



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 696 31 527 T2 2004.09.23

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 0 832 094 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 696 31 527.0

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US96/10508

(96) Europäisches Aktenzeichen: 96 922 490.6

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 96/40728

(86) PCT-Anmeldetag: 07.06.1996

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 19.12.1996

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 01.04.1998

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 11.02.2004

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 23.09.2004

(51) Int Cl.⁷: C07J 41/00

A61K 31/575, G01N 33/48

(30) Unionspriorität:

475572	07.06.1995	US
476855	07.06.1995	US
479455	07.06.1995	US
483057	07.06.1995	US
483059	07.06.1995	US
487443	07.06.1995	US
479457	07.06.1995	US

(73) Patentinhaber:

Genaera Corp., Plymouth Meeting, Pa., US

(74) Vertreter:

HOFFMANN · EITLE, 81925 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,
LU, MC, NL, PT, SE

(72) Erfinder:

ZASLOFF, Michael, Merion Station, US; SHINNAR,
Ann, Teaneck, US; KINNEY, William A., Richboro,
US; WILLIAMS, Jon, Robbinsville, US; RAO,
Meena N., Lansdale, US; ANDERSON, Mark,
Norristown, US; MCLANE, Michael, Lansdale, US;
JONES, Steven, West Chester, US

(54) Bezeichnung: AMINOSTERINVERBINDUNGEN ALS INHIBITOREN DER NATRIUM/PROTON-PUMP, PHARMAZUTISCHE METHODEN UND PRÄPARATEN DAVON

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingeleitet, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung**Erfindungsgebiet**

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Aminosterolverbindungen, die als Inhibitoren des Natrium/Protonen-Austauschers (NHE) nützlich sind. Die Erfindung betrifft auch pharmazeutische Zusammensetzungen, die solche Verbindungen enthalten, und die Verwendung solcher Verbindungen zum Inhibieren des NHE. Außerdem ist die Erfindung auf Untersuchungstechniken zum Durchmustern hinsichtlich der Wirksamkeit von Verbindungen als NHE-Inhibitoren ausgerichtet.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Jede der Zellen des Körpers muss ihr Säure-Basen-Gleichgewicht bewahren, oder genauer gesagt, ihre Wasserstoffionen- oder Protonen-Konzentration. Nur geringe Veränderungen der Wasserstoffionen-Konzentration verursachen merkliche Veränderungen der Raten der chemischen Reaktion in den Zellen – einige werden unterdrückt und andere werden beschleunigt. Sehr breit und allgemein formuliert bedeutet das, dass wenn eine Person eine hohe Wasserstoffionen-Konzentration (Acidose) hat, dass diese Person wahrscheinlich in einem Koma stirbt, und wenn eine Person eine niedrige Konzentration an Wasserstoffionen hat (Alkalose) kann er oder sie an Tetanus oder Krämpfen sterben. Zwischen diesen Extremen gibt es einen bemerkenswerten Bereich an Erkrankungen und Zuständen, die von den betroffenen Zellen und vom Niveau der wahrgenommenen Wasserstoffionen-Konzentration abhängen. Deswegen ist die Regulierung der Wasserstoffionen-Konzentration einer der wichtigsten Aspekte der Homöostase.

[0003] Ein Kurzschriftverfahren zur Beschreibung der Wasserstoffionen-Konzentration ist der pH-Wert: $pH = \log 1/(H^+ \text{-Konzentration}) = -\log (H^+ \text{-Konzentration})$. Der pH-Wert der normalen Zelle beträgt 7,4, aber eine Person kann nur sehr wenige Stunden mit einem pH-Wert von weniger als 7,0 oder mehr als 7,7 leben. Deswegen ist die Bewahrung des pH-Werts kritisch fürs Überleben.

[0004] Es gibt einige Mechanismen, das pH-Gleichgewicht zu bewahren. Während des Ruhezustands oder des konstitutiven Wachstums z. B. scheinen die Zellen den Chlorid/Bicarbonat-Austauscher zu verwenden, eine gut untersuchte Vorrichtung, die einen Protonen-Austausch über die Zellen ermöglicht, wie beispielsweise in roten Blutkörperchen.

[0005] Außerdem verwenden Zellen während beschleunigter Wachstumsperioden, die durch Mitogene, Wachstumsfaktoren, Sperma etc. induziert werden, ein weiteres Stück der zellulären Ausrüstung, um den bevorstehenden metabolischen Ausbruch zu handhaben. Dies ist der Natrium/Protonen (Na^+/H^+)-Austauscher – der „NHE“, der auch als „Antiporter“ bezeichnet wird. Da der NHE in einer Anzahl von Rollen und in einer Anzahl von Geweben arbeitet, hat der Körper eine Familie von NHEs entwickelt, und eine kürzlich erschienene Arbeit hat eine Familie von NHE-„Isoformen“ aufgeklärt, die in bestimmten Geweben lokalisiert sind und mit verschiedenen Funktionen assoziiert sind. Die NHE-„Isoformen“, die unten aufgeführt werden, sind höchstwahrscheinlich bedeutend.

[0006] NHE1 ist ein „Haushalts“-Austauscher und es wird vermutet, dass er bei der Hypertension nicht reguliert ist. Man vermutet, daß er eine Rolle im intrazellulären pH-Verhalten spielt. Außerdem wird geglaubt, dass die Kontrolle dieses Austauschers einen Patienten vor einer ischämischen Verletzung schützt.

[0007] NHE1 ist genetisch mit Diabetes assoziiert und dadurch kann die Hemmung das Voranschreiten des Diabetes durch Wirkungen auf die β -Zellen im Pankreas verändern. Zusätzlich ist das Wachstum vaskulärer glatter Muskulatur, die auf Glucose reagiert, mit einer erhöhten Expression von NHE1a assoziiert.

[0008] NHE1 β ist auf kernhaltigen Erythrozyten vorhanden. Er wird durch hohe Konzentrationen an Amilorid inhibiert. Diese NHE-Isoform wird durch adrenerge Mittel in einer cAMP-abhängigen Weise reguliert.

[0009] NHE2 ist mit zahlreichen Zellen des GI-Trakts und der Skelettmuskulatur assoziiert. Die Inhibierung könnte das Wachstum hyperplastischer Stadien oder hypertrophischer Stadien wie beispielsweise einer Hypertrophie der glatten Gefäßmuskulatur oder einer Herz-Hypertrophie verändern. Krebsformen muskulären Ursprungs, wie beispielsweise Rhabdomyosarkom oder Leiom sind vernünftige therapeutische Ziele.

[0010] NHE3 ist mit dem Dickdarm assoziiert. Die unten beschriebene Arbeit zeigt, dass es mit Endothelzellen assoziiert ist. Die Inhibierung würde Funktionen wie beispielsweise den Wasseraustausch im Darm betreffen (erhöhter Darmflüssigkeitsfluß, welcher beispielsweise die Grundlage von Verstopfung ist), Darmkrebs, etc. Auf Endothelzellen würde normales Wachstum durch die Inhibierung des Austauschers gehemmt.

[0011] NHE4 ist mit bestimmten Zellen der Niere assoziiert. Es scheint eine Rolle in der Regulierung des zellulären Volumens zu spielen. Spezifische Inhibitoren könnten die Nierenfunktion beeinflussen, und dadurch einen therapeutischen Nutzen bei Hypertension bieten.

[0012] NHE5 ist mit Lymphgewebe und Zellen des Gehirns assoziiert. Die Inhibierung von NHE5 könnte die Hemmung proliferativer Erkrankungen, die diese Zellen einschließen, verursachen. NHE5 ist ein möglicher Kandidat für die Proliferation von Gliazellen aufgrund von HIV- und weiteren viralen Infektionen.

[0013] Wie oben angemerkt, könnte die Inhibierung der NHE-Funktion bedeutende therapeutische Vorteile liefern, obwohl der NHE so funktioniert, dass er dem Körper hilft. Obwohl der NHE z. B. normalerweise nur arbeitet, wenn der intrazelluläre pH-Wert unter ein bestimmtes Niveau an Azidität sinkt, werden die NHEs durch Wachstumsfaktorstimulierung angeschaltet, obwohl die Zelle in einem "normalen" Ruhe-pH-Wert ausbalanciert ist. Infolgedessen beginnen die NHEs damit, Protonen bei einem pH-Wert aus der Zelle zu pumpen, bei dem sie normalerweise inaktiv sind. Die Zelle durchläuft so einen fortschreitenden Protonenverlust, was seine Netto-Puffer-Kapazität steigert oder in einigen Fällen tatsächlich alkaliert. Bei Einstellungen, wo die Pumpe vom Arbeiten abgehalten wird, führt der Wachstumsstimulus nicht zu einem zellulären Effekt. So üben Inhibitoren der NHE-Familie wahrscheinlich wachstumsinhibitorische Wirkung aus.

[0014] Während schwerem Säurestress – ein Zustand, in dem sich ein Gewebe befinden kann, wenn es von der Sauerstoff-Versorgung abgeschnitten ist (oder von der Blutzufuhr) – geht man davon aus, dass die NHE-Familie an der folgenden irreversiblen Schädigung beteiligt ist. Wenn der Blutfluss zum Herzen beispielsweise gestört ist, tritt eine lokale Azidose auf. Herzmuskelzellen entwickeln eine tiefe interne Azidität. Diese Azidität wiederum aktiviert ansonsten schlafende NHEs. Diese Austauscher eliminieren die Protonen schnell aus der Zelle, aber im Austausch für Natrium. Infolgedessen steigen die intrazellulären Natriumkonzentrationen. Anschließend wird der Natrium-Calcium-Austausch aktiviert, der internes Natrium für externes Calcium austauscht. Der Anstieg der internen Calcium⁺-Konzentration führt zu Zelltod, abgesenkter Kontraktilität und Arrhythmien. Daher glaubt man, dass ischämische Myokardschädigungen und assoziierte Arrhythmien von einem NHE-abhängigen Mechanismus ausgehen und die Inhibierung dieses NHEs könnten deswegen solch ein Auftreten verhindern. Falls der NHE inhibiert wird, könnte die Internalisierung von Na⁺ und langsamere metabolische Aktivität als Konsequenz des abgesenkten pH-Werts Schäden an der Zelle vermeiden. Dadurch gibt es ein Interesse an der Entwicklung von NHE-Inhibitoren zur Verwendung bei Herzschämie.

[0015] Weitere Mitglieder der NHE-Familie scheinen eine eher klassische Rolle beim Wasser- und Natriumtransport über epitheliale Oberflächen zu spielen. Insbesondere die NHE3-Isoform, die im Darm gefunden wird, spielt vermutlich eine Rolle beim Regulieren des Flüssigkeitsgehaltes des Darmlumens. Diese Pumpe ist in Fällen der Diarrhoe gehemmt. Die NHE3-Isoform, die auf dem proximalen Tubuli der Niere vorhanden ist, spielt vermutlich eine ähnliche Rolle hinsichtlich des Nierensalz- und Säureaustausches. Demgemäß sind Inhibitoren der NHE-Familie als therapeutische Modalitäten zur Behandlung von Hypertension angesehen worden.

[0016] Im Hinblick auf den erwarteten Wert der Hemmung der NHE-Wirkung haben Wissenschaftler NHE-Inhibitoren aufgespürt. Der am besten untersuchte Inhibitor von NHE ist Amilorid, ein Guanidin-modifiziertes Pyrazin, das klinisch als Diuretikum verwendet wird. Eine Anzahl an Derivaten sind erzeugt worden, indem verschiedene Alkylsubstituierungen inkorporiert wurden. Diese Derivate wurde an den verschiedenen Isoformen von NHE, die bekannt sind und oben beschrieben wurden, außer für NHE5, für das kein bekannter Inhibitor vorhanden ist, studiert.

[0017] Die Wirkungen dieser Inhibitoren gegen diese spezifischen Austauscher sind vorher bestimmt worden. Wie in Tabelle A unten ersichtlich wird, weist jeder Austauscher ein unterschiedliches Spektrum einer Reaktion auf jeden Inhibitor auf:

Tabelle A

	Amilorid <u>K_i</u> (μM)	DMA <u>K_i</u> (μM)	MPA <u>K_i</u> (μM)
NHE1	3	0,1	0,08
NHE2	3	0,7	5,0
NHE3	100	11	10

Anmerkungen:

DMA Dimethylamilorid
MPA Methylpropylamilorid

[0018] Siehe Counillon et al., Molecular Pharmacology, 44, 1993, 1041–1045.

[0019] Die von Counillon et al. beschriebenen NHE-Inhibitoren weisen eine Spezifität für NHE1 auf. Sie dienen daher einem therapeutischen Nutzen bei der Behandlung von Zuständen, wo eine Inhibierung dieser Isoform günstig ist. Diese Inhibitoren zielen jedoch nicht auf die anderen bekannten NHE-Isoformen ab – d. h.

NHE3 wird nicht betroffen.

[0020] Wie unten gezeigt wird, wird NHE3 auf Endothelzellen exprimiert und seine Inhibierung führt zu anti-angiogenen Wirkungen. Das Spektrum der NHE-Isoformen, die durch die Aminosterolverbindungen gemäß der Erfindung inhibiert werden, sind verschieden von denen, die durch Amilorid oder die Verbindungen von Counillon et al. inhibiert werden, und haben unterschiedliche verschiedene pharmakologische Wirkungen.

[0021] Zusätzlich haben Counillon et al. auch berichtet, dass bestimmte Benzoylguanidin-Derivate weitere NHE-Isoformen inhibieren. Insbesondere 3-Methylsulfonyl-4-piperidinobenzoyl-guanidin-methansulfonat weist eine besondere Selektivität für NHE1 auf, wie in der Tabelle unten gezeigt wird.

Tabelle B

NHE-Isoform	K_i (μM)
NHE1	0, 16
NHE2	5, 0
NHE3	650

[0022] Diese Benzoylguanidin-Verbindungen, die auf der chemischen Struktur von Amilorid beruhen, weisen die größte Spezifität für das Inhibieren von NHE1 auf, während sie eine beträchtliche Wirkung gegen NHE2 und NHE3 bewahren. Um eine pharmakologische Inhibierung von NHE1, der weit verbreiteten "Haushalts"-Isoform zu erreichen, würde eine nicht erwünschte Inaktivierung von NHE2 und NHE3 auftreten.

[0023] Fachleute haben deswegen ihre Suche nach NHE-Inhibitoren fortgesetzt, die eine selektive Wirkung gegen ein einziges spezifisches NHE aufweisen. Solche Inhibitoren würden eine präzisere Inhibierung eines Gewebes durch Stören der Wirkung des NHEs auf dessen Wachstum erlauben.

[0024] Deswegen haben die Fachleute erkannt, dass die Entwicklung von verschiedenen NHE-spezifischen Inhibitoren die Entwicklung neuer Therapien für eine ganze Anzahl an Erkrankungen oder Zuständen ermöglichen würde, einschließlich: Behandlung von Arrhythmien, Behandeln und Verhindern von Herzinfarkten; Behandeln und Verhindern von Angina pectoris und ischämischer Störungen des Herzens; Behandeln und Verhindern ischämischer Störungen des peripheren und zentralen Nervensystems; Behandeln und Verhindern ischämischer Störungen der peripheren Organe und Gliedmaßen; Behandlung von Schocks; Bereitstellen von anti-arteriosklerotischen Mitteln; Behandlung von diabetischen Komplikationen; Behandlung von Krebsen; Behandlung von fibrotischen Erkrankungen, einschließlich Fibrosen der Lunge, Leber und Niere; und Behandeln von Prostatahyperplasie. Weitere therapeutische Ziele schließen ein: Behandlung viraler Erkrankungen, wie beispielsweise HIV, HPV und HSV; Verhinderung von bösartigen Tumoren; Verhinderung von Diabetes (d. h. Inselzellverletzung); Verhinderung vaskulärer Komplikationen beim Diabetes; Behandlung von Störungen oder nicht normaler Neovaskularisierung, z. B. makulare Degeneration, rheumatoide Arthritis, Psoriasis, Krebs, maligne Hemangiome; Verhinderung von vaskulärer Retenose; Verhinderung von vaskulären Schäden, die mit Hypertension assoziiert sind; Immunsuppression und Behandlung von vaskulären Collagenstörungen.

[0025] Inhibitoren von NHEs von Bakterien, Pilzen und Protozoen würden auch als spezifische Mikrobizide wertvoll sein. Es ist bekannt, dass alle lebenden Zellen einen NHE einer Form oder einer anderen verwenden, um das intrazelluläre Na^+ und die pH-Homöostase zu bewahren. NHEs wurden aus zahlreichen Bakterien und Pilzen kloniert und weisen einige Sequenzhomologie gegenüber Säuger-Isoformen auf. Unter Verwendung hochspezifischer bakterieller oder pilzlicher NHEs als Ziel sollte es möglich sein, hochspezifische Inhibitoren eines solchen Austauschers zu entwickeln, d. h. einen, der besonders vorteilhaft ist, oder der keine Wirkung gegen die Säuger-Isoformen aufweist. Solche Verbindungen würden als Antibiotika eines unterschiedlichen Mechanismus nützlich sein.

[0026] Deswegen gibt es in diesem Fachgebiet einen Bedarf an spezifischen Inhibitoren von NHEs. Außerdem gibt es einen Bedarf, NHE-Inhibitoren für zahlreiche therapeutische Verwendungen zu entwickeln.

Zusammenfassung der Erfindung

[0027] Die vorliegende Erfindung erfüllt die im Fachgebiet geforderte Notwendigkeit der Bereitstellung von zahlreichen Aminosterolverbindungen, die zahlreiche NHE's inhibieren. Die Erfindung ist auf Aminosterolverbindungen ausgerichtet, die eine inhibitorische Wirkung auf NHE's ausüben, und auf Zusammensetzungen, die solche Verbindungen enthalten.

[0028] Daher ist die Erfindung auf neu isolierte und synthetisierte Aminosterolverbindungen ausgerichtet, die als Inhibitoren von NHE's wirken, wie beispielsweise die Verbindungen FX1A, FX1B, 1360, 1361, 1437 und 1436. Bei einigen dieser Steroidverbindungen wurde gefunden, dass sie ein Spektrum an NHEs inhibieren, während andere sich als vorteilhaft für das Inhibieren eines einzelnen, spezifischen NHE erwiesen.

[0029] Außerdem ist die Erfindung auf pharmazeutische Verwendungen und Therapien ausgerichtet, die die erfindungsgemäßen Verbindungen verwenden. Die Erfindung ist auch auf neue pharmazeutische Verwendun-

gen von Squalamin und pharmazeutisch annehmbare Salze davon ausgerichtet, die kürzlich isoliert und charakterisiert worden sind.

[0030] Zusätzlich richtet sich die Erfindung auf vorteilhafte Screening-Verfahren zum Untersuchen der therapeutischen Wirksamkeit einer Verbindung. Insbesondere ist ein Kaulquappentest entwickelt worden, der als günstiges Werkzeug zum Durchmustern von Verbindungen zur NHE-Inhibierung und der therapeutischen Wirkungen befunden wurde.

[0031] Eine besonders bevorzugte Verbindung der Erfindung ist die Verbindung 1436 (oder ein pharmazeutisch annehmbares Salz davon). Die Erfindung richtet sich auf eine pharmazeutische Zusammensetzung, die eine wirksame Menge dieser Verbindung umfasst und einen pharmazeutisch annehmbaren Trägerstoff oder Träger. Die Erfindung richtet sich des Weiteren auf ein Verfahren zum Inhibieren von Zellproliferation, umfassend die Verabreichung einer wirksamen Menge der Verbindung 1436., und insbesondere auf ein Verfahren bei dem die Zellen maligne Zellen, glatte Gefäßmuskelzellen, glatte Bronchialmuskelzellen, Fibroblasten, Lymphozyten oder Lymphgewebe, Muskulatur, Knochen, Knorpel, Epithel, hämatopoietisches Gewebe oder Nervengewebe sind. Außerdem richtet sich die Erfindung auf ein Verfahren zum Inhibieren der Zellproliferation, umfassend das Verabreichen einer wirksamen Menge einer Zusammensetzung, welche die Verbindung 1436 und Squalamin umfasst. Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zum Unterdrücken des Immunsystems durch die Inhibierung der Proliferation von Lymphozyten, umfassend das Verabreichen einer wirksamen Menge der Verbindung 1436. Zusätzlich schließt die Erfindung das Unterdrücken des Wachstums eines Wirbeltiers ein, umfassend das Verabreichen einer wirksamen Menge der Verbindung 1436. Die Erfindung betrifft auch das Behandeln von viralen Infektionen durch das Unterdrücken des Wachstums einer viralen Zielzelle, umfassend das Verabreichen einer wirksamen Menge der Verbindung 1436. Ein Verfahren zum Kontrollieren des arteriellen Drucks, umfassend das Verabreichen einer wirksamen Menge der Verbindung 1436 ist ebenfalls bevorzugt. Die Erfindung richtet sich auch auf ein Verfahren zum Schützen gegen Herzschämie, umfassend das Verabreichen einer wirksamen Menge der Verbindung 1436. Die Erfindung betrifft auch die ein Verfahren zum Schützen von transplantierten Organen, umfassend die Verabreichung einer wirksamen Menge der Verbindung 1436. Außerdem richtet sich die Erfindung auf ein Verfahren zum Behandeln einer Infektion, die durch ein mikrobielles Agens verursacht wird, wie beispielsweise Bakterien, Viren, Pilze, und Protozoen, umfassend die Verabreichung einer wirksamen Menge der Verbindung 1436. Die Erfindung betrifft auch die Verabreichung einer wirksamen Menge dieser Verbindung, um NHE zu inhibieren.

[0032] Die Erfindung richtet sich auch auf Verfahren zum Inhibieren von NHE3, bevorzugt ein Verfahren um diese NHE-Isoform spezifisch zu Inhibieren, die in einem pathologischen Prozess exprimiert ist, umfassend die Verabreichung einer wirksamen Menge an Squalamin (oder eines seiner pharmazeutisch annehmbaren Salze). Ein weiteres erfindungsgemäßes Verfahren schließt das Inhibieren des Wachstums von Endothelzellen ein, insbesondere denen neuer Kapillaren, umfassend die Verabreichung einer wirksamen Menge an Squalamin.

[0033] Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zum Untersuchen einer Verbindung hinsichtlich der NHE-inhibierenden Wirkung, oder der antiangiogenen Wirkung, umfassend das Durchführen eines Kaulquappen-Tests, umfassend die Schritte: (i) Herstellen einer wässrigen Lösung, die eine Verbindung enthält, die getestet werden soll (z. B. in einer Konzentration von 10 µg/ml); (ii) Hinzugeben einer Kaulquappe in die Lösung; und (iii) nach mindestens einem zeitlichen Intervall (z. B. ungefähr eine Stunde), Beobachten der Kaulquappe (z. B. ihren Schwanz und/oder Hände und Füße) unter einem Mikroskop. Bevorzugt, ist die Kaulquappe eine Xenopus-Kaulquappe, mehr bevorzugt eine Xenopus-Kaulquappe im Stadium 59–60. Ein solcher Test kann alleine oder in Kombination mit einem weiteren Test verwendet werden, z. B. einem Hühner-Chorioallantoin-membran-Test und/oder einem Hühnerembryo-Vitellin-Kapillarregressionstest.

[0034] Weitere Aspekte, Ziele und Vorteile werden aus der detaillierten Beschreibung unten klar, welche bevorzugte Eigenschaften und Ausführungsformen der Erfindung zusammen mit den anhängenden Figuren darstellt.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0035] Die **Fig. 1A** und **1B** zeigen die Inhibierung von Kaninchen- Natrium/Protonen-Austauscher Isoform 3 (NHE3) durch Squalamin. **Fig. 1A** ist ein Balkendiagramm der pH-Erholungsrate (y-Achse) als Funktion der wiederhergestellten Natriumion-Konzentration (X-Achse) für säurevorbeladene Zellen, durch Exposition gegenüber 40 mmol NH₄Cl wobei die Kurve, die durch "+" markiert ist, für die Kontrolle steht (kein Medikament) und die Kurve, die mit "Δ" gekennzeichnet ist für Squalamin steht. **Fig. 1B** zeigt den tatsächlichen internen pH-Wert (y-Achse) als Funktion der Zeit (x-Achse) nach der Zugabe von 5 µg/ml Squalamin bei nicht säurevorbeladenen Zellen.

[0036] **Fig. 2A** zeigt den Mangel an Inhibierung von Kaninchen- Natrium/Protonen-Austauscher Isoform 1 (NHE1) durch Squalamin. **Fig. 2B** zeigt das Fehlen einer Inhibierung des Human-NHE1 durch Squalamin. In diesen beiden Diagrammen des internen pH-WertH-Wers vs. Zeit, steht die Kurve, die mit "o" gekennzeichnet

ist für Squalamin und die mit "+" markiert ist für die Kontrolle (Zellen, die in Abwesenheit von Squalamin inkubiert wurden).

[0037] **Fig.** 3A, 3B und 3C stellen dar, dass Endothelzellen eine größere Sensitivität gegenüber Squalamin aufweisen (Balken über 3 auf der x-Achse) als gegenüber anderen membranwirksamen Mitteln, und dass Endothelzellen sensibler gegenüber Squalamin sind als Epithelzellen und Fibroblasten. **Fig.** 3A steht für die Verabreichung von 1 µg/ml des Mittels gegenüber Lungenendothelzellen des Rinds, während die **Fig.** 3B und 3C für die Verabreichung von 10 µg/ml der membranaktiven Mittel an humane Epithelzellen bzw. humane Vorhautfibroblasten bestehen.

[0038] **Fig.** 4A, 4B und 4C zeigen die Unterdrückung des Wachstums des murinen Melanoms durch die subkutane, intraperitoneale bzw. orale Verabreichung von Squalamin.

[0039] **Fig.** 5 zeigt die Unterdrückung des Wachstums des humanen Melanoms 1205Lu in immunsupprimierten (RAG-1) Mäusen durch Squalamin in verschiedenen Doierungen ("o" = 10 mg/kg/d, "+" = 20 mg/kg/d, "o" = 40 mg/kg/d, d = Tag).

[0040] **Fig.** 6 zeigt die pharmakokinetische Beseitigung von Squalamin aus einer Maus-IV PK-Studie.

[0041] **Fig.** 7 ist ein HPLC-Profil von Aminosterolen, die aus der Leber des Dornhais stammen, was die Diversität dieser Verbindungen darstellt.

[0042] **Fig.** 8 stellt die inhibitorische Wirkung der Verbindung 1436 auf NHE3 dar.

[0043] **Fig.** 9 stellt die Wirkung der Verbindung 1436 auf das Überleben bei Mäusen dar, die eine L1210 Leukämie haben.

[0044] **Fig.** 10 stellt dar, dass Squalamin und die Verbindung 1436 eine Synergie beim Supprimieren des Wachstums eines murinen Melanoms in Mäusen aufweisen.

[0045] **Fig.** 11 und 12 zeigen die *in vitro* Supprimierung des Wachstums glatter Muskulatur aus menschlichen Herzarterien durch die Verbindung 1436 (**Fig.** 13) und Squalamin (**Fig.** 14), wobei die Absorption gegen die Konzentration in µl/ml aufgetragen ist.

[0046] **Fig.** 13 ist ein erweitertes Balkendiagramm der Daten, die in den **Fig.** 12A und 12B gezeigt werden, und die beweisen, dass sowohl die Verbindung 1436 als auch Squalamin *in vitro* das Wachstum glatter Muskulatur aus Human-Koronararterien supprimieren.

[0047] **Fig.** 14 zeigt, dass die Verbindung 1436 das Wachstum von Mäusen in Dosis-abhängiger Weise unterdrückt.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

Synthese der Aminosterol-Verbindungen

[0048] Das als Squalamin bekannte Steroid ist Gegenstand des US-Patentes Nr. 5,192,756 an Zasloff et al. Diese Verbindung ist ein Breitband-Antibiotikum, das Bakterien, Pilze und Protozoen umbringt. Die absolute Stereochemie für Squalamin, Verbindung 1256, wird unten gezeigt. Die gesamte chemische Synthese von Squalamin wurde 1994 berichtet.

