(19) SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 964537 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS**
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE PUBLIC

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 964537

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
A61K 31/40 (2006.01)
A61K 31/555 (2006.01)
A61K 31/295 (2006.01)
A61K 31/28 (2006.01)

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **09.05.1995**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **12.11.1996**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **10.01.1997**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - Internationell ansökan - International application **09.05.1995 PCT/US1995/005886**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

13.05.1994 US 242498

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • **Monsanto Company,** 800 North Lindberg Boulevard, SAINT LOUIS, MO 63166, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • **Stern, Michael Keith,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
2 • **Salvemini, Daniela,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Menetelmiä peroksinitriitin hajoamiskatalyyttien käyttämiseksi, farmas euttisia koostumuksia sitä varten

Förfaranden för användning av sönderdelningskatalysatorer för peroxini trit, farmaceutiska kompositioner för peroxinitrit, farmaceutiska komp ositioner för detsamma

Menetelmiä peroksinitriitin hajoamiskatalyyttien käyttämiseksi, farmaseuttisia koostumuksia sitä varten

Tekninen ala

Tämä keksintö koskee metallikompleksien käyttömenetelmiä peroksinitriitin hajottamiseksi, niitä sisältäviä farmaseuttisia koostumuksia ja niiden käyttömenetelmiä.

Erityisesti tämä keksintö tuottaa nyt menetelmän valittujen tautien hoitamiseksi, jolloin menetelmä käsittää peroksinitriitin hajottamisen käyttämällä yhdistettä, joka on metallikompleksi. Tämä hajotus tuottaa edullisesti hyödyllisiä aineita estäen haitallisten hajotustuotteiden, kuten happiradikaalien, muodostumisen ja myös estäen superoksididismutaasin (SOD) inaktivoitumisen peroksinitriitin läsnäolon vaikutuksesta. Näin ollen tämän keksinnön valittujen metallikompleksien käyttömenetelmä sekä uudet farmaseuttiset koostumukset tällaista käyttöä varten ovat edullisesti sellaisten tautien hoitoa varten, joihin vaikuttaa edullisesti hoito, joka käsittää peroksinitriitin hajotuksen nopeudella, jota on nopeutettu luonnolliseen hajotuksen perusnopeuteen verrattuna, jolloin menetelmässä potilaalle annetaan hajoamisnopeutta kiihdyttävä tehokas määrä metallikompleksia yksikköannosmuodossa.

Toisin sanoen tämän keksinnön hoitomenetelmät ja uudet koostumukset tuottavat kaksinkertaisen hyödyn tautien hoidossa, nimittäin (1) peroksinitriitin katalyyttisen hajotuksen kiihdytetyn nopeuden ja (2) SOD:n suojaamisen peroksinitriitin aiheuttamaa inaktivoitumista vastaan.

Näin ollen tämä keksintö tekee mahdolliseksi menetelmän ihmisen tautien hoitamiseksi, joihin tällainen hajotus vaikuttaa edullisesti suojaamalla haitallisilta vaikutuksilta, jotka ovat seurausta peroksinitriitin läsnäolosta ihmisen elimistössä, jolloin tällaista menetelmää ei ole tähän mennessä tunnettu. Lisäksi, koska tuotetaan suoja SOD:n inaktivoitumista vastaan, tällainen hajotus

tarjoaa suojan tauteja vastaan, jotka ovat yhteydessä superoksidin liikatuotantoon.

Näihin tauteihin sisältyvät iskeemiset reperfuusiovauriot, kuten aivohalvaus, päävamma ja sydänlihaksen iskemia, verenmyrkytys, krooninen tai äkillinen tulehdus (kuten niveltulehdus ja tulehduksellinen suolitauti ja vastaavat), aikuisen hengitysvaikeusoireyhtymä, syöpä, bronkopulmonaalinen dysplasia, syövän lääkehoidosta johtuvat sivuvaikutukset, sydän-verisuonitaudit, diabetes (lukuun ottamatta vanadiiniporfyriinikompleksihoitoa), multippeliskleroosi, Parkinsonin tauti, suvussa esiintyvä amyotrofinen lateraaliskleroosi ja paksusuolen tulehdus ja spesifiset hermosairaudet, edullisesti iskeeminen reperfuusio, tulehdus, verenmyrkytys, multippeliskleroosi, Parkinsonin tauti ja aivohalvaus.

Tekninen tausta

Typpioksidi (NO) tunnetaan sen kaksinkertaisesta fysiologisesta tehtävästä hyödyllisenä lähettinä ja haitallisena välituotteena. On osoitettu, että typpioksidia muodostuu lukuisissa solutyypeissä, mukaan luettuna makrofagit, neutrofiilit, maksasolut ja endoteelisolut. Katso vastaavasti lähteet Hibbs et al., Science, 235, 473 - 476 (1987); Rimele et al., J. Pharmacol, Exp. Ther., 245, 102 - 111 (1988); Curran et al., J. Exp. Med., 170, 1769 - 1774 (1989); ja Plamer et al., Nature, 327, 524 - 526 (1987). Kemiallista reaktiota, joka vastaa NO:n tuotannosta, katalysoi luokka entsyymejä, joita kutsutaan typpioksidisyntaaseiksi (NOS), jotka muuttavat L-arginiinin sitrulliiniksi ja NO:ksi [Forstermann et al., Biochemical Pharmacology, 42, 1849 - 1857 (1991)]. Vaikka NO:n osuus signaalin tuottavana molekyylinä guanylaattisyklaasin stimulaatiossa on hyvin tunnettua [Monocada et al., Pharmacological Reviews, 43, 109 - 142 (1991)], sen sytotoksisuuden alkuperä on jäänyt epäselväksi.

Äskettäin on ilmestynyt vaikuttavia todisteita, jotka opettavat, että NO itsessään ei ehkä ole vastuussa soluvauriosta [katso Abst. of 1st Annual Mtg. of Oxygen Society, No. 12 - 4, 1993, Charleston, SC, "Nitric Oxide Requires Superoxide to Exert Bactericidal Activity", L. Brunnelli ja J. S. Beckman). Reaktiivisempien lajien sijasta superoksidin ja NO:n reaktion tuottamalla peroksinitriitillä on havaittu olevan osuutta sytotoksisuudessa, joka on havaittu NO:n liikatuotannon yhteydessä. Peroksinitriitin tiedetään hajoavan prosessin kautta, joka koskee ensimmäisenä protoneja. Protonien katalysoiman peroksinitriitin hajoamisen nopeus (jäljempänä "hajoamisen luonnollinen perusnopeus") tiedetään perustuen sitä koskeviin tutkimuksiin erilaisilla pH-alueilla [katso Keith et al., J. Chem. Soc. (A), sivu 90 (1969)]. Kun pH-arvo on 7,4 ja lämpötilaa pidetään 37 °C:ssa, peroksinitriitin havaittu hajoamisnopeus on $3,6 \times 10^{-1}s^{-1}$ [katso Beckman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 87, sivut 1620 - 1624 (1990)]. Beckman osoittaa, että peroksinitriitin hajoaminen tuottaa vahvan hapettimen, jolla on vastaava reaktiivisuus kuin hydroksyyliradikaalilla määritettynä deoksiriboosin tai dimetyylisulfoksidin hapettumisen avulla, mikä viittaa edelleen siihen, että superoksididismutaasi suojaa verisuonikudosta, joka on stimuloitu tuottamaan superoksidia ja NO:a patologisissa tiloissa, estämällä peroksinitriitin muodostumista. Katso Beckman et al., "Apparent Hydroxyl Radical Production by Peroxynitrite: Implications for Endothelial Injury from Nitric Oxide and Superoxide", julkaisussa Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 87, sivut 1629 - 1624, February 1990.

Lisäksi on hyvin tunnettua, että peroksinitriitti hajoaa tuottaen hydroksyyliradikaalin ja typpidioksidin, tehokkaan nitrausaineen. Nämä molemmat lajit ovat tehokkaita hapettimia, joiden on osoitettu reagoivan lipidimembraanin ja sulfhydryyliosuuksien kanssa [katso Radi et

al., "Peroxynitrite Oxidation of Sulfhydryls" julkaisussa The Journal of Biological Chemistry, Vol. 266, No. 7, March 5, sivut 4244 - 4250 (1991)].

Hardy et al. ehdottavat, että O_2-anionin vuorovaikutus typpioksidin kanssa muodostaa peroksinitriitin tai että O_2-anionin protonointi perhydroksyyliradikaalin muodostamiseksi on osallisena HAE-solujen tuhoutumisessa neutrofiilien välittämänä (FASEB Meeting on April 5 - 9, 1992, Anaheim, Kalifornia), ja lisäksi Hardy et al. ehdottavat peroksinitriitin osuutta ihmisen endoteelisolujen hapettavassa vauriossa [tiivistelmä julkaisussa "Experimental Biology" section of FASEB on March 28 - April 1, 1993, New Orleans, LA).

Toisin sanoen monissa viitteissä opetetaan erityisesti peroksinitriitin hajoamisesta peräisin olevia haitallisia tuotteita.

Lisäksi on osoitettu, että peroksinitriitin reaktio Mn- ja Fe-SOD:n kanssa johtaa entsyymin inaktivoitumiseen [katso myös julkaisu Radi et al., Arch. Biochem. Biophys., 288, 481 - 487 (1991)]. Nyt tiedetään, että peroksinitriitti inaktivoi myös CuZn-SOD:n.

Näin ollen peroksinitriitin hajoamisen vaikutukset, jotka johtuvat joko vahingollisten hajotustuotteiden muodostumisesta tai SOD:n inaktivoitumisesta, erilaisissa taudeissa ovat hyvin dokumentoituja.

Esimerkiksi tutkimus, jossa arvioidaan peroksinitriitin vahingollisia vaikutuksia rotan paksusuoleen, on raportoitu lähteessä Rachmilewitz et al., "Peroxynitrite-induced Rat Colitis: A New Model of Colonic Inflammation", Castroenterology 105 (6) (1993).

Beckman et al. patenttijulkaisussa PCT/US91/07 894 (vastaa US-patenttia 5 277 908) opettavat spesifisesti, että peroksinitriitti muodostuu superoksidin (O_2-) ja typpioksidin reaktion tuloksena kudoksissa, jotka ovat joutuneet iskeemisten, tulehduksellisten tai septisten olosuh-

teiden kohteeksi. Beckman et al. yhdistävät SOD:n puuttumisen ja peroksinitriitin amyotrofiseen lateraaliskleroosiin (ALS) julkaisussa Nature, Vol. 364, 12 August 1993, ja Hogg et al. ja Beckman et al. esittävät vastaavasti yhteyttä peroksinitriitin ja ateroskleroosin välillä julkaisussa Biochemical Society Transactions, Vol. 21, otettu vastaan joulukuun 22. päivä, 1002, ja julkaisussa "Extensive Nitration of Protein Tyrosines in Human Atherosclerosis Detected by Immunohistochemistry", Biol. Chem. Hoppe-Seyler, Vol. 375, sivut 81 - 88, February 1994. Lisäksi peroksinitriitin osallisuus erilaisissa tautitiloissa on havaittu tupakanpolttoon liittyvissä keuhkotaudeissa, ateroskleroosissa, amyotrofisessa lateraaliskleroosissa ja kylmän aiheuttamassa aivoturvotuksessa, kuten on selostettu julkaisussa Chem. Res. Toxicol., Vol. 5, No. 3 (1992), sivut 425 - 431. Katso myös julkaisu "Cold-induced Brain Edema in Mice", The Journal of Biological Chemistry, Vol. 268, No. 21, Issue of July 25, sivut 15394 - 15398 (1993).

Myöhemmin Scherch et al. ovat kehittäneet selkärangan hermosolun myrkyllisyysmäärityksen lääkkeiden seulomiseksi, jotka salpaavat peroksinitriitin myrkyllisyyden. [23rd Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Washington, D. D., November 7 - 12 (1993) ja tiivistelmä lähteissä Society for Neuroscience Abstracts 19 (1 - 3) 1993 ja Biosis 94:4951.

Lisäksi estämällä SOD:n inaktivoituminen vähentämällä peroksinitriitin läsnä olevaa määrää tämä keksintö tuottaa myös superoksididismutaasin tunnettujen fysiologisten hyötyjen parannuksen tällaisiin hyötyihin perustuvassa tautien hoidossa. Tässä suhteessa on osoitettu, että SOD ja sen jäljitelmät ovat hyödyllisiä tautien hoidossa superoksidin ja typpioksidin liikatuotannon estämiseksi. Näin ollen tämä keksintö koskee tunnettua tautien hoitoa SOD:lla ja SOD-jäljitelmillä.

Beckmanin et al. PCT-patenttihakemuksessa opetetaan myös, että SOD:t katalysoivat happiradikaalin, superoksidin, dismutaatiota ja tuotetaan viitteet, jotka osoittavat, että SOD:a ja sen muunnelmia on käytetty yleisesti hapetusvaurion estämiseksi tai vähentämiseksi aivohalvauksen ja päävamman, sydänlihaksen iskemian, vatsan verisuonitukkeuman, rakkotulehduksen ja erilaisten tulehdussairauksien hoidossa. Beckmanin et al. PCT-patenttihakemuksessa tiedetään myös peroksinitriitin läsnäolo näissä samoissa tautitiloissa, jotka liittyvät O_2- superoksidiin, osoittamatta muita tämän keksinnön parannuksia.

Lisäksi opetuksia koskien tauteja, joiden tiedetään liittyvän SOD:lla tai sen jäljitelmillä tapahtuvaan hoitoon, löytyy julkaisusta EP-0 524 161 (EP-patenttihakemus 92 870 097), joka liitetään tähän viittauksena.

Porfyriinikompleksit on julkaistu US-patentissa nro 5 284 674 arvokkaina diagnostisina ja hoidollisina aineina, ei-peptidi-phaeoforbidianalogit on julkaisu JP-patentissa Hei 5-331 063 endokeriinireseptoriantagonisteina, karotenoporfyriinit on julkaistu US-patentissa 5 286 474 arvokkaina nisäkkään kasvainkudoksen paikallistamiseksi ja visuaalistamiseksi ja vastaavat typpeä sisältävät makrosyklit ilman kompleksoitunutta metallia on julkaistu sytotoksisina aineina US-patentissa 5 283 255. Ei ole esitetty metallikomplekseja ja niiden hyödyllisyyttä, kuten ne nyt on havaittu tässä keksinnössä.

Derwent Abstract -julkaisun mukaan metallikompleksien on kuitenkin osoitettu olevan hyödyllisiä yhdisteitä välituotteina julkaisussa JP 05 277 377-A ja MRI-aineina US-patentissa 5 284 944; syaanipigmentteinä US-patentiss 5 286 592; valoa johtavina ftalosyaniinikoostumuksina US-patentissa 5 283 146; rekisteröintikerroksena optisessa rekisteröintiväliaineessa US-patentissa 5 284 943 ja eräänlaisina infrapuna-absorbentteina ja esitys/nauhoitusmateriaaleina US-patentin 5 296 1632 tiivistelmässä.

Rautahemoproteiinin on julkaistu olevan tehokas aine typpioksidin sitomiseksi tai hapettamiseksi, jolla on vahingollinen fysiologinen vaikutus, kun se on sytokiinin tai endotoksiinin indusoima, tautien, kuten septisen sokin, hoitamiseksi PCT-patenttihakemuksessa PCT/US93/01 288 (julkaisu WO 93/16 721).

Muita komplekseja ja niiden hyötyjä on julkaistu. Esimerkiksi "ruteeniftalosyaniinit" on julkaistu vesiliukoisina aineina fotodynaamista syövän hoitoa varten lähteessä Platinum Metals Rev., 39 (1), 14 - 18 (1995); valitut metalliorgaaniset kompleksit on julkaistu tulehduksen hoitona US-patentissa 4 866 054; viruksia estävät porfyriini- ja ftalosyaniinikoostumukset on julkaistu HIV-infektion tai HIV:n replikaation estäjinä US-patentissa 5 109 016; mangaani-mesotetra(4-sulfonatofenyyli)porfiini on valmistettu synteettisesti ja sitä on käytetty kasvainselektiivisenä MRI-varjoaineena; julkaisun JP 03 273 082 tiivistelmässä opetetaan peroksidia hajottavat metalliporfyriinit käytettäväksi hapettumisenestoaineina elintarvikkeiden ja muiden tuotteiden valmistuksessa; US-patentissa 4 758 429 opetetaan rauta-tetrafenyyliporfyriinisulfonaattiasetaatti magneettisten tai sähköisten dipolien aktivoimiseksi nivelessä vaihtelevan sähkömagneettisen kentän kanssa niveltulehduksen ja ei-tarttuvien niveltautien hoidossa; julkaisun EP 392 666 tiivistelmässä esitetään myrkytön labiili metalliatomi tai -kompleksi, kuten 1,5,9,13-tetratsasykloheksadekaani käytettäväksi viruksen, kuten HIV:n, hoidossa. Lähteessä CA 119:203240 julkaistaan valitut metalliporfyriinit hypoplyseemisinä aineina ja ne löytyvät FR-patentista 91-6174. Lukuisat muut viitteet osoittavat metallikompleksien vastaavia muita käyttökohteita.

Lopuksi typpeä sisältävät valitut makrosyklit on esitetty JP-patentissa 0 5 331 063 endoteliinireseptoriantagonisteina korkean verenpaineen, äkillisen munuaisen va-

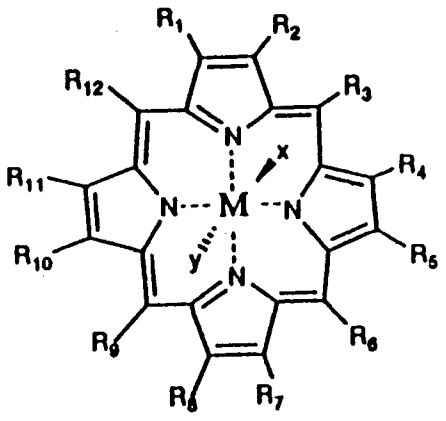
jaatoiminnan, kardiomyopatian ja sydäninfarktin hoitamiseksi ja estämiseksi.

Keksinnön yhteenveto

Tämä keksintö on menetelmä taudin hoitamiseksi, johon vaikuttaa edullisesti peroksinitriitin hajoaminen, jota on nopeutettu eli se on suurempi kuin hajomisen luonnollinen perusnopeus ihmisellä, joka sairastaa tautia, jolloin menetelmässä potilaalle annetaan yhdiste tai yhdiste, joka on metallikompleksi ja jonka avulla peroksinitriitti hajotetaan. Edullisesti peroksinitriitti hajotetaan hyödyllisiksi lajeiksi. Yhdiste on ligandirakenne, joka tuottaa kompleksoidun metallin, kuten jonkin siirtymämetalleista, esimerkkinä Mn, Fe, Ni ja V. Edullisia ligandeja ovat makrosykliset ligandit, kuten porfyriinit, atsamakrosyklit ja vastaavat.

