

PC1 3473

2023

72.066/SZE

A2

KIVONAT

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

FOSZFOGLIKOLIPID VALAMINT ALKALMAZÁSAI

A találmány egy új foszfoglikolipid vegyületre, és a vegyületet ^{tartalmazó gyógyszerkészítményre} vonatkozik,

amely alkalmas az ischemia/reperfúzió által kiváltott sérülés javítására. Specifikusan az igényelt foszfoglikolipid az (1) képletű 2-dezoxi-6O-[2-dezoxi-4-O-foszfono-3-O-[(R)-3-tetradekanoiloxi-tetradekanoil]-2-[(R)-3-oktadekanoiloxi-tetradekanoil-amino]- β -D-glükopiranozil]-2-[(R)-3-hexadekanoiloxi-tetradekanoil-amino]- β -D-glükopiranóz.

A találmány tárgyát képező foszfoglikolipidet kémiai szintézissel állíthatjuk elő a leírásban bemutatott ~~1. és 2. reakcióvezérlat~~ ^{eljárás} alkalmazásával.

PK

PO1 3473

S.B.G. & K.
Nemzetközi
Szabadalmi Iroda
H-1062 Budapest, Andrásy út 113.
Telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-523



A2

72.066/SZE

FOSZFOGLIKOLIPID VALAMINT ALKALMAZÁSAI

A találmány háttere

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

Az ischemia/reperfúzió által a szöveteknél fellépő károsodás nagymértékű lehet. Az oxigénhiányos szövetek szenvedhetnek mind reverzibilis, mind irreverzibilis károsodást. Sérült szövetek rendellenességet mutathatnak az automatizmusban is. Például az ischemia/reperfúzió során károsodó miokardiális szövetek irreverzibilis károsodást vagy miokardiális infarktust mutathatnak. Reverzibilis károsodás vagy bénulás jelensége nyilvánvalóan az optimum alatti szervi perfúzió csökkent szívizom hatékonyságához és kórtünettanához vezet. Az ischemiás miokardiális szövet reperfúziója elektrofiziológiai változásokat is okozhat, amelyek rendellenességeket okozhatnak az automatizmusban, beleértve a halálhoz vezető arritmiát.

Az ischemia/reperfúzió során beálló szövetkárosodás egzakt mechanizmusa nem ismert. Feltételezik azonban, hogy az események komplex sorozata következik be, ahol a szövetek károsodnak az ischemia és az azt követő reperfúzió során. Az ischemia alatt a szövetek nem rendelkeznek oxigént szolgáltató vérrel, amely anaerob metabolizmushoz és következésképpen intracelluláris acidózishoz vezet. A keringés hiánya in-farktuszokat okoz, vagy üszkös, elhalt szövetek területeit hozza létre. Az ischemiás szövetek kevesebb szabad gyököket befogó enzimeket termelnek. A

reperfúzió, és az oxigénellátás újraindulása során a szövetek károsodnak, amikor szabad gyökök termelődnek, beleértve a hidroxilgyököket is. Az oxidatív károsodás felborítja a kalcium egyensúlyt is a környező szövetekben bénulást okozva. Az oxidatív robbanás okozta károsodások tovább fokozódnak, amikor a sérült sejtek olyan faktorokat bocsátanak ki, amelyek gyulladást okozó neutrofileket visznek az ischemiás részekhez. A gyulladásszerű sejtek enzimeket termelnek, amelyek további toxikus szabadgyököket produkálnak és behatolnak a szövetközi területekre, ahol elpusztítják a myocitákat.

Az alkalmazott módszerek, amelyek védelmet nyújtanak az ischemia/reperfúzió okozta károsodás ellen, azon alapulnak, hogy csökkentik a kezdeti oxidatív robbanást és az azt követő kalcium túlterhelést, megelőzve az ezzel járó gyulladásszerű károsodást. Például azok az anyagok, amelyek egyrészt csökkentik az oxigénhiányos szabad gyökök termelését (beleértve az allopurinolt és a deferoxamint), vagy növelik az ilyen anyagok katabolizmusát, mint a szuperoxid dizmutáz, a kataláz, a glutation, és a réz-komplexek, amelyek valószínűleg csökkentik az infarktus területét és növelhetik a szívbénulásból adódó balkamrai funkció stabilizálódását is. Az olyan anyagok, amelyek blokkolják az izom nátrium-hidrogén kicserélődést, mint az amilorid, megelőzik a kalcium sejtbe történő kötelező belépését, amely együtt jár a nátrium kizárással és következésképpen csökkenti a kalcium túlterhelést.

A szöveteket védhetjük az ischemia/reperfúzió okozta sérülésektől az ischemiás előkezelésekkel. Ischemiás előkezelés előidézhető egy rövid előzetes ischemiával és az azt követő reperfúzióval, amely az ischemiás tolerancia gyors javulását eredményezi. Az ischemiás tolerancia ezen akut



prekondicionált állapota 30 perctől 2 óráig terjed, és a miokar-diális szövetben ez csökkent infarktusos területtel és a szívkamrai aritmia ritkább előfordulásával jár, nem csökken azonban a szívbénulások száma (Elliot, 1998).

Az akut előkezelt állapotot követő szakaszban, különösen az előkezelt ischemia további periódusainak hiányában az ischemiás tolerancia késleltetett állapota 12-24 órával később hat és 72 óráig fejt ki hatását. Az előkezelés késleltetett fázisában miokardiális infarktus, bénulás és aritmia ellen közöltek védőhatást különböző fajok esetében.

Az ischemia/reperfúzió jelenséggel szemben az előkezelt miocardium jellemzői közül megemlítjük az adenozin trifoszfát (ATP) védelmét néhány modellen, az intracelluláris acidózis gyengítését, és a myocitán belüli kalcium adagolás csökkenését. Az ismert módon a miocardium által az ischemia alatt kibocsátott bizonyos kémiai anyagokról kimutatták, hogy indukálják az akut és tartós ischemiás toleranciát és kardiális védelmet nyújtanak. Például az adenozin, a bradikinin, és opiát receptor antagonisták, amelyek indukálják az akut előkezelést, védelmet nyújtanak az ischemiás sérülés ellen az ATP függő káliumcsatorna (K_{ATP}) útján keresztül. A bimakalintról, amely ismert módon kinyitja a K_{ATP} csatornát, kimutatták, hogy korlátozza az infarktus méretét (Mizimura és mt.-i, 1955). A monofoszforil lipid A (MLA) kivédi az ischemiás szövetek mind irreverzibilis, mind reverzibilis károsodását (Elliot, 5,286,718 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalom).

A monofoszforil lipid A a lipid A egy detoxifikált származéka, egy aktív szerkezeti eleme a liposzacharidnak (LPS). A liposzacharid vagy endotoxin egy potens immunmodulátor, amelyet a legtöbb Gram negatív baktérium törzs termel. Leírták, hogy a liposzacharid ischemia előtt történő alkalmazása növeli a miokardiális kataláz aktivitást, ezáltal

növelve a miokardiális funkciót (Brown és mt.-i, Bensard és mt.-i). Az endotoxin védelmet nyújt a tüdőszérülések ellen a hypoxia alatt. (Berg és mt.-i). Úgy tűnik, hogy az endotoxin magas dózisának kardioprotektív hatása összefügg a „toxin” képességével, hogy előkezelés alatt miokardiális oxidatív stresszt indukál, ezáltal megvédi az egyedet az ischemiával társuló második oxidatív stressztől (Maulik és mt.-i). Azonban a liposzacharid meglehetősen toxikus. A monofoszforil lipid A-t szerkezetileg módosították, hogy kiküszöböljék a liposzacharid toxicitását. Az a feltevés, hogy monofoszforil lipid A védő hatása az ischemia/reperfúzió okozta sérülés ellen a nitrogén-oxid szintetáz termelésének indukálásán alapul, amely növeli a kardioprotektív ATP-függő kálium csatorna (K_{ATP}) „open-state” valószínűségét. A monofoszforil lipid A által okozott nitrogén-oxid átalakulás vezethet a gyulladáskeltő neutrofilek számának csökkenéséhez, amelyek belépnek az ischemiás területekre védve az egyedet további sérülésektől. Úgy tűnik, hogy az endotoxinnal ellentétben a monofoszforil lipid A nem indukálja a miokardiális oxidatív stresszt kardioprotektív dózis esetén. Azonban valamennyi jelenleg alkalmazott kezelésnek az ischemia/reperfúzió által okozott sérülés ellen hátránya van. Az e területen ismert hatékony anyagok nem rendelkeznek széles klinikai alkalmazási lehetőséggel, limitált hatékonyságuk és/vagy dóziszfüggő toxicitásuk van, és következésképpen alkalmazásuk limitált a szívben történő ischemia/reperfúzió sérülés javítására. Az endotoxin nagy mértékben toxikus kardioprotektív dózis esetén. A nem toxikus monofoszforil lipid A anyagot az *S. minnesota* törzs termeli fermentációban, amely hasonlóan a többi biológiai termékhez több hasonló típusú anyag keveréke, amelyek a zsírsavak helyettesítési módjában és lánchosszúságukban különböznek.

Bár összehasonlítva az endotoxinnal a monofoszforil lipid A nem toxikus, kardioprotektív dózisban okozhat enyhe, átmeneti, de nem dóziszfüggő hőemelkedést a hatékony dózistartományban. A fentiekből nyilvánvaló, hogy szükség van új készítményekre, amelyek biztonságosak, hatékonyak és amelyek széles klinikai alkalmazhatósággal rendelkeznek az ischemia/reperfúzió káros hatásainak megelőzésére vagy javítására. Olyan készítmények lennének alkalmasak, amelyek nem toxikusak, nem pirogének, kémiai szintézissel állíthatók elő és egy meghatározott kémiai szerkezettel rendelkeznek.

A találmány összefoglalása

A találmány egy új foszfoglikolipid vegyületre vonatkozik, amely alkalmas az ischemia/reperfúzió által kiváltott sérülés javítására. Specifikusan az igényelt foszfoglikolipid az (1) képletű 2-dezoxi-6O-[2-dezoxi-4-O-foszfono-3-O-[(R)-3-tetradekanoiloxi-tetradekanoil]-2-[(R)-3-oktadekanoiloxi-tetradekanoil-amino]- β -D-glükopiranozil]-2-[(R)-3-hexadekanoiloxi-tetra-dekanoil-amino]- β -D-glükopiranóz.

A találmány tárgyát képező foszfoglikolipidet kémiai szintézissel állíthatjuk elő a leírásban bemutatott 1. és 2. reakcióvázlat alkalmazásával.

A leírásban megtaláljuk az új foszfoglikolipid ischemia/reperfúzió által kiváltott sérülés javítására vonatkozó eljárást is. A találmány tárgyát képező vegyület különösen előnyös ezen alkalmazásra, mivel nem indukál

hőemelkedést vagy gyulladáskeltő citokineket a hatékony kardioprotektív dózishoz közeli dózisszinteken, a maximálisan tolerálható dózis lényegesen növelhető, ezáltal valószínűleg elérhető a terápiás dózisszint embereken, különösen akkor, ha közvetlenül az operációk előtt alkalmazzuk.

Az ábrák rövid leírása

Az **1. Ábra** a találmány tárgyát képező vegyület kardioprotektív hatását mutatja a területi miokardiális ischemia nyúl modellen 35 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dózis alkalmazása esetén 24 órával az ischemia előtt. A ■ fekete téglalap a balkamra veszélyeztetettségi %-át, az □ üres téglalap az infarktus veszélyeztetett terület %-át mutatja, * $p < 0,01$ placebo kontrollal szemben.

A **2. Ábra** a találmány tárgyát képező vegyület kardioprotektív hatásának dóziszfüggő válaszát mutatja nyúl modellen infarktussal szemben ischemia előtt 24 órával adagolva. A ■ fekete téglalap a balkamra veszélyeztetettségi %-át, az □ üres téglalap az infarktus veszélyeztetett terület %-át mutatja, # $p < 0,01$ placebo kontrollal szemben, * $p < 0,01$ placebo kontrollal szemben.

A **3. Ábra** a találmány tárgyát képező vegyület kardioprotektív hatását mutatja kutya modellen egy korai fázisban infarktus ellen, amelyet a bolus beadása után folytattak egy 3 órán át tartó infúzióval. Az állatokat az infúzió során L34 jelű

vegyülettel kezeltek, 3 órával az elzárás előtt, 1 órán át az elzárás, és 1 órán át az 5 órás reperfúzió alatt.

Jelentések: ■ fekete téglalap: placebo; □ üres téglalap: L34 bolus egyedül, emelkedő csíkozású téglalap: L34 bolus (70 μ g/kg) + infúzió (40 μ g/kg); süllyedő csíkozású téglalap: L34 bolus (35 μ g/kg) + infúzió (4 μ g/kg).

A **4. Ábra** a találmány tárgyát képező vegyület kardioprotektív hatását mutatja 10 perccel az ischemia előtt adva infarktus ellen a regionális miokardiális ischemia/reperfúzió sertés modelljén. A ■ fekete téglalap a balkamra veszélyeztetettség %-át, az □ üres téglalap az infarktus által veszélyeztetett terület %-át mutatja.

Az **5. Ábra** a találmány tárgyát képező vegyület kardioprotektív hatását mutatja reverzibilis kontraktilis diszfunkció, vagy kábulás ellen 10 perccel az ischemia előtt adva kutya modellen ismétlődő átmeneti regionális ischemia esetén. A ■ fekete négyzet a placebo kontrollt, a ● fekete kör az L34 vegyületet jelenti.

A **6. Ábra** a találmány tárgyát képező vegyület kardioprotektív hatását mutatja reverzibilis kontraktilis diszfunkció vagy kábulás ellen 24 órával az ischemia előtt adva kutya modellen ismétlődő átmeneti regionális ischemia esetén. A ■ fekete négyzet a placebo kontrollt, a ● fekete kör az L34 vegyületet jelenti.

A találmány részletes leírása

A találmány egy új foszfoglikolipid, speciálisan a 2-dezoxi-6O-[2-dezoxi-4-O-foszfono-3-O-[(R)-3-tetradekanoiloxi-tetradekanoil]-2-[(R)-3-oktadekanoiloxi-tetradekanoil]-

ami-no]- β -D-glükopiranozil]-2-[(R)-3-hexadekanoiloxi-tetradeka-noil-amino]- β -D-glükopiranozra és gyógyszerészetileg elfogadható sóira vonatkozik. A találmány tárgya az (1) képletű vegyület.

A találmány foszfoglikolipid vegyülete alkalmas az ischemia/reperfúzió okozta sérülés javítására.

Az (1) képletű vegyületet az 1. és 2. Reakcióvázlat alapján állítjuk elő.

