(19) Országkód:
HU

MAGYAR KÖZTÁRSASÁG
ORSZÁGOS TALÁLMÁNYI HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:
203 198 B

(21) A bejelentés száma: 5272/88
(22) A bejelentés napja: 1988.10.12.
(30) Elsőbbségi adatok:
87/25009 1987.10.26. GB

(51) Int. Cl.[5]
A 61 K 31/38

(40) A közzététel napja: 1990.05.28.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi Közlönyben: 1991.06.28. SZKV 91/06

(72) Feltalálók:
dr. Bollinger, Pietro, Bottmingen (CH)
Gubler, Hans Ulrich, Köniz (CH)
dr. Schnyder, Jörg, Bern (CH)

(73) Szabadalmas:
Sandoz Ag., Bázel (CH)

(54) Eljárás immungátló, monokin-, különösen interleukin-1-gátló hatású gyógyászati készítmények előállítására

(57) KIVONAT

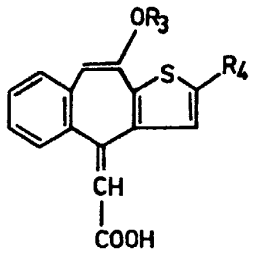
A találmány tárgya eljárás új gyógyászati készítmények előállítására, ismert módon előállított (Ib) általános képletű – ahol

R_3 jelentése 1–4 szénatomos alkilcsoport és

R_4 jelentése hidrogénatom- vagy halogénatom –

vegyületek felhasználásával. A találmány értelmében úgy járnak el, hogy az (Ib) általános képletű vegyületet vagy annak 1–4 szénatomos észterét vagy gyógyászati szempontból elfogadható sóját a gyógyszerkészítésben szokásos hígító-, vivő- és egyéb segédanyagokkal összekeverve immungátló-, monokin-, különösen interleukin-1-gátló hatású gyógyászati készítménnyé alakítják.

A találmány szerinti eljárással előállított készítmények különösen alkalmasak olyan kóros állapotok kezelésére, ahol az immunrendszer gátlása indokolt.



Ib. ábra

HU 203198 B

A leírás terjedelme: 12 oldal (ezen belül 1 ábra)

A találmány tárgya eljárás új immungátló monokin-, különösen interleukin-1-gátló hatású gyógyászati készítmények előállítására.

A találmány azon az új felismerésen alapszik, hogy egyes gyulladás-, láz- és fájdalomcsökkentő hatású vegyületek immungátló, monokin-, különösen interleukin-1- (a továbbiakban: IL-1) gátló hatással rendelkeznek.

Ennek alapján a találmány eljárás gyógyászati készítmények előállítására, ismert módon előállított (Ib) általános képletű vegyületek

- ahol

R_3 jelentése 1–4 szénatomos alkilcsoport és

R_4 jelentése hidrogénatom- vagy halogénatom – vagy azok 1–4 szénatomos alkilészterének vagy gyógyászati szempontból elfogadható valamely sójának a felhasználásával. A találmány értelmében az (Ib) általános képletű vegyületet a gyógyszerkészítésben szokásos hígító-, vivő- és egyéb segédanyagokkal összekeverve immungátló, monokin-, különösen interleukin-1-gátló hatású gyógyászati készítménnyé alakítjuk. Az „ismert módon előállított" kifejezés a találmány elsőbbségi napja előtt publikált eljárásokra vonatkozik.

E gyógyászati készítményeket úgy állítjuk elő, hogy az (Ib) általános képletű vegyületet a gyógyszerkészítésben szokásos hígító-, vivő- és segédanyagokkal összekeverjük.

A (Ib) általános képletű vegyületeket az alábbiakban „találmány szerinti eljárásban alkalmazható vegyületeknek" nevezzük; ezek ismert vegyületek, amelyek előállítási eljárását például a 138 765 számú európai közrebocsátási irat ismerteti. E vegyületek a 4-es és 10-es helyzetükön kívül egyéb szuszbsztituenseket is tartalmazhatnak, különösen a benzol- és/vagy tioféngyűrűjükben: így a benzolgyűrű halogénatommal, például klóratommal, vagy hidroxilcsoporttal monoszubsztituált lehet.

A találmány szerinti eljárásban alkalmazható, (Ib) általános képletű vegyületek egyik figyelemre méltó csoportját képviselik a {2-halogén-10-oxi-4H-benzo[4,5]ciklohepta[1,2-b] tiofen-4-ilidén}-ecetsavak, valamint azok 1–4 szénatomos észterei és gyógyászati szempontból elfogadható sói, előnyösen azok az (Ib) általános képletű vegyületek, ahol

R_3 jelentése 1–4 szénatomos alkilcsoport; és

R_4 halogénatomot jelent,

valamint azok 1–4 szénatomos észterei és gyógyászati szempontból elfogadható sói. E vegyületek is ismertek egyrészt a 2 183 648 számú nagy-britanniai közrebocsátási iratból és a világszerte bejelentett, publikált, ekvivalens bejelentésekből, így például a 3 641 907 számú német szövetségi köztársaságbeli közrebocsátási iratból.

Az (Ib) általános képletű vegyületekben az R_3 helyén levő alkilcsoport egyenes vagy elágazó szénláncú lehet, és előnyösen metilcsoport. R_4 helyén az (Ib) általános képletben a halogénatom fluor-, klór-, brómvagy jódatomot, előnyösen klóratomot jelent.

„Gyógyászati szempontból elfogadható sókon" értjük például az alkálifém-sókat, így a nátrium- és káliumsókat, valamint az alkáliföldfémekkel alkotott sókat, például a kalciumsókat.

A találmány szerinti eljárásban alkalmazható (Ib) általános képletű vegyületek cisz- és transz-izomerek, azaz Z-, illetve E-izomerek lehetnek. A találmány szerinti eljárásban mind a cisz-, mind a transz-izomerek, valamint ezek keverékei alkalmazhatók. A jelen leírásban és az igénypontokban a Z és E megjelölést a konvencionális CIP-nómenklatúra szerint használjuk [Angew. Chem *94*, 614 (1982); továbbá az alább idézett helyen]; ennek közelebbi, részletes magyarázata megtalálható a fentebb idézett 138 765 számú európai közrebocsátási iratban és a 2 183 648 számú nagy-britanniai közrebocsátási iratban.

A találmány szerinti eljárásban előnyös a (Z)-izomerek alkalmazása. Ennek megfelelően a találmány szerinti eljárásban a túlnyomó részben Z-izomert tartalmazó termékek használata előnyös; és legelőnyösebb a lényegében tiszta Z-izomer formák alkalmazása.

Az alábbiakban példákat adunk meg a találmány szerinti eljárásban alkalmazható vegyületekre:

D) [10-metoxi-4H-benzo[4,5]ciklohepta[1,2-b]tiofen-4-ilidén]-ecetsav: D1): a (Z,E)-izomer-keverék; D2): a (Z)-izomer; D3): az (E)-izomer;

H) [2-klór-10-metoxi-4H-benzo[4,5]ciklohepta [1,2-b]tiofen-4-ilidén]ecetsav;

H1): a (Z)-izomer; H2): az (E)-izomer.

A találmány szerinti eljárásban előnyösen alkalmazhatók a D2 és H1 jelű vegyületek, különösen azok túlnyomó részben Z-izomer alakot tartalmazó keverékei, még előnyösebben a tiszta vagy lényegében tiszta Z-izomer formájuk.

A fentiekben említett 138 765 számú európai közrebocsátási iratban a 2 183 648 számú nagy-britanniai közrebocsátási iratban ismertetett, a találmányunk szerinti eljárásban alkalmazható vegyületek a patkányon végzett adjuváns artritisz, a patkányon lipopoliszacchariddal előidézett láz és artritiszes fájdalom vizsgálati módszere alapján gyulladáscsökkentő, lázcsökkentő és fájdalomcsillapító hatással rendelkeznek. Ilyen felhasználásokban a vegyületek hatékonysága pillanatnyi enyhülést okozó (palliáns), vagyis a vegyületek enyhítik a gyulladási állapotokkal együttjáró tüneteket, például az ízületi gyulladás esetén.

Meglepő módon azt találtuk, hogy a találmány szerinti eljárásban alkalmazható vegyületek monokingátló, közelebbről IL-1-gátló hatással, különösen az IL-1 felszabadulását és elválasztását gátló hatással rendelkeznek. Ennek felismerése alapján azt találtuk, hogy ezek a vegyületek nem várt módon számos betegség és kóros állapot kezelésére vagy kiegészítő kezelésére alkalmazhatók. [Az IL-1 betegségek kóroktanában és kóros állapotokban mutatkozó szerepének részletes ismertetése megtalálható például a következő helyen: J. Clin. Immunol. *5*, 287 (1985)].

Megállapítottuk, hogy ezek a vegyületek *gyógyító* hatásúak; például ízületi gyulladás esetén befolyásolják vagy módosítják a betegség folyamatát, pl. megelőzik a csontok és a porcok elfajulását. Az IL-1 inhi-

bitorok kifejlesztése a gyógyszeripar egyik legfontosabb célkitűzése. A találmány értelmében felhasznált vegyületek nemcsak gyulladásgátló hatásúak, hanem IL-1-inhibitorok is.

