HU 0002267555 B1

(19) **HU**

MAGYAR KÖZTÁRSASÁG
Magyar Szabadalmi Hivatal

(11) Lajstromszám: **226 755** (13) **B1**

SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: **P 97 01694**
(22) A bejelentés napja: **1996. 06. 05.**

(51) Int. Cl.: ***A61K 31/40*** *(2006.01)*
C07C 209/34 *(2006.01)*

(40) A közzététel napja: **1999. 06. 28.**
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi Közlöny és Védjegyértesítőben: **2009. 09. 28.**

(86) A nemzetközi (PCT) bejelentési szám:
PCT/US 96/08903
(87) A nemzetközi közzétételi szám: **WO 9640116**

(30) Elsőbbségi adatok:
08/485,323 **1995. 06. 07.** **US**

(72) Feltalálók:
McMahon, Gerald, Kenwood, Kalifornia (US);
Sun, Li, Foster City, Kalifornia (US);
Tang, Peng Cho, Moraga, Kalifornia (US)

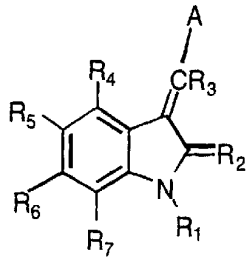
(73) Jogosult:
SUGEN, Inc., Redwood City, Kalifornia (US)

(74) Képviselő:
ifj. Szentpéteri Ádám, S. B. G. & K. Budapesti Nemzetközi Szabadalmi Iroda, Budapest

(54) **Betegségek kezelésére alkalmas indolinonszármazékok, alkalmazásuk és a vegyületeket tartalmazó gyógyászati készítmények**

(57) Kivonat

A találmány tárgyát az (I) általános képletű



(I)

vegyületek vagy azok gyógyászatilag elfogadható sói képezik, ahol

R_1 jelentése hidrogénatom;

R_2 jelentése oxigénatom vagy kénatom;

R_3 jelentése hidrogénatom;

R_4, R_5, R_6 és R_7 jelentése egymástól függetlenül hidrogénatom, alkilcsoport, alkoxicsoport, arilcsoport, aril-oxi-csoport, alkarilcsoport, alkaril-oxi-csoport, halogénatom, trihalogén-metil-csoport, S(O)R csoport, SO_2NRR' csoport, SO_3R csoport, SR csoport, NO_2 csoport, NRR' csoport, OH csoport, CN csoport, C(O)R csoport, OC(O)R csoport, NHC–(O)R csoport, $(CH_2)_nCO_2R$ csoport és CONRR' csoport;

A jelentése egy adott esetben helyettesített öttagú heteroarilcsoport;

n értéke 0–3;

R jelentése hidrogénatom, alkilcsoport vagy arilcsoport és

R' jelentése hidrogénatom, alkilcsoport vagy arilcsoport.

HU 226 755 B1

Ez a beadvány a 08/485323 sorszámú, 1995. június 7-én iktatott amerikai szabadalmi alkalmazás folytatása, így az a hivatkozás révén teljes egészében a találmány részét képezi.

1. Bevezetés

A találmány olyan új vegyületekkel kapcsolatos, melyek képesek a tirozin-kináz jelátalakítás modulálására, szabályozására és/vagy gátlására. A találmány ezenkívül kapcsolatos olyan eljárásokkal is, melyek akár a receptorcsoportba, akár a nem receptor csoportba tartozó tirozin-kinázok szabályozására, modulálására vagy gátlására vonatkoznak, a szabályozatlan tirozin-kináz jelátalakítással kapcsolatos rendellenességek, így például a sejtburjánzásos és anyagcsere-rendellenességek megelőzése és/vagy kezelése céljából.

2. A találmány háttere

A protein-tirozin-kinázok (PTK-k) az olyan fehérjék egy nagy és szerteágazó osztályát foglalják magukban, melyek enzimatikus aktivitással rendelkeznek. A protein-tirozin-kinázok fontos szerepet játszanak a sejtek növekedésének és differenciálódásának irányításában (áttekintés céljából lásd: Schlesinger & Ullrich, 1992, Neuron 9: 383–391).

A receptor tirozin-kináz által közvetített jelátalakítást például egy specifikus növekedési faktorral (ligandummal) való extracelluláris kölcsönhatás indítja el, amit receptordimerizáció, az inherens protein-tirozin-kináz-aktivitás átmeneti stimulálása és foszforiláció követ. Ily módon kötőhelyek keletkeznek az intracelluláris jelátalakító molekulák számára, ami citoplazmikus jelzőmolekulák egy sorával való komplexképződéshez vezet, ami elősegíti a megfelelő sejtválaszt (például sejt osztódását, az extracelluláris mikrokörnyezetre tett metabolikus hatásokat). Lásd: Schlesinger & Ullrich, 1992, Neuron 9: 303–391.

A receptor tirozin-kinázokat illetőleg azt is kimutatták, hogy a tirozinfoszforilációs helyek nagy affinitású kötőhelyül szolgálnak a jelzőmolekulák SH2 (src homológia) doménjei számára. Fantl és munkatársai, 1992, Cell 69: 413–423; Songyang és munkatársai, 1994, Mol. Cell. Biol. 14: 2777–2785; Songyang és munkatársai, 1993, Cell 72: 767–778 és Koch és munkatársai, 1991, Science 252: 668–678. Több olyan intracelluláris szubsztrát proteint azonosítottak, melyek a receptor tirozin-kinázokhoz (RTK-k) kapcsolódnak. Ezek két fő csoportra oszthatók: (1) azon szubsztrátok, melyek katalitikus doménnal rendelkeznek; és (2) azon szubsztrátok, melyekből hiányzik az ilyen domén, de amelyek adapterekként szolgálnak és katalitikusan aktív molekulákhoz kapcsolódnak. Songyang és munkatársai, 1993, Cell 72: 767–778. A receptorok vagy proteinek és a szubsztrátjaik SH2 doménjei közötti kölcsönhatások tulajdonságait a foszforilált tirozinreziduumokat azonnal körülvevő aminosavreziduumok határozzák meg. Az SH2 domének és az egyes receptorokon lévő foszfotirozinreziduumokat körülvevő aminosavszekvenciák közötti kötések közti különbségek összhangban vannak a szubsztrátjaik foszforilációs profiljai között megfigyelt különbségekkel. Songyang és munkatársai, 1993, Cell 72: 767–778. Ezek a megfigyelések azt sugallják, hogy az egyes receptor tirozin-kinázok funkcióját nemcsak expressziós formájuk és ligandumelérhetőségük határozza meg, hanem a bizonyos receptorok által aktivált jelátalakítási csatornák sora is. Így a foszforiláció olyan fontos szabályozólépést jelent, ami meghatározza a specifikus növekedési faktor receptorok, valamint differenciálódási faktor receptorok által felfrissített jelátalakítási csatornák szelektivitását.

A protein-tirozin-kinázokban létrejövő rendellenes expresszióról vagy mutációkról kimutatták, hogy azok szabályozatlan sejtburjánzáshoz (például rosszindulatú tumornövekedéshez) vagy kulcsfontosságú fejlődési folyamatok defektusaihoz vezetnek. Ennek következtében az orvosi társadalom jelentős összegeket fordít a protein-tirozin-kináz család tagjainak specifikus biológiai szerepének megismerésének, a differenciálódási folyamatokban betöltött szerepük, a daganatképződésben és más betegségek kialakulásában betöltött szerepük és a ligandumstimulálás hatására aktivált jelátalakítási csatornáik alapjául szolgáló biokémiai mechanizmusaik megismerésére, valamint új gyógyszerek kifejlesztésére.

A tirozin-kináz lehet receptor típusú (extracelluláris, transzmembrán és intracelluláris doménekkel), vagy nem receptor típusú (mely teljesen intracelluláris).

A receptor tirozin-kinázok. A receptor tirozin-kinázok a transzmembrán receptorok egy változatos biológiai tulajdonságokkal rendelkező nagy családját tartalmazzák. A receptor tirozin-kinázok inherens funkciói a ligandum kötésekor aktiválódnak, ami a receptor és az összetett celluláris szubsztrátok foszforilációját, ezt követően pedig celluláris válaszreakciók sorát eredményezi. Ullrich és Schlessinger, 1990, Cell 61: 203–212.

Eddig legalább tizenkilenc (19) különböző receptor tirozin-kináz alcsaládot azonosítottak. Az egyik receptor tirozin-kináz alcsaládról, melyet HER alcsaládként jelölnek, úgy gondolják, hogy az tartalmazza az EGFR, a HER2, a HER3 és a HER4 alcsaládokat. A receptorok HER alcsaládjához tartozó ligandumok közé tartozik például az epiteliális növekedési faktor [EGF (epithelial growth factor)], a TGF-α, az amfiregulin, a HB-EGF, a betacellulin és a heregulin.

A receptor tirozin-kinázok egy másik családja, melyet inzulinalcsaládnak neveznek, az INS-R, az IGF–1R és az IR-R alcsaládokat tartalmazza. Egy harmadik család, a „PDGF" alcsalád a PDGF α- és β-receptorokat, a CSFIR-t, a c-kit-et és az FLK-II-t tartalmazza. A receptor tirozin-kinázok egy másik alcsaládja, melyet FLK családként azonosítottak, ismereteink szerint a Kinase inser Domain-Receptor magzati máj kináz-1-et (fetal liver kinase) (KDR/FLK–1), a magzati máj kináz 4-et (fetal liver 4) és az fms típusú tirozin-kináz 1-et (flt–1) tartalmazza. Eredetileg e receptorok mindegyikét a vérképző növekedési faktorok receptorainak gondolták. A receptor tirozin-kinázok két további alcsaládját FGF receptor családnak (FGFR1, FGFR2, FGFR3 és FGFR4), valamint Met alcsaládnak (c-met és Ron) nevezik.

A PDGF és az FLK alcsaládok közötti hasonlóságok miatt e két alcsaláddal gyakran együtt foglalkoznak. Az ismert receptor tirozin-kináz alcsaládok leírása megtalálható Plowman és munkatársai cikkében [1994, DN&P 7 (6): 334–339], mely a hivatkozás révén a találmány részét képezi.

A nem receptor tirozin-kinázok. A nem receptor tirozin-kinázok olyan celluláris enzimekből állnak, melyekből hiányoznak az extracelluláris és a transzmembrán szekvenciák. Eddig tizenegy (11) alcsaládba (Src, Frk, Btk, Csk, Abl, Zap70, Fes/Fps, Fak, Jak, Ack és LIMK) tartozó, több mint huszonnégy nem receptor tirozin-kinázt azonosítottak. Jelenleg a nem receptor tirozin-kinázok Scr alcsaládja tartalmazza a legtöbb protein-tirozin-kinázt; idetartozik például az Scr, a Yes, a Fyn, a Lyn, az Lck, a Blk, a Hck, az Fgr és az Yrk. Az enzimek Scr alcsaládja az onkogenezishez kapcsolódik. A nem receptor tirozin-kinázok részletesebb leírását Bolen cikke adja meg (1993, Oncogene 8: 2025–2031), mely a hivatkozás révén a találmány részét képezi.

A tirozin-kinázok közül, mind a receptor tirozin-kinázok, mind pedig a nem receptor tirozin-kinázok közül sokról kiderült, hogy kapcsolatos a celluláris jelcsatornákkal, ami celluláris jelvizsgálatokhoz vezetett, melyek során megjelölték azokat a csatornákat, melyek patogén állapotokhoz, így például rákhoz, pikkelysömörhöz és túlfokozott immunválasz-reakciókhoz vezetnek.

A protein-tirozin-kinázok modulálására szolgáló vegyületek kifejlesztése. A protein-tirozin-kinázoknak a sejtburjánzás kontrollálásában, szabályozásában és modulálásában, valamint a rendellenes sejtburjánzással kapcsolatos betegségekben és rendellenességekben gyanított fontosságának fényében nagy erőfeszítéseket tettek a receptor tirozin-kinázok és nem receptor tirozin-kinázok „inhibitorainak” azonosítására, többféle megközelítésből kiindulva, például mutáns ligandumok felhasználásával (4966849 számú amerikai szabadalmi leírás), oldható receptorok és antitestek felhasználásával (WO 94/10202 számú beadvány; Kendall & Thomas, 1994, Proc. Nat'l Acad. Sci. 90: 10705–09; Kim és munkatársai, 1993, Nature 362: 841–844), RNS-ligandumok felhasználásával (Jellinek és munkatársai, Biochemistry 33: 10450–56; Takano és munkatársai, 1993, Mol. Bio. Cell 4: 358A; Kinsella és munkatársai, 1992, Exp. Cell Res. 199: 56–62; Wright és munkatársai, 1992, J. Cellular Phys. 152: 448–57) és tirozin-kináz-inhibitorok felhasználásával (WO 94/03427; WO 92/21660; WO 91/15495; WO 94/14808 és US 5330992 számú szabadalmi leírások, Mariani és munkatársai 1994, Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 35: 2268).

A közelmúltban több kísérletet tettek olyan kis molekulák beazonosítására, melyek tirozin-kináz-inhibitorokként viselkednek. Például a biszmonociklikus, a biciklikus és a heterociklusos arilvegyületeket (PCT WO 92/20642), a vinilén-aza-indol-származékokat (PCT WO 94/14808) és az 1-ciklopropil-4-piridil-kinolonokat (5330992 számú amerikai szabadalmi leírás) írták le általánosan tirozin-kináz-inhibitorokként. A rák kezelésében alkalmazható, tirozin-kináz-inhibitorokként felhasználható vegyületekként írták le a sztiril-vegyületeket (5217999 számú amerikai szabadalmi leírás), a sztiril-szubsztituált-piridil-vegyületeket (5302606 számú amerikai szabadalmi leírás), bizonyos kinazolinszármazékokat (0 566 266 A1 számú EP szabadalmi leírás), a szeleoindolokat és a szelenideket (PCT WO 94/03427), a triciklusos polihidroxilvegyületeket (PCT WO 92/21660) és a benzil-foszfonsav-vegyületeket (PCT WO 91/15495).

Ily módon kívánatos és a találmány tárgyát képezi az olyan, elegendően kis méretű vegyületek beazonosítása, melyek specifikusan gátolják a jelátalakítást a receptor tirozin-kinázok és a nem receptor tirozin-kinázok aktivitásának modulálásával, hogy szabályozzák és modulálják az abnormális és nem megfelelő sejtburjánzást.

3. A találmány összefoglalása

A találmány olyan szerves molekulákkal kapcsolatos, melyek képesek a tirozin-kináz jelátalakítás modulálására, szabályozására és/vagy gátlására. Az ilyen vegyületek hasznosak az olyan betegségek kezelésében, melyek a szabályozatlan tirozin-kináz jelátalakítással kapcsolatosak, így a sejtburjánzásos betegségek kezelésében, amilyen például a rák, az atheroszklerózis, az ízületi gyulladás vagy a resztenózis, valamint az olyan anyagcsere-betegségek kezelésében, mint amilyen például a cukorbaj.

A találmány tárgyát az (I) általános képletű vegyületek vagy azok gyógyászatilag elfogadható sói képezik, ahol

R_1 jelentése hidrogénatom;

R_2 jelentése oxigénatom vagy kénatom;

R_3 jelentése hidrogénatom;

R_4, R_5, R_6 és R_7 jelentése egymástól függetlenül hidrogénatom, alkilcsoport, alkoxicsoport, arilcsoport, aril-oxi-csoport, alkarilcsoport, alkaril-oxi-csoport, halogénatom, trihalogén-metil-csoport, –S(O)R csoport, $–SO_2NRR'$ csoport, $–SO_3R$ csoport, –SR csoport, $–NO_2$ csoport, –NRR' csoport, –OH csoport, –CN csoport, –C(O)R csoport, –OC(O)R csoport, –NHC–(O)R csoport, $–(CH_2)_nCO_2R$ csoport és –CONRR' csoport;

A jelentése egy öttagú heteroarilgyűrű, amelyet a tiofenil-, pirrolil-, pirazolil-, 1,2,3-triazolil-, 1,2,4-triazolil-, oxazolil-, izoxazolil-, tiazolil-, izotiazolil-, 2-szulfonil-furil-, 4-alkil-furil-, 1,2,3-oxadiazolil-, 1,2,4-oxadiazolil-, 1,2,5-oxadiazolil-, 1,3,4-oxadiazolil-, 1,2,3,4-oxatriazolil-, 1,2,3,5-oxatriazolil-, 1,2,3-tiadiazolil-, 1,2,4-tiadiazolil-, 1,2,5-tiadiazolil-, 1,3,4-tiadiazolil-, 1,2,3,4-tiatriazolil-, 1,2,3,5-tiatriazolil- és tetrazolilcsoportot magában foglaló csoportból választjuk, melyek adott esetben egy vagy több pozícióban alkilcsoporttal, alkoxicsoporttal, arilcsoporttal, aril-oxi-csoporttal, alkarilcsoporttal, alkaril-oxi-csoporttal, halogénatommal, trihalogén-metil-csoporttal, –S(O)R csoporttal, $–SO_2NRR'$ csoporttal, $–SO_3R$ csoporttal, –SR csoporttal, $–NO_2$ csoporttal, –NRR' csoporttal, –OH csoporttal, –CN csoporttal, –C(O)R csoporttal, –OC(O)R csoporttal, –NHC(O)R csoporttal, $–(CH_2)_nCO_2R$ csoporttal vagy –CONRR' csoporttal vannak szubsztituálva;

n értéke 0–3;

R jelentése hidrogénatom, alkilcsoport vagy arilcsoport és

R' jelentése hidrogénatom, alkilcsoport vagy arilcsoport, ahol

a fenti kifejezéseknél az

alkilcsoport 1–12 szénatomot tartalmazó, egyenes vagy elágazó láncú vagy ciklusos lánccal rendelkező alifás szénhidrogéncsoport, amely adott esetben egy vagy több, az alábbi csoportból választott szubsztituenssel helyettesített: hidroxilcsoport, cianocsoport, =O, =S, NO_2, halogénatom, $-N(CH_3)_2$, aminocsoport és –SH-csoport;

az arilcsoport jelentése egy olyan aromás csoport, amely legalább egy konjugált pi-elektronrendszerrel rendelkező gyűrűt tartalmaz, beleértve a karbociklusos aril-, a heterociklusos aril- és a biarilcsoportokat, és amely arilcsoport adott esetben egy vagy több, az alábbi csoportból választott szubsztituenssel helyettesített: halogénatom, trihalogén-metil-csoport, hidroxilcsoport, –SH, –OH, $-NO_2$, –SR általános képletű csoport, ahol R jelentése alkilcsoport, arilcsoport vagy alkil-arilcsoport, cianocsoport, alkoxicsoport, alkilcsoport és aminocsoport;

az alkarilcsoport jelentése egy olyan alkilcsoport, amely kovalensen kötődik egy arilcsoporthoz; és

az alkoxicsoport, az aril-oxi-csoport és az alkaril-oxi-csoport –O-alkil-, –O-aril- és –O-alkaril-csoportot jelent;

azzal a kikötéssel, hogy a vegyületek az alábbi vegyületektől eltérőek:

3-(pirrol-2-il-metilén)-2-indolinon;

3-(5-klór-3,4-dimetil-pirrol-2-il-metilén)-2-indolinon;

3-(3,5-dimetil-4-etil-pirrol-2-il)-2-indolinon;

3-(3,5-dimetil-4-etoxi-karbonil-pirrol-2-il)-2-indolinon;

2-[[[1-etil-2,3-dihidro-2-oxo-3-(1*H*-pirrol-2-il-metilén)-1*H*-indol-5-il]-oxi]-metil]-benzoesav;

3-(tién-2-il-metilén)-2-indolinon;

6-dietil-amino-3-[(izotiazol-2-il)-metilén]-2-indolinon;

5-klór-3-[(tiazol-2-il)-metilén]-2-indolinon; és

6-nitro-3-[(pirrol-2-il)-metilén]-2-indolinon.

A találmány további tárgya olyan gyógyszerkészítmények megadása, melyek a fentebb leírt, I általános képlettel jellemezhető vegyületek gyógyszerészeti szempontból hatékony mennyiségét tartalmazzák egy gyógyszerészeti szempontból elfogadható hordozó vagy oldószer mellett. Az ilyen gyógyszerkészítmények legjobb tudomásunk szerint modulálják a tirozin-kináz általi jelátalakítást, akár a katalitikus aktivitás gátlásával, az ATP felé mutatott affinitás gátlásával, vagy egy szubsztráttal való kölcsönhatásra vonatkozó képesség gátlásával.

Részletesebben, a találmány készítményei felhasználhatók olyan eljárásokban, melyek olyan betegségek kezelésére vonatkoznak, mint amilyen például a sejtburjánzás, a fibrotikus vagy anyagcsere-rendellenességek, így például a rák, a rostos elfajulás (fibrózis), a pikkelysömör, az atheroszklerózis, az ízületi gyulladás, valamint más, a rendellenes érfejlődéssel és/vagy érképződéssel kapcsolatos betegségek, mint amilyen például a diabetikus recehártya-betegség.

Szintén a találmány tárgyát képezi az (I) általános képletű vegyületek alkalmazása a tirozin-kináz jelátalakítással kapcsolatos rendellenességek kezelésére szolgáló gyógyszerkészítmények előállítására.

4. A találmány részletes leírása

4.1. Definíciók

A „gyógyszerészeti szempontból elfogadható sók" kifejezés olyan sókra utal, melyek megtartják a megfelelő szabad bázis biológiai hatékonyságát és tulajdonságait, és amelyeket olyan szervetlen savakkal való reakció útján kapunk meg, mint amilyen például a sósav, hidrobrómsav, a kénsav, a salétromsav, a foszforsav, a metánszulfonsav, az etánszulfonsav, a p-toluénszulfonsav, a szalicilsav, valamint más hasonló savak.

Az „alkilcsoport" kifejezés egyenes láncú, elágazásos vagy ciklikus, telített alifás szénhidrogéncsoportokra vonatkozik. Előnyösen az alkilcsoport 1–12 szénatomot tartalmaz. Még előnyösebben a kifejezés olyan kis szénatomszámú alkilcsoportokra utal, melyek 1–7 szénatomot, még előnyösebben pedig 1–4 szénatomot tartalmaznak. A jellegzetes alkilcsoportok közé tartozik például a metilcsoport, az etilcsoport, a propilcsoport, az izopropilcsoport, a butilcsoport, az izobutilcsoport, a tercier butilcsoport, a pentilcsoport, a hexilcsoport, valamint más hasonló csoportok. Az alkilcsoport adott esetben szubsztituálva lehet egy vagy több olyan szubsztituenssel, mely szubsztituensek lehetnek hidroxilcsoportok, cianocsoportok, alkoxicsoportok, =O-csoportok, =S-csoportok, NO_2-csoportok, halogénatomok, $N(CH_3)_2$-csoportok, aminocsoportok vagy SH-csoportok.

Az „alkenilcsoport" kifejezés olyan egyenes láncú, elágazásos vagy ciklikus, telítetlen alifás szénhidrogéncsoportokra vonatkozik, melyek legalább egy szénszén kettős kötést tartalmaznak. Előnyösen az alkenilcsoport 1–12 szénatomot tartalmaz. Még előnyösebben a kifejezés olyan kis szénatomszámú alkenilcsoportokra utal, melyek 1–7 szénatomot, még előnyösebben pedig 1–4 szénatomot tartalmaznak. Az alkenilcsoport adott esetben szubsztituálva lehet egy vagy több olyan szubsztituenssel, mely szubsztituensek lehetnek hidroxilcsoportok, cianocsoportok, alkoxicsoportok, =O-csoportok, =S-csoportok, NO_2-csoportok, halogénatomok, $N(CH_3)_2$-csoportok, aminocsoportok vagy SH-csoportok.

Az „alkinilcsoport" kifejezés olyan egyenes láncú, elágazásos vagy ciklikus, telítetlen alifás szénhidrogéncsoportokra vonatkozik, melyek legalább egy szénszén hármas kötést tartalmaznak. Előnyösen az alkinilcsoport 1–12 szénatomot tartalmaz. Még előnyösebben a kifejezés olyan kis szénatomszámú alkinilcsoportokra utal, melyek 1–7 szénatomot, még előnyösebben pedig 1–4 szénatomot tartalmaznak. Az alkinilcsoport adott esetben szubsztituálva lehet egy vagy több olyan szubsztituenssel, mely szubsztituensek lehetnek hidroxilcsoportok, cianocsoportok, alkoxicsoportok,

=O-csoportok, =S-csoportok, NO_2-csoportok, halogénatomok, $N(CH_3)_2$-csoportok, aminocsoportok vagy SH-csoportok.

Az „alkoxicsoport" kifejezés „–O-alkil-csoportokat" jelöl.

Az „arilcsoport" kifejezés olyan aromás csoportokat jelöl, melyek legalább egy olyan gyűrűt tartalmaznak, melyben konjugált π-elektronrendszer van. Az ilyen csoportok közé tartoznak a karbociklusos arilcsoportok, a heterociklusos arilcsoportok és a biarilcsoportok. Az arilcsoport adott esetben szubsztituálva lehet egy vagy több olyan szubsztituenssel, mely szubsztituensek lehetnek halogénatomok, trihalometilcsoportok, hidroxilcsoportok, SH-csoportok, OH-csoportok, NO_2-csoportok, amincsoportok, tioétercsoportok, cianocsoportok, alkoxicsoportok, alkilcsoportok vagy aminocsoportok.

Az „alkarilcsoport" kifejezés olyan alkilcsoportokat jelöl, melyek kovalens kötéssel kapcsolódnak egy arilcsoporthoz. Az alkilcsoport ebben az esetben előnyösen egy kis szénatomszámú alkilcsoport.

A „karboxiciklusos arilcsoport" kifejezés olyan arilcsoportokat jelöl, melyekben a gyűrű atomjai szénatomok.

A „heterociklusos arilcsoport" kifejezés olyan arilcsoportokat jelöl, melyekben a gyűrű atomjai között 1–3 heteroatom található, míg a gyűrű többi atomja szénatom. A lehetséges heteroatomok közé tartozik az oxigénatom, a kénatom és a nitrogénatom. Így a heterociklusos arilcsoportok közé tartozik például a furanilcsoport, a tienilcsoport, a piridilcsoport, a pirrolilcsoport, az N-kis szénatomszámú alkil-pirrolo-csoport, a pirimidilcsoport, a pirazinilcsoport, az imidazolilcsoport, valamint más hasonló csoportok.

Az „amidcsoport" kifejezés –C(O)–NH–R jellegű csoportokat jelöl, ahol R jelentése alkilcsoport, arilcsoport, alkil-aril-csoport vagy hidrogénatom.

A „tioamidcsoport" kifejezés –C(S)–NH–R jellegű csoportokat jelöl, ahol R jelentése alkilcsoport, arilcsoport, alkil-aril-csoport vagy hidrogénatom.

Az „amincsoport" kifejezés –N(R')R'' jellegű csoportokat jelöl, ahol R' és R'' jelentése egymástól függetlenül alkilcsoport, arilcsoport vagy alkil-aril-csoport.

A „tioéter" kifejezés –S–R jellegű csoportokat jelöl, ahol R jelentése alkilcsoport, arilcsoport vagy alkil-arilcsoport.

A „szulfonilcsoport" kifejezés $S(O)_2$–R jellegű csoportokat jelöl, ahol R jelentése arilcsoport, C(CN)=C-aril-csoport, CH_2CN-csoport, alkil-aril-csoport, szulfonamidcsoport, NH-alkil-csoport, NH-alkil-aril-csoport vagy NH-aril-csoport.

4.2. A találmány

A találmány olyan vegyületekkel kapcsolatos, melyek képesek a tirozin-kináz jelátalakítás, részletesebben a receptor tirozin-kináz és a nem receptor tirozin-kináz jelátalakítás szabályozására és/vagy modulálására.

A receptor tirozin-kináz által közvetített jelátalakítást például egy specifikus növekedési faktorral (liganddummal) való extracelluláris kölcsönhatás indítja el, amit receptordimerizáció, az inherens protein-tirozin-kináz-aktivitás átmeneti stimulálása és foszforiláció követ. Ily módon kötőhelyek keletkeznek az intracelluláris jelátalakító molekulák számára, ami citoplazmikus jelzőmolekulák egy sorával való komplexképződéshez vezet, ami elősegíti a megfelelő sejtválaszt (például sejt osztódását, az extracelluláris mikrokörnyezetre tett metabolikus hatásokat). Lásd: Schlesinger & Ullrich, 1992, Neuron 9: 303–391.

Kimutatták, hogy a tirozin foszforilációs helyek nagy affinitású kötőhelyül szolgálnak a jelzőmolekulák SH2 (src homológia) doménjei számára. Fantl és munkatársai, 1992, Cell 69: 413–423; Songyang és munkatársai, 1994, Mol. Cell. Biol. 14: 2777–2785; Songyang és munkatársai, 1993, Cell 72: 767–778 és Koch és munkatársai, 1991, Science 252: 668–678. Több olyan intracelluláris szubsztrát proteint azonosítottak, melyek a receptor tirozin-kinázokhoz (RTK-k) kapcsolódnak. Ezek két fő csoportra oszthatók: (1) azon szubsztrátok, melyek katalitikus doménnal rendelkeznek; és (2) azon szubsztrátok, melyekből hiányzik az ilyen domén, de amelyek adapterekként szolgálnak és katalitikusan aktív molekulákhoz kapcsolódnak. Songyang és munkatársai, 1993, Cell 72: 767–778. A receptorok vagy proteinek és a szubsztrátjaik SH2 doménjei közötti kölcsönhatások tulajdonságait a foszforilált tirozinreziduumokat azonnal körülvevő aminosavreziduumok határozzák meg. Az SH2 domének és az egyes receptorokon lévő foszfotirozinreziduumokat körülvevő aminosavszekvenciák közötti kötések közti különbségek összhangban vannak a szubsztrátjaik foszforilációs profiljai között megfigyelt különbségekkel. Songyang és munkatársai, 1993, Cell 72: 767–778. Ezek a megfigyelések azt sugallják, hogy az egyes receptor tirozinkinázok funkcióját nemcsak expressziós formájuk és ligandumelérhetőségük határozza meg, hanem a bizonyos receptorok által aktivált jelátalakítási csatornák sora is. Így a foszforiláció olyan fontos szabályozólépést jelent, ami meghatározza a specifikus növekedési faktor receptorok, valamint differenciálódási faktor receptorok által felfrissített jelátalakítási csatornák szelektivitását.

A tirozin-kináz jelátalakítás eredménye többek között a sejtburjánzás, a sejtdifferenciálódás és a sejtanyagcsere. Az abnormális sejtburjánzás rendellenességek és betegségek hosszú sorát idézheti elő, így például elősegítheti a kóros szövetképződést, mint amilyen például a karcinóma, a szarkóma, a leukémia, a glioblastoma, a vérérdaganat, a pikkelysömör, az arteriosclerosis, az ízületi gyulladás és a diabetikus recehártya-betegség (vagy más, a szabályozatlan érképződéssel és/vagy érfejlődéssel kapcsolatos rendellenességek).