Beispiel 1 – Herstellung von Haileber-Isolaten

[0049] Zusätzlich zu Squalamin sind mindestens 10 weitere verschiedene unterschiedliche Aminosterole aus Extrakten aus Dornhaileber gewonnen worden. Um die Aminosterole herzustellen, wurde Haileber in Methanol : Essigsäure extrahiert. Der wässrige Extrakt wurde auf C18-Kieselgel adsorbiert und mit 70% Acetonitril eluiert, und das Eluat wurde an SP-Sephadex adsorbiert und mit 1,5 mol NaCl eluiert. Das Eluat wurde auf 5 Mol NaCl eingestellt, und die Steroide ausgesalzen. Das Präzipitat wurde über Celite filtriert und mit warmem Wasser, gefolgt von Methanol, eluiert. Das Eluat wurde im Volumen reduziert und auf eine 1 inch C18-Säule aufgetragen und einer Chromatographie unter Verwendung eines ansteigenden Gradienten an Acetonitril unterworfen. Die Fraktionen wurden eingesammelt, durch Verdampfen konzentriert und getrennt mittels Dünnschicht-Chromatographie (TLC) analysiert.

[0050] Das HPLC-Profil der Aminosterole, die aus 90 kg Haileber isoliert wurden, ist in der **Fig.** 9 gezeigt. Die endgültige HPLC-Reinigung wurde wie von Moore et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 90, 1993, 1354–1358 beschrieben, durchgeführt. Die HPLC-Fraktionen wurden einzeln durch Kieselgel-Dünnenschicht-Chromatographie (6 : 3 : 1 CH₂Cl : MeOH : NH₄OH) aufgelöst und durch Iodverdampfung visualisiert. Fraktion 40 stellt den eher hydrophilen Teil des Elutionsprofils dar und die Fraktion 66 stellt den mehr hydrophoben Teil dar.

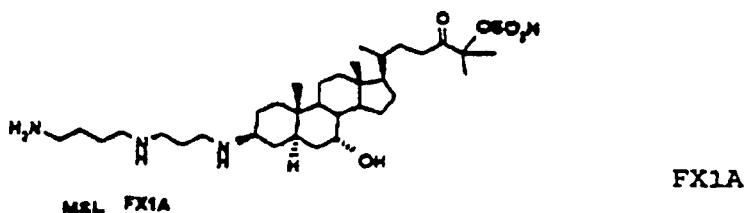
[0051] Squalamin eluiert von ungefähr Fraktion 62 beginnend und geht weiter bis ungefähr zur Fraktion 80. Zusätzlich können weitere Steroide zwischen den Fraktionen 43 bis 47 (R_f 82), 53–55 (R_f 1,02), 56–59 (R_f 0,51), 57–62 (R_f 0,96), 60–64 (R_f 0,47) und 61–66 (R_f 1,06) wie in Tabelle 1 unten beschrieben, eluiert gesehen werden.

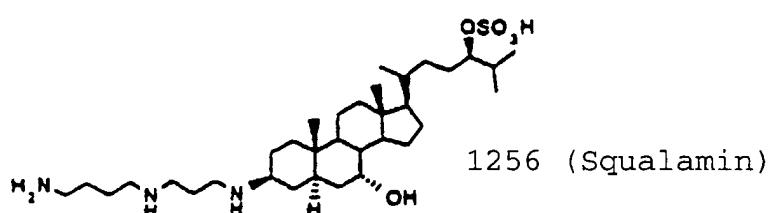
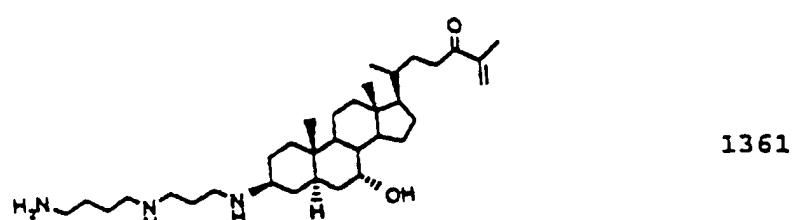
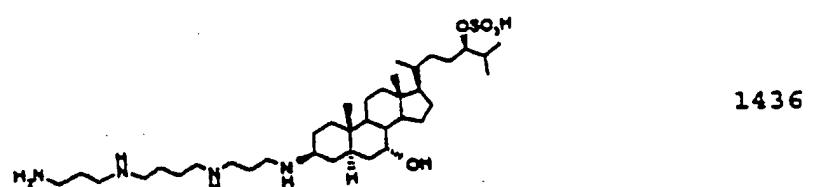
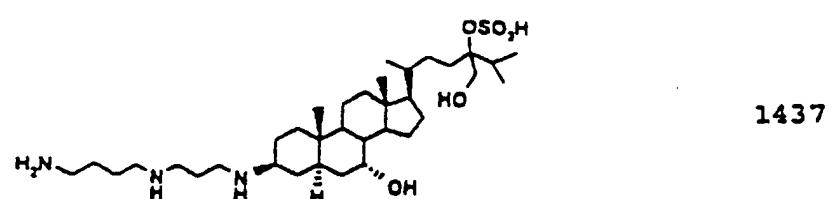
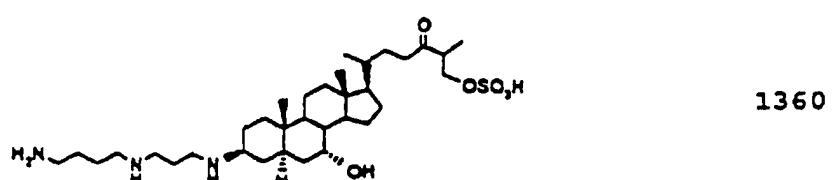
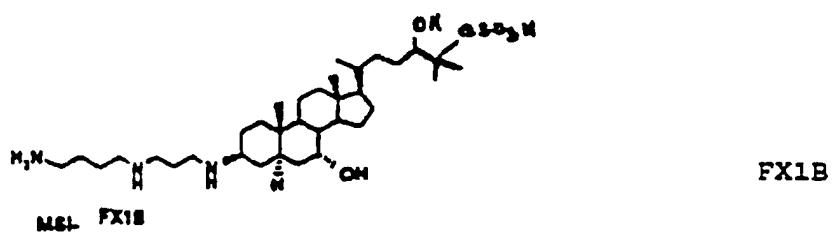
Tabelle 1

Chemische und strukturelle Charakterisierung von Aminosterolen, die aus Haileber isoliert wurden

<u>Fraktion</u>	<u>TLC R_f</u>	<u>Verbindung</u>	<u>Masse</u>
		<u>Nr.</u>	
43-47	0,82	FX 1A	664,5
		FX 1B	641,5
53-55	1,02	1360	641,49
56-59	0,51	FX 3	
57-62	0,96	1437	657,52
50-64	0,47	1436	684,52
61-66	1,05	1361	543,48
63-80	1,0	1256	627,98

[0052] Die Strukturen einiger dieser Verbindungen werden unten gezeigt.





[0053] Jede dieser Einheiten wurde isoliert, gereinigt, charakterisiert und die Struktur mittels NMR wie unten beschrieben, bestimmt.

Verbindung 1360:

[0054] Diese Verbindung, das Hauptsteroid der Fraktion 2 aus der präparativen C18 RP-HPLC wurde durch starken Kationenaustausch unter Verwendung von Sulfoethylaspartamid HPLC mit einem ansteigenden NaCl-Gradienten eluiert. Die Steroidfraktionen wurden mittels Kieselgel TLC, das mit CH₂Cl : CH₃OH : NH₄OH (6 : 3 : 1) entwickelt wurde und mit Iod visualisiert wurde, untersucht. Steroidfraktionen wurden dann gepoolt und mittels C18 RP-HPLC mit einem Gradienten von ansteigendem CH₃CN in wässrigem 0,1%igem TFA re-chromatographiert. Die TLC-Analyse der gereinigten Verbindung zeigte einen einzelnen spot bei R_f = 1,02 hinsichtlich Squalamin (R_f Squalamin = 1,0).

[0055] Bei anschließenden Isolierungen der Verbindung 1360 wurde keine starke Kationenaustausch-Chromatographie durchgeführt. Statt dessen wurden gepoolte Fraktionen aus der präparativen C18 RP-HPLC direkt C18 oder C8 RP-HPLC unter Verwendung eines flacheren CH₃CN-Gradienten unterworfen. Die Fraktionen wurden sowohl durch TLC wie auch für die Proben, die in D₂O gelöst wurden mittels ¹H-NMR untersucht.

[0056] Wenn sie durch FAB-MS untersucht wurde, zeigte die Verbindung typischerweise nur ein sehr schwaches (M + H)⁺-Signal bei 642,5 und ein intensives Fragment bei 562,5 Dalton in dem positiven Ionmodus. Im negativen Ionen-FAB-MS, (M - H)⁻ wurde bei 640,4 beobachtet. Anschließende Elektrospray-Ionisierung (ESI-MS) Analyse zeigte starke (M + H)⁺ und (M - H)⁻ -Signale auf, was mit einer ursprünglichen Masse von 641,4 zusammen mit vielen TFA-Addukten einhergeht. Dies lässt vermuten, dass die Labilität des Sulfats in der Verbindung 1360 unter FAB-Bedingungen stärker war.

[0057] Da das Mutterion im FAB-positiven Ionmodus sehr schwach in der Intensität war, wurde eine akkurate Massenbestimmung anhand des desulfurierten Fragments durchgeführt. Eine akkurate Masse von 561,49325 wurde beobachtet. Eine akkurate Muttermasse von 641,49 Dalton wurde dann durch Zugeben der Masse an SO₄²⁻ errechnet, welches der molekularen Formel C₃₄H₆₃N₃O₆S gleichkommt. Diese molekulare Formel mit einem zusätzlichen Sauerstoff und zwei weniger Wasserstoffen, wenn es mit Squalamin verglichen wird (C₃₄H₆₅N₃O₅S) deutete eine Verbindung, die einen Carbonylrest trägt, an.

[0058] ¹H-NMR der Verbindung 1360 in D₂O (300 MHz) zeigte verschiedene Eigenschaften, die sie vom Squalamin unterscheiden. Bei der Verbindung 1360 trat die Resonanz am weitesten abwärts bei δ = 4,15 ppm auf, wies ein geteiltes Muster von mindestens 7 Signalen mit einer Integration von zwei Protonen auf; bei Squalamin war die am meisten entschützte Resonanz bei δ = 4,2 ppm, die Sulfatposition (H24), aufgelöst bei 300 MHz als ein Multiplet aus 5 Signalen mit einer Integration von einem Proton. Bei 2,6 ppm wies die Verbindung 1360 ebenfalls ein schwach aufgelöstes Multiplet auf, was 2 Protonen zugeordnet werden kann. Es wurde vermutet, dass diese Resonanzen den Methylenproton α an einem Carbonyl zuzuordnen sind, beruhend auf dem Vergleich mit der Literatur. Beim Squalamin wies die Region von 2,2 bis 2,75 keine Resonanzen auf. Die Verbindung 1360 zeigte zwei unterschiedliche Methyldubletten, einen bei 0,95 ppm und den anderen bei 1,1 ppm; das steht dem Squalamin entgegen, in dem drei Methylgruppen als Duplets aufgeteilt sind, die in der 0,9 bis 1,05 ppm Region überlappen. Weitere Resonanz-Charakteristika waren bei den beiden Steroiden ziemlich ähnlich. In der oben liegenden Methylregion wiesen sowohl die Verbindung 1360 und Squalamin annuläre Singlet Methylsignale bei 0,85 und 0,65 ppm, Positionen 19 bzw. 18 auf. Die Resonanzen des Steroidnukleus (1,0 bis 2,1 ppm) und von Spermidin wiesen die gleichen charakteristischen Muster sowohl für die Verbindung 1360 und Squalamin auf. H7 zeigte an der Alkoholposition in dem Ring Resonanz bei 3,85 ppm bei beiden Steroiden in D₂O.

[0059] Ein COSY-Spektrum (correlated spectroscopy), das in D₂O durchgeführt wurde (300 MHz) legte das Sulfat auf der Position 27, -CH₂OSO₃⁻ fest. Diagnostische, sich überkreuzende Muster von Spitzenverten in der zweidimensionalen Frequenz (2D) wiesen darauf hin, dass der Dublettengipfel bei δ 1,1 ppm Methyl 26 war, was dann mit H25 bei 3,05 ppm verbunden war (verdeckt unter den Polyaminresonanzen), welches wiederum der nächste Nachbar zum Komplex-Multiplett bei 4,15 ppm war.

[0060] Die Polyaminregion in der 2D Karte war mit dem Splitmuster des Spermidins konsistent, was bestätigte, dass die Verbindung 1360 das gleiche Polyamin wie Squalamin hat. Ansonsten fehlten dem 2D-Überblick in D₂O viele sich überkreuzende Signale von Spitzensignalen, insbesondere in der Steroidnukleusregion, und konnte nicht zum Etablieren der vollständigen Primärstruktur verwendet werden.

[0061] Verbindung 1360 wurde im Vakuum getrocknet und in DMSO-d6 unter Stickstoff gelöst und dann unter Stickstoff unter Verwendung von Einfrier-Aufbau-Pumpzyklen versiegelt. Sowohl 1D und 2D ¹H-NMR-Spektren wurden bei 300 MHz und bei 600 MHz durchgeführt. Alle Protonenresonanzen der Verbindung in DMSO waren klar (außer für die Polyaminregion (2,8 bis 3,1)) und im Hinblick auf die Zuordnungen in D₂O verlagert. Das Multiplett bei einer Position 27 war beispielsweise abwärts nach 3,77 ppm verlagert und das H7-Proton nach 3,60 ppm verlagert. Zusätzlich trat ein neues Dublettensignal (Integration = 1H) bei 4,17 ppm auf. Diese neue Resonanz wurde als Hydroxyl an Position 7 identifiziert, beruhend auf seiner 2D-Verbindbarkeit mit H7, welches zweifellos bei 600 MHz war. Diese Resonanz konnte in D₂O aufgrund des schnellen Austauschs mit dem Lösungsmittel nicht beobachtet werden. Die 2D-Karte der Verbindung 1360 in DMSO bestätigte den Ort der Sulfatgruppe an der Position 27 erneut, die zuerst aus der 2D-COSY-Map in D₂O abgeleitet wurde.

[0062] Ein vorsichtiger Vergleich der 2D-COSY-Maps für die Verbindung 1360 und Squalamin legte das Vorhandensein eines Carbonyls an der Position 24 nahe. Das Multiplet, das bei 2,5 ppm (2,6 ppm in D₂O) mit einer Integration von zwei Protonen zentriert war, ergab starke Crosspeaks, die diese Resonanzen als H23a,b (lokaliert alpha zum Carbonyl an Position 24) und mit den nächsten Nachbarverbindungen an H22a,b identifizierte. In einem Gesamt-Korrelations-Spektroskopie-Experiment (TOCSY) war ein neuer Crosspeak als H22/H21 erkennbar aufgrund der Propagierung der Magnetisierung entlang des „Schwanzes“ des Steroids. Von 2D-COSY- und TOCSY-Mappen waren die Signale, die eine Propagierung der Magnetisierung von den Positionen 23 zu 24 und dann von 24 zu 25 erlauben würden, zusehends verloren. anders als bei dem COSY für Squalamin, das die nächsten sich überlagernden Nachbar-Spitzenwerte bei 22-23-24-25-26/27 zeigt, zeigte die Verbindung 1360 eine Unterbrechung der Konnektivität, was nahe legte, dass eine funktionale Gruppe an der Position 24 den Transfer des Protonensignals blockierte. Die Struktur kann durch Reduzieren von C=O zu einem Alkohol verifiziert werden, da eine Alkoholgruppe an der Position 24 jedoch für eine vollständige Protonenkonnectivität von den Positionen 21 bis 26 und 27 ermöglichen würde.

[0063] Das ¹³C-NMR der Verbindung 1360 in DMSO zeigte 34 Kohlenstoffsignale. Im Vergleich zu Squalamin hat die Verbindung 1360 ein Carbonyl bei 212 ppm (C24). C27 zeigte Resonanz bei 67 ppm, was in guter Übereinstimmung mit den Werten ist, die für Scymolsulfat berichtet wurden.

Verbindung 1361:

[0064] Verbindung 1361 wurde aus Haileber-Präparaten auf zwei verschiedene Arten isoliert: zuerst wurde ein Abbauprodukt der Verbindung 1360 und anschließend als geringfügiger Aminostyrol-Bestandteil, der mit leicht schnellerer Verzögerungszeit als Squalamin fraktionierte, während der präparativen C18-RP-HPLC (Verbindung der Fraktion VI) zugegeben. Bei frühen Versuchen jedes Aminosterols bis zur Homogenität zu reinigen, wurden die gepoolten Fraktionen aus C18-RP-HPLC einer Kieselgel-Flash-Chromatographie mit CH₂Cl₂ : CH₃OH : NH₄OH 6 : 3 : 1 unterworfen und die Aminosterole wurden auf TLC-Platten untersucht. Die Pools der freien Basensteroide wurden dann erneut einer C18-RP-HPLC unterworfen, unter Verwendung einer analytischen Säule. Das RP-HPLC-Elutionsprofil zeigte zwei Hauptsterioide – Verbindung 1360 und ein zweites, eher hydrophobes Steroid, das bei höherprozentigem CH₃CN eluierte. Die Labilität des Sulfats an der Position 27 in der Verbindung 1360 führte zur Bildung der Verbindung 1361, offensichtlich durch eine base-katalysierte Eliminierung.

[0065] Kennzeichnende Eigenschaften des ¹H-Spektrums der Verbindung 1361 in D₂O (400 MHz) schließen die Abwesenheit eines Multiplets bei δ = 4,15 ppm entsprechend den Methylenprotonen an der Position 27, die das Sulfat tragen, ein. Zwei neue Singlet-Protonen bei δ = 5,95 und 6,15 in D₂O jeweils mit Integrationswerten von ¹H wurden als Vinylprotonen identifiziert. Ebenfalls im Gegensatz zum Methylduplet bei δ = 0,9 ppm in Verbindung 1360 zeigte das neue Steroid ein Singlet-Methyl bei δ = 1,8 ppm, charakteristisch für ein allyles Methyl. Die chemischen Verlagerungen der Vinylgruppen und des allylischen Methyls lassen sich günstig mit Literaturwerten vergleichen. Ansonsten zeigte das ¹H-Spektrum Eigenschaften, die charakteristisch für die Verbindung 1360 sind, einschließlich des Vorhandenseins von Methylenignalen bei δ = 2,75 ppm, alpha bis Carbonyl bei Position 24. Die Polyaminregionen wiesen Splitmuster ähnlich dem des Squalamin auf, was das Spermidinaddukt bestätigte.

[0066] Die genaue Masse von 543,4823 wurde durch FAB-MS (positiver Ionenmodus) gemessen. Die molekulare Formel C₃₄H₆₁N₃O₂ hat eine kalkulierte Masse von 543,4842, was in guter Übereinstimmung mit dem experimentell beobachteten Wert ist. Diese molekulare Formel der Verbindung 1361 ist in Übereinstimmung mit der Eliminierung von Sulfat aus dem Muttermolekül, der Verbindung 1360. Außerdem hat die molekulare Formel der Verbindung 1361 ein Doppelbindungsäquivalent (DBE) von 5,5, verglichen mit 5,0 für die Verbindung 1360 und 4,0 für die Verbindung 1356; dieser DBE-Werte stimmt mit der zusätzlichen Nicht-Sättigung der Verbindung 1361 überein.

Verbindung 1436:

[0067] Diese Verbindung und die Steroide, die unten beschrieben werden, wurden durch das Unterwerfen von Fraktionen einer präparativen C18-RP-HPLC mit niedrigeren CH₃CN-Gradienten-Bedingungen mit kleineren C18-Säulen gereinigt. Obwohl eine starke Kationen-Austausch-Chromatographie und Kieselgel (SG) Flash-Chromatographie, gefolgt von RP-HPLC bei der Reinigung der Verbindungen 1360 und 1361 verwendet worden ist, wurden diese Protokolle nicht verwendet, wenn eine pH-Labilität erkannt wurde.

[0068] Obwohl die Verbindung 1436 von C18-RP-HPLC mit einer Retentionszeit eluiert, die nur etwas schneller ist als Squalamin, weist sein R_f = 0,47 auf TLC auf eine chemische Struktur hin, die eine signifikant höhere Polarität als Squalamin unter alkalischen Bedingungen hat (CH₂Cl₂ : CH₃OH : NH₄OH 6 : 3 : 1).

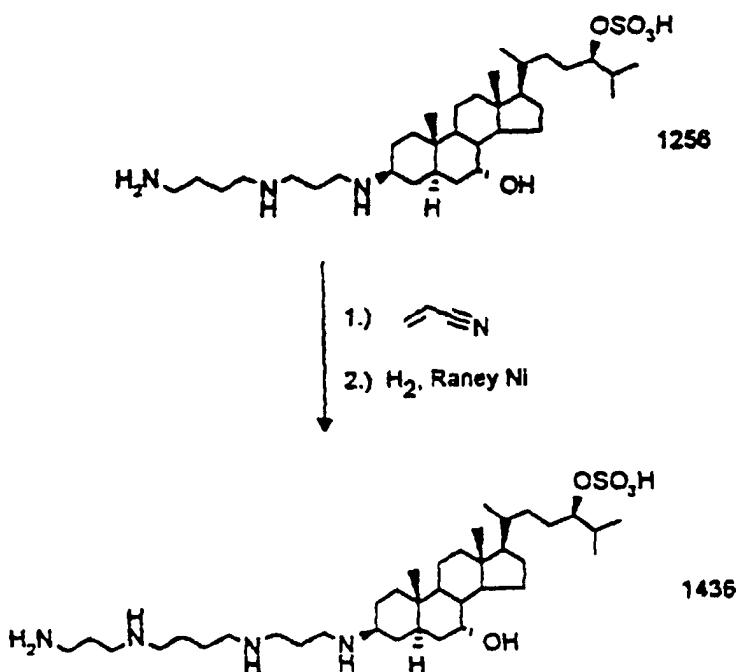
[0069] Das ¹H-NMR-Spektrum in D₂O (400 MHz) zeigte, dass die Polyaminregionen von denen des Squalamin verschieden sind. Sowohl das Splitmuster und die Integration ähnelte Spermin eher als Spermidin, d. h.

N,N'-Bis-3-aminopropyl-1,4-butan-diamin eher als N-(3-Aminopropyl)-1,4-butandiamin. Ansonsten schien das ^1H -Spektrum dem des Squalamins identisch: ein Proton an $\delta = 4,15$, die 24 Sulfatposition; ein Proton an $\delta = 3,85$, entsprechend der H7-Alkoholring-Position; drei überlappende Doublets in 0,85 bis 0,95 ppm entsprechend Methyl 21 und den Methylen 26 und 27. Die Identität des Spermins wurde durch das Durchführen von COSY in D_2O gestützt, durch das Vergleichen von Crosspeakmustern, zu dem der Referenzstandard des Spermins ($\text{C}_{10}\text{H}_{26}\text{N}_4$) und vom Spermidin ($\text{C}_7\text{H}_{19}\text{N}_3$) wie auch dem von Squalamin in D_2O . Obwohl die COSY-Spektren der Aminosterole im allgemeinen keine vollständige zweidimensionale Karte der Crosspeaks in D_2O ergeben und deswegen nicht auf eine vollständige nächste Nachbarschaft-Zuordnung vertraut werden kann, erfolgte die Polyaminregion einen kompletten Satz an off-diagonalen Crosspeaks, welches zuverlässig als Signaturmuster für das Unterscheiden zwischen Spermidin und Spermin dienten.

[0070] Das ^{13}C -Spektrum der Verbindung 1436 zeigte 3 zusätzliche Signale in D_2O aber ansonsten war das Kohlenstoffskelett des Steroids das gleiche wie bei Squalamin in D_2O . DEPT-135 (distortionless enhanced polarization transfer) wurde so durchgeführt, dass Methyl- und Methinsignale als positive Signale, Methylengruppen als negative Signale bezählt wurden und quaternärer Kohlenstoff null Intensität ergaben. DEPT-135 der Verbindung zeigte, dass diese drei zusätzlichen Signale Methylen waren (negativ).

[0071] Die molekulare Formel $\text{C}_{37}\text{H}_{72}\text{N}_4\text{O}_5\text{S}$ hat eine errechnete Masse von 684,53017, was in guter Übereinstimmung mit der experimentell beobachteten akkurate Masse von 684,5216 ist, die durch hoch auflösendes FAB-MS gemessen wurde (positiver Ionenmodus). Die zusätzliche Masse von 58 Dalton (684,5 versus 627,5 für Squalamin) war konsistent mit dem Vorhandensein einer zusätzlichen 3-Aminopropylgruppe, die dem Spermin zugeordnet wird. Des Weiteren ist die gleiche Nummernmasse (even number mass) des Mutterions in Übereinstimmung mit der Stickstoffregel, welche eine Verbindung mit einer geraden Anzahl an Stickstoffen voraussagt. FAB-MS zeigte auch eine Fragmentierung in Arten von sowohl 80 und 98 Masseneinheiten weniger als die $(\text{M} + \text{H})^+$ Ausgangsverbindung bei 685 amu (atomic mass units; Atommasseeinheiten). Diese Fragmente stellen den Verlust des Sulfats als Folge der Dehydrierung dar, was die strukturelle Labilität des Squalamins unter FAB-MS-Bedingungen wiederspiegelt.

[0072] Die Verbindung 1436 wurde auch aus der Verbindung 1256 (Squalamin) gemäß dem folgenden Reaktionsschema synthetisiert:



[0073] In eine Rundbodenflasche wurden 95 mg (0,106 mmol) Squalamin (TFA-Salz) gegeben, welches in 800 μl wasserfreiem Methanol gelöst wurde. Zu dem Gemisch wurden 118 μl (0,848 mmol) an Triethylamin, gefolgt von 100 μl (0,106 mmol) verdünnter Acrylonitrillösung (70 μl Acrylonitril, verdünnt auf 1000 μl in Methanol) gegeben. Nach 6 Stunden wurden weitere 40 μl (0,042 mmol) der verdünnten Acrylonitrillösung zugegeben. Nach 24 Stunden zeigte TLC das Vorhandensein von Ausgangsmaterial und ein Produkt mit $R_f = 0,7$ (Squalamin $R_f = 0,5$). Die Reaktion wurde gestoppt, und das Produkt durch Flash-Chromatographie (12 : 3 : 1 bis 6 : 3 : 1 CH_2Cl_2 : MeOH : NH₄OH) isoliert.

[0074] Das Produkt schien ein Gemisch in der NMR-Spektroskopie zu sein, obwohl es in der TLC homogen war. Das so erhaltene Produkt wurde in ein Hydrogenierungsgefäß zusammen mit 10 mg an Raney-Nickel, 7,3 mg an Natriumhydroxid und von 5 ml absolutem Ethanol und bei 40 psi für 17 Stunden hydrogeniert. Zwei Produkte, jetzt reparierbar (Flash-Chromatographie, 6 : 3 : 1 CH_2Cl_2 : MeOH : NH₄OH) wurden auf TLC gesehen,

wobei der niedrigere Spot mit der Referenz zusammenfiel (die natürlich isolierte Verbindung 1436). Dieses Produkt wurde durch Reverse-Phase-Chromatographie getrennt, um 1,5 mg des reinen Materials zu ergeben. Diese Verbindung hatte eine positive Masse ($M + 1$) Ion 685, und seine ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren waren identisch mit denen des natürlich isolierten Materials, was damit dessen Charakterisierung und Struktur bestätigt.

Verbindung 1437:

[0075] Dieses Steroid, das direkt nach der Verbindung 1360 in der präparativen C18 eluierte, weist ein $R_f = 0,96$ auf dem TLC auf, was einen mehr polaren Charakter als Squalamin selbst reflektiert. ^1H -NMR (400 MHz) in D_2O schien im Wesentlichen identisch zu dem von Squalamin für die Methylregion, Steroidnukleus und die Spermidinregion, und 7H an der Ring-Hydroxylposition. Verdächtigerweise war das Multiplet an $\delta = 4,15$ ppm entsprechend einem Proton an der 24-Sulfatposition abwesend. Statt dessen wurde ein neues Signal, das bei $\delta = 3,95$ zentriert war, beobachtet, mit der charakteristischen Gemalkohol-Kopplung und Integration für 2 Protonen.