A találmány szerinti eljárással előállított készítmények révén első megközelítésben a következő lehetőségek adódnak:

1. Módszer monokin-gátlásra, különösen a IL-1 felszabadulásának vagy elválasztásának a gátlására a gyulladáscsökkentéstől és lázcsökkentéstől eltérő terápiaként egy arra rászoruló egyénen; e módszer abban áll, hogy ennek az egyénnek a számára a találmány szerinti eljárásban alkalmazható valamely vegyület hatásos mennyiségét adagoljuk. A találmány szerinti eljárás specifikus alternatív megvalósítási módjainak alapján továbbá a következők válnak lehetővé:

2. Módszer monokin-gátlásra, különösen az IL-1 felszabadulásának vagy elválasztásának a gátlására a gyulladáscsökkentéstől és lázcsökkentéstől eltérő terápiaként exogén vagy endogén eredetű károsodások kezelésére egy arra rászoruló egyénen; e módszer abban áll, hogy ennek az egyénnek a számára a találmány szerinti eljárásban alkalmazható valamely vegyület hatásos mennyiségét adagoljuk.

A találmány szerinti eljárással előállított készítmény felhasználásával továbbá lehetségessé válik:

2.1. Módszer exogén vagy endogén behatásra fellépő, lázas vagy gyulladásos elváltozás heveny fázisának a kezelésére, vagy latens fertőzés vagy krónikus betegség következtében fellépő, láztól vagy gyulladástól eltérő elváltozások heveny fázisának a kezelésére egy arra rászoruló egyénen; e módszer abban áll, hogy ennek az egyénnek a számára a találmány szerinti eljárásban alkalmazható valamely vegyület hatásos mennyiségét adagoljuk.

2.2. Módszer neutrofília, mononukleáris sejtes beszűrődés, túlzott vérbőség, vér-cinkhiány, vér-vashiány, izomfehérje-lebomlás, étvágytalanság és kóros aluszékonyság kezelésére – amelyek például exogén vagy endogén káros behatások heveny fázisaiban válaszként lépnek fel, vagy latens fertőzés vagy krónikus megbetegedés következtében a heveny fázisban elváltozásként jelentkeznek – egy arra rászoruló egyénen; e módszer abban áll, hogy ennek az egyénnek a számára a találmány szerinti eljárásban alkalmazható valamely vegyület hatásos mennyiségét adagoljuk.

Exogén vagy endogén behatás például mikrobák, így baktériumok vagy vírusok fertőző támadása a szervezet ellen (például az influenza), a káros és kóros immunológiai reakciók, rákos megbetegedések, égési sebek és más sérülések.

Lappangó fertőzés, illetve krónikus megbetegedés például az ízületi gyulladás, különösen a reumás ízületi gyulladás és a gyulladásos bélmegbetegedések.

A találmány szerinti eljárással előállított készítmény felhasználásával adódik továbbá:

3. Módszer immungátlás (immunszuppresszió) kiváltására vagy elérésére, különösen autoimmun megbetegedés kezelésére egy arra rászoruló egyénen; a módszer abban áll, hogy ennek az egyénnek a számára a találmány szerinti eljárásban alkalmazható valamely vegyület hatásos mennyiségét adagoljuk.

A találmány szerinti eljárással előállított készítmények (a továbbiakban röviden: találmány szerinti készítmények) lehetővé teszik például a következő autoimmun megbetegedések kezelését: *csigolyamerevség;* autoimmun hematológiai elváltozások (például a hemolitikus vérszegénység, aplasztikus vérszegénység, vörös vérsejtes vérszegénység és az idiotápiás trombocitopénia); szisztémiás eritémás bőrfarkas (lupus erythematosus); többszörös porcgyulladás; bőrszarusodás; Wegener-féle granulomás állapot; dermatomyositis; aktív krónikus májgyulladás; súlyos izomgyengeség; pikkelysömör; idiopátiás zsírszékelés; autoimmun gyulladásos bélbetegség (például vastagbélfekély és Crohn-betegség); endokrin eredetű szemmegbetegedés; Grave-betegség; sarcoidosis; sclerosis multiplex; elsődleges epecirrózis; fiatalkori cukorbetegség (I. típusú diabetes mellitus); *Reiter-féle tünetcsoport;* nem fertőző uveagyulladás; autoimmun szaruhártyagyulladás (például a száraz szaru-kötőhártyagyulladás); szövetközti tüdőfibrózis; *pikkelysömörös, ízületi gyulladás* ; glomerulonephritis (vesegyulladásos tünetcsoporttal vagy anélkül, például az idiopátiás vesetünetcsoport vagy a minimális elváltozással járó vesebántalmak); ezek közül különösen figyelemre méltó a fentiekben aláhúzással jelzett megbetegedések kezelési lehetősége.

A fenti célokra a találmány szerinti eljárásban alkalmazható vegyületek – kívánt vagy megfelelő esetben – kombinációban vagy adjuvánsként is alkalmazhatók egyéb immunszuppresszív szteroidokkal vagy ciklosporinnal végzett terápiában; különösen olyan kezelés során, ahol immungátló hatóanyagként ciklosporint vagy ciklosporin A-t alkalmazunk (amely a kereskedelmi forgalomban Sandimmune^R vagy Sandimmun^R néven szerepel).

4. Módszer a) szöveti kalcium-kiürülés kezelésére; vagy b) a csontban vagy porcban lejátszódó degeneratív folyamatok kezelésére egy arra rászoruló egyénen; e módszer abban áll, hogy ennek az egyénnek a számára a találmány szerinti eljárásban alkalmazható valamely vegyület hatásos mennyiségét adagoljuk.

A találmány szerinti eljárás még további megvalósítási módjainak útján megvalósítható:

4.1. Módszer csont elmésztelenedésének vagy felszívódásának a kezelésére (például a csontból történő kalcium-ürülés kezelésére);

4.2. Módszer fog és foggyökér kalciumhiányának a kezelésére; valamint

4.3. Módszer felszívódási folyamatok (például kalcium felszívódásának) kezelésére vagy fibroblasztos beszűrődés kezelésére csontízületeken vagy csontízületeken belül egy arra rászoruló egyénen; e módszer abban áll, hogy ennek az egyénnek a számára a találmány szerinti eljárásban alkalmazható valamely vegyület hatásos mennyiségét adagoljuk.

A találmány szerinti eljárás egyik előnyös megvalósítási módjának révén a fenti 4. és 4.1.–4.3. pontokban említett módszerrel kezelhető: a szöveti kalcium-kiürülés mint a csontban vagy porcban végbemenő degeneratív folyamat, így például a fogínymegbetegedések, csontízületi gyulladás, csigolyamerevség egyik komponense; a különböző eredetű csontritkulások, például a klimax során, illetve a menstruáció megszűnése után jelentkező csontritkulás, valamint az aggkori csontritkulás, mozgáshiány vagy baleset következtében bekövetkező csontritkulás; egyéb csontbántalmak, például a csontok ásványi anyagveszteségével kapcsolatos heveny és krónikus állapotok; lehetővé válik a csontlágyulás során a specifikus terápiás kezeléshez járuló adjuváns kezelés; csontok gyógyítása és regenerálása, valamint a lappangó tetánia és tetánia kezelése.

Tekintettel a kalcium-felszívódást és a csont kalciumtartalmának kiürülését módosító sajátságaikra, a találmány szerinti eljárásban alkalmazható vegyületek különösen alkalmasak olyan ízületi gyulladásos állapotok kezelésére, ahol ezek a folyamatok játsszák a főszerepet, különösen a csontízületi gyulladás és a csigolyamerevség kezelésére.

5. Módszer fibrózis vagy fibrotikus állapotok kezelésére, például veleszületett májfibrózis, szívbelhártya-fibrózis, cisztás fibrózis, tüdőfibrózis, retroperitoneális fibrózis, rákos eredetű fibrózis, húgyhólyag körüli fibrózis, burjánzó fibrózis, szövethelyettesítő fibrózis, méhfibrózis, műtét utáni tapadásos elváltozások és hegek kezelésére egy arra rászoruló egyénen; e módszer abban áll, hogy ennek az egyénnek a számára a találmány szerinti eljárásban alkalmazható valamely vegyület hatásos mennyiségét adagoljuk.

A találmány szerinti eljárásban alkalmazott vegyületek különösen alkalmasak a tüdőfibrózis kezelésére.

6. Módszer daganatok támadásának vagy daganatok növekvésével kapcsolatos tüneteknek a kezelésére – vagy támogató vagy kombinációs kezelésére – (például izomfehérje bomlásának kezelésére, Kreutzfeld-Jacob-féle betegség, Alzheimer-betegség, kóros aluszékonyság, köszvény, endotoxin-előidézte sokk és felhám-hólyagkiütés (epidermolysis bullosa) kezelésére egy arra rászoruló egyénen; e módszer abban áll, hogy ennek az egyénnek a számára a találmány szerinti eljárásban alkalmazható valamely vegyület hatásos mennyiségét adagoljuk.

