

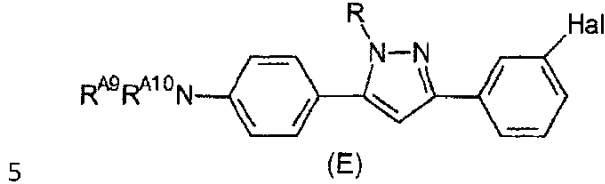
OZET

PROTEİN AGREGASYONU İLE BAĞLANTILI
HASTALIKLARDA VE/VEYA NÖRODEJENERATİF
5 **HASTALIKLARDA ROL OYNAYAN PROTEİNLERİN**
AGREGASYONUNU İNHİBE ETMEYE YÖNELİK İLAÇLAR

Mevcut buluş, formül (E) ile temsil edilen bir bileşik ile ilgilidir. Mevcut buluş ayrıca protein agregasyonu ile bağlantılı hastalıkların
10 ve/veya nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde veya önlenmesinde kullanılmaya yönelik, formül (E) ile temsil edilen bir bileşik ile ilgilidir. Ek olarak mevcut buluş, buluşa ait bileşiği içeren farmasötik ve tanı amaçlı kompozisyonlar ve ayrıca bir kit ile ilgilidir. Ek olarak mevcut buluş, agrege olmuş protein birikintilerini görüntülemeye
15 yönelik bir yöntem ile ilgilidir. Mevcut buluşa ait, saptanabilir şekilde etiketlenmiş bir bileşiğin hazırlanması amaçlı bir kit de açıklanır.

İSTEMLER

1. Aşağıdaki formül (E) ile temsil edilen bir bileşik:



burada:

R, hidrojen; C₁₋₄ alkil; ve -C₁₋₄ alkilen-halojen arasından seçilir; ve
Hal, F, Cl, Br ve I arasından seçilir;

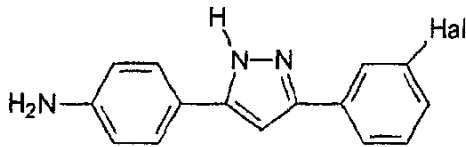
10 R^{A9}, H veya C₁₋₄ alkildir; ve

R^{A10}, H veya C₁₋₄ alkildir;

veya bu bileşiklerin bir solvatu veya tuzu.

2. İstem 1'e göre bileşik olup, burada bileşik şöyledir:

15



buradaki Hal, Cl veya Br'dir;

veya bu bileşiklerin bir solvatu veya tuzu.

20

3. İstem 1 veya 2'ye göre bileşik olup, burada bileşik, saptanabilir şekilde etiketlenir, burada saptanabilir etiket, ¹⁸F, ¹¹C, ¹²⁵I, ¹²³I, ¹³¹I, ⁷⁷Br ve ⁷⁶Br arasından seçilir.

4. İstem 3'e göre bileşik olup, burada saptanabilir etiket, ^{18}F ve ^{11}C arasından seçilir.

5. İstem 1 ila 4'ten herhangi birinde tanımlanan bir bileşik veya bunun bir solvatı veya tuzunu ve isteğe bağlı olarak farmasötik açıdan kabul edilebilir bir taşıyıcı içeren farmasötik veya tanı amaçlı bir kompozisyon.

6. Protein agregasyonu ile bağlantılı bir hastalığın ve/veya bir nörodejeneratif hastalığın tedavisinde veya önlenmesinde kullanılmaya yönelik, istem 1 ila 4'ten herhangi birine göre bir bileşik veya bunun bir solvatı veya tuzu.

7. İstem 6'ya göre bileşik olup, burada protein agregasyonu ile bağlantılı hastalık, en az bir proteinin veya bunun bir fragmanının veya türevinin agrege olmuş bir formunun varlığı ile karakterize edilir, burada protein, prion proteini, amiloid öncü protein (APP), alfa-sinüklein, süperoksid dismutaz, tau, immünoglobulin, amiloid-A, transtiretin, beta 2-mikroglobulin, sistatin C, apolipoprotein A1, TDP-43, islet amiloid polipeptit, ANF, gelsolin, insulin, lizozim, fibrinojen, huntingtin ve ataksin ve bir Poly-Q kümesine sahip diğer proteinlerden oluşan gruptan seçilir.

8. İstem 6'ya göre bileşik olup, burada hastalık, Parkinson hastalığı, prion hastalığı, Alzheimer hastalığı, çoklu sistem atrofisi, Difüze Lewy cisimi hastalığı, frontotemporal demans, amiyotrofik lateral skleroz, Huntington hastalığı, spinoserebellar ataksi ve diğer Poli-Q hastalıkları, kalıtsal serebral amiloid anjiyopati, ailevi amiloid

polinöropati, primer sistemik amiloidoz (AL amiloidoz), reaktif sistemik amiloidoz (AA amiloidoz), tip II diyabet, enjeksiyon-lokalize amiloidoz, beta-2 mikroglobulin amiloidoz, kalıtsal nöropatik olmayan amiloidoz ve Finlandiya kalıtsal sistemik amiloidozdan
5 oluşan gruptan seçilir.

9. İstem 8'e göre bileşik olup, burada prion hastalığı, Creutzfeldt-Jakob hastalığı, varyant Creutzfeldt-Jakob hastalığı, genetik insan prion hastalığı, Sığır Spongiform Ensefalopati (BSE) ve Scrapie
10 arasından seçilir.

10. İstem 1 ila 4'ten herhangi birine göre bir bileşiğin veya bunun bir solvatının veya tuzunun, protein agregasyonu ile bağlantılı bir hastalığın ve/veya bir nörodejeneratif hastalığın tedavisi veya
15 önlenmesi amaçlı farmasötik bir kompozisyonun hazırlanmasında kullanılması.

11. İstem 10'a göre kullanım olup, burada protein agregasyonu ile bağlantılı hastalık, en az bir proteinin veya bunun bir fragmanının veya türevinin agregate olmuş bir formunun varlığı ile karakterize edilir, burada protein, prion proteini, amiloid öncü protein (APP), alfa-sinüklein, süperoksid dismutaz, tau, immünoglobulin, amiloid-A, transtiretin, beta 2-mikroglobulin, sistatin C, apolipoprotein A1, TDP-43, islet amiloid polipeptit, ANF, gelsolin, insulin, lizozim, fibrinojen,
20 huntingtin ve ataksin ve bir Poly-Q kümesine sahip diğer proteinlerden oluşan gruptan seçilir.

12. İstem 10'a göre kullanım olup, burada hastalık, Parkinson hastalığı, prion hastalığı, Alzheimer hastalığı, çoklu sistem atrofisi, Difüze Lewy cisimi hastalığı, frontotemporal demans, amiyotrofik lateral skleroz, Huntington hastalığı, spinoserebellar ataksi ve diğer
5 Poli-Q hastalıkları, kalıtsal serebral amiloid anjiyopati, ailevi amiloid polinöropati, primer sistemik amiloidoz (AL amiloidoz), reaktif sistemik amiloidoz (AA amiloidoz), tip II diyabet, enjeksiyon-lokalize amiloidoz, beta-2 mikroglobulin amiloidoz, kalıtsal nöropatik olmayan amiloidoz ve Finlandiya kalıtsal sistemik amiloidozdan
10 oluşan gruptan seçilir.

13. İstem 10'a göre bileşik olup, burada prion hastalığı, Creutzfeldt-Jakob hastalığı, varyant Creutzfeldt-Jakob hastalığı, genetik insan prion hastalığı, Sığır Spongiform Ensefalopati (BSE) ve Scrapie
15 arasından seçilir.

14. İstem 1 ila 4'ten herhangi birinde tanımlanan bir bileşiğin veya bunun bir solvatının veya tuzunun, in vitro veya ex vivo protein agregasyonunun inhibe edilmesinde kullanılması.

20

15. İstem 3 veya 4'te tanımlanan bileşiği veya bunun bir solvatını veya tuzunu ve ek olarak bileşiğe spesifik olarak bağlanan bir antikor veya antikor fragmanı; ve/veya istem 11'de tanımlandığı gibi monomerik veya agrege olmuş bir protein; ve/veya isteğe bağlı olarak bileşik ile
25 kompleks haline getirilmiş, istem 11'de tanımlandığı gibi monomerik veya agrege olmuş bir protein ve kullanma talimatları içeren, bir veya daha fazla kap içinde bir kit.

16. Agrege olmuş protein birikintilerinin görüntülenmesine yönelik bir yöntemde kullanılma amaçlı, istem 3 veya 4'e göre bir bileşik veya bunun bir solvatu veya tuzu olup, yöntem aşağıdaki adımları içerir:

- (i) istem 3 veya 4'te tanımlandığı gibi saptanabilir şekilde etiketlenmiş bir bileşik veya bunun bir solvatını veya tuzunu içeren bir kompozisyondan saptanabilir bir miktarın, bir süjeye sokulması, burada saptanabilir etiket, ^{18}F , ^{11}C , ^{125}I , ^{123}I , ^{131}I , ^{77}Br ve ^{76}Br arasından seçilir;
- (ii) bileşiğin agrege olmuş protein ile birleşmesi için yeterli bir süre tanınması; ve
- (iii) agrege olmuş protein ile birleşen bileşiğin saptanması.

17. İstem 16'ya göre kullanılmaya yönelik bileşik olup, burada saptanabilir etiket, ^{18}F ve ^{11}C arasından seçilir.

15

- 18.** İstem 3 veya 4'te tanımlandığı gibi saptanabilir şekilde etiketlenmiş bir bileşiğin veya bunun bir solvatının veya tuzunun hazırlanmasına yönelik bir kit, burada kit, reaksiyon üzerine istem 3 veya 4'te tanımlanan bileşiği veya bunun bir solvatını veya tuzunu oluşturan en az iki öncü bileşik içerir, burada R, ^{18}F , ^{11}C , ^{125}I , ^{123}I , ^{131}I , ^{77}Br ve ^{76}Br arasından seçilen saptanabilir bir etiket içerir.

20

19. İstem 18'e göre kit olup, burada saptanabilir etiket, ^{18}F ve ^{11}C arasından seçilir.

25

25220

TARİFNAME

5 **PROTEİN AGREGASYONU İLE BAĞLANTILI**
HASTALIKLARDA VE/VEYA NÖRODEJENERATİF
HASTALIKLARDA ROL OYNAYAN PROTEİNLERİN
AGREGASYONUNU İNHİBE ETMEYE YÖNELİK İLAÇLAR

BULUŞUN ÖZETİ

10

Mevcut buluş, formül (E) ile temsil edilen bir bileşik ile ilgilidir. Mevcut buluş ayrıca protein agregasyonu ile bağlantılı hastalıkların ve/veya nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde veya önlenmesinde kullanılmaya yönelik, formül (E) ile temsil edilen bir bileşik ile 15 ilgilidir. Ek olarak mevcut buluş, buluşa ait bileşiği içeren farmasötik ve tanı amaçlı kompozisyonlar ve ayrıca bir kit ile ilgilidir. Ek olarak mevcut buluş, agrege olmuş protein birikintilerini görüntülemeye yönelik bir yöntem ile ilgilidir. Mevcut buluşa ait, saptanabilir şekilde etiketlenmiş bir bileşiğin hazırlanması amaçlı bir kit de açıklanır.

20

Bu spesifikasyonun metni boyunca birçok belgeye atıfta bulunulmuştur. Burada atıfta bulunulan dokümanların (üretici şartnameleri, talimatlar, vb. dahil) açıklanan içeriği buraya referans olarak dahil edilmiştir.

25

BULUŞUN ALT YAPISI

M. Ono ve arkadaşları (Bioorganic & Medicinal Chemistry 16 (2008) 6867-6872), 3,5-difenil-1,2,4-oksadiazoller bazlı bazı beta-amiloid sondalarını tarif eder.

- 5 US 2007/0276034, sinükleinopatilerin tedavisi için uygun oldukları iddia edilen bazı bis- ve tris-dihidroksiaril bileşiklerini ve bunların metilendioksi analoglarını ve farmasötik açıdan kabul edilebilir esterlerini açıklar.

- 10 WO 2008/131148, spesifik difenil-heteroaril türevlerini ve bunların, amiloid plaklarının bağlanması ve görüntülenmesi amaçlı kullanımlarını tarif eder.

- 15 NURR-1 aktivatörleri olarak faydalı heterosiklik bileşikler, WO 2004/072050'de açıklanır.

Radyo-etiketli etilen glikol veya polietilen glikol, dokuların görüntülenmesi için faydalı olabilecek bileşikler üzerinde bir etiketleme grubu olarak WO 2007/002540'ta kullanılır.

20

WO 98/17652, nörodejeneratif bozuklukların ve serebral iskeminin tedavisi için uygun olduğu belirtilen bazı oksadiazol türevlerini tarif eder.

- 25 Çok sayıda nörolojik ve nörodejeneratif hastalık bilinmektedir ve bunların birçoğu hali hazırda tedavi edilebilir değildir. Bu hastalıklar arasında Parkinson hastalığı, Chorea Huntington, Hallervorden-Spatz hastalığı, Alzheimer hastalığı, senil demans, Creutzfeldt-Jakob

hastalığı, arteriyosklerotik demans, serebral trombanjit obliterans, Lewy cisimli demans (DLB), çoklu sistem atrofisi (MSA) ve birçok başkaları gibi tıbbi durumlar bulunur.

- 5 Aralarında Creutzfeldt-Jakob hastalığı (CJD), scrapie ve büyükbaş spongiform ensefalopati (BSE) gibi hastalıkların da bulunduğu prion hastalıkları, patolojik olarak beynin bir spongiform dejenerasyonu ile karakterize edilir. Prion hastalıklarına, asıl olarak membran glikoprotein PrPC'nin yanlış katlanmış, agrege olmuş, beta yaprağı
- 10 açısından zengin PrPSc izoformundan oluşan, yaygın olmayan enfeksiyöz bir ajan neden olur.

- Prion hastalıkları, BSE'nin ortaya çıkmasına bağlı olarak kamu sağlığında önemli bir endişeye neden oldu. Bilimsel kanıtlar, BSE'nin
- 15 insanlara geçerek Creutzfeldt-Jakob hastalığının yeni bir varyantına (vCJD) neden olduğunu ortaya koyar (Will ve arkadaşları 1996, Bruce ve arkadaşları 1997). Şu anda kaç kişinin hastalığın kuluçka döneminde olduğu ve gelecekte vCJD'den etkileneceği bilinmemektedir. Mevcut kanıtlar, çok sayıda hastanın etkileneceği bir
 - 20 salgının yaklaşması ihtimalini ortadan kaldırmamaktadır (Andrews ve arkadaşları 2000). Bu, hastalığın daha fazla yayılmasını önleyen önlemlerin uygulanmasına ek olarak etkili terapötiklerin geliştirilmesi ihtiyacını vurgular. Ek olarak en son kanıtlar, kan transfüzyonu yoluyla sekonder bulaşmanın meydana gelebileceğini ortaya
 - 25 koymaktadır (Lewelyn ve arkadaşları, 2004).

Prion hastalıklarının patojenezindeki temel olay, hücrel prion proteini PrPC'nin büyük protein agregatları halinde agrege olan

- patolojik PrPSc izoformuna dönüşmesidir. PrPSc agregatlarının bu oluşumu, prion hastalıklarının patojenezinin işaretidir. Mevcut kanıtlar, PrPSc'nin hem bu dönüşüm için bir şablon hem de nöronal fonksiyon bozukluğu ve hücre ölümüne neden olan bir nörotoksik ajan görevi gördüğünü ortaya koyar (Prusiner 1998, Giese and Kretzschmar 2001). Bu nedenle prion hastalıklarına karşı en umut veren terapötik yaklaşım, PrPSc amplifikasyonuna müdahaledir. Hücre kültüründen ve in vivo çalışmalardan elde edilen kanıtlar, PrPSc oluşumu inhibe edildiğinde PrPSc'nin temizlenmesinin meydana gelebileceğini ortaya koyar (Mallucci 2003). Böylelikle bu terapötik strateji ayrıca kuluçka süresinde geç olduğunda ve hastalığın klinik belirtileri tezahür ettikten sonra bile etkili olabilir, bunun da insan prion hastalığının ele alınmasında kullanılması elzemdir.
- PrPSc amplifikasyonuna müdahalede etkili oldukları in vitro gösterilmiş, akridin türevleri, Kongo Kırmızısı, porfirinler/ftalosiyaninler, Cp-60, beta yaprak kırıcı peptitler ve PrP varyantları gibi bir dizi bileşik vardır (Caughey ve arkadaşları, 1998, Chabry ve arkadaşları, 1998, Demaimay ve arkadaşları, 2000, Horiuchi ve arkadaşları, 2000, Perrier ve arkadaşları, 2000, Rudyk ve arkadaşları, 2000, Soto ve arkadaşları, 2000). Bununla birlikte bu bileşiklerin hiçbiri bugüne kadar hastalığın tedavisi için veya arttırılmış terapötik potansa ve farmakolojik özelliklere sahip bileşiklerin geliştirilmesinde öncü bileşikler olarak başarıyla kullanılmamıştır.

Bugüne kadar potansiyel terapötikler olarak tanımlanmış maddeler asıl olarak şans eSERY keşfedilmiştir. Potansiyel anti-prion ilaçları

- için büyük bileşik kütüphanelerinin yüksek randımanlı taranmasına uygun birkaç in vitro deney, bugüne kadar oluşturulmuştur. Son zamanlarda yayınlanan çalışmalarda sistematik tarama için iki farklı yaklaşım önerilmiştir: biri maya bazlıdır (Bach ve arkadaşları, 2003) ve diğerinde, enfekte edilmiş ScN2a hücre kültürleri kullanılır (Kocisko ve arkadaşları, 2004, Kocisko ve arkadaşları, 2003). Bununla birlikte bu yaklaşımlar, sırasıyla 2500 ve 2000 bileşiğin taranmasına izin verdi ve zaman israfı oldukları anlaşıldı.
- 10 Düşük moleküler ağırlıklı maddelere ek olarak başka üç potansiyel yaklaşım şu anda test edilmektedir. İlk olarak PrP'ye yönelik antikolar, PrPSc oluşumunu baskılamak için kullanılmaktadır. Bu yöntem, hücre kültüründe ve ayrıca intraperitoneal yoldan enjeksiyon yapılmış farelerde başarıyla kullanılmıştır (Enari ve arkadaşları, 2001; 15 White ve arkadaşları, 2003). Bir başka yaklaşım, scrapie ile enfekte edilmiş farelerde kuluçka süresini arttırdığı bulunan CpG oligonükleotitlerinin uygulanmasıdır (Sethi ve arkadaşları, 2002). Bununla birlikte bu yöntemin tesir mekanizması şu ana kadar aydınlanmamıştır. Son olarak enfekte olmuş hayvanların veya 20 insanların nöronlarında PrPC ekspresyonunun siRNA ile baskılanması tartışılmaktadır. Bu yöntemin hücre kültürlerinde PrPSc oluşumunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Daude ve arkadaşları, 2003). Bu üç yöntemin tamamı, aynı problemle yüz yüzedir, yani moleküllerin kan-beyin bariyerinden geçmesi. Bu handicap nedeniyle bu yaklaşımlar 25 sadece periferik organlarda maruz kalma sonrası profilaks için uygundur, ancak hastalığın merkezi sinir sisteminde terapisi için uygun değildir.

Bir başka nörodejeneratif hastalık sınıfı olan, bilinen adıyla sinükleinopatiler, asıl olarak α -sinüklein ihtiva eden protein agregatlarının, oligomerlerin, protofibrillerin ve fibrillerin hücre içinde birikmesi ile karakterize edilir. Sinükleinopatiler söz konusu olduğunda sinir hücreleri üzerindeki patolojik etkilerin, α -sinüklein oligomerik agregatlarının oluşması ve ardından membran gözeneklerinin oluşması ile indüklenir. Sinükleinopatilerin örnekleri, Parkinson hastalığı (PD), Lewy cisimli demans (DLB) ve çoklu sistem atrofisidir (MSA). Bugüne kadar α -sinükleinin agregasyonunun inhibe edilmesi için terapötik stratejiler mevcut değildir.

Böylelikle prion hastalıkları ve sinükleinopatiler gibi agrege olan proteinlerle bağlantılı hastalıkların tedavisi için uygun yeni bileşiklerin tanımlanmasına ihtiyaç vardır.

Bu nedenle mevcut buluşun temelinde yatan teknik problem, prion hastalıklarının, sinükleinopatilerin ve agrege olan proteinler ile karakterize edilen diğer hastalıkların, özellikle Parkinson hastalığının tedavisine yönelik bileşiklerin sağlanmasıdır. Ek olarak yukarıda bahsedilen bozukluklarda agrege olmuş protein birikintilerinin görüntülenmesine uygun sondalar olan bileşiklerin sağlanmasına da ihtiyaç vardır.

ŞEKİLLERİN TARİFİ

Şekil 1: 2D-SIFT ile ve hücre kültüründe taranan, DIVERSet 1 ve 2 için üretilen SAR Haritası. Harita, DIVERSet 1 ve 2'nin birincil hücre kültürü taramasına ait 837 sonuç bileşiğinden oluşturulmuş, yapısal olarak benzer bileşiklerin (yıldızlar veya kutular ile temsil edilir)

kümelerini gösterir. Kümeler ise benzer kümeler birbirine yakın olacak şekilde düzenlenir. Kümeleri temsil eden semboller, harita açıklamalarında açıklandığı gibi SIFT aktiflerin ve hücre kültürü aktiflerinin ebatlarına ve oranlarına ayrı ayrı ölçeklenir, şekillendirilir ve renklendirilir. Böylelikle SIFT ve hücre kültürü aktiflerini yüksek oranlarda ihtiva eden büyük kümeler, büyük kırmızı yıldızlar ile sembolize edilir. DPP_1'den DPP_5'e kadar adlandırılmış beş küme seçilir ve bu kümeleri temsil eden prototipik bileşikler gösterilir.

Şekil 2: Tanımlanan kümeler halinde sınıflandırılan tüm bileşikler (Şekil 1), Şekil 2 A ile F'de çeşitli deneylerdeki aktiviteleri ile birlikte gösterilir. Bunların tamamı, 3,5-Difenil-pirazol (DPP) türevleri kimyasal bileşik sınıfına aittir (bakınız Şekil 1'de gösterilen DPP motifi). Şekil 2F'de, Şekil 1'in SAR haritasında bulunmayan ve pirazol halkasına eklenmiş bir N atomu ile tek hücre kültüründe aktif bir bileşik ihtiva eden başka bir küme, DPP_6 gösterilir. Şekil 2F'de ek olarak DIVERSet 1 ve 2'den 33 DPP bileşiğinin 4'ü gösterilir, bunların ise hücre kültüründe eylemsiz olduğu bulunmuştur ve DM programı tarafından bunların altı DPP sınıfına benzemediğine karar verilmiştir. Bu bileşikler, DPP motifinin kütüphane araştırması yoluyla tanımladık.

Şekil 3: Örnek 2'de tarif edilen yöntemlere göre, ilk tarama sonuçları ve ilaç kimyası konuları bazında sentezlenmiş bileşiklerin listesi. Bu bileşikler, çeşitli test deneyleri (yani SIFT, prion hastalıklarının hücre kültürü modellerinde deneyler, in vivo hayvan testleri veya α -sinüklein agregasyonunun biyokimyasal deneyleri) kullanılarak analiz edildi.

Şekil 4: Tedavinin, RML scrapie ile intraserebral enfeksiyonu sonrasında farelerin hayatta kalma süresi üzerindeki etkileri. Bileşikler, enfeksiyondan 80 gün sonra başlanarak 14 gün süreyle

günlük olarak uygulandı (50 µL 10 mM bileşik). (A) 10353_F11 bileşiği ile tedavi, intraserebral yoldan enfekte edilmiş farelerin hayatta kalmasını uzatır ($p < 0,05$). (B)'de farklı bileşikler ile tedavi sonrasında ortalama hayatta kalma süreleri gösterilir. Anle138b ve
 5 SERY149 bileşikleri ile günlük intraperitoneal enjeksiyon, RML scrapie ile tehdit sonrasında hayatta kalma sürelerini anlamlı düzeyde uzatır (anle138b: $p < 0,01$; SERY149: $p < 0,05$). ortalama hayatta kalma süreleri, gün $\pm$ standart sapma cinsinden ifade edilir.

Şekil 5: Tedavinin, RML scrapie ile intraperitoneal yoldan enfekte
 10 edilmiş farelerin splenik PrPSc düzeyi üzerindeki etkisi. (A) Scrapie prionları ile inokülasyon sonrasında fareler, bileşik (intraperitoneal için 25 µL 100 mM bileşik ve oral uygulama için 50 mg/kg) ile günde bir kez tedavi edildi. (B) Splenik PrPSc düzeylerinin bir nokta blot deneyinde dansitometrik analizi. Anle138b ile tedavi, PrPSc
 15 düzeylerinde kontrole kıyasla güçlü bir azalmayı indükledi ($p = 0,001$). (C) Scrapie ile enfekte edilmiş farelerin dalaklarının immünohistolojik analizi. Anle138b ile tedavi sonrasında düşük PrPSc birikintilerine sahip dalakların yüzdesi artar (derece +) ve güçlü PrPSc birinkileri ortadan kalkar (derece +++). (D) dalaklarda PrPSc boyalı
 20 birikintilerin (oklar) iki örneğini gösterir. soldaki resim, güçlü PrPSc boyaması gösterirken (derece +++), sağdaki resim, düşük PrPSc boyaması gösterir (derece +). çubuklar, ortalama PrPSc düzeyi $\pm$ standart hatayı gösterir.

Şekil 6: Fare beyninin immüno blot ve histolojik analizi. (A) Farelere
 25 RML scrapienin intraserebral inokülasyonundan sonra farelerin tedavisine enfeksiyondan 80 gün sonra başlandı. Bileşikler, belirtilen zaman noktalarında verildi (25 µL 100 mM bileşik, i.p. uygulaması için ve 50 mg/kg, oral uygulama için). (B) Prion inoküle edilmiş

farelerin beyin homojenatlarında farklı zaman noktalarında PrP^{Sc} düzeylerinin nicelendirilmesi. Anle138b ile tedavi, beyinde PrP^{Sc} birikmesini tamamen bloke eder. 106. günde PrP^{Sc} miktarı hala 80. gün düzeyindedir. Anle186b ile tedavi. fare beyinlerinde PrP^{Sc} birikmesinde bir azalmaya yol açar (C) bileşikler ile tedavi sonrasında 80. günde tedavi edilmemiş kontrole kıyasla nispi PrP^{Sc} düzeylerinde değişim. (D) apoptotik hücrelerin ((E)'de ok) H&E boyalı beyin dilimlerinde belirtilen zaman noktalarında histolojik incelemesi. Çizgili çizim, ortalama apoptotik hücre sayısı $\pm$ standart hatayı gösterir. (E), bir apoptotik hücreli H&E boyalı bir kesiti gösterir (ok).

Şekil 7: Buluşa ait bileşiklerin günlük uygulanması ile hayatta kalma süresinin uzatılması. İntraserebral yoldan RML scrapie suşu ile enfekte edilmiş fareler, scrapie enfeksiyonunun son aşamasına ulaşılan kadar uzatılmış bir hayatta kalma süresi gösterir.

Şekil 8: α -sinüklein agregasyonunun buluşa ait bileşikler ile baskılanması. (A) DPP bileşiği 351F11, multimerik α -sinüklein komplekslerinin oluşumunu doza bağımlı şekilde inhibe edebilir. (B) (C) α -sinüklein agregasyonu üzerinde diğer DPP ile ilişkili bileşikler için saptanan doza bağımlı inhibitör etki.

Şekil 9: Prion enfekte edilmiş hücre kültürleri, buluşa ait DPP ile ilişkili bileşikler ile işleme tabi tutuldu. DPP ile ilişkili bileşikler, hücre kültüründe düşük mikromolar ve hatta mikromolar altı konsantrasyonlarda bile güçlü bir PrP^{Sc} azaltması sergiledi.

Şekil 10: Anle138b ile yapılan günlük tedavinin, RML scrapie ile enfekte edilmiş farelerde PrP^{Sc} birikmesi ve prion patolojisi üzerindeki etkisi. (A) PrP^{Sc} için boyanmış beyin kesitleri (üst sıra: korteks ve hipokampus, alt sıra: serebellum), anle138b tedavisinin, DMSO ile tedavi edilen hayvanlara kıyasla PrP^{Sc} birikmesini azalttığını gösterir.

(B) Prion inoküle edilmiş farelerin beyin homojenatlarında belirtilen zaman noktalarında PrP^{Sc} düzeylerinin nicelendirilmesi, anle138b ile tedavi edilen farelerde PrP^{Sc} birikmesinin, tedavi hastalığın geç bir aşamasında (120 dpi) başlatıldıktan sonra bile güçlü şekilde azaldığını gösterir. (C) Serebellumdaki apoptotik hücrelerin, H&E boyalı beyin dilimlerinde histolojik nicelendirmesi, PrP^{Sc} birikmesinin inhibisyonunun, nöronal hücre ölümünün inhibe edilmesi ile sonuçlandığını gösterir. (D) Bileşik olmadan DMSO+fıstık yağı ile tedavi edilen kontrol fareleri, ilerleyen kilo kaybı gösterir. 80 dpi'den itibaren anle138b ile tedavi, ~100 gün süreyle kilo kaybını önler. 120 dpi'den itibaren tedavi, ~70 gün süreyle kilo kaybını inhibe eder. B ve C'de hata çubukları, standart hatayı gösterir (n = 4 fare). Şekil B'de gösterilen şekil açıklamaları, şekil C ve D için de geçerlidir.

Şekil 11: Farklı tedavi protokollerinin karşılaştırması. Şekilde gösterilen farklı zamanlarda ve programlarda anle138b ile yapılan tedavi, RML scrapie ile tehdit sonrasında hayatta kalma sürelerini anlamlı düzeyde uzattı (p < 0,01). Ortalama hayatta kalma süreleri, gün ± standart sapma cinsinden ifade edilir.

Şekil 12: Anle138b uygulamasının beyinde PrP^{Sc} düzeyleri üzerindeki doza bağımlı etkisi. C57BL/6 farelerine, intraserebral (i.c.) yoldan 30 µL %1 beyin homojenatı (RML scrapie) inoküle edildi. Tedavi, enfeksiyondan 80 gün sonra, DMSO+fıstık yağı ile karıştırılarak oral yoldan uygulanan farklı miktarlarda anle138b (Şekilde gösterilmiştir) ile başlatıldı. Enfeksiyondan 120 gün sonra hayvanlar öldürüldü ve beyinde PrP^{Sc} miktarı, enfeksiyondan 80 gün sonra öldürülen hayvanlarla karşılaştırılarak nicelendirildi. Hata çubukları, standart hatayı gösterir (n = 4 fare).

Şekil 13: 1 hafta süreyle DMSO+fıstık yağı ile karıştırılmış anle138b ile günde 1 mg ile tedavi edilen, enfekte edilmemiş farelerden alınan beyin dokusunun immüno-blotlanması yoluyla PrP^C'nin nicelendirilmesi. Her çubuk, her gruptaki dört fareyi temsil eder.

5 **Şekil 14:** Anle138b'nin farmakokinetik analizi. Tek bir anle138b dozu, gösterildiği gibi enfekte edilmemiş C57BL/6 farelerine uygulandı. Uygulamadan sonra farklı zaman noktalarında beyin ve serum içindeki bileşik miktarı, zaman noktası ve deney grubu başına 2 hayvan için LC-MS ile ölçüldü.

10 **Şekil 15:** α -sinüklein agregatlarının oluşumunun farklı bileşikler tarafından inhibisyonu. Tablo 2'de test edilen bileşiklerin yapıları gösterilir.

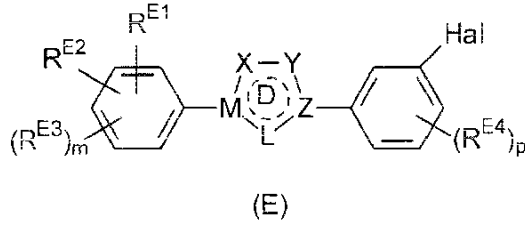
Şekil 16: Bir anti-TH antikoru ile immüno-boyanmış 50 μ m'lik kesitlerde tirozin hidroksilaz (TH) pozitif substantia nigra pars compacta (SNpc) hücrelerinin belirlenmesi suretiyle değerlendirilen, MPTP ile tedavi edilmiş farelerde MPTP ile tedavi edilmemiş farelere kıyasla nöron kaybının nicelendirilmesi. SNpc'de her iki kesitten biri, Stereo araştırmacı yazılımı (MicroBrightfield, Colchester, VT, ABD) kullanılarak analiz edildi. İmmüno-boyanmış hücreler, 20x objektif kullanılarak optik fraksiyonlaştırma yöntemi ile sayıldı. Stereolojik sayımlar, iki bağımsız araştırmacı tarafından kör şekilde yapıldı.

Şekil 17: Anle138C'nin ABeta agregasyonu üzerindeki etkisi. ABeta agregasyonu, dinamik ışık saçılımı yoluyla analiz edildi. Anle138C yokluğunda (üst panel) ve varlığında (orta panel) monomerik ve oligomerik Abeta40. Alttaki panel, örneğin santrifüjlenmesinden sonra ölçülen, amiloid fibrillar Abeta40 durumuna yönelik ebat dağılımını gösterir.

BULUŞUN DETAYLI AÇIKLAMASI

Buluş, istemlerde sıralanan düzenekler ile özetlenir. Aşağıda ve istemlerde sıralanan, tercih edilen düzeneklerin tamamının 5 kombinasyonlarının, mevcut açıklamanın kapsamı dahilinde şeklinde öngörüldüğü anlaşılr.

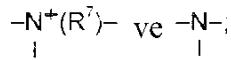
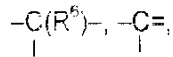
Mevcut açıklama, genel formül (E) ile temsil edilen bir bileşik ile ilgilidir



10

D halkasında X, Y ve L, $-C(R^1)(R^2)-$, $-C(R^3)=$, $-N(R^4)-$, $-N=$, $-N^+(R^5)=$, $-O-$ ve $-S-$ arasında birbirinden bağımsız olarak yönsüz şekilde seçilir;

15 M ve Z, aşağıdakiler arasında birbirinden bağımsız olarak yönsüz şekilde seçilir



20 - - - - isteğe bağlı bir çift bağ temsil eder.

X, Y, Z, L ve M'nin, valans ve stabilitenin izin verdiği şekilde seçileceği kendiliğinden bellidir.

$R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6$ ve R^7 birbirinden bağımsız olarak hidrojen; C_{1-4} alkil; $-C_{1-4}$ alkilen-halojen; $-C_{1-4}$ alkilen-OH; $-C_{1-4}$ alkilen- C_{1-4} alkoksi; $-C(O)-C_{1-4}$ alkil ve C_{6-10} aril arasından seçilir, burada aril halkası, C_{1-4} alkil veya halojen ile isteğe bağlı olarak ikame edilebilir. C_{6-10} aril grubu özellikle sınırlı değildir ve örn. fenil ve naftil arasından seçilebilir. Halojen atomu, F, Cl, Br veya I olabilir ve tipik olarak F veya Cl'dir.

Tercihen $R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6$ ve R^7 birbirinden bağımsız olarak hidrojen; C_{1-4} alkil; $-C_{1-4}$ alkilen-halojen; $-C_{1-4}$ alkilen-OH; $-C_{1-4}$ alkilen- C_{1-4} alkoksi ve $-C(O)-C_{1-4}$ alkil arasından seçilir. Daha fazla tercihen $R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6$ ve R^7 , hidrojen; C_{1-4} alkil ve $-C_{1-4}$ alkilen-halojen arasından seçilir.

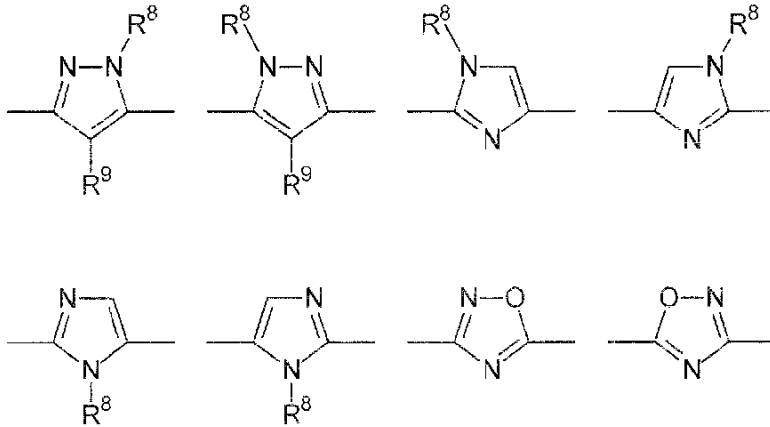
İkame edici seçimi, formül (E)'ye ait bileşiklerin amaçlanan kullanımına bağlı olabilir. Tercih edilen bir düzenekte $R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6$ ve R^7 'den en az biri (daha fazla tercihen R^4, R^5 ve R^7 'den en az biri), $-C_{1-4}$ alkilen-halojendir. Bileşikler, agregre olmuş proteinlerin birikintilerinin görüntülenmesine yönelik bir sonda olarak kullanılacaksa bu, özellikle faydalıdır, çünkü bu sayede bunların saptanabilen bir halojen izotopu gibi saptanabilen bir etiket ile hızlı ve verimli şekilde etiketlenmesi mümkün olur. Saptanabilen halojen izotoplarının örnekleri arasında $^{18}F, ^{125}I, ^{123}I, ^{131}I, ^{77}Br$ ve ^{76}Br , özellikle ^{18}F bulunur. Saptanabilen bir halojen izotopunun, formül (E)'ye ait bileşiklerde bulunan diğer halojen atomlarından biri, örneğin fenil halkasına eklenmiş halojen atomları olarak kullanılması da şüphesiz mümkündür.

Alternatif olarak ^{11}C , formül (E)'ye ait bileşikler saptanabilir şekilde etiketlemek için kullanılabilir. ^{11}C , R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 ve R^7 'den en az birinde (daha fazla tercihen R^4 , R^5 ve R^7 'den en az birinde) veya formül (E)'ye ait bileşiğin başka bir bölümünde bulunabilir.

5

Tercih edilen alternatif bir düzenekte R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 ve R^7 birbirinden bağımsız olarak hidrojen ve C_{1-4} alkil arasından seçilir, tercihen hidrojendir.

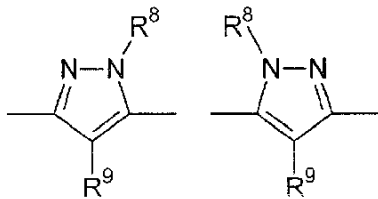
- 10 D halkası özellikle sınırlı değildir. Bunun tipik örnekleri arasında şunlar bulunur



15



D halkasının özellikle tercih edilen örnekleri şöyledir



20

Yukarıdaki formüllerde R^8 , hidrojen; C_{1-4} alkil; $-\text{C}_{1-4}$ alkilen-halojen; -

C_{1-4} alkilen-OH; $-C_{1-4}$ alkilen- C_{1-4} alkoksi; $-C(O)-C_{1-4}$ alkil ve C_{6-10} aril arasından seçilir, burada aril halkası, C_{1-4} alkil veya halojen ile isteğe bağlı olarak ikame edilebilir. Tercihen R^8 , hidrojen; C_{1-4} alkil; $-C_{1-4}$ alkilen-halojen; $-C_{1-4}$ alkilen-OH; $-C_{1-4}$ alkilen- C_{1-4} alkoksi ve $-C(O)-C_{1-4}$ alkil arasından seçilir. Daha fazla tercihen R^8 , hidrojen; C_{1-4} alkil; $-C_{1-4}$ alkilen-halojen arasından seçilir. Bir düzenekte R^8 , hidrojen ve C_{1-4} alkil arasından seçilir, daha fazla tercihen hidrojen'dir. Alternatif bir düzenekte R^8 , $-C_{1-4}$ alkilen-halojen'dir. Yukarıda açıklandığı gibi R^8 , arzu edilirse saptanabilir şekilde etiketlenebilir.

10

Yukarıdaki formüllerde R^9 , hidrojen; C_{1-4} alkil; $-C_{1-4}$ alkilen-halojen; $-C_{1-4}$ alkilen-OH; $-C_{1-4}$ alkilen- C_{1-4} alkoksi; $-C(O)-C_{1-4}$ alkil ve C_{6-10} aril arasından seçilir, burada aril halkası, C_{1-4} alkil veya halojen ile isteğe bağlı olarak ikame edilebilir. Tercihen R^9 , hidrojen; C_{1-4} alkil; $-C_{1-4}$ alkilen-halojen; $-C_{1-4}$ alkilen-OH; $-C_{1-4}$ alkilen- C_{1-4} alkoksi ve $-C(O)-C_{1-4}$ alkil arasından seçilir. Daha fazla tercihen R^9 , hidrojen; C_{1-4} alkil; $-C_{1-4}$ alkilen-halojen arasından seçilir. Bir düzenekte R^9 , hidrojen ve C_{1-4} alkil arasından seçilir, daha fazla tercihen hidrojen'dir. Alternatif bir düzenekte R^9 , $-C_{1-4}$ alkilen-halojen'dir. Yukarıda açıklandığı gibi R^9 , arzu edilirse saptanabilir şekilde etiketlenebilir.

20

Başka bir düzenekte R^8 ve R^9 hidrojen'dir. Yine başka bir düzenekte R^8 , $-C_{1-4}$ alkilen-halojen'dir ve R^9 , hidrojen'dir.

25 Hal, F, Cl, Br ve I arasından seçilir ve tercihen F, Cl veya Br, daha fazla tercihen Cl veya Br, en fazla tercihen Br'dir.

R^{E1} , hidroksi, C_{1-6} alkoksi ve $-NR^{E5}R^{E6}$ arasından seçilir.

R^{E2} , hidrojen, halojen, hidroksi, C_{1-6} alkoksi ve $-NR^{E5}R^{E6}$ arasından seçilir, tercihen R^{E2} , hidrojen, hidroksi, C_{1-6} alkoksi ve $-NR^{E5}R^{E6}$ arasından seçilir.

- 5 Alternatif bir düzende R^{E1} ve R^{E2} birlikte bir $-T-(CR^{E7}R^{E8})_n-V-$ yapısının yanı sıra komşu karbon atomlarına eklenmiş iseler bir ikili bağın bulunduğu karşılık gelen yapıları yönsüz şekilde oluşturabilir. Bu yapıda T, $CR^{E9}R^{E10}$, NH ve O arasından seçilir ve V, $CR^{E9}R^{E10}$, NH ve O arasından seçilir. Tercihen T ve V'den en az biri, NH veya
- 10 O'dur. Bu yapıların örnekleri arasında $-O-(CH_2)_n-O-$, $-O-(CF_2)_n-O-$, $-O-(CH_2)_n-CH_2-$, $-NH-(CH_2)_n-NH-$, $-NH-(CF_2)_n-NH-$, $-NH-(CH_2)_n-CH_2-$ veya bir ikili bağın bulunduğu karşılık gelen bir yapı bulunur. Örneğin $n = 1$ ise $-N=CH-NH-$, bir ikili bağın bulunduğu ve $-NH-CH_2-NH-$ 'ye karşılık gelen bir yapıdır. Tercihen R^{E1} ve R^{E2} birlikte bir $-O-(CH_2)_n-$
- 15 O- yapısı oluşturur. Bu grubun ayrıca karşılık gelen hidroksi gruplarına in vivo hidrolize olabildiği varsayılır.

n , 1 ila 3'tür; tercihen n , 1 veya 2'dir, daha fazla tercihen n , 1'dir.

- 20 R^{E5} ve R^{E6} birbirinden bağımsız olarak hidrojen ve C_{1-6} alkil arasından seçilir; tercihen R^{E5} ve R^{E6} birbirinden bağımsız olarak hidrojen ve C_{1-4} alkil arasından seçilir.