Ezért a találmány olyan vegyületekkel foglalkozik, melyek a receptor tirozin-kinázok és/vagy a nem receptor tirozin-kinázok enzimatikus aktivitására gyakorolt hatásuk révén, valamint az ilyen fehérjék által átalakított jelek megváltoztatásával szabályozzák, modulálják és/vagy gátolják a tirozin-kináz jelátalakítást. Részletesebben a találmány olyan vegyületekkel kapcsolatos,

melyek szabályozzák, modulálják és/vagy gátolják a receptor tirozin-kinázok és/vagy a nem receptor tirozin-kinázok által közvetített jelátalakítási csatornákat; a tömör tumor sok fajtájának a gyógyítására vonatkozó gyógyászati megközelítésként. Az itt megemlíthető betegségek közé tartozik, a rájuk való korlátozás nélkül a karcinóma, a szarkóma, a leukémia, a magvas vörösvérsejt-daganat, a glioblastoma, az agyhártyadaganat, az astrocytoma, a melanoma és az izomsejtdaganat. A tünetek közé tartoznak, a rájuk való korlátozás nélkül az agydaganatok, a hólyagdaganatok, gyomorrákok, a hasnyálmirigyrák, a petefészekrák, a vastagbélrák, a vérrákok, a tüdőrákok és a csontrákok.

4.3. A vegyületek

A találmány szerinti vegyületek az (I) általános képletű vegyületek vagy azok gyógyászatilag elfogadható sói, ahol

R_1 jelentése hidrogénatom;

R_2 jelentése oxigénatom vagy kénatom;

R_3 jelentése hidrogénatom;

R_4, R_5, R_6 és R_7 jelentése egymástól függetlenül hidrogénatom, alkilcsoport, alkoxicsoport, arilcsoport, aril-oxi-csoport, alkarilcsoport, alkaril-oxi-csoport, halogénatom, trihalogén-metil-csoport, –S(O)R csoport, $–SO_2NRR'$ csoport, $–SO_3R$ csoport, –SR csoport, $–NO_2$ csoport, –NRR' csoport, –OH csoport, –CN csoport, –C(O)R csoport, –OC(O)R csoport, –NHC–(O)R csoport, $–(CH_2)_nCO_2R$ csoport és –CONRR' csoport;

A jelentése egy öttagú heteroarilgyűrű, amelyet a tiofenil-, pirrolil-, pirazolil-, 1,2,3-triazolil-, 1,2,4-triazolil-, oxazolil-, izoxazolil-, tiazolil-, izotiazolil-, 2-szulfonil-furil-, 4-alkil-furil-, 1,2,3-oxadiazolil-, 1,2,4-oxadiazolil-, 1,2,5-oxadiazolil-, 1,3,4-oxadiazolil-, 1,2,3,4-oxatriazolil-, 1,2,3,5-oxatriazolil-, 1,2,3-tiadiazolil-, 1,2,4-tiadiazolil-, 1,2,5-tiadiazolil-, 1,3,4-tiadiazolil-, 1,2,3,4-tiatriazolil-, 1,2,3,5-tiatriazolil- és tetrazolilcsoportot magában foglaló csoportból választjuk, melyek adott esetben egy vagy több pozícióban alkilcsoporttal, alkoxicsoporttal, arilcsoporttal, aril-oxi-csoporttal, alkarilcsoporttal, alkaril-oxi-csoporttal, halogénatommal, trihalogén-metil-csoporttal, –S(O)R csoporttal, $–SO_2NRR'$ csoporttal, $–SO_3R$ csoporttal, –SR csoporttal, $–NO_2$ csoporttal, –NRR' csoporttal, –OH csoporttal, –CN csoporttal, –C(O)R csoporttal, –OC(O)R csoporttal, –NHC(O)R csoporttal, $–(CH_2)_nCO_2R$ csoporttal vagy –CONRR' csoporttal vannak szubsztituálva;

n értéke 0–3;

R jelentése hidrogénatom, alkilcsoport vagy arilcsoport és

R' jelentése hidrogénatom, alkilcsoport vagy arilcsoport, ahol

a fenti kifejezéseknél az

alkilcsoport 1–12 szénatomot tartalmazó, egyenes vagy elágazó láncú vagy ciklusos lánccal rendelkező alifás szénhidrogéncsoport, amely adott esetben egy vagy több, az alábbi csoportból választott szubsztituenssel helyettesített: hidroxicsoport, cianocsoport, =O, =S, NO_2, halogénatom, $–N(CH_3)_2$, aminocsoport és –SH-csoport;

az arilcsoport jelentése egy olyan aromás csoport, amely legalább egy konjugált pi-elektronrendszerrel rendelkező gyűrűt tartalmaz, beleértve a karbociklusos aril-, a heterociklusos aril- és a biarilcsoportokat, és amely arilcsoport adott esetben egy vagy több, az alábbi csoportból választott szubsztituenssel helyettesített: halogénatom, trihalogén-metil-csoport, hidroxilcsoport, –SH, –OH, $–NO_2$, –SR általános képletű csoport, ahol R jelentése alkilcsoport, arilcsoport vagy alkil-arilcsoport, cianocsoport, alkoxicsoport, alkilcsoport és aminocsoport;

az alkarilcsoport jelentése egy olyan alkilcsoport, amely kovalensen kötődik egy arilcsoporthoz; és

az alkoxicsoport, az aril-oxi-csoport és az alkaril-oxi-csoport –O-alkil-, –O-aril- és –O-alkaril-csoportot jelent;

azzal a kikötéssel, hogy a vegyületek az alábbi vegyületektől eltérőek:

3-(pirrol-2-il-metilén)-2-indolinon;

3-(5-klór-3,4-dimetil-pirrol-2-il-metilén)-2-indolinon;

3-(3,5-dimetil-4-etil-pirrol-2-il)-2-indolinon;

3-(3,5-dimetil-4-etoxi-karbonil-pirrol-2-il)-2-indolinon;

2-[[[1-etil-2,3-dihidro-2-oxo-3-(1*H*-pirrol-2-il-metilén)-1*H*-indol-5-il]-oxi]-metil]-benzoesav;

3-(tién-2-il-metilén)-2-indolinon;

6-dietil-amino-3-[(izotiazol-2-il)-metilén]-2-indolinon;

5-klór-3-[(tiazol-2-il)-metilén]-2-indolinon; és

6-nitro-3-[(pirrol-2-il)-metilén]-2-indolinon.

Előnyös találmány szerinti vegyület a 3-[(2,4-dimetil-pirrol-5-il)-metilén]-2-indolinon.

Az említett vegyületek mutathatják a tautoméria vagy a strukturális izoméria jelenségét. Így például az itt leírt vegyületek fölvehetik a cisz- vagy a transz-konformációt az indolinon 3-szubsztituense és az indolinongyűrű közötti kettős kötésnél, vagy lehetnek a cisz- és a transz-izomerek keverékei is. Mivel a leírásban szereplő formulák rajza csak egy lehetséges tautomer vagy strukturális izomer formációt reprezentálhat, azért világosan kell látni, hogy a találmány magában foglal minden olyan tautomer vagy strukturális izomer formát, valamint ilyenek keverékét, melyben megvan a képesség a tirozin-kináz jelátalakítás vagy a sejtburjánzás szabályozására, gátlására és/vagy modulálására; és így a találmány nem korlátozódik azon tautomer vagy strukturális izomer formációkra, melyeket a formulák megrajzolásánál alapul vettünk.

A fentebb leírt vegyületeken és azok gyógyszerészeti szempontból elfogadható sóin túlmenően, ahol arra mód van, a találmány vonatkozik a vegyületek olyan szolvatált és nem szolvatált formáira is (például a hidratált formákra), melyekben megvan a képesség a sejtburjánzás szabályozására és/vagy modulálására.

Az itt leírt vegyületek minden olyan ismert módszerrel előállíthatók, mely módszerek alkalmazhatók más, kémiailag rokon vegyületek előállítására. Alkalmas eljárások bemutatása a példák között található meg. A szükséges kiindulási anyagok szokásos szerves kémiai eljárások felhasználásával állíthatók elő. Egy adott

vegyület releváns aktivitása és a receptor tirozin-kinázok által közvetített jelátalakításra hatást gyakorló szerként való hatékonysága rendelkezésre álló eljárások felhasználásával határozható meg. Előnyösen a vegyületet egy sor vizsgálatnak vetjük alá, hogy meghatározzuk arra vonatkozó képességét, hogy modulálja, szabályozza és/vagy gátolja a sejtburjánzást. Ezek a vizsgálatok, a végrehajtásuk sorrendjében, biokémiai vizsgálatokból, sejtnövekedési vizsgálatokból és in vivo kísérletekből állnak.

4.4. Tünetek

Az itt leírt vegyületek hasznosak az olyan rendellenességek kezelésében, melyek a szabályozatlan tirozin-kináz jelátalakítással kapcsolatosak. Az ilyen rendellenességek közé tartoznak a sejtburjánzásos betegségek, a fibrotikus rendellenességek és az anyagcsere-rendellenességek.

Azok közé a sejtburjánzásos betegségek közé, melyek a találmány alapján kezelhetők vagy tovább vizsgálhatók, tartoznak a rákos megbetegedések, az erek burjánzásos rendellenességei, valamint a mezangiális sejtburjánzásos rendellenességek.

Az erek burjánzásos rendellenességei olyan angiogén és vaszkulogén rendellenességeket jelentenek, melyek általában az erek abnormális burjánzását eredményezik. Az erek képződése és terjeszkedése, vagy más néven a vaszkulogenezis és az angiogenezis, sok fiziológiai folyamatban játszanak fontos szerepet, így például az embrionális fejlődésben, a corpus luteum képződésben, a sebek gyógyulásában és a szervregenerálódásban. Ezenkívül kulcsfontosságú szerepet játszanak a rák kifejlődésében is. Az erek burjánzásos rendellenességeire ad további példát az ízületi gyulladás, ahol is új hajszálerek lepik el az ízületet és tönkreteszik a porcot; az olyan szembetegségek, mint amilyen például a diabetikus recehártya-betegség, ahol a retinában új hajszálerek lepik el az üvegtestet, és vérzésükkel vakságot okoznak. Ezzel szemben az erek összezsugorodásával, kontrakciójával vagy elzáródásával kapcsolatos rendellenességek, mint amilyen például a restenosis, szintén szóba jöhetnek.

A fibrotikus rendellenességek a sejtközi állomány abnormális képződését jelentik. A fibrotikus rendellenességekre ad példát a hepaticus cirrhosis és a mezangiális sejtburjánzásos rendellenességek. A hepaticus cirrhosist a sejtközi állomány alkotórészeinek elszaporodása jellemzi, ami a máj hegesedéséhez vezet. A hepaticus cirrhosis olyan betegségeket idézhet elő, mint amilyen például a máj cirrhosisos megbetegedése. A máj hegesedéséhez vezető megnövekedett sejtközi állomány eredménye lehet olyan vírusfertőzésnek is, mint amilyen például a hepatitis. Úgy tűnik, hogy a zsírsejtek fontos szerepet játszanak a hepaticus cirrhosisban. Az egyéb idetartozó fibrotikus rendellenességek közé tartozik az atheroszklerózis (lásd alább).

A mezangiális sejtburjánzásos rendellenességek olyan rendellenességeket jelentenek, melyek a mezangiális sejtek abnormális burjánzásából fakadnak. A mezagniális burjánzásos rendellenességek közé tartozik többféle humán vesebetegség, mint amilyen például a glomerulonephritis, a diabetikus vesebaj, a rosszindulatú vesezsugorodás, a trombózisos hajszálérbetegség tünetcsoport, a szervátültetéseknél megfigyelhető kilökődés és a glomerulopathiák. A mezangiális sejtburjánzás fenntartásáért a PDGF-R a felelős. Floege és munkatársai, 1993, Kidney International 43: 47S–54S.

A protein-tirozin-kinázok kapcsolatban vannak az ilyen sejtburjánzásos rendellenességekkel. Így például a receptor tirozin-kináz család néhány tagja kapcsolatba hozható a rák kifejlődésével. E receptorok némelyike, így például az EGFR (Tuzi és munkatársai, 1991, Br. J. Cancer 63: 227–233; Trop és munkatársai, 1992, APMIS 100: 713–719), a HER2/neu (Slamon és munkatársai, 1989, Science 244: 707–712) és a PDGF-R (Kumabe és munkatársai, 1992, Oncogene 7: 627–633) sok tumorban túlzott mértékű és/vagy tartósan aktivált az autokrin hurkok által. Valójában a legelterjedtebb és legsúlyosabb rákok esetében ezeket a receptortúltengéseket (Akbasak és Suner-Akbasak és munkatársai, 1992, J. Neurol. Sci. 111: 119–133; Dickson és munkatársai, 1992, Cancer Treatment Res. 61: 249–273; Korc és munkatársai, 1992, J. Clin. Invest. 90: 1352–1360) és autokrin hurkokat (Lee és Dongohue, 1992, J. Cell. Biol. 118: 1057–1070; Korc és munkatársai, mint fentebb, Akbasak és Suner-Akbasak és munkatársai, mint fentebb) ki is mutatták. Így például az EGFR receptort kapcsolatba hozták a pikkelyes sejtkarcinómával, az astrocytomával, a glioblastomával, a fej- és nyakrákkal, a tüdőrákkal és a hólyagrákkal. A HER2-t kapcsolatba hozták az emlőrákkal, a petefészekrákkal, a gyomorrákkal, a tüdőrákkal, a hasnyálmirigyrákkal és a hólyagrákkal. A PDGF-R-t kapcsolatba hozták a glioblastomával, a tüdőrákkal, a petefészekrákkal, a pigmentsejtes rákkal és a prosztatarákkal. Az RTK c-met általában a májrák-képződéssel, és így a májsejtrákkal kapcsolatos. Ezen túlmenően a c-met kapcsolatos a rosszindulatú daganatképződéssel. Részletesebben, az RTK c-met más rákos megbetegedések között kapcsolatos a vastagbélrákkal, a pajzsmirigyrákkal, a hasnyálmirigyrákkal, a gyomorrákkal, a leukémiával és a nyirokszövet-daganattal. Ezen túlmenően a c-met gén túltengését megfigyelték Hodgkins-kóros és Burkitts-kóros betegeknél, valamint nyirokszövetráksejtek esetében is.

Az IGF–IR, azonkívül, hogy kapcsolatban van a tápanyagellátással és a II típusú cukorbajjal, több rákfajtával is kapcsolatba hozható. Így például az IGF–I autokrin növekedés stimulátorként működik több tumortípus esetében is, így például a humán mellrákkarcinóma sejtjei (Arteaga és munkatársai, 1989, J. Clin. Invest. 84: 1418–1423) és a kis tüdőtumorsejtek (Macauley és munkatársai, 1990, Cancer Res. 50: 2511–2517) esetében. Ezen túlmenően úgy tűnik, hogy az IGF–I, mely fontos szerepet játszik az idegrendszer normális növekedésében és differenciálódásában, egyben a humán gliomák egy autokrin stimulátora is. Sandberg-Nordqvist és munkatársai, 1993, Cancer Res. 53: 2475–2478. Az IGF–IR és annak ligandumainak fontosságát a sejtburjánzásban alátámasztja az a tény is, hogy sejttenyészetben sokfajta sejtet [a kötőszöveti sej-

teket, a hámsejteket, a simaizomsejteket, a T-limfocitákat, a csontvelősejteket, a porcsejteket, a csontképző sejteket, a csontvelő törzssejtjeit (stem cells)] is növekedésre serkent az IGF–I. Goldring és Goldring, 1991, Eukaryotic Gene Expression 1: 301–326. Mostanában megjelent publikációk sorozatában Baserga még azt is leírja, hogy az IGF–I-R központi szerepet játszik a degeneráció mechanizmusában, és mint ilyen, előnyben részesített célpont lehet a humán rosszindulatú daganatok széles spektrumú terápiás kezelésében. Baserga, 1995, Cancer Res. 55: 249–252; Baserga, 1994, Cell 79: 927–930; Coppola és munkatársai, 1994, Mol. Cell Biol. 14: 4588–4595.

Azonban a receptor tirozin-kinázok rendellenességei és a betegségek közötti kapcsolat nem korlátozódik kizárólag a rákra. Így például a receptor tirozin-kinázok kapcsolatba hozhatók olyan anyagcsere-betegségekkel is, mint amilyen például a pikkelysömör, a mellitcukorbaj, a sebgyógyulás, a gyulladás, valamint a neurodegeneratív betegségek. Az EGF-R például kapcsolatos a corneális és dermális sebgyógyulással. Az Insulin-R és az IGF–1R defektusai jelennek meg a II típusú mellitcukorbajban. Az egyes receptor tirozin-kinázok és terápiás megjelenéseik közötti teljesebb megfeleltetés megtalálható Plowman és munkatársai cikkében, 1994, DN&P 7: 334–339.

Nemcsak a receptor típusú tirozin-kinázok, hanem sok celluláris tirozin-kináz (CTK), így például az src, abl, fps, yes, fyn, lyn, lck, blk, hck, fgr, yrk (összefoglalta Bolen és munkatársai, 1992, FASEB J. 6: 3403–3409) is kapcsolatos a sejtburjánzásos és metabolikus jelátalakítási csatornával; és így ezek is kapcsolatba hozhatók a találmány keretei közé tartozó tünetekkel. Így például a mutáción átesett src-ről (v-src) kimutatták, hogy az a csirkében egy onkoprotein ($pp60^{v\text{-}src}$). Ezen túlmenően a celluláris homológja, a protoonkogén $pp60^{c\text{-}src}$ sok receptor onkogén jelét közvetíti. Az EGF-R vagy a HER2/neu tumorokban való túltengése például a $pp60^{c\text{-}src}$ lényeges aktiválásához vezet, ami jellemző a rosszindulatú sejtekre, de nem figyelhető meg a normális sejtek esetében. A másik oldalon, a c-scr expressziójára nézve fogyatékos egerek márványcsont-betegséges fenotípust mutatnak, azt jelezvén, hogy a c-scr kulcsfontosságú szerepet játszik az osteoclast funkciókban, és mint ilyen, kapcsolatban állhat ezzel kapcsolatos betegségekkel. Hasonlóan, a Zap 70 kapcsolatban van a T-sejt-jelzéssel.

Ezen túlmenően a találmány célját képezi azon celluláris tirozin-kinázok modulálására alkalmas vegyületek azonosítása, melyek a receptor tirozin-kináz blokkolók hatását növelik, vagy amelyek akár együttműködnek azokkal.

Végül mind a receptor tirozin-kinázok, mind a nem receptor tirozin-kinázok kapcsolatba hozhatók hiperimmun rendellenességekkel.

4.5. Gyógyszerkészítmények és azok beadási módjai

A fent leírt vegyületek embereknek beadhatók önmagukban vagy gyógyszerkészítmények formájában, megfelelő hordozókkal vagy oldószerekkel keverve. A vegyületek közvetlen felhasználásra való formulázásának technikái megtalálhatók a „Remington's Pharmaceutical Sciences" című könyvben (Mack Publishing Co., Easton, PA, legutóbbi kiadás).

4.5.1. Az adminisztráció útjai

Az adminisztráció alkalmas útjai közé tartozik például az orális, a rektális, a nyálkahártyán keresztül történő vagy az intesztinális adminisztráció, a parenterális beadás, ideértve az intramuszkuláris, a szubkután és az intramedulláris injekciókat, valamint az intratekális, a közvetlen intraventrikuláris, az intravénás, az intraperitoneális, az intranazális és az intraokuláris injekciókat.

Másik lehetőségként a vegyületek alkalmazhatók lokálisan is, így például közvetlenül a tömör tumorba injekciózva azokat, gyakran egy raktározó vagy késleltetett felszívódású készítmény formájában.

Ezen túlmenően a gyógyszerek beadhatók célzott gyógyszer-felszabadító rendszerek formájában is, így például egy tumorspecifikus antitesttel borított liposzóma formájában. A liposzómák a tumort fogják megcélozni, és ott szelektíven fognak felszívódni.

4.5.2. Összetétel/előállítás

A találmány gyógyszerkészítményei önmagukban ismert eljárások felhasználásával állíthatók elő, így például hagyományos keverési, oldási, granulálási, drazsírozási, őrlési, emulgeálási, kapszulázási, felfogási vagy liofilezési eljárások felhasználásával.

Így a találmánnyal összhangban felhasználható gyógyszerkészítmények hagyományos eljárások felhasználásával állíthatók elő, egy vagy több olyan fiziológiailag elfogadható hordozó felhasználásával, melyek olyan kötőanyagokat és segédanyagokat tartalmaznak, melyek elősegítik az aktív vegyületek feldolgozását gyógyszerészetileg alkalmazható készítményekké. A megfelelő formulázás az alkalmazás választott útjától függ.

Injekciók előállításához a találmány vegyületeit vizes oldatok formájában, előnyösen fiziológiailag összeférhető kiegyenlítő oldatok formájában használjuk fel, mint amilyen például a Hank-féle oldat, a Ringer-féle oldat vagy a fiziológiás sóoldat.

A nyálkahártyán keresztül való alkalmazáshoz az átjárandó gáthoz megfelelő penetránsokat használunk a készítményekben. Az ilyen penetránsok a szakemberek számára általában ismertek.

Orális alkalmazásra a vegyületeket úgy formulázhatjuk meg könnyen, hogy az aktív vegyületeket összekeverjük a szakemberek számára jól ismert gyógyszerészeti szempontból elfogadható hordozókkal. Az ilyen hordozók lehetővé teszik, hogy a találmány vegyületeiből tablettákat, drazsékat, kapszulákat, folyadékokat, zseléket, szirupokat, szuszpenziókat, valamint más hasonló készítményeket állítsunk elő, melyet a kezelésre szoruló beteg szájon át vehet be. Orális alkalmazásra való gyógyszerkészítményeket szilárd kötőanyagok felhasználásával állíthatunk elő tabletták vagy drazséma-

gok formájában, adott esetben a keletkező elegy megőrlésével, a szemcsék elegyének feldolgozásával, és amennyiben szükséges, megfelelő segédanyagok hozzáadásával. A megfelelő kötőanyagok közé tartoznak különösen az olyan töltőanyagok, mint amilyenek például a cukrok, így például a laktóz, a szacharóz, a mannitol vagy a szorbitol; olyan cellulózkészítmények, mint amilyen például a kukoricakeményítő, a búzakeményítő, a rizskeményítő, a burgonyakeményítő, a zselatin, a tragakantmézga, a metil-cellulóz, a hidroxipropil-metil-cellulóz, a nátrium-karboxi-metil-cellulóz és/vagy a poli(vinil-pirrolidon) (PVP). Amennyiben az kívánatos, a készítményekhez dezintegrálószerek is adhatók, mint amilyen például a keresztkötéses poli(vinil-pirrolidon), az agar, az alginsav vagy annak egy sója, mint amilyen például a nátrium-alginát.

A drazsémagokat megfelelő bevonattal látjuk el. Erre a célra használhatók olyan telített cukoroldatok, melyek adott esetben tartalmazhatnak gumiarábikumot, talkot, poli(vinil-pirrolidon)-t, karbopolgélt, polietilénglikolt és/vagy titánium-dioxidot, lakkoldatokat és megfelelő szerves oldószereket vagy oldószerelegyeket. A tablettákhoz vagy a drazsék bevonatához festékanyagokat vagy pigmentanyagokat is hozzáadhatunk az azonosíthatóság kedvéért, vagy a különböző mennyiségű aktív vegyületet tartalmazó készítmények megjelölésére.

Az orálisan alkalmazható gyógyszerkészítmények közé tartoznak a zselatinból készült „push-fit" kapszulák, valamint a zselatinból és egy lágyítószerből, mint amilyen például a glicerol vagy a szorbitol, készült lágy, lezárt kapszulák. A push-fit kapszulák az aktív hatóanyagukat tartalmazhatják olyan töltőanyagokkal elkeverve, mint amilyen például a laktóz, olyan kötőanyagokkal elkeverve, mint amilyenek például a keményítők, és/vagy olyan lubrikánsokkal elkeverve, mint amilyen például a talk vagy a magnézium-sztearát; adott esetben további stabilizárószerekkel együtt. A lágy kapszulákban az aktív hatóanyag megfelelő folyadékokban, így például zsíros olajokban, folyékony paraffinban vagy folyékony polietilénglikolokban van feloldva vagy szuszpendálva. Ezenkívül ezek is tartalmazhatnak más stabilizálószereket. Az orális alkalmazásra szánt készítményeket az ilyen alkalmazáshoz megfelelő dózisokban kell előállítani.

Az orális (buccal) alkalmazáshoz a készítményeket hagyományos eljárások felhasználásával készült tabletták vagy pasztillák formájában állíthatjuk elő.

A találmánnyal összhangban álló inhalálásos adminisztrációra a vegyületeket kényelmesen aeroszolspray formájában hozhatjuk forgalomba, túlnyomásos palackokban vagy egy porlasztóban, megfelelő hajtógáz, például diklór-difluor-metán, triklór-fluor-metán, diklór-tetrafluor-etán, szén-dioxid, vagy más megfelelő gáz felhasználásával. Nyomás alatt lévő aeroszol esetében a dózisegységet egy olyan szelep segítségével állíthatjuk be, ami egy adott mennyiség kibocsátását biztosítja. Inhalálókészülékben vagy befúvókészülékben való alkalmazásra a például zselatinból készült kapszulákat és patronokat úgy állíthatjuk elő, hogy azok a vegyületnek és egy alkalmas poralapnak, például laktóznak vagy keményítőnek a porkeverékét tartalmazzák.

A vegyületekből készíthetők injekciózással, például egyszeri injekciózással vagy folyamatos infúzióval parenterálisan beadható készítmények is. Az injekciózásra szolgáló készítmények forgalomba hozhatók egységadagok formájában, például ampullák alakjában, vagy több adagot tartalmazó tartályokban, tartósítószer hozzáadása mellett. A készítmények előállíthatók szuszpenziók, oldatok vagy emulziók formájában, olajos vagy vizes hordozókban, és tartalmazhatnak olyan anyagokat, mint amilyenek például a szuszpendálószerek, a stabilizálószerek és/vagy a diszpergálószerek.

A parenterális alkalmazásra szolgáló gyógyszerkészítmények közé tartoznak az aktív vegyületek vízoldható formáinak vizes oldatai. Ezen túlmenően az aktív vegyületek szuszpenziói előállíthatók megfelelő olajos, beinjekciózásra alkalmas szuszpenziókként. A megfelelő lipofil oldószerek vagy hordozók közé tartoznak az olyan zsíros olajok, mint amilyen például a szezámolaj, az olyan zsírsav-észterek, mint amilyen például az etiloleát vagy a trigliceridek, vagy a liposzómák. A beinjekciózásra alkalmas vizes szuszpenziók olyan anyagokat tartalmazhatnak, melyek fokozzák a szuszpenzió viszkozitását, így például nátrium-karboxi-metil-cellulózt, szorbitolt vagy dextránt. Adott esetben a szuszpenzió tartalmazhat megfelelő stabilizálószereket vagy olyan szereket is, melyek megnövelik a vegyületek oldhatóságát, így lehetővé téve nagy koncentrációjú oldatok előállítását.

Másik lehetőségként az aktív hatóanyag lehet olyan por formájában, melyet felhasználás előtt elkeverünk egy megfelelő hordozóval, például steril, pirogénmentes vízzel.

A vegyületeket rektális készítmények formájában is előállíthatjuk, például kúpok vagy beöntések alakjában, melyek például olyan hagyományos kúpalapokat tartalmazhatnak, mint amilyen a kakaóvaj vagy más gliceridek.

Az eddig leírt készítményeken túlmenően a vegyületek előállíthatók raktározó- („depot") készítményekként is. Az ilyen hosszú távon ható készítmények adminisztrálhatók beültetéssel (például szubkután vagy intramuszkuláris beültetéssel), vagy intramuszkuláris injekciózással. Ilyenkor a vegyületeket megfelelő polimer vagy hidrofób anyagokkal formulázzuk meg (például egy alkalmas olajban lévő emulzióként), ioncserélő gyantákkal szereljük ki, vagy olyan gyengén oldódó származékokként hozzuk forgalomba, mint amilyen például egy gyengén oldódó só.

A találmány hidrofób vegyületeihez alkalmas gyógyszerészeti hordozók olyan oldószerrendszerek, melyek benzil-alkoholt, egy nem poláros felületaktív anyagot, egy vízzel elegyedő szerves polimert és egy vizes fázist tartalmaznak. Az oldószerrendszer lehet például a VPD oldószerrendszer. A VPD egy olyan oldat, mely 3% (w/v%) benzil-alkoholt, 8% (w/v%) polisziorbát 80 nem poláros felületaktív anyagot és 65% (w/v%) polietilénglikol 300-at tartalmaz, és amelynek a

végső térfogatát abszolút etanollal állítjuk be. A VPD oldószerrendszer (VPD:5W) 5%-os dextrózzal 1:1 arányban felhígított VPD-t tartalmaz egy vizes oldatban. Az oldószerrendszer hidrofób vegyületeket is felold úgy, hogy közben csak alacsony toxicitási szintet idéz elő a szervezeti adminisztráció esetén. Természetesen egy oldószerrendszer összetételének arányai jelentősen megváltoztathatók anélkül, hogy oldhatósági és toxicitási jellemzőit elrontanánk. Sőt, az oldószerrendszernek még az összetevőin is változtathatunk, így például a poliszorbát 80 helyett használhatunk más kis toxicitású nem poláros felületaktív anyagot; megváltoztathatjuk a polietilénglikol-frakció méretét; a polietilénglikol helyett használhatunk más biokompatibilis polimert, például poli(vinil-pirrolidon)-t; a dextróz helyett pedig használhatunk más cukrokat vagy poliszacharidokat.

A hidrofób gyógyszerészeti vegyületekből más készítményeket is készíthetünk. A hidrofób gyógyszerekhez való hordozókra ismert például szolgálnak a liposzómák és emulziók. Bizonyos szerves oldószerek, mint amilyen például a dimetil-szulfoxid, szintén alkalmazhatók, bár általában csak a nagyobb toxicitás árán. Ezen túlmenően a vegyületek egy késleltetett felszívódású rendszer felhasználásával is bejuttathatók a szervezetbe. Az ilyen rendszerekre ad példát az aktív hatóanyagot tartalmazó tömör hidrofób polimerek féligáteresztő állománya. Sok késleltetett felszívódású anyagot azonosítottak már, melyek a szakemberek számára jól ismertek. A késleltetett felszívódású kapszulák, kémiai természetüktől függően néhány héttől több mint 100 napig terjedő időtartam alatt szabadítják fel az aktív vegyületeket. A gyógyszer kémiai természetétől és biológiai stabilitásától függően a proteinstabilizáció további módszerei is alkalmazhatók.

A gyógyszerkészítmények ezenkívül tartalmazhatnak megfelelő szilárd vagy gélfázisú hordozókat vagy kötőanyagokat is. Az ilyen hordozókra és kötőanyagokra ad példát, a rájuk való korlátozás nélkül, a kalciumkarbonát, a kalcium-foszfát, sok cukorféle, a keményítők, a cellulózszármazékok, a zselatin és az olyan polimerek, mint amilyenek például a polietilénglikolok.

A találmány protein-tirozin-kinázokat moduláló vegyületei közül sok megadható gyógyszerészeti szempontból elfogadható ionpárral rendelkező sók formájában. Gyógyszerészeti szempontból elfogadható sók képezhetők sok savval, így például, a rájuk való korlátozás nélkül, sósavval, kénsavval, ecetsavval, tejsavval, borkősavval, almasavval, szukcinsavval stb. A savak általában jobban oldódnak vízben és más protikus oldószerekben, mint a megfelelő szabad bázisok.