A 6. pontban említett kóros állapotok közül a találmány szerinti eljárásban alkalmazható vegyületek különösen a daganatok növekvésével járó tünetek (például az izomfehérje bomlása), köszvény és endotoxinsokk kezelésére alkalmazhatók.

A találmány szerinti eljárás révén lehetővé válik:

A) a találmány szerinti készítmények alkalmazása a fenti 1–6. pontokban felsorolt kóros állapotok kezelésére;

B) a találmány szerinti eljárásban alkalmazható vegyületek gyógyászati készítményekké alakítása a fenti 1–6. pontokban felsorolt kóros állapotok kezelésében történő alkalmazásra;

C) a találmány szerinti olyan készítmények alkalmazása az 1.–6. pontokban felsorolt kezelési módszerekben, amelyek a találmány szerinti eljárásban alkalmazható vegyületeken kívül egy vagy több, gyógyászati szempontból elfogadható hígító- vagy vivőanyagot tartalmaznak.

A találmány szerinti eljárásban alkalmazható vegyületek monokin-gátló, különösen az IL-1 felszabadulását és elválasztását gátló hatása, másrészt a találmány szerinti eljárásban alkalmazható vegyületek alkalmazási lehetősége a fentiekben meghatározott betegségek és kóros állapotok kezelésére standard farmakológiai módszerekkel, illetve klinikai vizsgálatokkal igazolható; az alábbiakban mindezt részletesen leírjuk.

1. Az IL-1 elválasztására kifejtett gátló hatás

1.1. *Biológiai vizsgálat (biológiai meghatározás) porcsejteken*

Bevezetés

Igazolták, hogy az IL-1 viszonylag specifikus célsejtjei a nyúlból származó, összeolvadó porcsejt-tenyészetek. A tisztított IL-1 [J. Immunol. *138*, 496 (1987)], a rekombináns emberi IL-1-β (a következőkben: rhIL-1), valamint a stimulált emberi monocitákról, egér- és nyúl-hashártya makrofágokról vagy a P388D$_1$ egér-sejttörzsről gyűjtött, kondicionált közegek [J. Immunol. *114*, 894 (1975)] a porcsejtek elválasztásának lefolyásában jellegzetes elváltozásokat idéznek elő. Közelebbről, egy lappangó állapotban lévő fém-proteináz (a következőkben: MP) aktiválódik, míg a plazminogén-aktivátor (a következőkben: PA) elválasztása csökken. Az MP-válasz viszonylag specifikus az IL-1-re vonatkozóan, mivel az IL-2, TNF-α, a rekombináns emberi interferon (a következőkben: rh IFN-α), rh IFN-γ, a forbol-mirisztát-acetát, konkanavalin A, prosztaglandin-E és az indometacin ezt nem befolyásolja. A monokinnal indukált PA-elválasztás csökkenése nagyon érzékeny paraméter (a LAF-teszthez hasonlóan, lásd alább), ámbár nem annyira specifikus, mint az MP indukciója [Biochem. J. *219*, 667 (1984); Brit. J. Rheumatol. *24* (Supp. 1), 128 (1985); valamint J. Immunol. *138*, 496 (1987)].

1.1.a Az egérből származó makrofág-monokin gátlása

Egér hashártyájából elkülönített, nem-stimulált [J. Exp. Med. *148*, 435 (1987)] in vitro egy napon át tenyésztettünk a vizsgálandó vegyület különböző koncentrációinak jelenlétében. A tenyészközegeket 1:1 térfogatarányban friss közeggel hígítottuk, és összeolvadó nyúl-porcsejtekhez adtuk. További 2 nap elteltével meghatároztuk a porcsejttenyészet közegében az MP-aktivitást. E vizsgálat során a találmány szerinti eljárásban alkalmazható vegyületek, különösen a D2 jelű vegyület a monokin felszabadulását körülbelül 3,0–100 μM koncentráció-tartományban gátolták. Meghatároztuk a D2 jelű vegyület lényegében tiszta Z-izomer alakjának ED$_{50}$ értékét 3–5 külön kísérletben (minden egyes kísérletet összesen három ismétlésben végeztünk), és azt 100 μM nagyságrendűnek találtuk.

1.1.b Emberből származó monocita-monokin gátlása

Egészséges önkéntes egyénekből vett vérből egymagvú sejteket nyertünk centrifugálással, és e sejteket szövettenyésztő edényekben a vizsgálandó vegyület különböző koncentrációinak jelenlétében tenyésztettük [J. Immunol. *138*, 496 (1987)]. A nem tapadó limfocitákat 4 óra múlva többszörös mosással eltávolítottuk. Ezután friss közeget, vizsgálandó vegyületet és stimulánsként lipopoliszaccharidot (a következőkben: LPS) adtunk hozzá, és a monocitákat 19 órán át inkubáltuk. Az összegyűjtött tenyésztőközeget 1:10 térfogatarányban friss közeggel hígítottuk, és összeolvadó nyúl-porcsejtekhez adtuk. További 2 nap elmúltával meghatároztuk a porcsejttenyészet közegében az MP-aktivitást.

E vizsgálat során a találmány szerinti eljárásban alkalmazható vegyületek – különösen a D2 és K1 jelű vegyületek – a monokin felszabadulását körülbelül 30–100 μM koncentráció-tartományban gátolták. Meghatároztuk a lényegében tiszta (Z)-izomer alakban lévő D2 és K1 jelű vegyületek ED_{50}-értékét 3 vagy 7 külön kísérletben (minden egyes kísérletet összesen három párhuzamosban végeztünk), és azt 60–100 μM nagyságrendűnek találtuk.

1.2. *LAF-vizsgálati módszer (timocita-burjánzás vizsgálata)*

A monokin aktivitásának standard vizsgálati módszere a limfociták burjánzásának vizsgálatán alapul. Ez a módszer igen érzékeny, azonban viszonylag kevéssé specifikus, mivel az IL-2, a forbol-mirisztát-acetát, konkanavalin A, prosztaglandin-E és az indometacin zavarják. Emberi monocitákból tenyésztőközeget állítottunk elő a fenti 1.1.b. szerint, ezt 1:10, 1:20 és 1:40 térfogat arányban hígítottuk, és milliliterenként $1,5 \times 10^{-6}$ timocitát (ezeket C3H/HeJ törzsű egerekből nyertük) tartalmazó Dulbecco-féle módosított Eagle-közeghez adtuk, amely ezen kívül 20 mM (hidroxi-etil)-piperazin-etánszulfonsavat, 12 mM nátrium-hidrogén-karbonátot, 2 mM glutamint, 2% borjúmagzatszérumot, 10 μM 2-merkapto-etanolt, 0,1 μM indometacint és antibiotikumokat tartalmazott. A sejteket 2 napig 96-üreges tenyésztőlemezen inkubáltuk, és a burjánzás mértékét az utolsó 6 órában alkalmazott ^{3}H-timidin (üregenként 1 μC) bevitelével határoztuk meg. A beépült radioaktív komponenst tartalmazó terméket szűrőpapírra gyűjtöttük, és meghatároztuk a radioaktivitását. E vizsgálat során a találmány szerinti eljárásban alkalmazható vegyületek a monokin termelődését körülbelül 30–100 μM koncentráció-tartományban gátolták. Meghatároztuk a lényegében tiszta (Z)-izomer alakban lévő D2 és H1 jelű vegyületek ED_{50}-értékét 2 különálló kísérletben (mindkét kísérletet három ismétlésben végeztük), és azt 30 μM nagyságrendűnek találtuk.

Abból a célból, hogy a találmány szerinti eljárásban alkalmazható vegyületeknek a fenti LAF-módszerben alkalmazott egér-timocitákra kifejtett antagonista, illetve közvetlen befolyását kizárjuk, meghatároztuk a találmány szerinti eljárásban alkalmazható vegyületek hatását a ^{3}H-timidin beépülésére a timociták rekombináns emberi IL-1-vel vagy Il-2-vel végzett stimulálása után. E vizsgálat során a találmány szerinti eljárásban alkalmazható vegyületek – különösen a D2 és H1 jelű vegyületek – a 10 ng/ml rekombináns emberi IL-2 koncentrációval vagy 75 ng/ml rekombináns humán IL-1 koncentrációval indukált burjánzást nem befolyásolták lényegesen, és koncentrációfüggés sem volt megfigyelhető.

A továbbiakban meghatároztuk az MP-nek IL-1 által kiváltott elválasztására gyakorolt befolyását porcsejtek – mint az IL-1 célsejtjei – alkalmazásával. Az IL-1-et (beszerezhető: a Genzyme Corporation cégtől, USA) a találmány szerinti eljárásban alkalmazható vegyülettel vagy anélkül, vagy dexametazonnal (mint kontrollal) porcsejtekhez adtuk, és 2-napos inkubálás után a felülúszó közegben meghatároztuk a fém-proteináz aktivitását. E vizsgálat során a találmány szerinti eljárásban alkalmazható vegyületek – különösen a D2 és H1 jelű vegyületek – az MP-nek IL-1-okozta elválasztását nem befolyásolták.