R^{E7} ve R^{E8} birbirinden bağımsız olarak H veya F'dir ve tercihen H'dir.

25

R^{E9} ve R^{E10} birbirinden bağımsız olarak H veya F'dir ve tercihen H'dir.

R^{E1} ve R^{E2} 'nin fenil halkasına eklendiği pozisyon değişiklik gösterebilir.

Bir düzenekte R^{E1} ve R^{E2} birbirinden bağımsız olarak hidroksi veya
5 alkoksidir ve fenil halkasını D halkasına bağlayan karbon atomuna kıyasla meta ve para eklenir.

Bir ikinci düzenekte R^{E1} ve R^{E2} , bir $-T-(CR^{E7}R^{E8})_n-V-$ yapısı veya bir
ikili bağın bulunduğu karşılık gelen bir yapıdır ve fenil halkasını D
10 halkasına bağlayan karbon atomuna kıyasla meta ve para eklenir. $-T-(CR^{E7}R^{E8})_n-V-$ yapısı için yukarıdaki tercih edilen tanımlar, benzer şekilde bu düzenek için de geçerlidir.

Bir üçüncü düzenekte R^{E1} , $-NR^{E5}R^{E6}$ 'dır ve fenil halkasını D halkasına
15 bağlayan karbon atomuna kıyasla meta ve para eklenir.

Başka R^{E3} ikame edicileri, R^{E1} ve R^{E2} 'ye ek olarak fenil halkası
üzerinde isteğe bağlı olarak bulunabilir. R^{E3} , bir C_{1-6} alkil grubu veya
bir C_{5-10} aril grubu (örneğin bir fenil veya naftil grubu), tercihen bir
20 C_{1-6} alkil grubu, daha fazla tercihen bir C_{1-4} alkil grubu olabilir. m ikame edicilerinin sayısı özellikle sınırlı değildir ve tipik olarak 0 ila 2 aralığında, tercihen 0 veya 1, tipik olarak 0'dır.

Başka R^{E4} ikame edicileri de bulunabilir. Bunlar tipik olarak bir
25 halojen atomu, bir C_{1-6} alkil grubu veya bir C_{5-10} aril grubu (örneğin bir fenil veya naftil grubu), tercihen bir halojen atomu veya bir C_{1-6} alkil grubu, daha fazla tercihen bir C_{1-6} alkil grubu, en fazla tercihen bir C_{1-4} alkil grubudur. p ikame edicilerinin sayısı özellikle sınırlı

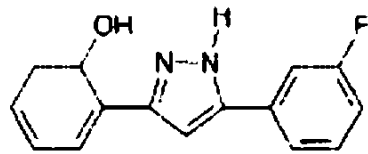
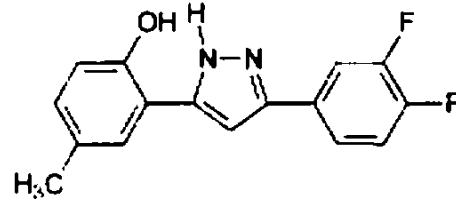
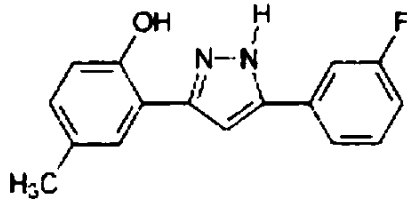
değildir ve tipik olarak 0 ila 2 aralığında, tercihen 0 veya 1, tipik olarak 0'dır.

Bazı düzeneklerde aşağıdaki bileşikler hariçtir:

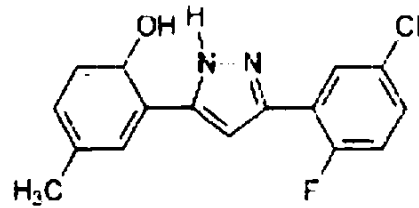
- 5 3(5)-(2-hidroksi-5-metilfenil)-5(3)-(4-klorofenil) pirazol (DE 41 26 543: Tablo 1'de bileşik 26);

orto-hidroksifenil-5 dikloro-3'-4' fenil-3 metil-2 pirazol (FR 2.104.932: Örnek IV);

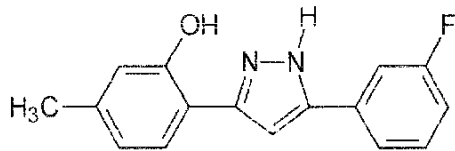
- 10 orto-hidroksifenil-5 dikloro-3'-4' fenil-3 fenil-2 pirazol (FR 2.104.932: Örnek IV);



ve



15

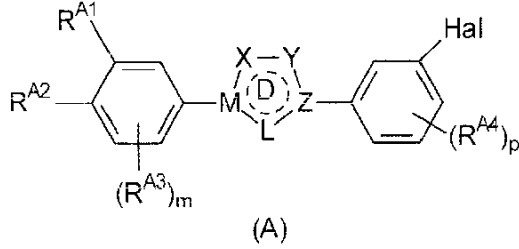


Bu bileşikler, WO 2004/080972'de IA-44, IA-47, IA-81, IA-106 ve IA-115 bileşikleri olarak açıklanır.

20

Açıklamanın diğer düzeneklerinde bu bileşikler dahil değildir.

Formül (E) ile temsil edilen bileşiklerin tercih edilen örnekleri arasında formül (A) ile temsil edilen bileşikler bulunur.



5

Yukarıda formül (E) ile ilgili olarak verilen X, Y, Z, M, L, D halkası, m, p ve Hal tanımları, benzer şekilde formül (A) için de geçerlidir.

R^{A1} ve R^{A2} 'nin her biri birbirinden bağımsız olarak hidrojen, halojen, hidroksi, C_{1-6} alkoksi ve $-NR^{A5}R^{A6}$ arasından seçilir; ancak R^{A1} ve R^{A2} 'den en az biri, hidroksi, C_{1-6} alkoksi veya $-NR^{A5}R^{A6}$ 'dır. Tercihen R^{A1} ve R^{A2} birbirinden bağımsız olarak hidrojen, hidroksi, C_{1-6} alkoksi ve $-NR^{A5}R^{A6}$ arasından seçilir.

Alternatif olarak R^{A1} ve R^{A2} birlikte yönsüz şekilde bir $-T-(CR^{E7}R^{E8})_n-V-$ yapısı oluşturabilir. Yukarıda böyle bir yapı oluşturan R^{E1} ve R^{E2} bağlamında verilen açıklamalar ve özellikle R^{E7} , R^{E8} , T, n ve V'nin yukarıdaki tanımları, bu yapıyı oluşturan R^{A1} ve R^{A2} için de benzer şekilde geçerlidir.

20

Bir düzenekte R^{A1} ve R^{A2} birbirinden bağımsız olarak hidroksi veya alkoksidir.

Bir ikinci düzenekte R^{A1} ve R^{A2} , bir $-T-(CR^{E7}R^{E8})_n-V-$ yapısı veya bir ikili bağın bulunduğu karşılık gelen bir yapıdır. $-T-(CR^{E7}R^{E8})_n-V-$ yapısı için yukarıdaki tercih edilen tanımlar, benzer şekilde bu düzenek için de geçerlidir.

5

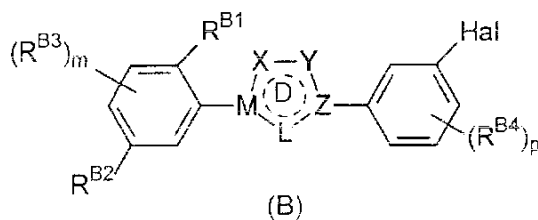
Bir üçüncü düzenekte R^{A1} , $-NR^{A5}R^{A6}$ 'dır ve R^{A2} , hidrojenidir.

Başka R^{A3} ikame edicileri, R^{A1} ve R^{A2} 'ye ek olarak fenil halkası üzerinde isteğe bağlı olarak bulunabilir. R^{A3} , bir C_{1-6} alkil grubu veya
10 bir C_{5-10} aril grubu (örneğin bir fenil veya naftil grubu), tercihen bir C_{1-6} alkil grubu, daha fazla tercihen bir C_{1-4} alkil grubu olabilir.

Başka R^{A4} ikame edicileri de bulunabilir. Bunlar tipik olarak bir halojen atomu, bir C_{1-6} alkil grubu veya bir C_{5-10} aril grubu (örneğin
15 bir fenil veya naftil grubu), tercihen bir halojen atomu veya bir C_{1-6} alkil grubu, daha fazla tercihen bir C_{1-6} alkil grubu, en fazla tercihen bir C_{1-4} alkil grubudur.

R^{A5} ve R^{A6} birbirinden bağımsız olarak hidrojen ve C_{1-6} alkil arasından
20 seçilir; tercihen R^{A5} ve R^{A6} birbirinden bağımsız olarak hidrojen ve C_{1-4} alkil arasından seçilir.

Formül (E) ile temsil edilen bileşiklerin tercih edilen örnekleri arasında formül (B) ile temsil edilen bileşikler bulunur.



25

Yukarıda formül (E) ile ilgili olarak verilen X, Y, Z, M, L, D halkası, m, p ve Hal tanımları, benzer şekilde formül (B) için de geçerlidir.

R^{B1} , hidroksi, C_{1-6} alkoksi ve $-NR^{B5}R^{B6}$ arasından seçilir. Tercihen
5 R^{B1} , hidroksi veya C_{1-6} alkoksidir.

R^{B2} , hidrojen, halojen, hidroksi, C_{1-6} alkoksi ve $-NR^{B5}R^{B6}$ arasından seçilir, tercihen R^{B2} , hidrojen, hidroksi, C_{1-6} alkoksi ve $-NR^{B5}R^{B6}$ arasından seçilir.

10

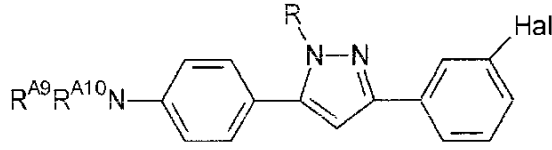
Bir düzenekte R^{B1} , hidroksi veya C_{1-6} alkoksidir ve R^{B2} , hidrojendir.

R^{B5} ve R^{B6} birbirinden bağımsız olarak hidrojen ve C_{1-6} alkil arasından seçilir; tercihen R^{B5} ve R^{B6} birbirinden bağımsız olarak hidrojen ve C_{1-4} alkil arasından seçilir.
15

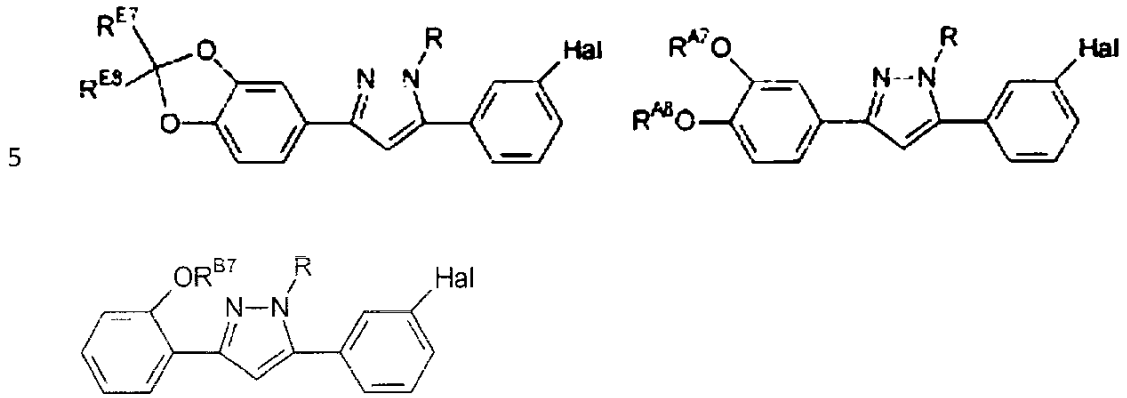
Başka R^{B3} ikame edicileri, R^{B1} ve R^{B2} 'ye ek olarak fenil halkası üzerinde isteğe bağlı olarak bulunabilir. R^{B3} , bir C_{1-6} alkil grubu veya bir C_{5-10} aril grubu (örneğin bir fenil veya naftil grubu), tercihen bir C_{1-6} alkil grubu, daha fazla tercihen bir C_{1-4} alkil grubu olabilir.
20

Başka R^{B4} ikame edicileri de bulunabilir. Bunlar tipik olarak bir halojen atomu, bir C_{1-6} alkil grubu veya bir C_{5-10} aril grubu (örneğin bir fenil veya naftil grubu), tercihen bir halojen atomu veya bir C_{1-6} alkil grubu, daha fazla tercihen bir C_{1-6} alkil grubu, en fazla tercihen bir C_{1-4} alkil grubudur.
25

Mevcut buluşa ait bileşikler şunlardır:



Mevcut buluşa ait tercih edilen bileşikler arasında şunlar bulunur



Yukarıda R^{E7} , R^{E8} ve Hal ile ilgili olarak verilen tanımlar, benzer
10 şekilde bu bileşikler için de geçerlidir.

R, hidrojen; C_{1-4} alkil; $-C_{1-4}$ alkilen-halojen; ve C_{6-10} aril (örneğin fenil ve naftil) arasından seçilir, burada aril halkası isteğe bağlı olarak C_{1-4} alkil veya halojen ile ikame edilebilir. Tercihen R, hidrojen; C_{1-4} alkil;
15 $-C_{1-4}$ alkilen-halojen arasından seçilir. Bir düzenekte R, hidrojen ve C_{1-4} alkil arasından seçilir, daha fazla tercihen hidrojen. Alternatif bir düzenekte R, $-C_{1-4}$ alkilen-halojendir. Yukarıda açıklandığı gibi R, arzu edilirse saptanabilir şekilde etiketlenebilir.

R^{A7} , H veya C_{1-6} alkil, tercihen H veya C_{1-4} alkildir.

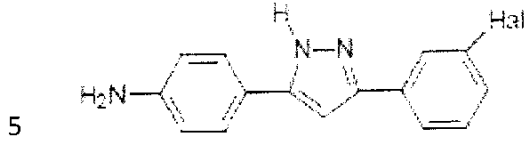
20 R^{A8} , H veya C_{1-6} alkil, tercihen H veya C_{1-4} alkildir.

R^{A9} , H veya C_{1-6} alkil, tercihen H veya C_{1-4} alkildir.

R^{A10} , H veya C_{1-6} alkil, tercihen H veya C_{1-4} alkildir.

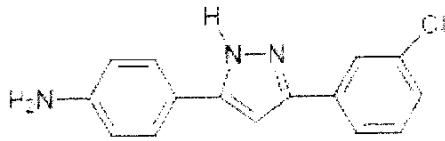
R^{B7} , H veya C_{1-6} alkil, tercihen H veya C_{1-4} alkildir.

Mevcut buluşa ait aşağıdaki bileşikler, proteinlerin agregasyonunu inhibe etmede veya agregate olmuş proteinleri görüntülemeye yüksek bir verimliliğe sahip oldukları bulunduğundan özellikle tercih edilir:

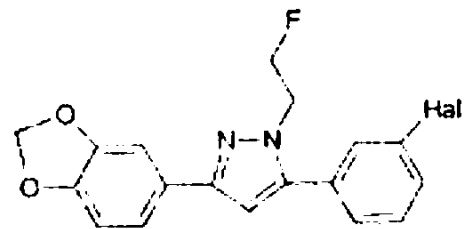
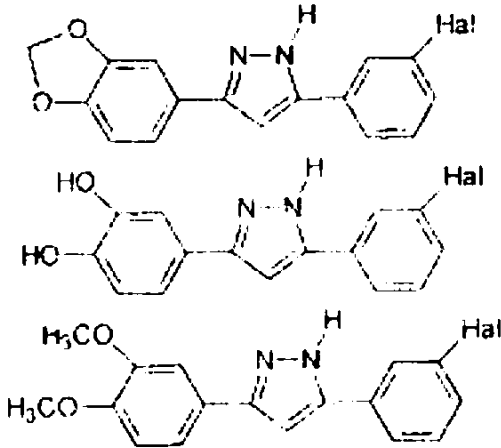


buradaki Hal, Cl veya Br'dir, tercihen Hal, Br'dir.

Mevcut buluşa ait en fazla tercih edilen bileşik şu anda aşağıdaki bileşiktir.



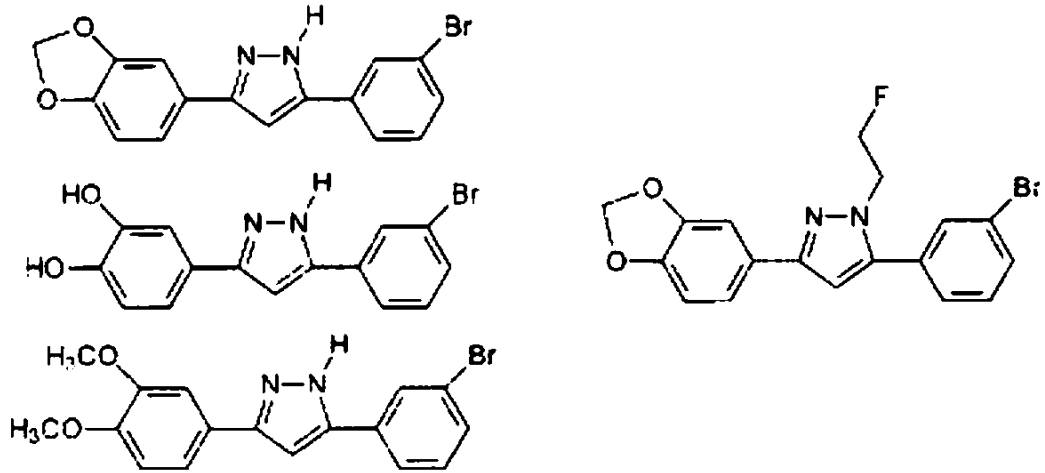
Bu açıklamaya ait aşağıdaki bileşikler, proteinlerin agregasyonunu inhibe etmede veya agregate olmuş proteinleri görüntülemeye yüksek bir verimliliğe sahip oldukları bulunduğundan özellikle tercih edilir:



burada Hal, Cl veya Br'dir, tercihen Hal, Br'dir.

Bu açıklamaya ait en fazla tercih edilen bileşikler şu anda aşağıdaki bileşiklerdir

5



Formül (E)'ye ait bileşikler ayrıca bunların ön ilaçları, esterleri, solvatları veya tuzları formunda bulunabilir.

10

Formül (E)'ye ait bileşikler, yine bu buluşun kapsamı dahilindeki tuzları oluşturur. Burada formül (E)'ye ait bir bileşiğe yapılan atıf, aksi belirtilmedikçe bunun tuzlarına yapılan atfı da kapsayacak şekilde anlaşılacaktır. Burada kullanıldığı gibi "tuz(lar)" terimi, inorganik ve/veya organik asitler ve bazlar ile oluşturulan asidik ve/veya bazik tuzları gösterir. Ek olarak bir bileşik, hem bir bazik yarım hem de bir asidik yarım ihtiva ettiğinde zwitteriyonlar ("dahili tuzlar") oluşturulabilir ve burada kullanılan "tuz(lar)" teriminin kapsamı dahilindedir. Farmasötik açıdan kabul edilebilir (yani toksik olmayan, fizyolojik açıdan kabul edilebilir) tuzlar tercih edilmekle birlikte diğer tuzlar da örn. hazırlık sırasında kullanılabilen izolasyon ve saflaştırma

15

20

adımlarında faydalıdır. Mevcut buluşa ait bileşiklerin tuzları, örneğin bir bileşiğin, denk miktar gibi bir miktar asit veya baz ile, içinde tuzun çökeldiği ortam gibi bir ortam veya sulu bir ortam içinde reaksiyona sokulması ve ardından liyofilizasyon yoluyla oluşturulabilir.

5

Bazik bir yarım ihtiva eden bileşikler, çeşitli organik ve inorganik asitler ile tuzlar oluşturabilir. Örnek asit ilaveli tuzlar arasında asetatlar (örneğin asetik asit veya trihaloasetik asit, örneğin trifloroasetik asit ile oluşturulanlar), adipatlar, alginatlar, askorbatlar, 10 aspartatlar, benzoatlar, benzensülfonatlar, bisülfatlar, boratlar, butiratlar, sitratlar, kamforatlar, kamforsülfonatlar, siklopentanpropiyonatlar, diglükonatlar, dodesilsülfatlar, etansülfonatlar, fumaratlar, glükoheptanoatlar, gliserofosfatlar, hemisülfatlar, heptanoatlar, heksanoatlar, hidrokloridler, 15 hidrobromidler, hidroiyodidler, hidroksietansülfonatlar (örn., 2-hidroksietansülfonatlar), laktatlar, maleatlar, metansülfonatlar, naftalensülfonatlar (örn., 2-naftalensülfonatlar), nikotinatlar, nitratlar, oksalatlar, pektinatlar, persülfatlar, fenilpropiyonatlar (örn., 3-fenilpropiyonatlar), fosfatlar, pikratlar, pivalatlar, propiyonatlar, 20 salisilatlar, sukinatlar, sülfatlar (sülfürik asit ile oluşturulanlar gibi), sülfonatlar (burada bahsedilenler gibi), tartratlar, tiyosiyanatlar, tosilatlar gibi tolüensülfonatlar, undekanoatlar ve benzeri bulunur.

Asidik bir yarım ihtiva eden bileşikler, çeşitli organik ve inorganik 25 bazlar ile tuzlar oluşturabilir. Örnek bazik tuzlar arasında amonyum tuzları, sodyum, lityum ve potasyum tuzları gibi alkali metal tuzları, kalsiyum ve magnezyum tuzları gibi alkalın toprak metal tuzları, benzatinler, disikloheksilaminler, hidrabaminler (N,N-

bis(dehidroabietil)etilendiamin ile oluşturulur), N-metil-D-glukaminler, N-metil-D-glikamidler, t-butil aminler gibi organik bazlarla tuzlar (örn. organik aminler) ve arginin, lizin gibi amino asitler ile tuzlar ve benzeri bulunur. Bazik nitrojen ihtiva eden gruplar,
 5 alt alkil halidler (örn. metil, etil, propil ve butil kloridler, bromidler ve iyodidler), dialkil sülfatlar (örn. dimetil, dietil, dibutil ve diamil sülfatlar), uzun zincirli halidler (örn. desil, lauril, miristil ve stearil kloridler, bromidler ve iyodidler), arilalkil halidler (örn. benzil ve fenetil bromidler) ve başkaları gibi ajanlar ile dörtlü hale getirilebilir.

10

Formül (E)'ye ait bileşiklerin ön ilaçları (referans) ve solvatları da burada öngörülür. Burada kullanıldığı gibi "ön ilaç" terimi, bir süjeye uygulandığında metabolik veya kimyasal proseslerle kimyasal dönüşüme uğrayarak formül (E)'ye ait bir bileşiği veya bunun bir
 15 tuzunu ve/veya solvatını veren bir bileşiği gösterir.

Formül (E)'ye ait bileşiklerin solvatları arasında örneğin hidratlar bulunur.

20 Formül (E)'ye ait bileşiklerin esterleri arasında C_{1-6} , tercihen C_{1-4} alkil esterler bulunur.

Formül (E)'ye ait bileşikler, bunların tautomerik formlarında (örn., bir amid veya imino eter olarak) bulunabilir. Bu gibi tüm tautomerik
 25 formlar, burada mevcut buluşun veya açıklamanın bir parçası olarak öngörülür.

Mevcut bileşiklerin tüm stereoizomerleri (örn. çeşitli ikame ediciler

üzerinde asimetrik karbonlara bağlı olarak var olabilenler), enantiyomerik formlar ve diastereomerik formlar dahil olmak üzere, ayrı ayrı bu buluşun veya açıklamanın kapsamı dahilinde öngörülür. Formül (E)'ye ait bileşiklerin tek tek stereoizomerleri örneğin önemli ölçüde diğer izomerlerden arınmış (örn., belirtilen aktiviteye sahip, saf veya önemli ölçüde saf bir optik izomer halinde) olabilir veya örneğin rasematlar halinde veya tüm diğer veya seçilen diğer stereoizomerler ile karıştırılabilir. Formül (E)'ye ait bileşiklerin kiral merkezleri, IUPAC 1974 Tavsiyeleri ile tanımlandığı gibi S veya R konfigürasyonuna sahip olabilir.

Rasemik formlar, fraksiyonel kristalleştirme, diastereomerik türevlerin ayrılması veya kristalleştirilmesi veya kiral kolon kromatografisi ile ayırma gibi fiziksel yöntemlerle çözümlenebilir. Tek tek optik izomerler, rasematlardan, bunlarla sınırlı olmamakla birlikte, optik olarak aktif bir asit ile tuz oluşumu, ardından kristalleştirme dahil, herhangi bir geleneksel yöntemle elde edilebilir.

Formül (E)'ye ait bileşiklerin tüm konfigürasyonel izomerleri, ister karışım halinde ister saf veya önemli ölçüde saf formda olsun, öngörülmüştür. Formül (E)'ye ait bileşiklerin tanımı, cis (Z) ve trans (E) alken izomerlerinin her ikisini, ayrıca siklik hidrokarbon veya heterosiklo halkalarının cis ve trans izomerlerini kapsar.

Tüm spesifikasyonda gruplar ve bunların ikame edicileri, stabil yarımlar ve bileşikler verecek şekilde seçilebilir.

Formül (E)'ye ait bileşikler, isteğe bağlı olarak farmasötik açıdan

kabul edilebilir bir taşıyıcı içeren farmasötik veya tanı amaçlı bir kompozisyon formunda sunulabilir.

Prion hastalıklarının hücre kültürü modellerinde hücre deneyleri ile
 5 kombinasyon halinde "yoğun şekilde flüoresan hedeflerin taranması (SIFT)" tekniğine dayalı bir biyokimyasal deney sistemi uygulayarak mevcut kaşifler, sentetik bileşiklerin büyük kütüphanelerini in vitro nörodejeneratif hastalıklara ve özellikle prion hastalıklarına ve sinükleinopatilere moleküler düzeyde eşlik eden agregasyon
 10 proseslerinin inhibitörleri açısından taradılar. Bu inhibitörler, bu hastalıklar için yeni terapötikler olma potansiyeline sahiptir.

Bu deney sistemi, otomasyon derecesi, ölçüm hızı (örnek başına 75 saniye), kimyasal bileşiklerin miktarı (birincil deney için sadece 200
 15 pikomol) ve ayrıca gerekli kullanılan ajan (örn. deney başına bir CJD vakasından sadece 0.2 mg beyin dengi) açılarından protein agregasyonunun inhibisyonu için yeni ilaçların taranmasında kullanılmaya yönelik tüm deney sistemlerini açık ara geride bırakır. Sadece bu nispeten düşük kaynak ve süre gereklilikleri, bu tür yüksek
 20 (yani 20.000) bileşik sayılarının taranmasına izin verir. Ek olarak tüm tarama verilerinin merkezi bir veritabanı üzerine haritalandırılması ve bunların otomatik analizi, yapı-aktivite ilişkilerinin verimli değerlendirilmesine ve analizine izin verir. Mevcut buluşa dahil edilen hücre kültürü tarama prosedürleri ile kombinasyon, hem biyokimyasal
 25 hem hücre bazlı deneylerde aktif olan bileşiklerin tanımlanmasına izin verir. Böylelikle sadece in vitro değil, ayrıca hücresel bağlamda aktif olan bileşikler tanımlanır, örn. in vivo uygulamalar için ayrıca

geliştirilecek olan tanımlanmış bileşiklerin uygun stabilitesi ve reaktivitesi sağlanır.

Böylelikle mevcut kaşifler, bu birincil taramada aktif olan bir dizi
 5 bileşik tanımladı, bunlar daha sonra seyreltme SERYlerinde
 geçerlenerek çok düşük konsantrasyonlarda bile aktif olan bileşikler
 tanımlandı. Birincil taramada "aktif" şeklinde karakterize edilen
 bileşikler, bir küme analizine tabi tutuldu, bu ise 3,5-difenil-pirazol
 (DPP) türevleri kimyasal bileşik sınıfına (bakınız Şekil 1'de gösterilen
 10 DPP motifi) ait, yüksek oranda aktif bileşikler içeren beş komşu
 kümeden (DPP_1'den DPP_5'e kadar; Şekil 1) oluşan bir grup ortaya
 çıkardı.

Mevcut kaşifler ayrıca nörodejeneratif hastalıklara ve özellikle prion
 15 hastalıklarına ve sinükleinopatilere moleküler düzeyde eşlik eden
 agregasyon proseslerinin inhibitörleri olmaya uygun ilgili bileşikleri
 tanımlamak amacıyla, tanımlanan bileşik sınıfının çeşitli ikame
 edicilerini ikame etti. Bu ilaç-kimya yaklaşımı kullanılarak bir dizi
 ilave bileşik sentezlendi. Bu bileşikler, ilk taramadan seçilen maddeler
 20 ile birlikte, SIFT deneyleri, hücre kültürü bazlı deneyler, fareler
 üzerinde in vivo deneyler dahil ileri testlerin yanı sıra α -sinüklein
 agregasyonuna yönelik biyokimyasal deneylere tabi tutuldu (bakınız
 Örnekler). Bu şekilde bu bileşiklerin hem in vitro hem in vivo
 aktivitesi geçerlendi. Bu bileşiklerin ayrıca sinükleinopatilerde
 25 bulunan bu patolojik protein agregasyonuna yönelik in vitro
 modellerde düşük mikro molar konsantrasyonlarda α -sinükleinin
 multimer oluşumunu etkili şekilde inhibe edebildiği bulgusu,
 tanımlanan bileşiklerin sadece anti-prion bileşikleri olarak görev

yapmakla kalmayıp ayrıca moleküler düzeyde patolojik mekanizmayı hedef alarak Parkinson Hastalığı, DLB ve MSA gibi sinükleinopatiler için terapötik potansiyele sahip olduğuna dair net bir göstergedir. Ek olarak bu bileşiklerin hem prion proteini hem de α -sinüklein

5 agregasyonu üzerinde in vitro inhibitör aktivitesi, proteinin baskın şekilde β -yaprak konformasyonları halinde yanlış katlanmasının, akabinde amiloid fibriller halinde protein agregasyonu için temel oluşturduğu daha geniş yelpazede protein agregasyonu hastalıklarına karşı bunların genel anti-agregatör aktivitesini yansıtabilir. Bu nedenle

10 bu bileşikler ve DPP madde sınıfının üyeleri ile ilişkili bileşikler, bunlarla sınırlı olmamakla birlikte Parkinson hastalığı, prion hastalığı, Alzheimer hastalığı, çoklu sistem atrofisi, Difüze Lewy cisimi hastalığı, frontotemporal demans, amiyotrofik lateral skleroz, Huntington hastalığı, spinoserebellar ataksi ve diğer Poli-Q

15 hastalıkları, kalıtsal serebral amiloid anjiyopati, ailevi amiloid polinöropati, primer sistemik amiloidoz (AL amiloidoz), reaktif sistemik amiloidoz (AA amiloidoz), tip II diyabet, enjeksiyon-lokalize amiloidoz, beta-2 mikroglobulin amiloidoz, kalıtsal nöropatik olmayan amiloidoz, Finlandiya kalıtsal sistemik amiloidoz dahil

20 (nörodejeneratif) protein agregasyonu hastalıklarının tüm panelinin nedensel tedavisi için terapötik olarak faydalı olma potansiyeline sahiptir.

Mevcut buluş ayrıca protein agregasyonu ile bağlantılı bir hastalığın

25 ve/veya bir nörodejeneratif hastalığın tedavisinde veya önlenmesinde kullanılmaya yönelik, mevcut buluşa ait bileşik ve ayrıca bunun bir ester, solvatu veya tuzu ile ilgilidir. Diğer düzenekler, mevcut buluşa ait bir bileşiğin, protein agregasyonu ile bağlantılı bir hastalığın

ve/veya bir nörodejeneratif hastalığın tedavisi veya önlenmesi amaçlı farmasötik bir kompozisyonun hazırlanmasında kullanılmasıdır.

Mevcut buluşa göre "agregasyon" terimi, tipik olarak bir veya daha fazla proteinin oligomerik veya multimerik komplekslerinin oluşmasına karşılık gelir, bunlara ise karbohidratlar, nükleik asitler ve lipidler gibi ilave biyo-moleküllerin komplekslere dahil olması eşlik edebilir.

Burada kullanıldığı gibi "protein agregasyonu ile bağlantılı bir hastalıkta ve/veya bir nörodejeneratif hastalıkta rol oynayan protein" terimi, agrege olmuş proteinlerin varlığı ile karakterize edilen bu hastalıklara karşılık gelir. Bu agrege olmuş proteinler, spesifik dokuda, daha fazla tercihen sinir dokusunda veya beyin dokusunda birikintiler oluşturabilir. Agregasyon derecesi, ilgili hastalığa bağlıdır.

Mevcut buluş ayrıca yukarıda tanımlandığı gibi mevcut buluşa ait bir bileşiğin, protein agregasyonu ile bağlantılı bir hastalığın ve/veya bir nörodejeneratif hastalığın tedavisi veya önlenmesi amaçlı farmasötik bir kompozisyonun hazırlanmasında kullanılması ile ilgilidir.

Mevcut buluşa göre "farmasötik kompozisyon" terimi, bir hastaya, tercihen bir insan hastaya uygulanmaya yönelik bir kompozisyon ile ilgilidir. Buluşa ait farmasötik kompozisyon, yukarıda belirtilen bileşikler ve isteğe bağlı olarak buluşa ait bileşiklerin karakteristiklerini değiştirebilen, örneğin bunların fonksiyonunu stabilize edebilen, modüle edebilen ve/veya aktifleştirebilen başka moleküller içerir. Kompozisyon, katı, sıvı veya gaz halinde olabilir ve

diğerlerinin yanında (bir) toz(lar), (bir) tablet(ler), (bir) çözelti(ler) veya (bir) aerosol(ler) formunda olabilir. Mevcut buluşa ait farmasötik kompozisyon isteğe bağlı ve ek olarak farmasötik açıdan kabul edilebilir bir taşıyıcı içerebilir. Uygun farmasötik taşıyıcıların örnekleri, teknikte iyi bilinir ve bunlar arasında fosfat tamponlu tuz 5 çözeltileri, su, emülsiyonlar, örneğin yağ/su emülsiyonları, çeşitli tiplerde nemlendirici ajanlar, steril çözeltiler, DMSO dahil organik solventler vb. bulunur. Bu tür taşıyıcıları içeren kompozisyonlar, iyi bilinen geleneksel yöntemlerle formüle edilebilir.

10

Farmasötik kompozisyon, bireysel hastanın klinik durumu, farmasötik kompozisyonu verme sahası, uygulama yöntemi, uygulama programı ve doktorların bildiği diğer faktörler hesaba katılarak iyi tıp uygulamaları ile tutarlı bir şekilde formüle edilecek ve dozlanacaktır.

15 Buradaki amaçlar doğrultusunda farmasötik kompozisyonun "etkili miktar" bu şekilde bu konular dikkate alınarak belirlenir. Uzman kişiler, bir kişiye uygulanan farmasötik kompozisyonların etkili miktarının, diğerlerinin yanı sıra bileşiğin doğasına bağlı olacağını bilir.

20

Buluşa veya açıklamaya ait farmasötik kompozisyonlar, oral, rektal, parenteral, intrasisternal, intravajinal, intraperitoneal, topik yoldan (tozlar, merhemler, damlalar veya transdermal yama yoluyla olduğu gibi), bukal yolla veya bir oral veya nazal sprey ile uygulanabilir.

25 "Farmasötik açıdan kabul edilebilir taşıyıcı", toksik olmayan katı, yarı katı veya sıvı dolgu maddesi, seyreltici, kapsül haline getirme materyali veya herhangi bir tipte formülasyon yardımcısı anlamına gelir. Burada kullanıldığı gibi "parenteral" terimi, intravenöz,

intramüsküler, intraperitonel, intrasternal, subkütan ve intraartiküler enjeksiyon ve infüzyonu içeren uygulama modlarına karşılık gelir.

Farmasötik kompozisyon ayrıca uygun şekilde sürekli salım sistemleri ile uygulanır. Sürekli salım kompozisyonlarının uygun örnekleri arasında şekilli mamuller, örn. filmler veya mikrokapsüller formunda yarı-geçirgen polimer matrisleri bulunur. Sürekli salım matrisleri arasında polilaktidler (ABD Pat. No. 3,773,919, EP 58 481), L-glutamik asit ve gamma-etil-L-glutamat kopolimerleri (Sidman. U. ve arkadaşları, Biopolymers 22:547-556 (1983)), poli (2- hidroksietil metakrilat) (R. Langer ve arkadaşları, J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277 (1981), ve R. Langer, Chem. Tech. 12:98-105 (1982)), etilen vinil asetat (R. Langer ve arkadaşları, Id.) veya poli-D-(-)-3-hidroksibutirik asit (EP 133 988) bulunur. Sürekli salım farmasötik kompozisyonu ayrıca lipozom şeklinde sıkıştırılmış bileşik içerir. Farmasötik kompozisyonu ihtiva eden lipozomlar, kendi başlarına bilinen yöntemlerle hazırlanır: DE 32 18 121; Epstein ve arkadaşları Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 82:3688-3692 (1985); Hwang ve arkadaşları Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 77:4030-4034 (1980); EP 52 322; EP 36 676; EP 88 046; EP 143 949; EP 142 641; Japon Patent Başvurusu 83-118008; ABD Patentleri No. 4,485,045 and 4,544,545; ve EP 102324. Sıradan şekilde lipozomlar, lipit içeriğinin, yaklaşık %30 mol. kolesterolden daha fazla olduğu, küçük (yaklaşık 200 - 800 Angstrom) tek lamelli tiptedir; seçilen oran, optimum terapi için ayarlanır.

25

Parenteral uygulama için farmasötik kompozisyon genellikle bunun, arzu edilen saflık derecesinde, enjekte edilebilir bir birim dozaj formunda (çözelti, süspansiyon veya emülsiyon), farmasötik açıdan

kabul edilebilir bir taşıyıcı, yani kullanılan dozaj ve konsantrasyonlarda alıcılar için toksik olmayan ve formülasyonun diğer bileşenleri ile uyumlu bir taşıyıcı ile karıştırılması suretiyle formüle edilir.

5

Genellikle formülasyonlar, farmasötik kompozisyonun bileşenlerinin sıvı taşıyıcılar veya ince bölünmüş katı taşıyıcılar veya her ikisi ile eşit ve sıkı bir şekilde temas ettirilmesi suretiyle hazırlanır. Daha sonra gerekirse ürün, arzu edilen formülasyon halinde şekillenir. Tercihen taşıyıcı, bir parenteral taşıyıcı, daha fazla tercihen alıcının kanı ile izotonik olan bir çözeltidir. Bu gibi taşıyıcı araçların örnekleri arasında su, tuz, Ringer çözeltisi ve dekstroz çözeltisi bulunur. Sabit yağlar ve etil oleat gibi sulu olmayan araçların yanı sıra lipozomlar da burada faydalıdır. Taşıyıcı uygun şekilde izotonikliği ve kimyasal stabiliteyi güçlendiren maddeler gibi az miktarlarda katkı maddeleri ihtiva eder. Bu gibi materyaller, kullanılan dozaj ve konsantrasyonlarda alıcılar için toksik değildir ve bunlar arasında tamponlar, örneğin fosfat, sitrat, sukinat, asetik asit ve diğer organik asitler veya bunların tuzları; antioksidanlar, örneğin askorbik asit; düşük moleküler ağırlıklı (yaklaşık on dörtten az) (poli)peptitler, örn. poli arginin veya tripeptitler; proteinler, örneğin serum albümini, jelatin veya immünoglobulinler; hidrofilik polimerler, örneğin polivinilpirolidon; amino asitler, örneğin glisin, glutamik asit, aspartik asit veya arginin; monosakaritler, disakaritler ve selüloz veya bunun türevleri dahil olmak üzere diğer karbohidratlar, glukoz, manoz veya dekstrinler; şelatlama ajanları, örneğin EDTA; şeker alkolleri, örneğin manitol veya sorbitol; karşı iyonlar, örneğin sodyum; ve/veya iyonik

25

olmayan surfektanlar, örneğin polisorbattar, poloksamerler veya PEG bulunur.

5 Terapötik uygulama için kullanılacak farmasötik kompozisyonun bileşenleri, steril olmak zorundadır. Sterillik, steril filtreleme membranlarından (örn., 0.2 µm membranlar) filtreleme yoluyla kolayca gerçekleştirilir. Farmasötik kompozisyonun terapötik bileşenleri genellikle steril bir erişim portuna sahip bir kap, örneğin hipodermik bir enjeksiyon iğnesi ile delinebilen bir stopere sahip bir
10 intravenöz çözelti poşeti veya şişesine yerleştirilir.

Farmasötik kompozisyonun bileşenleri sıradan bir şekilde sulu bir çözelti veya yeniden oluşturulacak liyofilize bir formülasyon şeklinde birim veya çok dozlu kaplar, örneğin kapalı ampuller veya şişeler
15 içerisinde saklanacaktır. Liyofilize edilmiş bir formülasyonun örneği olarak 10 ml'lik şişeler, 5 ml steril filtre edilmiş %1 (a/h) sulu çözelti ile doldurulur ve elde edilen karışım liyofilize edilir. İnfüzyon çözeltisi, liyofilize edilmiş bileşik(ler)in bakteriyostatik Enjeksiyon Suyu kullanılarak yeniden oluşturulması suretiyle hazırlanır.

20

Burada kullanıldığı gibi "terapötik açıdan etkili miktar" terimi, arzu edilen biyolojik etkiyi uyandırmak için yeterli bir miktara karşılık gelir. Mevcut buluşta arzu edilen biyolojik etki, protein agregasyonunun inhibe edilmesidir.

25

Protein agregasyonu ile bağlantılı bir hastalıkta ve/veya bir nörodejeneratif hastalıkta rol oynayan bir proteinin agregasyonunu inhibe etmek için güçlendirilmiş etkinliğe sahip bir bileşiğin

tanımlanmasına yönelik bir yöntem tarif edilmekte olup, (a) etiketlenmiş monomerik bir protein ile adı geçen proteinin farklı şekilde etiketlenmiş bir agregatının, yukarıda tanımlandığı gibi bir bileşiğin bir türevi olan bir aday agregasyon inhibitörünün (1) 5 varlığında ve/veya (2) yokluğunda temas ettirilmesi; (b) ortak lokalize etiketlerin miktarının belirlenmesi, bu ise monomerik proteinin adı geçen protein agregatına bağlanma derecesini temsil eder; ve (c) adı geçen bileşiğin varlığında ve yokluğunda elde edilen sonucun karşılaştırılması adımlarını içerir, burada adı geçen bileşiğin 10 varlığında ortak lokalize olmuş etiketlerin azalması, bileşiğin adı geçen proteinin agregasyonunu inhibe etme yeterliliğinin göstergesidir.

Burada kullanıldığı gibi "monomerik protein" terimi, her belirli 15 protein için spesifik olan üç boyutlu bir konformasyona sahip tek bir (poli)peptit zincirinden oluşan bir moleküler birime karşılık gelir, bu tercihen tipik olarak nanomolar, mikromolar veya milimolar konsantrasyonlara kadar sulu çözeltiler içinde çözülebilirdir ve bir veya daha fazla karbohidrat, karbohidrat türevi, lipit, fosfat, sülfat, yağ 20 asidi ve nükleotidin, zincir içindeki tek tek amino asitlere kovalent bağlanması suretiyle modifiye edilebilir. Tercihen adı geçen modifikasyon, bir fosforilasyon, glikosilasyon, proteolitik proses, glikasyon, oksidasyon ve nitrasyondur. Burada kullanıldığı gibi "(poli)peptit" terimi, 30 kadar amino asitten oluşan peptit grubunun 25 yanı sıra 30'dan fazla amino asitten oluşan polipeptit grubu içeren bir molekül grubunu tarif eder. Mevcut spesifikasyonda kullanıldığı gibi "protein" terimi ayrıca (poli)peptitlere karşılık gelir.

