

Angiogén hatású természetes vegyület alkalmazása*gyógyászati készítmények előállítására*
K i v o n a t

A találmány tárgyát az (I) képletű chrysanthon A, a (II) képletű chrysanthon B és a (III) képletű chrysanthon C antangiogén hatású gyógyszer előállítására szolgáló alkalmazása képezi.

Az alkalmazás eredményeképpen előállított gyógyszerek a következő betegségek kezelésénél használhatók például: daganatos jellegű betegségek, tumor metasztázisok prevenciójára és kezelésére, ízületi gyulladásal járó betegségek, diabéteszes retinopathia, psoriasis, krónikus gyulladásos betegségek és atherosclerosis.

TK

jellemezve ábrán: (i), (ii) és (iii) képletek

A2

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

Angiogén hatású természetes vegyület alkalmazása*Méhnyálkahártya-érképzés*

A találmány tárgya természetes eredetű vegyületek alkalmazása rendellenes angiogenezissel (érképzéssel) kapcsolatos kórképekben.

Az érképzés normálisa felnőttben nem látható, de a normál működéshez tartozik például sebgyógyulás esetén vagy a méhnyálkahártya helyreállításakor a női reprodukciós ciklus során.

Angiogén válasz stimulálható élettanilag, ha az érműködés csökken és a szöveti vérátáramlás elégtelen.

Általánosabban azt mondhatjuk, hogy élettani körülmények között az angiogenezis pozitív visszacsatolást képez válaszul az elégtelen vérátáramlásra vagy az oxigén- és tápanyagellátás csökkenése esetén, ami például akkor fordulhat elő, ha egy verőér elzáródik, szövetek nagymértékű növekedése esetén (például az izomszövet képződést kísérő neovaszkularizáció) és megnövekedett fizikai terhelés esetén a megnövekedett oxigén és tápanyag igénnyel összefüggésben.

Helyi ischaemia esetén egy artéria részleges vagy teljes elzáródása miatt a kollaterális véredények kifejlődése szükséges az átáramlás fennmaradása érdekében.

Az angiogenezis normál folyamatát a proangiogén molekulák, mint a fibroblaszt növekedési faktor (FGF), a placenta növekedési faktor, a vaszkuláris endotheliális növekedési faktor (VEGF), a transzformáló növekedési faktor (TGF), az angiogenin, az interleukin-8 és a hepatocita növekedési faktor, és a negatív angiogenezis szabályzók, mint a thrombospotin-1, az angiostatin, az alfa-interferon, a

prolaktin 16-Kd-os fragmentuma, a metallo-proteináz (MMPS) gátlók, a 4-es thrombocita faktor és a genisteine közti egyensúly modulálja.

Közismert, hogy egy elsődleges tumor növekedésének kedvez, ha a tumorszövet jól vaszkularizált. A megfelelő oxigén- és tápanyag-kínálat elősegíti a daganat gyors növekedését.

Kimutatták, hogy a nagymértékű angiogenezis kiugróan negatív faktor lehet a daganatok kórjóslatában [van Hinsbergh VW, Collen A, Koolwijk P; Ann. Oncol., 10 Suppl., 4:60-3, (1999); Buolamwini JK; Curr., Opin., Chem., Biol., 3(4):500-9, (1999. augusztus)].

Ugyancsak ismert a daganatos megbetegedések területén, hogy a daganatsejtek biológiájában alapvető jellemző a metasztatizáló képesség.

A metasztatizáló tumorsejtek képesek elszakadni a környező struktúráktól, betörnek a vér- és nyirokerekbe, és távolabb kolonizálnak más szöveteket, ahol folytatják önmaguk újratermelését.

A metasztatizálódás a betegség kórtörténetében is kritikus esemény, minthogy a rákos halálozás fő okozója. Ez szoros összefüggésben áll a vaszkuláris szövet jelenlétével a daganat helyén vagy a szomszédos területeken, és elősegíti ezt a folyamatot.

A daganatsejtek vándorlása a környező struktúrákon keresztül lehetővé teszi a sejtek számára a tumoron belüli erek elérését, akár korábban meglévőét vagy neoangiogenezis révén képződöttét, és így bejutnak a vérkeringésbe [Ray JM., Stetler-Stevenson WG, Liotta LA., Respir. J., 7(11):2062-72, (1994); Stetler-Stevenson WG, Liotta LA, Kleiner DE Jr; FASEB J., 7(15):1434-41, (1993 december)].