4.5.3. A hatékony dózis

A találmány szerinti felhasználásra alkalmas gyógyszerkészítmények közé azok a készítmények tartoznak, melyek az aktív vegyületet a kívánt célnak megfelelő mennyiségben tartalmazzák. Pontosabban megfogalmazva a gyógyszerészeti szempontból hatékony mennyiség az aktív vegyület olyan mennyiségét jelenti, mely hatékony a kezelt betegség tüneteinek megelőzésére, enyhítésére vagy javítására, vagy a kezelt beteg túlélési idejének meghosszabbítására. A gyógyszerészeti szempontból hatékony mennyiség meghatározása nem haladja meg a szakemberek képességeit, különösen az itt megadott részletes leírás fényében.

A találmány módszereiben felhasznált bármely vegyületre vonatkozó gyógyszerészeti szempontból hatékony dózis sejttenyészet-vizsgálatok alapján becsülhető meg előzetesen. Például a dózisok állatkísérletekben való alkalmazásával megállapíthatunk egy olyan körülbelüli koncentrációsávot, ami magában foglalja a sejttenyészetek alapján meghatározott IC_{50}-értéket (vagyis azt a koncentrációját a tesztvegyületnek, mely a protein-tirozin-kináz-aktivitás maximális gátlásának a felét éri el). Az ilyen információ felhasználható az ember esetében megfelelő dózis pontosabb meghatározására.

Az itt leírt vegyületek toxicitása és terápiás hatékonysága sejttenyészeteken vagy kísérleti állatokon elvégzett standard gyógyszerészeti eljárások felhasználásával állapítható meg. Így határozható meg például az LD_{50}-érték (a populáció 50%-ára halálos dózis) és az ED_{50}-érték (a populáció 50%-ánál gyógyszerészeti szempontból hatékony dózis). A toxikus és a terápiás hatékonyság közötti dózisarány a terápiás index, ami az LD_{50}-érték és az ED_{50}-érték hányadosával fejezhető ki. Azok a vegyületek az előnyösek, melyek magas terápiás indexszel rendelkeznek. Ezekből a sejttenyészet-vizsgálatokból és állatkísérletekből származó adatok felhasználhatók az emberi felhasználásra vonatkozó dózishatárok megállapítására. Az ilyen vegyületek adagolása előnyösen abba az ED_{50}-érték körüli sávba esik, ahol a toxicitás még kicsi, vagy egyáltalán nem jelentkezik. Az adagolás ezeken a határokon belül változhat, az alkalmazott készítmény fajtájától és az alkalmazás módjától függően. A legmegfelelőbb készítményt, az alkalmazás módját és adagolását az orvos választhatja meg a beteg állapotának ismeretében (lásd például Fingl és munkatársai, 1975, „The Pharmacological Basis of Therapeutics", 1. fejezet 1. oldal).

A dózisszintek és dózissávok minden adott esetben külön-külön állíthatók be úgy, hogy az aktív részlet plazmaszintje olyan legyen, ami elegendő a kinázmoduláló hatások vagy a minimális hatékony koncentráció (MEC, minimal effective concentration) fenntartására. A minimális hatékony koncentráció minden vegyület esetében más és más lesz, de minden esetben megbecsülhető in vitro adatok alapján; például a kináz 50–90%-os gátlásának eléréséhez szükséges koncentráció alapján, melyet az itt leírt vizsgálatok felhasználásával kaphatunk meg. A minimális hatékony koncentráció eléréséhez szükséges dózis függeni fog az egyedi jellemzőktől és az alkalmazás módjától. HPLC vizsgálatok vagy biológiai tesztek mégis használhatók a plazmakoncentráció meghatározására.

A dózisintervallumok meghatározására a minimális hatékony koncentráció értéke is felhasználható. A vegyületek olyan diéta mellett alkalmazandók, ami a plazmaszintet a minimális hatékony koncentráció felett tart-

ja az idő 10–90%-ában, előnyösebben az idő 30–90%-ában, legelőnyösebben pedig 50–90%-ában.

Helyi alkalmazás vagy szelektív felszívódás esetén a gyógyszer hatékony helyi koncentrációja nem biztos, hogy összefüggésben van a plazmakoncentrációval.

Az alkalmazott készítmény mennyisége természetesen függeni fog a kezelés alanyától, annak testsúlyától, a betegség súlyosságától, az alkalmazás módjától, valamint a kezelést végző orvos ítéletétől.

4.5.4. Csomagolás

A készítmény, amennyiben az kívánatos, forgalomba hozható olyan csomagolásban vagy adagolókészülékben, mely egy vagy több, aktív hatóanyagot tartalmazó egységadagot tartalmazhat. A csomagolás állhat például fém- vagy műanyag fóliából, mint amilyen például a hólyagcsomagolás (blister pack). A csomaghoz vagy az adagolókészülékhez csatolhatók az alkalmazásra vonatkozó utasítások is. A találmány vegyületeit megfelelő gyógyszerészeti hordozóban tartalmazó készítmények szintén előállíthatók, megfelelő csomagolásba helyezhetők, és elláthatók olyan címkékkel, melyeken fel van tüntetve egy megjelölt betegség kezelése. A címkén szereplő betegségek közé tartozhat valamely tumor kezelése, az érképződés gátlása, a fibrózis, a cukorbaj, valamint más hasonló betegségek kezelése.

5. Példák: A vegyületek előállítása

A találmány vegyületei ismert eljárások felhasználásával állíthatók elő. A következő példák a találmány vegyületeinek előnyben részesített előállítási módszereit adják meg.

5.1. A 3-szubsztituált-2-indolinon-analogonok általános előállítása

A találmány 3-szubsztituált-2-indolinon-vegyületeinek az előállítására az alábbi módszereket alkalmazzuk.

5.1.1. A) eljárás

A megfelelő oxindol (2-indolinon) 1 ekv. mennyiségének, a megfelelő aldehid 1,2 ekv. mennyiségének és 0,1 ekv. mennyiségű piperidin etanolban (1–2 ml/1 mmol oxindol) lévő reakcióelegyét 90 °C hőmérsékleten 3–5 órán keresztül keverjük. Hűtés után a csapadékot szűrjük, hideg etanollal mossuk és szárítjuk, hogy megkapjuk a célvegyületet.

5.1.2. B) eljárás

A megfelelő aldehidek Vilsmeier-reakcióval történő előállítása

1,2 ekv. *N,N*-dimetil-formamid 1,2-diklór-etánban (2,0 ml/1,0 mmol kiindulási anyag) lévő oldatához cseppenként hozzáadunk 1,2 ekv. foszfor(V)-oxi-kloridot 0 °C hőmérsékleten. Ezután az alkalmazott jégfürdőt eltávolítjuk, és a reakcióelegyet további 30 percen keresztül keverjük. Ezután az így keletkező oldathoz részletenként hozzáadjuk a kiindulási anyag 1,0 ekv. mennyiségét, és a reakcióelegyet 50–70 °C hőmérsékleten 5–48 órán keresztül keverjük. Ezután a reakcióelegyet 1 N jéghideg nátrium-hidroxid-oldatra öntjük (pH=9 keverés után), és az így keletkező elegyet szobahőmérsékleten 1 órán keresztül keverjük. A szerves fázist elválasztjuk, a vizes réteget pedig etil-acetáttal extraháljuk. Az összeöntött szerves fázisokat a 7-es pH eléréséig mossuk sóoldattal, vízmentes nátrium-szulfáton szárítjuk és párologtatjuk. A visszamaradó anyagot szilikagél oszlopon kromatografáljuk, eluálószerként etil-acetát és hexán elegyéből álló oldatot használva, hogy megkapjuk a címvegyületet.

A 3-szubsztituált-2-indolinon-analogonok előállítása

A megfelelő oxindol (2-indolinon) 1 ekv. mennyiségének, a megfelelő aldehid 1,2 ekv. mennyiségének és 0,1 ekv. mennyiségű piperidin etanolban (1–2 ml/1 mmol oxindol) lévő reakcióelegyét 90 °C hőmérsékleten 3–5 órán keresztül keverjük. Hűtés után a csapadékot szűrjük, hideg etanollal mossuk és szárítjuk, hogy megkapjuk a célvegyületet.

5.2. A 3-benzilidén-2-indolinon előállítása

A 3-benzilidén-2-indolinon előállítására vonatkozó előnyben részesített eljárás a következő: 2,0 ml metanolban lévő 137,0 mg oxindol oldatához hozzáadunk 123,2 μl benzaldehidet és 40 μl piperidint. A reakcióelegyet 3 órán keresztül visszafolyatjuk, majd az elegyet jeges vizes fürdőben lehűtjük. Az így keletkező csapadékot szűrjük, hideg metanollal mossuk, és egy sütőben 40 °C hőmérsékleten egy éjszakán keresztül szárítjuk. Ezt az eljárást alkalmazva hozzávetőlegesen 129,0 mg mennyiségben kapjuk meg a címvegyületet.

5.3. A 3-[(pirid-4-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

A 3-[(pirid-4-il)-metilén]-2-indolinon előállítására vonatkozó előnyben részesített eljárás a következő: 2,0 ml metanolban lévő 138,0 mg oxindol oldatához hozzáadunk 117,0 μl 4-piridil-karboxaldehidet és 40 μl piperidint. A reakcióelegyet 3 órán keresztül visszafolyatjuk, majd az elegyet jeges vizes fürdőben lehűtjük. Az így keletkező csapadékot szűrjük, hideg metanollal mossuk, és egy sütőben 40 °C hőmérsékleten egy éjszakán keresztül szárítjuk, hogy 134,5 mg mennyiségben megkapjuk a címvegyületet.

5.4. A 3-[4-(morfolin-4-il)-benzilidenil]-2-indolinon előállítása (B eljárás)

4-(Morfolin-4-il)-benzaldehid. 15 ml N,N-dimetil-formamid 50 ml 1,2-diklór-etánban lévő oldatához cseppenként hozzáadunk 10 ml foszfor(V)-oxi-kloridot 0 °C hőmérsékleten. Ezután az alkalmazott jégfürdőt eltávolítjuk, és a reakcióelegyet további 30 percen keresztül keverjük. Az így keletkező oldathoz részletenként hozzáadunk 16,3 g 4-fenil-morfolint, és a reakcióelegyet 2 napon keresztül visszafolyatjuk. Az így keletkező reakcióelegyhez hozzáadunk 2,5 ml trietil-amint, és az elegyet 2 napon keresztül visszafolyatjuk. Ezután a reakcióelegyet 1 N jéghideg nátrium-hidroxid-oldatra öntjük (pH=9 keverés után), és az így keletkező ele-

gyet szobahőmérsékleten 1 órán keresztül keverjük. A szerves fázist elválasztjuk, a vizes réteget pedig 2×20 ml diklór-metánnal extraháljuk. Az összeöntött szerves fázisokat a 7-es pH eléréséig mossuk sóoldattal, vízmentes nátrium-szulfáton szárítjuk és párologtatjuk. A visszamaradó anyagot szilikagél oszlopon szeparáljuk, eluálószerként etil-acetát és hexán elegyéből álló oldatot használva, hogy 12,95 g (68%) mennyiségben megkapjuk a címvegyületet egy fehér szilárd anyag formájában.

A 3-[4-(morfolin-4-il)-benzilidenil]-2-indolinon. 6,66 g oxindol, 11,50 g 4-(morfolin-4-il)-benzaldehid és 5 ml piperidin 50 ml etanolban lévő reakcióelegyét 90 °C hőmérsékleten 5 órán keresztül keverjük. Hűtés után a csapadékot szűrjük, hideg etanollal mossuk és szárítjuk, hogy 15,0 g mennyiségben (98%) megkapjuk a címvegyületet egy sárga szilárd anyag formájában.

5.5. A 3-[4-(4-formil-piperazin-1-il)-benzilidenil]-2-indolinon előállítása (B eljárás)

4-(4-Formil-piperazin-1-il)-benzaldehid. 2,3 ml (30 mmol) N,N-dimetil-formamid 10 ml 1,2-diklóretánban lévő oldatához cseppenként hozzáadunk 2,8 ml (30 mmol) foszfor(V)-oxi-kloridot 0 °C hőmérsékleten. Ezután az alkalmazott jégfürdőt eltávolítjuk, és a reakcióelegyet további 15 percen keresztül keverjük. Az így keletkező oldathoz részletenként hozzáadunk 3,2 ml (20 mmol) 1-fenil-piperidint, és a reakcióelegyet egy éjszakán keresztül visszafolyatjuk. Ezután a reakcióelegyet 2 N jéghideg nátrium-hidroxid-oldatra öntjük, és az így keletkező elegyet szobahőmérsékleten 1 órán keresztül keverjük. A szerves fázist elválasztjuk, a vizes réteget pedig 2×20 ml etil-acetáttal extraháljuk. Az összeöntött szerves fázisokat a 7-es pH eléréséig mossuk sóoldattal, vízmentes nátrium-szulfáton szárítjuk és párologtatjuk. A visszamaradó anyagot szilikagél oszlopon szeparáljuk, eluálószerként etil-acetátot és hexánt használva, hogy 1,5 g (40%) mennyiségben megkapjuk a címvegyületet egy fehér szilárd anyag formájában.

A 3-[4-(4-formil-piperazin-1-il)-benzilidenil]-2-indolinon. 133,15 mg oxindol, 228,3 mg 4-(piperazin-1-il)-benzaldehid és 3 csepp piperidin 2 ml etanolban lévő reakcióelegyét 90 °C hőmérsékleten 5 órán keresztül keverjük. Hűtés után a csapadékot szűrjük, hideg etanollal mossuk és szárítjuk, hogy 199,5 mg mennyiségben (65%) megkapjuk a címvegyületet egy sárga szilárd anyag formájában.

5.6. A 3-[4-(4-piperidin-1-il)-benzilidenil]-2-indolinon előállítása (B eljárás)

4-(Piperidin-1-il)-benzaldehid. 3,9 ml (30 mmol) N,N-dimetil-formamid 20 ml 1,2-diklór-etánban lévő oldatához cseppenként hozzáadunk 3 ml (3,9 mmol) foszfor(V)-oxi-kloridot 0 °C hőmérsékleten. Ezután az alkalmazott jégfürdőt eltávolítjuk, és a reakcióelegyet további 15 percen keresztül keverjük. Az így keletkező oldathoz részletenként hozzáadunk 16,0 g (10 mmol) 1-fenil-piperazint, és a reakcióelegyet 50 °C hőmérsékleten 1 órán keresztül keverjük. Ezután a reakcióelegyet 1 N jéghideg nátrium-hidroxid-oldatra öntjük, és az így keletkező elegyet szobahőmérsékleten 1 órán keresztül keverjük. A szerves fázist elválasztjuk, a vizes réteget pedig 2×20 ml etil-acetáttal extraháljuk. Az összeöntött szerves fázisokat a 7-es pH eléréséig mossuk sóoldattal, vízmentes nátrium-szulfáton szárítjuk és párologtatjuk. A visszamaradó anyagot szilikagél oszlopon szeparáljuk, eluálószerként etil-acetát és hexán elegyéből álló oldatot használva, hogy 9,0 g (41%) mennyiségben megkapjuk a címvegyületet egy világossárga szilárd anyag formájában.

A 3-[4-(piperidin-1-il)-benzilidenil]-2-indolinon. 134,0 mg oxindol, 226,8 mg 4-(piperidin-1-il)-benzaldehid és 3 csepp piperidin 2 ml etanolban lévő reakcióelegyét 90 °C hőmérsékleten 5 órán keresztül keverjük. Hűtés után a csapadékot szűrjük, hideg etanollal mossuk és szárítjuk, hogy 268,5 mg mennyiségben (88%) megkapjuk a címvegyületet egy sárga szilárd anyag formájában.

5.7. A 3-[2-klór-4-metoxi-benzilidenil]-2-indolinon előállítása

2-Klór-4-metoxi-benzaldehid. 10 ml N,N-dimetil-formamidban lévő 1,0 g (6,4 mmol) 2-klór-4-hidroxi-benzaldehid, 4,4 g (32 mmol) kálium-karbonát és 1,4 g (9,6 mmol) metil-jodid reakcióelegyét 70 °C hőmérsékleten 2 órán keresztül keverjük, majd jeges vízbe öntjük. Az így keletkező csapadékot szűrjük, vízzel mossuk és egy vákuumsütőben 40 °C hőmérsékleten szárítjuk egy éjszakán keresztül, hogy 750 mg (68%) mennyiségben megkapjuk a címvegyületet egy világos rózsaszín szilárd anyag formájában.

3-[2-Klór-4-metoxi-benzilidenil]-2-indolinon. 487,9 mg (3,7 mmol) oxindol, 750 mg (4,3 mmol) 2-klór-4-metoxi-benzaldehid és 4 csepp piperidin 5 ml etanolban lévő reakcióelegyét 90 °C hőmérsékleten 5 órán keresztül hevítjük, majd szobahőmérsékletre hűtjük. Az így keletkező sárga csapadékot szűrjük, hideg etanollal mossuk, és egy vákuumsütőben 40 °C hőmérsékleten szárítjuk egy éjszakán keresztül, hogy 680,2 mg mennyiségben (62%) megkapjuk a címvegyületet.

5.8. A 3-[(4-metil-tien-2-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

133,0 mg oxindol, 151,2 mg 4-metil-tiofén-2-karboxaldehid és 3 csepp piperidin 3 ml etanolban lévő reakcióelegyét 90 °C hőmérsékleten 3 órán keresztül keverjük. Hűtés után a csapadékot szűrjük, hideg etanollal mossuk és szárítjuk, hogy 147,3 mg mennyiségben (61%) megkapjuk a címvegyületet egy sárga szilárd anyag formájában.

5.9. A 3-[(3-metil-pirrol-2-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

133,0 mg oxindol, 130,9 mg 3-metil-pirrol-2-karboxaldehid és 3 csepp piperidin 2 ml etanolban lévő reakcióelegyét 90 °C hőmérsékleten 3 órán keresztül keverjük. Hűtés után a csapadékot szűrjük, hideg eta-

nollal mossuk és szárítjuk, hogy 150,9 mg mennyiségben (67%) megkapjuk a címvegyületet egy sárga szilárd anyag formájában.

5.10. A 3-[(3,4-dimetil-pirrol-2-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

A 3-[(3,4-dimetil-pirrol-2-il)-metilén]-2-indolinont a J. Heterociclic Chem. 13: 1145–1147 (1976)-ban leírtak szerint állítjuk elő.

Etil-4-metil-pirrol-3-karboxilát. 11,86 g (0,1 mol) etil-krotonát és 19,50 g (0,1 mol) p-toluénszulfonil-metil-izocianid-éter és dimetil-szulfoxid 2:1 arányú, 500 ml térfogatú elegyében lévő oldatát szobahőmérsékleten cseppenként hozzáadjuk 6,8 g nátrium-hidrid (60%-os ásványi olajos diszperzió, 0,17 mol) éterben lévő szuszpenziójához. A hozzáadás befejeztével a reakcióelegyet 30 percen keresztül keverjük, és felhígítjuk 400 ml vízzel. A vizes réteget 3×100 ml éterrel extraháljuk. Az összeöntött éterextraktumokat egy timföld-oszlopon vezetjük át, eluálószerként diklór-metánt használva. A szerves oldószert elpárologtatjuk, és az így visszamaradó anyagot állás közben engedjük megszilárdulni. Ezt a szilárd anyagot hexánnal mossuk, és egy vákuumsütőben 40 °C hőmérsékleten szárítjuk egy éjszakán keresztül, hogy 12,38 g (80%) mennyiségben megkapjuk a címvegyületet.

3,4-Dimetil-pirrol előállítása. 23 g (80 mmol) nátrium-dihidrobisz(2-metoxi-etoxi-aluminát) oldatához szobahőmérsékleten, nitrogénatmoszféra alatt cseppenként hozzáadjuk 5 g (34 mmol) etil-4-metil-pirrol-3-karboxilát 50 ml benzénben lévő oldatát. A reakcióelegyet 18 órán keresztül keverjük. A reakcióelegyhez hozzáadunk 100 ml vizet. A szerves fázist elválasztjuk, sóoldattal mossuk és vízmentes nátrium-szulfáton szárítjuk. Az oldószert eltávolítjuk, a visszamaradó anyagot pedig desztilláljuk, hogy 1,2 g (44%) mennyiségben megkapjuk a címvegyület.

3,4-Dimetil-pirrol-2-karboxaldehid előállítása. 0,92 ml (12 mmol) N,N-dimetil-formamid 10 ml 1,2-diklór-etánban lévő oldatához cseppenként hozzáadunk 1,0 ml (12 mmol) foszfor(V)-oxi-kloridot 0 °C hőmérsékleten. Ezután az alkalmazott jégfürdőt eltávolítjuk, és a reakcióelegyet további 30 percen keresztül keverjük. Az így keletkező oldathoz részletenként hozzáadunk 960,0 mg (10 mmol) 3,4-dimetil-pirrolt, és a reakcióelegyet 50 °C hőmérsékleten 5 órán keresztül keverjük. Ezután a reakcióelegyet 1 N jéghideg nátrium-hidroxid-oldatba öntjük (pH=9 keverés után), és az így keletkező elegyet szobahőmérsékleten 1 órán keresztül keverjük. A szerves fázist elválasztjuk, a vizes réteget pedig etil-acetáttal extraháljuk. Az összeöntött szerves fázisokat a 7-es pH eléréséig mossuk sóoldattal, vízmentes nátrium-szulfáton szárítjuk és párologtatjuk. A visszamaradó anyagot szilikagél oszlopon kromatografáljuk, eluálószerként etil-acetát és hexán elegyéből álló oldatot használva, hogy 610 mg (50%) mennyiségben megkapjuk a címvegyületet.

3-[(3,4-Dimetil-pirrol-2-il)-metilén]-2-indolinon. 67,0 mg (0,5 mmol) oxindol, 73,0 mg (0,6 mmol) 3,4-dimetil-pirrol-2-karboxaldehid és 2 csepp piperidin 2 ml etanolban lévő reakcióelegyét 90 °C hőmérsékleten 3 órán keresztül keverjük. Hűtés után a csapadékot szűrjük, hideg etanollal mossuk és szárítjuk, hogy 87,7 mg mennyiségben (37%) megkapjuk a címvegyületet egy sárga szilárd anyag formájában.

5.11. A 3-[(2,4-dimetil-3-etoxi-karbonil-pirrol-5-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

134,0 mg oxindol, 234,3 mg 4-etoxi-karbonil-3,5-dimetil-pirrol-2-karboxaldehid és 3 csepp piperidin 3 ml etanolban lévő reakcióelegyét 90 °C hőmérsékleten 3 órán keresztül keverjük. Hűtés után a csapadékot szűrjük, hideg etanollal mossuk és szárítjuk, hogy 244,6 mg mennyiségben (79%) megkapjuk a címvegyületet egy sárga szilárd anyag formájában.

5.12. A 3-[(2,3-dimetil-pirrol-5-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

134,0 mg oxindol, 147,8 mg 3,5-dimetil-pirrol-2-karboxaldehid és 3 csepp piperidin 2 ml etanolban lévő reakcióelegyét 90 °C hőmérsékleten 3 órán keresztül keverjük. Hűtés után a csapadékot szűrjük, hideg etanollal mossuk és szárítjuk, hogy 136,7 mg mennyiségben (57%) megkapjuk a címvegyületet egy sárga szilárd anyag formájában.

5.13. A 3-[(2-metil-merkapto-tien-5-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

134,0 mg oxindol, 189,9 mg 5-metil-merkapto-tiofén-2-karboxaldehid és 3 csepp piperidin 2 ml etanolban lévő reakcióelegyét 90 °C hőmérsékleten 3 órán keresztül keverjük. Hűtés után a csapadékot szűrjük, hideg etanollal mossuk és szárítjuk, hogy 246,6 mg mennyiségben (90%) megkapjuk a címvegyületet egy narancssárga szilárd anyag formájában.

5.14. A 3-[(2-metil-tien-5-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

134,0 mg oxindol, 151,42 mg 5-metil-tiofén-pirrol-2-karboxaldehid és 3 csepp piperidin 2 ml etanolban lévő reakcióelegyét 90 °C hőmérsékleten 3 órán keresztül keverjük. Hűtés után a csapadékot szűrjük, hideg etanollal mossuk és szárítjuk, hogy 237,8 mg mennyiségben (99%) megkapjuk a címvegyületet egy sárga szilárd anyag formájában.

5.15. A 3-[(3-metil-tien-2-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

134,0 mg oxindol, 151,4 mg 3-metil-tiofén-2-karboxaldehid és 3 csepp piperidin 2 ml etanolban lévő reakcióelegyét 90 °C hőmérsékleten 3 órán keresztül keverjük. Hűtés után a csapadékot szűrjük, hideg etanollal mossuk és szárítjuk, hogy 157,8 mg mennyiségben (65%) megkapjuk a címvegyületet egy sárga szilárd anyag formájában.

5.16. A 3-(2,5-dimetoxi-benzilidenil)-2-indolinon előállítása

A 3-(2,5-dimetoxi-benzilidenil)-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.17. A 3-(2,3-dimetoxi-benzilidenil)-2-indolinon előállítása

A 3-(2,3-dimetoxi-benzilidenil)-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.18. A 3-(3-bróm-6-metoxi-benzilidenil)-2-indolinon előállítása

A 3-(3-bróm-6-metoxi-benzilidenil)-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.19. A 3-[4-(4-t-butil-karbonil-piperazin-1-il)-benzilidenil]-2-indolinon előállítása

A 3-[4-(4-t-butil-karbonil-piperazin-1-il)-benzilidenil]-2-indolinont a B eljárás szerint állítjuk elő.

5.20. A 3-[(furan-2-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

A 3-[(furan-2-il)-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.21. A 3-(4-acetamido-benzilidenil)-2-indolinon előállítása

A 3-(4-acetamido-benzilidenil)-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.22. A 3-(2-klór-4-hidroxi-benzilidenil)-2-indolinon előállítása

A 3-(2-klór-4-hidroxi-benzilidenil)-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.23. A 3-(4-bróm-benzilidenil)-2-indolinon előállítása

A 3-(4-bróm-benzilidenil)-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.24. A 3-(4-acetil-amino-benzilidenil)-2-indolinon előállítása

A 3-(4-acetil-amino-benzilidenil)-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.25. A 3-(2-metoxi-benzilidenil)-2-indolinon előállítása

A 3-(2-metoxi-benzilidenil)-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.26. A 3-(4-dimetil-amino-benzilidenil)-1-metil-2-indolinon előállítása

A 3-(4-dimetil-amino-benzilidenil)-1-metil-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.27. A 3-(4-dimetil-amino-benzilidenil)-2-indolinon előállítása

A 3-(4-dimetil-amino-benzilidenil)-2-indolinon a Maybridge Chemical Co. Ltd.-től szerezhető be.

5.28. A 3-(4-bróm-benzilidenil)-1-metil-2-indolinon előállítása

A 3-(4-bróm-benzilidenil)-1-metil-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.29. Az 5-klór-3-(4-dimetil-amino-benzilidenil)-2-indolinon előállítása

Az 5-klór-3-(4-dimetil-amino-benzilidenil)-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.30. A 3-(4-bróm-benzilidenil)-5-klór-2-indolinon előállítása

A 3-(4-bróm-benzilidenil)-5-klór-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.31. A 3-(4-dietil-amino-benzilidenil)-2-indolinon előállítása

A 3-(4-dietil-amino-benzilidenil)-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.32. A 3-(4-di-n-butil-amino-benzilidenil)-2-indolinon előállítása

A 3-(4-di-n-butil-amino-benzilidenil)-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.33. Az 1-metil-3-[4-(morfolin-4-il)-benzilidenil]-2-indolinon előállítása

Az 1-metil-3-[4-(morfolin-4-il)-benzilidenil]-2-indolinont a B eljárás szerint állítjuk elő.

5.34. Az 5-klór-3-(4-(morfolin-4-il)-benzilidenil)-2-indolinon előállítása

Az 5-klór-3-(4-(morfolin-4-il)-benzilidenil)-2-indolinont a B eljárás szerint állítjuk elő.

5.35. A 3-(3,4-diklór-benzilidenil)-2-indolinon előállítása

A 3-(3,4-diklór-benzilidenil)-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.36. A 3-(2-etoxi-benzilidenil)-2-indolinon előállítása

A 3-(2-etoxi-benzilidenil)-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.37. A 3-(4-fluor-benzilidenil)-2-indolinon előállítása

A 3-(4-fluor-benzilidenil)-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.38. A 3-[(tien-2-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

A 3-[(tien-2-il)-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.39. A 3-(2-metoxi-benzilidenil)-2-indolinon előállítása

A 3-(2-metoxi-benzilidenil)-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.40. A 3-[2-[3,5-di(trifluor-metil)-fenil]-furan-5-il]-etilén]-2-indolinon előállítása

A 3-[-2[3,5-di(trifluor-metil)-fenil]-furan-5-il]-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.41. A 2,6-di(dimetil-amino)-3,5-di[(indolin-2-on-3-ilidenil)-metil]-fenil-cianid előállítása

A 2,6-di(dimetil-amino)-3,5-di[(indolin-2-on-3-ilidenil)-metil]-fenil-cianidot az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.42. A 3-[(3-(2-karboxi-etil)-4-metil-pirrol-5-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

A 3-[(3-(2-karboxi-etil)-4-metil-pirrol-5-il)-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.43. A 3-[(3,4-dibróm-5-metil-pirrol-2-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

A 3-[(3,4-dibróm-5-metil-pirrol-2-il)-metilén]-2-indolinont a B eljárás szerint állítjuk elő.

