

P0700038



~~SEJTBURJÁNZÁS CSÖKKENTÉSE (3R,4R)-~~

~~-TETRAHIDROKANNABINOL-11-KARBONSAVAK ALKALMAZÁSÁVAL~~

sejtburjázás mérséklésére szolgáló gyógyszerkészítmények előállítására

KIVONAT

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

A találmány tárgya kannabinoid-vegyületek (a tetrahidrokannabinol származékai) alkalmazására vonatkozik emlősből a sejtburjázás csökkentésére, *szolgáló gyógyszerkészítmény előállítására.*

Közelebbről a találmány ~~egy módszer sejtburjázás csökkentésére emlősből,~~

~~amely a következő lépéseket tartalmazza: azonosítunk egy olyan emlőst,~~

~~amelynél előnyös a sejtburjázás mérséklése, majd az emlősnek a sejtburján-~~

~~zást hatékonyan csökkentő mennyiségben egy (II) általános képletű vegyületet~~
alkalmazására vonatkozik.
~~adagolunk, ahol a képletben~~

R^1 jelentése hidrogénatom, $-\text{COCH}_3$ vagy $-\text{COCH}_2\text{CH}_3$;

R^2 jelentése egy elágazó szénláncú C_{5-12} alkilcsoport, mely egy terminális aromás gyűrűt tartalmaz, vagy egy elágazó $-\text{OCHCH}_3(\text{CH}_2)_m$ alkil-csoport, mely egy terminális aromás gyűrűt tartalmaz, és ahol $m = 0-7$;

R_3 jelentése hidrogénatom, C_{1-8} alkil- vagy C_{1-8} alkanolcsoport;

Y jelentés nélküli vagy jelentése egy áthidaló NH-csoport vagy oxigénatom;

azzal a kikötéssel, hogy amennyiben Y jelentése oxigénatom és R_2 jelentése elágazó C_{5-12} alkilcsoport, akkor R_3 jelentése $-\text{CHCH}_3$ csoporttól eltérő.

Jellemző képlet (II)

Mc

P0700038

A2



~~SEJTBURJÁNZÁS CSÖKKENTÉSE (3R,4R)-~~

~~-TETRAHIDROKANNABINOL-11-KARBONSÁVAK ALKALMAZÁSÁVAL~~

sejtburjánzás mérséklésére szolgáló gyógyszerkészítmények előállítására

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

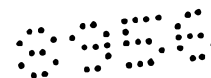
A találmány tárgyát egy olyan módszer képezi, mellyel a sejtburjánzás csökkenthető egy emlősben.

A Cannabis növényben található pszichoaktív anyag a tetrahidrokannabinol (THC). A THC a pszichoaktivitásán kívül még számos élettani hatással bír (pl. mint gyulladáscsökkentő vagy fájdalomcsillapító), ezért a vegyület számos származéka – amely megtartja a THC kedvező biokémiai vagy farmakológiai aktivitását a hozzászokás lehetősége vagy a pszichoaktív hatás nélkül – hasznosan alkalmazható és ezeket lehetséges gyógyszerként szintetizálták.

A THC és néhány származékához kapcsolódó egyik ilyen aktivitás a sejtburjánzás gátlása. Azonban ez a hatás is – a pszichoaktivitáshoz hasonlóan – a CB1 kannabinoid-receptorhoz való kötődéstől függ (Galve-Ropert és mts., Nat. Med., 2000, 6: 313-319. oldalak; De Petrocellis és mts., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, 95: 8375-8380. oldalak; és Bisogno és mts., Eur. J. Biochem., 1998, 254: 634-642. oldalak). Utóbbi miatt a THC nem pszichoaktív származékai – melyek nem kötődnek a CB1-receptorhoz – várhatóan nem gátolják a sejtburjánzást.

A találmány azon a felfedezésen alapul, hogy a nem pszichoaktív THC-származékok – pl. a THC-savak – képesek a sejtburjánzás csökkentésére. Ez a hatás nem függ az apoptózis ütemének fokozódásától, melyet a THC CB1-receptor által közvetített aktivitásaként azonosítottak (Sanchez és mts., FEBS Lett., 1998, 436: 6-10. oldalak).