"Agrege olmuş protein" terimi, yukarıda tanımlandığı gibi bir veya daha fazla tipte "monomerik protein(ler) veya polipeptit(ler)in" kovalent olmayan şekilde bağlanmış oligomerleri veya multimerleri anlamına gelir, bunlar ise monomerik protein ünitelerine göre
 5 kompleksleşmiş protein ünitelerinin değişmiş üç boyutlu konformasyonu ve tipik olarak komplekslerin sulu çözeltiler içinde düşük çözünürlüğü ile karakterize edilir.

"Protein agregasyonunu inhibe etmeye yönelik bileşik" terimi, protein
 10 agregatlarının oluşmasını önleyebilen ve/veya var olan protein agregatlarını ayrıştırabilen veya kırabilen bir bileşiğe karşılık gelir, burada adı geçen bileşikler, formül (E)'ye ait bileşiklerden türevlendirme yoluyla türetilir. Tercihen bu bileşikler, bilgisayarla modelleme yoluyla tasarlanır, burada bilgisayarla modelleme,
 15 proteinin monomerik veya agrege olmuş formuna veya her ikisine bağlanan bileşiklerin araştırılması için sanal tarama araçlarının kullanılmasına anlamına gelir. Genel olarak bu yöntemler, proteinlerin, tercihen bir substrat ile kristalleştirilmiş proteinlerin üç boyutlu yapısına dayanır. Daha fazla tercihen substrat, bir aday
 20 modülatör veya inhibitör ile yer değiştirir.

"Etiketlenmiş... protein" terimi, bir etiket eklendiği bir proteine karşılık gelir. Adı geçen etiket, doğrudan veya dolaylı şekilde eklenebilir. Dolaylı etiketleme özellikle etiketlenmiş (poli)peptidlere,
 25 daha fazla özellikle etiketlenmiş antikora karşılık gelir. Etiket eklenmesi, teknikte uzman kişilerce bilinen ve standart ders kitaplarında (bakınız örneğin Harlow and Lane "Antibodies, A

Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, 1998) tarif edilen bir dizi teknikle yapılabilir.

"Farklı şekilde etiketlenmiş protein" terimi, proteinin agrege olmuş ve monomerik izoformuna farklı etiketlerin eklenmesi anlamına gelir. 5 Tipik bir örnek, agrege olmuş proteine "FITC"nin ve monomerik proteine "Teksas kırmızısı"nın eklenmesidir. Bu etiketler, ışığın farklı dalga boylarında saptanabildiğinden protein izoformlarının miktarını ve/veya konumunu belirlemek mümkündür. Daha fazla özellikle farklı 10 etiketlerin kullanılması, ortak lokalize etiketlerin, yani birbirlerine yakın bulunan etiketlerin varlığının nicelendirilmesine izin verir.

"Ortak lokalize etiketlerin miktarının belirlenmesi", örn. tipik olarak 1 femtolitre örnekten az, aynı düşük hacimde elementten gelen en az iki 15 farklı dalga boyunda tekli fotonların (yani dalga boyuna spesifik) sayısının, tipik olarak 100 μ s'nin altında çok kısa bir süre içinde ayrı ayrı ölçülmesi, ardından belirli bir dalga boyundaki foton sayısı için bir eksenle çok boyutlu bir histogramda grafik olarak gösterilebilen ilgili foton sayılarının bilgisayarlı karşılaştırması yapılarak 20 gerçekleştirilebilir. İki dalga boyu söz konusu olduğunda belirli bir zaman periyoduna ait foton sayıları, iki boyutlu flüoresan yoğunluğu histogramında tekli noktalar halinde temsil edilebilir.

"Adı geçen bileşiğin varlığında ve yokluğunda elde edilen sonucun 25 karşılaştırılması" terimi, bileşiğin, protein agregatlarının oluşumu ve/veya miktarı üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi anlamına gelir. Burada kullanıldığı gibi agregasyonun aday inhibitör bileşiği varlığında, ortak lokalize etiketlerde %10'un üzerinde, daha fazla

tercihen %25'in üzerinde, hatta daha fazla tercihen %50'nin üzerinde ve en fazla tercihen %95'in üzerinde bir azalma, protein agregasyonunu inhibe etme yeterliliğine sahip bileşiklerin göstergesidir. "Adı geçen bileşiğin yokluğu" terimi, agrege olan

5 proteine bir inhibitörün veya aday inhibitörün ilave edilmediği veya edilmemiş olduğu anlamına gelir. Belirli durumlarda negatif kontrollerin, yani protein agregasyonu üzerinde etkisi olmayan bileşiklerin ilave edilmesi faydalı olabilir. "Adı geçen bileşiğin yokluğu" terimi ayrıca bu durumlara karşılık gelir. Benzer şekilde

10 protein agregasyonunu inhibe eden, formül (E)'ye ait bileşiklerden biri, yeni inhibitör bileşiklerin tanımlanmasına yönelik deneylerde pozitif kontroller olarak kullanılabilir. "Varlık" teriminin miktara karşılık geldiği açıktır. Görünür nedenlerle mevcut spesifikasyonda belirtilen bileşikler, farklı etkin konsantrasyonlara sahiptir. Tercihen

15 etkili konsantrasyonlar, 100 μ M'nin altında, daha fazla tercihen 10 μ M'nin altında ve hatta daha fazla tercihen 1 μ M'nin altındadır.

Mevcut spesifikasyona ait yöntem, protein agregasyonuna güçlendirilmiş bir etkinlik ile müdahale edebilen yeni bileşiklerin

20 tanımlanması için özellikle faydalıdır. Türevlendirilmiş bileşiklerin büyük kütüphanelerinin taranmasını sağlar ve yüksek sadakate sahip inhibe edici bileşiklerin tanımlanmasına izin verir. Mevcut buluşun bir yönünde yöntem, flüoresan korelasyonlu spektroskopiye dayanır. Son yıllarda flüoresan korelasyonlu spektroskopi (FCS), moleküler

25 düzeyde prion hastalıkları gibi nörodejeneratif hastalıklarda protein agregasyonunun yüksek düzeyde hassas analizine izin veren bir yöntem olarak kabul edilmiştir (Bieschke ve Schwille 1997, Bieschke ve arkadaşları 2000, Giese ve arkadaşları 2000, Post ve arkadaşları

1998). Ek olarak FCS, küçültülmeye ve otomasyona açıktır ve farmasötik endüstrisinde yüksek randımanlı tarama için kabul gören bir yöntem haline gelmiştir (Koltermann ve arkadaşları 1998). Flüoresan korelasyonlu spektroskopisi (FCS), mevcut konfokal formunda, tekli flüoresanla etiketlenmiş moleküllerin, yüksek apertürlü bir mikroskop objektifi içinden odaklanmış ve tek foton sayma dedektörü üzerinde konfokal şekilde görüntülenen bir uyarma lazeri ışını ile tanımlanan bir açık hacimli eleman içinden difüze olmasının neden olduğu sinyal dalgalanmalarını analiz eder (Schwille ve arkadaşları 1997). En fazla tercih edilen düzeneğinde yöntem, bu teknolojiye dayanır. Bu yöntem, örneğin PrPSc agregatlarına PrPC bağlanmasının veya α -sinükleinin oligomerlerinin veya protofibrillerinin veya fibrillerinin oluşumunun inhibe edilmesine dayanan yüksek randımanlı tarama için uygundur.

15

Protein agregasyonunun inhibitörlerinin saptanmasına yönelik bu deney sistemi, Alzheimer hastalığı ve Parkinson hastalığı gibi spesifik proteinlerin agregasyonu ile bağlantılı bir nörodejeneratif hastalık için yeni terapötiklerin araştırılmasında kullanılabilir. Ek olarak multimer oluşumunun, bunların bileşenlerinin kimyasal doğasından bağımsız olarak patojenezde önemli bir rol oynadığı tüm hastalıklar için potansiyel terapötiklerin araştırması mümkün olmalıdır.

20

Mevcut açıklamanın tercih edilen bir düzeneğinde adı geçen etiketler, flüoresan etiketleridir.

25

Tercihen etiket, florokromlardan, örn. flüoresin izotiyosiyanat (FITC), rodamin, Teksas Kırmızısı, Alexa 488, Alexa 647, fikoeritrin,

alofikosiyanin, 6-karboksifluoresin (6-FAM), 2',7'-dimetoksi-4',5'-dikloro-6-karboksifluoresin (JOE), 6-karboksi-X-rodamin (ROX), 6-karboksi-2',4',7',4,7-heksaklorofluoresin (HEX), 5-karboksifluoresin (5-FAM) veya N,N,N',N'-tetrametil-6-karboksirodamin (TAMRA),
 5 radyoaktif etiketler, örn. ^{32}P , ^{35}S , ^3H ; vb.'den oluşan gruptan seçilir. Etiket ayrıca iki aşamalı bir sistem olabilir, burada örn. protein veya (poli)peptit veya mevcut buluşa ait bileşik, yüksek afiniteli bir bağlanma ortağına, örn. avidin, spesifik antikorlar, vb.ye sahip biyotine, haptenlere, vb.ye konjüğe edilirken bağlanma ortağı,
 10 saptanabilen bir etikete konjüğe edilir.

Mevcut açıklamanın tercih edilen başka bir düzeneğinde adı geçen etiketler, adı geçen proteine spesifik olarak bağlanan bir antikora veya bir antikor fragmanına eklenir.

15

Antikorların "spesifik bağlanması" terimi, örneğin bunların çapraz reaktiviteleri bağlamında tarif edilebilir. Tercihen "...a spesifik olarak bağlanan antikor", agrege olan protein tarafından şifrelenen bir (poli)peptide %98'den az, %95'ten az, %90'dan az, %85'ten az,
 20 %80'den az, %75'ten az, %70'ten az ve %65'ten az özdeşliğe (teknikte bilinen yöntemler kullanılarak hesaplanır) sahip (poli)peptitlere bağlanmayan antikora karşılık gelir. Bununla birlikte antikorlar ayrıca bağlama afiniteleri bağlamında tarif edilebilir veya belirtilebilir. Tercih edilen bağlama afiniteleri arasında ayrılma sabiti veya K_d 'si
 25 $5 \times 10^{-6}\text{M}$, 10^{-6}M , $5 \times 10^{-7}\text{M}$, 10^{-7}M , $5 \times 10^{-8}\text{M}$, 10^{-8}M , $5 \times 10^{-9}\text{M}$, 10^{-9}M , $5 \times 10^{-10}\text{M}$, 10^{-10}M , $5 \times 10^{-11}\text{M}$, 10^{-11}M , $5 \times 10^{-12}\text{M}$, 10^{-12}M , $5 \times 10^{-13}\text{M}$, 10^{-13}M , $5 \times 10^{-14}\text{M}$, 10^{-14}M , $5 \times 10^{-15}\text{M}$ ve 10^{-15}M 'nin altında olanlar bulunur.

"Antikor" terimi, poliklonal, monoklonal, kimerik, insanlaştırılmış antikorlar, tek zincirli, tek zincirli Fv antikor veya antikor fragmanları, örneğin diğerlerinin yanı sıra Fab fragmanlarına karşılık gelir. Antikor fragmanları veya türevleri ayrıca F(ab')₂, Fv veya scFv

5 fragmanları içerir; bakınız örneğin Harlow ve Lane (1988) ve (1999), loc. cit. Bu tür antikorların ve/veya fragmanların üretilmesi için çeşitli prosedürler teknikte bilinir ve kullanılabilir. Böylelikle (antikor) türevleri, peptidomimetikler tarafından üretilbilir. Ayrıca tek zincirli antikorların üretilmesi için tarif edilen teknikler (diğerlerinin yanı sıra

10 bakınız ABD Patenti 4,946,778), bu buluşa ait polipeptit(ler)e ve füzyon proteinlerine spesifik tek zincirli antikorların üretimine adapte edilebilir. Ayrıca transgenik hayvanlar, bu buluşa ait polipeptitlere ve füzyon proteinlerine spesifik, insanlaştırılmış antikorları eksprese etmede kullanılabilir. En fazla tercihen bu buluşa ait antikor, bir

15 monoklonal antikordur. Monoklonal antikorların hazırlanması için sürekli hücre çizgisi kültürleri ile üretilen antikorlar sunan bir teknik kullanılabilir. Bu tekniklerin örnekleri arasında insan monoklonal antikorlarını üretmeye yönelik hibridoma tekniği (Köhler and Milstein Nature 256 (1975), 495-497), trioma tekniği, insan B hücresi

20 hibridoma tekniği (Kozbor, Immunology Today 4 (1983), 72) ve EBV-hibridoma tekniği bulunur (Cole ve arkadaşları, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. (1985), 77-96). BIAcore sisteminde kullanılan yüzey plazmon rezonansı, buluşa ait bir polipeptitin bir epitopuna bağlanan faj antikorlarının etkinliğini

25 arttırmak için kullanılabilir (Schier, Human Antibodies Hybridomas 7 (1996), 97-105; Malmberg, J. Immunol. Methods 183 (1995), 7-13). Bu buluş bağlamında "antikor" teriminin, hücrelerde eksprese edilebilen antikor yapılarını, örn. diğerlerinin arasında virüsler veya

plazmid vektörleri aracılığıyla transfekte ve/veya transdükte edilebilen antikor yapılarını içermesi de öngörülür. Uzman kişiler, birçok durumda antikorların, faj yüzeyi üzerinde açığa çıkan (faj gösterimi) peptitler gibi spesifik olarak bağlanan diğer bileşikler veya izole edilmiş (poli)peptitler ile değiştirilebileceğini bilirler. Antikor veya (poli)peptitler, etiketlenmeyebilir veya mevcut buluşta tarif edilen etiketlerden biri ile etiketlenebilir. Tercihen antikorlar, insan, fare, sıçan, keçi veya tavşandan elde edilebilir.

10 Mevcut açıklamanın daha fazla tercih edilen bir düzeneğinde adı geçen antikor, agrege olmuş ve monomerik proteini ayırt edebilir.

"Ayırt edebilme" terimi, bir antikorun proteinin ya monomerik veya agrege olmuş izoformuna spesifik olması anlamına gelir. Tercihen adı geçen antikor, proteinin bir izoformu için 5 kat azalmış bir K_d 'ye sahiptir, daha fazla tercihen K_d , 10 kat azalmıştır. Sonuç olarak adı geçen antikor, proteinin bir izoformuna bağlanabilirken diğer izoforma esasen bağlanamaz.

20 Mevcut açıklamanın tercih edilen başka bir düzeneğinde ortak lokalize etiket miktarı, "yoğun şekilde flüoresanlı hedeflerin taranması (SIFT)" (Bieschke ve arkadaşları 2000), FRET veya yüksek çözünürlüklü konfokal görüntüleme yöntemi kullanılarak belirlenir.

25 Tercihen adı geçen yüksek çözünürlüklü konfokal görüntüleme, bir konfokal lazer taramalı mikroskop veya döner disk teknolojisinin kullanıldığı bir mikroskop ile gerçekleştirilir.

Mevcut açıklamanın tercih edilen başka bir düzeneğinde adı geçen monomerik ve agrege olan proteinler, prion proteini, Amiloid öncü protein (APP), alfa-sinüklein, süperoksid dismutaz, tau, immünoglobulin, Amiloid-A, transtiretin, Beta2-mikroglobulin, sistatin C, Apolipoprotein A1, TDP-43, İşlet amiloid polipeptit, ANF, gelsolin, insulin, lizozim, fibrinojen, huntingtin ve ataksin ve bir Poly-Q kümesine sahip diğer proteinler ve adı geçen proteinlerin fragmanları veya türevlerinden oluşan gruptan seçilir. Tercih edilen bir düzenekte monomerik ve agrege olan proteinler, Amiloid öncü proteini (APP) ve alfa-sinükleinden oluşan gruptan seçilir. Daha fazla tercih edilen bir düzenekte monomerik ve agrege olan proteinler, alfa-sinükleindir.

Tercihen bir Poly-Q kümesine sahip adı geçen proteinler, en az 36 ardışık glutamin tortusuna sahip proteinlerdir. Daha fazla tercihen Poly-Q kümesine sahip adı geçen proteinler, huntingtin ve ataksinden oluşan gruptan seçilir.

Tercihen adı geçen fragmanlar veya türevler, fosforilasyon, glikosilasyon, proteolitik proses, glikasyon, oksidasyon ve nitrasyon yoluyla modifiye edilmiş gruptan seçilir. Mevcut buluşta bahsedilen (poli)peptitler, bir veya daha fazla karbohidrat, karbohidrat türevi, lipit, fosfat, sülfat, yağ asidi ve zincir içindeki tek tek amino asitlere eklenmiş nükleotitler ihtiva edebilir. Tercihen adı geçen modifikasyon, bir fosforilasyon, glikosilasyon, proteolitik proses, glikasyon, oksidasyon ve nitrasyondur.

Protein, bir omurgalı veya omurgasız proteini olabilir. Tercihen

protein, bir memeli veya kuş proteinidir. Daha fazla tercihen memeli proteini, primat, insan, fare, sıçan, bos (sığır), sus (domuz) ve koyun arasından seçilir. Belirli durumlarda karışık izoformların, yani örneğin insandan türetilmiş agrege olmuş formda PrPSc ve fareden türetilmiş monomerik formun kullanılması tercih edilebilir.

Proteinler, bir hayvandan veya doku kültüründen izole edilebilir veya rekombinant şekilde hazırlanabilir. Deney sisteminde kullanılmayı geliştirmek amacıyla proteinlerin kimyasal olarak modifiye edilebilmesi veya proteazlar veya glikosidazlar gibi enzimler ile işleme tabi tutulabilmesi kaşifler tarafından öngörülür.

Mevcut açıklamanın daha fazla tercih edilen başka bir düzeneğinde monomerik protein, prion proteinidir ve agrege olmuş protein, PrPSc'dir (Prusiner, 1998).

Mevcut açıklamanın daha fazla tercih edilen başka bir düzeneğinde monomerik protein, alfa-Sinükleindir ve adı geçen agrege olmuş protein, alfa-Sinükleinin oligomerleri veya protofibrilleri veya fibrillerinden oluşan gruptan seçilir.

Protein agregasyonu ile bağlantılı hastalıkların ve/veya nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde gelişmiş in vivo etkinliğe sahip bileşikler seçmeye yönelik bir yöntem tarif edilmekte olup, (a) formül (E)'ye ait bileşiğin bir türevi olan bir aday bileşiğin, mevcut buluşta tanımlandığı gibi proteinin agrege olabilen izoformuna sahip bir hücre kültürüne veya bir hayvana verilmesini; (b) gözlemlenebilen agregat miktarının nicelendirilmesini; ve (c) adı geçen proteinin

agregatlarını veya agregat oluşumunu azaltabilen bir bileşiğin tanımlanmasını ve seçilmesini içerir.

Bu yöntem, aday bileşiklerin in vivo, yani bir canlı organizmanın
 5 içindeki hücrelerde veya ex vivo, yani bunun dışında test edilmesine izin verir. Aday bileşiklerin in vivo ve ex vivo test edilmesi örneğin örneklerde gösterilmiştir (aşağı bakınız). Aday bileşiklerin in vivo ve ex vivo test edilmesi, kompleks bir kimyasal ortam varlığında stabilite, toksisite ve arzu edilen moleküler etkinin sağlanacağı konuma
 10 ulaşabilme ile ilgili veriler dahil önemli ilave bilgiler verir.

Tercihen bileşik, protein agregasyonu üzerinde bir etkinin gözlemlenebileceği bir konsantrasyonu belirlemek ve EC_{50} 'yi hesaplamak amacıyla çeşitli konsantrasyonlarda uygulanır, burada
 15 EC_{50} terimi, bir bileşiğin, bu bileşik için maksimum olası tepkinin %50'sini üreten (molar) konsantrasyonuna karşılık gelir.

Mevcut buluş veya açıklama ayrıca yukarıda tanımlandığı gibi formül (E)'ye ait bir bileşiğin, bir hayvanda (referans) in vitro veya ex vivo
 20 protein agregasyonunu inhibe etmede kullanılması ile ilgilidir.

Tercih edilen bir düzenekte hayvan, insan dışı bir hayvandır.

Mevcut buluş veya açıklama ayrıca sırasıyla mevcut buluşa veya
 25 açıklamaya ait bileşiği ve isteğe bağlı olarak farmasötik açıdan kabul edilebilir bir taşıyıcı veya eksipiyenler içeren farmasötik veya tanı amaçlı bir kompozisyon ile ilgilidir.

Mevcut spesifikasyona göre "tanı amaçlı kompozisyon" terimi, spesifikasyona ait farmasötik kompozisyonlara yönelik potansiyel tepkileri veya bunlarla tedavi edilebilirlikleri açısından bireysel pastalara tanı konulmasına yönelik kompozisyonlar ile ilgilidir. "Tanı amaçlı kompozisyon" terimi ayrıca yukarıda bahsedilen hastalıkların temelinde yatan agrege olmuş protein varlığının belirlenmesine yönelik kompozisyonlar ile ilgilidir. Tanı amaçlı kompozisyon, yukarıda bahsedilen bileşikler içerir. Tanı amaçlı kompozisyon ayrıca uygun tampon(lar) ve enzimler, örneğin geri transkriptaz, termostabil polimerazlar, vb. içerebilir. Tanı amaçlı kompozisyonları, bir kap veya birçok kap içinde paketlenir.

Daha fazla tercih edilen bir düzenekte adı geçen bileşiğin etkinliği, türevlendirme yoluyla ayrıca geliştirilir.

15

Mevcut spesifikasyona göre "türevlendirme" terimi, molekülün en az bir pozisyonunda modifikasyonlara sahip, kimyasal açıdan ilişkili bileşiklerin üretilmesine karşılık gelir.

Mevcut buluşun tercih edilen bir düzeneğinde adı geçen bileşik, saptanabilir veya saptanabilir şekilde etiketlenir. Bir bileşiğin varlığı, NMR spektroskopisi, optik saptama, pozitron emisyon tomografisi (PET), elektron mikroskobu, manyetik rezonans görüntüleme (MRI), spektrometre, kromatografi, ELISA deneyi, radyoaktif emisyon saptaması gibi geleneksel tekniklerle, tercihen sintilasyon sayımı veya gamma sayımı, tercihen PET yoluyla izlenebiliyorsa bunun saptanabilir olduğu veya saptanabilir şekilde etiketlendiği anlaşılır.

25

Formül (E)'ye ait bileşikler, agrege olmuş proteinlerin, özellikle amiloid birikintilerinin görüntülenmesi için sonda olarak kullanıldığında bunların etiketlenmesi gerekir. Etiketin spesifik doğası, görüntüleme için kullanılacak yöntemle bağlı olacaktır.

- 5 Pozitronlar (PET) yayan ve kısa bir yarı ömre sahip olan, ^{18}F , ^{11}C , ^{125}I , ^{123}I , ^{131}I , ^{77}Br ve ^{76}Br gibi tipik radyoaktif etiketler, özellikle ^{18}F ve ^{11}C faydalı olacaktır. Bunların kısa yarı ömürlerine bağlı olarak formül (E)'ye ait etiketlenmiş bileşikler, test için kullanılmadan kısa bir süre önce hazırlanmalıdır.

10

Sonuç olarak tanı amaçlı kompozisyon ayrıca formül (E)'ye ait bileşiklerin, arzu edilen bileşiği oluşturmak üzere reaksiyona giren öncülerinden oluşan bir kit formunda sunulabilir. Formül (E)'ye ait bileşik, X, Y veya L olan en az bir yarım, yani $-\text{N}(\text{R}^4)-$ ihtiva ediyorsa ve R^4 , saptanabilir bir etiket içeriyorsa böyle bir kit özellikle elverişlidir.

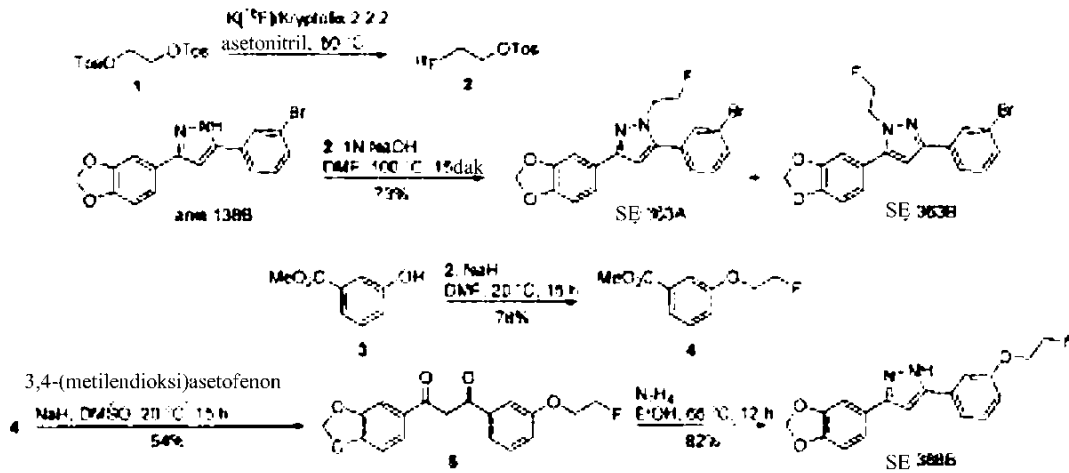
15

Tercih edilen bir düzende görüntüleme için kullanılan bileşik, X, Y veya L olarak bir $-\text{N}(\text{R}^4)-$ yarımına sahiptir, buradaki R^4 , $-\text{C}_{1-4}$ alkilen-halojendir, burada halojen atomu radyoaktiftir. Tercih edilen bir başka düzende görüntüleme için kullanılan bileşik, X, Y veya L olarak bir $-\text{N}(\text{R}^4)-$ yarımına sahiptir, buradaki R^4 , $-\text{C}_{1-4}$ alkildir, bu ise en az bir ^{11}C izotopu ihtiva eder.

20

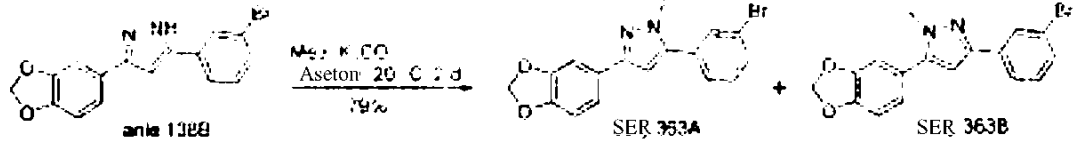
25 Uzman bir kişi, saptanabilir etiketin formül (E)'ye ait bileşiklere eklenebileceği yöntemler tasarlayabilecektir. Aşağıdaki şemalar, açıklayıcı örnek görevi görebilir.

2-[^{18}F]Floroetil tosilat **2**, oksijen, sülfür ve nitrojen nükleofilleri ihtiva eden bileşiklerin floroetilasyonu yoluyla veya metal aracılı çeşitli metilasyonlar yoluyla ^{18}F 'nin (yarı ömür 109.8 dak) dahil edilmesi için faydalı bir öncüdür (R. Schirmacher ve arkadaşları, J. Label. Compd. Radiopharm. 2002, 45, 763-774). 2-[^{18}F]floroetiltosilat, $\text{K}[^{18}\text{F}]/\text{Kryptofix 2.2.2}$ ile direkt nükleofilik ikame ile etilen glikol-1,2-ditosilat **1**'in direkt nükleofilik ikamesi yoluyla iki aşamalı bir sentezde sentezlenerek ^{18}F -floroetile edici ajan **2** elde edilebilir. Şema A'ya göre radyoaktif olmayan SERY 363A, SERY 363B ve SERY 388B sentezi için radyoaktif olmayan reaktif madde **2** kullanıldı. Bu bileşiklerin radyoaktif analoglarının sentezi için aynı koşullar kullanılabilir.



Başka bir faydalı pozitron yayıcı olan ^{11}C (yarı ömür 20.38 dak), [^{11}C]metil iyodid (J. Eriksson ve arkadaşları, J. Label. Compd. Radiopharm. 2006, 49, 1177-1186) aracılığıyla aynı tipte nükleofilik ikame ile sokulabilir. Şema B'ye göre radyoaktif olmayan SERY 392A ve SERY 392B sentezi için radyoaktif olmayan metil iyodid

kullanıldı. Bu bileşiklerin radyoaktif analoglarının sentezi için aynı koşullar kullanılabilir.



Şema B

- 5 Bu bileşiklerin sentezlenmesi özellikle kolay olduğundan saptanabilir yarımın D halkasına eklenmesi tercih edilmekle birlikte bu şart değildir. Saptanabilir yarımın molekül içinde farklı bir pozisyonda olduğu buluşa ait bileşiklerin sağlanması eşit derecede mümkündür.
- 10 Mevcut açıklama, agrege olmuş protein birikintilerinin görüntülenmesine yönelik, aşağıdaki adımları içeren bir yöntem sunar:
 - (i) mevcut buluşa ait saptanabilir şekilde etiketlenmiş bir bileşik içeren bir kompozisyonun saptanabilir bir miktarının bir süjeye sokulması;
 - 15 (ii) bileşiğin agrege olmuş protein ile birleşmesi için yeterli bir süre tanınması; ve
 - (iii) agrege olmuş protein ile birleşen bileşiğin saptanması.

Görüntüleme yönteminin tercih edilen bir düzeneginde agrege olmuş protein, Amiloid öncü proteini (APP) ve alfa-sinükleinden oluşan gruptan seçilir. Daha fazla tercih edilen bir düzenekte agrege olmuş protein, alfa-sinükleindir.

Saptanabilir şekilde etiketlenmiş bileşiği içeren kompozisyon, yukarıda tarif edilen uygulamalardan biri ile, örneğin oral veya

parenteral yoldan süjeye sokulabilir. Etiketlenmiş bileşik, bir hastaya sokulabilir ve bileşiğin agrege olmuş protein ile birleşmesi için yeterli bir süre geçtikten sonra etiketlenmiş bileşik, hastanın içinde invasif olmayan şekilde saptanır. Alternatif olarak etiketlenmiş bileşik, bir hastaya sokulabilir, bileşiğin agrege olmuş protein ile birleşmesi için yeterli süre tanınır ve daha sonra hastadan bir doku örneği alınır ve doku içerisindeki etiketlenmiş bileşik, hastadan uzakta doku içinde saptanır. Etiketlenmiş bileşik, doku örneği içine sokulmadan önce de hastadan bir doku örneği çıkarılabilir. Bileşiğin agrege olmuş proteine bağlanması için yeterli bir süre tanındıktan sonra bileşik saptanabilir.

Agrege olmuş protein ile birleşen etiketlenmiş bileşiğin saptanmasına yönelik yöntemler, teknikte iyi bilinir ve bunlar arasında, sınırlama olmadan, manyetik rezonans görüntüleme (MRI), pozitron emisyon tomografisi (PET) veya radyoetiketli bileşiklerin saptanması için tek foton emisyonlu bilgisayarlı tomografi (SPECT) bulunur. Bileşik içerisine dahil edilen etiket, kullanılacak saptama yöntemine bağlıdır. Böylelikle örneğin bir saptama yöntemi olarak PET seçilmesi durumunda bileşik, ^{11}C veya ^{18}F gibi pozitron yayan bir atoma sahip olmalıdır.

Agrege olmuş proteinlerin görüntülemesi, niceliksel şekilde de yapılabilir, böylece agrege olmuş protein miktarı belirlenebilir.

Buluşun veya açıklamanın tercih edilen bir düzeneğinde protein agregasyonu ile bağlantılı adı geçen hastalık, en az bir proteinin veya bunun bir fragmanının veya türevinin agrege olmuş formlarının varlığı ile karakterize edilir, burada bu protein, prion proteini, Amiloid öncü

- protein (APP), alfa-sinüklein, süperoksid dismutaz, tau, immünoglobulin, Amiloid-A, transtiretin, Beta2-mikroglobulin, sistatin C, Apolipoprotein A1, TDP-43, İşlet amiloid polipeptit, ANF, gelsolin, insulin, lizozim, fibrinojen, huntingtin ve ataksin ve bir Poly-Q kümesine sahip diğer proteinlerden oluşan gruptan seçilir. Tercih edilen bir düzenekte protein, Amiloid öncü proteini (APP) ve alfa-sinükleinden oluşan gruptan seçilir. Daha fazla tercih edilen bir düzenekte protein, alfa-sinükleindir.
- 5
- 10 Tercihen bir Poly-Q kümesine sahip adı geçen proteinler, en az 36 ardışık glutamin tortusuna sahip proteinlerdir. Daha fazla tercihen Poly-Q kümesine sahip adı geçen proteinler, huntingtin ve ataksinden oluşan gruptan seçilir.
- 15 Adı geçen proteinlerin, fosforilasyon, glikosilasyon, proteolitik proses ve benzeri yollarla modifiye edilmiş proteinler dahil, çeşitli izoformlarda var olabileceği uzman kişilerce bilinir. "En az bir ..." terimi, hastalığın agrege olmuş formda birden fazla protein varlığı ile ilişkilendirilebileceğine dair uzman kişilerce bilinen olguya karşılık gelir. Örneğin Alzheimer hastalığında, amiloid öncü proteininin (APP) agregatları ve tau agregatları genellikle saptanabilir.
- 20

Burada kullanıldığı gibi "nörodejeneratif hastalıklar" terimi, Parkinson hastalığı, prion hastalığı, Alzheimer hastalığı, çoklu sistem atrofisi, Difüze Lewy cismi hastalığı, frontotemporal demans, amiyotrofik lateral skleroz, Huntington hastalığı, spinoserebellar ataksi ve diğer Poly-Q hastalıkları, kalıtsal serebral amiloid anjiyopati, ailevi amiloid polinöropati gibi hastalıkları içerir. Ek olarak burada kullanıldığı gibi

25

"protein agregasyonu hastalığı", baskın şekilde sinir sisteminin dışında tezahür eden hastalıklara karşılık gelir ve primer sistemik amiloidoz (AL amiloidoz), reaktif sistemik amiloidoz (AA amiloidoz), tip II diyabet, enjeksiyon-lokalize amiloidoz, beta-2 mikroglobulin amiloidoz, kalıtsal nöropatik olmayan amiloidoz ve Finlandiya kalıtsal sistemik amiloidoz gibi hastalıkları içerir.

Buluşun tercih edilen başka bir düzeninde hastalık, Parkinson hastalığı, prion hastalığı, Alzheimer hastalığı, çoklu sistem atrofisi, Difüze Lewy cisimi hastalığı, frontotemporal demans, amiyotrofik lateral skleroz, Huntington hastalığı, spinoserebellar ataksi ve diğer Poli-Q hastalıkları, kalıtsal serebral amiloid anjiyopati, ailevi amiloid polinöropati, primer sistemik amiloidoz (AL amiloidoz), reaktif sistemik amiloidoz (AA amiloidoz), tip II diyabet, enjeksiyon-lokalize amiloidoz, beta-2 mikroglobulin amiloidoz, kalıtsal nöropatik olmayan amiloidoz, Finlandiya kalıtsal sistemik amiloidozdan oluşan gruptan seçilir. Daha fazla tercih edilen bir düzenekte hastalık, Parkinson hastalığıdır.

Buluşun veya açıklamanın tercih edilen bir düzeninde adı geçen prion hastalığı, Creutzfeldt-Jakob hastalığı, varyant Creutzfeldt-Jakob hastalığı, genetik insan prion hastalığı, Sığır Spongiform Ensefalopati (BSE) ve Scrapie arasından seçilir.

Son olarak formül (E)'ye ait bileşiği ve ek olarak adı geçen bileşiğe spesifik olarak bağlanan bir antikor veya antikor fragmanı; ve/veya yukarıda tanımlandığı gibi monomerik veya agregat olmuş protein; ve/veya isteğe bağlı olarak adı geçen bileşik ile kompleks haline

getirilmiş, yukarıda tanımlandığı gibi monomerik veya agrege olmuş protein ve kullanma talimatları içeren, bir veya daha fazla kap içinde bir kit tarif edilir.

GENEL DENEY PROSEDURLERİ

5

Formül (E)'ye ait bileşikler, organik sentezin geçerli tekniklerinden biriyle hazırlanabilir. Bu şekilde birçok teknik, L. F. Tietze, Th. Eicher "Reaktionen und Synthesen", 2. Auflage (Georg Thieme Verlag, Stuttgart, NY, 1991), T. W. Greene, P. G. M. Wuts
10 "Protective Groups in Organic Synthesis", Üçüncü Baskı (John Wiley & Sons, NY, 1999), ve ayrıca J. March "Advanced Organic Chemistry", Üçüncü Baskı (John Wiley & Sons, NY, 1985)'de ele alınmıştır.

15 Formül (E)'ye ait bileşiklerin hazırlanması için bir dizi örnek yöntem aşağıda sunulmuştur. Bu yöntemler, bu preparasyonların doğasını açıklama amaçlıdır ve uygulanabilir yöntemlerin kapsamını sınırlaması amaçlanmaz.

20 Genel olarak sıcaklık, reaksiyon süresi, solventler, geliştirme prosedürleri ve benzeri gibi reaksiyon koşulları, gerçekleştirilecek belirli reaksiyon için teknikte yaygın olanlar olacaktır. Alıntı yapılan referans materyali, burada alıntı yapılan materyal ile birlikte, bu koşulların detaylı açıklamalarını ihtiva eder. Tipik olarak sıcaklıklar, -
25 80°C ila 150°C olacaktır; solventler, aprotik veya protik olacaktır ve reaksiyon süreleri, 10 saniye ila 10 gün olacaktır. Geliştirme tipik olarak reaksiyona girmemiş reaktif maddelerin söndürülmesi,

ardından bir su/organik tabaka sistemi arasında bölümleme (özümleme) ve ürünü ihtiva eden tabakanın ayrılmasından oluşur.

Standart sentetik teknikler, örneğin susuz reaksiyon koşullarının (örn. eylemsiz gaz ortamlarının) kullanılması, teknikte yaygındır ve uygulanabilir olduğunda uygulanacaktır.

Aşağıdaki şemaların her birinin modifikasyonları, aşağıda üretilen spesifik örnek materyallerin çeşitli analoglarına götürür. Uygun organik sentez yöntemlerini açıklayan aşağıdaki referanslar, bu modifikasyonlara uygulanabilir.

Aşağıdaki örnek şemaların her birinde reaksiyon ürünlerinin birbirinden ve/veya başlangıç materyallerinden ayrılması avantajlı olabilir. Her bir adıma ait arzu edilen ürünler, teknikte yaygın tekniklerle arzu edilen homojenlik derecesine kadar ayrılır ve/veya saflaştırılır (bundan böyle ayrılır). Tipik olarak bu gibi ayırmalar, çok fazlı özümlemeler, bir solvent veya solvent karışımından kristalleştirme, damıtma, süblimasyon veya kromatografiyi içerir. Kromatografi, örneğin ebat eksklüzyonu veya iyon değiştirme kromatografisi, yüksek, orta ve düşük basınçta kromatografi, küçük ölçekli ve preparatif ince veya kalın tabaka kromatografisi ve ayrıca küçük ölçekli ince tabaka ve flaş kromatografisi teknikleri dahil bir dizi yöntem içerebilir.

25

Ayırma yöntemlerinin başka bir sınıfı, arzu edilen bir ürüne, reaksiyona girmemiş başlangıç materyaline, reaksiyon yan ürününe veya benzerine bağlanacak veya bunu başka şekilde ayrılabilir hale

getirecek şekilde seçilen bir reaktif madde ile bir karışımın işleme tabi tutulmasını içerir. Bu gibi reaktif maddeler arasında adsorbentler, örneğin aktifleştirilmiş karbon, moleküler elekler, iyon değiştirme ortamları veya benzeri bulunur. Alternatif olarak reaktif maddeler, bazik bir materyal durumunda asitler, asidik bir materyal durumunda bazlar, antikorlar gibi bağlayıcı reaktif maddeler, bağlama proteinleri, seçici şelatlayıcılar, örneğin kuron eterler, sıvı/sıvı iyon özümleme veya benzeri olabilir.

10 Uygun ayırma yöntemlerinin seçimi, dahil olan materyallerin doğasına bağlıdır. Örneğin damıtma ve süblimasyonda kaynama noktası ve moleküler ağırlık, kromatografide polar fonksiyonel grupların varlığı veya yokluğu, çok fazlı özümlemede asidik ve bazik ortamlarda materyallerin stabilitesi ve benzeri. Teknikte uzman bir kişi, arzu edilen ayırmayı sağlaması en olası olan teknikleri uygulayacaktır.

Ozelikle formül (E)'ye ait bileşikler, örneğin M. Ono ve arkadaşları (Bioorganic & Medicinal Chemistry 16 (2008) 6867-6872), WO 2008/131148, WO 2004/080972, WO 2004/072050 ve WO 98/17652'de açıklanan prosedürlere benzer bir tarzda hazırlanabilir. Alternatif yollar da mevcut spesifikasyonun örnek bölümünde örneklenmiştir.

Aşağıdaki örnekler, açıklama amaçlıdır. Bununla birlikte bunlar, sınırlayıcı şekilde yorumlanmayacaktır.

İstemlerde tanımlandığı gibi buluşun kapsamına girmeyen bileşikler veya düzenekler, sadece açıklama amaçlı kabul edilecektir.

ORNEKLER

Ornek 1: Protein agregasyonunu inhibe etmeye yönelik yeni bir bileşik sınıfının tanımlanması

5

Ticari bileşik kütüphanesi DIVERSet'ten (ChemBridge Corp., San Diego, CA, ABD), her biri 10.000 bileşik ihtiva eden ve DIVERSet 1 ve 2 olarak adlandırdığımız iki alt küme, prion propagasyonu inhibitörleri olarak, 2D-SIFT anti-prion deneyi (Bertsch ve arkadaşları
10 2005) ve prion hastalığının bir hücre kültürü modeli kullanılarak tarandı. Her iki deneyde birincil eşleşme sonuçları, bileşiklerin tek bir konsantrasyonda test edilmesi suretiyle elde edildi ve ardından seyreltme SERİlerinde geçerlendi. Ek olarak hücre kültürü eşleşme sonuçları, başka bir hücre çizgisi kullanılarak test edildi.

15 2DSIFT taraması

Yüksek randımanlı ve yüksek içerikli bir tarama deneyinde PrPC ile PrPSc arasındaki birleşme üzerinde ilaçların inhibitör etkisini test etmek amacıyla, iki renkli flüoresan ışığı için tek fotonlu dedektörler
20 ile evrik, iki renkli, konfokal mikroskop düzeninin kullanıldığı "Yoğun Flüoresanlı Hedefler için Tarama" (SIFT-) tekniğini uyguladık. Örnekler, 96 veya 384 oyuklu, kapak sürgülü cam tabanlara sahip mikrotiter plakalarda hazırlanır. Deney karışımı, rekombinant fare PrP (rPrP), fare PrP'yi tanımayan, ancak insan PrP'yi
25 tanıyan monoklonal antikor (mAb) L42 ve insan CJD beyninden hazırlanan PrPSc agregatlarından oluşur. rPrP ve mAb molekülleri, sırasıyla yeşil ve kırmızı floroforlar ile etiketlenir. Birçok rPrP ve mAb molekülünün PrPSc agregatlarına bağlanması, birçok kırmızı ve

yeşil ekli florofofor sergileyen üçlü komplekslerin oluşması ile sonuçlanacaktır. Bu agregatlar, SIFT yöntemi ile tanımlanabilir ve analiz edilebilir, çünkü bunlar, her iki flüoresan kanalında yüksek yoğunluklara aynı anda neden olur. İki boyutlu bir flüoresan yoğunluk histogramı ile kırmızı ve yeşim flüoresan yoğunluklarının dağılımı değerlendirilebilir. rPrP ile PrPSc arasındaki birleşmenin bir inhibitörü, deneye dahil edildiğinde üçlü agregatların yeşil flüoresan yoğunluğu azalmalıdır. Daha sonra 2D-histogramda agregatların renk dağılımı, bu histogramın "kırmızı" bölümlerine doğru kayacaktır.

