



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 603 17 564 T2 2008.10.23

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 581 223 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 603 17 564.3

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US03/38708

(96) Europäisches Aktenzeichen: 03 796 701.5

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 2004/052365

(86) PCT-Anmeldetag: 05.12.2003

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: 24.06.2004

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 05.10.2005

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: 14.11.2007

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 23.10.2008

(51) Int Cl.⁸: A61K 31/44 (2006.01)

A61K 31/454 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

A61P 15/00 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

A61P 33/00 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

431650 P 06.12.2002 US

(73) Patentinhaber:

The Feinstein Institute for Medical Research,
Manhasset, N.Y., US

(74) Vertreter:

Luderschmidt, Schüler & Partner, 65189
Wiesbaden

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, HU, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,
TR

(72) Erfinder:

TRACEY, Kevin J., Old Greenwich, CT 06870, US;
WANG, Hong, Philadelphia, PA 19104, US

(54) Bezeichnung: HEMMUNG VON ENTZÜNDUNGEN UNTER VERWENDUNG VON ALPHA-7-REZEPTOR VERBIN-
DENDEN CHOLINERGEN AGONISTEN

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**HINTERGRUND DER ERFINDUNG**

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft allgemein Medikamente zur Linderung einer Entzündung. Spezieller betrifft die Erfindung Medikamente zur Linderung einer Entzündung unter Einsatz von den α7-Rezeptor bindenden cholinergen Agonisten.

[0002] Vertebraten gelangen während einer Infektion oder Verletzung zu innerer Homöostase, indem sie die Aktivitäten von entzündungsfördernden und entzündungshemmenden Stoffwechselwegen im Gleichgewicht halten. Bei vielen Krankheitszuständen gerät jedoch die innere Homöostase aus dem Gleichgewicht. Das von vielen Gram-negativen Bakterien produzierte Endotoxin (Lipopolysaccharid, LPS) aktiviert die Makrophagen zur Freisetzung von Cytokinen, welche potentiell tödlich sind (Tracey et al., 1986; Wang et al., 1999; Nathan, 1987; Dinarello, 1994).

[0003] Eine Entzündung und andere gesundheitsschädliche Zustände (wie z. B. ein von einer Endotoxin-Exposition hervorgerufener septischer Schock) werden oft von entzündungsfördernden Cytokinen induziert, wie z. B. vom Tumor-Nekrose-Faktor (TNF; auch als TNFα oder Cachectin bekannt), von Interleukin (IL)-1α, IL-1β, IL-6, IL-8, IL-18, von Interferon γ, vom Plättchen-aktivierenden Faktor (PAF), vom Makrophagen-Migrations-Hemmefaktor (MIF) und anderen Verbindungen (Thompson, 1998). Bestimmte andere Komponenten wie z. B. das HMG-1-Protein (high mobility group Protein 1, HMG-1) werden während verschiedener Zustände wie z. B. einer Sepsis induziert und können auch als entzündungsfördernde Cytokine dienen (PCT-Veröffentlichung WO 00/47104). Diese entzündungsfördernden Cytokine werden von mehreren unterschiedlichen Zelltypen produziert, am wichtigsten von Immunzellen (wie z. B. Monocyten, Makrophagen und Neutrophilen), aber auch von Nicht-Immunzellen, wie z. B. Fibroblasten, Osteoblasten, glatten Muskelzellen, Epithelzellen und Neuronen (Zhang und Tracey, 1998). Über ihre Ausschüttung während einer inflammatorischen Cytokin-Kaskade tragen die entzündungsfördernden Cytokine zu verschiedenen Erkrankungen, insbesondere einer Sepsis, bei.

[0004] Inflammatorische Cytokin-Kaskaden tragen zu den schädlichen Eigenschaften zahlreicher Erkrankungen bei, einschließlich einer Entzündung und Apoptose.(Pulkki,, 1997). Umfasst werden Erkrankungen, die sowohl durch lokalisierte als auch systemische Reaktionen gekennzeichnet sind, einschließlich, ohne Einschränkung, Krankheiten, bei denen der Magen-Darm-Trakt und die damit verbundenen Gewebe eine Rolle spielen (wie z. B. eine Appendizitis, ein peptisches Ulkus, ein Magengeschwür und ein Zwölffingerdarmgeschwür, eine Peritonitis, eine Pankreatitis, eine Colitis ulcerosa, eine pseudomembranöse, akute und ischämische Kolitis, eine Divertikulitis, eine Epiglottitis, Achalasie, eine Cholangitis, eine Zoeliakie, eine Cholezystitis, eine Hepatitis, Morbus Crohn, eine Enteritis und Morbus Whipple); systemische oder lokale inflammatorische Krankheiten und Zustände (wie z. B. Asthma, Allergie, anaphylaktischer Schock, Immunkomplexkrankheit, Organ-Ischämie, Reperfusions-Schaden, Organnekrose, Heuschnupfen, Sepsis, Septikämie, endotoxischer Schock, Kachexie, Hyperpyrexie, eosinophiles Granulom, Granulomatose und Sarkoidose); Krankheiten, bei denen das Urogenitalsystem und die angrenzenden Gewebe betroffen sind (z. B. septischer Abortus, Epididymitis, Vaginitis, Prostatitis und Urethritis); Krankheiten, bei denen das Atmungssystem und die damit verbundenen Gewebe betroffen sind (z. B. Bronchitis, Emphysem, Rhinitis, zystische Fibrose, Schocklunge, Pneumonitis, pneumoultramikroskopische Silicovolcanokoniose, Alveolitis, Bronchiolitis, Pharyngitis, Pleuritis und Sinusitis); Krankheiten, die aus einer Infektion durch verschiedene Viren (z. B. Influenza, RS-Virus, HIV, Hepatitis B-Virus, Hepatitis C-Virus, Herpes), Bakterien (z. B. disseminierte Bakteriämie, Dengue-Fieber), Pilze (z. B. Candidose) sowie Protozoen und mehrzelligen Parasiten (z. B. Malaria, Filariose, Amöbiasis, Echinokokkuszysten) herrühren; dermatologische Erkrankungen und Zustände der Haut (z. B. Verbrennungen, Dermatitis, Dermatomyositis, Sonnenbrand, Urtikaria-Warzen und -Quaddeln); Krankheiten des Herz-Kreislauf-Systems und der beteiligten Gewebe (z. B. Vaskulitis, Angiitis, Endokarditis, Arteriitis, Atherosklerose, Thrombophlebitis, Perikarditis, Myokarditis, Myocard-Ischämie, dekompensierte Herzinsuffizienz, Periarteritis nodosa und rheumatisches Fieber); Krankheiten am zentralen und peripheren Nervensystem und den beteiligten Geweben (z. B. Alzheimer-Krankheit, Meningitis, Enzephalitis, multiple Sklerose, Hirninfarkt, zerebrale Embolie, Guillème-Barre-Syndrom, Neuritis, Neuralgie, Rückenmarksverletzung, Paralyse, Uveitis); Krankheiten der Knochen, Gelenke, Muskel und des Bindegewebes (z. B. die verschiedenen Arthritiden und Arthralgien, Osteomyelitis, Fasziitis, Paget-Krebs, Gicht, Periodontitis, rheumatische Arthritis und Synovitis); andere Autoimmun- und Entzündungs-Erkrankheiten (wie z. B. Myasthenia gravis, Thyroiditis, systemischer Lupus erythematosus, Goodpasture-Syndrom, Behcet-Syndrom, Allotransplantationsabstoßung, Transplantat-Wirt-Reaktion, Typ I-Diabetes, Bechterev-Krankheit, Berger-Krankheit und Retter-Syndrom) sowie verschiedene Krebsarten und proliferative Erkrankungen (wie die Hodgkin-Krankheit) und in jedem Falle die Entzündungs- oder Immunreaktion des Wirts

gegen jede Primärerkrankung (Gattorno et al., 2000; Yeh und Schuster, 1999; McGuinness et al., 2000; Hsu et al., 1999; Prystowsky und Rege, 1997; Kimmings et al., 2000; Hirano, 1999; Lee et al., 1995; Waseman et al., 2000; Katagiri et al., 1997; Baumgardner und Orosz, 1999; Dibbs et al., 1999; Blum und Miller, 1998; Blackwell und Christman, 1996; Fox, 2000; Carteron, 2000; Hommes und van Deventer, 2000; Gracie et al., 1999; Kanai et al., 2001; Jander und Stoll, 2001; Watanabe et al., 1997; Rayner et al., 2000, Amrani et al., 2000).

[0005] Säugetiere reagieren auf eine von inflammatorischen Cytokinkaskaden verursachte Entzündung zum Teil über eine Regulation des zentralen Nervensystems. Diese Reaktion ist in Bezug auf systemische humorale Reaktionsmechanismen während der Entzündungsreaktionen auf Endotoxin genau charakterisiert worden (Bestedovsky et al., 1986; Woiciechowsky et al., 1998; Hu et al.; 1991; Lipton und Catania, 1997). In einem Satz von Reaktionen werden afferente Nervus vagus-Fasern von Endotoxin oder Cytokinen aktiviert und stimulieren über die Ausschüttung von Glucocorticoid-Hormonen das Auslösen von humoralen entzündungshemmenden Antworten (Watkins und Maier, 1999; Sternberg, 1997; Scheinmann et al., 1995). Eine frühere Arbeit erhellte eine Rolle für die Signalübertragung durch die Vagus-Nerven als kritische Komponente in der afferenten Schlinge, welche die Adrenocorticotropin- und Fieberreaktionen gegen eine systemische Endotoxämie und Zytokinämie moduliert (Gaykema et al., 1995; Fleshner et al., 1998; Watkins et al., 1995; Romanovsky et al., 1997).

[0006] Ein anderer Satz von Reaktionen erfolgt über eine efferente Nervus vagus-Signalübertragung mit der Bezeichnung "cholinerge entzündungshemmende Leitung" (cholinergic anti-inflammatory pathway; Borovka et al., 2000). Die Stimulierung des efferenten Nervus vagus setzt die systemischen Entzündungsantworten herab und hemmt die Freisetzung von TNF (Id., Bernik et al., 2002; Tracey et al., 2001; US-Patent 09/855,446). Acetylcholin, der grundsätzliche Neurotransmitter des Nervus vagus, verringert die Cytokinsynthese der Makrophagen, indem es Signale über α -Bungarotoxin-empfindliche nicotinerge Acetylcholinrezeptoren überträgt, die Identität des essentiellen Makrophagenrezeptors ist jedoch nicht bekannt.

[0007] Die nicotinergen Acetylcholinrezeptoren sind eine Familie von Liganden-gesteuerten pentameren Innkanälen. Beim Menschen sind 16 verschiedene Untereinheiten identifiziert worden (α 1-7, α 9-10, β 1-4, δ , ϵ und γ), welche eine große Anzahl von Homo- und Hetero-Pentamer-Rezeptoren mit bestimmten strukturellen und pharmakologischen Eigenschaften bilden (Lindstrom, 1995; Leonard und Bertrand, 2001; LeNovere und Changeux, 1995). Die hauptsächliche bekannte Funktion dieser Rezeptor_Familie besteht in der Übertragung von Signalen für den Neurotransmitter Acetylcholin an den Verbindungsstellen von Nerven und Muskeln sowie im zentralen und peripheren Nervensystem (Lindstrom, 1995; Leonard und Bertrand, 2001; LeNovere und Changeux, 1995, Marubio und Changeux, 2000, Steinlein, 1998). Unsere frühere Arbeit wies auf das Vorkommen von α -Bungarotoxin-empfindlichen nicotinergen Rezeptoren auf primären menschlichen Makrophagen hin (Borovkova et al., 2000), aber die Identität der spezifischen Rezeptor-Untereinheit war nicht bekannt.

[0008] Die Kenntnis des besonderen nicotinergen Rezeptors, der für die Hemmung einer Entzündung verantwortlich ist, wäre für die Identifizierung spezifischer Agonisten des Rezeptors, welche die Entzündung hemmen würden, von Nutzen. Derartige Agonisten hätten wahrscheinlich weniger Nebenwirkungen als die derzeit identifizierten Agonisten, die relativ unspezifisch sind. Die Identität von anderen von dem entzündungshemmenden Rezeptor beeinflussten physiologischen Wirkungen würde ebenfalls erleichtert.

BESCHREIBUNG DES STANDES DER TECHNIK

Zitierte Schriften:

- Amrany, Y. et al. Respir. Res. 1: 49-53 (2000).
- Bernik, T. R. et al. Pharmacological stimulation of the cholinergic anti-inflammatory pathway. J. Exp. Med. 195: 781-788 (2002).
- Bestedovsky, H. et al. Science 233: 652-654 (1986).
- Bianchi, M. et al. An inhibitor of macrophage arginine transport and nitric oxide production (CNI-1493) prevents acute inflammation and endotoxin lethality. Mol. Med. 1: 254-266 (1995).
- Blackwell, T. S. und Christman, J. W. Br. J. Anaesth. 77: 110-117 (1996).
- Blum, A. und Miller, H. Am. Heart J. 135: 181-186 (1998).
- Borovka, L. V., Ivanova, S., Zhang, M., Yang, H., Botchkina, G. I., Watkins, L. R., Wang, H., Abumrad, N., Eaton, J. W. & Tracey, K. J. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. Nature 405: 458-462 (2000).
- Baumgardner, G. L. und Orosz, C. G. Semin. Liver Dis. 19: 189-204 (1999).
- Carteron, N. L. Mol. Med. Today 6: 315-323 (2000).

- Cohen, P. S. et al. The critical role of p38 MAP kinase in T cell HIV-1 replication. *Molecular Medicine* 3: 339-346 (1997).
- Dibbs, Z. et al. Proc. Assoc. Am. Physicians 111: 423-428 (1999).
- Dinarelle, C. A. FASER J. 8: 1314-1325 (1994).
- Risdel, R. C. und Green, W. N. Neuronal α -bungarotoxin receptors are α 7 subunit homomers. *J. Neurosci.* 20: 133-139 (2000).
- Feng, G., Steinbach, J. H. und Safes, J. R. Rapsyn clusters neuronal acetylcholine receptors but is inessential for formation of an interneuronal cholinergic synapse. *J. Neurosci.* 18: 4166-4176 (1998).
- Fleshner, M. et al. *J. Neuroimmunol.* 86: 134-141 (1998).
- Fox, D. A. *Arch. Intern. Med.* 28: 437-444 (2000).
- Franceschini, D. et al. Altered baroreflex responses in α 7 deficient mice. *Behavioural Brain Res.* 113: 3-10 (2000)
- Francis, M. M. et al. *Mol. Pharmacol.* 60: 71-79 (2001).
- Gattorno, M. et al. *J. Rheumatol.* 27: 2251-2255 (2000).
- Gault, J. et al. Genomic organization and partial duplication of the human α 7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor gene (CHRNA7). *Genomics* 52: 173-185 (1998).
- Gaykema, R. P. et al. *Endocrinology* 136: 4717-4720 (1995).
- Gracie, J. A. et al. *J. Clin. Invest.* 104: 1393-1401 (1999).
- Holladay et al. Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors as Targets for Drug Discovery. *Journal of Medicinal Chemistry* 40: 4169-4194 (1997).
- Hommes, D. W. und van Deventer, S. J. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 3: 191-195 (2000).
- Hsu, H. Y. et al. *J. Pediatr. Gastroenterol.* 29: 540-545 (1999).
- Hu, X. X. et al. *J. Neuroimmunol.* 31: 35-42 (1991).
- Jander, S. und Stoll, G. J. *J. Neuroimmunol.* 114: 263-258 (2001).
- Kanai, T. et al. *Digestion* 63 Suppl. 1: 37-42 (2001).
- Katagiri, M. et al. *J. Clin. Gastroenterol.* 25 Suppl. 1: S211-214 (1997).
- Keffer, J. et al. Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *EMBO J.* 10: 4025-4031 (1991).
- Kem, W. R. et al. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 283: 979-992 (1997).
- Kimmings, A. N. et al. *Eur. J. Surg.* 166: 700-705 (2000).
- Kontoyiannis, D. et al. Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: implications for joint- and gut-associated immunopathologies. *Immunity* 10: 387-398 (1999).
- Kumins, N. H., Hunt, J., Gamelli, R. L. und Filkins, J. P. Partial hepatectomy reduces the endotoxin-induced peak circulating level of tumor necrosis factor in rats. *Shock* 5: 385-388 (1996).
- LeNovere, N. & Changeux, J-P. Molecular evolution of the nicotinic acetylcholine receptor: an example of multigene family in excitable cells. *J. Mol. Evol.* 40: 155-172 (1995)
- Lee, H. G. et al. *Clin. Exp. Immunol.* 100: 139-144 (1995).
- Leonard, S. und Bertrand, D. Neuronal nicotinic receptors: from structure to function. *Nicotine % Tobacco Res.* 3: 203-223 (2001).
- Lin, W. et al. Distinct roles of nerve and muscle in postsynaptic differentiation of the neuromuscular synapse. *Nature* 410: 1057-1064 (2001).
- Lindstrom, J. M. Nicotinic acetylcholine receptors. In "Hand Book Of Receptors And Channels: Ligand-And Voltage-Gated Ion Channels." Herausgegeben von R. Alan North. CRC Press, Inc. (1995).
- Marubio, L. M. und Changeux, J. P. Nicotinic acetylcholine receptor knockout mice as animal models for studying receptor function. *Eur. J. Pharmacol.* 393: 113-121 (2000).
- McGuinness, P. H. et al. *Gut* 46: 260-269 (2000)
- Nathan, C. F. *J. Clin. Invest.* 79: 319-326 (1987).
- Orr-Utreger, A. et al. Mice deficient in the α 7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor lack α bungarotoxin binding sites and hippocampal fast nicotinic currents. *J. Neurosci.* 17: 9165-9171 (1997).
- Peng, X. et al. Human α 7 acetylcholine receptor: cloning of the α 7 subunit from the SH-SY5Y cell line and determination of pharmacological properties of native receptors and functional α 7 homomers expressed in Xenopus oocytes. *Mol. Pharmacol.* 45: 546-554 (1994).
- Pulkki, K. J. *Ann. Med.* 29: 339-343 (1997)
- Prystowsky, J. B. und Rege, R. V. *J. Surg. Res.* 71: 123-126 (1997)
- Rayner, S. A. et al. *Clin. Exp. Immunol.* 122: 109-116 (2000).
- Romanovsky, A. A. et al. *Am. J. Physiol.* 273: R407-413 (1997).
- Seguela, P et al. Molecular cloning, functional properties and distribution of rat brain α 7: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium. *J. Neurosci.* 13: 596-604 (1993).
- Scheinman, R. I. et al. *Science* 270: 283-286 (1995).
- Shoop, R. D., Yamada, N. und Berg, D. K. Cytoskeletal links of neuronal acetylcholine receptors containing α 7 subunits. *J. Neurosci.* 20: 4021-4029 (2000).

Shoop, R. D. et al. Synaptically driven calcium transients via nicotinic receptors on somatic spines. *J. Neurosci.* 21: 771-781 (2001).
Simosky, J. K. et al. *Biol. Psychiatry* 50: 493-500 (2001).
Steinlein, O. New functions for nicotine acetylcholine receptors? *Behavioural Brain Res.* 95: 31-35 (1998).
Sternberg, E. M. *J. Clin. Invest.* 100: 2641-2647 (1997).
Tsutsui, H. et al. *Immunol. Rev.* 174: 192-209 (2000).
Tracey, K. J. et al. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science* 234: 470-474 (1986).
Tracey, K. J., Czura, C. J. und Ivanova, S. Mind over immunity. *FASER J.* 15: 1575-1576 (2001).
Vijayaraghavan, S. et al. Nicotinic receptors that bind α -bungarotoxin on neurons raise intracellular free Ca²⁺. *Neuron* 8: 353-362 (1992).
Wang, H. et al. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 285: 248-251 (1999).
Waserman, S. et al. *Can. Respir. J.* 7: 229-273 (2000).
Watanabe, H. et al. *J. Reconstr. Microsurg.* 13: 193-197 (1997).
Watkins, L. R. und Maier, S. F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 7710-7713 (1999).
Watkins, L. R. et al. *Neurosci. Lett.* 183: 27-31 (1995).
Woiciechowsky, C. et al. *Nat. Med.* 4: 808-813 (1998).
Yeh, S. S. und Schuster, M. W. *Am. J. Clin. Nutr.* 70: 183-197 (1999).
Zhang und Tracey, in *The Cytokine Handbook*, 3. Aufl., Thompson Academic Press, 515-547 (1998).
PCT-Patentanmeldungsveröffentlichung WO 98/30998.
PCT-Patentanmeldungsveröffentlichung WO 00/47104.
PCT-Patentanmeldungsveröffentlichung WO 01/85727.
PCT-Patentanmeldungsveröffentlichung WO 02/44176.
PCT-Patentanmeldungsveröffentlichung WO 02/057275.
US-Patentanmeldung 09/855,446.
US-Patentanmeldungsveröffentlichung 2002/0040035.
US-Patentanmeldungsveröffentlichung 2002/0086871.
US-Patent 5,902,814.
US-Patent 5,977,144.
US-Patent 6,110,914.
US-Patent 6,407,095.
US-Patent 6,436,909.
Masato Nauri et al., *Jpn. J. Pharmacol.* 1998, 76, 23-29.
Masato Nauri et al., *Jpn. J. Pharmacol.* 1998, 76, 463-469.
S. Shimohama et al., *Brain Research* 1998, 779, 359-363.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0009] Die vorliegende Erfindung beruht demnach auf der Entdeckung, dass der α 7-Rezeptor der α -Bungarotoxin-empfindliche Rezeptor ist, welcher die Freisetzung entzündungsfördernder Cytokine aus Makrophagen beeinflusst. Mit dieser Kenntnis wären verschiedene nützliche Zusammensetzungen zur Behandlung von inflammatorischen Zuständen und zur Identifizierung von für diese Behandlung nützlichen Verbindungen denkbar. Die Untersuchungen von Makrophagen-Antworten auf cholinerge Agonisten und Antagonisten werden mit dieser Kenntnis ebenfalls erleichtert.