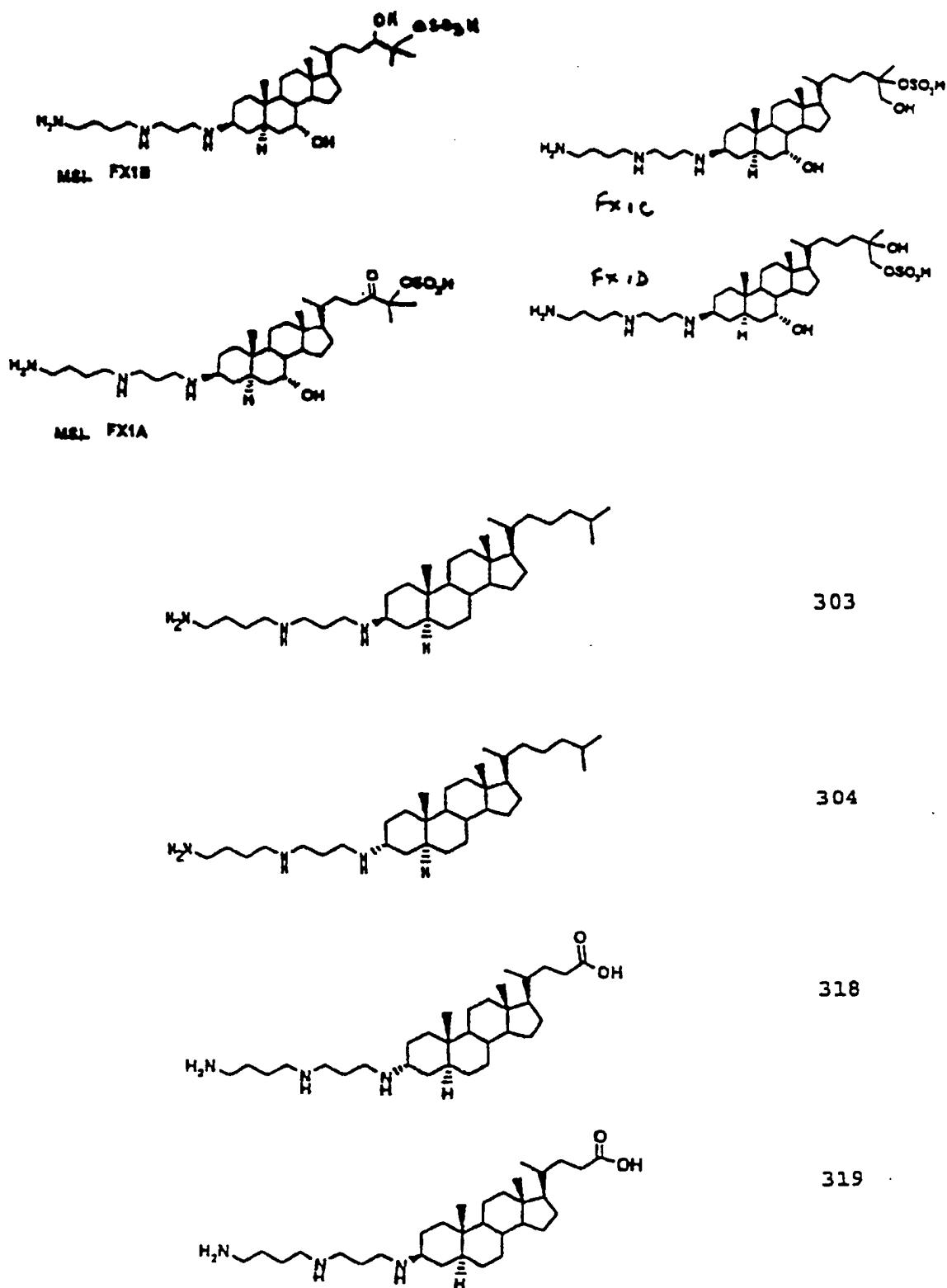
[0076] Wenn es mit Squalamin verglichen wurde, offenbarte das ^{13}C -Spektrum der Verbindung 1437 in D_2O nur bemerkenswerte Veränderungen. Ein neues Signal trug bei $\delta = 72$ ppm auf, das anschließend als eine CH_2OH -Gruppe identifiziert wurde, da sein DEPT-135-Signal negativ war. In Squalamin wurde die Sulfatposition als $\delta = 86$ ppm als ein primärer Kohlenstoff identifiziert (positives DEPT-135-signal). Bei der Verbindung 1437 jedoch verschob sich diese Kohlenstoffresonanz der Sulfatposition zu 76 ppm und ergab kein DEPT-135-Signal, wodurch es als quaternäres Kohlenstoff identifiziert wurde. Die Aminosterolstruktur, die mit diesen Daten konsistent ist, hat das Kohlenstoffskelett von Ergostanol, mit Kohlenstoff 24, der das Sulfat trägt und Kohlenstoff 24', welcher der Alkohol ist.

[0077] FAB-MS in dem positiven Ionmodus zeigte $(M + H)^+$ bei 658,6, der sich aufgrund des Sulfatverlustes zu 578,6 aufspaltete; die negative Ionmodusanalyse bestätigte ein pseudomolekulares Mutterion $(M - H)^-$ bei 656,4. Die exakte Masse von 578,5264 wurde wegen der niedrigeren Intensität des Muttersignals an dem desulfurierten Fragment bestimmt. Die akkurate Masse des Mutterions konnte dann als 657,526 (durch Zugeben der Masse des Sulfats) errechnet werden. Die Verbindung 1437 ist deswegen 30 Dalton größer als Squalamin, was durch einen zusätzlichen CH_2OH -Rest erklärt werden könnte.

Steroide in der Fraktion 1:

[0078] Fraktion 1 (FX1) ist die früheste Steroidfraktion, die von einer präparativen C18-RP-HPLC eluiert. Die TLC-Analyse zeigt typischerweise einen einzelnen Hauptspot mit $R_f = 0,80$ bis 0,84 (bezogen auf Squalamin, $R_f = 1,0$) und Protein, das beim TLC-Ursprung blieb. Wenn die TLC-Platten mit konzentrierten Proben (≥ 3 mg/ml) laufen gelassen wurden, waren Spuren zusätzlicher Spots mit R_f -Werten, die entweder etwas größer oder kleiner als der Hauptbestandteil waren, unterscheidbar.

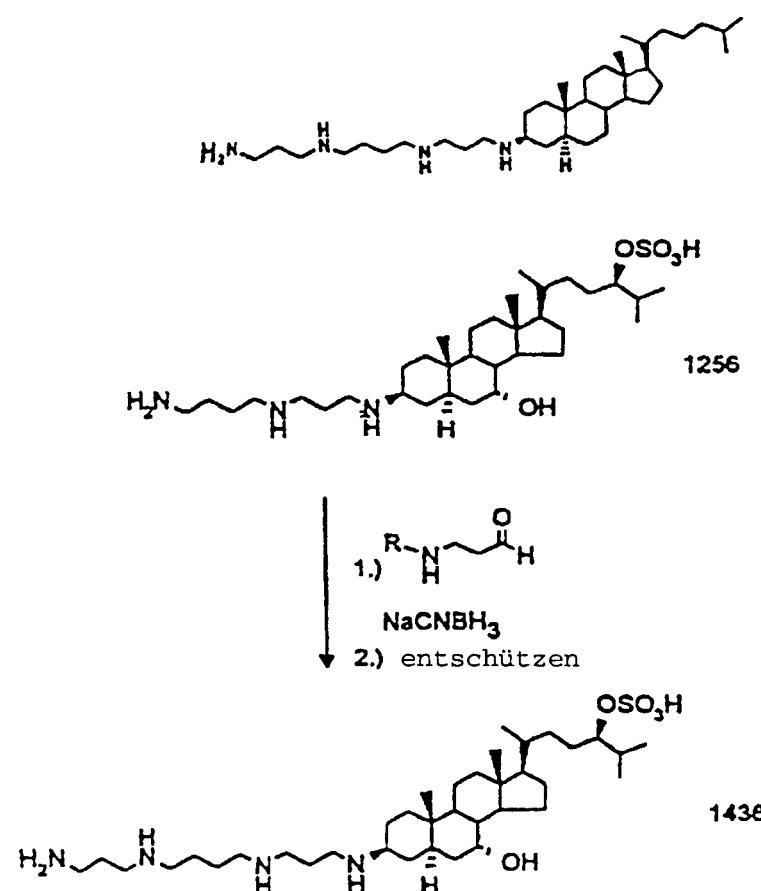
[0079] Wenn sie einer hoch auflösenden RP-HPLC unter Verwendung von C18-Säulen mit 60 bis 100 Å Porengröße und sehr flachen CH_3CN -Gradienten unterworfen wurde, konnte die Fraktion I in bis zu 7 Bestandteile getrennt werden, die als I-1, I-2, I-3, I-4, I-5, I-6 und I-7 bezeichnet wurden. Die Steroide FX1A, FX1B, FX1C, FX1D werden als mögliche Strukturen dargestellt:



Beispiel H

Herstellung der Verbindung 1436:

[0080] Diese Verbindung kann aus Squalamin durch das Kuppeln von β -Alaninaldehyd, gefolgt von der Reduzierung wie im folgenden Schema gezeigt, einfach hergestellt werden:



[0081] Der obige Ansatz erlaubt die leichte Umwandlung von Squalamin, das in großen Mengen in Haileber vorhanden ist, in die Verbindung 1436, die in ungefähr 5% der Squalaminmenge vorhanden ist.

[0082] Zusätzliche Aminosterolverbindungen, wie solche, die in den Tabellen I und II hier gezeigt sind, können auf analoge Weisen, wie die oben angegebenen, hergestellt werden.

Therapeutische Wirkungen und Nutzen

[0083] Aminosterolverbindungen wie beispielsweise Squalamin wurden als wirksame Inhibitoren von NHE entdeckt. Beim Suchen danach, den antimikrobiellen Mechanismus der Wirkung von Squalamin aufzuklären wurde gezeigt, dass Squalamin vorteilhaft eine spezifische NHE-Isoform inhibiert – die Verbindung inhibiert NHE3, aber nicht NHE1. Zusätzlich wurde bestimmt, dass Squalamin den Austauscher durch einen speziellen Mechanismus inhibiert. Die speziellen und vorteilhaften Wirkungen und Nutzen von Squalamin und weiteren Aminosterolen werden aus den Ergebnissen der experimentellen Tests, die unten beschrieben werden, offensichtlich.

Spezifische Inhibierung von NHE3:

[0084] Um die Spezifität der Squalamin-Inhibierung von NHEs zu bestimmen, wurde Squalamin in einer Zelllinie untersucht, die entweder humanes NHE1 oder humanes NHE3 exprimiert, indem den Verfahren gefolgt wurde, die von Tse et al., J. Biol. Chem. 268, 1993, 11917–11924 ausgeführt wurden. Die inneren pH-Werte wurden entweder nach der Säurebeladung oder in Abwesenheit einer Säurebeladungsforderung gemessen, wobei die Ergebnisse in den **Fig. 1A** und **1B** gezeigt werden.

[0085] Genauer gesagt wurden PS120 Fibroblasten, die mit dem Kaninchen-NHE3 transfiziert waren, in supplementierten Dulbecco's modifizierten Eagle's Medium wie von Levine et al., J. Biol. Chem. 268, 1993, 25527–25535 beschrieben, gezüchtet. Transfizierte Zellen, die auf Glasdeckgläsern gezüchtet wurden, wurden dann auf die internen pH-Wert-Veränderungen nach der Behandlung mit 5 µg/ml Squalamin unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs BCECF-AM (2',7'-Bis(carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluoresceinacetoxymethylester) als pH-Indikator wie von Levine et al. beschrieben, untersucht. Für Säure-vorbeladene Zellen war die Rate der pH-Wert-Erhöhung als Funktion der wiederhergestellten extrazellulären Natriumion-Konzentration gegenüber einer Exposition von 40 mmol NH₄Cl überwacht, wobei die Ergebnisse in der **Fig. 1A** gezeigt werden. Für nicht Säure-vorbeladene Zellen wurde der tatsächliche interne pH-Wert als Funktion der Zeit, gefolgt von der Zugabe von Squalamin, überwacht, welcher die Ergebnisse die in **Fig. 1B** dargestellt sind, zeigt.

[0086] Wie in den **Fig. 1A** und **1B** gezeigt wird, inhibierte Squalamin NHE3 sowohl im Hinblick auf die Protonen-Konzentration sowohl des K_m und des V_{max} -Niveaus. Im Gegensatz dazu betrafen die vorhandenen Mittel wie beispielsweise Amilorid, nur V_{max} .

[0087] Das bedeutet, dass das Aminosterol Squalamin nicht nur die absolute Anzahl an Protonen, die durch die Zelle sezerniert werden können (den V_{max} -Effekt) reduziert, sondern auch die Zelle dazu zwingt, auf einen niedrigeren pH-Wert in Gegenwart dieses Inhibitors (dem K_m -Effekt) zu fallen. Als Folge daraus wird der Natrium/Protonen-Austauscher stärker durch Squalamin inaktiviert als durch Amilorid.

[0088] Im Gegensatz zu seinen Wirkungen auf NHE3, die in den **Fig. 1A** und **1B** gezeigt sind, zeigte Squalamin keine inhibitorische Wirkung gegenüber humanem NHE1 oder Kaninchen-NHE1, wie in den **Fig. 2A** und **2B** gezeigt wird. PS120 Fibroblasten, die mit Kaninchen- oder menschlichem NHE1 transfiziert waren, wurden wie oben beschrieben gezüchtet. Transfizierte Zellen, die Kaninchen-NHE1 (**Fig. 2A**) oder humanen NHE1 exprimieren (**Fig. 2B**), die auf Glas der Gläschchen gezüchtet wurden, wurden dann für innere pH-Wertveränderungen nach der Behandlung mit 5 µg/ml Squalamin untersucht, unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs BCECF-AM bei Zellen, die durch Exposition gegenüber 40 mmol NH₄Cl Säure vorbeladen wurden. Die pH-Erhöhungsraten als Funktion der wiederhergestellten extrazellulären Natriumionen-Konzentration wurde überwacht.

[0089] Zusätzlich wurde der Ruhe-pH-Wert dieser Zellen ebenfalls inhibiert, wie in **Fig. 1B** demonstriert wird. Deswegen verursacht der Effekt von Squalamin auf den Protonen-Austausch in der Zelle auf einen niedrigeren pH-Wert in seiner Gegenwart zu fallen, bevor die Aktivierung der Pumpe auftritt.

[0090] Durch diese Studien ist Squalamin als distinkter Inhibitor mit einer Spezifität für NHE3 gegenüber NHE1 entdeckt worden. Außerdem wurde Squalamin als Inhibitor identifiziert, der eine Zelle dazu bringt, auf einen niedrigeren pH-Wert zu sinken, bevor die Pumpe aktiviert wird. Die Ergebnisse, die in den **Fig. 1A**, **1B**, **2A** und **2B** gezeigt werden beweisen, dass Squalamin eine einzigartige NHE-Spezifität aufweist.

Die Expression von NHE3:

[0091] So ein spezifischer Effekt auf NHE3 ist aus mehreren Gründen wichtig. NHE3, der auf den apikalen Oberflächen einer limitierten Anzahl von Zelltypen vorhanden ist, ist spezialisierter als NHE1. Eine Zelle von besonderem therapeutischem Interesse ist die Endothelzelle.

[0092] Unter Verwendung der PCR ist die Expression dieses Antiporters sowohl in menschlichen mikrovaskulären und menschlichen Lungenarterien Endothelzellen jetzt bewiesen worden. Gesamt-RNA wurde aus primären humanen Lungenarterien-Endothelzellen (HPAEC) aus der humanen Melanom-Zelllinie wm1617 und aus humanen mikrovaskulären Endothelzellen (HMVEC) mit einer Modifizierung des Verfahrens von Chomczynski et al., Anal. Biochem. 162, 1987, 156, isoliert und dann wurden sie mit MMLV Reverse Transkriptase unter Verwendung eines Erststrang-cDNA-Synthesekits (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA) revers transkribiert. Gesamt-RNA aus dem menschlichen Dünndarm, die von Clontech erhalten wurde, wurde ebenfalls auf die gleiche Weise revers transkribiert.

[0093] Ungefähr 80 ng des cDNA-Produkts wurden dann in einer 50 µl Reaktionsmischung unter Verwendung von Reagenzien aus dem AmpliTaq DNA Polymerase-Kit amplifiziert (Perkin Elmer, Norwalk, CT) und enthaltend 400 ng jedes der beiden Oligonukleotide, die für humanes NHE3 spezifisch sind (B13: 5'-CATCTGGACCTGGAACACG-3'; B14: 5'-CGTAGCTGATGGCATCCTTC-3') unter Verwendung eines Thermozyklus von 5', 94°C und dann 38 Zyklen von 50", 94°C, 1', 57°C, 2', 71°C und zum Schluß 10', 72°C, bevor auf 4°C abgekühlt wurde. 20 µl dieser Probe wurden auf einem 1,7%igen Agarosegel analysiert. Die erwartete NHE3-PCR-Bande von ungefähr 550 Basenpaaren wurde in den meisten Fällen gesehen, wie in Tabelle 2 unten gezeigt wird.

[0094] 1 µl jeder PCR-Reaktion wurde dann durch eine "nested" PCR in einer 50 µl Reaktionsmischung unter Verwendung zweier interner Primer (B15: 5'-CTGGTCTTCATCTCCGTGTAC-3'; B16: 5'-AGCTCGTGG-AA-GACATTCAAGG) weiter mit einem 5', 94°C Programm des thermischen Zyklierens, dann 35 Zyklen zu 50", 94°C, 1', 58°C, 2', 71°C und Final 10', 72°C vor dem Abkühlen auf 4°C analysiert. Ungefähr 20 µl dieser Reaktion wurden auf einem weiteren 1,7%igen Agarosegel analysiert. Die erwartete NHE3 PCR-Bande von ungefähr 490 Basenpaaren wurden in allen Fällen wie in der Tabelle unten angemerkt, gesehen. Die DNA-Sequenzierung der HPAEC und HMVEC nested PCR-Banden von beiden Enden aus bestätigte, dass sie die erwarteten Human-NHE3-Sequenzen hatten.

Tabelle 2
Expression von humanem NHE3 in humanen Endothelzelllinien

	Sichtbare Detektion von humanem NHE3 mittels PCR	
Gesamt-RNA-Quelle	1. PCR-Runde	2. nested PCR-Runden
Dünndarm	-	+
humane Melanom	+	+
HPAEC	+	+
HMVEC	+/- (mehrere Banden)	+

[0095] Dadurch wird eine Vielzahl an Ereignissen, die von Endothelzell-Wachstum/-form abhängen durch Squalamin und funktionell verwandte Verbindungen inhibiert. Die experimentellen Tests, die unten diskutiert werden, wurden durchgeführt, um die Wirkungen dieses Aminosterols zu untersuchen.

Wachstumsinhibition von Endothelzellen, Fibroblasten und Epithelzellen in vitro:

[0096] Wenn nicht transformierte humane Zellen in Gegenwart von ansteigenden Konzentrationen an Squalamin gezüchtet werden, weisen die Endothelzellen eine besondere Sensitivität gegenüber Squalamin auf, wie durch das folgende Experiment gezeigt wird. Rinder-Lungen-Endothelzellen, die menschliche epitheliale Zelllinie MCF 10A und menschliche Vorhautfibroblasten wurden in Gegenwart von 12 verschiedenen membranwirksamen Mitteln, einschließlich Peptiden und Squalamin inkubiert.

[0097] Genauer gesagt, wurden Rinder-Lungen-Endothelzellen, menschliche epitheliale Zelllinie MCF 10A und menschliche Vorhautfibroblasten in Gegenwart der folgenden 12 membranaktiven Mittel inkubiert: (1) RGD[KIAGKIA]₃-NH₂; (2) d-[KKLLKKL]₂-NH₂; (3) Squalamin; (9) SWLSKTAKKLENSAKKRISSEGIAIAIQGGPR; (5) FLGGLIKIVPAMICAVTKC; (6) Magainin 2; (7) PGLA; (8) GFASFLGKALKAAALKIGANLLGGTPQQ; (9) PR-39; (10) 1-[KKLLKKL]₂-NH₂; (11) Cecropin B und (12) [KIAGKIA]₃-NH₂. Das Zellwachstum wurde durch Absorption bei 600 nm gemessen. Die Ergebnisse werden in den **Fig. 3A** bis **3C** gezeigt.

[0098] Wie aus der **Fig. 3A** ersichtlich wird, inhibierte Squalamin das Wachstum der Rinder-Lungenarterien-Endothelzellen (BPE) bei 1 µg/ml. Im Gegensatz dazu wies es bei 10 µg/ml keine Wirkung auf das Wachstum weiter epithelialer (**Fig. 3B**) oder Fibroblasten- (**Fig. 3C**) Linien auf. Peptide, die das Wachstum von epithelialen Zellen jedoch inhibierten, wiesen keine Wirkung auf BPE auf. Das bedeutet, dass endotheliale Zellen gegenüber Squalamin sensitiver sind als Fibroblasten oder epithelialen Zellen.

Inhibition einer Röhrchenbildung von Endothelzellen in vitro:

[0099] Endothelzellen haben die Fähigkeit, in vitro tubuläre Aggregate zu bilden, die Kapillaren in verschiedenen Frühstadien der Bildung ähneln. Diese Umwandlung tritt unter relativ spezifischen Bedingungen auf, in denen essentielle Wachstumsfaktoren zusammen mit einem wirksamen Substrat zur Verfügung gestellt werden. Es ist gezeigt worden, dass sowohl die Interaktion von Wachstumsfaktoren mit der Endothelzelle und seine Anheftung an ein Substrat NHE aktivieren. Die Aktivierung dieses Austauschers ist wie man glaubt, für anschließende morphologische Veränderungen der Endothelzelle in eine multizelluläre tubuläre Struktur notwendig.

[0100] Um die Wirkung der Verbindungen der nabelartigen Strukturen, die durch menschliche mikrovaskuläre Zellen gebildet werden zu untersuchen, wenn diese in Gegenwart von VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) und basischen Fibroblasten-Wachstumsfaktor auf einer Collagenmatrix ausplattiert wurden, wurde ein Standard-Tubusbildungstest durchgeführt. Die Ergebnisse werden in der Tabelle unten gezeigt.

Tabelle 3
Wirkung verschiedener Aminosterole auf Endothel-Tubusbildung

	µg/ml			
	<u>0,01</u>	<u>0,1</u>	<u>1,0</u>	<u>10,0</u>
Fumagillin	-	+/-	+	
Squalamin	-	+	+	+

Anmerkung:

- + = Inhibierung der Angiogenese
- = keine Inhibierung der Angiogenese
- T = Toxisch
- = Abrundung der Zelle bei 10 µg/ml

[0101] Wie in Tabelle 3 gezeigt wird, inhibiert Squalamin die Nabelbildung bei ungefähr 0,1 µg/ml, verglichen mit Fumagillin, das eine vergleichbare Wirkung bei 10 µg/ml aufweist. Bei diesen Konzentrationen scheint Squalamin die Überlebensfähigkeit der Zelle oder deren Proliferation nicht stark zu beeinflussen. Diese Eigenschaft in vitro korreliert grob mit der antiangiogenen Wirkung in komplexeren in vivo Modellen (siehe Goto et al., Lab Investigation 69, 1993, 508–518).

LPS-induzierte Neutrophilen-Adhärenz an menschlichen Nabelschnur-Venen-Endothelzellen:

[0102] Wenn Endothelzellen bestimmten Stimuli, einschließlich Lipopolysaccharid (LPS) und bestimmten Zytokinen ausgesetzt werden, werden spezifische Adhäsionsmoleküle auf der Plasmamembran induziert, die die Bindung von Leukozyten fördern. Diese Leukozyten-Endothelzellen-Interaktionen sind vermutlich notwendig, um Leukozyten an Stellen bakterieller Invasion zu bringen, und die Extravasierung dieser Leukozyten aus der Kapillare in das umgebende Gewebe zu erleichtern. Leukozyten-Adhäsions-Moleküle schließen die Selektine und ICAM-1 ein.

[0103] Um zu bestimmen, ob Squalamin diese besondere Endothell-Funktion inhibiert, wurden Standard-Adhäsions-Assays wie in Gamble et al., J. Immun. Methods 109, 1988, 175-184 ausgeführt, durchgeführt. Die Expression der Zelloberflächen-Liganden in einem auf Endothel basierenden System zeigte, dass es die Adhärenz von Granulozyten in einem System unter Verwendung von menschlichen Nabelschnurvenen-Endothelzellen bewirkt, die gereinigte Neutrophile und Induktoren von Zelloberflächenliganden wie beispielsweise LPS (100 ng/ml) und TNF-α (40 ng/ml). In diesen Experimenten wurden ungefähr 2×10^5 menschliche Nabelschnurvenenzellen (Passage 2 bis 6) pro Kavität aussortiert. Die Zellen wurden über Nacht in einem serumfreien Medium gezüchtet. Für die Induktion wurde entweder TNF-α (40 ng/ml) zu den Endothelzellen für 6 Stunden vor der Zugabe von Neutrophilen hinzugegeben oder LPS (100 ng/ml) wurde für 4 bis 6 Stunden hinzugegeben. Es wurde herausgefunden, dass die LPS-Reaktion durch Zugeben von 1% FBS in die Kavitäten anstieg, um eine Quelle für LPS bindendes Protein zur Verfügung zu stellen. Nach der Aktivierung der Endothelzellen wurden ungefähr 50×10^6 neutrophile Zellen pro Kavität hinzugegeben. Die Platten wurden für 30 Minuten bei Raumtemperatur leicht geschwenkt, gefolgt von der Entfernung des Mediums und dem Waschen in serumfreiem Medium für 3 male und dann dem Fotografieren jeder Kavität. Experimente, um die Wirkungen von Squalamin zu testen, wurden durch Zugeben von Squalamin zu 10 µg, 1,0 µg oder 0,1 µg zum Zeitpunkt der Zugabe von LPS oder TNF-α durchgeführt. Eine zweite Wiederholungsdosis von Squalamin wurde zum Zeitpunkt der Zugabe von Neutrophilen hinzugegeben. Ein monoklonaler Antikörper gegen ICAM-1 war eine positive Kontrolle.

[0104] Bei der Verwendung von drei verschiedenen Personen gab es keine Inhibierung durch Squalamin auf die Adhärenz der neutrophilen Zellen unter Verwendung von aktivierten Human-Endothelzellen. Es gab ungefähr 50% Inhibition der Adhärenz, wenn 40 µg/ml eines monokonalen Antikörpers gegen ICAM-1 vor der Zugabe von Neutrophilen hinzugegeben wurde.

[0105] Diese Ergebnisse deuten an, dass die Inhibierung des endothelialen NHEs durch Squalamin sowohl das Wachstum und die Kapillarbildung in vitro beeinflusst, aber nicht alle Signaltransduktionswege in dieser Zelle inhibiert. Das heißt, dass bestimmte "Haushalts"-Funktionen wie beispielsweise die Fähigkeit der Endothelzellen, Leukozyten an die Stelle einer Infektion anzulocken, nicht durch Squalamin gestört werden sollte. Das beweist, dass Squalamin zur Inhibierung von der Angiogenese verwendet werden kann aber nicht bestimmte wichtige Endothelzell-Funktionen anderweitig zerstört, wie beispielsweise die Leukozyten-Rekrutierung an Stellen einer Infektion oder Entzündung.

Anti-proliferative Wirkung:

Das Chorioallantoin-Membran-Modell:

[0106] Unter Verwendung des klassischen Chorioallantoin-Membran-Modells ist herausgefunden worden, dass Squalamin ein Inhibitor des Kapillarwachstums ist. Die wachsenden Kapillaren in den Chorioallantoin-Membran-Modellen (CAM-Modell) wurden als System verwendet, in dem die Wirkung von Mitteln untersucht

wurde hinsichtlich des Potentials, das Wachstum neuer Gefäße zu inhibieren. Die Neovaskularisierung tritt am aggressivsten innerhalb der ersten Woche nach der embryonalen Entwicklung auf. Danach ist das Kapillarwachstum prinzipiell als „Verlängerung“ statt als „de novo“-Bildung charakterisiert.