Tämä keksintö on uusi menetelmä taudin hoitamiseksi nisäkkäällä, mukaan luettuna ihminen, jolloin tautiin vaikuttaa edullisesti peroksinitriitin puuttuminen, jolloin menetelmässä potilaalle annetaan hajoamista nopeuttava tehokas määrä yhdistettä, jolla on kaava

Rakenne I



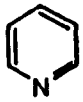
Z

jossa

R_3, R_6, R_9 tai R_{12} on valittu toisistaan riippumatta ryhmästä, joka koostuu H-atomista, alkyylistä, alkenyylis-

tä, CH_2COOH:sta, fenyylistä, pyridinyylistä ja N-alkyylipyridyylistä siten, että fenyyli, pyridinyyli ja N-alkyylipyridyyli ovat


Fenyyli


Pyridyyli


N-alkyylipyridiini

jotka ovat kiinnittyneet hiiliatomiin ja fenyyli on mahdollisesti substituoitu halogeenilla, alkyylillä, aryylillä, bentsyylillä, ryhmillä COOH, $CONH_2$, SO_3H, NO_2, NH_2 tai $N(R)_{3^+}$, jossa R on vety, alkyyli tai alkyyliaryyli;

pyridinyyli on mahdollisesti substituoitu halogeenilla, alkyylillä, aryylillä, bentsyylillä, ryhmillä COOH, $CONH_2$, SO_3H, NO_2, NH_2, $N(R)_{3^+}$ tai NHCOR', jolloin R on kuten edellä on määritelty ja R' on alkyyli; ja

N-alkyylipyridiinirengas on mahdollisesti substituoitu halogeenilla, alkyylillä, aryylillä, bentsyylillä, ryhmillä COOH, $CONH_2$, SO_3H, NO_2, NH_2, $N(R)_{3^+}$ tai NHCOR', jolloin R ja R' ovat kuten edellä on määritelty;

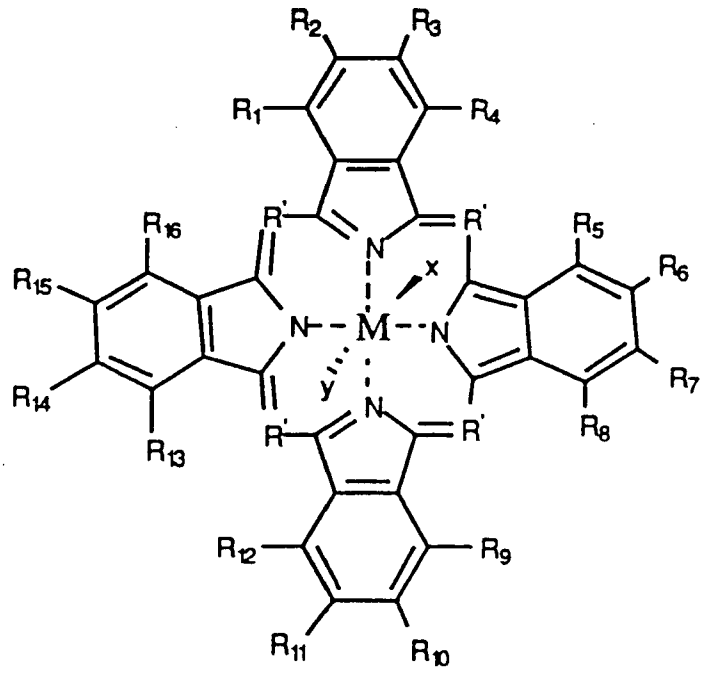
R_1, R_2, R_4, R_5, R_7, R_8, R_{10} tai R_{11} on valittu toisistaan riippumatta ryhmästä, joka koostuu H-atomista, alkyylistä, alkenyylistä, karboksialkyylistä, Cl-atomista, Br-atomista, F-atomista, NO_2-ryhmästä, hydroksialkyylistä ja SO_3H-ryhmästä tai R_1 ja R_2 voivat muodostaa yhdessä renkaan, jossa on 5 - 8 hiiliatomia, edullisesti 6 hiiliatomia;

X ja Y ovat sopivasti ligandeja tai varausta neutraloivia anioneja, jotka ovat peräisin mistä tahansa yksihampaisesta tai monihampaisesta koordinoituvasta ligandista tai ligandijärjestelmästä tai sen vastaavasta anionista (esim. bentsoehaposta tai bentsoaattianionista, fenolista tai fenoksidianionista, alkoholista tai alkoksidianionis-

ta), ja ne on valittu toisistaan riippumatta ryhmästä, joka koostuu halidista, oksosta, akvosta, hydroksosta, alkoholista, fenolista, dihapesta, peroksosta, hydroperoksosta, alkyyliperoksosta, aryyliperoksosta, ammoniakista, alkyyliaminosta, aryyliaminosta, heterosykloalkyyliaminosta, heterosykloaryylista, aminosta, amiinioksideista, hydratsiinista, alkyylihydratsiinista, aryylihydratsiinista, typpioksidista, syanidista, syanaatista, tiosyanaatista, isosyanaatista, isotiosyanaatista, alkyylinitriilistä, aryylinitriilistä, alkyyli-isonitriilistä, aryyli-isonitriilistä, nitraatista, nitriitistä, atsidosta, alkyylisulfonihaposta, aryylisulfonihaposta, alkyylisulfoksidista, aryylisulfoksidista, alkyyliaryylisulfoksidista, alkyylisulfeenihaposta, aryylisulfeenihaposta, alkyylisulfiinihaposta, aryylisulfiinihaposta, alkyylitiolikarboksyylihaposta, aryylitiolikarboksyylihaposta, alkyylitiolitiokarboksyylihaposta, aryylitiolitiokarboksyylihaposta, alkyylikarboksyylihaposta (kuten etikkahaposta, trifluorietikkahaposta, oksaalihaposta), aryylikarboksyylihaposta (kuten bentsoehaposta, ftaalihaposta), ureasta, alkyyliureasta, aryyliureasta, alkyyliaryyliureasta, tioureasta, alkyylitioureasta, aryylitioureasta, alkyyliaryylitioureasta, sulfaatista, sulfiitista, bisulfaatista, bisulfiitista, tiosulfaatista, tiosulfiitista, hydrosulfiitista, alkyylifosfiinista, aryylifosfiinista, alkyylifosfiinioksidista, aryylifosfiinioksidista, alkyyliaryylifosfiinioksidista, alkyylifosfiinisulfidista, aryylifosfiinisulfidista, alkyyliaryylifosfiinisulfidista, alkyylifosfonihaposta, aryylifosfonihaposta, alkyylifosfiinihaposta, aryylifosfiinihaposta, alkyylisfosfoniumhaposta (alkyl phosphinous acid), aryylifosfoniumhaposta, fosfaatista, tiofosfaatista, fosfiitista, pyrofosfiitista, trifosfaatista, vetyfosfaatista, divetyfosfaatista, alkyyliguanidinosta, aryyliguanidinosta, alkyyliaryyliguanidinosta, alkyylikarbamaatista, aryylikarbamaatista, alkyyliaryylikarbamaatis-

ta, alkyylitiokarbamaatista, aryylitiokarbamaatista, alkyyliaryylitiokarbamaatista, alkyyliditiokarbamaatista, aryyliditiokarbamaatista, alkyyliaryyliditiokarbamaatista, bikarbonaatista, karbonaatista, perkloraatista, kloraatista, kloriitista, hypokloriitista, perbromaatista, bromaatista, bromiitista, hypobromiitista, tetrahalomanganaatista, tetrafluoriboraatista, heksafluorifosfaatista, heksafluorianitmonaatista, hypofosfiitista, jodaatista, perjodaatista, metaboraatista, tetra-aryyliboraatista, tetra-alkyyliboraatista, tartraatista, salisylaatista, sukkinaatista, sitraatista, askorbaatista, sakkarinaatista, aminohaposta, hydroksaamihaposta, tiotosylaatista ja ioninvaihtohartsien tai -järjestelmien anioneista; sillä varauksella, että kun X:n ja Y:n sisältävällä kompleksilla on positiivinen nettovaraus, niin Z on läsnä ja on vastaioni, joka on itsenäisesti X tai Y, tai kun X:n ja Y:n sisältävällä kompleksilla on negatiivinen nettovaraus, niin Z on läsnä ja on vastaioni, joka on valittu ryhmästä, joka koostuu alkali- ja maa-alkalimetallikationeista, orgaanisista kationeista, kuten alkyyli- tai alkyyliaryyliammoniumkationeista; ja M on valittu ryhmästä, joka koostuu Mn-, Fe-, Ni- ja V-atomeista;

Rakenne II



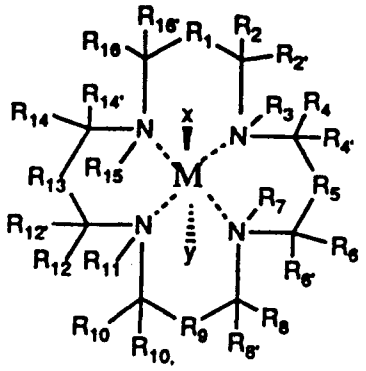
jossa

R' on CH tai N;

R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}, R_{11}, R_{12}, R_{13}, R_{14}, R_{15} ja R_{16} on valittu toisistaan riippumatta ryhmästä, joka koostuu H-atomista, ryhmistä SO_3H, COOH, NO_2, NH_2 ja N-alkyyliaminosta;

X, Y, Z ja M on valittu kuten edellä on määritelty;

Rakenne III



Z

A

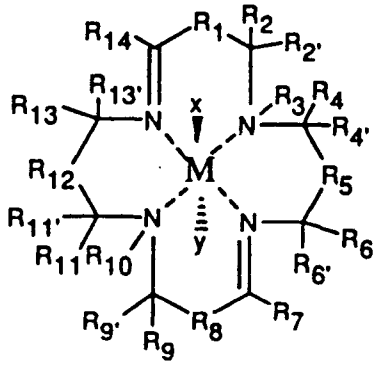
jossa

R_1, R_5, R_9 ja R_{13} ovat toisistaan riippumatta suora sidos tai CH_2;

R_2, R_2', R_4, R_4', R_6, R_6', R_8, R_8', R_{10}, R_{10}', R_{12}, R_{12}', R_{14}, R_{14}', R_{16}, R_{16}' ovat toisistaan riippumatta H tai alkyyli;

R_3, R_7, R_{11}, R_{15} ovat toisistaan riippumatta H tai alkyyli;

X, Y, Z ja M ovat kuten edellä on määritelty;



Z

B

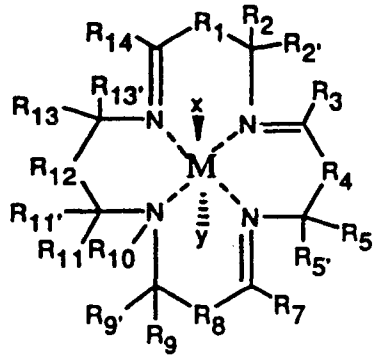
jossa

R_1, R_5, R_8 ja R_{12} ovat toisistaan riippumatta suora sidos tai CH_2;

R_2, R_2', R_4, R_4', R_6, R_6', R_7, R_9, R_9', R_{11}, R_{11}', R_{13}, R_{13}', R_{14} ovat toisistaan riippumatta H tai alkyyli;

R_3 ja R_{10} ovat toisistaan riippumatta H tai alkyyli;

X, Y, Z ja M ovat kuten edellä on määritelty;



C

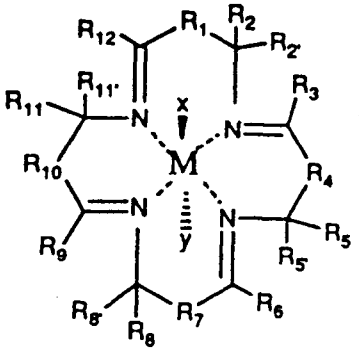
jossa

R_1, R_4, R_8, R_{12} ovat toisistaan riippumatta suora sidos tai CH_2;

R_2, R_2', R_3, R_5, R_5', R_7, R_9, R_9', R_{11}, R_{11}', R_{13}, R_{13}', R_{14} ovat toisistaan riippumatta H tai alkyyli;

R_{10} on H tai alkyyli;

X, Y, Z ja M ovat kuten edellä on määritelty;



D

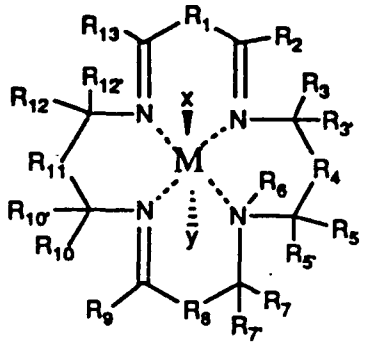
jossa

R_1, R_4, R_7 ja R_{10} ovat toisistaan riippumatta suora sidos tai CH_2;

R_2, R_2', R_3, R_5, R_5', R_6, R_8, R_8', R_9, R_{11}, R_{11}' ja R_{12} ovat toisistaan riippumatta H tai alkyyli;

X, Y, Z ja M ovat kuten edellä on määritelty;

Z



E

jossa

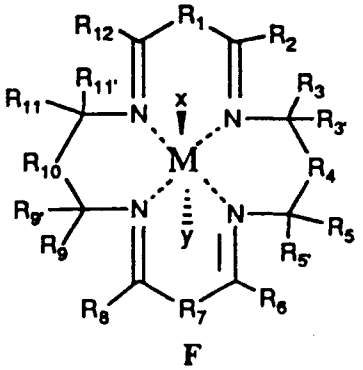
R_1, R_4, R_8 ja R_{11} ovat toisistaan riippumatta suora sidos tai CH_2;

R_2, R_3, R_3', R_5, R_5', R_7, R_7', R_9, R_{10}, R_{10}', R_{12}, R_{12}' ja R_{13} ovat toisistaan riippumatta H tai alkyyli;

R_6 on vety tai alkyyli;

X, Y, Z ja M ovat kuten edellä on määritelty;

Z



F

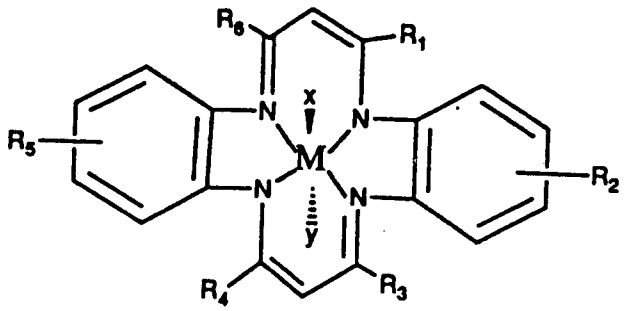
jossa

R_1, R_4, R_7 ja R_{10} ovat toisistaan riippumatta H tai alkyyli;

R_2, R_3, R_3', R_5, R_5', R_6, R_8, R_9, R_9', R_{11}, R_{11}' ja R_{12} ovat toisistaan riippumatta H tai alkyyli;

X, Y, Z ja M ovat kuten edellä on määritely;

Z



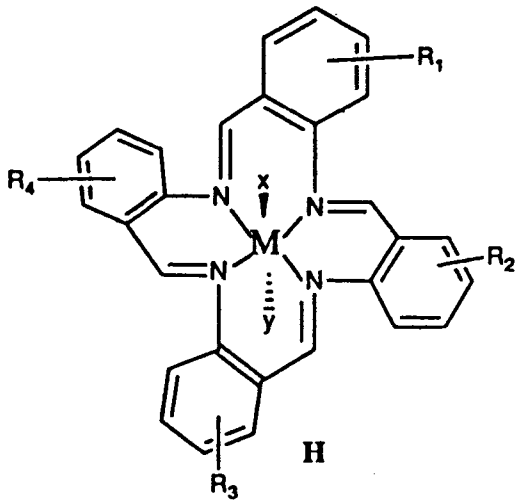
G

jossa

R_1, R_3, R_4 ja R_6 ovat toisistaan riippumatta H tai alkyyli;

R_2 ja R_5 on valittu toisistaan riippumatta ryhmästä, joka koostuu H-atomista, alkyylistä, SO_3H-ryhmästä, NO_2-ryhmästä, NH_2-ryhmästä, halogeenista, COOH-ryhmästä ja $N(R)_{3+}$-ryhmästä, jossa R on kuten edellä on määritelty;

X, Y, Z ja M ovat kuten edellä on määritelty;



H

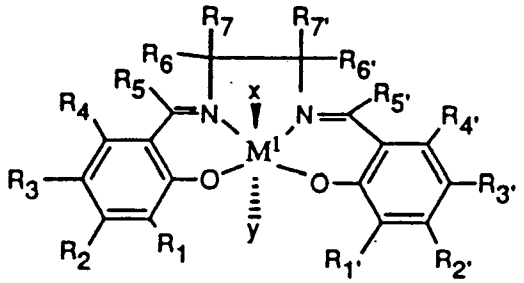
Z

jossa

R_1, R_2, R_3, R_4 on valittu toisistaan riippumatta ryhmästä, joka koostuu H-atomista, alkyylistä, SO_3H-ryhmästä, NO_2-ryhmästä, NH_2-ryhmästä, halogeenista, COOH-ryhmästä ja $N(R)_{3+}$-ryhmästä, jossa R on kuten edellä on määritelty;

X, Y, Z ja M ovat kuten edellä on määritelty;

Rakenne IV

Z 

jossa

R_1, R_1', R_2, R_2', R_3, R_3', R_4, R_4', R_5, R_5', R_6, R_6', R_7 ja R_7' on valittu toisistaan riippumatta ryhmästä, joka koostuu H-atomista, alkyylistä, alkoksista, NO_2-ryhmästä, aryylistä, halogeenista, NH_2-ryhmästä, SO_3H-ryhmästä, ja R_6, R_6', R_7 ja R_7' voivat kukin muodostaa yhdessä toisen R_6-, R_6'-, R_7- ja R_7'-ryhmän kanssa syklisen ryhmän, edullisesti 6 hiiliatomia sisältävän sykloalkyyliryhmän;

M^1 on Fe, Ni tai V;

X, Y ja Z ovat kuten edellä on määritelty,

yhdessä farmaseuttisesti hyväksyttävän kantajan kanssa, edullisesti yksikköannosmuodossa.

Tämä keksintö on myös farmaseuttinen koostumus taudin hoitamiseksi ihmisellä, jolloin tautiin vaikuttaa edullisesti peroksinitriitin nopeutettu hajoaminen sen hajoamisen luonnolliseen perusnopeuteen verrattuna, jolloin mainittu koostumus sisältää ihmisellä peroksinitriitin hajoamisen nopeuttamisen kannalta tehokkaan määrän kaavan I, II, IIIA, IIIB, IIIC, IIID, IIIE, IIIF, IIIG, IIIH mukaista yhdistettä, kuten edellä on määritelty, farmaseuttisesti hyväksyttävän kantajan kanssa yksikköannosmuodossa, edullisesti suun kautta otettavassa yksikköannosmuodossa.

X, Y ja Z ovat kukin farmaseuttisesti hyväksyttävä anioni tai kationi.

Piirustusten kuvaus

Kuvio 1: Graafinen esitys, joka kuvaa havaittua k-arvoa verrattuna katalyyttien konsentraatioon Fe(III)-

TMPS:n ja Fe(III)TPPS:n tapauksessa esittäen metallikompleksien aiheuttaman peroksinitriitin hajoamisen katalyyttistä luonnetta.

Kuvio 2: Graafinen esitys, joka kuvaa peroksinitriitin aiheuttamaa CuZnSOD:n inaktivoitumista.

Kuvio 3: Graafinen esitys, joka kuvaa CuZnSOD:n konsentraatiosta riippuvaista suojausta peroksinitriitin aiheuttamaa inaktivoitumista vastaan käytettäessä peroksinitriitin hajoamista edistävää katalyyttiä Fe(III)TMPyP.

Kuvio 4: Graafinen esitys, joka kuvaa CuZnSOD:n konsentraatiosta riippuvaista suojausta peroksinitriitin aiheuttamaa inaktivoitumista vastaan käytettäessä peroksinitriitin hajoamista edistävää katalyyttiä Fe(III)TMPS.

Kuvio 5: Peroksinitriitin välittämä ihmisen hiussuonen endoteelisolun vaurio. Aitoa peroksinitriittiä pantiin suoraan ^{51}Cr-leimattujen HMDE-solujen pinnalle, joita kasvatettiin 96-kuoppaisilla soluviljelylevyillä. Sitten 45 minuutin kuluttua spesifisen soluvaurion määrä määritettiin ja se saatettiin vastaavuussuhteeseen peroksinitriitin konsentraation kanssa käyttämällä pienimmän neliösumman regressiolinjaa. Arvot edustavat keskiarvoa kolmesta kerranteesta ± SEM.

Kuvio 6: Peroksinitriittikatalyytit, Fe(TMPyP) (kolmio) ja Ni(II)dienoN$_4$)PF$_6$ (ympyrä), lisättiin HDME-soluihin soluvauriomäärityksessä välittömästi ennen aidon peroksinitriitin lisäämistä. Sitten 45 minuutin kuluttua spesifisen soluvaurion määrä määritettiin väliaineeseen vapautuneen radioleiman määrän avulla. Arvot edustavat keskiarvoa kolmesta kerranteesta ± SEM. *p < 0,01 vs. 0 μM:n kontrolli Dunnettin testin mukaan.

Kuvio 7: Ihmisen aortan endoteelisolujen neutrofiilin välittämän vaurion estäminen Fe(TMPyP):n vaikutuksesta. Peroksinitriittikatalyytti, Fe(TMPyP), lisättiin neutrofiileihin soluvauriomäärityksessä välittömästi ennen aktivoimista TNF/C5a:lla. Kahden tunnin kuluttua spesifi-

sen soluvaurion määrä määritettiin väliaineeseen vapautuneen radioleiman määrän avulla. Arvot edustavat keskiarvoa kolmesta kerranteesta ± SEM. *p < 0,01 vs. 0 μM:n kontrolli Dunnettin testin mukaan.

Kuvio 8: RAW-solujen Ni- ja Fe-katalyyttien tuottaman suojan vertaaminen PN:n (peroksinitriitin) välittämää vauriota vastaan. RAW 264.7 -solut saatettiin viljeltäväksi niiden määrän ollessa suunnilleen 2 x 10^5 solua/kuoppa 96-kuoppaisella levyllä. PN:ää (360 mikromolaarista) lisättiin jokaiseen solukuoppaan Ni-katalyytin tai FeTMPyP:n lisääntyvien konsentraatioiden läsnä ollessa, jotka johtivat täydelliseen suojaan PN:n välittämää vauriota vastaan määritettynä solujen kyvyn avulla metaboloida Alamar Blue -sinistä fluoresoivaksi tuotteeksi. Kukin tila edustaa keskiarvoa 4 kuopasta ± sem.

Kuvio 9. Fe-katalyyttien tuottama suoja PN:n välittämää RAW-solujen vauriota vastaan. Soluja käsiteltiin 500 mikromolaarisella PN:llä seuraavien katalyyttien läsnä ollessa tai puuttuessa: FeTMPyP, FeTMPS, FeTPPS. Solujen elinkelpoisuutta seurattiin, kuten tekstissä ja kuvioiden 1, 2 ja 3 teksteissä on selostettu. Arvot edustavat keskiarvoa neljästä määrityksestä ± sem.

Kuvio 10: FeTMPS:n, FeTMPyP:n tai ZnTMPyP:n vaikutukset (annos 30 mg/kg, laskimonsisäisenä bolus-annoksena) annettuna 3 tunnin kuluttua herkistyksestä E. colin lipopolysakkaridilla (LPS, 3 mg/kg, laskimonsisäinen bolusannos) radioleimatun albumiinin vuodon lisääntymiseen (plasman purkautuminen suonen ulkopuolelle, μl/g kudosta) havaittuna yhden tunnin kuluttua (esim. 4 tunnin kuluttua LPS-herkistyksestä) rotan tyhjäsuolessa. Tulokset on esitetty 4 - 8 rotan keskiarvona ± sem.

Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus

Tässä käytettynä termi "alkyyli" yksin tai yhdistelmässä tarkoittaa suoraketjuista tai haaraketjuista alkyyliradikaalia, joka sisältää 1 - noin 22 hiiliatomia,

edullisesti noin 1 - 18 hiiliatomia ja edullisimmin noin 1 - 12 hiiliatomia. Esimerkkeihin tällaisista radikaaleista sisältyvät, rajoittumatta kuitenkaan niihin, metyyli, etyyli, n-propyyli, isopropyyli, n-butyyli, isobutyyli, sek-butyyli, tert-butyyli, pentyyli, isoamyyli, heksyyli, oktyyli, nonyyli, dekyyli, dodekyyli, tetradekyyli, heksadekyyli, oktadekyyli ja eikosyyli. Termi "aryyli" yksin tai yhdistelmässä tarkoittaa fenyyli- tai naftyyliradikaalia, jolla on mahdollisesti yksi tai useampia substituentteja, jotka on valittu alkyylistä, sykloalkyylistä, sykloalkenyylistä, aryylistä, heterosyklistä, alkoksiaryylistä, alkaryylistä, alkoksista, halogeenista, hydroksista, amiinista, syaanista, nitrosta, alkyylitiosta, fenoksista, eetteristä, trifluorimetyylistä ja vastaavista, esimerkkinä fenyyli, p-tolyyli, 4-metoksifenyyli, 4-(tert-butoksi)-fenyyli, 4-fluorifenyyli, 4-kloorifenyyli, 4-hydroksifenyyli, 1-naftyyli, 2-naftyyli ja vastaavat. Termi "aralkyyli" yksin tai yhdistelmässä tarkoittaa alkyyli- tai sykloalkyyliradikaalia, kuten tässä on määritetty, jossa yksi vetyatomi on korvattu aryyliradikaalilla, kuten tässä on määritetty, esimerkkinä bentsyyli, 2-fenyylietyyli ja vastaavat. Termi "heterosyklinen" tarkoittaa rengasrakenteita, jotka sisältävät vähintään yhden muun atomilajin hiilen lisäksi renkaassa. Yleisimpiin muihin atomilajeihin sisältyvät typpi, happi ja rikki. Esimerkkeihin heterosyklisistä ryhmistä sisältyvät, rajoittumatta kuitenkaan niihin, pyrrolidinyyli-, piperidyyli-, imidatsolidinyyli-, tetrahydrofuryyli-, tetrahydrotienyyli-, furyyli-, tienyyli-, pyridyyli-, kinolyyli-, isokinolyyli-, pyridatsinyyli-, pyratsinyyli-, indolyyli-, imidatsolyyli-, oksatsolyyli-, tiatsolyyli-, pyratsolyyli-, pyridinyyli-, bentsoksadiatsolyyli-, bentsotiadiatsolyyli-, triatsolyyli- ja tetratsolyyliryhmät. Termi "sykloalkyyli" yksin tai yhdistelmässä tarkoittaa sykloalkyyliradikaalia, joka sisältää 3 - noin 10, edullisesti 3 - noin 8 ja edullisimmin 3 -

noin 6 hiiliatomia. Esimerkkeihin tällaisista sykloalkyyliradikaaleista sisältyvät, rajoittumatta kuitenkaan niihin, syklopropyyli, syklobutyyli, syklofetyyli, sykloheksyyli, sykloheptyyli, syklo-oktyyli ja perhydronaftyyli. Termi "sykloalkenyyli" yksin tai yhdistelmässä tarkoittaa sykloalkyyliradikaalia, jolla on yksi tai useampia kaksoissidoksia. Esimerkkeihin sykloalkenyyliradikaaleista sisältyvät, rajoittumatta kuitenkaan niihin, syklopentenyyli, sykloheksenyyli, syklo-oktenyyli, syklopentadienyyli, sykloheksadienyyli ja syklo-oktadienyyli.

Tässä keksinnössä käyttökelpoisia makrosyklisiä ligandeja, kun kaava on rakenne I, voidaan valmistaa alalla tunnettujen yleisten synteettisten menetelmien mukaisesti tiettyjen ligandien valmistamiseksi. Katso esimerkiksi:

1) Campestrini, S., Meunier, B., Inorg. Chem., 31, 1999 - 2006 (1992).

2) Robert, A., Loock, B., Momenteau, M., Meunier, B., Inorg. Chem., 30, 706 - 711 (1991).

3) Lindsey, J. S., Wagner, T. W., J. Org. Chem., 54, 828 - 836 (1989).

4) Zipplies, M. F., Lee, W. A., Bruice, T. C., J. Am. Chem. Soc., 108, 4433 - 4445 (1986).

Tässä keksinnössä käyttökelpoisia ligandeja, kun kaava on rakenne II, voidaan valmistaa alalla tunnettujen yleisten synteettisten menetelmien mukaisesti tiettyjen ligandien valmistamiseksi. Katso esimerkiksi:

1) Jotkin yhdisteet ovat kaupallisesti saatavissa yhtiöltä Porphyrin Products, Inc., (Logan, Utah).

2) Y. L. Meltze, Phtalocyanine Technology in Chemical Process Reviews No. 42; Noyes Data Corp, Park Ridge, N. J. (1970).

Tässä keksinnössä käyttökelpoisia ligandeja, kun kaava on rakenne III, voidaan valmistaa alalla tunnettujen yleisten synteettisten menetelmien mukaisesti tiettyjen ligandien valmistamiseksi. Katso esimerkiksi:

1) Goedgen, V. L., Molin-Case, J., Whang, Y-A, J. C. S. Chem. Comm., 337 - 338 (1973).

2) Martin, J. G., Cummings, S. C., Inorg. Chem., 12, 1477 - 1482 (1973).

3) Riley, D. P., Stone, J. A., Busch, D. H., J. Am. Chem. Soc., 98, 1752 - 1762 (1976).

4) Dabrowiak, J. C., Merrell, P. H., Stone, J. A., Busch, D. H., J. Am. Chem. Soc., 95, 6613 - 6622 (1973).

5) Riley, D. P., Busch, D. H., Inorg. Chem., 23, 3235 - 3241 (1984).

6) Watkins, D. D., Riley, D. P., Stone, J. A., Busch, D. H., Inorg. Chem., 15, 387 - 393 (1976).

7) Riley, D. P., Stone, J. A., Busch, D. H., J. Am. Chem. Soc., 99, 767 - 777 (1977).

Tässä keksinnössä käyttökelpoisia ligandeja, kun kaava on rakenne IV, voidaan valmistaa alalla tunnettujen yleisten synteettisten menetelmien mukaisesti tiettyjen ligandien valmistamiseksi. Katso esimerkiksi:

1) Diehl, H., Hoch, C. C., Inorganic Synthesis, Vol. 3, sivu 196, McGraw-Hill, New York (1950).

2) Srinivasan, K., Michaud, P., Kochi, J. K., J. Am. Chem. Soc., 108, 2309 - 2320 (1986).

3) Samsel, E. G., Srinivasan, K., Kochi, J. K., J. Am. Chem. Soc., 107, 7606 - 7617 (1985).

Tämän keksinnön yhdisteillä voi olla yksi tai useampia epäsymmetrisiä hiiliatomeja ja siten ne kykenevät esiintymään optisten isomeerien muodossa sekä niiden raseemisten ja ei-raseemisten seosten muodossa. Optisia isomeereja voidaan saada erottamalla raseemiset seokset tavanomaisten menetelmien mukaisesti esimerkiksi muodostamalla diastereoisomeerisia suoloja käsittelemällä ne optisesti aktiivisella hapolla. Esimerkkejä sopivista hapoista ovat viinihappo, diasetyyliviinihappo, dibentsoyyliviinihappo, ditoluolyyliviinihappo ja kamferisulfonihappo ja sitten diastereoisomeerien seoksen erottaminen tapahtuu

kiteyttämällä ja sen jälkeen vapauttamalla optisesti aktiiviset emäkset näistä suoloista. Toisenlainen menetelmä optisten isomeerien erottamiseksi käsittää kiraalisen kromatografiapylvään käytön, jolloin mainittu pylväs on valittu optimaalisesti enantiomeerien erottamisen maksimoimiseksi. Vielä muu käytettävissä oleva menetelmä käsittää kovalenttisten diastereoisomeerimolekyylien synteesin saattamalla reagoimaan keksinnön yhdisteiden yksi tai useampi sekundaarinen amiiniryhmä optisesti puhtaan hapon kanssa aktivoidussa muodossa tai optisesti puhtaan isosyanaatin kanssa. Syntetisoidut diastereoisomeerit voidaan erottaa tavanomaisin keinoin, kuten käyttämällä kromatografiaa, tislausta, kiteyttämistä tai sublimaatiota ja sitten hydrolysoida enantiomeerisesti puhtaan ligandin vapauttamiseksi. Keksinnön optisesti aktiivisia yhdisteitä voidaan saada samoin käyttämällä optisesti aktiivisia lähtöaineita, kuten luonnon aminohappoja.

Tämän keksinnön metallikompleksien seulomiseksi peroksinitriitin hajoamista edistävän katalyyttisen aktiivisuuden osalta valmistetaan peroksinitriitti ja eristetään se natriumsuolana saattamalla hapan vetyperoksidi reagoimaan natriumnitriitin kanssa ja sen jälkeen pysäyttämällä reaktio nopeasti NaOH:lla, kuten on esitetty lähteessä Halfpenny ja Robinson, J. Chem. Soc., 928 - 938 (1952). Peroksinitriitillä on absorbanssimaksimi aallonpituudella 302 nm ekstinktiokertoimen ollessa 1670 $M^{-1}cm^{-1}$. Näin ollen on mahdollista havaita suoraan peroksinitriitin hajoaminen käyttämällä keskeytetyn virtauksen spektrofotometrianalyysiä seuraamalla absorbanssin hajoamista aallonpituudella 302 nm. Tämä tarkoittaa, että tällainen peroksinitriitin hajoamisen havainnointi hajoamisen tapahtuessa kiihdytetyllä nopeudella luonnolliseen hajoamisnopeuteen verrattuna lisättäessä metallikompleksia identifioi tämän keksinnön yhdisteen.

Lisäksi nyt on havaittu, että peroksinitriitti inaktivoi CuZnSOD-entsyymin konsentraatiosta riippuvaisella tavalla. Koska on tunnettua, että peroksinitriitti inaktivoi myös MnSOD:n [katso "Peroxynitrite-Mediated Tyrosine Nitration Catalyzed by Superoxide Dismutase", Ischiropoulos et al., lähteessä Archives of Biochemistry and Biophysics, Vol. 298, No. 2, November 1, sivut 431 - 437 (1992)], tämä keksintö tuottaa yhdisteen, joka suojaa CuZnSOD:n peroksinitriitin aiheuttamalta inaktivoitumiselta.

Tällä tavalla tämän keksinnön yhdisteen on osoitettu olevan hyödyllinen sellaisen taudin hoitamiseksi ihmisellä, johon vaikuttaa edullisesti SOD-entsyymin läsnäolo.

Tämä tarkoittaa, että tämän keksinnön hoito on tautitilaa varten, jonka on aiheuttanut joko peroksinitriitin läsnäolo tai SOD-entsyymin suojaavan läsnäolon puuttuminen, kuten esimerkiksi sydäninfarktissa, aivohalvauksessa tai autoimmuunitaudissa. Näiden jälkimmäisten tautien on osoitettu olevan yhteydessä myös peroksinitriitin läsnäoloon.

Näiden metallikompleksien on havaittu sisältyvän tähän keksintöön määrittämällä niiden hajotusvaikutus peroksinitriittiin, kuten tässä on esitetty.

Yhdisteiden ja johdannaisten sekä välituotteiden edellä esitettyjen yleisten kaavojen mukaiset mahdolliset ekvivalentit ovat yhdisteitä, jotka vastaavat muuten edellä mainittuja ja joilla on samat yleiset ominaisuudet, kuten esimerkiksi yhdisteiden tautomeerit ja esimerkiksi yhdisteet, joissa yksi tai useammat erilaisista R-ryhmistä ovat määriteltyjen substituenttien yksinkertaisia muunnelmia, esim. substituentteja, jotka ovat korkeampi alkyyliryhmä kuin on osoitettu tai joissa tosyyliryhmät ovat muita typpeä tai happea suojaavia ryhmiä tai joissa O-tosyyli on halidi. Anioneja, joilla on muu varaus kuin 1, esimerkkinä karbonaatti, fosfaatti ja vetyfosfaatti, voidaan

käyttää sellaisten anionien sijasta, joiden varaus on 1, mikäli ne eivät vaikuta haitallisesti kompleksin yleiseen aktiivisuuteen. Kuitenkin sellaisten anionien käyttö, joiden varaus on muu kuin 1, johtaa edellä esitetyn kompleksin yleisen kaavan lievään muunnelmaan. Lisäksi, kun substituentin on tarkoitus olla tai se voi olla vety, sellaisen substituentin tarkka kemiallinen luonne, joka on muu kuin vety tuossa asemassa, esim. hydrokarbyyliradikaali tai halogeeni, hydroksi, amino ja vastaava funktionaalinen ryhmä, ei ole kriittinen, mikäli se ei vaikuta haitallisesti yleiseen aktiivisuuteen ja/tai synteesimenetelmään.

Kemialliset reaktiot, jotka on esitetty edellä esitetyissä viitteissä, on julkaistu yleisesti ottaen huomioon muunnelmat, jotka ovat sopivia niiden laajimmassa sovellutuksessa tämän keksinnön yhdisteiden valmistamiseksi. Toisinaan reaktiot eivät ehkä ole sovellettavissa, kuten ne on kuvattu, jokaiselle yhdisteelle, joka sisältyy julkaistuun suoja-alaan. Alan ammattimiehet tunnistavat vaivatta yhdisteet, joille reaktio ei sovellu. Kaikissa tällaisissa tapauksissa joko reaktiot voidaan toteuttaa menestyksellisesti käyttämällä tavanomaisia muunnelmia, jotka alan ammattimiehet tuntevat, esim. suojaamalla sopivasti häiritsevät ryhmät, vaihtamalla vaihtoehtoisiin tavanomaisiin reagensseihin, muuntamalla rutiininomaisesti reaktiolosuhteita ym. tai tässä julkaistut tai muuten tavanomaiset muut reaktiot ovat käyttökelpoisia tämän keksinnön vastaavien yhdisteiden valmistamiseksi. Kaikissa valmistusmenetelmissä kaikki lähtöaineet ovat tunnettuja tai helposti valmistettavissa tunnetuista lähtöaineista.

Uskotaan, että alan ammattimiehet osaavat vaivatta hyödyntää tätä keksintöä täydessä laajuudessaan käyttäen edellä esitettyä selostusta. Näin ollen seuraavat edulliset spesififiset suoritusmuodot tulee tulkita pelkästään kuvaaviksi eikä jäljellä olevaa julkaisua rajoittaviksi millään tavoin.

Esimerkit

Kaikkia reagensseja käytettiin, kuten ne oli vastaanotettu, ellei toisin mainita. Yhtiöltä Porphyrin Products Inc. (Logan, UT) hankittiin 5,10,15,20-tetrakis(N-metyyli-4-pyridyyli)porfyriinitetratosylaatti ja asetato-5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonatofenyyli)porfyriinirauta-(III). Rauta(III)sitraatti- ja rauta(III)EDTA-kompleksit hankittiin yhtiöltä Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI). Kaikki ydinmagneettiset resonanssispektrit (NMR-spektrit) saatiin Varian VXR-300- tai Varian VXR-400-spektrometreillä. Kvalitatiiviset ja kvantitatiiviset massaspektrit ajettiin Finnigan MAT90-, Finnigan 4500- ja VG40-250T-spektrometreillä.

Esimerkki 1

Asetato(5,10,15,20-tetrakis(N-metyyli-4-pyridyyli)-porfinato)rauta(III)tetratosylaatin, Fe(III)-TMPyP:n, synteesi

5,10,15,20-tetra(N-metyylipyridyyli)porfiinitetratosylaatti, (H_2TMPyP), (0,30 g, 0,231 mmol), pantiin 100 ml:n pyöreäpohjaiseen pulloon, joka oli varustettu magneettisella sekoitussauvalla, ja liuotettiin minimimäärään MeOH:a. Lisättiin vedetöntä $Fe(OAc)_2$:a (0,120 g, 0,692 mmol) ja välittömästi sen jälkeen 25 ml jääetikkaa ja 100 µl trietyyliamiinia. Reaktioseosta kuumennettiin palautusjäähdyttäen. Reaktiota seurattiin näkyvän spektroskopian avulla ja se määritettiin tapahtuneeksi täydellisesti, kun voimakas vyöhyke ilmestyi aallonpituudella 426 osoittaen metalloitunutta porfyriinia. MeOH poistettiin haihduttamalla ja kiinteä aine otettiin jälleen minimimäärään MeOH:a. Seos väkevöitiin tyhjössä ~ 20 ml:n kokonaistilavuuteen, jossa reagoimaton $Fe(OAc)_2$ saostuu. Kiinteä aine erotettiin sentrifugoimalla ja emäliuos kromatografoitiin Sephadex LH-20 -pylväällä (2 x 30 cm) käyttäen MeOH:a eluenttina. Ensimmäinen värjääntynyt vyöhyke kerättiin talteen ja Fe(III)TMPyP(OAc) eristettiin saostamalla

sen jälkeen kun liuotin oli haihdutettu ja jäännös trituroitu eetterin kanssa, jolloin saatiin 85 mg (26 %) haluttua tuotetta, joka vahvistettiin oikeaksi massaspektrianalyysin avulla.

Esimerkki 2

5,10,15,20-tetrakis(3,5-disulfonoitu mesityyli)porfyriinioktanatriumsuolan (H_2TMPS) synteesi

5,10,15,20-tetramesityyliporfyriini (H_2TMP) valmistettiin kondensoimalla pyrroli ja mesitaldehydi tiiviisti suljetuissa lasiputkissa Badgerin menetelmän mukaan [G. M. Badger, R. A. Jones, R. L. Laslett, Aust. J. Chem., 17, 1022 (1964)] tai refluksoivassa kollidiinissa Meunierin menetelmän mukaan (Meunier et al., Nouv. J. Chim., 10, 39 - 49 (1986)]. Kloriiniepäpuhtaudet poistettiin hapettamalla 2,3-dikloori-5,6-disyaani-1,4-bentsokinonilla refluksoivassa bentseenissä ja sen jälkeen kromatografoimalla tuote käyttäen emäksistä aluminaa. Molemmat menetelmät tuottivat lähes samanlaisia H_2TMPS-saantoja.

H_2TMPS:n synteesi toteutettiin käyttäen Meunierin menetelmää (Meunier et al., Inorg. Chem., 31, 1999 - 2006 (1992)] hiukan muunnettuna. H_2TMP (1,0 g, 1,28 mmol) pantiin 25 ml:n pyöreäpohjaiseen pulloon, joka oli varustettu palautusjäähdyttimellä ja sekoitussauvalla. Lisättiin 10 ml savuavaa rikkihappoa (H_2SO_4 + 18 - 23 % SO_3:a) ja reaktioseosta kuumennettiin 80 °C:n lämpötilassa 40 minuutin ajan. Reaktioseos jäähdytettiin ja se lisättiin tipoittain 100 ml:aan vettä, jota jäähdytettiin jäähauteessa. Tulokseksi saatu vesiliuos neutraloitiin 2 N NaOH:lla (~ 220 ml) pH-arvoon 6 - 7. Vesi poistettiin haihduttamalla ja tulokseksi saatu kiinteä jäännös trituroitiin minimimäärän kanssa MeOH:a. Tulokseksi saatu sakka poistettiin suodattamalla ja suodos väkevöitiin vielä 60 ml:n tilavuuteen tyhjössä. Tulokseksi saatu sakka (ylimääräinen Na_2SO_4) erotettiin sentrifugoimalla. Päällysneste haihdutettiin kui-

viin, jolloin saatiin 1,59 g (78 %) haluttua sulfonoitua porfyriinia.

Esimerkki 3

Asetato-5,10,15,20-tetrakis(3,5-disulfonatomesityyli)porfyriinimangaani(III)oktanatriumsuolan [Mn(III)TMPS] synteesi

H_2TMPS (0,2 g, 0,125 mmol) ja $Mn(OAc)_2$ (0,296 g, 1,71 mmol) liuotettiin 38 ml:aan vettä ja saatua liuosta kuumennettiin 85 °C:n lämpötilassa 1 tunnin ajan. Reaktiota seurattiin näkyvän spektroskopian avulla ja sen määritettiin tapahtuneen täydellisesti, kun vapaan porfyriiniemäksen Soret-vyöhyke (416 nm) oli korvattu uudella vyöhykkeellä aallonpituudella 486 nm, mikä on tunnusomaista Mn(III)porfyriinilajeille. Reaktioseos väkevöitiin tyhjössä 10 ml:n tilavuuteen ja se kromatografoitiin Dowex 50WX-8 -kationinvaihtohartsilla (H+-muoto) ylimääräisen $Mn(OAc)_2$:n poistamiseksi. Eluentti väkevöitiin 10 ml:n tilavuuteen ja sen pH-arvo säädettiin arvoon 8,0 1,0 N NaOH:lla. Tulokseksi saatu liuos haihdutettiin kuiviin. Jäännös otettiin 7 ml:aan MeOH:a ja kromatografoitiin Sephadex LH-20 -pylväällä käyttäen MeOH:a eluenttina. Purppuranpunainen vyöhyke kerättiin talteen ja haihdutettiin kuiviin, jolloin saatiin 0,175 g (90 %) haluttua metalloitua porfyriinia määritettynä massaspektrianalyysin avulla.