[0010] Die vorliegende Erfindung betrifft somit die Herstellung von Zusammensetzungen zur Hemmung der Freisetzung eines entzündungsfördernden Cytokins aus einem Makrophagen, welche einen cholinergen Agonisten in einer Menge umfassen, die ausreicht, um die aus dem Makrophagen freigesetzte Menge des entzündungsfördernden Cytokins zu reduzieren, wobei der cholinerge Agonist selektiv für einen nicotinergen α 7-Rezeptor ist.

[0011] In anderen Ausführungsformen betrifft die Erfindung die Herstellung von Zusammensetzungen zur Hemmung einer inflammatorischen Cytokin-Kaskade in einem Patienten, welche einen cholinergen Agonisten in einer Menge umfassen, die ausreicht, um die inflammatorische Cytokin-Kaskade zu hemmen, wobei der cholinerge Agonist selektiv für einen nicotinergen α 7-Rezeptor ist. In diesen Ausführungsformen leidet der Patient vorzugsweise unter einem von der inflammatorischen Cytokin-Kaskade vermittelten Zustand oder er läuft Gefahr, in einen solchen Zustand zu geraten.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0012] Die vorstehenden und andere Aufgaben, Merkmale und Vorteile der Erfindung sind aus der folgenden mehr ins einzelne gehenden Beschreibung bevorzugter erfindungsgemäßer Ausführungsformen zu ersehen, wie sie in den anhängenden Zeichnungen veranschaulicht werden, in denen sich durchwegs in den verschiedenen Ansichten gleiche Bezugszeichen auf gleiche Teile beziehen. Die Zeichnungen sind nicht notwendigerweise maßstabsgetreu, vielmehr wurde mehr Wert auf die Veranschaulichung der Prinzipien der Erfindung gelegt.

[0013] [Fig. 1](#) stellt Mikrofluoreszenzbilder dar, welche zeigen, dass die α -Bungarotoxin-bindenden nicotinergen Rezeptoren auf der Oberfläche von Makrophagen als Cluster vorliegen. Primäre Makrophagen des Menschen wurden mit FITC-markiertem α -Bungarotoxin (α -bgt, 1,5 μ g/ml) angefärbt und mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Die Bilder 1a und b zeigen Mikrobilder mit geringerer Vergrößerung. a: Die Zellen wurden mit α -Bungarotoxin allein angefärbt. b: Vor Zusatz von α -Bungarotoxin wurden 500 μ M Nicotin zugegeben. Die Bilder 1c und d zeigen Mikrobilder mit höherer Vergrößerung, um die Rezeptor-Cluster zu erkennen. c: Die Brennpunktsebenen waren auf den inneren Schichten nahe der Mitte (die drei unteren Zellen) oder nahe der Zelloberfläche (obere Zelle). d: Die Brennpunktsebene war auf der Oberfläche der Zelle.

[0014] [Fig. 2](#) sind Photographien von Gelen und Western-Blots, welche die mRNA und Protein-Expression der nicotinergen α 7- und α 1-Rezeptoren in primären Makrophagen des Menschen zeigen. Bild a zeigt die Ergebnisse einer RT-PCR mit α 7-spezifischen Primern, welche eine α 7-Bande mit 843 bp erzeugen. Die PCR-Produkte wurden durch Sequenzierung verifiziert (Daten nicht gezeigt). MAC1 und MAC2: Von zwei nicht verwandten Spendern stammende Makrophagen. Bild b zeigt die Western-Blots. Die Zelllysate von PC12-Zellen oder von menschlichen Makrophagen (MAC) wurden entweder mit Kontroll-Sepharosekügelchen oder mit Sepharosekügelchen inkubiert, die mit α Bungarotoxin konjugiert waren. Die gebundenen Proteine wurden so dann wie angegeben mit α 7-spezifischen polyklonalen und monoklonalen Antikörpern analysiert.

[0015] [Fig. 3](#) stellt Bilder und Mikrobilder dar, welche zeigen, dass Antisense-Oligonucleotide zu der α 7-Untereinheit des Nicotin-Acetylcholin-Rezeptors die Wirkung des Nicotins auf eine TNF-Freisetzung hemmt. Die Bilder a-c sind Darstellungen, welche die experimentellen Ergebnisse zusammenfassen, welche die LPS-stimulierte TNF-Freisetzung aus primären humanen Makrophagen zeigen, die mit Antisense-Oligonucleotiden zu verschiedenen Untereinheiten der nicotinergen Rezeptoren vorbehandelt wurden. Wo angegeben, wurde das Nicotin (Nic, 1 μ M) 5 bis 10 Minuten vor der LPS-Induktion (199 ng/ml) zugegeben. Die TNF-Konzentrationen im Zellkulturmedium wurden mit L929-Assays bestimmt. CT: (nicht stimuliert) Makrophagenkulturen als Kontrolle. AS α 7, AS α 1 und AS α 10: Antisense-Oligonucleotide zu der AS α 7-, AS α 1- bzw. AS α 10-Untereinheit. Die Bilder d und e sind Fluoreszenz-Mikrobilder, welche die FITC- α -Bungarotoxin-Färbung von primären menschlichen Makrophagen wiedergeben, die mit dem α 7-Antisense-Oligonucleotid (AS α 7) behandelt (e) oder nicht behandelt (d) und mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop betrachtet wurden.

[0016] [Fig. 4](#) ist eine Darstellung, welche Experimente zusammenfasst, die eine erhöhte Cytokinproduktion in α 7-defizienten Mäusen während einer Endotoxinämie zeigen. α 7-defizienten Mäusen (−/−) oder in Alter und Geschlecht zusammenpassenden Wildtyp-Mäusen (+/+) wurde LPS (0,1 mg/kg i. p.) injiziert. Das Blut und die Organe wurden entweder 1 Stunde (für TNF) oder 4 Stunden (für IL-1 β und IL-6) nach der LPS-Stimulation entnommen. Die Konzentrationen von TNF, IL-1 β und IL-6 im Serum oder in den Organen wurden mit einem ELISA gemessen. Bild a: TNF-Konzentrationen im Serum. n = 10 pro Gruppe. Bild b: THF-Konzentrationen in der Leber. n = 6 pro Gruppe. Bild c: TNF-Konzentrationen in der Milz. n = 6 pro Gruppe. Bild d: IL-1 β -Konzentrationen im Serum. n = 8 pro Gruppe. Bild e: IL-6-Konzentrationen im Serum. n = 9 pro Gruppe. * = p < 0,05 gegenüber den Wildtyp-Kontrollen.

[0017] [Fig. 5](#) ist eine Darstellung, in der gezeigt wird, dass eine Stimulation des Nervus vagus das TNF in Mäusen nicht hemmt, die einen Mangel an nicotinerger Acetylcholin-Rezeptor- α 7-Untereinheit aufweisen. α 7-defiziente Mäuse (−/−) oder in Alter und Geschlecht zusammenpassende Wildtyp-Mäuse (+/+) wurden entweder einer Scheinoperation (SHAM) oder einer Stimulierung des Nervus Vagus (VNS, linker Vagus, 1 Volt, 2 ms, 1 Hz) unterzogen; das Blut wurde 2 Stunden nach der LPS-Verabreichung gesammelt. Die Serum-TNF-Konzentrationen wurden mit einem ELISA bestimmt. n = 10 (SHAM α 7+/+). n = 11 (VNS α 7+/, SHAM α 7−/−, VNS α 7−/−). * = 0,05 gegenüber SHAM α 7+/+.

[0018] [Fig. 6](#) ist eine graphische Darstellung, in welcher die Mortalität (prozentuales Überleben) von Mäusen im Verlauf der Verabreichung von entweder Verbindung (V) oder Verbindung (VI) nach Induktion einer Sepsis mittels des Modells aus Zäkalligatur und Punktur.

[0019] [Fig. 7](#) ist ein Vergleich nebeneinander liegender graphischer Darstellungen, welche die gemessenen Mengen der LPS-induzierten Freisetzung von TNF- α aus murinen RAW.2647-Makrophagen-ähnlichen Zellen wiedergeben, die mit steigenden Konzentrationen von entweder der Verbindung (V) oder von Nicotin behandelt wurden, als Funktion der Konzentrationen dieser Verbindungen

[0020] [Fig. 8A](#) ist eine graphische Darstellung, in welcher die prozentuale Hemmung der LPS-induzierten Freisetzung von TNF- α aus murinen RAW.2647-Makrophagen-ähnlichen Zellen gezeigt wird, die mit steigenden Konzentrationen der Verbindung (VI) behandelt wurden, als Funktion der Vorinkubationszeit.

[0021] [Fig. 8B](#) ist eine graphische Darstellung, in welcher die prozentuale Hemmung der LPS-induzierten Freisetzung von TNF- α aus murinen RAW 264.7-Makrophagen-ähnlichen Zellen gezeigt wird, die mit steigenden Konzentrationen der Verbindung (VI) behandelt wurden, als Funktion der Konzentration der Verbindung (VI).

[0022] [Fig. 9](#) ist ein Balkendiagramm der gemessenen Blutstrom-Konzentrationen von TNF- α nach Verabreichung an Mäuse, denen vorher Verbindung (VI) verabreicht worden war.

[0023] [Fig. 10](#) stellt einen Vergleich nebeneinander liegender Balkendiagramme dar, welche das Kolongewicht (A) und die Kolonlänge (B) der Mäuse wiedergeben, denen nach Induktion einer Kolitis durch Dextran-Natriumsulfat die Verbindung (VI) verabreicht worden war.

[0024] [Fig. 11](#) ist ein Balkendiagramm, das die gemessenen Konzentrationen von TNF- α wiedergibt, das aus LPS-stimulierten murinen RAW.264.7-Makrophagen-ähnlichen Zellen nach Vorinkubation mit steigenden Mengen der Verbindung (VII) freigesetzt wurde.

GENAUE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0025] Es folgt eine Beschreibung der bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung.

Definitionen der Substituenten

[0026] Der hier verwendete Ausdruck "Alkyl" umfasst, wenn nicht anders angegeben, gesättigte, monovalente, geradkettige oder verzweigte Kohlenwasserstoff-Reste, typischerweise C₁-C₁₀, vorzugsweise C₁-C₆. Beispiele für Alkyl-Gruppen sind Methyl, Ethyl, Propyl, Isopropyl und t-Butyl.

[0027] Der hier verwendete Ausdruck "Alkenyl" umfasst, wenn nicht anders angegeben, Alkylreste mit mindestens einer Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindung, wobei Alkyl die obige Definition hat. Beispiele für Alkenyl sind Ethenyl und Propenyl.

[0028] Der hier verwendete Ausdruck "Alkinyl" umfasst, wenn nicht anders angegeben, Alkylreste mit mindestens einer Kohlenstoff-Kohlenstoff-Dreifachbindung, wobei Alkyl die obige Definition hat. Beispiele für Alkinyl-Gruppen sind Ethinyl und 2-Propinyl.

[0029] Der hier verwendete Ausdruck "Alkoxy" bedeutet eine "Alkyl-O"-Gruppe, wobei Alkyl die oben angegebene Bedeutung hat.

[0030] Der hier verwendete Ausdruck "Cycloalkyl" umfasst, wenn nicht anders angegeben, nicht-aromatische, gesättigte, cyclische Alkylreste, wobei Alkyl die oben angegebene Bedeutung hat. Beispiele für Cycloalkyle sind Cyclopropyl, Cyclobutyl, Cyclopentyl, Cyclohexyl und Cycloheptyl. "Bicycloalkyl"-Gruppen sind nicht-aromatische, gesättigte, carbocyclische Gruppen, die aus zwei Ringen bestehen. Beispiele für Bicycloalkyl-Gruppen sind Bicyclo[2.2.2]-Octyl und Norbornyl. Die Ausdrücke "Cycloalkenyl" und "Bicycloalkenyl" betreffen nichtaromatische, carbocyclische Cycloalkyl- und Bicycloalkyl-Reste wie oben definiert, mit der Ausnahme, dass sie eine oder mehrere Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindungen umfassen, welche Kohlenstoffring-Glieder miteinander verbinden (eine "endocyclische" Doppelbindung) und/oder sie eine oder mehrere Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindungen umfassen, welche ein Kohlenstoffring-Glied und einen angrenzenden nicht zu einem Kohlenstoffring gehörenden Kohlenstoff miteinander verbinden (eine "exocyclische" Doppelbindung). Beispiele für Cycloalkenyl-Gruppen sind Cyclopentenyl und Cyclohexenyl. Ein nicht einschränkendes Beispiel für eine Bicycloalkenyl-Gruppe ist Norborenyl. Die Cycloalkyl-, Cycloalkenyl-, Bicycloalkyl- und Bicycloalkenyl-Gruppen umfassen auch Gruppen, die den oben für jede der jeweiligen Kategorie beschriebenen Gruppen ähnlich sind, die jedoch mit einer oder mehreren Oxo-Resten substituiert sind. Beispiele für der-

artige Gruppen mit Oxo-Resten sind Oxocyclopentyl, Oxocyclobutyl, Oxocyclopentyl und Norcamphoryl.

[0031] Der hier verwendete Ausdruck "Cycloalkoxy" umfasst, wenn nicht anders angegeben, eine "Cycloalkyl-O"-Gruppe, wobei Cycloalkyl die oben angegebene Bedeutung hat.

[0032] Der hier verwendete Ausdruck "Aryl" bezieht sich auf eine carbocyclische Gruppe. Beispiele für Arylgruppen sind Phenyl und Naphthyl.

[0033] Der hier verwendete Ausdruck "Heteroaryl" bezieht sich auf aromatische Gruppen, welche eines oder mehrere Heteroatome (O, S oder N) enthalten. Eine Heteroaryl-Gruppe kann monocyclisch oder polycyclisch sein. Die Heteroaryl-Gruppen dieser Erfindung können auch Ringsysteme umfassen, die mit einem oder mehreren Oxo-Resten substituiert sind. Beispiele für Heteroarylgruppen sind Pyridinyl, Pyridazinyl, Imidazolyl, Pyrimidinyl, Pyrazolyl, Triazolyl, Pyrazinyl, Chinolyl, Isochinolyl, Tetrazolyl, Furyl, Thienyl, Isoxazolyl, Thiazolyl, Oxazolyl, Isothiazolyl, Pyrrolyl, Chinolinyl, Isochinolinyl, Indolyl, Benzimidazolyl, Benzofuranyl, Cinnolinyl, Indazolyl, Indolizinyl, Phthalazinyl, Pyridazinyl, Triazinyl, Isoindolyl, Purinyl, Oxadiazolyl, Thiazolyl, Thiadiazolyl, Furazanyl, Benzofurazanyl, Benzothiophenyl, Benzotriazolyl, Benzothiazolyl, Benzoxazolyl, Chinazolinyl, Chinoxaliny, Naphthyridinyl, Dihydrochinolyl, Tetrahydrochinolyl, Dihydroisochinolyl, Tetrahydroisochinolyl, Benzofuryl, Europyridinyl, Pyrrolopyrimidinyl und Azaindolyl.

[0034] Die vorstehenden Heteroaryl-Gruppen können (wo dies möglich ist) an C oder N angeheftet sein. Beispielsweise kann eine von Pyrrol stammende Gruppe Pyrrol-1-yl (an N geheftet) oder Pyrrol-3-yl (an C geheftet) sein.

[0035] Im Kontext der vorliegenden Erfindung ist eine bicyclische carbocyclische Gruppe eine bicyclische Verbindung, in der Kohlenstoff nur als Ringatom vorkommt. Die Ringstruktur kann insbesondere aromatisch, gesättigt oder teilweise gesättigt sein. Beispiele für derartige Verbindungen sind Indanyl, Naphtalenyl, Azulenyl.

[0036] Im Kontext der vorliegenden Erfindung kann eine Aminogruppe eine primäre (-NH₂), sekundäre (-NH-R_a) oder tertiäre (-NR_aR_b) Aminogruppe sein, wobei R_a und R_b jeweils eine Alkyl-, Alkenyl-, Alkinyl-, Alkoxy-, Cycloalkyl-, Cycloalkoxy-, Aryl- und eine bicyclische Carboxyl-Gruppe sein können.

[0037] Bei der Ausführung der vorliegenden Erfindung werden, falls nicht anders angegeben, konventionelle Techniken der Zellkultur, Molekularbiologie, Mikrobiologie, Zellbiologie und Immunologie eingesetzt, die dem Fachmann wohl bekannt sind. Derartige Techniken sind vollständig in der Literatur beschrieben. Siehe z. B. Sambrook et al., 1989, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel et al. (1995), "Short Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons; Methods in Enzymology (einige Bände); Methods in Cell Biology (einige Bände) und Methods in Molecular Biology (einige Bände).

[0038] Zur Ausführung der vorliegenden Erfindung können pharmazeutisch verträgliche Salze der hier beschriebenen Verbindungen eingesetzt werden. Der hier verwendete Begriff "pharmazeutisch verträgliches Salz" der beschriebenen Verbindung ist ein Produkt, das eine Innenbindung enthält, welche durch die Reaktion einer erfindungsgemäßen Verbindung mit entweder einer Säure oder Base zustande kam, welche Verbindung für die Verabreichung an einen Empfänger geeignet ist. Beispielsweise kann ein saures Salz einer ein Amin oder eine andere basische Gruppe enthaltenden Verbindung dadurch erhalten werden, dass man die Verbindung mit einer geeigneten organischen oder anorganischen Säure reagieren lässt, wie z. B. mit Chlorwasserstoff, Bromwasserstoff, Essigsäure, Perchlorsäure und dergl. Andere Beispiele für derartige Salze sind Hydrochloride, Hydrobromide, Sulfate, Methansulfonate, Nitrate, Maleate, Acetate, Citrate, Fumarate, Tartrate (z. B. (+)-Tartrate, (-)-Tartrate oder Mischungen derselben einschließlich racemischer Mischungen), Succinate, Benzoate und Salze mit Aminosäuren wie Glutaminsäure. Salze können auch mit geeigneten organischen Basen gebildet werden, wenn die Verbindung eine saure funktionelle Gruppe wie -COOH oder -SO₃H umfasst. Derartige für die Bildung von pharmazeutisch verträglichen Basenadditionssalzen mit Verbindungen der vorliegenden Erfindung geeignete Basen umfassen organische Basen, welche nicht toxisch und stark genug sind, um mit der sauren funktionellen Gruppe zu reagieren. Solche organischen Basen sind im Stand der Technik gut bekannt und umfassen Aminosäuren wie Arginin und Lysin, Mono-, Di- und Triethanolamine, Cholin, ein Mono-, Di- und Trialkylamin wie Methylamin, Dimethylamin und Trimethylamin, Guanidin, N-Benzylphenetylamin, N-Methylglucosamin, N-Methylpiperazin, Morpholin, Ethylendiamin und Tris(hydroxymethyl)aminomethan.

[0039] Der hier verwendete Begriff "pharmazeutische Zusammensetzung" ist eine Formulierung mit den beschriebenen Verbindungen und einem pharmazeutisch verträglichen Verdünnungsmittel oder Träger in einer

Form, die für die Verabreichung an einen Empfänger geeignet ist. Die pharmazeutische Zusammensetzung kann in Bulkform oder in Form einer Einheitsdosis vorliegen. Die Einheitsdosisform kann in verschiedenen Formen vorliegen, wie z. B. einer Kapsel, einem IV-Beutel, einer Tablette, einer einzelnen Pumpe auf einem Aerosol-Inhalator oder einem Fläschchen. Die Menge des aktiven Inhaltsstoffs (d. h. eine Formulierung der beschriebenen Verbindung oder von Salzen derselben) in einer Einheitsdosis der Verbindung ist eine wirksame Menge und kann je nach der besonderen stattfindenden Behandlung variieren. Man sei sich bewusst, dass es notwendig sein kann, je nach dem Alter und Befinden des Patienten Routinevariationen an der Dosierung vorzunehmen. Die Dosierung kann auch vom Verabreichungsweg abhängen. Es werden verschiedene Wege erwogen, einschließlich einer topischen, oralen, pulmonalen, rektalen, vaginalen, parenteralen Verabreichung, einschließlich einer transdermalen, subkutanen, intravenösen, intramuskulären, intraperitonealen und intranasalen Verabreichung.

[0040] Die hier beschriebenen Verbindungen und die pharmazeutisch verträglichen Salze derselben können in pharmazeutischen Präparaten in Kombination mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger oder Verdünnungsmittel eingesetzt werden. Geeignete pharmazeutisch verträgliche Träger sind inerte feste Füllstoffe oder Verdünnungsmittel und sterile wässrige oder organische Lösungen. Die Verbindungen liegen in solchen pharmazeutischen Zusammensetzungen in Mengen vor, die ausreichen, um für die gewünschte Dosierungsmenge in dem hier beschriebenen Bereich zu sorgen. Techniken zur Formulierung und Verabreichung der erfindungsgemäßen Verbindungen sind in Remington: the Science and Practice of Pharmacy, 19. Ausgabe, Mack Publishing Co., Easton, PA (1995) zu finden.

[0041] Der hier verwendete Begriff "Empfänger" umfasst Säugetiere, z. B. Menschen, Haustiere (z. B. Hunde, Katzen, Vögel und dergl.), Farmtiere (z. B. Kühe, Schafe, Schweine, Pferde und Geflügel) sowie Labortiere (z. B. Ratten, Mäuse und Meerschweinchen). In einer besonderen Ausführungsform der beschriebenen Verfahren ist der Empfänger ein Mensch.