[0107] In dem Standardassay werden Mittel lokal auf eine Region eines Embryos aufgetragen, über bei dem eine Neovaskularisierung auftreten wird. Die Mittel werden auf ihre Fähigkeit, diesen Prozess zu inhibieren, untersucht, wie durch die Untersuchung mit dem Auge über 7 Tage nach der Anwendung bewertet wird. Mittel, die das Gefäßwachstum während der Dauer der de novo Kapillarbildung stören aber nicht mit folgendem Kapillarwachstum interferieren, werden im allgemeinen als „spezifische“ Inhibitoren einer Neovaskularisierung betrachtet, was verschieden von den weniger spezifischen toxischen Substanzen ist. Der verwendete Test wird in Details in Auerbach et al., Pharm. Ther. 51, 1991, 1–11 beschrieben. Die Ergebnisse werden unten tabellarisch gezeigt.

Tabelle 4
Inhibierung des Kapillarwachstums im CAM-Modell

3tägiger Embryo:	Squalamin aufgetragen <u>(µg)</u>	Prozent positive			Mittel- wert
		Test 1	Test 2		
	0,65	28			
	1,25	18	18	18	
	2,5	35	18	27	
	5,0	91	57	74	
	20	52*	58*	55	
	40	50*	13*	32	

*geringe vaskuläre Reizung bemerkt.

13tägiger Embryo:	Squalamin aufgetragen <u>(µg)</u>	Prozent positive
	5,0	0/26

[0108] Wie aus der Tabelle 4 ersichtlich wird, führte das Auftragen von nur 0,65 µg Squalamin auf ein 3-Tage-CAM zur Inhibierung der CAM-Gefäß Neovaskularisierung. Im Gegensatz dazu übte das Auftragen von zehnmal mehr der Squalaminmenge auf ein 13 Tage altes Hühnchen keine inhibitorische Wirkung aus.

[0109] Das bedeutet, dass Squalamin in einem klassischen Angiogenesetest eine starke aber spezifische inhibitorische Aktivität aufwies, gleich der Leistungsfähigkeit der aktivsten Verbindungen, die bis heute in der Literatur beschrieben sind. Die Wirkung ist mit einer Unterdrückung der Neovaskularisierung statt einer toxischen Inhibierung des Kapillarwachstums in Übereinstimmung.

Die Vitallin-Kapillaren eines 3- bis 5tägigen Hühner-Embryo-Modells:

[0110] Im Verlauf der Untersuchung von Squalamin im „klassischen“ Hühner-Chorioallantoin-Membran-Modell wurde bemerkt, dass dieses Steroid einen dramatischen und schnellen Effekt auf die Kapillargefäß-Integrität in den 3 bis 5 Tage alten Hühnerembryonen ausübte. Unter Verwendung von Hühner-Embryo-Vitellin-Kapillaren-Tests wurden Verbindungen auf ihre Fähigkeit, eine kapillare Reaktion zu induzieren, getestet. Jede Verbindung wurde in 0,1 ml 15% Ficol 400 und PBS auf den Embryo aufgetragen und die vaskuläre Regression wurde nach 60 Minuten untersucht.

[0111] Es wurde gefunden, dass das Squalamin die Vitellin-Kapillaren von 3 bis 5 Tage alten Hühner-Embryonen zerstört. Der 3 Tage alte Hühnerembryo besteht aus einer Embryo-Scheibe, aus der zahlreiche Gefäße entspringen und zurückkehren, die eine „8“-förmige Struktur bilden – der Embryo im Zentrum und vaskuläre Schlaufen, die über beide Pole auswärts ausgestreckt sind.

[0112] Die Anwendung von Squalamin auf die embryonale Struktur (0,1 ml in den 15% Ficol in PBS) führte zum fortschreitenden Ablösen der Vitellingefäße, wobei die dünntesten Kapillaren die ersten waren, die diese Veränderung aufwiesen. Nach einer Ruheperiode von ungefähr 15 Minuten wurde eine Verengung des Durchgangs zwischen den Kapillaren und den sekundären Gefäßen, im Allgemeinen auf der „venösen“ Seite, beobachtet. Der kontinuierliche pulsartige Blutfluss dauerte an, was zum „Anschwellen“ der Blindröhre führte, gefolgt von einem Abschnüren der verbleibenden Verbindung und der Bildung eines eingeschlossenen vaskulä-

ren Sacks, der einer „Blutinsel“ ähnelte. Dieser Vorgang ging weiter bis nur die größten Gefäße intakt blieben. Das Embryo-Herz schlug heftig weiter. Es gab keine Zeichen von Hämorrhagie, was die Integrität der Kapillarstruktur reflektiert. Zusätzlich wurde keine offensichtliche Zerstörung der zirkulierenden roten Zellen mikroskopisch beobachtet, was das Nichtvorhandensein einer Hämolyse beweist.

[0113] Unter Verwendung dieses Tests, der zu zeigen scheint, was für gewöhnlich als kapillare „Regression“ bezeichnet wird, dass eine minimale Konzentration an Squalamin benötigt wird, um eine Wirkung innerhalb von 60 Minuten zu beobachten. Die Ergebnisse werden in der Tabelle unten zusammengefasst.

Tabelle 5

Auswirkung der verschiedenen Aminosterole im Hühner-Embryo Vitellin Kapillar-Regressionstest

<u>Verbindung</u>	Menge der aufgetragenen Verbindung (μg)				
	10	1	0,1	0,01	0,001
Verbindung 1436	+	+	+	+	+/-
Squalamin	+	+	+	+	0
Verbindung 1360		0			
Trägerstoff	0	0	0	0	0

Anmerkungen:

- + = vaskuläre Reaktivität
- 0 = keine vaskuläre Reaktivität
- +/- = gleichmäßige Reaktivität
- Vehikel = 15% (w/w) Ficoll in Phosphat-gepufferter Salzlösung

[0114] Wie aus Tabelle 5 zu sehen ist, kann 0,1 bis 0,01 μg Squalamin in 0,1 ml Medium Veränderungen auslösen. Verbindungen mit verschiedenen Aktivitätsbereichen wurden gefunden, wobei Squalamin, besonders wirksam sind. Dieses Experiment zeigt, dass die getesteten Steroide die Kapillaren über einen Zeitintervall, der einige Minuten beträgt, dramatisch restrukturieren können. Die Ergebnisse weisen auch darauf hin, dass Squalamin diese Wirkung durch die Inhibierung von NHE ausübt.

Kaulquappentest:

[0115] Ein neu entwickelter Test, bei dem Kaulquappen verwendet werden, bevorzugt Xenopus laevis Stadien 59–60, wurde verwendet, um die Wirkung einer Verbindung durch Überwachen des Kapillarverschlusses im Kaulquappenschwanz zu studieren. Tiere in diesen Stadien wurden verwendet, da sie die Periode der Umwandlung zwischen Metamorphose darstellen, wobei die Tiere sowohl embryonale wie auch adulte Gewebe besitzen. Die erfindungsgemäßen Verbindungen betreffen die Form, Lebensfähigkeit und Integrität der embryonalen Gewebe, während sie die adulten Gewebe nicht beeinflussen, was ein aussagekräftiges hochspezifisches Mittel zur Durchmusterung bietet. Substanzen, die beispielsweise alle Epithelien des Tieres, sowohl adult wie auch embryonal, können als toxisch angesehen werden. Substanzen, die nur die embryonalen Gewebe zerstören, weisen eine sehr einzigartige Spezifität auf.

[0116] In diesem Test werden Kaulquappen in Petrischalen getan, die eine Lösung der Testverbindung in destilliertem Wasser enthalten, bevorzugt ungefähr 100 ml. Die bevorzugte Konzentration der Testverbindung reicht von ungefähr 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bis ungefähr 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Das Volumen der Flüssigkeit ist ausreichend für das Tier, um frei herumzuschwimmen und aus der Lösung zu trinken. Auf diese Weise röhrt der beobachtete Effekt von der oralen Absorption her und von der folgenden systemischen Verteilung des Mittels. Falls das Volumen der Flüssigkeit nicht ausreicht, um eine orale Aufnahme zu erlauben, würden die Auswirkungen, die beobachtet werden, aus der Absorption durch das Oberflächen-Epithel stammen. Auf diese Weise kann ein einfacher Test zur Identifizierung führen, ob eine Verbindung Eigenschaften einer oralen Zugänglichkeit hat.

[0117] In einer weiteren Ausführungsform dieses Tests kann eine Lösung einer Verbindung in Wasser direkt in das Abdomen des Tieres unter Verwendung von Standardtechniken injiziert werden. Die Konzentration der Verbindung von ungefähr 0,05 mg/ml bis ungefähr 0,5 mg/ml in ungefähr 0,05 ml Wasser werden bevorzugt.

[0118] Nach einer gewissen Zeit, typischerweise ungefähr 60 Minuten, wird der Verschluss des Blutflusses durch die Kapillaren im Schwanz der Kaulquappe unter einem umgekehrten Mikroskop bei einer Vergrößerung

von ungefähr 100mal beobachtet.

[0119] Wenn die Kaulquappen in destilliertes Wasser das Squalamin in einer Konzentration von 10 µg/ml ent-hält, getan wurden, wurde beobachtet, dass der Blutfluss durch die Kapillaren des Schwanzes abgebrochen ist. Der Vorgang trat von caudaler in cranialer Richtung auf. Der Blutfluss innerhalb der am meisten distal gelegenen Gefäße hörte anfänglich auf, gefolgt von den größeren Gefäßen. Während dieses Zeitraums wurde beobachtet, dass das kardiovaskuläre System ansonsten robust ist, wie durch den fortgesetzten Herzschlag, die pulsartige Ausdehnung der großen Gefäße und am seltensten einem unveränderten Blutfluss durch die feinen Kapillaren der Hände und Füße bewiesen wurde. Das bedeutet, dass eine selektive Beendigung des Blutflusses in lokalisierten Regionen gesehen wurde. Wenn die Tiere für einige Tage in Squalamin gelassen werden, kam es zu einer verstärkten Regression der am meisten distalen Teile des Schwanzes, wie auch der peripheren Aspekte der Schwanzflosse werden beobachtet, was den Regionen des Tiers entspricht, die durch die verschlossene Vaskulatur perfundiert werden. Diese Wirkung resultiert augenscheinlich aus einer selektiven Änderung im restlichen Durchmesser der Schwanzkapillaren. Die Inhibierung von Endothelzellen NHE führt offensichtlich zu einer Veränderung der Form der Zelle, die die Kapillare ausmacht, was zu einem verringerten Fluss führt. Das fortgesetzte funktionieren der Kapillarbetten in den „adulten“ Teilen der Kaulquappe (die Gliedmaßen) deutet darauf hin, dass Squalamin für bestimmte Kapillaren selektiv ist. Aus den Ergebnissen des Kaulquappenschwanz-Kapillar-Verschlußtests wurden Squalamin und die Verbindung 1436 als Auslöser eines allgemeinen vaskulären Verschlusseffekts ausgemacht.

Unterdrückung des Wachstums von Melanom:

Unterdrückung des Wachstums von Melanomen in Mäusen, durch orale und parenterale Verabreichungswege:

[0120] Das Wachstum von B16-Melanomen in C57B-Mäusen hängt von der Neovaskularisierung ab. Daher ist dies ein anerkanntes Modell zum Untersuchen des Einflusses von Inhibitoren auf die Angiogenese auf das Wachstum des Krebses.

[0121] Unter Verwendung des Wachstums von B16-Melanomazellen in C57B-Mäusen, einem anerkannten Modell für die Untersuchung von Inhibitoren der Angiogenese auf das Wachstum von Krebsen, wurden die Auswirkungen der subkutanen, intraperitonealen und oralen Verabreichung von Squalamin untersucht. Ein Inkubatum von B16-Melanomzellen wurde subkutan auf den Rücken der C57B-Mäuse implantiert, was zum progressiven Wachstum von Melanomläsionen über 30 bis 40 Tage führte, wie in den **Fig. 4A** bis **9C** gezeigt wird.

[0122] In diesem Modell wurden wenige Hinweise von Metastasen mit oder ohne Behandlung bei chemo-therapeutischen Mitteln beobachtet. Wenn Tiere mit Squalamin entweder subkutan (**Fig. 4A**), intraperitoneal (**Fig. 4B**) oder oral (**Fig. 4C**) behandelt wurden, wurde eine dosisabhängige Unterdrückung des Tumorvolumens beobachtet. Die Messung sowohl des Körpergewichts und der hämatologischen Parameter zeigte keine signifikante Unterdrückung. Da Squalamin selbst eine minimale zytostatische Wirkung gegen B16 in Kultur zeigt, außer bei sehr hohen Konzentrationen, wurde diese Antwort des Tumors aus sekundär aufgrund der Störung mit der Kapillarentwicklung interpretiert.

Unterdrückung des Wachstums humaner Melanome in immunsupprimierten Mäusen:

[0123] Wie aus **Fig. 5** ersichtlich ist, entwickelt sich das Melanom 1205Lu aggressiv in RAG-1-Mäusen nach der Implantierung. Es wurde herausgefunden, dass Squalamin das Wachstum von Melanom 1205Lu in RAG-1-Mäusen in einer dosisabhängigen Weise unterdrückt.

[0124] Squalamin wurde verabreicht, nachdem die Tumore ungefähr 0,1 ml erreicht haben, und eine klare Unterdrückung des Tumorwachstums in einer dosisabhängigen Weise wurde herausgefunden, wie durch die **Fig. 5** bewiesen. Nach der Beendigung der Behandlung setzte sich das Tumorwachstum in einer Rate fort, die ähnlich den unbehandelten Kontrollen war, was vermuten lässt, dass die Auswirkung von Squalamin bei dieser Versuchsanordnung reversibel ist.

Unterdrückung der Tumor-induzierten Cornea-Neovaskularisierung in Kaninchen:

[0125] Die Implantierung des VX2-Karzinoms in die Kaninchencornea führte zur Induzierung von neuen Blutgefäßen innerhalb einiger Tage (Tamargo et al., Cancer Research 51, 1991, 672–675). Man glaubt, dass dieses Karzinom Wachstumsfaktoren verbirgt, die neues Blutgefäßwachstum stimulieren. Dadurch ist dieses Modell andeutungsweise *in vivo* ein Beweis für eine therapeutische Nützlichkeit bei der Behandlung von pathologischen Störungen der Vaskularisierung, einschließlich der metastatischen Ausbreitung von Tumoren, der diabetischen Retinopathie, der makulären Degeneration und der rheumatoiden Arthritis.

[0126] Dieses Experiment folgte dem Veröffentlichungsprotokoll – ein Tumor war neben einem Polymer, das eine Konzentration des zu untersuchenden Mittels enthält, implantiert. Das Polymer setzt das Mittel langsam

in die unmittelbare Nachbarschaft des Tumors frei, was fortgesetzt hohe lokale Konzentrationen des Mittels ermöglicht. Bei diesem Experiment inhibierte Squalamin, das in ein Pellet von ELVAX 40 P (DuPont, Wilmington, DE) eingefügt wurde, die Bildung von neuen Blutgefäßen zu ungefähr 60% an den Tagen 7 und 14 und ungefähr 25% am Tag 21.

[0127] Wie durch die oben beschriebenen Experimente bewiesen, stellt Squalamin einen leistungsfähigen Inhibitor von NHE3 zur Verfügung. Squalamin sollte deswegen eine unschätzbare therapeutische Intervention bieten, wo immer die Bildung neuer Blutgefäße *in vivo* beteiligt ist.

[0128] In der Tat können einige pathologische Vorgänge, die auf der Bildung neuer Blutgefäße beruhen, durch die Inhibition von NHE3 behandelt werden. Als Mittel, das mit dem Vorgang der Neovaskularisierung interferiert, hat Squalamin einen therapeutischen Nutzen in der Behandlung von Erkrankungen oder Störungen, die von einer fortgesetzten Neovaskularisierung abhängen, wenn eine Störung der Neovaskularisierung die Intensität des pathologischen Vorgangs vermindert. So hat Squalamin einen Nutzen zum Behandeln von Störungen einschließlich dem Wachstum und der Metastasierung fester Tumoren, rheumatoider Arthritis, Psoriasis, diabetischer Retinopathie, makularer Degeneration, neovaskuläres Glaucom, Papillom, retrolentale Fibroplasie und Organabstoßung.

[0129] Außerdem haben weitere Aminosterole eine anti-angiogene Wirkung gezeigt. Die Verbindungen wurden verschiedenen Tests unterworfen, einschließlich des Hühner-Embryo-Kapillar-Regressionstests, dem Kaulquappentest, dem Test für die Inhibition der Endothel-Nabelbildung und dem Test für die direkte Inhibition von NHE, wie oben beschrieben, um ihre Nutzen zu bestimmen. Wie aus den oben gezeigten Daten klar wird, ist die Korrelation zwischen den Ergebnissen aus dem Hühnchen, Kaulquappen und der *in vitro* Inhibition des Endothelzell-Nabelbildungstests herausragend.

Xenopus-Kaulquappen-Test:

[0130] Der oben beschriebene Kaulquappen-Test bietet einen vorteilhaften Weg, die pharmakologischen Ziele jedes Steroids zu bestimmen, wenn sie in ein Säugetier eingeführt werden, und um die pharmakologischen Kategorien, zu denen die synthetischen Verbindungen gehören, zu bestimmen. In diesem Test wurde jedes der Steroide in 100 ml destilliertem Wasser bei einer Konzentration von 10 µg/ml gelöst. Xenopus-Kaulquappen im Stadium 59 bis 60 wurden hineingetan und mittels Lichtmikroskopie und oberflächlicher Beobachtung 1 Stunde später bewertet.

[0131] Die getesteten Steroide wurden als verschiedene und unterscheidbare pharmakologische Antworten in diesem Tier hervorrufende Substanzen beobachtet:

[0132] Verbindung 1256 (Squalamin): Vaskuläre Occlusion in den feinen Kapillaren des Schwanzes. Keine Wirkung auf den Gefäßfluß durch Hände oder Füße. Aktivitätsverlust und Tod trat innerhalb von 2 Stunden auf.

[0133] FX1: Gesteigerte Weiterleitung von Fäkalmaterial innerhalb von 1 Stunde. Nach 12 Stunden enthielt die Lösung beträchtliche fäkale Reste. Das Kreislaufsystem des Tieres schien hyperemic, was eine hämatopoietische Stimulierung nahe legt.

[0134] Verbindung 1360: Schwellung und Lysierung bestimmter Erythrozyten trat auf, was zu einer Akkumulation von Kernen in einigen kleinen Gefäßen des Schwanzes führte. Anschließender Gewebszusammenbruch trat in Bereichen des Schwanzes auf, die diese nukleären Plaques umgeben.

[0135] Verbindung 1361: Ähnlich der Verbindung 1360.

[0136] Verbindung 1436: Graduierliche Reduzierung der Gesamtaktivität. Der Herzschlag bleibt stark, was eine Unterdrückung des Nervensystems nahe legt. Die Melanozyten über dem Kopf und Schwanz begannen anzuschwellen, zuerst wiesen sie sichtbare distinkte Nuklei auf, und es wurde gefolgt durch das Zerfallen in Fragmente. Das Tier starb nach ungefähr 2 Stunden.

[0137] Verbindung 1437: Das Epithel, das die embryonalen Teile des Tieres bedeckt, wie beispielsweise den Schwanz und die Antenne, begann sich in Schichten abzulösen. Die Schichten der Zellen blieben zuerst intakt aber lösten sich nacheinander voneinander ab. Eine Färbung mit Trypan Blau zeigte, dass Zelltod auftrat. Das Tier war ansonsten aktiv, mit wenig bemerkbarem Gewebszusammenbruch.

[0138] FX3: Aus dem muskulären Bündel innerhalb des Schwanzes begann Myoglobin auszulecken. Die Streifungen der Skelettmuskulatur wuchsen weniger unterscheidbar. Teile der Muskulatur begannen sich zu trennen.

Inhibition des Mitogen-stimulierten Wachstums humaner T-Zellen:

[0139] Spezifische Tests wurden verwendet, um Steroide mit einer besonderen biologischen Wirkung zu identifizieren, wie beispielsweise einem Test zur Inhibition des Mitogen-stimulierten Wachstums humaner T-Zellen. Die Mitogen-induzierte Zellproliferation ist nach Berichten von der Aktivierung des NHE abhängig. Um daher zu bestimmen, welche Steroide auf bestimmte Zellen wirken, muß man bestimmen, welche Steroide die Mitogen (oder Wachstumsfaktor) aktivierte zelluläre Proliferation inhibieren.

[0140] Der T-Lymphozyt ist die lymphoide Zelle, die als Wirt der HIV-Infektion dient. Ein Steroid, das die Transformierung humaner Lymphozyten inhibiert, wirkt prinzipiell auf ein NHE, das möglicherweise durch die HIV-Infektion aktiviert wurde. Da GP120 in der Tat Hippocampuszellen NHE durch die Bindung an seinen zellulären Rezeptor aktiviert (Benos et al., J. Biol. Chem. 269, 1994, 13811–13816) ist die Vermutung, dass ein ähnlicher Effekt einer frühen viralen Interaktion mit dem Lymphozyten erfolgt, begründet. Dies bildete die Basis des nächsten Tests.

[0141] Menschliches heparinisiertes Blut, das frisch abgenommen wurde, wurde in Kulturgefäße, die 10 µg/ml Phytohaemagglutinin (PHA) in RPMI-Medium mit 10% FCS enthalten, eingefüllt. Verschiedene gereinigte Steroide wurden anschließend in Konzentrationen von 1,5 und 10 µg/ml hinzugegeben. Die Kulturen wurden 72 Stunden inkubiert, worauf Colcemid in einer Konzentration von 1 µg/ml zugegeben wurde. Die Kulturen wurden für zusätzliche 2 Stunden stehen gelassen und die Zellen wurden eingesammelt. Die Mitosedaten wurden unter Verwendung von cytochemischen Standard-Techniken, gefolgt von einer Giemsa-Färbung, eingeschätzt. Die Ergebnisse werden unten tabellarisch dargestellt.

Tabelle 6
Inhibierung der PHA-stimulierten Human-Lymphozyten

<u>Verbindung</u>	<u>(% Kontrolle)</u>		
	<u>1 µg/ml</u>	<u>5 µg/ml</u>	<u>10 µg/ml</u>
1256	3	8	10
1360	5	5	5
1436	20	50	80
1437			10
FX3			5

[0142] Wie aus der obigen Tabelle ersichtlich ist, inhibiert die Verbindung 1436 die Blasten-Transformierung am wirkungsvollsten mit mehr als 75% Inhibition, die bei 10 µg/ml beobachtet wurde. Es wurde auch eine Wirkung bei Squalamin bei dieser Konzentration beobachtet, aber die anderen Steroide waren beträchtlich weniger wirksam. Unter Verwendung dieses einfachen Tests wurde die Verbindung 1436 zur Verwendung bei der Behandlung von T-Zell-lymphoproliferativen Erkrankungen, einschließlich viraler Infektionen, die in diesen Zellen aktiv verbreiten, identifiziert.

[0143] Tests mit ähnlichem Design, die eine Zelle von Interesse und einen entsprechenden Wachstumsfaktor verwenden, können leicht konstruiert werden. Das heißt, um zu bestimmen, welches Steroid das Nützlichste beim Inhibieren der Proliferation von vaskulären glatten Muskelzellen nach einer Angioplastie sein kann, muss man nur eine Kultur mit menschlichen Koronar glatten Muskelzellen ansetzen und bestimmen, welches Steroid das PDGFstimulierte Wachstum dieser Zellen inhibiert, wie unten diskutiert wird.

Inhibition eines Spektrums von Zellen:

[0144] Unter Verwendung des Zelltests nach Baker et al., Cancer Res. 5, 1993, 3052–3057, wurde beobachtet, wie die Verbindung 1436 das Wachstum eines sehr breiten Spektrums an Zellen inhibiert. Wie in Tabelle 7 unten ausgeführt wird, waren alle malignen Tumoren, die Endothelzellen und die glatten Gefäßmuskelzellen die in Gewebekultur untersucht wurden empfindlich gegenüber einer Inhibition. Das bedeutet, dass die Verbindung 1436 bei der Wachstumsfaktor-abhängigen Proliferation vieler Arten von Gewebe eine Anwendung findet.

Tabelle 7
In vitro durch die Verbindung 1436 (10 µg/ml) inhibierte Krebszellen:

Menschliches Dickdarmkarzinom	SW948
Menschliches Dickdarmkarzinom	HT29
Menschliches Ovarkarzinom	SKOV3
Menschliches Melanom	WM1617
Lewis Lungenkarzinom	
B16 Melanom der Maus	
L1210 Leukämie der Maus	

Nicht transformierte Zellen, die in vitro durch die Verbindung 1436 inhibiert werden (10 µg/ml)

Lungenendothelzellen des Rinds

Menschliche mikrovaskuläre Endothelzellen

Menschliche Nabelschnurvenenendothelzellen

Menschliche glatte Muskelzellen der Koronararterien

Inhibierung von NHE3:

[0145] Die Verbindung 1436 inhibierte auch NHE3 des Kaninchens. PS120 Fibroblasten, die mit dem NHE3 des Kaninchens transfiziert waren, wurden gezüchtet und bei einer Exposition gegen über 40 mM NH₃C1 mit Säure vorbeladen, wie oben in Zusammenhang mit den **Fig. 1A** und **1B** beschrieben wurde. Die internen zellulären pH-Veränderungen, die als Rate der pH-Erholung als Funktion der wieder hergestellten extrazellulären Natrium-Ionenkonzentration nach Exposition gegenüber 10 µg/ml der Verbindung gilt, wurde mit dem Fluoreszenz-Farbstoff BCECF-AM, wie oben beschrieben, untersucht. Die Ergebnisse werden in **Fig. 10** dargestellt.

[0146] Das bedeutet, dass die Verbindung 1436 ein Inhibitor des NHE3 ist. Die Inhibierung von NHE3, die durch die Verbindung 1436 verursacht wird, erklärt jedoch nicht genau die sehr unterschiedlichen pharmakologischen Wirkungen von Squalamin und der Verbindung 1436, wenn sie in Zellen in einer Kultur getestet werden und in vielen in vivo-Modellen, wie oben beschrieben wurde. Das legt nahe, dass die Verbindung 1436 zusätzlich zu NHE3 einen weiteren NHE inhibiert. Ein guter NHE-Kandidat ist NHE5 (der kürzlich kloniert wurde, siehe Klanke et al., Genomics 25, 1995, 615–622), welcher mindestens in Lymphzellen, dem Hirn und den Hoden exprimiert ist.

Inhibierung von NHE5-exprimierenden Zellen:

[0147] Um zu bestimmen, ob NHE5 der andere NHE war, der durch die Verbindung 1436 betroffen war, wurde ein Test durchgeführt, um zu untersuchen, ob Zellen, die durch diese Verbindung inhibiert wurden, NHE5 exprimierten. Unter Verwendung des Verfahrens von Klanke et al. Und einer geeigneten PCR-Primer, die von Klanke et al. beschrieben wurden, wurde herausgefunden, dass NHE5 in allen Zellarten exprimiert wurde, die gegenüber der Verbindung 1436 empfindlich waren (siehe Tabelle unten). Die gesamte cDNA wurde aus isolierter RNA oder Gesamt-RNA oder PolyA⁺-RNA, die von Clontech Laboratories (Palo Alto, CA) bezogen wurde, hergestellt. Die anfänglichen PCR Zyklusreaktionen wurden mit Primern, die für menschliches NHE1, menschliches NHE3 oder menschliches NHE5 spezifisch waren, mit 80 ng cDNA oder im Falle von PolyA⁺-RNA als cDNA Quelle, mit 1,5 ng cDNA durchgeführt, wie in Zusammenhang mit Tabelle 2 oben beschrieben. Die Anlagerungstemperaturen waren in allen Fällen 57°C. "Semi-nested"-PCR-Reaktionen wurden für menschliche NHE1 und NHE5 durchgeführt, und "nested"-PCR-Reaktionen für menschliches NHE3 in den zweiten PCR-Reaktionen, mit den Bedingungen, die oben in Zusammenhang mit Tabelle 2 beschrieben sind, außer, dass die Anlagerungstemperatur für die zweite PCR-Runde für die Primer, die NHE5 detektieren 65°C betrug. Die Ergebnisse sind unten tabellarisch dargestellt.