10 **20 000 Bileşiğin Birincil SIFT Taraması**

Yukarıda tarif edilen deney sistemi, ilave bileşiklerin olmadığı negatif kontroller ve 17 μ M DOSPA ihtiva eden pozitif kontroller ve ayrıca CJD çubukları ve bileşiklerin olmadığı kontroller (antikor ve rPrP karışımında agregasyon bulunmadığını kontrol etmeye yarar) içeren bir birinci tarama için 96 oyuklu mikrotiter plakalarda her biri 10.000 ayrı, ilaç benzeri bileşik ihtiva eden iki kütüphaneye (ChemBridge; "DIVERSet1" ve "DIVERSet2") uygulandı.

20 DOSPA ihtiva eden örnekler, baskın şekilde yeşil rPrP ile etiketlenmiş agregatların sinyallerini izleyen sektörlerde azalan SIFT sinyali gösterdi. Bu, bu kontrollerde daha az rPrP'nin CJD prion çubuklarına bağlandığını gösterir. Prion çubukları, kırmızı antikor etiketleri ile işaretlendiğinden bunların flüoresanı hala "kırmızı" sektörlerde SIFT
25 sinyali üretir. Bileşiklerin büyük kısmı, SIFT sinyalinin dağılımını etkilemedi. Ancak DIVERSet bileşiklerinin bir kısmı, "yeşil" sektörlerde saptanan agregat sayısını düşürdü. Bu örneklerin SIFT eğrileri, DOSPA kontrollerine doğru kaydırılır. Böylelikle karşılık

- gelen bileşikler, potansiyel anti-prion ilaçları için birincil eşleşme sonuçları olarak kabul edilebilir. Zaman zaman bazı teknik problemler, kusurlara neden oldu, bunlar ise bütün bir mikrotiter plakasının tüm ölçümünü engelledi. Bunun yanı sıra dağılımı yapılmamış ölçümlerin sadece yaklaşık %7'si, aykırı değer olarak görülmeliydi ve büyük ölçüde test edilen bileşiklerin içsel flüoresanı nedeniyle otomatik SIFT analizi için uygun değildi. SIFT deneyi ile işleme tabi tutulamayan bileşiklerin bu oldukça düşük yüzdesi beklenmedikti ve deneyin çok yönlülüğünü ve sağlamlığını vurgular.
- 10 Problemlili ölçümlerin ve bileşiklerin tanımlanması, SIFT deneyi verilerinin yüksek içerik doğası sayesinde kolaylaşır. Her örnek için birçok flüoresan parametresi aynı anda kaydedilir, örneğin her renk kanalına ait ortalama flüoresan yoğunlukları. Bunlar, renk dağılımı histogramının her sektöründe yüksek yoğunluk durumlarının toplamları ile birlikte görüntülenir. Bu nedenle yüksek içsel flüoresana sahip örnekler kolayca sınıflandırma dışı bırakılabilir.

SIFT birincil eşleşme sonuçları ve seyreltme SERYleri ile geçерleme

- 20 Bir bileşiğin birincim eşleşme sonucu olarak sınıflandırılması için 1 ila 5. "yeşil" sektörlerdeki kutuların toplamını analiz ettik ve işleme tabi tutulmamış kontrollere kıyasla DOSPA etkisinin yaklaşık %50'si kadar bir kesme değerini, gerekli minimum etki olarak tanımladık. DiVERSet bileşikleri, Bertsch ve arkadaşları 2005 tarafından tarif edildiği gibi bunların, prion agregasyonu üzerindeki inhibitör etkisini karakterize eden SIFT tarama verilerinden ölçekli SIFT aktivite değerlerine (tp1_sift) tahsis edildi. Sıfırdan küçük aktivite değerleri, inhibitör etki olmamasını yansıtırken sıfırdan büyük değerler, bir

inhibitör etkiyi yansıtır. Burada bir civarındaki değerler, verilen bir plaka üzerinde pozitif kontrol ölçümleri kadar eşit şekilde yüksek olan bir inhibitör etkiyi gösterir.

- 5 Birincil eşleşme sonuçları, PrPC - PrPSc birleşmesinin doza bağımlı inhibisyonu açısından, her bileşiğin iki tekrarlı altı noktalı seyreltme SERYsi (0.1-100 μ M) kullanılarak SIFT deneyinde kontrol edildi. Doz-tepki eğrileri, bu bileşiklerin konsantrasyona bağımlı inhibitör aktivitesini teyit etti. 17 μ M DOSPA etkisi ile kıyaslandığında
- 10 rPrP'nin prion çubuklarına bağlanmasının yarı maksimal inhibisyonu, 0.3 ila 60 μ M aralığındaki EC₅₀ değerlerinde gözlemlendi.

Hücre kültürü birincil eşleşme sonuçları ve seyreltme SERYleri ile geçirme

- 15 SIFT deneyine ek olarak DIVERSet kütüphaneleri de prion hastalıklarının hücre kültürü modellerinde tarandı. Bu deneylerde DIVERSet bileşiklerinin anti-prion aktivitesi başlangıçta 20 μ M konsantrasyonda test edildi. Birincil hücre kültürü taramasının (SMB hücreleri üzerinde 20 μ M'de) sonuçları, ikili bir değişken ile şifrelenir
- 20 (tp3_reduktion), burada "1.0" değeri, "aktif"i ve "0.0", "eylemsiz"i şifreler. Birincil taramada tanımlanan aktif bileşikler geçerlendi, burada amaç, çok düşük konsantrasyonlarda bile aktif olan bileşikleri tanımlamaktır. Birincil hücre kültürü eşleşme sonuçlarının geçerlenmesi, DIVERSet 1 için dört konsantrasyonda (1 μ M, 4 μ M,
- 25 10 μ M, 40 μ M) ve DIVERSet 2 için sadece iki konsantrasyonda (0.2 μ M 2 μ M) seyreltme SERYlerinde yapıldı. Sonuçlar (tp3_reduktion_mue), 1 μ M'de (DS1) veya 0.2 μ M'de (DS2) aktif için "1.0" ile ve 2 μ M'de (DS2) aktif için "0.5" ile gösterilir. 20 μ M'nin

5 üzerindeki konsantrasyonlarda eylemsiz olan bileşikler, "0.0" (DS1 + 2) ile gösterilir. Ek olarak birincil SMB hücre kültürü eşleşme sonuçları, ScN2a hücreleri üzerinde tekli konsantrasyonlarda geçerlendi (tp3_scn2a), burada yine "0.0" ve "1.0", sırasıyla eylemsiz ve aktif olan bileşikleri gösterir.

Yeni anti-prion bileşikleri olarak difenilpirazoller (DPP) ve ilgili bileşikler

SAR-harita oluşturma

10

Birincil hücre kültürü taramasında "aktif" şeklinde karakterize edilen DIVERSet bileşikleri, Benchware HTS DataMiner yazılım paketi (DM; Tripos Inc., St. Louis, MO, ABD) kullanılarak bir küme analizine tabi tutuldu ve Şekil 1'de gösterilen SAR-haritası elde edildi.

15 İki kütüphanede bulunan bileşiklerin fazla sayısı (20.000), DataMiner kullanarak silgi analizi için başlangıç noktası olarak aşırı büyük olduğundan analiz başlangıçta, DIVERSet 1 ve 2'nin hücre kültürü taramasının birincil eşleşme sonuçları (837 bileşik) ile kısıtlandı. Böylelikle sadece aktif bileşikler için kümeler belirlendi. Burada DM

20 programı, yapısal açıdan benzeyen ve aktif bileşikleri kümeler halinde gruplandırdı ve bu nedenle potansiyel açıdan alakalı yeni öncü yapıların tanımlanması için uygundur. İkinci adımda bu şekilde oluşturulan sınıflandırma, hücre kültüründe eylemsiz olan bileşikleri kapsayan kütüphanenin geri kalanına uygulandı. Burada uygulanan

25 ölçüt, yüksek yapısal benzerlik gösteriyorsa DM programı, diğer (eylemsiz) bileşikleri, oluşturulan kümelere ilave etti.

Küme analizinin sonucu, DateMiner tarafından bir SAR-harita

formunda grafik şekilde gösterilir, burada madde kümeleri S, semboller ile temsil edilir. Temsil edilen kümeler yapısal açıdan benzer ise bunlar birbirlerine yakın konumlandırılacak şekilde DM, sembolleri düzenler. Sembollerin ebadı, formu ve rengi, kullanıcı tarafından seçilebilen, kümeye spesifik özelliklere göre tahsis edilir.

Böylelikle sembollerin büyüklüğü, kümenin büyüklüğü /S/ ile, yani bunun içinde bulunan bileşiklerin C sayısı ile orantılı olacak şekilde seçildi. Sembollerin biçimi, karşılık gelen kümeler, S'deki maddelerin C aşağıdaki fraksiyonuna

$$P_{SIFT}(S) = \frac{| \{C \in S \mid a(C) \geq a_{min}\} |}{|S|}$$

göre belirlendi, bunların SIFT taramasında belirlenen birincil aktivitesi, $a(C)$, $a_{min}=0.25$ 'lik seçilen bir eşik üzerinde idi. Böylelikle $P_{SIFT}(S)$ fraksiyonu %50'nin üzerinde olan kümeler, yıldızlar şeklinde gösterilirken geri kalan, asıl olarak aktif olmayan kümeler, kareler halinde gösterilir. Benzer şekilde sembollerin rengi, kümelerin fraksiyonlarını

$$P_{ZK}(S) = \frac{| \{C \in S \mid C \text{ birincil eşleşmedir} \} |}{|S|}$$

hücre kültürü bazlı taramanın birincil eşleşme sonuçlarına göre şifreler, burada %50'nin üzerinde aktif maddeli kümelerin sembolleri, kırmızıdır ve geri kalan kümeler yeşildir. Şekil 1, yukarıda tarif edilen küme analizinden elde edilen SAR-haritasını gösterir. Büyük kırmızı yıldızlar, SIFT ve hücre kültürü pozitif maddelerin yüksek oranda bulunduğu kümeleri sembolize eder. Bu kümeler, potansiyel öncü yapıları temsil eder. DataMiner kullanılarak ilgili kümeler ayrıca analiz edildi ve beş komşudan oluşan bir grup tanımlandı (DPP_1'den

DPP_5'e kadar adlandırılır) ve Şekil 1'de kalın şekilde gösterildi. Bu kümeler halinde sınıflandırılan tüm bileşikler, Şekil 2'de çeşitli deneylerdeki aktiviteleri ile birlikte gösterilir. Bu kümelerin, birbirine yakın ilişki halinde konumlanması, bunların yapısal olarak benzer maddeler ihtiva ettiğini gösterir, yani bunların tamamı, 3,5-Difenil-pirazol (DPP) türevleri kimyasal bileşik sınıfına aittir (bakınız Şekil 1'de gösterilen DPP motifi).

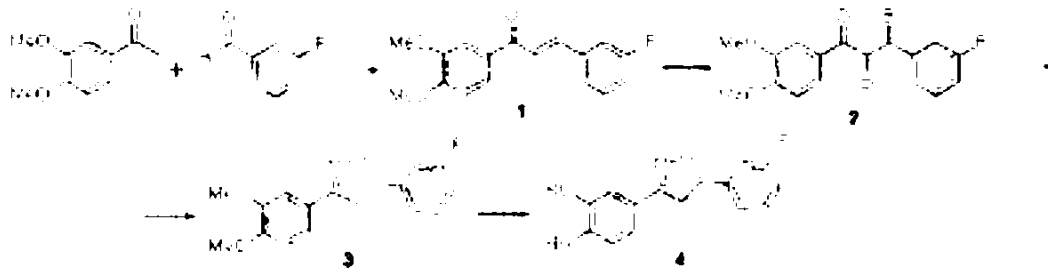
Örnek 2: İlaç kimyası yönleri kapsamında agregasyonu inhibe etmeye yönelik yeni ilaçların sentezi

10

Yukarıda tarif edildiği gibi yeni öncü yapının keşfedilmesine dayanarak bir dizi başka madde, aşağıda belirtildiği gibi farklı ikame edicilerin seçici ikamesi yoluyla sentezlendi. Aşağıda, istemlerin kapsamına girmeyen bileşikler, referans bileşikler olarak kabul edilmiştir.

15

Sema 1: izoksazollerin sentezi



(E)-1-(3,4-Dimetoksifenil)-3-(3-florofenil)-2-propen-1-on (1) [Nam ve arkadaşları 2004]

Metanol (10 ml) içinde 3,4-dimetoksiasetofenon (1.8 g, 10 mmol), 3-florobenzaldehid (1.24 g, 10 mmol), NaOH (50 mg, 1.25 mmol) ve Ba(OH)₂·8H₂O (100 mg, 0.32 mmol) ihtiva eden bir çözelti, oda sıcaklığında 24 saat süreyle karıştırıldı. Reaksiyon, +4°C'ye

20

soğutuldu, elde edilen çökelti filtreleme yoluyla toplandı, metanolden yeniden kristalleştirildi ve kurutularak **1** (1.65 g, %58), sarı bir toz halinde elde edildi.

2,3-Dibromo-1-(3,4-dimetoksifenil)-3-(3-florofenil)-propan-1-on

5 **(2) [Harris ve arkadaşları 1977]**

Kloroform (11 ml) içinde **1** (715 mg, 2.5 mmol) ihtiva eden bir çözeltiye, kloroform (4 ml) içinde bromin (400 mg, 2.5 mmol) ihtiva eden bir çözelti, 0°C'de damlalar halinde ilave edildi. 0°C'de 2 saat
10 süreyle karıştırıldıktan sonra reaksiyon, petrol benzin (20 ml) ile seyreltildi ve karışım, 10 saat süreyle donduruldu (-24°C), elde edilen çökelti filtreleme yoluyla toplandı, n-heksan (10 ml) ile yıkandı ve kurutularak **2** (780 mg, %70), beyaz bir toz halinde elde edildi.

3-(3,4-Dimetoksifenil)-5-(3-florofenil)izoksazol (3) [Harris ve arkadaşları 1977]

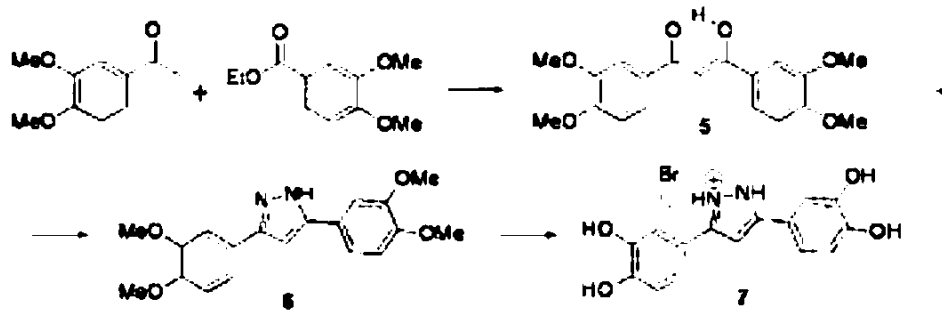
Etanol (6 ml) içinde **2** (450 mg, 1 mmol) ihtiva eden bir çözelti, hidroksilamin hidroklorid (306 mg, 4.4 mmol), ardından su (1.5 ml) içinde bir NaOH çözeltisi (460 mg, 11.5 mmol) ile işleme tabi tutuldu.
20 Karışım, 2 saat süreyle reflaks altında ısıtıldı, soğutuldu ve su (3 ml) ile işleme tabi tutuldu. Bir gece süreyle dondurulduktan (4°C) sonra ürün, filtreleme yoluyla toplandı, su (5 ml) ile yıkandı ve kurutularak **3** (180 mg, %60) beyaz bir toz halinde elde edildi.

3-(3,4-Dihidroksifenil)-5-(3-florofenil)izoksazol (4) [Vanelle ve arkadaşları, 2000]

Diklorometan (5 ml) içinde **3** (100 mg 0.33 mmol) ihtiva eden bir çözelti, -78°C'ye kadar soğutuldu, boron tribromid (0.16 mi, 1.7

mmol) ile işleme tabi tutuldu, -78°C'de 3 saat süreyle ve sonra bir gece süreyle oda sıcaklığında karıştırıldı. Karışım, -78°C'ye kadar soğutuldu ve metanol (5 ml) ile söndürüldü. 3 saat süreyle oda sıcaklığında karıştırıldıktan sonra solventler, indirgenmiş basınç altında buharlaştırıldı, tortu dört kez metanol (10 ml) ile birlikte buharlaştırıldı. Elde edilen çökelti, 5 ml kloroform içinde reflaksa tabi tutuldu, soğutma sonrasında ürün filtreleme yoluyla toplandı ve kurutularak **4** (60 mg, %67), beyaz bir toz halinde elde edildi.

Şema 2: pirazollerin sentezi



10 **1,3-Bis(3,4-dimetoksifenil)-propan-1,3-dion (5) [Anselme, 1967]**

Mineral yağ içinde %60'lık bir sodyum hidrid süspansiyonu (0.4 g, 10 mmol), petrol benzin (20 ml) ile iki kez yıkandı, susuz DMSO (10 ml) ilave edildi. 30 dakika süreyle oda sıcaklığında argon altında karıştırıldıktan sonra THF (5 ml) ilave edildi, şişe 15°C'ye kadar soğutuldu ve etil 3,4-dimetoksibenzoat (2.1 g, 10 mmol) ilave edildi. Sıcaklığın 10°C'ye kadar düşmesine izin verildi ve DMSO (4 ml) içinde 3,4-dimetoksiasetofenon (1.08 g, 6 mmol), sıcaklık 15°C'nin üzerine çıkmayacak bir hızda ilave edildi. İlave tamamlandıktan sonra reaksiyon karışımı, 72 saat süreyle oda sıcaklığında karıştırıldı, sonra %85 fosforik asit (1 ml) ihtiva eden ezilmiş buz (250 g) içine yavaş yavaş döküldü. Elde edilen çökelti filtreleme yoluyla toplandı, su (50

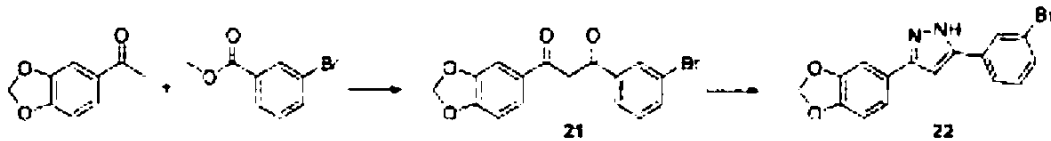
ml) ile yıkandı ve kurutularak 5 (2,1 g, %99) sarı bir toz halinde elde edildi.

3,5-Bis(3,4-dimetoksifenil)pirazol (6) [Hauser ve arkadaşları 1957]

- 5 Etanol (15 ml) içinde **5** (1,0 g, 2.9 mmol) ve hidrazin hidrat (218 mg, 4.4 mmol) ihtiva eden bir çözelti, reflaks altında 3 saat süreyle karıştırılarak ısıtıldı. Berrak sarı çözelti, indirgenmiş basınç altında buharlaştırıldı, su ilave edildi ve elde edilen çökelti, filtreleme yoluyla toplandı, su ile yıkandı ve kurutularak **6** (960 mg, %97) sarı bir toz
10 halinde elde edildi.

3,5-Bis(3,4-dihidroksifenil)pirazol hidrobromid (7) [Vanelle ve arkadaşları 2000]

- Diklorometan (5 ml) içinde **6** (120 mg 0.35 mmol) ihtiva eden bir
15 çözelti, -78°C'ye kadar soğutuldu, boron tribromid (0.34 ml, 3.5 mmol) ile işleme tabi tutuldu, -78°C'de 3 saat süreyle ve sonra bir gece süreyle oda sıcaklığında karıştırıldı. Karışım, -78°C'ye kadar soğutuldu ve metanol (5 ml) ile söndürüldü. 3 saat süreyle oda sıcaklığında karıştırıldıktan sonra solventler, indirgenmiş basınç
20 altında buharlaştırıldı, tortu dört kez metanol (10 ml) ile birlikte buharlaştırıldı. Elde edilen çökelti, 5 ml kloroform içinde reflaksa tabi tutuldu, soğutma sonrasında ürün filtreleme yoluyla toplandı ve kurutularak **7** (108 mg, %85), sarı bir toz halinde elde edildi.



- 25 **1-(1,3-Benzodioxol-5-il)-3-(3-bromofenil)-propan-1,3-dion (21)**
[Anselme, 1967]

1. Prosedür

Kuru, 500-mL'lik, üç boyunlu bir şişeye, Teflon® kaplı manyetik bir karıştırma çubuğu, bir kauçuk septum, bir termometre ve bir reflaks kondansatörü takılır, buna ise saf nitrojen kaynağına bağlanmış bir T tüp takılır. T tüpün geri kalan bağlantısı, bir balonlama cihazına bağlanır, böylelikle reaksiyon boyunca nitrojen akışı hızı gözlenebilir. Şişe, bir su banyosu ile aralıklı olarak soğutulabilecek şekilde aparat düzenlenir. Reaksiyon kabı, nitrojen ile yıkandıktan sonra statik bir nitrojen atmosferi, reaksiyonun geri kalanı boyunca reaksiyon kabında muhafaza edilir. Şişe, mineral yağ içinde ykl. %60'lık bir sodyum hidrid dispersiyonu (5 g, 0.125 mol) ile doldurulur (Not 1). Mineral yağ, petrol benzin 40/60 (3 × 40 mL) ile hidriddan yıkanır (Not 2). Süpernatant petrol benzin tabakası, kauçuk septum içinden sokulan bir paslanmaz çelik iğneli bir Luer-lock hipodermik şırınga kullanılarak çıkarılır. Geri kalan sodyum hidrid, 80 mL dimetil sülfoksit (Not 3) ile karıştırılır ve kauçuk septum, basıncı dengeleyen bir damlatma hunisi ile değiştirilir. 60 mL dimetil sülfoksit içinde 16.4 g (0.1 mol) 1-(1,3-benzodioksol-5-il)etanon (Not 4) ve 26.9 g (0.125 mol) metil 3-bromobenzoat (Not 5) ihtiva eden bir çözelti, damlatma hunisi içine konulur. Huniyi stoper takılır, karıştırma başlatılır ve şişe içeriği, bir su banyosu içinde 15°C'ye kadar soğutulur. 1-(1,3-benzodioksol-5-il)etanon ve metil 3-bromobenzoat ihtiva eden bir çözelti, yavaş yavaş ilave edilir, bu şekilde hidrojen çıkışı, kontrol edilebilir bir hızda tutulur ve sıcaklık, 60 dakika boyunca 20°C'nin üzerine yükselmez (Not 6). İlave tamamlandıktan sonra banyo çıkarılır ve reaksiyon karışımı, oda sıcaklığında (23 °C) 15 saat süreyle karıştırılır. Elde edilen kırmızı-kahverengi homojen reaksiyon

karışımı, 5 mL %85 ortofosforik asit (Not 7) ihtiva eden 500 mL buz ve su içine yavaş yavaş karıştırılarak dökülür. 1 saat süreyle karıştırıldıktan sonra ürün, filtreleme yoluyla çıkarılır (Not 8), su (2×100 mL) ile emmeli filtreleme yoluyla yıkanır ve 40°C'de 6 saat
5 süreyle sabit ağırlığa kadar vakumla kurutularak 34.4 g ham (Not 9) ürün elde edilir. 200 mL %99.9 etanolden ve 200 mL etil asetattan (Not 10) yeniden kristalleştirme ve 40°C'de 6 saat süreyle sabit ağırlığa kadar vakum içinde kurutma, 28.5 g (%82 verim) saf (Not 11) 1-(1,3-benzodioksol-5-il)-3-(3-bromofenil)propan-1,3-dion verir, m.p.
10 136-137°C. Filtrat, ykl. 30 mL hacme kadar indirgenmiş basınç altında konsantre edilir, ayrılan kristalli katı, bir filtre üzerinde toplanır, etanol (2×10 mL) ile emmeli filtreleme yoluyla yıkanır ve 40°C'de 6 saat süreyle sabit ağırlığa kadar vakumla kurutularak ilave (3.15 g) ham ürün elde edilir. Ham ürün, 20 mL %99.9 etanolden ve
15 20 mL etil asetattan iki kez yeniden kristalleştirilir ve 40°C'de 6 saat süreyle sabit ağırlığa kadar vakumla kurutularak ilave 1.8 g (%5 verim) saf 1-(1,3-benzodioksol-5-il)-3-(3-bromofenil)propan-1,3-dion elde edilir (Not 12). Toplam ürün verimi, 30.3 g (%87)'dir.

2. Notlar

- 20 1. 13431 sipariş numarası ile Alfa Aesar GmbH & Co KG, Karlsruhe'den temin edilebilen sodyum hidride, %57-63 yağ dispersiyonu kullanıldı.
2. Analiz için kaynama aralığı 40-60°C olan, 101775 sipariş numaralı, Merck KGaA, Darmstadt'tan petrol benzin GR
25 kullanıldı.
3. Analiz için, 102952 sipariş numaralı, Merck KGaA, Darmstadt'tan dimetil sülfoksit GR, tekrar saflaştırılmadan kullanıldı.

4. A13597 sipariş numarası ile Alfa Aesar GmbH & Co KG, Karlsruhe'den temin edilebilen 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)etanon, %98 kullanıldı.
5. A16174 sipariş numarası ile Alfa Aesar GmbH & Co KG, Karlsruhe'den temin edilebilen metil 3-bromobenzoat, %98 kullanıldı.
6. Çözeltinin ilave edilmesi sırasında köpürme gözlenir. Ölçeğin yükseltilmesi sırasında mekanik karıştırıcı ve polietilen glikol dimetil eter gibi bir köpürme önleyici ajan kullanılması gerekebilir.
- 10 7. Analiz için, 100573 sipariş numaralı, Merck KGaA, Darmstadt'tan ortofosforik asit, %85 a/a çözelti, GR kullanıldı.
8. Reaksiyon karışımının pH değeri, pH = 7'dir. İlave olarak 15 mL ortofosforik asit ile pH = 2'ye kadar asitlendirme yoluyla 1.3 g 3-bromobenzoik asit elde edilebilir.
- 15 9. HPLC ile belirlenen ürün saflığı, %96.3'tür.
10. Merck KGaA, Darmstadt'tan temin edilebilen, analiz için 100983 sipariş numaralı, %99.9 saf etanol GR ve analiz için 109623 sipariş numaralı, etil asetat GR kullanıldı.
- 20 11. HPLC ile belirlenen ürün saflığı, %99.3'tür. Analitik HPLC, bir Waters HPLC sistemi ile Waters 996 Fotodiyot Dizi Dedektörü kullanılarak yapılır. Tüm ayırmalar, su içinde %0.1 h/h trifloroasetik asit (TFA) (solvent A) ve asetonitril içinde %0.1 h/h TFA (solvent B) içeren bir mobil faz, ters fazlı (RP) kolon
- 25 Eurospher RP 18, 100 Å, 5 µm, 250 × 4.6 mm'nin 1 mL/dakikalık akış hızlarında kullanılmasını içeriyordu. Bileşik, HPLC için asetonitril GR içinde 1 mg/mL konsantrasyonda çözülür. 20.9 ve 10.3 dakika tutulma sürelerine (RT) sahip pikler, ANLE 138A'nın

sırasıyla enol ve keto formlarıdır. 20.9 veya 10.3 dakikalık ayrıca toplanan piklerin yeniden enjekte edilmesi tekrar özdeş RT'lere sahip aynı iki piki verir.

12. HPLC ile belirlenen ürün saflığı, %98.4'tür.

5

3-(1,3-Benzodioksol-5-il)-5-(3-bromofenil)-1H-pirazol (22) **[Hauser ve arkadaşları 1957]**

1. Prosedür

10

28.4 g (81.8 mmol) 1-(1,3-benzodioksol-5-il)-3-(3-bromofenil)propan-1,3-dion (Not 1) ve 200 mL n-butil alkol (Not 2) ihtiva eden bir karışım, 500 mL'lik, yuvarlak tabanlı, Teflon® kaplı manyetik bir karıştırıcı, bir reflaks kondansatörü ve elektrikli ısıtma mantosu takılmış bir şişe içine konulur. Karıştırma ve ısıtma başlatılır, 15 6 mL (6.2 g, 123.4 mmol) hidrazin monohidrat (Not 3), katının çözülmesi üzerine ilave edilir ve reaksiyon karışımı, 4 saat süreyle karıştırılarak reflaks altında ısıtılır. Reaksiyon karışımı, 20°C'ye kadar soğutulur, 0°C'de 1 saat süreyle saklanır ve ayrılan ürün, emişli 20 filtreleme yoluyla toplanır. Su (100 mL) ile yıkama ve 40°C'de 36 saat süreyle sabit ağırlığa kadar vakum içinde kurutma, 26.8 g (%95 verim) 3-(1,3-benzodioksol-5-il-5-(3-bromofenil)-1H-pirazolü (Not 4) verir, m.p. 195-197°C.

2. Notlar

25

1. 1-(1,3-benzodioksol-5-il)-3-(3-bromofenil)propan-1,3-dion, ANLE 138A'ya yönelik protokole göre hazırlanır.

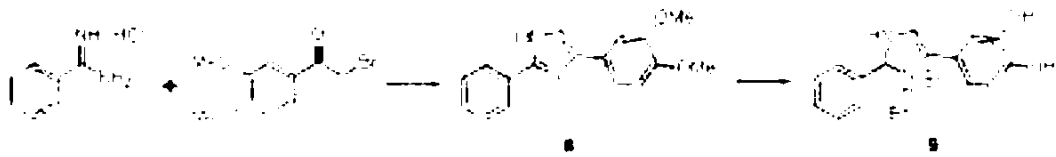
2. 8017 sipariş numarası ile J.T. Baker B. V., Deventer, Hollanda'dan temin edilebilen n-butil alkol, %99.4 GR "Baker analizli" kullanıldı.

3. 53850 sipariş numarası ile Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen'den temin edilebilen hidrazin monohidrat GR purum kullanıldı.

4. HPLC ile belirlenen ürün saflığı, %99.3'tür. Analitik HPLC, bir Waters HPLC sistemi ile Waters 996 Fotodiyot Dizi Dedektörü kullanılarak yapılır. Tüm ayırmalar, su içinde %0.1 h/h trifloroasetik asit (TFA) (solvent A) ve asetronitril içinde %0.1 h/h TFA (solvent B) içeren bir mobil faz, ters fazlı (RP) kolon Eurospher RP 18, 100 A, 5 µm, 250 × 4.6 mm'nin 1 mL/dakikalık akış hızlarında kullanılmasını içeriyordu. Bileşik, HPLC için asetronitril GR içinde 1 mg/mL konsantrasyonda çözülür.

15

Sema 3: imidazollerin sentezi



4-(3,4-Dimetoksifenil)-2-fenilimidazol (8) [Li ve arkadaşları 2000]

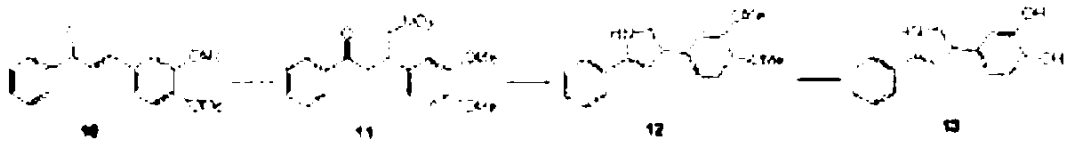
THF (6 ml) ve su (15 ml) içinde benamidin hidroklorid (313 mg, 2 mmol) ve sodyum bikarbonat (672 mg, 8 mmol) ihtiva eden bir karışım, reflaks altında ısıtıldı. THF (1.5 ml) içinde α-bromo-3,4-dimetoksiasetofenon (518 mg, 2 mmol) ihtiva eden bir çözelti, reaksiyon reflaks altında tutulurken 30 dakika boyunca ilave edildi. İlaveden sonra reaksiyon, reflaks altında 2 saat süreyle ısıtıldı, THF indirgenmiş basınç altında buharlaştırıldı. Karışıma etil asetat (20 ml)

ilave edildi, organik faz ayrıldı, brin (5 ml) ile yıkandı, sodyum sülfat ile kurutuldu ve indirgenmiş basınç altında buharlaştırıldı. Elde edilen ham ürün, silika jel (kloroform/metanol 100:1) üzerinde kolon kromatografisi ile saflaştırılarak **8** (470 mg, %84), bir katı halinde elde edildi.

4-(3,4-Dihidroksifenil)-2-fenilimidazol hidrobromid (9) [Vanelle ve arkadaşları 2000]

Diklorometan (5 ml) içinde **8** (190 mg 0.68 mmol) ihtiva eden bir çözelti, -78°C'ye kadar soğutuldu, boron tribromid (0.32 ml, 3.4 mmol) ile işleme tabi tutuldu, -78°C'de 3 saat süreyle ve sonra bir gece süreyle oda sıcaklığında karıştırıldı. Karışım, -78°C'ye kadar soğutuldu ve metanol (5 ml) ile söndürüldü. 3 saat süreyle oda sıcaklığında karıştırıldıktan sonra solventler, indirgenmiş basınç altında buharlaştırıldı, tortu dört kez metanol (10 ml) ile birlikte buharlaştırıldı. Elde edilen çökelti, 5 ml kloroform içinde reflaksa tabi tutuldu, soğutma sonrasında ürün filtreleme yoluyla toplandı ve kurutularak **9** (192 mg, %85), bir toz halinde elde edildi.

Şema 4: pirollerin sentezi



(E)-1-Fenil)-3-(3,4-dimetoksifenil)-2-propen-1-on (10)

Bileşik **10**, **1**'in preparasyonu için tarif edilen prosedüre göre hazırlandı. Verim %90.

3-(3,4-Dimetoksifenil)-4-nitro-1-fenilbutan-1-on (11) [Hall ve arkadaşları 2005]

MeOH (30 ml) içinde **10** (774 mg, 2.9 mmol) ihtiva eden bir çözelti, dietilamin (1.55 ml, 15 mmol) ve nitrometan (0.81 ml, 15 mmol) ile işleme tabi tutuldu ve reflaks altında 24 saat süreyle ısıtıldı. Çözelti soğutuldu, diklorometan (60 ml) ve su (50 ml) arasında bölündü ve 1 M hidroklorik asit ile asitlendi. Organik tabaka ayrıldı, sulu tabaka, 5 diklorometan (20 ml) ile özümlendi. Birleştirilen organik tabakalar, su (50 ml) ve brin (50 ml) ile yıkandı ve sodyum sülfat ile kurutuldu. Solvent, indirgenmiş basınç altında çıkarıldı ve elde edilen yağ, silika jel (n-heksan/etil asetat 3:2) üzerinde kolon kromatografisi ile 10 saflaştırılarak **11** (780 mg, %82), bir katı halinde elde edildi.

4-(3,4-Dimetoksifenil)-1-fenilpirol (12) [Hall ve arkadaşları 2005]

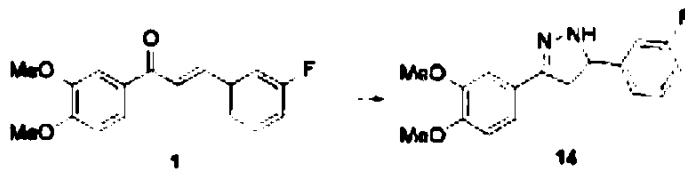
Metanol (13 ml) ve THF (26 ml) içinde, oda sıcaklığında **11** (400 mg, 1.22 mmol) ihtiva eden, karıştırılan bir çözelti, potasyum hidroksid 15 (343 mg, 6.1 mmol) ile işleme tabi tutuldu. 1 saat sonra reaksiyon karışımı, metanol (13 ml) içinde sülfürik asit (2.44 ml) ihtiva eden bir çözeltiye 0°C'de damlalar halinde ilave edildi ve oda sıcaklığında 1 saat süreyle karıştırıldı. Su (20 ml) ve buz (20 ml) ilave edildi ve karışım, sulu 1M sodyum hidroksid ile nötralize edildi ve 20 diklorometan (2 × 50 ml) ile özümlendi. Birleştirilen organik fraksiyonlar, brin (25 ml) ile yıkandı, sodyum sülfat üzerinde kurutuldu ve indirgenmiş basınç altında buharlaştırıldı. Elde edilen yağ, asetik asit (8 ml) ve amonyum klorid (470 mg) ile işleme tabi tutuldu, çözelti 100°C'de 1 saat süreyle ısıtıldı. Reaksiyon karışımı 25 soğutuldu, buz (50 ml) ilave edildi ve karışım, sulu 1M sodyum hidroksid ile nötralize edildi. Çözelti, diklorometan (2 × 50 ml) ile özümlendi. Birleştirilen organik fraksiyonlar, brin (25 ml) ile yıkandı, sodyum sülfat üzerinde kurutuldu ve indirgenmiş basınç altında

buharlaştırıldı. Ham ürün, silika jel (n-heksan/etil asetat 3:1) üzerinde kolon kromatografisiyle saflaştırıldı ve sonra bir n-heksan/etil asetat (2:1) karışımından yeniden kristalleştirilerek **12** (150 mg, %44), bir katı halinde elde edildi.

5 **4-(3,4-Dihidroksifenil)-1-fenilpirol (13) [Vanelle ve arkadaşları 2000]**

Diklorometan (5 ml) içinde **12** (80 mg 0.29 mmol) ihtiva eden bir çözelti, -78°C'ye kadar soğutuldu, boron tribromid (0.13 ml, 1.4 mmol) ile işleme tabi tutuldu, -78°C'de 3 saat süreyle ve sonra bir gece süreyle oda sıcaklığında karıştırıldı. Karışım, -78°C'ye kadar soğutuldu ve metanol (5 ml) ile söndürüldü. 3 saat süreyle oda sıcaklığında karıştırıldıktan sonra solventler, indirgenmiş basınç altında buharlaştırıldı, tortu dört kez metanol (10 ml) ile birlikte buharlaştırıldı. Elde edilen ham ürün, silika jel (kloroform/metanol 95:5) üzerinde kolon kromatografisi ile saflaştırıldı ve sonra birkaç damla asetonitril ile kloroformdan yeniden kristalleştirilerek **13** (36 mg, %50), bir katı halinde elde edildi.

Şema 5: pirazolinlerin sentezi

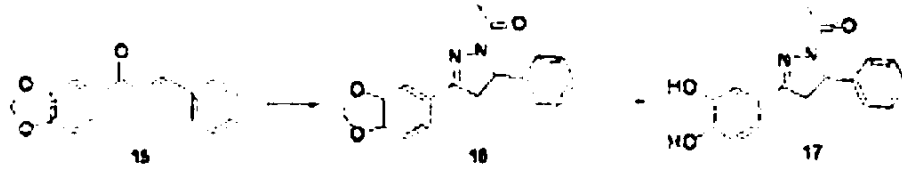


20 **3-(3,4-Dimetoksifenil)-5-(3-florofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol (14)**

Su (0.14 ml) içinde **1** (57 mg, 0.2 mmol) ve hidrazin hidrat (0.5 mg, 10 mmol) ihtiva eden bir süspansiyon, 100°C'de 1.5 saat süreyle karıştırılarak ısıtıldı. Reaksiyon karışımı soğutuldu, su (0.2 ml) ilave

edildi ve elde edilen çökelti, filtreleme yoluyla toplandı, su ile yıkandı ve kurutularak **14** (37 mg, %62), beyaz bir katı halinde elde edildi.

Şema 6: N-Ac-pirazolinlerin sentezi



(E)-1-(3,4-Metilendioksifenil)-3-fenil-2-propen-1-on (15)

5

Bileşik **15**, **1**'in preparasyonu için tarif edilen prosedüre göre hazırlandı. Verim %64.

1-Asetil-3-(3,4-metilendioksifenil)-5-fenil-4,5-dihidropirazol (16)

[Chimenti ve arkadaşları 2004]

10

Asetik asit (12 ml) içinde **15** (504 mg, 2 mmol) ve hidrazin hidrat (250mg, 5 mmol) ihtiva eden bir çözelti, 120°C'de 24 saat süreyle karıştırılarak ısıtıldı. Reaksiyon karışımı soğutuldu, soğuk su (40 ml) ilave edildi ve elde edilen çökelti, filtreleme yoluyla toplandı, etanolden yeniden kristalleştirildi ve kurutularak **16** (458 mg, %74), beyaz bir katı halinde elde edildi.

15

1-Asetil-3-(3,4-dihidroksifenil)-5-fenil-4,5-dihidropirazol (17)

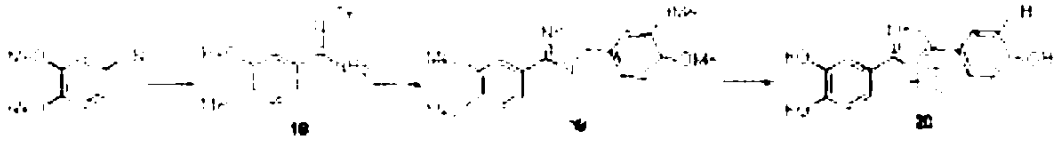
[Vanelle ve arkadaşları 2000]

20

Diklorometan (3 ml) içinde **17** (70 mg 0.23 mmol) ihtiva eden bir çözelti, -78°C'ye kadar soğutuldu, boron tribromid (0.11 ml, 1.16 mmol) ile işleme tabi tutuldu, -78°C'de 3 saat süreyle ve sonra bir gece süreyle oda sıcaklığında karıştırıldı. Karışım, -78°C'ye kadar soğutuldu ve metanol (5 ml) ile söndürüldü. 3 saat süreyle oda

sıcaklığında karıştırıldıktan sonra solventler, indirgenmiş basınç altında buharlaştırıldı, tortu dört kez metanol (10 ml) ile birlikte buharlaştırıldı. Elde edilen ham ürün, silika jel (n-heksan/etil asetat 1:1) üzerinde kolon kromatografisi ile saflaştırılarak 17 (25 mg, %37),
5 bir katı halinde elde edildi.

Şema 7: 1,2,4-oksadiazollerin sentezi



3,4-Dimetoksibenzamidoksim (18) [Chalquest, 2001]

Etanol (70 ml) içinde 3,4-dimetoksibenzonitril (4.0 g, 24.5 mmol),
10 hidroksilamin hidroklorid (2.0 g, 28.8 mmol), N,N-diizopropiletilamin (5.0 ml, 29.2 mmol) ihtiva eden bir çözelti, oda sıcaklığında 48 saat süreyle karıştırıldı. Etanol, indirgenmiş basınç altında buharlaştırıldı, soğuk su (60 ml) ilave edildi ve elde edilen çökelti, filtreleme yoluyla toplandı ve kurutularak **18** (3.4 g, %71) beyaz bir toz halinde elde
15 edildi.

3,5-Bis(3,4-dimetoksifenil)-1,2,4-oksadiazol (19) [Korbonits, 1982]

Etanol (12 ml) içinde **18** (700 mg, 3.57 mmol) ve etil 3,4-dimetoksibenzoat (834 mg, 3.97 mmol) ihtiva eden bir çözeltiye
20 potasyum tert-butoksit (425 mg, 3.79 mmol) ilave edildi ve reaksiyon karışımı, reflaks altında 12 saat süreyle ısıtıldı. Karışım soğutuldu ve çökelti filtreleme yoluyla toplandı, sıcak etanol ile yıkandı ve kurutularak **19** (540 mg, %44) beyaz bir toz halinde elde edildi.