A nyirok- és vérerek közti összeköttetés a daganat vaszkularizált részén lehetővé teszi a daganatos sejtek mindkét érrendszerbe való bejutását.

Jelenlegi vizsgálatok közvetlen kapcsolatot mutattak ki az angiogenezis és ízületi betegség között [Koch AE; Arthritis and Rheumatism 41, 951-962, (1998)]. Részletezve: kimutatták, hogy az ízületi porcok neovaszkularizációja döntő szerepet játszik a pannus (értartalmú kötőszövet) képződésben és az ízületi gyulladás súlyosbodásában. A normál porc nem tartalmaz vérereket, míg az ízületi gyulladásban szenvedő betegek szinoviális folyadékában egy – endothel sejtek által termelt – angiogenezis-stimuláló faktor (EASF) van jelen.

E faktor jelenléte a porc vaszkularizációjával és a porc károsodásával áll kapcsolatban.

Más betegségek is mutatnak összefüggést kóros angiogenezissel.

Azt találták, hogy diabéteszes retinopathia [Histol. Histopathol 14(4):1287-94, (1999. okt.)], psoriasis [Br. J. Dermatol, 141(6):1054-60, (1999. dec.)], krónikus gyulladás és atherosclerosis [Planta Med. 64(8):686-95; (1998 dec.)], esetén az érintett szövetek neovaszkularizációja súlyosbító tényező.

Így a neovaszkularizáció korlátozása alapvető eleme ezen betegségek gyógyításának és kézben tartásának.

A humán terápiában alkalmazható antiangiogén hatású természetes eredetű vegyületek már ismertek.

Például a fumagillin, egy az Aspergillus fumigatus gombából kivont vegyület, jelentős antiangiogén képességgel rendelkezik. Mes-

terséges származéka, a TNP-470 klinikai kísérleti stádiumában van daganatok kezelésére [Griffith EC, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95(26) 15163-8 (1998)].

A combrestatin, egy afrikai fűzfa kérgéből kivont hatóanyag hatékony gátlója a neovaszkularizációnak, és közvetlenül és szelektíven hat az éppen aktuálisan képződött véredények endotheljére [Cancer Research, 57, 1829 (1997)]. Ezt a vegyületet most vetették alá fázis I klinikai vizsgálatoknak, és ezután vetik alá fázis II vizsgálatoknak mint angiogenezis gátlót.

A curcuminok, amelyek a *Curcuma longa*-ból izolált fenolos vegyületek, az angiogenezist közvetlenül az endothelium morfogenezisére hatva gátolják számos proteáz hatásának befolyásolása révén [Cell Growth Diff. 9(4), 305-12 (1998)].

A cinnamaldehyde, a *Cinnamomum cassia* Blume kérgéből izolált vegyületek számottevő antiangiogén tulajdonságot mutattak, erősebbet, mint a többi természetben előforduló vegyület, mint a genistein, hasonló hatásmechanizmussal [Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 7(19), 2473-6 (1997)].

Az utóbbi években történt fejlődés ellenére számos szakember a farmakológiai kutatások ezen területét az orvostudomány az egyik legígéretesebb területnek tartja kóros angiogenezissel jellemezhető betegségek, és különösen daganatok kezelésére szolgáló új gyógyszerek felfedezése szempontjából.

Ezen betegségek esetében még kevésbé felismert szükség van olyan új vegyületekre, amelyek képesek az ezen megbetegedésekért felelős kóros angiogenezis mechanizmusának gátlására vagy megakadályozására, és így lehetővé válik gyógyításuk.

Amint már említettük, ilyen betegségek közé tartoznak az ízületi gyulladások, daganatok, diabéteszes retinopathia, psoriasis, krónikus gyulladás és atherosclerosis.

Egy természetben előforduló gomba eredetű termék, a chrysanthon A, egy Nasini és munkatársai által az *Ascochyta chrysanthemis* gombából izolált metabolit [Phytochemistry 29, 923 (1989)] bakteriosztatikus és gombaellenes hatásúnak mutatkozott. E gombatorzsön végzett további vizsgálatok lehetővé tették két másik chrysanthon A-val kapcsolatos vegyület izolálását, pontosabban a chrysanthon B-ét és a chrysanthon C-ét, melyeket Nasini és munkatársai izoláltak [Phytochemistry Vol. 29, No. 8, 2499-2502. oldal (1990)].