1.3. *Radioimmun-mérés: az IL-1 kvantitatív meghatározása*

Az 1.1.b szerinti eljárást követtük, és a kapott, nem hígított tenyésztőközegben az IL-1 koncentrációit CISTRON IL-1 radioimmun-mérő készlettel (beszerezhető a Cistron cégtől, 10, Bloomfield Avenue, P.O.Box 2004, Pine Brook, NJ 07 058 USA) meghatároztuk. Ez a mérőmódszer az IL-1β-ra specifikus, és mind a sejten kívüli, mind a sejten belüli anyag érzékelésére alkalmas.

E vizsgálat során beigazolódott, hogy a találmány szerinti eljárásban alkalmazható vegyületek – különösen a D2 és K1 jelű vegyületek – a sejten kívüli (extracelluláris) IL-1 koncentrációját csökkentik. Ezzel szemben a sejten belüli (intracelluláris) IL-1 koncentrációja lényegében változatlan maradt. Meghatároztuk a lényegében Z-izomer alakban lévő D2 és H1 jelű vegyületek Ed_{50} értékét az extracelluláris IL-1 koncentráció csökkentésében 2-8 kísérletben (minden egyes kísérletet összesen három párhuzamosban végeztünk), és azokat 40–25 νM nagyságrendűnek találtuk. Minden egyes meghatározásunk azt mutatta, hogy az extracelluláris IL-1 tartalom jelentős mértékben csökkent.

1.4. *A felszabadulás, illetve a szintézis gátlásának vizsgálata*

1.4.a Homogenizátumok és lizátumok előállítása

Hevítéssel inaktivált 1% emberi AB-szérumot tartalmazó, 0,3 ml foszfáttal pufferolt fiziológiás konyhasóoldatot adtunk kimosott, összetapadó emberi monocitákhoz, és utána a sejteket leválasztottuk. A sejteket tartalmazó oldatot azonos csoporthoz tartozó két másik üvegbe vittük át, és ezt az eljárást háromszor ismételtük. Az így kapott 0,9 ml térfogatú szuszpenziót Dounce homogenizáló berendezéssel (gyártója a Kontes Co, Vineland, NJ) homogenizáltuk úgy, hogy a B-zúzót ötször alkalmaztuk hét ütéssel.

A lizátumot úgy állítottuk elő, hogy a mosott emberi monocitákból álló egysejt-réteghez 0,01% digitonint tartalmazó 0,3 ml vizet adtunk.

1.4.b Az IL-1 szintézisére és felszabadulására kifejtett hatás

50 µl homogenizátumot a közeggel 500 µl-re hígítottunk, majd összeolvadó porcsejtekhez adtuk, hogy a fém-proteináz-indukáló hatást – amely az IL-1 tartalom mértéke – ellenőrizzük.

Az IL-1-tartalmat meghatároztuk továbbá a tenyésztőközegben, valamint a sejt-homogenizátumokban és sejt-lizátumokban radioimmun-méréssel (a következőkben: RIA-méréssel) (lásd a fenti 1.3. pontot).

E vizsgálat során a találmány szerinti eljárásban alkalmazható vegyületek – különösen a D2 jelű vegyület – jelentősen csökkentették az IL-1 szintjét a felülúszó közegben, míg a sejt-homogenizátumokban és sejt-lizátumokban jelenlévő IL-1-tartalom csak kevéssé csökkent vagy változatlan maradt.

1.5. *A monociták tapadására gyakorolt hatás*

Frissen gyűjtött, emberi egymagvú sejtekből a vizsgálandó vegyület vagy vivőanyag jelenlétében monocitákat különítettünk el, majd 4 óra elmúltával a közeget leszívtuk, és az egysejt-réteget szokás szerint mostuk. Ezt követően a tapadó monocitákat vizes digitonin-oldattal lizáltuk, és meghatároztuk a DNS mennyiségét, valamint az LDH citoszol enzim-aktivitását. E vizsgálat során a találmány szerinti eljárásban alkalmazható vegyületek – különösen a D2 jelű vegyület – és a vivőanyag nem csökkentették a monociták tapadóképességét.

1.6. *A monokinok elválasztására kifejtett hatás*

Az IL-1-en TNF-α-n és IL-6-on kívül két jól megkülönböztethető monokin létezik, amelyek stimulált monocitákból szabadulnak fel.

A fentebb leírt módon emberi monocitákból tenyésztőközeget állítottunk elő, és a fentebb leírt RIA-méréssel meghatároztuk az IL-1 és TNF-α-tartalmat, valamint az alábbiakban leírt biológiai vizsgálattal meghatároztuk az IL-6-tartalmat. E vizsgálat során a találmány szerinti eljárásban alkalmazható vegyületek – különösen a D2 jelű vegyület – az IL-1 felszabadulását jelentősebb mértékben gátolták, mint az IL-6 és TNF-α felszabadulását.

Az IL-6 biológiai meghatározása:

Az emberi monocitákból származó IL-6 kondicionált közegekben történő mérése céljából 0,2 ml térfogatú, milliliterenként $2,4 \times 10^4$ B13.29 sejtet tartalmazó közeget 96-üreges lemezeken tenyésztettünk 48 órán át olyan tenyésztőközeggel, amelyet 200 E/ml rekombináns IL-6-tal, 50 µM 2-merkapto-etanollal és antibiotikumokkal kiegészített, szérummentes, Iscove szerint módosított Dulbecco-közeggel hígítottunk. A burjánzás mértékét az utolsó 6 órában alkalmazott ^{3}H-timidin (üregenként 1 µC) beépülésével határoztuk meg. A beépült radioaktivitást tartalmazó terméket szűrőpapírra gyűjtöttük, aktivitását meghatároztuk, és standard IL-6 készítményhez viszonyítottuk.

1.7. *A laktát-dehidrogenáz szivárgására és a lizozim elválasztására gyakorolt hatás*

A fentebb leírtak szerint emberi monocitákból tenyésztő-közeget állítottunk elő. A lizozimet és a laktát-dehidrogenázt (a továbbiakban) LDH) kinetikusan ellenőriztük egy személyi számítógéppel összekapcsolt Twinreader műszerrel (gyártója a Flow Laboratories AG cég). 50 µl térfogatú mintákat az LDH meghatározása céljából 200 µl szuszbsztrátum-keverékkel elegyítettünk, amely végkoncentrációban 50 mM foszfát-puffert (pH 7,5), 0,8 mM nátrium-piruvátot, 0,24 mM NADH2 -t és 0,04% szarvasmarha-albumint tartalmazott, és egyperces időközökben 11-szer mértük az abszorbancia változását 340 nm hullámhosszon. A számítógép megadta azokat a kezdeti sebességeket, amelyeket az egységek meghatározásához használtunk. A lizozim meghatározása céljából 50 µl térfogatú mintákat 100 µl olyan szuszpenzióval elegyítettünk, amely milliliterenként 1,2 mg M. lysodeikticus-t, valamint 67 mM koncentrációban foszfát-puffert (pH 6,2) tartalmazott, majd 4-perces időközökben 11-szer mértük a zavarosság változását 492 nm hullámhosszon. Minden egyes mérési sorozathoz kalibrációs görbét készítettünk kristályos tyúktojás-fehérje lizozim alkalmazásával [J. Exp. Med. *148*, 435 (1978)]. Sem a kontrollból, sem a kezelt sejttenyészetekből végbemenő jelentős LDH-szivárgást nem figyeltünk meg. A találmány szerinti eljárásban alkalmazható vegyületek – különösen a D2 jelű vegyület – csupán elhanyagolható mértékben csökkentették a lizozim felszabadulását, és ez a csökkenés nem esett a nem stimulált kontrollok szintje alá.

2. *A csontfelszívódás megelőzése (a szöveti kalcium-kiürülés kezelése)*

4–5 napos Swiss albino egerek koponyacsontjának frontális és parietális részét (felezett koponyatetőcsont) rozsdamentes acélhálón BGJ csontszöveti tenyésztőközegben tenyésztettünk, amelyet a közeg közbenső fázisában 1 mg/ml BSA-val és a nedves atmoszférában gázzal (95% levegő és 5% szén-dioxid keveréke) egészítettünk ki. A tenyésztést 37 °C hőmérsékleten végeztük [lásd a következő helyen: Reynolds és munkatársai: „Organ Culture in Biomedical Research", kiadók: Balls és Mamichendam, Cambridge University Press, 355–366. old; (1987)].

Meghatároztuk a vizsgálandó anyag különböző koncentrációinak befolyását a vizsgálati közegbe történő kalcium-felszabadulásra a kalcium-felszabadulást serkentő anyagok [PGE_2, LPS és 1,25-dihidro-D_3-vitamin] jelenlétében. Ebből a célból megmértük a kalcium-koncentrációkat olyan csonttenyészet-felülúszókban, amelyeket 72- és 144-órás tenyészetekből nyertünk, valamint mértük a kalcium-koncentrációkat a koponyacsontok TCA-kivonataiban a tenyésztés végén spektrofotometriás módszerrel [Am. J. Clin. Pathol. *58*, 376 (1972)]. Meghatároztuk továbbá az N-

acetil-glükóz-aminidáz lizozim-enzim aktivitását csonttenyészet-felülúszókban és koponyacsontok Triton 100 kivonataiban tenyésztés után Banerjee és Basu módszerével [Biochem. J. *45*, 113 (1975)]. Az enzim aktivitásának változását a felezett koponyacsontra esőμegységekben és a felszabadulás százalékos értékében fejeztük ki.