Ennek megfelelően a találmány fő tárgya egy módszer sejtburjánzás csökkentésére emlősben (például emberben), amelyben azonosítunk egy olyan emlőst, amelynél előnyös a sejtburjánzás mérséklése, majd az emlősnek a sejtburjánzást hatékonyan csökkentő mennyiségben egy (I) általános képletű vegyületet adagolunk, ahol a képletben



R^1 jelentése hidrogénatom, $-\text{COCH}_3$ vagy $-\text{COCH}_2\text{CH}_3$ és R^2 jelentése egy elágazó szénláncú C_{5-12} alkilcsoport. Az R^1 lehet hidrogénatom és R^2 lehet egy C_9 alkilcsoport, amely lehet egy elágazó alkilcsoport, pl. az 1,1-dimetilheptil.

A találmány egy további tárgya egy módszer sejtburjánzás csökkentésére emlősen (például emberben), amelyben azonosítunk egy olyan emlőst, amelynél előnyös a sejtburjánzás mérséklése, majd az emlősnek a sejtburjánzást hatékonyan csökkentő mennyiségben egy (II) általános képletű vegyületet adagolunk, ahol a képletben

R^1 jelentése hidrogénatom, $-\text{COCH}_3$ vagy $-\text{COCH}_2\text{CH}_3$;

R^2 jelentése egy elágazó szénláncú C_{5-12} alkilcsoport, mely egy terminális aromás gyűrűt tartalmaz, vagy egy elágazó $-\text{OCHCH}_3(\text{CH}_2)_m$ alkil-csoport, mely egy terminális aromás gyűrűt tartalmaz, és ahol $m = 0-7$;

R_3 jelentése hidrogénatom, C_{1-8} alkil- vagy C_{1-8} alkanolcsoport;

Y jelentés nélküli vagy jelentése egy áthidaló NH-csoport vagy oxigénatom;

azzal a kikötéssel, hogy amennyiben Y jelentése oxigénatom és R_2 jelentése elágazó C_{5-12} alkilcsoport, akkor R_3 jelentése $-\text{CHCH}_3$ csoporttól eltérő.

A (II) általános képletű vegyület előnyös formái azok, amelyekben R_1 jelentése hidrogénatom, R_2 jelentése 1',1'-dimetilheptil-csoport és Y jelentés nélküli. Ezek az előnyös vegyületek a (III) általános képlettel írhatóak le, ahol a képletben R jelentése lehet hidrogénatom, elágazó vagy egyenes szénláncú C_{1-8} alkil- vagy elágazó vagy egyenes szénláncú C_{1-8} alkanolcsoport. Egy másik előnyös formában az R jelentése metil- vagy metanolcsoport, vagy egy elágazó vagy egyenes etil, propil, etanol vagy propranol.

A vegyületet adagolhatjuk szájon át (pl. mint étrend-kiegészítőt), szisztémásan, intravénásan vagy egy implantátumon keresztül, amely a vegyület nyújtott leadását biztosítja. Ezen kívül a vegyületet adagolhatjuk egy sejtburjánzással jellemezhető előzetes betegség vagy állapot kezelésére, vagy utóbbiak megelőzésére. A vegyületet egy emlősnek adagolhatjuk kb. 0,1-20 mg/kgtesttömeg dózisban (pl. kb. 0,2-2 mg/kgtesttömeg) a sejtburjánzás hatékony csökkentésére. A módszer különösen hasznos daganatos betegségben szenvedő emlős kezelésére.



Ezen kívül egy sejtet a vegyülettel in vitro is kezelhetünk a sejtburjánzás csökkentése vagy megszüntetése céljából.

A jelen alkalmazásban a „sejtburjánzás” kifejezés sejtszámnövekedést jelent. A „sejtburjánzás csökkentése” alatt olyan sejtburjánzás-csökkenést értünk, melyet nem kizárólagosan az apoptózis fokozódása okoz.

A jelen alkalmazásban az „alkil” egy egyenes vagy elágazó szénhidrogénláncot jelent, amely szénatomokat vagy gyűrűs szénhidrogén-csoportokat tartalmaz. Ezek az alkilcsoportok tartalmazhatnak még egy vagy több kettős-, vagy hármaskötést is. A „helyettesített alkilcsoport” egy olyan alkilcsoport, melyben egy atomot egy másik atommal – pl. kén-, oxigén- vagy halogén-atommal – helyettesítünk.

