

1229/11

5000

734 0

ajánlat

~~Ditio~~-karbamátok (alkalmazása) ateroszklerózis és más

kardiovaszkuláris és gyulladásos betegségek kezelésére és ilyen ~~szervek~~,
vegyületeket tartalmazó) gyógyszerkészítmények ~~szervek~~

Georgia

Emory University, Atlanta, GA, Amerikai Egyesült Államok

A nemzetközi bejelentés napja: 1993. 11. 01.

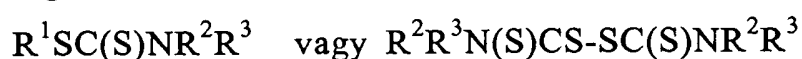
Elsőbbsége: 1992. 10. 30. (07/969 934) US

Nemzetközi bejelentési szám: PCT/US93/10496

Nemzetközi közzétételi szám: WO 94/09772

K I V O N A T K Ö Z Z É T É T E L I P É L D Á N Y

A találmány gyógyszerkészítményekre és azok előállítás el-
járására vonatkozik, amelyek alkalmasak különböző kardiovasz-
kuláris betegségek kezelésére és amelyek valamely következő álta-
lános képletnek megfelelő nem-toxikus ditio-karbamát hatásos
mennyiségét tartalmazzák:



a képletben

R^1 jelentése hidrogénatom vagy gyógyászatilag elfogadható
kation, előnyösen nátrium vagy kálium, vagy $NR^4R^5R^6R^7$
általános képletű csoport, amely képletben

R^4 , R^5 , R^6 és R^7 jelentése egymástól függetlenül hidrogéna-
tom, 1-6 szénatomos, lineáris, egyenes vagy elágazó
láncú vagy ciklusos alkilcsoport, hidroxil-1-6 széna-
tomos alkilcsoport, ahol egy vagy több hidroxil-

csoport kapcsolódhat bármelyik szénatomhoz, vagy
arilcsoport, és

R^2 és R^3 jelentése egymástól függetlenül 1-10 szénatomos egyenes
vagy elágazó láncú vagy ciklusos alkilcsoport

$-(CHOH)_n(CH_2)_nOH$ csoport, ahol n értéke 0, 1, 2, 3, 4, 5
vagy 6, $-(CH_2)_nCO_2R^1$ vagy $-(CH_2)_nCO_2R^4$ általános képle-
tű csoport, hidroxil-1-6 szénatomos alkilcsoport vagy R^2 és
 R^3 együttesen egy hidat képeznek, amely lehet egy $-(CH_2)_m$
általános képletű csoport, ahol m értéke 3-6, és

R^4 jelentése alkil-, aril-, alkaril- vagy aralkil-csoport, előnyö-
sen acetyl-, propionil-, vagy butiril-csoport.

Handwritten notes:
R¹ = H
R² = CH₃
R³ = CH₃
R⁴ = CH₃

1229/95

1

5082

DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft

Budapest

D

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

gyógy
alkalmazása
Ditio(karbamátok alkalmazása) ateroszklerózis és más

kardiovaszkuláris és gyulladásos betegségek kezelésére (és ilyen

vegyületeket) tartalmazó gyógyszerkészítmények

Georgia
Emory University, Atlanta, GA, Amerikai Egyesült Államok

Feltalálók:

MEDFORD Russel M., Atlanta, GA, *Georgia*,

OFFERMANN Margaret K., Atlanta GA, *Georgia*,

ALEXANDER R. Wayne, Atlanta, GA, *Georgia*,

Amerikai Egyesült Államok

A nemzetközi bejelentés napja: 1993. 11. 01.

Elsőbbsége: 1992. 10. 30. (07/969 934) US

Nemzetközi bejelentési szám: PCT/US93/10496

Nemzetközi közzétételi szám: WO 94/09772

A találmány ditio-karbamátok alkalmazására vonatkozik ateroszklerózis és más kardiovaszkuláris és gyulladásos betegségek kezelésénél, valamint vonatkozik ilyen vegyületeket tartalmazó gyógyszerkészítményekre és ezek előállítására is.

A leukociták endotéliumhoz való adhéziója egy alapvető és korai jelenség a különböző gyulladásos betegségek esetén, beleértve az ateroszklerózist, az autoimmun elváltozásokat és bakteriális, valamint vírus fertőzéseket. Ezt a folyamatot részben az endoteliális sejtfelületi adhéziós molekulák, így például az ICAM-1 (intracellular adhesion molecule-1), a VCAM-1 (vascular adhesion molecule-1), és az ELAM-1 (endothelial leukocyte adhesion molecule-1) indukált expressziója közvetíti. Ezek az adhéziós molekulák az immunsejtekhez kötődnek, ami megindítja és tovább viszi a gyulladásos választ. Az egyik ilyen adhéziós molekula a VCAM-1 különösen jelentős szerepet játszik a monociták megkötésénél. Több jel indukálja a sejtfelületi adhéziós molekulák expresszióját.

Az ateroszklerózis az artériás intima krónikus gyulladásos betegsége, amelyre a leukociták, simaizomsejtek, lipidek és extracelluláris matrix gócos akkumulációja jellemző. Az ateroszklerotikus vérlemezkék patogenézisének egy alapvető jellemző és egyike a legkorábban kimutatható jeleknek a mononukleáris leukociták adhéziója az artériás endotélium diszkrét szegmenseihez egy VCAM-proteinen keresztül a vaszkuláris endoteliális sejtek felületén. Az endoteliális sejtek kötődése után a mononukleáris leukociták lipidtartalmú makrofágokká alakulnak vagy "habsejteket" alkotnak. Az ateroszklerózis az érfalakon belül nagymértékű gócos sérülések

formájában alakul ki, általában ott, ahol a véráram normális laminális áramlása meg van zavarva, így például a véredény átfolyás elválasztóknál. Ezeket az "alacsony nyírófeszültségű" területeket az oxidative módosított kis sűrűségű lipoproteinek ox-LDL) abnormális helyi akkumulációja jellemzi.

Említették már, hogy az ateroszklerózis patogenézisének korai jelenségeit egy kis sűrűségű lipoprotein közvetíti, amely reakcióképes oxigén révén egy ox-LDL formává alakult át (Steinberg és mtársai, "Beyond cholesterol: Modifications of lowdensity lipoprotein that increase its atherogenicity," N. Engl. J. Med. 320: 915-924 (1989); Parthasarathy és mtársai, "Probucol inhibits oxidative modification of low density lipoprotein," J. Clin. Invest. 11(2): 641-4 (1986)). Nem teljesen tiszta, hogy az LDL milyen mechanizmus révén oxidálódik akár intracellulárisan, akár extracellulárisan.

A kardiovaszkuláris betegségek és különösen az ateroszklerózis jelenlegi terápiáinál nem a betegség okát kezelik, hanem a betegség szimptomáit vagy a betegséggel kapcsolatos alacsonyabb rizikó faktorokat. Az ilyen tünetek kezelésére előírt gyógyszerek közé tartoznak a lipidcsökkentő szerek, így például a probukol és a nikotinsav, az aszpirin (ez gátolja a vérlemezkék összetapadását), antitrombotikus szerek, így például a coumadin, a kalciumcsatorna blokkolók, így például a varapamil, diltiazem és nifedipin, angiotenzin konvertáló enzim (ACE) inhibitorok, így például a captopril és enalapril, β -blokkolók, így például a propranolol, terbutanol és labetalol. Mivel ezek a terápiás szerek nem szelektívek, ezek számos különböző szervre egyaránt hatnak és szignifikáns mellékhatá-

saik is vannak. Jelenleg nem ismert olyan hatóanyag, amely a monocitáknak a sejtfelületi adhézións molekulákhoz, így például a VCAM-1-hez való kötődését gátolnák.

Tekintve, hogy a kardiovaszkuláris betegségek jelenleg a vezető okok közé tartoznak a halálozásban az Egyesült Államokban és a kardiovaszkuláris betegségek 90%-át ateroszklerózisként diagnosztizálják, igen nagy szükség van új kezelési módokra és gyógyszerekre ezek kezeléséhez.

A ditiokarbamátok átmenetifém-kelátorok, amelyeket klinikailag alkalmaznak a nehézfémek detoxikálásában (Baselt, R.C., és mtársai, "Comparisons of antidotal efficacy of sodium diethyldithiocarbamate, D-penicillamine and triethylenetetramine upon acute toxicity of nickel carbonyl in rats," Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 18(4): 677-88 (1977); Menne, T., and K. Kaaber, "Treatment of pompholyx due to nickel allergy with chelating agents, Contact Dermatitis 4(5): 289-90 (1978); Sunderman, F.W., "Clinical response to therapeutic agents in poisoning from mercury vapor," Ann. Clin. Lab. Sci. 8(4): 259-69 (1978); Sunderman, F.W., "Efficacy of sodium diethyldithiocarbamate (dithiocarb) in acute nickel carbonyl poisoning," Ann. Clin. Lab. Sci. 9(1): 1-10 (1919); Gale, G.R., és mtársai, "Diethyldithiocarbamate in treatment of acute cadmium poisoning," Ann. Clin. Lab. Sci. 11(6): 476-83 (1981); Jones, M.M., és M.G. Cherian, "The search for chelate antagonists for chronic cadmium intoxication," Toxicology 62(1): 1-25 (1990); Jones, S.G., és mtársai, "A comparison of diethyldithiocarbamate and EDTA as antidotes for acute cadmium intoxication," Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 38(2): 211-8 (1982); Pages,

A. és m  rsai, "Dithiocarbamates in heavy metal poisoning: complexes of N,N-di(1-hydroxyethyl)dithiocarbamate with Zn(II), Cd(II), Hg(II), C H₃ Hg(II), and 35 C₆Li₅Li₉ (II), " J. Inorg. Biochem. 25 (1) : 35-4Z (1985) ; Tandon, S.K.,   s m  rsai, "The lead-chelating effects of substituted dithiocarbamates, Biomed. Environ. Sci. 3(3): 299-305 (1990)).

A ditio-karbamátokat ugyancsak haszn  lj  k a cisz-platina kemoter  pi  s kezel  sekkel együttesen a vese toxicit  s megakad  lyoz  s  ra (Hacker, M.P.   s m  rsai, "Effect of disulfiram (tetraethylthiuram disulfide) and diethyldithiocarbamate on the bladder toxicity and antitumor activity of cyclophosphamide in mice, Cancer Res. 42(11): 4490-4499 (1982); Bodenner, "Selected protection against cisdiamminedichloroplatinum (II) - induced toxicity in k  deny, gut, and bone marrow by diethyldithiocarbamate", Canc. Res. 46: 2751-2755 (1986)). Az   tmeneti f  mek kel  t form  ban val   megk  t  s  nek az lehet a hat  sa, hogy intracellul  risan blokkolják a hidroxil-gy  k k  pz  d  st a Haber-Weiss-Fenton reakci   r  v  n.

(Saran, M.   s m  rsai, Radical reactions in vivo - an overview", Radiat. Environ. Biophys. 29(4) 249-62 (1990)).

Jelenleg egy dito-karbamátot haszn  ln  k az alkoholfüggőség kezelésére, ez a disulfuram, ami egy dietil-ditio-karbonát dimer. A disulfuram gátolja a máj aldehyd-dehidrogenázt (Inoue, K.   s m  rsai, "Effect of disulfuram and its reduced metabolite, diethyldithiocarbamate on aldehyde dehydrogenase of human erythrocytes", Life Sci. 30(5): 419-24 (1982)).

Leírták azt is, hogy a ditio-karbamátok gátolják a HIV vírus replikációt és ugyancsak fokozzák specifikus T sejt

alpopulációk érlelődését. Ez vezetett oda, hogy a dietil-ditio-karbamátot klinikai vizsgálatoknál alkalmazzák AIDS betegek-nél (Reisinger, E. és mtársai, "Inhibition of HIV progression by dithiocarb" Lancet 335: 679 (1990)).

A fentiek alapján a találmányunk ateroszklerózis és más kardiovaszkuláris és gyulladásos begeteségek kezelésére vonatkozik.

Vonatkozik továbbá a találmány az ateroszklerózis és kardiovaszkuláris és gyulladásos betegségek kezelésére alkalmas gyógyszerkészítményekre is.