E vizsgálatok során a találmány szerinti eljárásban alkalmazott vegyületek – különösen a lényegében tiszta Z-izomer alakú D2 és H1 jelű vegyületek – a kalcium felszabadulását gátolták, és ezzel párhuzamosan befolyásolták az N-acetil-glükóz-aminidáz enzimet 1×10^{-5} -5×10^{-6} M nagyságrendű koncentráció-tartományban. Meghatároztuk a lényegében tiszta Z-izomer alakjában lévő D2 jelű vegyület IC_{50}-értékeit, és az alábbi eredményeket kaptuk:

	IC_{50} (M)	
Az alábbi vegyület jelenlétében	Kalcium	N-Acetil-glükóz-amidináz
PGE_2	$2{,}2 \times 10^{-5}$	$7{,}9 \times 10^{-6}$
LPS	$2{,}8 \times 10^{-5}$	$8{,}3 \times 10^{-6}$
1,25-Dihidro-D_3-vitamin	$3{,}8 \times 10^{-5}$	$3{,}7 \times 10^{-5}$

(Az IC_{50}-értékek kiszámítása céljából a kontrolltenyészetekben végbemenő felszívódás mértékének és a maximálisan stimulált tenyészetekben végbemenő felszívódásnak a különbségét 100%-nak vettük. Az IC_{50}-érték a vizsgálandó anyagnak az a koncentrációja, amely a maximális felszívódást 50%-os mértékben gátolja.

3. *A reumatoid (torzulással járó) ízületi gyulladás állatmodelljén kifejtett módosító hatás vizsgálata*

48 érett nőstény patkányon adjuváns artritiszt idéztünk elő, majd a vizsgálandó vegyületet 40 napig orálisan adagoltuk. A 10., 20., 30. és 40. napon mértük az ízület duzzadását és a csontsűrűséget, és ezt placeboval kezelt kontrollállatok paramétereivel hasonlítottuk össze. Ezenkívül megmértük a porc glikozamino-glikánjait (a következőkben: GAG) a combnyakízület fej-részében, amelyet a kezelési időszak után eltávolítottunk. A vizsgálat kezdetén, majd a 3., 6., 9., 16. és 22. napon meghatároztuk a szérum α_2-makroglobulin-tartalmát.

Amidőn a találmány szerinti eljárásban alkalmazható vegyületeket orálisan, naponta 2,5–20 mg/kg mennyiségben adagoltuk, a gyulladásos folyamat által kezdetben előidézett csontsűrűség-csökkenés után megfigyeltük, hogy a csont normális ásványanyag-tartalma helyreállt. Denzitometriás mérésekkel megállapítottuk, hogy nemcsak a csontsűrűség növekedett, hanem a szérum α_2-makroglobulin-koncentrációi is a dózistól függően csökkentek. Az érintett porcok GAG-tartalmának elemzése azt mutatta, hogy a proteoglikán-tartalom a dózistól függő módon növekedett.

A reumatoid ízületi gyulladás ezen vizsgálati modelljén a találmány szerinti eljárásban alkalmazható vegyületek – például a lényegében tiszta Z-alakú D2 jelű vegyület – a kóros állapotot módosító hatást mutatott, különösen 30-napos kezelés után; a találmány szerinti eljárásban alkalmazható vegyületek főként az adjuváns artritiszben szenvedő patkányok csontjára és porcára gyakoroltak védőhatást.

A csontsűrűség in vivo mérésére érett patkányokon a radiográfiás-denzitometriás módszert alkalmaztuk [J. Amer. Ger. Soc. *17*, 142 (1969)]. A vizsgálandó anyaggal végzett kezelés során a csontot hosszanti irányban vizsgáltuk, és megfigyeléseinket összehasonlítottuk egyrészt kezeletlen artritiszes patkányokon, másrészt kontrollállatokon végzett megfigyeléseinkkel. In vivo menynyiségi radiográfiás (pásztázó) módszert alkalmaztunk, aminek során paraméterként a trabekuláris tömeget vettük. A radiográfiás képet a letapogatás után viszonylagos optikai sűrűségi (ROD) egységekké alakítottuk át egy nagy feloldású denzitometriás mérőműszerrel. A rendszer jellemzői következtében (a sötétedés a viszonylagos optikai sűrűség növekvését jelenti) a regisztrált értékeket (1-x)-ben fejeztük ki, ahol x jelenti a viszonylagos optikai sűrűség kísérletesen mért értékét. Így összhangba hoztuk a röntgensugarak csontszövetre kifejtett biológiai hatását (amely esetben a film sötétedése a csontsűrűség csökkenését jelzi). Az így kapott denzitometriás értékeket az állat testsúlyának függvényeként ábrázoltuk, aminek során azonos súlytartományon belüli állatcsoportokat választottunk.

4. *Az immungátló (autoimmun betegségekre kifejtett) hatás vizsgálata*

Az alábbi kísérletekben a találmány szerinti eljárásban alkalmazható vegyületeket – például a lényegében tiszta Z-izomer alakjában levő D2 vagy H1 jelű vegyületet – orálisan, naponta 5-60 mg/kg mennyiségben adagoltuk önmagában vagy ciklosparin A-val kombinálva, amely utóbbit naponta, orálisan körülbelül 1–10 mg/kg mennyiségben, olívaolajos oldatban adagoltuk (tehát lényegesen kisebb dózisban, mint amit általában alkalmaztunk az immungátló hatás elérése céljából a leírt vizsgálati modelleken).

4.1. *Az uvea-gyulladásra (uveitis) kifejtett hatás: a kísérletileg előidézett autoimmun uveitis modulálása*

E vizsgálatot Nussenblatt és munkatársai általános módszerével [Arch. Ophthal. *100*, 1146 (1982)] végeztük. 6–10, egyenként 150–200 g testsúlyú nőstény Lewis-patkányt 30 μg szarvasmarha S-antigénnel immunizáltunk, amelyet 2,5 mg/ml Mycobacterium tuberculosis H 37 RA-val dúsított komplett Freund-adjuvánsban emulgeáltunk (1:1 tömegrész arányban). Az immunizálást az állat hátsó végtagjának talpába történő befecskendezéssel végeztük.

A vizsgálandó anyagot a fentebb meghatározott dózisban adagoltuk vagy ciklosporin A nélkül; vagy ciklosporin A-val kombináltan, az immunizálás után 7 nappal kezdődően, egymást követő 7 napon át. A kontrollcsoportnak a vizsgálandó anyag helyett placebót adagoltunk. Az immunizálás utáni 14. napon a patkányokat leöltük, szemeiket azonnal eltávolítottuk, formaldehidben fixáltuk, majd paraffinviaszba ágyaztuk, hematoxilin-eozinnal és PAS-val megfestettük. A hisztopatológiás értékelést maszkírozott formában végeztük, és a gyulladást 0-tól 4-ig terjedő pontskálával értékeltük; 0 jelentette azt, hogy nincs gyulladás, és 4 jelentette a teljes szemgyulladást. Külön kiválasztott eseteket transzmissziós és pásztázó elektronmikroszkópiával vizsgáltunk. A kísérletileg előidézett autoimmun uveitiszben szenvedő állatok szemei generalizált retinagyulladást és érhártyagyulladást mutattak, és az üvegtest üregében a retina alatti térségben és a szem elülső kamrájában gyulladásos sejteket tartalmazó rostos izzadmány jelent meg.

Amidőn egy vizsgálati vegyületet, vagy vizsgálandó vegyületet és ciklosporin A-t kombináltan adagoltunk a feltüntetett dózisokban, a kísérletileg előidézett autoimmun uveitiszben szenvedő állatok száma lényegesen csökkent azokkal a kontrollcsoportokkal összehasonlítva, amelyek csak placebót, vagy placebót és azonos adagban ciklosporin A-t kaptak.

4.2.a *Többszörös szklerózisra kifejtett hatás; I. A kísérletileg előidézett allergiás agy- és gerincvelőgyulladásra gyakorolt hatás*

Ezt a vizsgálatot a Borel és munkatársai által leírt általános módszerrel [Agents and Actions *6*, 468 (1967)] végeztük. 8–12 nőstény Wistar vagy hím Lewis patkányból álló csoportokon kísérleti úton allergiás agy- és gerincvelő-gyulladást idéztünk elő úgy, hogy az állatok hátsó végtagjának talpába 0,1 ml-t fecskendeztünk intradermálisan olyan emulzióból, amely 2,5 g szarvasmarha-gerincvelőt (liofilizálás után 12 ml vízben oldva), 1,5 ml Arlacel A-t, 8,0 ml Nujolt és 0,2 ml fiziológiás konyhasó-oldatot, valamint 20 mg elölt, szárított Mycobacterium phlei-t tartalmazott. A vizsgálandó vegyületet önmagában vagy a vizsgálandó vegyületet és ciklosporin A-t hetenként 5 napon át, a szenzibilizálás napjával kezdve három héten át adagoltuk. A kontrollcsoportban a kísérletileg előidézett allergiás agy- és gerincvelő-gyulladás általában a szenzibilizálás után 9–16 nappal kezdődött, és a paralízis tünetei a hátsó végtagokon és a farkon jelentkeztek. A kísérleti állatok kóros tüneteit naponta vizsgáltuk, és a betegség megjelenését akkor ítéltük pozitívnak, ha a tünetek mindkét hátsó végtagon és a farkon is megfigyelhetők voltak. A vizsgálati állatokat összesen 25 napon át figyeltük meg.