A találmány szerinti módszer a nem pszichoaktív kannabinoid vegyületek gyógyszerként való új alkalmazását teszi lehetővé a sejtburjánzással járó állapotok vagy betegségek (pl. a rákbetegség) kezelésére vagy megelőzésére. Az ilyen kannabinoidokat – alacsony toxicitásuk, nem pszichoaktív jellegük és a hozzászokás alacsony kockázata miatt – étrendkiegészítőként használhatjuk (pl. mint egy naponta szedett vitamintablettát) a daganat megelőzésére. Ezen kívül a vegyületeket alkalmazhatjuk bőrön át is, pl. egy kóros sejtburjánzással jellemezhető bőrbetegség, mint például a pszoriázis esetén.

Az alábbiakban használatos technikai és tudományos fogalmak – ha másképpen nincs meghatározva – azonosak a találmány fogalmi körében a szakemberek által szokványosan használatosakkal. Noha az alábbiakban ismertetjük a jelen találmány tesztelésére vagy gyakorlati használatára alkalmas módszereket és anyagokat, egyéb, a szakemberek számára jól ismert módszereket és hasonló vagy ekvivalens anyagokat is alkalmazhatunk. Valamennyi publikációt, szabadalmi bejelentést, szabadalmat és egyéb hivatkozásokat teljes terjedelmükben alkalmazzuk. Probléma esetén a jelen specifikációk – ideértve a meghatározásokat is – a döntőek. Ezen kívül az alkalmazott anyagok, módszerek és példák csak szemléltető és nem korlátozó jellegűek.

A találmány egyéb jellegzetességei és előnyei nyilvánvalóak lesznek a következő részletes leírás és a szabadalmi igénypontok alapján.



Az ábrák rövid ismertetése

Az 1. ábra egy vonaldiagramm, amely a különböző vegyületek koncentrációját a sejtszám függvényében ábrázolja.

A 2. ábra egy oszlopdiagramm, amely az ajulénsav koncentrációját a sejtszám függvényében ábrázolja.

A 3. ábra egy vonaldiagramm, amely a különböző vegyületek koncentrációját az 1 millió sejtben észlelhető neutrális lipidek mennyiségének függvényében ábrázolja.

A 4. ábra egy vonaldiagramm, amely az inokulációt követő napok számát a daganat átmérőjének függvényében ábrázolja.

A találmány részletes ismertetése

A találmány a sejtburjánzás csökkentésének egy módszerére (pl. daganatkezelésre) vonatkozik egy emlősben, egy THC-származék adagolása által. Ezek a THC-származékok [pl. az (I), (II) és (III) általános képlettel meghatározottak] nem, vagy csak kis mértékben pszichoaktívak és nem kötődnek a CB1-receptorhoz. Ezek a THC-származékok ismertek és szintetizálhatók (lásd pl. US 5 338 753 szabadalmi leírást: Burnstein és mts., J. Medicinal Chem., 1992, 35: 3185-3141. oldalak; és Burnstein, Pharmacol. Ther., 1999, 82: 87-96. oldalak).

A THC-származékokat adagolhatjuk bármely arra alkalmas módon, pl. intravénásan, intraarteriálisan, bőrön keresztül, injekcióval, intraperitoneálisan, intrapleurálisan, szájon át, szubkután, intramuszkulárisan, szublingválisan, intraepidermálisan vagy rektálisan. A formuláció lehet oldat, szuszpenzió, kúp, tabletta, granulátum, por, kapszula, kenőcs vagy krém formájában. Ezen gyógyászati készítményekhez hozzáadhatunk még egy oldószert (pl. vizet vagy fiziológiás sóoldatot), egy szolubilizáló anyagot (pl. etanolt, poliszorbátokat vagy Cremophor EL7-et), izotóniát elősegítő anyagot, egy tartósítószert, egy antioxidánst, egy segédanyagot (pl. laktózt, keményítőt, kristályos cellulózt, mannitot, maltózt, kalcium-hidrogénfoszfátot, könnyű szilíciumsav-anhidridet vagy kalcium-karbonátot), egy kötőanyagot (pl. keményítőt, polivinil-pirrolidont, hidroxipropil-cellulózt, etil-cellulózt, karboximetil-cellulózt vagy gumiarabikumot),