5.44. A 3-[(3,4-dimetil-2-formil-pirrol-5-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

A 3-[(3,4-dimetil-2-formil-pirrol-5-il)-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.45. A 3-{[4-(2-metoxi-karbonil-etil)-3-metil-pirrol-5-il]-metilén}-2-indolinon előállítása

A 3-{[4-(2-metil-karbonil-etil)-2-metil-pirrol-5-il]-metilén}-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.46. A 3-[(2-jód-furan-5-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

A 3-[(2-jód-furan-5-il)-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.47. A 3-[(3-etoxi-karbonil-2-metil-furan-5-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

A 3-[(3-etoxi-karbonil-2-metil-furan-5-il)-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.48. A 3-[(3-bróm-tien-2-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

A 3-[(3-bróm-tien-2-il)-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.49. A 3-[(2-klór-tien-5-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

A 3-[(2-klór-tien-5-il)-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.50. A 3-[(2,3-dimetil-furan-5-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

A 3-[(2,3-dimetil-furan-5-il)-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.51. A 3-[(5-nitro-tien-2-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

A 3-[(5-nitro-tien-2-il)-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.52. A 3-[(2-karboxi-tien-5-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

A 3-[(2-karboxi-tien-5-il)-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.53. A 3-[(2-bróm-tien-5-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

A 3-[(2-bróm-tien-5-il)-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.54. A 3-[(4-bróm-tien-2-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

A 3-[(4-bróm-tien-2-il)-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.55. A 3-[(2-szulfonil-furan-5-il)-metilén]-2-indolinon nátriumsójának az előállítása

A 3-[(szulfonil-furan-5-il)-metilén]-2-indolinon nátriumsóját az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.56. A 3-[(furan-2-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

A 3-[(furan-2-il)-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.57. A 3-[(2-metil-furan-5-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

A 3-[(2-metil-furan-5-il)-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.58. A 3-[(2-etil-furan-5-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

A 3-[(2-etil-furan-5-il)-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.59. A 3-[(2-nitro-furan-5-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

A 3-[(2-nitro-furan-5-il)-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.60. A 3-[(5-bróm-furan-2-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

A 3-[(5-bróm-furan-2-il)-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.61. A 3-[(2-etil-tien-5-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

A 3-[(2-etil-tien-5-il)-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.62. A 3-[(4,5-dimetil-3-etil-pirrol-2-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

A 3-[(4,5-dimetil-3-etil-pirrol-2-il)-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.63. A 3-[(5-etoxi-karbonil-4-etoxi-karbonil-etil-3-etoxi-karbonil-metil-pirrol-2-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

A 3-[(5-etoxi-karbonil-4-etoxi-karbonil-etil-3-etoxi-karbonil-metil-pirrol-2-il)-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.64. A 3-[(5-karboxi-3-etil-4-metil-pirrol-2-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

A 3-[(5-karboxi-3-etil-4-metil-pirrol-2-il)-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.65. A 3-[(3,5-dijód-4-metil-pirrol-2-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

A 3-[(3,5-dijód-4-metil-pirrol-2-il)-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.66. A 3-[(5-klór-3-metoxi-karbonil-4-metoxi-karbonil-metil-pirrol-2-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

A 3-[(5-klór-3-metoxi-karbonil-4-metoxi-karbonil-metil-pirrol-2-il)-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.67. A 3-[(3-acetil-5-etoxi-karbonil-4-metil-pirrol-2-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

A 3-[(3-acetil-5-etoxi-karbonil-4-metil-pirrol-2-il)-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.68. A 3-[[1-(3,5-diklór-fenil)-pirrol-2-il]-metilén]-2-indolinon előállítása

A 3-[[1-(3,5-diklór-fenil)-pirrol-2-il]-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.69. A 3-[1-((4-klór-fenil)-pirrol-2-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

A 3-[1-((4-klór-fenil)-pirrol-2-il)-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.70. A 3-[((4-etoxi-karbonil-3-metil)-pirrol-2-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

A 3-[((4-etoxi-karbonil-3-metil)-pirrol-2-il)-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.71. A 3-[(1-metil-pirrol-2-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

A 3-[(1-metil-pirrol-2-il)-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.72. A 3-[(5-etoxi-karbonil-3-etoxi-karbonil-etil-4-etoxi-karbonil-metil-pirrol-2-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

A 3-[(5-etoxi-karbonil-3-etoxi-karbonil-etil-4-etoxi-karbonil-metil-pirrol-2-il)-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.73. A 3-[4-(pirrolidin-1-il)-benzilidenil]-2-indolinon előállítása

A 3-[4-(pirrolidin-1-il)-benzilidenil]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.74. A 3-[(5-metil-imidazol-2-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

A 3-[(5-metil-imidazol-2-il)-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.75. A 3-[(5-metil-tiazol-2-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

A 3-[(5-metil-tiazol-2-il)-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.76. A 3-[(3-metil-pirazol-5-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

A 3-[(3-metil-pirazol-5-il)-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.77. A 3-[(imidazol-4-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

A 3-[(imidazol-4-il)-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.78. A 3-[(4-klór-pirazol-3-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

A 3-[(4-klór-pirazol-3-il)-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.79. A 3-[(4-bróm-1-(4-klór-benzil)-pirazol-5-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

A 3-[(4-bróm-1-(4-klór-benzil)-pirazol-5-il)-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.80. A 3-[(4-klór-1-metil-pirazol-3-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

A 3-[(4-klór-1-metil-pirazol-3-il)-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.81. A 3-[(4-etil-3,5-dimetil-pirrol-2-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

A 3-[(4-etil-3,5-dimetil-pirrol-2-il)-metilén]-2-indolinont a B eljárás szerint állítjuk elő.

5.82. A 3-[(5-etil-pirrol-2-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

A 3-[(5-etil-pirrol-2-il)-metilén]-2-indolinont a B eljárás szerint állítjuk elő.

5.83. A 3-[(3,5-dimetil-4-(propen-2-il)-pirrol-2-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

A 3-[(3,5-dimetil-4-(propen-2-il)-pirrol-2-il)-metilén]-2-indolinont a B eljárás szerint állítjuk elő.

5.84. Az 5,6-dimetoxil-3-[2,3-dimetoxil-benzilidenil]-2-indolinon előállítása

Az 5,6-dimetoxil-3-[2,3-dimetoxil-benzilidenil]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.85. A 3-[2,4,6-trimetoxi-benzilidenil]-2-indolinon előállítása

A 3-[2,4,6-trimetoxi-benzilidenil]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.86. Az 5-klór-3-[(pirrol-2-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

Az 5-klór-3-[(pirrol-2-il)-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.87. Az 5-klór-3-[(3-metil-pirrol-2-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

Az 5-klór-3-[(3-metil-pirrol-2-il)-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.88. A 3-(4-izopropil-benzilidenil)-2-indolinon előállítása

A 3-(4-izopropil-benzilidenil)-2-indolinon beszerezhető a Maybridge Chemical Co. Ltd.-től.

5.89. Az 5-klór-3-[(3,5-dimetil-pirrol-2-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

Az 5-klór-3-[(3,5-dimetil-pirrol-2-il)-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.90. A 3-[(pirrol-2-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

A 3-[(pirrol-2-il)-metilén]-2-indolinon beszerezhető a Maybridge Chemical Co. Ltd.-től.

5.91. Az 5-klór-3-[(indol-3-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

Az 5-klór-3-[(indol-3-il)-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.92. Az 5-klór-3-[(tien-2-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

Az 5-klór-3-[(tien-2-il)-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.93. Az 5-klór-3-[(3-metil-tien-2-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

Az 5-klór-3-[(3-metil-tien-2-il)-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.94. Az 5-klór-3-[(5-metil-tien-2-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

Az 5-klór-3-[(5-metil-tien-2-il)-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.95. Az 5-klór-3-[(5-etil-tien-2-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

Az 5-klór-3-[(5-etil-tien-2-il)-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.96. Az 5-klór-3-[(5-metil-merkapto-tien-2-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

Az 5-klór-3-[(5-metil-merkapto-tien-2-il)-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.97. Az 5-klór-3-[(imidazol-2-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

Az 5-klór-3-[(imidazol-2-il)-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.98. A 3-[2,4-dimetoxi-6-metil-benzilidenil]-2-indolinon előállítása

A 3-[2,4-dimetoxi-6-metil-benzilidenil]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.99. Az 3-nitro-3-[(3-pirrol-2-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

Az 5-nitro-3-[(3-pirro-2-il)-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.100. A 3-[(3-metil-pirrol-2-il)-metilén]-5-nitro-2-indolinon előállítása

A 3-[(3-metil-pirrol-2-il)-metilén]-5-nitro-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.101. A 3-[(3,5-dimetil-pirrol-2-il)-metilén]-5-nitro-2-indolinon előállítása

A 3-[(3,5-dimetil-pirrol-2-il)-metilén]-5-nitro-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.102. A 3-[(indol-3-il)-metilén]-5-nitro-2-indolinon előállítása

A 3-[(indol-3-il)-metilén]-5-nitro-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.103. Az 5-nitro-3-[(tien-2-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

Az 5-nitro-3-[(tien-2-il)-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.104. A 3-[(3-metil-tien-2-il)-metilén]-5-nitro-2-indolinon előállítása

A 3-[(3-metil-tien-2-il)-metilén]-5-nitro-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.105. A 3-[(5-metil-tien-2-il)-metilén]-5-nitro-2-indolinon előállítása

A 3-[(5-metil-tien-2-il)-metilén]-5-nitro-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.106. A 3-[(5-etil-tien-2-il)-metilén]-5-nitro-2-indolinon előállítása

A 3-[(5-etil-tien-2-il)-metilén]-5-nitro-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.107. A 3-[(5-metil-merkapto-tien-2-il)-metilén]-5-nitro-2-indolinon előállítása

A 3-[(5-metil-merkapto-tien-2-il)-metilén]-5-nitro-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.108. A 3-[(imidazol-2-il)-metilén]-5-nitro-2-indolinon előállítása

A 3-[(imidazol-2-il)-metilén]-5-nitro-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.109. A 3-[(oxazol-2-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

A 3-[(oxazol-2-il)-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.110. A 3-[(oxazol-4-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

A 3-[(oxazol-4-il)-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.111. A 3-[(oxazol-5-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

A 3-[(oxazol-5-il)-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.112. A 3-[(tiazol-2-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

A 3-[(tiazol-2-il)-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.113. A 3-[(tiazol-4-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

A 3-[(tiazol-4-il)-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.114. A 3-[(tiazol-5-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

A 3-[(tiazol-5-il)-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.115. A 3-[(imidazol-2-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

A 3-[(imidazol-2-il)-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.116. A 3-[(pirazol-3-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

A 3-[(pirazol-3-il)-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.117. A 3-[(pirazol-4-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

A 3-[(pirazol-4-il)-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.118. A 3-[(izoxazol-3-2-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

A 3-[(izoxazol-3-il)-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.119. A 3-[(izoxazol-4-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

A 3-[(izoxazol-4-il)-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.120. A 3-[(izoxazol-5-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

A 3-[(izoxazol-5-il)-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.121. A 3-[(izotiazol-3-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

A 3-[(izotiazol-3-il)-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.122. A 3-[(izotiazol-4-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

A 3-[(izotiazol-4-il)-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.123. A 3-[(izotiazol-5-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

A 3-[(izotiazol-5-il)-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.124. A 3-[(1,2,3-triazol-4-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

A 3-[(1,2,3-triazol-4-il)-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.125. A 3-[(1,3,4-tiadiazol-2-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

A 3-[(1,3,4-tiadiazol-il)-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.126. A 3-[(5-fenil-1,2,4-oxadiazol-3-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

A 3-[(5-fenil-1,2,4-oxadiazol-3-il)-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.127. A 3-[(3-fenil-1,2,4-oxadiazol-5-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

A 3-[(3-fenil-1,2,4-oxadiazol-5-il)-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

5.128. A 3-[(3-fenil-1,2,5-oxadiazol-4-il)-metilén]-2-indolinon előállítása

A 3-[(3-fenil-1,2,5-oxadiazol-4-il)-metilén]-2-indolinont az A eljárás szerint állítjuk elő.

6. Példák: In vitro *RTK vizsgálatok*

A találmány különböző vegyületeinek az aktivitási szintjét és egy vagy több receptor tirozin-kinázra gyakorolt hatását a következő in vitro vizsgálatok felhasználásával állapíthatjuk meg. Ugyanezen irányelvek alapján bármely másik tirozin-kinázra is tervezhető hasonló vizsgálat, szakemberek számára jól ismert módszerek felhasználásával.

6.1. Enzimkötésű immunoszorbens vizsgálat (ELISA, Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Az enzimkötésű immunoszorbens vizsgálatok (ELISA, Enzyme Linked Immunosorbent Assay) felhasználásával kimutatható és megmérhető a tirozin-kináz-aktivitás jelenléte. Az ELISA ismert eljárások szerint végezhető el, melyek leírása megtalálható például: Voller és munkatársai, 1980, „Enzyme-Linked Immunosorbent Assay", a Manual of Clinical Immunology című könyvben, 2. kiadás, kiadta Rose és Friedman, 359–371. oldal, Am. Soc. of Microbiology, Washington, D.C.

A leírt eljárás adaptálható egy specifikus receptor tirozin-kináz aktivitásának a meghatározására is. Specifikus receptor tirozin-kinázokra vonatkozó ELISA kísérletek elvégzésének előnyben részesített módjait alább adjuk meg. Ezeknek az eljárásoknak az adaptálása egy vegyületnek a receptor tirozin-kináz család más tagjaival vagy nem receptor tirozin-kinázokkal szemben mutatott aktivitásának a meghatározására szakemberek számára nem okozhat nehézséget.

6.1.1. FLK–1 ELISA

Az FLK–1 receptor kináz aktivitásának, pontosabban az FLK–1 receptoron megfigyelhető protein-tirozin-kináz-aktivitás gátlásának vagy aktiválásának a mérésére egy ELISA vizsgálatot végzünk el. Még pontosabban a következő vizsgálatot végezzük el FLK–1/NIH3T3 sejtekben lévő FLK–1 receptor kináz aktivitásának a kimérésére.

Anyagok és módszerek

Anyagok. A következő reagenseket és anyagokat használjuk fel:

a) 96 üregű Corning típusú ELISA lemezek (Corning katalógusszám: 25805-96);
b) Cappel gyártmányú kecske antinyúl IgG (katalógusszám: 55614);
c) PBS (Gibco katalógusszám: 450-1300EB);
d) TBSW-puffer [50 mM Tris (pH=7,2), 150 mM nátrium-klorid és 0,1% Tween 20];
e) etanol-amin-készlet [10%-os etanol-amin (pH=7,0), 4 °C hőmérsékleten tárolva];
f) HNTG-puffer [20 mM HEPES-puffer (pH=7,5), 150 mM nátrium-klorid, 0,2% Triton X–100 és 10% glicerol];
g) EDTA [0,5 M (pH=7,0), egy 100X készletként];
h) nátrium-orto-vanadát (0,5 M, egy 100X készletként);
i) nátrium-pirofoszfát (0,2 M, egy 100X készletként);
j) NUNC 96 üregű V fenekű polipropilénlemezek (Applied Scientific katalógusszám: AS–72092);
k) NIH3T3 C7#3 sejtek (FLK–1-gyel rendelkező sejtek);
l) DMEM 1X magas glukóztartalmú L Glutamin (katalógusszám: 11965-050);
m) FBS, Gibco (katalógusszám: 16000-028);
n) L-glutamin, Gibco (katalógusszám: 25030-016);
o) VEGF, PeproTech, Inc. (katalógusszám: 100-20) (1 μg/100 μl készlet formájában tárolva Milli-Q dH_2O-ban, –20 °C hőmérsékleten raktározva);
p) tisztított affinitású anti-FLK–1 antiszérum, Enzymology Lab, Sugen, Inc.;
q) foszfotirozinspecifikus UB40 monoklonális antitest, Enzymology Lab, Sugen, Inc. (Lásd Fendley és munkatársai, 1990, Cancer Research 50: 1550–1558);
r) EIA minőségű kecske antiegér IgG-POD (BioRad katalógusszám: 172-1011);
s) 2,2-azino-bisz(3-etil-benztiazolin)-6-szulfonsav (ABTS) oldat [100 mM (vízmentes) citromsav, 250 mM Na_2HPO_4 (pH=4,0), 0,5 mg/ml ABTS (Sigma katalógusszám: A–1888)], az oldatot sötétben, 4 °C hőmérsékleten kell tartani a felhasználásig;
t) hidrogén-peroxid (30%-os oldat) (Fisher katalógusszám: H325);
u) ABTS/H_2O_2 (15 ml ABTS-oldat, 2 μl hidrogén-peroxid), elkészítendő 5 perccel a felhasználás előtt, majd a felhasználásig szobahőmérsékleten tárolandó;
v) 0,2 M sósavkészlet H_2O-ban;
w) dimetil-szulfoxid (100%-os) (Sigma katalógusszám: D–8418); valamint
y) Trypsin-EDTA (Gibco BRL katalógusszám: 25200-049).

Az eljárás. A vizsgálat elvégzésére a következő eljárást alkalmazzuk:

1. A Corning gyártmányú 96 üregű ELISA lemezekre felhordunk üregenként 1,0 μg 0,1 M nátrium-karbonátban (pH=9,6) lévő antinyúl IgG antitestet. A végső térfogatot üregenként 150 μl-re állítjuk be. A bevont lemezeket egy éjszakán keresztül 4 °C hőmérsékleten tartjuk. A lemezek 4 °C hőmérsékleten tárolva maximum két hétig tarthatók el.

2. Növesztő táptalajban (Growth media) (DMEM, 2,0 mM L-glutaminnal és 10% FBS-sel kiegészítve) sejteket tenyésztünk megfelelő sejttenyészeti csészékben az összefolyásig, 37 °C hőmérsékleten, 5%-os szén-dioxid-arány mellett.

3. Tripszinizálással begyűjtjük a sejteket, és azokat Corning 25850 polisztirén 96 üregű kerek fenekű sejtlemezekbe telepítjük, 25 000 sejt/üreg mennyiségben, 200 μl táptalajban.

4. A sejteket legalább egy napon keresztül tenyésztjük 37 °C hőmérsékleten, 5%-os szén-dioxid-tartalom mellett.

5. A sejteket 1X D-PBS felhasználásával mossuk.

6. A rendszerhez üregenként hozzáadunk 200 μl éheztető táptalajt (starvation media) (DMEM, 2,0 mM L-glutamin, 0,1% FBS). A rendszert egy éjszakán keresztül inkubáljuk 37 °C hőmérsékleten, 5%-os szén-dioxid-tartalom mellett.

7. A vegyületeket/extraktumokat az éheztető táptalajjal 1:20 arányban felhígítjuk polipropilén 96 üregű lemezekben. A kontrollként szolgáló üregekben dimetil-szulfoxidot hígítunk 1:20 arányban.

8. A 96 üregű sejttenyészeti lemezekből eltávolítjuk az éheztető táptalajt, és minden üregbe 162 μl friss éheztető táptalajt teszünk.

9. Minden üreghez hozzáadunk 18 μl mennyiséget a (7. lépésből származó) 1:20 arányban hígított vegyületből/extraktumból, a kontrollul szolgáló üregekhez (+/– VEGF) pedig az 1:20 arányban hígított dimetil-szulfoxidból, és a sejtstimulálás utáni végső hígítást 1:200-ra állítjuk be. A végső dimetil-szulfoxid-tartalom 5%. A lemezt 37 °C hőmérsékleten 2 órán keresztül inkubáljuk 5%-os szén-dioxid-tartalom mellett.

10. A meg nem kötött antitestet a lemezek lefordításával távolítjuk el az ELISA lemezekből, hogy a folyadék eltávozhasson. A rendszert 3-szor mossuk TBSW+0,5% etanol-aminnal (pH=7,0). A lemezt papírtörülközővel megtörölgetjük, hogy a fölösleges folyadékot és a buborékokat eltávolítsuk.

11. A lemezeket üregenként 150 μl TBSW+0,5% etanol-aminnal (pH=7,0) blokkoljuk. A lemezeket 30 percen keresztül inkubáljuk, egy mikrotiterlemez-rázón való rázás közben.

12. A lemezt a 10. lépésben leírtak szerint 3-szor mossuk.

13. A rendszerhez üregenként hozzáadunk 0,5 μg tisztított affinitású anti-FLU–1 poliklonális nyúl antiszérumot. A végső térfogatot TBSW+0,5% etanol-aminnal

(pH=7,0) minden egyes üregben 150 µl-re állítjuk be. Rázás közben a lemezt 30 percen keresztül inkubáljuk.

14. A sejtekhez hozzáadunk 180 µl éheztető táptalajt, és a sejteket üregenként 20 µl 10,0 mM nátrium-orto-vanadáttal és 500 ng/ml VEGF-fel (mely 1,0 mM nátrium-orto-vanadát és 50 ng/ml VEGF végső koncentrációt eredményez üregenként) stimuláljuk 8 percen keresztül, 37 °C hőmérsékleten, 5%-os szén-dioxid-tartalom mellett. A negatív kontrollüregekhez csak éheztető táptalajt adunk.

15. A 8 perc elteltével a táptalajt eltávolítjuk a sejtekről, és a rendszert üregenként 200 µl PBS felhasználásával egyszer átmossuk.

16. A sejteket üregenként 150 µl HNTG felhasználásával 5 percen keresztül tartó, szobahőmérsékleten való rázás közben szétroncsoljuk. A HNTG nátrium-orto-vanadátot, nátrium-pirofoszfátot és EDTA-t tartalmaz.

17. Az ELISA lemezt a 10. lépésben leírtak szerint háromszor mossuk.

18. A sejtbomlástermékeket a sejtlemezből az ELISA lemezbe tesszük, és rázás közben 2 órán keresztül inkubáljuk. A sejtbomlástermék átvitelét fel-le pipettázással hajtjuk végre, az üregek kapargatása közben.

19. A lemezt a 10. lépésben leírtak szerint háromszor mossuk.

20. Az ELISA lemezt üregenként 0,02 µg TBSW+0,5% etanol-aminban lévő UB40-nel inkubáljuk. Az üregenkénti végső térfogatot 150 µl-re állítjuk be. Az inkubálást rázás közben, 30 percen keresztül végezzük.

21. A lemezt a 10. lépésben leírtak szerint háromszor mossuk.

22. Az ELISA lemezt TBSW+0,5% etanol-aminban (pH=7,0) lévő 1:10 000 arányban hígított EIA minőségű kecske antiegér IgG konjugált tormaperoxidázzal inkubáljuk. Az üregenkénti végső térfogatot 150 µl-re állítjuk be. Az inkubálást rázás közben, 30 percen keresztül végezzük.

23. A lemezt a 10. lépésben leírtak szerint mossuk.

24. Az üregekhez hozzáadunk 100 µl ABTS/H_2O_2 oldatot. A lemezt rázás közben tíz percen keresztül inkubáljuk.

25. Az elszíneződéssel járó reakció megállítására 100 µl 0,2 M sósavat adunk az üregekhez, hogy a sósav végső koncentrációja 0,1 M legyen. A rendszert 1 percen keresztül rázzuk szobahőmérsékleten. A buborékokat lassú légáramlattal eltávolítjuk, és az ELISA lemezt egy ELISA lemezleolvasón leolvassuk 410 nm hullámhosszon.

6.1.2. HER–2 ELISA

1. vizsgálat: EGF receptor-HER2 chimer receptor vizsgálat egész sejtekben. Egész EGFR-NIH3T3 sejtekben a HER–2 kináz aktivitást az alább leírtak szerint mérjük meg.

Anyagok és reagensek. A vizsgálat végrehajtásához a következő anyagokat és reagenseket használjuk fel:

a) EGF: szabványkoncentráció=16,5 ILM; EGF 201, TOYOBO, Co., Ltd. Japán.

b) 05–101 (UBI) (egy EGFR extracelluláris domént felismerő monoklonális antitest).

c) Antifoszfotirozin antitest (anti-Ptyr) (poliklonális) (lásd Flendley és munkatársai, mint fentebb).

d) Detektáló antitest: kecske antinyúl IgG tormaperoxidáz konjugát, TAGO, Inc., Burlingame, CA.

e) TBST-puffer:

Tris-HCl, pH=7,2	50 mM
NaCl	150 mM
Triton X–100	0,1

f) HNTG 5X készlet:

HEPES	0,1 M
NaCl	0,75 M
Glicerol	50%
Triton X–100	1,0%

g) ABTS készlet:

Citromsav	100 mM
Na_2HPO_4	250 mM
Tömény HCl	0,5 pM
ABTS*	0,5 mg/ml

* (2,2'-azino-bisz(3-etil-benztiazolin-szulfonsav). Az oldat felhasználásig sötétben, 4 °C hőmérsékleten tárolandó.

h) A következő szabványreagensek:
EDTA 100 mM pH=7,0
Na_3VO_4 0,5 M
$Na_4(P_2O_7)$ 0,2 M

Eljárás. A következő eljárást alkalmazzuk:

A) *Az ELISA lemez előbevonása*

1. Az ELISA lemezre (Corning, 96 üregű, katalógusszám: 25805-96) felhordunk 0,5 g 05–101 antitestet üregenként, PBS-ben, 100 µl üregenkénti végső térfogat mellett, és a rendszert egy éjszakán keresztül 4 °C hőmérsékleten tároljuk. A bevont lemezek maximum 10 napig használhatók fel, ha 4 °C hőmérsékleten tároljuk azokat.

2. A felhasználás napján eltávolítjuk a bevonópuffert, és azt 100 µl blokkolópufferre [PBS-ben lévő 5%-os szegfű instant zsírmentes száraz tej (Carnation Instant Non-Fat Dry Milk)] cseréljük. A lemezt rázás közben szobahőmérsékleten (körülbelül 23–25 °C hőmérsékleten) inkubáljuk 30 percen keresztül. Közvetlenül a felhasználás előtt a blokkolópuffert eltávolítjuk, és a lemezt négyszer mossuk TBST-pufferrel.

B) *A sejtek telepítése*

1. A vizsgálathoz olyan NIH3T3 sejtfonalat használhatunk, melyben túlzott mennyiségben van jelen egy olyan chirem receptor, mely tartalmaz EGFR extracelluláris domént és extracelluláris HER2 kináz domént.

2. A kísérlethez olyan csészéket választunk, melyek 80–90%-os összefolyással rendelkeznek. A sejteket tripszinizáljuk, majd a reakciónak 10%-os magzati szarvasmarhaszérummal vetünk véget. A sejteket DMEM-táptalajban (10% CS DMEM-táptalaj) szuszpendáljuk, és szobahőmérsékleten, 1500 percenkénti fordulatszámon egyszer 5 percen keresztül centrifugáljuk.

3. A sejteket újraszuszpendáljuk telepítő táptalajban (DMEM, 0,5% szarvasmarhaszérum), majd tripánkék felhasználásával megszámoljuk. A 90% fölötti életképesség elfogadható. A sejteket DMEM-táptalajba (0,5% szarvasmarhaszérum) telepítjük, 10 000 sejt/üreg sűrűségben, 100 µl üregenkénti térfogat mellett, egy 96 üregű mikrotiterlemezben. A telepített sejteket 37 °C hőmérsékleten, 5%-os szén-dioxid-tartalom mellett körülbelül 40 órán keresztül inkubáljuk.

C) *Vizsgálati eljárások*

1. A telepített sejtek szennyezettségét egy invertált mikroszkóp felhasználásával ellenőrizzük. A gyógyszerkészletet (10 mg/ml, DMSO-ban) 1:10 arányban hígítjuk DMEM-táptalajban, majd 5 l mennyiséget ebből átrakunk egy TBST üregbe, hogy végül 1:200 arányban hígított gyógyszeroldatot és 1%-os DMSO-koncentrációt kapjunk. A kontrollüregekbe csak DMSO-t teszünk. A rendszert 37 °C hőmérsékleten, 5%-os szén-dioxid-tartalom mellett két órán keresztül inkubáljuk.

2. Elkészítjük az EGF ligandumot: a szabvány EGF-et DMEM-ben hígítjuk oly módon, hogy 10 µl hígított EGF átvitelekor (1:12 hígítás) 100 nM végső koncentrációt kapjunk.

3. Elkészítünk annyi friss HNTG*-t, amennyi elég az üregenkénti 100 µl térfogathoz; majd jégre tesszük.

HNTG* (10 ml):

HNTG készlet	2,0 ml
Milli-Q H_2O	7,3 ml
EDTA, 100 mM, pH=7,0	0,5 ml
Na_3VO_4, 0,5 M	0,1 ml
$Na_4(P_2O_7)$, 0,2 M	0,1 ml

4. 120 percen keresztül tartó, a gyógyszerrel együtt történő inkubálás után a sejtekhez hozzáadunk előkészített SGF ligandumot, üregenként 10 µl mennyiségben, hogy a végső koncentráció 100 nM legyen. A kontrollüregekbe csak DMEM-et teszünk. A rendszert szobahőmérsékleten, rázás közben 5 percen keresztül inkubáljuk.

5. A rendszerből eltávolítjuk a gyógyszert, az EGF-et és a DMEM-et. A sejteket kétszer mossuk PBS-sel. A HNTG*-t a sejtekhez adjuk, 100 µl üregenkénti mennyiségben. A rendszert 5 percre jégre tesszük. Ez alatt az idő alatt egy másik ELISA lemezből eltávolítjuk a blokkolópuffert, és a fentebb leírtak szerint a lemezt TBST-vel mossuk.

6. Egy pipettaheggyel, melyet biztonságosan egy mikropipettorhoz erősítünk, a sejteket lekaparjuk a lemezről, és a sejtes anyagot a HNTG* sejtoldó puffer többszöri beszívásával és kiengedésével homogenizáljuk. A sejtbomlásterméket átvisszük egy burkolt, blokkolt és mosott ELISA lemezre. A rendszert rázás közben egy órán keresztül inkubáljuk szobahőmérsékleten.

7. A sejtbomlásterméket eltávolítjuk, és négyszer mossuk TBST-vel. Az ELISA lemezre ráviszünk üregenként 100 µl frissen hígított anti-Ptyr antitestet. A rendszert rázás közben 30 percen keresztül inkubáljuk szobahőmérsékleten, az anti-Ptyr antiszérum jelenlétében (1:3000 hígítás TBST-ben).

8. Az anti-Ptyr antitestet eltávolítjuk, és négyszer mossuk TBST-vel. Az ELISA lemezre ráviszünk üregenként 100 µl frissen hígított TAGO antinyúl IgG antitestet. A rendszert rázás közben 30 percen keresztül inkubáljuk szobahőmérsékleten (antinyúl IgG antitest: 1:3000 hígítás TBST-ben).

9. A TAGO detektáló antitestet eltávolítjuk, és négyszer mossuk TBST-vel. Az ELISA lemezre ráviszünk üregenként 100 µl frissen hígított ABTS/H_2O_2 oldatot. A rendszert rázás közben 20 percen keresztül inkubáljuk szobahőmérsékleten (ABTS/H_2O_2 oldat: 1,0 µl 30%-os H_2O_2 10 ml ABTS készletben).

10. A reakciót 50 µl 5 N kénsav hozzáadásával megszakítjuk (nem kötelező), és meghatározzuk az OD-t 410 nm-nél.

11. A maximális foszfotirozinjelet akkor kapjuk, ha a pozitív kontrollokra kapott értékből levonjuk a negatív kontrollokra kapott értéket. Az extraktumot tartalmazó üregekre vonatkozó százalékos foszfotirozingátlást ezután számoljuk ki, a negatív kontrollra kapott érték levonása után.

2. vizsgálat: HER-2-BT474 ELISA. Az egész sejt HER2-aktivitás mérésére egy második vizsgálatot végezhetünk. Egy ilyen vizsgálat a következőképpen végezhető el.