A találmány foszfoglikolipid vegyületét, a továbbiakban L34-el jelzett vegyületet, előállíthatjuk az N-aciloxi-csoporttal acilezett vagy a nitrogén atomon védett glikozil akceptor egység és a megfelelő védőcsoporttal ellátott és/vagy a 3-O-acil-oxi-csoporttal acilezett glikozil donor egység Koenigs-Knorr típusú kapcsolási reakciójával. E találmány egy előnyben részesített példáját az (1) képletű vegyületet az ismert szerkezetű kiindulási anyagokból, a (2) képletű benzil-2-amino-2-dezoxi-4,6-O-izopropilidén- β -D-glükopiranozid és az (5) képletű 2-trimetilszilil-etil-2-amino-2-dezoxi-4,6-O-izopropilidén- β -D-glükopiranozidból állítottuk elő, mint azt az 1. és 2. Reakcióvázlaton bemutatjuk. A (2) képletű vegyület N-acilezése (R)-3-tetradekanoiloxi-tetradekánsavval 1-(3-dimetil-amino-propil)-3-etil-karbodiimid metil-jodid (EDC.Mel) jelenlétében a (3) képletű intermediert eredményezi. A hidroxil-csoport védeése 2,2,2-triklóretil-kloroformáttal (Troc-Cl) majd az acetamid hidrolízise a (4) képletű glikozil akceptort szolgáltatja.

A (9) képletű glikozil donor szintézisét a következő reakciókkal oldottuk meg: az (5) képletű vegyület

nitrogénatomjának védésére a Schotten-Baumann módszert használtuk Troc-
-Cl-al, amely a (6) képletű vegyületet eredményezte. E termék 3-O-acilezése (R)-3-tetradekanoiloxi-tetradekánsavval EDC.Mel és 4-pirrolidino-piridin jelenlétében majd az acetamid hasítása a (7) képletű diolt szolgáltatva, amelyet azután átalakítottuk a (8) képletű vegyületté 1,1-dimetil-2,2,2-triklóretil-klór-formáttal (TCBOC-Cl) és difenil-klór-foszfáttal. Végül a (8) képletű vegyület (9) képletű glikozil donorrá alakítását α,α -di-klórmetil-metil-éter cink(II)-klorid jelenlétében történő reakciójával vagy bármely más az irodalomból ismert reakcióval végezhetjük.

A (4) és (9) képletű vegyületek kapcsolását a Koenigs-Knorr típusú reakcióval végezzük ezüst-triflát vagy más alkalmas katalizátor jelenlétében, amely a (10) képletű diszacharidot szolgáltatja. A triklóretil-bázisú védőcsoportot azután cink forgáccsal ecetsavban távolítjuk el, a glükózamin nitrogénatomját szelektíven acilezzük (R)-3-oktadekanoiloxi-tetradekánsavval megfelelő kapcsoló reagens mint a 2-etoxi-1-e-toxikarbonil-1,2-dihidro-kinolin (EEDQ) jelenlétében, amelynek során a (11) képletű hexaacilezett származékot nyerjük. A (11) képletű vegyület maradék védőcsoportjait azután palládium vagy palládium katalizátorok jelenlétében történő katalitikus hidrogénezéssel távolítjuk el, így az (1) képletű vegyületet nyerjük.

Az irodalomban jártas szakemberek realizálhatnák, hogy a foszfát- és (R)-3-alkanoiloxi-tetradekanoil-csoportok bevezetését a glükózamin egységekbe nem szükségszerűen az 1. és 2. Reakcióséma vagy az alább leírt 1. példa alapján kell végezni. E csoportok kiépítését végezhetjük a glikozilálási (kapcsolási) reakciót követően olyan nitrogén- és oxigén-védőcsoportokat használva, amelyek alkalmasak a



jelenlévő amino- és hidroxil-csoportok megkülönböztetésére. Továbbá, egyéb, az 1. és 2. Reakcióséma vagy az alább leírt 1. példában leírt védőcsoportoktól különböző védőcsoportokat is alkalmazhatunk a foszfát-, amino- és hidroxil-csoportok átmeneti védésére a szintézis lépések során. A tipikus foszfát-védőcsoportok közül a korlátozás szándéka nélkül megemlítjük a fenil-, benzil- és o-szilil-csoportokat, előnyösen a foszfát csoportot két fenil-csoporttal védjük. A 6 helyzetű hidroxilcsoport átmeneti védésére a cukorkémiában általánosan alkalmazott védőcsoportokat, mint például a szilil-, benzil- vagy benziloxi-metil-étereket vagy egy alkil-karbonátot használunk; előnyösen a 6-hidroxil-csoportot 1,1-dimetil-2,2,2-triklóretil-karbonát (TCBOC) formájában védjük. A cukorkémia amino-csoportjainál alkalmazott nitrogén védőcsoportok közül a korlátozás szándéka nélkül megemlítjük az általánosan alkalmazott karbamátokat, mint például a terc-butil-, (t-BOC), benzil-, (Cbz), a 2,2,2-triklóretil-, (Troc), és a 9-fluorenil-metil-csoportokat (Fmoc), előnyösen a glikozil donor [például a (9) képletű vegyület] aminocsoportját 2,2,2-triklóretil-csoporttal védjük. Továbbá, a kapcsolási reakcióban a glikozil donor anomer centrumához kapcsolódó aktiváló és leváló csoportjaként a klóratomon kívül más atomokat is alkalmazhatunk. Az általánosan alkalmazott aktiváló csoportok közül a korlátozás szándéka nélkül megemlítjük a fluoratomot, klóratomot, brómatomot az acetoxi-csoportot és a triklóraceti-midát- csoportot.

A találmány tárgyát képező vegyületet alkalmazhatjuk bármilyen gyógyszerészetileg elfogadható só formájában. A találmány tárgya szerint alkalmas sók közül alkalmazhatunk trietil-amin-, trietanol-amin-, trisz-, glicin- és ammónium-sókat. Az irodalomban jártas szakemberek további a találmányban alkalmazható sókat is javasolhatnának.



A találmány tárgyát képező új foszfoglikolipid hasznos a korlátozás szándéka nélkül az olyan metabolitikusan aktív szövetek károsodásának feljavításában, mint a helyi vértelenség, reperfúzió sérülés okozta szívizom szövet károsodás. A szövetek eredendően károsodnak az ischemia során, amikor azok oxigén ellátása nem megfelelő. Az ischemia során bekövetkező oxigénszegény állapot sejt nekrozishoz vezet. Az oxigénszegény állapot egy megnövekedett szabadgyök képződéshez vezet a reperfúzió alatt, aktiválja a komplementer utat, az érrendszeri adhéziós molekulák túlszabályozását és a gyulladáskeltő citokinek termelését. A találmány tárgyát képező vegyület megvédi az oxigén szegénnyé vált szöveteket az ischemia alatt. Az irodalomban jártas szakemberek számára az is nyilvánvaló, hogy a találmány tárgyát képező vegyületnek hatékonynak kell lennie az oxigén újrafelvételt követő valamennyi típusú hypoxia vagy anoxia esetén.

Az elmélet szerint egy további sejtkárosodás és sejt elhalás következik be a reperfúzió általi oxigén újra bevezetés esetén. A sejtek szabad gyökök általi károsodása kalcium túltermelést és egy sor enzimrendszer aktivitásának csökkenését eredményezi, nagy valószínűséggel magában foglalva a nitrogén-oxid szintetáz enzim működésének csökkenését, amely csökkenti a nitrogén-oxid termelést, amely ezáltal a neutrofil adhézió növekedéséhez vezet. A találmány tárgyát képező vegyület kardioprotektív hatását blokkolhatjuk amino-gua-nidinnel, az indukálható nitrogén-oxid szintetáz (iNOS) szelektív inhibitorával. A gyógyszer adagolása blokkolta az L34 vegyület kardioprotektív hatását kutyákon, amely valószínűsíti a vegyület nitrogén-oxiddal összefüggő hatásmechanizmusát.



A neutrofilek nagy mértékben hozzájárulnak a gyulladásos sérülés létrehozásában, amely a szövetek ischemiát követő állapotában következik be. Az ischemiás részhez kapcsolódó neutrofileket C5a és 5b névvel jelöljük (komplement fragmensek), citokinek és kemokinek, amelyek kemotaktikusak a sejt számára. Az aktivált neutrofilek az endotheliummal kapcsolatos sejtekhez kapcsolódnak, áthatolnak az endothelium gáton, ahol elpusztítják a miocitákat. A gyulladáskeltő neutrofilek kapcsolódása és áthatolása az endothelium gáton az adhéziós molekulák túlszabályozottságától mind az endothelium felszínén, mind a neutrofileken. A citokineket, mint az IL-6-ot az ischemiás szövetek termelik, amelyek bizonyítottan döntő szerepet játszik az adhéziós molekulák túlszabályozásában. A találmány tárgyát képező vegyület egyedülálló abban a vonatkozásban, hogy hatékony dózisban nem indukál gyulladáskeltő citokineket vagy lázat, amikor még hatékony az ischemia/reperfúzió által okozott sérülés javításában. Érthető, hogy a hasonló lánchosszúságú zsírsavszármazékokat tartalmazó rokon szerkezetű vegyületek várhatóan biológiai aktivitással rendelkeznek.

A klinikai gyakorlatban ischemia bekövetkezhet előreláthatóan vagy váratlanul. A tervezett operációk okozta ischemia magában foglalja a koszorúér bypass operációját, a szívbillentyű cseréjét, a szívkamra operációját, az artéria lekötésével járó műtéteket, plasztikai sebészeti beavatkozásokat, bőrátültetéseket, szervátültetést, szövetek transzplantációját, az aorta verőértágulatát, vagy a bél reszekciót. A szövetek kerülhetnek oxigénszegény állapotba a nem tervezhető események, mint a miokardiális infarktus, agyvérzés, fulladás, bélelhalás, traumás végtagamputálás és visszaültetés. Meglepő módon a találmány foszfoglitolipid



vegyülete mind akut, mind hosszú ideig tartó védelmet biztosít az ischemiás szöveteknek. Továbbá, az akut védőhatás időtartamát kiterjeszthetjük a bolus adás utáni infúzió elindításával.

A találmány tárgyát képező vegyület védőhatást biztosít az ischemiás szöveteknek percekben belül a vegyület betegeknél történő adása után. Például, a találmány tárgyát képező vegyület adagolása a vizsgálandó állatoknak 10 perccel ischemia előtt olyan védelmet biztosít, amely igazolható a kezelt állatok csökkent mértékű infarktus területével és kábulásával. Ez az azonnali vagy akut védőhatás az idő előrehaladása folytán eltűnik vagy csökken. Egy késleltetett védőhatás nyilvánvalóvá válik mintegy 24 órával a gyógyszer adása után. Késleltetett védőhatást találtunk nyilvánvalóan kutyák és nyulak esetén, amikor az állatokat kezeltük a találmány tárgyát képező vegyülettel 24 órával az ischemia előtt, amelyet a csökkent infarktus terület és kábulás illusztrált. A találmány szerinti vegyület védelme az ischemiás szövetek felé kétfázisú, a védelem két teljesen elkülönülő periódusát ajánlja, a védelem egy akut periódusát, és a védelem egy késleltetett periódusát. Azt találtuk, hogy az L34 molekula akut védőhatása növelhető min. 3 órával, ha a bolus adása után azonnal infúziót alkalmazunk megengedve egy klinikusnak, hogy élesen elválasszuk a védelem akut és késleltetett fázisát. A találmány szerinti vegyületet előnyösen alkalmazhatjuk a sürgősségi vagy trauma esetekben, amikor nem tudjuk a dózist optimálisan alkalmazni az oxigénhiányos állapotban. Továbbá, az elnyújtott védőhatás teszi a vegyületet igazán alkalmassá olyan helyzetekben, amikor az ischemia egy nappal az egyszeri dózis adása után következik be.



Az ischemiás sérülések ellen védő eljárásokban a találmány szerinti vegyületeket formulázhatjuk egy gyógyszerészetileg elfogadható vivőanyaggal injekció, inhaláció, orron át történő, rektális vagy vaginális alkalmazásra becsepegtetés vagy lenyelés útján. Az itt használt „gyógyszerészetileg elfogadható vivőanyag” kifejezés jelentése egy anyag, közeg, amely nem befolyásolja az aktív hatóanyag biológiai aktivitását, és nem toxikus a betegre nézve. A gyógyszerészetileg elfogadható vivőanyagok tartalmazzák az olaj-a-vízben emulziókat, vagy víz-az-olajban emulziókat, vizes készítményeket, amelyek tartalmazhatnak szerves oldószereket (ko-szol-venseket) intravénás (IV) alkalmazásra, liposzómákat vagy felületaktív anyagokat tartalmazó vesiculumot, mikrocseppeket vagy mikroszómákat, porokat, tablettákat, kapszulákat, kúpokat, vizes szuszpenziókat és aeroszolókat.

A találmány vegyületének készítményeit alkalmazhatjuk parenterálisan, azaz intraperitoneálisan, szubkután, intramuszkulárisan, vagy intravénásan, amelyek a következő, előnyben részesített vivőanyagokat tartalmaznak. Az intravénás alkalmazás egy előnyben részesített keveréke 10 % USP minőségű etanolt, 40 % USP minőségű propilén-glikolt vagy polietilén-glikol 600-at tartalmaznak, és a visszamaradó rész USP minőségű, injekció készítésére alkalmas víz (WFI). A további elfogadható vivőanyagok közé soroljuk a 10% USP minőségű etanolt és USP minőségű, injekció készítésére alkalmas vizet; 0,01-0,1 % trietanol-amint tartalmazó USP minőségű, injekció készítésére alkalmas vizet; vagy 0,01-0,1 % dipalmitoil-difosz-fatidilkolint; és 1-10 % squalént vagy parenterális növényi eredetű olaj-a-vízben emulziót. A gyógyszerészetileg elfogadható parenterális oldószerek közé soroljuk azokat az oldószereket, amelyek olyan oldatot vagy diszperziót szolgáltatnak,



amelyek úgy szűrhetők 0,22 μ m méretű szűrőn, hogy aktív hatóanyagot nem tart vissza.

Az előnyben részesített vivőanyagok a szubkután vagy intramuszkuláris alkalmazásra a PBS oldatok (phosphate buffer solution), az 5 % dextrózt tartalmazó WFI oldatok, és a 0,01-0,1 % trietanolamint 5 % dextrózzal vagy 0,9 % nátrium-kloriddal tartalmazó USP minőségű WFI oldatok, vagy 1:2, vagy 1:4 arányú elegye 10 % USP etanolt, 40% propilén-glikolt tartalmaz, amely kiegészül az elfogadható izotóniás oldatokkal, mint az 5 % dextróz, vagy 0,9 % nátrium-klorid és 1:10% squalent, vagy parenterális, növényi eredetű olaj-a-vízben emulziókkal.