[0042] Unter dem hier verwendeten Ausdruck "therapeutisch wirksame Menge" einer erfindungsgemäßen Verbindung ist die Menge zu verstehen, welche, wenn sie an einen Empfänger mit einem Bedarf nach einer Behandlung verabreicht wird, die Prognose des Empfängers verbessert, z. B. das Auftreten von einem oder mehreren mit einer Pilzinfektion einhergehenden Symptomen verzögert und/oder deren Heftigkeit verringert. Die Menge der an einen Empfänger zu verabreichenden beschriebenen Verbindung hängt ab von der besonderen Krankheit, der Verabreichungsweise und den Eigenschaften des Empfängers wie z. B. dem allgemeinen Gesundheitszustand, anderen Krankheiten, dem Alter, dem Geschlecht, dem Genotyp, dem Körpergewicht und der Arzneimittel-Toleranz.

[0043] Der Fachmann ist in der Lage, je nach diesen und anderen Faktoren die geeignete Dosierung zu bestimmen. Wirksame Mengen der beschriebenen Verbindungen bewegen sich typischerweise im Bereich von etwa 0,1 mg/kg Körpergewicht pro Tag bis etwa 1000 mg/kg Körpergewicht pro Tag und vorzugsweise von 1 mg/kg Körpergewicht pro Tag bis 100 mg/kg Körpergewicht pro Tag.

[0044] Die vorliegende Erfindung basiert auf der Identifizierung des α -Bungarotoxin-empfindlichen Rezeptors, der, wenn er einem Agonisten dieses Rezeptors ausgesetzt wird, die Freisetzung von entzündungsfördernden Cytokinen aus Makrophagen hemmt, wenn die Makrophagen anderweitig stimuliert sind, um inflammatorische Cytokine freizusetzen. Der für diese Hemmung verantwortliche Rezeptor ist der α 7-Rezeptor. Die Behandlung eines Makrophagen mit einem Agonisten für den α 7-Rezeptor hindert somit den Makrophagen daran, entzündungsfördernde Cytokine, insbesondere TNF, freizusetzen, falls der Makrophage anderweitig stimuliert war, z. B. mit einem bakteriellen Polysaccharid (LPS), um entzündungsfördernde Cytokine freizusetzen.

[0045] Demgemäß befasst sich die vorliegende Erfindung in einigen Ausführungsformen mit der Herstellung von Zusammensetzungen, welche die Freisetzung eines entzündungsfördernden Cytokins aus einer Säugerzelle hemmen, wobei die Zusammensetzungen einen cholinergen Agonisten in einer Menge umfassen, die ausreicht, die von der Zelle freigesetzte Menge an entzündungsförderndem Cytokin herab zu setzen, wobei der cholinerge Agonist selektiv für einen α 7-cholinergen Rezeptor ist.

[0046] Unter dem hier verwendeten Begriff Cytokine versteht man lösliche Proteine oder Peptide, die auf natürliche Weise von Säugerzellen produziert werden und welche in vivo als humorale Regulatoren in mikro- oder pikomolaren Konzentrationen wirken. Cytokine können entweder unter normalen oder pathologischen Bedingungen die funktionellen Aktivitäten einzelner Zellen und Gewebe modulieren. Ein entzündungsförderndes Cytokin ist ein Cytokin, das in der Lage ist, jede der folgenden mit einer Entzündung einhergehenden Reaktionen auszulösen: Vasodilatation, Hyperämie, erhöhte Gefäßdurchlässigkeit mit damit einhergehendem Ödem, Ak-

kumulation von Granulozyten und einkernigen Phagozyten oder Ablagerung von Fibrin. In einigen Fällen kann das entzündungsfördernde Cytokin auch eine Apoptose verursachen, wie z. B. bei chronischer Herzinsuffizienz, wo gezeigt worden ist, dass TNF eine Apoptose der Cardiomyozyten stimuliert (Pulkki, 1997; Tsutsui et al., 2000). Beispiele für entzündungsfördernde Cytokine sind der Tumor-Nekrose-Faktor TNF), Interleukin (IL)-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-18, Interferon γ , HMG-1, der Plättchen aktivierende Faktor (PAF), der Makrophagen-Migrations-inhibierende-Faktor (MIF). In bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung ist das durch Behandlung mit dem cholinergen Agonisten gehemmte entzündungsfördernde Cytokin TNF, ein IL-1, IL-6 oder IL18, weil diese Cytokine von Makrophagen produziert werden und für viele wichtigen Beschwerden schädliche Zustände vermitteln, z. B. einen endotoxischen Schock, Asthma, rheumatoide Arthritis, entzündliche Gallenerkrankung, Herzinsuffizienz und Transplantat-Abstoßung. In den am meisten bevorzugten Ausführungsformen ist das entzündungsfördernde Cytokin TNF.

[0047] Die entzündungsfördernden Cytokine sind von den entzündungshemmenden Cytokinen wie IL-4, IL-10 und IL-13 zu unterscheiden, welche keine Mediatoren einer Entzündung sind. In bevorzugten Ausführungsformen wird die Freisetzung von entzündungshemmenden Cytokinen nicht durch cholinerge Agonisten gehemmt.

[0048] In vielen Fällen werden die entzündungsfördernden Cytokine in einer inflammatorischen Cytokin-Kaskade produziert, was hier als in vivo-Freisetzung von mindestens einem entzündungsfördernden Cytokin in einem Säugetier definiert wird, wobei die Freisetzung des Cytokins einen physiologischen Zustand des Säugertiers beeinflusst. Somit wird eine inflammatorische Cytokin-Kaskade in den Ausführungsformen der Erfindung gehemmt, in welchen die Freisetzung von entzündungsfördernden Cytokinen einen schädlichen physiologischen Zustand hervorruft.

[0049] Jede Sägerzelle, die entzündungsfördernde Cytokine produziert, ist gemeint. Beispiele sind Monozyten, Makrophagen, Mastzellen, Neutrophile, Epithelzellen, Osteoblasten, Fibroblasten, Zellen der glatten Muskulatur und Nervenzellen. In bevorzugten Ausführungsformen ist die Zelle ein Makrophag.

[0050] Der hier verwendete Begriff "cholinriger α 7-Rezeptor" bedeutet einen Rezeptor mit einer α 7-Untereinheit. Der Rezeptor kann nur α 7-Untereinheiten umfassen. Alternativ umfasst der Rezeptor (eine) α 7-Untereinheit(en) und (eine) Untereinheit(en) von anderen cholinergen Rezeptor-Subtypen. In einer Ausführungsform ist der Rezeptor ein Homopentamer. In einer anderen Ausführungsform ist der Rezeptor ein Heteropentamer.

[0051] Der hier verwendete Ausdruck "Agonist eines cholinergen α 7-Rezeptors" steht für eine Verbindung, die sich in vivo oder in vitro an einen Rezeptor mit einer α 7-Untereinheit bindet und den Rezeptor induziert, seine physiologische Funktion auszuüben. In einer Ausführungsform hemmt der Agonist eines cholinergen Rezeptors die Freisetzung von entzündungsfördernden Cytokinen aus Zellen, welche cholinerge Rezeptoren mit α 7-Untereinheiten exprimieren, wenn die Zelle anderweitig zur Freisetzung solcher entzündungsfördernden Cytokine stimuliert worden ist. Der Fachmann kann mit jedem einschlägig bekannten Verfahren ermitteln, z. B. mit den in Beispiel 1 unten beschriebenen, ob irgendeine besondere Verbindung ein Agonist eines α 7-Rezeptors ist.

[0052] Wird auf die Wirkung des cholinergen Agonisten auf die Freisetzung von entzündungsfördernden Cytokinen oder auf eine inflammatorische Cytokin-Kaskade Bezug genommen, umfasst die Verwendung der Ausdrücke "hemmen" oder "herabsetzen" zumindest eine kleine aber messbare Reduktion bei der entzündungsfördernden Freisetzung von Cytokinen. In bevorzugten Ausführungsformen wird die Freisetzung der entzündungsfördernden Cytokine um mindestens 20% von der nicht behandelten Kontrollen gehemmt; in mehr bevorzugten Ausführungsformen beträgt die Hemmung mindestens 50%, in noch mehr bevorzugten Ausführungsformen beträgt die Hemmung mindestens 70% und in den am meisten bevorzugten Ausführungsformen beträgt die Hemmung mindestens 80%. Derartige Reduktionen bei der Freisetzung von entzündungsfördernden Cytokinen sind in der Lage, die schädlichen Wirkungen einer inflammatorischen Cytokin-Kaskade bei Ausführungsformen in vivo zu senken.

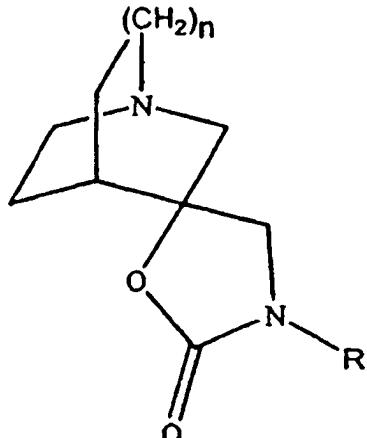
[0053] Es wäre zu erwarten, dass jeder α 7-Agonist die Freisetzung von entzündungsfördernden Cytokinen aus Sägerzellen hemmt. In bevorzugten Ausführungsformen ist der cholinerge Agonist in nützlichen Konzentrationen gegenüber der Zelle nicht anderweitig toxisch. In mehr bevorzugten Ausführungsformen ist der cholinerge Agonist therapeutisch in vivo eingesetzt worden oder er wird auf natürliche Weise von den Sägerzellen produziert. Beispiele sind Acetylcholin, Muscarin, Nicotin, 3-2,4-Dimethoxybenzylidinanabasein (DMXB-A, auch bekannt als GTS-21) (Kern et al., 1997; Simosky et al., 2001), Cholin, Cocainmethiodid (Francis et al., 2001).

[0054] In den am meisten bevorzugten Ausführungsformen ist der cholinerge Agonist ein Agonist, der selektiv oder spezifisch für $\alpha 7$ ist, da von einem derartigen Agonisten erwartet werden könnte, dass er bei einem Empfänger, der auf eine Entzündung hin behandelt wird, weniger Nebenwirkungen hervorruft als ein nicht-spezifischer cholinriger Agonist (z. B. Nicotin). Wenn hier geschrieben wird, dass ein Agonist selektiv für $\alpha 7$ ist, dann ist der Agonist ein Agonist, der $\alpha 7$ in größerem Umfang aktiviert als zumindest einen anderen nicotinergen Rezeptor. Ein derartiger Unterschied in der Aktivierung lässt sich messen, indem die Aktivierung der verschiedenen Rezeptoren nach jedem bekannten Verfahren verglichen wird, z. B. indem ein *in vitro* Rezeptor-Bindungssassay wie diejenigen von NovaScreen Biosciences Corporation (Hanover, MD) hergestellten eingesetzt wird oder mit Verfahren, die in der WO 02/44176 (Untersuchung von $\alpha 4\beta 2$), im US-Patent 6,407,095 (peripherer nicotiniger Rezeptor des Ganglion-Typs), in der US-Patentanmeldungsveröffentlichung 2002/0086871 (Bindung eines markierten Liganden an Membranen, die aus GH₄C1-Zellen gewonnen wurden, welche mit dem betreffenden Rezeptor transfiziert worden sind), in der US-Patentanmeldungsveröffentlichung 2002/0086871 ($\alpha 1$ und $\alpha 4$) und in der WO 97/30998 beschrieben sind. Schriften, in denen Verfahren zur Ermittlung von Agonisten beschrieben werden, welche selektiv für $\alpha 7$ -Rezeptoren sind, sind das US-Patent 5,977,144 (Tabelle 1), WO 02/057275 (SS. 41-42) und Holladay et al., (1997). Assays für andere nicotinerge Rezeptor-Subtypen sind dem Fachmann bekannt.

[0055] Es wird die Bindung oder Aktivität (aktuelle Antworten) von Xenopus-Oocyten ausgenutzt, welche nach Verabreichung des Agonisten entweder den $\alpha 7$ -Rezeptor Subtyp oder einen anderen Rezeptor-Subtyp (z. B. $\alpha 4\beta 2$) exprimieren. Die Agonisten, welche zu einer größeren Aktivierung des $\alpha 7$ -Rezeptor-Subtyps führen, werden als $\alpha 7$ -selektive Agonisten ermittelt. Bei Einsatz von jeder der obigen Verfahren oder eines gleichwertigen Verfahrens ist es bevorzugt, dass der $\alpha 7$ -selektive Agonist mindestens um das 2-fache, mehr bevorzugt mindestens um das 5-fache, noch mehr bevorzugt mindestens um das 10-fache und am meisten bevorzugt mindestens um das 50-fache eher in der Lage ist, den $\alpha 7$ -Rezeptor zu aktivieren als zumindest ein anderer nicotiniger Rezeptor.

[0056] Ein Agonist ist spezifisch für $\alpha 7$, wenn dieser Agonist den $\alpha 7$ -Rezeptor in weitaus größerem Umfang aktiviert (d. h. mindestens um das 10-fache, vorzugsweise mindestens um das 20-fache, mehr bevorzugt mindestens um das 50-fache) als jeden anderen nicotinergen Rezeptor. Am meisten bevorzugt aktiviert der spezifische Agonist keinen anderen nicotinergen Rezeptor in irgendeinem messbaren Umfang (d. h. signifikant bei $P = 0,05$ gegenüber einem unbehandelten Rezeptor in einem gut kontrollierten Vergleich). Beispiele für $\alpha 7$ -spezifische Agonisten sind DMXB-A (Verbindung (V)) und Cocainmethiodid.

[0057] In einigen Ausführungsformen ist der nicotinerge Agonist eine Verbindung der Formel I:

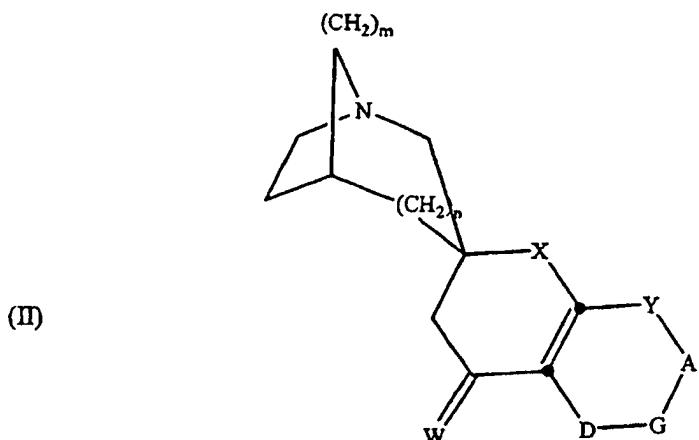


I

in welcher R Wasserstoff oder eine Methylgruppe darstellt und
n 0 oder 1 ist;

oder ein pharmazeutisch verträgliches Salz derselben. In besonders bevorzugten Ausführungsformen ist der nicotinerge cholinerge Agonist (–)-Spiro[1-azabicyclo[2.2.2]octan-3,5'-oxazolidin-2'-on] (Verbindung (VII)). Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der Formel I sind im US-Patent 5,902,814 beschrieben.

[0058] In anderen Ausführungsformen ist der nicotinerge cholinerge Agonist eine Verbindung der Formel II:



in welcher m 1 oder 2 ist,

n 0 oder 1 ist,

Y CH, N oder NO darstellt,

X Sauerstoff oder Schwefel ist,

W Sauerstoff, H₂ oder F₂ ist,

A für N oder C(R²) steht,

G für N oder C(R³) steht und

D für N oder C(R⁴) steht,

mit dem Vorbehalt, dass nicht mehr als ein Vertreter aus der Gruppe A, G und D ein Stickstoff ist, aber mindestens ein Vertreter aus der Gruppe Y, A, G und D Stickstoff oder NO ist,

R¹ Wasserstoff oder ein C₁-C₄-Alkyl ist;

R², R³ und R⁴ unabhängig voneinander Wasserstoff, Halogen, ein C₁-C₄-Alkyl, ein C₂-C₄-Alkenyl, ein C₂-C₄-Alkinyl, ein Aryl, ein Heteroaryl, OH, OC₁-C₄-Alkyl, CO₂R₁, -CN, NO₂, -NR₅R₆, -CF₃ oder -OSO₂CF₃, oder R² sind und R³ bzw. R⁴ zusammen einen anderen sechsgliedrigen aromatischen oder heteroaromatischen Ring bilden können, der A und G bzw. G und D umfasst, Null bis zwei Stickstoffatome enthält und mit einem oder zwei der folgenden Substituenten substituiert ist: unabhängig voneinander Wasserstoff, Halogen ein C₁-C₄-Alkyl, C₂-C₄-Alkenyl, C₂-C₄-Alkinyl, Aryl, Heteroaryl, OH, OC₁-C₄-Alkyl, CO₂R¹, -CN, -NO₂, -NR⁵R⁶, -CF₃ oder -OSO₂CF₃;

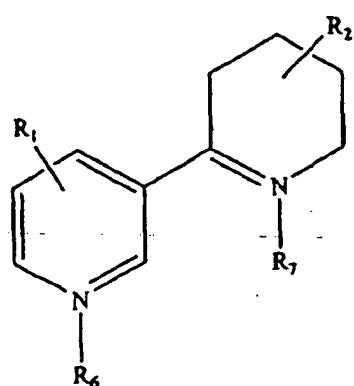
R⁵ und R⁶ unabhängig voneinander Wasserstoff, ein C₁-C₄-Alkyl, C(O)R⁷, C(O)NHR⁵, C(O)R⁹, SO₂R¹⁰ sind oder zusammen (CH₂)_jQ(CH₂)_k sein können, worin Q für O, S, NR¹¹ steht oder eine Bindung ist,

j ist 2 bis 7,

k ist 0 bis 2,

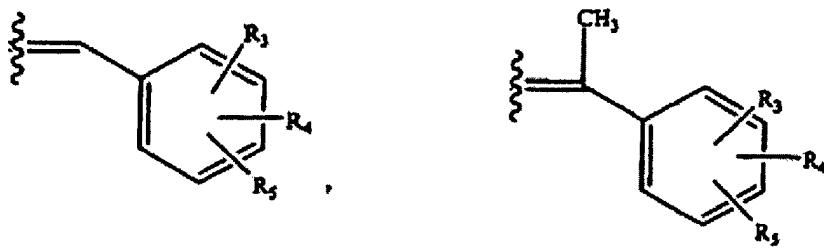
R⁷, R⁸, R⁹, R¹⁰ und R¹¹ sind unabhängig voneinander C₁-C₄-Alkyl, Aryl oder Heteroaryl oder ein Enantiomer davon; ein pharmazeutisch verträgliches Salz derselben. In bevorzugten Ausführungsformen ist ein cholinerge Agonist eine Verbindung der Formel II, in welcher m 1 ist; n 0 ist; p 0 ist; x Sauerstoff ist, A für C(R²) steht; G für C(R³) steht und D für C(R⁴) steht. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist der nicotinerge cholinerge Agonist (R)-(-)-5'-Phenylspiro[1-azabicyclo[2.2.2]octan-3,2'-(3'H)-furo[2,3-b]pyridin]. Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der Formel II sind im US-Patent 6,110,914 beschrieben.

[0059] In zusätzlichen Ausführungsformen ist der nicotinerge cholinerge Agonist eine Verbindung der Formel III:

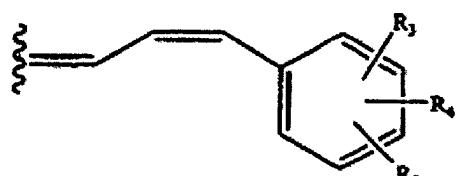


III

in welcher R₁, R₆ und R₇ Wasserstoff oder ein C₁-C₄-Alkyl sind und R₂ ausgewählt ist aus der Gruppe



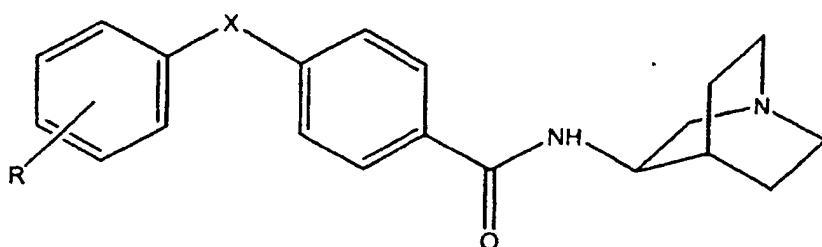
und



in welcher R₁, R₄ und R₅ ausgewählt sind aus Wasserstoff, C₁-C₄-Alkyl, das wahlweise mit N,N-Dialkylamin mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen in jedem Alkyl substituiert ist, C₁-C₆-Alkoxy, das wahlweise mit N,N-Dialkylamin mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen in jedem Alkyl substituiert ist, Carboalkoxy mit 1 bis 4 Kohlenstoffen im Alkoxy; Amino; Amido mit 1 bis 4 Kohlenstoffen im Acyl; Cyano und N,N-Dialkylamino mit 1 bis 4 Kohlenstoffen in jedem Alkyl, Halogen, Hydroxyl oder Nitro.