Jelenleg azt találtuk, hogy a chrysanthon A, chrysanthon B és chrysanthon C antiangiogén hatással rendelkeznek, így alkalmas szerek kóros angiogenezissel jellemzett betegségek kezelésére.

A jelen találmány szerinti vegyületek a következők:

az (I) képletű chrysanthon A, melyet a Phytochemistryben [29, 923 (1989)] ismertetnek;

a (II) képletű chrysanthon B, melyet a Phytochemistryben [Vol. 29, No. 8, 2499-2502. oldal (1990)] ismertetnek és

a (III) képletű chrysanton C, melyet a Phytochemistryben [Vol. 29, No. 8, 2499-2502. oldal (1990)] ismertetnek.

A találmány szerinti vegyületekről kitűnt, hogy antiangiogén hatással rendelkeznek, és így alkalmas szerek lehetnek kóros angiogenezissel jellemzett betegségek kezelésére.

A jelen találmány további tárgya chrysanthon A vagy chrysanthon B vagy chrysanthon C alkalmazása antiangiogén hatású gyógyszer előállítására.

A jelen találmány további tárgya chrysanthon A vagy chrysanthon B vagy chrysanthon C alkalmazása tumor-típusú betegségek kezelésére.

A jelen találmány tárgya továbbá a chrysanthon A vagy chrysanthon B vagy chrysanthon C alkalmazása tumor metasztázisok megelőzésére és csökkentésére.

A jelen találmány tárgya továbbá chrysanthon A vagy chrysanthon B vagy chrysanthon C alkalmazása ízületi gyulladással járó betegségek kezelésére.

A jelen találmány tárgya továbbá chrysanthon A vagy chrysanthon B vagy chrysanthon C alkalmazása diabéteszes retinopathia kezelésére.

A jelen találmány tárgya továbbá chrysanthon A vagy chrysanthon B vagy chrysanthon C alkalmazása psoriasis kezelésére.

A jelen találmány tárgya továbbá chrysanthon A vagy chrysanthon B vagy chrysanthon C alkalmazása krónikus gyulladásos betegségek kezelésére.

A jelen találmány tárgya továbbá chrysanthon A vagy chrysanthon B vagy chrysanthon C alkalmazása atherosclerosis kezelésére.

A jelen találmány szerinti vegyületek előállíthatók a Phytochemistry 29, 923 (1989) és a Phytochemistry Vol. 29. No. 8, 2499-2502. oldalak (1990) ismertetése alapján.

Az alábbiakban számos kísérleti adatot ismertetünk a találmány szemléltetésére.

1. példa

A chrysanthon A hatásvizsgálata

Ezen vegyület farmakológiai hatását olyan prediktív biológiai vizsgálatok útján mértük, amelyek reprodukálják a fő angiogén mechanizmusokat in vitro. Ezeket a vizsgálatokat általánosan alkalmazzák az értékelendő vegyületek pro- vagy antiangiogén hatásának mérésére.

Toxicitásvizsgálatok

A chrysanthon A saját (intrinsic) toxicitásának értékelését suraminnal való összehasonlítással végeztük, az alább ismertetésre kerülő Szulforhodamin B (SRB) citotoxicitás teszttel.

Marha mikrovaszkuláris endothel sejteket (BMEC) szélesztettünk 3000 sejt/lyuk sűrűségben 96-lyukú mikrotiter lemezekre normál tenyésztőközegben (200 μ l/lyuk). A következő napon a vizsgálati vegyületeket skaláris koncentrációban hozzáadtuk a lyukakhoz. A sejtszélesztést követő harmadik napon a közeget eltávolítottuk és PBS-sel háromszor átmosást végeztünk. Az átmosások végén minden lyukhoz 200 μ l tenyésztőközeget adtunk, és a lemezeket a következő 48 órára 37 °C-os, 5 % CO₂ tartalmú inkubátorba helyeztük. Ezen inkubációs periódus végén a közeget eltávolítottuk, és a sejteket 15 %-os triklór-ecetsavas (TCA) oldattal 1 órán át hidegen kezeltük. A lyukakat háromszor átmostuk desztillált vízzel, melynek során a lemezt bemeztettük, majd felfordítva kivettük. 200 μ l/lyuk 1 %-os ecetsavban oldott 0,4 % SRB-t adtunk a lemezekhez, és 30 percig inkubáltuk

azokat. A lyukakat háromszor átmostuk 1 %-os ecetsavval, és végül 200 μ l/lyuk 10 mmólos Tris-t adtunk hozzájuk.