Amidőn a vizsgálandó vegyületet önmagában, vagy a vizsgálandó vegyületet és ciklosporin A-t kombináltan a fentebb említett dózisokban adagoltuk, a kísérletileg létrehozott allergiás agy- és gerincvelőgyulladás lényegesen csökkent mértékben jelentkezett a vizsgálati időszakban, mint azokban a kontrollcsoportokban, amelyek csak placebót vagy placebót és azonos dózisban ciklosporin A-t kaptak.

4.2.b Többszörös szklerózisra kifejtett hatás; II: kísérletileg előidézett, előzőleg fennálló allergiás agy- és gerincvelőgyulladásra gyakorolt hatás

E vizsgálatunkat a 4.2.a.-ban leírt eljáráshoz hasonlóan végeztük, azonban a vizsgálandó anyagot önmagában, vagy a vizsgálandó anyagot és ciklosporin A-t kombináltan a szenzibilizálás utáni 8–9. napon (tehát közvetlenül a kórtünetek jelentkezése előtt) kezdtük adagolni; az adagolást naponta vagy minden második napon, körülbelül 14 napon át végeztük. A kezelési időszak alatt az állatokon fellépő kórtüneteket naponta vizsgáltuk, és a 4.2.a-ban leírtak szerint pontozással értékeltük.

Amidőn a vizsgálandó vegyületet önmagában, vagy a vizsgálandó vegyületet és ciklosporin A-t a fenti dózisokban adagoltuk, a kísérletileg előidézett agy- és gerincvelőgyulladás kórtünetei lényegesen csökkent mértékben jelentkeztek a vizsgálati időszakban, mint azokban a kontrollcsoportokban, kamelyek csak blacebót, vagy blacebót és azonos dózisban ciklosporin A-t kaptak.

4.3. *Szisztémás eritémás bőrfarkasra (lupus erythematosus) kifejtett hatás vizsgálata az (NZB/NZW)F1 egérmodellen*

E vizsgálatainkat a Steinberg és munkatársai által leírt [Bulletin on the Rheumatic Diseases *28*, 940 (1977–78)] (NZB/NZW)F1 egértörzs-modellre alapoztuk. Az ezen állattörzshöz tartozó nőstényeken mintegy 5–7,5 hónapos korukban gyakran jelentkeznek a szisztémás eritémás bőrfarkas tünetei anti-DNS és anti-eritrocitás auto-antitestek képződésével, valamint fehérjevizeléssel. Ez a kóros állapot végül az állatok pusztulásához vezet. A hatás vizsgálatára 6–8 nőstény egérből álló csoportokat alkalmaztunk. A kezelést vagy csak a vizsgálandó vegyülettel, vagy a vizsgálandó vegyülettel és ciklosporin A-val végeztük, hetenként ötször, és a kezelést körülbelül 8–10 hétig folytattuk. A kezelést vagy a) az auto-antitestek spontán keletkezése előtt, például a kísérleti állatok körülbelül 5-hónapos korában, vagy b) közvetlenül az auto-antitestek spontán keletkezése után, például az állatok körülbelül 8–9 hónapos korában kezdtük meg. Az anti-DNS és anti-eritrocita antitestek koncentrációját szabályszerű időközökben mértük a kezelési időszak során az ELISA-módszerrel, és a terápia kezdete előtt körülbelül egy hétig. Vizsgáltuk ezenkívül a fehérjevizelést (amelyet hetenként egyszer mértünk) és az állatok élettartamát. Az a) és b) szerinti kezelésekkel kapott eredmények azt mutatták, hogy a vizsgált vegyületek megelőző, illetve terápiás hatással rendelkeznek.

Ha a vizsgálandó vegyületet önmagában, vagy a vizsgálandó vegyületet ciklosporin A-val együtt a fenti dózisokban adagoltuk, megfigyelhettük, hogy az auto-antitestek koncentrációja lényegesen csökkent, a fehérjevizelés lényegesen ritkábban fordult elő, és az ál-

latok átlagos életkora növekedett. Ez mind a megelőző, mind a terápiás kezelés alkalmával megfigyelhető volt, ha az eredményeket a kontrollcsoporttal hasonlítottuk össze, amely csak blacebót, vagy blacebót és azonos mennyiségű ciklosporin A-t kapott.

5. *Tüdőfibrózisra kifejtett hatás*

E vizsgálatunkat G. J. Laurent és munkatársai általános módszerével [Eur. J. Clin. Invest. *11*, 441 (1981)] végeztük. Négy fehér, újzélandi nyúlból álló csoportokon (amelyekben az állatok átlagos életkora a kísérlet kezdetén 127 nap és testtömegük 2,0–2,5 kg volt) tüdőfibrózist idéztünk elő úgy, hogy az állatokba légcsövükön keresztül 10 mg/kg adagban bleomicint csepegtettünk be. A kísérleti állatok tüdejét 2, 4 és 8 hét múlva vizsgáltuk. Ha a vizsgálandó vegyületet, azaz a találmány szerinti eljárásban alkalmazható valamilyen vegyületet – például a lényegében tiszta Z-izomer alakú D2 vagy H1 jelű vegyületet – orálisan, naponta körülbelül 2,5–60 mg/kg dózisban adagoltuk, akkor megfigyelhető volt a tüdőfibrózis jelentős csökkenése a kontrollcsoportokkal összehasonlítva, amelyeket csak blacebóval kezeltünk.

6. *Klinikai vizsgálat, I: pikkelysömörre kifejtett hatás*

E vizsgálatunkat olyan felnőtt férfiakon és nőkön végeztük, akik testfelületük 20%-ánál nagyobb részét borító súlyos, krónikus pikkelysömörben szenvedtek, és betegségük állapota az előzőleg alkalmazott terápiás eljárással stabilizálódott vagy súlyosbodott. Kísérletünk kezdete előtt 2 héttel valamennyi szisztémás, helyi vagy besugárzásos terápiát leállítottunk; a vizsgálati időszak alatt csupán 2%-os olívaolajos szalicilsavoldat, kátránytartalmú sampon és/vagy 1%-os hidrokortizonos krém vagy kenőcs alkalmazását engedtük meg ízületi gyulladás vagy más, a pikkelysömört kísérő betegség kezelésére.

Kétheti „kimosási" időszak után a kísérleti egyéneket éjszakán át 8–10 órán át éheztettük, majd a következő laboratóriumi vizsgálatokat végeztük: teljes vérkép, szérum-elektrolitok, vércukorszint (glükóz-tartalom), kalcium-, foszfor-, húgysav-meghatározás; alanin-aminotranszferáz/aszparaginát-aminotranszferáz(laktát-dehidrogenáz (ALT/AST/LDH), a plazma epidermisznövekedési faktora, növekedési hormon és vizelet-EGF meghatározása. A pikkelysömör klinikai súlyosságát a „rule of nines" skálával értékeltük; a sömör vöröses színét, vastagságát és pikkelyességét 0-tól 4-ig terjedő skálával pontoztuk [Arch. Dermatol. *119*, 548 (1983)]. A sérülések közül egyeseket kiválasztottunk, ezekről klinikai fényképfelvételeket készítettünk. 1%-os lidokain (infiltrációs) érzéstelenítés alkalmazása mellett 6 mm mélységig terjedő bőrbiopsziát végeztünk.

A klinikai vizsgálat során a betegeknek a találmány szerinti eljárásban alkalmazható valamilyen vegyületet – például a lényegében tiszta Z-alakú D2 vagy H1 jelű vegyületet – naponta orálisan, körülbelül 400 mg-tól körülbelül 1200 mg-ig terjedő mennyiségben adagoltunk egyszerre vagy négy részletben.

A kísérleti időszak alatt semmiféle más terápiát nem végeztünk, kivéve az előző „kimosási" időszakban alkalmazott kezelést. A vizsgálat kezdetén végzett valamennyi meghatározást (vérvizsgálat, vizeletvizsgálat, a pikkelysömör klinikai súlyosságának kiértékelése, klinikai fényképfelvételek, bőr-biopszia) megismételtük a vizsgálat 7., 14., 21. és 28. napján.

A vizsgálatban részt vevő, a találmány szerinti eljárásban alkalmazható vegyülettel kezelt egyének pikkelysömörös állapota kifejezetten javult: ezt mutatta a pikkelysömör klinikai súlyosságának mind erősebb csökkenése, különösen a pikkelysömörös bőrsérülések mértékében, valamint a bőrsérüléses állapotok pontszámának jelentős csökkenése. A bőrből vett minták biopsziás vizsgálata azt mutatta, hogy a bőrsérülések állapota szövettani szempontból jelentősen megváltozott: a mitózis-index csökkent, valamint enyhült a gyulladásos beszűrődés, és a bőr erezete jelentős mértékben javult.