3,5-Bis(3,4-dihidroksifenil)-1,2,4-oksadiazol hidrobromid (20)

25 **[Vanelle ve arkadaşları 2000]**

Diklorometan (6 ml) içinde 19 (220 mg 0.64 mmol) ihtiva eden bir çözelti, -78°C'ye kadar soğutuldu, boron tribromid (0.59 ml, 6.1 mmol) ile işleme tabi tutuldu, -78°C'de 3 saat süreyle ve sonra bir gece süreyle oda sıcaklığında karıştırıldı. Karışım, -78°C'ye kadar
 5 soğutuldu ve metanol (5 ml) ile söndürüldü. 3 saat süreyle oda sıcaklığında karıştırıldıktan sonra solventler, indirgenmiş basınç altında buharlaştırıldı, tortu dört kez metanol (10 ml) ile birlikte buharlaştırıldı. Elde edilen çökelti, 5 ml kloroform içinde reflaksa tabi tutuldu, soğutma sonrasında ürün filtreleme yoluyla toplandı ve
 10 kurutularak **20** (190 mg, %81), bir toz halinde elde edildi.

Yukarıdaki örnekler, arzu edilen bileşiklerin nasıl sentezleneceğine veya türetileceğine yönelik örnekleri temsil eder. Şekil 3'te gösterilen geri kalan bileşikler, buna göre sentezlendi. Kimyasal şekilde
 15 sentezlenen bu bileşikler, ilk taramadan seçilen maddeler ile birlikte, SIFT deneyleri, hücre kültürü bazlı deneyler, fareler üzerinde in vivo deneyler dahil ileri testlerin yanı sıra α -sinüklein agregasyonuna yönelik biyokimyasal deneylere tabi tutuldu (aşağı bakınız). Test edilen maddelerin bir listesi Şekil 3'te sunulmuştur.

20 **Örnek 3: Kullanılan materyal ve yöntemler**

Bileşik kütüphaneleri

Taranan kütüphanelerin her biri 10.000 bileşik ihtiva eder ve bunlara
 25 DiVERSet1 ve DiVERSet2 isimlerini verdik, çünkü bunlar, daha büyük DiVERSet kütüphanesinin sadece bir kısmını kapsamaktadır (ChemBridge Corp., San Diego, CA). DiVERSet, rasyonel şekilde seçilmiş, çeşitli, ilaç benzeri küçük moleküllerin oluşturduğu bir

koleksiyondur. Bileşikler, dimetil sülfoksit (DMSO) çözeltisi içinde ve 96 oyuklu mikrotiter plakalar üzerinde sağlandı. Her bileşik için moleküler yapıları ve fiziko-kimyasal verileri ihtiva eden bir veritabanı, www.chembridge.cam adresinde bulunur.

5 **Rekombinant fare PrP 23-231'in üretilmesi**

Rekombinant PrP 23-231, esasen Liemann ve arkadaşları (1998) tarafından tarif edilen şekilde üretildi ve saflaştırıldı, sadece bakteriyel ekspresyon için BL21DE3 RIL E.coli hücreleri (Novagen), fare PrP23-231'e yönelik pET17b-MmPrP23-231WT31 plazmidini ile transforme edildi. Ayrıca bakteriler, 0,5'lik optik yoğunluğa kadar büyütüldükten sonra protein üretimi, 1 mM IPTG ilave edilerek indüklendi ve iki saat sonra hücreler toplandı. Daha sonra lizis tamponuna %0,5 Triton X-100 ilave edilerek ve bir French pres kullanmak yerine 37°C'de 30 dakika süreyle inkübe edilerek bakteriler lize edildi. Ek olarak jel filtrelemenin yerini, bir nikel şelat afinite kromatografisi adımı aldı. Yeniden katlanma sonrasında son katyon değiştirme kromatografisi adımı da uygulanmadı.

Özellikle iyon değiştirme kromatografisi ile önceden saflaştırılan PrP, tarif edildiği gibi oksidasyona tabi tutuldu ve 0,1 mM EDTA ilave edilerek ve pH yaklaşık 6'ya ayarlanarak oksidasyon sonlandırıldı. 0,1 mM NiCl₂ ilave edildikten sonra 50 mg'e kadar PrP, daha önce NiCl₂ yüklenmiş 2 mL şelatlayıcı sefaroza (Pharmacia), üreticinin tavsiyelerine göre uygulandı ve tampon A (8 M Ure, 10 mM MOPS pH7,0) ile önceden dengelendi. PrP'nin Ni-şelat matrisine bağlanması, karışım sürekli baş aşağı çevrilerek oda sıcaklığında en az 3 saat süreyle yapıldı. Matris, bir poliprep-kolonuna (BioRad) transfer edildi

ve genel akıştan boşaltıldı. Kolon, iki kez 5 mL tampon B (8 M Ure, 10 mM MOPS pH7,0, 500 mM NaCl) ile yıkandı ve sonra sırayla 6 kez 5 mL tampon D (7,2 M Ure, 10 mM MOPS pH 7,0, 150 mM NaCl, 50 mM İmidazol) ile elüte edildi. Saflaştırılmış PrP'yi ihtiva eden fraksiyonlar havuzlandı, bir centriprep cihazı ile konsantre edildi ve son olarak yeniden katlanma için 1:50 oranında 10 mM MES pH 6,0 içine seyreltildi.

Antikorların ve rekombinant PrP'nin flüoresanla etiketlenmesi

L42 monoklonal antikor (r-biopharm, Darmstadt, Almanya), Alexa Fluor 647 (Alexa-647; Invitrogen, Eugene) ile üreticinin kılavuzuna göre etiketlendi. Rekombinant fare PrP 23,231, Alexa Fluor 488 (Alexa-488; Invitrogen, Eugene) ile 20 mM potasyum fosfat tamponu, pH 6, %0.1 Nonidet P40, 40 mM sodyum bikarbonat tamponu, pH 8,3 içinde etiketlendi. Bağlanmamış floroforlar, PD10 kolonları (GE Healthcare, Freiburg, Almanya) üzerinde jel filtreleme yoluyla ayrıldı, 20 mM potasyum fosfat tamponu, pH 6, %0.1 Nonidet P40 ile dengelendi. Etiketleme reaksiyonunun ve oranının kalite kontrolü, bir Insight Okuyucu (Evotec Technologies, Hamburg, Almanya) üzerinde flüoresan korelasyonlu spektroskopi (FCS) ölçümleri ile yapıldı. Etiketleme oranı, rPrP molekülü başına yaklaşık 1,3 florofor idi.

PrPC-PrPSc birleşmesi için deney

PrPSc, CJD hastalarının beyinlerinden, Safar ve arkadaşlarına (Safar ve arkadaşları (1998)) göre hazırlandı ve 1xPBS+%0.1 sarkosil çözeltisi içinde yeniden süspanse edilmiş nihai pelet parçaları, tampon A (20 mM potasyum fosfat tamponu, pH 6.0, %0.1 Nonidet P40) içine beş kat seyreltildi ve bir su banyosu sonikatörü içinde 60 saniye

süreyle sese tabi tutuldu. 1000 rpm'de 1 dakika süreyle santrifüjlendikten sonra süpernatant, deney için tampon A içinde 100 kat seyreltildi.

- 5 Etiketlenmiş fare rPrP ve etiketlenmiş L42 monoklonal antikorun bir karışımı, 20 mM potasyum fosfat tamponu, pH 6, %0.1 Nonidet P40 içinde hazırlandı, bu şekilde etiketlenmiş moleküller, 2-6 nM'de yaklaşık olarak eşit şekilde boldu. 20 µL'lik bir deney hacmi içinde 8 µL rPrP / antikor karışımı, 2 µL bileşik ve 10 µL seyreltilmiş PrPSc
- 10 preparasyonu karıştırıldı. Örnekler, kapak camı tabanlı 96 oyuklu plakalar (Evotec-Technologies, Hamburg, Almanya) üzerine yüklendi ve bir insight Okuyucu ile ölçüldü.

Tek partikül ölçümü ve analizi

- 15 FIDA ölçümleri, 488 nm lazer için 200 µW ve 633 nm lazer için 300 µW uyarma enerjilerinde yapıldı. Tarama parametreleri, 100 µm tarama yolu uzunluğu, 50 Hz ışın tarayıcı frekansı ve 2000 µm konumlama tablası hareketine ayarlandı. Ölçüm süresi 10 saniye idi. İki florofordan gelen flüoresan, tek foton dedektörleri ile ayrı ayrı
- 20 kaydedildi ve fotonlar, 40µs kutu uzunluğu kullanılarak sabit uzunluktaki zaman aralıklarında (kutular) toplandı. Kırmızı ve yeşil flüoresan foton sayımları sayısı ölçüldü ve daha önce tarif edildiği gibi (Bieschke ve arkadaşları, 2000) iki boyutlu bir yoğunluk dağılımı histogramında analiz edildi.
- 25 Flüoresan yoğunluğu verileri, 2D-SIFT yazılım modülü (Evotec-Technologies, Hamburg, Almanya) kullanılarak, sektörlerdeki yüksek yoğunluklu kutuların toplanması suretiyle değerlendirildi. Her ölçüm

için kutu yoğunluklarına yönelik kesme değerleri, kontrol ölçümlerine göre elle ayarlandı.

Ornek 4: Yeni potansiyel antiprion bileşiklerinin, scrapie enfekte edilmiş farelerde, enfeksiyondan 80 gün sonra terapötik uygulaması

Bu yeni potansiyel antiprion bileşiklerinin, bulaşıcı spongiform ensefalopatileri (TSE) veya prion hastalıkları ile savaşmada etkinliğini kanıtlamak amacıyla, SIFT ve/veya scrapie hücre kültürü deneyinde antiprion aktivitesine sahip bileşiklerin, ileri bir kuluçka dönemi aşamasında scrapie'nin RML suşu ile enfekte edilmiş fareleri tedavi etmek için kullanıldığı hayvan deneyleri yapıldı. Enfeksiyondan 80 gün sonra 14 gün zaman aralığı ile bileşiklerin intraperitonel uygulanmasını seçtik, çünkü bu tipik olarak bu prion suşu ile enfekte edilmiş hayvanlarda ilk subklinik semptomların görüldüğü zamandır. Bu, TSE'den etkilenmiş ve ilk hastalık semptomlarını gösteren bir insanın gerçekçi olarak bir terapötik tedavi alacağı en erken zamana karşılık gelecektir. Terapi için böyle çok katı koşulları seçerek test edilen bileşiklerin, gerçekçi bir düzende prion terapötikleri olarak fonksiyonelliğini değerlendirmek istedik. Tipik olarak TSE terapötikleri bugüne kadar sadece prionlarla enfekte olma zamanı civarında uygulandıkları hayvan deneylerinde maruz kalma sonrası profilaks için test edildi. Gerçek yaşamda böyle bir terapötik rejimin TSE'den etkilenmiş kişiler için makul olduğu ancak çok nadir durumlar söz konusudur. TSE hastalarının büyük kısmı için ailevi ve sporadik vakalarda (ki bunlar büyük çoğunluktur) enfeksiyon zamanı veya kuluçka süresinin başlangıcı bilinmez ve gerçekleştirilemez. Bu

nedenle TSE hastalarının büyük kısmı tedaviyi ancak ilk TSE semptomları meydana geldikten sonra alabilecektir.

Deney prosedürleri:

- 5 6-7 haftalık, dişi C57BI6 fareleri, RML scrapie suşundan ileri derecede hasta farelerden alınan, fosfat tamponlu tuz (PBS) içinde 30 μ L %1 steril beyin homojenatının intraserebral enjeksiyonu yoluyla RML scrapie ile inoküle edildi. Enfeksiyondan 80 gün sonra bu fareler, seçilen yeni potansiyel antiprion bileşikleri ile veya sulu
- 10 Dimetilsülfoksit (DMSO) araç ile tedavi edildi. Bu tedavi için bir hücre kültürü modelinde antiprion aktivitelerine göre beş potansiyel antiprion bileşiği seçildi ve bunlar, Diverset kimyasal bileşik kütüphanesindeki (Chembridge Corp., San Diego, ABD) plaka pozisyonuna göre 10353F11 ve anle138b, anle143b, SER Y106 ve
- 15 SER Y149 şeklinde isimlendirildi. Bu bileşiklerle tedavi, arka arkaya 14 gün boyunca, günde 50 μ L 10353F11 bileşiği seyreltisi, diğer bileşikler için araç (DMSO) içinde 25 μ L'nin intraperitoneal enjeksiyonu ile gerçekleştirildi. 10353F11 bileşiği, 10 mM konsantrasyonda kullanıldı ve anle138b, anle143b, SER Y106 ve
- 20 SER Y149 bileşikleri için 100 mM, tüm süre boyunca enjekte edildi. Hayvanlar, enfeksiyondan 80 gün sonrasında itibaren eğitimli hayvan bakıcıları tarafından hastalık belirtileri için her gün izlendi. Hayvanlar, ataksi, tremor, sırt üstü yatar pozisyonundan dik duruma geçmede zorluk ve kuyruk katılığı şeklindeki klinik semptomlar ile anlaşılan son
- 25 hastalık aşamasına ulaştıklarında ve can çekiştiklerinde öldürüldü. Tipik olarak hastalığın son aşamasında ilerleyen hastalık, bir veya iki gün içinde hayvanın ölmesine yol açacaktır. Öldürülen hayvanlardan bir yarı küresi ve dalağın bir yarısı, western blot analizi için -80°C'de

taze dondurulurken ikinci yarı küre ve dalağın diğer yarısı ve ayrıca iç organlar, (immün)histoloji için %4 formaldehid çözeltisi içinde sabitlendi.

Sonuçlar

5

Şekil 4'te gösterildiği gibi intraserebral yoldan RML scrapie suşu ile enfekte edilmiş farelerin, kuluçka süresinin geç bir aşamasında (80. gün p.i.), seçilen potansiyel anti-prion ilaçlarının günlük intraperitoneal uygulaması ile tedavi edilmesi, scrapie enfeksiyonunun son aşamasına ulaşılana kadar kuluçka süresinin 10353F11 (Şekil 4 A) ve anle138b ve SERY149 (Şekil 4 B) için uzatılması ile sonuçlandı. Yedi hayvandan oluşan grup için anle138b bileşiği ve sekiz hayvandan oluşan grup için SERY149 bileşiği için belirlenen ortalama hayatta kalma süresi, sadece %100 DMSO aracını almış on iki hayvandan oluşan bir grupla kıyaslandığında sırasıyla 14.9 ve 11.5 gün kadar uzatıldı. SERY106 ve anle143b bileşikleri için tedavi edilen sekiz hayvandan oluşan bir grupta, aynı DMSO kontrol grubuna kıyasla hayatta kalma süresinin uzaması, istatistiksel anlamlılık düzeyinin altındaydı. 10353F11 bileşiği için sekiz hayvandan oluşan grupta belirlenen hayatta kalma süresi, kontrol grubuna kıyasla 11 gün kadar uzadı. Deneylerde gözlemlenen hayatta kalma süresinin uzaması, kabaca tedavi süresine karşılık gelir. Bu ise bu ilaçlarla yapılan tedavinin, ilaçlar uygulandığı sürece hastalığın ilerlemesini durdurduğu anlamına gelebilir. Bu durumda bu ilaçlarla yapılan tedavi, TSE ile enfekte olmuş kişilerin ömürlerinin uzamasına ve hastalığın ilerlemesi durdurularak bunların sağlık durumunun daha kötüleşmeden stabilize edilmesine yol açacaktır.

Ornek 5: Potansiyel bir antiprion bileşığının, scrapie enfekte edilmiş farelerde, intraperitonel enfeksiyondan sonra terapötik uygulaması

- 5 Bu yeni antiprion bileşığının, bulaşıcı spongiform ensefalopatileri (TSE) veya prion hastalıkları ile savaşmada etkinliğini kanıtlamak için ilave bir hayvan deneyi yapıldı. Bu deney için fareler, intraperitonel yoldan RML scrapie ile enfekte edildi ve geç aşamalı prion hastalığı için bir hayvan modelinde antiprion aktivitesi kanıtlanmış anle138b
- 10 bileşığı ile tedavi edildi (Ornek 4). Bileşığın intraperitonel ve oral uygulamasının bir kombinasyonunu seçtik ve enfeksiyondan hemen sonra tedaviyi başlattık.

Deney prosedürleri:

15 **Scrapie enfeksiyonu ve farelerin tedavisi**

- 6-7 haftalık, dişi C57BI6 fareleri, RML scrapie suşundan ileri derecede hasta farelerden alınan, fosfat tamponlu tuz (PBS) içinde 100 µL %1 steril beyin homojenatının intraperitonel inokülasyonu yoluyla
- 20 RML scrapie ile inoküle edildi. Bu farelerin anle138b bileşığı ile veya sulu Dimetilsülfoksid (DMSO) araç ile tedavisine, enfeksiyondan hemen sonra başlandı. Bu bileşik ile tedavi, arka arkaya 14 gün boyunca, günde 25 µL araç (DMSO) içinde seyreltilmiş bileşığın intraperitonel enjeksiyonu, ardından bitkisel yağ/DMSO karışımı
- 25 içinde günde 50 µL bileşığın oral gavaj yoluyla 4 ve 5 gün oral uygulanması yoluyla gerçekleştirildi (Şekil 5 A). Anle138b bileşığı, intraperitonel uygulama için 100 mM ve oral uygulama için 50 mg/kg konsantrasyonda kullanıldı. Enfeksiyondan sonra 35. günde, PrPSc

intraperitoneal enfekte edilmiş farelerin dalaklarında net bir şekilde saptandığında hayvanlar öldürüldü. Öldürülen hayvanlardan dalağın bir yarısı, western blot analizi için -80°C'de taze dondurulurken dalağın diğer yarısı ve ayrıca iç organlar, immün-histoloji için %4 formaldehid çözeltisi içinde sabitlendi.

PET Blot

Formalin ile sabitlenen beyin dokusu, 2 mm kalınlığında doku blokları halinde kesildi, 1 saat süreyle konsantre formik asit içinde dekontamine edildi, Brown ve arkadaşları, 1990'ın protokolü uygulanarak 48 saat süreyle %4 fosfat tamponlu tuz ile tamponlanmış formalin içinde son sabitlemesi yapıldı ve parafin içine gömüldü. Kesitler (5-7 µm), bir mikrotom üzerinde kesildi, bir su banyosu (55°C) içine konuldu, önceden ıslatılmış 0.45 µm gözenekli nitroselüloz membran (Bio-Rad, Richmond, CA) üzerinde toplandı ve 55°C'de en az 30 dakika süreyle kurutuldu. Nitroselüloz membranın parafini ksilen ile giderildi. Ksilen, izopropanol ile değiştirildi, ardından kademeli rehidrasyon yapıldı. Tween 20, %0.1 nihai konsantrasyonda, damıtılmış H₂O içinde son rehidrasyon adımına ilave edildi. Membranlar kurutuldu ve takip eden PrPSc boyasında kalite kaybı olmadan aylarca oda sıcaklığında saklandı.

TBST (10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.8; 100 mmol/L NaCl; %0.05 Tween 20) ile önceden ıslatıldıktan sonra 250 µg/ml proteinaz K (Boehringer) ile PK tamponu (10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.8; 100 mmol/L NaCl; %0.1 Brij 35) içinde 8 saat süreyle 55°C'de sindirim yapıldı. Bu adım ile membrana eklenen proteinler, membrana sabitlendi. Uç kez TBST ile yıkandıktan sonra membranlar üzerindeki

proteinler, 3 mol/L guanidin izotiyosiyanat ile 10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.8) içinde 10 dakika süreyle denature edildi. Guanidin, üç kez TBST ile yıkandı. Bloklama çözeltisi (TBST içinde %0.2 kazein) içinde 30 dakika süreyle ön inkübasyon yapıldıktan sonra immüno-

5 saptama yapıldı. Birincil antikor olarak rekombinant fare PrP'ye yönelik, CDC1 olarak adlandırılan bir poliklonal tavşan antikoru, Antikor-Seyretilici çözeltisi (Ventana) içinde 1:500 seyreltide kullanıldı. İnkübasyon en az 1 saat süreyle yapıldı. TBST içinde üç yıkamadan sonra en az 1 saat süreyle inkübasyon, bir alkalın

10 fosfatazla birleştirilmiş tavşan anti-fare antikoru (Dako, Hamburg) ile 1:500 seyreltide yapıldı. TBST içinde 10 dakika süreyle beş yıkama yapıldıktan sonra membranlar, 5 dakika süreyle NTM (100 mmol/L Tris-HCl, pH 9.5; 100 mmol/L NaCl; 50 mmol/L MgCl₂) içinde iki kez inkübe edilerek alkalın pH'a ayarlandı. Antikor reaksiyonunun

15 görselleştirilmesi, NBT/BCIP kullanılarak formazan reaksiyonu ile sağlandı. Blotlar, bir Olympus kesmeli mikroskop ile değerlendirildi.

Sonuçlar

İlaçla tedavi edilen ve araçla tedavi edilen farelerin ölümünden sonra

20 çıkarılan dalak dokusu, PrPSc birikintilerinin varlığı için immüno-histokimyasal yoldan boyandı ve splenik PrPSc düzeyi için immunoblot ile analiz edildi. Şekil 5B'de gösterildiği gibi tedavi edilen hayvanların splenik PrPSc düzeyi, araçla tedavi edilen farelere kıyasla anlamlı şekilde azalır. Enfekte edilmiş farelerden alınan dalak

25 dokusunun incelenmesi, PrPSc birikintilerinin, anle138b bileşiği ile tedavi sonrasında azaldığını gösterir. Düşük PrPSc birikintilerine sahip dalakların yüzdesi artar ve güçlü PrPSc birinkileri azalır (Şekil 5 C). (Şekil 5 D)'de iki PET Blotu, PrPSc birikintileri örnekleri

gösterilir. Sonuçlar, seçilen deney kurulumu ve terapötik rejimle bu bileşiğin periferik dokularda açık bir antiprion etkinliğini gösterir.

Örnek 6: Yeni antiprion bileşiklerinin, scrapie enfekte edilmiş farelerde, enfeksiyondan 80 gün sonra terapötik uygulaması

5

Hayatta kalma süresinin uzamasının, tedavi süresine karşılık geldiğine dair örnek 4'te yapılan gözlemi kanıtlamak amacıyla, bileşiklerin, ileri bir kuluçka dönemi aşamasında scrapie'nin RML suşu ile enfekte edilmiş fareleri tedavi etmek için daha yüksek bir dozajda ve daha uzun süreyle uygulandığı bir hayvan deneyi yapıldı. Enfeksiyondan 80 gün sonra bileşiklerin intraperitonel ve oral uygulamasının bir kombinasyonunu seçtik, çünkü bu tipik olarak bu prion suşu ile enfekte edilmiş hayvanlarda ilk subklinik semptomların görüldüğü zamandır.

15 **Deney prosedürleri:**

6-7 haftalık, dişi C57Bl6 fareleri, RML scrapie suşundan ileri derecede hasta farelerden alınan, fosfat tamponlu tuz (PBS) içinde 30 µL %1 steril beyin homojenatının intraserebral enjeksiyonu yoluyla RML scrapie ile inoküle edildi. Bu fareler, enfeksiyondan sonra 80. günde yeni antiprion bileşikleri ile veya DMSO araç ile tedavi edildi. İki potansiyel antiprion bileşiği, anle138b ve anle186b kullanıldı. Bu bileşikler ile tedavi, arka arkaya 14 gün boyunca, DMSO araç içinde seyreltilmiş günde 25 µL bileşiğin intraperitonel enjeksiyonu, ardından bitkisel yağ/DMSO karışımı içinde günde 50 µL bileşiğin 5 gün süreyle oral gavaj yoluyla iki oral uygulanması yoluyla gerçekleştirildi (Şekil 6 A). 3 kontrol faresinde ve anle138b ile tedavi edilmiş 2 farede bileşik, ek olarak oral yoldan 109. günden 136. güne

kadar, DMSO/bileşik stok çözeltileri ile karıştırılmış fıstık yağı gıda peletleri sunularak verildi. Bileşikler, intraperitoneal uygulama için 100 mM ve oral uygulama için 50 mg/kg konsantrasyonda kullanıldı. Her tedavi grubundan dört hayvan, belirtilen zaman noktalarında öldürüldü (Şekil 6 A). Her tedavi grubundan sekiz hayvan, enfeksiyondan 80 gün sonrasından itibaren eğitimli hayvan bakıcıları tarafından hastalık belirtileri için her gün izlendi. Hayvanlar, ataksi, tremor, sırt üstü yatar pozisyondan dik duruma geçmede zorluk ve kuyruk katılığı şeklindeki klinik semptomlar ile anlaşılan son hastalık aşamasına ulaştıklarında ve can çekiştiklerinde öldürüldü. Tipik olarak hastalığın son aşamasında ilerleyen hastalık, bir veya iki gün içinde hayvanın ölmesine yol açacaktır. Öldürülen hayvanlardan bir yarı küresi ve dalağın bir yarısı, western blot analizi için -80°C'de taze dondurulurken ikinci yarı küre ve dalağın diğer yarısı ve ayrıca iç organlar, histoloji için %4 formaldehid çözeltisi içinde sabitlendi.

Sonuçlar

Beyin homojenatlarında PrPSc düzeyi ve enfeksiyondan sonra apoptotik hücre ölümü

20

İlaçla tedavi edilen ve araçla tedavi edilen farelerin beyin homojenatları, PrPSc düzeyleri açısından immüno blot analizi ile analiz edildi. Şekil 6B'de gösterildiği gibi anle138b grubundan, gösterilen zaman noktalarında incelenen tüm hayvanların beyinde PrPSc düzeyi, 80. günde tedavi edilmemiş farelerin düzeyinde tutulabilirken kontrol grubundaki PrPSc düzeyi artar. Anle186b'ye ait sonuçlar, kontrol grubu ile anle138b arasındadır. PrPSc artışı yavaşlatılabildi (Şekil 6B). Şekil 6C, bileşikler ile tedavi sonrasında

80. günde tedavi edilmemiş kontrole kıyasla nispi PrPSc düzeylerindeki değişimi gösterir. Beyinlerdeki PrPSc düzeyi, anle138b ile tedavi sonrasında bir miktar azalır. H&E boyalı beyin dilimlerinin belirtilen zaman noktalarında histolojik incelemesi sonrasında anle138b ve anle186b ile tedavi edilmiş fareler, patolojik değişimlerde bir azalma gösterdi. Tedavi edilen gruplardan enfekte olmuş farelerin serebellar granül hücre tabakasında apoptotik hücre sayısı, kontrol grubuna kıyasla azalır (Şekil 6 D). Bu sonuçlar, her iki bileşiğin kan-beyin bariyerini geçebildiğini gösterir. Bu nedenle terapi, tedavi sırasında hayvanların beyinde PrPSc'nin daha fazla birikmesini ve hastalığı ilerlemesini önleyebildi. Bu sonuçlar, anle138b bileşiği ile yapılan tedavinin, ilaçlar uygulandığı sürece hastalığın ilerlemesini durdurduğu anlamına gelir. Bu sonuçlar, PrPSc oluşumuna müdahale edilerek bu bileşiğin kullanıldığı bir terapi ile hastalık ilerlemesinin modifiye edilmesinin mümkün olabileceğini gösterir. Bu durumda tedavi, TSE ile enfekte olmuş kişilerin ömürlerinin uzamasına ve hastalığın ilerlemesi durdurularak bunların sağlık durumunun daha kötüleşmeden stabilize edilmesine veya belki de iyileştirilmesine yol açacaktır.

20 **Kuluçka süresinin uzatılması**

Şekil 7'de gösterildiği gibi intraserebral yoldan RML scrapie suşu ile enfekte edilmiş farelerin, kuluçka süresinin geç bir aşamasında (80. gün p.i.), bileşiklerin günlük uygulaması ile tedavi edilmesi, scrapie enfeksiyonunun son aşamasına ulaşılana kadar hayatta kalma süresinin uzatılması ile sonuçlandı (Şekil 7). Ek olarak 109. günden 136. güne kadar, fıstık yağı ile karıştırılmış anle138b beslenerek ilave bir tedavi alan iki farede daha uzun hayatta kalma süreleri, i) hayatta

kalma süresinin tedavi süresi ile ilişkili olduğunu, ii) bileşiğin oral yoldan verildiğinde etkili olduğunu, ve iii) bileşiğin kan-beyin bariyerini geçebildiğini gösterir.

Örnek 7: α -sinüklein agregasyonunun in vitro baskılanması

5

Sinükleinopatiler, asıl olarak α -sinüklein proteininden oluşan agregatların ve fibrillerin hücre içi birikmesi ile karakterize edilen (nörodejeneratif) hastalıklardır (inceleme için bakınız: Goedert, 2001). En öne çıkan nörodejeneratif sinükleinopatiler, Parkinson hastalığı (PD), Lewy cisimli demans (DLB) ve çoklu sistem atrofisidir (MSA).

10

α -sinükleinin in vitro agregasyonunun, biyolojik membranların yakın civarında doğal şekilde meydana gelen dielektrik koşullarını taklit eden, organik solventler gibi maddeler varlığında meydana geldiği gösterilmiştir (Munishkina ve arkadaşları, 2003). Hastalık süreci sırasında α -sinüklein yanlış katlanmasının ve agregasyonunun araştırılması ve toksik agregat türlerinin oluşumu amaçlı model sistemler sağlayan in vitro agregasyon deneyleri geliştirildi (Kostka ve arkadaşları 2008).

20

Seçilen bileşikler, α -sinüklein agregasyonunu bastırma potansiyelleri açısından test etmek amacıyla, organik solvent dimetilsülfoksidin (DMSO) düşük konsantrasyonlarda (< %3) ve - bazı deneylerde - ferrik demirin in vitro α -sinüklein agregasyonunu indüklemeye kullanıldığı bir in vitro sistem kullandık. Multimer oluşumu, çapraz korelasyon analizi ile tek partiküllü flüoresan korelasyon düzeni kullanılarak izlendi ve SIFT analizi, yeşil Alexa488- veya kırmızı Alexa647 floroforları ile ayrı ayrı etiketlenmiş α -sinüklein

25

monomerleri karışımlarına uygulandı. Bu α -sinüklein karışımları, reaksiyona bir bileşiğin ilave edildiği örneklere paralel şekilde agrege edildi.

Deney prosedürleri:

5

α -sinükleinin flüoresanla etiketlenmesi

Rekombinant α -sinüklein, amino reaktif flüoresan boyalarla, ya Alexa Fluor-488-O-sukinimidil esterle ya da Alexa Fluor-647-O-sukinimidil ester (Molecular Probes, ABD) ile etiketlendi. Reaksiyon tamamlandıktan sonra bağlanmamış boya molekülleri, reaksiyon karışımlarının arka arkaya iki PD10 kolonundan (Amersham Bioscience, Almanya) üreticinin talimatlarına göre ebat eksklüzyonlu kromatografisi yoluyla ayrıldı. Etiketleme verimliliği ve bağlanmamış boyanın çıkarılması, FCS ölçümleri ile etiketlenmiş α -sinüklein monomerlerini ihtiva eden fraksiyonların uygun seyreltileriyle belirlendi.

Tek partikül flüoresan korelasyon ölçümleri

20 μ l hacimde, flüoresan korelasyon ölçümleri için bir cam kapak sürgülü taban ile donatılmış özel bir mikro-titer plakanın (Evotec-Technologies, Almanya) oyukları içinde α -sinüklein agregasyonu, pH 7.0'da 50 mM Tris ihtiva eden bir tampon içinde yapıldı ve α -sinüklein monomerlerinin bir karışımı, Alexa488- veya Alexa647-floroforları ile ayrı ayrı, her α -sinüklein türünden yaklaşık 5-10 nM'lik bir nihai konsantrasyonda etiketlendi. Ölçümler, bir insight flüoresan korelasyon aleti (Evotec-Technologies, Almanya) üzerinde, 1.2 NA'lık 40x mikroskop objektifi (Olympus, Japonya) ile FIDA optik ayarları,

70 μm iğne deliği çapı ve 488 nm lazerde 200 μW uyarma ve 633 nm lazerde 300 μW uyarma kullanılarak gerçekleştirildi. Ölçüm süresi, 10 saniye idi, bu sürede lazer fokusu, 100 μm tarama yolu uzunluğu, 50 Hz tarama frekansı ve 2000 μm konumlandırma tablası hareketi kullanılarak bir ışınli tarayıcı cihaz tarafından oyuk içinden geçirildi. Bu, yaklaşık 10 mm/s'lik bir tarama hızına denktir. İki boyutlu yoğunluk dağılım histogramları oluşturuldu ve 2-D SIFT yazılımı (Evotec OAI, Almanya) kullanılarak analiz edildi.

Sonuçlar: α -sinüklein agregasyonunun bileşikler tarafından baskılanması

α -sinükleinin, DMSO ve DMSO/ Fe^{3+} 'nin neden olduğu agregasyonu, hem kırmızı hem yeşil etiketli α -sinüklein ünitelerini yüksek miktarlarda ihtiva eden multimerik α -sinüklein komplekslerinin oluşması ile yansıtılır. Böylelikle inhibitör bileşiklerin ilave edilmediği kontrol reaksiyonu, yüksek miktarlarda fotonlar yayan çok sayıda kompleksin varlığını gösterir. DPP bileşiği 35F11'in deney çözeltisine ilavesi, Şekil 8A'da görülebileceği gibi multimerik α -sinüklein komplekslerinin oluşumunu doza bağımlı şekilde büyük ölçüde inhibe edebilir. Böylelikle 351F11 bileşiği, sinükleinopatilerde bulunan patolojik protein agregasyonuna yönelik bu in vitro modelde düşük mikro molar konsantrasyonda multimer α -sinüklein oluşumunu verimli şekilde inhibe edebilir. Bu, 351F11 bileşiğinin sadece bir anti-prion bileşiği olarak görev yapabilmekle kalmayıp ayrıca Parkinson Hastalığı, DLB ve MSA gibi sinükleinopatiler için, moleküler düzeyde patolojik mekanizmaya müdahale eden bir terapötik bileşik haline gelme potansiyeline de sahip olduğunun açık bir göstergesidir. α -sinüklein agregasyonu üzerinde, araştırılan diğer DPP ile ilişkili

bileşikler için de doza bağımlı bir inhibitör etki saptanabildi (Şekil 8 B, C). Bu nedenle bu bileşikler, α -sinüklein agregasyonunu in vitro inhibe etmede kanıtlanmış bir kapasiteye sahip yeni bir madde grubunu temsil eder, bu ise Parkinson hastalığına ve diğer

5 sinükleinopatilere karşı nedene yönelik bir terapinin geliştirilmesine izin verecektir.

Ek olarak bu bileşiğin hem prion proteini hem de α -sinüklein agregasyonu üzerinde in vitro inhibitör aktivitesi, proteinin baskın

10 şekilde β -yaprak konformasyonları halinde yanlış katlanmasının, akabinde amiloid fibriller halinde protein agregasyonu için temel oluşturduğu daha geniş yelpazede protein agregasyonu hastalıklarına karşı bunun genel anti-agregatör aktivitesini yansıtabilir. Bu nedenle bu bileşikler ve DPP madde sınıfının diğer üyeleri, örneğin Alzheimer

15 hastalığı, prion hastalığı, Parkinson hastalığı, çoklu sistem atrofisi, Difüze Lewy cisimi hastalığı, frontotemporal demans, amiyotrofik lateral skleroz, Huntington hastalığı, spinoserebellar ataksi ve diğer Poli-Q hastalıkları, kalıtsal serebral amiloid anjiyopati, ailevi amiloid polinöropati, primer sistemik amiloidoz (AL amiloidoz), reaktif

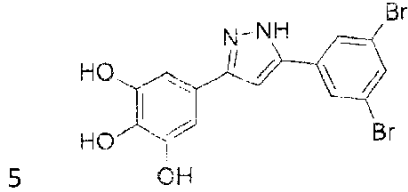
20 sistemik amiloidoz (AA amiloidoz), tip II diyabet, enjeksiyon-lokalize amiloidoz, beta-2 mikroglobulin amiloidoz, kalıtsal nöropatik olmayan amiloidoz, Finlandiya kalıtsal sistemik amiloidoz dahil (nörodejeneratif) protein agregasyonu hastalıklarının tüm panelinin nedensel tedavisi için terapötik olarak faydalı olma potansiyeline

25 sahiptir.

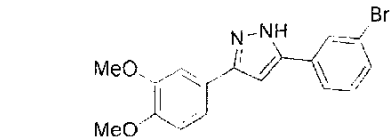
Örnek 8: PrPSc'nin hücre kültüründe inhibisyonu

Deney prosedürleri:

Prion enfekte edilmiş hücre kültürleri, yukarıda tarif edilen birincil tarama için tarif edildiği gibi yeni sentezlenmiş bileşikler ile işleme tabi tutuldu. Bileşikler, şekil 9'da gösterilen konsantrasyonlarda ilave edildi. Bileşiklerin yapıları, aşağıda ve Şekil 3'te gösterilir.



5-(3,5-Dibromofenil)-3-(3,4,5-trihidroksifenil)pirazol (anle145d)



5-(3-Bromofenil)-3-(3,4-dimetoksifenil)pirazol (SERY255b)

Sonuçlar:

DPP ile ilişkili bileşiklerin çok yüksek bir kısmı, hücre kültüründe düşük mikromolar ve hatta mikromolar altı konsantrasyonlarda bile güçlü bir PrP^{Sc} azaltması sergiledi. Bu, bu bileşiklerin, anti-prion aktiviteye sahip bir ilişkili kimyasallar grubunu temsil ettiğini gösterir.

Örnek 9: Farklı DPP türevlerinin, beyin ve dalakta PrP^{Sc} birikmesi üzerindeki inhibitör etkisi

20

Bileşikler, PrP^{Sc} birikmesi üzerindeki inhibitör etkileri bağlamında in vivo şu üç deney protokolü ile test edildi:

- C57BL/6 farelerine, intraserebral (i.c.) yoldan 30 µL %1 beyin homojenatı (RML scrapie) inoküle edildi. Tedavi, enfeksiyondan

80 gün sonra, DMSO+fıstık yağı ile karıştırılarak oral yoldan uygulanan günde 1 mg bileşik ile başlatıldı. Beyinde PrP^{Sc} düzeyi, enfeksiyondan sonra 120. günde immünoiblot analizi ile ölçüldü.

b) C57BL/6 farelerine, intraserebral (i.c.) yoldan 30 µL %1 beyin homojenatı (RML scrapie) inoküle edildi. Tedavi, enfeksiyondan sonra 80. günde, 14 gün süreyle intraperitoneal enjeksiyon yoluyla uygulanan günde 0,84 mg bileşik (DMSO içinde) ile başlatıldı, ardından 2 x 5 gün süreyle (arada tedavi yapılmayan 2 günlü) 1 mg bileşik (DMSO+bitkisel yağ içinde), oral yoldan gavaj ile uygulandı. Beyinde PrP^{Sc} düzeyi, enfeksiyondan sonra 106. günde ölçüldü.

c) C57BL/6 farelerine, intraperitoneal (i.p.) yoldan 100 µL %1 beyin homojenatı (RML scrapie) inoküle edildi. Dalakta PrP^{Sc} düzeyi, DMSO+fıstık yağı ile karıştırılmış günde 1 mg bileşik ile 34 gün süreyle tedavinin ardından, enfeksiyondan sonra 35. günde belirlendi.

PrP^{Sc} birikmesinin, DMSO ile tedavi edilen gruplara kıyasla nispi inhibisyonu, tablo 1'de gösterilir (tedavi süresinin sonunda DMSO ile tedavi edilen hayvanların ortalama değeri, %0 inhibisyon olarak tanımlandı; tedavi süresinin başlangıcında kontrol hayvanlarının ortalama değeri, %100 inhibisyon olarak tanımlandı).

Tablo 1: Farklı DPP türevlerinin, beyin ve dalakta PrP^{Sc} birikmesi üzerindeki inhibitör etkisi (^{a,b,c}, kullanılan (yukarıda tarif edildiği gibi) deney protokolünü gösterir)

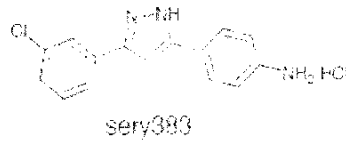
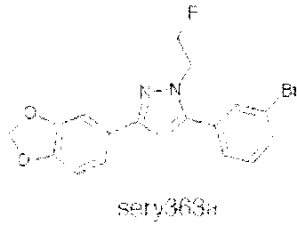
bileşik	R1 R2 R3	inhibisyon [%]**
anle138b		69 ^a ; 108 ^b ; 62 ^c ;
sery255b		40 ^a ; <10 ^c
anle138c		< 10 ^a
sery338b		27 ^a
sery345		<10 ^a
sery378b		40 ^a
anle234b		<10 ^a
sery335b		60 ^a ; 46 ^c
anle186b		31 ^b
anle197b		<10 ^c
anle236b		<10 ^a
sery313		37 ^c
anle232b		<10 ^a
anle233b		17 ^a

Bu deneylerin sonuçları, bu deney koşulları altında, i) anle138b bileşiğinin ve kimyasal olarak alakalı bileşiklerin, in vivo güçlü bir

prion amplifikasyonu inhibisyonu sağladığını, ii) bu deney koşulları altında bu uygulama için anle138b'nin bir göreceli aktivite optimumunu temsil ettiğini gösteren bir yapı-aktivite ilişkisi olduğunu gösterir.

5 **Ornek 10: Kan-beyin bariyeri aşılabılır ve patolojik protein agregatları ile etkileşim gözlenir**

C57BL/6 farelerine, intraserebral (i.c.) yoldan 30 μ L %1 beyin homojenatı (RML scrapie) inoküle edildi. Tedavi, enfeksiyondan 80 gün sonra, DMSO+fıstık yağı ile karıştırılarak oral yoldan uygulanan günde 1 mg bileşik (SERY383) veya 3 mg bileşik (SERY363a) ile başlatıldı. Beyinde PrP^{Sc} düzeyi, enfeksiyondan sonra 120. günde immünoiblot analizi ile ölçüldü.



15

DMSO ile tedavi edilen kontrollere kıyasla sery363a, PrP^{Sc} birikmesinde %35'lik bir azalma ile sonuçlandı ve sery383, PrP^{Sc} birikmesinde %30'luk bir azalma ile sonuçlandı.

20 Sery363a, bu deneylerde sentezlendi ve test edildi, çünkü anle138b'nin izotop etiketlemeye çok uygun bir modifikasyonunu sunar, bu da PET görüntülemesi için bir tanı izleyicisi olarak kullanılmak üzere gereklidir.

25 Sery383, bu deneyde test edildi, çünkü bu bileşiğin yanı sıra bir -NH₂

grubu ve bir halojen atomu ihtiva eden, yapısal açıdan benzer bileşiklerin, alfa-sinüklein agregasyonunun inhibisyonu için yüksek oranda aktif oldukları bulundu (bakınız örnek 16, " α -sinüklein agregatlarının oluşumunun farklı bileşikler tarafından inhibisyonu").

5

Bu deneylerin sonuçları, her iki bileşiğin de kan-beyin bariyerini geçebildiğini ve patolojik protein agregatları ile etkileşime girebildiğini gösterir, bu ise bu bileşiklerin, bir terapötik bileşik ve ayrıca tanı amaçlı bir bileşik olarak kullanılmak suretiyle

10

Örnek 11: Anle138b ile yapılan günlük tedavinin, RML scrapie ile enfekte edilmiş farelerde PrP^{Sc} birikmesi ve prion patolojisi üzerindeki etkisi.

15

C57BL/6 farelerine, intraserebral (i.c.) yoldan 30 μ L %1 beyin homojenatı (RML scrapie) inoküle edildi. Tedavi, enfeksiyondan ayrı ayrı 80 gün veya 120 gün sonra, DMSO+fıstık yağı ile karıştırılarak oral yoldan uygulanan günde 5 mg bileşik ile başlatıldı (Şekil 10).