A vivőanyagok példái a nyálkahártyán keresztüli felszívódásra a különös adagolási utaktól függenek. Amennyiben orálisan adjuk azokat, a példák tartalmazzák a gyógyszerészeti minőségű mannitot, keményítőt, laktózt, magnézium-sztearátot, nátrium-szacharidot, cellulózt, magnézium-karbonátot, és hasonlókat, a leginkább előnyben részesített a mannit alkalmazása. Ha orron át alkalmazzuk azokat, polietilén-glikol, foszfolipidek, glikolok, és glikolipidek, a szőlőcukor, és/vagy metil-cellulóz, por szuszpenziók olyan adalékanyagokkal együtt mint a laktóz és tartósítószer mint a benzalkónium-klorid, az EDTA használhatók. Egy különösen előnyben részesített forma a foszfolipid az 1,2-dipalmitoil-sn-gliceril-3-foszfokolin (DPPC), egy megfelelő vizes izotóniás vivőanyaggal 0,01-0,1% koncentrációban, amely a találmány szerinti vegyületet 0,1-0,3 mg/ml koncentrációban tartalmazza. Ha inhalációval adjuk, a megfelelő vivőanyagok közé soroljuk a polietilén-glikolt, vagy glikolokat, a DPPC-t, a metil-cellulózt, a elosztó anyagokat, a tartósítószeret, az



előnyben részesített vivőanyagok a polietilén-glikolok és a DPPC.

A találmány szerinti vegyületet az egyednek egy hatékony mennyiségben adjuk, hogy javítsuk annak állapotát, vagy védelmet nyújtunk az ischemia/reperfúzió okozta sérülés esetén. Az itt használt „hatékony mennyiség” az a mennyiség, amely pozitív választ ad a vivőanyag és negatív kontrollal szemben. A találmány szerinti vegyület beadandó pontos mennyisége függ az adagolás módjától, a gyógyszerészeti készítménytől és a betegtől. Például, ha intravénásan adagoljuk a sertéseknek, hogy csökkentsük a az infarktus területet a bal elülső leszálló artéria elzárása után, a vegyület mennyisége 1-1000 ÷g/kg, előnyösen 10-300 ÷g/kg, és legelőnyösebben 35-100 ÷g/kg testtömegre számolva.

A következőkben a példák bemutatják az eljárásokat a találmány gyakorlására. Valamennyi % tömegszázalék, és valamennyi oldószer keverék térfogat %-ban megadott, hacsak nem specifikáltuk.

1. Példa - az (L34) jelű új foszfoglikolipid előállítása

A 2-dezoxi-6O-[2-dezoxi-4-O-foszfono-3-O-[(R)-3-tetradekano-iloxi-tetradekanoil]-2-[(R)-3-oktadekanoiloxi-tetradekanoil-ami-no]-β-D-glükopiranozil]-2-[-[(R)-3-

hexadekanoiloxi-tetradeka-noil-amino]-D-glükopiranoz
 trietilammóniumsó [(1) képletű vegyület] előállítása.

(1) 0,432 g (1,40 mmól) Benzil-2-amino-2-dezoxi-4,6-O--izopropilidén-]-β-D-glükopiranozid (2) és 0,70 g (1,54 mmól) (R)-3-hexadekanoil-tetradekánsav diklórmetános oldatát reagáltatjuk 0,62 g (2,10 mmól) EDC-Mel-vel és a reakcióelegyet 16 órán át kevertetjük szobahőfokon. A reakcióelegyet bepároljuk, a keletkező maradékot flash kromatográfiával tisztítjuk szilikagél oszlopon (gradiens elúciót alkalmazva 35-45 % etil-acetátot tartalmazó hexánnal), így 0,89 g (85 %) (3) képletű benzil-2-dezoxi-4,6-O-izopropilidén-2-[(R)-3-hexadekanoiloxi-tetradekanoil-amino]-β-D-glükopiranozidot nyerünk amorf szilárd anyag formájában. ¹H NMR (CDCl₃) δ 0,88 (~t, 6H), 1,1-1,7 (m, 46 H), 1,44 (s, 3H), 1,53 (s, 3H), 2,25 (t, 2H, J=7,5 Hz), 2,42 (m, AB-típus, 2H), 3,30 (td, 1H, J=10, 5 Hz), 3,51 (m, 1H), 3,61 (~t, 1H, J=9 Hz), 3,75-4,0 (m, 3H), 4,58 (d, 1H, J=11,8 Hz), 5,06 (m, 1H), 5,97 (d, 1H, J=6,0 Hz), 7,33 (s, 5H).

(2) 0,74 g (0,99 mmól) (3) képletű vegyület, 0,012 g (0,01 mmól) DMAP és 0,20 ml (2,5 mmól) piridin 6 ml-es diklórmetános oldatát reagáltatjuk 0,15 ml (1,1 mmól) 2,2,2-triklór-etil-kloroformáttal és szobahőmérsékleten kevertetjük 3 órán át. A reakcióelegyet bepároljuk, a maradékot feloldjuk 15 ml 80 %-os vizes ecetsavban és 60 °C-on melegítjük 1 órán át. Az oldatot vákuumban bepároljuk, a maradékként nyert szirupszerű anyagot flash kromatográfiával tisztítjuk szilikagél oszlopon (gradiens elúciót alkalmazva 50-55 % etil-acetátot tartalmazó hexánnal), így 0,71 g (81 %) (4) képletű benzil-2-dezoxi-[(R)-3-hexadekanoiloxi-tetradekanoil-amino]-



-3-O-(2,2,2-triklóretoxi-karbonil)- β -D-glükopiranozidot nyerünk szintelen amorf szilárd anyag formájában. ^1H NMR (CDCl_3) δ 0,87 (~t, 6H), 1,1-1,15 (m, 46 H), 2,22 (t, 2H, $J=7,5$ Hz), 2,29 (dd, 1H részben rejtve a triplet miatt, $J=14,7, 5$ Hz) 2,43 (dd, 1H, 14,7, 5 Hz), 3,00 (széles s, 2H), 3,45 (m, 1H), 3,75-4,15 (m, 4H), 4,55 (d, 1H, $J=12$ Hz), 4,7-4,9 (m, 4H), 5,0-5,15 (m, 2H), 6,34 (d, 1H, $J=8,4$ Hz), 7,28 (széles s, 5H).

(3) 6,46 g (20,2 mmól) 2-Trimetilszilil-etil-2-amino-2-dezoxi-4,6-O-izopropilidén-)- β -D-glükopiranozid (5) 300 ml-es kloroformos oldatához 300 ml 1 N vizes nátrium-hidrogén-karbonát oldatot és 8,5 g (40 mmól) 2,2,2-triklóretil-kloroformátot adunk. A reakcióelegyet erőteljesen kevertetjük 3 órán át. A szerves fázist elválasztottuk, vízmentes nátrium-szulfáttal szárítottuk. Az oldatot vákuumban bepároljuk, a maradékként nyert szirupszerű anyagot flash kromatográfiával tisztítjuk szilikagél oszlopon (gradiens elúciót alkalmazva 30-40 % etil-acetátot tartalmazó hexánnal), így 9,6 g (96 %) (6) képletű 2-trimetilszilil-etil-2-dezoxi-4,6-O-izopropilidén-2-(2,2,2-triklóretoxi-karbonil-amino)- β -D-glükopiranozidot nyerünk szintelen szilárd anyag formájában: olvadáspont 69-70 °C; ^1H NMR (CDCl_3) δ 0,0 (s, 9H), 0,94 m, 2H), 1,44 és 1,52 (2s, 6H), 2,94 (széles s, 1H), 3,23-3,37 (m, 2H), 3,48-3,62 (m, 2H), 3,79 (t, 1H, $J=\sim 10,5$ Hz), 3,88-4,08 (m, 3H), 4,65 (d, 1H, $J=8,3$ Hz), 4,74 (m, 2H), 5,39 (d, 1H, $J=7,4$ Hz).

(4) 7,5 g (15,2 mmól) (6) képletű vegyület, 7,58 g (16,7 mmól) (R)-3-tetradekanoiloxi-tetradekánsav és 0,25 g (1,7 mmól) 4-pirrolidino-piridin 95 ml-es diklórmétános oldatához adunk 4,94 g (16,7 mmól) 1-(3-dimetilamino-propil)-3-etil-kar-



bodiimid metil-jodidot (EDC.Mel) és a reakcióelegyet 16 órán át kevertetjük szobahőfokon. A reakcióelegyet szűrjük egy rövid CELITE® ágyon, vákuumban bepároljuk, és a maradékot 100 ml 60 °C hőmérsékletű 90 %-os vizes ecetsavval 1 órán át melegítjük. A reakcióelegyet vákuumban bepároljuk, a visszamaradó ecetsavat és vizet 2x150 ml toluol hozzáadása közben azeotróp desztillációval távolítjuk el. A nyers diolt flash kromatográfiával szilikagél oszlopon (gradiens elúciót alkalmazva oldószerként 30-40 % etil-acetátot tartalmazó hexánt használva 11,8 g (83 %) 2-(trimetil-szilil)-etil-2-dezoxi-3-O-[(R)-3-hexadekanóiloxi-tetradekanoil]-2-(2,2,2-triklóretoxi-karbonil-ami-no)-β-D-glükopiranozidot (7 képletű vegyület) nyerünk szilárd amorf anyag formájában: ¹H NMR (CDCl₃) δ 0,0 (s, 9H), 0,9 (m, 8H), 1,1-1,7 (m, 42H), 2,30 (t, 2H, J=7,4 Hz), 2,52 (m, 2H), 3,36-3,72 (m, 4H), 3,78-4,03 (m, 3H), 4,57 (d, 1H, J=8,3 Hz), 4,65 (d, 1H, J=11 Hz), 4,77 (d, 1H, J=11Hz), 5,05-5,15 (m, 2H), 5,20 (d, 1H, J=7,4 Hz),

(5) 10,9 g (12 mmól) (7 képletű vegyület) és 2 ml (25 mmól) piridin 125 ml-es diklórmétános oldatához adjuk cseppenként 0 °C-on 3,17 g (13,2 mmól) 2,2,2-triklór-1,1-dimetil-etil-kloroformát 25 ml-es diklórmétános oldatát. A reakcióelegyet hagyjuk lassan felmelegedni szobahőfokra 3,5 óra alatt. E hőfokon adunk hozzá sorrendben 0,89 g (6,0 mmól) 4-pirro-lidini-piridint, 10,5 ml (60 mmól) N,N-diizopropil-etil-amint és 3,7 ml (18 mmól) difenil-klorofoszfátot és a reakcióelegyet 5 órán át kevertetjük szobahőfokon. Hígítjuk 500 ml diklórmétánnal, mossuk 2 x 250 ml hideg 7,5 %-os vizes sósav oldattal, 250 ml vízzel, 250 ml telített vizes nátrium-hidrogén-karbonát oldattal, nátrium-szulfáttal szárítjuk, végül bepároljuk. A maradék anyagot flash kromatográfiával szilikagél oszlopon tisztítjuk oldószerként 12,5 % etil-acetátot

tartalmazó hexánt használva. Így 15,1 g (95 %) (8) képletű 2-trimetilszilil--etil-2-dezoxi-4-O-difenilfoszfono-3-O-[(R)-3-tetradekanoiloxi-tetradekanoil]-6-O-(2,2,2-triklór-1,1-dimetil-etoxikarbonil)-2-(2,2,2-triklóretoxi-karbonil-amino)- β -D-glükopiranozidot nyerünk viszkózus olaj formájában. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 0,0 (s, 9H), 0,8-1,0 (m, 8H), 1,1-1,65 (m, 42H), 1,83 és 1,90 (2s, 6H), 2,15-2,45 (m, 4H), 3,34 (q, 1H, $J \sim 8$ Hz), 3,37 (m, 1H), 3,81 (m, 1H), 3,95 (m, 1H), 4,27 (dd, 1H, $J = 12,5$ Hz), 4,34 (d, 1H, $J = 12$ Hz), 4,58 (d, 1H, $J = 12$ Hz), 4,66 (q, 1H, $J \sim 9$ Hz), 4,86 (d, 1H, $J = 12$ Hz), 5,03 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz), 5,21 (m, 1H), 5,54-5,70 (m, 2H), 7,2-7,8 (m, 10H).

(6) 6,5 g (4,84 mmól) (8) képletű vegyületet és 2,18 ml

(24,2 mmól) diklórmetil-metil-étert feloldunk 60 ml kloroformban, az oldatot lehűtjük 0°C -ra, hozzáadunk 2,41 ml (2,41 mmól) cink(II)-klorid 1M éteres oldatát, azután keverés közben a reakcióelegyet engedjük szobahőfokra felmelegedni és e hőfokon kevertetjük egy éjszakán át. Az elegyet hígítjuk etil-acetáttal, az oldatot mossuk telített vizes nátrium-hidrogén-karbonát oldattal, nátrium-szulfáttal szárítjuk és végül bepároljuk. A maradékként kapott világos sárga olajat flash kromatográfiával szilikagél oszlopon tisztítjuk oldószerként 10 % etil-acetátot tartalmazó hexánt használva. Ily módon 5,4 g (88 %) (9) képletű 2-dezoxi-4-O-difenilfoszfono-3-O-[(R)-3-tetradekanoiloxi-tetra-dekanoil]-6-O-(2,2,2-triklór-1,1-dimetil--etoxikarbonil)-2-(2,2,2-triklóretoxi-karbonil-amino)- β -D-glüko-piranozidil-kloridot nyerünk szilárd amorf anyag formájában: $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 0,88 (~t, 6H), 1,1-1,6 (m, 42 H), 1,78 (s, 3H), 1,88 (s, 3H), 2,18 (t, 2H, $J = 7,6$ Hz), 2,34-2,52 (m, 2H), 4,2-4,4 (m, 4H), 4,70 (d, 1H, $J = 12$ Hz), 4,73 (d,



1H, J=12 Hz), 4,83 (~q, 1H, J=9 Hz), 5,09 (m, 1H), 5,51 (~t, 1H, J=10 Hz), 5,79 (d, 1H, J=8,0 Hz), 6,26 (d, 1H, J=3,6 Hz), 7,1-7,4 (m, 10H).