Esimerkki 4

Asetato-5,10,15,20-tetrakis(3,5-disulfonatomesityyli)porfyriinirauta(III)oktanatriumsuolan [Fe(III)-TMPS) synteesi

H_2TMPS (0,2 g, 0,125 mmol) ja $Fe(OAc)_2$ (0,300 g, 1,72 mmol) liuotettiin 38 ml:aan vettä. Reaktioseos saatettiin refluksoimaan ja sitä seurattiin näkyvän spektroskopian auvlla täydellisen metalloitumisen määrittämiseksi. Kun reaktio oli tapahtunut täydellisesti, reaktioseos suodatettiin ja väkevöitiin 10 ml:n tilavuuteen. Oranssin-

ruskea reaktioseos kuljetettiin Dowex 50WX-8 -kationinvaihtopylvään (H+-muoto) läpi ylimääräisen $Fe(OAc)_2$:n poistamiseksi. Eluentti väkevöitiin 10 ml:n tilavuuteen ja sen pH säädettiin arvoon 7,5 1,0 N NaOH:lla. Tulokseksi saatu liuos haihdutettiin kuiviin. Jäännös otettiin 7 ml:aan MeOH:a ja kromatografoitiin Sephadex LH-20 -pylväällä käyttäen MeOH:a eluenttina. Oranssinruskea vyöhyke haihdutettiin kuiviin, jolloin saatiin 0,170 g (72 %) haluttua Fe-porfyriiniä määritettynä massaspektrianalyysin avulla.

Esimerkki 5

Asetato-5,10,15,20-tetrakis(3,5-disulfonatomesityyli)porfyriininikkeli(II)oktanatriumsuolan [Ni(II)-TMPS] synteesi

H_2TMPS (0,1 g, 0,063 mmol) ja $Ni(OAc)_2$ (0,156 g, 0,63 mmol) liuotettiin 20 ml:aan vettä ja saatua liuosta refluksoitiin 3 tunnin ajan. Reaktioseos oli väriltään oranssi osoittaen Ni-porfyriinia. Reaktion täydellinen tapahtuminen vahvistettiin Vis-spektroskopian avulla. Reaktioseos väkevöitiin 5 ml:n tilavuuteen ja kromatografoitiin Dowex 50 WX-8 -ioninvaihtopylväällä (H+-muoto) ylimääräisen $Ni(OAc)_2$:n poistamiseksi. Eluentti väkevöitiin 5 ml:n tilavuuteen ja sen pH säädettiin arvoon 8,0 1,0 N NaOH:lla. Tulokseksi saatu liuos haihdutettiin kuiviin. Jäännös otettiin 7 ml:aan MeOH:a ja kromatografoitiin Sephadex LH-20 -pylväällä käyttäen MeOH:a eluenttina. Tuote eristettiin poistamalla liuotin, jolloin saatiin 0,090 g (85 %) haluttua metalloitua porfyriinia todettuna massaspektrianalyysin avulla.

Esimerkki 6

N,N'-etyleenibis(3,3'-dimetoksisalisylideeniamiini)ligandin synteesi

Käytettiin Colemanin menetelmän muunnelmaa [Coleman et al., Inorg. Chem., 20, 700 (1981)]. Lisättiin 25 ml absoluuttista EtOH:a ja 3-metoksisalisyylialdehydiä (3,04 g, 0,02 mol) 100 ml:n pyöreäpohjaiseen pulloon, joka oli va-

rustettu sekoitussauvalla. Valmistettiin 20 ml absoluuttisen EtOH:n ja eteenidiamiinin (0,601 g, 0,01 mol) liuosta ja se lisättiin yhtenä annoksena salisyylialdehydiin. Reaktioseosta refluksoitiin 1 tunnin ajan, jona aikana kellanoranssi sakka ilmestyi. Tuote kerättiin talteen suodattamalla, pestiin 100 ml:lla kuumaa etanolia ja kuivattiin tyhjössä, jolloin saatiin 4,4 g (98 %) haluttua tuotetta.

Esimerkki 7

Kloori[N,N'-etyleenibis(3,3'-dimetoksisalisylideeniaminato)rauta(III):n synteesi

N,N'-etyleenibis(3,3'-dimetoksisalisylideeniamiini) (0,05 g, 0,188 mmol) liuotettiin 20 ml:aan MeOH:a ja lisättiin yhtenä annoksena $Fe(Cl)_3$ (0,030 g, 0,188 mmol). Liuosta refluksoitiin 1 tunnin ajan, jonka jälkeen liuotin poistettiin tyhjössä. Purppuranpunainen jäännös pestiin minimimäärällä vettä. Kiinteä aine otettiin 10 ml:aan MeOH:a, suodatettiin ja eristettiin uudelleen poistamalla liuotin, jolloin saatiin 0,047 g (70 %) haluttua rautakompleksia.

Esimerkki 8

12,14-dimetyyli-1,4,8,11-tetra-atsasyklotetradeka-11,13-dienatonikkeli(II)heksafluorifosfaatin, Ni(II)([14]dienoN$_4$)PF$_6$:n, synteesi

Ni(II)([14]dienoN$_4$)PF$_6$ valmistettiin käyttämällä Martinin ja Cummingsin menetelmää [Martin, J. G., Cummings, S. C., Inorg. Chem., 12, 1477 - 1482 (1973)]. Yhdiste karakterisoitiin massaspektrianalyysin avulla ja sen osoitettiin olevan yhdenmukainen toivotun rakenteen kanssa.

Esimerkki 9

12,14-dimetyyli-1,4,8,11-tetra-atsasyklotetradeka-11,14-dieeninikkeli(II)heksafluorifosfaatin, Ni(II)([14]dieeniN$_4$)(PF$_6$)$_2$:n, synteesi

Ni(II)([14]dieeniN$_4$)(PF$_6$)$_2$ valmistettiin Ni(II)([14]dienoN$_4$)PF$_6$:sta käyttämällä Martinin ja Cummingsin

menetelmää [Martin, J. G., Cummings, S. C., Inorg. Chem., 12, 1477 - 1482 (1973)].

Esimerkki 10

6,8,15,17-tetrametyylidibentso[b,i][1,4,8,11]tetra-atsatetradeka-2,4,7,9,12,14-heksaenatonikkeli-(II):n, Ni(II)[14]12eeniN$_4$:n, synteesi

Ni(II)[14]12eeniN$_4$ valmistettiin käyttämällä Goendgenin et al. menetelmää [Goendgen et al., J. C. S. Chem. Comm., 337 - 338 (1973)]. Kompleksi karakterisoitiin massaspektrianalyysin avulla ja se oli yhdenmukainen halutun rakenteen kanssa.

Esimerkki 11

Tämä esimerkki kuvaa näissä tutkimuksissa käytettyjen peroksinitriitin varastoliuosten valmistusta. Käytettiin Hughsin kuvaaman menetelmän muunnettua versiota [Hughs, M. M., Nicklin, H. G., J. Chem. Soc., (A), 450 - 452 (1968)].

Lisättiin 10 ml:aan voimakkaasti sekoitettavaa 0,6 M $NaNO_2$:n liuosta, jota pidettiin 0 °C:n lämpötilassa, yhtä suuri tilavuus HCl/H_2O_2-liuosta (0,6 M HCl ja 0,7 M H_2O_2) ja sen jälkeen välittömästi ja nopeasti 10 ml 0,75 M NaOH:a. Tulokseksi saatua keltaista liuosta käsiteltiin 25 mg:lla MnO_2:a 3 minuutin ajan ja sitten se suodatettiin välittömästi. Suodos pantiin -20 °C:n lämpötilaan pakastimeen useiksi päiviksi, mikä johti natriumperoksinitriitin fraktioitumiseen, mikä havaittiin hienona keltaisena vyöhykkeenä pullon pinnalla. Keltainen vyöhyke kerättiin talteen, jolloin saatiin ~ 1 ml 280 mM natriumperoksinitriittiliuosta. Tätä liuosta voitiin sekoittaa pakastettuna -20 °C:n lämpötilassa useiden päivien ajan peroksinitriitin hajoamisen ollessa minimaalista.

Esimerkki 12

Tämä esimerkki kuvaa menetelmiä, joita käytettiin tarkoituksena määrittää, olivatko yhdisteet peroksinitrii-

tin hajotuskatalyyttejä, käyttämällä kineettistä keskeytetyn virtauksen analyysiä.

Kaikki analyysit toteutettiin käyttäen kaliumfosfaattipuskureita (Calbiochem), jotka olivat biologista laatua, käyttäen ultrapuhdasta vettä, joka oli valmistettu Rileyn menetelmän mukaan [Riley, D. P. et al., Anal. Biochem., 196, 344 - 349 (1991)]. Kineettiset mittaukset suoritettiin OLIS Rapid Scanning Stopped-Flow Spectrometer -spektrometrillä (On-Line Instrument Systems Inc., Bogart, Georgia) käyttäen OLIS-RSM-1000-käyttöjärjestelmää tietojen hankkimiseksi ja manipuloimiseksi. Peroksinitriitillä on voimakas absorbanssi aallonpituudella 302 nm (ekstinktiokerroin = 1 670 $M^{-1}cm^{-1}$) ja sen on osoitettu hajoavan prosessissa, joka tapahtuu ensiksi (first-order) natriumperoksinitriitissä ja protoneissa [Hughs, M. N.; Nicklin, H.G., J. Chem. Soc., (A), 450 - 452 (1968)], jolloin $t_{½}$ = 1,9 s 37 °C:ssa, pH = 7,4 [Beckman, J. S., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 87, 1620 - 1624 (1990)].

Näin ollen tyypillisessä kokeessa natriumperoksinitriitin luonnollisen hajoamisen perusnopeus määritettiin seuraavasti. Otetaan 24 mM natriumperoksinitriitin varastoliuosta 50 mM NaOH:ssa pienitilavuuksiseen ruiskuun ja 100 mM kaliumfosfaattia, pH-arvo 7,4, varataan suuritilavuuksiseen ruiskuun keskeytetyn virtauksen spektrofotometrissä. Kaikki keskeytetyn virtauksen mittaukset suoritettiin 22 °C ± 1 °C:n lämpötilassa. Liuosten ruiskuttaminen samaan osastoon johtaa natriumperoksinitriitin varastoliuoksen ~ 25-kertaiseen laimennukseen. Natriumperoksinitriitin hajoaminen tapahtuu ensin peroksinitriitissä, jolloin $t_{½}$ = 5,2 s ja $k_{havaittu}$ = 1,39 x 10^{-1} ± 0,15 s^{-1}. Peroksinitriitin hajoamista edistävän katalyyttisen aktiivisuuden testaamiseksi metallikompleksi liuotettiin 100 mM kaliumfosfaattipuskuriin, pH-arvo 7,4, ja pantiin suureen ruiskuun ja peroksinitriitin hajoamista seurattiin, kuten edellä on kuvattu. Testattavien kompleksien katalyyttinen

nopeusvakio ($k_{cat}M^{-1}s^{-1}$) määritettiin vaihtelemalla kompleksin konsentraatiota ja piirtämällä käyrä $k_{havaittu}$ vs. [kompleksi], taulukko 1. $k_{havaittu}$-arvot saatiin kunkin katalyytin konsentraation kolmen keskeytetyn virtauksen analyysin keskiarvosta. Kuviossa 1 on esitetty tämän analyysin edustavat tiedot erilaisten yhdisteiden osalta. Mn:n, Fe:n, Co:n, Cu:n ja Ni:n yksinkertaiset kaksi- ja kolmearvoiset kloridisuolat eivät osoittaneet lainkaan peroksinitriitin katalyyttistä hajotusaktiivisuutta konsentraatiolla 0,050 mM ja sitä pienemmillä konsentraatioilla.

Taulukko 1

Metallikompleksien katalyyttiset nopeusvakiot natriumperoksinitriitin hajottamiseksi, kun pH-arvo on 7,4 ja lämpötila 22 °C

Esim. nro	Kompleksi	k_{cat} (M^{-1} sec^{-1})
1	Fe(III)TMPyP	2,75 x 10^{+6}
	Fe(III)TPPS	2,06 x 10^{+6}
	Methemoglobiini	3,20 x 10^{+5}
	Oksihemoglobiini	2,94 x 10^{+5}
4	Fe(III)TMPS	1,60 x 10^{+5}
5	Ni(II)TMPS	8,72 x 10^{+4}
7	Fe(III)(3,3'MeO_2Salen)	5,00 x 10^{+4}
3	Mn(III)TMPS	2,90 x 10^{+4}
8	Ni(II)([14]dienoN_4)PF_6	2,05 x 10^{+4}
9	Ni(II)([14]dieeniN_4)$(PF_6)_2$	1,80 x 10^{+4}
10	Ni(II)[14]12 eeniN_4	1,70 x 10^{+4}
	Fe(III)EDTA	2,00 x 10^{+4}
	Fe(III)sitraatti	1,50 x 10^{+4}
2	H2TMPS	Inaktiivinen
1 (SM)[b]	H2TMPyP	Inaktiivinen
	ZnTMPyP	Inaktiivinen
	Ni(CR)Cl_2[a]	Inaktiivinen

[a] CR = 2,12-dimetyyli,3,7,11,17-tetra-atsabisyklo[11.3.1]-heptadeka-1(17),2,11,13,15-pentaeeni.

[b] Lähtöaine.

Esimerkki 13

Tämä esimerkki kuvaa CuZn-superoksididismutaasin (CuZnSOD) inaktivoitumista peroksinitriitin vaikutuksesta ja sitä, että esimerkissä 12 aktiiviseksi osoitettu peroksinitriitin hajoamista edistävä katalyytti suojaa

CuZnSOD:a peroksinitriitin aiheuttamaa inaktivoitumista vastaan.

Nautaeläimen maksan CuZnSOD:n (DDI Pharmaceuticals Inc., Mountain View, CA) varastoliuokset valmistettiin liuottamalla ~ 1,0 mg entsyymiä 10 ml:aan 50 mM kaliumfosfaattipuskuria, pH-arvo 7,4. Tämän liuoksen aktiivisuus superoksidin dismutatoimiseksi määritettiin käyttämällä Rileyn menetelmää [Riley, D. P. et al., Anal. Biochem., 196, 344 - 349 (1991)]. Kaikki $k_{havaittu}$-arvot olivat keskiarvo kolmesta ajosta käyttäen keskeytetyn virtauksen spektrofotometriä, jonka oli valmistanut Kinetic Instruments Inc. (Ann Arbor, MI) ja joka oli liitetty MAC IICX-PC -tietokoneeseen.

Peroksinitriitin aiheuttama CuZnSOD:n inaktivoituminen

Peroksinitriitin inaktivoiminen toteutettiin sekoittamalla (aloquate) 1,0 ml CuZnSOD:n varastoliuosta 50 mM fosfaattipuskuriin, pH-arvo 7,4, siten että saavutettiin 10 ml:n lopullinen määritystilavuus peroksinitriitti- ja EDTA-liuosten lisäämisen jälkeen. Näihin määritysliuoksiin lisättiin eri määriä peroksinitriittiä (25 mM varastoliuos) siten, että peroksinitriitin lopullinen konsentraatio määrityksessä vaihteli siten, että se oli 0, 25, 50, 75 ja 100 μM. Peroksinitriitin lisäämisen jälkeen lisättiin 100 μl 2,5 mM EDTA:n varastoliuosta jokaiseen määritysliuokseen siten, että EDTA:n lopullinen konsentraatio oli 250 μM. Sitten jokaisnesta liuoksesta analysoitiin superoksididismutaasin aktiivisuus käyttämällä keskeytetyn virtauksen analyysiä. Kuviossa 2 esitetään käyrä $k_{havaittu}$ vs. peroksinitriitin konsentraatio. Kontrollireaktioseos, joka sisälsi CuZnSOD:n, kun läsnä oli 250 μM EDTA:a pelkästään ja 100 μM kaliumnitriittiä tai -nitraattia, ei osoittanut CuZnSOD:n aktiivisuuden vähenemistä.

Esimerkki 14

CuZnSOD:n suojaaminen peroksinitriitin aiheuttamalta inaktivoitumiselta käyttäen peroksinitriitin hajoamista edistäviä katalyyttejä

Määritysliuokset valmistettiin, kuten edellä on kuvattu lukuun ottamatta erilaisten peroksinitriitin hajoamista edistävien katalyyttien lisäämistä. Lopullista liuoksen tilavuutta pidettiin 10 ml:ssa. Näin ollen määritysliuoksiin lisättiin Fe(III)TMPyP:ä (lopulliset konsentraatiot 0,5 ja 1,0 uM) ja Fe(III)TMPS:ä (lopulliset konsentraatiot 1,0 ja 5,0 uM). Sitten liuokset käsiteltiin eri määrillä peroksinitriittiä siten, että saavutettiin lopulliset konsentraatiot 0,25, 50, 75 ja 100 uM. Peroksinitriittikäsittelyn jälkeen lisättiin EDTA:a lopulliseen konsentraatioon 250 μM. Sitten liuoksista määritettiin SOD-aktiivisuus. Käyrät $k_{havaittu}$ vs. [peroksinitriitti] katalyyttien eri konsentraatioilla kuvaavat Fe(III)TMPyP:n suojaavaa vaikutusta kuviossa 3 ja Fe(III)TMPS:n suojaavaa vaikutusta kuviossa 4. Käytetyissä määritysolosuhteissa Fe(III)TMPyP:n ja Fe(III)TMPS:n ei osoitettu olevan tehokkaita katalyyttejä superoksidin dismutaation kannalta.

Esimerkki 15

Arviointi in vitro

Aineisto: Ihmisen rekombinantti tuumorinekroositekijä-alfa (TNF-α) saatiin yhtiöltä Genzyme Corporation, Cambridge, MA. Ihimisen rekombinantti komplementti C5a ja L-arginiini (L-arg) hankittiin yhtiöltä Sigma Chemical Company, St. Louis, MO. Aito peroksinitriitti 50 mM NaOH:ssa valmistettiin, kuten edellä on kuvattu.

Endoteelisolujen eristäminen: Ihmisen ihon hiussuonen endoteelisolut (HDME-solut) vastasyntyneen esinahasta preparoitiin, kuten aikaisemmin on kuvattu [Marks, R. M., Czerniecki, M. ja Penny, R., Vit. Cell. Devel. Biol., 21, 627 - 635 (1985)]. Lyhyesti esitettynä useilta luovuttajilta peräisin oleva vastasyntyneen esinahkakudos pestiin

70-%:isessa etanolissa, leikattiin pieniksi paloiksi, sitten kappaleet upotettiin trypsiiniin (0,6-%:inen; Irvine Scientific, Santa Ana, CA) ja EDTA:an (1-%:inen; Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) 7 - 9 minuutin ajaksi. Endoteelisolut poistettiin puristamalla kudoksen keratinisoitumatonta pintaa leikkausveitsen terällä. Solut sentrifugoitiin 35-%:isen Percoll-tiheysgradientin läpi (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO). Soluja sentrifugoitiin kierrosnopeudella 250 x g 10 minuutin ajan, solut, jotka vastasivat tiheyttä alle 1,048 g/ml, kerättiin talteen ja saatettiin viljelyyn gelatiinilla päällystetyille kudosviljelymaljoille (0,1 %; Sigma Chemical Company, St. Louis, MO). Kontaminoivat solut poistettiin päivittäin käyttäen 25 gauge-yksikön neulaa, joka oli asennettu tuberkuliiniruiskuun. Puhdistettuja endoteelisoluja kasvatettiin vaihtoon (passage) 5 (~ 8 populaation kaksinkertaistumista) MCDB 131 -elatusaineessa (endoteelinen peruselatusaine; Clonetics Corporation), joka oli täydennetty 30 %:lla ihmisen seerumia (BioWittaker, Inc., Walkersville, MD), 10 ng:lla/ml EGF:ää (Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA), 2 mmol/l L-glutamiinia (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) ja 250 µg:lla/ml dibutyryyli cAMP:a, 1 µg:lla/ml hydrokortisonia (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO). Nämä solut karakterisoitiin normaaleiksi endoteelisoluiksi testaamalla endoteelisolumarkkerit (tekijä VIII:n immunoreaktiivisuus, soluun liittyvän angiotensiinin muuttavan entsyymin aktiivisuus ja pienitiheyksisen lipoproteiinin otto). Solut kryosuojattiin vaihdossa 5 10-%:iseen DMSO:iin käytettäväksi myöhemmissä määrityksissä mykoplasmanegatiivisuuden testaamisen jälkeen (Coriel Institute, Camden, NJ).

Neutrofiilien valmistus: Ihmisen neutrofiilit eristettiin terveiden luovuttajien perifeerisestä verestä [Look, D. C., Rapp., S. R., Keller, B. T. ja Holtzman, M. J., Am. J. Physiol., 263, L79 - L87 (1992)]. EDTA:lla an-

tikoaguloitu veri erotettiin käyttämällä yksivaiheista tiheyssentrifugointia (PMN Prep, Robbins Scientific, Sunnyvale, CA) ja sen jälkeen pesemällä useita kertoja Hankin puskuroidussa suolaliuoksessa (HBSS; Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) ja hajottamalla punasolut hypotonisesti. Valmisteet sisälsivät > 95 % neutrofiilejä, joista > 95 % oli eläviä trypaanisinisen (GIBCO Laboratories, Grand Island, NY) ekskluusion mukaan. Puhdistetut neutrofiilit suspendoitiin HBSS-liuokseen, joka oli täydennetty 0,01 %:lla BSA:ta (Miles, Inc., Kankakee, IL) ja 300 umol/l L-arg:a (HBSSBA), solujen konsentraation ollessa 5 x 10^6 solua/ml.