[0060] In einer bevorzugten Ausführungsform ist ein Agonist eine Verbindung der Formel III, in welcher R₂ an die Position 3 des Tetrahydropyridinrings angeheftet ist und in welcher ferner R₃, das an die Position 4 oder 2 des Phenylrings angeheftet ist, ausgewählt ist aus der Gruppe Amino, Hydroxyl, Chlor, Cyano, Dimethylamino, Methyl, Methoxy, Acetylarnino, Acetoxy und Nitro. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist der Agonist eine Verbindung der Formel III, in welcher R₃ Hydroxyl ist und in welcher R₁, R₄ und R₅ Wasserstoff sind. In einer anderen besonders bevorzugten Ausführungsform ist der Agonist eine Verbindung der Formel III, in welcher R₃ Acetoxy ist und in welcher R₁, R₄ und R₅ Wasserstoff sind. In einer anderen besonders bevorzugten Ausführungsform ist der Agonist eine Verbindung der Formel III, in welcher R₃ Methoxy ist und in welcher R₁, R₄ und R₅ Wasserstoff sind. In einer anderen besonders bevorzugten Ausführungsform ist der Agonist eine Verbindung der Formel III, in welcher R₃ Methoxy ist und in welcher R₁ und R₄ Wasserstoff sind und in welcher ferner R₃ an die Position 2 des Phenylrings angeheftet ist und R₅, das an die Position 4 des Phenylrings angeheftet ist, Methoxy oder Hydroxy ist. In besonders bevorzugten Ausführungsformen ist der nicotinerge cholinerge Agonist ausgewählt aus 3-2,4-Dimethoxybenzylidinanabasein (DMXB-A; Verbindung (V)), 3-(4-Hydroxybenzyliden)anabasein, 3-(4-Methoxybenzyliden)anabasein, 3-(4-Aminobenzyliden)anabasein, 3-(4-Hydroxy-2-methoxybenzyliden)anabasein (Verbindung (VI)), 3-(4-Methoxy-2-hydroxybenzyliden)anabasein, Trans-3-cinnamylidenanabasein, Trans-3-(2-methoxycinnamyliden)anabasein und Trans-3-(4-methoxycinnamyliden)anabasein. Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der Formel III sind im US-Patent 5,977,144 beschrieben.

[0061] In weiteren Ausführungsformen ist der Agonist eine Verbindung der Formel IV:

**IV**

in welcher X für O oder S steht

und R ausgewählt ist aus H, OR₁, NHC(O)R₁ und einem Halogen, wobei R₁ ein C₁-C₆-Alkyl ist. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist der nicotinerge cholinerge Agonist ausgewählt aus der Gruppe N-[(3R)-1-Azabicyclo[2.2.2]oct-3-yl]-4-(hydroxyphenoxy)benzamid, N-[(3R)-1-Azabicyclo[2.2.2]oct-3-yl]-4-(4-acetamidophenoxy)benzamid, N-[(3R)-1-Azabicyclo[2.2.2]oct-3-yl]-4-(phenylsulfonyl)benzamid, und N-[(3R)-1-Azabicyclo[2.2.2]oct-3-yl]-4-(3-chlorophenylsulfonyl)benzamid. Verfahren zur

Herstellung von Verbindungen der Formel IV sind in der PCT-Patentanmeldungsveröffentlichung WO 01/85727 beschrieben.

[0062] In noch anderen Ausführungsformen ist der Agonist (1-Aza-bicyclo[2.2.2]oct-3-yl-carbaminsäure-1-(2-fluorophenyl)ethylester. Verfahren zur Herstellung dieser Verbindung sind in der US-Patentanmeldungsveröffentlichung 2002/0040035 beschrieben worden.

[0063] In noch anderen Ausführungsformen ist der $\alpha 7$ -Agonist ein Antikörper, der ein selektiver Agonist (am meisten bevorzugt ein spezifischer Agonist) des nicotinergen $\alpha 7$ -Rezeptors ist. Die Antikörper können polyklonal oder monoklonal sein; sie können aus jeder der zahlreichen humanen, nicht-humanen eukaryotischen, Zell-, Pilz- oder Bakterienquellen stammen; sie können von genomischen oder von Vektoren stammenden Codierungsequenzen codiert werden und sie können gegen natives oder rekombinantes $\alpha 7$ oder Fragmente desselben mit oder ohne Einsatz eines Adjuvans ausgelöst werden, alles nach den verschiedenen Verfahren und Prozeduren, die im Stand der Technik zur Erzeugung und Produktion von Antikörpern bekannt sind. Andere Beispiele für solche nützlichen Antikörper sind chimäre, einzelkettige und verschiedene humane oder humanisierte Typen von Antikörpern sowie verschiedene Fragmente derselben, wie z. B. Fab-Fragmente und aus spezialisierten Expressionssystemen hergestellte Fragmente.

[0064] Ein Beispiel für Verfahren zur Erzeugung von Antikörpern für den nicotinergen $\alpha 7$ -Rezeptor ist die Immunisierung eines geeigneten Labortieres mit dem $\alpha 7$ -Rezeptor oder einem Fragment desselben und die Isolierung der durch die Immunisierung hervorgerufenen Antikörper, welche sich an $\alpha 7$ binden. Die Immunisierungs- und Isolierungsverfahren sind dem Fachmann gut bekannt. Die Antikörper, welche Agonisten sind, lassen sich nach den hier beschriebenen Verfahren identifizieren, indem z. B. die isolierten Antikörper mit einem Makrophagen zusammengebracht werden, welcher zur Freisetzung entzündungsfördernder Cytokine stimuliert worden ist, oder mit jedem anderen geeigneten Verfahren zur Beurteilung der Aktivität eines $\alpha 7$ -Rezeptors. Die Selektivität für $\alpha 7$ kann, wie zuvor beschrieben, durch das Screening der Aktivität gegen mindestens einen anderen nicotinergen oder cholinergen Rezeptor beurteilt werden. Antikörper, von denen gefunden wurde, dass sie selektive Agonisten gegen den $\alpha 7$ -Rezeptor sind, können ferner nach ihrer Wirksamkeit bei der Behandlung von einer oder mehreren der hier beschriebenen Entzündungserkrankungen bewertet werden, z. B. mit zusätzlichen in vitro-Tests oder in vivo-Tests in Tiermodellen. Die vorliegende Erfindung umfasst auch nach diesem Verfahren identifizierte $\alpha 7$ -selektive Antikörper-Agonisten.

[0065] Die vorliegende Erfindung ist auch für das Studium von Zellen in Kultur von Nutzen, beispielsweise für das Studium der Wirkung der Freisetzung von entzündungsfördernden Cytokinen auf die Biologie von Makrophagen oder zum Testen von Verbindungen auf cholinerge Agonisten-Aktivität. In vivo-Anwendungen stellen jedoch viele der bevorzugten Ausführungsformen. In diesen Ausführungsformen befindet sich die Zelle in einem Patienten, der unter einem Zustand leidet oder Gefahr läuft daran zu leiden, welcher von einer inflammatorischen Cytokin-Kaskade ausgelöst wird. Der hier verwendete Ausdruck Patient kann jedes Säugetier sein. In den bevorzugten Ausführungsformen ist der Patient jedoch ein Mensch.

[0066] Die Zusammensetzungen können bei der Behandlung von jedem von einer inflammatorischen Cytokin-Kaskade ausgelösten Zustand verwendet werden. In bevorzugten Ausführungsformen wird bei dem Zustand die inflammatorische Cytokin-Kaskade durch die Freisetzung von entzündungsfördernden Cytokinen aus einem Makrophagen beeinflusst. Bei dem Zustand kann die inflammatorische Cytokin-Kaskade eine systemische Reaktion hervorrufen, wie z. B. einen septischen Schock. Alternativ kann der Zustand von einer lokalisierten inflammatorischen Cytokin-Kaskade ausgelöst werden, wie z. B. bei rheumatoider Arthritis.

[0067] Zustände, die sich mit Hilfe der vorliegenden Erfindung zweckmäßig behandeln lassen sind Appendizitis, peptisches Ulkus, Magenulkus, Duodenalulkus, Peritonitis, Pankreatitis oder akute ischämische Kolitis, Divertikulitis, Epiglottitis, Achalasie, Cholangitis, Cholezystitis, Hepatitis, Morbus Crohn, Enteritis, Morbus Whipple, Asthma, Allergie, anaphylaktischer Schock, Immunkomplexkrankheit, Organnekrose, Heuschnupfen, Sepsis, Septikämie, endotoxischer Schock, Kachexie, Hyperpyrexie, eosinophiles Granulom, Granulomatose, Sarkoidose, septischer Abortus, Epididymitis, Vaginitis, Prostatitis, Urethritis, Bronchitis, Emphysem, Rhinitis, zystische Fibrose, Pneumonitis, pneumoultramikroskopische Silicovolcanokoniose, Alveolitis, Bronchiolitis, Pharyngitis, Peuritis, Sinusitis, Influenza, RS-Virusinfektion, Herpesinfektion, HIV-Infektion, Hepatitis B-Infektion, Hepatitis C-Virusinfektion, disseminierte Bakteriämie, Dengue-Fieber, Candidose, Malaria, Filariose, Amöbiasis, Echinokokkuszysten, Verbrennungen, Vaskulitis, Angiitis, Endokarditis, Arteritis, Atherosklerose, Thrombophlebitis, Perikarditis, Myokarditis, Periarteritis nodosa, rheumatisches Fieber, Zöliakie, dekomprimierte Herzinsuffizienz, Schocklunge, chronisch-obstruktive Lungenerkrankung, Meningitis, Enzephalitis, Neuropathie, Neuralgie, Rückenmarksverletzung, Paralyse, Uveitis, Arthritiden, Arthralgie, Osteomyelitis, Fasziitis, Pa-

get-Krebs, Gicht, Periodontitis, rheumatische Arthritis, Synovitis, Myasthenia gravis, Thyroiditis, systemischer Lupus erythematosus, Goodpasture-Syndrom, Behcet-Syndrom, Allotransplantationsabstoßung, Transplantat-Wirt-Reaktion, Bechterev-Krankheit, Berger-Krankheit, Retier-Syndrom oder Hodgkin-Krankheit.

[0068] In einer alternativen Ausführungsform ist der Zustand jeder der oben angeführten Zustände, vorausgesetzt, dass der Zustand keine Colitis ulcerosa, Schlaganfall, Typ II-Diabetes, Morbus Crohn, Alzheimer-Krankheit oder eine Hautentzündung ist.

[0069] In einer Ausführungsform ist der Zustand Appendizitis, peptisches Ulkus, Magenulkus, Duodenalulkus, Peritonitis, Pankreatitis, Hepatitis, Morbus Crohn, Asthma, Allergie, anaphylaktischer Schock, Organischämie, Reperfusionssschaden, Organnekrose, Heuschnupfen, Sepsis, Septikämie, endotoxischer Schock, Kachexie, septischer Abortus, disseminierte Bakteriämie, Verbrennungen, Alzheimer-Krankheit, Zöliakie, dekompensierte Herzinsuffizienz, Schocklunge, Herzinfarkt, zerebrale Embolie, Rückenmarksverletzung, Paralyse, Allotransplantationsabstoßung oder Transplantat-Wirt-Reaktion.

[0070] In einer anderen Ausführungsform ist der Zustand Appendizitis, peptisches Ulkus, Magenulkus, Duodenalulkus, Peritonitis, Pankreatitis, Hepatitis, Asthma, Allergie, anaphylaktischer Schock, Organischämie, Reperfusionssschaden, Organnekrose, Heuschnupfen, Sepsis, Septikämie, endotoxischer Schock, Kachexie, septischer Abortus, disseminierte Bakteriämie, Verbrennungen, dekompensierte Herzinsuffizienz, Schocklunge, Herzinfarkt, zerebrale Embolie, Rückenmarksverletzung, Paralyse, Allotransplantations-abstoßung oder Transplantat-Wirt-Reaktion. In einer Ausführungsform ist der Zustand eine Sepsis.

[0071] In noch einer anderen Ausführungsform ist der Zustand ausgewählt aus der Gruppe Peritonitis, Pankreatitis, Sepsis, endotoxischer Schock, Kachexie, Verbrennungen, Schocklunge, chronisch-obstruktive Lungenerkrankung, Psoriasis, rheumatische Arthritis, systemischer Lupus erythematosus, Herzischämie und Allotransplantationsabstoßung.

[0072] In einer alternativen Ausführungsform ist der Zustand ausgewählt aus der Gruppe Peritonitis, Pankreatitis, Sepsis, endotoxischer Schock, Schocklunge, chronisch-obstruktive Lungenerkrankung, rheumatische Arthritis, systemischer Lupus erythematosus, Herzischämie, Allotransplantationsabstoßung, Asthma, Transplantat-Wirt-Reaktion, dekompensierte Herzinsuffizienz und zystische Fibrose.

[0073] Diese Zustände werden vorzugsweise mit jeder der Verbindungen I–VII oder pharmazeutisch verträglichen Salzen derselben behandelt.

[0074] Der Verabreichungsweg des cholinergen Agonisten hängt von dem zu behandelnden Zustand ab. Beispielsweise kann für die Behandlung einer systemischen Erkrankung, wie z. B. eines septischen Schocks, eine intravenöse Injektion bevorzugt sein und für die Behandlung einer Magen-Darm-Erkrankung, wie z. B. eines Magengeschwürs, kann eine orale Verabreichung bevorzugt sein. Der Verabreichungsweg und die Dosierung des zu verabreichenden cholinergen Agonisten lassen sich von einem Fachmann ohne ungebührliches herumexperimentieren zusammen mit standardisierten Dosis-Wirkungs-Untersuchungen ermitteln. Relevante Umstände, die bei Durchführung dieser Bestimmungen zu beachten sind, sind der zu behandelnde Zustand oder die zu behandelnden Zustände, die Wahl der zu verabreichenden Zusammensetzung, das Alter, Gewicht und die Reaktion des einzelnen Patienten sowie die Heftigkeit der Symptome des Patienten. Somit kann je nach dem Zustand der cholinerge Agonist oral, parenteral, intranasal, vaginal, rektal, lingual, sublingual, bukkal, intrabukkal und transdermal an den Patienten verabreicht werden.

[0075] Demgemäß lassen sich für eine orale, linguale, sublinguale, bukkale und intrabukkale Verabreichung bestimmte Zusammensetzungen aus cholinergen Agonisten ohne ungebührliches Herumexperimentieren mit im Stand der Technik bekannten Mitteln, z. B. mit einem inerten Verdünnungsmittel oder mit einem essbaren Träger, herstellen. Die Zusammensetzungen können in Gelatine-Kapseln eingeschlossen oder zu Tabletten verpresst sein. Für den Zweck einer oralen therapeutischen Verabreichung können die therapeutischen Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung mit Vehikeln aufgenommen werden und in Form von Tabletten, Pastillen, Kapseln, Elixieren, Suspensionen, Sirups, Oblaten und Kaugummis verwendet werden.

[0076] Die Tabletten, Pillen, Kapseln und Pastillen können auch Bindemittel, Adsorptionsmittel, Auflösungsmittel, Schmiermittel, Süßstoffe und Aromastoffe enthalten. Einige Beispiele für Bindemittel sind mikrokristalline Cellulose, Tragant, oder Gelatine. Beispiele für Adsorptionsmittel sind Stärke und Lactose. Einige Beispiele für Auflösungsmittel sind Alginsäure und Kornstärke. Beispiele für Schmiermittel sind Magnesiumstearat und Kaliumstearat. Ein Beispiel für ein Gleitmittel ist kolloidales Siliciumdioxid. Einige Beispiele für Süßstoffe sind

Sucrose und Saccharin. Beispiele für Aromastoffe sind Pfefferminz, Methylsalicylat und Orangenaroma. Die bei der Herstellung dieser verschiedenen Zusammensetzungen eingesetzten Stoffe sollten pharmazeutisch rein und in den eingesetzten Mengen nicht-toxisch sein.

[0077] Zusammensetzungen mit cholinergen Agonisten der vorliegenden Erfindung lassen sich leicht parenteral verabreichen, wie z. B. durch intravenöse, intramuskuläre, intrathekale oder subkutane Injektion. Eine parenterale Verabreichung kann durch Eintragen der Zusammensetzungen mit cholinergen Agonisten der vorliegenden Erfindung in eine Lösung oder Suspension erfolgen. Derartige Lösungen oder Suspensionen können auch sterile Verdünnungsmittel wie Wasser für Injektionszwecke, eine Saline-Lösung, fixierte Öle, Polyethylen-glykole, Glycerin, Propylenglykol oder andere synthetische Lösungsmittel umfassen. Parenterale Formulierungen können auch antibakterielle Stoffe wie z. B. Benzylalkohol oder Methylparabene, Antioxidantien wie z. B. Ascorbinsäure oder Natriumbisulfit und Chelierungsmittel wie EDTA umfassen. Puffer wie z. B. Acetate, Citrate oder Phosphate und Mittel zum Einstellen der Tonizität wie z. B. Natriumchlorid oder Dextrose können ebenfalls zugesetzt werden. Das parenterale Präparat kann in Ampullen, Einwegspritzen oder in aus Glas oder Plastik bestehende Mehrfachdosis-Behälter eingeschlossen sein.

[0078] Eine rektale Verabreichung umfasst die Verabreichung der pharmazeutischen Zusammensetzungen in das Rektum oder den Dickdarm. Dies kann unter Einsatz von Suppositorien oder Klistieren erfolgen. Zäpfchen-Formulierungen lassen sich leicht mit im Stand der Technik bekannten Verfahren herstellen. Beispielsweise können Zäpfchen-Formulierungen durch Erhitzen von Glycerin auf etwa 120°C, Lösen des cholinergen Agonisten in dem Glycerin, Mischen des erhitzen Glycerins, worauf gereinigtes Wasser zugesetzt werden kann und Gießen der heißen Mischung in eine Zäpfchenform hergestellt werden.

[0079] Eine transdermale Verabreichung umfasst die perkutane Absorption des cholinergen Agonisten durch die Haut. Transdermale Formulierungen umfassen Pflaster (wie das bekannte Nicotinpflaster), Salben, Cremes, Gele und Salben. Die vorliegende Erfindung umfasst die nasale Verabreichung einer therapeutisch wirksamen Menge des cholinergen Agonisten an das Säugetier. Die hier benutzten Begriffe nasal verabreichen oder nasale Verabreichung umfasst die Verabreichung des cholinergen Agonisten an die Mucosa-Membranen des Nasengangs oder der Nasenhöhle des Patienten. Pharmazeutische Zusammensetzungen für eine nasale Verabreichung eines cholinergen Agonisten umfassen hier therapeutisch wirksame Mengen des z. B. als Nasenspray, Nasentropfen, Suspension, Gel, Salbe, Creme oder Pulver zu verabreichenden, nach bekannten Verfahren hergestellten Agonisten. Die Verabreichung des cholinergen Agonisten kann auch unter Einsatz eines Nasentampons oder eines Nasenschwammes erfolgen.

[0080] Wie zuvor beschrieben, sind die bevorzugten cholinergen Agonisten für diese Verfahren selektiv oder spezifisch für den α_7 -Rezeptor und umfassen z. B. DMXB-A (Verbindung (V)) und Cocainmethiodid.

[0081] In den folgenden Beispielen werden bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung beschrieben. Andere Ausführungsformen im Geltungsbereich der Ansprüche erschließen sich dem Fachmann bei Berücksichtigung der Beschreibung oder der hier beschriebenen Ausführung der Erfindung. Die Beschreibung soll zusammen mit den Beispielen nur beispielhaft sein.

Beispiel 1. Der nicotinerge α_7 -Rezeptor als molekulares Substrat der Neuroimmun-Synapse

Zusammenfassung des Beispiels

[0082] Hier berichten wir, dass die α_7 -Untereinheit des nicotinergen Rezeptors für die Acetylcholin-Hemmung der TNF-Freisetzung aus Makrophagen benötigt wird. α -Bungarotoxin hat sich an diskrete auf der Oberfläche von primären menschlichen Makrophagen exprimierten Rezeptor-Clustern gebunden. Ein Immunoblotting mit α_7 -spezifischen Antikörpern bestätigte die Identität der α_7 -Untereinheit in den Proteinen, die durch Anhängen an α -Bungarotoxin-konjugierte Kugelchen isoliert wurden. Wurden die Makrophagen α_7 -Antisense-Oligonucleotiden ausgesetzt, nahm die Bindung des α -Bungarotoxins ab und die TNF-Freisetzung in Gegenwart von Nicotin wurde wiederhergestellt. In der α_7 -Untereinheit des nicotinergen Rezeptors defiziente Mäuse produzierten während einer Endotoxämie im Vergleich mit Wildtyp-Mäusen signifikant mehr TNF, IL-1 β und IL-6. Aus α_7 -Knockout-Mäusen isolierte Makrophagen reagierten nicht auf cholinerge Agonisten und produzierten weiterhin TNF. Schließlich hemmte eine elektrische Stimulation des Nervus vagus mittels einer Vorschrift, die in Wildtyp-Mäusen eine TNF-Freisetzung hemmte, die TNF-Freisetzung in α_7 -defizienten Mäusen nicht. Somit ist die α_7 -Untereinheit des nicotinergen Acetylcholin-Rezeptors essentiell für eine cholinerge Hemmung von entzündungsfördernden Cytokinen.

Ergebnisse und Diskussion

[0083] Als erster Schritt bei der Identifizierung des bei der Hemmung einer entzündungsfördernden Cytokin-Freisetzung eine Rolle spielenden Makrophagen-Rezeptors wurden primäre Makrophagen des Menschen mit FITC- α -Bungarotoxin, einem Peptid-Antagonisten, der sich an eine Untereinheit eines cholinergen Rezeptors bindet, markiert (Lindstrom, 1995; Leonard & Bertrand, 2001). Auf der Oberfläche der Makrophagen wurde eine starke Bindung von α -Bungarotoxin beobachtet (**Fig. 1a**). Eine Vorbehandlung mit Nicotin verringerte die Intensität der Bindung merklich (**Fig. 1b**). An den Verbindungsstellen von Nerven und Muskeln und an den neuronalen Synapsen bilden nicotinerge Rezeptoren Aggregate oder Cluster, welche eine schnelle Signalübertragung erleichtern (Lin et al., 2001; Feng et al., 1998; Shoop et al., 2000). Bei stärkerer Vergrößerung lassen sich auf der Oberfläche der Makrophagen diskrete Cluster der α -Bungarotoxin-Bindung klar erkennen, welche insbesondere auf der Oberfläche des Zellkörpers konzentriert sind.

