhatunk orálisan, transzdermálisan (például ragtapasz alkalmazásával), parenterálisan (például intravénásan), rektálisan vagy topikálisan. PDE10-inhibito-

rok napi dózisa a találmány szerinti rendellenességek és állapot kezelésére alkalmazva általában körülbelül 0,01 és körülbelül 100 mg/kg között van, a kezelendő páciens testtömegére vonatkoztatva. Például szelektív PDE10-inhibitort be lehet adni például pszichotikus rendellenesség kezelésére átlagos testtömegű (körülbelül 70 kg) embernek, körülbelül 1 mg és körülbelül 7000 mg közötti napi dózisban, előnyösen körülbelül 1 mg és körülbelül 1000 mg közötti napi dózisban, egyetlen vagy elosztott (azaz több) részletben. A fentebb említett dózistartományokra alapozva képzett orvos megválaszthatja a beadott mennyiséget, figyelembe véve ismert szempontokat, például a kezelendő személy tömegét, korát és állapotát, a betegség súlyosságát, és a kiválasztott beadási módot.

Az alábbi példákkal a találmány szerinti megoldás szemléltetésére szolgál. Azonban nyilvánvaló, hogy a találmány szerinti megoldást, melyet a leírásban és a szabadalmi igénypontokban ismertetünk, nem kívánjuk korlátozni az alábbi példákban leírt részletekkel.

1. példa

Szelektív PDE10-inhibitorok: papaverin

Papaverint szkríneltük arra vonatkozóan, hogy milyen mértékben képes ciklikus nukleotid hidrolízisét gátolni, amelyben PDE10-et és más géncsaládokból származó PDE-enzimeket alkalmaztunk. A vizsgálati eljárásban, az egyes PDE-k esetén alkalmazott ciklikus nukleotid szubsztrát koncentrációja a Km-koncentráció 1/3-a volt. Ez lehetővé tette a különböző enzimekhez tartozó IC_{50}-értékek összehasonlítását.

A PDE-aktivitást ittrium-szilikátos SPA-gyöngyöket alkalmazó vizsgálati eljárás alkalmazásával mértünk, melyet fentebb, a részletes leírásban ismertettünk. A radioaktivitás egységeit a nem gátolt aktivitás (100%) százalékaira konvertáltuk, az inhibitorkoncentráció függvényében ábrázolva, és az IC_{50}-értékekhez Microsoft Excel „Fit Curve" alkalmazásával jutottunk.

Megfigyeltük, hogy a papaverin kivételesen hatékony kompetitív inhibitora PDE10-nek, IC_{50}-értéke 18 nM (1. táblázat). A papaverin az összes többi, tesztelt PDE-vel szemben alkalmazva lényegesen kevésbé volt hatékony. PDE10 után az enzimet leghatékonyabban a PDE40 gátolta, IC_{50}-értéke 320 nM , amely 19-szer kisebb érték, mint ugyanez PDE10-re. Tehát az adatok alapján első alkalommal jelenthetjük ki, hogy a papaverin szelektív PDE10-inhibitor, és ezt a vegyületet lehet alkalmazni az említett enzim fiziológiájának vizsgálatára.

1. táblázat. IC_{50}-értékek papaverin-gátlásra a felsorolt PDE-k esetén. Meghatároztuk az IC_{50}-értékeket az egyes enzimekre, az alkalmazott szubsztrátkoncentráció a Km-érték 1/3-a volt, amely lehetővé tett különböző enzimek összehasonlítását. A PDE10-szelektivitási arányhoz úgy jutunk, hogy az adott PDE-hez tartozó IC_{50}-értéket elosztjuk a PDE10-hez tartozó IC_{50}-értékkel.

Izoenzim	IC_{50}, μM	Szelektivitási arány (IC_{50}/ IC_{50}, PDE10)
PDE10	0,018	-
PDE1	37	2,055
PDE2	9	500
PDE3A	1,3	72
PDE4A	1,9	105
PDE4B	1,4	78
PDE4C	0,8	44
PDE4D	0,32	18
PDE5	8	444
PDE6	0,86	48
PDE7	27	1500
PDE8	>10	>555
PDE9	400	20000
PDE11	11	611

2. példa

Szelektív PDE10-inhibitor hatásai ciklikus nukleotid metabolizmusára közepes méretű tüskés neuronokban

Szelektív PDE10-inhibitorként papaverin ciklikus nukleotid metabolizmusára kifejtett hatásait vizsgáltuk patkányeredetű közepes méretű tüskés neuronok primer tenyészetében, melyet az 1. példában leírtak szerint határoztunk meg.

E17-patkányembrió striatumából származó neuronokat tenyésztettünk BDNF jelenlétében, amelyek így nagyon hasonló fenotípust mutattak korábban leírt fenotípusokhoz [Ventimiglia és mtsai., Eur. J. Neurosci. 7, 213-222 (1995)]. Az ilyen neuronok körülbelül 50%-a pozitívan festődött GABA-immunoreaktivitásra, ami megerősítette közepes méretű, tüskés neuronok jelenlétét a tenyészetekben. PDE-10-mRNS expresszióját 5 DIV mértékben igazoltuk RNáz-védési vizsgálati eljárással ezekben a tenyészetekben.