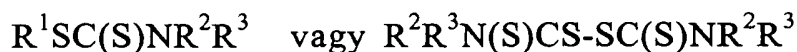
Vonatkozik továbbá a találmány készítményekre és eljárásra, amelyek blokkolják a sejtek azon képességét, hogy olyan géntermékeket expreszszáljanak, amelyek felelősek a leukocitáknak a sejtekhez való tapadásához, valamint a sejtek aktiválásáért.

Felismertük, hogy a ditio-karboxilátok és különösen a ditio-karbamátok blokkolják az endoteliális sejtfelületi adhéziós molekula, a VCAM-1 indukált expresszióját és ily módon alkalmazhatók ateroszklerózis, érplasztika utáni resztenózis, koronáriás, artériás betegségek, angina és más kardiovaszkuláris betegségek, valamint nem-kardiovaszkuláris gyulladásos betegségek kezelésére, amelyeket a VCAM-1 közvetít.

Igen fontos, hogy bizonyos ditio-karbamátok, így például a nátrium-pirrolidin-N-ditio-karbamát (PDTC) szignifinkáns mértékben nem blokkolja az egyéb endoteliális sejtfelületi adhéziós molekulák, így például az ICAM-1 vagy ELAM-1 indukált expresszióját és ily módon nem befolyásolja ellentétesen azokat a gyulladásos válaszokat, amelyeket a VCAM-1 nem

közvetít. Felismertük továbbá azt is, hogy a PDTC jelentős mértékben toxikus a vaszkuláris simaizomsejtek szaporodására vagy abnormális osztódására. Egy másik ditio-karbamát a nátrium-N-metil-N-karboxi-metil-N-karboditioát ugyancsak gátolja a VCAM-1 expresszióját anélkül, hogy szignifikáns hatással lenne az ICAM-1-re, de nem fejt ki kiemelt toxicitást a vaszkuláris simaizomsejtek abnormális osztódására. Egyéb aktív ditio-karbamátok azon képességét, hogy szelektíven gátolják a VCAM-1 expresszióját (anélkül, hogy gátolnák az ELAM-1 vagy ICAM-1 expresszióját), valamint azt, hogy kiemelten toxikusak az abnormálisan osztódó simaizomsejtekre, a következőkben leírt módszerekkel vizsgáltuk.

A találmány szerinti, az ateroszklerózis és más kardiovaszkuláris és gyulladásos betegségek kezelésére alkalmazható ditio-karbamátokat a korlátozás szándéka nélkül a következő képletekkel írjuk le:



a képletekben

R^1 jelentése hidrogénatom vagy gyógyászatilag elfogadható kation, előnyösen nátrium vagy kálium, vagy $NR^4R^5R^6R^7$ általános képletű csoport, amely képletben

R^4 , R^5 , R^6 és R^7 jelentése egymástól függetlenül hidrogénatom, 1-6 szénatomos, lineáris, egyenes vagy elágazó láncú vagy ciklusos alkilcsoport, hidroxil-1-6 szénatomos alkilcsoport, ahol egy vagy több hidroxilcsoport kapcsolódhat bármelyik szénatomhoz, vagy arilcsoport, és

R^2 és R^3 jelentése egymástól függetlenül 1-10 szénatomos egyenes vagy elágazó láncú vagy ciklusos alkilcsoport

$-(CHOH)_n(CH_2)_nOH$ csoport, ahol n értéke 0, 1, 2, 3, 4, 5 vagy 6, $-(CH_2)_nCO_2R^1$ vagy $-(CH_2)_nCO_2R^4$ általános képletű csoport, hidroxil-1-6 szénatomos alkilcsoport vagy R^2 és R^3 együttesen egy hidat képeznek, amely lehet egy $-(CH_2)_m$ általános képletű csoport, ahol m értéke 3-6, és

R^4 jelentése alkil-, aril-, alkaril- vagy aralkil-csoport, előnyösen acetyl-, propionil-, vagy butiril-csoport.

Az említett aktív ditio-karboxilátokat és különösen a ditio-karbamátokat alkalmazhatjuk akut és krónikus, a VCAM-1 által közvetített gyulladásos betegségek kezelésére, ezek a korlátozás szándéka nélkül lehetnek rheumatikus és oszteoarthritisz eredetűek, lehet továbbá asztma vagy dermatitisz, továbbá alkalmazhatók sclerosis multiplex kezelésénél is.

A vegyületek egyaránt alkalmazhatók a kardiovaszkuláris betegségek primer vagy kapcsolt kezelésére. Kapcsolt kezelés esetén olyan szerekkel alkalmazhatók kombinációban például, amelyeket a betegségek rizikójának csökkentésével alkalmaznak az LDL és szérumban koleszterinszint csökkentésére. A találmány szerinti alkalmazásnak a kardiovaszkuláris betegségek kezelésénél az a különleges előnye, hogy az túlmegy a jelenlegi terápiákon, amelyeket egyszerűen a betegség progressziójának gátlására alkalmaznak és lehetővé teszi a megfelelő alkalmazással, hogy orvosilag kezeljék az ateroszklerózist azáltal, hogy megakadályozza az új sérülések kifejlődését és a már meglévő sérüléseket visszafejleszti. A vegyületek alkalmazhatók a kis véredény betegségek kezelésére is, amelyek nem kezelhetők se-

bérszi vagy érplasztikai úton vagy más olyan véredény beteségek esetén, ahol a sebészi beavatkozás nem megoldás. A vegyületek alkalmazhatók továbbá a betegek stabilizálására a revaszkularizációs terápiát megelőzően.

Az aktív vegyületeket vagy azok keverékét bármilyen megfelelő módon adagolhatjuk, így például orálisan vagy intravénásan. A dózis általában 0,5-500 mg/testtömeg kg közötti érték és a dózis adagolását a naponként kétszeri adagolási gyakoriságtól a két naponkénti adagolási gyakoriságig végezzük. Az adagolás hossza is széles határok között változhat és egyetlen dózistól, amelyet naponta egyszer vagy kétszer adagoltak, egészen a 2-6 hónapig történő adagolásig terjedhet.

A vegyületeket adagolhatjuk közvetlen az érfalba is, perfúziós ballon-katéter alkalmazásával a koronáriás vagy más artériás érplasztikát követően vagy ahelyett. Például 2-5 ml fiziológiás sóoldatot adagolhatunk 1-5 atmoszférikus nyomáson, amely sóoldat 100 μ mól mennyiségű vegyületet vagy vegyület keverékét tartalmaz. Ezután a következő 6 hónapos periódus során, amikor a restenosis rizikója a legnagyobb, az aktív vegyületeket más megfelelő módon és dózisban adagoljuk.

Relative rövid ideig tartó kezelést alkalmaznak az aktív vegyületekkel az olyan koronáriás artériás sérülések “zsugorítására”, amelyek érplasztikával vagy sebészi beavatkozással nem kezelhetők. Ilyen rövid idejű kezelésnél például a korlátozás szándéka nélkül 2-6 hónapon át 0,5-500 mg/kg hatóanyagot adagolnak kétnaponkénti egyszeri-től a napi háromszori adagolásig terjedő gyakorisággal.

A hosszabb ideig tartó kezelést alkalmazzuk a nagy rizikó faktorú betegeknek a sérülések kialakulásának megakadályozására. A hosszú ideig tartó kezelés évekig tarthat, a dózis 0,5-500 mg/kg és az adagolási intervallum a kétnaponkénti egyszeri adagolástól a napi háromszori adagolásig terjed. A hatóanyagokat adagolhatjuk közvetlenül a koronáriás érplasztikai beavatkozás előtt vagy azt követően, annak érdekében, hogy csökkentsük vagy elimináljuk a proliferatív és gyulladásos válaszok kialakulását, amelyek általában a klinikailag szignifikáns restenosis-hoz vezetnek.

A hatóanyagot adagolhatjuk együtt más szerekkel is, amelyeket a kardiovaszkuláris betegségek kezelésénél alkalmaznak, ilyenek például a következők: lipidcsökkentő szerek, így például nobukol és nikotinsav, vérlemezkeaggregációt gátlók, így például az aszpirin, antitrombotikus szerek, így például a coumadin, kalciumcsatorna blokkolók, így például varapamil, diltiazem és nifedipin, angiotenzin konvertáló enzim (ACE) inhibitorok, így például captopril és enalapril, továbbá β -blokkolók, így például propanolol, terbutanol és labetalol. A vegyületeket adagolhatjuk továbbá nem-szteroid gyulladásgátló szerekkel együtt is, ilyenek például az ibuprofen, indometacin, fenoprofen, mefenaminsav, flufenaminsav vagy szulindak, továbbá adagolhatjuk kortikoszteroidokkal együtt is.

Az 1. ábrán az alábbiakban ismertetett módon előállított mRNS autoradiogramját mutatjuk be, az mRNS-t vagy 32 P-jelzett humán VCAM-1 specifikus cDNS-hez (A panel) E-szelektin (ELAM-1) specifikus cDNS-hez (panel B) vagy ICAM-1-specifikus cDNS-hez (panel C) hibridizáltuk. Egy 30

perces 50 μmol nátrium-pirrolidin-ditiokarbamáttal (PDTC) végzett kezelés után a HUVE (humán köldök véna) sejteket IL-1b hatásnak tettük ki (10 U/ml) 50 μmol PDTC folyamatos jelenlétében. A parallel végzett kontroll kísérletet hasonlóképpen végeztük, kivéve, hogy PDTC-t nem alkalmaztunk. A megjelölt időpontokban az összes RNS-t izoláltuk, és 20 μg 1%-os agaróz-formaldehid gélelektroforézis denaturálással méret-frakcionált anyagot mikrocellulózra vittük, a fentiek szerint hibridizáltuk, majd autoradiográfiával láthatóvá tettük. Sáv 1 - 0 óra, sáv 2, 4, 6, 8-0l-1 önmagában 2, 4, 8 és 24 órán át, sáv 3, 5, 7, 9 -IL-1 PDTC-vel 2, 4, 8, illetve 24 óráig.

A 2. ábrán az alábbiakban ismertetett módon előállított mRNS autoradiogramját mutatjuk be, amelyet ^{32}P -jelzett humán VCAM-1 specifikus cDNS-hez (panel A), E-szelektin (ELAM-1) specifikus cDNS-hez (panel B) vagy ICAM-1 specifikus cDNS-hez (panel C) hibridizáltuk. A HUVE sejteket a megadott koncentrációjú PDTC-vel előkezeltük, majd IL-1b hatásának tettük ki PDTC jelenlétében 4 órán át, majd vizsgáltuk a VCAM-1 mRNS akkumulációját Northern szűrő hibridizációs analízissel. Sáv 1 -kontroll, sáv 2 -IL-1 (U/ml), sáv 3 -IL-1b + PDTC (0,05 μmol), sáv 4 -IL-1 LB+PDTC (0,5 μmol), sáv 5 -IL-1b+PDTC (5 μmol), sáv 6 -IL-1b+PDTC (50 μmol), sáv -IL-1b+PDTC (100 μmol).

A 3. ábrán az alábbiakban ismertetett módon előállított mRNS autoradiogramját mutatjuk be, amelyet ^{32}P -humán VCAM-1 specifikus cDNS-hez (panel A), E-szelektin (ELAM-1) specifikus cDNS-hez (panel B) vagy ICAM-1 specifikus cDNS-hez (panel C) hibridizáltunk. A HUVE sejteket az

1. ábra ismertetésénél leírt módon előkezeltük 50 μ mól PDTC-vel, majd 4 órán át az alábbiakban ismertetett szerek hatásának tettük ki, majd vizsgáltuk a VCAM-1 (panel A) és ICAM-1 (panel B) mRNS akkumulációt. Sáv 1 -TNFa (100 U/ml), sáv 2 -THFa+PDTC, sáv 3 -lipopoliszacharid (LPS) (100 ng/ml), sáv 4 -LPS+PDTC, sáv 5 -poli(I:C) (100 mg/ml), sáv 6 poli(I:C)+PDTC.