[0084] Bis heute stellen $\alpha 1$, $\alpha 7$ und $\alpha 9$ die α -Bungarotoxin bindenden Untereinheiten des nicotinergen Rezeptors dar, die man in humanen Zellen kennt (Lindstrom, 1995; Leonard und Bertrand, 2001). Die $\alpha 1$ -Untereinheit zusammen mit der $\beta 1$ -, δ - und entweder ϵ -(adult) oder γ -Untereinheit (fötal) bilden heteropentamere nicotinerge Rezeptoren, welche die Muskel-Kontraktion regulieren; $\alpha 7$ und $\alpha 9$ können jeweils homopentamere nicotinerge Rezeptoren bilden (Lindstrom, 1995; Leonard und Bertrand, 2001). Um zu ermitteln, ob diese Rezeptor-Untereinheiten in Makrophagen exprimiert werden, isolierten wir RNA aus primären menschlichen Makrophagen, welche in vitro von peripheren einkernigen Blutzellen (PBMC) abgetrennt worden waren und führten eine RT-PCR-Analyse durch. Um die Empfindlichkeit und Spezifität des Experiments zu steigern, führten wir nach einer reversen Transkription unter Einsatz von für jede Untereinheit spezifischen Nested-Primern zwei PCR-Zyklen durch. Die Identitäten der PCR-Produkte wurden mittels Sequenzierung bestätigt. Die Expression von sowohl $\alpha 1$ - als auch $\alpha 10$ - (Daten nicht wiedergegeben) und $\alpha 7$ -mRNA (**Fig. 2a**) wurde in menschlichen Makrophagen, die von nicht verwandten Blutspendern stammten, nachgewiesen. Mit derselben RT-PCR-Strategie konnte die Expression der mRNA für die $\alpha 9$ -Untereinheit nicht nachgewiesen werden (Daten nicht wiedergegeben).

[0085] Als nächstes wurde die Protein-Expression der $\alpha 1$ - und $\alpha 7$ -Untereinheit mit Hilfe des Western-Blotting untersucht. Der $\alpha 7$ -spezifische Antikörper erkannte eine klare Bande mit einem offensichtlichen Molekulargewicht von etwa 55 kD (ähnlich dem veröffentlichten Molekulargewicht für das $\alpha 7$ -Protein [Peng, et al., 1994]; Drisdel und Green, 2000), sowohl von differenzierten primären Makrophagen als auch von nicht differenzierten PBMCs (Daten nicht angegeben). Die δ -Untereinheit, eine notwendige Komponente des heteropentameren nicotinergen $\alpha 1$ -Acetylcholin-Rezeptors, ließ sich mit dieser nested-RT-PCR-Strategie nicht nachweisen (Daten nicht angegeben). Um zu bestätigen, dass die positiven Signale in den Makrophagen einen nicotinernen $\alpha 7$ -Rezeptor repräsentierten, der α -Bungarotoxin bindet, setzten wir α -Bungarotoxin-konjugierte Kugelchen ein, um die entweder aus menschlichen Makrophagen oder aus PC12-Zellen (Pheochromocytom-Zellen der Ratte, von denen gezeigt wurde, dass sie das $\alpha 7$ -Homopentamer exprimieren [Drisdel und Green, 2000]) gewonnenen Proteine abzufangen. Die zurückgehaltenen Proteine wurden mit Hilfe des Western-Blotting unter Einsatz von polyklonalen oder monokonalen $\alpha 7$ -spezifischen Antikörpern, welche das $\alpha 7$ -Protein von sowohl Mensch als auch Ratte erkannten, analysiert (die $\alpha 7$ -Proteine von Mensch und Ratte enthalten die gleiche Anzahl von Aminosäuren und sind zu 94% identisch [Peng et al., 1994; Seguela et al., 1993]). Die Ergebnisse zeigten klar, dass die menschlichen Makrophagen das α -Bungarotoxin bindende $\alpha 7$ -Protein mit einem offensichtlichen Molekulargewicht ähnlich der $\alpha 7$ -Untereinheit in PC12-Zellen (**Fig. 2b**) exprimieren. Die Identität der $\alpha 7$ -Untereinheit des Makrophagen wurde durch Klonieren des vom Makrophagen exprimierten $\alpha 7$ in voller Länge durch RT-PCR-Verfahren bestätigt. Die in voller Länge vorliegende nicotinerge Acetylcholin- $\alpha 7$ -Untereinheit in Makrophagen enthält die Exons 1 bis 10, was identisch ist mit der in Neuronen exprimierten nicotinernen Acetylcholin- $\alpha 7$ -Untereinheit (Gault et al., 1998). Zusammengenommen identifizieren diese Daten die nicotinerge Acetylcholin- $\alpha 7$ -Untereinheit als den α -Bungarotoxin bindenden Rezeptor, der auf der Oberfläche von menschlichen Makrophagen exprimiert wird.

[0086] Um zu untersuchen, ob der $\alpha 7$ -Rezeptor für die cholinerge Hemmung der TNF-Freisetzung benötigt wird, synthetisierten wir die Phosphorothioat-Antsense-Oligonucleotide, welche das Initiationscodon für die Translation des Gens für die menschliche $\alpha 7$ -Untereinheit umgeben. Als Kontrollen wurden Antisense-Oligonucleotide zu ähnlichen Regionen der Gene für die $\alpha 1$ - und $\alpha 10$ -Untereinheit synthetisiert. Makrophagen, die den für $\alpha 7$ spezifischen Antisense-Oligonucleotiden (AS $\alpha 7$) ausgesetzt wurden, reagierten signifikant weniger auf die TNF-inhibitorische Handlung des Nicotins (**Fig. 3a**). Antisense-Oligonucleotide für die nicotinerge Acetylcholin- $\alpha 7$ -Untereinheit stellten die TNF-Freisetzung des Makrophagen in Gegenwart von Nicotin wieder her. Wenn die Makrophagen AS $\alpha 7$ ausgesetzt wurden, stimuliert dies nicht die TNF-Synthese in Abwesenheit von LPS und Nicotin. Unter ähnlichen Bedingungen veränderten Antisense-Oligonucleotide für die $\alpha 1$ - (AS $\alpha 1$) und

α 10-(AS α 1) Untereinheit die Wirkung von Nicotin auf die LPS-induzierte TNF-Freisetzung nicht signifikant (**Fig. 3b und c**), was darauf hinweist, dass die Suppression von TNF durch Nicotin spezifisch für die nicotinerge Acetylcholinrezeptor- α 7-Untereinheit ist. Zusätzliche Sätze von Antisense-Oligonucleotiden für α 7, α 1 und α 10 ergaben ähnliche Ergebnisse (Daten nicht angegeben). Die Zugabe von Antisense-Oligonucleotiden für die nicotinerge Acetylcholin- α 7-Untereinheit zu Makrophagen-Kulturen verringerte die Oberflächenbindung von FITC-markiertem α -Bungarotoxin (**Fig. 3d und e**). Zusammen genommen zeigen diese Daten, dass die nicotinerge Acetylcholinrezeptor- α 7-Untereinheit des nicotinergen Rezeptors für eine vom cholinergen entzündungshemmenden Weg abhängige Hemmung der TNF-Freisetzung in Makrophagen notwendig ist.

[0087] Makrophagen stellen die Hauptquelle für in Reaktion auf bakterielles Endotoxin in vivo produziertes TNF dar (Bianchi et al., 1996). Um zu untersuchen, ob die α -7-Untereinheit des nicotinergen Rezeptors essentiell für den "Cholinergic Anti-inflammatory Pathway" in vivo ist, maßen wir die Produktion in Mäusen mit defizientem α -7-Gen, das mittels genetischer Knockout-Technologie erzeugt wurde (Orr-Utreger et al., 1997). Mäuse, denen die α -7-Rezeptor-Untereinheit fehlt, nehmen eine normale Entwicklung und zeigen keine schweren anatomischen Schäden. (Id.; Franceschini et al., 2001). Die TNF-Konzentration im Serum in Mäusen mit defizienter α -7-Untereinheit, welche Endotoxin ausgesetzt wurden, lag um mehr als das 5-fache über der von Wildtyp-Kontrollmäusen (Wildtyp-Serum-TNF = 2,3 ! 0,3 ng ml⁻¹ gegenüber α -7-Knockout-Mäuse-Serum-TNF = 12,2 ! 4,7 ng ml⁻¹, $p < 0,05$ (zweiseitiger t-Test) (**Fig. 4a**)). Die TNF-Produktion in Leber und Milz war in Knockout-Mäusen ebenfalls höher (**Fig. 4b und c**), was auf eine kritische Funktion der nicotinergen Acetylcholinrezeptor- α -7-Untereinheit bei der Regulation von inflammatorischen Reaktionen in vivo hindeutet. Endotoxämische Mäuse mit defizienter α -7-Untereinheit produzierten im Vergleich mit Wildtyp-Mäusen ebenfalls signifikant höhere Konzentrationen an IL-1 β (**Fig. 4d**) und IL-5 (**Fig. 4e**). Von Knockoutmäusen mit α -7-Untereinheit stammende Makrophagen waren widerstandsfähig gegen cholinerge Agonisten und produzierten TNF auf normale Weise in Gegenwart von Nicotin oder Acetylcholin (Tabelle 1). Somit ist die Expression der α -7-Untereinheit des nicotinergen Acetylcholin-Rezeptors in Makrophagen essentiell für die cholinerge Modulation von TNF.

Tabelle 1. TNF-Produktion von Wildtyp-Makrophagen und α 7-defizienten peritonealen Makrophagen.

Behandlung	TNF-ng ml ⁻¹	
	Wildtyp	α 7-Knockout
Kontrolle	0,004 ! 0,0005	0,004 ! 0,0004
LPS	16,8 ! 2,3	18,1 ! 4,9
LPS + Nicotin (1 μ M)	5,2 ! 0,9*	17,8 ! 0,6
LPS + Nicotin (10 μ M)	7,3 ! 1,0*	17,4 ! 2,9
LPS + Ach (1 μ M)	10,3 ! 1,1	20,4 ! 3,8
LPS + Ach (10 μ M)	5,7 ! 0,9*	21,4 ! 2,4

[0088] Aus Thioglykolat entnommenen Wildtyp-Mäusen oder Knockout-Mäusen mit der α 7-Untereinheit des nicotinergen Acetylcholin-Rezeptors isolierte peritoneale Makrophagen wurden mit LPS (100 ng/ml) 4 Stunden lang in Kultur stimuliert. Kontrolle: nicht stimulierte Makrophagen-Kulturen. Wo angegeben, wurden 5 bis 10 Minuten vor LPS Nicotin oder Acetylcholin (Ach) zugegeben. Die TNF-Konzentrationen wurden mit einem ELISA gemessen; Die Daten sind Mittelwerte ! Standardfehler. $n = 8$ pro Gruppe. * = signifikant verschieden von LPS bei $p < 0,05$ durch zweiseitigen t-Test.

[0089] Um zu ermitteln ob die α 7-Untereinheit des nicotinergen Acetylcholin-Rezeptors für die Vagus-Hemmung von systemischem TNF benötigt wird, legten wir an die Vagus-Nerven von endotoxämischen Wildtyp-Mäusen oder Mäusen mit defizienter β 7-Untereinheit eine elektrische Stimulation an (Borovikova et al., 2000). Die elektrische Stimulation des Vagus-Nervs senkte die Endotoxin-induzierten Serum-TNF-Konzentrationen in Wildtyp-Mäusen signifikant (**Fig. 5**). Bei Anwendung dieser Vorschrift reduzierte die Stimulation des Vagus-Nervs bei Mäusen mit defizienter α 7-Untereinheit des nicotinergen Acetylcholin-Rezeptors die Serum-TNF-Konzentrationen während einer Endotoxämie jedoch nicht (**Fig. 5**). Somit benötigt eine funktionelle Reaktion auf eine Stimulation des Vagus-Nervs in vivo die α 7-Untereinheiten des Acetylcholin-Rezeptors, um die Freisetzung von TNF zu hemmen.

[0090] Diese Beobachtungen haben einige Implikationen für das Verständnis der Regulation einer Entzündung und der TNF-Freisetzung sowie auf das Design künftiger Therapeutika. Frühere Daten zeigen, dass die

α 7-Untereinheit des nicotinergen Acetylcholin-Rezeptors homopentamere Rezeptoren bildet, die an der schnellen chemischen Signalübertragung zwischen den Zellen beteiligt sind (Lindstrom, 1995; leonard & Bertrand, 1001; Le Novere & Changeux, 1995). Die neuronalen nicotinergen Acetylcholin- α 7-Rezeptoren sind für Calcium hoch durchlässig (Vijayaraghavan et al., 1992; Shoop et al., 2001) und wir haben beobachtet, dass Nicotin ein vorübergehendes Einströmen von Calcium in die Makrophagen induziert (Daten nicht wiedergegeben). Die Rolle(n) dieses erhöhten Einströmens und die intrazellulären Mechanismen zum Hemmen der TNF-Freisetzung machen eine weitere Untersuchung erforderlich. Eine Unterbrechung der Expression der α 7-Untereinheit des nicotinergen Acetylcholin-Rezeptors in vivo steigerte die Endotoxin-induzierte Freisetzung von TNF signifikant und machte die Nervus vagus-Stimulation als Verfahren zur Hemmung der TNF-Freisetzung unwirksam. Dies deutet darauf hin, dass das Produkt des Gens für die α 7-Untereinheit des nicotinergen Acetylcholin-Rezeptors essentiell für die Nervus vagus-Regulation einer akuten TNF-Freisetzung während der systemischen inflammatorischen Reaktion auf eine Endotoxämie ist. Es scheint, dass eine Freisetzung von Acetylcholin aus den Enden des Nervus vagus oder vielleicht aus anderen Quellen (z. B. Lymphozyten oder Epithelzellen) die Aktivierung der Makrophagen spezifisch hemmen kann. Das Potential ist vorhanden, cholinerge Agonisten zu entwickeln, welche auf peripheren Immunzellen die α 7-Untereinheiten von nicotinergen Acetylcholin-Rezeptoren ansteuern, um als entzündungshemmende Mittel zur Hemmung der TNF-Freisetzung Verwendung zu finden. Es kann auch möglich sein, Stimulatoren des Nervus vagus mit entzündungshemmender Aktivität zu entwickeln; ähnliche Vorrichtungen sind klinisch sicher und werden bei der Behandlung von einigen Patienten mit einer einen Krampfanfall auslösenden Erkrankung eingesetzt. TNF ist ein klinisch zugelassenes Zielmedikament für rheumatoide Arthritis und Morbus Crohn und so scheint es vernünftig, eine Strategie zur Hemmung von TNF in Betracht zu ziehen, die auf die α 7-Untereinheit des nicotinergen Acetylcholin-Rezeptors gerichtet ist.

Methoden

[0091] α -Bungarotoxin-Färbung und Konfokalmikroskopie. Die Isolierung und Kultur von menschlichen Makrophagen wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt (Borovikova et al., 2000). Die Zellen wurden 7 Tage lang in Gegenwart von MCSF (2 ng/ml) in komplettem Kulturmedium (RPMI 1640 mit 10% hitzeinaktiviertem Huhmansen serum) differenziert. Die differenzierten Makrophagen wurden mit FITC-markiertem α -Bungarotoxin bei 1,5 μ g ml⁻¹ (SIGMA) im Zellkulturmedium bei 4°C 15 Minuten lang inkubiert. Wo angegeben wurden zu einer Endkonzentration von 500 μ M vor der Zugabe des α -Bungarotoxins Nicotin zugesetzt. Die Zellen wurden drei Mal mit RPMI-Medium (GIBCO) gewaschen und dann 15 Minuten lang bei Raumtemperatur in 4% Paraformaldehyd-PBS-Lösung (pH 7,2) fixiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen mit PBS ein Mal gewaschen und zur Beobachtung mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop auf einen Objekträger gegeben.

[0092] RT-PCR. Aus in vitro differenzierten menschlichen Makrophagen wurde unter Verwendung des TRI-ZOL-Reagenzes die Gesamt-RNA gewonnen. Die reverse Transkription und der erste Zyklus der PCR erfolgten unter Verwendung des Titan One Tube RT-PCR-Kits (Roche Molecular Biochemicals) nach der Vorschrift des Herstellers. Der zweite Zyklus der nested PCR wurde unter Verwendung des Promega 2 × PCR-Master-Mix durchgeführt. Die PCR-Produkte aus der nested PCR wurden auf einem Agarose-Gel einer Elektrophorese unterzogen und unter Verwendung des Gene Clean III Kits (Biolab) gewonnen und zum Sequenzieren gegeben, um die Ergebnisse zu bestätigen. Die Primer-Sätze für die reverse Transkription und den ersten PCR-Zyklus waren: α 1: Sense-Primer 5'-CCAGACCTGAGCAACTTCATGG-3', Antisende-Primer 5'-AAT-GAGTCGACCTGCAAACACG-3'; α : Sense-Primer 5'-GACTGTTCGTTCCAGATGG-3', Antisense-Primer 5'-ACGAAGTTGGAGCCGACATCA-3'; α 9: Sense-Primer 5'-CGAGATCAGTACGATGGCCTAG-3', Antisense-Primer 5'-TCTGTGACTAATCCGCTTGC-3'. Die Primer-Sätze für die nested PCR waren: α : Sense-Primer 5'-ATCACCTACCCTCGTCATGC-3', Antisense-Primer 5'-GTATGTGGCCATCACCATTGC-3'; α 7: Sense-Primer 5'-CCCGGCAAGAGGGAGTGAAAGGT-3'; Antisense-Primer 5'-TGCAGATGATGGTGAA-GACC-3'; α : Sense-Primer 5'-AGAGCCTGTGAACACCAATGTGG-3', Antisense-Primer 5'-ATGACTTCGC-CACCTTCTTCC-3'. Zum Klonieren der α 7-cDNA in voller Länge wurden die folgenden Primer verwendet: 5' AGGTGCCTCTGTGGCCGCA 3' mit 5' GACTACTCAG-TGGCCCTG 3'; 5 CGACACGGAGACGTGGAG 3' mit 5' GGTACGGATG-TGCCAAGGAGT 3'; 5' CAAGGATCCGGACTAACATGCGCTGCTCG 3' mit 5' CGGCTCGAGTCACCAGTGTGGTTACGCAAAGTC3'.

[0093] Western Blotting und Pull-Down-Assay für α -Bungarotoxin. Mittels Inkubation von PC 12 oder primären menschlichen Makrophagen mit Lyse-Puffer (150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris pH 7,4, 0,02% Sodiumazid, 1% Triton X-100 und Protease-Inhibitor-Cocktail) auf Eis über einen Zeitraum von 90 Minuten wurden Zelllysate hergestellt. Zum Western-Blotting mit entweder einem α 7-spezifischen Antikörper (Santa Cruz sc-1447) oder einem monokonalen α 1-Antikörper (Oncogene) wurden gleiche Mengen Gesamtprotein auf SDS PAGE-Gele aufgetragen. Für den α -Bungarotoxin-Pull-Down-Assay wurde α -Bungarotoxin an CNBr-ak-

tivierte Sepharose-Kügelchen (Pharmacia) konjugiert und dann mit den Zelllysaten bei 4°C über Nacht inkubiert. Die Kügelchen und die gebundenen Proteine wurden vier Mal mit Lyse-Puffer gewaschen und dann durch Western-Blotting mit α 7-spezifischen Antikörpern (polyklonal: Santa Cruz H-302, monoklonal: Sigma M-220) analysiert.

[0094] Experimente mit Antisense-Oligonucleotiden. Es wurden Phosphorothioat-Antisense-Oligonucleotide synthetisiert und mittels Genosys gereinigt. Die Sequenzen der Oligonucleotide sind: ASa7: 5'-gcagccatgtt-gaggcccg-3'; ASa1: 5'-gggctccatggctaccgga-3'; ASa10: 5'-ccccatggccctggactgc-3'. Diese Sequenzen decken die divergierenden Translations-Initiations-Regionen der α 7-, α 1- und α 10-Gene ab. Die Abgabe der Antisense-Oligonucleotide erfolgte wie bei Cohen et al. (1977) mit Oligonucleotid-Konzentrationen von 1 μ M über einen Zeitraum von 24 Stunden. Für die Zellkultur-Experimente wurden die mit Oligonucleotiden vorbehandelten Makrophagen-Kulturen mit frischem Medium gewaschen und mit 100 ng/ml LPS mit oder ohne Nicotin (1 μ M, 5–10 Minuten vor LPS zugesetzt) stimuliert. Vier Stunden nach LPS wurden die Mengen des freigesetzten TNF mit einem L929-Assay gemessen und dann durch einen TNF-ELISA bestätigt. Für das Anfärben des α -Bungarotoxins wurden vorbehandelte Zellen gewaschen und wie oben beschrieben für die FITC- α -Bungarotoxin-Färbung weiter behandelt. Agonisten des Nicotins und anderer α 7-Untereinheiten des nicotinerge Acetylcholin-Rezeptors hemmen die LPS-induzierte TNF-Freisetzung in der murinen Makrophagen-ähnlichen Zelllinie RAW264.7 ebenfalls signifikant.