(7) 1,40 g (1,54 mmól) (4) képletű és 2,33 g (1,85 mmól) (9) képletű vegyületek 18,5 ml 1,2-diklór-etános oldatát kevertetjük 1 g elporított 4 A méretű molekulaszűrő jelenlétében 1 órán át, ezután 1,43 g (5,55 mmól) AgOTf-et adunk hozzá egy részletben. A reakcióelegyet fénytől védve 4 órán át kevertettük szobahőfokon. Egy további ekvivalens mennyiségű 0,475 g (1,85 mmól) AgOTf-et adunk hozzá és egy éjszakán át szobahőfokon kevertettük. A keletkező szuszpenziót leszűrtük, az oldatot vákuumban bepároltuk, melynek eredményeképpen csaknem színtelen olajat kaptunk. A maradékot flash kromatográfiával szilikagél oszlopon gradiens elúciót alkalmazva 20-25 % etil-acetátot tartalmazó hexánnal. Ily módon 2,40 g (73 %) (10) képletű benzil-2-dezoxi-6O-[2-dezoxi-4-O-difenil-foszfono-3-O-[(R)-3-tetradekanoiloxi-tetradekanoil]-6-O-(2,2,2-triklór-1,1-dimetil-etoxikarbonil-2-(2,2,2-triklór-etoxikarbonil-amino)-β-D-glükopiranozil]-3-O-(2,2,2-triklór-etoxikarbonil)-2-[(R)-3-hexadekanoiloxi-tetradekanoil-amino]-D-glükopiranozidot nyerünk színtelen szilárd anyag formájában: olvadáspont: 95-97 °C; ¹H NMR (CDCl₃) δ 0,88 (t, 12 H J= Hz), 1,1-1,65 (m, 88H), 1,84 (s, 3H), 1,90 (s, 3H), 2,15-2,47 (m, 8H), 3,06 (széles s, 1H), 3,37-3,55 (m, 2H), 3,63-3,83 (m, 3H), 3,88 (dd, 1H, J=11 Hz), 4,17 (dd, 1H, J=12, 2,5 Hz), 4,24 (dd, 1H, J=11,5 Hz), 4,38 (dd, 1H, J=11 Hz), 4,55-4,95 (m, 8H), 5,00 (m, 1H), 5,05-5,25 (m, 2H), 5,49 (~t, 1H, J=9 Hz), 5,89 (d, 1H, J=8,2 Hz), 5,93 (d, 1H, J=6,6 Hz).

(8) 11,7 g (5,53 mmól) (10) képletű vegyület 250 ml-es ecetsavas oldatához adunk 60 °C-on három egyenlő részletben 1 óra alatt 27,1 g (0,415 mmól) cink forgácsot. A reakcióelegyet egy CELITE ® ágyon szűrjük, és az oldatot bepároljuk. A maradékot feloldjuk 500 ml etil-acetátban, mossuk sorrendben 500 ml 1M vizes sósav oldattal, 500 ml telített vizes nátrium-hidrogén-karbonát oldattal, vízmentes nátrium-szulfáttal szárítjuk, szűrjük, az oldatot bepároljuk. Az így nyert nyers triol és 3,1 g (6,08 mmól) (R)-3-oktadekanoil-tetradekánsav 60 ml-es diklórmétános oldatához adunk 2,26 g (9,12 mmól) 2-e-toxi-1-etoxikarbonil-1,2-dihidro-kinolint (EEDQ) és 16 órán át kevertetjük szobahőfokon. A reakcióelegyet vákuumban bepároljuk, és a maradékot flash kromatográfiával szilikagél oszlopon etil-acetát-kloroform-ecetsav 10:90:5 arányú elegyével tisztítjuk. Ily módon 6,4 g (56 %) (11) képletű benzil-2-dezoxi--6O-[2-dezoxi-4-O-difenil-foszfono-3-O-[(R)-3-tetradekano-iloxi-tetradekanoil]-2-[(R)-3-oktadekanoiloxi-tetradekanoil-amino]-β-D-glükopiranozil]-2-[-[(R)-3-hexadekanoiloxi-tetradekanoil-amino]-D-glükopiranozil] nyerünk szintelen szirupszerű anyag formájában.

(9) 6,3 g (3,07 mmól) (11) képletű vegyület 25 ml ecetsavat és 250 ml tetrahydro-furánt tartalmazó oldószerkelegetben hidrogénezzük 3,5 g palládium szén katalizátor jelenlétében szobahőfokon 65 psi nyomáson 18 órán át. A katalizátort kiszűrjük, 3,0 g platina-oxid katalizátort adunk az oldathoz és a hidrogéneezést folytatjuk változatlan körülmények között 24 órán át. A katalizátort kiszűrtük, átmostuk kloroformmal és az egyesített szűrletet és mosófolyadékot bepároltuk. A maradékot flash kromatográfiával szilikagél oszlopon kloroform-metanol-víz-triethyl-amin 90:10:1:1 arányú elegyével tisztítva 3,9 g anyagot kaptunk, amelyet feloldottunk hideg 500 ml kloroform-metanol

2:1 arányú elegyében és mostuk 200 ml hideg 0,1 N sósav oldattal. Az alsó szerves fázist elválasztottuk, szűrtük Whatman féle szűrőpapíron (No. 4) és vákuumban bepárooltuk. Ily módon 3,6 g (65 %) szabad savat nyertünk. A szabad sav egy részét liofilizáltuk 2 %-os vizes trietil-amint tartalmazó oldatból, amely folyamat eredményeképpen a tiszta (1) képletű 2-dezoxi-6O-[2-dezoxi-4-O-foszfono-3-O-[(R)-3-tetradekanoiloxi-tetradekanoil]-2-[(R)-3-oktadekanoiloxi-tetradekanoil-amino]-β-D-glükopiranozil]-2-[-[(R)-3-hexadekanoiloxi-tetradekanoil-amino]-D-glükopiranozil] trietilammónium só nyerünk fehér szilárd anyag formájában: olvadáspont: 174-175 °C (bomlás közben) IR (film): 3306, 2920, 2851, 1732, 1652, 1552, 1467, 1378, 1308, 1178, 1060, 953, 845, 721, cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃-CD₃OD) δ 0,88 (~t, 18 H), 1,15-1,7 (m, 147 H), 2,25-2,7 (m, 12 H), 3,07 (q, 6H, J=7,4 Hz), 3,22-4,3 (m, 12 H), 4,69 (d, 1H, J=8,5 Hz), 5,05-5,25 (m, 5H), 6,69 (d, 1H, J=8,5 Hz), 7,41 (d, 1H, J=8,5 Hz); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 174,0, 173,4, 170,8, 170,5, 100,1, 91,4, 75,7, 72,7, 71,8, 71,1, 71,0, 7,06, 61,0, 54,9, 54,0, 45,6, 41,7, 41,1, 39,3, 34,5, 32,0, 29,8, 29,5, 29,4, 25,4, 25,1, 22,7, 14,2, 8,6.

Analízis a C₁₀₈H₂₀₈N₃O₂₁P x 5 H₂O képlet alapján:

számított: C:64,67; H: 10,95; N:2,09; P:1,54 %

talált: C:64,58; H: 10,63; N:2,12; P:1,58 %

2. Példa: Az L34 vegyület kardioprotektív hatása az infarktus kiterjedésére kutyákban

Kutyák előzetes kezelése a találmány tárgyát képező vegyülettel az ischemia/reperfúzió bekövetkezése előtt jelentősen csökkentette az infarktus területét a kontrolok alkalmazásával szemben. Azon állatok esetén, amelyeket L34 vegyülettel kezeltek akár 10 percig, akár 24 óráig 1 órával a

baloldali elülső leszálló szívkoszorúér elzáródást, és 3 órával a reperfúziót megelőzően, kisebb infarktus területet mutattak, amint azt a veszélyeztetett terület százalékában fejeztünk ki. Továbbá, amino-guanidin, egy szelektív nitrogén monoxid szintetáz inhibitor adagolása gátolta az L34 vegyület késleltetett kardioprotektív hatását, amit a kezelt állatokon figyeltünk meg.

19,0-30,0 kg tömegű, akár hím, akár nőstény mongrel kutyákat koplaltattunk egy éjszakán át, érzéstelenítettük 200 mg /testsúly kg intravénásan adott nátrium barbitállal, és 15 mg /testsúly kg nátrium pentobarbitállal, lélegeztettük azokat oxigénnel dúsított levegővel 5-7 bar nyomást alkalmazva, hogy megelőzzük a tüdő tökéletlen telítődését. Egy automata vér gáz rendszerrel monitoroztuk az artériás vér pH-ját, az oxigén és széndioxid nyomást kiválasztott időpontokban és azokat a normál fiziológiai állapotnak megfelelő értékeken tartottuk. (pH= 7.35-7.45; pO₂: 10,6-16,0 kPa; pCO₂: 10,6-16,0 kPa) a lélegeztetés és az oxigén adagolás állításával és szükség szerint 1,5 % nátrium-hidrogén-karbonát oldat infúziójával. A testhőmérsékleteket egy melegítő párna segítségével 38±1 °C-on tartottuk.

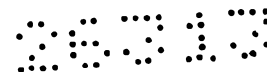
Egy dupla nyomásérzékelő mikrotip katétert vezettünk az aortába és a bal kamrába a bal nyaki verőér artérián keresztül az aortás és bal kamrai nyomások mérésére. A bal kamrai kontraktilitás dP/dt értéket határoztuk meg a bal kamrai nyomás pulzus elektronikus differenciálásával.

A baloldali mellkas megnyitását az ötödik bordaközben végeztük el. A tüdőt félrehúztuk, a szívburkot megnyitottuk, és a szívet rögzítettük. A bal elülső leszálló koszorúér 10-15 mm-es szegmentjét kivágtuk a környező szövetekből. Egy kalibrált elektromágneses áramlásmérőt helyeztünk a bal



elülső leszálló koszorúér köré, hogy a koszorúér véráramlást meghatározzuk. A bal szívpitvari fülcsébe kanült helyeztünk el a radioaktív mikroszférák számára, hogy a regionális miokardiális véráramot meghatározzuk a reperfúzió alatt az ischemiás és normális területekhez. Elektródokat csatlakoztattunk a bal szívpitvari fülcséhez, hogy gyorsítsuk a szívet egy elektromos stimulátorral (típusa Grass SD9) 150 beat/perc sebességgel, amikor szívverés 140 beat/perc érték alá esik.

Az állatokat randomizáltan 5 csoportba osztottuk; az első csoportot azok az állatok alkották, amelyek 35 μ g/testsúly kg gyógyszert kaptak intravénásan 24 órával az elzáródás előtt (24 óra); a második csoportot azok az állatok alkották, amelyek 35 μ g/testsúly kg gyógyszert kaptak 24 órával az elzáródás előtt és 30 mg /testsúly kg aminoguanidint 60 perccel az elzáródás előtt; a harmadik csoportot azok az állatok alkották, amelyek 70 μ g/testsúly kg gyógyszert kaptak 10 perccel az elzáródás előtt; a negyedik csoportot azok az állatok alkották, amelyek 30 mg/testsúly kg aminoguanidint kaptak 60 perccel az elzáródás előtt; az ötödik csoport állatai vivőanyagot kaptak. Az állatkísérlet során a hemodinamikai változókat monitoroztuk és feljegyeztük. A találmány tárgyát képező L34 jelű foszfoglikolipid vegyületet feloldottuk 40 % propilén-glikolt és 10 % etanolt tartalmazó „water for injection” (WFI) minőségű vízben, az oldatot azonos mennyiségű 5 % dextrózt tartalmazó vizes oldattal (D5W), majd az így elkészített oldatot adtuk intravénásan 24 órával vagy 10 perccel a kísérlet megkezdése előtt. A kontrol csoportot azonos térfogatú placebóval kezeltük [40 % propilén-glikol, 10 % etanol vízben (WFI) oldva és hígítva D5W-vel]. Valamennyi állatot 60 percig kezeltük a baloldali elülső leszálló



szívkoszorúér elzáródás folyamán, és 3 óráig a reperfúzió idején.

Helyi miokardiális véráramot mértünk radioaktív mikroszféra technikával. A mikroszférákat a szívkoszorúér elzáródás 5. és 30. percében injektáltuk, valamint a reperfúziós periódus végén. Karbonizált műanyag mikroszférákat (15 μm átmérőjű, New England Nuclear) ^{14}C , ^{103}Ru vagy ^{95}Nb izotóppal jelöltünk, szuszpendáltuk 0,01 % Tween 80-at tartalmazó izotóniás sóoldatban. A Tween 80 hozzáadás meggátolja az aggregációt. A mikroszférákat ultraszonikáltuk 5 percig, és homogenizáltuk további 5 percig adagolás előtt. 1 ml mikroszféra szuszpenziót ($2-4 \times 10^6$ sféra) adtunk a bal szívpitvari katéteren keresztül, amelyet átmostunk 5 ml fiziológiás sóoldattal. Egy referens véráram mintát vezettünk vissza a femorális artériából egy állandó, 6,6 ml/perc sebességgel közvetlenül a mikroszféra injektálás előtt.

A reperfúzió végén a bal elülső leszálló koszorúérbe kanült vezettünk és 10 ml Patent Blue dye festékanyagot és 10 ml fiziológiás sóoldatot injektáltunk azonos nyomással a bal szívpitvarba és a bal elülső leszálló koszorúérbe, hogy meghatározzuk az anatómiás veszélyeztetett területet (AAR) és a nem ischemiás területet. A szívet azután elektromosan fibrilláltuk, (20V, 250Hz négyzetes hullám pulzusokat alkalmaztunk direkt módon a bal kamrába) és azonnal eltávolítottuk. A balkamrát kivágtuk, és keresztirányban felszeleteltük 6-7 mm széles darabokra, a csúcstól a bázisig. A festetlen ischemiás területet és a kék színű normál területet szétválasztottuk és mindkét területet inkubáltuk 37°C hőmérsékleten 30 percig 1 % 2,3,5-trifenil-tetrazólium-kloridot (TTC) tartalmazó 7,4 pH értékű 0,1 M foszfát



pufferben. A TTC téglavörös színűre festi az infarktus által nem érintett szívizmot, jelezve egy formazin csapadék jelenlétét, amely az életképes szövetekben jelenlévő dehidrogenáz enzim által redukált TTC-ből keletkezik. A veszélyeztetett területet kifejeztük a bal szívkamra százalékában és az infarktus által érintett területeket kifejeztük a veszélyeztetett terület százalékában. A balkamra, a veszélyeztetett terület, és az infarktus által érintett területek tömegét mértük.