Anyagok és reagensek. A következő anyagokat és reagenseket használjuk fel:

a) BT–474 (ATCC HBT20), egy olyan humán mellrák-sejtfonal, mely magas HER2 kinázszintet mutat.

b) Növesztő táptalaj, melynek tartalma: RPMI+10% FBS+GMS-G (Gibco készlet)+glutamin; BT–474 sejtek 37 °C hőmérsékleten való, 5%-os szén-dioxid-tartalom mellett egy inkubátorban történő tenyésztésére.

c) Egy monoklonális anti-HER2 antitest.

d) D-PBS:

KH_2PO_4	0,20 g/l 10 (GIBCO, 310-4190AJ)
K_2HPO_4	2,16 g/l
KCl	0,20 g/l
NaCl	8,00 g/l (pH=7,2)

e) Blokkolópuffer: TBST+5% tej (koncentrált instant zsírmentes száraz tej).

f) TBST-puffer:

Tris-HCl	50 mM
NaCl	150 mM (pH=7,2, HCl 10 N)
Triton X–100	0,1%

ahol is a szabvány TES-oldatot (10X) készítjük el, és a Triton X–100-at hígítás közben adjuk hozzá a pufferhez.

g) HNTG-puffer (5x):

HEPES	0,1 M
NaCl	750 mM [pH=7,2 (HCl, 1 N)]
Glicerol	50%
Triton X–100	1,0%

Szabványoldatot (5x) állítunk elő, és 4 °C hőmérsékleten tároljuk.

h) EDTA-HCl: 0,5 M pH=7,0 (10 N HCl), 500X készletként.

i) Na_3VO_4: 0,5 M, 100X készletként, részletekben –80 °C hőmérsékleten tároljuk.
j) $Na_4(P_2O_7)$: 0,2 M, 100X készletként.
k) Poliklonális antiszérum antifoszfotirozin.
l) Kecske antinyúl IgG, tormaperoxidáz (POD) konjugát [detektáló antitest, Tago (katalógusszám: 4520; Lot No. 1802]: Tago, Inc., Burlingame, CA.
m) ABTS-oldat:

Citromsav	100 mM
Na_2HPO_4	250 mM
ABTS	0,5 mg/ml

ahol az ABTS jelentése (2,2'-azino-bisz(3-etil-benztiazolin-szulfonsav). Ehhez a vizsgálathoz az ABTS-oldatot sötétben, 4 °C hőmérsékleten kell tárolni. Amikor az oldat megzöldül, ki kell dobni.
n) Hidrogén-peroxid: a 30%-os oldatot sötétben tároljuk, 4 °C hőmérsékleten.

Eljárás. A következő lépések mindegyikét szobahőmérsékleten, steril körülmények között hajtjuk végre, hacsak mást nem mondunk. Az ELISA lemezek mosását minden alkalommal háromszori desztillált vízzel való, és egyszeri TBST-vel való öblítéssel végezzük.

A) *A sejtek telepítése*

1. Szövettenyészeti csészékben (Corning 25020-100) BT474 sejteket tenyésztünk, 80–90%-os összefolyásig, majd Trypsin-EDTA (0,25%, GIBCO) felhasználásával összegyűjtjük azokat.

2. A sejteket friss táptalajban újraszuszpendáljuk, majd 96 üregű szövettenyészeti lemezekbe (Corning, 25806-96) rakjuk, körülbelül 25 000–50 000 sejt/üreg (100 µl/üreg) sűrűségben. A sejteket 37 °C hőmérsékleten 5%-os szén-dioxid-tartalom mellett egy éjszakán keresztül inkubáljuk.

B) *Az ELISA lemezek beborítása és blokkolása*

1. Az ELISA lemezre (Corning 25805-96) egy éjszaka alatt, 4 °C hőmérsékleten felhordunk 150 µl PBS-ben lévő 0,5 µg HER2 antitestet üregenként, és a lemezt parafilmmel lezárjuk. Az antitesttel borított lemezek maximum két hétig használhatók fel, amennyiben 4 °C hőmérsékleten tároljuk azokat.

2. A felhasználás napján a bevonóoldatot eltávolítjuk, azt 200 µl blokkolópufferre cseréljük, a lemezt rázzuk, majd eltávolítjuk a blokkolópuffert is, és a lemezt közvetlenül a sejtbomlástermék hozzáadása előtt mossuk.

C) *Vizsgálati eljárások*

1. A gyógyszereket szérummentes állapotban TBST-zzük. A gyógyszerek hozzáadása előtt a régi táptalajt szérummentes RPMI-re cseréljük (90 µl/üreg).

2. A gyógyszerkészletet (100% DMSO-ban) 1:10 arányban hígítjuk RPMI-vel, majd 10 µl/üreg mennyiségben az így kapott oldatot a sejtekhez adjuk, aminek eredményeképpen a végső gyógyszer DMSO-koncentráció 1% lesz. A sejteket 37 °C hőmérsékleten 5%-os szén-dioxid-tartalom mellett inkubáljuk.

3. Friss sejtoldó puffert (HNTG*) készítünk:

5×HNTG	2 ml
EDTA	0,2 ml
Na_3VO_4	0,1 ml
$Na_4P_2O_7$	0,1 ml
H_2O	7,3 ml.

4. A gyógyszer két órán keresztül tartó preinkubációja után az oldatot teljesen eltávolítjuk a lemezről, a sejtekhez HNTG*-t adunk (100 µl/üreg), és a lemezt 10 percen keresztül rázzuk.

5. Egy 12 csatornás pipetta felhasználásával a sejteket eltávolítjuk a lemezről, és a sejtbomlásterméket többszöri beszívással és kieresztéssel homogenizáljuk. Ezután a sejtbomlásterméket teljes egészében átvisszük az ELISA lemezre, és azt 1 órán keresztül rázzuk.

6. A sejtbomlásterméket eltávolítjuk, a lemezt mossuk, hozzáadunk üregenként 100 µl anti-pTyr-t (1:3000 arányú hígítás TBST-vel), és a rendszert 30 percen keresztül rázzuk.

7. Az anti-pTyr-t eltávolítjuk, a lemezt mossuk, hozzáadunk üregenként 100 µl kecske antinyúl IgG konjugált antitestet (1:5000 arányú hígítás TBST-vel), és a rendszert 30 percen keresztül rázzuk.

8. Eltávolítjuk az antinyúl IgG antitestet, a lemezt mossuk, és hozzáadunk üregenként 100 l friss ABTS/H_2O_2 oldatot (1,2 µl H_2O_2 10 ml ABTS-hez), hogy az elszíneződés beinduljon, ami általában 20 percet vesz igénybe.

9. OD-mérés 410 nm-en, Dynatec MR5000.

6.1.3. PDGF-R ELISA

Minden sejttenyészeti táptalajt, a glutamint és a magzati szarvasmarhaszérumot a Gibco Life Technologiestől (Gran Island, NY) szerezzük be, hacsak mást nem mondunk. Minden sejttenyészetet 90–95% levegő és 5–10% szén-dioxid összetételű nedves atmoszférában növesztünk, 37 °C hőmérsékleten. Hetente kétszer minden sejtfonalból rutinszerűen kitenyésztünk egy alkultúrát, és a tenyészeteket Mycotest módszerrel (Gibco) vizsgálva negatív mycoplazma eredményt kapunk.

Az ELISA vizsgálathoz a sejteket (U1242, beszerzési hely: Joseph Schlessinger, NY) 80–90%-os összefolyásig növesztjük növesztő táptalajban (MEM 10% FBS-sel, NEAA, 1 mM NaPyr és 2 mM GLN), és 96 üregű szövettenyésztő lemezekbe telepítjük, 0,5% szérumban, üregenkénti 25 000–30 000 sejtsűrűség mellett. Egy éjszakán keresztül tartó, 0,5% szérumtartalmú táptalajban való inkubálás után a sejteket átrakjuk szérummentes táptalajba, és 2 órán keresztül kezeljük a tesztvegyülettel, 5%-os szén-dioxid-tartalom mellett, 37 °C hőmérsékleten. Ezután a sejteket 5–10 percen keresztül stimuláljuk a ligandummal, majd HNTG-vel (20 mM Hepes, 150 mM nátrium-klorid, 10% glicerol, 5 mM EDTA, 5 mM Na_3VO_4, 0,2% Triton X–100 és 2 mM NaPyr) szétroncsoljuk. A sejtbomlásterméket (0,5 mg/üreg, PBS-ben) olyan ELISA lemezekre visszük át, melyeket előzőleg receptorspecifikus antitesttel borítottunk, és amelyeket TBST-ben (50 mM Tris-HCl pH=7,2, 150 mM NaCl és 0,1% Triton X–100)

lévő 5%-os tejjel szobahőmérsékleten, 30 percen keresztül blokkolunk. A sejtbomlásterméket rázás közben egy órán keresztül inkubáljuk szobahőmérsékleten. A lemezeket négyszer mossuk TBST-vel, majd poliklonális antifoszfotirozin antitesttel inkubáljuk szobahőmérsékleten, 30 percen keresztül. Az antifoszfotirozin antitest fölöslegét TBST-vel való négyszeri öblítéssel eltávolítjuk. Az ELISA lemezhez 30 percre kecske antinyúl IgG antitestet adunk szobahőmérsékleten, majd a lemezt négyszer öblítjük TBST-vel. Az elszíneződés megindításához ABTS (100 mM citromsav, 250 mM Na_2HPO_4 és 0,5 mg/ml 2,2'-azino-bisz(3-etil-benztiazolin-6-szulfonsav)+H_2O_2 (1,2 ml 30%-os H_2O_2 10 ml ABTS-hez) elegyet adunk. A 410 nm hullámhosszon és a 630 nm referencia-hullámhosszon való abszorbanciát körülbelül 15–30 perccel az ABTS hozzáadása után vesszük fel.

6.1.4. IGF–I ELISA

A foszfotirozin szintjét az IGF–I receptoron a következő eljárás felhasználásával mérhetjük meg, mely az IGF–I receptor tirozin-kináz-aktivitást adja meg.

Anyagok és reagensek. A következő anyagokat és reagenseket használjuk fel:

a) Ebben a vizsgálatban 3T3/IGF–1R sejtfonalat használunk, mely sejtfonalban túlteng az IGF–1 receptor.

b) A NIH3T3/IGF–1R sejteket egy inkubátorban növesztjük 37 °C hőmérsékleten, 5%-os szén-dioxid-tartalom mellett. A növesztő táptalaj összetétele: DMEM+10% FBS (hővel inaktivált)+2 mM L-glutamin.

c) A 17–69 nevezetű anti-IGF–1R antitestet használjuk. Az antitesteket az Enzimology Lab., SUGEN, Inc. tisztítja.

d) D-PBS:

KH_2PO_4	0,20 g/l
K_2HPO_4	2,16 g/l
KCl	0,20 g/l
NaCl	8,00 g/l (pH=7,2)

e) Blokkolópuffer: TBST+5% tej (koncentrált instant zsírmentes száraz tej).

f) TBST-puffer:

Tris-HCl	50 mM
NaCl	150 mM (pH=7,2, HCl 10 N)
Triton X–100	0,1%

ahol is a szabvány TES-oldatot (10X) készítjük el, és a Triton X–100-at hígítás közben adjuk hozzá a pufferhez.

g) HNTG-puffer:

HEPES	20 mM
NaCl	150 mM (pH=7,2/HCl 1 N)
Glicerol	10%
Triton X–100	0,2%

Szabványoldatot (5x) állítunk elő, és 4 °C hőmérsékleten tároljuk.

h) EDTA-HCl: 0,5 M pH=7,0 (NaOH), 100X készletként.

i) Na_3VO_4: 0,5 M, 100X készletként, részletekben –80 °C hőmérsékleten tároljuk.

j) $Na_4(P_2O_7)$: 0,2 M, 100X készletként.

k) Inzulinszerű növekedési faktor (Insuline-like growth factor-1), a Promegától (katalógusszám: G5111).

l) Poliklonális antiszérum antifoszfotirozin: az Enzymology Lab., SUGEN Inc.-től származó nyúlszérum.

m) Kecske antinyúl IgG, POD konjugát (detektáló antitest), Tago (katalógusszám: 4520; Lot No. 1802): Tago, Inc., Burlingame, CA.

n) ABTS (2,2'-azino-bisz(3-etil-benztiazolin-szulfonsav)-oldat:

Citromsav	100 mM
Na_2HPO_4	250 mM (pH=4,0/l N HCl)
ABTS	0,5 mg/ml

Az ABTS-oldatot sötétben, 4 °C hőmérsékleten kell tárolni. Amikor az oldat megzöldül, ki kell dobni.

o) Hidrogén-peroxid: a 30%-os oldatot sötétben tároljuk, 4 °C hőmérsékleten.

Eljárás. A következő lépések mindegyikét szobahőmérsékleten visszük végbe, hacsak mást nem mondunk. Az ELISA lemezek mosását háromszori csapvízzel való, és egyszeri TBST-vel való öblítéssel végezzük. A lemezeket papírtörülközőkkel szárazra töröljük.

A) *A sejtek telepítése*

1. A szövettenyészeti csészékben (Corning 25020-100) 80–90%-os összefolyásig növesztett sejteket, Trypsin-EDTA (0,25%, 0,5 ml/D–100, GIBCO) felhasználásával összegyűjtjük.

2. A sejteket friss DMEM+10% FBS+2 mM L-glutamin elegyében újraszuszpendáljuk, majd 96 üregű szövettenyészeti lemezekbe (Corning, 25806–96) rakjuk, körülbelül 20 000 sejt/üreg (100 µl/üreg) sűrűségben. A sejteket 1 napon keresztül inkubáljuk, majd a táptalajt szérummentes táptalajra cseréljük ki (90/µl), és a sejteket 37 °C hőmérsékleten 5%-os szén-dioxid-tartalom mellett egy éjszakán keresztül inkubáljuk.

B) *Az ELISA lemezek beborítása és blokkolása*

1. Az ELISA lemezre (Corning 25805-96) legalább 2 óra alatt, felhordunk 100 µl PBS-ben lévő 0,5 µg anti-IGF–1R antitestet.

2. A bevonóoldatot eltávolítjuk, azt 100 µl blokkolópufferre cseréljük, és a lemezt 30 percen keresztül rázzuk. Ezután eltávolítjuk a blokkolópuffert is, és a lemezt közvetlenül a sejtbomlástermék hozzáadása előtt mossuk.

C) *Vizsgálati eljárások*

1. A gyógyszereket szérummentes állapotban TBST-zzük.

2. A gyógyszerkészletet (100% DMDO-ban) 1:10 arányban hígítjuk DMEM-vel egy 96 üregű polipropilénlemezen, majd 10 µl/üreg mennyiségben az így kapott oldatot a sejtekhez adjuk, aminek eredményeképpen a végső gyógyszerhígítási arány 1:100 lesz, a végső DMSO-koncentráció pedig 1% lesz. A sejteket 37 °C hőmérsékleten 5%-os szén-dioxid-tartalom mellett 2 órán keresztül inkubáljuk.

3. Friss sejtoldó puffert (HNTG*) készítünk:

HNTG	2 ml
EDTA	0,1 ml
Na_3VO_4	0,1 ml
$Na_4P_2O_7$	0,1 ml
H_2O	7,3 ml

4. A gyógyszer két órán keresztül tartó inkubációja után a sejtekhez hozzáadunk üregenként 10 µl PBS-ben lévő 200 nM IGF–1 ligandumot (a végső koncentráció=20 nM), és a rendszert 37 °C hőmérsékleten 5%-os szén-dioxid-tartalom mellett 10 percen keresztül inkubáljuk.

5. A táptalajt eltávolítjuk, a rendszerhez hozzáadunk üregenként 100 µl HNTG*-t, és a lemezt 10 percen keresztül rázzuk. A sejteket megvizsgáljuk mikroszkóppal, hogy ellenőrizzük, megfelelő mértékben elbomlottak-e.

6. Egy 12 csatornás pipetta felhasználásával a sejteket eltávolítjuk a lemezről, és a sejtbomlásterméket többszöri beszívással és kieresztéssel homogenizáljuk. Ezután a sejtbomlásterméket teljes egészében átvisszük az antitesttel borított ELISA lemezre, és azt 1 órán keresztül rázzuk.

7. A sejtbomlásterméket eltávolítjuk, a lemezt mossuk, hozzáadunk üregenként 100 µl anti-pTyr-t (1:3000 arányú hígítás TBST-vel), és a rendszert 30 percen keresztül rázzuk.

8. Az anti-pTyr-t eltávolítjuk, a lemezt mossuk, hozzáadunk üregenként 100 µl Tagót (1:3000 arányú hígítás TBST-vel), és a rendszert 30 percen keresztül rázzuk.

9. Eltávolítjuk a detektáló antitestet, a lemezt mossuk, és hozzáadunk üregenként 100 µl friss ABTS/H_2O_2 oldatot (1,2 µl H_2O_2 10 ml ABTS-hez), hogy az elszíneződés beinduljon.

10. Az OD-t egy Ingres-hez kapcsolt Dynatec MR5000 felhasználásával mérjük.

6.1.5. EGF receptor ELISA

Egész sejtekben az EGF receptor kináz aktivitást (EGFR-NIH3T3 vizsgálat) az alább leírtak szerint mérjük meg.

Anyagok és reagensek. A vizsgálat végrehajtásához a következő anyagokat és reagenseket használjuk fel:

a) EGF ligandum: szabványkoncentráció=16,5 ILM; EGF 201, TOYOBO, Co., Ltd., Japán.

b) 05–101 (UBI) (egy EGFR extracelluláris domént felismerő monoklonális antitest).

c) Antifoszfotirozin antitest (anti-Ptyr) (poliklonális).

d) Detektáló antitest: Kecske antinyúl IgG tormaperoxidáz konjugát, TAGO, Inc., Burlingame, CA.

e) TBST-puffer:

Tris-HCl, pH=7,2	50 mM
NaCl	150 mM
Triton X–100	0,1

f) HNTG 5X készlet:

HEPES	0,1 M
NaCl	0,75 M
Glicerol	50%
Triton X–100	1,0%

g) ABTS készlet:

Citromsav	100 mM
Na_2HPO_4	250 mM
Tömény HCl	4,0 pH
ABTS*	0,5 mg/ml

Az oldat felhasználásáig sötétben, 4 °C hőmérsékleten tárolandó.

h) A következő szabványreagensek:
EDTA 100 mM pH=7,0
Na_3VO_4 0,5 M
$Na_4(P_2O_7)$ 0,2 M

Eljárás. A következő eljárást alkalmazzuk:

A) *Az ELISA lemez előbevonása*

1. Az ELISA lemezekre (Corning, 96 üregű, katalógusszám: 25805-96) felhordunk 0,5 µg 05–101 antitestet üregenként, PBS-ben, 150 µl üregenkénti végső térfogat mellett, és a rendszert egy éjszakán keresztül 4 °C hőmérsékleten tároljuk. A bevont lemezek maximum 10 napig használhatók fel, ha 4 °C hőmérsékleten tároljuk azokat.

2. A felhasználás napján eltávolítjuk a bevonópuffert, és azt blokkolópufferre [PBS-ben lévő 5%-os szegfű instant zsírmentes száraz tej (Carnation Instant Non-Fat Dry Milk)] cseréljük. A lemezt rázás közben, szobahőmérsékleten (körülbelül 23–25 °C hőmérsékleten) inkubáljuk 30 percen keresztül. Közvetlenül a felhasználás előtt a blokkolópuffert eltávolítjuk, és a lemezt négyszer mossuk TBST-pufferrel.

B) *A sejtek telepítése*

1. A vizsgálathoz használhatunk NIH 3T3/C7 sejtfonalat (Honegger és munkatársai, Cell 51: 199–209, 1987).

2. A kísérlethez olyan csészéket választunk, melyek 80–90%-os összefolyással rendelkeznek. A sejteket tripszinizáljuk, majd a reakciónak 10% CS DMEM-táptalaj hozzáadásával vetünk véget. A sejteket DMEM-táptalajban (10% CS DMEM-táptalaj) szuszpendáljuk, és egyszer 1000 percenkénti fordulatszámon, egyszer szobahőmérsékleten 5 percen keresztül centrifugáljuk.

3. A sejteket újraszuszpendáljuk telepítő táptalajban (DMEM, 0,5% szarvasmarhaszérum), és tripánkék felhasználásával megszámoljuk. A 90% fölötti életképesség elfogadható. A sejteket telepítsük DMEM-táptalajba (0,5% szarvasmarhaszérum), 10 000 sejt/üreg sűrűségben, 100 µl üregenkénti térfogat mellett, egy 96 üregű mikrotiterlemezben. A telepített sejteket 37 °C hőmérsékleten, 5%-os szén-dioxid-tartalom mellett körülbelül 40 órán keresztül inkubáljuk.

C) *Vizsgálati eljárások*

1. A telepített sejtek szennyezettségét egy invertált mikroszkóp felhasználásával ellenőrizzük. A gyógyszerkészletet (10 mg/ml, DMSO-ban) 1:10 arányban hígítjuk DMEM-táptalajjal, majd 5 µl mennyiséget ebből átrakunk egy vizsgálati üregbe, hogy végül 1:200 arányban

hígított gyógyszeroldatot és 1%-os DMSO-koncentrációt kapjunk. A kontrollüregekbe csak DMSO-t teszünk. A rendszert 37 °C hőmérsékleten, 5%-os szén-dioxid-tartalom mellett két órán keresztül inkubáljuk.

2. Elkészítjük az EGF ligandumot: a szabvány EGF-et DMEM-ben hígítjuk oly módon, hogy 10 µl hígított EGF átvitelekor (1:12 hígítás) 25 nM végső koncentrációt kapjunk.

3. Elkészítünk 10 ml friss HNTG*-t, amennyi elég az üregenkénti 100 µl térfogathoz.

A HNTG* a következő összetevőket tartalmazza:

HNTG készlet	2,0 ml
Milli-Q H_2O	7,3 ml
EDTA, 100 mM, pH=7,0	0,5 ml
Na_3VO_4, 0,5 M	0,1 ml
$Na_4(P_2O_7)$, 0,2 M	0,1 ml

4. Jégre tesszük.

5. 120 percen keresztül tartó, a gyógyszerrel együtt történő inkubálás után a sejtekhez hozzáadunk előkészített EGF ligandumot, üregenként 10 µl mennyiségben, hogy a végső koncentráció 25 nM legyen. A kontrollüregekbe csak DMEM-et teszünk. A rendszert szobahőmérsékleten, rázás közben 5 percen keresztül inkubáljuk.

6. A rendszerből eltávolítjuk a gyógyszert, az EGF-et és a DMEM-et. A sejteket kétszer mossuk PBS-sel. A HNTG*-t a sejtekhez adjuk, 100 µl üregenkénti mennyiségben. A rendszert 5 percre jégre tesszük. Ez alatt az idő alatt egy másik ELISA lemezből eltávolítjuk a blokkolópuffert, és a fentebb leírtak szerint a lemezt TBST-vel mossuk.

7. Egy pipettaheggyel, melyet biztonságosan egy mikropipettorhoz erősítünk, a sejteket lekaparjuk a lemezről, és a sejtes anyagot a HNTG* sejtoldó puffer többszöri beszívásával és kiengedésével homogenizáljuk. A sejtbomlásterméket átvisszük egy burkolt, blokkolt és mosott ELISA lemezre. A rendszert rázás közben egy órán keresztül inkubáljuk szobahőmérsékleten.

8. A sejtbomlásterméket eltávolítjuk, és négyszer mossuk TBST-vel. Az ELISA lemezre ráviszünk üregenként 100 µl frissen hígított anti-Ptyr antitestet. A rendszert rázás közben 30 percen keresztül inkubáljuk szobahőmérsékleten, az anti-Ptyr antiszérum jelenlétében (1:3000 hígítás TBST-ben).

9. Az anti-Ptyr antitestet eltávolítjuk, és négyszer mossuk TBST-vel. Az ELISA lemezre ráviszünk üregenként 100 µl frissen hígított TAGO 30 antinyúl IgG antitestet. A rendszert rázás közben 30 percen keresztül inkubáljuk szobahőmérsékleten (antinyúl IgG antitest: 1:3000 hígítás TBST-ben).

10. A detektáló antitestet eltávolítjuk, és négyszer mossuk TBST-vel. Az ELISA lemezre ráviszünk üregenként 100 µl frissen hígított ABTS/H_2O_2 oldatot. A rendszert 20 percen keresztül inkubáljuk szobahőmérsékleten (ABTS/H_2O_2 oldat: 1,2 µl 30%-os H_2O_2 10 ml ABTS készletben).

11. A reakciót 50 µl 5 N kénsav hozzáadásával megszakítjuk (nem kötelező), és meghatározzuk az OD-t 410 nm-nél.

12. A maximális foszfotirozinjelet akkor kapjuk, ha a pozitív kontrollokra kapott értékből levonjuk a negatív kontrollokra kapott értéket. Az extraktumot tartalmazó üregekre vonatkozó százalékos foszfotirozingátlást ezután számoljuk ki, a negatív kontrollra kapott érték levonása után.

6.1.6. Celluláris inzulin receptor ELISA

Annak eldöntésére, hogy a találmány vegyülete rendelkezik-e inzulinreceptor tirozin-kináz-aktivitással, a következő eljárást alkalmazzuk.

Anyagok és reagensek. A következő anyagokat és reagenseket használjuk fel az inzulinreceptoron megfigyelhető foszfotirozinszintek mérésére (ami az inzulinreceptor tirozin-kináz-aktivitását adja meg):

1. Az előnyben részesített sejtfonal egy NIH3T3 sejtfonal (ATCC No. 1658), melyben túlteng az inzulinreceptor (H25 sejtek).
2. A H25 sejteket egy inkubátorban növesztjük 37 °C hőmérsékleten, 5%-os szén-dioxid-tartalom mellett. A növesztő táptalaj összetétele: DMEM+10% FBS (hővel inaktivált)+2 mm L-glutamin.
3. Az ELISA lemez befedésére a BBE nevezetű monoklonális anti-IR antitestet használjuk. Az antitesteket az Enzimology Lab., SUGEN, Inc. tisztítja.
4. D-PBS:

KH_2PO_4	0,20 g/l (GIBCO, 310-4190AJ)
K_2HPO_4	2,16 g/l
KCl	0,20 g/l
NaCl	8,00 g/l (pH=7,2)

5. Blokkolópuffer: TBST+5% tej (koncentrált instant zsírmentes száraz tej)
6. TBST-puffer:

Tris-HCl	50 mM
NaCl	150 mM (pH=7,2, HCl 1 N)
Triton X–100	0,1%

ahol is a szabvány TBS-oldatot (10X) készítjük el, és a Triton X–100-at hígítás közben adjuk hozzá a pufferhez.

7. HNTG-puffer:

HEPES	20 mM
NaCl	150 mM pH=7,2 (HCl 1 N)
Glicerol	10%
Triton X–100	0,2%

Szabványoldatot (5x) állítunk elő, és azt 4 °C hőmérsékleten tároljuk.

8. EDTA-HCl: 0,5 M pH=7,0 (NaOH), 100X készletként.
9. Na_3VO_4: 0,5 M, 100X készletként, részletekben –80 °C hőmérsékleten tároljuk.
10. $Na_4(P_2O_7)$: 0,2 M, 100X készletként.
11. Inzulin a GIBCO BRL-től (katalógusszám: 18125039).
12. Poliklonális antiszérum antifoszfotirozin: az Enzymology Lab., SUGEN Inc.-től származó nyúlszérum.
13. Detektáló antitest, előnyösen kecske antinyúl IgG, POD konjugát, Tago (katalógusszám: 4520; Lot No. 1802): Tago, Inc., Burlingame, CA.

14. ABTS (2,2'-azino-bisz(3-etil-benztiazolin-szulfonsav)-oldat:
Citromsav 100 mM
Na_2HPO_4 250 mM (pH=4,0/1 N HCl)
ABTS 0,5 mg/ml
Az ABTS-oldatot sötétben, 4 °C hőmérsékleten kell tárolni. Amikor az oldat megzöldül, ki kell dobni.
15. Hidrogén-peroxid: a 30%-os oldatot sötétben tároljuk, 4 °C hőmérsékleten.

Eljárás. A következő lépések mindegyikét szobahőmérsékleten visszük végbe, hacsak mást nem mondunk. Az ELISA lemezek mosását háromszori csapvízzel való, és egyszeri TBST-vel való öblítéssel végezzük. A lemezeket papírtörülközőkkel szárazra töröljük.

A) *A sejtek telepítése*

1. A szövettenyészeti csészékben (10 cm, Corning 25020-100) 80–90%-os összefolyásig növesztett sejteket Trypsin-EDTA (0,25%, 0,5 ml/D–100, GIBCO) felhasználásával összegyűjtjük.

2. A sejteket friss DMEM+10% FBS+2 mM L-glutamin elegyében újraszuszpendáljuk, majd 96 üregű szövettenyészeti lemezekbe (Corning, 25806-96) rakjuk, körülbelül 20 000 sejt/üreg (100 µl/üreg) sűrűségben. A sejteket ezután 1 napon keresztül inkubáljuk. Az inkubálást követően a táptalajt 0,01% szérumtartalmú táptalajra cseréljük ki (90/µl), és a sejteket 37 °C hőmérsékleten 5%-os szén-dioxid-tartalom mellett egy éjszakán keresztül inkubáljuk.

B) *Az ELISA lemezek beborítása és blokkolása*

1. Az ELISA lemezre (Corning 25805-96) legalább 2 óra alatt felhordunk 100 µl PBS-ben lévő 0,5 µg anti-IR antitestet.

2. A bevonóoldatot eltávolítjuk, azt 100 µl blokkolópufferre cseréljük, és a lemezt 30 percen keresztül rázzuk. Ezután eltávolítjuk a blokkolópuffert is, és a lemezt közvetlenül a sejtbomlástermék hozzáadása előtt mossuk.

C) *Vizsgálati eljárások*

1. A gyógyszereket szérummentes állapotban TBST-zzük.

2. A gyógyszerkészletet (100% DMDO-ban) 1:10 arányban hígítjuk DMEM-vel egy 96 üregű polipropilénlemezen, majd 10 µl/üreg mennyiségben az így kapott oldatot a sejtekhez adjuk, aminek eredményeképpen a végső gyógyszerhígítási arány 1:100 lesz, a végső DMSO-koncentráció pedig 1% lesz. A sejteket 37 °C hőmérsékleten 5%-os szén-dioxid-tartalom mellett 2 órán keresztül inkubáljuk.

3. Friss sejtoldó puffert (HNTG*) készítünk:
HNTG (5x) 2 ml
EDTA 0,1 ml
Na_3VO_4 0,1 ml
$Na_4P_2O_7$ 0,1 ml
H_2O 7,3 ml
HNTG* 10 ml

4. A gyógyszer két órán keresztül tartó inkubációja után a sejtekhez hozzáadunk üregenként 10 µl PBS-ben lévő 1 µM inzulint (a végső koncentráció=100 nM), és a rendszert 37 °C hőmérsékleten 5%-os szén-dioxid-tartalom mellett 10 percen keresztül inkubáljuk.

5. A táptalajt eltávolítjuk, a rendszerhez hozzáadunk üregenként 100 µl HNTG*-t, és a lemezt 10 percen keresztül rázzuk. A sejteket megvizsgáljuk mikroszkóppal, hogy ellenőrizzük, megfelelő mértékben elbomlottak-e.

6. Egy 12 csatornás pipetta felhasználásával a sejteket lekaparjuk a lemezről, és a sejtbomlásterméket többszöri beszívással és kieresztéssel homogenizáljuk. Ezután a sejtbomlásterméket teljes egészében átvisszük az antitesttel borított ELISA lemezre, és azt 1 órán keresztül rázzuk.

7. A sejtbomlásterméket eltávolítjuk, a lemezt mossuk, hozzáadunk üregenként 100 µl anti-pTyr-t (1:3000 arányú hígítás TBST-vel), és a rendszert 30 percen keresztül rázzuk.

8. Az anti-pTyr-t eltávolítjuk, a lemezt mossuk, hozzáadunk üregenként 100 µl Tagót (1:3000 arányú hígítás TBST-vel), és a rendszert 30 percen keresztül rázzuk.

9. Eltávolítjuk a detektáló antitestet, a lemezt mossuk, és hozzáadunk üregenként 100 µl friss ABTS/H_2O_2 oldatot (1,2 µl H_2O_2 10 ml ABTS-hez), hogy az elszíneződés beinduljon.