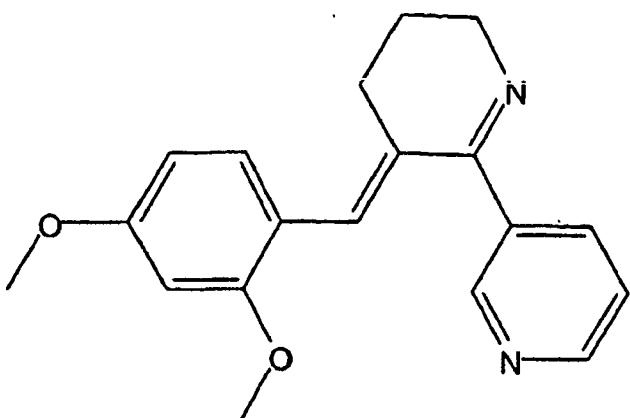
[0095] Mäuse mit defizientem nicotinergem α 7-Rezeptor. Mäuse mit defizientem nicotinergem α 7-Rezeptor (Mausstamm C57BL/6) und deren Wildtyp-Würfe wurden von The Jackson Laboratory (B6.1297.Chrna^{7tm1Bay}, #003232) gekauft. Es wurden Züchtungen von homozygoten Knockout-Mäusen oder Wildtyp-Mäusen durchgeführt, um Nachkommen zu erhalten. Für die Endotoxin-Experimente wurden etwa 8 bis 12 Wochen alte männliche oder weibliche Mäuse (zusammen mit in Alter und Geschlecht zueinander passenden Wildtyp-Kontrollen) verwendet. Die Mäuse wurden einzeln gewogen und ihnen entsprechend 0,1 mg/kg LPS gegeben (i. p.). Für die TNF-Experimente wurden eine Stunde nach der LPS-Gabe Blut, Leber und Milz entnommen. Für die IL-1 β - und die IL-6-Experimente wurden eine Stunde nach der LPS-Gabe Blutproben gesammelt. Die Mengen an TNF, IL-1 β - und IL-6 wurden mit Hilfe eines ELISA gemessen. Die Genotypen der Mäuse wurden durch genomische PCR-Strategien bestätigt. Die Makrophagen des Peritoneums wurden aus mit Thiolglykolat stimulierten (48 Stunden) männlichen und weiblichen etwa 8 Wochen alten α 7-Knockout- und Wildtypmäusen ($n = 8$ pro Gruppe) isoliert. Die Makrophagen wurden für jede Gruppe gepoolt und über Nacht kultiviert. 5–10 Minuten vor LPS (100 ng/ml) wurden Nicotin und Acetylcholin zugegeben. Mit Acetylcholin wurde Pyridostigminbromid (100 μ l) zugegeben. Vier Stunden nach der LPS-Induktion wurden die TNF-Konzentrationen mit einem ELISA gemessen.

[0096] Stimulation des Nervus vagus. Mäuse mit defizientem nicotinergem α 7-Rezeptor (C57BL/6-Stamm, männlich und weiblich) und in Alter und Geschlecht zusammenpassende C57BL/6-Wildtyp-Mäuse wurden mit Ketamin (100 mg/kg, intramuskulär) und Xylazin (10 mg/kg, intramuskulär) narkotisiert. Die Mäuse wurden entweder einer Scheinoperation oder einer Stimulation des Nervus vagus (linker Vagus, 1 Volt, 3 ms, 1 Hz) mit einem elektrischen Stimulationsmodul (STM 100A, Harvard Apparatus) unterzogen. Die Stimulation erfolgte während 20 Minuten (10 Minuten vor und 10 Minuten nach der LPS-Verabreichung). LPS wurde mit einer tödlichen Dosis gegeben (75 mg/kg, intraperitoneal). Zwei Stunden nach der LPS-Verabreichung wurde das Blut gesammelt. Die TNF-Konzentrationen wurden mit einem ELISA gemessen.

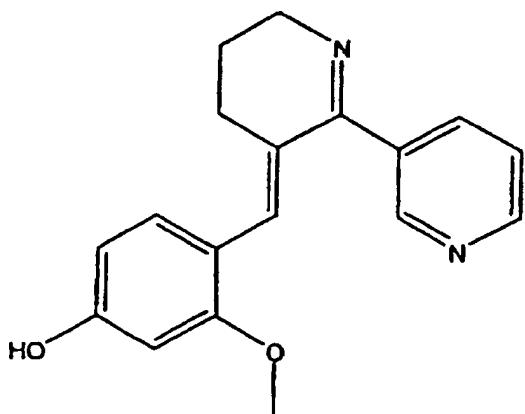
[0097] Statistische Analyse. Es wurde eine statistische Analyse durchgeführt, wobei, wo angegeben, der zweiseitige t-Test verwendet wurde; $P < 0,05$ wird als signifikant angesehen. Die Experimente wurden zweifach oder dreifach durchgeführt; für die in vivo- und ex vivo-Experimente bezieht sich "n" auf die Anzahl der Tiere bei jedem Zustand.

Beispiel 2: Die Verbindungen (V) und (VI) gewähren im murinen Caecal-Ligation- und Puncture-Model der Sepsis Schutz

[0098] Es wurde gezeigt, dass die Verbindungen der Formeln (V) und (VI) besonders wirksam bei einer Behandlung im murinen Caecal-Ligation- und Puncture-Modell sind.



3-(2,4-Dimethoxybenzyliden)anabasein (V)



3-(4-Hydroxy-2-methoxy-benzyliden)anabasein (VI)

[0099] Die Caecal Ligation und Puncture (CLP) wurde wie bei Fink und Heard, J. of Surg. Res. 49: 186-196 (1990), Wichman et al., Crit. Care Med. 26: 2078-2086 (1998) und Remick et al., Shock 4: 89-95 (1995) beschrieben durchgeführt. Kurz gesagt wurden BALB/c-Mäuse mit 75 mg/kg Ketamin (Fort Dodge, Fort Dodge, Iowa) und 20 mg/kg Xylazin (Böhringer Ingelheim, St. Joseph, MO) intramuskulär narkotisiert. Es wurde ein Medianschnitt durchgeführt und der Blinddarm herausgenommen. In einer Höhe 5,0 mm von der Blinddarmspitze entfernt von der Ileozökalklappe wurde eine 6-0 Prolene-Naht-Ligatur angebracht.

[0100] Der ligierte Blinddarmstumpf wurde sodann einmal mit einer 22-Gauge-Nadel punktiert, ohne direkten Ausstoß von Kot. Der Blinddarm wurde dann wieder in seine normale Position im Unterleib gebracht. Der Abdomen wurde dann mit einer fortlaufenden 6-0-Prolene-Naht in zwei Schichten, Peritoneum und Fascia, geschlossen, um das Ausfließen von Flüssigkeit zu verhindern. Alle Tiere wurden mit einer normalen subkutan mit 20 ml/kg Körpergewicht verabreichten Saline-Lösung wieder zu Bewusstsein gebracht. Jede Maus erhielt 30 Minuten nach dem chirurgischen Eingriff eine subkutane Imipenem-Injektion (0,5 mg/Maus) (Primaxin, Merck & Co., Inc., West Point, PA). Die Tiere ließ man sich dann erholen.

[0101] Die Mäuse wurden entweder mit 4 mg/kg 3-(2,4-Dimethoxybenzyliden)anabasein (Verbindung (V)) oder mit 4 mg/kg 3-(4-Hydroxy-2-methoxybenzyliden)anabasein (Verbindung (VI)) oder mit der Vehikelkontrolle behandelt. Die Verbindungen und die Vehikelkontrolle wurden zweimal täglich an den Tagen 1 und 2 (24 bzw. 48 Stunden nach dem chirurgischen Eingriff) und einmal am Tag 3 intraperitoneal (i. p.) verabreicht. Die Sterblichkeit wurde täglich über einen Zeitraum von 14 Tagen nach dem chirurgischen Eingriff überwacht. Die Ergebnisse sind in [Fig. 6](#) wiedergegeben, in welcher der Prozentsatz der überlebenden Tiere nach der Behandlung mit entweder Verbindung (V) oder Verbindung (VI) oder der Vehikelkontrolle gezeigt wird. Am Tag 14 überlebten 91% ($p < 0,01$) der mit Verbindung (V) behandelten Mäuse und 82% ($p < 0,02$) der mit Verbindung (VI) behandelten Mäuse, während nur 30% der mit der Vehikelkontrolle behandelten Mäuse überlebt hatten. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Verbindungen (V) und (VI) das Überleben im CLP-Modell der Sepsis signifikant verbesserten.

Beispiel 3: Verbindung (V) und Nicotin hemmen die LPS-induzierte TNF- α -Freisetzung aus murinen Makrophagen-ähnlichen RAW264.7 Zellen

[0102] Murine Makrophagen-ähnliche RAW264.7 Zellen (American Type Tissue Culture Collection, Rockville, Md., USA) wurden unter mit 10% fötalem Rinderserum, Penicillin und Streptomycin supplementiertem DMEM gezüchtet. Die Zellen wurden in 24-Well Gewebekulturplatten in Opti-MEM 1 Medium ausgesät und bei 90% Konfluenz eingesetzt. Die Zellen wurden entweder mit 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10 oder 100 μ M Verbindung (V) oder Nicotin (Sigma) behandelt. Fünf Minuten nach dem Zusatz von Verbindung (V) oder Nicotin wurden die Zellen mit LPS (500 ng/ml) behandelt. Die Überstände wurden nach 4 Stunden gesammelt und der TNF- α mit einem ELISA gemessen (Maus-ELISA-Kit von R&D Systems Inc., Minneapolis, MN).

[0103] Die Ergebnisse sind in [Fig. 7](#) wiedergegeben, in welcher gezeigt wird, dass wie bei Nicotin die Verbindung (V) die TNF- α -Freisetzung aus RAW264.7 Zellen dosisabhängig hemmt.

Beispiel 4: Verbindung (VI) hemmt die LPS-induzierte TNF- α -Freisetzung aus murinen Makrophagen-ähnlichen RAW264.7 Zellen

[0104] Murine Makrophagen-ähnliche RAW264.7 Zellen (American Type Tissue Culture Collection, Rockville, Md., USA) wurden unter mit 10% fötalem Rinderserum, Penicillin und Streptomycin supplementiertem DMEM gezüchtet. Die Zellen wurden in 24-Well Gewebekulturplatten in Opti-MEM 1 Medium ausgesät und bei 90% Konfluenz eingesetzt.

[0105] In [Fig. 8](#) wurden die Zellen mit 0,1, 1 und 10 μ M der Verbindung (VI) behandelt. 0, 1, 4, oder 24 Stunden nach der Vorinkubation mit Verbindung (VI) wurden die Zellen mit LPS (500 ng/ml) behandelt. Nach 4 Stunden wurden die Überstände gesammelt und der TNF- α mit einem ELISA gemessen (Maus-ELISA-Kit von R&D Systems Inc., Minneapolis, MN). Die in [Fig. 8A](#) wiedergegebenen Ergebnisse zeigen die prozentuale Hemmung des TNF- α .

[0106] [Fig. 8B](#) zeigt die Bedingung der Vorinkubation bei Stunde 0 der [Fig. 8A](#) und gibt die prozentuale Hemmung des TNF- α an. Der geschätzte IC₅₀-Wert für Verbindung (VI) beträgt 0,9 μ M.

Beispiel 5: Eine Behandlung mit Verbindung (VI) vor der Verabreichung von LPS hemmt in Mäusen zirkulierenden TNF

[0107] C57 B/6-Mäuse wurden intraperitoneal (i. p.) mit 4 mg/kg der Verbindung (VI) oder der Vehikelkontrolle behandelt. Fünf Minuten nach der Behandlung mit der Verbindung (VI) oder der Vehikelkontrolle wurde den Mäusen 100 μ g LPS i. p. injiziert. Zwei Stunden nach der Behandlung mit LPS wurden die Mäuse getötet und Blutproben für die Messung von TNF- α gesammelt. Der TNF- α wurde wie oben beschrieben mit einem ELISA gemessen.

[0108] Wie in [Fig. 9](#) gezeigt, senkte eine Behandlung mit Verbindung (VI) vor Verabreichung von LPS die Konzentration von zirkulierendem TNF- α im Vergleich mit Mäusen, die mit der Vehikelkontrolle behandelt wurden, um nahezu 50%.

Beispiel 6: Verbindung (VI) vermindert die Entzündung des Kolons bei muriner DSS-Colitis

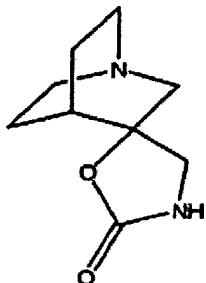
[0109] Wie bei Hove et al., Dig. Dis. Sci. 47(9): 2056-2063 (2002) beschrieben, wurde eine Dextran-Natriumsulfat-induzierte (DSS) Kolitis durchgeführt. An C57 B/6-Mäuse wurden 3% (w/v) DSS (Mol.gew. 40 kD; TdB Consultancy, Uppsala, Schweden) im Drinkwasser sieben Tage lang verfüttert. 12 Stunden nach Beginn der DSS-Behandlung wurde den Mäusen zweimal am Tag 7 Tage lang 4 mg/kg Verbindung (VI) i. p. injiziert. Am Tag 7 wurden die Mäuse getötet.

[0110] Nach dem Tod wurden die Kolons geerntet und durch einen Medianschnitt entnommen. Die Gesamtlänge des Kolons wurde gemessen und die Ergebnisse in [Fig. 10\(B\)](#) wiedergegeben. Die Verkürzung des Kolons ist ein Hinweis auf eine größere Heftigkeit der Colitis. Mit Verbindung (V) behandelte Mäuse wiesen eine geringfügig größere Kolonlänge auf als die Kontrollmäuse ($p = 0,07$), was auf eine geringere Heftigkeit der Colitis in mit Verbindung (VI) behandelten Mäusen hinweist. Ein anderer Indikator für die Heftigkeit der Erkrankung, das Gewicht des Kolons, wurde ebenfalls gemessen. Das Nassgewicht des Kolons wurde aufgezeichnet und als Index für ein inflammatorisches Ödem benutzt. Die Ergebnisse sind in [Fig. 10\(A\)](#) wiedergegeben. Das Kolongewicht in mit Verbindung (VI) behandelten Mäusen war im Vergleich mit den Mäusen im Kontroll-Zu-

stand verringert. Diese Ergebnisse legen nahe, dass Verbindung (VI) eine Entzündung des Kolons bei muriner DSS-Colitis verringert.

Beispiel 7: Verbindung (VII) hemmt die TNF- α -Freisetzung aus LPS-stimulierten murinen Makrophagen-ähnlichen RAW246.7-Zellen

[0111] Sie Verbindung (VII) zeigte signifikante Wirkungen bei der Hemmung der Freisetzung von TNF- α .



(-)Spiro[1-azabicyclo[2.2.2]octan-3,5'-oxazolidin-2'-on] (VII)

[0112] Marine Makrophagen-ähnliche RAW246.7-Zellen (American Type Tissue Culture Collection, Rockville, Md., USA) wurden wie oben in Beispiel 3 beschrieben gezüchtet. Die Zellen wurden mit 0, 0,01, 0,1, 1, 10 und 100 μ M (-)-Spiro[1-azabicyclo[2.2.2]octan-3,5'-oxazolidin-2'-on] (Verbindung (VII)) behandelt. Fünf Minuten nach Zugabe der Verbindung (VII) wurden die Zellen mit LPS (500 ng/ml) behandelt. Der TNF- α wurde wie oben beschrieben mit einem ELISA gemessen.

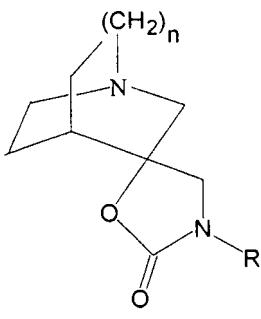
[0113] Die Ergebnisse sind in [Fig. 11](#) wiedergegeben, in welcher gezeigt wird, dass die höheren Konzentrationen der Verbindung (VII) die Freisetzung von TNF- α aus RAW264.7-Zellen hemmen. In Zellen, die mit 100 μ M der Verbindung (VII) behandelt wurden, wurde die TNF- α -Freisetzung im Vergleich mit den Kontrollzellen um mehr als das 4-fache verringert.

[0114] Vor dem Hintergrund der obigen Ausführungen ist zu ersehen, dass die verschiedenen Vorteile der Erfindung erreicht und andere Vorteile erzielt werden.

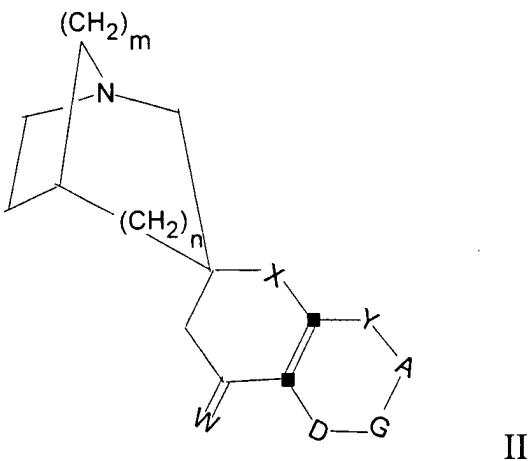
Patentansprüche

1. Verwendung eines cholinergen Agonisten, der selektiv für einen α 7-Nicotinrezeptor ist, zur Herstellung eines Medikaments für die Behandlung einer entzündlichen Beschwerde, wobei die Beschwerde ausgewählt ist aus Appendizitis, peptisches Ulkus, Magenulkus, Duodenalulkus, Peritonitis, Pankreatitis, Epiglottitis, Achalasie, Cholangitis, Cholezystitis, Hepatitis, Morbus Whipple, Asthma, Allergie, anaphylaktischer Schock, Immunkomplexkrankheit, Organnekrose, Heuschnupfen, Sepsis, Septikämie, endotoxischer Schock, Kachexie, Hyperpyrexie, eosinophiles Granulom, Granulomatose, Sarkoidose, septischer Abortus, Epididymitis, Vaginitis, Prostatitis, Urethritis, Bronchitis, Emphysem, Rhinitis, zystische Fibrose, Pneumonitis, pneumoultramikroskopische Silicovolcanokoniose, Alveolitis, Bronchiolitis, Pharyngitis, Peruritis, Sinusitis, Influenza, RS-Virusinfektion, Herpesinfektion, HIV-Infektion, Hepatitis B-Virusinfektion, Hepatitis C-Virusinfektion, disseminierte Bakteriämie, Dengue-Fieber, Candidose, Malaria, Filariose, Amöbiasis, Echinokokkuszysten, Verbrennungen, Vaskulitis, Angiitis, Endokarditis, Arteriitis, Atherosklerose, Thrombophlebitis, Perikarditis, Myokarditis, Periarteriitis nodosa, rheumatisches Fieber, Zöliakie, dekompensierte Herzinsuffizienz, Schocklunge, chronisch-obstruktive Lungenerkrankung, Meningitis, Enzephalitis, Neuritis, Neuralgie, Rückenmarksverletzung, Paralyse, Uveitis, Arthritiden, Arthralgie, Osteomyelitis, Fasziitis, Paget-Krebs, Gicht, Periodontitis, rheumatische Arthritis, Synovitis, Myasthenia gravis, Thyroiditis, systemischer Lupus erythematosus, Goodpasture-Syndrom, Behcet-Syndrom, Allotransplantationsabstoßung, Transplantat-Wirt-Reaktion, Bechterev-Krankheit, Berger-Krankheit, Retier-Syndrom und Hodgkin-Krankheit.