egy kenőanyagot (pl. magnézium-sztearátot, talkumot vagy keményített olajokat) vagy egy stabilizátort (pl. laktózt, mannitot, maltózt, poliszorbitet, makrogolokat vagy polioxietilénnel keményített kasztorolajat). Szükség esetén hozzáadhatunk még glicerint, dimetilacetamidot, 70%-os nátrium-laktátot, egy felületi feszültségnövelőt vagy egy bázikus anyagot, pl. nátrium-hidroxidot, etiléndiamint, etanolamint, nátrium-hidrogén-karbonátot, arginint, meglumint vagy triszamino-metánt. Utóbbi összetevőkkel gyógyászati készítményeket állíthatunk elő, pl. oldatokat, tablettákat, granulátumokat vagy kapszulákat. A vegyület lassú leadására alkalmas készítményeket a US 4 880 830 számú szabadalmi iratban leírtaknak megfelelően készíthetjük el.

A jelen találmány szerinti vegyületek dózisát az állatkísérletek és számos egyéb körülmény figyelembevételével határozzuk meg. A még specifikusabb dózisok nagysága függhet az alkalmazás módjától, az egyén állapotától, pl. korától, testtömegétől, nemétől, érzékenységétől, az elfogyasztott ételtől, a dózisok közötti időtől, az egyidejűleg adott egyéb gyógyszerektől és a betegség eredetétől, súlyosságától és fázisától. Egy adott állapotban az optimális dózist és alkalmazási gyakoriságot a szakorvos által használt megfelelő adagolási teszttel határozhatjuk meg, amely a fenti irányvonalakon alapul.

Az emberben való alkalmazás előtt a THC-származékok biológiai aktivitását (pl. a sejtburjánzás csökkentését) in vitro és in vivo is vizsgálhatjuk. Az in vitro vizsgálatokat elvégezhetjük az alábbi példában és Marshall és mts. közleményében – Growth Reg., 1995, 5: 69-84. oldalak – leírtak szerint. A daganatnövekedés in vivo modelljei jól ismertek, melyek leírását megtalálhatjuk Nagane és mts. – Cancer Res., 2000, 60: 847-853. oldalak – és Price és mts. – Clin. Cancer Res., 1999, 5: 845-854. oldalak – cikkeiben.

A találmány további leírását megtalálhatjuk a következő példákban, melyek nem korlátozzák a találmánynak a szabadalmi igénypontokban meghatározott oltalmi körét. Az alábbi példa az 1',1'-dimetilheptil- Δ^8 -THC-11-karbonsav (szintén ismert, mint CT3 vagy ajuleminsav) használatát szemlélteti a sejtburjánzás csökkentésében.

Példa

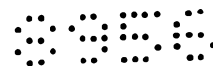
Anyagok és módszerek

Sejtek és anyagok: A C6 és U87 gliomasajeteket az ATCC-től (Manassas, VA) szereztük be. Az egyéb humán sejtvonalak tenyésztését és fenntartását az Onkológiai Központ Daganatbankjában végeztük. A WI38 sejtek a Massachusetts Egyetem Orvosi Központjának Szövettenyésztő Laboratóriumából (Worcester, MA) származnak. Valamennyi vegyszert és oldószert – ha másképpen nem jeleztük – a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) cégtől vásároltuk. A THC-t és THC-11-karbonsavat a NIDA biztosította. Az ajuleminsavat Burnstein és mts. – J. Medicinal. Chem., 1992, 35: 3185-3141. oldalak – módszere szerint szintetizáltuk.

Sejtburjánzás vizsgálatok: A sejtszám in vitro változásának meghatározását az MTT-tesztel végeztük Marshall és mts. – Growth reg., 1995, 5: 69-84. oldalak – leírásának megfelelően.