A transzmurális szövetcsíkokat szétszítottuk az ischemiás (3 szelet) és a nem ischemiás területek (5 szelet) subepicardium, közép-szívizom és subendocardium részekre és mértük a szövetminták tömegeit (0,3-0,8 g). A transzmurális szeleteket az ischemiás terület közepéből nyertük, és legalább 1 cm távolságra voltak a perfúzió határától, amelyet a Patent Blue dye festék jelzett. Az összes mintát megvizsgáltunk gammaszámlálóval valamennyi izotóp aktivitásának meghatározására. Mindegyik izotóp aktivitását meghatároztuk a referencia véréram mintákban is. A miokardiális véráramlást számítógép segítségével számítottuk ki, hogy mindegyik izotóp valódi aktivitását határozzuk meg az egyedi mintákban és a szöveti véráramlást a $Q_m = Q_r \times C_m / C_r$ képletből számítottuk ki, ahol Q_m a miokardiális véráramlás (ml/perc/g). Q_r a referens véráramlás visszavezetési foka, (6,6 ml/perc), C_r a referens véréram minta aktivitása (szám/perc), és C_m a szövetminta aktivitása (szám/perc/g) mértékegységben. A transzmurális véráramlást a mindegyik régió három rétegének súlyozott átlagából számoltuk. Az eredményeket az 1. Táblázatban foglaljuk össze:

1. Táblázat

Csoport	N	IS/AAR(%)	Transzmurális Collaterális véráram ml/perc/g
L34 (24 óra) (35 µg/kg)	7	13,3±2,2%*	0,06±0,01
L34 (10 perc) (70 µg/kg)	7	15,0±3,0%*	0,05±0,01
L34 (24 óra) (35 µg/kg) +AG(30 mg/kg)	9	25,2±2,7%	0,06±0,01
AG (30 mg/kg)	7	22,4±2,8%	0,07±0,02



Placebo	10	26,8±2,4%	0,07±0,01
---------	----	-----------	-----------

Valamennyi értéket az átlag±átlagtól való eltérést jelenti.

*P<0,05 a kontrol csoporttal szemben

Rövidítések: IS= infarct size= infarktus terület

AAR= area at risk = a veszélyeztetett terület

A transzmurális collaterális véráram ml/perc/g dimenzióban kifejezve nem tért el szignifikánsan a kezelt csoportok között.

A placebo infarktus terület átlag 26,8±2,4% volt. A találmány tárgyát képező vegyület adagolása után a kezelt állatokban az infarktus terület 10 perccel az elzárás előtt adagolva 15,0±3,0%, míg 24 órával az elzárás előtt adagolva 13,3±2,2% volt. Amikor a kutyákat előzetesen kezeltük a találmány tárgyát képező vegyülettel az ischemia / reperfúzió folyamatot megelőzően, jelentősen csökkent területű infarktust észleltünk a kontrol csoporthoz viszonyítva. Amikor amino-guanidint adtunk az állatoknak, az a 24 órával az elzáródás előtt adott, a találmány tárgyát képező anyag infarktus területet csökkentő hatását blokkolta, és az átlag így 25,2±2,7% volt.

3. Példa: Az L34 vegyület kardioprotektív hatása az infarktus kiterjedésére nyulak esetén

Nyulak előzetes kezelése a találmány tárgyát képező vegyülettel az ischemia/reperfúzió bekövetkezése előtt jelentősen csökkentette az infarktus területét a kontrolok alkalmazásával szemben. Azon állatok, amelyeket L34 vegyülettel kezeltünk 24 órával az arteria circumflexum első



nagy anterio-laterális ágának, vagy magának a circumflexumnak 30 perces elzárását, majd az azt követő reperfúziót megelőzően csökkent területű infarktust mutatott, amelyet a veszélyeztetett terület százalékában fejeztünk ki. (IS/AAR %).

2,5-3,5 kg tömegű hím, új-zélandi fehér nyulaknak adtunk placebót vagy L34 vegyületet 24 órával a kísérlet megkezdése előtt. Az L34 jelű vegyületet 40 % propilén-glikolt és 10 % etanolt tartalmazó vízben oldottuk fel. A kísérletek folyamán az állatokat intramuszkulárisan altattuk 35 mg/testsúly kg ketaminnal, és 5 mg/testsúly kg xylazinnal. A mellkas üreget megnyitottuk, és az állatok légcsövébe visszahajtott endotracheális csövet (Portex, 4,0 mm belső átmérőjű) vezettünk be, azután mechanikus úton lélegeztettük azokat egy pozitív nyomású lélegeztetővel (MD Industries, Mobile, AL) A lélegeztetés sebességét 27-35 lélegzés/perc értékre állítottuk, és a belélegzett térfogat kb. 10-17 ml volt. A lélegeztetés mértékét szükség szerint gyakran állítottuk, hogy az oxigénnyomás pO_2 értékét > 100 Hgmm, a széndioxid nyomás pCO_2 értékét 35-45 Hgmm között, a pH-t 7,35-7,45 értéken tudjuk tartani. Azután a bal torkolati vénát izoláltuk és kanuláltuk egy polietilén (PE) katéterrel, a kísérlet folyamán folyamatosan 0,9 %-os nátrium-klorid oldatot adagoltunk 0,15 ml/perc sebességgel. A nyaki verőeret kivágtuk, és egy folyadékkal töltött polietilén csőbe helyeztük és azonnal összekapcsoltuk egy többcsatornás polygraph rekorderrel egy nyomásátvivőn keresztül az artériás nyomás mérésére. Az EKG-t a kísérlet alatt folyamatosan mértük egy standard elektrokardiogram II elvezetésén keresztül. A baloldali mellkasüreg megnyitása a negyedik bordaköznél történt, és a szívburkot megnyitottuk hogy a szívet elérjük. Egy selyemzsinórt helyeztünk el a circumflexum artéria nagy marginális ága köré, középen az atrio-ventrikuláris horony és

a csúcs között egy atraumatikus tűvel, és a kötés végeit egy kisméretű vinil csövön keresztül fonállal lekötöttük egy hurkot képezvén. A bal circumflexum koronaér első anterio-laterális ágát elzártuk az atrio-ventriculáris horony és a csúcs között a hurok meghúzásával, amelyet azután rögzítettünk a tubusnak egy érfogóval történő elzárásával. A nyulaknak 500 egység heparint adtunk a trombózis hurok körüli elkerülése céljából. A miokardiális ischemiát a regionális cianózis, az ST emelkedés és a vérnyomás csökkenése igazolta. A reperfúziót a felület feletti hiperémia igazolta a hurok megengedése után.

Mindegyik kísérlet végén a ligatúrát a circumflexum artéria nagy marginális ága körül újra meghúztuk, hogy újra elzárjuk az artériát és kb. 4 ml 10 %-os Evans kék festéket injektáltunk a torkolati vénába, amíg a szemek kékké nem váltak. A festék megmutatja a szívizom infarktus veszélyeztetette területét a nem veszélyeztetett, átáramoltatott területtől.

A nyulakat felboncoltuk, a szívüket kiemeltük, és keresztirányban hat egyenlő vastagságú szeletre vágtuk. A veszélyeztetett területet a negatív festéssel határoztuk meg, és számoltuk, mint a balkamra részének %-a, amely tartalmazza a veszélyeztetett területet (AAR/LV %), és az infarktus területet mint a veszélyeztetett terület %-át (IS/AAR%)

A szeletek festését inkubáltuk 37 °C hőmérsékleten 20 percig 1 % 2,3,5-trifenil-tetrazólium-kloridot (TTC) tartalmazó 7,4 pH értékű izotóniás foszfát pufferben. Az életképes szívizom vörös színű, míg a nem életképes, elhalt vagy infarktusos szövetek enyhén színesek vagy színtelenek. Az infarktusos szövetek és a veszélyeztetett zóna területeit computer morfometriával határoztuk meg, Bioquant software



használatával, és az infarktusos terület és a veszélyeztetett terület százalékát számítással határoztuk meg.

Az 1. ábra mutatja azon állatokat, amelyeket a találmány tárgya szerinti vegyülettel kezeltek, és amelyek kb. 70 % csökkenést mutattak az infarktusos területet illetően, amelyet a kontrolhoz viszonyítva a veszélyeztetett terület százalékában fejeztünk ki. A 2. ábrán az L34 jelű vegyület hatását látjuk.

4. Példa: Az L34 vegyület kardioprotektív hatása az infarktus kiterjedésére kutyák esetén gyógyszer infúzióval.

Kutyák előzetes kezelése a találmány tárgyát képező vegyülettel az ischemia/reperfúzió bekövetkezése előtt jelentősen csökkentette az infarktus területét a kontrolok alkalmazásával szemben. Azon állatok esetén, amelyeket először az L34 jelű vegyület bolusával kezeltek, majd folyamatos infúziót alkalmaztak 3 órával az elzárást megelőzően, majd folytatva 1 órán át az ischemia és 1-3 órán át a reperfúzió alatt, egy csökkent méretű infarktus méretet mutatott, amelyet a nekrosis terület (AN) és a veszélyeztetett terület (AR) arányával fejeztünk ki. Azon állatok esetében, ahol csak bolust alkalmaztunk 3 órával az ischemia előtt, nem találtunk védő effektust.

A 16-24 kg súlyú mongrel kutyákat randomizáltan az alábbi 4 csoport egyikébe soroltuk: bolus kontrol; magas dózisú L34 plusz infúzió; alacsony dózisú L34 plusz infúzió végül csak az L34 bolust kapó állatok. Azon állatok, amelyek magas dózisú L34-et és infúziót kaptak, egy 70 µg/testsúly kg mennyiségű intravénás injekciót kaptak, a vivőanyag 40 % propilén-glikol és 10 % etanol vizes oldata, amelyet hígítottunk 5 % dextrózt tartalmazó vizes oldattal 10 ml végső



térfogatra, amelyet azonnal a gyógyszer egy 40 $\mu\text{g}/\text{testsúly kg}/\text{óra}$ mennyiségű infúziója követett 3 órával az elzárás megkezdése előtt. Az a csoport, amely alacsony dózist és infúziót kapott, először egy 35 $\mu\text{g}/\text{testsúly kg}$ mennyiségű bolust kapott, majd ezt követően a gyógyszer 4.0 $\mu\text{g}/\text{testsúly kg}/\text{óra}$ mennyiségű infúziója következett. Mindkét csoport esetén a gyógyszer infúziója az elzáródás alatt 1 órán át, a reperfüzió alatt 1-3 órán át tartott. Azon állatok, amelyek csak bolust kaptak, 70 $\mu\text{g}/\text{testsúly kg}$ mennyiségű L34 vegyületet 3 órával az elzárás megkezdése előtt. Azok a kutyák, amelyek csak placebot kaptak, az anyagot a testsúlyra megállapított és hígított „dózis” formájában kapták meg.

Valamennyi kutyát pentobarbitál nátriummal altatták intravénásan 30 $\text{mg}/\text{testsúly kg}$ mennyiségben, légcsövükbe bevezettek egy tubust és lélegeztették azokat normál levegővel. A bal nyaki vénába és a bal nyaki verőérbe kanült vezettek be a folyadékok és gyógyszerek adagolására és hogy monitorozzák a szívverést és az artériás nyomást. A szívet a bal mellkasüreg megnyitása után feltárták, és rögzítették egy szívburoki bölcsőben. Egy folyadékkal töltött katétert helyeztünk el a bal szívpitvarban a radioaktív izotópok (^{141}Ce , a ^{103}Ru vagy a ^{95}Nb) későbbi bevezetésére és a regionális szívizom véráramlás mérésére. A bal elülső leszálló koszorúér egy szegmentjét izoláltuk, általában disztálisan az első nagy diagonális elágazáshoz, mint a későbbi koszorúér elzárás helyéhez.

Stabilizálódás után az állatok keringését 60 percen át elzártuk. A szívverést és a vérnyomást monitoroztuk közvetlenül a tartós elzárás előtt, és 10 perccel az elzárás alkalmazását követően. Mindegyik kutya a lidocain

profilaktikus dózist (1,5 mg / testsúly kg intravénásan bolus formájában) kapta és a bal elülső leszálló koszorúérüket lekötöttük. Az ischemia súlyosságát valamennyi állat esetén a regionális szívizom véráramlás mérésével állapították meg a bal elülső leszálló koszorúér elzárásának alkalmazását követően.

A 3 órán át tartó reperfúzió végén a bal elülső leszálló koszorúér lezárását megszüntettük és 0,25 ml/kg UNISPERSE® kék pigmentet injektáltunk a koszorúér rendszerbe a bal szívpitvari katéteren keresztül hogy körvonalazzuk in vivo az elzárt bal elülső leszálló koszorúér határait, és a mély álomban lévő állatoknál a szívet megállítottuk intrakardiális kálium-klorid injekcióval. A szíveket gyorsan kiemeltük az állatokból. A szívet felvágtuk harántirányban a csúcstól a bázisig és inkubáltuk TTC festékben az életképes és az elhalt szövetek kimutatására a miocardium ischemiás zónáján belül. Fixálás után a szövetblokkokat kivágtuk az előzetesen ischemiás bal elülső leszálló koszorúér ág centrumából és a távolabbi részekből, a normál módon átáramoltatott circumflexumból és felosztottuk subendocardiális, mid- és subepicardiális szegmensekre. A regionális miokardiális véráramlást azután kiszámítottuk standard módszereket használva. A 3. Ábra azon állatok eredményét mutatja, amelyeket L34 bolussal kezeltek, majd infúziót alkalmaztak a gyógyszerrel 3 órával az ischemia előtt, az eredmények statisztikusan szignifikáns csökkenést mutatnak az infarktus területen amint azt kifejeztük az elhalt terület (AN) veszélyeztetett területre (AR) vonatkoztatott arányával.

Azon kutyák esetében, amelyek csak L34 bolust kaptak 3 órával az elzárás előtt, nem láttunk csökkenést az infarktus területen, amely ha figyelembe vesszük a 2. és 5. példa eredményeit (lent) azt sugallja, hogy az L34 vegyületnek 10 perccel a bolus beadás után mért kardioprotektív aktivitása 3 órával a bolus beadása után eltűnt. Ezek az adatok azt is



demonstrálják, hogy a gyógyszer akut kardioprotektív hatását fenntarthatjuk legalább 3 órán át, ha a bolus beadása után azonnal infúziót alkalmazunk.

5. Példa – az L34 kardioprotektív hatása a sertések infarktus területére

Sertések előzetes kezelése a találmány tárgyát képező vegyülettel az ischemia/reperfúzió bekövetkezése előtt jelentősen csökkentette az infarktus területét a kontrolok alkalmazásával szemben. Azon állatok esetén, amelyeket az L34 jelű vegyülettel kezeltek 10 perccel a 40 perces bal elülső leszálló koszorúér elzárás előtt és a 3 órás reperfúzió előtt, az infarktus csökkent méretet mutatott, amelyet a veszélyeztetett terület tömegszázalékában fejezünk ki.

Ahhoz, hogy megállapítsuk az L34 jelű vegyület infarktusméretet csökkentő hatását, 9 sertést egy nyílt vizsgálatban a következő 4 csoport egyikébe vontuk be: (1) kontrol (n=2), (2) placebo kontrol (n=4), (3) L34 (35 μ g/testsúly kg) (n=2), (4) L34 (70 μ g/testsúly kg) (n=1). Az L34 jelű vegyületet 10% etanolt, 40 % propilén-glikolt tartalmazó injekció gyártásra alkalmas minőségű vizes oldatban formuláztuk. További vak vizsgálatokat végeztünk 8 sertéssel, amelyeket randomizáltan két csoportba osztottunk: (1) A csoport (n=4); (2) B csoport (n=4). Az A és B csoport állatai vagy placebo kontrolt vagy L34-et kaptak. A placebo vagy gyógyszer injekciót 1:1 arányban hígítottuk 5 % dextrózt tartalmazó vizes oldattal (injekció készítésére alkalmas vízzel készítve) beadás előtt.