10. Az OD-t egy Ingres-hez kapcsolt Dynatec MR5000 felhasználásával mérjük. Minden további lépést az Ingres instrukciói alapján kell elvégezni.

6.1.7. Az ELISA vizsgálatokból származó kísérleti eredmények

A találmány különböző vegyületeire vonatkozó, a fent leírt eljárások alkalmazásával nyert kísérleti eredményeket az 1. táblázat tartalmazza.

1. táblázat
Az ELISA vizsgálatok eredményei

Vegyület (példa száma)	PDGFR	FLK–1	EGFR	HER2 kináz	IGF–1R
	IC_{50} (µM)	IC_{50} (µM)	IC_{50} (µM)	IC_{50} (µM)	IC_{50} (µM)
27.	19,4	0,8			
4313.	14,5	18,8	11	16,9	8,0
1B.	12	0,39			
16.	87,4	4,2			

1. táblázat (folytatás)

Vegyület (példa száma)	PDGFR	FLK–1	EGFR	HER2 kináz	IGF–1R
	IC_{50} (μM)	IC_{50} (μM)	IC_{50} (μM)	IC_{50} (μM)	IC_{50} (μM)
17.		11,8			
20.		28,8			
21.		9			
22.		2,2			
24.		8,5			
26.		22,6			
28.				22,5	
29.	7,9	11,2			
32.		20,9			
4.	33,1	2,1			
33.		21,6		39,4	
34.		4,1			
5.	5,8	1,6		90,2	
36.		4		51,5	
37.		9,6			
38.		4,7			
39.		14,8	36,7		
41.		6,4			
8.		2,9		89,8	
42.		0,4			
43.		1,8			
9.	17	0,24			
44.		23,8			
10.		0,17			
45.	53,7	1,1			
11.		0,07			
12.	10,8	0,11			
48.		15,4			
13.		2,3			
50.		4,6			
14.		2,4			
53.		51,4			
15.		4,5		70,6	
55.		8,6			
57.		73,4			
58.		41,2			
59.		22,8			
6.		4,5		92,6	
61.		3,4	44		
62.	65,5	0,14			
64.		36,2			
70.		0,18			
71.		20,3			

1. táblázat (folytatás)

Vegyület (példa száma)	PDGFR	FLK–1	EGFR	HER2 kináz	IGF–1R
	IC_{50} (μM)	IC_{50} (μM)	IC_{50} (μM)	IC_{50} (μM)	IC_{50} (μM)
73.	86	1,6			
74.	55,9	2,7			
76.		8,7			
77.	14,2	1,5			
78.		7,4			
81.	0,15				
7.	5,3	39,6	30,4		

6.2. Sejtnövekedési vizsgálatok

A találmány vegyületeinek a sejtek növekedésére gyakorolt hatása, ami az adott vegyület és egy vagy több receptor tirozin-kináz kölcsönhatásának az eredménye, a következő vizsgálatok elvégzésével mérhető. Hacsak mást nem mondunk, a következő vizsgálatok általánosan alkalmazhatók egy adott vegyület tetszőleges receptor tirozin-kinázzal szemben mutatott aktivitásának a mérésére. Az alább leírt vizsgálatok mindig egy adott receptor tirozin-kinázra vonatkoznak, de szakemberek számára nem okozhat problémát, hogy a leírt eljárásokat egy másik receptor tirozin-kinázzal szembeni aktivitás mérésére adaptálja.

6.2.1. Lágy agar vizsgálat

A lágy agar vizsgálatot alkalmazhatjuk az egyes anyagok sejtnövekedésre gyakorolt hatásának mérésére. Hacsak mást nem mondunk, a lágy agar vizsgálatot a következők szerint hajtjuk végre.

Anyagok és reagensek. Az alábbi anyagokat és reagenseket használjuk fel:

a) Egy 39 °C hőmérsékletű és egy 37 °C hőmérsékletű vízfürdő.
b) A 2X vizsgálati táptalaj olyan 2X Dulbecco-féle 5-módosított Eagle-féle táptalajt (DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Gibco katalógusszám: CA400-4ANO3) tartalmaz, melyet a következőkkel egészítünk ki:
   – 20% magzati szarvasmarhaszérum (FBS, Fetal Bovine Serum), 2 mM nátrium-piruvát 4 mM glutamin-amin és
   – 20 mM HEPES nem esszenciális aminosavak (1:50 100x készletből).
c) Az 1X vizsgálati táptalaj olyan 1X DMEM-ből készül, melyet 10% FBS-sel, 1 mM nátrium-piruváttal, 2 mM glutamin, 10 mM HEPES-sel, nem esszenciális aminosavval (1:100 arányban a 100x készletből).
d) 1,6% SeaPlaque Agarose autokláv üvegben.
e) Steril 35 mm-es Corning lemezek (FMC Bioproducts katalógusszám: 50102).
f) Steril 5 ml-es üvegpipetták (egyesével csomagolva).
g) Steril 15 ml-es és 50 ml-es kúpszerű centrifugakémcsövek.
h) Pipetták és steril hegyek.
i) Steril mikrocentrifuga-kémcsövek.
j) T75 lombikokban lévő sejtek: SKOV–3 (ATCC HTB77).
k) 0,25%-os tripszinoldat (Gibco katalógusszám: 25200-015).

Eljárás. A lágy agar vizsgálat elvégzéséhez a következő eljárást alkalmazzuk:

A) *Az alapréteg elkészítésére vonatkozó eljárás*

1. Az összes táptalajt felmelegítjük a 37 °C hőmérsékletű vízfürdőben.

2. Az 1X vizsgálati táptalaj+0,8% agar elkészítése: a megolvasztott (és 39 °C hőmérsékletre hűtött) agarból a 2X vizsgálati táptalajjal 1:2 (térfogat:térfogat) arányú hígítást készítünk.

3. Amikor nem használjuk, az összes agarral együtt lévő táptalajt melegen tartjuk a 39 °C hőmérsékletű vízfürdőben.

4. Az 1X vizsgálati táptalaj+0,8% agar 1 ml mennyiségét több csészébe szétosztjuk, és a lemezt óvatosan megkeverjük, hogy egy egységes alapréteget kapjunk. A buborékképződést elkerüljük.

5. Az alapréteget hűtőszekrényben hűtjük, amíg az meg nem szilárdul (körülbelül 20 perc). Az alaprétegeket a hűtőszekrényben tarthatjuk éjszakára.

B) *A sejtek összegyűjtésére vonatkozó eljárás*

1. Sejtfonalanként egy lombikot kiveszünk az inkubátorból; a táptalajt leszívjuk; egyszer mossuk PBS-sel és leszívjuk; és hozzáadunk 3 ml tripszinoldatot.

2. Miután minden sejtet kimostunk a lombikból, hozzáadunk 3 ml 1X vizsgálati táptalajt, hogy legátoljuk a tripszinaktivitást. A sejteket föl-le pipettázzuk, majd a szuszpenziót egy 15 ml-es kémcsőbe rakjuk.

3. A sejtek koncentrációját egy Coulter számláló felhasználásával, életképességüket pedig tripánkék-kirekesztéssel határozzuk meg.

4. Kiveszünk a rendszerből akkora mennyiséget, ami elegendő lemezenként 3300 életképes sejt telepítésére, és azt az 1X vizsgálati táptalajjal 1,5 ml-re hígítjuk.

C) *A felső 0,4% „agarose" réteg elkészítésére vonatkozó eljárás*

1. Hozzáadjuk a TBST-vegyületeket kétszer akkora koncentrációban, mint amilyen a kívánt végső vizsgálati koncentrációjuk; +1,5 ml 1X vizsgálati táptalaj és 10% FBS elegyben lévő sejtszuszpenziót; +1,5 ml 1X vizsgálati táptalajt+0,8% „agarose"-t*: összesen=3 ml 1X táptalaj, 10% FBS+0,4% „agarose", 3300 életképes sejt/ml koncentráció mellett, TBST-vegyületekkel és azok nélkül.

*(A 2X táptalajnak a fent leírt alapréteg-eljáráshoz felhasznált 1,6% agar 30-cal való 1:2 arányú hígításával állítjuk elő.)

2. A vizsgálati elegy (Assay Mix) 1 ml mennyiségét felhordjuk az alapréteg 1 ml mennyiségére. A másodpéldányokat a 3 ml térfogatból borítjuk be.

3. A csészéket 2–3 héten keresztül inkubáljuk egy 100%-os nedvességtartalmú, 10% szén-dioxid-tartalmú inkubátorban.

4. A 60 mikronos és annál nagyobb kolóniákat pozitívnak értékeljük.

6.2.2. Szulforodamin B (SRB) növekedési vizsgálatok

Az SRB vizsgálatokat az egyes anyagok sejtnövekedésre kifejtett hatásának mérésére használhatjuk. A vizsgálatokat a következők szerint végezzük el:

1. vizsgálat: 3T3/E/H+TGF-a(T) sejtnövekedési SRB vizsgálat

Anyagok:
96 üregű, lapos fenekű steril lemezek,
96 üregű kerek fenekű steril lemezek,
steril 25 ml-es és 100 ml-es tartály,
pipetták, többcsatornás pipettázó,
steril pipettacsúcsok,
steril 15 ml-es és 50 ml-es kémcsövek.
Reagensek:
1%-os ecetsavban lévő 0,4%-os SRB,
10 mM Tris-bázis,
10%-os TCA,
1%-os ecetsav,
steril DMSO (Sigma),
DMSO-ban lévő vegyület (100 mM vagy még kisebb koncentrációjú szabványoldat),
sejtdisszociációs oldatban lévő 25%-os Trypsin-EDTA (Sigma).
Sejtfonal és növesztő táptalaj:
3T3/E/H+TGF-a(T) (NIH 3T3 clone 7 sejtek, melyek EGF-R/HER2 chimerát és TGF-a-t tartalmaznak, tumorból származó autokrin huroksejtek),
2%-os borjúszérum/DMEM+2 mM glutamin.
Eljárás:
0. nap: A sejtek felhordása
A vizsgálat ezen részét egy lamináris áramlási térben (laminar flow hood) visszük végbe.

1. A sejteket a szokásos módon tripszinezzük. A sejtszuszpenzióból 100 µl mennyiséget átteszünk 10 ml izotónba. A sejteket a Coulter számlálóval számoljuk.

2. A sejteket növesztő táptalajban 60 000 sejt/ml sűrűségűre hígítjuk. Egy 96 üregű lapos fenekű lemez minden üregébe átteszünk belőlük 100 µl mennyiséget, hogy 6000 sejt/üreg sűrűséget kapjunk.

3. Minden egyes vegyülethez egy fél lemezt használunk fel (4 sor), a vegyület minden egyes koncentrációjához 4 üreget használunk, 4 üreget a táptalajkontrollhoz és 4 üreget a DMSO-kontrollhoz.

4. A lemezeket óvatosan összerázzuk, hogy a sejtek egyenletesen oszoljanak el rajtuk.

5. A lemezeket 37 °C hőmérsékleten inkubáljuk egy 10%-os szén-dioxid-tartalmú inkubátorban.

1. nap: A vegyületek hozzáadása
A vizsgálat ezen részét egy lamináris áramlási térben visszük végbe.

1. Egy 96 üregű kerek fenekű lemez 3–11. oszlopaiba beleteszünk 125 µl növesztési táptalajt. Ezt a lemezt használjuk a vegyületek kititrálására; vegyületenként 4 sort.

2. Egy steril 15 ml-es kémcsőben, 8 µl mennyiségű vegyület összesen 2 ml növesztő táptalajba való vitelével elkészítjük a vegyület legmagasabb koncentrációjának 2X oldatát 1:250 arányú hígításra. Ennél a hígításnál a DMSO koncentrációja 0,4% a 2X oldat esetében vagy 0,2% az 1X oldat esetében a sejteken. A vegyület kiindulási koncentrációja általában 100 µM, de ez a koncentráció változhat a vegyület oldhatóságától függően.

3. A kiindulási vegyület 2X oldatát vigyük a 96 üregű kerek fenekű lemez 12. oszlopában lévő üregnégyesbe. A lemezen jobbról balra 1:2 arányú sorozathígítást végzünk oly módon, hogy a 12. oszlopból 125 µl mennyiséget átviszünk a 11. oszlopba, a 11. oszlopból a 10. oszlopba, és így tovább. A 96 üregű lapos fenekű lemez megfelelő üregeibe a sejteken lévő táptalaj 100 µl mennyiségére 100 µl mennyiségeket viszünk a vegyület hígításaiból. Az üregenkénti teljes térfogat 200 µl kell legyen.

4. A vivőanyag (vehicle) kontrollhoz DMSO-ból 2X oldatot készítünk, a táptalajban lévő 0,4% DMSO-koncentráció mellett. A DMSO-oldat 100 µl mennyiségét a megfelelő sejtes üregekbe visszük. A DMSO végső koncentrációja 0,2%.

5. A táptalajkontroll üregei esetében a megfelelő sejtes üregekhez üregenként 100 µl növesztő táptalajt adunk.

6. A lemezt visszatesszük az inkubátorba, és 4 napon keresztül inkubáljuk.

5. nap: A vizsgálat végrehajtása
A vizsgálat ezen részét az asztalon visszük végbe.

1. Leszívjuk vagy leöntjük a táptalajt. A sejtek fixálására minden egyes üreghez hozzáadunk 200 µl hideg, 1%-os TCA-t. A lemezt legalább 60 percen keresztül inkubáljuk 4 °C hőmérsékleten.

2. A TCA-t eltávolítjuk, és az üregeket vízzel ötször mossuk. A lemezeket fejjel lefelé papírtörölközőkre téve szárítjuk.

3. A sejteket 0,4%-os SRB-vel megfestjük, 10 percen keresztül.

4. Az SRB-t leöntjük, és az üregeket ötször öblítjük 1%-os ecetsavval. A lemezeket teljesen fejjel lefelé fordítva szárítjuk papírtörölközőkön.

5. A festéket üregenként 100 μl 10 mM Tris-bázissal oldhatóvá tesszük egy rázógépen, 5–10 perc alatt.

6. A lemezeket egy Dynatech ELISA lemezleolvasóval leolvassuk 570 nm hullámhosszon, 630 nm-en felvett referencia mellett.

2. vizsgálat: 3T3/EGF-R+TGF-a(T) sejtnövekedési SRB vizsgálat

Anyagok és reagensek: ugyanaz, mint az 1. vizsgálat esetében.

Sejtfonal és növesztő táptalaj:

3T3/EGF-R+TGF-a(T) (NIH 3T3 clone 7 sejtek, melyek EGF-R és TGF-a-t tartalmaznak, tumorból származó autokrin huroksejtek),

2%-os borjúszérum/DMEM+2 mM glutamin.

Eljárás:

0. nap: A sejtek felhordása

A vizsgálat ezen részét egy lamináris áramlási térben visszük végbe.

1. A sejteket a szokásos módon tripszinezzük. A sejtszuszpenzióból 100 μl mennyiséget átteszünk 10 ml izotónba. A sejteket a Coulter számlálóval számoljuk.

2. A sejteket növesztő táptalajban 60 000 sejt/ml sűrűségűre hígítjuk. Egy 96 üregű lapos fenekű lemez minden üregébe ebből átteszünk 100 μl mennyiséget, hogy 6000 sejt/üreg sűrűséget kapjunk.

3. Minden egyes vegyülethez egy fél lemezt használunk fel (4 sor), a vegyület minden egyes koncentrációjához 4 üreget használunk, 4 üreget a táptalajkontrollhoz és 4 üreget a DMSO-kontrollhoz.

4. A lemezeket óvatosan összerázzuk, hogy a sejtek egyenletesen oszoljanak el rajtuk.

5. A lemezeket 37 °C hőmérsékleten inkubáljuk egy 10%-os szén-dioxid-tartalmú inkubátorban.

1. nap: A vegyület hozzáadása: ugyanaz, mint az 1. vizsgálat esetében.

5. nap: A vizsgálat végrehajtása: ugyanaz, mint az 1. vizsgálat esetében.

3. vizsgálat: 3T3/PDGP-βR/PDGF-BB(T) sejtnövekedési SRB vizsgálat

Sejtfonal és növesztő táptalaj:

3T3/PDGF-βR/PDGF-BB(T) (NIH 3T3 clone 7 sejtek, melyek PDGF β-receptort és PDGF-BB-t tartalmaznak, thymushiányos egerekből kimetszett tumorokból),

2%-os borjúszérum/DMEM+2 mM glutamin.

Eljárás:

0. nap: A sejtek felhordása

A vizsgálat ezen részét egy lamináris áramlási térben visszük végbe.

1. A sejteket a szokásos módon tripszinezzük. A sejtszuszpenzióból 100 μl mennyiséget átteszünk 10 ml izotónba. A sejteket a Coulter számlálóval számoljuk.

2. A sejteket növesztő táptalajban 60 000 sejt/ml sűrűségűre hígítjuk. Egy 96 üregű lapos fenekű lemez minden üregébe ebből átteszünk 100 μl mennyiséget, hogy 6000 sejt/üreg sűrűséget kapjunk.

3. Minden egyes vegyülethez egy fél lemezt használunk fel (4 sor), a vegyület minden egyes koncentrációjához 4 üreget használunk, 4 üreget a táptalajkontrollhoz és 4 üreget a DMSO-kontrollhoz.

4. A lemezeket óvatosan összerázzuk, hogy a sejtek egyenletesen oszoljanak el rajtuk.

5. A lemezeket 37 °C hőmérsékleten inkubáljuk egy 10%-os szén-dioxid-tartalmú inkubátorban.

1. nap: A vegyület hozzáadása: ugyanaz, mint az 1. vizsgálat esetében.

5. nap: A vizsgálat végrehajtása: ugyanaz, mint az 1. vizsgálat esetében.

4. vizsgálat: Humán simaizomsejtek (SMC, Smooth Muscle Cells) sejtnövekedési SRB vizsgálata

Anyagok és reagensek: ugyanaz, mint az 1. vizsgálat esetében.

Sejtfonal és növesztő táptalaj:

Humán aortasimaizom-sejtek (Clonetics),

Clonetics-féle „Bullet" készlet: Simaizom-alaptáptalaj (SmBM, Smooth Muscle Basal Medium), ami olyan módosított MCDB 131, mely a következő összetevőket tartalmazza: magzati szarvasmarhaszérum (5%), hFGF (2 ng/ml), hEGF (0,1 ng/ml), inzulin (5,0 μg/ml), gentamicin (50 μg/ml) és amhotericin B (50 ng/ml).

Eljárás:

0. nap: A sejtek felhordása

A vizsgálat ezen részét egy lamináris áramlási térben visszük végbe.

1. A sejteket a szokásos módon tripszinezzük. A sejtszuszpenzióból 100 μl mennyiséget átteszünk 10 ml izotónba. A sejteket a Coulter számlálóval számoljuk.

2. A sejteket növesztő táptalajban 60 000 sejt/ml sűrűségűre hígítjuk. Egy 96 üregű lapos fenekű lemez minden üregébe ebből átteszünk 100 μl mennyiséget, hogy 6000 sejt/üreg sűrűséget kapjunk.

3. Minden egyes vegyülethez egy fél lemezt használunk fel (4 sor), a vegyület minden egyes koncentrációjához 4 üreget használunk, 4 üreget a táptalajkontrollhoz és 4 üreget a DMSO-kontrollhoz.

4. A lemezeket óvatosan összerázzuk, hogy a sejtek egyenletesen oszoljanak el rajtuk.

5. A lemezeket 37 °C hőmérsékleten inkubáljuk egy 10%-os szén-dioxid-tartalmú inkubátorban.

1. nap: A vegyület hozzáadása: ugyanaz, mint az 1. vizsgálat esetében.

5. nap: A vizsgálat végrehajtása: ugyanaz, mint az 1. vizsgálat esetében.

6.2.3. 3T3 sejtnövekedési vizsgálat

1. vizsgálat: PDGF-indukált BrdU egyesítési vizsgálat (PDGF-Induced BrdU Incorporation Assay)

Anyagok és reagensek

1. PDGF: humán PDGF B/B; 1276-956, Boehringer Mannheim, Németország.
2. BrdU jelzőreagens: 10 mM, PBS-ben (pH=7,4), katalógusszám: 1 647 229, Boehringer Mannheim, Németország.

3. FixDenat: fixálóoldat (felhasználásra kész állapotban), katalógusszám: 1 647 229, Boehringer Mannheim, Németország.
4. Anti-BrdU-POD: peroxidázzal konjugált monoklonális egérantitest, katalógusszám: 1 647 229, Boehringer Mannheim, Németország.
5. TMB-szubsztrátoldat: tetrametil-benzidin (TMB), felhasználásra kész állapotban, katalógusszám: 1 647 229, Boehringer Mannheim, Németország.
6. PBS mosóoldat: 1X PBS, pH=7,4, helyben készített.
7. Albumin, szarvasmarha (BSA): V frakciójú por; A–8551, Sigma Chemical Co., USA.

Eljárás

1. 3T3 sejtfonal: 3T3/EGFRc7.

2. A sejteket 8000 sejt/üreg sűrűségben DMEM, 10% CS és 2 mM Gln elegyébe telepítjük egy 96 üregű lemezben. A sejteket egy éjszakán keresztül inkubáljuk 37 °C hőmérsékleten, 5%-os szén-dioxid-tartalom mellett.

3. 24 óra elteltével a sejteket PBS-sel mossuk, majd 24 órán keresztül szérummentes táptalajban (0% CS DMEM és 0,1% BSA) a szérumra nézve kiéheztetjük.

4. A 3. napon a sejtekhez egy időben hozzáadjuk a tesztvegyületet és a ligandumot (PDGF=3,8 nM, DMEM-ben 0,1% BSA mellett állítjuk elő). A negatív kontrollüregekhez csak szérummentes DMEM+0,1% BSA-t adunk; a pozitív kontrollsejtekhez hozzáadjuk a ligandumot (PDGF), de a tesztvegyületet nem. A tesztvegyületeket szérummentes, ligandumtartalmú DMEM-ben állítjuk elő egy 96 üregű lemezben, és sorozathígítással 7 tesztkoncentrációt készítünk.

5. 20 óra ligandumaktiválás után a rendszerhez hígított BrdU jelzőreagenst adunk (1:100 arányú hígítás DMEM-ben, 0,1% BSA), és a sejteket a BrdU-val (végső koncentráció=10 μM) 1,5 órán keresztül inkubáljuk.

6. A jelzőreagenssel való inkubálás után a táptalajt dekantálással és a fejjel lefelé fordított lemez papírtörölközőhöz való érintésével eltávolítjuk. A rendszerhez hozzáadunk üregenként 50 μl FixDenat-oldatot, és a lemezeket szobahőmérsékleten 45 percen keresztül inkubáljuk egy lemezrázón.

7. A FixDenat-oldatot dekantálással és a fejjel lefelé fordított lemez papírtörölközőhöz való érintésével alaposan eltávolítjuk. Blokkolóoldatként tejet (PBS-ben lévő 5%-os dehidratált tej, 200 μl/üreg) adunk a rendszerhez, és a lemezt szobahőmérsékleten 30 percen keresztül inkubáljuk egy lemezrázón.

8. A blokkolóoldatot dekantálással eltávolítjuk, és az üregeket egyszer mossuk PBS-sel. A rendszerhez hozzáadunk üregenként 100 μl anti-BrdU-POD oldatot (1:100 arányú hígítás PBS-ben, 1% BSA), és a lemezt szobahőmérsékleten 90 percen keresztül inkubáljuk egy lemezrázón.

9. Az antitestkonjugátot dekantálással és az üregek ötszöri PBS-sel való kiöblítésével alaposan eltávolítjuk, és a lemezt fejjel lefelé fordítva egy papírtörölközőre téve szárítjuk.

10. A rendszerhez hozzáadunk üregenként 100 μl TMB-szubsztrátoldatot, és a lemezt szobahőmérsékleten 20 percen keresztül inkubáljuk egy lemezrázón, amíg a színfejlődés elégséges nem lesz a fotometriás detektáláshoz.

11. A minták abszorbanciáját 410 nm hullámhosszon mérjük („duális hullámhossz" módban, ahol egy szűrő referencia-hullámhosszként 490 nm-en mér), egy Dynatech ELISA lemezleolvasó felhasználásával.

2. vizsgálat: EGF-indukált BrdU egyesítési vizsgálat

Anyagok és reagensek

1. EGF: egér EGF, 201; Toyobo, Co., Ltd. Japán.
2. BrdU jelzőreagens: 10 mM, PBS-ben (pH=7,4), katalógusszám: 1 647 229, Boehringer Mannheim, Németország.
3. FixDenat: fixálóoldat (felhasználásra kész állapotban), katalógusszám: 1 647 229, Boehringer Mannheim, Németország.
4. Anti-BrdU-POD: peroxidázzal konjugált monoklonális egérantitest, katalógusszám: 1 647 229, Boehringer Mannheim, Németország.
5. TMB-szubsztrátoldat: tetrametil-benzidin (TMB), felhasználásra kész állapotban, katalógusszám: 1 647 229, Boehringer Mannheim, Németország.
6. PBS mosóoldat: 1X PBS, pH=7,4, helyben készített.
7. Albumin, szarvasmarha (BSA): V frakciójú por; A–8551, Sigma Chemical Co., USA.

Eljárás

1. 3T3 sejtfonal: 3T3/EGFRC7.

2. A sejteket 8000 sejt/üreg sűrűségben DMEM, 10% CS és 2 mM Gln elegyébe telepítjük egy 96 üregű lemezben. A sejteket egy éjszakán keresztül inkubáljuk 37 °C hőmérsékleten, 5%-os szén-dioxid-tartalom mellett.

3. 24 óra elteltével a sejteket PBS-sel mossuk, majd 24 órán keresztül szérummentes táptalajban (0% CS DMEM és 0,1% BSA) a szérumra nézve kiéheztetjük.

4. A 3. napon a sejtekhez egy időben hozzáadjuk a tesztvegyületet és a ligandumot (EGF=2 nM, DMEM-ben 0,1% BSA mellett állítjuk elő). A negatív kontrollüregekhez csak szérummentes DMEM+0,1% BSA-t adunk; a pozitív kontrollsejtekhez hozzáadjuk a ligandumot (EGF), de a tesztvegyületet nem. A tesztvegyületeket szérummentes, ligandumtartalmú DMEM-ben állítjuk elő egy 96 üregű lemezben, és sorozathígítással 7 tesztkoncentrációt készítünk.

5. 20 óra ligandumaktiválás után a rendszerhez hígított BrdU jelzőreagenst adunk (1:100 arányú hígítás DMEM-ben, 0,1% BSA), és a sejteket a BrdU-val (végső koncentráció=10 μM) 1,5 órán keresztül inkubáljuk.

6. A jelzőreagenssel való inkubálás után a táptalajt dekantálással és a fejjel lefelé fordított lemez papírtörölközőhöz való érintésével eltávolítjuk. A rendszerhez hozzáadunk üregenként 50 μl FixDenat-oldatot, és a

lemezeket szobahőmérsékleten 45 percen keresztül inkubáljuk egy lemezrázón.

7. A FixDenat-oldatot dekantálással és a fejjel lefelé fordított lemez papírtörölközőhöz való érintésével alaposan eltávolítjuk. Blokkolóoldatként tejet (PBS-ben lévő 5%-os dehidratált tej, 200 μl/üreg) adunk a rendszerhez, és a lemezt szobahőmérsékleten 30 percen keresztül inkubáljuk egy lemezrázón.

8. A blokkolóoldatot dekantálással eltávolítjuk, és az üregeket egyszer mossuk PBS-sel. A rendszerhez hozzáadunk üregenként 100 μl anti-BrdU-POD oldatot (1:100 arányú hígítás PBS-ben, 1% BSA), és a lemezt szobahőmérsékleten 90 percen keresztül inkubáljuk egy lemezrázón.

9. Az antitestkonjugátot dekantálással és az üregek ötszöri PBS-sel való kiöblítésével alaposan eltávolítjuk, és a lemezt fejjel lefelé fordítva egy papírtörölközőre téve szárítjuk.

10. A rendszerhez hozzáadunk üregenként 100 μl TMB-szubsztrátoldatot, és a lemezt szobahőmérsékleten 20 percen keresztül inkubáljuk egy lemezrázón, amíg a színfejlődés elégséges nem lesz a fotometriás detektáláshoz.

11. A minták abszorbanciáját 410 nm hullámhosszon mérjük („duális hullámhossz" módban, ahol egy szűrő referencia-hullámhosszként 490 nm-en mér), egy Dynatech ELISA lemezleolvasó felhasználásával.

3. vizsgálat: EGF-indukált HER2-hajtott BrdU egyesítési vizsgálat

Anyagok és reagensek

1. EGF: egér, 201; Toyobo, Co., Ltd., Japán.
2. BrdU jelzőreagens: 10 mM, PBS-ben (pH=7,4), katalógusszám: 1 647 229, Boehringer Mannheim, Németország.
3. FixDenat: fixálóoldat (felhasználásra kész állapotban), katalógusszám: 1 647 229, Boehringer Mannheim, Németország.
4. Anti-BrdU-POD: peroxidázzal konjugált monoklonális egérantitest, katalógusszám: 1 647 229, Boehringer Mannheim, Németország.
5. TMB-szubsztrátoldat: tetrametil-benzidin (TMB), felhasználásra kész állapotban, katalógusszám: 1 647 229, Boehringer Mannheim, Németország.
6. PBS mosóoldat: 1X PBS, pH=7,4, helyben készített.
7. Albumin, szarvasmarha (BSA): V frakciójú por; A–8551, Sigma Chemical Co., USA.

Eljárás

1. 3T3 sejtfonal: 3T3/EGFr/Her2/EGFr (EGFr egy Her2 kináz doménnel).

2. A sejteket 8000 sejt/üreg sűrűségben DMEM, 10% CS és 2 mM Gln elegyébe telepítjük egy 96 üregű lemezben. A sejteket egy éjszakán keresztül inkubáljuk 37 °C hőmérsékleten, 5%-os szén-dioxid-tartalom mellett.

3. 24 óra elteltével a sejteket PBS-sel mossuk, majd 24 órán keresztül szérummentes táptalajban (0% CS DMEM és 0,1% BSA) a szérumra nézve kiéheztetjük.

4. A 3. napon a sejtekhez egy időben hozzáadjuk a tesztvegyületet és a ligandumot (EGF=2 nM, DMEM-ben 0,1% BSA mellett állítjuk elő). A negatív kontrollüregekhez csak szérummentes DMEM+0,1% BSA-t adunk; a pozitív kontrollsejtekhez hozzáadjuk a ligandumot (EGF), de a tesztvegyületet nem. A tesztvegyületeket szérummentes, ligandumtartalmú DMEM-ben állítjuk elő egy 96 üregű lemezben, és sorozathígítással 7 tesztkoncentrációt készítünk.

5. 20 óra ligandumaktiválás után a rendszerhez hígított BrdU jelzőreagenst adunk (1:100 arányú hígítás DMEM-ben, 0,1% BSA), és a sejteket a BrdU-val (végső koncentráció=10 μM) 1,5 órán keresztül inkubáljuk.

6. A jelzőreagenssel való inkubálás után a táptalajt dekantálással és a fejjel lefelé fordított lemez papírtörölközőhöz való érintésével eltávolítjuk. A rendszerhez hozzáadunk üregenként 50 μl FixDenat-oldatot, és a lemezeket szobahőmérsékleten 45 percen keresztül inkubáljuk egy lemezrázón.