Flow-citometria/sejtciklus analízis: a flow-citometria céljára a sejteket alacsony szérumtartalmú (0,5%) közegben növesztettük két napig a sejtek G0/G1 fázisban való szinkronizálása miatt, melyet követően a sejteket áthelyeztük magas szérumtartalmú közegbe (10%). Ezután a sejteket propidium-joddal jeleztük és 4%-os paraformaldehidben fixáltuk. Meghatároztuk a sejtek DNS tartalmát MoFlo FACS sejtszeparáló segítségével.

Lipidbeépülés vizsgálata. A sejtek kezelését a következő módon végeztük: a C-6 sejtek egyrétegű tenyészetét 24-lyukú tenyésztőedényekben a fentiekben leírtak szerint hoztuk létre. ¹⁴C-jelzett arachidonsavat (150 000 dpm/lyuk) [ARC, St. Louis, MO (specifikus aktivitás 55 mCi/mmol)] adtunk a sejtenyészethez, melyet ezután két órán át inkubáltunk. Az adott kannabinoid vegyülettel való kezelés elindításakor a vegyületet 10 µl DMSO-ban hozzáadtuk a sejtenyészethez 1 ml tenyésztőközeghez, majd a kezelést további 48 óráig folytattuk (kivéve, ha másképpen nem jeleztük). Az inkubálás végén a közeget eltávolítottuk, a sejteket kétszer mostuk 1 ml PBS-el, majd a sejtlipideket szobahőmérsékleten 1 órán át extraháltuk 0,5 ml abszolút etanolban. Valamennyi kezelést négy párhuzamos mintában végeztünk. A kontroll sejteket azonos módon tartottuk kannabinoid vegyület hozzáadása nélkül.



Az extrahált lipidek csoportos vizsgálata céljából a mintákat liofilizáltuk. A vákumlepirálás előtt visszanyerési markerként a mintákhoz ^{14}C -koleszterint (50 000 dpm) adtunk (ARC, St. Louis, MO; specifikus aktivitás 50 mCi/mmol). A beszárított mintákat feloldottuk 30 μl metanolban – amely egyaránt 10 μg szteroil-arachidonol-digliceridet, trioleint és lecitin tartalmazott –, majd felvittük 0,25 mm-es szilikagél vékonyréteglemezekre. Az első elúciót a neutrális lipidek vizsgálatára 9:1 arányú diklórmétán-aceton keverékével végeztük. A standardok R_f értékei a következők voltak: lecitin = 0; koleszterin = 0,38; diglicerid = 0,64 és triglicerid = 0,81. A neutrális lipidek mennyiségi meghatározása után a második elúciót a foszfolipidek vizsgálatára 50:25:8:4 arányú kloroform:metanol:ecetsav:víz keverékével végeztük. A lecitin R_f értéke 0,33 volt, míg a DG és a TG az oldószerfrontba távozott. Valamennyi standardot jódgőz segítségével azonosítottuk.

A jelzett lipidek mennyiségének meghatározását a következő módon végeztük. A radioaktív foltok azonosítására a lemezekre 48 órán át röntgenfilmet helyeztünk. A Fluor-S System (Biorad) segítségével létrehoztuk a filmek TIFF számítógépes fájljait. A kromatogramok mennyiségi vizsgálatát az NIH Image szoftverrel végeztük. A görbék csúcsmagasság értékeit használtuk, mivel valamennyi jelzett összetevő egy szűk, éles, keskeny csúcsot adott a kromatogrammon. Valamennyi értéket korrigáltuk a visszanyeréssel, melynek során az egyes zónákban az egyedi koleszterin standardokat alkalmaztuk. Az így kapott értékeket elosztottuk az egyes lyukak sejtszámával és az eredményeket 1 millió sejtre vonatkoztatva fejeztük ki.

Protein-kináz C (PKC) meghatározás. A sejteket áthelyeztük MEM-közegbe (0,5% szérum) és egy éjszakán át inkubáltuk. A következő nap a sejteket vagy DMSO-val vagy 25 μM ajuleminsavval kezeltük a meghatározott inkubációs ideig, majd a lemezeket tripszinnel kezeltük. A PKC-aktivitást 5×10^6 tripszinnel kezelt sejtben egy egységcsomaggal (Calbiochem, Cat. No. 53984) határoztuk meg.