2. Verwendung nach Anspruch 1, bei welcher der cholinerge Agonist ausgewählt ist aus einem quartären Analogen des Cocains; (1-Aza-bicyclo[2.2.2]octan-3-yl-carbaminsäure-1-(2-fluorophenyl)ethylester, einer Verbindung der Formel I:



in welcher R Wasserstoff oder eine Methylgruppe darstellt und n 0 oder 1 ist;
einem pharmazeutisch verträglichen Salz der Verbindung der Formel I; einer Verbindung der Formel II:



in welcher m 1 oder 2 ist,
n 0 oder 1 ist,
Y CH, N oder NO darstellt,
X Sauerstoff oder Schwefel ist,
W Sauerstoff, H₂ oder F₂ ist,
A für N oder C(R²) steht,
G für N oder C(R³) steht und
D für N oder C(R⁴) steht,

mit dem Vorbehalt, dass nicht mehr als ein Vertreter aus der Gruppe A, G und D ein Stickstoff ist, aber mindestens ein Vertreter aus der Gruppe Y, A, G und D Stickstoff oder NO ist,

R¹ Wasserstoff oder ein C₁-C₄-Alkyl ist,

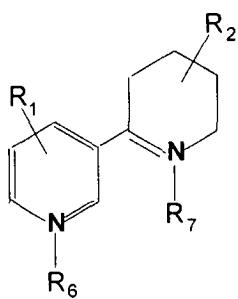
R², R³ und R⁴ unabhängig voneinander Wasserstoff, Halogen, ein C₁-C₄-Alkyl, ein C₂-C₄-Alkenyl, ein C₂-C₄-Alkinyl, ein Aryl, ein Heteroaryl, OH, OC₁-C₄-Alkyl, CO₂R₁, -CN, -NO₂, -NR₅R₆, -CF₃ oder -OSO₂CF₃, oder R² sind und R³ bzw. R⁴ zusammen einen anderen sechsgliedrigen aromatischen oder heteroaromatischen Ring bilden können, der A und G bzw. G und D umfasst, Null bis zwei Stickstoffatome enthält und mit einem oder zwei der folgenden Substituenten substituiert ist: unabhängig voneinander Wasserstoff, Halogen ein C₁-C₄-Alkyl, C₂-C₄-Alkenyl, C₂-C₄-Alkinyl, Aryl, Heteroaryl, OH, OC₁-C₄-Alkyl, CO₂R¹, -CN, -NO₂, -NR⁵R⁶, -CF₃,

R⁵ und R⁶ unabhängig voneinander Wasserstoff, ein C₁-C₄-Alkyl, C(O)R⁷, C(O)NHR⁵, C(O)R⁹, SO₂R¹⁰ sind oder zusammen (CH₂)Q(CH₂)_k sein können, worin Q für O, S, NR¹¹ steht oder eine Bindung ist,

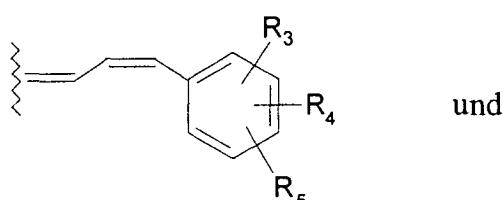
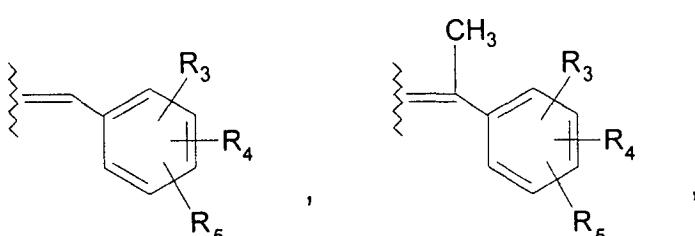
j ist 2 bis 7,

k ist 0 bis 2,

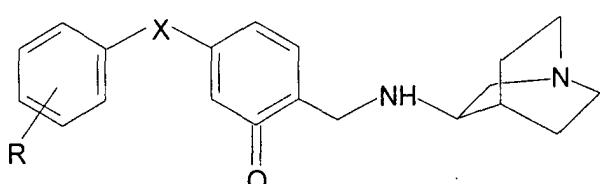
R⁷, R⁸, R⁹, R¹⁰ und R¹¹ sind unabhängig voneinander C₁-C₄-Alkyl, Aryl oder Heteroaryl oder ein Enantiomer davon; ein pharmazeutisch verträgliches Salz einer Verbindung der Formel II; eine Verbindung der Formel III:



in welcher R₁, R₆ und R₇ Wasserstoff oder ein C₁-C₄-Alkyl sind und R₂ ausgewählt ist aus der Gruppe



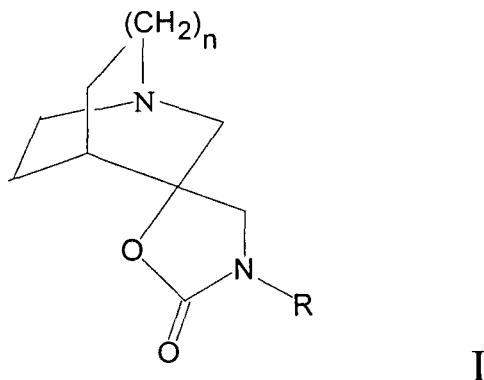
in welcher R₁, R₄ und R₅ ausgewählt sind aus Wasserstoff, C₁-C₄-Alkyl, das wahlweise mit N,N-Dialkylamin mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen in jedem Alkyl substituiert ist; C₁-C₆-Alkoxy, das wahlweise mit N,N-Dialkylamin mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen in jedem Alkyl substituiert ist; Carboalkoxy mit 1 bis 4 Kohlenstoffen im Alkoxy; Amido; Amido mit 1 bis 4 Kohlenstoffen im Acyl; Cyano und N,N-Dialkylamino mit 1 bis 4 Kohlenstoffen in jedem Alkyl, Halogen, Hydroxyl oder Nitro; und einer Verbindung der Formel IV:



IV

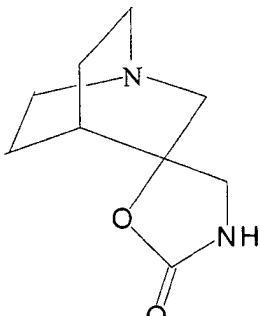
in welcher X für O oder S steht und R ausgewählt ist aus H, OR₁, NHC(O)R₁ und einem Halogen, wobei R₁ ein C₁-C₆-Alkyl ist.

3. Verwendung nach Anspruch 1, bei welcher der cholinerge Agonist eine Verbindung der Formel I ist:



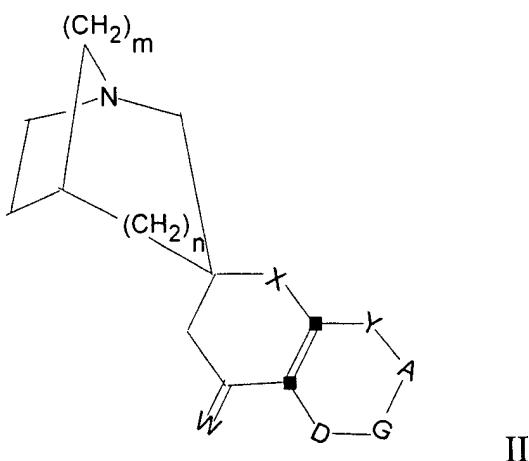
in welcher R für Wasserstoff oder Methyl steht und
n für 0 oder 1;
oder ein pharmazeutisch verträgliches Salz davon.

4. Verwendung nach Anspruch 3, bei welcher der cholinerge Agonist (-)-Spiro[1-azabicyclo[2.2.2]octan-3,5'-oxazolidin-2'-on ist



(VII)

5. Verwendung nach Anspruch 1, bei welcher der cholinerge Agonist eine Verbindung der Formel II ist:



in welcher m 1 oder 2 ist,
n 0 oder 1 ist,
Y CH, N oder NO darstellt,
X Sauerstoff oder Schwefel ist,
W Sauerstoff, H₂ oder F₂ ist,
A für N oder C(R²) steht,
G für N oder C(R³) steht und
D für N oder C(R⁴) steht,

mit dem Vorbehalt, dass nicht mehr als ein Vertreter aus der Gruppe A, G und D ein Stickstoff ist, aber mindestens ein Vertreter aus der Gruppe Y, A, G und D Stickstoff oder NO ist,

R¹ ist Wasserstoff oder ein C₁-C₄-Alkyl,

R², R³ und R⁴ sind unabhängig voneinander Wasserstoff, Halogen, ein C₁-C₄-Alkyl, ein C₂-C₄-Alkenyl, ein C₂-C₄-Alkenyl, ein Aryl, ein Heteroaryl, OH, OC₁-C₄-Alkyl, CO₂R₁, -CN, -NO₂, -NR₅R₆, -CF₃ oder -OSO₂CF₃, oder R² und R³ bzw. R³ und R⁴ können zusammen einen anderen sechsgliedrigen aromatischen oder heteroaromatischen Ring bilden, der A und G bzw. G und D umfasst, null bis zwei Stickstoffatome enthält und mit einem oder zwei der folgenden Substituenten substituiert ist: unabhängig voneinander Wasserstoff, Halogen ein C₁-C₄-Alkyl, C₂-C₄-Alkenyl, C₂-C₄-Alkinyl, Aryl, Heteroaryl, OH, OC₁-C₄-Alkyl, CO₂R¹, -CN, -NO₂, -NR⁵R⁶, -CF₃, R⁵ und R⁶ sind unabhängig voneinander Wasserstoff, ein C₁-C₄-Alkyl, C(O)R⁷, C(O)NHR⁵, C(O)R⁹, SO₂R¹⁰ oder können zusammen (CH₂)_jQ(CH₂)_k sein, worin Q für O, S, NR¹¹ steht oder eine Bindung ist,

j ist 2 bis 7,

k ist 0 bis 2,

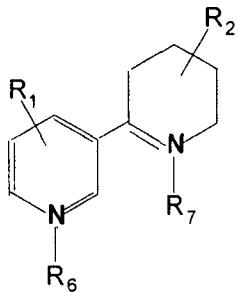
R⁷, R⁸, R⁹, R¹⁰ und R¹¹ sind unabhängig voneinander C₁-C₄-Alkyl, Aryl oder Heteroaryl oder ein Enantiomer davon oder ein pharmazeutisch verträgliches Salz davon.

6. Verwendung nach Anspruch 5, bei welcher der cholinerge Agonist eine Verbindung der Formel II ist, in

welcher m 1 ist; n 0 ist, p 0 ist; X für Sauerstoff steht; A für C(R²) steht; G für C(R³) steht und D für C(R⁴) steht.

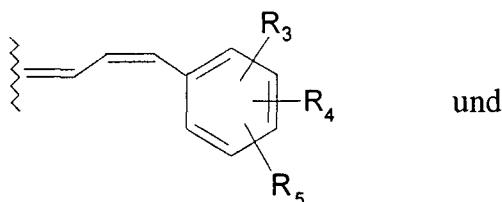
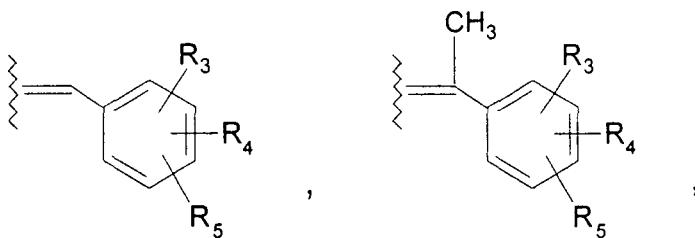
7. Verwendung nach Anspruch 6, bei welcher der cholinerge Agonist 5'-Phenylspiro[1-azabicyclo[2.2.2]octan-3,2'-(3'H)-furo[2,3-b]pyridin] ist.

8. Verwendung nach Anspruch 1, bei welcher der cholinerge Agonist eine Verbindung der Formel III ist:



III

in welcher R₁, R₆ und R₇ Wasserstoff oder ein C₁-C₄-Alkyl sind und R₂ ausgewählt ist aus der Gruppe



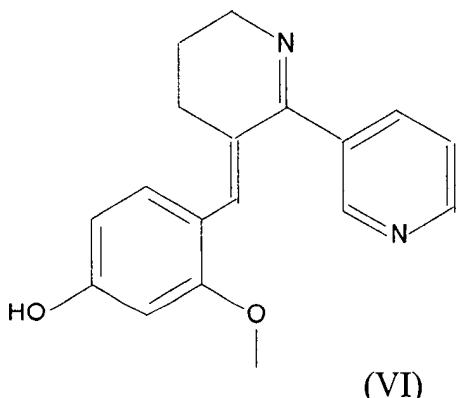
in welcher R₁, R₄ und R₅ ausgewählt sind aus Wasserstoff, C₁-C₄-Alkyl, das wahlweise mit N,N-Dialkylamin mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen in jedem Alkyl substituiert ist, C₁-C₆-Alkoxy, das wahlweise mit N,N-Dialkylamin mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen in jedem Alkyl substituiert ist, Carboalkoxy mit 1 bis 4 Kohlenstoffen im Alkoxy, Amido mit 1 bis 4 Kohlenstoffen im Acyl, Cyano und N,N-Dialkylamin mit 1 bis 4 Kohlenstoffen in jedem Alkyl, Halogen, Hydroxyl oder Nitro.

9. Verwendung nach Anspruch 8, bei welcher der cholinerge Agonist eine Verbindung der Formel III ist, in welcher R₂ an die Position 3 des Tetrahydropyridinrings angeheftet ist und in welcher ferner R₃, das an die Position 4 oder 2 des Phenylrings angeheftet ist, ausgewählt ist aus der Gruppe Amino, Hydroxyl, Chlor, Cyano, Dimethylamino, Methyl, Methoxy, Acetylamino, Acetoxy und Nitro.

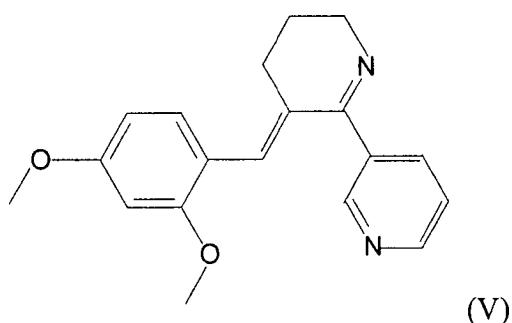
10. Verwendung nach Anspruch 8, bei welcher der cholinerge Agonist eine Verbindung ist, die ausgewählt ist aus der Formel III, in welcher R₃ Hydroxyl ist und in welcher R₁, R₄ und R₅ Wasserstoff sind; der Formel III, in welcher R₃ Acetylamino ist und in welcher R₁, R₄ und R₅ Wasserstoff sind; der Formel III, in welcher R₃ Acetoxy ist und in welcher R₁, R₄ und R₅ Wasserstoff sind; der Formel III, in welcher R₃ Methoxy ist und in welcher R₁, R₄ und R₅ Wasserstoff sind; der Formel III, in welcher R₃ Methoxy ist und in welcher R₁ und R₄ Wasserstoff sind und in welcher ferner R₃ an die Position 2 des Phenylrings angeheftet ist und R₅, das an die Position 4 des Phenylrings angeheftet ist, Methoxy oder Hydroxy ist.

11. Verwendung nach Anspruch 8, bei welcher der cholinerge Agonist ausgewählt ist aus 3-(2,4-Dimethoxybenzylidin)anabasein (DMXB-A), 3-(4-Hydroxybenzylidin)anabasein, 3-(4-Methoxybenzylidin)anabasein, 3-(4-Aminobenzylidin)anabasein, 3-(4-Hydroxy-2-methoxybenzylidin)anabasein, 3-(4-Methoxy-2-hydroxybenzylidin)anabasein, Trans-3-cinnamylidenanabasein, Trans-3-(2-methoxycinnamyliden)anabasein und Trans-3-(4-methoxycinnamyliden)anabasein.

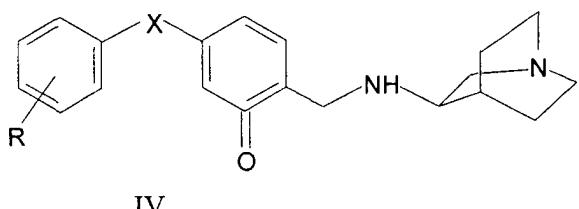
12. Verwendung nach Anspruch 8, bei welcher der cholinerge Agonist 3-(4-Hydroxy-2-methoxybenzyliden)anabasein ist



13. Verwendung nach Anspruch 8, bei welcher der cholinerge Agonist 3-(2,4-Dimethoxybenzyliden)anabasein ist.



14. Verwendung nach Anspruch 1, bei welcher der cholinerge Agonist eine Verbindung der Formel IV ist



in welcher X O oder S ist; und

R ausgewählt ist aus HOR₁, NHC(O)R₁ und einem Halogen, wobei R₁ ein C₁-C₄-Alkyl ist.

15. Verwendung nach Anspruch 13, bei welcher der cholinerge Agonist ausgewählt ist aus N-[(3R)-1-Azabicyclo[2.2.2]oct-3-yl]-4-(hydroxyphenoxy)benzamid, N-[(3R)-1-Azabicyclo[2.2.2]oct-3-yl]-4-(4-acetamido-phenoxy)benzamid, N-[(3R)-1-Azabicyclo[2.2.2]oct-3-yl]-4-(phenylsulfanyl)benzamid, und N-[(3R)-1-Azabicyclo[2.2.2]oct-3-yl]-4-(3-chlorophenylsulfonyl)benzamid. 16 Verwendung nach Anspruch 13, bei welcher der cholinerge Agonist N-[(3R)-1-Azabicyclo[2.2.2]oct-3-yl]-4-(phenylsulfanyl)benzamid ist.

16. Verwendung nach Anspruch 13, bei welcher der cholinerge Agonist Cocainmethiodid ist.

17. Verwendung nach Anspruch 1, bei welcher die Beschwerde ausgewählt ist aus Appendizitis, peptisches Ulkus, Magenulkus, Duodenalulkus, Peritonitis, Pankreatitis, Hepatitis, Asthma, Allergie, anaphylaktischer Schock, Organnekrose, Heuschnupfen, Sepsis, Septikämie, endotoxischer Schock, Kachexie, septischer Abortus, disseminierte Bakteriämie, Verbrennungen, Zöliakie, dekompensierte Herzinsuffizienz, Schocklunge, chronisch-obstruktive Lungenerkrankung, rheumatische Arthritis, systemischer Lupus erythematosus, Rückenmarksverletzung, Paralyse, Allotransplantationsabstoßung und Transplantat-Wirt-Reaktion.

18. Verwendung nach Anspruch 1, bei welcher die Beschwerde ausgewählt ist aus Appendizitis, peptisches Ulkus, Magenulkus, Duodenalulkus, Peritonitis, Pankreatitis, Hepatitis, Asthma, Allergie, anaphylaktischer Schock, Organnekrose, Heuschnupfen, Sepsis, Septikämie, endotoxischer Schock, Kachexie, septischer Abortus, disseminierte Bakteriämie, Verbrennungen, Zöliakie, dekompensierte Herzinsuffizienz, Schock-

lunge, chronisch-obstruktive Lungenerkrankung, rheumatische Arthritis, systemischer Lupus erythematosus, Rückenmarksverletzung, Paralyse, Allotransplantationsabstoßung oder Transplantat-Wirt-Reaktion.

19. Verwendung nach Anspruch 1, bei welcher die Beschwerde ausgewählt ist aus Peritonitis, Pankreatitis, Sepsis, endotoxischer Schock, Schocklunge, chronisch-obstruktive Lungenerkrankung, rheumatische Arthritis, systemischer Lupus erythematosus, Allotransplantationsabstoßung, Asthma, Transplantat-Wirt-Reaktion, dekompensierte Herzinsuffizienz und zystische Fibrose.

20. Verwendung nach Anspruch 1, bei welcher die Beschwerde ausgewählt ist aus Peritonitis, Pankreatitis, Sepsis, endotoxischer Schock, Kachexie, Schocklunge, chronisch-obstruktive Lungenerkrankung, rheumatische Arthritis, systemischer Lupus erythematosus und Allotransplantationsabstoßung.