20

PrP^{Sc} için boyanmış beyin kesitleri (Şekil 10A), anle138b tedavisinin, DMSO ile tedavi edilen hayvanlara kıyasla PrP^{Sc} birikmesini azalttığını gösterir. Prion inoküle edilmiş farelerin beyin homojenatlarında farklı zaman noktalarında PrP^{Sc} düzeylerinin nicelendirilmesi, anle138b ile tedavi edilen farelerde PrP^{Sc}

25

birikmesinin, tedavi hastalığın geç bir aşamasında (120 dpi; Şekil 10B) başlatıldıktan sonra bile güçlü şekilde azaldığını gösterir. Serebellumdaki apoptotik hücrelerin, H&E boyalı beyin dilimlerinde histolojik nicelendirmesi, PrP^{Sc} birikmesinin inhibisyonunun, nöronal

hücre ölümünün inhibe edilmesi ile sonuçlandığını gösterir (Şekil 10C). Bileşik olmadan DMSO+fıstık yağı ile tedavi edilen kontrol fareleri, ilerleyen kilo kaybı gösterir (Şekil 10D). 80 dpi'den itibaren anle138b ile tedavi, ~100 gün süreyle kilo kaybını önler. 120 dpi'den itibaren tedavi, ~70 gün süreyle kilo kaybını inhibe eder.

Bu deney bulguları, hastalığın belirgin belirtileri ortaya çıktıktan sonra tedaviye geç başlandığında bile bileşik tedavisinin, PrP^{Sc} birikmesini, nöronal hücre ölümünü ve hastalığın klinik belirtilerinin ilerlemesini inhibe ettiğini gösterir.

Örnek 12: Farklı tedavi protokollerinin karşılaştırması

C57BL/6 farelerine, intraserebral (i.c.) yoldan 30 µL %1 beyin homojenatı (RML scrapie) inoküle edildi. Farklı zamanlarda ve programlarda (Şekil 11'in şekil açıklamalarında gösterilmiştir) anle138b ile yapılan tedavi, RML scrapie ile tehdit sonrasında hayatta kalma sürelerini anlamlı düzeyde uzattı ($p < 0,01$). Ortalama hayatta kalma süreleri, gün $\pm$ standart sapma cinsinden ifade edilir.

Şekil 11'de gösterildiği gibi bu deney bulguları, i) bileşik tedavisinin, bileşiğin oral yoldan uygulanmasından sonra da etkili olduğunu, ii) tedavinin, hastalığın klinik aşamasında geç başlatıldığında da etkili olduğunu, ve iii) daha uzun tedavinin daha uzun hayatta kalma ile sonuçlandığını gösterir.

Örnek 13: Anle138b uygulamasının beyinde PrP^{Sc} düzeyleri üzerindeki doza bağımlı etkisi.

C57BL/6 farelerine, intraserebral (i.c.) yoldan 30 µL %1 beyin homojenatı (RML scrapie) inoküle edildi. Tedavi, enfeksiyondan 80 gün sonra, DMSO+fıstık yağı ile karıştırılarak oral yoldan uygulanan farklı miktarlarda anle138b (Şekil 12'de gösterilmiştir) ile başlatıldı.

5 Enfeksiyondan 120 gün sonra hayvanlar öldürüldü ve beyinde PrP^{Sc} miktarı, enfeksiyondan 80 gün sonra öldürülen hayvanlarla karşılaştırılarak nicelendirildi.

Şekil 12'de sunulan veriler, anle138b'nin beyinde PrP^{Sc} birikmesini

10 doza bağımlı şekilde azalttığını gösterir.

Ornek 14: 1 hafta süreyle DMSO+fıstık yağı ile karıştırılmış anle138b ile günde 1 mg ile tedavi edilen, enfekte edilmemiş farelerden alınan beyin dokusunun immüno-blotlanması yoluyla

15 **PrP^C'nin nicelendirilmesi. Şekil 13'te gösterildiği gibi anle138b ile tedavi edilen farelerde, kontrol fareleri ile karşılaştırıldığında PrP^C düzeyinde azalma gözlenmedi.**

Bu deney bulguları, scrapie ile enfekte edilmiş farelerde terapötik

20 etkinin, PrP^C'nin ekspresyonunun azaltılmasına değil, patolojik agregat olmuş protein türlerinin oluşumunun inhibe edilmesine bağlı olduğunu gösterir.

Ornek 15: anle138b'nin farmakokinetik analizi

25

Tek bir anle138b dozu, şekil 14'te gösterildiği gibi enfekte edilmemiş C57BL/6 farelerine uygulandı. Uygulamadan sonra farklı zaman

noktalarında beyin ve serum içindeki bileşik miktarı, zaman noktası ve deney grubu başına 2 hayvan için LC-MS ile ölçüldü.

- 5 Bu deney bulguları, iyi bir oral biyo-yararlanım ve iyi beyin penetrasyonu olduğunu gösterir. anle138c, farelerin kanında saptandı, böylelikle bunun, anle138b'nin bir metaboliti olduğu varsayılır.

Ornek 16: α -sinüklein agregatlarının oluşumunun farklı bileşikler tarafından inhibisyonu.

- 10 α -sinüklein agregasyonu, DMSO ve 10 μ M FeCl₃ ile indüklendi ve Kostka ve arkadaşlarında (J Biol Chem (2008) 283: 10992-11003) tarif edildiği gibi konfokal tek molekül spektroskopisi ile analiz edildi. 10 μ M konsantrasyonda ilave edilen farklı bileşiklerin, orta II oligomer oluşumu üzerindeki etkisi, Tablo 2'de gösterildiği gibi
- 15 bileşiksiz kontrollere kıyasla incelendi. İlgili bileşiklerin yapıları, Şekil 15'te gösterilmiştir.

Tablo 2: α -sinüklein agregatlarının oluşumunun farklı bileşikler tarafından inhibisyonu.

Bileşik	Orta II	Bileşik	Orta II	Bileşik	Orta II
anle138c	< %5	sery85	< %25	sery145	< %50
sery117	< %5	sery335b	< %25	sery345	< %50
sery384	< %5	sery275b	< %25	sery256b	< %50
sery383	< %5 < %5	sery140	< %25	sery161	< %75
sery109	< %5	anle138b	< %25	sery315b	< %75
sery320c	< %5	sery363b	< %25	sery316b	< %75
		sery319	< %25	sery292b	< %75
				sery329	< %75

Bu deney bulguları, bu bileşiklerin, toksik α -sinüklein agregatlarının oluşumunu inhibe ettiğini gösterir, bu da bu yapısal açıdan alakalı bileşiklerin, protein agregasyonu olan protein hastalıklarının tedavisi için ve ayrıca özellikle α -sinüklein agregasyonunun gözlemlenebildiği hastalıkların tedavisi için kullanılma potansiyeline sahip olduğunu gösterir.

Ornek 16: Bir in vivo fare Parkinson hastalığı modelinde bileşiklerin etkisi

10

Deney kanıtları, Parkinson hastalığının deneysel modellerinde, uygun konsantrasyonlarda MPTP ve rotenon gibi mitokondriyal toksinler kullanılarak agregate olmuş α -sinüklein oluşumunun gözlenebileceğini ve nöronal hücre ölümüne katkıda bulunduğunu ortaya koyar. Fareler, 1-5. günlerde intraperitoneal enjeksiyon yoluyla MPTP (günlük 30mg/kg vücut ağırlığı) ile işleme tabi tutularak substantia nigra'da dopaminerjik nöronların dejenerasyonu indüklendi. Hayvanlar (deney grubu başına 3-10), farklı bileşikler veya araç ile tedavi edildi (günlük 250mg/kg vücut ağırlığı, oral uygulama (bileşiğin 487,5 μ l zeytin yağı ile karıştırılmış 12,5 μ l DMSO içinde tüple beslenmesi) 0-12. günlerde). MPTP ile işleme tabi tutulmamış farelere (Kontrol, %0 hücre ölümü olarak tanımlanır) kıyasla MPTP ile işleme tabi tutulmuş, sadece araç ile tedavi edilmiş farelerde (DMSO; %100 hücre ölümü olarak tanımlanır) nöron kaydı, 12. günde nicelendirildi. Tirosin hidroksilaz (TH) pozitif substantia nigra pars compacta (SNpc) hücrelerinin nicelendirilmesi için 50 μ m kesitler, bir anti-TH antikoru ile immüno-boyandı. SNpc'de her iki kesitten biri, Stereo araştırmacı yazılımı (MicroBrightfield, Colchester, VT, ABD) kullanılarak analiz

25

edildi. İmmüno-boyanmış hücreler, 20x objektif kullanılarak optik fraksiyonlaştırma yöntemi ile sayıldı. Stereolojik sayımlar, iki bağımsız araştırmacı tarafından kör şekilde yapıldı.

- 5 Şekil 16'da gösterilen deney bulguları, test edilen bileşiklerin bir in vivo Parkinson hastalığı modelinde hücre ölümünü azalttığını gösterir.

Ornek 17: Anle138c'nin ABeta agregasyonu üzerindeki etkisi

- 10 50 μ M konsantrasyonla Abeta40, 30 saat süreyle aşağıdaki koşulda inkübe edildi: 50 mM sodyum fosfat, 50 mM sodyum klorid, %0.01 sodyum azid, pH 7.4 37 °C, ince manyetik çubuklarla karıştırma, 50 μ M anle138c ile veya olmadan. DMSO, test örneğinin eşit konsantrasyonunda kontrol örneğine ilave edildi. DMSO
- 15 konsantrasyonu, %2 (hacim/hacim) idi ve anle138C stok çözeltisi, 3 mM idi. Peptit çözeltisi, 16000 g'de DLS deneylerinden önce 15 dakika süreyle santrifüjlendi.

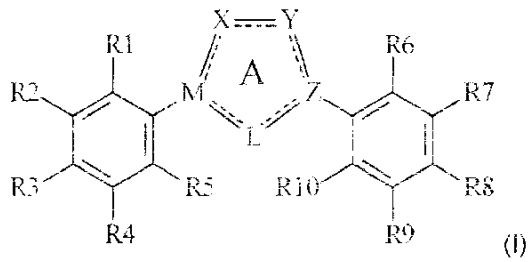
- Monomerik Abeta40'taki en büyük pike, yaklaşık 1.5 nm'lik bir
- 20 hidrodinamik yarıçap ve yaklaşık 30 nm'de bir oligomer piki (üst panel) karşılık gelirken anle138C varlığında Abeta40 agregat durumu (orta panel), monomer pikine el olarak yaklaşık 20 nm'de bir oligomer piki gösterdi. Alttaki panel, örneğin santrifüjlenmesinden sonra ölçülen, amiloid fibrillar Abeta40 durumuna yönelik ebat dağılımını
- 25 gösterir. ABeta agregasyonu, dinamik ışık saçılımı yoluyla analiz edildi. DLS ölçümleri, iki tekrar halinde 25°C'de, bir DynaPro Titan (Wyatt Technology Corp., CA) aleti üzerinde, 827.08 nm'lik bir lazer ile yapıldı. Saçma açısı 90° idi. DLS ölçümü, 10 saniye uzunluğunda

yirmi alımdan oluşuyordu. Çözeltinin refraktif endeksi (RI), 589 nm ve 20°C'de 1.333'te ayarlandı ve çalışılan dalga boyunda RI, Cauchy denklemi yoluyla, 3119 nm² katsayı ile elde edildi. Viskozite, 20°C'de 1.019 cp idi ve sıcaklığa bağımlı değişimler, bir sulu model ile hesaplandı. Ebat dağılımı, sınırlanmış bir regülarizasyon yöntemi ile belirlendi.

Şekil 17'de gösterilen bu deney bulguları, anle138c'nin, büyük Abeta40 oligomerleri oluşumunu inhibe ettiğini gösterir, bu ise anle138c'nin ve ilgili bileşiklerin ayrıca ABeta agregasyonuna müdahale edebildiğini, Alzheimer hastalığı gibi, agrege olmuş ABeta birikintisi ile nöropatolojik olarak karakterize edilen hastalıklarda terapötik ve tanı amaçlı olarak kullanılabileceğini gösterir.

Mevcut açıklamaya ait bileşiklerin alternatif bir düzeneği, aşağıdaki maddelerde özetlenir. Bu bileşikler, buluşa ait yukarıda bahsedilen bileşiklerle aynı şekilde kullanılabilir.

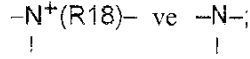
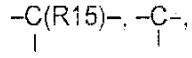
1. Aşağıdaki formül (I) ile temsil edilen bir bileşik



burada

X, Y ve L birbirinden bağımsız olarak yönsüz şekilde -C(R11)(R12)-, -C(R13)=, -N(R14)-, -N=, -N⁺(R17)=, -O- ve -S- arasından seçilir;

M ve Z birbirinden bağımsız olarak yönsüz şekilde şunlar arasından seçilir

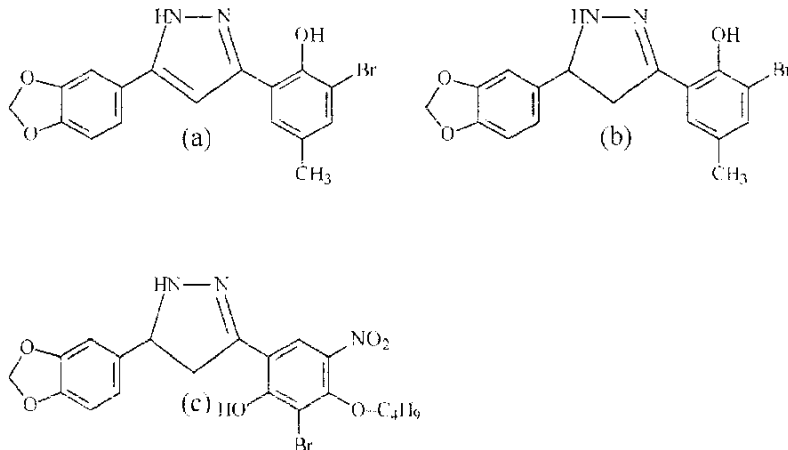


5 - - - -, isteğe bağlı bir ikili bağı temsil eder;

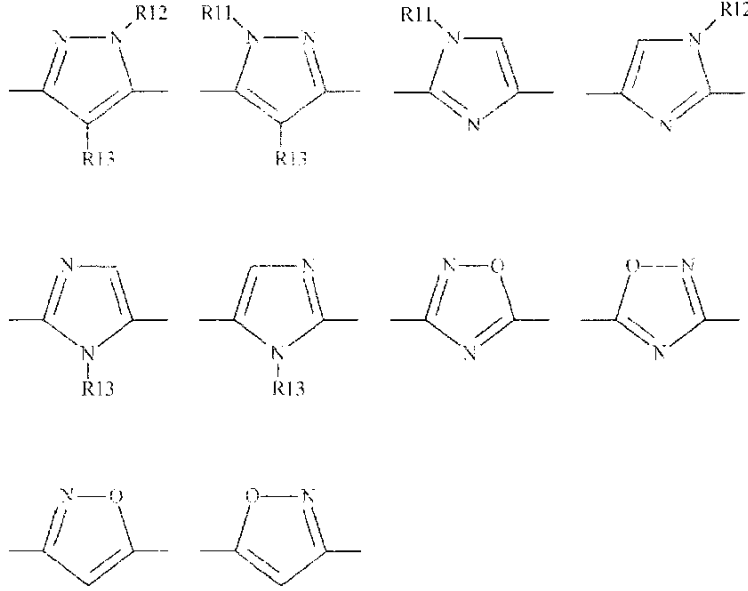
R1 ila R15 veya R17 veya R18 birbirinden bağımsız olarak hidrojen, halo, siyano, hidroksi, nitro, amino, azido, sülfonil, tiyo, fosfonil, karboksi, karbonilamido, alkil, alkenil, alkinil, alkoksi, asil, asiloksi, asilamino, bir karbosiklik grubu, karbosiklooks, karbosikloalkil, 10 karbosikloalkenil, aril, arilalkil, arilalkenil, arilalkinil, ariloksi, arilalkoksi, bir heterosiklik grup, heterosiklooks, heterosikloalkil, bir heteroaril grubu, heteroariloksi, heteroarilalkil, heteroarilalkenil ve heteroarilalkoksi arasından seçilir veya iki komşu grup bağlanarak 1 ila 6 karbon atomuna sahip bir köprü grubu oluşturulabilir, burada bir 15 veya iki karbon atomu, -O-, -S- veya -N(R')- ile değiştirilebilir, burada R', H ve C₁₋₄alkil arasından seçilir; bunların her biri isteğe bağlı olarak ikame edilir;

ayrıca bunun bir ön ilacı, ester, solvatu veya tuzu;

buradaki şart, bileşiğin aşağıdaki (a), (b) veya (c) bileşiklerinden biri 20 olmamasıdır.



2. Madde 1'e göre bileşik olup, burada A halkası yönlü şekilde aşağıdaki yapılar arasından seçilir:



5

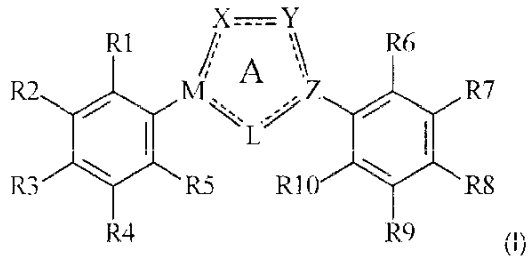
3. Madde 1 veya 2'ye göre bileşik olup, burada R7, halo, siyano, hidroksi, nitro, azido, alkoksi, tiyo, alkiltiyo, amino, haloalkoksi, alkil veya haloalkildir.

10

4. Madde 1 ile 3'ten herhangi birine göre bileşik olup, burada R2 ve R3'ün her biri, birbirinden bağımsız olarak hidroksi ve C₁₋₆ alkoksi arasından seçilir; veya R2 ve R3 birlikte bir -O-(CH₂)_n-O- yapısı oluşturur, burada n, 1 ile 3'tür, tercihen n, 1'dir.

15

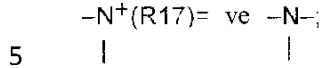
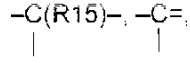
5. Aşağıdaki formül (I) ile temsil edilen bir bileşik



burada

X, Y ve L birbirinden bağımsız olarak yönsüz şekilde -C(R11)(R12)-, -C(R13)=, -N(R14)-, -N=, -N⁺(R17)=, -O- ve -S- arasından seçilir;

M ve Z birbirinden bağımsız olarak yönsüz şekilde şunlar arasından seçilir



---, isteğe bağlı bir ikili bağı temsil eder;

R1 ila R15 veya R17 veya R18 birbirinden bağımsız olarak hidrojen, halo, siyano, hidroksi, nitro, amino, azido, sülfonil, tiyo, fosfonil, karboksi, karbonilamido, alkil, alkenil, alkinil, alkoksi, asil, asiloksi, asilamino, bir karbosiklik grubu, karbosiklooks, karbosikloalkil, karbosikloalkenil, aril, arilalkil, arilalkenil, arilalkinil, ariloksi, arilalkoksi, bir heterosiklik grup, heterosiklooks, heterosikloalkil, bir heteroaril grubu, heteroariloksi, heteroarilalkil, heteroarilalkenil ve heteroarilalkoksi arasından seçilir veya iki komşu grup bağlanarak 1 ila 6 karbon atomuna sahip bir köprü grubu oluşturulabilir, burada bir veya iki karbon atomu, -O-, -S- veya -N(R')- ile değiştirilebilir, burada R', H ve C₁₋₄alkil arasından seçilir; bunların her biri isteğe bağlı olarak ikame edilir;

ayrıca bunun bir ön ilacı, esteri, solvatu veya tuzu;

20 protein agregasyonu ile bağlantılı bir hastalığın ve/veya bir nörodejeneratif hastalığın tedavisinde veya önlenmesinde kullanılmaya yöneliktir.

6. Madde 5'te tanımlanan, formül (I) ile temsil edilen bir bileşiğin, protein agregasyonu ile bağlantılı bir hastalığın ve/veya bir nörodejeneratif hastalığın tedavisi veya önlenmesi amaçlı 25 farmasötik bir kompozisyonun hazırlanmasında kullanılması.

7. Protein agregasyonu ile bağlantılı bir hastalığın ve/veya bir nörodejeneratif hastalığın tedavisi veya önlenmesi amaçlı bir yöntem olup, madde 5'te tanımlanan formül (I) ile temsil edilen bir bileşikten terapötik açıdan etkili bir miktarın, buna ihtiyaç duyan
5 bir hastaya uygulanmasını içerir.

8. Protein agregasyonu ile bağlantılı bir hastalıkta ve/veya bir nörodejeneratif hastalıkta rol oynayan bir proteinin agregasyonunu inhibe etmeye yönelik bir bileşiği tanımlama yöntemi olup, aşağıdaki adımları içerir:

10 etiketlenmiş bir monomerik proteinin ve adı geçen proteinin farklı şekilde etiketlenmiş bir agregatının, madde 5'te tanımlanan bir bileşik olan bir aday agregasyon inhibitörünün (1) varlığında ve/veya (2) yokluğunda temas ettirilmesi;

monomerik proteinin, adı geçen protein agregatına bağlanma
15 derecesini temsil eden, ortak lokalize etiketlerin miktarının belirlenmesi; ve

adı geçen bileşiğin varlığında ve yokluğunda elde edilen sonucun karşılaştırılması, burada adı geçen bileşiğin varlığında ortak lokalize olmuş etiketlerde azalma, bileşiğin adı geçen proteinin agregasyonunu
20 inhibe edebildiğini göstergesidir.

9. Madde 8'e ait yöntem olup, burada adı geçen etiketler, flüoresan etiketleridir.

10. Madde 8 veya 9'a ait yöntem olup, burada adı geçen etiketler, adı geçen proteine spesifik olarak bağlanan bir antikora veya bir antikor
25 fragmanına eklenir.

11. Madde 10'a ait yöntem olup, burada adı geçen antikor veya antikor fragmanı, agrege olmuş ve monomerik proteini ayırt edebilir.

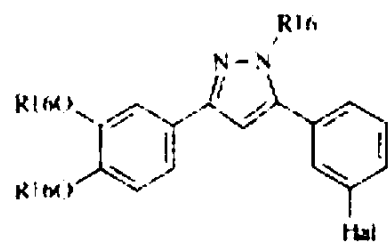
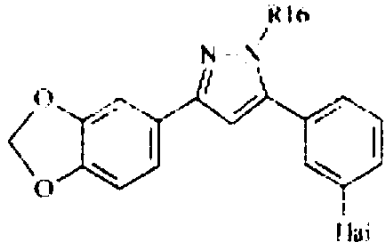
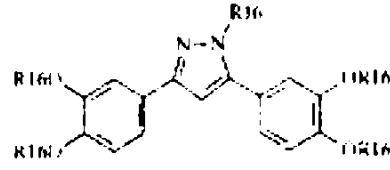
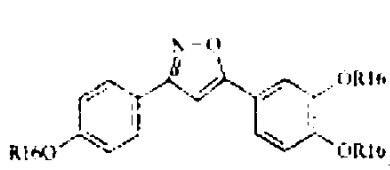
12. Madde 8 ila 11'den herhangi birine ait yöntem olup, burada ortak lokalize etiket miktarı, "yoğun şekilde flüoresanlı hedeflerin taranması (SIFT)" veya Flüoresan rezonans enerji transferi (FRET) veya yüksek çözünürlüklü konfokal görüntüleme yöntemi kullanılarak belirlenir.
- 5 13. Madde 8 ila 12'den herhangi birine ait yöntem olup, burada adı geçen monomerik ve agregre olmuş proteinler, prion proteini, Amiloid öncü protein (APP), alfa-sinüklein, süperoksid dismutaz, tau, immünoglobulin, Amiloid-A, transtiretin, Beta2-mikroglobulin, sistatin C, Apolipoprotein A1, TDP-43, İşlet amiloid polipeptit, ANF, 10 gelsolin, insulin, lizozim, fibrinojen, huntingtin ve ataksin ve bir Poly-Q kümesine sahip diğer proteinler ve adı geçen proteinlerin fragmanları veya türevlerinden oluşan gruptan seçilir.
14. Madde 13'e ait yöntem olup, burada adı geçen monomerik protein, prion proteinidir ve adı geçen agregre olmuş protein, PrPsc'dir.
- 15 15. Madde 13'e ait yöntem olup, burada adı geçen monomerik protein, alfa-Sinükleindir ve adı geçen agregre olmuş protein, alfa-Sinükleinin oligomerleri veya protofibrilleri veya fibrillerinden oluşan gruptan seçilir.
16. Protein agregasyonu ile bağlantılı bir hastalığın ve/veya bir 20 nörodejeneratif hastalığın tedavisinde veya önlenmesinde in vivo etkinliğe sahip bileşikler seçme yöntemi olup aşağıdakileri içerir:
- (a) madde 5'te tanımlanan bir aday bileşiğin, madde 13 ila 15'ten herhangi birinde tanımlanan proteinin agregre olabilen izoformuna sahip bir hücre kültürüne veya insan dışı bir 25 hayvana uygulanması;
 - (b) gözlemlenebilen agregat miktarının nicelendirilmesi; ve
 - (c) adı geçen proteinin agregatlarını veya agregat oluşumunu azaltabilen veya hücre kültürünün veya insan dışı hayvanın

hayatta kalma süresini arttırabilen bir bileşiğin tanımlanması ve seçilmesi.

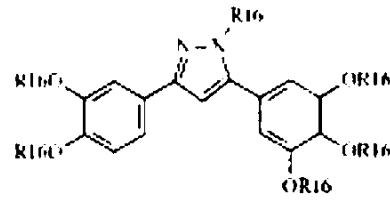
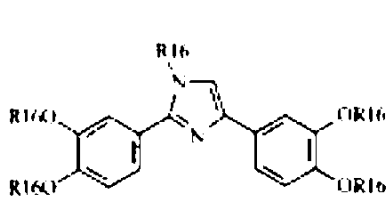
17. Madde 5'te tanımlanan bir bileşiğin, in vitro, bir hayvan içinde veya ex vivo protein agregasyonunu inhibe etmede kullanılması.

5 18. Madde 5'te tanımlanan bir bileşik ve isteğe bağlı olarak farmasötik açıdan kabul edilebilir bir taşıyıcı içeren farmasötik veya tanı amaçlı bir kompozisyon.

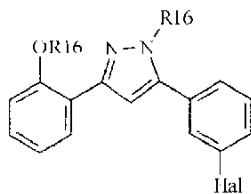
19. Madde 1 ile 5'ten herhangi birine göre bileşik veya madde 6'ya göre kullanım veya madde 7 ile 16'dan herhangi birine göre yöntem veya madde 17'ye göre kullanım veya madde 18'e göre kompozisyon olup, burada adı geçen bileşik, aşağıdakilerden oluşan gruptan seçilir:



15



ve



burada her R16 birbirinden bağımsız olarak H ve C₁₋₄alkil arasından seçilir; veya iki komşu R16 grubu bağlanarak 1 ila 3 karbon atomuna sahip bir köprü grubu oluşturulabilir; ayrıca bunun bir ön ilacı, esteri, solvatu veya tuzu.

5 20. Madde 16 veya 19'dan herhangi birine göre yöntem veya madde 17 ila 19'dan herhangi birine göre kullanım, madde 18 veya 19'dan herhangi birine göre tanı amaçlı kompozisyon olup, burada adı geçen bileşik, saptanabilir şekilde etiketlenir.

21. Madde 16, 19 ila 20'den herhangi birine göre yöntem veya madde 10 17, 19 ila 20'den herhangi birine göre kullanım olup, burada adı geçen bileşiklerden ikisi veya daha fazlası aynı anda kullanılır.

22. Madde 5 veya 19'dan herhangi birine göre bileşik olup, burada protein agregasyonu ile bağlantılı adı geçen hastalık, en az bir proteinin veya bunun bir fragmanının veya türevinin agreg olmuş bir 15 formunun varlığı ile karakterize edilir, burada protein, prion proteini, Amiloid öncü protein (APP), alfa-sinüklein, süperoksid dismutaz, tau, immünoglobulin, Amiloid-A, transtiretin, Beta2-mikroglobulin, sistatin C, Apolipoprotein A1, TDP-43, İlet amiloid polipeptit, ANF, gelsolin, insulin, lizozim, fibrinojen, huntingtin ve ataksin ve bir Poly- 20 Q kümesine sahip diğer proteinlerden oluşan gruptan seçilir.

23. Madde 5, 19 veya 22'den herhangi birine göre bileşik olup, burada adı geçen hastalık, Alzheimer hastalığı, prion hastalığı, Parkinson hastalığı, çoklu sistem atrofisi, Difüze Lewy cisimi hastalığı, frontotemporal demans, amiyotrofik lateral skleroz, Huntington 25 hastalığı, spinoserebellar ataksi ve diğer Poli-Q hastalıkları, kalıtsal serebral amiloid anjiyopati, ailevi amiloid polinöropati, primer sistemik amiloidoz (AL amiloidoz), reaktif sistemik amiloidoz (AA amiloidoz), tip II diyabet, enjeksiyon-lokalize amiloidoz, beta-2

mikroglobulin amiloidoz, kalıtsal nöropatik olmayan amiloidoz ve Finlandiya kalıtsal sistemik amiloidozdan oluşan gruptan seçilir.

24. Madde 23'e göre bileşik olup, burada adı geçen prion hastalığı, Creutzfeldt-Jakob hastalığı, varyant Creutzfeldt-Jakob hastalığı, 5 genetik insan prion hastalığı, Sığır Spongiform Ensefalopati (BSE) ve Scrapie arasından seçilir.

25. Madde 5 ve 18 ile 24'ten herhangi birinde tanımlanan bileşiği ve ek olarak adı geçen bileşiğe spesifik olarak bağlanan bir antikor veya antikor fragmanı; ve/veya madde 13 ile 15'te tanımlandığı gibi 10 monomerik veya agrege olmuş protein; ve/veya isteğe bağlı olarak adı geçen bileşik ile kompleks haline getirilmiş, madde 13 ile 15'te tanımlandığı gibi monomerik veya agrege olmuş protein ve kullanma talimatları içeren, bir veya daha fazla kap içinde bir kit.

15 Burada kullanıldığı gibi "halo" terimi, florin, klorin, bromin ve iyodin arasından seçilen, tercihen bromin olan bir halojen atomuna karşılık gelir.

Burada kullanıldığı gibi "karboksi" terimi, -COOH grubuna karşılık 20 gelir.

"Alkil" ve "alk" terimleri, 1 ile 12 karbon atomu, tercihen 1 ile 6 karbon atomu, daha fazla tercihen 1 ile 4 karbon atomu ihtiva eden, düz veya dallı zincirli bir alkan (hidrokarbon) radikaline karşılık gelir. Bu tür örnek gruplar arasında, bunlarla sınırlı olmamakla birlikte 25 metil, etil, propil, izopropil, n-butil, t-butil, izobutil, pentil, heksil, izoheksil, heptil bulunur.

"Alkenil" terimi, 2 ile 12 karbon atomu, tercihen 2 ile 6 karbon atomu

ve en az bir karbon-karbon ikili bağı ihtiva eden, düz veya dallı zincirli bir hidrokarbon radikaline karşılık gelir. Bu tür örnek gruplar arasında etenil veya alil bulunur.

- 5 "Alkinil" terimi, 2 ila 12 karbon atomu, tercihen 2 ila 6 karbon atomu ve en az bir karbondan karbona üçlü bağ ihtiva eden, düz veya dallı zincirli bir hidrokarbon radikaline karşılık gelir. Bu tür örnek gruplar arasında etinil bulunur.
- 10 "Alkoksi" terimi, bir oksijen bağı (-O-) yoluyla bağlanmış, yukarıda tarif edildiği gibi bir alkil grubuna karşılık gelir.

Mevcut buluşa göre bir "asil grubu", bir alkil, aril, heterosiklik veya heteroarilin bir karbonil grubuna eklendiği fonksiyonel bir gruptur.

- 15 Asil gruplarının örnekleri, formil grubu; C₁₋₆ alkil-karbonil grubu örneğin asetil grubu, propiyonil grubu, butiril grubu ve pivaloil grubu; C₂₋₆ alkenil-karbonil grubu örneğin etenoil grubu, propenoil grubu ve butenoil grubu; aroil grubu örneğin benzoil grubu ve benzeri, tercihen asetil grubudur.
- 20 Burada kullanıldığı gibi "asiloksi" terimi, -O-'ya bağlanmış bir asil grubuna karşılık gelir. Benzer şekilde "asilamino", -N(R') -'ye bağlanmış bir asil grubuna karşılık gelir, burada R', H veya C₁₋₆ alkildir.
- 25 "Karbosiklik grubu" terimi, 1 ila 4 halka, tercihen 1 halka ve halka başına 3 ila 8 karbon ihtiva eden, tam doymuş siklik bir hidrokarbon grubuna karşılık gelir. Bu tür örnek gruplar arasında siklopropil, siklobutil, siklopentil, sikloheksil, vb. bulunur.

"Karbosiklooksî" terimi, bir oksijen bağı (-O-) yoluyla bağlanmış, yukarıda tarif edildiği gibi bir karbosiklik gruba karşılık gelir.

- 5 "Karbosikloalkil" terimi, bir karbosiklik grubu ile ikame edilmiş bir alkil grubuna karşılık gelir, burada karbosiklik ve alkil, yukarıda belirtildiği gibi tanımlanır.

- 10 "Karbosikloalkenil" terimi, bir karbosiklik grubu ile ikame edilmiş bir alkenil grubuna karşılık gelir, burada karbosiklik grubu ve alkenil, yukarıda belirtildiği gibi tanımlanır.

- 15 "Aril" terimi, 6 ila 20, tercihen 6 ila 10 omurga karbon atomuna sahip ve 1 ila 3 aromatik halkaya sahip olan siklik, aromatik hidrokarbon gruplarına, özellikle fenil, bifenil veya naftil gibi monosiklik veya bisiklik gruplara karşılık gelir. İki veya daha fazla aromatik halka (bisiklik, vb.) ihtiva ettiğinde aril grubunun aromatik halkaları, tek bir noktadan birleştirilebilir (örn., bifenil) veya füzyonla birleştirilebilir (örn., naftil, fenantrenil ve benzeri).

- 20 "Arilalkil" terimi, bir aril grubu ile ikame edilmiş bir alkil grubuna karşılık gelir, burada aril ve alkil, yukarıda belirtildiği gibi tanımlanır.

- 25 "Arilalkenil" terimi, bir aril grubu ile ikame edilmiş bir alkenil grubuna karşılık gelir, burada aril ve alkenil, yukarıda belirtildiği gibi tanımlanır.

"Arilalkinil" terimi, bir aril grubu ile ikame edilmiş bir alkinil grubuna

karşılık gelir, burada aril ve alkinil, yukarıda belirtildiği gibi tanımlanır.

"Ariloksi" terimi, bir oksijen bağı (-O-) yoluyla bağlanmış, yukarıda
5 tarif edildiği gibi bir aril grubuna, örneğin fenoksi grubu, antriloksi grubu, bifenililoksi grubu ve benzerine, tercihen fenoksi grubuna karşılık gelir.

"Arilalkoksi" terimi, bir aril grubu ile ikame edilmiş bir alkoksi
10 grubuna karşılık gelir, burada aril ve alkoksi, yukarıda belirtildiği gibi tanımlanır.

"Heterosiklik grup" terimi, tamamen doymuş veya kısmen veya tamamen doymamış, siklik gruplara karşılık gelir (örneğin 3 ila 7
15 üyeli monosiklik, 7 ila 11 üyeli bisiklik veya 10 ila 16 üyeli trisiklik halka sistemi) ve en az bir karbon atomu ihtiva eden halkada en az bir heteroatoma sahiptir. Bir heteroatom ihtiva eden heterosiklik grubunun her halkası, nitrojen atomları, oksijen atomları ve/veya sülfür atomları arasından seçilen 1, 2, 3 veya 4 heteroatoma sahip
20 olabilir, burada nitrojen ve sülfür heteroatomları isteğe bağlı olarak oksidize edilebilir ve nitrojen heteroatomları isteğe bağlı olarak katernize edilebilir. ("Heteroarilyum" terimi, bir katernar nitrojen atomu ve böylelikle bir pozitif yük taşıyan bir heteroaril grubuna karşılık gelir.) Heterosiklik grup, molekülün geri kalanına halkanın
25 veya halka sisteminin herhangi bir heteroatomundan veya karbon atomundan eklenebilir. Örnek monosiklik heterosiklik gruplar arasında etilen oksid, azetidinil, pirolidinil, pirolil, pirazolil, oksetanil, pirazolinil, imidazolil, imidazolinil, imidazolidinil, oksazolil,

oksazolidinil, izoksazolinil, izoksazolil, tiyazolil, tiyadiazolil, tiyazolidinil, izotiyazolil, izotiyazolidinil, furil, tetrahidrofuril, tiyenil, oksadiazolil, piperidinil, piperazinil, 2-oksopiperazinil, 2-oksopiperidinil, 2-oksopirrolodinil, 2-oksoazepinil, azepinil, 5 heksahidro diazepinil, 4-piperidonil, piridil, pirazinil, pirimidinil, piridazinil, triazinil, triazolil, tetrazolil, tetrahidropiranil, morfolinil, tiyamolpholinil, tiyamorfolinil sülfoksid, tiyamorfolinil sülfon, 1,3-dioksolan ve tetrahidro-1,1-dioksotiyenil ve benzeri bulunur. Örnek bisiklik heterosiklik gruplar arasında indolil, izoindolil, benzotiyazolil, 10 benzodioksolil, benzoksazolil, benzoksadiazolil, benzotiyenil, kinükolidinil, kinolinil, tetrahidroizokinolinil, izokinolinil, benzimidazolil, benzopiranil, indolizinil, benzofuril, benzofurazanil, kromonil, kumarinil, benzopiranil, sinnolinil, kinoksalinil, indazolil, pirolopiridil, furopiridinil (örneğin furo [2,3-c] piridinil, furo [3,2-b] 15 piridinil] veya furo [2,3-b] piridinil), dihidrobenzodioksinil, dihidrodioksidobenzotiyofenil, dihidroizoindolil, dihidroindolil, dihidrokinolinil, dihidrokinazolinil (örneğin 3,4-dihidro-4-okso-kinazolinil), triazinilazepinil, tetrahidrokinolinil ve benzeri bulunur. Örnek trisiklik heterosiklik gruplar arasında karbazolil, benzidolil, 20 fenantrolinil, dibenzofuranil, akridinil, fenantridinil, ksantenil ve benzeri bulunur.

"Heterosiklooksi" terimi, bir oksijen bağı (-O-) yoluyla bağlanmış, yukarıda tarif edildiği gibi bir heterosiklik gruba karşılık gelir.

25

"Heterosikloalkil" terimi, bir heterosiklik grup ile ikame edilmiş bir alkil grubuna karşılık gelir, burada heterosiklik ve alkil, yukarıda belirtildiği gibi tanımlanır.

Burada kullanıldığı gibi "heteroaril" terimi, heteroatomlar olarak oksijen, sülfür ve/veya nitrojen ihtiva edebilen ve buna başka bir aromatik halkanın füzyonla birleştirilebildiği, 5 veya 6 elemanlı bir aromatik halkaya karşılık gelir. Sınırlama olmadan heteroaril gruplarının sınırlayıcı olmayan örnekleri, benzofuranil, furil, tiyenil, benzotiyenil, tiyazolil, imidazolil, oksazolil, oksadiazolil, tiyadiazolil, benzotiyazolil, triazolil, tetrazolil, izoksazolil, izotiyazolil, pirolil, piranil, tetrahidropiranil, pirazolil, piridil, kinolinil, izokinolinil, purinil, karbazolil, benzoksazolil, benamidazolil, indolil, izoindolil, pirazinil, diazinil, pirazin, triazinil, triazin, tetrazinil, tetrazolil, benzotiyofenil, benzopiridil ve benzimidazolildir.

"Heteroariloksi" terimi, bir oksijen bağı (-O-) yoluyla bağlanmış, yukarıda tarif edildiği gibi bir heteroaril grubuna karşılık gelir.

"Heteroarilalkil", "heteroarilalkenil" ve "heteroarilalkinil" terimleri, bir alkil, alkenil veya alkinil grubunun bir heteroaril grubu ile ikame edildiği gruplara karşılık gelir, burada heteroaril ve alkil, alkenil ve alkinil, yukarıda belirtildiği gibi tanımlanır.

"Heteroarilalkoksi" terimi, bir heteroaril grubu ile ikame edilmiş bir alkoksi grubuna karşılık gelir, burada heteroaril ve alkoksi, yukarıda belirtildiği gibi tanımlanır.

25

Burada kullanıldığı gibi "ikame edilmiş" terimi, herhangi bir ekleme noktasından bir veya daha fazla ikame edici, tercihen 1 ila 4 ikame edici ile ikame edilmiş bir gruba karşılık gelir. Örnek ikame ediciler

arasında, bunlarla sınırlı olmamakla birlikte aşağıdaki gruplardan biri veya daha fazlası bulunur: alkil, alkoksi, halo, hidroksi, karboksi (yani, -COOH), alkoksikarbonil, alkilkarboniloksi, amino (yani -NH₂), tiyol ve nitro.

5

Tercih edilen alternatif bir düzenekte R1, hidrojen ve alkilden oluşan gruptan seçilir, daha fazla tercihen hidrojendir.

10 Tercih edilen alternatif bir düzenekte R2, hidroksi ve alkoksiden oluşan gruptan seçilir.

Tercih edilen alternatif bir düzenekte R3, hidroksi ve alkoksiden oluşan gruptan seçilir.

15 Başka bir tercih edilen alternatif düzenekte R2 ve R3 birbirine bağlanır ve bir -O(CH₂)_nO- yapısı oluşturur, burada n, 1 ila 3'tür, tercihen n, 1'dir.

Tercih edilen alternatif bir düzenekte R4, hidrojen, hidroksi ve alkoksiden oluşan gruptan seçilir, daha fazla tercihen hidrojendir.

20

Tercih edilen alternatif bir düzenekte R5, hidrojen ve alkilden oluşan gruptan seçilir, daha fazla tercihen hidrojendir.

25 Tercih edilen alternatif bir düzenekte R6, hidrojen ve alkilden oluşan gruptan seçilir, daha fazla tercihen hidrojendir.

Tercih edilen alternatif bir düzenekte R7, hidrojen, halo, siyano, nitro, hidroksi ve alkoksiden oluşan gruptan seçilir, daha fazla tercihen R7,

hidrojen, halo, hidroksi veya alkoksidir, hatta daha fazla tercihen R7, halodur.

5 Tercih edilen alternatif bir düzenekte R8, hidrojen, hidroksi ve alkoksiden oluşan gruptan seçilir.

Tercih edilen alternatif bir düzenekte R9, hidrojen, halo, hidroksi ve alkoksiden oluşan gruptan seçilir.

10 Tercih edilen alternatif bir düzenekte R10, hidrojen ve alkilden oluşan gruptan seçilir, daha fazla tercihen hidrojendir.

Tercih edilen alternatif bir düzenekte R11, hidrojen ve alkilden oluşan gruptan seçilir.

15

Tercih edilen alternatif bir düzenekte R12, hidrojen ve alkilden oluşan gruptan seçilir.

Tercih edilen alternatif bir düzenekte R13, hidrojen ve alkilden oluşan gruptan seçilir.

20

Tercih edilen alternatif bir düzenekte R14, hidrojen ve alkilden oluşan gruptan seçilir.

25 Tercih edilen alternatif bir düzenekte R15, hidrojen ve alkilden oluşan gruptan seçilir.

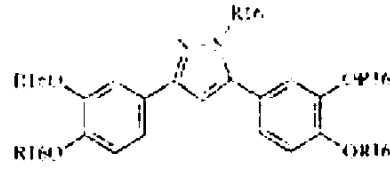
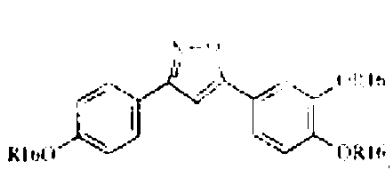
Buluşa ait bileşiğin tercih edilen başka bir alternatif düzeneginde R7,

halo, siyano, hidroksil veya nitro, azido, alkoksi, tiyo, alkiltiyo, amino, haloalkoksi, alkil veya haloalkildir.