Tabelle 8

Austauscher	NHE1		NHE3		NHE5	
PCR-Zyklen	1	2	1	2	1	2

Untersuchte Zelllinie oder Gewebe

Nebennierendrüse	+	+	-	+	+	+
Gesamthirn	+	+	+*	+	+	+
Dünndarm	-	+	-	+		
Skelettmuskel	+	+	-	-/+*	-	+
HPAEC (Endothel)	+	+	+*	+	+	+
HMVEC (Endothel)	+	+	-	+	+	+
CaCO ₂ (Epithel)	+	+	+*	+	+	+
Melanom (WM1617)	+	+	+*	+	+	+
Dickdarmkarzinom (polyA+ RNA)	+	+	+*	+	-	-
Leukämie HL-60	+	+	-	+	-	+
Leukämie MOLT4 (polyA+ RNA)	+	+	-	+	-	+
Astrozytom	+		+		+	
Glioblastom	+		+		+	

mehrere PCR-Banden

[0148] Es wird vermutet, dass NHE5 – welches eine ähnliche Sequenz hat wie NHE3 – das durch die Verbindung 1436 effizienter inhibierte Ziel ist. Zellen, die sowohl NHE3 und NHeS aufweisen, würden dadurch durch Verbindung 1436 beide NHE-Isoformen herunterregulieren, aber NHE3 würde in Gegenwart von Squalamin inhibiert werden.

Inhibierung der Mäuseleukämie:

[0149] Aufgrund seiner inhibitorischen Wirkung auf das Wachstum zahlreicher Krebszellen, wurde die Verbindung in einem klassischen Modell der Mausleukämie untersucht (Baker et al, Cancer Res., 53, 1993, 2052–2057). C57B Mäusen wurden L1210 Lymphoblastom-Leukämiezellen inkuliert bei einer Inkulationsgröße, die bei 100% der Tiere eine Leukämie verursacht. Mäuse erhielten die Verbindung 1436 zu 1, 5, 10 mg/kg alle 3 Tage intraperitoneal. Wie in Fig. 11 gezeigt, wurde bei der höchsten Dosis der Verbindung 46 eine signifikante Verlängerung der Lebensspanne erreicht.

[0150] Von besonderem Interesse ist das hämatologische Profil, das während des Verlaufs der Behandlung bestimmt wurde. Tiere wurden mit Cisplatin und der Verbindung 1436 behandelt. Wie aus der Tabelle 9 unten klar wird, entwickelten die Tiere, die mit Cisplatin behandelt wurden, am Tag 28 eine starke Anämie, aufgrund der Unterdrückung der Knochenmarks-Erythrozyten-Vorläuferzellen. Im Gegensatz dazu wiesen Tiere, die mit der Verbindung 1436 behandelt wurden einen nahezu normalen Hämatokritwert auf, mit einem Beweis auf eine robuste Granulozytenzahl.

Tabelle 9

Mittel	Behandlung	RBC ($10^6/\text{mm}^3$)		RBC ($10^6/\text{mm}^3$)	
		Zeit (früh)	Zeit (spät)	Zeit (früh)	Zeit (spät)
Cisplatin	Inokuliere Mäuse mit 5×10^5 L1210 Zellen ip, Tag 1 injiziere Cisplatin 8 mg/kg ip	9.4	1.5	8.1	18.1
Verbdg. 1436	Inokuliere Mäuse mit 5×10^5 L1210 Zellen ip, Tag 1 injiziere Verbindung 1436 8 mg/kg ip	4.8	8.8	3.3	3.7

Synergistische Inhibierung des Tumorwachstums:

[0151] Auf der Grundlage der Idee, dass Tumorwachstum sowohl diktionaler Expansion einer malignen Zelle zusammen mit der Entwicklung einer unterstützenden Gefäßversorgung einschließt, wurde eine Kombination der Verbindung 1436 mit Squalamin getestet, um zu bestimmen ob es einen synergistischen Effekt auf das Wachstum fester Tumoren erreicht. Dieses Konzept wurde im B16-Melanommodell untersucht.

[0152] Tieren wurde B16-Melanom implantiert, gefolgt von der Behandlung mit der Verbindung 1436 oder 1256, die in einem kombinierten Plan oder getrennt verabreicht werden. Wie aus der Fig. 12 offensichtlich wird, wurde keine signifikante Auswirkung auf das Tumorvolumen beobachtet, wenn Squalamin zu 5 mg/kg/Tag oder die Verbindung 1436 zu 10 mg/kg alle 3 Tage verabreicht wurde. Im Gegensatz dazu wurde eine signifikante Reduzierung des Tumorwachstums bemerkt, wenn beide Mittel gleichzeitig verabreicht wurden. Weder die Verabreichung von Squalamin zu 15 mg/kg/Tag noch die Verbindung 1436 alleine in einem tolerierbaren Zeitplan konnte diese Wirkung hervorrufen. Das bedeutet, dass eine Kombination dieser zwei Verbindungen einen therapeutischen Nutzen bei Tumoren ausübt, die auf eine Neovaskularisierung angewiesen sind, was die metastatische Ausbreitung verhindern könnte.

Auswirkungen von Aminosterolen auf lymphotrope Viren:

[0153] Da die Verbindung 1436 die PHA-stimulierte Proliferation menschlicher T-Zellen inhibiert, und die Proliferation der lymphoblastischen Leukämie in Mäusen kontrolliert, ohne, wie oben gezeigt wurde, eine nachteilige Toxizität zu haben, schien sie ein guter Kandidat für die in vitro Untersuchung als Inhibitor von HIV. PHA-stimulierte Lymphozyten wurden mit dem klinischen HIV-Isolat in einer Multiplizität der Infektion (multiplicity of infection) von 10 inkuliert. Frische Lymphozyten wurden erhalten und mit PHA und IL-2 stimuliert. Nach 3 Tagen, wurden 1000 TCID des Virus (klinisches HIV-Isolat) für eine Stunde bei einer M. O. I. von 1 : 10 verabreicht. Die Zellen wurden gewaschen und in einer Dosis-Wirkungs-Form wurde das Medikament ins Medium verabreicht. Nach 3 Tagen wurde der Überstand mit $\frac{1}{2}$ Volumen frischen Mediums und $\frac{1}{2}$ des frischen Medikaments ausgetauscht. Nach 7 Tagen wurde ein Tensid hinzugegeben und das HIV P-24 Antigen wurde mittels ELISA bestimmt. Die Lebensfähigkeit der Lymphozyten wurde gemeinsam mit dem Erscheinungsbild des viralen Genprodukts p24 untersucht. Die Ergebnisse sind unten tabellarisch zusammengefasst.

Tabelle 10
Inhibierung der HIV Replikation durch die Verbindung 1436

Konz. µM	P-24-ELISA	% Lebensfähigkeit
0,5	40561	91
1	7464	--
5	3426	--
10	421	95
20	9	90.1

[0154] Wie oben gezeigt wird, inhibierte die Verbindung 1436 die Antigensynthese um 97%, während die Lebensfähigkeit zu 95% aufrechterhalten blieb.

[0155] Die obigen Experimente unterstützen eindeutig die Nützlichkeit der Verbindung 1436 bei der Behandlung von lymphotropen viralen Erkrankungen. Auf der Grundlage dieser Studien, sollte die Identifizierung der spezifischen NHE-Inhibitoren von spezifischen zellulären Zielen des spezifischen Virus die rationale Entwicklung einer wirksamen antiviralen Therapie für ein gegebenes infektiöses Agens erlauben. Das bedeutet, dass der NHE-Inhibitor der Aminosterole, die auf die Epithelzellen des Atemtrakts wirken bei der Behandlung von respiratorischen Viren wirksam sein sollte, die sich auf diesen Zellen propagieren lassen, wie beispielsweise Herpes, Influenza und RSV. Das Konzept kann auf Viren, die das ZNS infizieren (Herpes) und die Leber (Hepatitis) übertragen werden und eine Anwendung finden. Dieser Ansatz verhindert die Infektion des zellulären Ziels durch das Virus, indem die Aktivierung des zellulären NHEs verhindert wird, das für die Zellproliferation und die effiziente intrazelluläre Virusvermehrung benötigt wird.

Wirkung auf die Insulinsekretion:

[0156] Beim Studieren zusätzlicher Rollen für die erfundungsgemäßen Aminosterole wurde bemerkt, dass die Freisetzung von Insulin aus der Inselzelle des Pankreas die Aktivierung der Inselzellen-NHE2 benötigte, die schließlich durch einen Mechanismus aktiviert wurden, der durch Glukose ausgelöst wurde. Es wird angenommen, dass die Überstimulierung der Inselzelle eine Rolle bei der Depletierung der Inselzellenfunktion im Typ II Diabetes spielen könnte. Zusätzlich sind Vorschläge gemacht worden, dass die genetischen Mechanismen, die zur Hyperaktivität der Inselzell-NHEs führen, eine Rolle beim Typ I Diabetes spielen können.

[0157] Das bedeutet, dass der Beginn des Diabetes in Individuen, die genetisch suszeptibel sind oder sich durch erworbene Prozesse (Fettleibigkeit) in Risikobedingungen begeben haben verzögert oder gelindert werden kann, wenn die Inselzellsfunktion unterdrückt werden würde. Die Inhibition des für die Sezernierung von Insulin verantwortlichen NHE könnte in diesem Rahmen einen therapeutischen Nutzen bilden.

[0158] Um die Wirkung eines Steroid-Administrators oder des für die Sezernierung von Insulin verantwortlichen NHEs zu untersuchen, wurden einige der Aminosterole aus der Haileber an hungernde Mäuse verabreicht. Männliche CD-1-Mäuse wurden in 1 bis 4 Behandlungsgruppen eingeteilt. Der Gesamt-Blutglukosewert wurde unter Verwendung eines Glukometers (Lifescan Glucometer II und One Touch Teststrips) getestet. Die statistische Analyse erfolgte durch einfache Varianzanalyse (ANOVA) gefolgt vom anschließenden Vonferoni's T-Test. Die Ergebnisse werden unten tabellarisch dargestellt.

Tabelle 11
Wirkung der Verbindung auf Blutglukose in hungernden Mäusen

<u>Gruppe</u>	<u>n</u>	<u>Ver- bin- dung</u>	<u>Gesamt- dosis mg/kg</u>	<u>Behandlung</u>	<u>Hunger-Blut- Glukose Mittel- wert + SEM (mg/dl)</u>
1	5	--	--	über Nacht hungern, Blut erhalten	38 ± 5,2
2	4	1437 (in H ₂ O)	20	10 mg/kg i.v. Tag 0 PM, über Nacht hun- gern, 10 mg/kg i.v. Tag 1 AM, Blut erhalten 30 Minuten nach der 2. Dosis	82 ± 15,3
3	4	1256 (in H ₂ O)	20	10 mg/kg i.v. Tag 0 PM, über Nacht hun- gern, 10 mg/kg i.v. Tag 1 AM, Blut erhalten 30 Minuten nach der 2. Dosis	65 ± 7,3
4	3	1436 (in D5W)	20	10 mg/kg i.v. Tag 0 PM, über Nacht hun- gern, 10 mg/kg i.v. Tag 1 AM, Blut erhalten 30 Minuten nach der 2. Dosis	105 ± 8,0

[0159] Wie aus den obigen Daten ersichtlich wird, waren die Glutglukoseniveaus nach der Verabreichung dieser Steroide zwischen 2- bis 3fach erhöht gegenüber dem Normalwert. Die Hunger-Blutglukose der Gruppe 2 war signifikant erhöht, verglichen mit der Gruppe 1 ($p < 0,05$). Die Hunger-Blut-Glukose der Gruppe 4 war gegenüber der Gruppe 1 signifikant erhöht. Daher scheint es, dass die intravenöse Verabreichung der Verbindung 1436 in D5W (5% Glukose) oder Verbindung 1437 in Wasser eine Hyperglykämie in den Mäusen verursachte. Es wird vermutet, dass die beobachtete hyperglykämische Antwort aus einer Inhibierung der Insulinsekretion bestand, wie aus grundlegenden physiologischen Prinzipien zu vermuten ist. Das heißt, dass die lang dauernde chronische Verabreichung einer Verbindung wie der Verbindung 1436 wertvoll beim Verhindern oder Verzögern des Einsetzens sowohl des Typ-I- und des Typ-II Diabetes sein kann.

Wirkung auf das Wachstum der glatten Muskulatur der Arterien:

[0160] Aminosterole der Erfindung können ebenfalls eine Wirkung beim Inhibieren der Wachstumsfaktor-mediierten Proliferation der glatten Muskulatur innerhalb der Arterie haben. Nach einer koronaren Angioplastie tritt sekundär zu einer reparativen Proliferation der glatten Gefäßmuskulatur innerhalb der Wand des chirurgisch behandelten Blutgefäßes häufig ein Wiederverschluss auf. Dieser Prozess findet im Allgemeinen über den Verlauf von 7 bis 10 Tagen statt. Um zu untersuchen, ob ein Mittel die Wachstumsfaktor-mediierte Proliferation der glatten Muskulatur innerhalb einer Arterie verhindern kann, wurde die Verbindung 1436 *in vitro* für seine Wirkung auf die Proliferation auf menschliche koronare Arterien glatte Muskulatur untersucht. Die Ergebnisse für die Verbindung 1436 sind in der **Fig. 13** gezeigt, und die für Squalamin werden in der **Fig. 14** gezeigt, **Fig. 15** ist ein zusammengesetzter logarithmischer Graph.

[0161] Wie aus der **Fig. 13** ersichtlich ist, war die Verbindung 1436 bei ungefähr 10 bis 12 µg/ml beim Unterdrücken des Wachstums dieser Zellen wirksam. Zellen konnten beispielsweise in einem Ruhestadium in Gegenwart dieses Steroids bei ungefähr 11 µg/ml ohne Verlust der Lebensfähigkeit bewahrt werden. Dieses Experiment legt nahe, dass die lokale Verabreichung der Verbindung 1436 an der Stelle der Angioplastie über eine langsame Freisetzung verabreichung in einer nahen vaskulären Stelle die Muskel-Proliferation während der Dauer reduzieren könnte, bei der das Gefäßendothel einen Verschluss bildet und die zellulären Ereignisse, die die akute Wunde umgeben, abklingen.

Auswirkungen auf das Wachstum und die Gewichtszunahme

[0162] Während der Untersuchung der physiologischen Wirkungen der Verbindung 1436 bei normal aufgezogenen Mäusen wurde klar, dass dieses Steroid sowohl das lineare Wachstum und die Wachstumszunahme bei heranwachsenden Mäusen in einer Dosis-abhängigen Weise unterdrückte. Die Tiere wurden mit QTD (i.p.) beginnend am Tag 1 dosiert. Die Fig. 16 zeigt, dass C57B-Mäuse, die mit 10 mg/kg, QTD i.p., 5 mg/kg QTD i.p. und 1 mg/kg QTD i.p. behandelt wurden eine Dosis-abhängige Reduzierung des Wachstums aufwiesen. Nach 6 Dosierungen war das Wachstum der Tiere, die 10 mg/kg OTD erhielten, in einem Ausmaß unterdrückt, dass das Wachstum über fast einen Monat nach Beginn der Behandlung fast vollkommen unterdrückt war. Auffällig war die offensichtliche Gesundheit der behandelten Tiere – alle waren aktiv, normal proportioniert, nicht kachektisch und in anscheinend herausragendem klinischem Zustand. Sie erschienen ganz ähnlich wie hypophysektomierte Tiere erscheinen könnten.

[0163] Die Verbindung 1436 infibierte das Wachstum verschiedener Zelltypen und -gewebe eindeutig und dies erklärt in gewisser Weise die beobachtete starke Unterdrückung des Wachstums. Der herausragend gute Gesundheitszustand dieser Tiere suggeriert jedoch, dass ein zusätzlicher Mechanismus einbezogen sein muss – einer, der die Inhibierung der pituären Funktion einschließt. Von der Verbindung 1436 wird angenommen, dass sie die Sekretion der Hirnanhangdrüsen-Hormone teilweise inhibiert, was zur beobachteten Wachstumsunterdrückung führt. Diese Eigenschaft der Verbindung 1936, unabhängig von ihrem genauen Mechanismus, suggeriert, dass es eine nicht bekannte Form einer antiproliferativen Wirkung ausübt, wenn sie an ein Tier verabreicht wird. Sie wird nicht nur auf die Wachstumsfaktor-induzierte zelluläre Proliferation wirken, indem sie auf die proliferierende Zelle wirkt, sondern auch die Sekretion wachstumsfördernder Hormone auf zentralem, endokrinem Niveau inhibieren. So versetzt die Verbindung 1436 das Tier in einen "Wachstums-inhibierten" Status. In einem solchen Zustand werden maligne Zellen, die keine optimalen exogenen hormonellen Stimulierungen durch Hormone wie beispielsweise Wachstumshormone und vielleicht LH und FSH erhalten. Die Sekretion von Hormonen wie beispielsweise Östrogen und Progesteron wie auch Insulin wird dadurch wahrscheinlich dereguliert. Viral infizierte Zellen werden unter physiologisch ungünstige Bedingungen gestellt und die Wirksamkeit der viralen Infektionen könnte dramatisch reduziert werden. Immunologisch fremde Zellen, die im Wachstum unterdrückt sind, könnten durch das Existieren des Immunsystems entfernt werden, was jetzt eine Chance ermöglicht, kinetisch mit diesen „fremden“ Zellen fertig zu werden.

Wirkung auf den arteriellen Widerstand

[0164] Die Verbindung 1436 hat sich ebenfalls als den arteriellen Widerstand in der Ratte nach der intravenösen (i. v.) Verabreichung erwiesen. Eine 2008 schwere Ratte wurde in die rechte Karotidarterie kathetisiert, und die Verbindung wurde über einen Zeitraum von 10 Sekunden eingeführt, bis zu einer Gesamtdosis von 5 mg/kg. Innerhalb von 30 Sekunden ist der mittlere arterielle Druck von 100 mm Hg abgefallen auf ungefähr 70 mm Hg abgefallen, mit einer markanten Erniedrigung des Pulstdrucks von ungefähr 40 mm auf ungefähr 10 mm. Trotz des Abfalls des Blutdrucks, wurde kein signifikanter Anstieg der Herzfrequenz beobachtet. Wenn der Herzausstoß im Grunde nicht betroffen war, sollte die Reduzierung des Blutdrucks im Prinzip aus einer Reduzierung des systemischen Widerstands herrühren.

[0165] Die Wirkung wurde über 30 Minuten verfolgt, ohne signifikante Veränderung. Zu dem Zeitpunkt wurden 40 µg Noradrenalin eingeschleust. Ein fast sofortiger Anstieg des Blutdrucks wurde mit einem verbundenen Anstieg des Pulstdrucks beobachtet. Diese Daten beweisen, dass die Wirkung der Verbindung 1436 durch pharmakologische Standardanwendungen leicht umkehrbar ist.

[0166] Die Fähigkeit der Verbindung 1436, den arteriellen Widerstand und en arteriellen Blutdruck zu senken, indiziert dessen Anwendung als Blutdrucksenkendes Mittel. Da es keine kompensierende Tachykardie auszulösen scheint, ist der Nettoeffekt die Reduzierung der Auswurfwiderstand des Herzens. Eine physiologische Folge dieser Art physiologischen Effekts wäre die Verlangsamung des Vorgangs der Proliferation der Herz-Hypertrophie und der arteriellen glatten Muskulatur. Aufgrund dieser Eigenschaften, sollte die Verbindung eine wirksame Behandlung der kongestiven Herzinsuffizienz sein, bei dem eine Reduzierung des peripheren Gefäßwiderstands gewünscht wäre. Seine Schnelligkeit der Wirkung und die leichte Reversibilität, zusammen mit dem minimalen Tachykardie-Effekt machen die Verbindung zu einem wertvollen therapeutischen Mittel.

[0167] Das bedeutet, dass die Verbindung 1436 ein antiproliferatives und therapeutisches Mittel mit zuvor unbekannten und wertvollen Eigenschaften und Nutzen darstellt. Sie kann eindeutig bei Erkrankungen verwendet werden, bei denen die Unterdrückung des Wachstums spezieller Gewebe oder ganzer Organystem gewünscht ist.

Unterdrückung kardiotoxischer Wirkungen der Ischämie:

[0168] Es ist vorgeschlagen worden, dass die Inhibitoren der NHE Familie eine therapeutische Rolle bei der

Behandlung von Ischämiezuständen des Herzens spielen könnten. Diese Zustände treten nach Herzinfarkten, während Herzversagen und im Verlauf einer Transplantation eines Organs von einem Donor auf einen Empfänger auf.

[0169] Um zu bestimmen, ob die Verbindung 1936 einen solchen Nutzen hat, wurde das folgende Experiment durchgeführt. Das Herz eines juvenilen *Xenopus laevis* Frosches wurde aus dem lebenden Tier herausoperiert. Das Herz wurde in eine Petrischale getan, die Krebs-Ringer-Puffer mit Adrenalin 50 µg/ml enthält und mit dem bloßen Auge untersucht. Bei Raumtemperatur, schlug das Herz für ungefähr eine Stunde auf koordinierte Weise weiter (Artriumkontraktion gefolgt von der Ventrikelkontraktion). In Gegenwart von 10 µg/ml der Verbindung 1436, hielt der spontane Herzschlag für bis zu 24 Stunden an. Der Atrium-Schrittmacher und die Weiterleitung der Artriumkontraktion zum Ventrikel blieben in diesem Zeitraum kräftig.

[0170] Obwohl der genaue Mechanismus, der dieses Persistenzphänomen der Herzaktivität ex vivo erklärt, noch nicht vollständig verstanden wird, wird vermutet, dass die Verbindung 1436 durch das Inhibieren von NHE3 und NHE5 die Akkumulation intrakardialen Kalziums durch das Blockieren dieser NHEs verhindert. Das gegenwärtige Verständnis in dem Fachgebiet, dass intrazelluläre Säure, die sich während der Ischämie anhäuft, durch den NHE gegen extrazelluläres Natrium ausgetauscht wird. Dann wiederum wird das Natrium, das in die Zelle geleitet wird, anschließend im Tausch gegen extrazelluläres Kalzium durch den Natrium/Kalzium Austauscher ausgeschieden. Es ist das Kalzium, das auf diesem Weg eindringt, und zu Herzstillstand und Arrhythmie führt. Durch das Blockieren des NHE, verhindert die Verbindung 1436, dass Protonen oder Säure die Herzzelle verlassen, was den Energieverbrauch und die Arbeitsleistung reduziert, welches Wirkungen sind, die, zusammen mit der Verhinderung des schlussendlichen Eindringens schädlichen Kalziums die Zelle schützen.

Antiproliferative Tests und Tumorwachstums-Unterdrückungstests als charakterisierende Tests:

[0171] Wie oben, wurde der Kaulquappentest verwendet, um zusätzliche Verbindungen zu finden. In Gegenwart von 10 µg/ml der Verbindung 1436 erleidet die *Xenopus* Kaulquappe im Stadium 59 bis 60 eine dramatische Zerstörung der Melanozyten auf ihrem Kopf, Rumpf und Schwanz, zusammen mit einer Unterdrückung des Nervensystems. Auf die Integrität der Epithelzellen, den Gefäßfluss und das Erythrozytvolumen, die Gewebsintegrität, die Streifung der Muskelfasern und die Aktivität des GI-Trakts wurden keine Auswirkungen beobachtet.

[0172] Verbindung 1437 (Fraktion 4) enthält eine ungewöhnliche Ergosterolartige Seitenkette. Dieses Molekül kann aufgrund seiner dramatischen Wirkung auf das embryonale Gewebe, das den Kaulquappenschwanz bedeckt, leicht von allen anderen Steroiden, die aus dem Hai isoliert wurden, unterschieden werden.

[0173] Unter Verwendung des oben beschriebenen Kaulquappen-Tests konnte beobachtet werden, dass sich die larvale Haut innerhalb von 60 Minuten Exposition dieses Steroids in einer Konzentration von 10 µg/ml als eine Hülle ablöst. Das beschleunigte Auftreten dieses Vorgangs legt nahe, dass NHE, das durch das epitheliale Gewebe exprimiert wird, das Ziel ist. Da die Wirkung des NHE und die Zellmembranproteine, die an der Adhäsion beteiligt sind miteinander kommunizieren (Schwartz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 88, 7849–7853), wurde vorgeschlagen, dass die Inhibition von NHE auf dem Epithel zur Zerstörung der zellulären Kontakte zwischen dem Epithel und der darunter liegenden Schicht führt, und so zu einem Abstoßungseffekt führt.

[0174] Unter Verwendung des oben beschriebenen Tests, wurden die antikanzerogenen Wirkungen der Verbindung 1937 gegenüber mehreren Krebszelllinien untersucht. Die Verbindung 1437 wies gegen das menschliche Ovarkarzinom SKOV3 eine antikanzerogene Wirkung auf. Das bedeutet, dass die Verbindung 1437 eine Verwendung finden sollte bei der Behandlung von Karzinomen, die einen sensitiven Phänotyp aufweisen.

[0175] Wie die Untersuchung oben beweist, zielt die Verbindung auf "Mesothelial-artige" Epithelschicht ab, eine Hautschicht, die nur aus einer zellulären Schicht besteht. Eine solche Schicht ähnelt Epitheloberflächen, wie beispielsweise dem menschlichen Peritoneum, Synovium, Perikard und Ependym. Demnach sollte die Verbindung 1437 auf diese Gewebe und daraus entstandene Entartungen antiproliferative Wirkungen ausüben. Außerdem können diese Gewebe virale Infektionen unterstützen und deswegen sollte die Verbindung in diesen Fällen einen therapeutischen antiviralen Nutzen mit sich bringen.

[0176] Unter Verwendung des *Xenopus*-Kaulquappen-Tests, ist es möglich Verbindungen zu identifizieren, die mit der Verbindung 1437 geringe chemische Ähnlichkeit aufweisen, aber die gleichen pharmakologischen Wirkung im Hinblick auf die Abstoßung von Epithel hervorrufen.

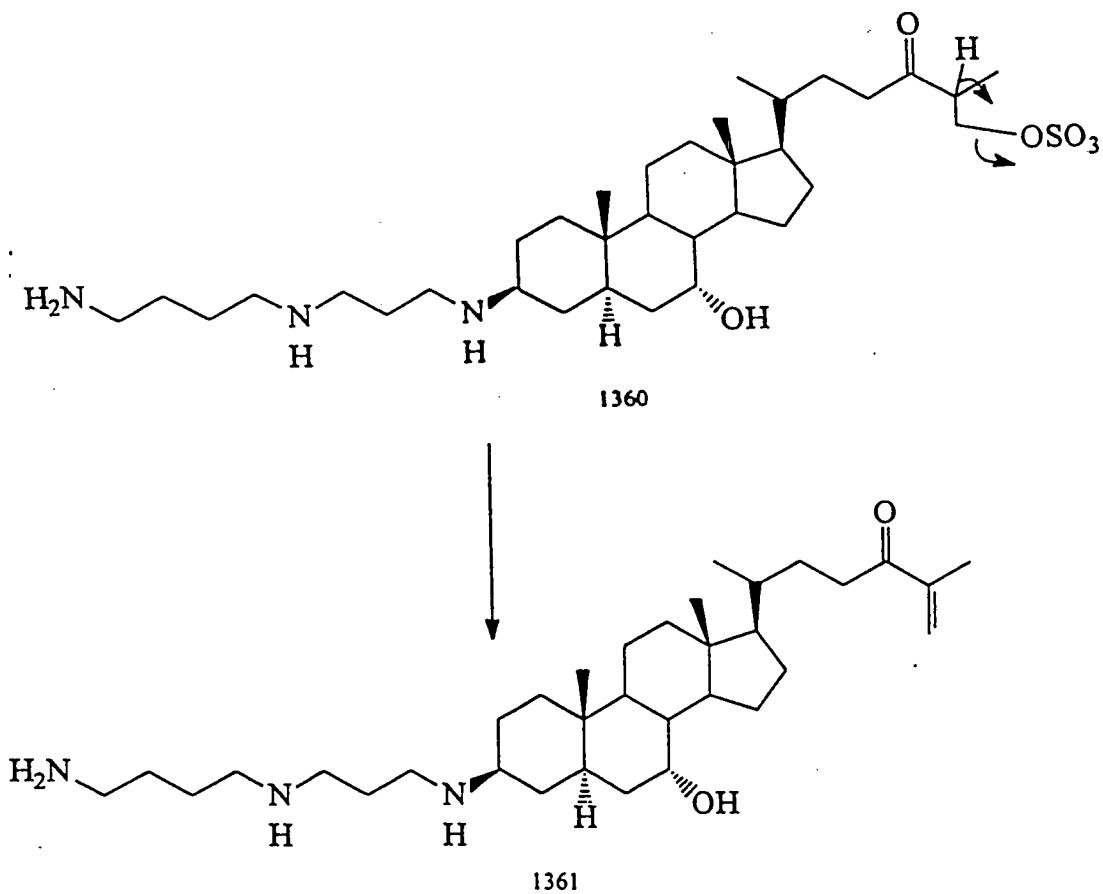
[0177] Steroid 1360 (Fraktion 2) enthält eine Seitenkette, die eine Ketogruppe an dem Kohlenstoff 24 und ein Sulfat an dem C27 Hydroxyl trägt. Obwohl es in seiner Struktur Squalamin ähnlich ist, weist es ein entscheidendes unterschiedliches pharmakologisches Profil, sowohl im Kaulquappenwie auch im Hühnerembryotest auf.