Előállítottunk striatalis tenyészeteket korábban leírtak szerint [Ventimiglia és mtsai., Eur. J. Neurosci. 7, 213-222 (1995)]. Röviden összefoglalva, E17-patkányokból származó striatumokat (caudate nucleus és putamen) feldaraboltunk, előállítottunk egysejtes szuszpenziót, és 5 x 10^4 neuron/sejt sűrűségben szélesztettük több tenyésztőhelyet tartalmazó tálcákra, amelyek poli-L-ornitin/laminin-nal voltak burkolva. A sejteket B27-kiegészítést és 100 ng/ml BDNF-et tartalmazó Neurobasal-tápközegbe oltottuk. A kísérleteket tipikusan 4 napig végeztük *in vitro*. Ezekben a sejttenyészetekben a sejtek többségét a közepes tüskés

neuronok alkották (50-60%, GABA-immunoreaktivitással igazolva).

RNáz-védési vizsgálati eljáráshoz RNS-t preparáltunk ezekből a patkányeredetű, közepes méretű tüskés neuronokat tartalmazó, primer tenyészetekből centrifugálással 150.000 g-n, 20°C-on, 21 óra hosszáig, 5,7 M cézium-klorid-gradiensen, korábban leírt eljárás szerint [Iredale, P. A. és mtsai., Mol. Pharmacol. 50, 1103-1110 (1996)]. Az RNS-üledéket felszuszpendáltuk 0,3 M nátrium-acetátban (pH 5,2), etanollal kicsaptuk és a koncentrációját spektrofotometriával meghatároztuk. PDE10-ribopróbát egéreredetű cDNS-ből izolált, 914 bp méretű fragmens (megfelelt a 380-1294. bp-nak) PCR-amplifikációjával állítottunk elő. Ezt a fragmenst azután pGEM3Zf-be klónoztuk. A vektort linearizáltuk, és T7-RNS-polimerázt alkalmaztunk [^{32}P]-jelölt, antiszensz ribopróba szintetizálására. RNáz-védési vizsgálati eljárást végeztünk RPAII-reagenskészlet (Ambion) alkalmazásával. Röviden összefoglalva, 5 µg totál celluláris RNS-t hibiridizáltunk [^{32}P]-jelölt PDE10-ribopróbával (körülbelül 105 cpm/minta) egy éjszakán át 42°C-on. A következő napon a mintákat RNáz-A-val és T1-el inkubáltuk 30 percig, 37°C-on, és azután a védett, dupla szálú RNS-fragmenseket kicsaptuk, és karbamidot tartalmazó, 6%-os poliakrilamid-gélen megfuttattuk.

Papaverin ciklikus nukleotidokra kifejtett hatásainak tesztelése céljából, a striatalis sejttenyészetet 4 napos *in vitro* tenyésztés után Ca^{2+}/Mg^{2+}-mentes, foszfát-pufferolt nátrium-klorid-oldattal mostuk, és egy óra hosszáig előin-

kubáltuk Ca^{2+}/Mg^{2+}-mentes, foszfát-pufferolt nátrium-kloridot, 30 mM HEPES-t, 1 mM kalcium-kloridot, 1 mg/ml dextrózt és 5 mM magnézium-kloridot tartalmazó pufferben. A striatalis sejteket foszfodiészteráz-inhibitorok hatásának tettük ki, és húsz percig inkubáltuk 37°C-on. Ha cGMP-t mértünk, a neuronokat nátrium-nitroprusszidal (amely nitrogén-oxid-forrás) stimuláltuk két percig, ezt követően 20 percig inkubáltuk a vegyülettel. Ha cAMP-t mértünk, a neuronokat forskolinnal 20 percig stimuláltuk, amely adenilát cikláz aktivátora. A sejteket lizáltuk cAMP SPA direkt szrínelő vizsgálati eljárásban alkalmazott puffer (0,01% nátrium-azidot tartalmazó, 0,05 M acetát) és A-puffer (133 mg/ml dodecil-trimetil-ammónium-bromid) 9:1-arányú kombinációjával, és a lizátumokat száraz jégen fagyasztottuk. cGMP [I125] vagy cAMP [I125] szcintillációs közelségi vizsgálati eljárást (SPA) alkalmaztunk a megfelelő ciklikus nukleotid sejtlizátumokban lévő koncentrációjának detektálására.