A 4. ábrán bemutatjuk a VCAM-1 és ICAM-1 relatív sejtfelületi expresszióját PDTC jelenlétében (sötét oszlopok) vagy anélkül (fehér oszlopok) több különböző típusú indukáló inger jelenlétében. Az összefolyó HUVE sejteket vagy előkezeltük, vagy nem (CTL csak) 30 percig 50 μ mól PDTC-vel, majd a megadott ideig a megadott szerek hatásának tettük ki PDTC jelenlétében vagy anélkül (CTL csak). A sejtfelületi expressziót VCAM-1 specifikus (4B9) és ICAM-1 specifikus (80H10) egér monoklón antitestek primer kötésével, majd ezt követően tor-ma-peroxidáz kecske anti-egér (IgG) szekunder kötésével határoztuk meg. A kvantitatív értékelést a TMB kalorimetrikus konverziójának meghatározásával végeztük 450 nm-nél. A 4. ábrából kitűnik, hogy több szabályozó jel indukálja a VCAM-1-et, de nem indukálja az ICAM-1-et a szokásos ditio-karbamát érzékeny út révén a humán vaszkuláris endoteliális sejtekben.

Az 5. ábrán bemutatjuk a relatív VCAM-1 sejtfelületi expressziót (O.D. 595 nmól) humán köldök véna endoteliális sejtekben, TNFa-val aktiválva a különböző antioxidáns koncentrációk függvényében. (A PDTC nátrium-N-pirrolidin-ditio-karbamát, a DETC nátrium-N,N-dietil-N-karbo-ditiolát, ezt

nátrium-dietil-ditio-karbamátként is említik, az NAC N-acetil-cisztein és a DF dezferoximin).

A 6. ábrán látható a relatív VCAM-1 sejtfelületi expresszió (O.D. 595 nm) humán köldök véna endoteliális sejtekben, TNFa-val aktiválva, a megadott mennyiségű antioxidánsok jelenlétében. A PDTC nátrium-N-pirrolidon-N-ditiokarbamát, a DIDTC nátrium-N,N-dietil-N-karboditioát, az SarDTC nátrium-N-metil-N-karboxi-metil-N-karboditioát, az IDADTC trinátrium-N,N-di(karboxi-metil)-N-karboditioát, az MGDTC nátrium-N-metil-D-glükamin-N-karboditioát, az MeOBGDTC nátrium-N-(4-metoxi-benzil)-D-glükamin-N-karboditioát, a DEDTC nátrium-N,N-dietil-N-karboditioát, a Di-PDTC nátrium-N,N-diizopropil-L-karboditioát, az NAC N-acetil-cisztein.

A 7. ábrán bemutatjuk a HUVE sejtekhez kötődött Molt-4 sejtek százalékos mennyiségét TNFa-val (100 U/ml) stimulálva vagy nem stimulálva 6 órán át, PDTC jelenlétében vagy anélkül.

A 8. ábrán a következő aktív ditio-karbamátok képletét mutatjuk be: (1) nátrium-pirrolidin-N-karboditioát, (2) nátrium-N-metil-N-karboxi-metil-N-karboditioát, (3) trinátrium-N,N-di(karboxi-metil)-N-karboditioát, (4) nátrium-N-metil-D-glükamin-N-karboditioát, (5) nátrium-N-(4-metoxi-benzil)-D-glükamin-N-karboditioát, (6) nátrium-N,N-dietil-N-karboditioát (nátrium-dietil-ditio-karbamát), és (7) nátrium-N,N-diizopropil-N-karboditioát.

A találmány szerinti vegyületekkel kapcsolatban az alkilcsoport, hacsak másképp nem jelöljük, telített, egyenes vagy elágazó láncú vagy ciklusos 1-10 szénatomos szénhidrogéncsoport-

tokat jelent, különösen metil-, etil-, propil-, izopropil-, butil-, izobutil-, terc-butil-, pentil-, ciklopentil-, izopentil-, neopentil-, hexil-, izohexil-, ciklohexil-, 3-metil-pentil-, 2,2-dimetil-butil- vagy 2,3-dimetil-butil-csoport.

Az alkenilcsoport, hacsak másképp nem jelöljük egyenes vagy elágazó láncú vagy ciklusos 2-10 szénatomos szénhidrogéncsoportot jelent, amely legalább egy kettőskötést tartalmaz.

Az alkinilcsoport, hacsak másképp nem jelöljük, 2-10 szénatomos egyenes vagy elágazó láncú szénhidrogéncsoportot jelent, amely legalább egy hármaskötést tartalmaz.

Az aralkilcsoport arilcsoportot jelent, amely legalább egy alkilcsoportot tartalmaz szubsztituensként.

Az alkarilcsoport alkilcsoportot jelent, amely legalább egy arilcsoportot tartalmaz szubsztituensként.

A halogén- (alkil-, alkenil- vagy alkinil-)-csoport olyan alkil-, alkenil- vagy alkinil-csoportot jelent, amelyekben legalább egy hidrogénatom helyén halogénatom van.

Az arilcsoport, hacsak másképp nem jelöljük fenil- vagy szubsztituált fenilcsoportot jelent, ahol a fenilcsoporton lévő egy vagy több szubsztituens valamely következő csoport: hidroxil-, CO_2H vagy gyógyászatilag elfogadható sója, $\text{CO}_2(\text{alkil})$ -, alkoxil-, alkil- vagy glükamincsoport.

Az alkoxics csoport, hacsak másképp nem jelöljük -O-csoportot jelent.

A halogénatom jelentése fluor-, klór-, bróm- vagy jódatom.

A hidroxil-alkil-csoport 1-6 szénatomos alkilcsoportot jelent, amelyben legalább egy hidrogénatom bármelyik szénatomon hidroxilcsoporttal van helyettesítve.

A tiol-antioxidáns kifejezés kéntartalmú vegyületre utal, amely lassítja az oxidációt.

A gyógyászatilag elfogadható származék kifejezés olyan származékra utal, amely adagolás után közvetve vagy közvetlenül az anyavegyületté alakul vagy annak aktivitásával rendelkezik.

I. Aktív vegyületek

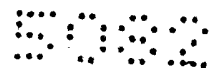
Felsimertük, hogy a ditio-karboxilátok alkalmazhatók az ateroszklerózis és más kardiovaszkuláris és gyulladásos betegségek kezelésére. A ditio-karboxilátok, beleértve ditio-karbamátokat is, alkalmazható a sejtek, beleértve az endoteliális sejteket is, azon képességének blokkolására, hogy expresszálják a VCAM-1-et, amely egy gén termék és amely felelős a leukocitáknak a sejtekez való tapadásáért. Az a tény, hogy a ditio-karboxilátok, beleértve a ditio-karbamátokat is, gátolják a VCAM-1 gén expresszióját, erőteljesen aláhúzza az oxidáció fontosságát abban, hogy az egy kezdedeti jel a megváltoztatott ér-gyulladásos sejt kölcsönhatásokban. A specifikus molekuláris mechanizmus, amellyel a ditio-karboxilátok hatnak a VCAM-1 gén expresszió gátlásában, nem ismert.

Legalább egy a vegyületek közül, a nátrium-pirrolidin-ditiokarbamát (PDTC) A VCAM-1 gén expressziót kisebb mint 1 μ mól mennyiségben gátolja. Ez a vegyület továbbá kifejezett toxicitást mutat a vaszkuláris simaizom sejtek szaporodására vagy abnormális osztódására. Felismertük, hogy a nátrium-pirrolidin-ditio-karbamát szignifikáns mértékben nem blokkolja az ELAM-1 vagy ICAM-1 expressziót és így módon az ezen vegyülettel végzett kezelés ellentétesen nem befolyásolja az ELAM-1 vagy ICAM-1 által közvetített gyulladásos válaszokat. Így az általánosított

immunoszuppresszió elkerülhető. Ez elkerülheti az adhéziós molekulák általános gátlásából eredő szisztémás komplikációkat számos más sejttípus esetén is, amelyekről ismert, hogy azokat expresszálják.

A ditio-karboxilátok az A-SC(S)-B szerkezetnek felelnek meg és azon általános vegyületcsoportnak tagjai, amelyek tiol-antioxidánsként ismertek és ezeket még karboditiolként vagy karboditiolátként is említjük. Úgy tűnik, hogy az SC(S) molekularész a lényeges a terápiás aktivitás szempontjából és az A és B jelentése lehet bármilyen csoport, amely hátrányosan nem befolyásolja a vegyület hatását vagy toxicitását. Az A és B csoportot a szakterületen jártas szakember választhatja meg úgy, hogy a kívánt jellemzőjű vegyületet nyerje, beleértve a vegyület méretét, töltését, toxicitását, valamint a stabilitás mértékét (beleértve a stabilitást savas környezetben, így például a gyomorban, vagy bázikus környezetben, így például a béltraktusban). Az A és B megválasztásának továbbá fontos szerepe van a vegyület szövetben való eloszlásában, valamint a farmakokinetikai tulajdonságokban is. Általában a kardiovaszkuláris betegségek kezelésénél kívánatos, hogy a vegyület a vaszkuláris endoteliális sejteket tartalmazó artéris intimális rétegben akkumulálódjon vagy lokalizálódjon. A vegyületek előnyösen vesén keresztül eliminálódnak.

Nem korlátozó példaként az A és B csoport jelentése lehet például egymástól függetlenül valamely következő csoport: alkil-, alkenil-, alkinil-, alkaril-, aralkil-, halogén-alkil-, halogén-alkenil-, halogén-alkinil-, aril-, alkaril-, hidrogén-, 1-6 szénatomos alkoxi-1-10 szénatomos alkil-, 1-6 szénatomos alkil-tio-1-10 szénatomos alkil-, 1-10 szénatomos szubsztituált alkil- (ahol a



szubsztituens jelentése lehet egymástól függetlenül hidroxil-, karbonil-, vagy karbonsav-csoport bármelyik szénatomon), NR^2R^3 , $-(\text{CHOH})_n\text{CH}_2\text{OH}$ csoport, ahol n értéke 0, 1, 2, 3, 4, 5 vagy 6, $-(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2\text{R}^1$ csoport, beleértve az acetil-, propionil- vagy butiril-csoportot, hidroxil-1-6 szénatomos alkil- (ahol az egy vagy több hidroxilcsoport bármelyik szénatomhoz kapcsolódhat), továbbá A jelentése lehet egy gyógyászatilag elfogadható kation, előnyösen például nátrium vagy kálium vagy $\text{NR}^4\text{R}^5\text{R}^6\text{R}^7$ csoport is. Egy másik kiviteli formánál dimert, így például B-C(S)S-SC(S)-B vegyületet is adagolhatunk.

A ditio-karboxilátokat az ateroszklerózis és más kardio-vaszkuláris és gyulladásos betegségek kezelésénél úgy kell megválasztani, hogy a megfelelő lipofilicitásúak legyenek, hogy a beteg részénél lokalizálódjanak. A vegyület nem kerülhet be az alacsony átmeneti szakaszokba, így például a zsírlerakódásokba. A kardiovaszkuláris betegségek kezelésének egy előnyös kiviteli formájánál a vegyület farmakokinetikai tulajdonságait nem befolyásolhatja nagyobb mértékben a pangásos szívelégtelenség vagy veseelégtelenség.

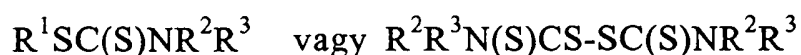
A ditio-karboxilát fiziológiailag elfogadható kell, hogy legyen. Általában a vegyület terápiás indexe legalább 2, előnyösen 5 vagy 10. A terápiás index jelentése $\text{EC}_{50}/\text{IC}_{50}$, ahol EC_{50} jelentése az a vegyületkoncentráció, amely 50%-os értékben gátolja a VCAM-1 expresszióját és IC_{50} jelentése az a vegyületkoncentráció, amely 50%-ban toxikus a célsejtre nézve. A celluláris toxicitást meghatározhatjuk közvetlenül a sejtek számának meghatározásával, továbbá trypan kék kizárással, vagy különböző metabolikus aktivitás vizsgálatokkal, így például 3H-timidin



inkorporációval, ezek a szakember számára ismertek. A PDTC terápiás indexe szövet kultúrákban 100 fölötti érték, ezt úgy határoztuk meg, hogy a sejt toxicitást osztottuk a TNFa-val aktivált VCAM-1 expresszió gátlásával HUVE (humán köldök véna) sejtek esetén. A gyorsan osztódó HT-18 humán glioma sejtípusok esetén végzett vizsgálatok nem mutattak ki toxicitást a terápiás koncentrációnál 100-szor nagyobb koncentráció esetén sem. Az orálisan adagolható dietil-ditio-karbamát a disulfiram, amelyet orális adagolással alkalmaznak alkoholfüggőség kezelésére, általában nem fejt ki lényeges klinikai toxicitást ha megfelelően adagolják.