Endoteelisolujen vaurion määritykset: Stimuloitujen neutrofiilien tai peroksinitriitin sytotoksiset vaikutukset endoteelisoluihin määritettiin käyttäen ^{51}Cr-vapautumismääritystä, kuten Moldow on selostanut [Moldow et al., Methods Enzymol., 105, 378 - 385 (1984)]. Vaihdon 5 HMDE-soluja kasvatettiin tiheyteen ~ 1 - 2 x 10^4 solua/cm^2 (yhteensulautuminen ~ 90 %) 96-kuoppaisilla mikrotitrauslevyillä ja niitä leimattiin 18 tunnin ajan 10 uCi:lla/ml natrium[^{51}Cr]kromaattia (Amersham Corporation, Arlington Heights, IL). HMDE-soluja aktivoitiin sytokiinilla 4 tunnin ajan käyttäen 100 U:ta/ml ihmisen rekombinanttia tuumorinekroositekijä-alfaa (TNF-α, Genzyme Corporation, Cambridge, MA), sitten ne pestiin kahdesti HBSSBA:lla. Neutrofiilien suspensioita lisättiin konsentraation ollessa 2,5 x 10^5/kuoppa ja niiden annettiin laskeutua 15 minuutin ajan. Ellei toisin mainita, neutrofiilit aktivitoitiin herkistämällä niitä 25 U:lla/ml TNF-α:aa 10 minuutin ajan ja sitten niitä aktivoitiin 3 μg:lla/ml C5a-komplementtikomponenttia (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO). Inkubointeja jatkettiin 2 tunnin ajan 37 °C:ssa. Kun käytettiin aitoa peroksinitriittiä, se lisättiin neutrofiilien puuttuessa. Peroksinitriitti lisättiin suoraan HDME-solukerrokseen 25 mM varastoliuoksesta 50 mM NaOH:ssa, jolloin

lopulliseksi konsentraatioksi saatiin 0 - 800 μM. Kaikki estäjät valmistettiin juuri ennen määritystä HBSSBA:han ja niitä lisättiin 1/10 kuopan tilavuudesta ennen peroksinitriitin lisäämistä tai neutrofiiliaktivointia.

^{51}Cr:n vapautuminen määritettiin imemällä päällysneste kustakin kuopasta (liukoinen fraktio). Monokerrokset pestiin varovasti HBSSBA:lla kiinnittymättömien solujen poistamiseksi ja pesunesteet yhdistettiin liukoiseen fraktioon. Kiinnittyneet solut kustakin kuopasta liuotettiin 1 N NaOH:lla ja psoitettiin erilliseen putkeen. Molemmat fraktiot analysoitiin gamma-tuikespektrometrillä. Tulokset on ilmoitettu ^{51}Cr:n vapautumisprosenttina seuraavasti: vapautumis-% = cpm (liukoinen + kiinnittymätön/kokonais-cpm/kuoppa) x 100. Spesifinen sytotoksisuus heijastaa eroa stimuloitujen ja stimuloimattomien neutrofiilien (tyypillisesti 1 - 2 % enemmän kuin itsestään tapahtuva vapautuminen) aiheuttaman ^{51}Cr:n vapautumisen välillä. Tulokset vahvistettiin oikeiksi 2 - 3 erillisessä määrityksessä ja esitetyt tiedot ovat edustavia.

Kuten kuviosta 5 voidaan nähdä, peroksinitriitin lisääminen endoteelisoluihin johtaa annoksesta riippuvaiseen soluvaurion lisääntymiseen, mikä osoittaa peroksinitriitin sytotoksisia vaikutuksia. Kompleksit, joiden on osoitettu olevan peroksinitriitin hajoamista edistäviä katalyyttejä keskeytetyn virtauksen analyysin avulla, kykenevät suojaamaan peroksinitriitin välittämältä soluvauriolta kuviossa 6. Nämä kompleksit kykenevät myös suojaamaan neutrofiilien välittämältä soluvauriolta annoksesta riippuvaisella tavalla kuviossa 7.

Esimerkki 16

Solujen suojaamismääritykset käyttäen peroksinitriitin hajoamista edistäviä katalyyttejä

Solujen elinkelpoisuusmääritys järjestettiin peroksinitriittikatalyyttien (PN-katalyyttien) tehokkuuden määrittämiseksi nopeasti solujen suojaamisessa PN:n välittä-

mää vauriota ja kuolemaa vastaan. Peroksinitriittiherkistys koostui soluihin eksogeenisesti lisätyn synteettisen PN:n pulssista. PN-katalyyttien tehokkuuden määrittämiseksi paremmin solujen suojaamisessa PN:n välittämää vauriota vastaan, määrityksen mukaan maksimaalisen vaurion (100 %) aiheuttava peroksinitriitin määrä (50 mM NaOH:ssa) lisättiin eksogeenisenä pulssina jokaiseen solukuoppaan joko katalyytin läsnä ollessa tai sen puuttuessa. NaOH-vehikkeli ei ollut itsessään myrkyllinen.

Soluja (RAW 264.7-solut tai P815-mastosytoomasolut; American Type Collection, Rockville, Md) viljeltiin yhteensulautumiseen saakka 96-kuoppaisilla kudosviljelylevyillä. Kukin kuoppa pestiin kahdesti Dulbeccon fosfaatilla puskuroidulla suolaliuoksella (DBPS; GIBCO BRL, Grand Island, NY) proteiinin ja muiden seerumin aineosien poistamiseksi, jotka olisivat saattaneet reagoida eksogeenisen peroksinitriitin kanssa. Sitten jokaiseen kuoppaan lisättiin 200 μl DPBS-liuosta. PN:ää pantiin seuraavaksi erillisiin kuoppiin lisääntyviä konsentraatioita, ja solujen elinkelpoisuutta seurattiin. Annosta, jolla saavutetaan maksimaalinen solujen kuolema, käytettiin sitten katalyytin tuottaman suojaamisen määrittämiseksi.

Fosfaatilla puskuroitua suolaliuosta (200 μl), joka sisältää lisääntyviä konsentraatioita katalyyttiä, lisätään seuraavaksi yksittäisiin solukuoppiin. PN:n maksimaalinen annos lisätään sitten kaikkiin solukuoppiin. Sitten 15 minuutin kuluttua väliaine poistetaan jokaisesta kuopasta ja solujen annetaan joko toipua yön yli Earles-minimiessentiaalisessa elatusaineessa ilman fenolipunaista ja täydennettynä 10 %:lla nautasikiön seerumia tai vaihtoehtoisesti solulevystä analysoidaan tuona päivänä mitokondriaalinen eheys käyttäen Alamar Blue -elinkelpoisuusmääritystä (Alamar Biosciences, Inc.; Sacramento, CA). Molemmissa tapauksissa soluja inkuboidaan 37 °C:n lämpötilassa CO_2-pitoisuuden ollessa 5 %.

Soluvaurio mitataan seuraavasti. Lyhyesti sanottuna 10-%:ista Alamar Blue -sinistä (tilavuuden mukaan) Earles MEM -elatusaineessa, jossa on 10 % nautasikiön seerumia, lisätään jokaiseen kuoppaan 1 - 2 tunnin ajaksi. Solujen väriaineaineenvaihdunta tuottaa fluoresoivan tuotteen, joka on suoraan suhteessa elävien solujen lukumäärään. Lisäksi fluoresoivan aineenvaihduntatuotteen tuotanto on lineaarista yli 2 tunnin ajan. Fluoresoivan tuotteen määrä 100 µl:ssa käytettyä elatusainetta kustakin solukuopasta mitataan sitten IDEXX-fluoresoivalla levylukulaitteella [lisäysasetus (gain setting) 1 %] emission aallonpituudella 575 nm aloittaen aallonpituudella 545 nm. Solujen elinkelpoisuus on annettu joko absoluuttisina fluoresoivina yksiköinä tai prosenttina käsittelemättömien solujen arvosta (100 %).

Kuten kuviosta 8 voidaan nähdä, sekä Fe- että Ni-koordinoidut katalyytit kykenivät suojaamaan hiiren monosyytti-makrofagilinjaa RAW 264.7; tässä kokeessa PN lisättiin annoksena, joka aiheutti solujen elinkelpoisuuden 50 %:n vähenemisen.

Lisääntyvien PN-annosten vertailu RAW- ja P815-soluilla ei osoittanut todisteita erilaisesta herkkyydestä peroksinitriitin välittämälle vauriolle (tietoja ei ole esitetty). Kuitenkin, kuten kuviossa 9 on esitetty, FeTMPyP, FeTMPS ja FeTPPS osoittavat merkittävää solujen suojaamista, kun taas H_2TMPyP ja ZnTMPyP olivat suhteellisen tehottomia (tietoja ei ole esitetty), tulos, joka on yhdenmukaisnn niiden katalyyttisen tehon puuttumisen kanssa. Katalyytin lisääminen PN:n jälkeen ei kyennyt pelastamaan soluja vauriolta (tietoja ei ole esitetty), mikä osoittaa katalyyttien kykyä suojata soluja suoraan PN:stä johtuvalta hapettavalta vauriolta.

Esimerkki 17

Arviointi in vivo

Karrageenin aiheuttama käpälän turvotus. Peroksinitriittikatalyyttien vaikutukset in vivo testattiin ensin

karrageenin aiheuttamalla käpälän turvotuksella. Tämän tulehduksen in vivo -mallin käytön valinta perustui tietoon, että 1) NOS-estäjät ja 2) superoksididismutaasi (SOD) salpaavat tulehduksellisen vasteen. Tämä osoittaa sekä NO:n että O_2^-:n osallisuutta. Urospuoliset Sprague Dawley -rotat hankittiin yhtiöltä Harlan Sprague-Dawley (Indianapolis, IN). Urospuoliset Sprague Dawley -rotat (175 - 200 g) saivat jalkapohjaan ruiskeen karrageenia (0,1 ml 1-%:isena suspensiona 0,85-%:isessa suolaliuoksessa) oikeanpuoleiseen takakäpälään. Käpälän tilavuus mitattiin pletysmonometrillä välittömästi ennen karrageeniruisketta ja sitten tunnin välein 1 - 6 tunnin ajan. Turvotus ilmaistiin käpän tilavuuden lisäyksenä (millilitroissa) mitattuna karrageeniruiskeen jälkeen ja verrattuna ennen ruisketta saatuun arvoon kunkin yksittäisen eläimen osalta.

Rotille annettiin laskimonsisäisesti bolus-ruiske aktiivisia tai inaktiivisia peroksinitriittikatalyyttejä yhden tunnin kuluttua jalkapohjansisäisesti annetusta karrageeniruiskeesta; käpälän turvotus määritettiin sen jälkeen joka tunti 6 tuntiin saakka. Yhteenveto näillä aineilla saaduista suhteellisista estämisprosenteista on esitetty taulukossa 2. Näissä koeolosuhteissa inaktiiviset peroksinitriittikatalyytit H_2TMPS, ZnTMPyP tai MnTPPS (kaikkien annos 30 mg/kg) tai $FeCl_3$ (5 mg/kg, n = 6) eivät estäneet turvotuksen muodostumista.

Taulukko 2

Peroksinitriitin hajoamista edistävien katalyyttien aiheuttama käpälän turvotuksen estäminen prosentteina.

Yhdiste	Annos (mg/kg)	Aika (h) karrageenin jälkeen 1	2	3	4	5	6
FeTMPS	3	0	42	47	47	33	33
	10	0	61	60	53	53	47
	30	0	85	80	80	80	81
FeTMPy	3	0	9	10	17	6	0
	10	0	13	11	28	21	2
	30	0	44	43	50	32	32
FeTPPS	3	0	29	20	20	19	5
	10	0	17	20	23	19	20
	30	0	27	25	30	34	33
ZnTMPS	30	0	0	0	0	0	0
H_2TMPS	30	0	0	0	0	0	0
MnTMPS	30	0	0	0	0	0	0

Tulokset on ilmaistu käpälän turvotuksen estämisprosenttina verrattun arvoihin, jotka on saatu kontrollirotilta samoina ajankohtina. Kukin piste on keskiarvo ± s.e.m, kun n = 6 eläintä.

Endotoksiinin aiheuttama suolivaurio rotalla. Monen elimen vajaatoimintaoireyhtymä (MOFS), joka kehittyy septisen kohtauksen jälkeen, on useimmissa tapauksissa kohtalokas. MOFS:n "moottori" on ruuansulatuskanava, erityisesti ohutsuoli. Laajaa iskemiaa voidaan havaita suolen limakalvossa johtuen perinpohjaisesta verisuonten supistumisesta. Iskemia ja hypoksia johtavat limakalvon vammoihin, joita tavataan sekä eläimillä (rotalla, kissalla, koirilla) ja ihmisellä. Limakalvon vaurion alkuperä on hypoksia. Reperfuusion aikana (esim. ensimmäisen vaikean verisuonten supistumisen jälkeen) O_2-anionia voi vapautua ja sillä on

merkittävä osuus limakalvovammojen patogeneesissä ruuansulatuskanavassa. Suolivaurion, joka on seurausta sisäelimen valtimon tukkeutuman aiheuttamasta sokista, estää superoksididismutaasi ja LPS:n aiheuttaman suolitulehduksen estävät typpioksidiradan valikoimattomat estäjät (Boughton-Smith, N. K. et al., 1993). Nyt on olemassa merkittäviä kokeellisia ja kliinisiä todisteita, jotka viittaavat siihen, että liiallisella NO:n tuotannolla on merkittävä patologinen osuus alhaisessa verenpaineessa, alentuneessa reagoivuudessa verisuonia supistaviin aineisiin ja kardiovaskulaarisessa romahduksessa, jotka liittyvät septiseen sokkiin. Lisäksi typpioksidisyntaasiestäjät estävät endotoksiinin aiheuttamaa suolivauriota. Olemme kehittäneet endotoksiinin aiheuttaman suolivaurion mallin rotilla ja arvioineet peroksinitriittikatalyyttien hoidollisen käytön vaikutukset.

Suolen verisuonten läpäisyvyys määritettiin nautaeläimen [^{125}I]-leimatun seerumin albumiinin ([^{125}I]-BSA:n) vuotamisena tyhjäsuolikudokseen, kun mainittu leimattu albumiini oli annettu laskimonsisäisesti (0,5 ml, 0,5 μCi) yhdessä joko LPS:n kanssa (3 mg/kg, serotyyppi 0111:B4) tai isotonisen suolaliuoksen kanssa. Neljän tunnin kuluttua LPS:n antamisesta tyhjäsuolikudoksen leikkeiden suonet sidottiin ja leikkeet poistettiin. Suolikudokset pestiin nopeasti, kuivattiin imupaperilla ja punnittiin. Veri (0,5 ml) kerättiin putkiin, jotka sisälsivät trinatriumsitraattia (lopullinen konsentraatio 0,318 %) ja plasma preparoitiin sentrifugoimalla (10 000 g x 10 min). [^{125}I]-BSA-pitoisuus koko kudoksen leikkeissa ja plasman näytteissä (100 μl) määritettiin gammalaskimen avulla. Plasman kokonaispitoisuus suolikudoksissa ilmaistiin μl:ina/g kudosta. Suonen sisäisen tilavuuden muutokset suolikudoksessa määritettiin ylimääräisestä rottaryhmästä antamalla niille [^{125}I]-BSA:ta laskimonsisäisesti 2 minuuttia ennen tyhjäsuolen poistamista. Kudoksen ja plasman radioleimapitoi-

suus määritettiin ja suonen sisäinen tilavuus ilmaistiin µl:ina/g kudosta. Tämä arvo vähennettiin arvosta, joka saatiin plasman vuototutkimuksissa, suolen plasman albumiinivuodon mitan saamiseksi. LPS:n antaminen jälkeen (4 tuntia) plasmavuodossa ilmeni merkitsevä ($P < 0,01$) lisäys (arvosta 77 ± 10 arvoon 224 ± 18 µl/g kudosta, n = 8). FeTMPS:n tai FeTMPyP:n antaminen (30 mg/kg, laskimonsisäisesti, n = 4) 3 tunnin kuluttua LPS-ruiskeen antamisesta aiheutti radioleimatun albumiinin vuodon vähenemisen määritettynä 1 tunnin kuluttua, kuten kuviossa 10 on esitetty. Sitä vastoin inaktiivisen peroksinitriittikatalyytin, ZnTMPyP:n, antaminen (30 mg/kg, laskimonsisäisesti, n = 4) 3 tunnin kuluttua LPS-ruiskeen antamisesta ei estänyt radioleimatun albumiinin vuotoa määritettynä yhden tunnin kuluttua (kuvio 10). Näitä tietoja tukee tyhjäsuolikudoksen histologinen tutkimus. Verrattuna suolaliuoksella käsiteltyihin rottiin LPS aiheutti perinpohjaisen tyhjäsuolen vaurion, jossa ilmeni ankara poimujen ja nukkalisäkkeiden hajoaminen. LPS:n aiheuttama vaurio oli vähemmän ankara tyhjäsuolissa, jotka oli otettu rotilta, jotka oli käsitelty FeTMPS:llä tai FeTMPyP:llä (30 mg/kg, laskimonsisäisesti).

Näin ollen yhdisteet, jotka ovat tämän keksinnön yhdisteitä tai komplekseja, ovat uusia ja niitä voidaan hyödyntää lukuisien tulehdustautien ja sairauksien hoitamiseksi. Esimerkiksi iskeemisen elimen reperfuusiovaurio, esim. iskeemisen sydänlihaksen reperfuusiovaurio, tulehduksellinen suolitauti, nivelreuma, nivelrikko, korkea verenpaine, psoriasis, elimensiirron hylkimisreaktiot, elimen säilyttäminen, impotenssi, säteilyn aiheuttama vamma, astma, ateroskleroosi, tromboosi, verihiutaleiden kasautuminen, syövän etäpesäkkeiden lääkehoidon sivuvaikutukset, influenssa, aivohalvaus, palovammat, trauma, äkillinen haimatulehdus, munuaisaltaan ja munuaisen tulehdus, maksatulehdus, autoimmuunitaudit, insuliinista riippuvai-

nen diabetes mellitus, disseminoitunut intravaskulaarinen koagulaatio, rasvatulppa, aikuisen ja lapsen hengitysvaikeus ja verenvuodot vastasyntyneillä.

Potilaat, jotka saavat IL-2-hoitoa, kehittävät usein mahdollisesti hengenvaarallisia sivuvaikutuksia, joihin sisältyvät kuume, vilunväristykset, alhainen verenpaine, hiussuonten vuoto-oireyhtymä sekä merkit monien elinten toimintahäiriöistä, erityisesti mukaan luettuna munuaisen vajaatoiminta ja keltaisuus, joka johtuu sapen virtauksen tukoksesta. IL-2 indusoi sytokiinien monimutkaisen verkoston, johon sisältyvät tuumorinekroositekijä, interleukiini 1 ja 6. Näin ollen IL-2:lla hoidetut potilaat muistuttavat potilaita, joilla on endotoksemia (alentunut verenpaine, kohonneet TNF-pitoisuudet, kohonneet sytokiinipitoisuudet jne.). Jotkut niistä indusoivat vapaiden radikaalien vapautumisen sekä iNOS:n, mistä seuraa NO:n vapautuminen. Äskettäinen julkaisu osoittaa, että iNOS indusoituu potilailla, jotka saavat IL-2:ta munuaissolusyövän ja pahanlaatuisen melanooman hoitamiseksi [Hibbs, J. B. et al., Evidence for cytokine-inducible nitric oxide synthesis from L-arginine in patients receiving interleukin-2 therapy. J. Clin. Invest., Vol. 89, 867 - 877).

Tämän keksinnön yhdisteiden tai kompleksien aktiivisuus superoksididismutaasin suojaamiseksi voidaan osoittaa käyttäen edellä kuvattua keskeytetyn virtauksen kinetiikkaa. Kineettinen keskeytetyn virtauksen analyysi on tarkka ja suora menetelmä peroksinitriitin hajoamisnopeuksien seuraamiseksi kvantitatiivisesti vedessä. Kineettinen keskeytetyn virtauksen analyysi on sopiva kompleksien seulomiseksi katalyyttisen peroksinitriitin hajoamista edistävän aktiivisuuden osalta ja identifioituna keskeytetyn virtauksen analyysin avulla tämän keksinnön aktiivisten kompleksien on osoitettu korreloivan edellä kuvattujen tautitilojen ja sairauksien hoidon kanssa.

Toisin sanoen tämä keksintö koskee menetelmiä ja koostumuksia taudin tai sairauden hoitamiseksi, johon vaikuttaa edullisesti peroksinitriitin hajoaminen, joka on nopeutettu luonnolliseen hajoamisen perusnopeuteen verrattuna, edullisesti ihimisellä, joka sairastaa tällaista tautia tai sairautta, jolloin menetelmässä potilaalle annetaan metallikompleksia annosyksikkömuodossa hajoamisnopeutta jouduttavia tehokkaita määriä peroksinitriitin hajottamiseksi, jolloin metallikompleksi on edullisesti, kuten edellä on määritelty. Tällaiset menetelmät tai koostumukset toteuttavat näiden tautien hoidon vaikuttamatta haitallisesti normaaleihin biologisesti edullisiin mekanismeihin.

Päivittäinen kokonaisannos, joka annetaan isännälle yhtenä tai jaettuina annoksina, voi olla esimerkiksi noin 1 - 100 mg/paino-kg päivittäin ja tavallisemmin noin 3 - 30 mg/kg. Annosyksikkökoostumukset voivat sisältää tällaisten määrien murto-osia, jotka muodostavat päivittäisen annoksen. Murto-osien määrä on edullisesti noin 1 - 3 kertaa päivässä noin 30 mg/kg/yksikköannosmuodosta. Annosten konsentraatiot seerumissa ovat noin 15 μM - 1,5 mM, edullisen vaihtelualueen ollessa 3 - 300 μM.

Aktiivisen aineen määrä, joka voidaan yhdistää kantaja-aineiden kanssa yhden annostusmuodon tuottamiseksi, vaihtelee riippuen hoidettavasta isännästä ja lääkkeen nimenomaisesta antamistavasta.