A papaverin egymagában nem befolyásolta sem a cAMP, sem a cGMP alacsony alapszintjét a striatalis tenyészetekben. Ezért a vegyületek hatásait olyan körülmények között vizsgáltuk, amelyben cAMP- vagy cGMP-szintézis stimulálva volt forskolinnal vagy NO-donor nátrium-nitroprusszidal (SNP), sorrendben. A tenyészetek 20 perces stimulálása forskolinnal (0,1-10 μM) a cAMP-mennyiségek koncentráció-függő növekedését eredményezte. Ehhez hasonlóan, a tenyészetek rövid, 2 perces kezelése SNP-vel (3-1000 μM) a cGMP-mennyiségek koncentráció-függő növekedését eredményezte. Forskolin egymagában (10 μM) nem változtatta meg a cGMP-

3098

koncentrációkat, az SNP (300 μM) sem növelte a cAMP-mennyiségeket. A papaverin cAMP- és cGMP-metabolizmusra kifejtett hatásaink meghatározása céljából, striatalis tenyészeteket inkubáltunk különböző koncentrációjú vegyületekkel, és azután szubmaximálisan hatékony koncentrációban stimuláltuk forskolinnal (1 μM) vagy SNP-vel (100 μM). Az említett forskolin- vagy SNP-koncentrációk 2-3-szoros növekedést eredményeztek a cAMP és cGMP alapszintjéhez képest, sorrendben. A papaverin koncentráció-függő növekedést eredményezett az SNP-indukált cGMP-akkumulációban, 11,7 μM EC_{200}-értékkel (akkora inhibitorkoncentráció, amely 2-szeres növekedést eredményez) (2. táblázat). A maximális hatást 100 μM-nál figyeltük meg, ahol a cGMP-szintek 5-szörösére emelkedtek olyan tenyészetekben, amelyeket csak SNP-vel egymagában stimuláltunk. A papaverin cAMP-akkumulációban is okozott növekedést, forskolin-stimulált tenyészetekben. Azonban a vegyület 3,3-szor kevésbé hatékony cAMP-szint növekedésének elősegítésében, mint cGMP-re. A papaverin hatásait striatalis tenyészetekben eltérő szelektivitással rendelkező, más PDE-inhibitorokhoz hasonlítottuk (2. táblázat).

2. táblázat. cGMP és cAMP megnövekedett mennyiségének megfelelő EC_{200}-értékek patkányból származó striatalis neuronok primer tenyészetében. Az EC_{200}-értékek arra a koncentrációra utalnak, amely 200%-os növekedést okoz a cGMP- vagy cAMP-termelésben, SNP- vagy forskolin-stimulált tenyészetekben, sorrendben. Az egyes értékek jelentése: középérték ± S.E.M. a megjelölt számú kísérletből (n). Az egyes kísérletekben, valamennyi körülményt 3-6 leánytenyészetben ismételtünk.

Vegyület	cGMP, ED_{200} (μM)±S.E.M. (n)	cAMP, ED_{200} (μM)±S.E.M. (n)	cAMP/cGMP
Papaverin	11,7±8,3 (4)	38,3±11,4 (4)	3,3
Rolipram	11,7±8,3 (4)	2,5±2,0 (3)	0,09
Zaprinast	11,7±8,3 (4)	>100 (3)	1
IBMX	19,5	30,2	1,5

3. példa

Szelektív PDE10-inhibitor hatása bazális ganglionok működésének vizsgálatára kidolgozott állatmodellben

Humán és nem-humán emlősszervezeteken végzett vizsgálatokban kimutatták, hogy a bazális ganglionok igen sokféle motoros valamint kognitív és emocionális/étvággyal kapcsolatos viselkedést szabályoznak [Graybiel, A. M., Current Biology 10, R509-11 (2000)]. Rágcsálókban kifejlesztettek kísérleti modelleket, amelyeket vegyületek bazális ganglionok működésére kifejtett hatásainak meghatározására lehet

3095

alkalmazni. Azt találtuk, hogy a papaverin előre nem látható módon, egyedi profillal rendelkezik viselkedésre kifejtett hatásaiban, két ilyen modellben.

Papaverin hatását egymagában és kombinációban haloperidollal teszteltük annak meghatározása céljából, hogy milyen mértékben képes katalepsziát indukálni hím CD-patkányokban. Ezt az állatmodellt alkalmaztuk annak analizálására, hogy vegyületek milyen hatást fejtenek ki bazális ganglionok kimeneteire. Papaverint (1,0, 3,2, 10 vagy 32 mg/kg) vagy vivőanyagot szubkután adtunk be. Néhány kísérletben ezt azonnal 1,0 mg/kg haloperidol (s.c. 0,3%-os borkősavban) követte. Harminc perccel a drog beadása után, meghatároztuk a katalepszia fokát úgy, hogy az állatok első lábait egy emelvényre (10 cm magas, 1 cm átmérőjű) helyeztük, és meghatároztuk a latenciaidőt arra vonatkozóan, hogy az állatok mennyi idő alatt veszik le mindkét első lábukat az emelvényről, amelyben a latenciaidő küszöbértéke 30 másodperc volt. A latenciaidőket az egyes kezelési csoportokra Kruskall-Wallace-féle variancianalízis alkalmazásával állítottuk sorba. Post hoc analízist Mann-Whithey-féle U-teszt alkalmazásával végeztünk.