A lyuk festődését spektrofotometriás leolvasással mértük 540 nm hullámhossznál. A vizsgált vegyületet és a kontrollokat tartalmazó lyukaknál nyert értékek összehasonlítása lehetővé tette a jelen találmány szerinti vegyületet IC_{50} és IC_0 értékeinek meghatározását, melyek 50 %-os citotoxikus hatásúként (IC_{50}), illetve maximális nem citotoxikus koncentrációként (IC_0) határozhatók meg.

A kapott eredmények, melyeket az 1. táblázatban tüntettünk fel, azt mutatják, hogy a chrysanthon Az IC_{50} értéke 1,5 μ mol/l BMEC-n.

Kemotaxisvizsgálat

Ez a vizsgálat az első szűrővizsgálat a potenciális angiogenezist gátló vagy elősegítő hatással rendelkező vegyületek esetében [Glaser . B. M. és munkatársai, Nature, 288:483-4 (1998)].

Az A chrysanthont – a jelen találmánnyal kapcsolatos vegyületek egyikét – kemotaxis vizsgálatnak vetettük alá Boyden-kamra segítségével [Werner F., Goodwin R. H. és Leonard E. J., Journal of Immunology Methods, 33:239-247(1980)].

Ezen in vitro vizsgálat megvalósításához szükséges volt marhaendotheliális sejtek izolálása és tenyésztése mind az aortából (BAEC), mind a melléékvesevelőből (BMEC), valamint a megfelelő referenciavegyületek meghatározása. A Boyden-kamra kemotaxis vizsgálatban való alkalmazásának egyik előnye kvantitatív adatok nyerésének a lehetősége. A Boyden-kamra 8 μ m pórusnagyságú polikarbonát szűrővel elválasztott felső és alsó üregből áll. A kemoattraktánst tartalmazó oldatot az alsó üregbe helyezzük, míg a sejteket a felső üregbe. Inkubációs periódus után a kemotaktikus

stimulusra válaszul a szűrőn átvándorolt sejtek a membrán alsó fel-
színén megszámálhatók.

A kemotaxis vizsgálatban a kiválasztott kemoattraktáns marha-
szérum volt (1 % DMEM kultúra közegben). A BMEC endothelium sej-
teket DMEM-ben reszuszpendáltuk 1 % marha szérumalbuminnal
(BSA), és ebben a vizsgálatban 4 órán át elemeztük. A kemotaxist
közvetlen fénymikroszkópos sejtszámlálással mértük. A százalékos
vándorlást – amit a kemotaxis táblázat mutat – „% migráció”-ként
fejeztük ki az alábbi képlet szerint:

$$(T-C/C) \times 100$$

ahol

T = a vizsgált mintában a vándorló sejtek átlagos száma (n°), és

C = a kontroll esetben a vándorló sejtek átlagos száma.

Mindegyik kemotaxis kísérletnél alkalmaztunk kontrollt, ami olyan
sejtekből állt, amelyeket nem kezeltünk a vizsgálandó vegyülettel, és
amelyek a szérum felé vándoroltak.

A vándorló sejtek átlagos száma lyukanként 5 mikroszkópos látó-
tér leolvasására vonatkozik mintánként 4 független kemotaxis lyuk
esetén.

Szokványosan suramin alkalmazandó referencia vegyületként a
kemotaxis vizsgálatokban.

A kapott eredményeket az 1. táblázatban ismertetjük, ami azt
mutatja, hogy két független kísérletben, melyekben az IC₅₀-nek meg-
felelő 0,4 μ mol/l chrysanthont alkalmaztunk, a BMEC migrációgátlás
44 % $\pm$ 0,7, illetve 52 % $\pm$ 2,8 volt.

1. táblázat

Név	BMEC-re vonatkozó toxicitás		% migráció IC ₀
	IC ₅₀	IC ₀	
Suramin (referencia)	> 500 µM	100 µM	100 µM = -58
Chrysanthon A	1,5 µ	0,4 µM	0,4 µM = -44/-52

2. példa

A chrysanthon C hatásvizsgálata

Toxicitásvizsgálat

Ezt a vizsgálatot az 1. példában ismertetett eljárás szerint végeztük el.

A kapott eredmények – melyeket a 2. táblázatban ismertetünk – azt mutatják, hogy a chrysanthon C BMEC-re vonatkoztatott IC₅₀ értéke 35 µmol/l.