Ismertek ugyanakkor bizonyos ditio-karbamátok, amelyek genotoxikusak. Ezek a vegyületek nem esnek a találmány oltalmi körébe, amely csak a fiziológiailag elfogadható anyagok alkalmazására vonatkozik. Ilyen genotoxikus ditio-karbamát például a fungicid hatású cink-dimetil-ditio-karbamát. Továbbá, bizonyos ditio-karbamátok anti-kolineszteráz tulajdonságai neurotoxikus hatásokat eredményezhetnek (Miller, D., Neurotoxicity of the pesticidal carbamates, Neurobehav. Toxicol. Teratol. 4(6): 779-87 (1982)).

A találmány szerint alkalmazható ditio-karboxilátok közé tartoznak a korlátozás szándéka nélkül például a következő képletű ditio-karbamátok:



a képletekben

R^1 jelentése hidrogénatom vagy gyógyászatilag elfogadható kation, előnyösen nátrium vagy kálium, vagy $NR^4R^5R^6R^7$ általános képletű csoport, ahol R^4 , R^5 , R^6 és R^7 jelentése

egymástól függetlenül hidrogénatom, 1-6 szénatomos egyenes vagy elágazó láncú vagy ciklusos alkil-, hidroxil-1-6 szénatomos alkil- (ahol egy vagy több hidroxilcsoport helyezkedik el bármelyik szénatomon) vagy aril-csoport, és R^2 és R^3 jelentése egymástól függetlenül 1-10 szénatomos egyenes vagy elágazó láncú vagy ciklusos alkil-,
 $-(CHOH)_n(CH_2)_nOH$, ahol n értéke 0, 1, 2, 3, 4, 5 vagy 6,
 $-(CH_2)_nCO_2R^1$, $-(CH_2)_nCO_2R^4$ általános képletű csoport,
 hidroxil-1-6 szénatomos alkil-csoport vagy R^2 és R^3 együttesen egy hidat képeznek, amely lehet $-(CH_2)_m$ csoport, ahol m értéke 3-6, és R^4 jelentése alkil-, aril-, alkaril- vagy aralkil-csoport, így például acetyl-, propionyl- vagy butyryl-csoport.

Közelebbről említjük a 8. ábrán bemutatott ditio-karbamátokat: (1) nátrium-pirrolidin-N-karboditioát, (2) nátrium-N-metil-N-karboxi-metil-N-karboditioát, (3) trinátrium-N,N-di(karboxi-metil)-N-karboditioát, (4) nátrium-N-metil-D-glükamin-N-karboditioát, (5) nátrium-N-(4-metoxi-benzil)-D-glükamin-N-karboditioát, (6) nátrium-N,N-diethyl-N-karboditioát (nátrium-diethyl-ditio-karbamát), és (7) nátrium-N,N-diisopropyl-N-karboditioát.

Az aktív ditio-karboxilátok és különösen a ditio-karbamátok kereskedelmi forgalomban beszerezhetők vagy ismert módszerekkel előállíthatók.

Molekuláris szinten a PDTC-ről kimutattuk, hogy gátolja az NF- κ B transzkripció szabályozó faktor aktiválását bizonyos citokin és nem-citokin ingerekre válaszképpen (Schreck, R., és társai, "Reactive oxygen intermediates as apparently widely used

messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1", EMBO J. 10(8): 2247-58 (1991); Schreck, R., és mátrai, "Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear factor B activation in intact cells", J. Exp. Med. 115:1181-1194 (1992)).

Azonban a HUVE sejtmag extraktumok különböző kB-szerű fokozó motifokkal végzett gél mobilitásos eltolási vizsgálatánál felismertük, hogy az endoteliális sejtek a VCAM-1 expresszióját egy látszólag új, Nf-kB-től eltérő transzkripciós szabályozó faktoron keresztül aktiválják. Ez azt sugallja, hogy a PDTC szabályozhatja az endoteliális sejt gén expresszióját az új transzkripciós szabályozó proteinra kifejtett hatásán keresztül. Kimutattuk azt is, hogy a VCAM-expressziót tenyésztett Kaposi szarkóma sejtekben több faktor indukálja, amelyek fontosak lehetnek a patogenézisében. A PDPC blokkolja VCAM-1 expressziót Kaposi szarkóma sejtekben, amelyeket TNF, IL-1 és poli(I:C) anyagokkal aktiváltunk.

Felismertük azt is, hogy a simaizom sejtek a VCAM-1 oldható formáját termelik, amelyeket a sejtek kiválaszthatnak és amely természetes antihisztaminként hathat.

II. Biológiai aktivitás

A ditio-karboxilátok azon képességét, hogy gátolják a VCAM-1 expresszióját, különböző módon határozhatjuk meg, ilyenek azok a módszerek, amelyeket részletesen az 1-7. példákban ismertettünk. Az 1-3. és 6-7. példákban a nátrium-pirrolidin-N-karboditioát (PDTC) biológiai aktivitását mutatjuk be. Ezekkel a példákkal azonban nem kívánjuk a találmány oltalmi körét korlátozni, ebbe beletartozik bármely fentiekben ismertetett vegyület alkalmazása a VCAM-1 által közvetített ateroszklerózis és más

5032

.

.



gyulladásos és kardiovaszkuláris betegségek kezelésére. Bármely fentiekben említett vegyülettel a PDTC helyettesíthető és hasonló módon értékelhető.

A 4. és 5. példákban összehasonlító adatokat mutatunk be különböző ditio-karbamátoknak a VCAM-1 gén expressziót gátló hatására vonatkozóan. A példákból kitűnik, hogy a találmány szerinti ditio-karbamátok specifikusan blokkolják a VCAM-1 vaszkuláris sejtek által történő expresszáldását, ami az ateroszklerózis és gyulladásos válasz esetén aktívként ismert számos jelzésre következik be.

Kísérleti eljárások

Sejtkultúrák: a HUVE sejteket humán köldök vénából izoláltuk, kanüleztük, Hanks oldattal átöblítettük a vér eltávolítására, majd 1% kolagenáz jelenlétében 15 percig 37°C hőmérsékleten inkubáltuk. Ezután a kollagenázt eltávolítottuk, és a sejteket a következő összetételű közegben tenyésztettük: M199 közeg a következőkkel kiegészítve: 20% szarvasmarha embrió szérum (HyClone), 16 µg/ml heparin (ESI Pharmaceutical, Cherry Hill, NJ), 50 µg/ml endoteliális sejt növekedési kiegészítő (Collaborative Research Incorporated, Bedford MA), 25 mmól Hepes puffer, 2 mmól L-glutamin, 100 µg/ml penicillin és 100 µg/ml sztreptomycin, a tenyésztést 37°C hőmérsékleten szövettényészeti lemezen végeztük, amelyet 0,1% zselatinnal borítottunk. A sejteket 1:4 osztással összefolyásig passzáltuk. Az első nyolc passzálnál nyert sejteket alkalmaztuk.

Citokinekkal és más reagensekkel végzett inkubálás: az összefolyt HUVE sejteket foszfáttal pufferált sóoldattal mostuk, majd új tápközeget adagoltunk. A megadott PDTC koncentrációkat



adagoltuk előkezelésként 30 perccel a cytokinek adagolása előtt. A cytokineket és egyéb kiváltókat közvetlenül a közeghez adagoltuk a megadott időn át és a megadott koncentrációkban. A humán rekombináns IL-1b-t az Upjohn Company (Kalamazoo, MI) nagylelkű ajándékaként kaptuk. A TNFa-t a Bohringer Engelheim cégtől szereztük be, a bakteriális lipopoliszacharidot (LPS), a poliinozinsav:policitidilinsav (Poly I:C) anyagot és a pirrolidin-ditiokarbamátot (PDTC) a Sigma Chemical cégtől (St. Louis, MO) szereztük be. Az összes többi reagens reagens tisztaságú volt.

RNS izolálás: az összes celluláris RNS-t egyetlen extrakcióval választottuk el, ehhez savas guanidinium-tiocianát-fenol-klorofom keveréket alkalmaztunk. A sejteket foszfáttal pufferolt sóoldattal öblítettük, majd 2 ml guanidim-izotiocianáttal lizáltuk. Az oldatot 0,2 ml nátrium-acetáttal megsavanyítottuk (pH=4), majd 2 ml fenollal és 0,4 ml klorofom:izoamil-alkohol eleggyel (24:1) extraháltuk. Az RNS-t kétszer etanolal kicsaptuk, mielőtt a Northern blot analízishez alkalmaztuk.

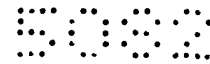
Northern blot analízis: az összes celluláris RNS-t (20 µg) méret-frakcionáltuk, ehhez 1% agaróz formaldehid gélt alkalmaztunk 0,1 µg/ml etidium-bromid jelenlétében. Az RNS-t nitrocellulóz szűrőre vittük át és kovalensen kötöttük ultraviola besugárzással Stratlinker UV térhálósító alkalmazásával (Tratagene, LA Jolla, CA). A hibridizációt 42°-on 18 órán át végeztük 5X SSC (1X=150 mmól NaCl, 15 mmól Na-citrát), 1% nátrium-dodecil-szulfát, 5X Denhart oldat, 50% formamid, 10% dextrán-szulfát és 100 µg/ml vágott denaturált lazac sperma DNS jelenlétében. Kb. $1-2 \times 10^6$ cpm/ml jelzett próbát (specifikus aktivi-

tás $> 10^8$ cpm/ μ g DNS) alkalmaztunk minden hibridizációnál. A hibridizációt követően a szűrőket 0,2XSSC végső mennyiséggel átmostuk 55°C hőmérsékleten. A nitrocellulózt forró víz alkalmazásával tisztítottuk, a többi mintával való rehibridációt megelőzően. Az autoradiográfiát egy intenzifikáló szűrővel végeztük -70°C hőmérsékleten.

Minták: a 32 P jelzett DNS mintákat random primer oligonukleotid módszerrel készítettük. Az ICAM-1 minta humán cDNS Eco R1 fragmense volt, az ELAM-1 minta humán cDNS 1,85 kb Hind III fragmense, a VCAM-1 minta 132-1814-ig terjedő nukleotidot tartalmazó humán cDNS Hind III-Xho I fragmense volt.

Enzim-kapcsolású immunoszorbens vizsgálat (ELISA): a HUVE sejteket 96-lyukú szövettenyésztő lemezre vittük 48-72 órával a vizsgálat előtt. Minden lyukba primer antitesteket adagoltunk M199 közegben, amely még 5% FBS-t tartalmazott és 37°C hőmérsékleten 1 órán át inkubáltuk. A sejteket ezután mostuk és további 1 órán át kecske anti-egér IgG-vel (Bio Rad) konjugált peroxidázzal inkubáltuk, amelyet 1/500 arányban M199+5%FBS tápközeggel hígítottunk. A lyukakat ezután mostuk és az antitestek kötődését detektáltuk 100 μ l mennyiségű 10 mg/ml 3,3,5,5'-tetrametil-benzidil (Sigma) plusz 0,003% H_2O_2 adagolásával. A reakciót 25 μ l 8 n kénsav adagolásával állítottuk le. A lemezeket ELISA leolvasó berendezéssel (Bio Rad) értékeltük OD 450 nm-nél miután kivágtuk a sorokat, amelyeket csak második lépés antitesttel festettünk. Az adatok három párhuzamos mérés átlagát jelentik.

Antitestek: a vaszkuláris sejt adhéziós molekula-1-et (VCAM-1) felismerő monoklón antitest (Mab) 4B9 Dr. John



Harlan nagylelkű ajándéka volt (University of Washington). Az endoteliális sejt adhéziós molekulát (ELAM-1) felsimerő MAb E9A1F1 Dr. Swerlick (Emory University) nagylelkű ajándéka volt. Az intracelluláris adhéziós molekula-1-et (ICAM-1) felismerő MAb 84H10-et termelő hibridomákat rutinszerűen saját laboratóriumunkban tenyésztettük és az antitestet mint szövettenyészet felülűszót alkalmaztuk.