Annostusohje tautitilan hoitamiseksi tämän keksinnön yhdisteillä ja/tai koostumuksilla valitaan erilaisten tekijöiden mukaisesti, mukaan luettuna potilaan tyyppi, ikä, paino, sukupuoli, ruokavalio ja lääketieteellinen tila, taudin ankaruus, lääkkeen antotapa, käytettävän nimenomaisen yhdisteen farmakologiset seikat, kuten aktiivisuus, tehokkuus, farmakokineettiset ja toksikologiset profiilit, käytetäänkö lääkkeen vapauttamisjärjestelmää ja annetaanko lääke osana lääkeyhdistelmää. Näin ollen todel-

la käytettävä annostusohje voi vaihdella laajasti ja sen vuoksi se voi poiketa edellä esitetystä edullisesta annostusohjeesta.

Tämän keksinnön yhdisteet voidaan antaa potilaalle suun kautta, ruuansulatuskanavan ulkopuolisesti, inhalaatiosuihkeena, peräsuolen kautta tai paikallisesti annostusyksikkövalmisteissa, jotka sisältävät tavanomaisia myrkyttömiä farmaseuttisesti hyväksyttäviä kantaja-aineita, lisäaineita ja vehikkeleitä toivomuksen mukaan. Lääkkeen antaminen paikallisesti voi myös käsittää transdermaalisen käytön, kuten transdermaaliset laastarit ja iontoforeesilaitteet. Tässä käytettynä termi ruuansulatuskanavan ulkopuolinen sisältää ihonalaiset ruiskeet, laskimonsisäisen, lihaksensisäisen, rintalastansisäisen ruiskeen tai infuusiotekniikan.

Ruiskeena annettavat valmisteet, esimerkiksi steriilit ruiskeena annettavat vesipitoiset tai öljyiset suspensiot, voidaan formuloida alalla tunnetulla tavalla käyttäen sopivia dispergointi- tai kostutusaineita ja suspendoimisaineita. Steriili ruiskeena annettava valmiste voi myös olla steriili ruiskutettava liuos tai suspensio myrkyttömässä parenteraalisesti hyväksyttävässä laimennusaineessa tai liuottimessa, esimerkiksi liuoksena 1,3-butaanidiolissa. Hyväksyttävien vehikkeleiden ja liuotin joukkoon, jota voidaan käyttää, sisältyvät vesi, Ringerin liuos ja isotoninen natriumkloridiliuos. Lisäksi steriilejä rasvaöljyjä käytetään tavanomaisesti liuottimena tai suspendoimisväliaineena. Tätä tarkoitusta varten voidaan käyttää mitä tahansa mietoa rasvaöljyä, mukaan luettuna synteettiset mono- tai diglyseridit. Lisäksi rasvahapoilla, kuten öljyhapolla, on käyttöä ruiskeiden valmistuksessa.

Peräpuikkoja lääkkeen antamiseksi peräsuolen kautta voidaan valmistaa sekoittamalla lääkeaine sopivan ärsyttämättömän täyteaineen kanssa, kuten kaakaovoin ja polyetee-

niglykolien kanssa, jotka ovat kiinteitä tavallisissa lämpötiloissa, mutta nestemäisiä peräsuolen lämpötilassa ja sulavat siten peräsuolessa ja vapauttavat lääkkeen.

Kiinteät annostusmuodot otettavaksi suun kautta voivat sisältää kapselit, tabletit, pillerit, jauheet, rakeet ja geelit. Tällaisissa kiinteissä annostusmuodoissa aktiivinen yhdiste voidaan sekoittaa vähintään yhden inertin laimennusaineen, kuten sakkaroosin, laktoosin tai tärkkelyksen kanssa. Tällaiset annostusmuodot voivat sisältää myös, kuten normaalissa käytännössä, ylimääräisiä aineita, jotka ovat muita kuin inerttejä laimennusaineita, esim. voiteluaineita, kuten magnesiumstearaattia. Kapseleiden, tablettien ja pillereiden tapauksessa annostusmuodot voivat sisältää myös puskuriaineita. Voidaan lisäksi valmistaa tabletteja ja pillereitä, joilla on enteeriset päällysteet.

Nestemäiset annostusmuodot otettavaksi suun kautta voivat käsittää farmaseuttisesti hyväksyttävät emulsiot, liuokset, suspensiot, siirapit ja eliksiirit, jotka sisältävät inerttejä laimennusaineita, joita käytetään yleisesti alalla, kuten vettä. Tällaiset koostumukset voivat sisältää myös lisäaineita, kuten kostutusaineita, emulgointi- ja suspendointiaineita ja makeutusaineita, makuaineita ja tuoksuaineita.

Vaikka keksinnön yhdisteet voidaan antaa ainoana aktiivisena farmaseuttisena aineena, niitä voidaan myös käyttää yhdistelmässä yhden tai useamman tämän keksinnön yhdisteen kanssa tai yhden tai useamman yhdisteen kanssa, joiden tiedetään olevan tehokkaita erityistä tautitilaa vastaan, joka on hoidon kohteena.

Patenttivaatimukset

1. Peroksinitriitin hajoamista edistävän katalyytin käyttö valmistettaessa lääkeainetta sellaisen taudin hoitamiseksi, johon vaikuttaa edullisesti hoito, joka käsittää peroksinitriitin hajottamisen kiihdytetyllä nopeudella peroksinitriitin luonnolliseen hajoamisen perusnopeuteen verrattuna, t u n n e t t u siitä, että peroksinitriitin hajoamista edistävä katalyytti on ligandirakenne, jolla on metalli, joka on valittu ryhmästä, joka koostuu Mn-, Fe-, Ni- ja V-atomeista.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen käyttö, t u n n e t t u siitä, että tauti on iskeeminen reperfuusio, syövän lääkehoidon sivuvaikutus, tulehdus, verenmyrkytys, aivohalvaus, multippeliskleroosi tai Parkinsonin tauti.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen käyttö, t u n n e t t u siitä, että tulehdus on äkillinen tai krooninen tulehdus.

4. Patenttivaatimuksen 2 mukainen käyttö, t u n n e t t u siitä, että tauti on verenmyrkytys.

5. Patenttivaatimuksen 2 mukainen käyttö, t u n n e t t u siitä, että tauti on aivohalvaus.

6. Patenttivaatimuksen 2 mukainen käyttö, t u n n e t t u siitä, että tauti on iskeeminen reperfuusio.

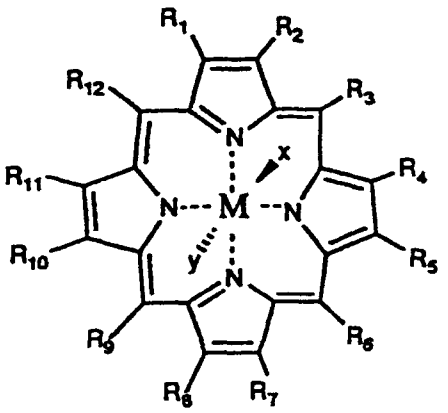
7. Patenttivaatimuksen 1 mukainen käyttö, t u n n e t t u siitä, että peroksinitriitin hajoamista edistävä katalyytti on metallin ligandirakenne, jolloin metalli on valittu ryhmästä, joka koostuu Mn-, Fe-, Ni- ja V-atomeista.

8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen käyttö, t u n n e t t u siitä, että ligandirakenne on makrosyklinen ligandirakenne, jolla on metalli, joka on Mn, Fe tai Ni.

9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen käyttö, t u n n e t t u siitä, että makrosyklinen ligandirakenne on porfyriiniligandi.

10. Annosteluyksikön muodossa oleva farmaseuttinen koostumus sellaisten tautien hoitoon ihmisellä, joihin sisältyvät iskeemiset reperfuusiovauriot, verenmyrkytys, krooninen tai äkillinen tulehdus (kuten niveltulehdus ja tulehduksellinen suolitauti ja vastaavat), aikuisen hengitysvaikeusoireyhtymä, syöpä, bronkopulmonaalinen dysplasia, syövän lääkehoidosta johtuvat sivuvaikutukset, sydänverisuonitaudit, diabetes, multippeliskleroosi, paksusuolen tulehdus ja spesifiset hermosairaudet, jotka liittyvät peroksinitriittiin, ja joka käsittää annosteluyksikköä kohti sellaisen määrän metallikompleksia, joka on tehokas peroksinitriitin hajottamiseksi, t u n n e t t u siitä, että mainitulla metallikompleksilla on kaava:

Rakenne I

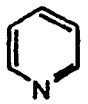


Z

jossa

R_3, R_6, R_9 tai R_{12} on valittu toisistaan riippumatta ryhmästä, joka koostuu H-atomista, alkyylistä, alkenyylistä, CH_2COOH:sta, fenyylistä, pyridinyylistä ja N-alkyylipyridyylistä siten, että fenyyli, pyridinyyli ja N-alkyylipyridyyli ovat


Fenyyli


Pyridyyli


N-alkyylipyridiini

jotka ovat kiinnittyneet hiiliatomiin ja fenyyli on mahdollisesti substituoitu halogeenilla, alkyylillä, aryylillä, bentsyylillä, ryhmillä COOH, $CONH_2$, SO_3H, NO_2, NH_2, $(N(R)_3)^+$ tai NHCOR', jolloin R on vety, alkyyli, aryyli tai alkaryyli; ja R' on alkyyli;

pyridinyyli on mahdollisesti substituoitu halogeenilla, alkyylillä, aryylillä, bentsyylillä, ryhmillä COOH, $CONH_2$, SO_3H, NO_2, NH_2, $N(R)_3^+$ tai NHCOR', jolloin R ja R' ovat kuten edellä on määritelty; ja

N-alkyylipyridiinirengas on mahdollisesti substituoitu halogeenilla, alkyylillä, aryylillä, bentsyylillä, ryhmillä COOH, $CONH_2$, SO_3H, NO_2, NH_2, $N(R)_3^+$ tai NHCOR', jolloin R ja R' ovat kuten edellä on määritelty;

R_1, R_2, R_4, R_5, R_7, R_8, R_{10} tai R_{11} on valittu toisistaan riippumatta ryhmästä, joka koostuu H-atomista, alkyylistä, alkenyylistä, karboksialkyylistä, Cl-atomista, Br-atomista, F-atomista, NO_2-ryhmästä, hydroksialkyylistä ja SO_3H-ryhmästä tai R_1 ja R_2 voivat muodostaa yhdessä renkaan, jossa on 5 - 8 hiiliatomia;

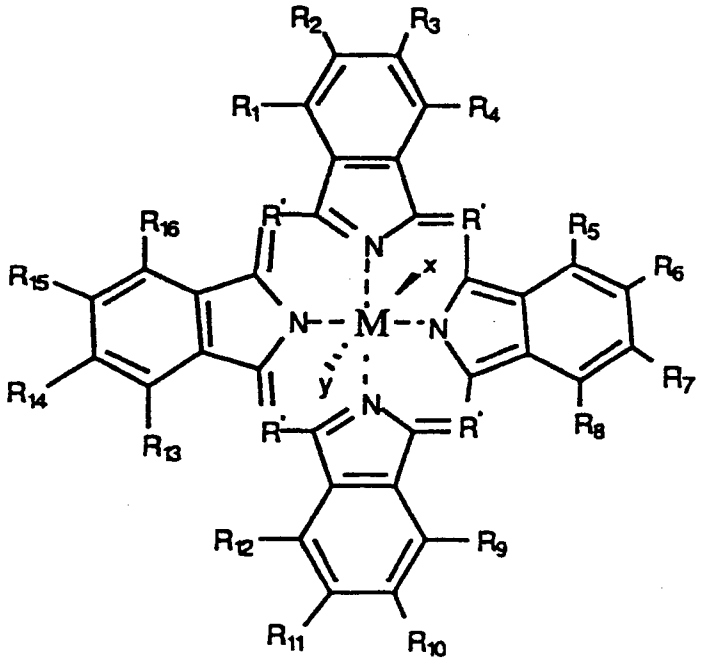
X ja Y ovat ligandeja tai varausta neutraloivia anioneja, jotka ovat peräisin mistä tahansa yksihampaisesta tai monihampaisesta koordinoituvasta ligandista tai ligandijärjestelmästä tai sen vastaavasta anionista, ja ne on valittu toisistaan riippumatta ryhmästä, joka koostuu halidista, oksosta, akvosta, hydroksosta, alkoholista, fenolista, dihapesta, peroksosta, hydroperoksosta, alkyyliperoksosta, aryyliperoksosta, ammoniakista, alkyyliaminosta, aryyliaminosta, heterosykloalkyyliaminosta, hetero-

sykloaryylista, aminosta, amiinioksideista, hydratsiinista, alkyylihydratsiinista, aryylihydratsiinista, typpioksidista, syanidista, syanaatista, tiosyanaatista, isosyanaatista, isotiosyanaatista, alkyylinitriilistä, aryylinitriilistä, alkyyli-isonitriilistä, aryyli-isonitriilistä, nitraatista, nitriitistä, atsidosta, alkyylisulfonihaposta, aryylisulfonihaposta, alkyylisulfoksidista, aryylisulfoksidista, alkyyliaryylisulfoksidista, alkyylisulfeenihaposta, aryylisulfeenihaposta, alkyylisulfiinihaposta, aryylisulfiinihaposta, alkyylitiolikarboksyylihaposta, aryylitiolikarboksyylihaposta, alkyylitiolitiokarboksyylihaposta, aryylitiolitiokarboksyylihaposta, alkyylikarboksyylihaposta, aryylikarboksyylihaposta, ureasta, alkyyliureasta, aryyliureasta, alkyyliaryyliureasta, tioureasta, alkyylitioureasta, aryylitioureasta, alkyyliaryylitioureasta, sulfaatista, sulfiitista, bisulfaatista, bisulfiitista, tiosulfaatista, tiosulfiitista, hydrosulfiitista, alkyylifosfiinista, aryylifosfiinista, alkyylifosfiinioksidista, aryylifosfiinioksidista, alkyyliaryylifosfiinioksidista, alkyylifosfiinisulfidista, aryylifosfiinisulfidista, alkyyliaryylifosfiinisulfidista, alkyylifosfonihaposta, aryylifosfonihaposta, alkyylifosfiinihaposta, aryylifosfiinihaposta, alkyylisfosfoniumhaposta (alkyl phosphinous acid), aryylifosfoniumhaposta, fosfaatista, tiofosfaatista, fosfiitista, pyrofosfiitista, trifosfaatista, vetyfosfaatista, divetyfosfaatista, alkyyliguanidinosta, aryyliguanidinosta, alkyyliaryyliguanidinosta, alkyylikarbamaatista, aryylikarbamaatista, alkyyliaryylikarbamaatista, alkyylitiokarbamaatista, aryylitiokarbamaatista, alkyyliaryylitiokarbamaatista, alkyyliditiokarbamaatista, aryyliditiokarbamaatista, alkyyliaryyliditiokarbamaatista, bikarbonaatista, karbonaatista, perkloraatista, kloraatista, kloriitista, hypokloriitista, perbromaatista, bromaatista, bromiitista, hypobromiitista, tetrahalomanganaatista, tetrafluoriboraatista, heksafluorifosfaatista, heksafluorianitmonaatista, hypofosfiitista, jodaatista,

perjodaatista, metaboraatista, tetra-aryyliboraatista, tetra-alkyyliboraatista, tartraatista, salisylaatista, sukkinaatista, sitraatista, askorbaatista, sakkarinaatista, aminohaposta, hydroksaamihaposta, tiotosylaatista ja ioninvaihtohartsien tai -järjestelmien anioneista; sillä varauksella, että kun X:n ja Y:n sisältävällä kompleksilla on positiivinen nettovaraus, niin Z on vastaioni, joka on itsenäisesti X tai Y, tai kun X:n ja Y:n sisältävällä kompleksilla on negatiivinen nettovaraus, niin Z on vastaioni, joka on valittu ryhmästä, joka koostuu alkali- ja maa-alkalimetallikationeista tai orgaanisista kationeista, kuten alkyyli- tai alkyyliaryyliammoniumkationeista; ja M on valittu ryhmästä, joka koostuu Mn-, Fe-, Ni- ja V-atomeista;

Rakenne II

Z



jossa

R' on CH tai N;

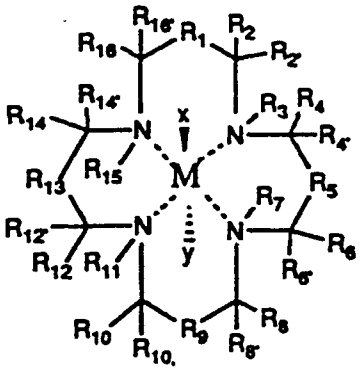
R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}, R_{11}, R_{12}, R_{13}, R_{14}, R_{15} ja R_{16} on valittu toisistaan riippumatta ryhmästä,

joka koostuu H-atomista, ryhmistä SO_3H, COOH, NO_2, NH_2 ja N-alkyyliaminosta;

X, Y, Z ja M ovat kuten edellä on määritelty;

Rakenne III

Z



A

jossa

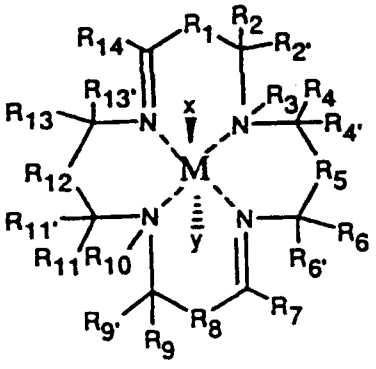
R_1, R_5, R_9 ja R_{13} ovat toisistaan riippumatta suora sidos tai CH_2;

R_2, R_2', R_4, R_4', R_6, R_6', R_8, R_8', R_{10}, R_{10}', R_{12}, R_{12}', R_{14}, R_{14}', R_{16}, R_{16}' ovat toisistaan riippumatta H tai alkyyli;

R_3, R_7, R_{11}, R_{15} ovat toisistaan riippumatta H tai alkyyli;

X, Y, Z ja M ovat kuten edellä on määritelty;

Z



B

jossa

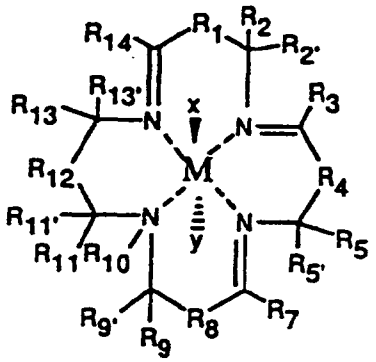
R_1, R_5, R_8 ja R_{12} ovat toisistaan riippumatta suora sidos tai CH_2;

R_2, R_2', R_4, R_4', R_6, R_6', R_7, R_9, R_9', R_{11}, R_{11}', R_{13}, R_{13}', R_{14} ovat toisistaan riippumatta H tai alkyyli;

R_3 ja R_{10} ovat toisistaan riippumatta H tai alkyyli;

X, Y, Z ja M ovat kuten edellä on määritelty;

Z



C

jossa

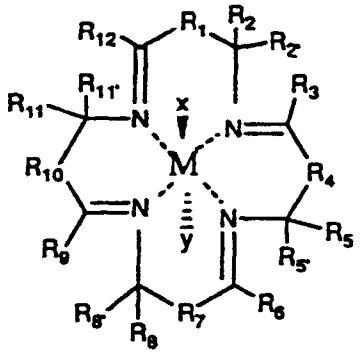
R_1, R_4, R_8, R_{12} ovat toisistaan riippumatta suora sidos tai CH_2;

R_2, R_2', R_3, R_5, R_5', R_7, R_9, R_9', R_{11}, R_{11}', R_{13}, R_{13}', R_{14} ovat toisistaan riippumatta H tai alkyyli;

R_{10} on H tai alkyyli;

X, Y, Z ja M ovat kuten edellä on määritelty;

Z



D

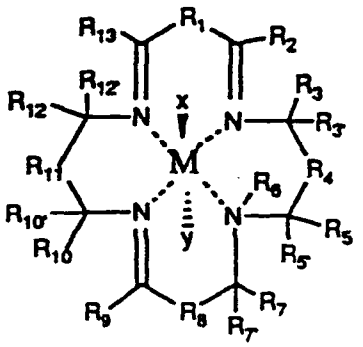
jossa

R_1, R_4, R_7 ja R_{10} ovat toisistaan riippumatta suora sidos tai CH_2;

R_2, R_2', R_3, R_5, R_5', R_6, R_8, R_8', R_9, R_{11}, R_{11}' ja R_{12} ovat toisistaan riippumatta H tai alkyyli;

X, Y, Z ja M ovat kuten edellä on määritelty;

Z



E

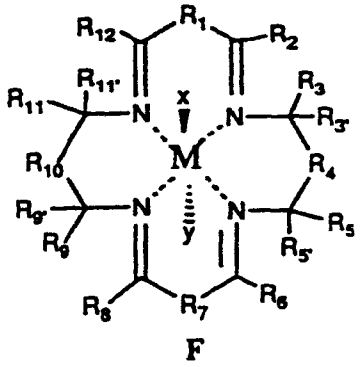
jossa

R_1, R_4, R_8 ja R_{11} ovat toisistaan riippumatta suora sidos tai CH_2;

R_2, R_3, R_3', R_5, R_5', R_7, R_7', R_9, R_{10}, R_{10}', R_{12}, R_{12}' ja R_{13} ovat toisistaan riippumatta H tai alkyyli;

R_6 on vety tai alkyyli;

X, Y, Z ja M ovat kuten edellä on määritelty;