Hím sertéseket (15-20 kg tömegű) altattunk ketaminnal (25 mg/kg. intramuszkulárisan beadva) és pentobarbitál nátriummal (10 mg/kg, intravénásan beadva) légcsövükbe bevezettek egy tubust és lélegeztették azokat normál levegővel. A sertéseket egy 37 °C hőmérsékletű cirkulált vízzel melegített párnára helyeztük. Valamennyi állat bal kamrai artériájába 5Fr Millar katétert helyeztünk a bal kamrai nyomás mérésére és 24G1.V. katétert helyeztünk a jobb kamra artériába vérvétel céljából. A mellkast a középső szegycsontnál nyitottuk meg, és a szívburkot felmetszettük. A bal elülső leszálló artériát azonosítottuk, és egy 4-0 típusú varrást alkalmaztunk disztálisan az első diagonális elágazáshoz. A varrás végeit átvezettük egy kisméretű műanyag csövön, hogy hurkot képezzünk.

Miután az állatok egyensúlyi állapotba kerültek és vérvételre sor került, L34-et adtunk 35 µg/testsúly kg mennyiségben intravénásan 10 perccel a koszorúér elzárása előtt. Miokardiális helyi ischemiát idéztünk elő a bevezetett fonal hurkának meghúzásával és szabályozásával.

40 perces elzárást követően a hurkot megengedtük és a miokardiumot 3 órán át reperfúzió alá vetettük. A haemodinamikai paramétereket bizonyos időpontokban feljegyeztük és a vérmintákat összegyűjtöttük.

A protokoll végén a koszorúér elzárásokat megszüntettük, 8 ml 50 %-os UNISPERSE® kék festéket (Dupont, DE) injektáltunk a bal szívpitvarba, és 0,8 ml 1 %-os trifenil-tetrazo-lium-klorid (TTC) oldatot injektáltunk a koszorúérbe disztálisan az elzárási ponthoz. A szívet kiemeltük és egy éjszakára -70 °C hőmérsékleten lefagyasztottuk, azután felolvasztottuk, és 2 mm vastag szeletekre vágtuk harántirányban egy elektromos szeletelő készülékkel (Rival, MO). Mindegyik szelet tömegét lemértük



és mértük a festetlen szövetek területét (infarktusos terület), és a TTC festékanyag által vörös színűre festett szövet területet (veszélyeztetett terület). A mérésekhez egy Power Mac 7300 computert (Apple, CA) és egy HP ScanJet 5p Scanner számlálót (Hewlett Packard, CA) használtunk.

A 4. Ábra adatai szerint a találmány tárgyát képező vegyülettel történt kezelés után 46 % csökkenést kaptunk az infarktus területen, mint elhalt terület / veszélyeztetett terület g--ban kifejezett százalékában.

5. Példa – az L34 kardioprotektív hatása a kutyák szívének megállása esetén

A találmány tárgyát képező vegyület mind akut, mind elnyújtott védő hatást szolgáltat kutyák esetében a szív megállása ellen. A kutyák előkezelése a találmány tárgyát képező vegyülettel 10 perccel és 24 órával az ischemia előtt szignifikáns javulást mutatott a regionális szegmens rövidítés (izom összehúzódás dinamika)visszaállásában a többszörös ische-mia/reperfúzió szív megállítási protokoll által kezelt és altatott kutyák ischemia/reperfúzió folyamatokon átment miokardiu-mában. A kutyák koszorúereit 5 alkalommal 5 percig elzártuk, amelyeket 10-10 perces reperfúzió követett, végül 2 órás re-perfúzió zárt. Az ischemiás terület regionális szisztolés izom összehúzódás dinamikáját határoztuk meg sonomicrometria segítségével, melynek során piezoelektromos kristályokat helyezünk fel a szívbelhártyában kb. 10-15 mm mélységben. Regionális miokardiális véráramlást határoztunk meg a radioaktív mikroszféra technikával az elzárási periódus első 5 percében és a 2 órán át tartó reperfúzió végén. A haemodinamikai jellemzőket és a vérgázokat mértük a kísérlet különböző időpontjaiban. Nem találtunk szignifikáns különbséget a kontrol és az előkezelt



csoport között a testtömegek, a balkamra tömegek, a veszélyeztetett terület tömegek vagy a veszélyeztetett terület bal kamra tömegére vonatkoztatott %-ok vonatkozásában. Továbbá, nem találtunk jelentős különbségeket a csoportok között a regionális miokardiális vagy transzmurális véráramlások között a nem ischemiás vagy ischemiás területeken az első elzárási szakaszban vagy a reperfúzió 2. órájában. Ezért valamennyi csoportnál hasonló mértékű ischemiát idéztünk elő az első elzárási szakaszban, és hasonló véráramlást kaptak a reperfúzió szakaszában. Az átlagos artériás vérnyomás és pulzus szignifikánsan ($p < 0,05$) magasabb volt az L34-el 10 perccel az elzárás előtt kezelt állatoknál a kontrol csoporthoz viszonyítva, azonban nem volt szignifikáns különbség a csoportok között a protokoll további adatai között. Ráadásul a vérgázok vonatkozásában nem találtunk különbséget a csoportok között.

Az L34 vegyülettel 10 perccel az első elzárás előtt történt előkezelés egy szignifikánsan jobb regenerálódást mutatott az érfal vonatkozásában (%SS), követve az első, második és negyedik elzárási szakaszt és minden időpontban mértünk a reperfúzió utolsó két órájában, ahogy összehasonlítottuk a kontroll csoporttal. (5. ábra) Hasonlóan, az L34 vegyülettel történt 24 óra előkezelés egy szignifikánsan jobb regenerálódást mutatott a sejtfal vonatkozásában (%SS), követve az első, második és negyedik elzárási szakaszt és minden időpontban mértünk a reperfúzió utolsó két órájában, ahogy összehasonlítottuk a kontroll csoporttal (6. ábra)

7. Példa – Az L34 vegyület hatása a TNF- α és IL-8 kiválasztásra a THP-1 sejtekben.

A humán myelomonocita sejtvonalat általánosan használják különböző vegyületek proinflammatory státuszának analízisére. A THP-1 sejtek (American Type Culture Collections, ATCC, katalógusszám: 202-TIB) az RPMI 1640-ben növesztették, 10 % hővel inaktivált kolosztrummentes borjú szérum (FBS) és 2×10^{-5} M β -merkaptó-etanol adtuk úgy, hogy a sejtsűrűség $4 \times 10^5 - 7 \times 10^5$ között legyen. A sejteket elválasztottuk a táptalajról, újraszuszpendáltuk 1×10^6 sejt/ml koncentrációban RPMI 1640 táptalajon, amely 5 % kolosztrummentes borjú szérumot tartalmazott. Az újraszuszpendált sejteket azután átpipettáztuk egy steril egyszer használatos polisztirol 150 x 25 mm petricsészébe és kezeltük egy természetes, érlelődést elősegítő anyaggal, az $1 \alpha, 25$ -dihidroxi- D_3 vitaminnal 1×10^{-7} koncentrációban 24-72 óráig az érlelés kívánt fokától függően. Az így előkezelt sejteket háromszor mostuk RPMI 1640-ben, amely 2-10 % kolosztrummentes borjú szérumot tartalmazott. A harmadik mosás után a sejteket újraszuszpendáltuk 5 % kolosztrummentes borjú szérumot és 2 % humán AB szérumot (Irvine Scientific) tartalmazó RPMI 1640-ben 5×10^5 sejt/ml koncentrációban, majd átpipettáztuk egy 24 lyukú sima aljú polisztirol lemezbe, lyukanként 2 ml szuszpenziót használva. Az L34 különböző koncentrációival történő inkubálás után a felülúszókat centrifugálással összegyűjtöttük, 4, 16, 24 óra inkubálás után aliquot részekre osztottuk és -70 °C hőmérsékleten tároltuk amíg a proinflammatory citokineket teszteltük. A citokin koncentrációt kvantifikáltuk a THP-1 felülúszókban, standard humán citokin ELISA kitet használva a fejlesztő laboratóriumból. A meghatározás a gyártó instrukciói alapján történt. Az L34 nem indukált detektálható



mennyiségű TNF- α -t vagy THP-1 által történő IL-8 kiválasztást 1 ng/ml és 10 μ g/ml közötti koncentrációkban.

8. Példa – L34 hatása nyulak hőemelkedésére

A találmány tárgyát képező vegyületet megvizsgáltuk pirogenitásra, az USP által előírt standard 3 nyúl pirogén tesztet (NAMSA, Northwood OH) használva 10 és 1000 μ g/kg közötti dózis szinteken. 3 nyulat kezeltünk intravénásan, a gyógyszert 40 % propilén-glikolt, 10 % etanolt tartalmazó vízben oldottunk, különböző dózisokban használtuk, felhasználás előtt 1:1 arányban hígítottuk D5W oldattal. Valamennyi állat testhőmérsékletét monitoroztuk 4 órán át. A pirogén dózist és a határdózist az USP definíciók alapján állapítottuk meg. Bármilyen mértékű hőmérséklet csökkenést korigáltunk. Egyedi hőmérséklet emelkedés, amely nem haladta meg a 0,5 °F értéket fogadtuk el nem-pirogén anyagnak. A határ pirogén dózist az értéket választottuk, ahol legalább a három közül egy nyúl hőmérsékletemelkedése $\geq 0,5^{\circ}\text{C}$ három órával az adagolás után.

E teszt eredményeit a 2. Táblázatban közöljük. A kívánalmaknak megfelelően a találmány tárgyát képező vegyület nem bizonyult pirogénnek egyetlen vizsgált dózis esetén sem.

2. Táblázat

Az L34 pirogenitása

L34 dózis $\mu\text{g}/\text{kg}$					
10	20	30	40	60	80

Átlag hőmérséklet emelkedés					
0,14	0,17	0,17	0,00	0,10	0,13

L34 dózis $\mu\text{g}/\text{kg}$					
120	160	240	360	480	500
1000					

Átlag hőmérséklet emelkedés					
0,23	0,17	0,00	0,30	0,06	0,12
0,10					

Hangsúlyozzuk, hogy az itt leírt példák és adatok csupán bemutató cézzal szerepelnek, és annak fényében különböző módosításokat és változásokat javasolunk a témában jártas és az irodalmat ismerő személyeknek, és azoknak, akik a jövőben szerzik meg e tudást, és szélesítik ezen alkalmazást és az igénypontok körét.

Referenciák

Bensard, D.D., J.M. Brown, B.O. Anderson, A. Banerjee, P.F. Shanley, M.A. Grosso, G.J. Whitman és A.H. Harken (1990) Az endogén szövet antioxidáns enzim aktivitás csökkenti a miokardiális reperfúziós sérülést.

J. Surg. Res. 49(2): 126-131.

Berg, J.,R. Allison és A. Taylor. (1990) Az endotoxin kiterjeszti a felnőtt egerek túlélését hypoxia esetén.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med 193: 167-170.

Brown J.M. és mt.-i: Az endotoxin előkezelés növeli az endogén miokardiális kataláz aktivitást és csökkenti az ischemia/reperfúzió által okozott sérülést izolált patkány szíven.

Proc. Natl. Acad. Sci. 86: 2516-2520

Elliot, amerikai egyesült államokbeli szabadalom No. 5,286,718.

Elliot G. (1998) A Monophosphoryl Lipid A egy tartós előkezelést indukál a szív ischemia/reperfúzió sérülés esetén.

J. Mol. Cell Cardiol. 30:3-17.

Maulik N., M. Watanabe, D. Engelman, V. E. Kagan, E. Kisin, V. Tyurin, G. A. Cordis, és D. K. Das. (1995) Az ischemia miokardiális adaptálása az endotoxin által kiváltott oxidatív stresszhez.

Am. J. Physiol. 269:C907-C916

Mizumura, T.,K.Nithipatikom and G.J.Gross (1995) Bimakalim, egy ATP érzékeny káliumcsatorna nyitó anyag, amely

utánozza az ischemiás előkezelés infarktus méretet csökkentő hatásait, az adenzin kibocsátást és a neutrofil funkciókat kutyákban.

Circulation 92: 1236-1245

Szabadalmi igénypontok

1. Az (1) képletű foszfoglikolipid vagy gyógyszerészetileg elfogadható sója.

2. Eljárás az ischemia periódusát követő, a szervekhez vagy szövetekhez tartó véráramlás reperfúziója által okozott, állatokban előforduló szervi vagy szöveti sérülés javítására, amelynek során az (1) képletű foszfoglikolipid vagy gyógyszerészetileg elfogadható sója hatékony mennyiségét adjuk az állatnak.

3. A 2. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett foszfoglikolipidet az állatnak az ischemiát megelőző mintegy 24 órán át adjuk.

4. A 2. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett foszfoglikolipidet az állatnak az ischemia alatt adjuk.

5. A 2. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett foszfoglikolipidet az állatnak a reperfúzió alatt adjuk.

6. A 2. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett foszfoglikolipidet az állatnak parenterálisan vagy orálisan adjuk.

7. A 2. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett foszfoglikolipidet az állatnak intravénásan adjuk.

8. A 2. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett foszfoglikolipidet az állatnak bolus formájában adjuk.

9. A 2. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett foszfoglikolipidet az állatnak infúzió formájában adjuk.

10. A 2. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett foszfoglikolipidet az állatnak bolus, majd infúzió formájában adjuk.

11. A 2. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett foszfoglikolipidet az állatnak bolus formájában intravénásan, majd infúzió formájában adjuk.

12. A 2. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett foszfoglikolipidet az állatnak bolus formájában 1-1000 μg /testtömeg kg mennyiségben adjuk.

13. A 2. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett foszfoglikolipidet az állatnak bolus formájában 10-300 μg /testtömeg kg mennyiségben adjuk.

14. A 2. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett foszfoglikolipidet az állatnak bolus formájában 35-100 μg /testtömeg kg mennyiségben adjuk.

15. A 2. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett ischemia és az azt követő reperfúzió olyan orvosi beavatkozás során következik be mint az artéria lekötésével járó műtétek, szívsebészeti műtétek, szervátültetések, szövet átültetések, plasztikai műtétek, bőrátültetés és bél reszekció.

16. A 2. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett ischemia és az azt követő reperfúzió olyan események során következik be, mint a miokardiális infarktus, agyvérzés, fulladás, bélelhalás, traumás végtagamputálás és visszaültetés.

17. Az (1) képletű foszfoglikolipidet tartalmazó gyógyszerészeti készítmény vagy gyógyszerészetileg elfogadható sója egy gyógyszerészetileg elfogadható vivőanyaggal együtt.