[0178] Wenn Kaulquappen im Stadium 59–60 in eine 10 µg/ml Lösung der Verbindung 1360 getan wurden, trat innerhalb von 60 Minuten im gesamten Schwanz eine ausgedehnte Gefäßverschließung auf – bei den distalen Teilen in größerem Maße als bei den proximalen. Ein Verschluss trat aufgrund eines sichtbaren An-

schwellens der Erythrozyten, gefolgt von deren Platzen und der Freisetzung der Nuklei auf. Die Nuklei wurden durch die Ausformung des vaskulären Bettes in die distalen Arterien und Venen transportiert, die mit einer Münzauf trennungsmaschine verglichen werden kann, die Münzen verschiedener Größe und Gewichte in spezielle Auffangröhren aufteilt. Sobald sich die Nuklei in diesen Gefäßen ansammelten, endete auf proximaler Seite der Blutfluss. Innerhalb von 20 bis 20 Minuten, nachdem sich die nukleären Stopfen bildeten, begann das Gewebe um diese Stopfen zusammen zu brechen. Es schien als setzten die Nuklei hydrolytische Enzyme frei, die im wesentlichen die Grundsubstanz auflösten, die diese Gewebe zusammenhält.

[0179] Im Hühnerembryontest, erzeugt die Anwendung der Verbindung 1360 eine unterschiedliche Wirkung als die, die in der Kaulquappe gesehen wurde. Innerhalb von 20 Minuten wies das Blut, das durch die embryonalen Gefäße fließt, eine hellere rote Färbung auf, was einen höheren Oxygenierungsgrad widerspiegelt, als bei roten Zellen, die der Verbindung nicht ausgesetzt waren. Obwohl einige zahllose Mechanismen diese Wirkung erklären könnten, wird angenommen, dass die roten Blutkörperchen des Hühnchens einen stärker alkalischen inneren pH Wert nach der Exposition gegenüber der Verbindung 1360 erfahren. Diese könnte durch die Aktivierung der NHEs dieser Zelle hervorgerufen sein. Außerdem würde die Aktivierung des Austauschers auch ein Anschwellen verursachen – ein Phänomen, das bei der Kaulquappe beobachtet wird.

[0180] Es ist bekannt, dass die kernhaltigen Erythrozyten von Amphibien und Fischen (und wahrscheinlich Vögeln) einen spezifischen NHE exprimieren, der als NHE1-beta bezeichnet wird. Anders als bei allen anderen charakterisierten, wird dieser Austauscher durch cAMP aktiviert und wird durch den Zustand der Hämoglobin-oxygenierung aktiviert. Diese Daten suggerieren, dass die Verbindung 1360 sich als aktivierend für diesen Austauscher herausstellen wird. Außerdem macht die chemische Struktur dieser Verbindung sie ideal geeignet dafür in der vermuteten Weise zu funktionieren. Es wurde entdeckt, dass die Verbindung unter leicht alkalischen Bedingungen eine Dehydratierung des 27-Hydroxyls erlebt, einen Verlust des Sulfats und die Erzeugung des entsprechenden 27-ens, wie in dem Schema unten ausgeführt wird:



[0181] Das bedeutet, dass bei der Erhöhung der Alkalität im Inneren einer Zelle, die Überlebenszeit der Verbindung 1360 abnimmt, wodurch eine außergewöhnliche Art von "Rückkoppelung" hervorgerufen wird. Es ist möglich, dass die Verbindung 1361, das Produkt der hydrolytischen Umwandlung, gegenüber dem gleichen NHE inhibitorisch wirkt.

[0182] Die Daten beweisen, dass die Verbindung 1360 eindeutig mit einem NHE interagiert, dass auf Blutzellen im Embryonalstadium vorhanden ist. Da der menschliche Fötus kernhaltige rote Blutkörperchen erzeugt, die in der Größe vergleichbar sind, mit denen der Vögel, Fische und Amphibien, wird vermutet, dass einige menschliche Blutzellen, vielleicht fötale, auch zelluläre Ziele dieser Verbindung darstellen. Die Aktivierung der

fötalen NHEs könnte bei Strategien eine Verwendung finden, die darauf zielen, den Fötus vor hypoxischer Schädigung zu schützen.

[0183] Das gesamte Ausmaß der Anwendungen der Verbindung 1360 erwartet die Beschreibung der Verteilung der Erythrozyten-NHE-Isoform beim Menschen. Es scheint jedoch bei einigen Szenarien eine stimulierende Aktivität zu haben, anstatt ein Inhibitor eines NHE zu sein. Auf jeden Fall könnte die Verbindung für das folgende verwendet werden: antibakterielle, antifungizide, antivirale, etc. fötale Stressbehandlung und Behandlung hämatologischer Entartungen.

[0184] Obwohl die chemische Struktur der Fraktion 3 (FX3) noch vollständig aufzuklären ist, ist es aufgrund der Eigenschaften in der Dünnschichtchromatographie ein Spermin, das mit dem Steroid verbunden ist, ähnlich wie die Verbindung 1436. Dieses Steroid hat eine starke Wirkung auf die embryonalen Skelettmuskeln der Kaulquappe.

[0185] Im Kaulquappentest, wurde innerhalb einer Stunde nach der Gabe ein Auslecken eines braunen Pigments aus den Muskelbündeln des Schwanzes bei Kaulquappen im Stadium 59–60 beobachtet. Die Querstreifungen wurden undeutlich und verschwommen. Der Herzschlag und andere Funktionen, einschließlich der Muskelaktivität der Gliedmaßen waren nicht betroffen. Diese Beobachtungen suggerieren, dass FX3 auf primitives Mesenchym, einschließlich der Muskulatur zielt.

[0186] Falls sich die Beobachtungen in der Kaulquappe auf den Menschen übertragen lassen, dann sollte FX3 die Proliferation von bestimmten mesenchymalen Zellen stark beeinflussen. Das bedeutet, dass es eine Verwendung bei der Behandlung einer Vielzahl von Krebsarten mesenchymalen Ursprungs haben würde, wie beispielsweise in der gestreiften Muskulatur, dem Bindegewebe, Fibroblastengewebe, Knochen, und Fettgewebe.

[0187] Zusätzlich würde FX3, falls die Proliferation von Fibroblasten betroffen ist, eine Anwendung bei der Kontrolle von Proliferation von Fibroblasten bei Szenarien haben, wo dieser Vorgang nicht erwünscht ist. Das bedeutet, dass die Vernarbung des ZNS verhindert werden könnte. Eine unerwünschte Vernarbung nach einer Operation an Stellen, die durch eine Fibrose verkompliziert würde, wäre ein ernst zunehmendes therapeutisches Ziel. Generalisierte Zustände der Fibroblastenproliferation, die bei Herz-, Nieren- und Leberkrankheiten beobachtet werden, könnten verzögert werden.

[0188] Falls die Proliferation von Muskeln inhibiert wird, könnte FX3 eine Verwendung finden bei der Inhibition hyperplastischer Erkrankungen der Muskulatur.

[0189] Durch die Verwendung des Xenopus Kaulquappen-Tests sind einige Aminosterole identifiziert worden, die pharmakologische Wirkung ähnlich der bei FX3 gesehenen, aufweisen. Diese Verbindungen weisen im Allgemeinen den Spermin-Rest auf. Sie sind chemisch einfacher als Squalamin und bieten weniger teure Möglichkeiten der Medikamenten-Designs als natürlich auftretende Steroide.

[0190] Die Struktur der Fraktion 1 (FX 1A)-Steroids ist oben dargestellt. Es scheint in Wasser eine schnelle Umwandlung in ein anderes Molekül zu durchlaufen (FX1B). FX1A übt einen unterschiedlichen Pharmakologischen Effekt auf die Xenopus Kaulquappe aus, wenn der oben dargestellte Test verwendet wird.

[0191] Innerhalb einiger Stunden nach Zugabe dieses Steroids in das Wasser, das die Kaulquappe umgibt, ist die fäkalen Freisetzung stark erhöht. Da der GI-Trakt einer Anzahl an Vertebraten NHE bei der Kontrolle der Darmflüssigkeitssekretion verwendet wird angenommen, dass die Fraktion 1 auf einen derartigen NHE einwirkt. Die Zunahme an Fäkalmaterial könnte einer „Diarrhöe“ entsprechen, einem Zustand, der bei Menschen auftritt, wenn der Darm-NHE gehemmt wird. Da dieses Steroid eine geringe Wirkung auf die Gesamtaktivität, die Muskelintegrität oder Lebensfähigkeit irgendeines sichtbaren Gewebes ausübt, könnte es einer physiologischen Funktion, wie beispielsweise der Regulierung des Natrium-Wasser-Austauschers dienen.

[0192] Obwohl die Verwendungen klarer sein werden, sobald das Steroid und das Ziel besser charakterisiert sind, suggerieren die Daten der Kaulquappe, dass Fraktion 1 eine Anwendung bei der Modulierung des Natrium/Protonen-Austauschs bei bestimmten physiologischen Störungen finden wird. Diese schließen die Behandlung von Hochdruck, Cystischer Fibrose und Verstopfung ein.

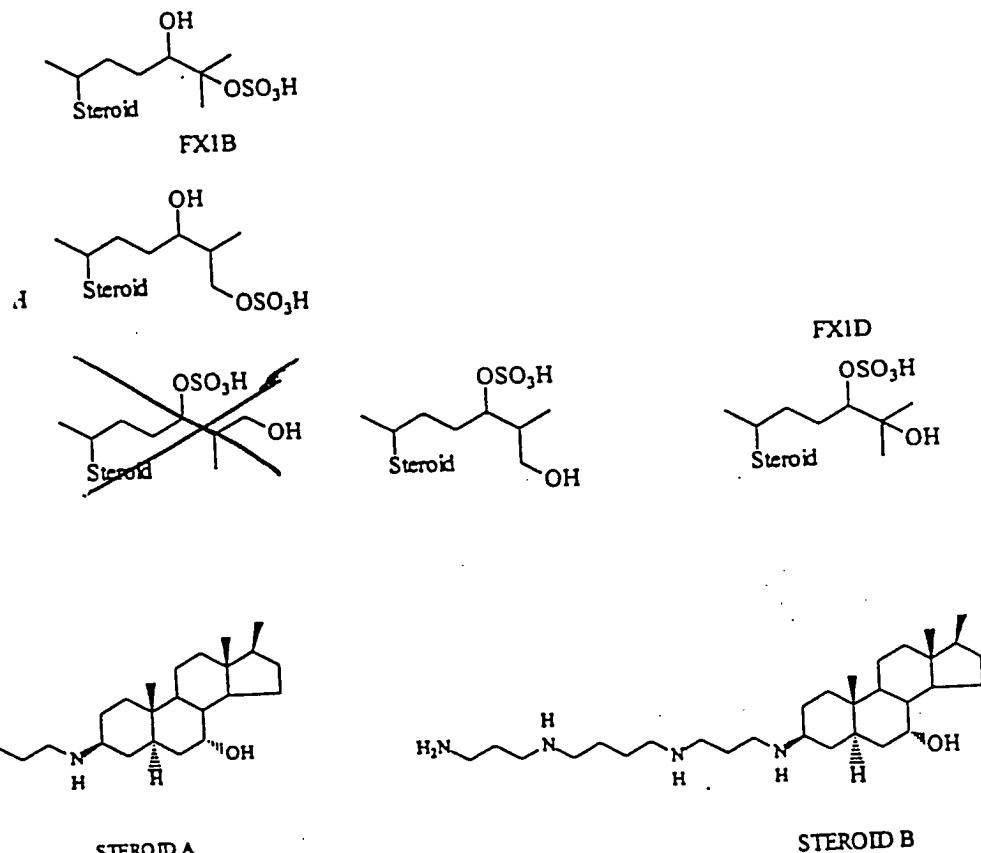
[0193] Aufgrund seiner Wirkungen auf die Dynamik der Darmflüssigkeit, könnte dieses Mittel ein antimikrobielles sein, dass die Abtötung empfindlicher Bakterien, Parasiten, Pilze, etc. bewirken könnte, während die Entleerung der infektiösen Last aus dem Darm unterstützt wird. Fraktion 1 könnte ebenfalls eine Verwendung finden als wirksames antibakterielles, antiparasitäres oder antifungizides Mittel.

Zusätzliche Aminosterolstrukturen

[0194] Aus den diversen aus *Squalus acanthias* isolierten Aminosteroiden, war es möglich das Vorhandensein ähnlicher Aminosterole vorherzusagen, die noch nicht aus den Geweben dieses Tiers isoliert worden sind. Es kann abgeleitet werden, dass diese Sterole in Wirbeltiergebenen vorhanden sind aufgrund der Strukturen, die bis heute bestimmt worden sind, und aufgrund der bekannten biochemischen Umwandlungen, die eine Cholesterinseitenkette erfahren kann (siehe Tammar, „Gallensalze in Fischen, „Chemical Zoology, (Herausg. Florskin et al.), Academic Press, 1974, 595–612).

[0195] Deswegen sollte man aufgrund des Vorhandenseins von Squalamin, welches ein 24 Sulfatohydroxyl trägt in der Lage sein, andere Derivate mit einem Squalamin-Steroidnukleus und einem Aminosterolanteil zu finden, die sich aber in der Position des Sulfatohydroxyl in der Seitenkette unterscheiden, wie unten gezeigt wird. Da eine Hydroxylierung an den Kohlenstoffen 25, 26 oder 27 erfolgen kann, und da jedes davon eine stereospezifische chemische Entität darstellen würde, ist es vernünftig ihr Vorhandensein in der Natur anzunehmen, und zu vermuten, dass sie verschiedene pharmakologische Eigenschaften aufweisen.

[0196] Das Vorhandensein von Steroiden, die zusammen mit einem zweiten Hydroxyl ein einzelnes Sulfat in der Cholesterinseitenkette tragen, lässt eine potentielle Diversität im Muster der Seitenketten-Sulfatierung und der Hydroxylierung an einer einzelnen Position vermuten. Das bedeutet, dass in der Natur wahrscheinlich Aminosterole existieren, bei denen eine Sulfatierung an den Kohlenstoffen 24, 25, 26 oder 27 gefunden wird. Andererseits kann jedes dieser vier sulfatierten an den verfügbaren Kohlenstoffen 24, 25, 26 und 27 hydroxyliert sein. Auf Grundlage der induktiven Logik und den hier offenbarten Daten können zumindest die folgenden Steroide aus Naturprodukten isoliert werden:



Betrachtungen zur Struktur-Aktivität von NHE-Inhibitoren:

[0197] Auf Grundlage der oben zur Verfügung gestellten Informationen, können jetzt Hauptstrukturelemente der Aminosterolinhibitoren des Natrium/Protonen-Austauschers abgeleitet werden. Die Schlüssel-Kernstruktur enthält einen Steroidnukleus und eine unterscheidende Seitenkette. Die Aminosterolanteil bestimmt die spezifische NHE-Isoform. Zusätzlich erweitert das Vorhandensein von Spermine oder Spermidin, das an das Steroid angehängt ist, das Wirkungsspektrum. Auf der Grundlage dieser Verallgemeinerung kann leicht erkannt werden, dass die Struktur der Seitenkette eine große Spezifität bedingt.

[0198] Das bedeutet, dass andere synthetische Steroid-NHE-Inhibitoren mit hoher pharmakologischer Spezifität durch die Betrachtung der modularen Art des Moleküls entworfen werden können. Chemische Entitäten, die das Aminosterol in Form und molekularen Oberflächen-eigenschaften nachahmen, werden mit der NHE Familie interagieren. Eine derartige Chemikalien-Nachahmungen der steroidalen Nukleus sind bekannt und werden bei der Synthese nichtsteroider Östrogenagonisten und -Antagonisten weit verbreitet verwendet.

[0199] Die Anhängung spezifischer Cholesterin-Seitenketten an diese stereomimetischen Strukturen wiederum etabliert die Spezifität von individuellen NHE-Isoformen.

Antimikrobielle Wirkung:

[0200] Die Aminosterol NHE-Inhibitoren stellen eine Klasse von Antibiotika dar, die auf der Wirkweise ba-

siert. Da diese Stoffe auch mit spezifischen NHE-Isoformen in humanen Geweben interagieren, kann die vorsichtige Auswahl eines Antibiotikums dieser Klasse unerwünschte Nebenwirkungen aufgrund der Wirts-NHE-Inhibition ausräumen, oder den therapeutischen Nutzen potenzieren. So würde die Verwendung eines Mittels wie der Verbindung 1436 die Lymphoproliferation während der aktiven Behandlung einer Infektion unterdrücken. Die orale Verabreichung der Fraktion 1 kann den Übergang von Darmflüssigkeit erhöhen während sie parasitäre Ziele abtötet. Weiter kann ein wirksames Antipilzmittel entworfen werden, um die Spezifität für das pathogene Ziel gegenüber empfindlichen Vertebraten-Isoformen zu erhöhen.

[0201] Wie in der Tabelle I am Ende dieser Beschreibung gezeigt wird, unterscheidet sich das antibakterielle/antipilzliche Spektrum von Verbindung zu Verbindung. Deswegen ist es möglich ein antimikrobielles Steroid mit oder ohne Squalamin-artige pharmakologische Wirkung zu erreichen.

[0202] Wie in Tabelle II, die der Tabelle I folgt, fortgesetzt wird, unterscheiden sich die Wirkungen natürlicher und synthetischer Aminosterole in den verschiedenen Tests. IM Hinblick auf das vorher gesagte, ist es jetzt möglich nach Steroiden mit oder ohne Squalamin-artige pharmakologische Wirkung zu screenen.

Selektion der NHE-Isoform:

[0203] Durch die Verwendung molekularbiologischer Techniken ist es möglich zu bestimmen, welche NHE-Isoformen in spezifischen Zellen wie beispielsweise bösartigen Krebserkrankungen, exprimiert sind. Menschliche Melanome exprimieren NHE1, NHE3 und NHE5 und menschliche Adenokarzinome exprimieren im wesentlichen NHE3 (siehe Tabelle 8).

[0204] Das bedeutet, dass eine Behandlung dieser Art von Adenokarzinom am wirksamsten mit Verwendung eines spezifischeren NHE3-Inhibitors wie beispielsweise Squalamin oder der Verbindung 319 erreicht werden kann. Im Gegensatz dazu exprimiert ein Melanom beträchtliche Mengen an NHE5 zusammen mit NHE3. Das bedeutet, dass die Behandlung dieser bösartigen Erkrankung einen Inhibitor von NHE3 und NHE5 wie beispielsweise die Verbindung 1436 alleine oder in Kombination mit Squalamin einschließen sollte.

[0205] Zusammengefasst erlaubt die Erfahrung die Nützlichkeit der Aminosterol-NHE-Inhibitoren durch diagnostische Untersuchung der exprimierten NHE-Isoformen in den Zielgeweben zu etablieren. Diagnostische Ansätze können die immunologische Detektion des spezifischen NHE-Isoform-Proteins oder ein molekularbiologisches Verfahren wie beispielsweise die PCR schließen, die spezifische Sequenzinformation verwendet und Standard-Technologien.

[0206] Weitere Ausführungsformen der Erfindung werden dem Fachmann nach Betrachtung der Beschreibung und dem Arbeiten mit der Erfindung ersichtlich. Die Ausführungsformen und bevorzugten oben beschriebenen Eigenschaften sollten als exemplarisch betrachtet werden, wobei die Erfindung in den anhängenden Ansprüchen definiert wird.

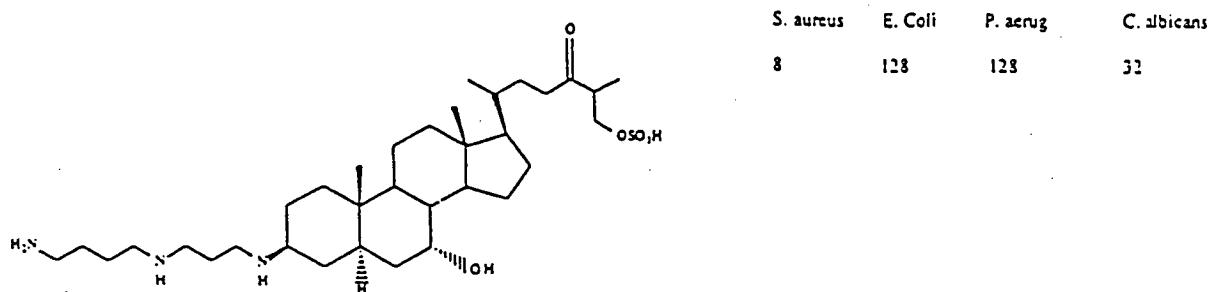
Tabelle I
Antibiotikawirkung natürlicher und synthetischer Aminosterole

Struktur

Antibiotische Wirkung

MIC Werte ($\mu\text{g}/\text{ml}$)

Verbindung 1360



Verbindung 1361

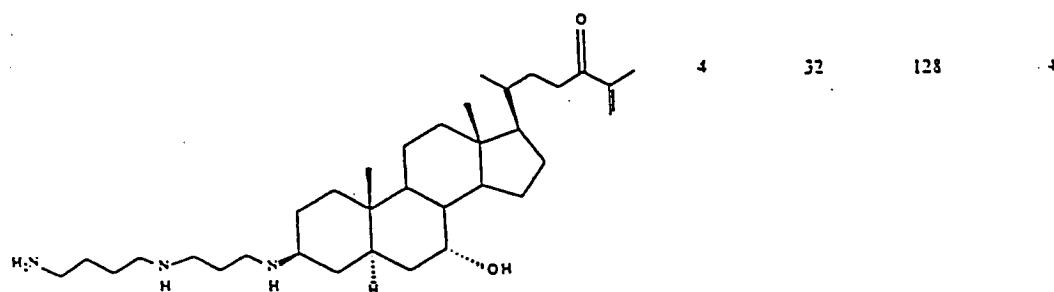
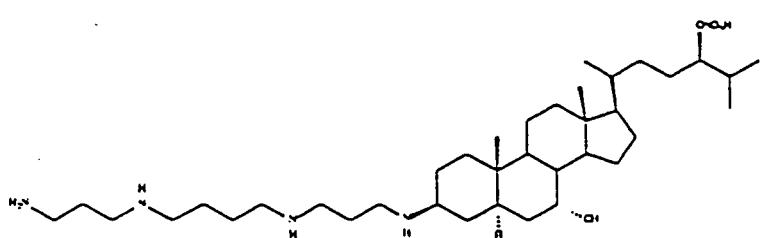


Tabelle I (Fortsetzung)

Antibiotische Wirkung

MIC Werte ($\mu\text{g}/\text{ml}$)

Verbindung 1436

S. aureus *E. Coli* *P. aerug* *C. albicans*

Verbindung 1437

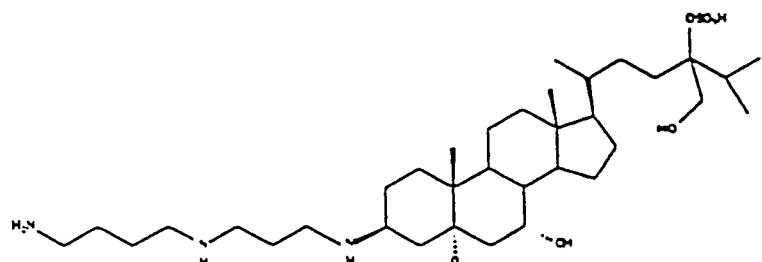


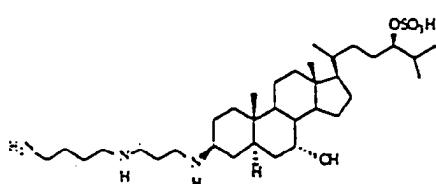
Tabelle II

Antibiotikawirkung natürlicher und synthetischer Aminosterole in Hühnerembryo- und Kaulquappentests

V = vaskulär; M = Melanozyten; E = epithelial; TB = Gewebezusammenbruch; GI = gastrointestinal; Mus = Muskel, Tox = Lethalität nach 2 Stunden

Struktur	Minimale wirksame Konzentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)						
	Hühner- embryo	Kaulquappe (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	Röhren- bildung	HM	LLC		
dissoz.- test			($\mu\text{g}/\text{ml}$)	($\mu\text{g}/\text{ml}$)	($\mu\text{g}/\text{ml}$)		
	0,01			0,01-0	7,8	13,2	

1256

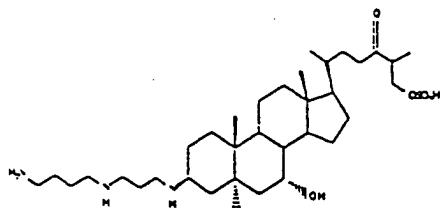


V	M	E	TB	GI	Mus	Tox
-	+	-	-	-	-	-

1

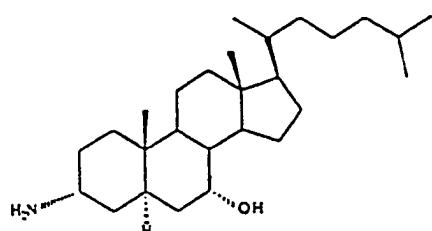
1360

> 10



V	M	E	TB	GI	Mus	Tox
-	+	+	+	-	-	-

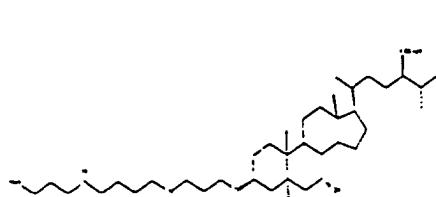
1363



V	M	E	TB	GI	Mus	Tox
-	-	-	-	+	-	-

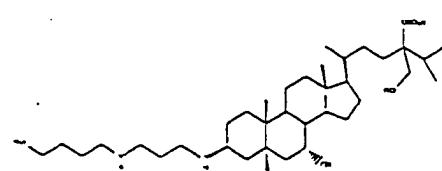
Tabelle II (Fortsetzung)

Struktur	Minimale wirksame Konzentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)						
	Hühner- embryo	Kaulquappe (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	Röhren- bildung	HM	LLC	MMT	MTT
dissoz.- test						MMT	MTT
1436	1			6.9		16.7	



V	M	E	IB	Gl	Mus	Tox
-	+	±	-	-	-	+

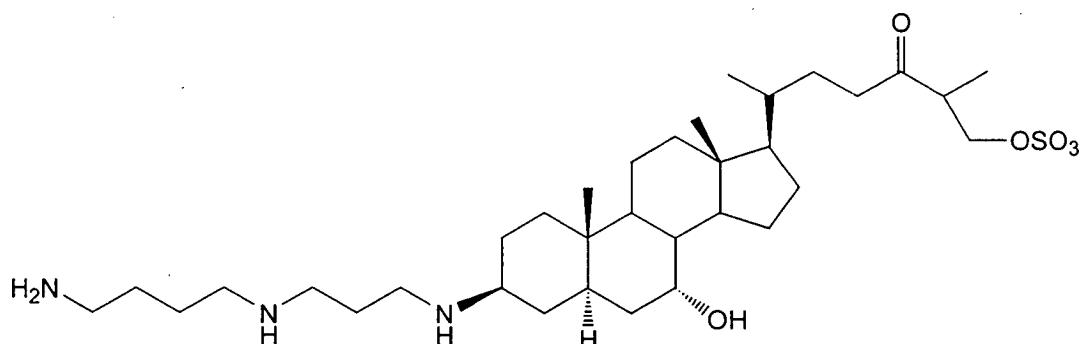
1437 >1



V	M	E	IB	Gl	Mus	Tox
-	-	+	-	-	-	-

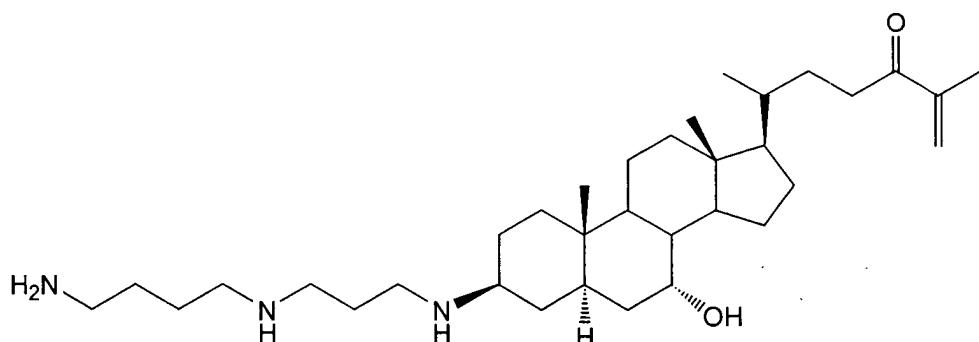
Patentansprüche

1. Verbindung mit der folgenden Struktur



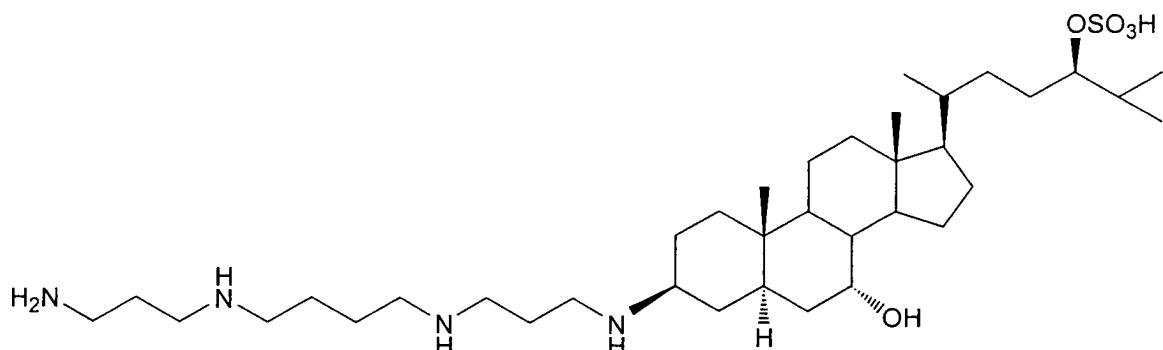
oder ein pharmazeutisch akzeptables Salz davon.