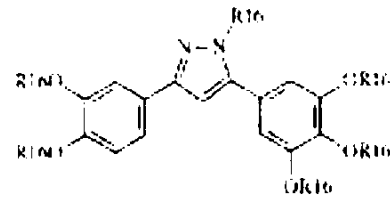
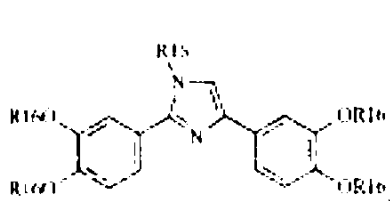
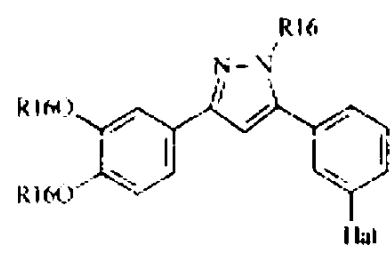
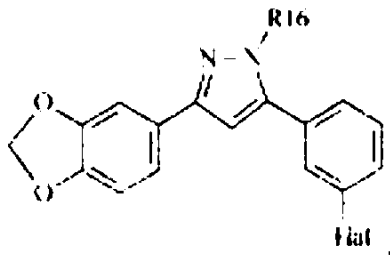
Tercih edilen alternatif bir düzenekte R7, halo, siyano, hidroksil veya
5 nitrodur, daha fazla tercihen halo'dur.

Başka bir tercih edilen alternatif düzenekte R2 ve R3'ün her biri, birbirinden bağımsız olarak hidroksi ve C₁₋₆ alkoksi arasından seçilir; veya R2 ve R3 birlikte bir -O-(CH₂)_n-O- yapısı oluşturur, burada n, 1
10 ila 3'tür, tercihen n, 1'dir.

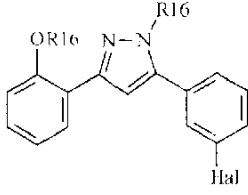
Tercih edilen alternatif bir düzenekte bileşik, aşağıdakilerden oluşan gruptan seçilir



15

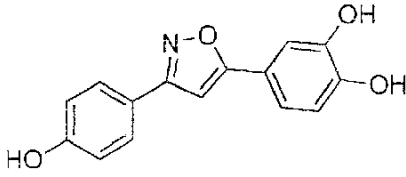


ve



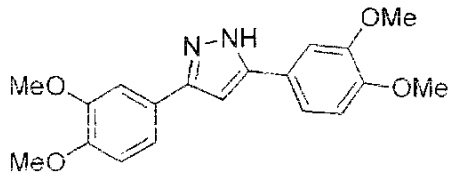
burada her R16 birbirinden bağımsız olarak H ve C₁₋₄alkil arasından seçilir; veya iki komşu R16 grubu bağlanarak 1 ila 3 karbon atomuna sahip bir köprü grubu oluşturulabilir; ayrıca bunun ön ilaçları, esterleri, solvatları veya tuzları.

Daha fazla tercih edilen alternatif bir düzenekte bileşik, aşağıdakilerden oluşan gruptan seçilir:



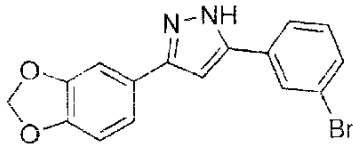
10

3-(4-Hidroksifenil)-5-(3,4-dihidroksifenil)izoksazol

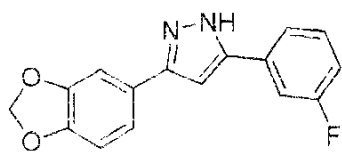


3,5-Bis(3,4-dimetoksifenil)pirazol

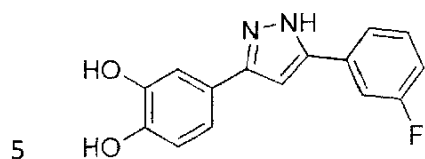
15



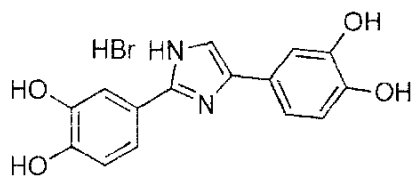
5-(3-Bromofenil)-3-(3,4-metilendioksifenil)pirazol



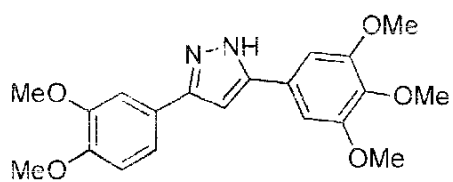
5-(3-Fluorofenil)-3-(3,4-metilendioksifenil)pirazol



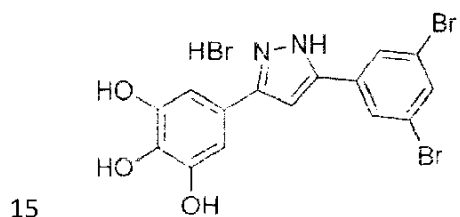
3-(3,4-Dihidroksifenil)-5-(3-florofenil)pirazol



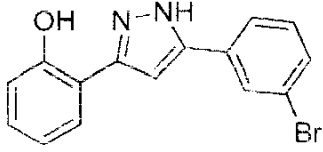
10 **2,4-Bis(3,4-dihidroksifenil)imidazol hidrobromid**



3-(3,4-Dimetoksifenil)-5-(3,4,5-trimetoksifenil)pirazol



5-(3,5-Dibromofenil)-3-(3,4,5-trihidroksifenil)pirazol hidrobromid



5-(3-Bromofenil)-3-(2-hidroksifenil)pirazol (10353_F11)

- 5 Alternatif düzeneğe ait bileşikler, saptanabilir şekilde etiketlenebilir.

10

15

20

25

TARİFNAME İÇERİSİNDE ATIF YAPILAN REFERANSLAR

- Başvuru sahibi tarafından atıf yapılan referanslara ilişkin bu liste, yalnızca okuyucunun yardımı içindir ve Avrupa Patent Belgesinin bir kısmını oluşturmaz. Her ne kadar referansların derlenmesine büyük önem verilmiş olsa da, hatalar veya eksiklikler engellenememektedir ve EPO bu bağlamda hiçbir sorumluluk kabul etmemektedir.

Tarifname içerisinde atıfta bulunulan patent dökümanları:

- US 20070276034 A [0004]
- WO 2008131148 A [0005] [0170]
- WO 2004072050 A [0006] [0170]
- WO 2007002540 A [0007]
- WO 9817652 A [0008] [0170]
- DE 4126543 [0048]
- FR 2104932 [0048]
- WO 2004080972 A [0049] [0170]
- US 3773919 A [0101]
- EP 58481 A [0101]
- EP 133988 A [0101]
- DE 3218121 [0101]
- EP 52322 A [0101]
- EP 36676 A [0101]
- EP 88046 A [0101]
- EP 143949 A [0101]
- EP 142641 A [0101]
- JP 58118008 A [0101]
- US 4485045 A [0101]
- US 4544545 A [0101]
- EP 102324 A [0101]
- US 4946778 A [0121]

10 Tarifnamede belirtilen patentleştirilmemiş literatür:

- **M. ONO et al.** Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2008, vol. 16, 6867-6872 [0003] [0170]
- **SIDMAN. U. et al.** Biopolymers, 1983, vol. 22, 547-556 [0101]
- **R. LANGER et al.** J. Biomed. Mater. Res., 1981, vol. 15, 167-277 [0101]
- **R. LANGER.** Chem. Tech., 1982, vol. 12, 98-105 [0101]
- **EPSTEIN et al.** Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 1985, vol. 82, 3688-3692 [0101]
- **HWANG et al.** Proc. Natl. Acad.
- **SCHIER.** Human Antibodies Hybridomas, 1996, vol. 7, 97-105 [0121]
- **MALMBORG.** J. Immunol. Methods, 1995, vol. 183, 7-13 [0121]
- **R. SCHIRRMACHER et al.** J. Label. Compd. Radiopharm., 2002, vol. 45, 763-774 [0147]
- **J. ERIKSSON et al.** J. Label. Compd. Radiopharm., 2006, vol. 49, 1177-1186 [0148]
- **L. F. TIETZE ; TH. EICHER.** Reaktionen und Synthesen.

Sci. (USA), 1980, vol. 77, 4030-4034 [0101]

• **HARLOW ; LANE.** Antibodies, A Laboratory Manual. CSH Press, 1998 [0111]

• **KOHLER ; MILSTEIN.** Nature, 1975, vol. 256, 495-497 [0121]

• **KOZBOR.** Immunology Today 4, 1983, 72 [0121]

• **COLE et al.** Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy. Alan R. Liss, Inc, 1985, 77-96 [0121]

Georg Thieme Verlag, 1991 [0162]

• **T. W. GREENE ; P. G. M. WUTS.** Protective Groups in Organic Synthesis. John Wiley & Sons, 1999 [0162]

• **J. MARCH.** Advanced Organic Chemistry. John Wiley & Sons, 1985 [0162]

• **KOSTKA et al.** J Biol Chem, 2008, vol. 283, 10992-11003 [0257]

5

10

15

ŞEKİLLERDEKİ YAZILARIN ANLAMLARI

ŞEKİL 1

A = 3,5-Difenil-pirazol (DPP)

B = Sembol büyüklüğü ~ # küme elemanları

5 C = P_CC – Hücre kültürü aktiflerinin oranı (tp3_reduktion ==1)

D = P_SIFT– SIFT aktiflerinin oranı (tp1_sift > 0.25)

ŞEKİL 2

E = sınıflandırılmamış

10

ŞEKİL 4

F = kontrol

G = gün

15 **ŞEKİL 5**

H = prion inokülasyonu

I = uygulama i.p.

J = uygulama oral

K = PrPSc düzeyi dalak [kontrole göre]

20 L = yüzde

M = derece

ŞEKİL 6

N = PrP^{Sc} düzeyi

25 O = PrPSc düzeyi beyin [tedavi edilmemiş kontrole göre]

P = tedavi edilmemiş

R = 80. güne kadar değişim %'si

S = apoptik hücre/10 görsel alan (100 x büyütme)

ŞEKİL 7

T = fıstık

ŞEKİL 8

- 5 U = bileşik (351F11) konsantrasyonu
 V = bileşiksiz
 Y = Kontrolün %'si olarak agregat sinyali (SIFT)
 Z = bileşik konsantrasyonu

ŞEKİL 9

A1 = Kontrol %'si
 B1 = bileşik

ŞEKİL 10

- 15 C1 = PrP^{Sc} düzeyi beyin [80 dpi %'si]
 D1 = Enfeksiyondan sonra gün (dpi)
 E1 = apopt. hücre/10 görsel alan [100x büyütme]
 F1 = Fare ağırlığı [g]

ŞEKİL 11

- 20 G1 = tedavi yok
 H1 = Enfeksiyondan sonra gün
 I1 = intraperitoneal
 J1 = oral (gava)
 25 K1 = oral (fıstık yağı)

ŞEKİL 12

L1 = PrP^{Sc} düzeyi beyin

$M1 = \text{doz [mg/gün]}$

ŞEKİL 13

$N1 = \text{PrP}^c \text{ düzeyi [başlangıç \%’si]}$

5 $O1 = \text{Başlangıç}$

ŞEKİL 14

$P1 = \text{konsantrasyon beyin [ng/mL]}$

$R1 = \text{süre [saat]}$

10 $S1 = \text{oral (DMSO/bitkisel yağ 1mg)}$

$T1 = \text{oral (fıstık yağı 1mg)}$

$U1 = \text{oral (fıstık yağı 5mg)}$

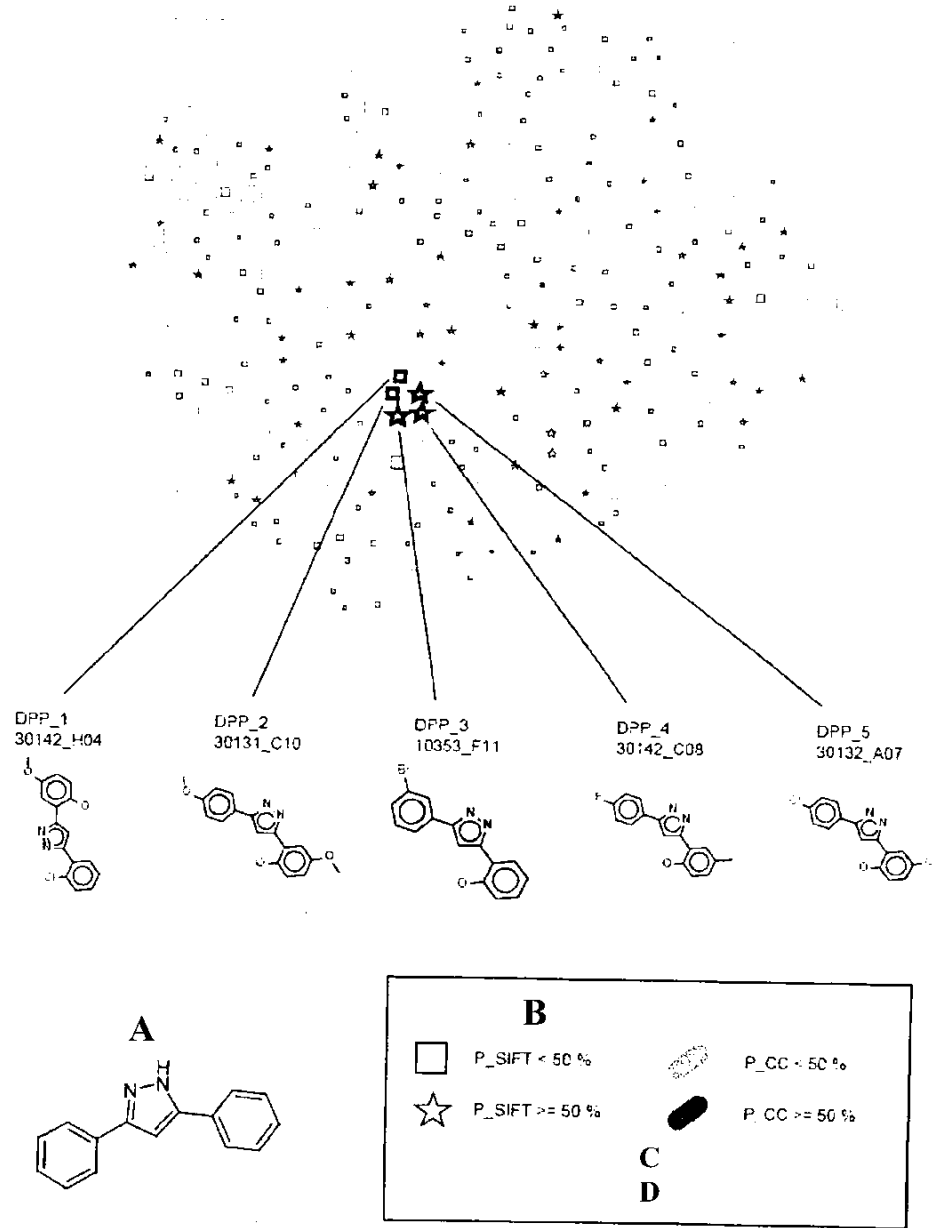
$V1 = \text{konsantrasyon serum [ng/mL]}$

15 ŞEKİL 17

$Y1 = \text{Yoğunluk \%’si}$

20

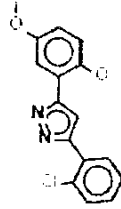
25



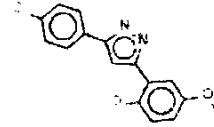
ŞEKİL 1

A)

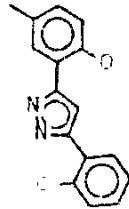
DPP_1



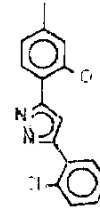
substance_id: 30142_H04
 tp1_sft: 0.318
 tp3_reduktion: 1.0
 tp3_reduktion_mue: 0.5
 tp3_scr2a: 1.0



substance_id: 30136_B06
 tp1_sft: 0.318
 tp3_reduktion: 1.0
 tp3_reduktion_mue: 0.0
 tp3_scr2a: 1.0



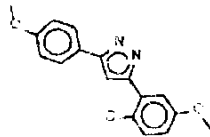
substance_id: 30131_A02
 tp1_sft: -0.341
 tp3_reduktion: 0.0
 tp3_scr2a: 0.0



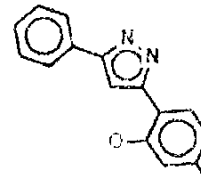
substance_id: 30143_DC2
 tp1_sft: -0.385
 tp3_reduktion: 0.0
 tp3_scr2a: 0.0

B)

DPP_2

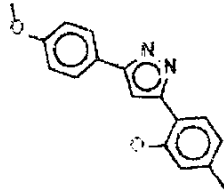


substance_id: 30131_C10
 tp1_sft: 0.049
 tp3_reduktion: 1.0
 tp3_reduktion_mue: 1.0
 tp3_scr2a: 0.5

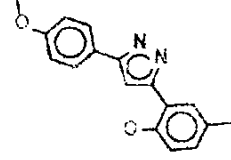


substance_id: 30139_H04
 tp1_sft: -0.509
 tp3_reduktion: 1.0
 tp3_reduktion_mue: 1.0
 tp3_scr2a: 1.0

ŞEKİL 2

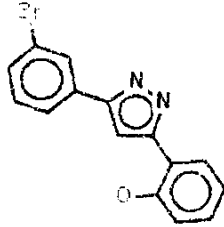


substance_id: 30142_E08
 tp1_sift: 0.304
 tp3_reduktion: 1.0
 tp3_reduktion_mue: 1.0
 tp3_scr2a: 0.5

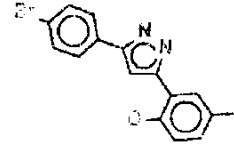


substance_id: 30139_E02
 tp1_sift: 0.367
 tp3_reduktion: 1.0
 tp3_reduktion_mue: 0.5
 tp3_scr2a: 1.0

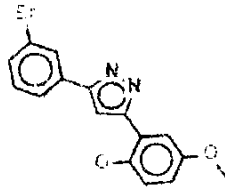
C)



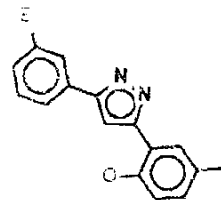
substance_id: 10353_F11
 tp1_sift: 1.039
 tp1_sift_validation: -1.0
 tp3_reduktion: 1.0
 tp3_reduktion_mue: 1.0
 tp3_scr2a: 1.0



substance_id: 30134_F02
 tp1_sift: -0.587
 tp3_reduktion: 1.0
 tp3_reduktion_mue: 0.5
 tp3_scr2a: 0.5

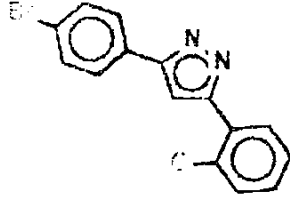


substance_id: 10353_B07
 tp3_reduktion: 0.0

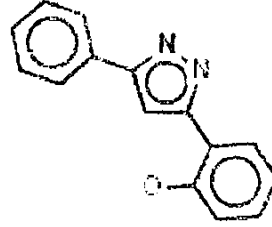


substance_id: 10353_C08
 tp1_sift: 0.964
 tp3_reduktion: 0.0

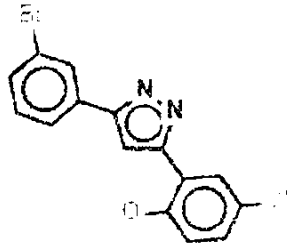
ŞEKİL 2 devamı



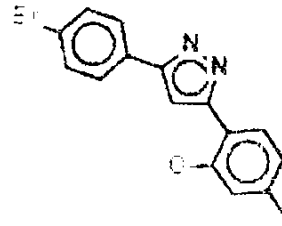
substance_id: 30135_G10
 tp1_sift: 0.505
 tp3_reduktion: 1.0
 tp3_reduktion_mue: 0.5
 tp3_scn2a: 0.0



substance_id: 30131_A08
 tp1_sift: -0.141
 tp3_reduktion: 1.0
 tp3_reduktion_mue: 0.0
 tp3_scn2a: 0.0



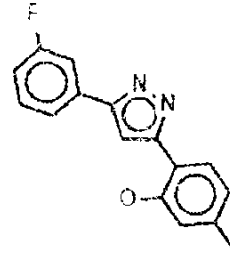
substance_id: 10353_H11
 tp1_sift: 0.76
 tp3_reduktion: 0.0



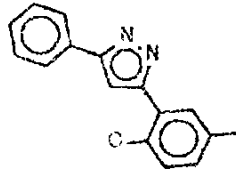
substance_id: 30140_A08
 tp1_sift: -0.324
 tp3_reduktion: 0.0
 tp3_scn2a: 0.0

D)

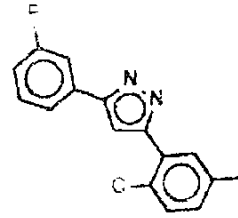
DPP_4



substance_id: 10353_G03
 tp1_sift: 0.575
 tp3_reduktion: 1.0
 tp3_reduktion_mue: 1.0
 tp3_scr2a: 1.0

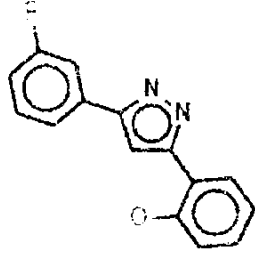


substance_id: 30139_B02
 tp1_sift: 0.071
 tp3_reduktion: 1.0
 tp3_reduktion_mue: 0.5
 tp3_scr2a: 1.0

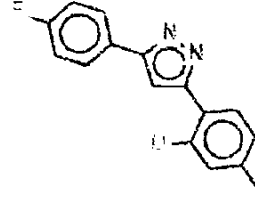


substance_id: 10353_E03
 tp1_sift: 1.303
 tp1_sift_validation: -1.0
 tp3_reduktion: 1.0
 tp3_reduktion_mue: 0.0

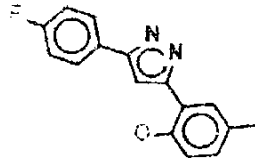
ŞEKİL 2 devamı



substance_id: 10354_H03
 tp1_sift: 0.093
 tp3_reduktion: 1.0
 tp3_reduktion_mue: 1.0
 tp3_scn2a: 1.0



substance_id: 30137_A03
 tp1_sift: 0.153
 tp3_reduktion: 1.0
 tp3_reduktion_mue: 1.0
 tp3_scn2a: 0.5

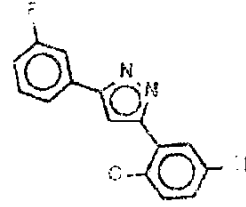


substance_id: 30142_C08
 tp1_sift: 0.349
 tp3_reduktion: 1.0
 tp3_reduktion_mue: 0.0
 tp3_scn2a: 1.0

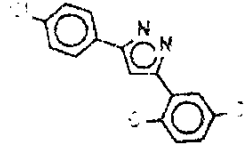
ŞEKİL 2 devamı

E)

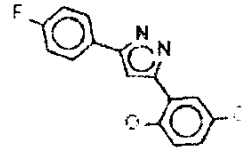
DPP_5



substance_id: 10353_C11
 tp1_sift: 0.717
 tp3_reduktion: 1.0
 tp3_reduktion_mue: 1.0
 tp3_scn2a: 0.0

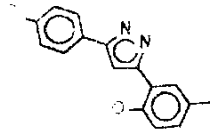


substance_id: 30132_A07
 tp1_sift: 0.718
 tp3_reduktion: 1.0
 tp3_reduktion_mue: 0.5
 tp3_scn2a: 0.5

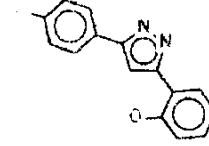


substance_id: 30134_F11
 tp1_sift: -0.107
 tp3_reduktion: 1.0
 tp3_reduktion_mue: 0.0
 tp3_scn2a: 0.5

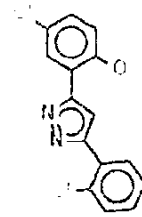
ŞEKİL 2 devamı



substance_id: 30133_D04
 tp1_sift: 0.273
 tp3_reduktion: 1.0
 tp3_reduktion_mue: 1.0
 tp3_scn2a: 0.5



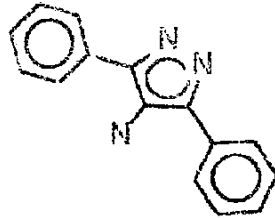
substance_id: 30138_F05
 tp1_sift: -0.154
 tp3_reduktion: 1.0
 tp3_reduktion_mue: 1.0
 tp3_scn2a: 1.0



substance_id: 30136_B07
 tp1_sift: 0.4
 tp3_reduktion: 1.0
 tp3_reduktion_mue: 0.0
 tp3_scn2a: 1.0

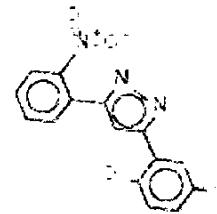
F)

DPP_6



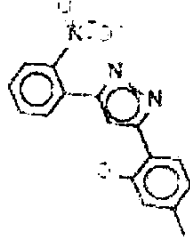
substance_id: 30165_G11
 tp3_reduktion: 1.0

E

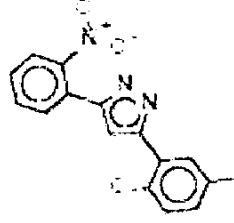


substance_id: 30142_D07
 tp1_sift: -0.034
 tp3_reduktion: 0.0
 tp3_scn2a: 0.0

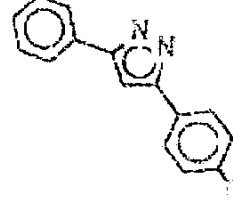
ŞEKİL 2 devamı



substance_id: 20141_A07
 tp1_sifr: 0.193
 tp3_reduction: 0.0
 tp3_sch2a: 0.0

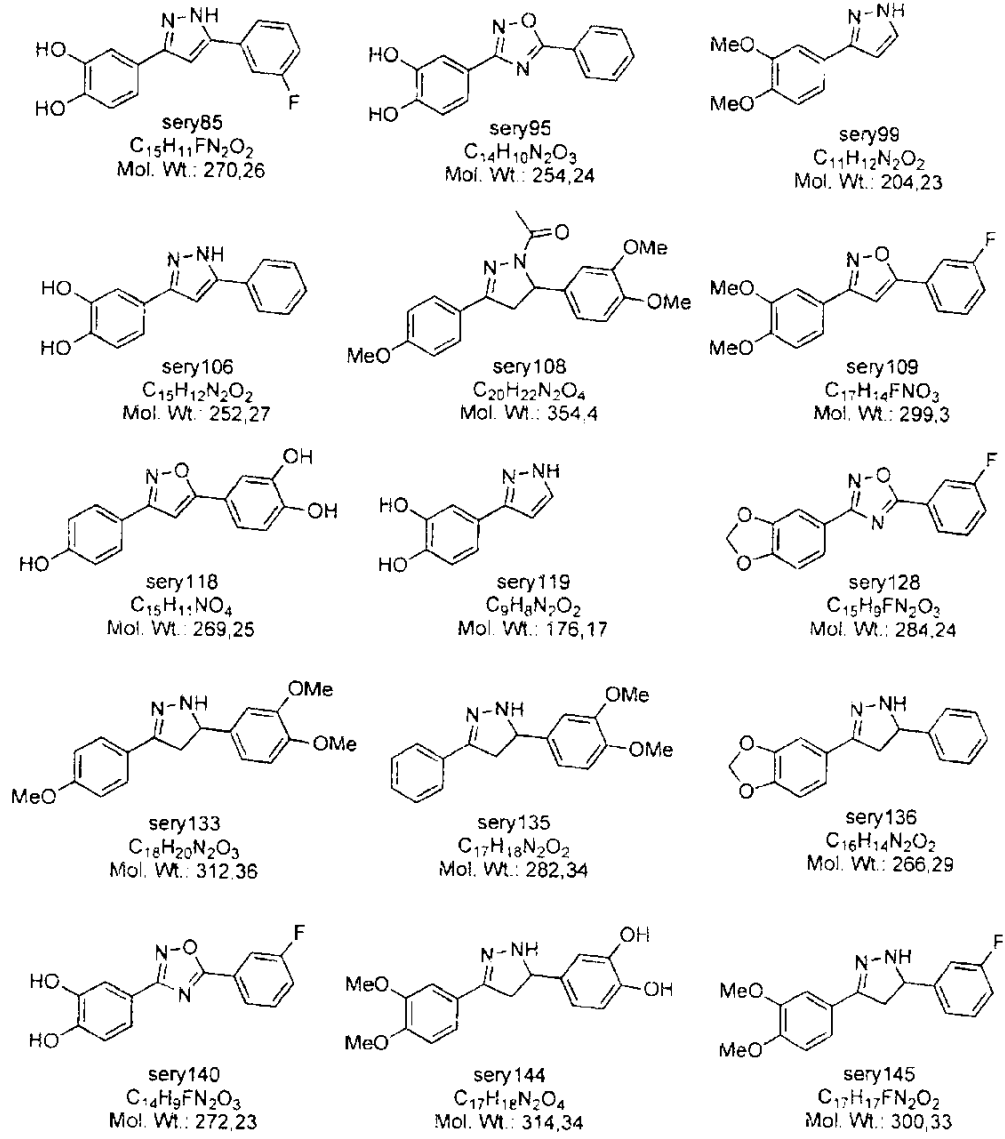


substance_id: 20132_G10
 tp1_sifr: 0.143
 tp3_reduction: 0.0
 tp3_sch2a: 0.0

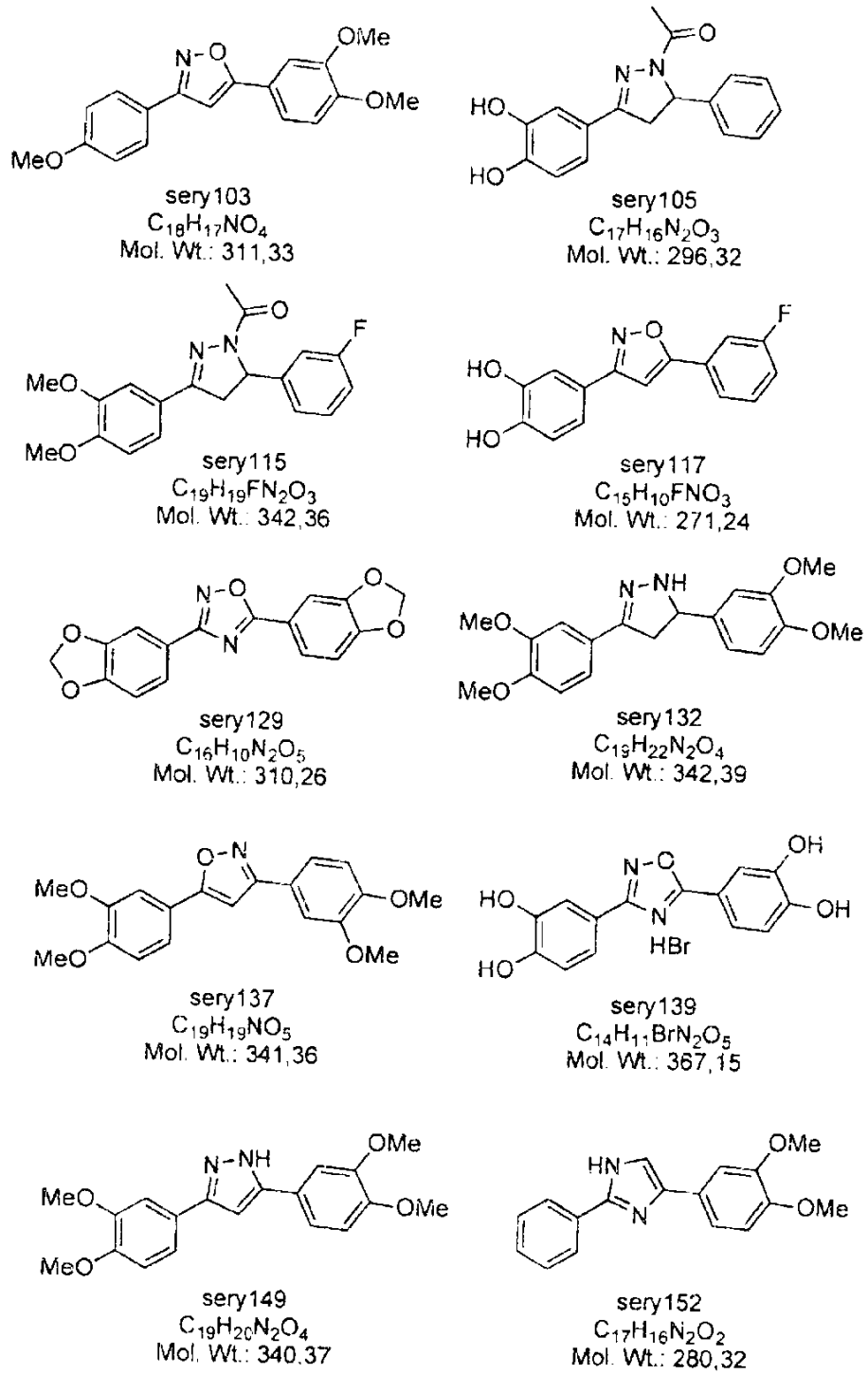


substance_id: 20203_E03
 tp1_sifr: 0.517

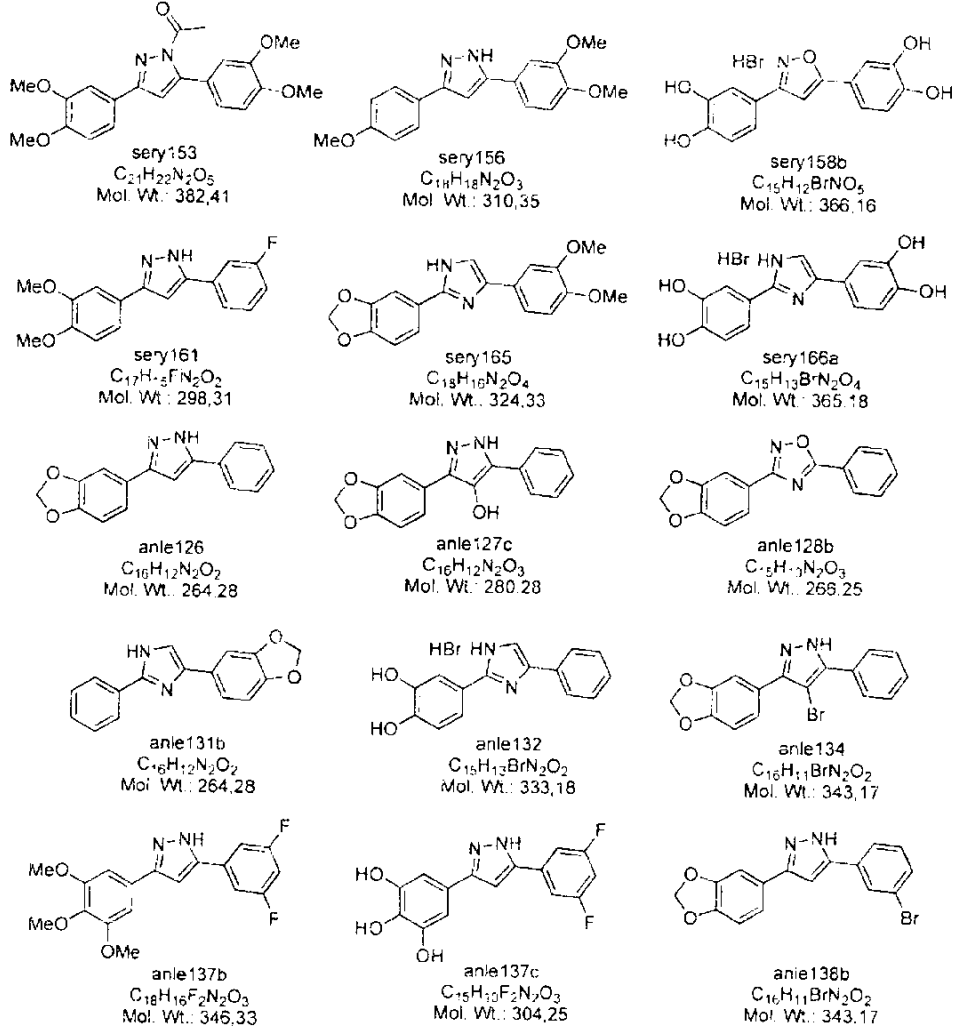
ŞEKİL 2 devamı



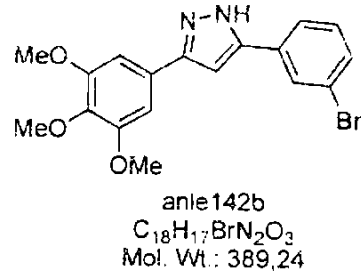
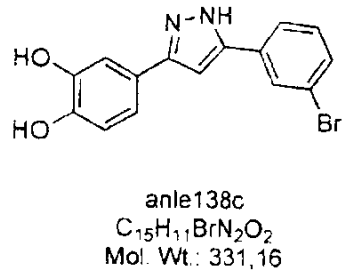
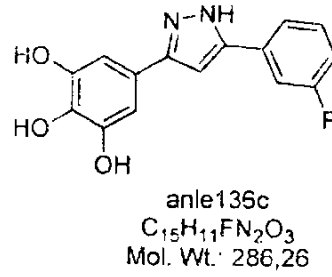
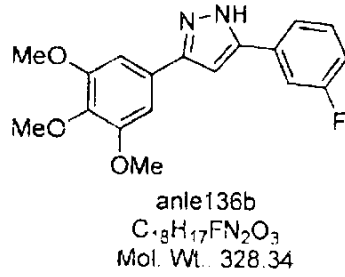
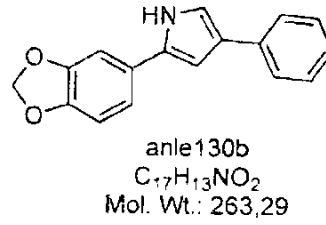
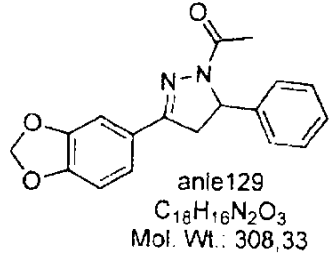
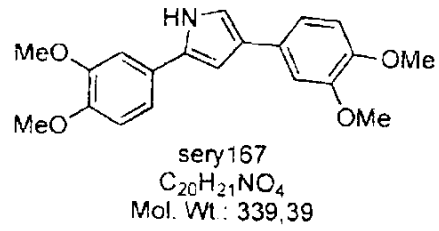
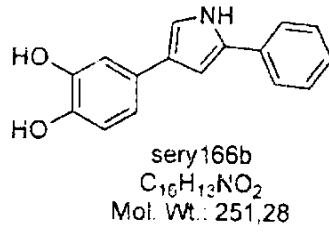
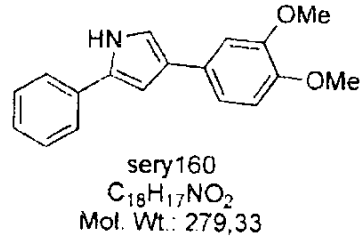
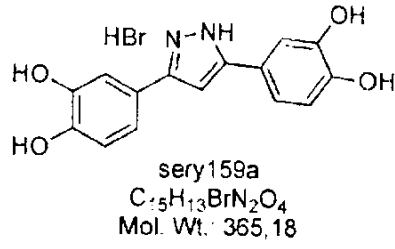
ŞEKİL 3

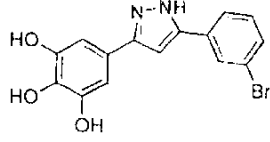


ŞEKİL 3 devamı

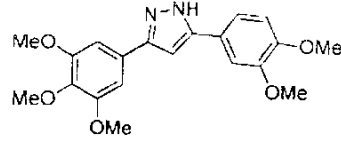


ŞEKİL 3 devamı

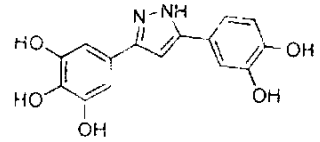




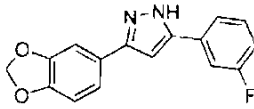
anie142c
C₁₅H₁₁BrN₂O₃
Mol. Wt.: 347,16



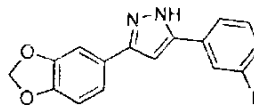
anie143b
C₁₉H₁₈BrN₂O₄
Mol. Wt.: 419,27



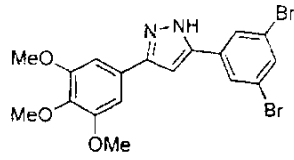
anie143c
C₁₅H₁₂N₂O₅
Mol. Wt.: 300,27



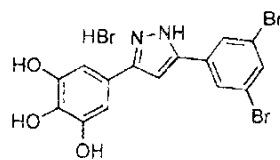
anie186b
C₁₆H₁₁FN₂O₂
Mol. Wt.: 282,27



anie197b
C₁₆H₁₁IN₂O₂
Mol. Wt.: 390,18

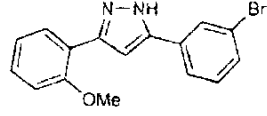


anie145b
C₁₈H₁₆Br₂N₂O₃
Mol. Wt.: 468,14

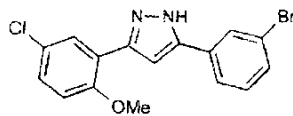


anie145c
C₁₅H₁₁Br₂N₂O₃
Mol. Wt.: 506,97

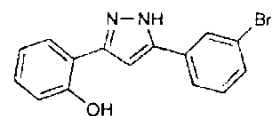
ŞEKİL 3 devamı



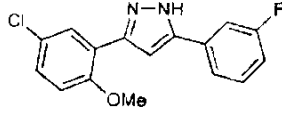
sery256b
C₁₆H₁₃BrN₂O
Mol. Wt.: 329,19



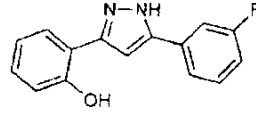
sery257b
C₁₆H₁₂BrClN₂O
Mol. Wt.: 363,64



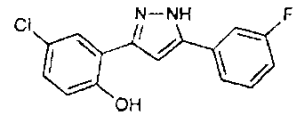
sery260a
C₁₅H₁₁BrN₂O
Mol. Wt.: 315,16



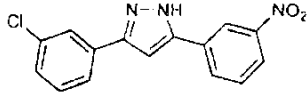
sery261b
C₁₆H₁₂ClFN₂O
Mol. Wt.: 302,73



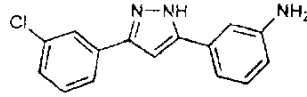
sery263a
C₁₅H₁₁FN₂O
Mol. Wt.: 254,26



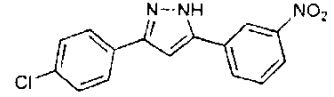
sery263b
C₁₅H₁₀ClFN₂O
Mol. Wt.: 288,7



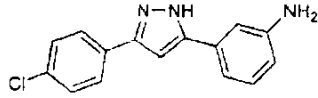
sery275a
C₁₅H₁₀ClN₃O₂
Mol. Wt.: 299,71



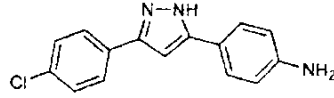
sery275b
C₁₅H₁₂ClN₃
Mol. Wt.: 269,73



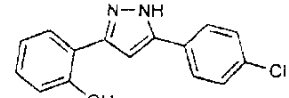
sery278a
C₁₅H₁₀ClN₃O₂
Mol. Wt.: 299,71



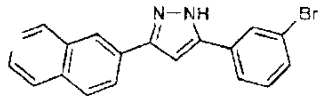
sery280a
C₁₅H₁₂ClN₃
Mol. Wt.: 269,73



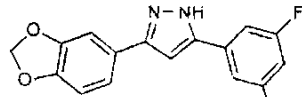
sery280b
C₁₅H₁₂ClN₃
Mol. Wt.: 269,73



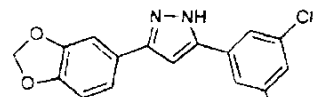
sery283
C₁₅H₁₁ClN₂O
Mol. Wt.: 270,71



sery292b
C₁₉H₁₃BrN₂
Mol. Wt.: 349,22

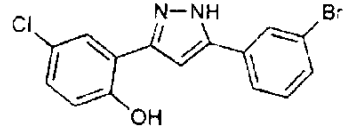


sery294b
C₁₆H₁₀F₂N₂O₂
Mol. Wt.: 300,26

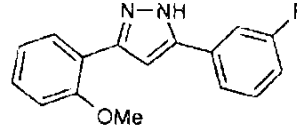


sery297b
C₁₆H₁₀Cl₂N₂O₂
Mol. Wt.: 333,17

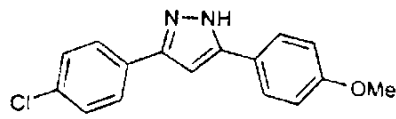
ŞEKİL 3 devamı



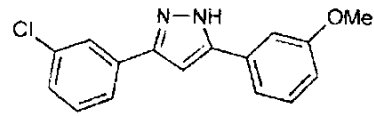
sery260b
 $C_{15}H_{10}BrClN_2O$
 Mol. Wt.: 349,61