Z

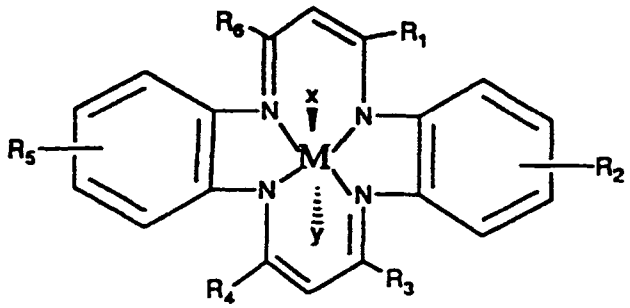
F

jossa

R_1, R_4, R_7 ja R_{10} ovat toisistaan riippumatta H tai alkyyli;

R_2, R_3, R_3', R_5, R_5', R_6, R_8, R_9, R_9', R_{11}, R_{11}' ja R_{12} ovat toisistaan riippumatta H tai alkyyli;

X, Y, Z ja M ovat kuten edellä on määritely;



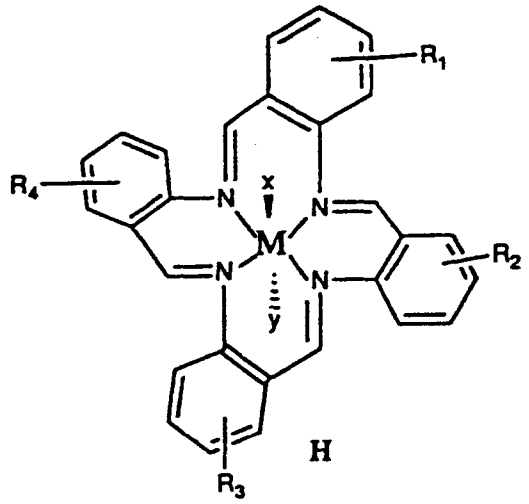
G

jossa

R_1, R_3, R_4 ja R_6 ovat toisistaan riippumatta H tai alkyyli;

R_2 ja R_5 on valittu toisistaan riippumatta ryhmästä, joka koostuu H-atomista, alkyylistä, SO_3H-ryhmästä, NO_2-ryhmästä, NH_2-ryhmästä, halogeenista, COOH-ryhmästä ja $N(R)_3^+$-ryhmästä, jossa R on kuten edellä on määritelty;

X, Y, Z ja M ovat kuten edellä on määritelty;



H

jossa

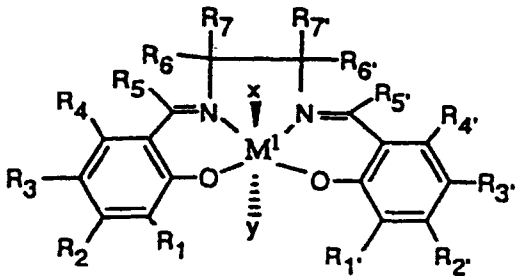
R_1, R_2, R_3, R_4 on valittu toisistaan riippumatta ryhmästä, joka koostuu H-atomista, alkyylistä, SO_3H-ryhmästä, NO_2-ryhmästä, NH_2-ryhmästä, halogeenista, COOH-

ryhmästä ja $N(R)_{3+}$-ryhmästä, jossa R on kuten edellä on määritelty;

X, Y, Z ja M ovat kuten edellä on määritelty;

Rakenne IV

Z



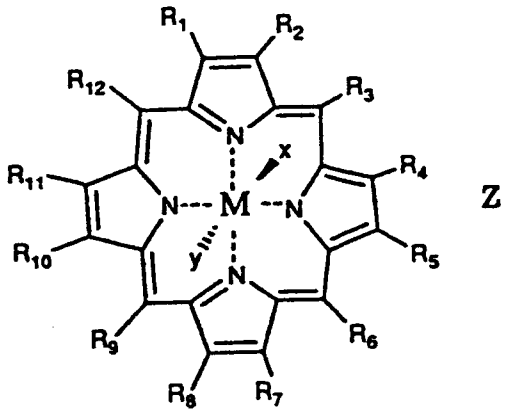
jossa

R_1, R_1', R_2, R_2', R_3, R_3', R_4, R_4', R_5, R_5', R_6, R_6', R_7 ja R_7' on valittu toisistaan riippumatta ryhmästä, joka koostuu H-atomista, alkyylistä, alkoksista, NO_2-ryhmästä, aryylistä, halogeenista, NH_2-ryhmästä, SO_3H-ryhmästä, ja R_6, R_6', R_7 ja R_7' voivat kukin muodostaa yhdessä toisen muun R_6-, R_6'-, R_7- ja R_7'-ryhmän kanssa syklisen ryhmän, edullisesti 6 hiiliatomia sisältävän sykloalkyyliryhmän;

M^1 on Fe, Ni tai V;

X, Y ja Z ovat kuten edellä on määritelty.

11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen koostumus, t u n n e t t u siitä, että metallikompleksi on rakenne I, jolla on kaava

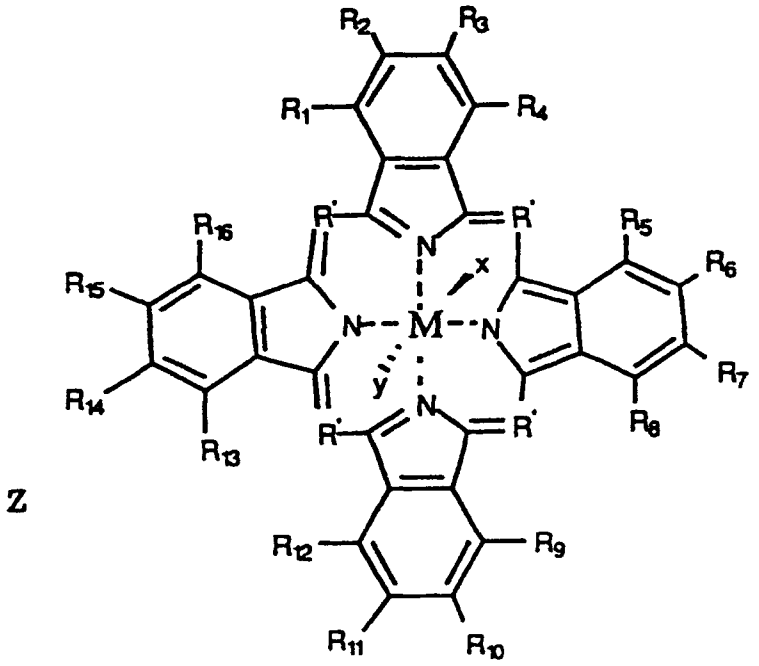


Z

jossa

R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}, R_{11}, R_{12}, M, X, Y ja Z ovat, kuten edellä on määritelty patenttivaatimuksessa 10.

12. Patenttivaatimuksen 10 mukainen koostumus, t u n n e t t u siitä, että metallikompleksi on rakenne II, jolla on kaava



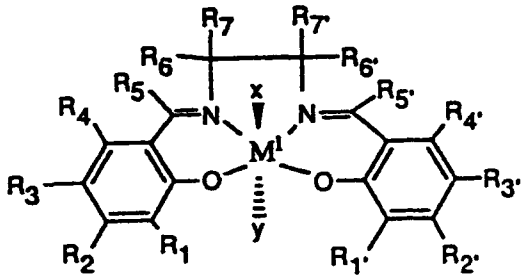
jossa

R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}, R_{11}, R_{12}, R_{13}, R_{14}, R_{15}, R_{16}, X, Y, M ja Z ovat kuten on määritelty rakenteen II yhteydessä patenttivaatimuksessa 10.

13. Patenttivaatimuksen 10 mukainen koostumus, t u n n e t t u siitä, että metallikompleksi on rakenne IIIA, IIIB, IIIC, IIID, IIIE tai IIIF, jolla on kaava, kuten se on edellä määritelty.

14. Patenttivaatimuksen 10 mukainen koostumus, t u n n e t t u siitä, että metallikompleksi on rakenne IIIG tai IIIH, jolla on kaava, kuten se on edellä määritelty.

15. Patenttivaatimuksen 10 mukainen koostumus, t u n n e t t u siitä, että metallikompleksi on rakenne IV, jolla on kaava



Z

jossa

R_1, R_1', R_2, R_2', R_3, R_3', R_4, R_4', R_5, R_5', R_6, R_6', R_7, R_7', X, Y, Z ja M^1 ovat kuten edellä on määritelty.

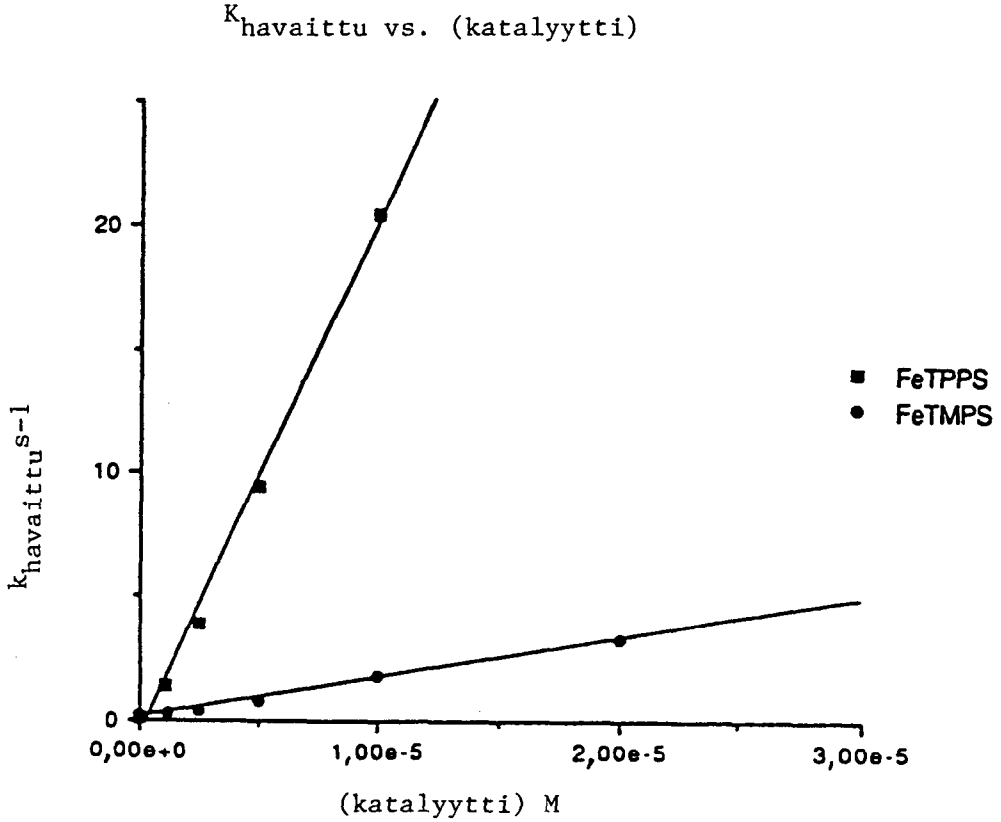
16. Patenttivaatimuksen 10 mukainen koostumus, t u n n e t t u siitä, että M on Fe.

17. Patenttivaatimuksen 10 mukainen koostumus, t u n n e t t u siitä, että M on Ni.

18. Patenttivaatimuksen 10 mukainen koostumus, t u n n e t t u siitä, että M on V.

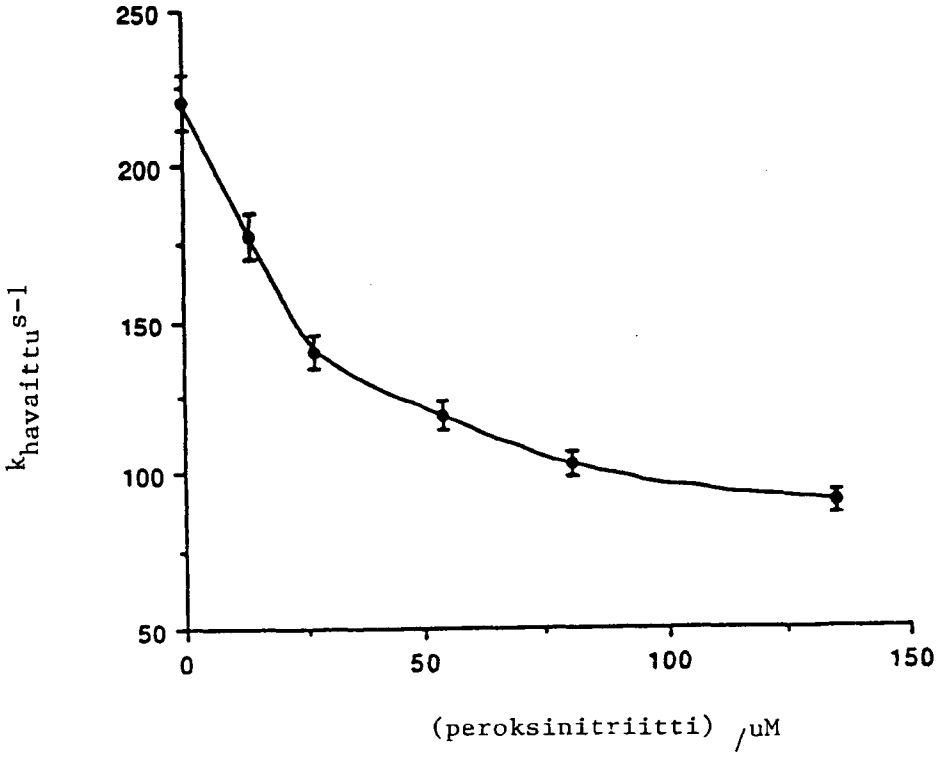
19. Patenttivaatimuksen 10 mukainen koostumus, t u n n e t t u siitä, että M ja M^1 ovat Mn.

20. Patenttivaatimuksen 10 mukainen koostumus, t u n n e t t u siitä, että M on Fe.


$K_{havaittu}$ vs. (katalyytti)
$k_{havaittu}$ s^{-1}
20
10
0
0,00e+0
1,00e-5
2,00e-5
3,00e-5
(katalyytti) M
FeTPPS
FeTMPS