2. Verbindung mit der folgenden Struktur:



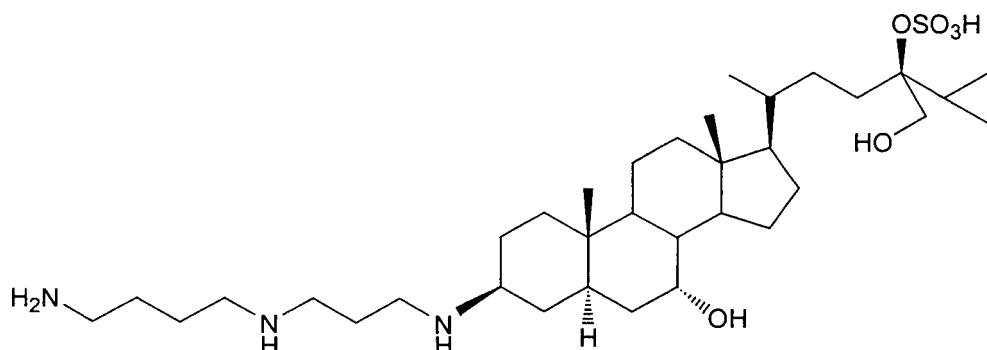
oder ein pharmazeutisch akzeptables Salz davon.

3. Verbindung mit der folgenden Struktur:



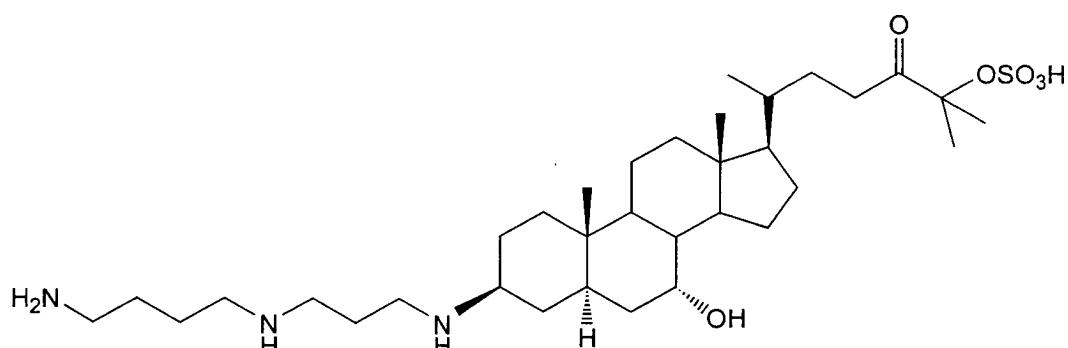
oder ein pharmazeutisch akzeptables Salz davon.

4. Verbindung mit der folgenden Struktur:



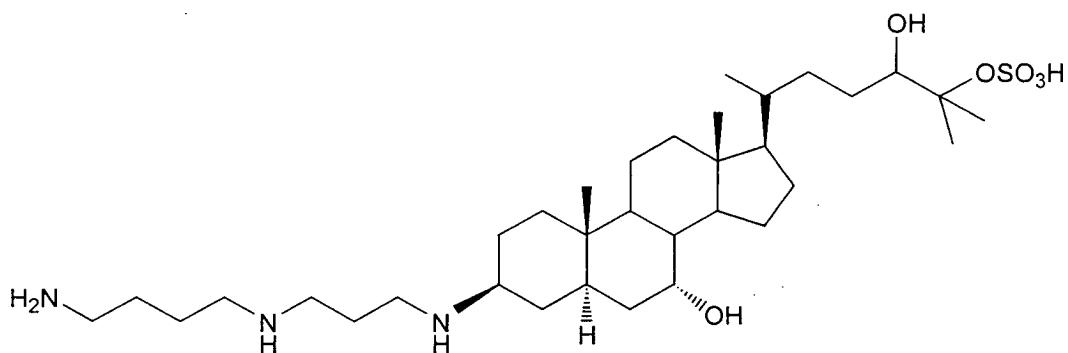
oder ein pharmazeutisch akzeptables Salz davon.

5. Verbindung mit der folgenden Struktur:



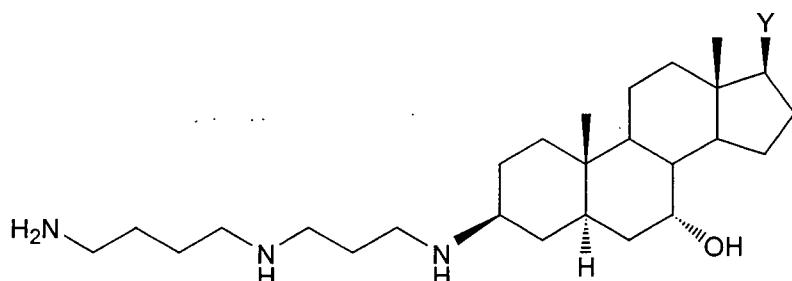
oder ein pharmazeutisch akzeptables Salz davon.

6. Verbindung mit der folgenden Struktur:

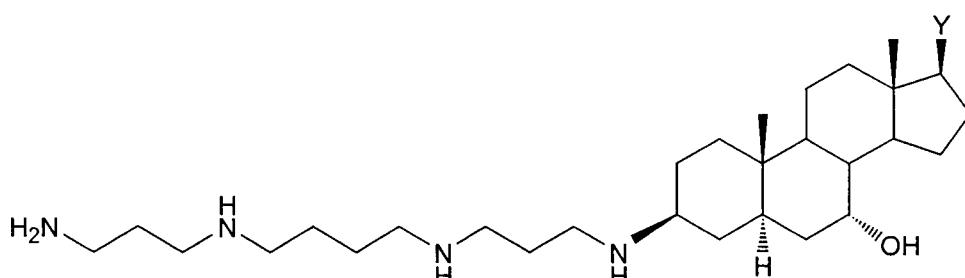


oder ein pharmazeutisch akzeptables Salz davon.

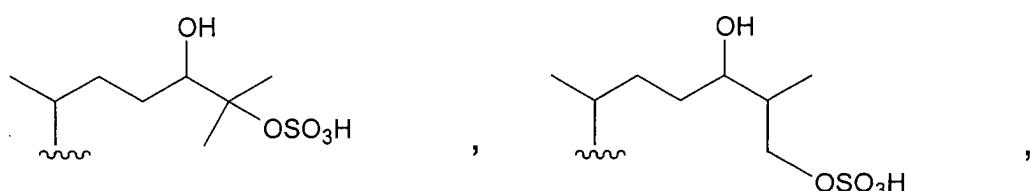
7. Verbindung mit der folgenden Struktur:



oder



wobei Y ein Mitglied ist, das aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus:



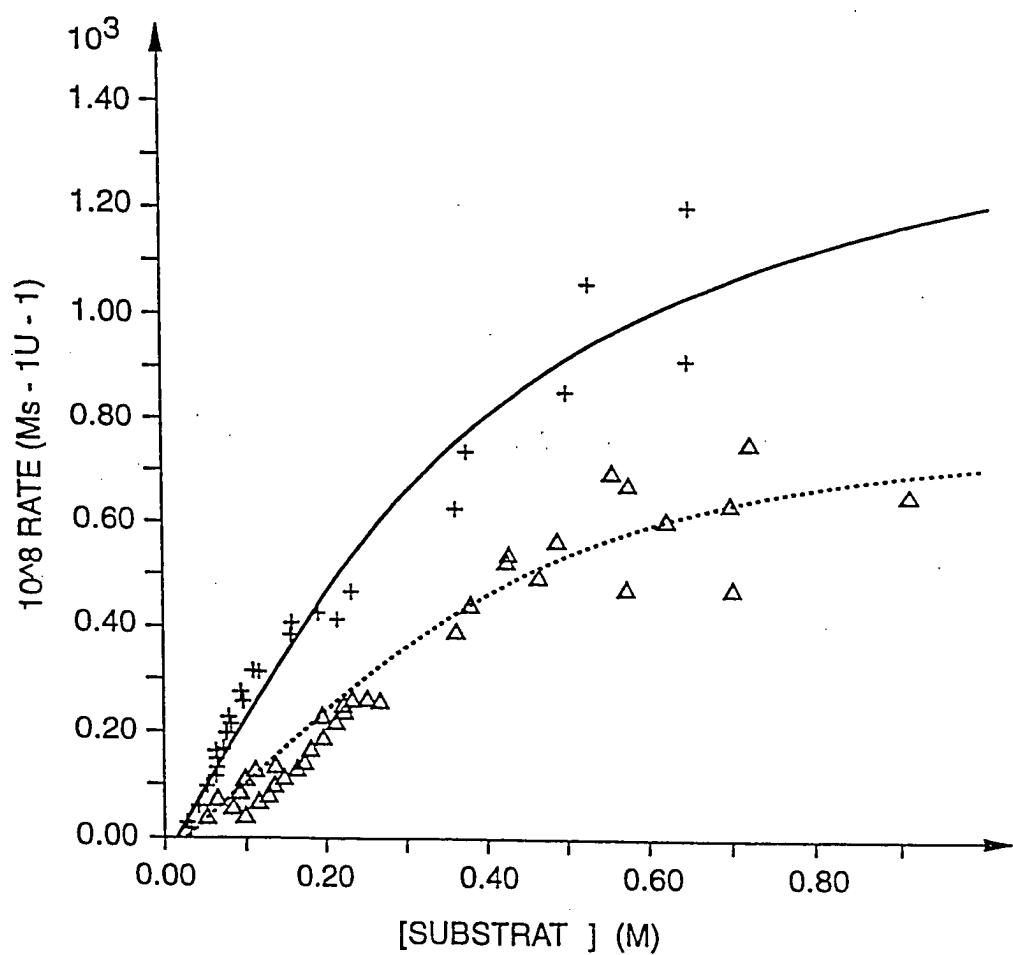
8. Verwendung einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 zur Herstellung eines Medikaments zum Inhibieren der Proliferation von Zellen.

9. Verwendung gemäß Anspruch 8, wobei die Zellen ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus: malignen Zellen; vaskulären glatten Muskelzellen; bronchialen glatten Muskelzellen; Fibroblasten; Lymphozyten oder Lymphgewebe; Muskelzellen; Knochenzellen; Bindegewebsgewebe; epithelialen Zellen; hämatopoietischem Gewebe und neuralem Gewebe.

10. Verwendung einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 zur Herstellung eines Medikaments zum Behandeln einer Infektion, die durch ein mikrobielles Agens verursacht wird.
11. Verwendung gemäß Anspruch 10, wobei das mikrobielle Agens ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Bakterien, Viren, Pilzen und Protozoen.
12. Verwendung einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 zur Herstellung eines Medikaments zum Inhibieren von NHE.
13. Verwendung einer Verbindung gemäß Anspruch 3 zur Herstellung eines Medikaments zum Unterdrücken des Immunsystems durch Inhibieren der Proliferation von Lymphozyten.
14. Verwendung einer Verbindung gemäß Anspruch 3 zur Herstellung eines Medikaments zum Unterdrücken des Wachstums eines Wirbeltiers.
15. Verwendung einer Verbindung gemäß Anspruch 3 zur Herstellung eines Medikaments zum Behandeln einer viralen Infektion durch Unterdrücken des Wachstums einer viralen Zielzelle.
16. Verwendung einer Verbindung gemäß Anspruch 3 zur Herstellung eines Medikaments zum Kontrollieren des arteriellen Drucks.
17. Verwendung einer Verbindung gemäß Anspruch 3 zur Herstellung eines Medikaments zum Schützen gegen Herzischämie.
18. Verwendung einer Verbindung gemäß Anspruch 3 zur Herstellung eines Medikaments zum Schützen transplantierter Organe.
19. Verwendung einer Verbindung gemäß Anspruch 3 zur Herstellung eines Medikaments zum Unterdrücken der Gewichtszunahme bei einem Wirbeltier.

Es folgen 15 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

**FIG. 1A**

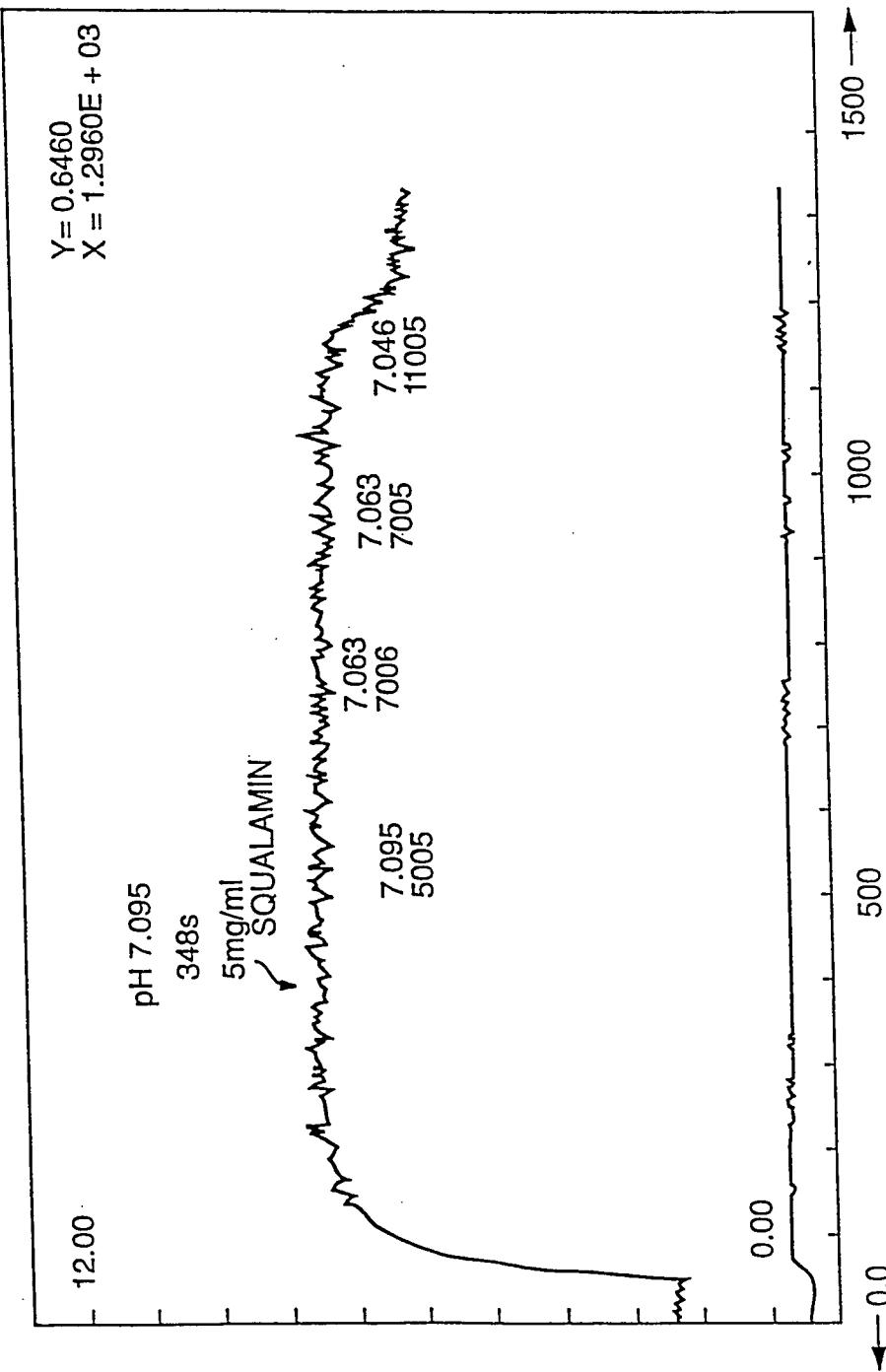


FIG. 1B

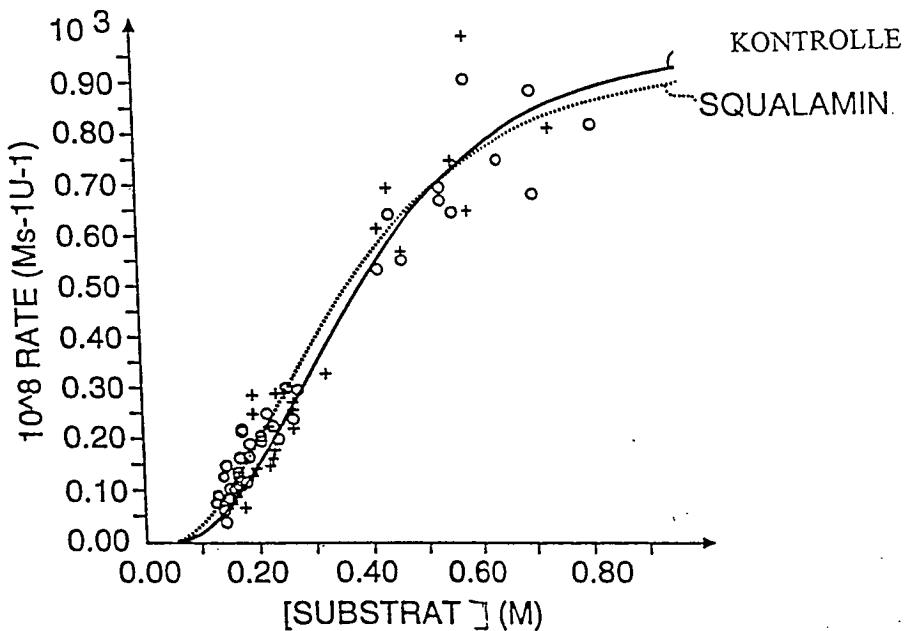


FIG. 2A

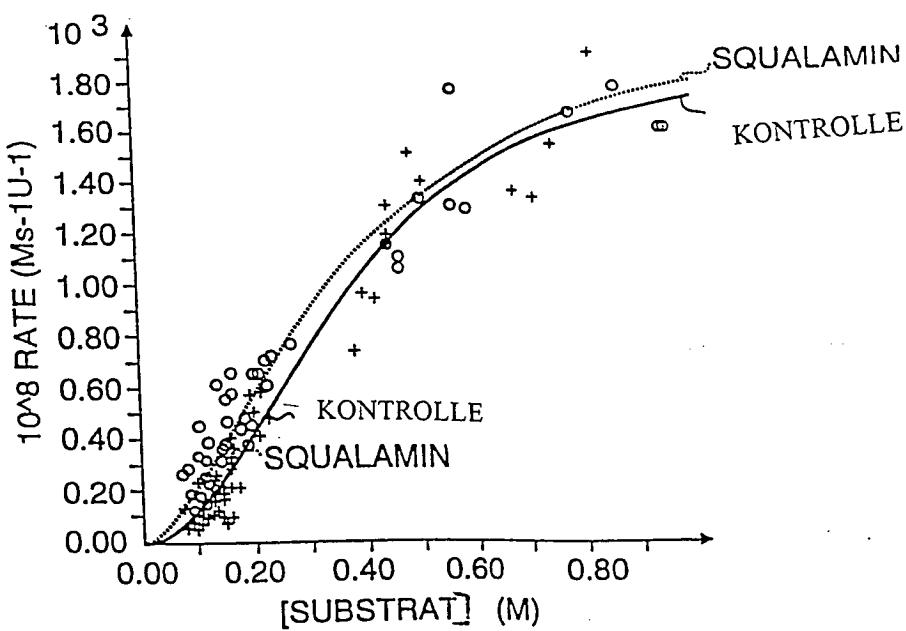


FIG. 2B

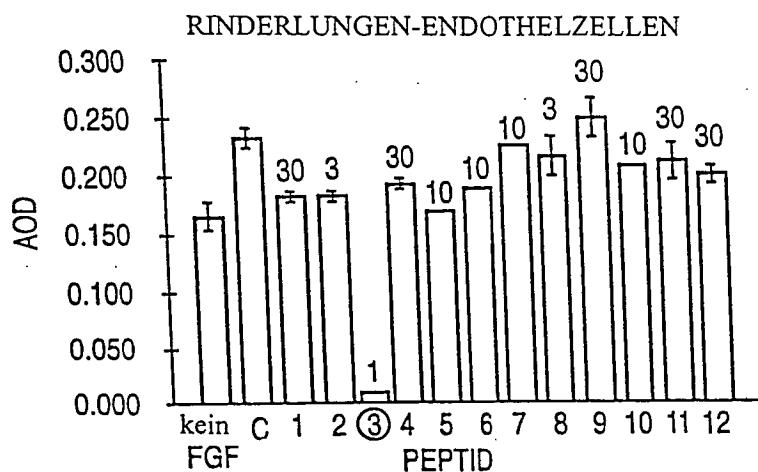
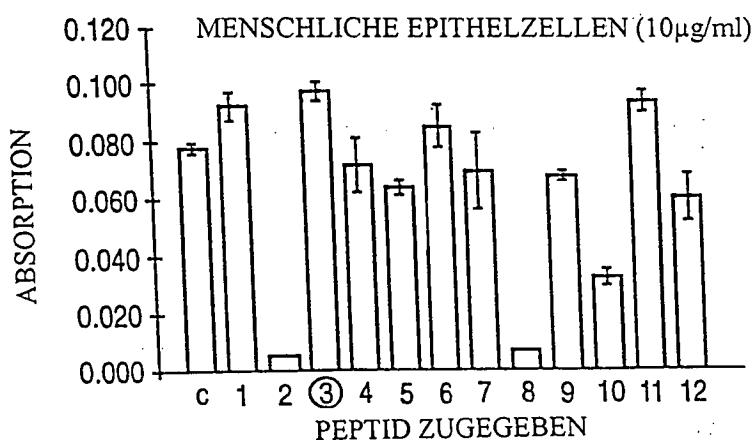
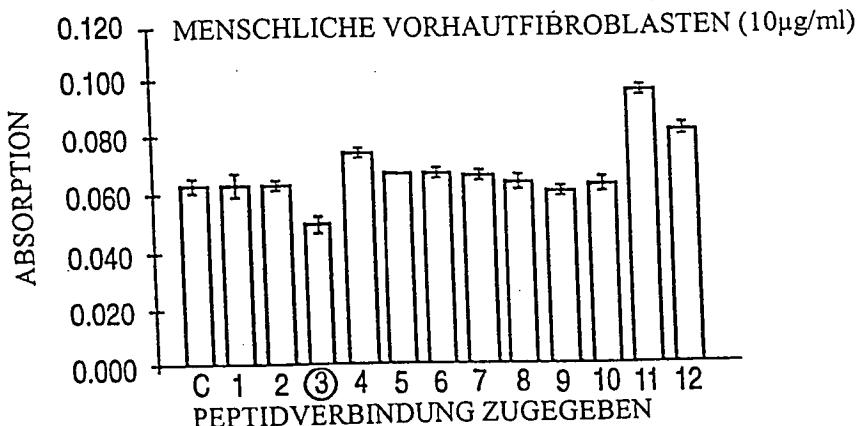
**FIG. 3A****FIG. 3B****FIG. 3C**