A találmány szerinti eljárásban alkalmazott vegyületek hatását keresztezett kettős-vak kísérletben is igazoltuk. Ennek során két betegcsoportot alkalmaztunk: az egyik csoportnak a találmány szerinti eljárásban alkalmazható valamilyen vegyületet adagoltunk a fentebb meghatározott dózisban, a másik betegcsoportnak csak blacebót adtunk, és a két csoportban a bőrsérülések súlyosságát hasonlítottuk össze.

7. *Klinikai vizsgálat, II: Alzheimer-betegségre (AD/SDAT) kifejtett hatás*

E vizsgálatunkat 6–10 nő- és férfibetegből álló csoportokon végeztük; e betegek enyhe-mérsékelt AD/SDAT típusú elmegyengeségben szenvedtek (a betegeknek ezt az állapotát a „Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders" (3. kiadás) (rövidítve: DSM-III) kézikönyvben meghatározott paraméterek alapján állapítottuk meg. A vizsgálatból kizártuk azokat az egyéneket, akik valamilyen súlyos szív-érrendszeri betegségben, alacsony vérnyomásban (szisztolés vérnyomás 120-nál alacsonyabb) vagy súlyos endokrin megbetegedésben, súlyos májbetegségben, veseelégtelenségben szenvedtek, és/vagy a kedvezőtlen felszívódás kóros tüneteit mutatták.

Vizsgálatunkat EEG és pszichometriás teszt felvételével kezdtük, és ezt tekintettük a kísérlet 0 időpontjának. Ezt követően a betegek blacebót kaptak, vagy az alábbiakban leírt kezelésben részesültek. Az EEG és a pszichometriás teszt felvételét az adagolás után 60, 120 és 180 perccel megismételtük.

Az alábbi pszichometriás teszteket végeztük:

i) Szelektív emlékezési próba [Buschke: „Selective Reminding for Analysis of Memory and Learning", J. Verbal Learning and Verbal Behaviour *12*, 543 (1973)];

ii) a konstrukciós készség mérése [Muratomo és munkatársai: „Effect of Physostigmin on Constructional and Memory Tasks in Alzheimer's Disease", Arch. Neurol. *36*, 501 (1973)]; és

iii) geometriai ábrákra való emlékezés (Benton-féle vizuális emlékezési próba).

A vizsgálat során a betegeknek placebót vagy a találmány szerinti eljárásban alkalmazható valamilyen vegyületet – például a lényegében tiszta Z-izomer alakjában lévő D2 vagy H1 jelű vegyületet – körülbelül 450 mg-tól körülbelül 1200 mg-ig terjedő mennyiségben orálisan adagoltuk egyszerre vagy két–három részletben.

Mértük továbbá a következő paramétereket:

Hematológiai értékek:

a vörösvérsejtek száma, hemoglobin, hematokrit, fehérvérsejtszám, minőségi vérkép, vérsüllyedés, vérglükóz-koncentráció (vércukorszint);

Vizeleti paraméterek: albumin, glükóz;

Szérum-értékek: alkalikus foszfatáz, ALT, AST, S-GT, S-bilirubin, S-T4, S-T3, S-TSH és kreatinin.

A találmány szerinti eljárásban alkalmazható vegyületek fentiekben meghatározott adagjával kezelt egyének állapota az EEG eredményei és a pszichometriás tesztek eredményei alapján a blacebóval kezelt egyénekkel összehasonlítva kifejezett javulást mutatott.

8. *Klinikai vizsgálat, III: a kalcium-felszívódásra kifejtett hatás a foggyökérhártya-megbetegedés befolyásolása alapján*

E vizsgálatunkat foggyökérhártya-megbetegedésben szenvedő, önkéntes nőkön és férfiakon végeztük. A találmány szerinti eljárásban alkalmazható vegyületet – például a lényegében tiszta Z-izomer alakú D2 vagy H1 jelű vegyületet – körülbelül 400 mg-tól 1200 mg-ig terjedő mennyiségben naponta, orálisan adagoltuk, egyszerre vagy napi négy részletben, vagy úgy, hogy e mennyiséget a fogínymegbetegedés helyére fecskendeztük körülbelül 0,5 mg-tól vagy 1,0 mg-tól körülbelül 5,0 mg-ig terjedő dózisban. A betegeket szabályszerű időközökben, hetenként vagy hetenként kétszer vizsgáltuk. Azt találtuk, hogy a kezelt betegek állapota körülbelül 2–3 héten át végzett folyamatos kezelés után határozott javulást mutatott.

9. *Klinikai vizsgálat, IV: degeneratív ízületi megbetegedésre kifejtett hatás*

E vizsgálatunkat olyan önkéntes nő- és férfibetegeken végeztük, akik pikkelysömörös ízületi gyulladásban, szeronegatív csigolyaízületi gyulladásban vagy csontízületi gyulladásban szenvedtek. A találmány szerinti eljárásban alkalmazható vegyületet – például a lényegében tiszta Z-izomer alakú D2 vagy H1 jelű vegyületet – orálisan, naponta körülbelül 200–1200 mg mennyiségben egyszerre vagy napi négy részletben 8 héten át adagoltuk. A betegeket szabályszerű időközökben, kéthetenként vizsgáltuk; ekkor betegségük előrehaladását az ízületi fájdalmak erőssége alapján, a Steinbrocker-módszer szerint az ízület működőképességének kiértékelésével, a kézfogás erősségével vagy a Richtie-féle index segítségével értékeltük. Azt találtuk, hogy a kezelt egyének állapota 8-hetes kezelés után javult.

Hasonló eredményeket értünk el a fentiekben leírt, más betegségekre és kóros állapotokra kifejtett hatás (például az izomfehérje lebomlása, beteges aluszékonyság stb.) vonatkozásában a találmány szerinti eljárásban alkalmazható vegyületekkel, különösen a lényegében tiszta Z-izomer alakú D2 vagy H1 jelű vegyület alkalmazásával, a fentiekben meghatározott vagy azokkal egyenértékű mennyiségek adagolása útján.

A találmány szerinti eljárásban alkalmazható vegyületek napi adagja természetesen számos tényezőtől – például a találmány szerinti eljárásban alkalmazott, adott vegyülettől, a kezelendő kóros állapottól és a kívánt hatástól – függ. Általában kielégítő eredményeket érhetünk el, ha a találmány szerinti eljárásban alkalmazható vegyületet orálisan körülbelül 100 mg-tól körülbelül 2,0 g-ig, előnyösen körülbelül 350 mg-tól 2,0 g-ig, például körülbelül 1,5 g-ig terjedő mennyiségben naponta egyetlen adagban vagy 2–4 részletben vagy késleltetett felszabadulást biztosító formában adagoljuk. Ennek alapján az orális adagolásra alkalmas dózisegység a hatóanyagot körülbelül 25 mg-tól körülbelül 1,0 g-ig terjedő mennyiségben, egy vagy több gyógyászati szempontból elfogadható hígítószerrel vagy vivőanyaggal összekeverve tartalmazza.

Ha a találmány szerinti eljárásban alkalmazható vegyületet más immungátló hatóanyaggal vagy annak adjuvánsaként adagoljuk – például a fentiekben említett betegségek vagy kóros állapotok kezelése céljából –, akkor az együttesen adagolt immungátló hatóanyag adagja természetesen függ az alkalmazott immungátló típusától – amely például lehet valamilyen szteroid vagy ciklosporin –, az alkalmazott specifikus hatóanyagtól, a kezelendő kóros állapottól és a kívánt terápiás eredménytől. Általában kielégítő eredményeket érhetünk el, ha az együttesen alkalmazott immungátló hatóanyagot olyan adagokban alkalmazzuk, amely nagyságrendileg 80%-a, például 50%-a annak az adagnak, amelyben az együttesen adagolt immungátlót monoterápia során alkalmazzuk. Ha tehát együttesen adagolt immungátló szerként ciklosporint alkalmazunk, akkor kielégítő eredményeket érünk el, ha a ciklosporint naponta körülbelül 1–25 mg/kg mennyiségben (például a ciklosporin A esetében naponta körülbelül 5–15 mg/kg mennyiségben) orálisan adagoljuk a beteg számára, egyszerre vagy napi 2–3 részletben. Amennyiben a ciklosporin intravénás adagolása – így infuziós alkalmazása (például a kezelés kezdetén) – kívánatos, akkor alacsonyabb adagot alkalmazunk, például naponta körülbelül 0,5–5,0 mg/kg (például a ciklosporin A esetében naponta körülbelül 1–3 mg/kg) mennyiséget adagolunk kezdő dózisként, illetve naponta körülbelül 2 mg/kg fenntartó dózist adagolunk.