18. A 17. igénypont szerinti gyógyszerészeti készítmény azzal jellemezve, hogy gyógyszerészeti vivőanyagként injekció gyártására alkalmas vizet, polietilén-glikolt, propilén-glikolt és etanolt, olaj-a-vízben emulziókat, liposzómákat és felületaktív anyagot tartalmazó vesiculumot alkalmazunk.

19. A 17. igénypont szerinti gyógyszerészeti készítmény azzal jellemezve, hogy gyógyszerészeti vivőanyagként propilén-glikol és etanol injekció gyártására alkalmas vizes oldatát alkalmazzuk.

20. A 17. igénypont szerinti gyógyszerészeti készítmény azzal jellemezve, hogy gyógyszerészeti vivőanyagként 40 v/v % propilén-glikol és 10 v/v % etanol injekció gyártására alkalmas vizes oldatát alkalmazzuk.

21. Eljárás az ischemia periódusát követő, a szervhez vagy a szövethez tartó véráramlás reperfüziója által előidézett szervi vagy szöveti sérülés kezelésére alkalmas gyógyszer akut védőhatásának kiterjesztésére, amelynek során a gyógyszert bolus, majd azt követően infúzió formájában adjuk az állatnak.

22. A 21. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett gyógyszer az (1) képletű foszfoglikolipid vagy gyógyszerészetileg elfogadható sója.

23. A 22. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett gyógyszert bolus formájában mintegy 1-1000 μg /testtömeg kg mennyiségben, majd infúzió formájában mintegy 1-100 μg /testsúly kg/óra mennyiségben adjuk az állatnak.

24. A 22. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett gyógyszert bolus formájában mintegy 10-300 μg /testtömeg kg mennyiségben, majd infúzió formájában mintegy 1-100 μg /testsúly kg/óra mennyiségben adjuk az állatnak.

25. A 22. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett gyógyszert bolus formájában mintegy 35-100 μg /testtömeg kg mennyiségben, majd infúzió formájában mintegy 4-40 μg /testtömeg kg/óra mennyiségben adjuk az állatnak.

26. Eljárás az indukálható nitrogén-oxid szintetáz indukálására azzal jellemezve, hogy az (1) képletű foszfoglikolipid vagy gyógyszerészetileg elfogadható sója

hatékony mennyiségét adjuk olyan állatnak, amely képes a nitrogén-oxid szintetáz termelésére.

A meghatalmazott

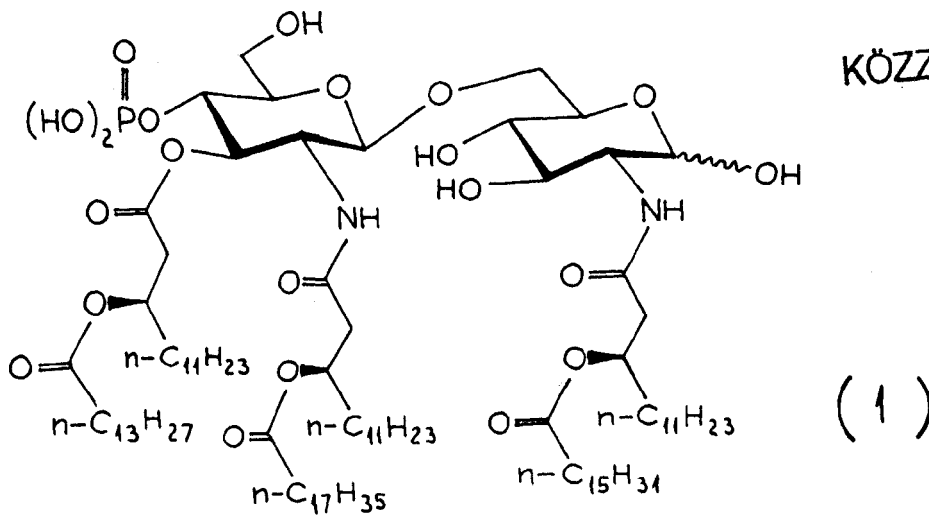
ifj. Szentpéteri Ádám

szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Nemzetközi
Szabadalmi Iroda tagja
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
Telefon: 34-24-950; Fax: 34-24-923

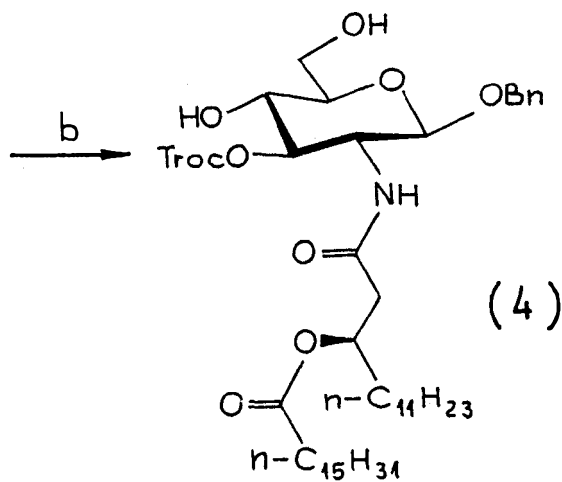
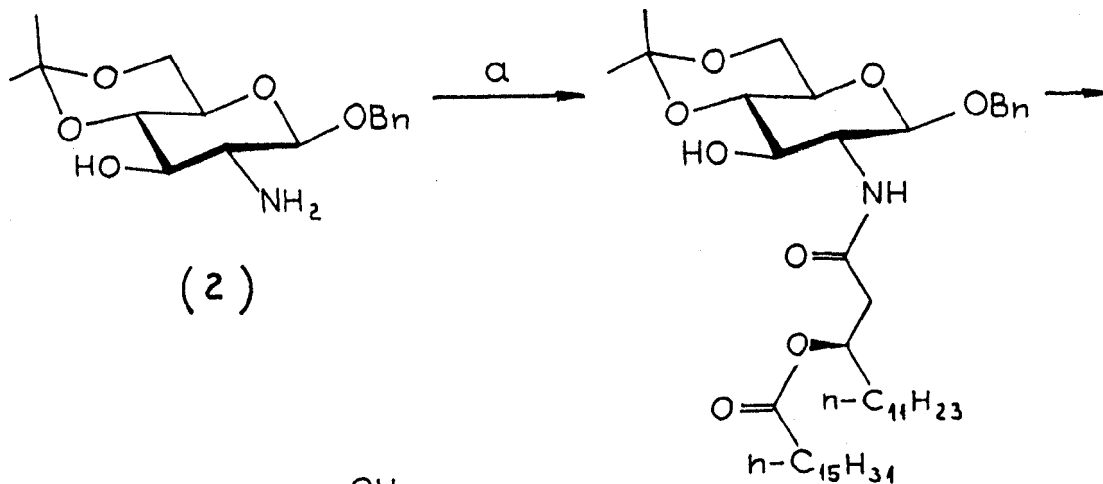
9 oldal nézzel

*2001. 12. 07
PK*

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



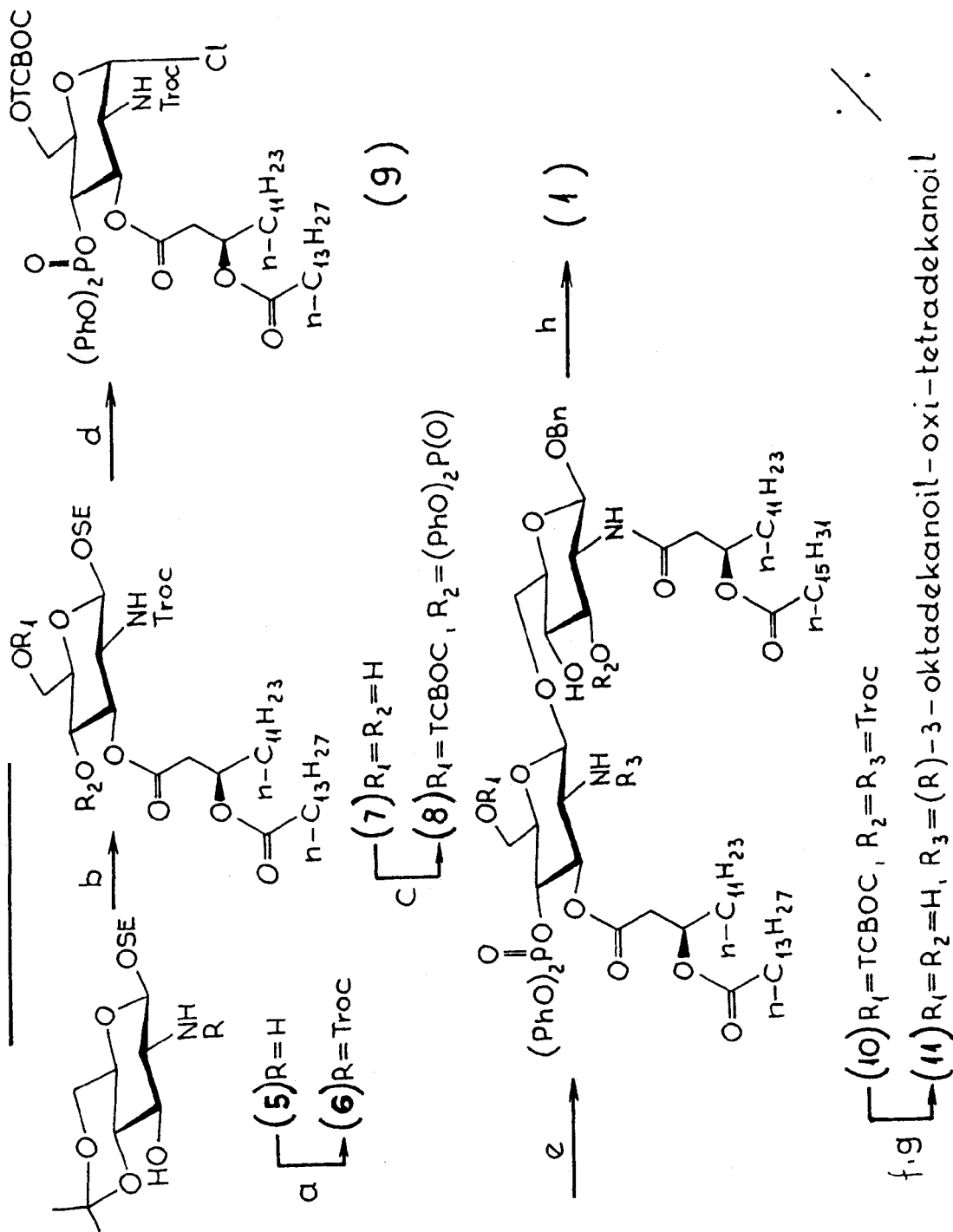
1. Reakcióvázlat



(a) (R)-3-hexadekanoil-oxi-tetradekánsav, EDC·MeI, CH₂Cl₂;