FIG. 4A

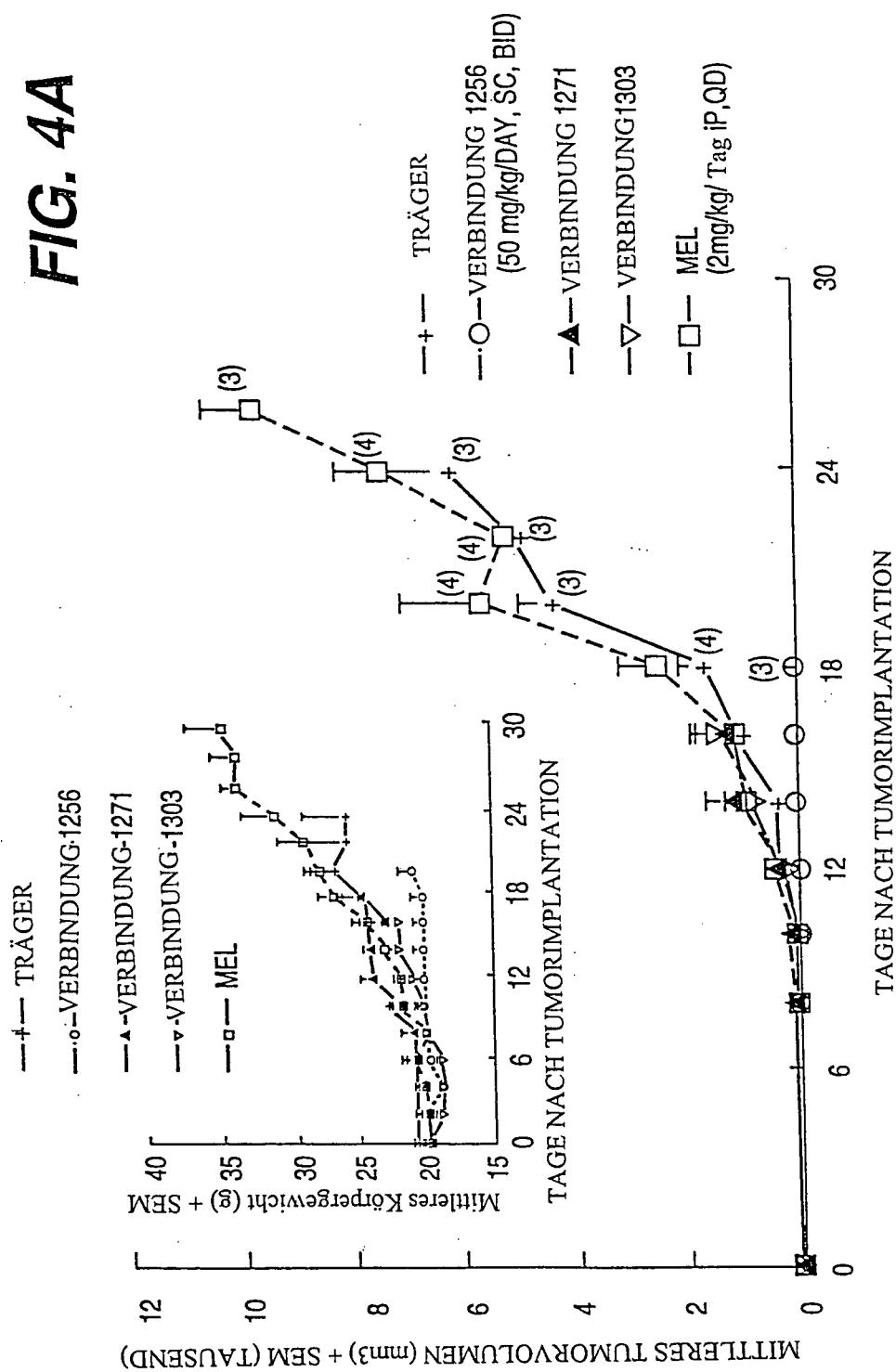


FIG. 4B

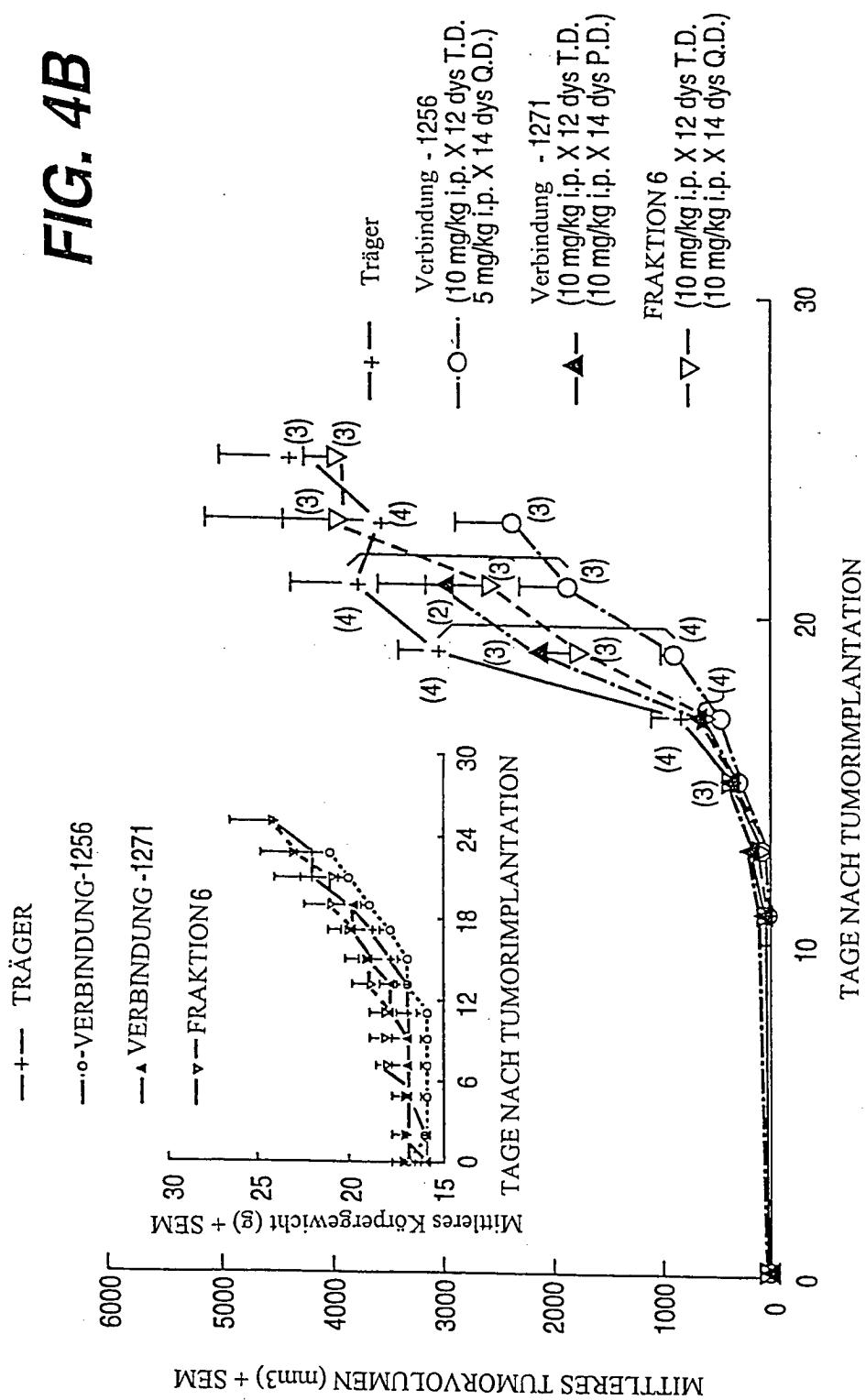
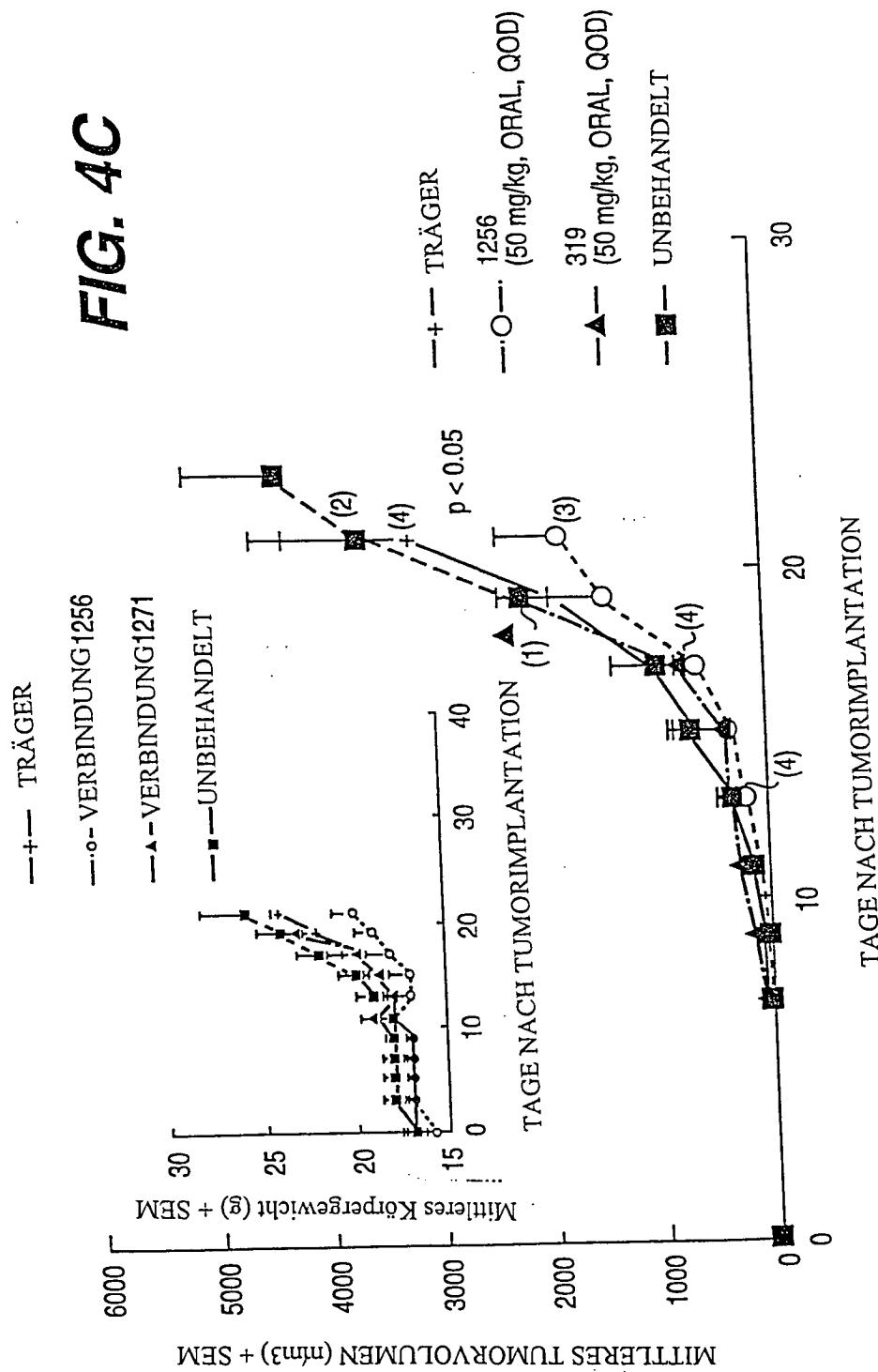


FIG. 4C

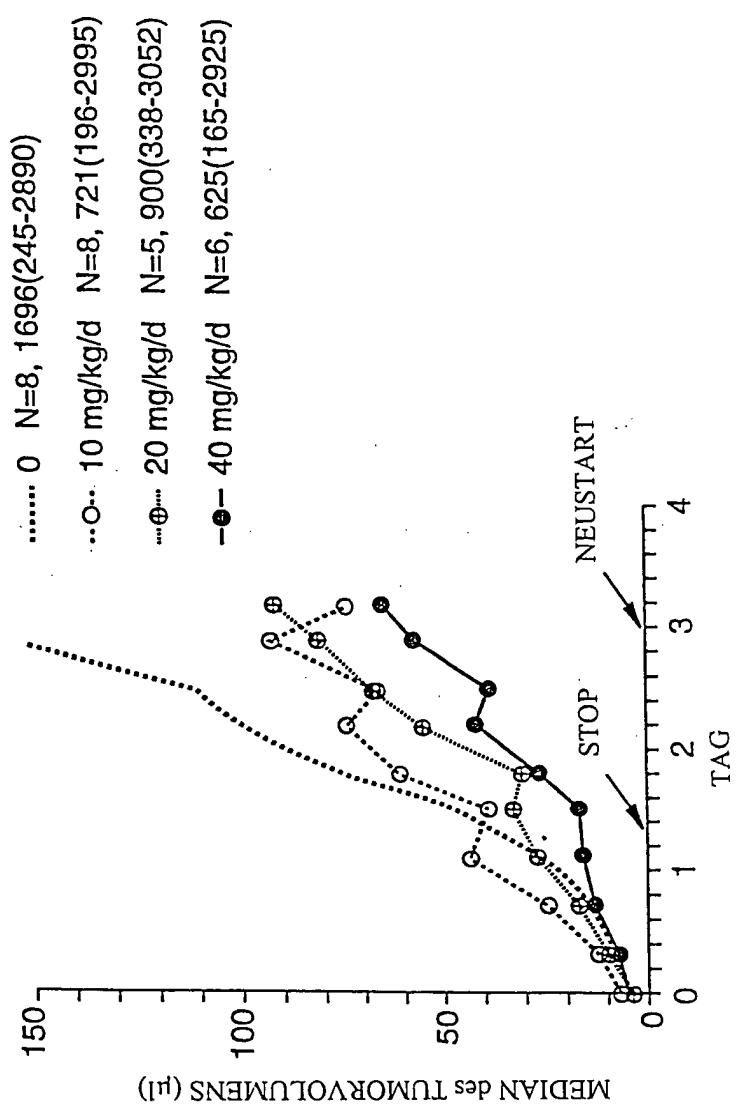


FIG. 5

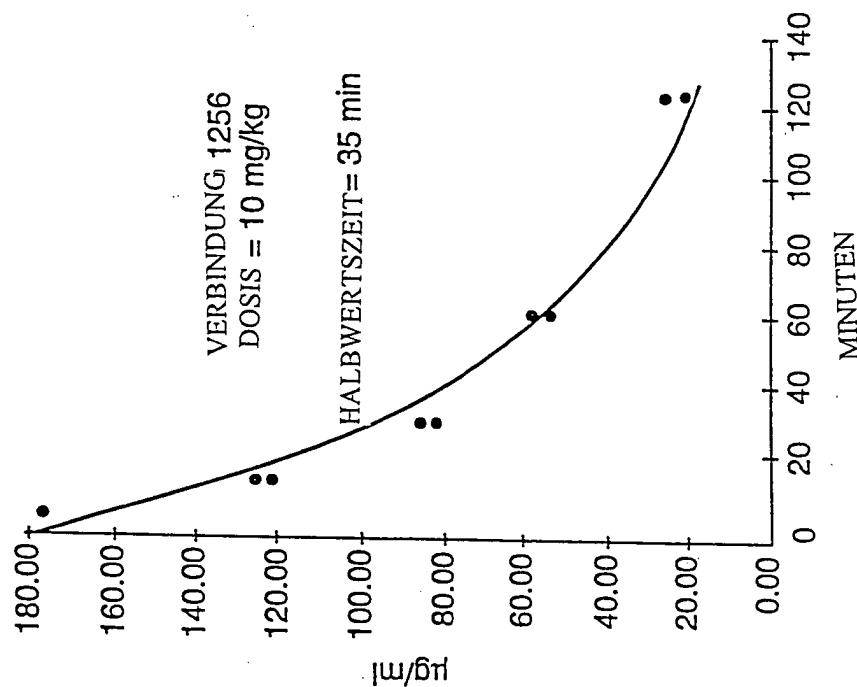


FIG. 6

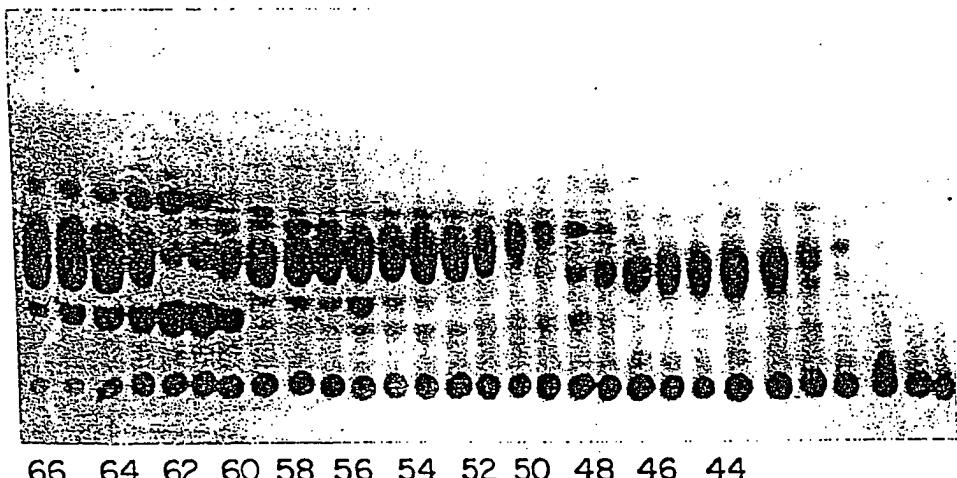


FIG. 7

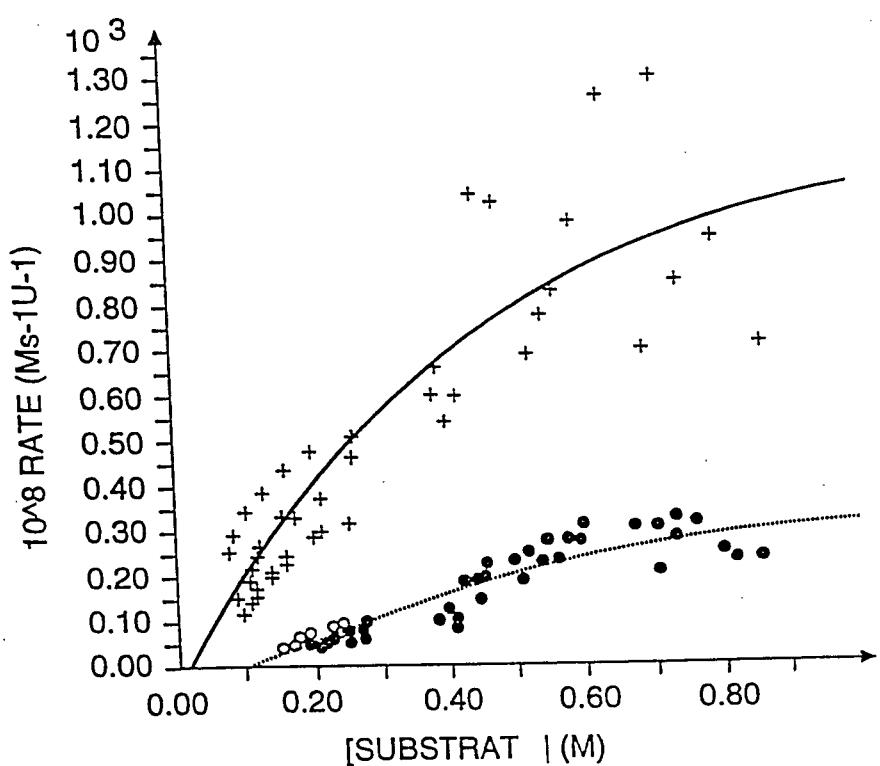


FIG. 8

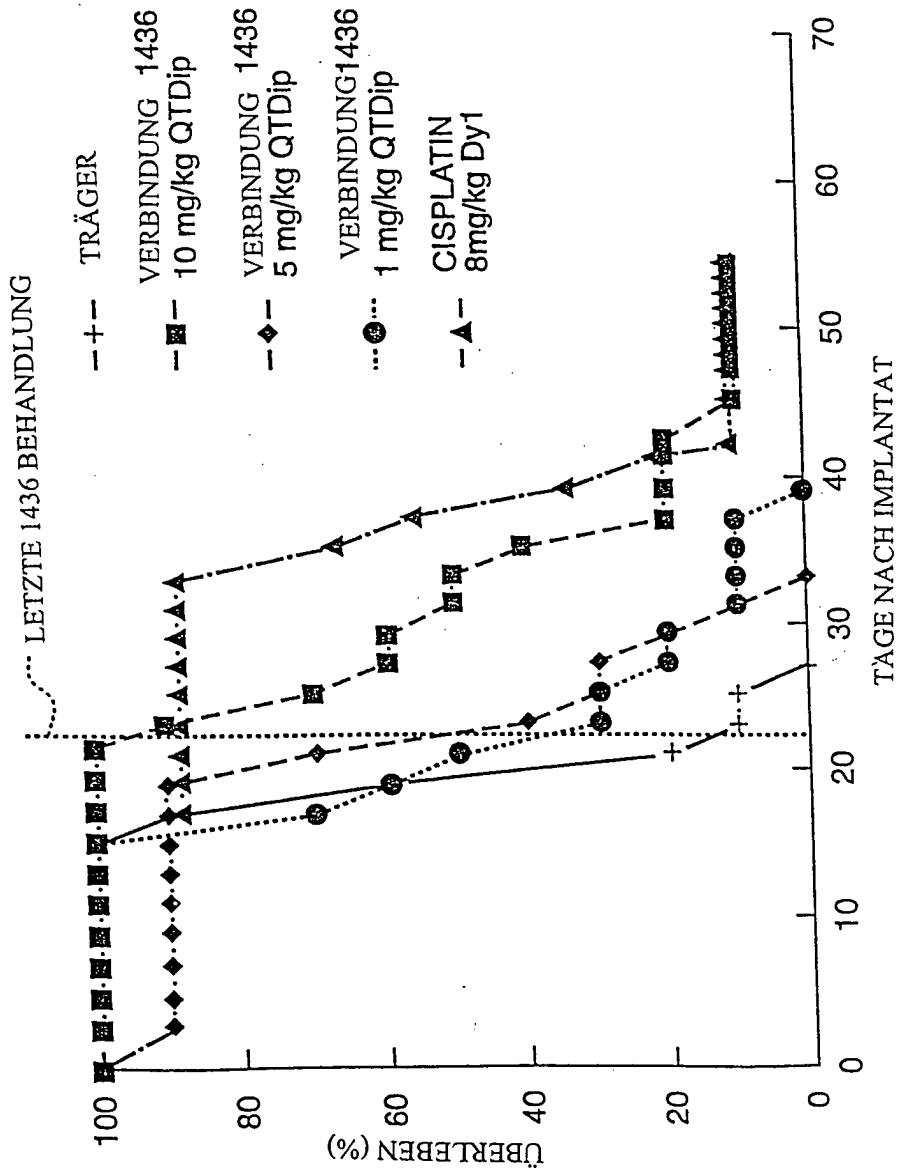


FIG. 9

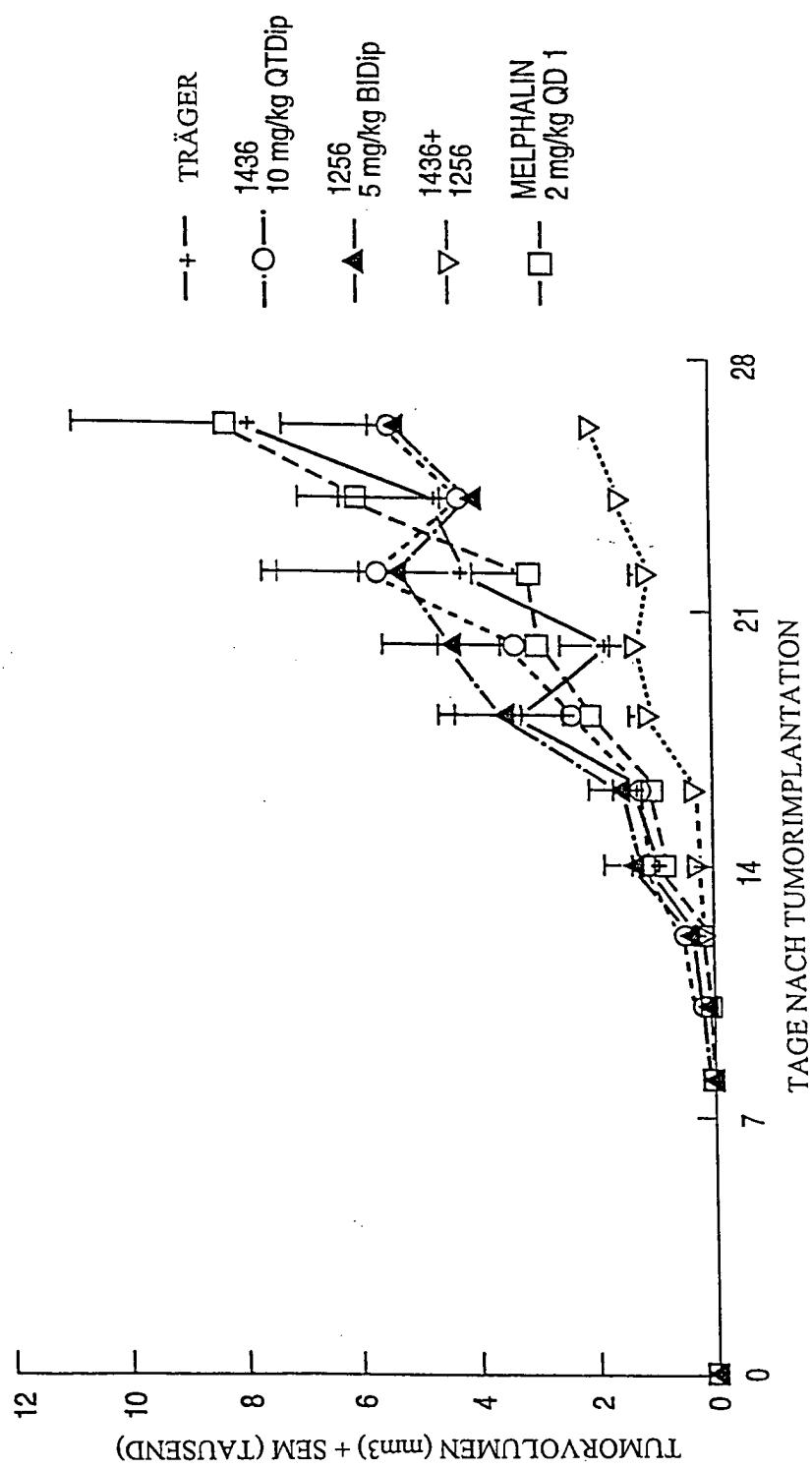
FIG. 10

FIG. 11

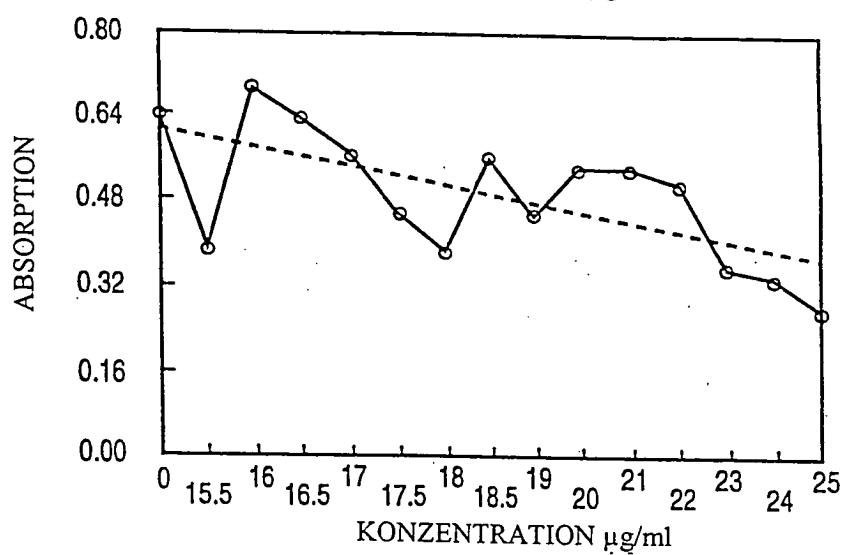
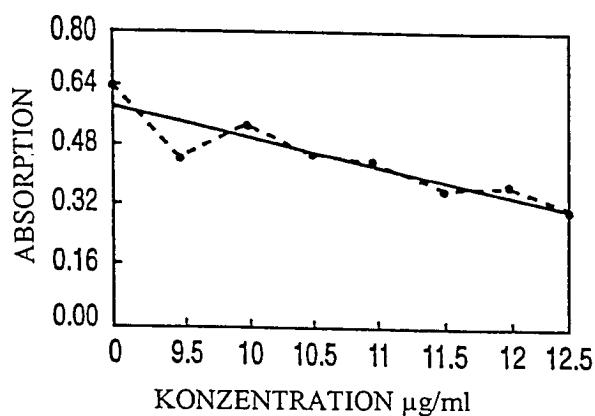


FIG. 12

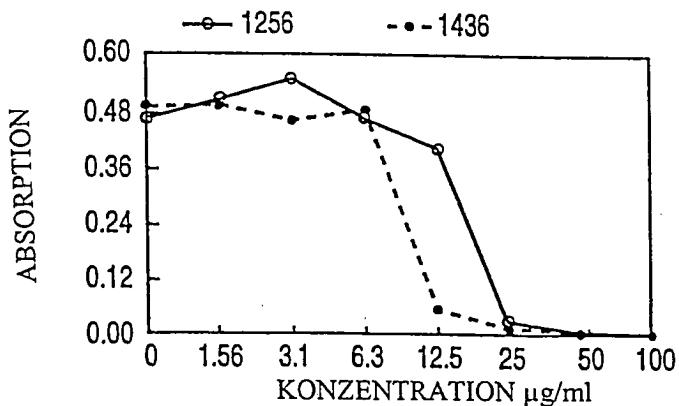


FIG. 13

FIG. 14