A haloperidol antipszichotikus ágens erőteljes katalepsziát idézett elő ebben a modellben, korábban leírtak szerint [Chartoff, E. és mtsai., J. Pharmacol. Exp. Ther. 291, 531-537 (1999)]. Azt találtuk, hogy a haloperidol maximális, hatékony dózisa 1 mg/kg s.c. volt. Ezzel ellentétben, papaverin nem indukált katalepsziát, ha egymagában adtuk be egészen 32 mg/kg s.c. ($p=0,86$) dózisig. Azonban az

1. ábrán látható, hogy a papaverin lehetővé tette a katalepszia kialakulását szubmaximális dózisú (0,32 mg/kg, s.c.) haloperidol alkalmazása esetén ($p<0,001$). Haloperidol-indukált katalepsziát lehetővé tevő, minimálisan hatékony papaverin-dózis 3,2 mg/kg, s.c. Ebben a kísérletben kimutattuk, hogy papaverin képes megváltoztatni bazális ganglionok kimenetét antipszichotikus aktivitással megegyező irányban.

4. példa

Szelektív PDE10-inhibitor hatása pszichózis vizsgálatára létrehozott állatmodellben

Ezután a papaverinnek a mozgási (lokomotor) aktivitására kifejtett hatását vizsgáltuk patkányokban, (előre-hátra) mozgatott dobozban. PCP-stimulált mozgás mértékének csökkenése rágcsálókban elfogadott módszer primer szkrínelésre új antipszichotikus ágensek keresésére. Az újabb, atipikus antipszichotikus ágensek általában inkább PCP-stimulált gátlást mutatnak, az amfetamin-stimulált mozgásaktivitással szemben. Kifejlett, hím, Sprague-Dawley-féle patkányokat (250-300 g) a Charles River cégtől (Wilmington, MA) szereztünk be. A mozgásaktivitást kereskedelmi forgalomban rendelkezésre álló, mozgatható boxokban (Coulbourn Instruments, Allentown, PA) határoztuk meg „crossover" mozgásviselkedés vizsgálatával. Az adatokat 5 percenként gyűjtöttük, 1 órával a drog beadása után. Az állatok egyrészt hordozót (5% DMSO, 5% Emulphor, 90% fiziológiás nátrium-klorid-oldat), fenciklidint (PCP, Sigma Chem., Co.) vagy amfetamin-szulfátot (RBI) kaptak, majd közvetlenül ezután

hordozót vagy tesztvegyületet. A statisztikai analízist Student-féle t-próba alkalmazásával végeztük.

Az amfetamin és fenciklidin (PCP) pszichostimulánsok egyaránt nagymértékben fokozták a mozgásaktivitást ebben a modellben. A papaverin egymagában (32 mg/kg, i.p.) kismértékű csökkenést idézett elő a mozgásaktivitásban, amely statisztikailag szignifikáns néhány vizsgálat szerint (2. ábra). Azonban ugyanekkora dózis papaverin szignifikáns csökkenést idézett elő 3,2 mg/kg i.p. fenciklidinnel stimulált mozgásaktivitásban, anélkül, hogy befolyásolná viselkedés szempontjából ekvivalens dózis amfetaminnal (1 mg/kg, i.p.) előidézett aktivitást.

Diszkusszió

A fentebb említettek szerint, már leírták PDE10-mRNS nagymértékű expresszióját striatumban, nucleus accumbensben és tuber olfactoriumban (szaglógumóban), *in situ* hibridizálás alkalmazásával kimutatva (Seeger, T. F. és mtsai., mint fent). Ennek megfelelő, nagy mennyiségű PDE10-fehérjét is találtunk ezekben az agyi régiókban, PDE10-fehérjére specifikus monoklonális ellenanyag alkalmazásával. A striatumban és n. accumbensben nagymértékű PDE10-mRNS-expressziót találtunk a közepes méretű, tüskés neuronokban. Közepes méretű, tüskés neuronok a striatumból, n. accumbensből és tuber olfactoriumból kimenő neuronok; és az említett agyi struktúrákban lévő összes neuron 95%-át teszik ki. Továbbá, nagy mennyiségű PDE10-fehérjét figyeltünk meg olyan közepes méretű, tüskés neuronok nyúlványaiban (axonokban és végződésekben), amelyek a striatumból, n. accumbensből és tuber

olfactoriumból más agyi régiók felé nyúlnak, például globus pallidusba és substantia nigra-ba. Ez utóbbi agyi régiókban egyébként kevés vagy nem detektálható mennyiségű PDE10-mRNS van. Tehát ezekben a régiókban nagy mennyiségű PDE10-fehérje a közepes méretű, tüskés neuronok axonjaiból és végződéseiből származik. Vizsgálatainkban továbbá kimutattuk, hogy PDE10-mRNS és -fehérje kisebb mértékben expresszálódik más agyi régiók neuronjaiban, konkrétan a kéregben (cortex), hippocampusban és kisagyban (cerebellumban).