Kemotaxisvizsgálat

Ezt a vizsgálatot az 1. példában ismertetett eljárás szerint végeztük el.

A kapott eredmények – melyeket a 2. táblázatban ismertetünk – azt mutatják, hogy az IC₀ értéknek megfelelő 10 µmol/l chrysanthon C-t alkalmazva a BMEC migráció gátlás 54 % ± 7,6 volt.

2. táblázat

Név	BMEC-re vonatkozó toxicitás		% migráció IC ₀
	IC ₅₀	IC ₀	
Suramin (referencia)	> 500 µM	100 µM	100 µM = -58
Chrysanthon C	35 µ	10 µM	10 µM = -54

3. példa

Humán tumor sejtvonalakon chrysanthon A-val végzett citotoxicitásvizsgálatok

Ezt a kísérletet az 1. példában ismertetett toxicitásvizsgálat alkalmazásával végeztük el.

A következő négy humán tumor sejtvonalat vizsgáltuk: MCF-7; Mes-Sa; LoVo és LoVo-Dx.

A kapott eredmények – melyeket a 3. táblázatban ismertetünk – azt mutatják, hogy a chrysanthon A közvetlen citotoxikus hatással rendelkezik a vizsgált tumor sejtvonalakra.

3. táblázat

	IC ₅₀ MCF-7 sejtvonal	IC ₅₀ Mes-Sa sejtvonal	IC ₅₀ LoVo sejtvonal	IC ₅₀ LoVo-Dx sejtvonal
Chrysanthon A	11,6 ± 0,7 µM	7,8 ± 0,2 µM	15,8 ± 0,4 µM	80 ± 4 µM

Szabadalmi igénypontok

1. Az (I) képletű chrysanthon A alkalmazása antiangiogén hatású gyógyszer előállítására.
2. A (II) képletű chrysanthon B alkalmazása antiangiogén hatású gyógyszer előállítására.
3. A (III) képletű chrysanthon C alkalmazása antiangiogén hatású gyógyszer előállítására.
4. Az 1., 2. vagy 3. igénypont szerinti alkalmazás daganatos jellegű betegségek kezelésére.
5. Az 1., 2. vagy 3. igénypont szerinti alkalmazás tumor metasztázisok prevenciójára és kezelésére.
6. Az 1., 2. vagy 3. igénypont szerinti alkalmazás ízületi gyulladással járó betegségek kezelésére.
7. Az 1., 2. vagy 3. igénypont szerinti alkalmazás diabéteszes retinopathia kezelésére.
8. Az 1., 2. vagy 3. igénypont szerinti alkalmazás psoriasis kezelésére.
9. Az 1., 2. vagy 3. igénypont szerinti alkalmazás krónikus gyulladásos betegségek kezelésére.
10. Az 1., 2. vagy 3. igénypont szerinti alkalmazás atherosclerosis kezelésére.

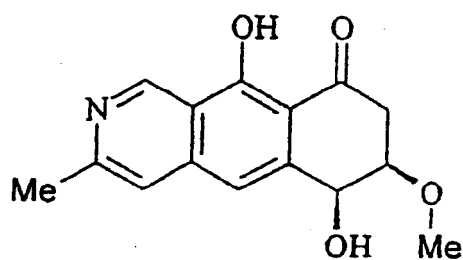
A meghatalmazott:

1 oldal nyitva

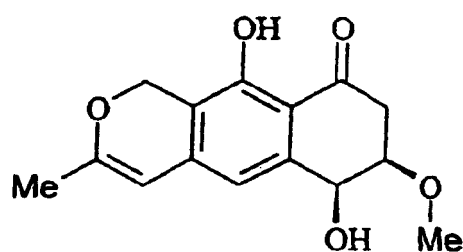
2008. 09. 25.

PK

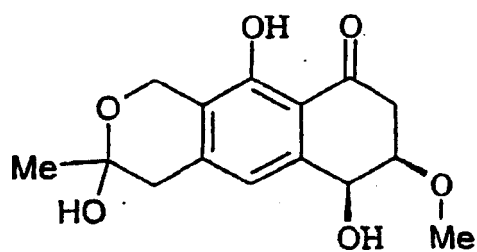
Török
DANUBIA
 Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.
 dr. Török Ferenc
 szabadalmi ügyvivő



(I)



(II)



(III)