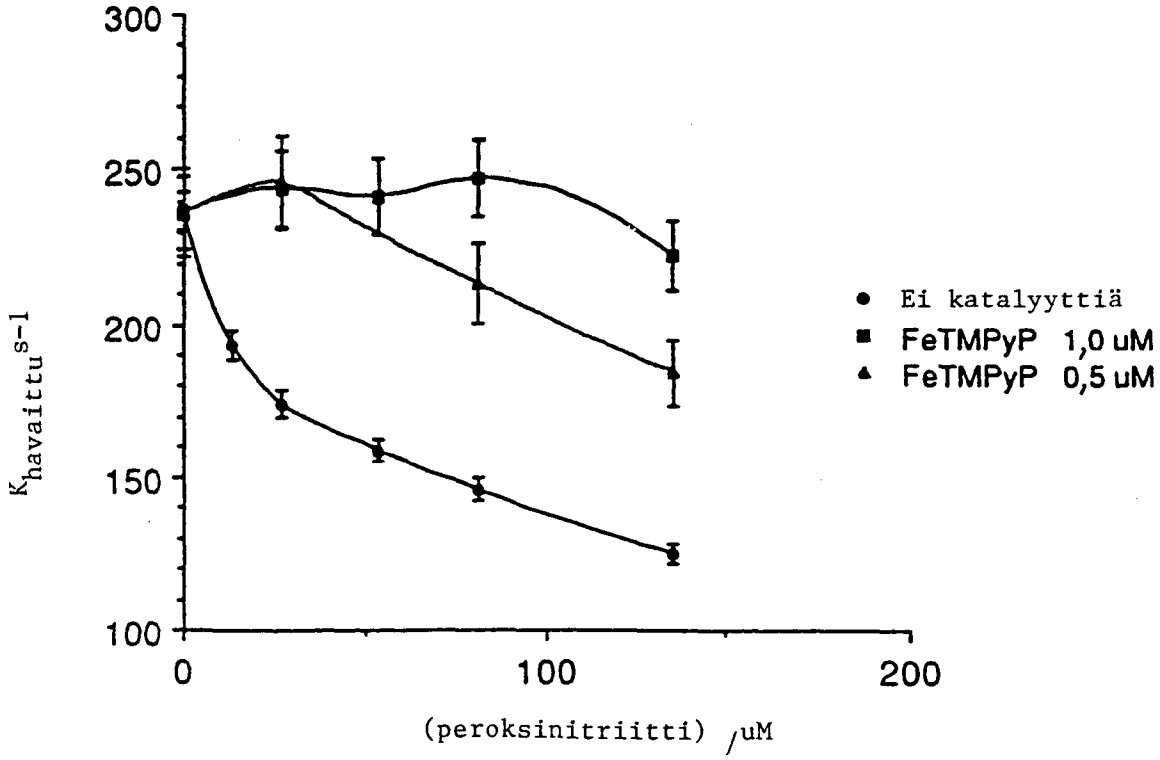
Kuvio 1

Peroksinitriitin aiheuttama CuZnSOD:n inaktivoituminen



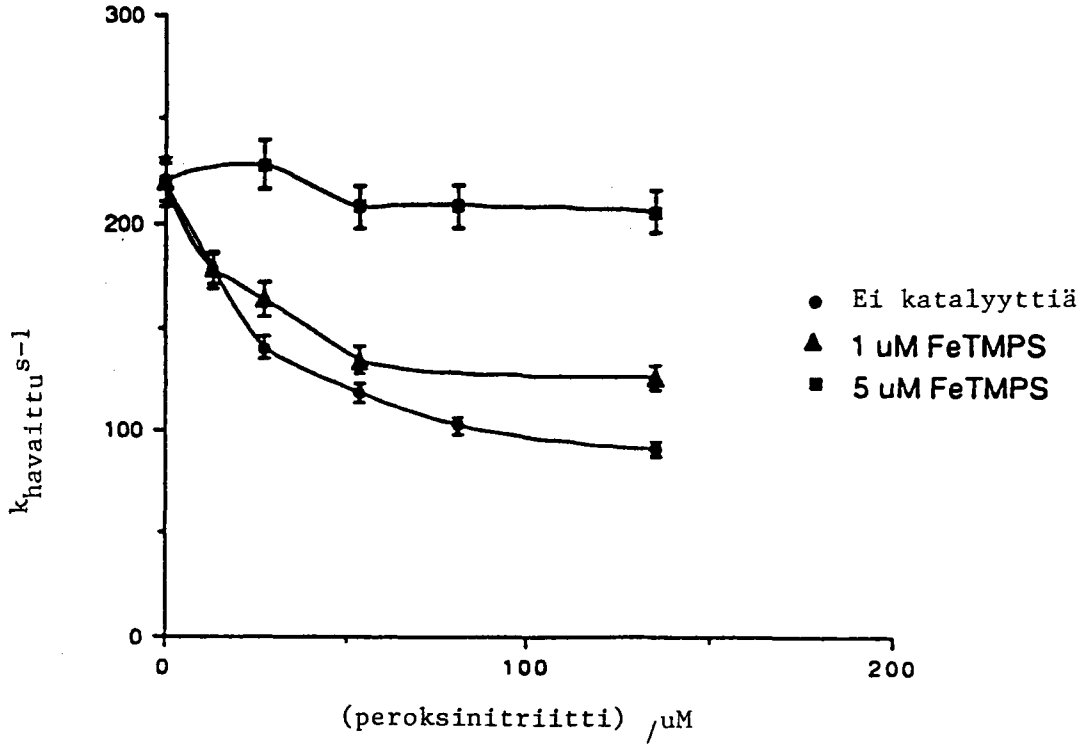
Kuvio 2

Fe(III)TMPyP:n tuottama CuZnSOD:n suojaaminen

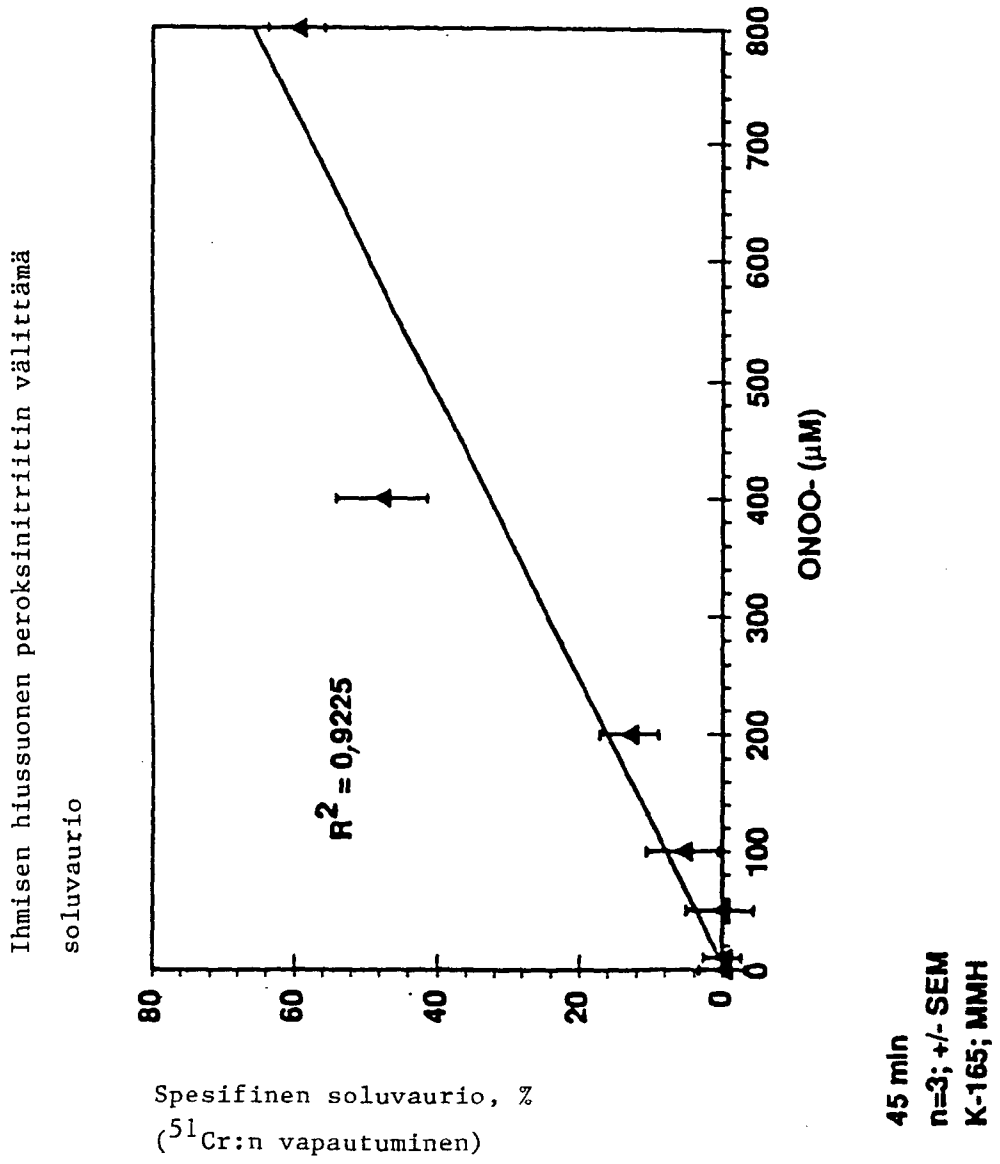


Kuvio 3

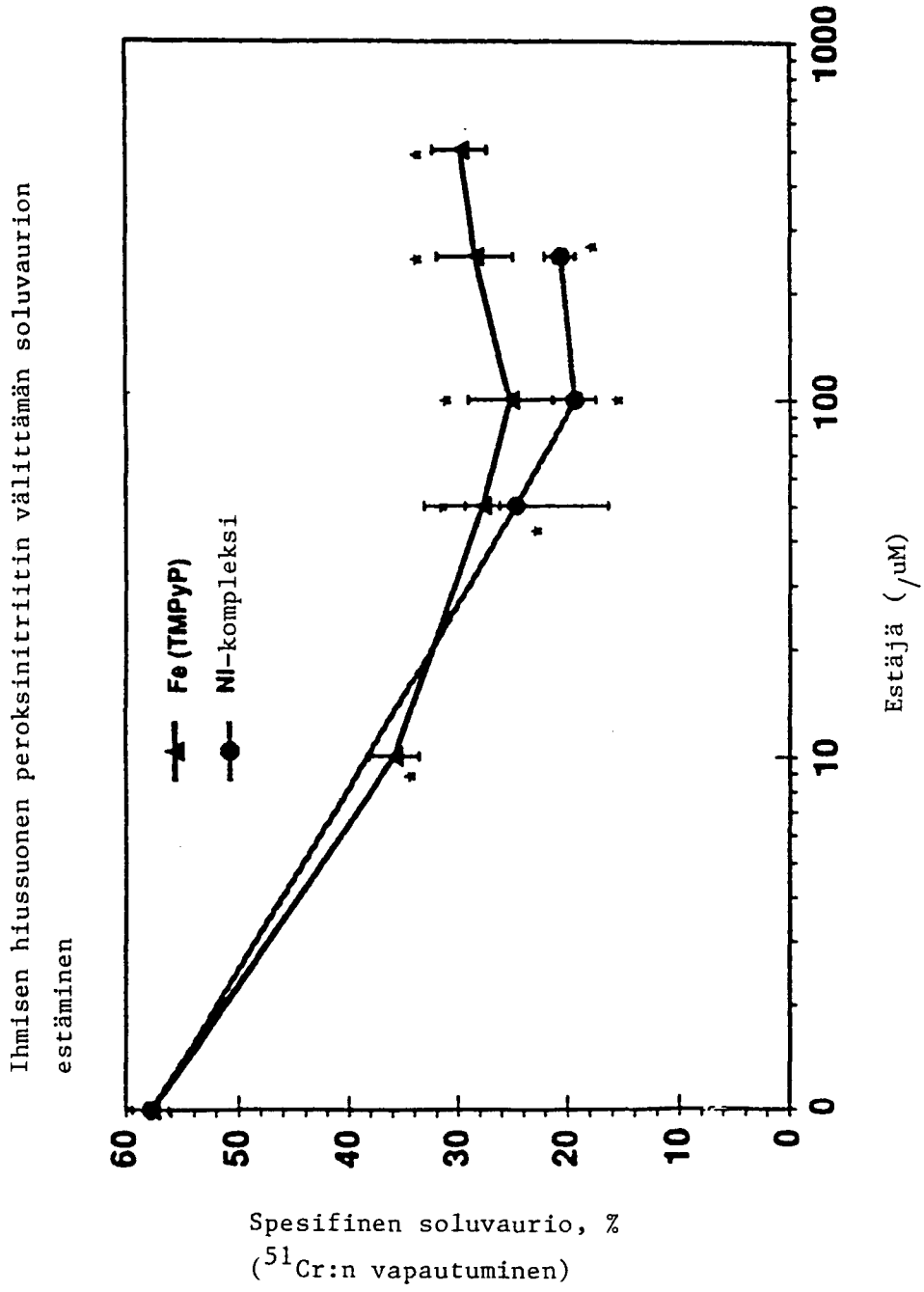
Fe(III)TMPS:n tuottama CuZnSOD:n suojaaminen



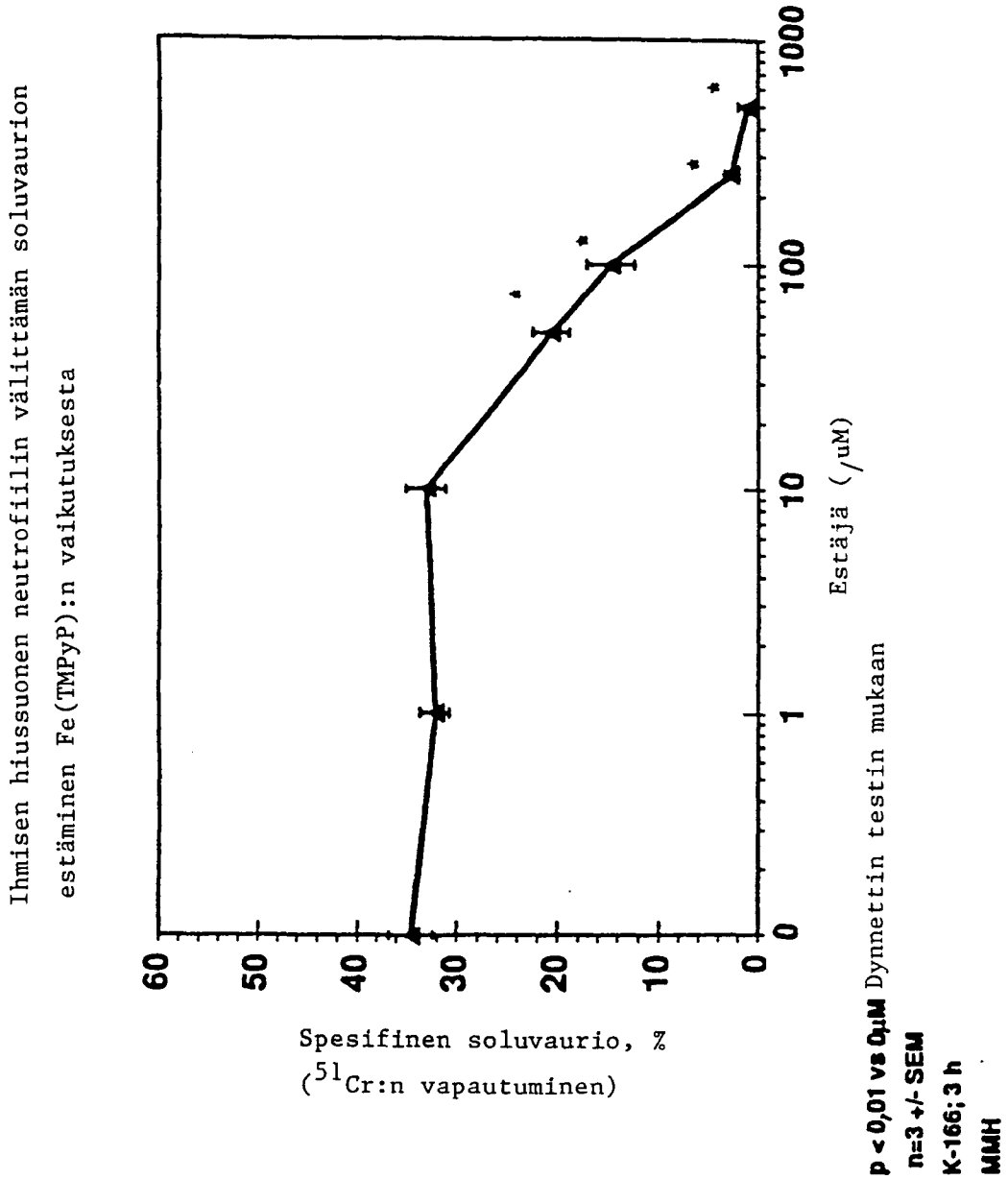
Kuvio 4


Ihmisen hiussuonen peroksinitriitin välittämä soluvaurio
Spesifinen soluvaurio, %
(^{51}Cr:n vapautuminen)
R^2 = 0,9225
ONOO- (µM)
0
100
200
300
400
500
600
700
800
0
20
40
60
80
45 min
n=3; +/- SEM
K-165; MMH

Kuvio 5

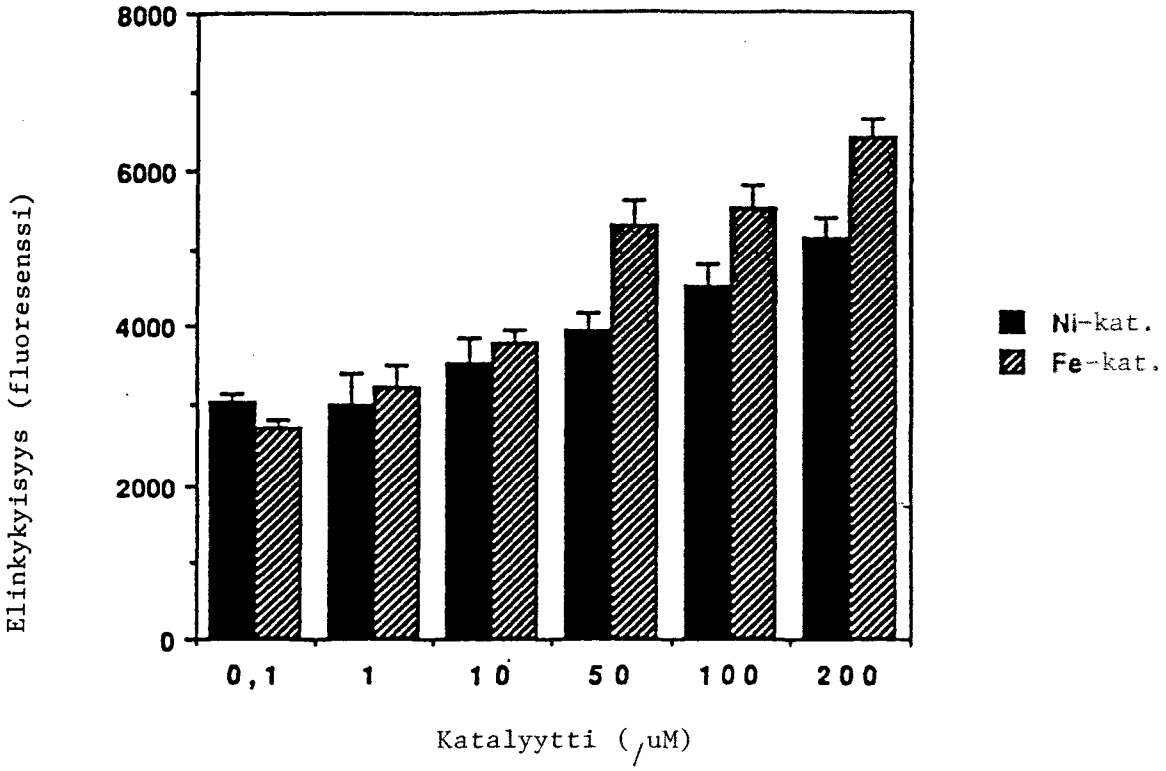

Ihmisen hiussuonen peroksinitriitin välittämän soluvaurion estäminen
Fe (TMPyP)
Ni-kompleksi
Spesifinen soluvaurio, %
(^{51}Cr:n vapautuminen)
Estäjä (µM)
0
10
100
1000
0
10
20
30
40
50
60
* p < 0,01 vs 0µM Dynettin testin mukaan
K-164; n=3 +/- SEM; 45 min
MMH

Kuvio 6


Ihmisen hiussuonen neutrofiilin välittämän soluvaurion estäminen Fe(TMPyP):n vaikutuksesta
Spesifinen soluvaurio, %
(51Cr:n vapautuminen)
60
50
40
30
20
10
0
0
1
10
100
1000
Estäjä (/uM)
* p < 0,01 vs 0 uM Dynettin testin mukaan
n=3 +/- SEM
K-166; 3 h
MMH

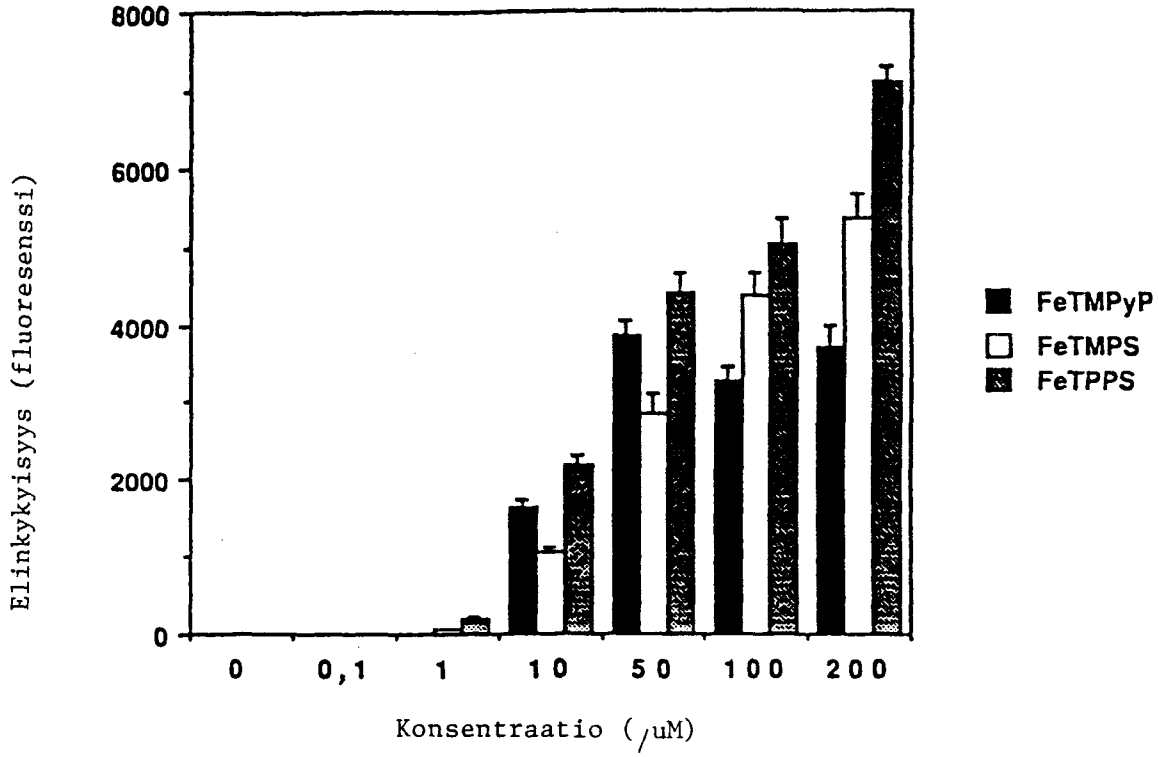
Kuvio 7

Ni- ja Fe-katalyytin vertaaminen
RAW-solujen suojaaminen PN:n välittämältä vauriolta

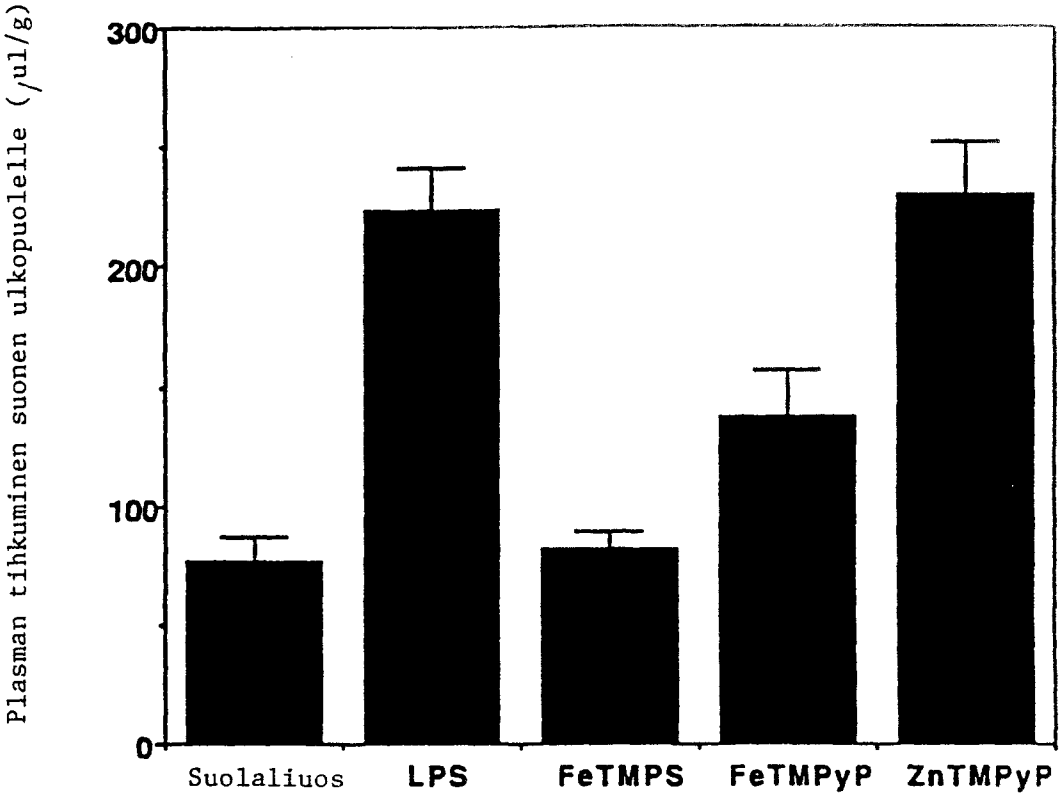


Kuvio 8

Suojaaminen peroksinitriitin välittämältä
RAW-solujen vauriolta



Kuvio 9


Plasman tihkuminen suonen ulkopuolelle (µl/g)
300
200
100
0
Suolaliuos
LPS
FeTMPS
FeTMPyP
ZnTMPyP

Kuvio 10

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
Patentti- ja innovaatiolinja
PL 1160
00101 Helsinki

TUTKIMUSRAPORTTI

PATENTTIHAKEMUS NRO	LUOKITUS, IPC7
964537	A61K 31/40

TUTKITUT PATENTTILUOKAT (luokitusjärjestelmät ja luokkatiedot)

TUTKIMUKSESSA KÄYTETYT TIETOKANNAT

VIITEJULKAISUT

Kategoria*)	Julkaisun tunnistetiedot ja tiedot sen olennaisista kohdista	Koskee vaatimuksia
	FR 2676358 A, I.R.2.M Société en Nom Collectif, 27.11.1992	
	WO 89/11274 A2, Georgia State University Foundation Inc, 30.11.89	

Jatkuu seuraavalla sivulla ☐

*) X Julkaisu, jonka perusteella keksintö ei ole uusi tai ei eroa olennaisesti ennestään tunnetusta tekniikasta.
Y Julkaisu, jonka perusteella keksintö ei eroa olennaisesti ennestään tunnetusta tekniikasta, kun otetaan huomioon tämä ja yksi tai useampi samaan kategoriaan kuuluva julkaisu yhdessä.
A Yleistä tekniikan tasoa edustava julkaisu.

O Tullut julkiseksi esitelmän välityksellä, hyväksikäyttämällä tai muutoin muun kuin kirjoituksen avulla.
P Julkaistu ennen hakemuksen tekemispäivää mutta ei ennen aikaisinta etuoikeuspäivää.
T Julkaistu hakemuksen tekemispäivän tai etuoikeuspäivän jälkeen ja valaisee keksinnön periaatetta tai teoreettista taustaa.
E Aikaisempi suomalainen tai Suomea koskeva patentti- tai hyödyllisyysmallihakemus, joka on tullut julkiseksi hakemuksen tekemispäivänä (etuoikeuspäivänä) tai sen jälkeen.
D Julkaisu, joka on mainittu hakemuksessa.
L Julkaisu, joka kyseenalaistaa etuoikeuden, osoittaa toisen julkaisun julkaisupäivämäärän tai johon viitataan jostakin muusta syystä.

& Samaan patenttiperheeseen kuuluva julkaisu.

Lisätietoja liitteessä ☐

Päiväys	Tutkijainsinööri