(b) Troc-Cl, DMAP, piridin, CH₂Cl₂; majd 80% vizes AcOH, 60°C-on

2. Reakcióvázlat

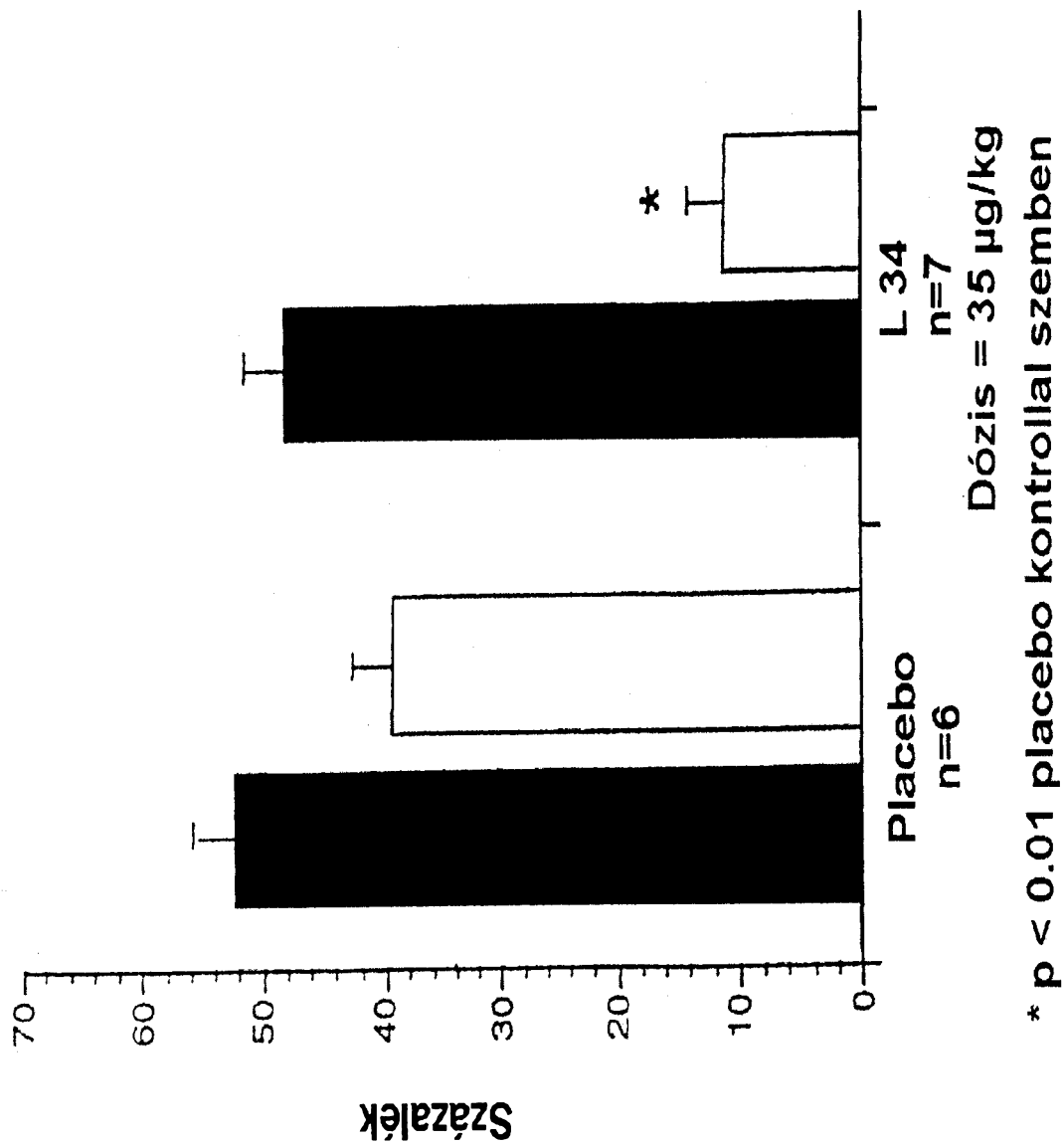


Pa1 3473

08010

4/9

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



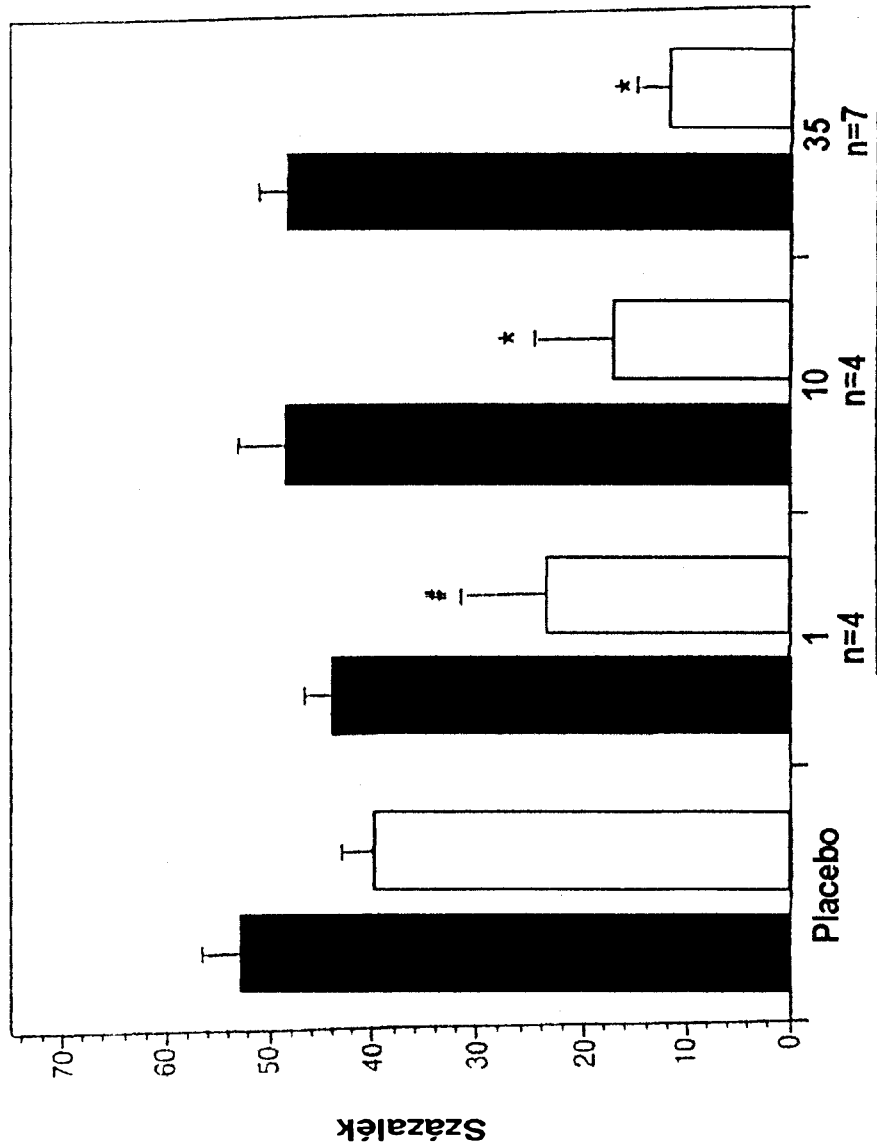
1. ábra

Pa1 3473

08010

5/9

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



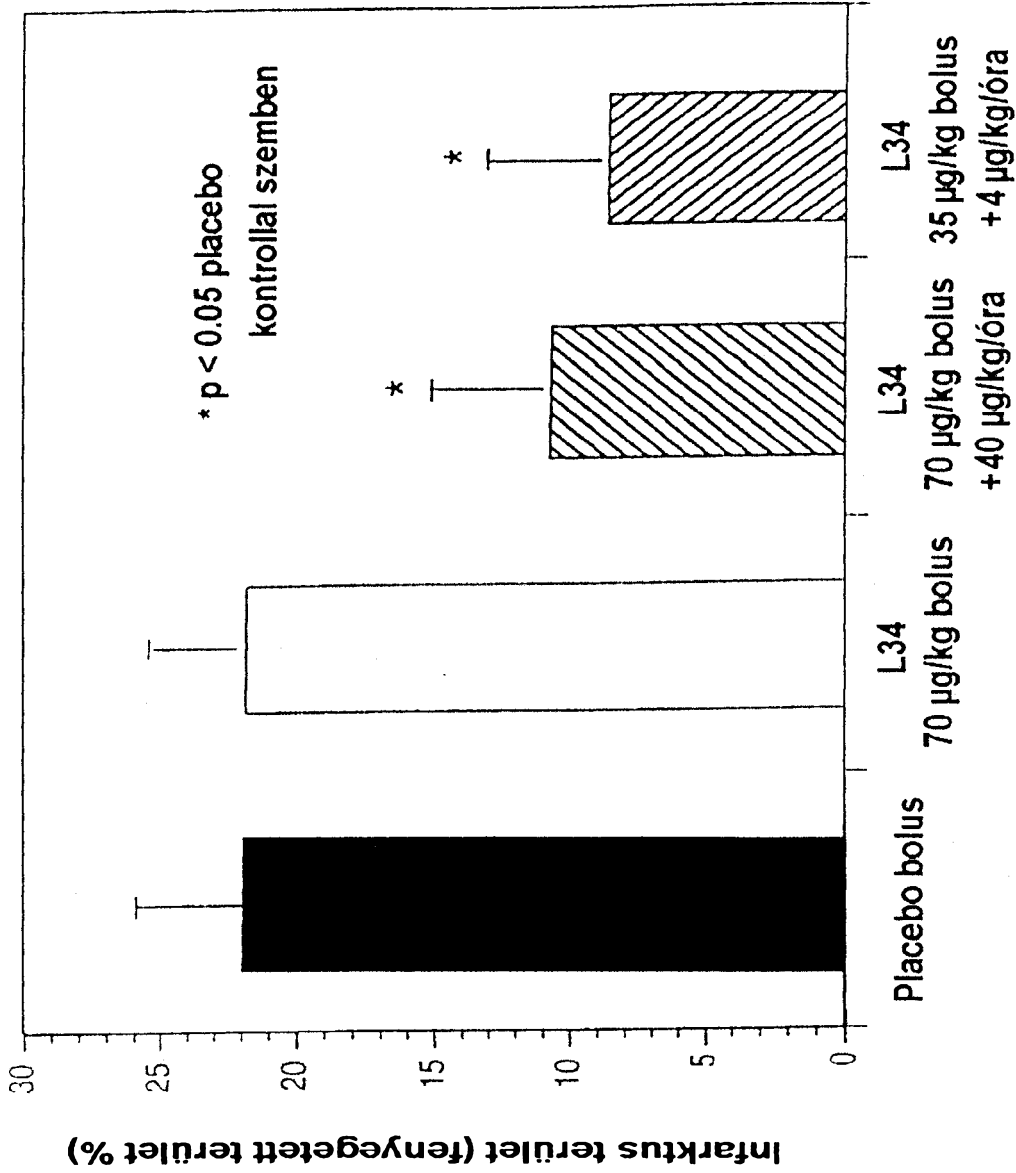
Dózis µg/kg-ban kifejezve

* p < 0.01 placebo kontrollal szemben

p < 0.05 placebo kontrollal szemben

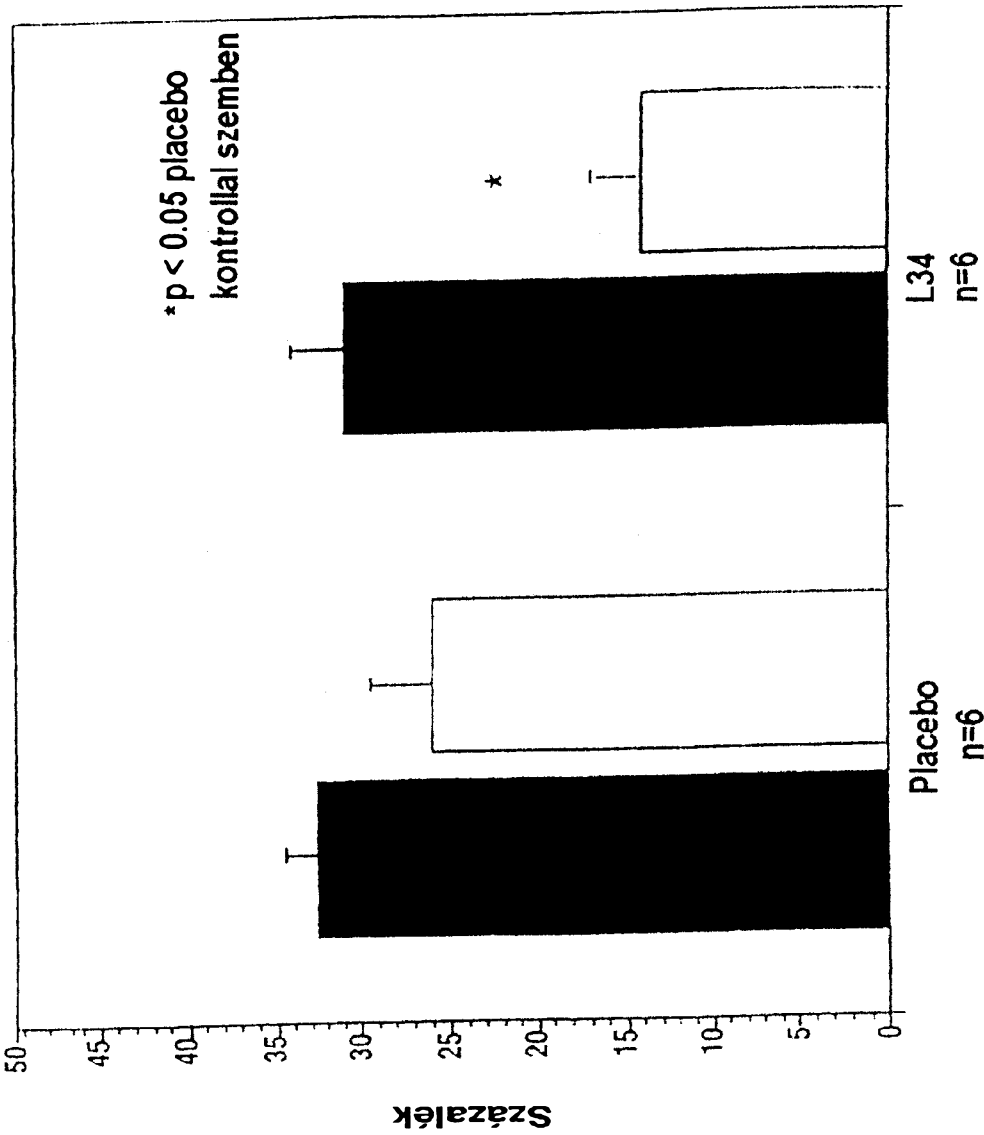
2. ábra

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



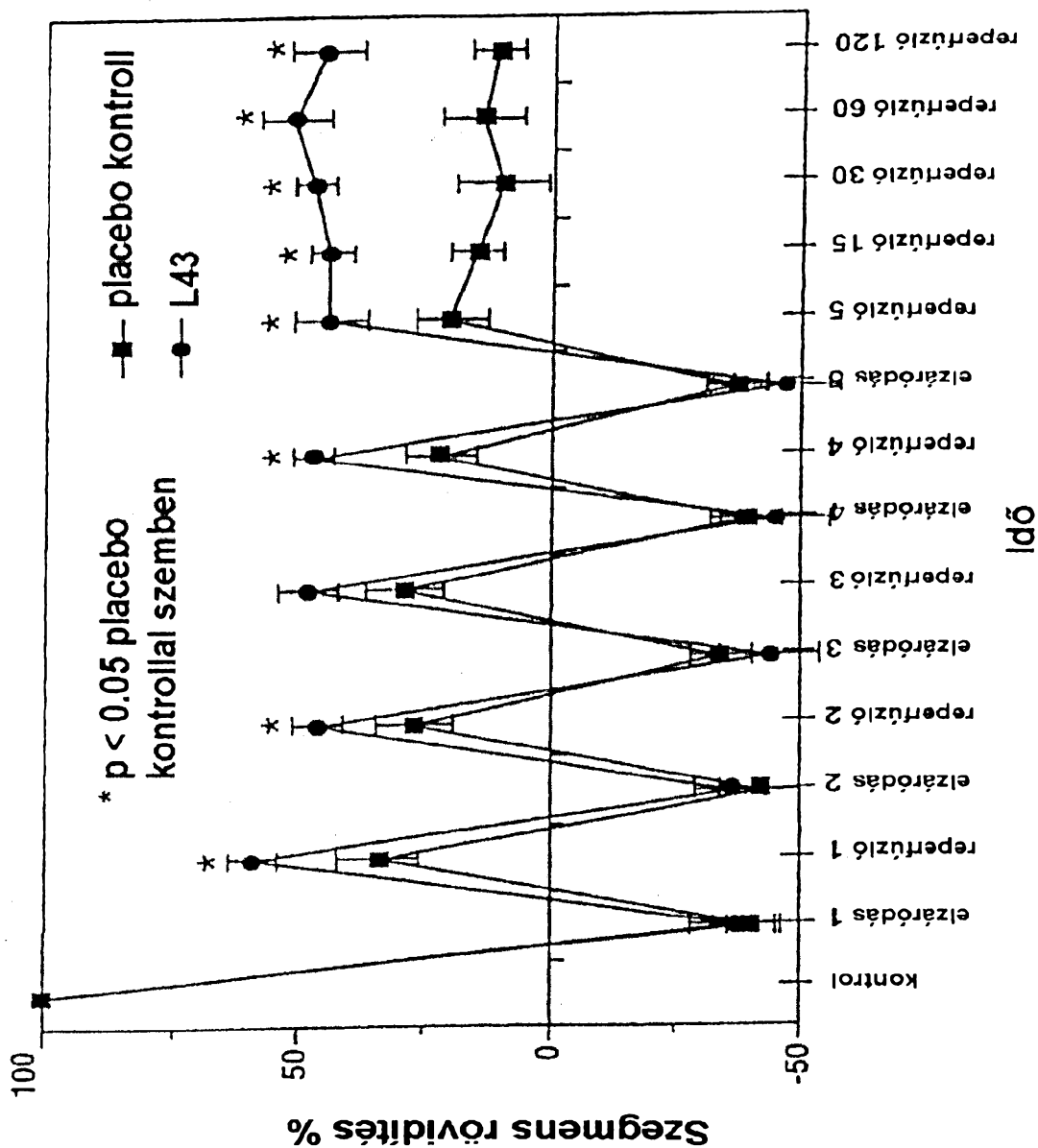
3. ábra

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



4. ábra

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



Idő

5.ábra