A striatumban és nucleus accumbensben tapasztalt, nagymértékű PDE10-expresszió különösen érdekes azt tekintve, hogy ezek a bazális ganglionok fő, agykérgi bemenő magvai, valamint alapvető, idegvégződéseket tartalmazó területe a középagy dopaminerg nyúlványainak. A striatumba és ventrális nyúlványába, a nucleus accumbensbe, afferens, glutamáterg izgalom érkezik az agykéreg lényegében minden régiójából, és szubkortikális integrációs helyként működik igen sokféle kérgi aktivitásra. A dorzális striatumot általában úgy tekintjük, hogy a motoros viselkedés szabályzásában játszik szerepet, míg a ventrális régiók, például az accumbens, emocionális/étvággyal kapcsolatos viselkedések szabályzásában játszik szerepet. Tehát feltételezzük, hogy PDE10 valószínűleg olyan jeltovábbító folyamatsorban játszik szerepet, amely számos ilyen alapvető, fiziológiai folyamatot szabályoz.

A striatum kéreg felől jövő bemenete primer ingerületet biztosít a GABAerg, közepes méretű, tüskés nyúlványos neuronok (MSN) számára, amelyek az összes striatalis neuro-

nok akár 95%-át is alkothatják. Az MSN glutamáterg aktiválása viszont középagyból kiinduló, masszív dopaminerg bemenettel szabályozott. Ezen két afferens rendszer antagonisztikus természetét számos vizsgálatban kimutatták. Például laboratóriumi állatokban mozgásaktivitást lehet stimulálni dopaminreceptor-agonistákkal vagy a glutamátreceptor NMDA-altípusának antagonistájával [Carlsson, M. L. és Carlsson, A., Trends Neurosci. 13, 272-276 (1990)]. D_2-dopaminreceptor-antagonisták, például haloperidol kataleptikus hatását NMDA-receptor-antagonisták, például haloperidol-indukált génexpresszió csökkenti [Chartoff, E. és mtsai., J. Pharmacol. Exp. Ther. 291, 531-537 (1999)]. A közelmúltban kimutatták, hogy D_2-dopaminreceptorok blokkolása striatalis NMDA-receptorok foszforilált vagy aktivált állapotának növekedését eredményezi [Leveque és mtsai., Journal of Neuroscience 20, 4011-4020 (2000)].

Az a felismerés, hogy valamennyi, klinikailag hatásos antipszichotikum potenciális D_2-antagonista-aktivitással rendelkezik, ahhoz az eredeti elmélethez vezetett, amely szerint a schizophrenia szimptómái a mezolimbikus dopaminrendszer túlzott aktivitásának eredménye. Kémiai vegyületek dopamin-agonisták közvetlen vagy közvetett stimuláns tulajdonságait képesek csökkenteni, így ez fontos laboratóriumi teszttté vált új antipszichotikus ágensek kutatásában. A közelmúltban kimutatták, hogy NMDA-receptor-antagonisták, például PCP megbízhatóan reprodukálták a schizopheria pozitív, negatív és kognitív szimptómáit emberekben [Luby és mtsai., (1959); Rosenbaum és mtsai., (1959); Krystal és

mtsai., (1994)], ami a schizopheria hipofrontalitás-elméletének kifejlesztéséhez vezetett. Leegyszerűsítve, ebben az elméletben feltételezik, hogy a striatum-mediált viselkedési gátlás schizophreniában deficiens, csökkent mértékű glutamáterg, és konkrétan NMDA-receptor-mediált neurotranszmisszió következtében. Ez az elmélet teljesen összhangban van D_2-dopaminreceptor-antagonisták ismert antipszichotikus hatásával, azt véve, hogy közvetlenül vagy közvetve képesek a striatum kérgi bemenetének gátlását feloldani (a fentebb leírtak szerint). Ahhoz ragaszkodva, hogy PCP megkettőzi schizphrenia szimptómáit emberekben, PCP-stimulált mozgás elsődleges szkríneléskénti való alkalmazásához vezetett rágcsálókban, új antipszichotikus ágensek kutatása során. Újabb és valószínűleg hatékonyabb, atípusos antipszichotikus ágensek elsősorban PCP-stimulált mozgásaktivitással szemben fejtik ki hatásukat amfetamin-stimulált mozgásaktivitáshoz viszonyítva, amely úgy tűnik, alátámasztja az említett megközelítést [Gleason, S. D. és Shannon, H. E., Psychopharmacol. 129, 79-84 (1997)].

Bár antipszichotikus terápia jelenleg alkalmazott megközelítései általában membránreceptorokat vesznek célba, feltételezzük, hogy PDE10 intracelluláris manipulációival, amely NMDA-receptor hatásait fokozza vagy D_2-dopaminreceptor hatásait csökkenti az MSN-ben, szintén antipszichotikus hatásokat lehet létrehozni. Ismeretes, hogy cAMP- és PKA-aktivitás növelése striatalis neuronokban fokozza glutamátagonistákra, például NMDA-ra adott válasz mértékét [Colwell, C.S. és M.S. Levine, J. Neuroscience 15, 1704-