7. A FixDenat-oldatot dekantálással és a fejjel lefelé fordított lemez papírtörölközőhöz való érintésével alaposan eltávolítjuk. Blokkolóoldatként tejet (PBS-ben lévő 5%-os dehidratált tej, 200 μl/üreg) adunk a rendszerhez, és a lemezt szobahőmérsékleten 30 percen keresztül inkubáljuk egy lemezrázón.

8. A blokkolóoldatot dekantálással eltávolítjuk, és az üregeket egyszer mossuk PBS-sel. A rendszerhez hozzáadunk üregenként 100 μl anti-BrdU-POD oldatot (1:100 arányú hígítás PBS-ben, 1% BSA), és a lemezt szobahőmérsékleten 90 percen keresztül inkubáljuk egy lemezrázón.

9. Az antitestkonjugátot dekantálással és az üregek ötszöri PBS-sel való kiöblítésével alaposan eltávolítjuk, és a lemezt fejjel lefelé fordítva egy papírtörölközőre téve szárítjuk.

10. A rendszerhez hozzáadunk üregenként 100 μl TMB-szubsztrátoldatot, és a lemezt szobahőmérsékleten 20 percen keresztül inkubáljuk egy lemezrázón, amíg a színfejlődés elégséges nem lesz a fotometriás detektáláshoz.

11. A minták abszorbanciáját 410 nm hullámhosszon mérjük („duális hullámhossz" módban, ahol egy szűrő referencia-hullámhosszként 490 nm-en mér), egy Dynatech ELISA lemezleolvasó felhasználásával.

4. vizsgálat: IGF1-indukált BrdU egyesítési vizsgálat

Anyagok és reagensek

1. IGF1 ligandum: humán, rekombináns; G511, Promega Corp., USA.
2. BrdU jelzőreagens: 10 mM, PBS-ben (pH=7,4), katalógusszám: 1 647 229, Boehringer Mannheim, Németország.
3. FixDenat: fixálóoldat (felhasználásra kész állapotban), katalógusszám: 1 647 229, Boehringer Mannheim, Németország.

4. Anti-BrdU-POD: peroxidázzal konjugált monoklonális egérantitest, katalógusszám: 1 647 229, Boehringer Mannheim, Németország.
5. TMB-szubsztrátoldat: tetrametil-benzidin (TMB), felhasználásra kész állapotban, katalógusszám: 1 647 229, Boehringer Mannheim, Németország.
6. PBS mosóoldat: 1X PBS, pH=7,4, helyben készített.
7. Albumin, szarvasmarha (BSA): V frakciójú por; A–8551, Sigma Chemical Co., USA.

Eljárás

1. 3T3 sejtfonal: 3T3/IGF1r.

2. A sejteket 8000 sejt/üreg sűrűségben DMEM, 10% CS és 2 mM Gln elegyébe telepítjük egy 96 üregű lemezben. A sejteket egy éjszakán keresztül inkubáljuk 37 °C hőmérsékleten, 5%-os szén-dioxid-tartalom mellett.

3. 24 óra elteltével a sejteket PBS-sel mossuk, majd 24 órán keresztül szérummentes táptalajban (0% CS DMEM és 0,1% BSA) a szérumra nézve kiéheztetjük.

4. A 3. napon a sejtekhez egy időben hozzáadjuk a tesztvegyületet és a ligandumot (IGF1=3,3 nM, DMEM-ben 0,1% BSA mellett állítjuk elő). A negatív kontrollüregekhez csak szérummentes DMEM+0,1% BSA-t adunk; a pozitív kontrollsejtekhez hozzáadjuk a ligandumot (IGF1), de a tesztvegyületet nem. A tesztvegyületeket szérummentes, ligandumtartalmú DMEM-ben állítjuk elő egy 96 üregű lemezben, és sorozathígítással 7 tesztkoncentrációt készítünk.

5. 16 óra ligandumaktiválás után a rendszerhez hígított BrdU jelzőreagenst adunk (1:100 arányú hígítás DMEM-ben, 0,1% BSA), és a sejteket a BrdU-val (végső koncentráció=10 μM) 1,5 órán keresztül inkubáljuk.

6. A jelzőreagenssel való inkubálás után a táptalajt dekantálással és a fejjel lefelé fordított lemez papírtörölközőhöz való érintésével eltávolítjuk. A rendszerhez hozzáadunk üregenként 50 μl FixDenat-oldatot, és a lemezeket szobahőmérsékleten 45 percen keresztül inkubáljuk egy lemezrázón.

7. A FixDenat-oldatot dekantálással és a fejjel lefelé fordított lemez papírtörölközőhöz való érintésével alaposan eltávolítjuk. Blokkolóoldatként tejet (PBS-ben lévő 5%-os dehidratált tej, 200 μl/üreg) adunk a rendszerhez, és a lemezt szobahőmérsékleten 30 percen keresztül inkubáljuk egy lemezrázón.

8. A blokkolóoldatot dekantálással eltávolítjuk, és az üregeket egyszer mossuk PBS-sel. A rendszerhez hozzáadunk üregenként 100 μl anti-BrdU-POD oldatot (1:100 arányú hígítás PBS-ben, 1% BSA), és a lemezt szobahőmérsékleten 90 percen keresztül inkubáljuk egy lemezrázón.

9. Az antitestkonjugátot dekantálással és az üregek ötszöri PBS-sel való kiöblítésével alaposan eltávolítjuk, és a lemezt fejjel lefelé fordítva egy papírtörölközőre téve szárítjuk.

10. A rendszerhez hozzáadunk üregenként 100 μl TMB-szubsztrátoldatot, és a lemezt szobahőmérsékleten 20 percen keresztül inkubáljuk egy lemezrázón, amíg a színfejlődés elégséges nem lesz a fotometriás detektáláshoz.

11. A minták abszorbanciáját 410 nm hullámhosszon mérjük („duális hullámhossz" módban, ahol egy szűrő referencia-hullámhosszként 490 nm-en mér), egy Dynatech ELISA lemezleolvasó felhasználásával.

5. vizsgálat: Inzulinindukált BrdU egyesítési vizsgálat

Anyagok és reagensek

1. Inzulin: kristályos, szarvasmarha, cink; 13 007, Gibco BRL, USA.
2. BrdU jelzőreagens: 10 mM, PBS-ben (pH=7,4), katalógusszám: 1 647 229, Boehringer Mannheim, Németország.
3. FixDenat: fixálóoldat (felhasználásra kész állapotban), katalógusszám: 1 647 229, Boehringer Mannheim, Németország.
4. Anti-BrdU-POD: peroxidázzal konjugált monoklonális egérantitest, katalógusszám: 1 647 229, Boehringer Mannheim, Németország.
5. TMB-szubsztrátoldat: tetrametil-benzidin (TMB), felhasználásra kész állapotban, katalógusszám: 1 647 229, Boehringer Mannheim, Németország.
6. PBS mosóoldat: 1X PBS, pH=7,4, helyben készített.
7. Albumin, szarvasmarha (BSA): V frakciójú por; A–8551, Sigma Chemical Co., USA.

Eljárás

1. 3T3 sejtfonal: H25.

2. A sejteket 8000 sejt/üreg sűrűségben DMEM, 10% CS és 2 mM Gln elegyébe telepítjük egy 96 üregű lemezben. A sejteket egy éjszakán keresztül inkubáljuk 37 °C hőmérsékleten, 5%-os szén-dioxid-tartalom mellett.

3. 24 óra elteltével a sejteket PBS-sel mossuk, majd 24 órán keresztül szérummentes táptalajban (0% CS DMEM és 0,1% BSA) a szérumra nézve kiéheztetjük.

4. A 3. napon a sejtekhez egy időben hozzáadjuk a tesztvegyületet és a ligandumot (Inzulin=10 nM, DMEM-ben 0,1% BSA mellett állítjuk elő). A negatív kontrollüregekhez csak szérummentes DMEM+0,1% BSA-t adunk; a pozitív kontrollsejtekhez hozzáadjuk a ligandumot (Inzulin), de a tesztvegyületet nem. A tesztvegyületeket szérummentes, ligandumtartalmú DMEM-ben állítjuk egy 96 üregű lemezben, és sorozathígítással 7 tesztkoncentrációt készítünk.

5. 16 óra ligandumaktiválás után a rendszerhez hígított BrdU jelzőreagenst adunk (1:100 arányú hígítás DMEM-ben, 0,1% BSA), és a sejteket a BrdU-val (végső koncentráció=10 μM) 1,5 órán keresztül inkubáljuk.

6. A jelzőreagenssel való inkubálás után a táptalajt dekantálással és a fejjel lefelé fordított lemez papírtörölközőhöz való érintésével eltávolítjuk. A rendszerhez hozzáadunk üregenként 50 μl FixDenat-oldatot, és a lemezeket szobahőmérsékleten 45 percen keresztül inkubáljuk egy lemezrázón.

7. A FixDenat-oldatot dekantálással és a fejjel lefelé fordított lemez papírtörölközőhöz való érintésével alaposan eltávolítjuk. Blokkolóoldatként tejet (PBS-ben lévő 5%-os dehidratált tej, 200 μl/üreg) adunk a rendszerhez, és a lemezt szobahőmérsékleten 30 percen keresztül inkubáljuk egy lemezrázón.

8. A blokkolóoldatot dekantálással eltávolítjuk, és az üregeket egyszer mossuk PBS-sel. A rendszerhez hozzáadunk üregenként 100 μl anti-BrdU-POD oldatot (1:100 arányú hígítás PBS-ben, 1% BSA), és a lemezt szobahőmérsékleten 90 percen keresztül inkubáljuk egy lemezrázón.

9. Az antitestkonjugátot dekantálással és az üregek ötszöri PBS-sel való kiöblítésével alaposan eltávolítjuk, és a lemezt fejjel lefelé fordítva egy papírtörölközőre téve szárítjuk.

10. A rendszerhez hozzáadunk üregenként 100 μl TMB-szubsztrátoldatot, és a lemezt szobahőmérsékleten 20 percen keresztül inkubáljuk egy lemezrázón, amíg a színfejlődés elégséges nem lesz a fotometriás detektáláshoz.

11. A minták abszorbanciáját 410 nm hullámhosszon mérjük („duális hullámhossz" módban, ahol egy szűrő referencia-hullámhosszként 490 nm-en mér), egy Dynatech ELISA lemezleolvasó felhasználásával.

6.2.4. HUV-EC-C vizsgálat

A vegyületek aktivitásának a mérésére a következő eljárást is alkalmazhatjuk:

0. nap

1. A HUV-EC-C sejteket (humán köldökvéna endotheliális sejtek) (Amerikai szövetgyűjtemény; katalógusszám: 1730 CRL) mossuk és tripszinezzük. A rendszert kétszer mossuk Dulbecco-féle foszfátpufferezett sóoldattal (D-PBS; a Gibco BRL-től; katalógusszám: 14190-029), körülbelül 1 ml mennyiség felhasználásával a szövettenyésztő csésze 10 cm^2-einként. A tripszinezést 0,05% Tripszin-EDTA felhasználásával végezzük, nem enzimatikus sejtdisszociációs oldatban (Sigma Chemical Company; katalógusszám: C–1544). A 0,05%-os tripszint 0,25%-os tripszin/1 mM EDTA (Gibco; katalógusszám: 25200-049) sejtdisszociációs oldatban való hígításával készítjük el. A tripszinezést a szövettenyésztő csésze 25–30 cm^2-einként körülbelül 1 ml oldattal végezzük 37 °C hőmérsékleten, körülbelül 5 percen keresztül. Miután a sejtek leváltak a csészéről, hozzáadunk ugyanakkora mennyiségű vizsgálati táptalajt, és áttesszük egy 50 ml-es steril centrifugáló kémcsőbe (Fisher Scientific; katalógusszám: 05-539-6).

2. A sejteket 35 ml vizsgálati táptalajjal mossuk az 50 ml-es steril centrifugáló kémcsőben a vizsgálati táptalaj hozzáadásával, körülbelül 200×g-vel 10 percen keresztül centrifugálunk, a felülúszó folyadékot leszívjuk és 35 ml D-PBS-sel újraszuszpendáljuk. A D-PBS-sel való mosást még kétszer megismételjük, és a sejteket a szövettenyésztő csésze 10 cm^2-einként körülbelül 1 ml vizsgálati táptalajban újraszuszpendáljuk. A vizsgálati táptalaj összetétele a következő: F12K táptalaj (Gibco BRL; katalógusszám: 21127-014)+0,5% hővel inaktivált magzati szarvasmarhaszérum. A sejteket egy Coulter Counter®v (Coulter Electronics, Inc.) felhasználásával számláljuk, majd hozzáadunk annyi vizsgálati táptalajt, hogy a sejtek koncentrációja 0,8–1,0×10^5 legyen ml-enként.

3. A sejteket 96 üregű lapos fenekű lemezekre visszük 100 μl/üreg vagy 0,8–1,0×10^4 sejt/üreg mennyiségben, és a lemezeket körülbelül 24 órán keresztül inkubáljuk 37 °C hőmérsékleten 5%-os szén-dioxid-tartalom mellett.

1. nap

1. Különálló 96 üregű lemezekben kétszeres gyógyszerhígítási sort készítünk, általában 50 μM-tól lefelé 0 μM-ig. Ugyanazt a vizsgálati táptalajt használjuk most is, mint amit a 0. nap 2. lépésében leírtunk. A hígítási sorokat a lemez megfelelő oszlopának felső üregéhez 90 μl/üreg mennyiségű, 200 μM koncentrációjú (4X a végső üregbeni koncentráció) gyógyszer hozzáadásával készítjük el. Mivel a szabvány-gyógyszerkoncentráció általában 20 mM DMSO-ban, így a 200 μM gyógyszer-koncentráció 2% DMSO-t tartalmaz.

Így a gyógyszer hígítási soraihoz olyan oldószert használunk, melyet a vizsgálati táptalajban (F12K+0,5 magzati szarvasmarhaszérum) 2% DMSO-tartalommal készítünk el, azért, hogy a gyógyszer felhígúljon, de a DMSO-koncentráció ne változzon. Ezt az oldószert hozzáadjuk az oszlop fennmaradó üregeihez, 60 μl/üreg mennyiségben. Az oszlop felső üregében lévő 120 μl 200 μM-os hígítású gyógyszerből 60 μl mennyiséget kiveszünk, és azt összekeverjük a következő üregben lévő 60 μl-rel. Ezután ebből az üregből veszünk ki 60 μl mennyiséget, és azt a harmadik üregben lévő 60 μl-rel keverjük el, és így tovább egészen addig, míg a kétszeres hígítási sor el nem készül. Amikor az utolsó előtti üreget bekevertük, az üregben lévő 120 μl-ből 60 μl-t kiveszünk, és azt eldobjuk. Az utolsó üregben meghagyjuk az eredetileg benne lévő 60 μl DMSO/táptalaj oldószert, mint gyógyszer nélküli kontrollt. A gyógyszer hígításaiból 9 oszlopot készítünk, ami elég ahhoz, hogy 3-3 üregünk legyen mind 1. a VEGF-hez (származási hely: Pepro Tech Inc., katalógusszám: 100-200), 2. az endoteliális sejt növekedési faktorhoz (ECGF) (mely más néven savas fibroblaszt faktorként vagy aFGF-ként is ismert) (származási hely: Boehringer Mannheim Biochemica, katalógusszám: 143 9 600) és 3. a vizsgálati táptalajkontrollhoz. Az ECGF nátrium-heparinnal való preparátumként szerezhető be.

2. A gyógyszerhígításokból üregenként 50 μl mennyiséget átviszünk a HUV-EC-C sejteket 0,8–1,0×10^4 sejt/100 μl/üreg mennyiségben tartalmazó, 0. napról való, 96 üregű vizsgálati lemezekbe, és azokat körülbelül 2 órán keresztül inkubáljuk 37 °C hőmérsékleten, 5%-os szén-dioxid-tartalom mellett.

3. Minden egyes gyógyszer-koncentrációhoz három példányban hozzáadunk üregenként 50 μl

80 μg/ml koncentrációjú VEGF-et, 20 ng/ml koncentrációjú ECGF-et vagy vizsgálat táptalajt. Akárcsak a gyógyszer esetében, a növekedési faktor koncentrációja is négyszerese a kívánt végső koncentrációnak. A növekedési faktorok koncentrációinak beállítására a 0. nap 2. lépéséből származó vizsgálati táptalajt használjuk. A rendszert körülbelül 24 órán keresztül inkubáljuk 37 °C hőmérsékleten, 5%-os szén-dioxid-tartalom mellett. Ekkor minden egyes üregben lesz 50 μl gyógyszerhígítás, 50 μl növekedési faktor vagy táptalaj és 100 μl sejt, azaz összesen 200 μl mennyiség üregenként. Így a gyógyszerek és a növekedési faktorok 4X koncentrációi 1X koncentrációk lesznek, amint minden összetevőt az üregekhez adunk.

2. nap

1. A rendszerhez hozzáadunk üregenként 1 μCi (10 μl/üreg a 100 μCi/ml oldatból, melyet RMPI táptalajban készítünk el 10% hővel inaktivált magzati szarvasmarhaszérum hozzáadásával) ^{3}H-timidint (Amersham; katalógusszám: TRK–686), és a rendszert körülbelül 24 órán keresztül inkubáljuk 37 °C hőmérsékleten, 5%-os szén-dioxid-tartalom mellett. Megjegyzés: a ^{3}H-timidin-oldatot azért RPMI táptalajban készítjük el, mert minden más esetben, amikor a ^{3}H-timidint használjuk, olyan kísérletekről van szó, melyeket RPMI-ben kell elvégezni. A táptalaj különbözősége ennél a lépésnél valószínűleg nem lényeges. Az RPMI származási helye a Gibco BRL, katalógusszám: 11875-051.

3. nap

1. A lemezeket egy éjszakán keresztül fagyasztjuk –20 °C hőmérsékleten.

4. nap

1. A lemezeket felolvasztjuk, és tartalmukat egy 96 üregű lemezbetakarító (Tomtec Harvester 96®) felhasználásával szűrőlapokra (Wallac; katalógusszám: 1205-401) gyűjtjük; és a beütéseket egy Wallac Betaplate™ folyadékszcintillációs számlálóval számláljuk.

6.2.5. PDGF-R celluláris vizsgálat

A PDGF celluláris kináz vizsgálatot a következők szerint végezzük el: a sejteket 0,2 M Hepes, 0,15 M NaCl, 10% V/V glicerol, 0,04% Triton X–100, 5 mM EDTA, 5 mM nátrium-vanadát és 2 mM Na+pirofoszfát elegyében elbomlasztjuk; a sejtbomlásterméket ezután egy olyan ELISA lemezre visszük, mely anti-PDGF receptor antitesttel van borítva (Genzime); az ELISA lemezeket a sejtbomlástermék hozzáadása előtt borítjuk be üregenként 150 μl PBS-ben lévő 0,5 μg antitesttel 18 órán keresztül, 4 °C hőmérsékleten; a sejtbomlásterméket a beburkolt lemezekben 1 órán keresztül inkubáljuk, majd négyszer mossuk TBST-ben (35 nM Tris-HCl pH=7,0, 0,15 M NaCl, 0,1% Triton X–100); a rendszerhez 100 μl PBS-ben lévő antifoszfotirozin antitestet adunk, és az elegyet szobahőmérsékleten 30 percen keresztül inkubáljuk; ezután az üregeket négyszer mossuk TBST-ben, egy POD-hoz konjugált másodlagos antitestet adunk minden egyes üreghez, és a kezelt üregeket szobahőmérsékleten 30 percen keresztül inkubáljuk; az üregeket ezután négyszer mossuk TBST-ben, minden egyes üreghez ABTS/H_2O_2 oldatot adunk, és az üregeket két percen keresztül inkubáljuk; az abszorbanciát ezután 410 nm hullámhosszon mérjük.

6.2.6. A sejtnövekedési vizsgálat kísérleti eredményei

A különböző vegyületekre a fent leírt vizsgálatok felhasználásával kapott eredmények a következő táblázatokban találhatók.

2. táblázat

Endoteliális sejtekben való mitogenezis [^{3}H]timidin egyesítés (inkorporáció)

Vegyület (példa száma)	HUV-EC VEGF (μM)	Vizsgálat a-FGF (μM)
27.	1,1	153,8
1B.	0,2	6,0
16.	6,6	3,4
17.	4,8	35,7
4796.	30,7	35,8
20.	43,2	
21.	19,9	
22.	2,5	45,2
23.	1,6	4,6
24.	14,8	
25.	3,4	3,7
26.	25,6	19,3
28.	8,0	13,0
29.	34,3	16,3
30.	1,0	1,4
32.	4,4	4,9
4.	0,6	
33.	46,1	27,3
5.	0,8	25,8
5201.	2,5	2,3
36.	2,3	0,7
37.	5,1	11,8
38.	2,9	130
5217.	9,6	10,5
41.	2,4	2,7
8.	2,2	
42.	<0,8	2,0
9.	<0,8	31,1
44.	0,9	0,6
10.	<0,8	
45.	39,8	35,5
11.	<0,8	22,7

2. táblázat (folytatás)

Vegyület (példa száma)	HUV-EC VEGF (μM)	Vizsgálat a-FGF (μM)
5409.	26,0	
12.	<0,8	
48.	13,6	40
13.	0,7	
50.	11,4	
14.	2,5	
15.	5,7	
5429.	27,6	
59.	0,16	0,14
60.	39,8	33,0
61.	1,2	30,0
63.	3,8	3,4
64.	20	20
68.	<0,07	<0,07
69.	0,5	0,8
70.	0,14	7,9
71.	3,8	12,9
73.	1,3	3,2
74.	0,54	8,7
76.	2,0	5,0
77.	1,2	14,1
81.	0,05	37,8
7.	1,2	3,8

3. táblázat

Mitogenezis 3T3/EGFR sejtekben BrdU egyesítés (inkorporáció)

Vegyület (példa száma)	PDGFR PDGF ligandum	FGFR FGF ligandum	EGFR EGF ligandum
	IC_{50} (μM)	IC_{50} (μM)	IC_{50} (μM)
27.	75		
4313.	6	5,5	5,5
1B.	2,5		
29.	9	4,9	60
4.	3	10	20
5402.	50	40	
36.	3	25	
10.	5,2		
45.	7,5	70	100
12.	2,8	70	
61.	30	16	
5463.			23
71.	70	60	95
5465.	40	25	50
73.	18	15	17
74.	8		
5469.	4	15	28
77.	4	50	54
81.	6,5	9	48

4. táblázat

Különféle sejtfonalakon elvégzett sejtnövekedési vizsgálatok SRB readout

Vegyület (példa száma)	3T3/E/H+TGF-a(T)	3T3/EGFR+TGF-a(T)	3T3/PDGFR+PDGF(T)	SMC
	IC_{50} (μM)	IC_{50} (μM)	IC_{50} (μM)	IC_{50} (μM)
27.	36			
4313.	32	10,7		8,8
1B.	78		10	
5.			22,2	

3T3/E/H+TGF-α(T): NIH 3T3 sejtek, melyek EGFR/HER2 chimerát és TGF-α-t tartalmaznak, tumorból származnak.

3T3/EGFR+TGF-α(T): NIH 3T3 sejtek, melyek EGFR-t és TGF-α-t tartalmaznak, tumorból származnak.

3T3/PDGFR+PDGF(T): NIH 3T3 sejtek, melyek PDGF-βR-t és PDGF-ββ-t tartalmaznak, tumorból származnak.

SMC: humán simaizomsejtek a Cloneticstől.

6.3. A sejttoxicitás mérése

A gyógyhatású vegyületeknek erősebb kell legyen a receptor tirozin-kináz-aktivitást gátló képessége, mint az általa gyakorolt citotoxikus hatás. Egy vegyület hatékonyságának és sejttoxicitásának mértéke megkapható a terápiás indexének meghatározásával: IC_{50}/LD_{50}. Az IC_{50}, az 50%-os gátlás eléréséhez szükséges dózis, standard eljárások felhasználásával határozható meg, így például az itt leírt módon. Az LD_{50}, az 50%-os toxicitást eredményező dózis szintén mérhető standard eljárások felhasználásával (Mossman, 1993, J. Immunol. Methods, 65: 55–63), a felszabadított LDH mennyiségének a mérésével (Korzeniewski és Callewaert, 1983, J. Immunol. Methods 64: 313; Decker és Lohmann-Matthes, 1988, J. Immunol. Methods 115: 61), vagy a halálos dózis állatkísérletekben való méré-

sével. Azok a vegyületek az előnyben részesítettek, melyek nagy terápiás indexszel rendelkeznek. A terápiás index értéke nagyobb kell legyen, mint 2, előnyösen azonban értéke legalább 10, még előnyösebben pedig legalább 50.

6.3. In vivo *állatmodellek*

6.3.1. Xenograft állatmodellek

A humán tumorok arra vonatkozó képessége, hogy xenograftokként thymushiányos egerekben (például Balb/c, nu/nu) nőjön, hasznos *in vivo* modellt szolgáltat a humán tumorokkal szembeni terápiákra adott biológiai válaszreakciók tanulmányozására. A humán tumorok thymushiányos egerekbe történő első sikeres xenotranszplantációja óta (Rygaard és Polvsen, 1969, Acta Pathol. Microbial. Scand. 77: 758–760) sok különböző humán tumorsejtfonalat (például emlőráksejtek, tüdőráksejtek, húgy- és ivarszervi ráksejtek, gyomor- és bélráksejtek, fej- és nyaki ráksejtek, a glioblastomasejtek, csontráksejtek és a rosszindulatú pigmentsejtes ráksejtek) ültettek át és növesztettek sikeresen „nude" egerekben. A humán emlőtumor-sejtfonalakról, ideértve az MCF–7, a ZR75–1 és az MDA-MB–231 sejtfonalakat is, megállapították, hogy azok szubkutáns xenograftok a „nude" egerekben (Warri és munkatársai, 1991, Int. J. Cancer 49: 616–623; Ozzello és Sordat, 1980, Eur. J. Cancer 16: 553–559; Osborne és munkatársai, 1985, Cancer Res. 45: 584–590; Seibert és munkatársai, 1983, Cancer Res. 43: 2223–2239).

1. vizsgálat: HER2/xenograft állatmodell

A lehetséges tumorellenes gyógyszerek HER2-tartalmú tumorokra kifejtett hatásának vizsgálatához a tumorsejteknek képeseknek kell lenniük a növekedésre pótlólagos ösztrogén hiányában is. Sok emlősejtfonal áll függőségben az ösztrogéntől a „nude" egerekben való in vivo növekedéshez (Osborne és munkatársai, mint fentebb), azonban az exogén ösztrogén elnyomja HER2-t a „nude" egerekben (Warri és munkatársai, mint fentebb, Dati és munkatársai, 1990, Oncogene 5: 1001–1006). Így például az MCF–7, a ZR–75–1 és a T47D sejtek jól nőnek in vivo körülmények között ösztrogén jelenlétében, de nagyon alacsony HER2-szinteket mutatnak (Warri és munkatársai, mint fentebb, Dati és munkatársai, mint fentebb).

A következő típusú xenograft eljárás alkalmazható:

1. Öt-hat hetes nőstény Balb/c nu/nu thymushiányos egerek hátulsó csípőjébe (szubkutánsan) beültetjük a tumorsejteket;

2. beadjuk a tumor elleni vegyületet;

3. a tumor növekedését a tumor méretének mérésével mérjük.

A tumorokat vizsgálhatjuk egyes receptorok, mint amilyen például a HER2, az EGF vagy a PDGF, jelenlétére is, Western- és immunhisztokémiai vizsgálatok felhasználásával. A fenti eljárásokat a tudomány e területén jártas szakemberek jól ismert módszerek alkalmazásával, például különféle kezelési rendszerek alkalmazásával tovább módosíthatják.

2. vizsgálat: FLK–1/xenograft állatmodell

Megvizsgáljuk a találmány vegyületeinek arra vonatkozó képességét, hogy miként gátolják az SC xenograftokként meghonosított petefészek-, melanoma-, prosztata-, tüdő- és emlőtumorsejteket. Ezeket a vizsgálatokat 1 mg/kg/nap és 75 mg/kg/nap közötti dózisok felhasználásával végezzük.

Anyagok és módszerek. A tumorsejteket szubkutánsan a megjelölt egértörzsekbe ültetjük. A kezelést az átültetést követő első napon kezdjük, hacsak mást nem mondunk (az SCID egerekben az A375 melanoma-sejtfonal kezelését például a 9. napon kezdjük el). Minden egyes vizsgálati csoport nyolc (8)–tizenhat (16) egérből áll.

Részletes leírás

Az állatok. A nőstény thymushiányos egerek (BALB/c, nu/nu), a BALB/c egerek, a Wistar-patkányok és a Fisher 344 patkányok a Simonsen Laboratoriesből (Gilroy, CA) származnak. A nőstény A/I egerek beszerzési helye a Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). A DA patkányok a B&K Universal, Inc.-ból (Fremont, CA) származnak. A thymushiányos R/Nu patkányok, a DBA/2N egerek és a BALB/c egerek származási helye a Harlan Sprague Dawley (Indianapolis, IN). A nőstény C57BL/6 egerek származási helye a Taconic (Germantown, NY). Minden állatot „clean-room" körülmények között tartunk Micro-isolator ketrecekben, Alpha-dri alommal. Steril rágcsáló-ennivalót és *ad libitum* vizet adunk nekik.

Minden eljárást a „NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" útmutatásaival összhangban végzünk el.

Szubkutáns xenograft modell. A sejtfonalakat a fentebb leírtak szerint növesztjük a megfelelő táptalajban (lásd a 6. fejezetet). A sejteket összefolyásukkor vagy azt kicsivel megelőzően gyűjtjük be 0,05%-os tripszin-EDTA felhasználásával, és 10 percen keresztül 450×g-n pelletezzük. Az így kapott pelleteket steril PBS-ben vagy táptalajban (FBS nélkül) újraszuszpendáljuk az ábrák magyarázó szövegében jelzett megfelelő koncentrációban, és a sejteket beültetjük az egerek hátulsó csípőjébe. A tumornövekedést 3–6 héten keresztül mérjük nóniuszos tolómérők felhasználásával; a tumor térfogatát a hossz×szélesség×magasság formula alapján számítjuk ki, hacsak mást nem mondunk. A P értékeket a Student-féle t-próbával állapítjuk meg. Az 50–100 μl kötőanyagban (dimetil-szulfoxid, PBTE, PBTE6C:D5w vagy PBTE:D5W) lévő vegyületet IP injekció formájában juttatjuk a helyükre, az ábrák magyarázó szövegében jelzett koncentrációban.

Intracerebrális xenograft modell. Az egér IC modellhez patkányból származó C6 gliomasejteket gyűjtünk be, és azokat steril PBS-ben szuszpendáljuk $2,5\times10^7$ sejt/ml koncentrációban, majd jégre tesszük. A sejteket BALB/c, nu/nu egerekbe ültetjük a következők szerint: a 70%-os etanollal való mosás előtt, amennyiben szükséges, az egerek homlokfalcsonti fejbőrét egy állatszőrnyíró géppel leborotváljuk. Az állatokat izofluoránnal elaltatjuk, és a tűt a koponyacsonton keresztül behelyezzük a bal agyféltekébe. A sejteket a Hamilton-féle gáz-

biztos fecskendőkből olyan 30 ga 12,7 mm-es tűk felhasználásával adagoljuk ki, melyekhez csak 3 mm-es behatolást lehetővé tévő hüvelyeket erősítünk. A 4 μl mennyiségű sejtszuszpenzió pontos beadása érdekében egy ismétlő kiadagolót használunk. Az állatok hogylétét naponta ellenőrizzük, és akkor öljük meg azokat, amikor súlyuknak körülbelül 40%-át már elveszítették, és/vagy idegi tüneteket kezdenek mutatni.