A találmány szerinti eljárás megvalósításával lehetővé válik továbbá:

7. Módszer valamilyen immungátló hatóanyag – például immungátló szteroid vagy immungátló ciklosporin, így a ciklosporin A – azon adagjának csökkentésére, amely immungátló terápiában részt vevő beteg hatásos kezeléséhez – például a fentiekben felsorolt, immungátló terápiával kezelhető betegség vagy kóros állapot kezeléséhez – szükséges; e mód-

10

szer abban áll, hogy a találmány szerinti eljárásban alkalmazható valamely vegyületet a fentiekben meghatározott dózisban az immungátló szerrel együttesen adagolunk; továbbá:

8. Módszer immungátlás előidézésére – például a fentiekben felsorolt specifikus autoimmun megbetegedések kezelésére – egy ilyen kezelésre szoruló egyénen; e módszer abban áll, hogy ennek az egyénnek a számára a) a találmány szerinti eljárásban alkalmazható valamely vegyület hatásos mennyiségét és b) egy második hatóanyag hatásos mennyiségét adagoljuk, ahol a második hatóanyag egy immungátló szer, például immungátló szteroid vagy immungátló ciklosporin, például ciklosporin A.

A találmány szerinti eljárással úgy állítunk elő készítményeket, hogy egy találmány szerinti eljárásban alkalmazható vegyületet gyógyászati szempontból elfogadható hígítószerekkel vagy vivőanyagokkal bensőleg összekeverünk, és az így kapott keveréket olyan gyógyászati készítménnyé alakítjuk, amely a kényelmes adagolást lehetővé teszi.

A találmány szerinti eljárást az alábbi nem korlátozó jellegű példában részletesen ismertetjük.

Példa

Orális adagolásra alkalmazható szilárd készítmények előállítása

Tablettákban vagy kapszulákban a hatóanyagot a gyógyszerkészítésben szokásos, gyógyászati szempontból elfogadható vivőanyagokkal: például közömbös hígítószerekkel, így kalcium-karbonáttal, nátrium-karbonáttal, laktózzal vagy talkummal; granuláló és a szétesést elősegítő szerekkel, például keményítővel vagy algin-savval; valamint ízesítő-, színező- és édesítőszerekkel, kötőanyagokkal, például keményítővel, zselatinnal vagy akácmézgával; és csúsztatóanyagokkal, például magnézium-sztearáttal, sztearinsavval vagy talkummal összekeverve alkalmazhatjuk.

Az alábbi példában kapszulák előállítását mutatjuk be:

Komponensek	*mg*
Hatóanyag, például a lényegében tiszta Z-izomer alakú D2 vagy H1 jelű vegyület	200,00
Laktóz (200 mesh finomságú)	109,75
Kukoricakeményítő	35,00
Szilícium-dioxid (Aerosil 200)	1,75
Magnézium-sztearát	3,50
Összesen:	350,00

A komponenseket a szokásos galenuszi módszerrel bensőleg összekeverjük, majd keményzselatin kapszulába töltjük, és a kapszulákat lezárjuk. Az üres kapszula tömege 97,0 mg, a megtöltött kapszula tömege 477,0 mg.

A találmány szerinti eljárásban alkalmazható vegyületek a fentiekben felsorolt kezelésekhez szükséges adagokban jól tűrhetők.

Megállapítottuk, hogy a lényegében tiszta Z-izomer alakú D2 jelű vegyület LD_{50}-értéke 14 napig tartó orális adagolás után, illetve 7 napig tartó intravénás adagolás során a következő: egereken orálisan 1623 mg/kg, intravénásan 163 mg/kg; patkányokon orálisan 1721 mg/kg, intravénásan 51 mg/kg.

Azt találtuk továbbá, hogy ugyanezt a vegyületet vadásztacskók általában jól tűrik, ha 26 héten át naponta 200 mg/kg mennyiségben adagoljuk.

A lényegében tiszta Z-izomer alakú H1 jelű vegyület esetében krónikus toxikológiai vizsgálatokat végeztünk, és nem figyeltünk meg kóros hatásokat, ha a vegyületet zselatinkapszulákban 150, illetve 200 mg/kg mennyiségben orálisan több, mint 5 héten át, vagy olívaolajban a 6–8. héttől kezdődően adagoltuk.

A találmány szerinti eljárásban alkalmazható, gyógyászati szempontból elfogadható sók aktivitása és elviselhetősége ugyanolyan, mint a szabad savaké, vagy azokéhoz hasonló.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás hatóanyagként (Ib) általános képletű vegyületeket – ahol

R_3 jelentése 1–4 szénatomos alkilcsoport és

R_4 jelentése hidrogénatom vagy halogénatom –

vagy azok 1–4 szénatomos alkilészterét vagy gyógyászati szempontból elfogadható valamely sóját tartalmazó gyógyászati készítmények előállítására, *azzal jellemezve*, hogy az ismert módon előállított (Ib) általános képletű vegyületet a gyógyszerkészítésben szokásos hígító-, vivő- és egyéb segédanyagokkal összekeverve immungátló, monokin-, különösen interleukin-1-gátló hatású gyógyászati készítménnyé alakítjuk. (Elsőbbsége: 1987. 10. 26.)

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az (Ib) általános képletű vegyületet – ahol R_3 és R_4 jelentése az 1. igénypont szerinti – a gyógyszerkészítésben szokásos hígító-, vivő- és segédanyagokkal összekeverve immungátló hatású, vagy külső vagy belső sérülések, fibrózis vagy kóros fibrotikus állapotok kezelésére alkalmas gyógyászati készítménnyé alakítjuk. (Elsőbbsége: 1988. 10. 12.)

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az (Ib) képletű vegyületet – ahol R_3 és R_4 jelentése az 1. igénypont szerinti – a gyógyszerkészítésben szokásos hígító-, vivő- és egyéb segédanyagokkal összekeverve daganatok támadásának vagy daganat növekedésével kapcsolatos tüneteknek a kezelésére vagy Kreutzfeld-Jacob betegség, Alzheimer-betegség, kóros aluszékonyság, köszvény, endotoxin előidézte sokk és felhámhólyagkiütés (epidermolysis bullosa) kezelésére alkalmas gyógyászati készítménnyé alakítjuk. (Elsőbbsége: 1988. 10. 12.)

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az (Ib) képletű vegyületet – ahol R_3 és R_4 jelentése az 1. igénypont szerinti – a gyógyszerkészítésben szokásos hígító-, vivő- és egyéb segédanyagok-

kal összekeverve a szöveti kalcium-kiürülést gátló gyógyászati készítménnyé alakítjuk. (Elsőbbsége: 1988. 10. 12.)

5. A 4. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az (Ib) képletű vegyületet – ahol R_3 és R_4 jelentése az 1. igénypont szerinti – a gyógyszerkészítésben szokásos hígító-, vivő- és egyéb segédanyagokkal összekeverve csont- és porcdegenerálódást gátló gyógyászati készítménnyé alakítjuk. (Elsőbbsége: 1987. 10. 26.)

6. A 4. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az (Ib) képletű vegyületet – ahol R_3 és R_4 jelentése az 1. igénypont szerinti – a gyógyszerkészítésben szokásos hígító-, vivő- és egyéb segédanyagokkal összekeverve csont elmésztelenedésének vagy felszívódásának a kezelésére alkalmas gyógyászati készítménnyé alakítjuk. (Elsőbbsége: 1988. 10. 12.)

7. A 4. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az (Ib) képletű vegyületet – ahol R_3 és R_4 jelentése az 1. igénypont szerinti – a gyógyszerkészítésben szokásos hígító-, vivő- és egyéb segédanyagokkal összekeverve fog és foggyökér kalciumhiányának a kezelésére alkalmas gyógyászati készítménnyé alakítjuk. (Elsőbbsége: 1988. 10. 12.)

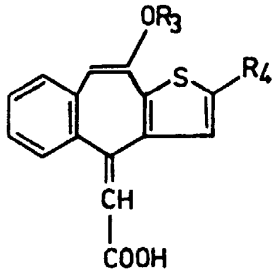
8. A 4. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az (Ib) képletű vegyületet – ahol R_3 és R_4 jelentése az 1. igénypont szerinti – a gyógyszerkészítésben szokásos hígító-, vivő- és egyéb segédanyagokkal összekeverve csontízületeknél vagy csontízületekben reszorpciós folyamatok vagy fibroblaszto beszűrődések kezelésére alkalmas gyógyászati készítménnyé alakítjuk. (Elsőbbsége: 1987. 10. 26.)

9. Az előző igénypontpok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy (Ib) általános képletű vegyületként – ahol R_3 és R_4 az 1. igénypont szerinti –

D) (Z)-[10-metoxi-4H-benzo[4,5]ciklohepta[1,2-b]tiofen-4-ilidén]-ecetsavat,

H) (Z)-[2-klór-10-metoxi-4H-benzo[4,5]ciklohepta[1,2-b]tiofen-4-ilidén]-ecetsavat

vagy e vegyületek gyógyászati szempontból elfogadható sóit alkalmazzuk. (Elsőbbsége: 1988. 10. 12.)



Ib. ábra

Kiadja az Országos Találmányi Hivatal, Budapest
A kiadásért felel: dr. Szvoboda Gabriella osztályvezető
ARCANUM Bt. – BUDAPEST