1713 (1995)]. Haloperidol neuroleptikus hatása szintén függ cAMP-szintek [Ward, R.P. és D.M. Dorsa, Neuroscience 89, 927-938 (1999)] és PKA-aktiválódás [Adams, M.R. és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 12157-12161 (1997)] növekedésétől. cGMP mennyisége a striatumban szintén növekszik D_2-dopaminreceptor blokkolására [Altar, C. A. és mtsai., Eur. J. Pharmacol. 181, 17-21 (1990)], és ismeretes, hogy PKG néhány, a folyamatsorban később elhlyezkedő szubsztrátja ugyanaz, mint amelyeket PKA foszforilál, például I. típusú protein foszfatáz endogén inhibitorát, DARP-t [Greengard, P. és mtsai., Brain Res. Rev. 26, 274-284 (1998)]. Ezért feltételezzük, hogy ciklikus nukleotid mennyiségét az MSN-ben, a striatumban szelektíven növelni képes ágensek esetén ésszerű módon várható, hogy striatalis funkciót képesek növelni, antipszichotikus hatást kifejtve, és hogy PDE10-inhibitor terápiásan hatékony lesz pszichózis kezelésében, mivel ilyen vegyület gátolni képes cAMP és cGMP PDE10-katalizált metabolizmusát, növelve az említett ciklikus nukleotidok mennyiségeit az MSN-ben.

A papaverinnel végzett, fentebb leírt kísérletekkel kimutattuk, hogy szelektív PDE10-inhibitor képes növelni ciklikus nukleotid koncentrációját az MSN-ekben, a bazális ganglionok striatumában. A fentebb leírt, állatmodelleken végzett kísérletekkel kimutattuk, hogy szelektív PDE10-inhibitor egyedi és nem várt változásokat képes előidézi bazális ganlionok működésében.

A bazális ganglionok abnormális működése a pszichózison kívül, különféle neuropszichiátriai állapotokat is je-

3095

lenthet, például figyelemhiányt/hiperaktivitási rendellenességet (ADHD) és ezzel összefüggő figyelemzavarokat [Seeman, P. és mtsai., Molecular Psychiatry 3, 386-96 (1998)], depressziót [Kapur, S., Biol. Psychiatry 32, 1-17 (1992); Willner, P., Brain Res. 287, 225-236 (1983)] és vegyi anyag kóros élvezetét [Self, D. W., Annals of Med. 30, 379-389 (1998)]. Számos neurológiai rendellenesség, például Parkinson-kór, „nyugtalan láb" szindróma [Hening, W. és mtsai., Sleep 22, 970-999 (1999)] és Huntington-betegség is összefügg bazális ganglionok működési zavarával. Tehát, itt közölt vizsgálataink alapján feltételezzük, hogy PDE10-inhibitor terápiás hatással rendelkezik ilyen rendellenességek esetén.

A fentebb leírtak szerint azt találtuk, hogy PDE10-mRNS és PDE10-fehérje a hippocampus és kéreg neuronjaiban is expresszálódik. Mivel a kognitív folyamatok a hippocampus és kéreg működésétől függnek, feltételezzük, hogy PDE10 kognitív folyamatokban is szerepet játszik, és hogy PDE10-inhibitort lehet alkalmazni olyan rendellenességek kezelésére, amelyeknek jellemző komponense a deficiens kognitív funkció, például Alzheimer-kór vagy kognitív képességek öregedéssel összefüggő hanyatlása esetén.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás szorongás vagy pszichotikus rendellenesség kezelésére emlősszervezetben, *azzal jellemezve*, hogy az emlősszervezetnek szelektív PDE10-inhibitor akkora mennyiségét adjuk be, amely hatásos a szorongás és pszichotikus rendellenesség kezelésére.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy pszichotikus rendellenességként a következő betegségek bármelyikét kezeljük: schizophrenia, például paranoid, dezorganizált, katatóniás, differenciálatlan vagy reziduális típus; schizophreniform rendellenesség; schizoaffektív rendellenesség, például az érzékcsalódással járó típus vagy a depresszív típus; vegyi anyag által indukált pszichotikus rendellenesség, például alkohol, amfetamin, cannabis, kokain, hallucinogének, inhalációs anyagok, opioidok vagy fenciklidin által indukált pszichózis; paranoid típusú személyiségzavar; vagy schizoid típusú személyiségzavar; és szorongásos rendellenességként a következő betegségek bármelyikét kezeljük: pánikbetegség, agorafóbia; specifikus fóbia; szociális fóbia; obszesszív-kompulzív rendellenesség; poszttraumás stresszt kísérő rendellenesség; akut stresszt kísérő rendellenesség vagy általános szorongásos rendellenesség.

3. Eljárás mozgásrendellenesség, például Huntington-betegség és dopamin-agonistát alkalmazó terápiával asszociált diszkinézia kezelésére emlősszervezetben, *azzal jellemezve*, hogy az emlősszervezetnek szelektív PDE10-inhibitor

akkora mennyiségét adjuk be, amely hatásos a rendellenesség kezelésére.

4. Eljárás mozgás-rendellenesség, például Parkinson-kór és nyugtalan láb szindróma kezelésére emlősszervezetben, *azzal jellemezve*, hogy az emlősszervezetnek szelektív PDE10-inhibitor akkora mennyiségét adjuk be, amely hatásos a rendellenesség kezelésére.