A patkány IC modellhez a patkányokat [Wistar, Sprague-Dawley, Fisher 344 vagy thymushiányos R/Nu patkányok; körülbelül 200–400 g testtömeggel (némelyek 300–400 g testtömeggel)] 100 mg/kg Ketaset (ketaminhidroklorid; Aveco, Fort Dodge, Iowa) IP injekcióval való beadásával elaltatjuk. A narkózis beállta után a fejbőrt leborotváljuk, és az állatot behelyezzük egy sztereotaxikus készülékbe (Stoelting, Wood Dale, IL). A bőrt a bemetszés helyén háromszor megtisztítjuk, felváltva használva 70%-os etanolos és 10%-os Povidone-Iodine-os tampont. A fejbőr középső részén egy 1,0–1,5 cm hosszúságú bemetszést készítünk egy steril szike felhasználásával. A bőrt enyhén elválasztjuk és oldalirányba széthúzzuk, hogy szabaddá tegyük a koponyacsont felszínén a csontvarratot. Egy fogászati fúrógép (Stoelting, Wood Dale, IL) felhasználásával egy kis (1-2 mm átmérőjű) lyukat készítünk a koponyacsontban, körülbelül 1 mm-re előre és 2 mm-re oldalirányban a koponyatetőtől. A sejtszuszpenziót egy 50 μl-es Hamilton-féle fecskendőbe szívjuk, melyre egy 23 vagy 25 ga standard vágott hegyű tűt teszünk. A fecskendőt a koponyacsonton fúrt lyukba vezetjük a pókhálóburok szintjén, és addig nyomjuk előre, amíg a tű hegye 3 mm mélyen nem hatol az agyba, ahová a sejtszuszpenziót lassan beinjekciózzuk. Miután a sejteket beinjekcióztuk, a tűt a lyukban hagyjuk még 1–2 percre, hogy időt hagyjunk a sejtek teljes bejutására. A koponyacsontot megtisztítjuk, és a bőrt 2-3 öltéssel összevarrjuk. Megvizsgáljuk, hogy az állatok rendbejönnek-e az altatás és a műtét után. A kísérlet teljes tartama alatt az állatokat legalább naponta kétszer megvizsgáljuk, hogy megjelentek-e az intracerebrális tumor fejlődésével kapcsolatos tünetek. Azokat az állatokat, melyeknél előrehaladott tüneti jelenségek figyelhetők meg (támaszkodás, egyensúlyvesztés, kiszáradás, étvágytalanság, koordinációs zavarok, az ápolási tevékenységek megszűnése és/vagy jelentős súlyveszteség), humánusan megöljük, és a kísérlet szempontjából érdekes szerveket és szöveteket kimetsszük.

Intraperitoneális modell. A sejtfonalakat a megfelelő táptalajban növesztjük. A sejteket összegyűjtjük, és steril PBS-sel vagy FBS-mentes táptalajjal mossuk, megfelelő koncentrációban újraszuszpendáljuk, és a megfelelő egértörzs egyedeinek IP üregébe injekciózzuk. Az egereket naponta megvizsgáljuk a hasvízkór kialakulásának szempontjából. Az egyes egyedeket akkor öljük meg, amikor súlygyarapodásuk elérte a 40%-ot, vagy amikor az IP tumor terhe kezd túl nagy stresszt és fájdalmat okozni az állatnak.

6.3.2. In vivo *VEGF pellet modell*

A következő példában a pelletmodellt alkalmazzuk egy vegyület FLK–1 receptorral szembeni aktivitásának, valamint az érképződéssel kapcsolatos rendellenességekkel szembeni aktivitásának vizsgálatára. Ebben a modellben a VEGF egy időkésleltetett pelletbe van ágyazva, és azt szubkután ültetjük be a „nude" egerek hasára, hogy egy „vörösödési" reakciót, azt követően pedig egy, a pellet körüli feldagadást váltsunk ki. Ezután a potenciális FLK–1 inhibitorokat metilcellulózban beültethetjük a VEGF pellet közelébe, hogy eldönthessük, vajon az adott inhibitor használható-e a „vörösödés" és az azt követő feldagadás gátlására.

Anyagok és eljárások. A következő anyagokat használjuk fel:

1. VEGF – humán rekombináns liofilezett termék: kereskedelmi úton beszerezhető a Peprotechtől, Inc., Princeton Businness Park, G2; P.O. box 275, Rocky Hill, NJ 08553.

2. A 21 napos késleltetett pelletekbe ágyazott VEGF beszerzési helye: Innovative Research of America (Innovative Research of America, 3361 Executive Parkway, P.O. Box 2746, Toledo, Ohio 34606), „patent matrix driven" kézbesítési rendszer felhasználásával. A pelletek VEGF-tartalma 0,20, 0,21 vagy 2,1 μg VEGF/pellet. Ezek a dózisok közelítőleg napi 10 és 100 ng VEGF-felszabadulást eredményeznek.

3. Metil-cellulóz.

4. Víz (steril).

5. Metanol.

6. A megfelelő gyógyszerek/inhibitorok.

7. 10 cm-es szövettenyészeti lemezek.

8. Parafilm.

A VEGF pellet modell vizsgálat elvégzéséhez a következő eljárást követjük:

1. A Peprotechtől beszerzett VEGF-et elküldjük az Innovative Researchbe a megrendelt pellet előállítására.

2. Steril vízben 1,5%-os (w/v) metil-cellulóz-oldatot készítünk.

3. A gyógyszereket metanolban oldjuk (a szokásos koncentrációtartomány: 10–20 mg/ml).

4. A steril 10 cm-es lemezekbe steril parafilmet helyezünk.

5. Az 1,5%-os metil-cellulóz 1,35 ml mennyiségéhez 150 μg metanolban lévő gyógyszert adunk, és az elegyet erősen megkeverjük/megforgatjuk.

6. A homogenátum 25 μl-es részleteit a parafilmre helyezzük, és lemezekké szárítjuk.

7. Az egereket (6–10 hetes Balb/C thymushiányos nu/nu nőstény egerek) izoflurán belélegeztetésével elaltatjuk.

8. A VEGF pelleteket és a metil-cellulóz-lemezeket szubkután beültetjük az egerek hasára; és

9. az egereket 24 óra és 48 óra elteltével megvizsgáljuk a vörösödés és a feldagadás szempontjából.

A kísérlet pontos kivitelezési körülményei a következők voltak:

N=4 állat/csoport

Kontrollok: VEGF pellet+gyógyszer placebo,
VEGF placebo+gyógyszerpellet.

Kísérleti eredmények. A találmány vegyületeitől e kísérlet alapján azt várjuk, hogy azok aktivitást mutatnak.

6.3.3. Emlőzsírcsomó-modell

Sok receptor tirozin-kináz, így például a HER2 receptor, mellrákban igazoltan betöltött szerepe miatt az emlőzsírcsomó-modell különösen hasznos az ilyen receptor tirozin-kinázokat gátló vegyületek hatékonyságának mérésére. A tumorsejteket közvetlenül a kívánt helyre ültetve, az így kapott in situ modellek pontosabb képet adnak a tumorfejlődés biológiájáról, mint a szubkutáns modellek. Humán emlősejtfonalakat, ideértve az MCF–7-et is, már növesztettek thymushiányos egerek emlőzsírcsomójában. Shafie és Grantham, 1981, Natl. Cancer Instit. 67: 51–56; Gottardis és munkatársai, 1988, J. Steroid Biochem. 30: 311–314. Pontosabban a következő eljárás alkalmazható egy vegyület HER2 receptorra gyakorolt gátlóhatásának a mérésére:

1. Nőstény thymushiányos egerek hónalji emlőzsírcsomójába különböző koncentrációkban beültetünk olyan MDA-MB–231 és MCF–7 sejteket, melyek HER2-vel vannak transzfektálva;

2. beadjuk a vegyületet;

3. a tumor növekedését különböző időpontokban mérjük.

A tumorokat vizsgálhatjuk egyes receptorok, mint amilyen például a HER2, jelenlétére is, Western- és immunhisztokémiai vizsgálatok felhasználásával. A fenti eljárásokat a tudomány e területén jártas szakemberek jól ismert módszerek alkalmazásával, például különféle kezelési rendszerek alkalmazása révén tovább módosíthatják.

6.3.4. Tumorbehatolásos modell (Tumor Invasion Model)

Az alábbiakban leírt, újonnan kifejlesztett tumorbehatolásos modell alkalmazható a KDR/FLK–1 receptorokkal szemben szelektív inhibitorokként azonosított vegyületek gyógyászati értékének és hatékonyságának a megbecslésére.

6.3.4.1. Eljárás

Kísérleti állatokként nyolchetes (nőstény) „nude” egereket (Simonsen Inc.) használunk. A tumorsejtek beültetését egy lamináris áramlási térben végezzük. Az altatást Xylazin/Ketamin koktél (100 mg/kg ketamin és 5 mg/kg) intraperitoneális úton való beadásával végezzük. A hasüreg feltárásához egy középvonalas vágást csinálunk (körülbelül 1,5 cm hosszúságban), 10^7 tumorsejt 10 µl térfogatú táptalajban való befecskendezéséhez. A sejteket vagy a hasnyálmirigy doudenális lebenyébe, vagy a vastagbél savóhártyája alá fecskendezzük. A hashártyát és az izmokat 6-0 selyem tovafutó varrattal zárjuk össze, a bőrt pedig kapcsok (would clips) felhasználásával zárjuk össze. Az állatokat naponta megvizsgáljuk.

6.3.4.2. A vizsgálat

2–6 hét elteltével, az állatok duzzadásos vizsgálatától függően az egereket megöljük, a különféle szerveket (tüdő, máj, agy, gyomor, lép, szív, izom) kimetsszük és megvizsgáljuk (a tumor méretének mérése, a behatolás nagysága, immunkémiai vizsgálatok és in situ hibridizáció).

6.3.5. Eredmények

A fent leírt *in vivo* vizsgálat alapján kapott, különböző vegyületekre vonatkozó eredmények az alábbi, 5. táblázatban találhatók meg.

5. táblázat

In vivo adatok

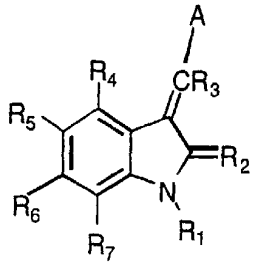
Vegyület (példa száma)	EpH4-VEGF %-os gátlás @ mg/kg
27.	56% @ 75
22.	50% @ 75 63% @ 50 42% @ 75
4942.	– 42% @ 50/50 46% @ 50 47% @ 25
12.	50% @ 50
14.	– 57% @ 37,5/37,5 45% @ 50
15.	– 65% @ 50 47% @ 50
	– 65% @ 50

A találmányt a példaként bemutatott megtestesülései semmi esetre sem korlátozzák érvényességi területében; a példák csupán a találmány egyes megtestesüléseinek illusztrálására szolgálnak; és így minden olyan klón, DNS vagy aminosavszekvencia, mely a példákban megadottakkal funkcionális szempontból ekvivalens, a találmány keretei közé tartozik. Az itt leírt módosítási lehetőségeken túlmenően a találmány számos más módosítási lehetősége is nyilvánvaló lesz a tudomány e területén jártas szakemberek számára a fenti leírásból és a hozzá kapcsolódó rajzokból. Az ilyen módosítások is beleértendők a csatolt igénypontok érvényességi körébe.

A megidézett összes forrásmű a hivatkozás révén teljes egészében a találmány részét képezi.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Az (I) általános képletű



(I)

vegyületek vagy azok gyógyászatilag elfogadható sói, ahol

R_1 jelentése hidrogénatom;

R_2 jelentése oxigénatom vagy kénatom;

R_3 jelentése hidrogénatom;

R_4, R_5, R_6 és R_7 jelentése egymástól függetlenül hidrogénatom, alkilcsoport, alkoxicsoport, arilcsoport, aril-oxi-csoport, alkarilcsoport, alkaril-oxi-csoport, halogénatom, trihalogén-metil-csoport, –S(O)R csoport, $–SO_2NRR'$ csoport, $–SO_3R$ csoport, –SR csoport, $–NO_2$ csoport, –NRR' csoport, –OH csoport, –CN csoport, –C(O)R csoport, –OC(O)R csoport, –NHC(O)R csoport, $–(CH_2)_nCO_2R$ csoport és –CONRR' csoport;

A jelentése egy öttagú heteroarilcsoport, amelyet a tiofenil-, pirrolil-, pirazolil-, 1,2,3-triazolil-, 1,2,4-triazolil-, oxazolil-, izoxazolil-, tiazolil-, izotiazolil-, 2-szulfonil-furil-, 4-alkil-furil-, 1,2,3-oxadiazolil-, 1,2,4-oxadiazolil-, 1,2,5-oxadiazolil-, 1,3,4-oxadiazolil-, 1,2,3,4-oxatriazolil-, 1,2,3,5-oxatriazolil-, 1,2,3-tiadiazolil-, 1,2,4-tiadiazolil-, 1,2,5-tiadiazolil-, 1,3,4-tiadiazolilgyűrűt, 1,2,3,4-tiatriazolil-, 1,2,3,5-tiatriazolil- és tetrazolilcsoportot magában foglaló csoportból választjuk, melyek adott esetben egy vagy több pozícióban alkilcsoporttal, alkoxicsoporttal, arilcsoporttal, aril-oxi-csoporttal, alkarilcsoporttal, alkaril-oxi-csoporttal, halogénatommal, trihalogén-metil-csoporttal, –S(O)R csoporttal, $–SO_2NRR'$ csoporttal, $–SO_3R$ csoporttal, –SR csoporttal, $–NO_2$ csoporttal, –NRR' csoporttal, –OH csoporttal, –CN csoporttal, –C(O)R csoporttal, –OC(O)R csoporttal, –NHC(O)R csoporttal, $–(CH_2)_nCO_2R$ csoporttal vagy –CONRR' csoporttal vannak szubsztituálva;

n értéke 0–3;

R jelentése hidrogénatom, alkilcsoport vagy arilcsoport és

R' jelentése hidrogénatom, alkilcsoport vagy arilcsoport, ahol

a fenti kifejezéseknél az

alkilcsoport 1–12 szénatomot tartalmazó, egyenes vagy elágazó láncú vagy ciklusos alifás szénhidrogéncsoport, amely adott esetben egy vagy több, az alábbi csoportból választott szubsztituenssel helyettesített: hidroxilcsoport, cianocsoport, =O, =S, $–NO_2$, halogénatom, $–N(CH_3)_2$, aminocsoport és –SH csoport;

az arilcsoport jelentése egy olyan aromás csoport, amely legalább egy konjugált pi-elektronrendszerrel rendelkező gyűrűt tartalmaz, beleértve a karbociklusos aril-, a heterociklusos aril- és a biarilcsoportokat, és amely arilcsoport adott esetben egy vagy több, az alábbi csoportból választott szubsztituenssel helyettesített: halogénatom, trihalogén-metil-csoport, hidroxilcsoport, –SH, –OH, $–NO_2$, –SR általános képletű csoport, ahol R jelentése alkilcsoport, arilcsoport vagy alkil-aril-csoport, cianocsoport, alkoxicsoport, alkilcsoport és aminocsoport;

az alkarilcsoport jelentése egy olyan alkilcsoport, amely kovalensen kötődik egy arilcsoporthoz; és

az alkoxicsoport, az aril-oxi-csoport és az alkaril-oxi-csoport –O-alkil-, –O-aril- és –O-alkaril-csoportot jelent;

azzal a kikötéssel, hogy a vegyületek az alábbi vegyületektől eltérőek:

3-(pirrol-2-il-metilén)-2-indolinon;

3-(5-klór-3,4-dimetil-pirrol-2-il-metilén)-2-indolinon;

3-(3,5-dimetil-4-etil-pirrol-2-il)-2-indolinon;

3-(3,5-dimetil-4-etoxi-karbonil-pirrol-2-il)-2-indolinon;

2-[[[1-etil-2,3-dihidro-2-oxo-3-(1*H*-pirrol-2-il-metilén)-1*H*-indol-5-il]-oxi]-metil]-benzoesav;

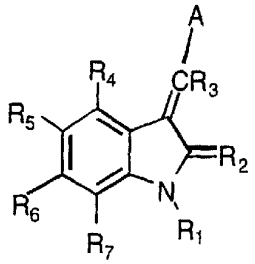
3-(tién-2-il-metilén)-2-indolinon;

6-dietil-amino-3-[(izotiazol-2-il)-metilén]-2-indolinon;

5-klór-3-[(tiazol-2-il)-metilén]-2-indolinon; és

6-nitro-3-[(pirrol-2-il)-metilén]-2-indolinon.

2. Az (I) általános képletű



(I)

vegyületek vagy azok gyógyászatilag elfogadható sói, ahol

R_1 jelentése hidrogénatom;

R_2 jelentése oxigénatom vagy kénatom;

R_3 jelentése hidrogénatom;

R_4, R_5, R_6 és R_7 jelentése egymástól függetlenül hidrogénatom, alkilcsoport, alkoxicsoport, arilcsoport, aril-oxi-csoport, alkarilcsoport, alkaril-oxi-csoport, halogénatom, trihalogén-metil-csoport, –S(O)R csoport, $–SO_2NRR'$ csoport, $–SO_3R$ csoport, –SR csoport, $–NO_2$ csoport, –NRR' csoport, –OH csoport, –CN csoport, –C(O)R csoport, –OC(O)R csoport, –NHC(O)R csoport, $–(CH_2)_nCO_2R$ csoport és –CONRR' csoport;

A jelentése egy öttagú heteroarilcsoport, amelyet a pirazolil-, 1,2,3-triazolil-, 1,2,4-triazolil-, oxazolil-, izoxazolil-, tiazolil-, izotiazolil-, 2-szulfonil-furil-, 4-alkil-furil-, 1,2,3-oxadiazolil-, 1,2,4-oxadiazolil-, 1,2,5-oxadiazolil-, 1,3,4-oxadiazolil-, 1,2,3,4-oxatriazolil-, 1,2,3,5-oxatriazolil-, 1,2,3-tiadiazolil-, 1,2,4-tiadiazolil-, 1,2,5-tiadiazolil-, 1,3,4-tiadiazolil-, 1,2,3,4-tiatriazolil-, 1,2,3,5-tiatriazolil- és tetrazolilcsoportot magában foglaló csoportból választjuk, amelyek adott esetben egy vagy több pozícióban alkilcsoporttal, alkoxicsoporttal, arilcsoporttal, aril-oxi-csoporttal, alkarilcsoporttal, alkaril-oxi-csoporttal, halogénatommal, trihalogén-metil-csoporttal, –S(O)R csoporttal, $–SO_2NRR'$ csoporttal, $–SO_3R$ csoporttal, –SR csoporttal, $–NO_2$ csoporttal, –NRR' csoporttal, –OH csoporttal, –CN csoporttal, –C(O)R csoporttal, –OC(O)R csoporttal, –NHC(O)R csoporttal, $–(CH_2)_nCO_2R$ csoporttal vagy –CONRR' csoporttal vannak szubsztituálva;

n értéke 0–3;

R jelentése hidrogénatom, alkilcsoport vagy arilcsoport és

R' hidrogénatomot, alkilcsoportot vagy arilcsoportot jelent,

ahol a fenti kifejezéseknél az alkilcsoport, az arilcsoport, az alkarilcsoport, az alkoxicsoport, az aril-oxi-

csoport és az alkaril-oxi-csoport jelentése az 1. igénypontban megadott; azzal a kikötéssel, hogy a vegyületek az alábbi vegyületektől eltérőek:

6-dietil-amino-3-[(izotiazol-2-il)-metilén]-2-indolinon; és

5-klór-3-[(tiazol-2-il)-metilén]-2-indolinon.

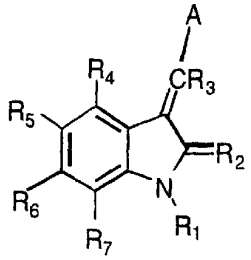
3. Az 1. igénypont szerinti vegyület, amelyet az alábbi csoportból választunk: 3-[(3-metil-pirrol-2-il)-metilén]-2-indolinon; 3-[(3,4-dimetil-pirrol-2-il)-metilén]-2-indolinon; 3-[(2-metil-tién-5-il)-metilén]-2-indolinon; 3-[(3-metil-tién-2-il)-metilén]-2-indolinon; 3-{[4-(2-metoxi-karbonil-etil)-3-metil-pirrol-5-il]-metilén}-2-indolinon; 3-[(4,5-dimetil-3-etil-pirrol-2-il)-metilén]-2-indolinon; 5-klór-3-[(5-metil-tién-2-il)-metilén]-2-indolinon; 3-[(3,5-dimetil-pirrol-2-il)-metilén]-5-nitro-2-indolinon; 3-[(3-(2-karboxi-etil)-4-metil-pirrol-5-il)-metilén]-2-indolinon; 5-klór-3-[(3,5-dimetil-pirrol-2-il)-metilén]-2-indolinon; és 3-[(2,4-dimetil-pirrol-5-il)-metilén]-2-indolinon vagy ezek gyógyszerészetileg elfogadható sói.

4. A 3. igénypont szerinti vegyület, *azzal jellemezve,* hogy az említett vegyület a 3-[(2,4-dimetil-pirrol-5-il)-metilén]-2-indolinon vagy ennek gyógyászatilag elfogadható sója.

5. Gyógyászati készítmény, amely egy gyógyászatilag elfogadható hordozót vagy kötőanyagot és egy, az 1–4. igénypontok bármelyike szerinti vegyületet tartalmaz.

6. Az 5. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, amely gyógyászati készítmény parenterális vagy szubkután beadásra alkalmas, vagy retardkészítmény formájú.

7. Az (I) általános képletű



(I)

vegyületeknek vagy azok gyógyászatilag elfogadható sóinak, ahol

R_1 jelentése hidrogénatom;

R_2 jelentése oxigénatom vagy kénatom;

R_3 jelentése hidrogénatom;

R_4, R_5, R_6 és R_7 jelentése egymástól függetlenül hidrogénatom, alkilcsoport, alkoxicsoport, arilcsoport, aril-oxi-csoport, alkarilcsoport, alkaril-oxi-csoport, halogénatom, trihalogén-metil-csoport, –S(O)R csoport, $–SO_2NRR'$ csoport, $–SO_3R$ csoport, –SR csoport, $–NO_2$ csoport, –NRR' csoport, –OH csoport, –CN csoport, –C(O)R csoport, –OC(O)R csoport, –NHC–(O)R csoport, $–(CH_2)_nCO_2R$ csoport és –CONRR' csoport;

A jelentése egy öttagú heteroarilcsoport, amelyet a tiofenil-, pirrolil-, pirazolil-, 1,2,3-triazolil-, 1,2,4-triazolil-, oxazolil-, izoxazolil-, tiazolil-, izotiazolil-, 2-szulfonil-furil-, 4-alkil-furil-, 1,2,3-oxadiazolil-, 1,2,4-oxadiazolil-, 1,2,5-oxadiazolil-, 1,3,4-oxadiazolil-, 1,2,3,4-oxatriazolil-, 1,2,3,5-oxatriazolil-, 1,2,3-tiadiazolil-, 1,2,4-tiadiazolil-, 1,2,5-tiadiazolil-, 1,3,4-tiadiazolilgyűrűt, 1,2,3,4-tiatriazolil-, 1,2,3,5-tiatriazolil- és tetrazolilcsoportot magában foglaló csoportból választjuk, melyek adott esetben egy vagy több pozícióban alkilcsoporttal, alkoxicsoporttal, arilcsoporttal, aril-oxi-csoporttal, alkarilcsoporttal, alkaril-oxi-csoporttal, halogénatommal, trihalogén-metil-csoporttal, –S(O)R csoporttal, $–SO_2NRR'$ csoporttal, $–SO_3R$ csoporttal, –SR csoporttal, $–NO_2$ csoporttal, –NRR' csoporttal, –OH csoporttal, –CN csoporttal, –C(O)R csoporttal, –OC(O)R csoporttal, –NHC(O)R csoporttal, $–(CH_2)_nCO_2R$ csoporttal vagy –CONRR' csoporttal vannak szubsztituálva;

n értéke 0–3;

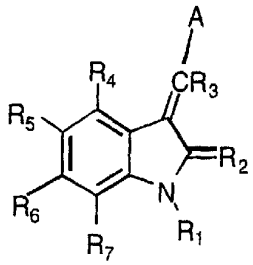
R jelentése hidrogénatom, alkilcsoport vagy arilcsoport és

R' jelentése hidrogénatom, alkilcsoport vagy arilcsoport,

ahol a fenti kifejezéseknél az alkilcsoport, az arilcsoport, az alkarilcsoport, az alkoxicsoport, az aril-oxi-csoport és az alkaril-oxi-csoport jelentése az 1. igénypontban megadott;

alkalmazása a szabályozatlan tirozin-kináz jelátalakítással kapcsolatos rendellenességek kezelésére szolgáló gyógyszerkészítmény előállítására.

8. Az (I) általános képletű



(I)

vegyületeknek vagy azok gyógyászatilag elfogadható sóinak, ahol

R_1 jelentése hidrogénatom;

R_2 jelentése oxigénatom vagy kénatom;

R_3 jelentése hidrogénatom;

R_4, R_5, R_6 és R_7 jelentése egymástól függetlenül hidrogénatom, alkilcsoport, alkoxicsoport, arilcsoport, aril-oxi-csoport, alkarilcsoport, alkaril-oxi-csoport, halogénatom, trihalogén-metil-csoport, –S(O)R csoport, $–SO_2NRR'$ csoport, $–SO_3R$ csoport, –SR csoport, $–NO_2$ csoport, –NRR' csoport, –OH csoport, –CN csoport, –C(O)R csoport, –OC(O)R csoport, –NHC(O)R csoport, $–(CH_2)_nCO_2R$ csoport és –CONRR' csoport;

A jelentése egy öttagú heteroarilcsoport, amelyet a pirazolil-, 1,2,3-triazolil-, 1,2,4-triazolil-, oxazolil-, izoxazolil-, tiazolil-, izotiazolil-, 2-szulfonil-furil-, 4-alkil-furil-, 1,2,3-oxadiazolil-, 1,2,4-oxadiazolil-, 1,2,5-oxadiazolil-, 1,3,4-oxadiazolil-, 1,2,3,4-oxatriazolil-, 1,2,3,5-oxatriazolil-, 1,2,3-tiadiazolil-, 1,2,4-tiadiazolil-, 1,2,5-tiadiazolil-, 1,3,4-tiadiazolil-, 1,2,3,4-tiatriazolil-, 1,2,3,5-tiatriazolil- és tetrazolilcsoportot magában foglaló csoportból választjuk, amelyek adott esetben egy vagy több pozícióban alkilcsoporttal, alkoxicsoporttal, arilcsoporttal, aril-oxi-csoporttal, alkarilcsoporttal, alkaril-oxi-csoport-

tal, halogénatommal, trihalogén-metil-csoporttal, –S(O)R csoporttal, $–SO_2NRR'$ csoporttal, $–SO_3R$ csoporttal, –SR csoporttal, $–NO_2$ csoporttal, –NRR' csoporttal, –OH csoporttal, –CN csoporttal, –C(O)R csoporttal, –OC(O)R csoporttal, –NHC(O)R csoporttal, $–(CH_2)_nCO_2R$ csoporttal vagy –CONRR' csoporttal vannak szubsztituálva;

n értéke 0–3;

R jelentése hidrogénatom, alkilcsoport vagy arilcsoport és

R' hidrogénatomot, alkilcsoportot vagy arilcsoportot jelent,

ahol a fenti kifejezéseknél az alkilcsoport, az arilcsoport, az alkarilcsoport, az alkoxicsoport, az aril-oxi-csoport és az alkaril-oxi-csoport jelentése az 1. igénypontban megadott;

alkalmazása a szabályozatlan tirozin-kináz jelátalakítására, szabályozására, módosítására és gátlására szolgáló gyógyszerkészítmény előállítására.

9. A 7. vagy 8. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a betegséget az alábbi csoportból választjuk: rák, véredény-proliferatív rendellenesség, fibrózisos rendellenesség, mezangiális sejtproliferatív rendellenesség és metabolikus rendellenesség.

10. A 9. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a véredény-proliferatív rendellenesség arthritis vagy restenosis.

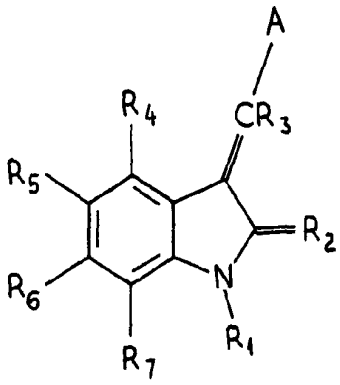
11. A 9. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a fibrózisos rendellenesség hepatikus cirrhosis vagy atheroszklerózis.

12. A 9. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a mezangiális sejtproliferatív rendellenesség glomerulonephritis, diabetikus nefropátia, rosszindulatú nefroszklerózis, trombózisos mikroangiopátia szindrómák, transzplantátumkilökődés és glomerulopathiák.

13. A 9. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a metabolikus rendellenesség psoriasis, diabetes mellitus, sebgyógyulás, gyulladás vagy neurodegeneratív betegség.

14. A 7. vagy 8. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a vegyületet az alábbi csoportból választjuk: 3-[(3-metil-pirrol-2-il)-metilén]-2-indolinon; 3-[(3,4-dimetil-pirrol-2-il)-metilén]-2-indolinon; 3-[(2-metil-tién-5-il)-metilén]-2-indolinon; 3-[(3-metil-tién-2-il)-metilén]-2-indolinon; 3-{[4-(2-metoxi-karbonil-etil)-3-metil-pirrol-5-il]-metilén}-2-indolinon; 3-[(4,5-dimetil-3-etil-pirrol-2-il)-metilén]-2-indolinon; 5-klór-3-[(5-metil-tién-2-il)-metilén]-2-indolinon; 3-[(3,5-dimetil-pirrol-2-il)-metilén]-5-nitro-2-indolinon; 3-[(3-(2-karboxi-etil)-4-metil-pirrol-5-il)-metilén]-2-indolinon; 5-klór-3-[(3,5-dimetil-pirrol-2-il)-metilén]-2-indolinon; és 3-[(2,4-dimetil-pirrol-5-il)-metilén]-2-indolinon vagy ezek gyógyszerészetileg elfogadható sói.

15. A 14. igénypont szerinti alkalmazás, ahol az említett vegyület a 3-[(2,4-dimetil-pirrol-5-il)-metilén]-2-indolinon vagy ennek gyógyászatilag elfogadható sója.



(I)

Kiadja a Magyar Szabadalmi Hivatal, Budapest
Felelős vezető: Törőcsik Zsuzsanna
Windor Bt., Budapest