21. Verwendung nach Anspruch 1, bei welcher die Beschwerde eine Sepsis ist.

Es folgen 11 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Fig.1

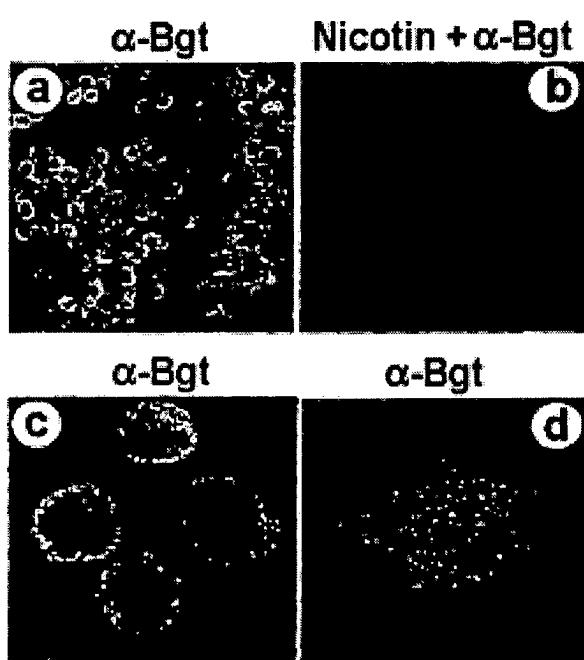


Fig.2

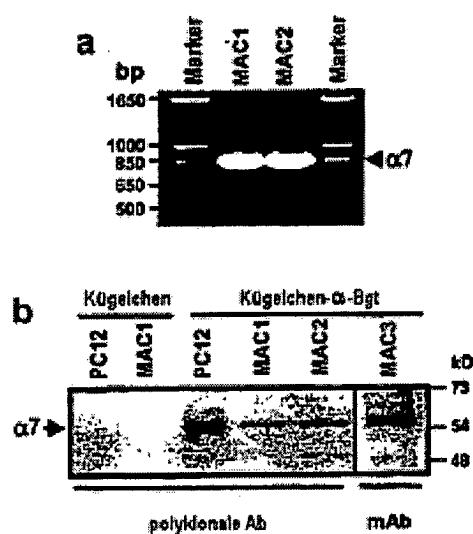


Fig. 3

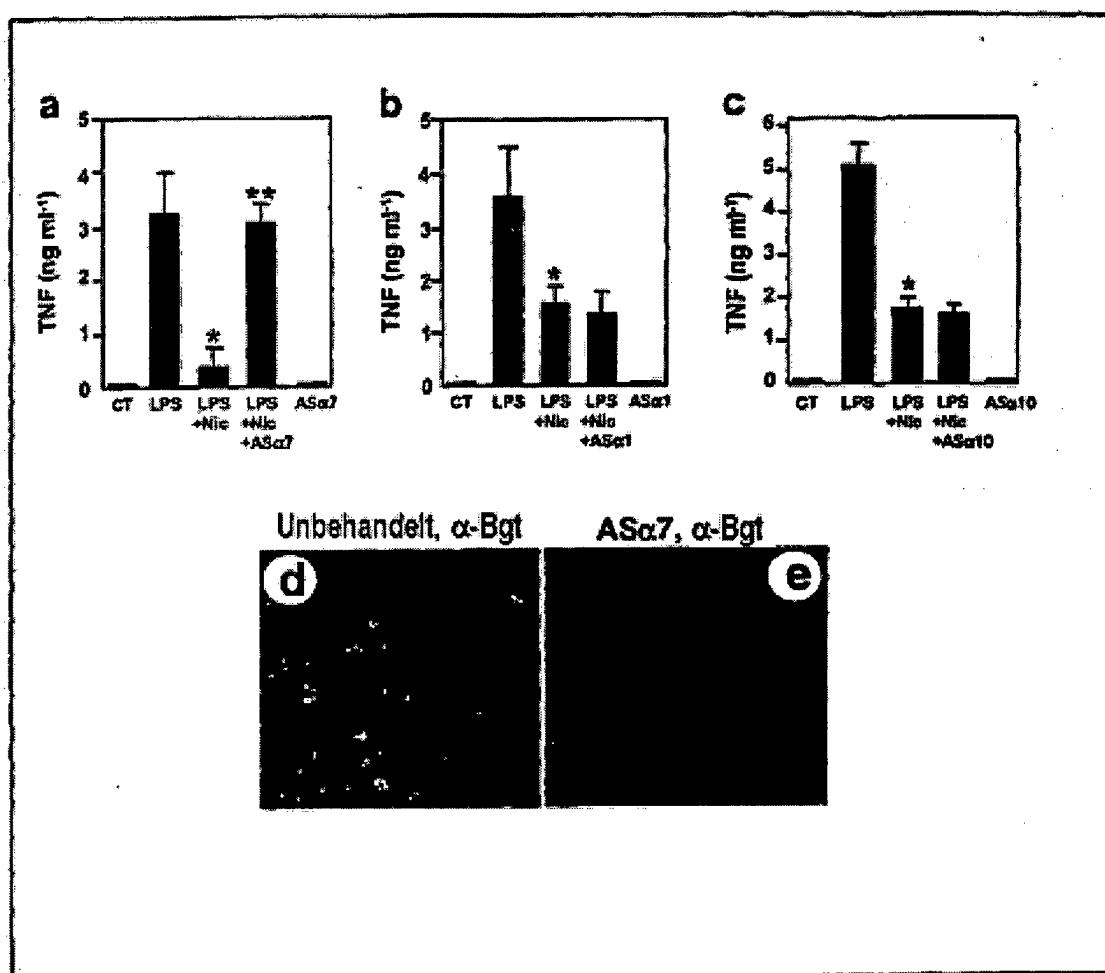


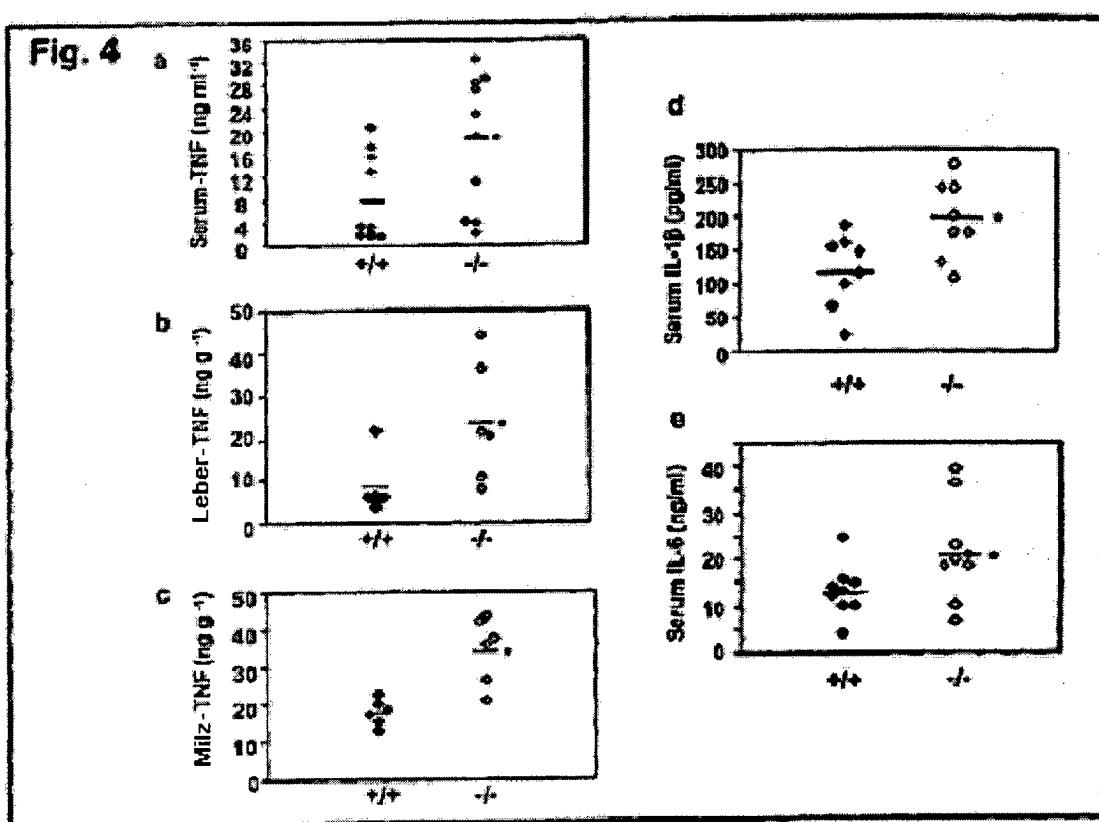
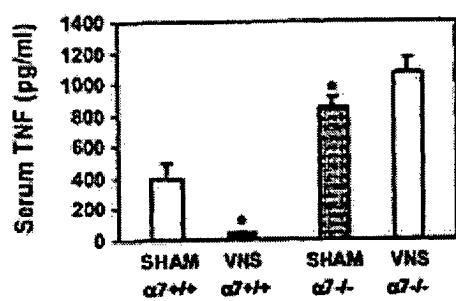
Fig. 4

Fig. 5



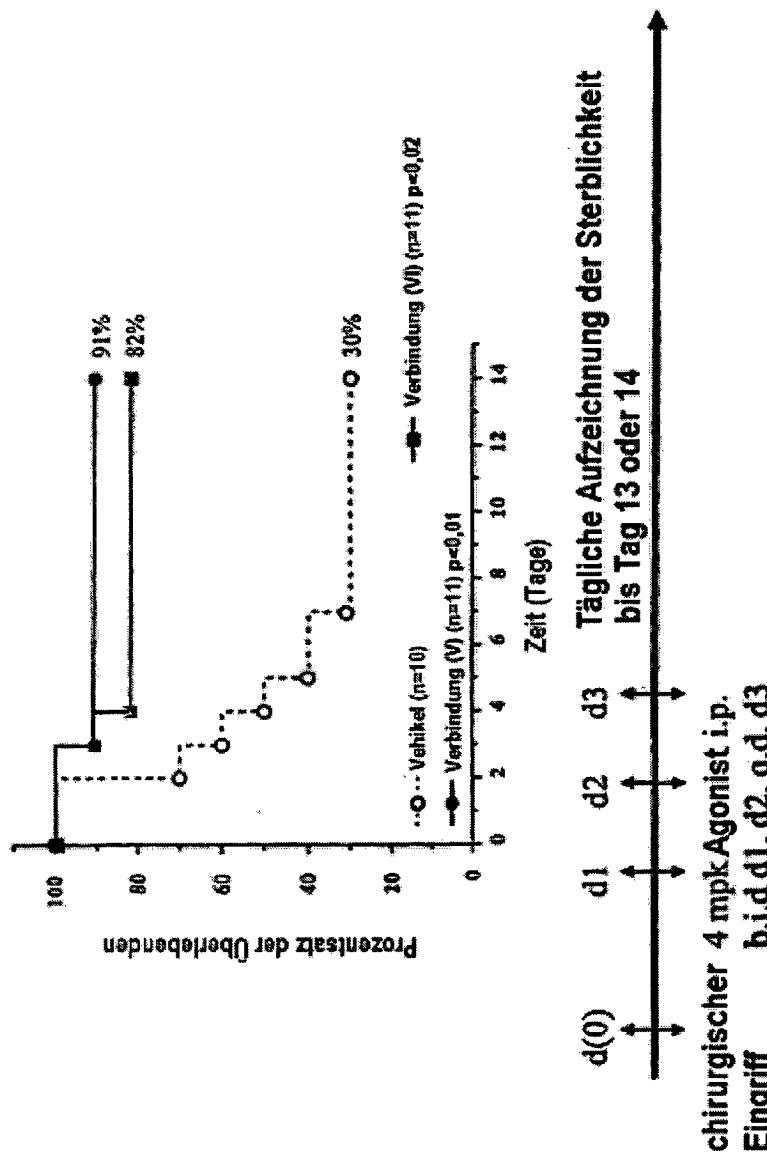
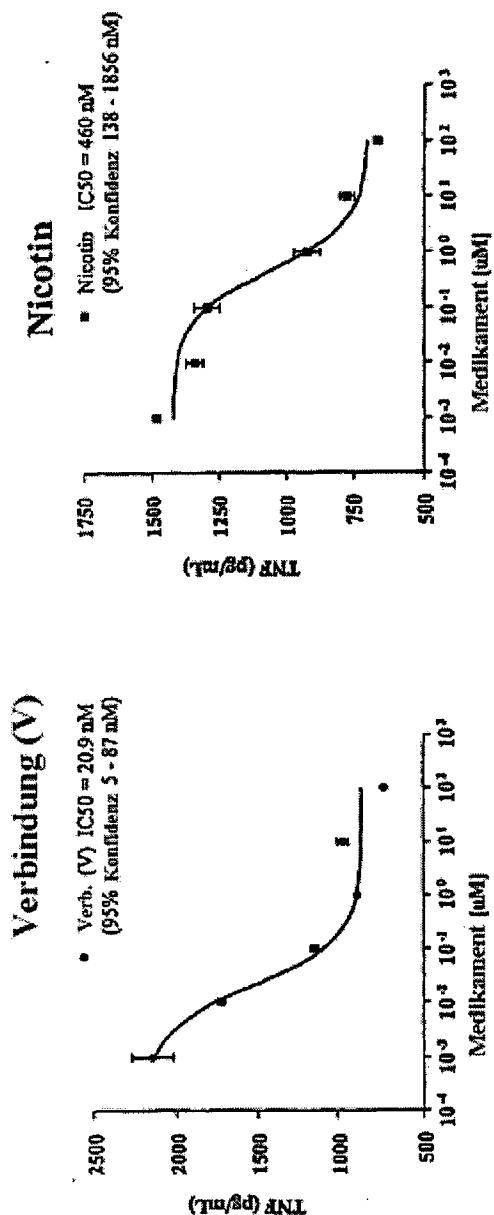


FIG. 6



Blockade der TNF-Produktion in LPS-stimulierten RAW264.7-Zellen

FIG. 7

A. Prozentuale Hemmung des TNF-alpha durch Verbindung (VI) nach Stimulation mit LPS über 4 Stunden

B. Dosis-Wirkungs-Blockade der TNF-Produktion von LPS-stimulierten RAW264.7-Zellen ohne Vorinkubation mit Verbindung (VI)

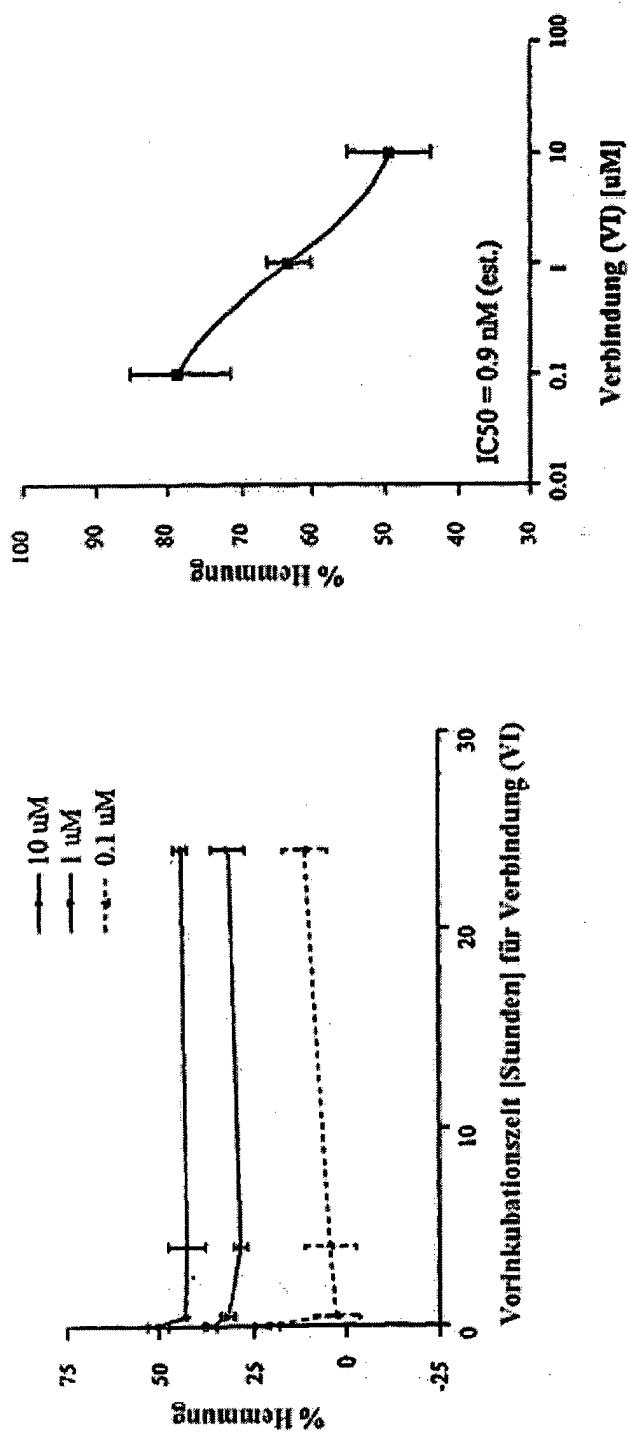


FIG. 8A

FIG. 8B

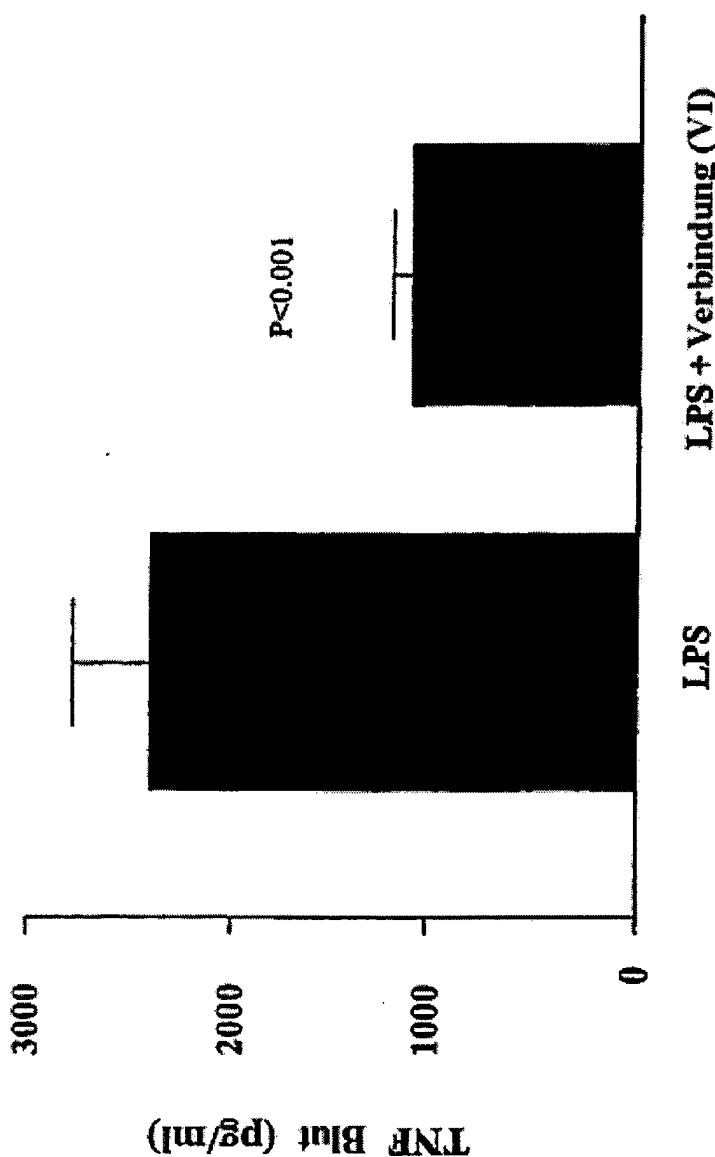
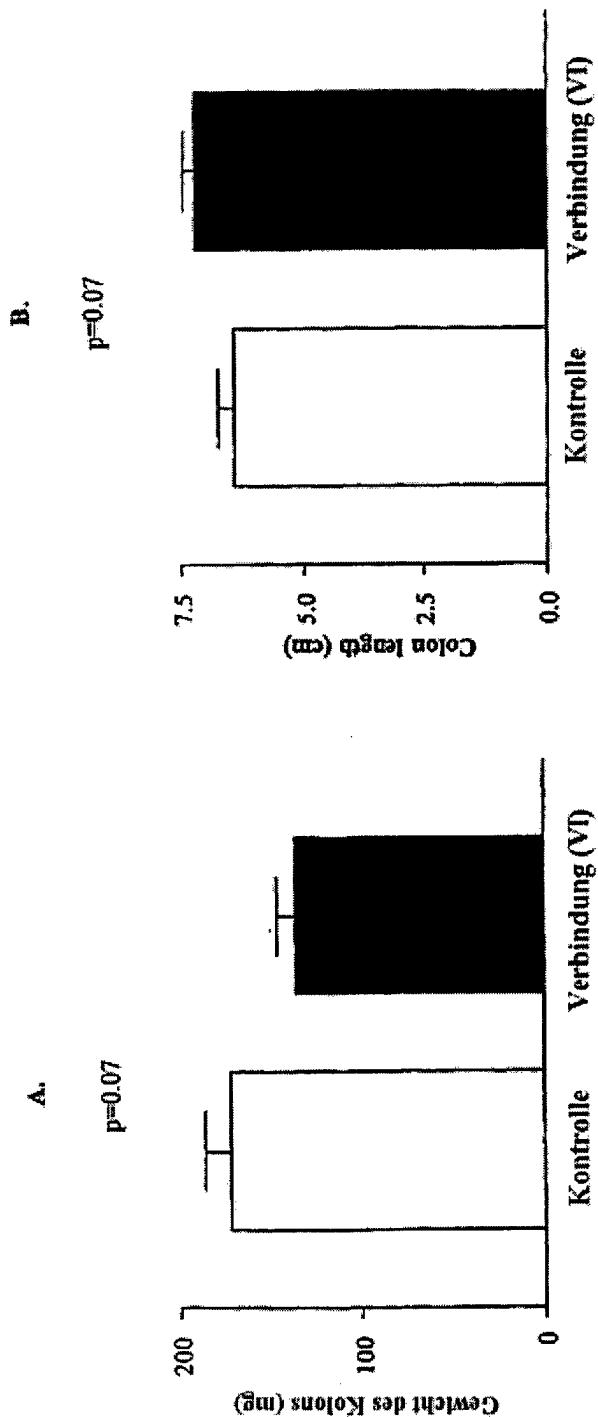


FIG. 9



Verbindung (VI) dosiert mit 4 mg/kg i.p., Beginn 12 Stunden nach DSS, zweimal täglich, über 7 Tage

FIG. 10

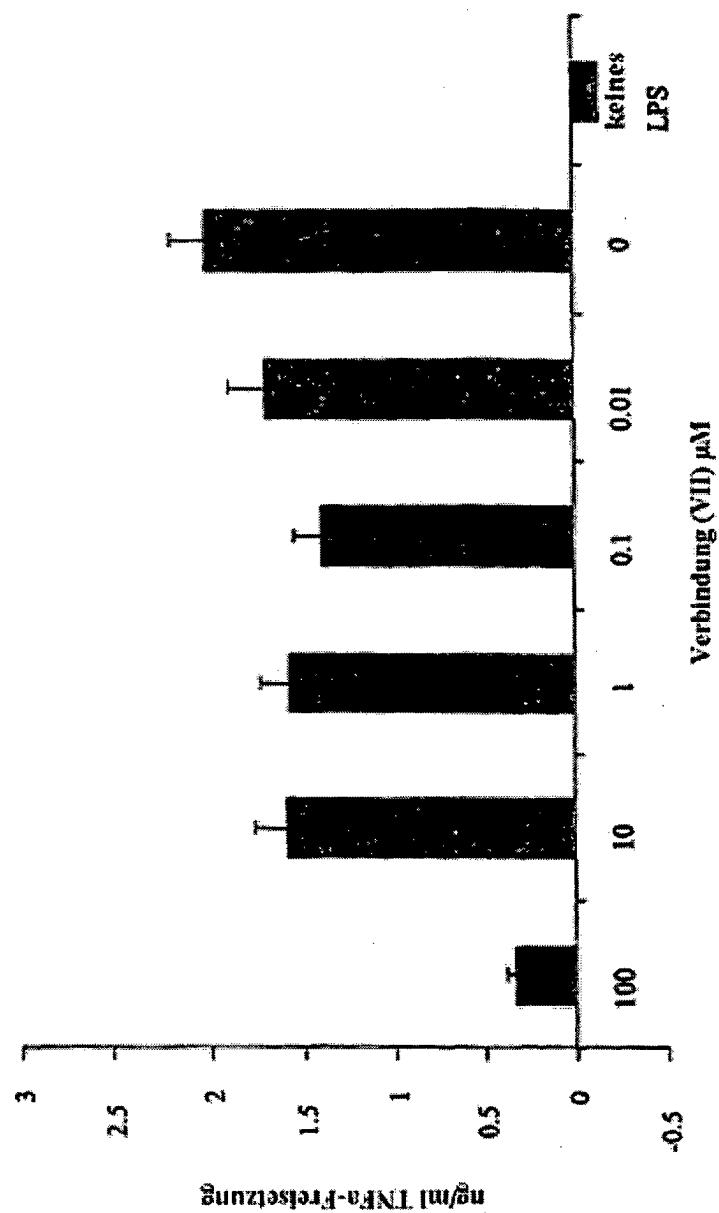


FIG. 11