5. Eljárás kábítószer-élvezet, például alkohol-, amfetamin-, kokain- vagy ópiát-élvezet kezelésére emlősszervezetben, *azzal jellemezve*, hogy az emlősszervezetnek szelektív PDE10-inhibitor akkora mennyiségét adjuk be, amely hatásos kábítószer-élvezet kezelésére.

6. Eljárás szimptómaként deficiens kognitív képességgel járó rendellenességek kezelésére emlősszervezetben, *azzal jellemezve*, hogy az emlősszervezetnek szelektív PDE10-inhibitor akkora mennyiségét adjuk be, amely hatásos a deficiens kognitív képesség kezelésére.

7. A 6. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy rendellenességként a következő betegségek bármelyikét kezeljük: dementia, például Alzheimer-kór, multi-infarktusos dementia, alkoholos dementia vagy más, droggal kapcsolatos dementia, intrakraniális tumorokkal vagy agytraumával asszociált dementia, Huntington-betegséggel vagy Parkinson-kórral asszociált dementia vagy AIDS-el kapcsolatos dementia; delírium; amnéziás rendellenesség; poszttraumás stressz betegség; mentális visszamaradottság; tanulási rendellenesség, például olvasási készség rendellenessége, matematikai készség rendellenessége vagy írásbeli kifeje-

zőkészség rendellenessége; figyelemzavar/hiperaktivitás rendellenessége; vagy kognitív képességek öregedéssel összefüggő hanyatlása.

8. Eljárás kedélybetegség vagy kedélybeteg epizód kezelésére emlősszervezetben, *azzal jellemezve*, hogy az emlősszervezetnek szelektív PDE10-inhibitor akkora mennyiségét adjuk be, amely hatásos a rendellenesség vagy epizód kezelésére.

9. A 8. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy kedélybetegségként vagy kedélybeteg epizódként a következő betegségek bármelyikét kezeljük: enyhe, mérsékelt vagy súlyos típusú, jelentős depresszív kedélybeteg epizód, mániás vagy kevert kedélybeteg epizód, hipomániás kedélybeteg epizód; atípusos jellemzőkkel rendelkező, depresszív kedélybeteg epizód; melankólikus jellemzőkkel rendelkező, depresszív kedélybeteg epizód; katatóniás jellemzőkkel rendelkező, depresszív kedélybeteg epizód; szülés után kialakuló kedélybeteg epizód; szélütés utáni depresszió; jelentős depressziós rendellenesség; disztímiás rendellenesség (kóros lehangoltság); kismértékű depressziós rendellenesség; menstruáció előtti depressziós rendellenesség; posztpszichotikus depressziós rendellenesség schizophreniában; nagymértékű depressziós rendellenesség, amely pszichotikus rendellenességhez, például érzékcsalódáshoz vagy schizophreniához hozzáadódik; bipoláris rendellenesség, például bipoláris I. betegség, bipoláris II. betegség vagy ciklotímiás betegség.

30995

10. Eljárás PDE10 szelektív gátlására emlősszervezetben, *azzal jellemezve*, hogy az emlősszervezetnek papaverin akkora mennyiségét adjuk be, amely hatásos PDE10 gátlására.

A meghatalmazott:

DANUBIA

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

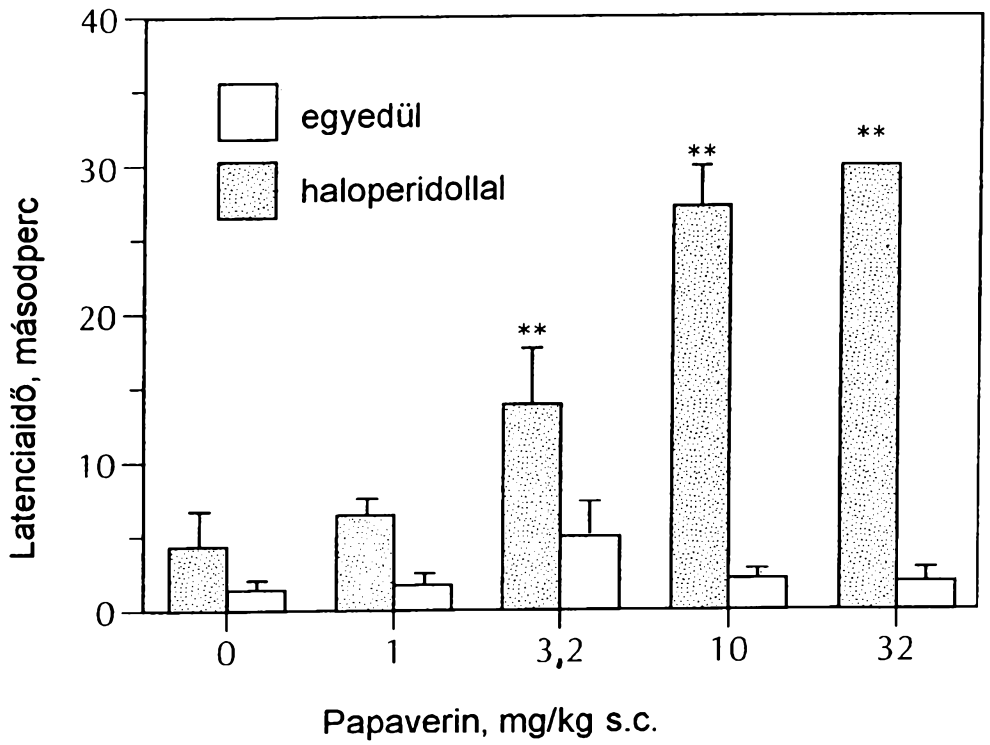
2 oldal vagyon

2002. 11. 26

dr. Pethő Árpád

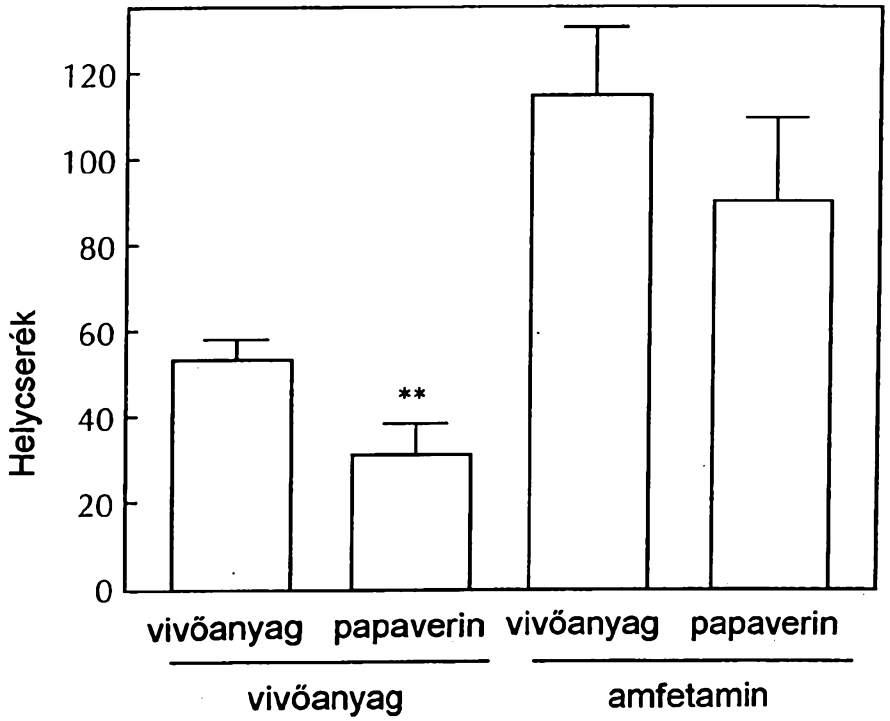
szabadalmi ügyvivő

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

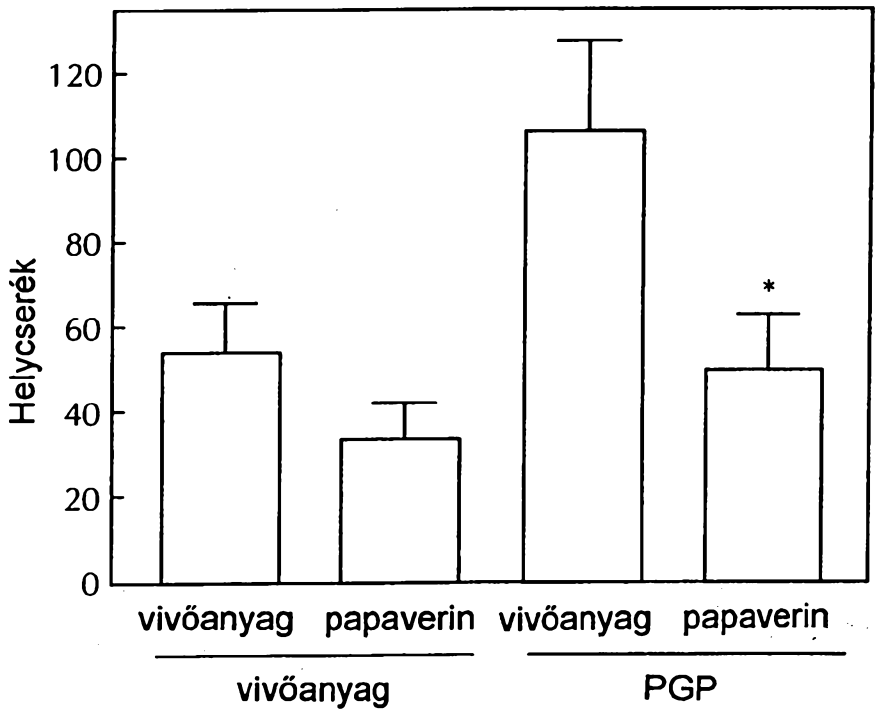


1. ábra

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



2A ábra



2B ábra