1. példa

PDTC blokkolja az IL-1b közvetített HUVE sejt VCAM-1 mRNS akkumulációt, de nem blokkolja ICAM-1 vagy ELAM-1 esetén

Annak meghatározására, hogy az endoteliális sejt oxidatív állapota képes-e megváltoztatni a sejtadhéziós molekula gének alap vagy indukált expresszióját, tenyésztett human vaszkuláris endoteliális sejteket indukáló cytokin, IL-1b (10 U/ml) hatásának tettünk ki tiolezzett fémkelátor antioxidáns, pirrolidin-ditiokarbamát jelenlétében (PDTC, 50 μ mól) vagy anélkül max. 24 órán át. Mint az az 1. ábrán látható az IL-1b önmagában (sáv 2,4,6,8,) indukálja a várt gyors és tranziens VCAM-1 (panel 1), E-szelektin (ELAM-1, panel 2) és ICAM-1 (panel 3) mRNS akkumulációt, ennek max. értéke 4 óránál van. Azonban, PDTC jelenlétében az IL-1b - indukált VCAM-1 mRNS akkumuláció erősen gátolva van, több mint 90%-kal (panel A, sáv 3,5,7,9). Ezzel szemben, bár az ELAM-1 IL-1b közvetített indukciója enyhén gátolt 2 és 24 óránál (lásd sáv 2,3,8,9 panel B), a PDTC nem gátol 4 és 8 óránál (sáv 5 és 7, panel B). Az IL-1b közvetített ICAM-1 mRNS akkumuláció nincs befolyásolva (panel B, sáv 3,5,7,9). Ténylegesen az IL-1b közvetített ICAM-1 mRNS akkumulációban gyenge növekedés volt meg-



figyelhető (~30%) (lásd sáv 4 és 5 a panel B-n). Azonos mennyiségű nitrocellulóz-átvitt RNS volt kimutatható sávonként etidium-bromiddal végzett festéssel és vizualizálással.

Dózis-válasz analízist végeztünk annak megállapítására, hogy a PDTC dózis-függően gátolja-e az IL-1b - indukált VCAM-1 gén expressziót. Mint az a 2. ábrából látható, a PDTC egy meredek dózis-válasz görbének megfelelően gátolja az IL-1b által közvetített VCAM-1 gén expressziót (2. ábra, panel A) a kalkulált, kb 10 μmol , EC_{50} értéknél, míg ugyanezen koncentrációnál a PDTC nem gátolja az ELAM-1 expresszió IL-1b által közvetített indukcióját (2. ábra, panel B). Az IL-1b - közvetített ICAM-1 mRNS akkumulációt a PDTC 0,5 μmol -nál nagyobb koncentráció estén növeli (lásd 2. ábra sáv 2 és 4-7. panel C).

Ezek az adatok demonstrálják, hogy az IL-1b hasznosít egy ditiokarboxilát és különösen egy ditiokarbamát érzékeny lépést a jelzőrendszerének részeként a VCAM-1 gén expresszió indukciójában. Az adatok tovább azt is mutatják, hogy ez a ditiokarbamát-érzékeny lépés nem játszik jelentős szerepet az ELAM-1 vagy ICAM-1 gén expresszió IL-1b k közvetített indukciójában.

2. példa

A PDTC blokkolja a HUVE sejt VCAM-1 mRNS akkumulációját több inger esetén

Annak meghatározására, hogy más jól ismert VCAM-1 gén expresszió aktivátorok szintén hasznosítják-e a PDTC-szenzitív lépést, három különböző aktivátorcsoportot vizsgáltunk: egy másik klasszikus receptor-közvetített indukálószer (tumor nekrozis faktor, TNFa), nem-receptor közvetített indukálószer (lipopoliszacharid, LPS) és egy nemrég ismert új indukáló



anyag (kettős szálú RNS, poli(I:C)). Mindhárom esetben a PDTC igen jelentősen gátolta a VCAM-1 mRNS akkumulációt HUVE sejtekben négy óra után (3. ábra, panel A). Bár a TNFa - közvetített ELAM-1 gén expresszió bizonyos mértékig visszanyomott, az LPS és poli(I:C) által közvetített ELAM-1 mRNS akkumuláció nem változott (3. ábra, sáv 3-6, panel B). Az ICAM-1 mRNS akkumuláció indukciója szintén nem változott (3. ábra, panel C). Ezek az adatok azt mutatják, hogy szerkezetileg eltérő, eltérő utakon ható indukálószerke, a szokásos, a VCAM-1 gén expresszióra specifikus szabályozó lépést fejtik ki.

3. példa

A PDTC blokkolja a több inger által indukált VCAM-1 HUVE sejt felületi expresszióját

Annak meghatározására, hogy - hasonlóan az mRNS-éhez - a VCAM-1 endoteliális sejt felületi protein expressziójának indukciója szintén gátolható PDTC-vel, monoklon antitesteket alkalmaztunk az ELISA analízisnél a sejt felületi VCAM-1 és ICAM-1 indukciójának számszerűsítésére tenyésztett HUVE sejtekben. Mint az a 4. ábrán látható a különböző csoportokba tartozó aktiválószerke PDTC nélkül (-PDTC) gyors és tranziens VCAM-1 akkumulációt indukálnak a sejt felületen (bal felső panel), ennek maximuma hat óránál van. PDTC jelenlétében (+PDTC, jobb felső panel), a VCAM-1 sejt felületi expresszióját minden vizsgált szerke jelentős módon gátolja (80-90%). Ezzel szemben a sejt felületi ICAM-1 expresszió indukciója változatlan maradt (alsó jobb és bal panelek).

Ezek az adatok mutatják, hogy az mRNS akkumulációhoz hasonlóan a sejt felületi VCAM-1 expressziót is szelektíve gátolják a

ditiokarbamátok és hogy több csoportja az aktiválószereknek hasonló, ditiokarbamát-szenzitív mechanizmust hasznosít a VCAM-gén expresszió indukálásában.

4. példa

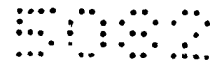
Antioxidánsok hatásosságának összehasonlítása a TNFa-indukált VCAM-1 blokkolásban

Annak meghatározására, hogy a szerkezetileg hasonló vagy nem hasonló antioxidánsok gátolják-e a VCAM-1 gén expresszió indukcióját és ha igen milyen hatékonysággal, HUVE sejteket TNFa hatásnak tettük ki hat órán át különböző koncentrációjú, négy különböző antioxidáns jelenlétében vagy azok nélkül. Mint az az 5. ábrából kitűnik, mind a dietil-ditiokarbamát (DETC), mind az N-acetil-cisztein (NAC) gátolja a VCAM-1 expresszió indukcióját 5 μ mól ill. 30 μ mól koncentrációkban. Ezzel szemben a PDTC 5 és 50 μ mól koncentrációknál volt hatásos. A vas-kelátor, a dezferroximin, a vizsgált koncentrációkban nem volt hatásos

5. példa

A PDTC gátolja a VCAM-1/VLA-4 közvetített adhézió TNF indukcióját

A 4. példában leírt módon vizsgáltuk különböző antioxidánsok képességét a VCAM-1 TNFa indukciójának gátlására HUVE sejtekben. A 6. ábrán bemutatjuk a relatív VCAM-1 sejtfelületi expresszió értékét (O.D.595 nmól) TNFa - aktivált HUVE sejtekben a PDTC (nátrium-N-pirrolidin-ditiokarbamát), DIDTC (nátrium-N,N-metil-dietil-N-karboditioát), SarDTC (nátrium-N-metil-N-karboxi-metil-N-karboditioát), IDADTC (tri-nátrium-N,N-di(karboxi-metil)-N-karboditioát, MGDTC (nátrium-N-metil-D-glükamin-N-karboditioát), MeOBGDTC (nátrium-N-(4-



metoxi-benzil)-D-glükamin-N-karboditioát), DEDTC (nátrium-N,N-dietil-N-karboditioát), Di-PDTC (nátrium-N,N-diizopropil-N-karboditioát) és NAC (N-acetil-cisztein) koncentrációk függvényében. A legkevésbé aktiv vegyület a MeOBGDTC és NAC.

6. példa

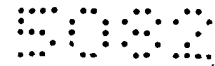
A PDTC gátolja a VCAM-1/VLA-4 közvetített adhézió TNF indukcióját

Annak meghatározására, hogy a VCAM-1 szabályozás PDTC gátlása funkcionális konzekvenciákkal is jár-e, vizsgálatuk Molt-4 sejtek HUVE sejtekhez való kötődését TNFa-val stimulálva (100 U/ml) vagy stimulálás nélkül hat órán át PDTC jelenlétében vagy anélkül. A Molt-4 sejtekről korábban kimutattuk, hogy kötődnek az aktivált HUVE sejtekhez egy VCAM-1 függő mechanizmussal. Mint az a 6. ábrából kitűnik, a HUVE sejtekhez kötött Molt-4 sejtek %-os mennyisége csökkent PDTC jelenlétében.

7. példa

A PDTC gátolja a monociták kötődését a mellkasi aortához koleszterines táppal kezelt nyulak esetén

A kísérletet annak meghatározására végeztük, hogy a tiol antioxidáns PDTC hatásos-e az ateroszklerózis első monocita kötő komponensének blokkolásában kísérleti állat modell esetében. Kifejlett ujjélandi fehér nyúlnak (3,5 kg) naponta egyszer, öt napon át intravénásan PDTC-t adagoltunk (20 mg/kg, 20 mg/ml PBS-ben). Az injekciókat egy állandóra behelyezett kanülön keresztül adagoltuk a marginális füli vénába, amelyet nyitott állapotban tartottunk heparinizált sóoldattal végzett öblítéssel. A PDTC oldatot minden nap vagy minden másnap (fénytől védve tároltuk 4°C-on) frissen készítettük és szűrtük (0,45 mm porusú szűrőn) közvet-



len a felhasználás előtt. Az első injekció után, amikor a kanült behelyeztük, a hatóanyagot a nyúlaknak éber állapotukban adagoltuk észrevehető diszkomfort vagy más hatás megjelenése nélkül. A második napon az állatoknak 1 t% koleszterint tartalmazó tápot adtunk és az etetést a kísérlet hátralevő részében folytattuk. Az 5. napon az állatokat végleg elaltattuk és a mellkasi aortát kimetsztük és fixáltuk. A megfelelő preparálás után a mintát LaB emmitterrel felszerelt ISI DS-130 scanning elektronmikroszkóppal leképeztük. Kettős-szűrős leképező és a CRT szűrőn transzparens rács alkalmazásával 620x-os nagyításnál 64 szomszédos mezőt határoztunk meg, ezek kb. $1,3 \text{ mm}^2$ területet foglaltak el. Mindegyik mezőn belül megszámláltuk és feljegyeztük a feltapadt leukociták (WBC) és eritrociták (RBC) számát. Az ívből származó minták esetén nyert adatok a következők: 5 WBC és ~25 RBC per $1,3 \text{ mm}^2$ területen. A WBC adhézió ezen szintje hasonló a szokásos táppal táplált kontroll állatok szintjéhez (mezőnként kb 7 állapítható meg az ív és mellkasi mintákon 2 "negatív kontroll" kísérletben). A "pozitív kontroll" állatoknak 1% koleszterint adagoltunk 4 napon át, de nem adagoltunk antioxidánst, ezeknél az állatoknál 5-szörös növekedést állapítottunk meg az adhézióban, 38 WBC/ $1,3 \text{ mm}^2$. Minden ívmintához odatapadva, jelentős mennyiségű, tulnyomórészt sejtméretű törmeléklet figyeltünk meg. Nem tisztázott, hogy ez egy változás a készítményben vagy in vivo van jelen, és ha igen kapcsolatban van-e a PDTC adagolással. Ez a tanulmányozás azt sugallja, hogy a PDTC infúzió hatásosan blokkolja a kezdeti monocita adhéziót a mellkasi endoteliumhoz.

III. Gyógyszerkészítmények

VCAM-1 közvetített kardiovaszkuláris elváltozásokban vagy gyulladásos betegségekben szenvedő humán egyedeket és állatokat és különösen emlősöket kezelhünk oly módon, hogy betegeknek egy vagy több fentiek szerinti vegyületet vagy annak gyógyszerészetileg elfogadható származékát vagy sóját adagoljuk gyógyszerészetileg elfogadható hordozóanyaggal vagy hígítóanyaggal elkeverve. A hatóanyagot megfelelő formában, így például orálisan, parenterálisan, intravénásan, intradermálisan vagy szubkután adagoljuk.