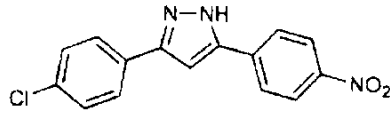
sery261a
 $C_{78}H_{59}Br_4Cl_2FN_{10}O_5$
 Mol. Wt.: 1625,89



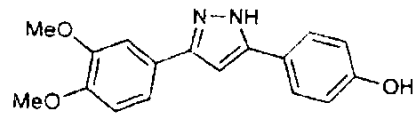
sery269b
 $C_{16}H_{13}ClN_2O$
 Mol. Wt.: 284,74



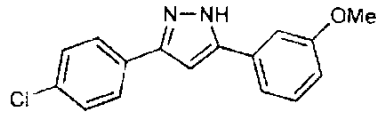
sery301
 $C_{16}H_{13}ClN_2O$
 Mol. Wt.: 284,74



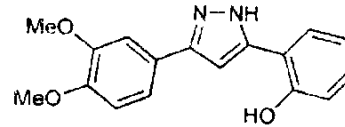
sery278b
 $C_{15}H_{10}ClN_3O_2$
 Mol. Wt.: 299,71



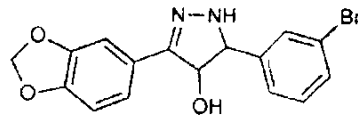
sery279b
 $C_{17}H_{16}N_2O_3$
 Mol. Wt.: 296,32



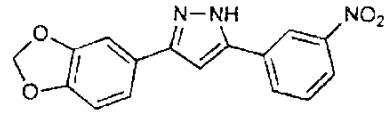
sery289
 $C_{16}H_{13}ClN_2O$
 Mol. Wt.: 284,74



sery290b
 $C_{17}H_{16}N_2O_3$
 Mol. Wt.: 296,32

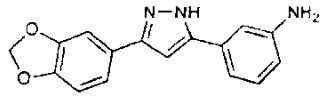


sery300a
 $C_{15}H_{13}BrN_2O_3$
 Mol. Wt.: 361,19

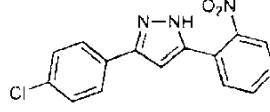


sery302c
 $C_{16}H_{11}N_3O_4$
 Mol. Wt.: 309,28

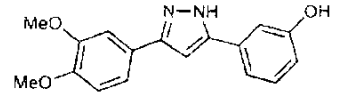
ŞEKİL 3 devamı



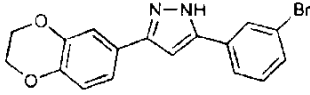
sery308
C₁₆H₁₃N₃O₂
Mol. Wt.: 279,29



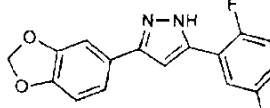
sery309
C₁₅H₁₀ClN₃O₂
Mol. Wt.: 299,71



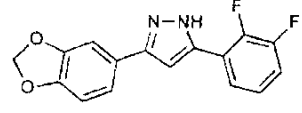
sery310b
C₁₇H₁₆N₂O₃
Mol. Wt.: 296,32



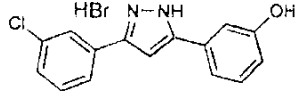
sery315b
C₁₇H₁₃BrN₂O₂
Mol. Wt.: 357,2



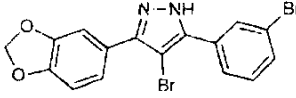
sery316b
C₁₆H₁₀F₂N₂O₂
Mol. Wt.: 300,26



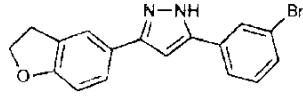
sery319
C₁₆H₁₀F₂N₂O₂
Mol. Wt.: 300,26



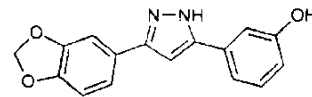
sery320c
C₁₅H₁₂BrClN₂O
Mol. Wt.: 351,63



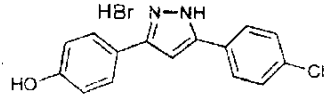
sery330
C₁₅H₁₀Br₂N₂O₂
Mol. Wt.: 422,07



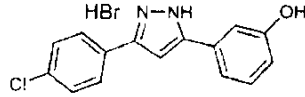
sery312b
C₁₇H₁₃BrN₂O
Mol. Wt.: 341,2



sery313b
C₁₆H₁₂N₂O₃
Mol. Wt.: 280,28

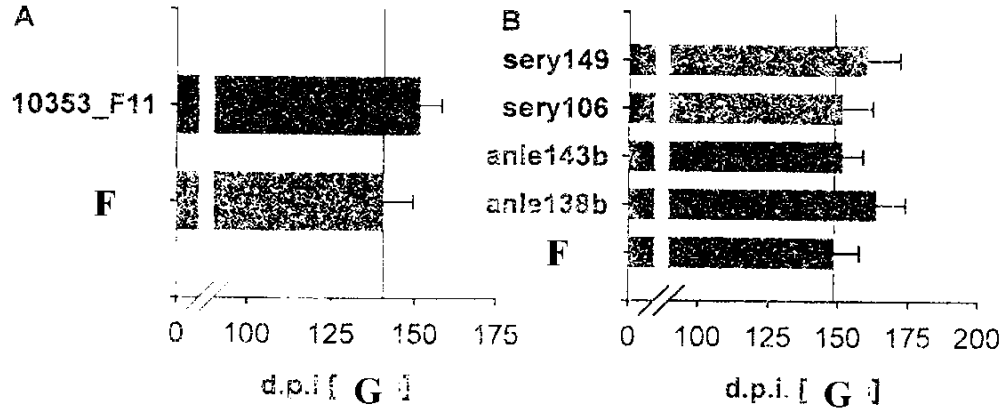


sery320a
C₁₅H₁₂BrClN₂O
Mol. Wt.: 351,63

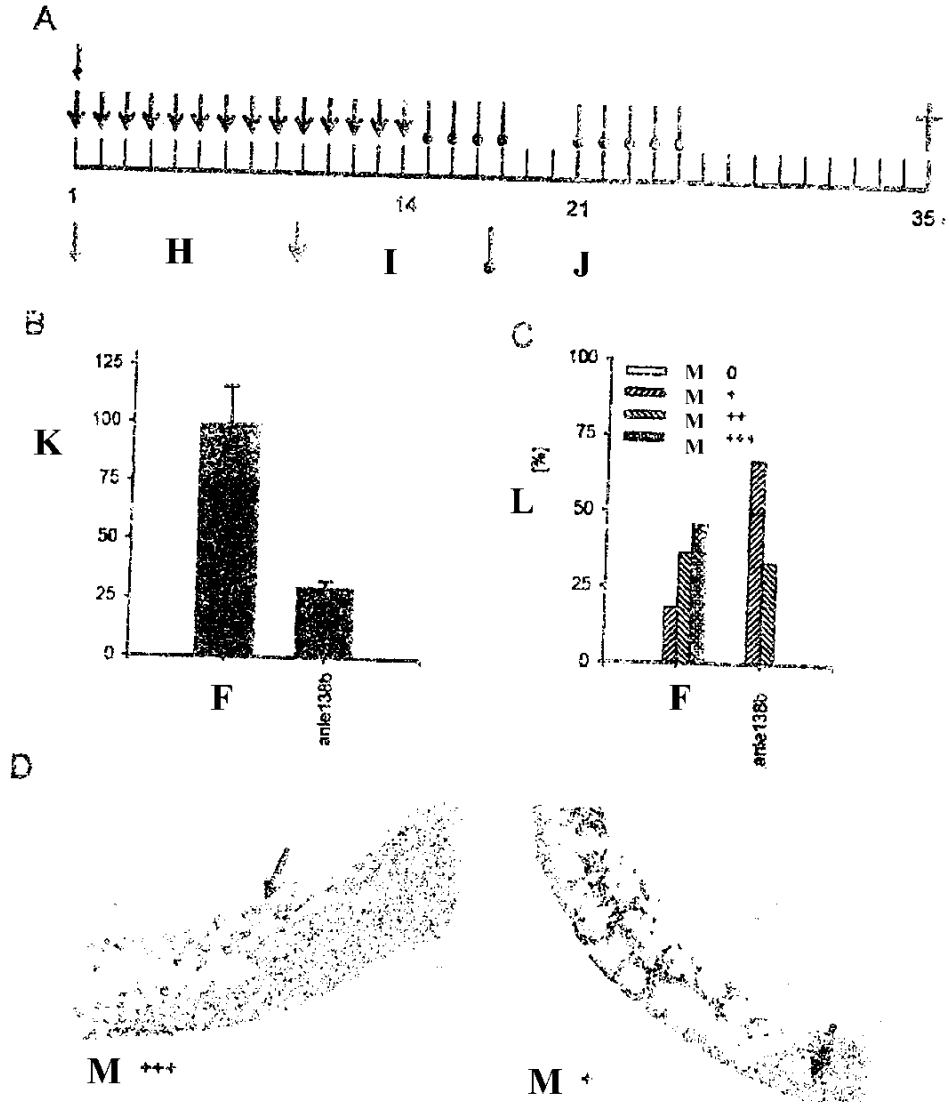


sery320b
C₁₅H₁₂BrClN₂O
Mol. Wt.: 351,63

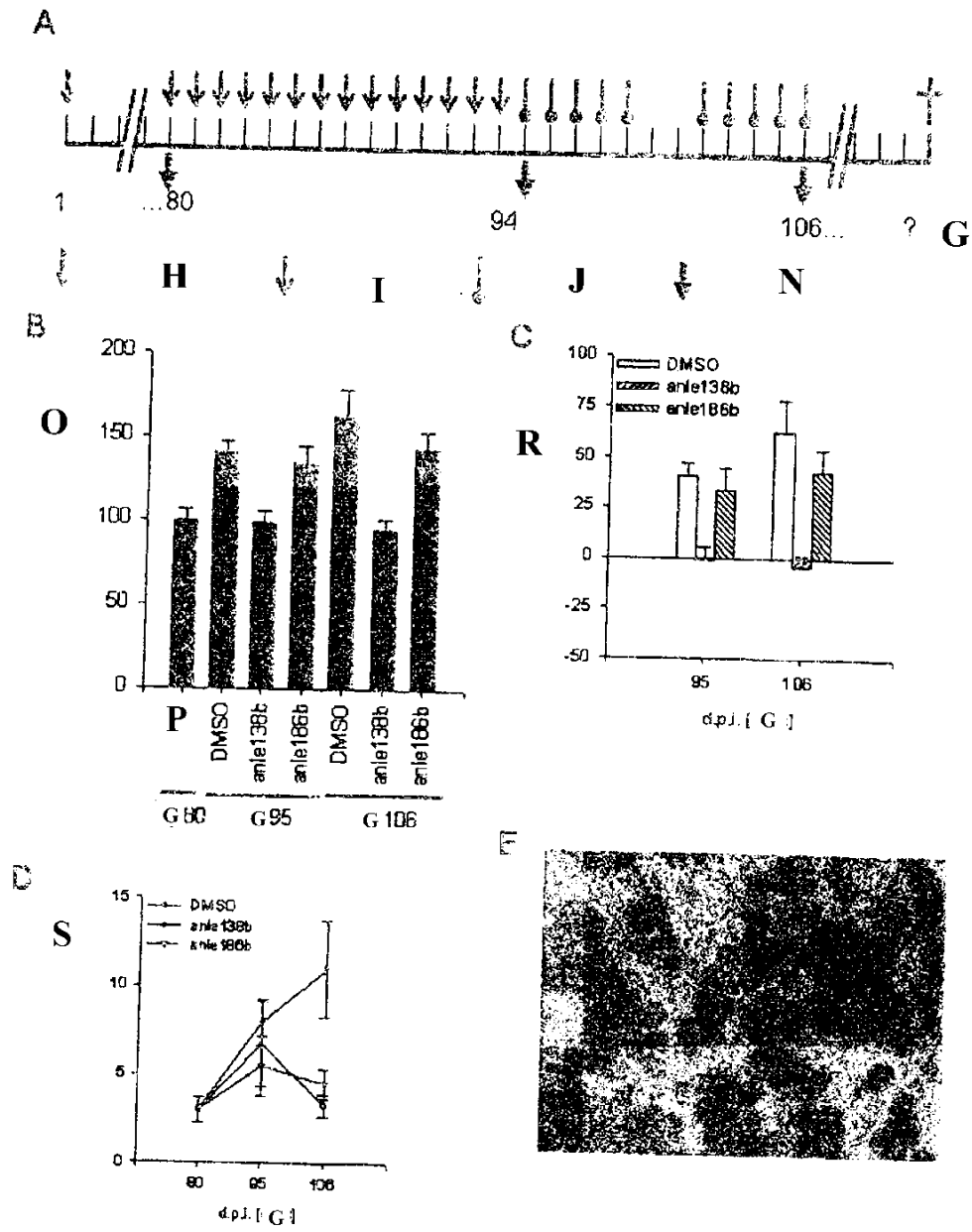
ŞEKİL 3 devamı



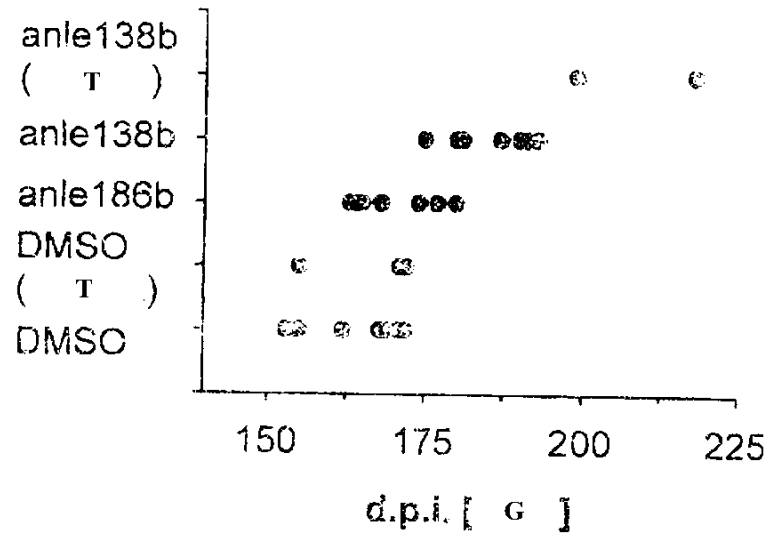
ŞEKİL 4



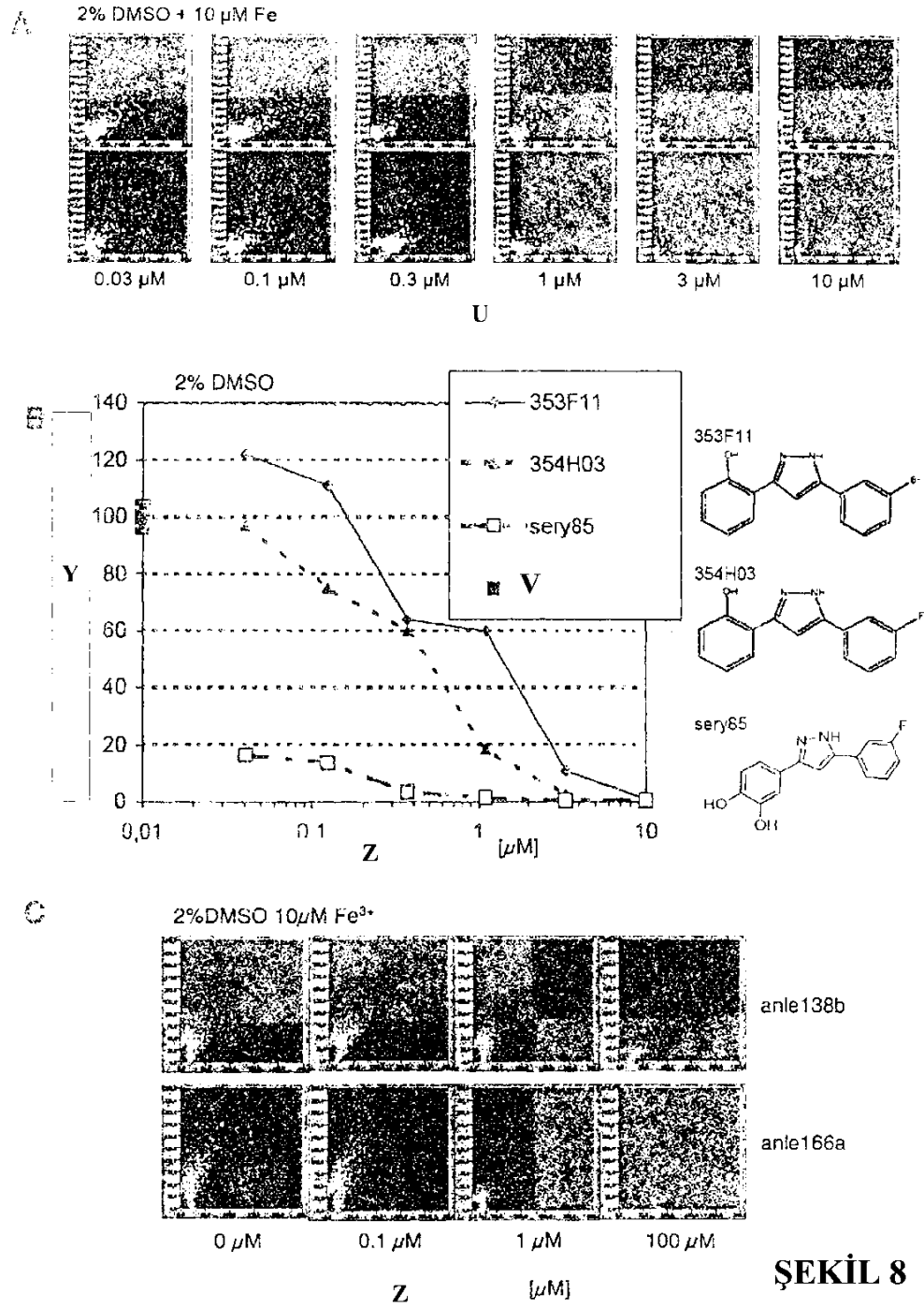
ŞEKİL 5



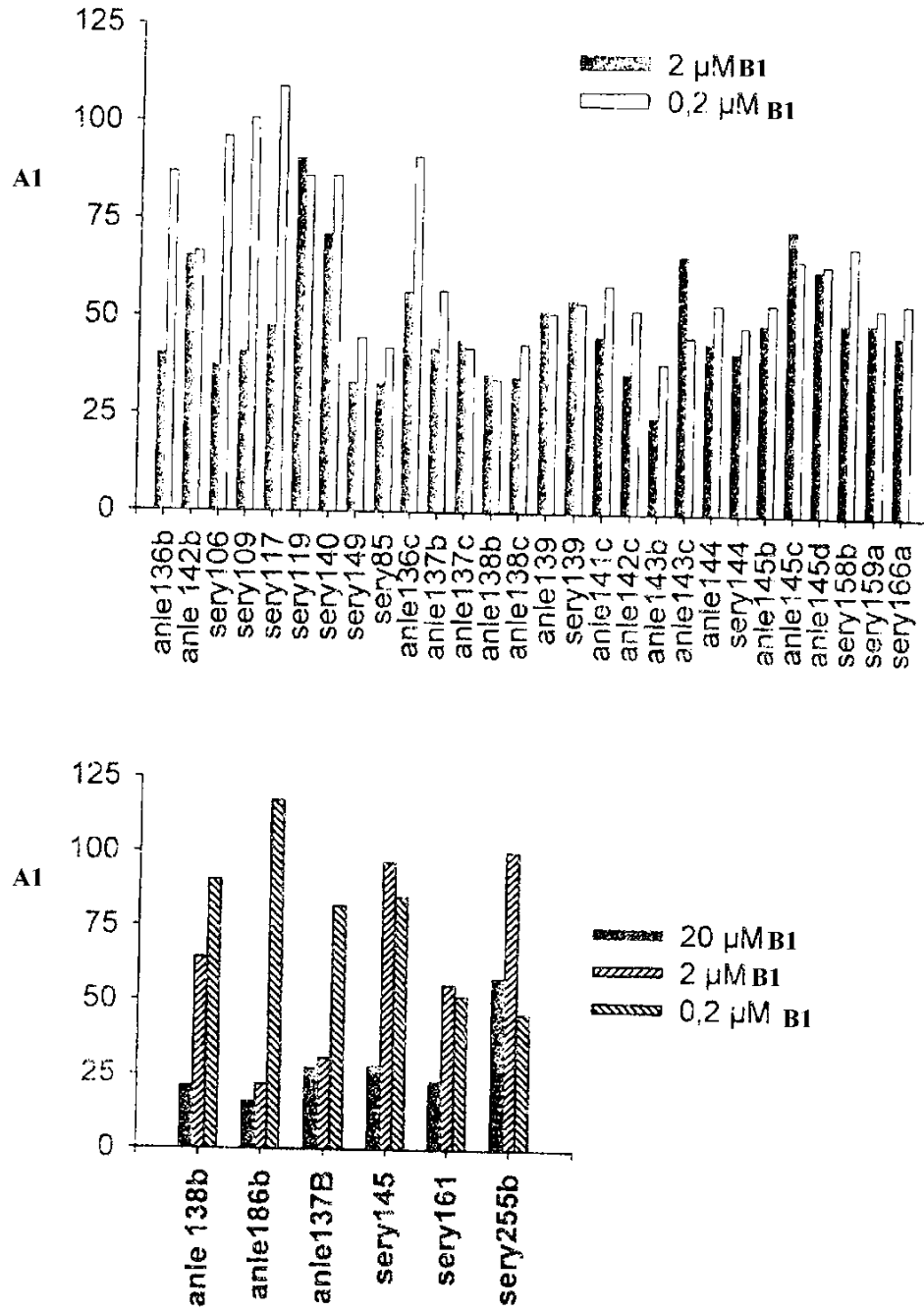
ŞEKİL 6



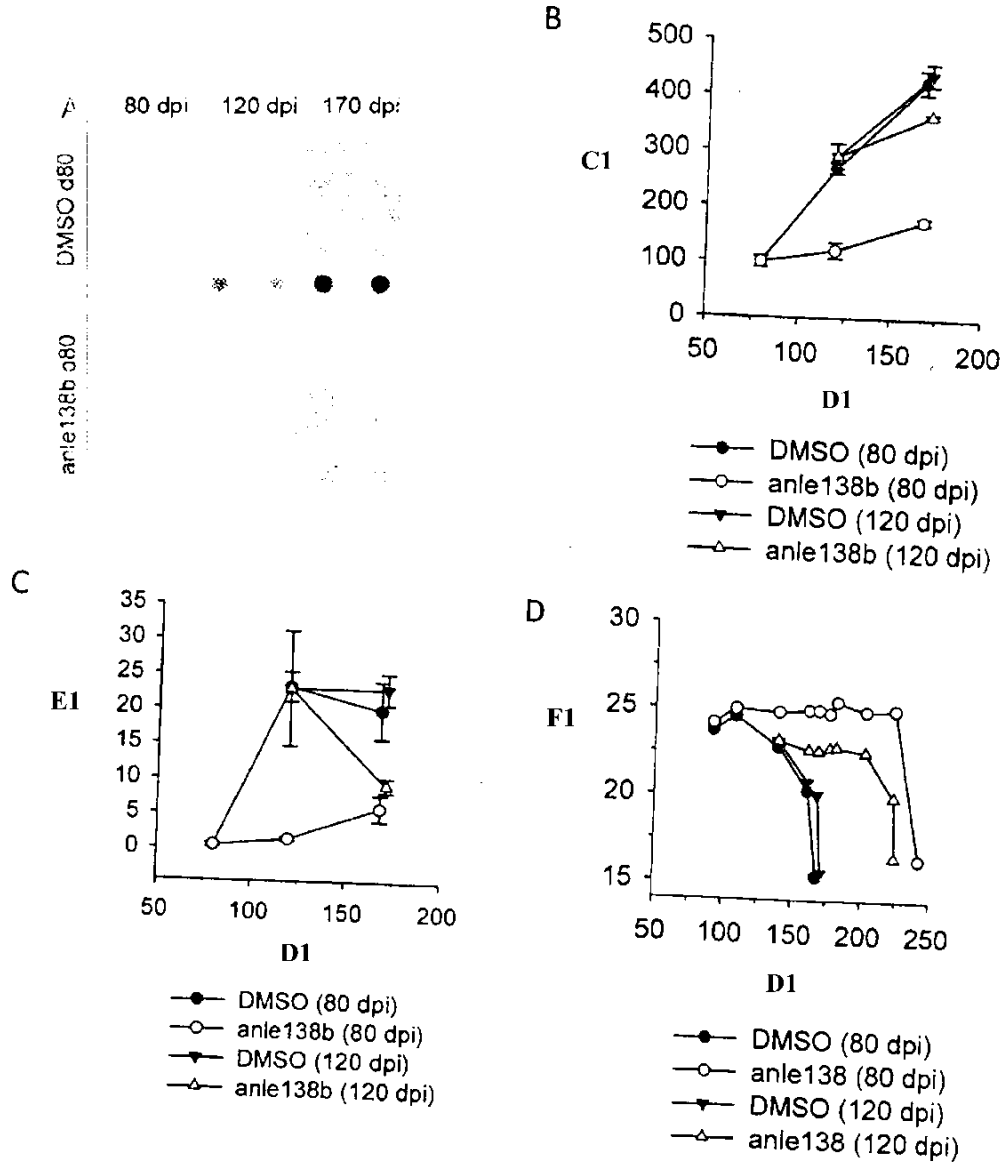
ŞEKİL 7



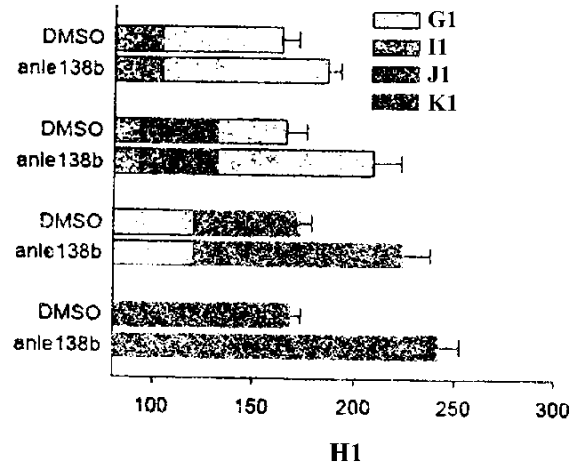
ŞEKİL 8



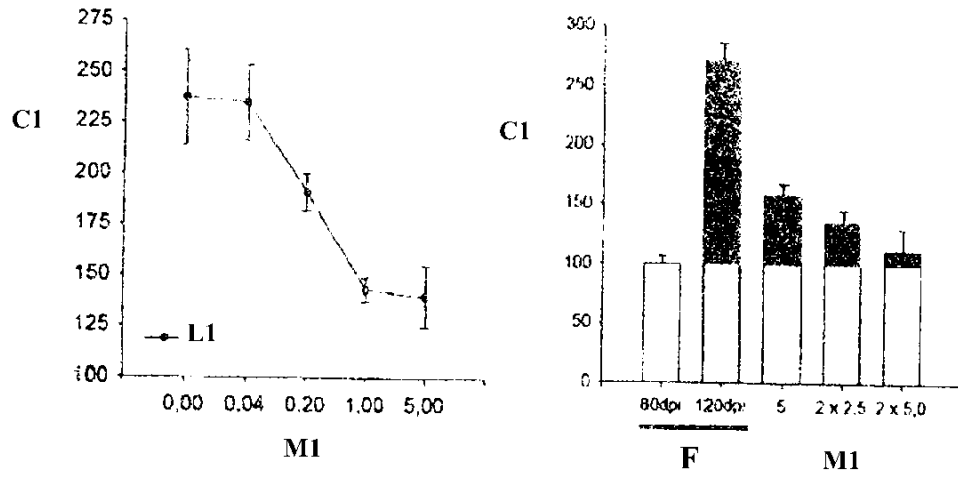
ŞEKİL 9



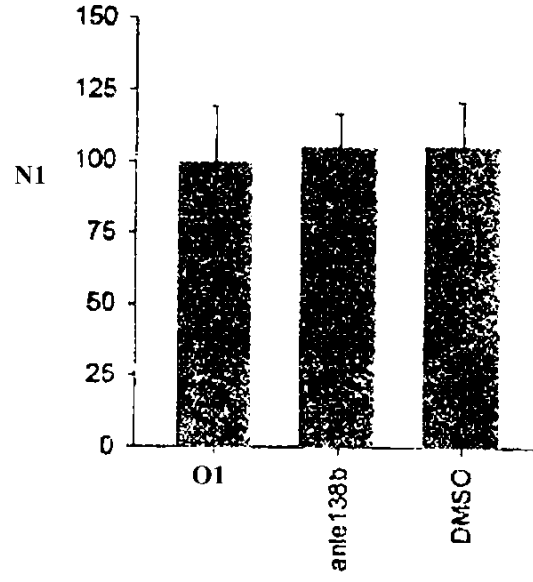
ŞEKİL 10



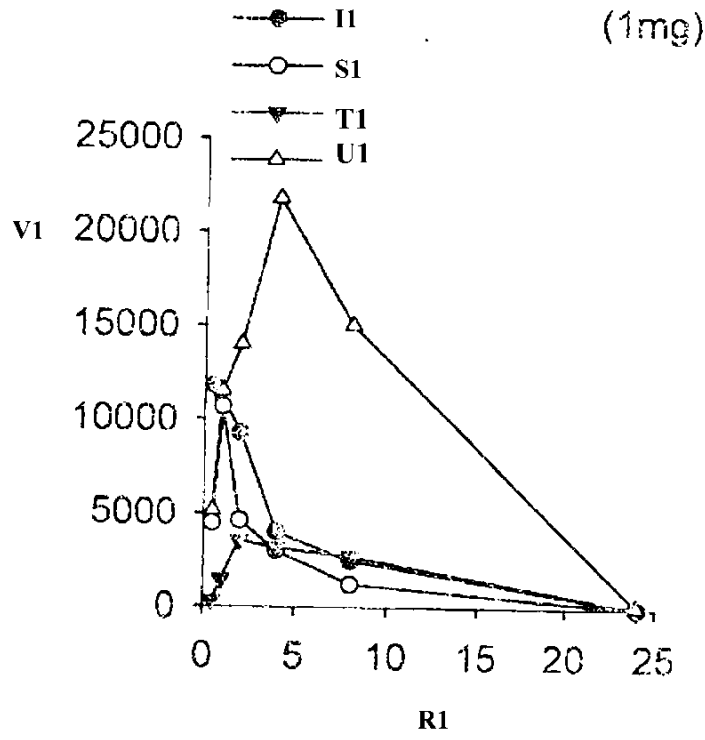
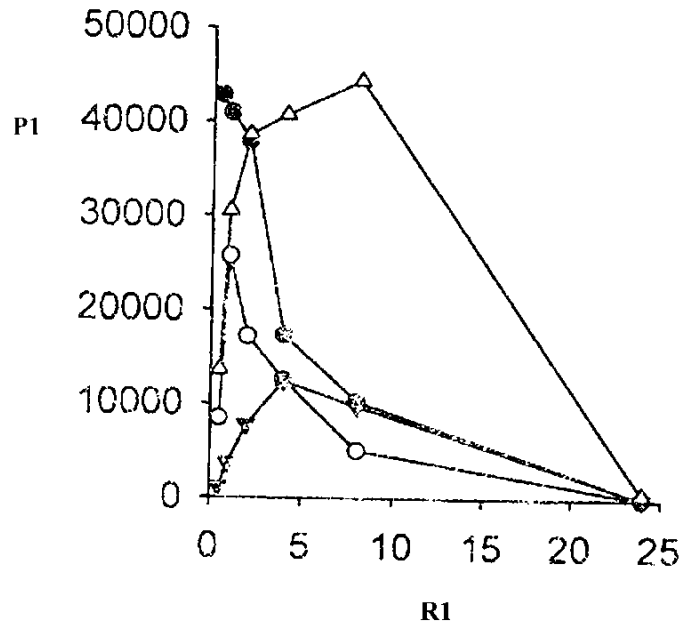
ŞEKİL 11



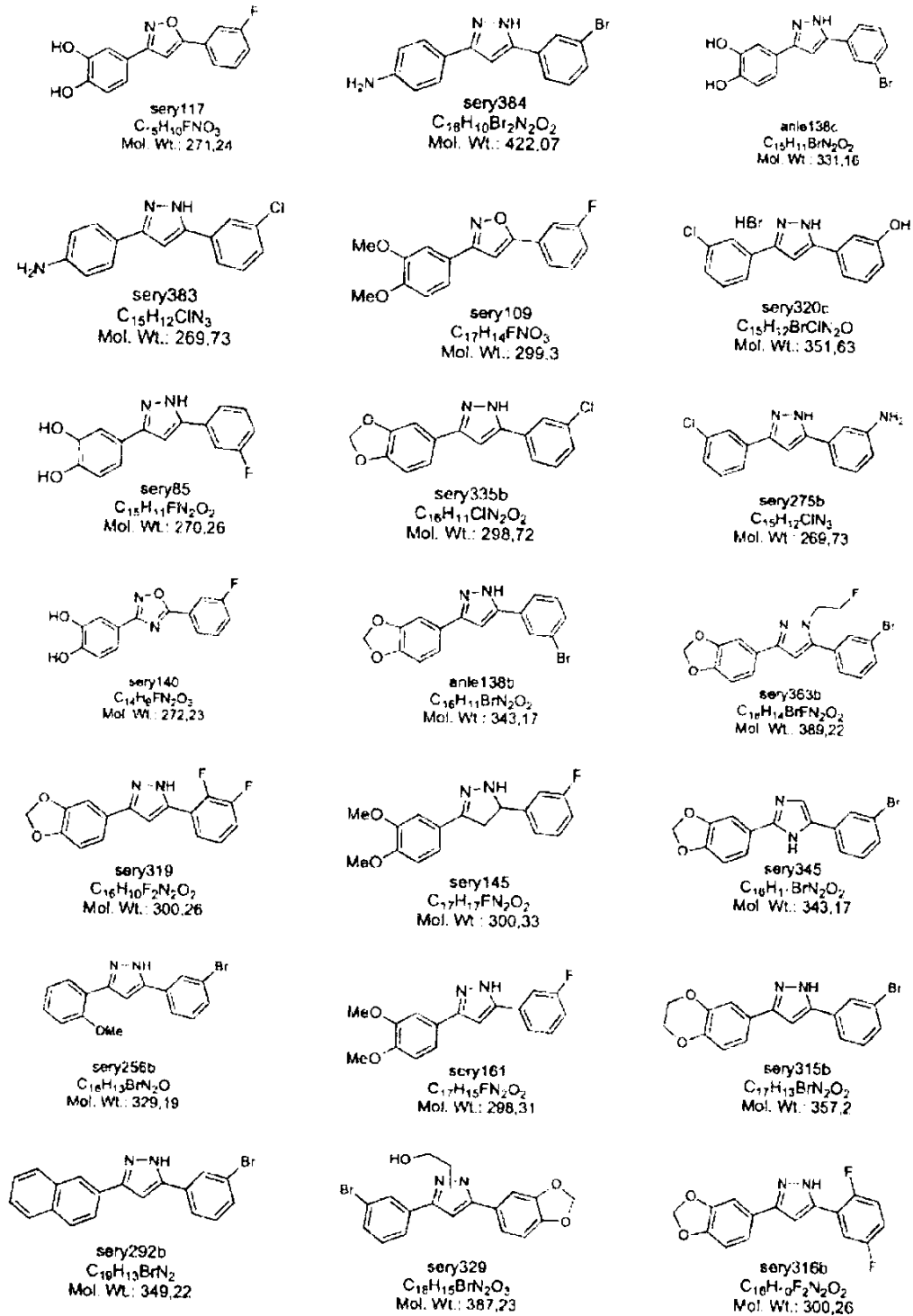
ŞEKİL 12



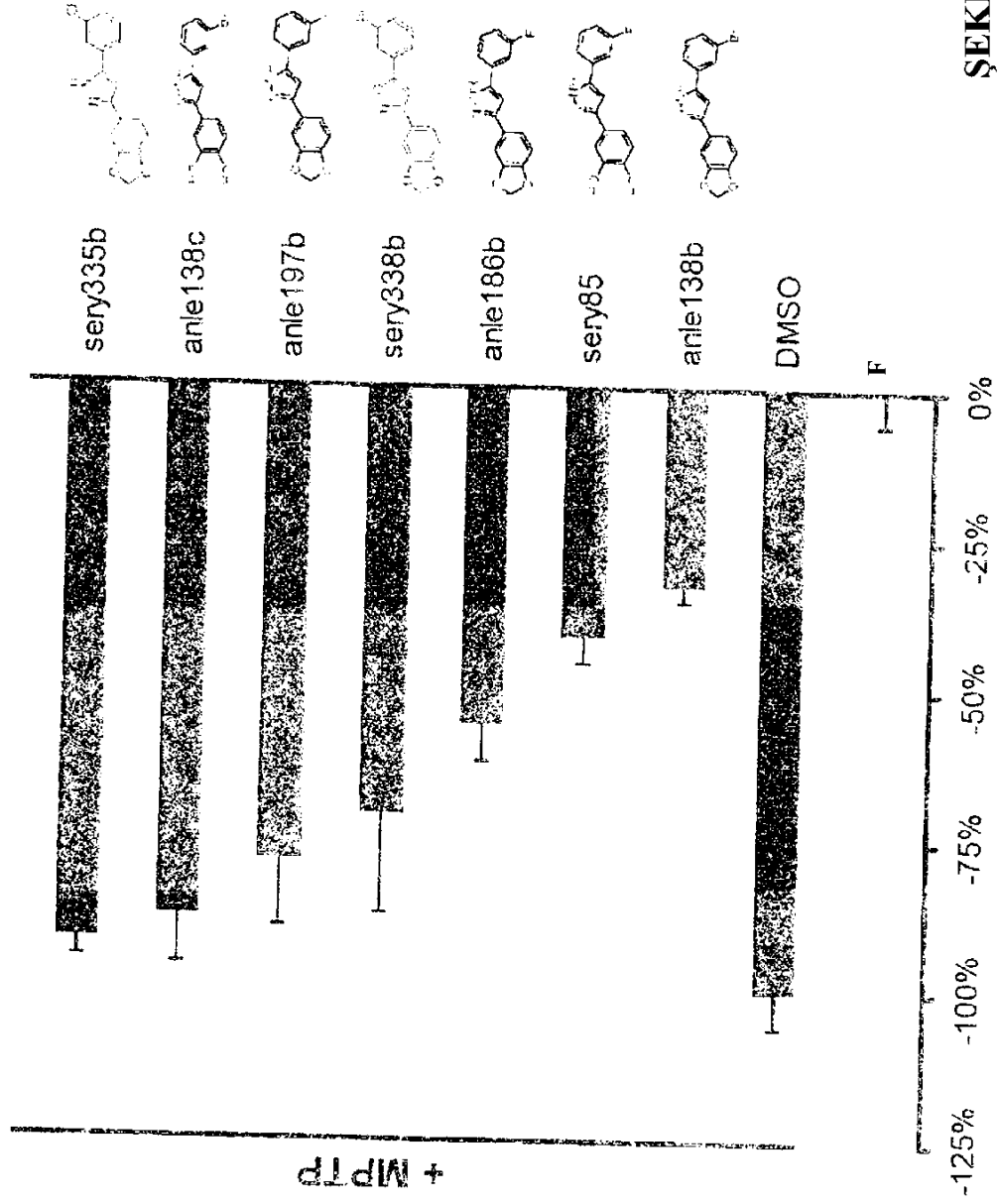
ŞEKİL 13

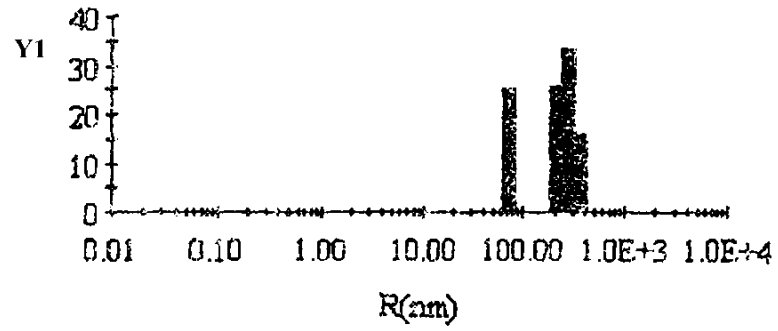
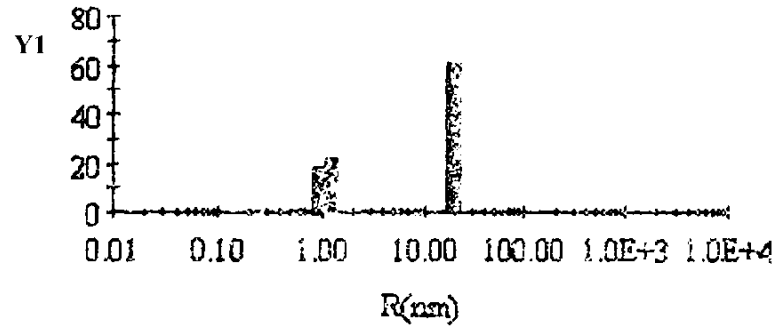
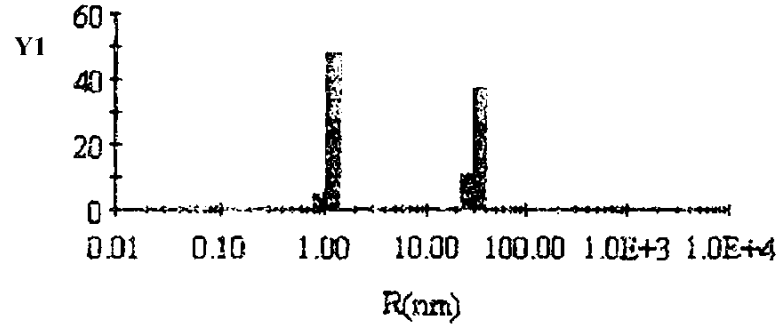


ŞEKİL 14



ŞEKİL 15





ŞEKİL 17