A gyógyszerészetileg elfogadható só vagy komplex kifejezés olyan sókra vagy komplexekre utal, amelyek megtartják a fentiekben említett vegyületek biológiai aktivitását és minimális nem kívánatos toxikus mellékhatással rendelkeznek. A korlátozás szándéka nélkül ilyen sóként említjük például a következőket: a) savaddíciós sók, amelyeket valamely következő szervetlen illetve szerves sóval állítunk elő: sósav, hidrogén-bromid, kénsav, foszforsav, salétromsav, illetve ecetsav, oxálsav, borkősav, borostyánkősav, almasav, aszkorbinsav, benzoészav, tanninsav, pamóinsav, alginsav, poliglutaminsav, naftalinszulfonsav, naftalindiszulfonsav, vagy poligalakturonsav, b) bázisokkal képzett addíciós sók, például a következők: többértékű fémkationok, így például cink, kalcium, bizmut, bárium, magnézium, alumínium, réz, kobalt, nikkel, kadmium, nátrium, kálium, stb. vagy N,N-dibenzil-etilén-diamin, D-glükózamin, ammónium, tetraetil-ammónium, vagy etilén-diamin, vagy c) az a) és b) pont kombinációja, így például cink-tannát sók stb.

A hatóanyagot olyan mennyiségű gyógyszerészetileg elfogadható hordozóanyaggal vagy hígítóanyaggal együtt adagoljuk a

betegnek, hogy a kívánt terápiás hatást biztosítsuk komoly toxikus mellékhatások nélkül. A hatóanyag előnyös mennyisége az összes fentiekben említett tünetek esetén általában 0,5-500 mg/kg, előnyösen 1-100 mg/kg naponta. A gyógyszerészetileg elfogadható származékok hatásos mennyiségét az adagolni kívánt anyavegyület tömege alapján számítjuk. Ha a származék önmagában is aktív, a hatásos dózist a fentiek alapján állapítjuk meg a származék tömegének alkalmazásával vagy pedig más a szakterületen ismert módon.

A vegyületeket általában bármilyen alkalmas dózis egység formájában adagolhatjuk, amely dózis egység tartalmazhat például 1-3000 mg, előnyösen 5-500 mg hatóanyagot. Az orális dózisokban általában 25-250 mg hatóanyagot alkalmazunk.

A hatóanyagot úgy kell adagolni, hogy a csúcskoncentráció a plazmában 0,1-100 μmol , előnyösen 1-1 μmol legyen. Ezt például intravénás injekcióval érhetjük el, ami a hatóanyag oldata vagy készítménye, a hatóanyagot előnyösen sóoldatban vagy egyéb vizes közegben és bolusként adagoljuk.

A hatóanyag koncentrációja a gyógyszerkészítményben függ a vegyület abszorpciójától, eloszlásától, inaktiválásától, valamint a kiválasztódásától, valamint a szakterületen ismert faktortól. Megjegyezzük, hogy a dózis értéke függ továbbá még a kezelendő tünetek komolyságától. Nyilvánvaló továbbá, hogy minden adott betegnél az adott dózist az egyéni szükséglettől és a kezelőorvos szakmai megítélésétől függően meghatározott ideig kell adagolni, továbbá hogy a fentiekben említett koncentrációhatárok csupán példaképpen szolgálnak és semmiképpen sem korlátozzák a gya-



korlati alkalmazást. A hatóanyagot adagolhatjuk egyszer vagy több hasonló dózissra osztva különböző időintervallumokban.

Az orális adagolású készítmények általában inert hígítóanyagot vagy egy ehető hordozóanyagot tartalmaznak. A készítmények lehetnek zselatinkapszulák vagy sajtolt tabletták. Az orális kezelés céljára a hatóanyagot vivőanyagokkal tablettákká, ostyákká vagy kapszulákká alakítjuk. Gyógyszerészetileg kompatibilis kötőanyagokat és/vagy adjuvánsokat szintén alkalmazhatunk.

A tabletták, pirulák, kapszulák, ostyák és hasonló készítmények esetén például a következő vegyületeket vagy alkotókat alkalmazhatjuk: kötőanyagok, így például mikrokristályos cellulóz, tragantgumi vagy zselatin; vivőanyagok, így például keményítő vagy laktóz; dezintegrálószer, így például algin-sav, Primogel vagy kukoricakeményítő; csúsztatóanyagok, így például magnézium-sztearát vagy Sterotes; glidánsanyag, így például kolloid elosz-lású szilícium-dioxid; édesítőszer, így például szachróz vagy sza-charin; továbbá ízesítőszer, így például borsmenta, metil-szalicilát vagy narancsíz. Amennyiben a dózis egység egy kap-szula, az tartalmazhat még a fentiekben említett anyagokon kívül folyékony hordozót is, így például egy zsírsav olajat. Továbbá, a dózis egységek tartalmazhatnak még különböző egyéb anyagokat is, amelyek megváltoztatják a fizikai formáját a dózis egységnek, így például tartalmazhatnak még cukor, sellak vagy más enterális bevonószert.

A hatóanyagokat vagy gyógyszerészetileg elfogadható sóikat vagy származékaikat adagolhatjuk egy elixír, szuszpenzió, szirup, ostya, rágógumi vagy más hasonló komponenseként is. A szirup

tartalmazhat a hatóanyag mellett szacharózt mint édesítőszert, bizonyos konzerválószerket, festékeket, szinezőanyagokat és ízanyagokat.

A hatóanyagot vagy gyógyászatilag elfogadható származékait vagy sóit adagolhatjuk továbbá más hatóanyagokkal együttesen is, amelyek nem befolyásolják a kívánt hatást, ilyenek lehetnek például a következők: antibiotikumok, gomba-elleni szerek, gyulladásgátlók, vagy vírusellenes vegyületek. A hatóanyagokat adagolhatjuk lipidcsökkentő szerekkel együtt is, ilyenek például a probucol és a nikotinsav, vérlemezkeaggregációt gátló anyagokkal, ilyen például az aszpirin, antitrombotikus szerekkel, ilyen például a coumadin, kalciumcsatorna blokkolókkal, ilyenek például a varapamil, a diltiazem és a nifedipin, angiotenzin konvertáló enzim (ACE) inhibitorokkal, ilyen például a captopril és az enalapril, továbbá β -blokkolókkal, ilyen például a propranolol, terbutalol és labetalol. A vegyületeket adagolhatjuk továbbá különböző nem-szteroid gyulladásgátlókkal együtt is, ilyenek például az ibuprofen, indometacin, aszpirin, fenoprofén, mefenaminsav, flufanaminsav, szulindak. A vegyületeket kortikoszteroidokkal együtt is adagolhatjuk.

A parenterális, intradermális, szubkután vagy topikális adagolású oldatok vagy szuszpenziók például a következő komponensekt tartalmazhatják: steril hígítók, így például injekció céljára alkalmas víz, sóoldat, fixált olajok, polietilén-glikolok, glicerin, propilén-glikol vagy szintetikus oldószerek; antibakteriális szerek, így például benzil-alkohol vagy metil-parabens; antioxidánsok, így például aszkorbinsav vagy nátrium-biszulfit; kelátképzőszerek, így például etilén-diamin-tetraecetsav; pufferek,



így például acetátok, citrátok vagy foszfátok, továbbá a tonicitás beállítására alkalmas szerek, így például a nátrium-klorid vagy dextróz. A parenterális készítmények lehetnek ampullák, eldobható fecskendők vagy több adagot tartalmazó fiolák üvegből vagy műanyagból.

Intravénás adagolás esetén az előnyös hordozóanyagok közé tartozik a fiziológiai sóoldat vagy a foszfáttal pufferolt sóoldat (PBS).

A találmány szerinti hatóanyagokat adagolhatjuk transzdermális tapaszokkal is. Ezen transzdermális tapaszok előállítása a szakterületen ismert (például Brown, L., és R. Langer, "Transdermal Delivery of Drugs", Ann. Rev. Med., 39:221-229 (1988)).

Egy további kivitelezési formánál a hatóanyagot olyan hordozókkal keverjük el, amelyek védik a vegyületet a szervezetből való gyors kiürüléssel szemben, ilyenek a szabályozott felszabadulású készítmények, beleértve az implantátumokat és mikrokapszulázott hordozórendszereket. Erre a célra biológiai úton lebomlani képes biokompatibilis polimereket alkalmazunk, például a következőket: etilén-vinil-acetát, polianhidridek, poliglikolsavak, kollagén, poliortoészterek vagy politejsav. Ezen készítmények előállítása a szakterületen jártas szakember számára ismert. Az anyagokat kereskedelmi forgalomban beszerezhetjük például az Alza Corporation és Nova Pharmaceuticals Inc cégektől.

Liposzóma szuszpenziókat szintén alkalmazhatunk mint gyógyszerészetileg elfogadható hordozóanyagokat. Ezeket a szakterületen jártas szakember számára ismert módon állítjuk elő (például USP 4 522 811 számú szabadalmi leírás). Például

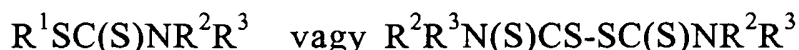
liposzóma készítményeket állíthatunk elő oly módon, hogy a megfelelő lipidet vagy lipideket (például sztearoil-foszfátidil-
-etanolamin, sztearoil-foszfátidil-kolin, arachadoil-foszfátidil-
-kolin, és koleszterin) megfelelő szerves oldószerben feloldunk,
majd elpárologtatjuk, amikor is egy vékony film vagy egy szárított
lipidréteg marad vissza a tartály felületén. A hatóanyag vagy
monofoszfátja, difoszfátja és/vagy trifoszfátja vizes oldatát ezután
beadagoljuk a tartályba. A tartályt ezután kézzel rázzuk, hogy a
lipidet a tartály falától elválasszuk, majd a lipid aggregátumokat
diszpergáljuk és így képezzük a liposzóma szuszpenziót.

A találmány szerinti megoldás különböző módosításai és
változatai, amelyek a szakember számára nyilvánvalóak, szintén a
találmány oltalmi körébe tartoznak.



Szabadalmi igénypontok

1. A következő képleteknek megfelelő nem-toxikus ditiokarbamátok alkalmazása humán kardiovaszkuláris betegségek kezelésére alkalmas gyógyszerkészítmények előállításánál:



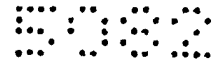
a képletben

R^1 jelentése hidrogénatom vagy gyógyászatilag elfogadható kation, előnyösen nátrium vagy kálium, vagy $NR^4R^5R^6R^7$ általános képletű csoport, amely képletben R^4 , R^5 , R^6 és R^7 jelentése egymástól függetlenül hidrogénatom, 1-6 szénatomos, lineáris, egyenes vagy elágazó láncú vagy ciklusos alkilcsoport, hidroxil-1-6 szénatomos alkilcsoport, ahol egy vagy több hidroxilcsoport kapcsolódhat bármelyik szénatomhoz, vagy arilcsoport, és

R^2 és R^3 jelentése egymástól függetlenül 1-10 szénatomos egyenes vagy elágazó láncú vagy ciklusos alkilcsoport $-(CHOH)_n(CH_2)_nOH$ csoport, ahol n értéke 0, 1, 2, 3, 4, 5 vagy 6, $-(CH_2)_nCO_2R^1$ vagy $-(CH_2)_nCO_2R^4$ általános képletű csoport, hidroxil-1-6 szénatomos alkilcsoport vagy R^2 és R^3 együttesen egy hidat képeznek, amely lehet egy $-(CH_2)_m$ általános képletű csoport, ahol m értéke 3-6, és

R^4 jelentése alkil-, aril-, alkaril- vagy aralkil-csoport, előnyösen acetyl-, propionil-, vagy butiril-csoport.

2. Az 1. igénypont szerinti alkalmazása a következő ditiokarbamátoknak: nátrium-pirrolidin-N-karboditioát, nátrium-N-metil-N-karboxi-metil-N-karboditioát, trinátrium-N,N-



-di(karboxi-metil)-N-karboditioát, nátrium-N-metil-D-glükamin-N-karboditioát, nátrium-N,N-dietil-N-karboditioát (nátrium-dietil-ditio-karbamát), és nátrium-N,N-diizopropil-N-karboditioát.

3. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás ahol a ditiokarbamát nátrium-pirrolidin-N-karboditioát.

4. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás ateroszklerózis kezelésére alkalmas gyógyszerkészítmények előállításához.

5. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás érplasztika utáni restenosis kezelésére alkalmas gyógyszerkészítmények előállításához.

6. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás koronáriás artériás betegségek kezelésére alkalmas gyógyszerkészítmények előállításához.

7. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás angina kezelésére alkalmas gyógyszerkészítmények előállításához.

8. Az 1. igénypont szerinti alkalmazása kis véredény betegségeinek kezelésére alkalmas gyógyszerkészítmények előállításához.

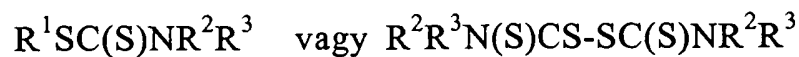
9. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás, amelynél a ditiokarbamátot 0,5-500 mg/kg testtömeg mennyiségben alkalmazzuk.

10. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a ditiokarbamátot perfúziós ballonkatéteren keresztül történő adagolásra alkalmas gyógyszerkészítményekhez alkalmazzuk.

11. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás, amelynél a ditiokarbamátot valamely következő gyógyhatású szerrel kombináltan alkalmazzuk a gyógyszerkészítmény előállításánál: lipid csökkentő szer, vérlemezkeaggregációt gátló szer, antitrombotikus

szer, kalciumcsatorna blokkoló, angiotenzin konvertáló enzim (ACE) inhibitor, β -blokkoló, nem szteroid gyulladásgátló vagy kortikoszteroid.

12. Gyógyszerkészítmény, amely a kardiovaszkuláris betegségek kezelésére hatásos mennyiségben valamely következő képletnek megfelelő nem-toxikus ditio-karbamátot tartalmaz:



a képletben

R^1 jelentése hidrogénatom vagy gyógyászatilag elfogadható kation, előnyösen nátrium vagy kálium, vagy $NR^4R^5R^6R^7$ általános képletű csoport, amely képletben

R^4 , R^5 , R^6 és R^7 jelentése egymástól függetlenül hidrogénatom, 1-6 szénatomos, lineáris, egyenes vagy elágazó láncú vagy ciklusos alkilcsoport, hidroxil-1-6 szénatomos alkilcsoport, ahol egy vagy több hidroxilcsoport kapcsolódhat bármelyik szénatomhoz, vagy arilcsoport, és

R^2 és R^3 jelentése egymástól függetlenül 1-10 szénatomos egyenes vagy elágazó láncú vagy ciklusos alkilcsoport

$-(CHOH)_n(CH_2)_nOH$ csoport, ahol n értéke 0, 1, 2, 3, 4, 5 vagy 6, $-(CH_2)_nCO_2R^1$ vagy $-(CH_2)_nCO_2R^4$ általános képletű csoport, hidroxil-1-6 szénatomos alkilcsoport vagy R^2 és R^3 együttesen egy hidat képeznek, amely lehet egy $-(CH_2)_m$ általános képletű csoport, ahol m értéke 3-6, és

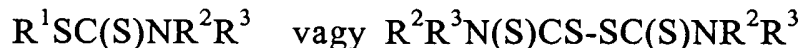
R^4 jelentése alkil-, aril-, alkaril- vagy aralkil-csoport, előnyösen acetil-, propionil-, vagy butiril-csoport - gyógyszerészetileg elfogadható hígítóanyaggal vagy hordozóanyaggal együtt.



13. A 12. igénypont szerinti gyógyszerkészítmény, amely ditio-karbamátként valamely következő vegyületet tartalmaz: nátrium-pirrolidin-N-karboditioát, nátrium-N-metil-N-karboxi-metil-N-karboditioát, trinátrium-N,N-di(karboxi-metil)-N-karboditioát, nátrium-N-metil-D-glükamin-N-karboditioát, nátrium-N,N-dietyl-N-karboditioát (nátrium-dietyl-ditio-karbamát), és nátrium-N,N-diizopropil-N-karboditioát.

14. A 12. igénypont szerinti gyógyszerkészítmény, amely ditio-karbamátként nátrium-pirrolidin-N-karboditioátot tartalmaz.

15. Eljárás kardiovaszkuláris betegségek kezelésére alkalmas gyógyszerkészítmények előállítására **azzal jellemezve**, hogy valamely következő képletnek megfelelő nem-toxikus ditio-karbamátot gyógyszerészetileg elfogadható hordozóanyaggal vagy hígítóanyaggal elkeverünk:



a képletben

R^1 jelentése hidrogénatom vagy gyógyászatilag elfogadható kation, előnyösen nátrium vagy kálium, vagy $NR^4R^5R^6R^7$ általános képletű csoport, amely képletben

R^4 , R^5 , R^6 és R^7 jelentése egymástól függetlenül hidrogénatom, 1-6 szénatomos, lineáris, egyenes vagy elágazó láncú vagy ciklusos alkilcsoport, hidroxil-1-6 szénatomos alkilcsoport, ahol egy vagy több hidroxilcsoport kapcsolódhat bármelyik szénatomhoz, vagy arilcsoport, és

R^2 és R^3 jelentése egymástól függetlenül 1-10 szénatomos egyenes vagy elágazó láncú vagy ciklusos alkilcsoport

$-(CHOH)_n(CH_2)_nOH$ csoport, ahol n értéke 0, 1, 2, 3, 4, 5



vagy 6, $-(CH_2)_nCO_2R^1$ vagy $-(CH_2)_nCO_2R^4$ általános képletű csoport, hidroxil-1-6 szénatomos alkilcsoport vagy R^2 és R^3 együttesen egy hidat képeznek, amely lehet egy $-(CH_2)_m$ általános képletű csoport, ahol m értéke 3-6, és

R^4 jelentése alkil-, aril-, alkaril- vagy aralkil-csoport, előnyösen acetyl-, propionil-, vagy butiril-csoport.

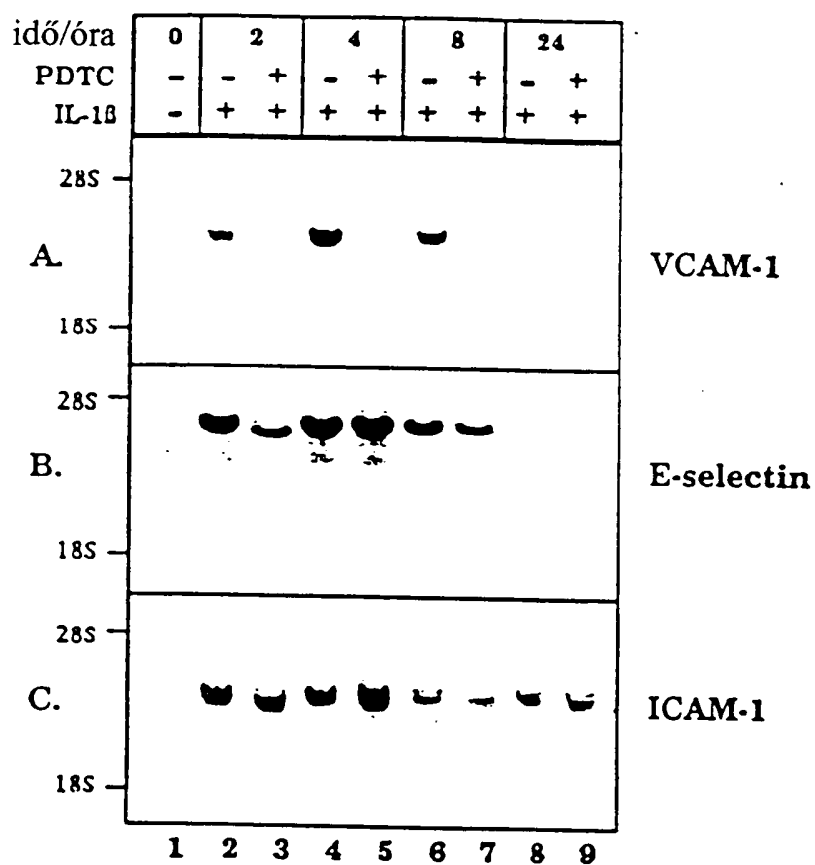
A meghatalmazott:

DANUBIA

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft

1. ábra

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

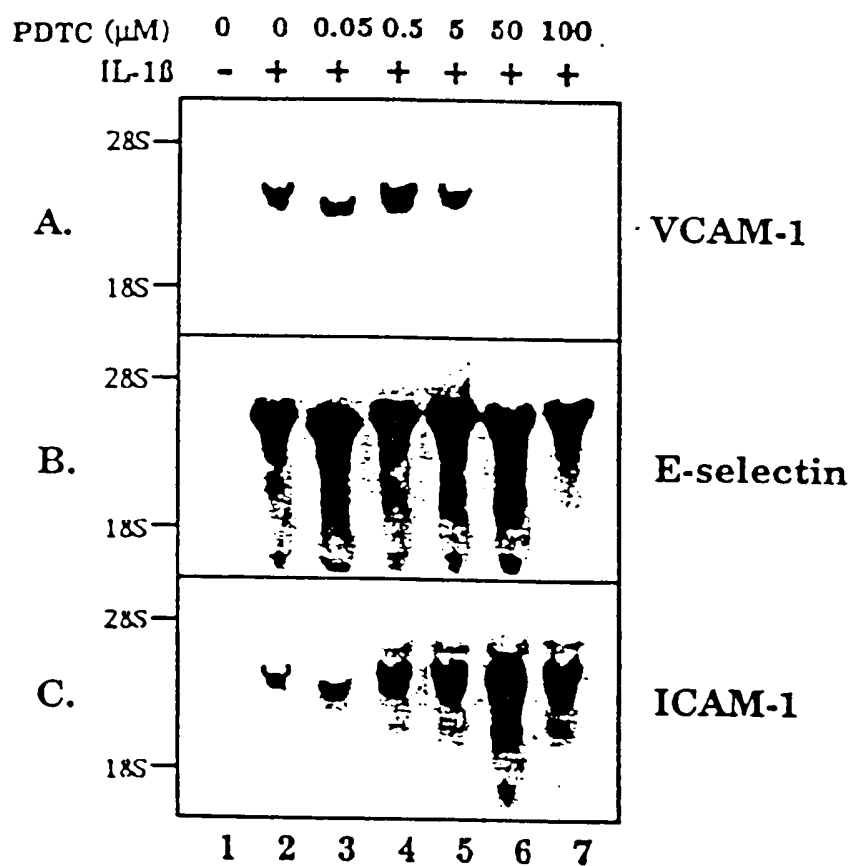


1229/95

5082
2/8

2. ábra

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

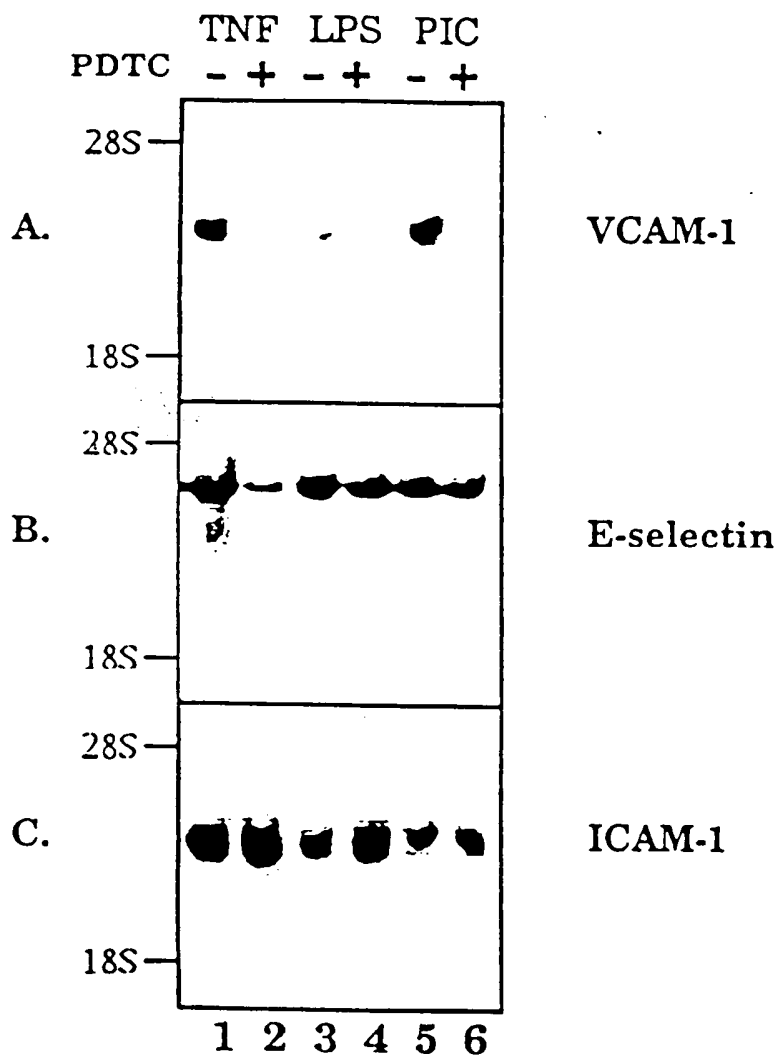


1229/95

3/8

3. ábra

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

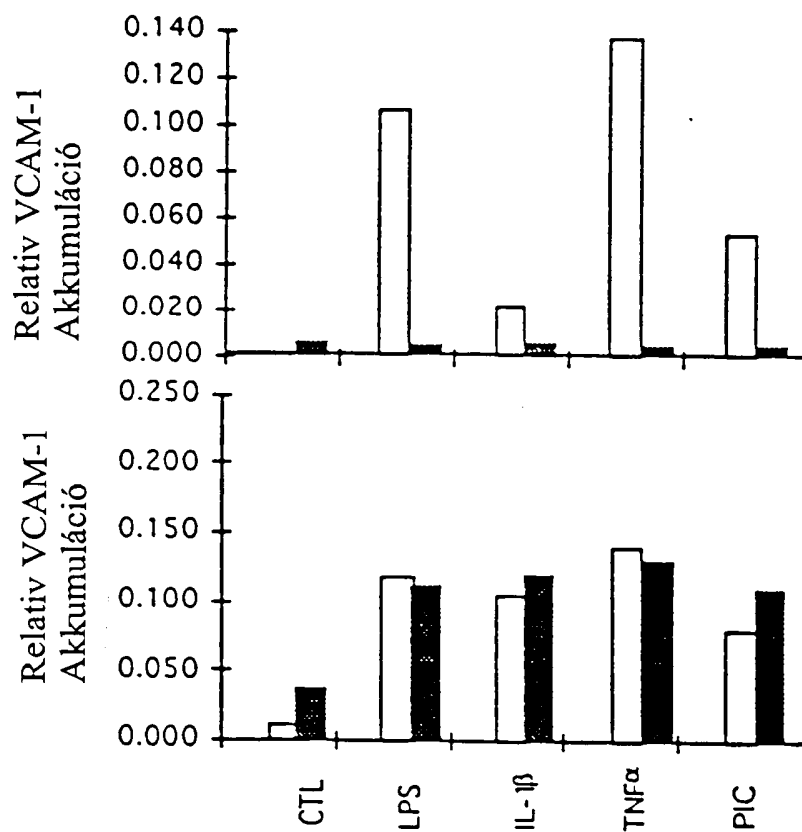


1229/95

5088
4/8

4. ábra

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



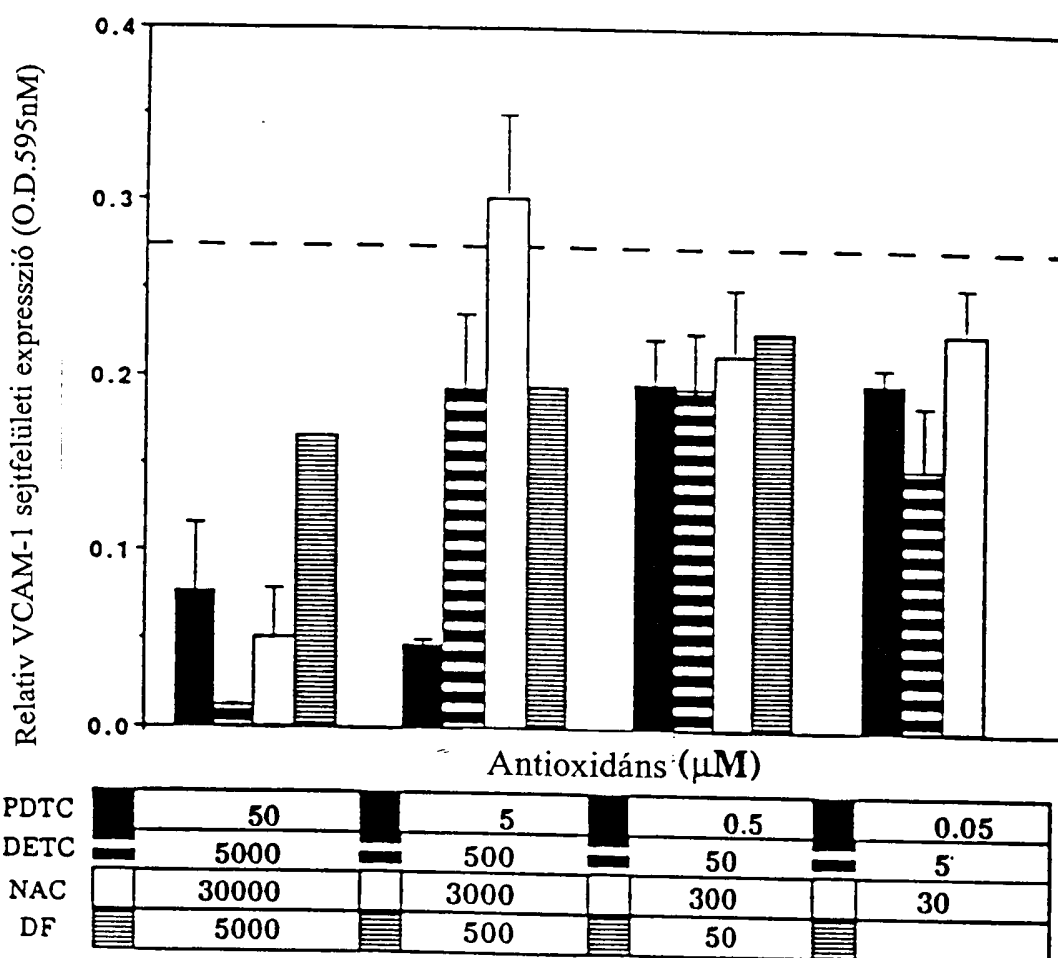
1229/95

5082

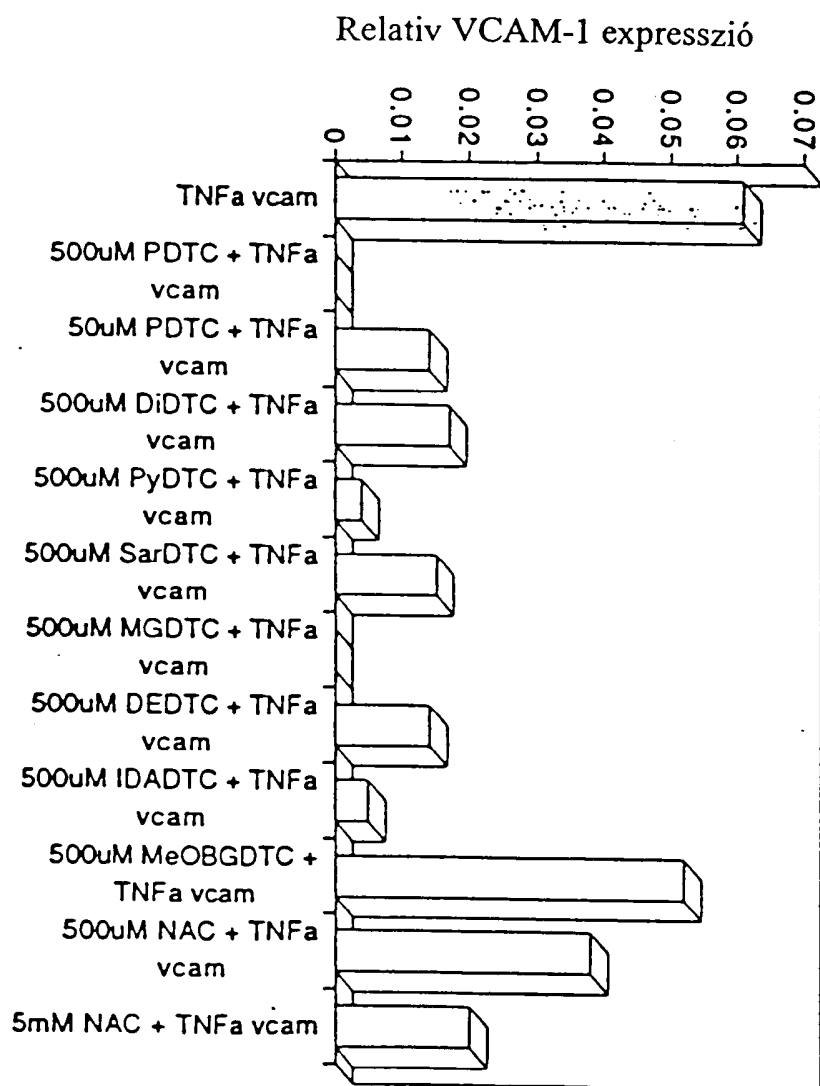
5/8

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

5. ábra



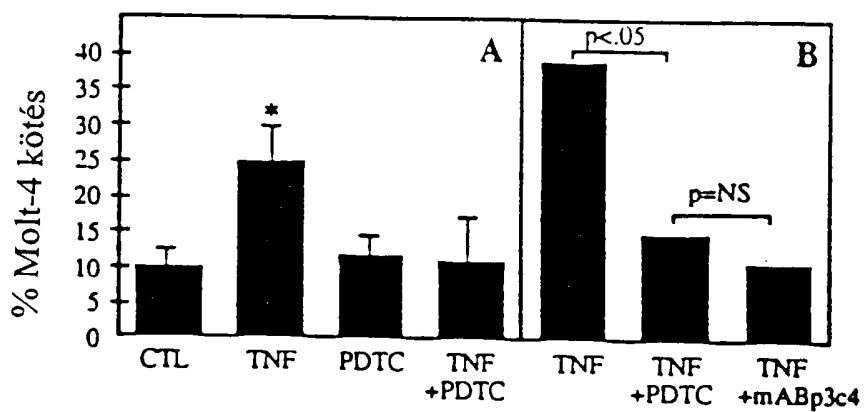
KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



6. ábra

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

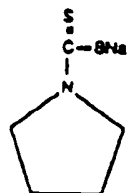
7. ábra



1229/95

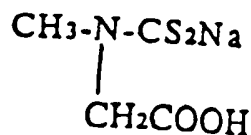
KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

8. ábra



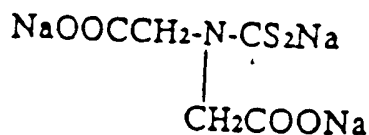
1

Nátrium-pirrolidin-N-karboditioát



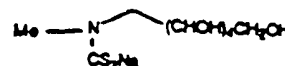
2

Nátrium-N-metil-N-karboxi-metil-N-karboditioát
(vagy nátrium-sarkozin-ditiokarbamát)



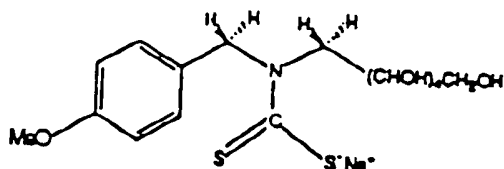
3

Trinátrium-N,N-di(karboxi-metil)-N-karboditioát
(vagy imino-di-ecetsav-ditiokarbamát, trinátrium)



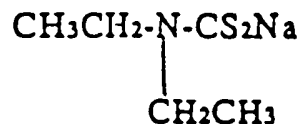
4

Nátrium-N-metil-D-glükamin-N-karboditioát



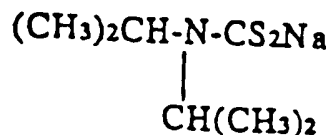
5

Nátrium-N-(4-metoxi-benzil)-D-glükamin-N-karboditioát



6

Nátrium-N,N-dietil-N-karboditioát
(vagy nátrium-dietil-ditiokarbamát)



7

Nátrium-N,N-diizopropil-N-karboditioát
(vagy nátrium-diizopropil-N-karboditioát)