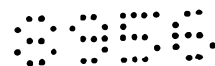
In vivo szubkután modell. Hím nu/nu BALBc egerek (Charles River) jobb hátsó végtag izomzatába 10^6 U87 sejtet injektáltunk. Az inokuláció után két nappal az egerek száján át 0,1 mg/kg ajuleminsavat kaptak 0,05 ml sáfrány-



olajban, vagy csak 0,05 ml sáfrányolajat. Ezt követően hétfőnként, szerdánként és péntekenként azonos dózist kaptak. Amikor a daganatok láthatóvá váltak, méretüket meghatároztuk két mérés átlagából, az egymásra merőleges átmé-
rők alkalmazásával. A látható daganatok méretét a gyógyszeradagolás napján mértük.

Eredmények

A növekedési képességet MTT vizsgálattal meghatározva azt észleltük, hogy a Δ^9 -THC, a THC-11-karbonsav és az ajuleminsav egyaránt dóziszfüggően gátolták a C6 gliomasejteket, 10, 20 és 55 μM IC_{50} értékkel (1. ábra). Számos daganattípusból (agy, mell, hólyag, tüdő és prosztatata) származó humán sejtvonal proliferációjának érzékenységet vizsgáltuk az egyes vegyületek 25 μM -os koncentrációjával szemben 48 órán keresztül. Ebben a dózisban az ajuleminsav nagyobb mértékben gátolta a sejtburjánzást, mint akár a THC vagy a THC-11-karbonsav (jelen alkalmazásban a „THC” a Δ^8 - vagy Δ^9 -THC-re vonatkozik). A gátlás mértéke a következő volt: $61,3 \pm 12,1$, $39,4 \pm 22,0$ és $13,1 \pm 18,5\%$ (átlag + SD) az ajuleminsav, a THC és a THC-11-karbonsav esetén, ahol $p < 0,001$ volt egymintás ANOVA, páros, többszörös összehasonlítással analízálva (Student-Newman-Keuls módszer), melyet az 1. táblázat mutat.

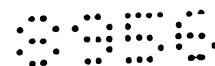
**1. táblázat**

Humán daganatsejtvonalak növekedésének százalékos gátlása 48 órás MTT
vizsgálat során

Sejtvonal	Szöveti eredet	Δ^9 -THC (25 μ M)	Ajuleminsav (25 μ M)	THC-11- karbonsav (25 μ M)
U87	Agy	20 $\pm$ 5	54 $\pm$ 2	5 $\pm$ 1
U373	Agy	0	34 $\pm$ 1	0
U118	Agy	39 $\pm$ 5	60 $\pm$ 2	14 $\pm$ 3
A172	Agy	42 $\pm$ 5	76 $\pm$ 1	61 $\pm$ 2
HS578T	Mell	52 $\pm$ 5	60 $\pm$ 2	2 $\pm$ 1
HT1376	Hólyag	23 $\pm$ 5	60 $\pm$ 2	21 $\pm$ 12
J82	Hólyag	63 $\pm$ 6	57 $\pm$ 3	1 $\pm$ 1
Calu6	Tüdő	28 $\pm$ 5	69 $\pm$ 3	19 $\pm$ 5
Du145	Prosztata	55 $\pm$ 7	74 $\pm$ 2	7 $\pm$ 3
PC3	Prosztata	72 $\pm$ 2	69 $\pm$ 2	1 $\pm$ 1

A THC-vel összehasonlítva az ajuleminsav ebben a dózisban szignifikánsan hatékonyabb ($p < 0,05$) volt a tíz sejtvonalból hat esetben.

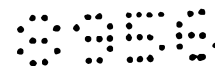
A három kannabinoid vegyület szintén gátolta a WI38 normál patkány fibroblaszt sejteket. Azonban meg kell jegyeznünk, hogy a THC-val ellentétben, az ajuleminsav kisebb mértékben gátolta a WI38 sejtek burjánzását, mint a C6 gliomasejteket. Például három különböző kísérletben a Δ^9 -THC 25 μ M koncentrációja 66%-ban gátolta a WI38 sejtburjánzást, összehasonlítva az 50%-kal a C6 sejtek esetén. Ezzel összehasonlítva az ajuleminsavval való két napos inkubáció ellentétes hatású volt, vagyis a gátlás mértéke 65% volt C6 sejtek, míg 44% a WI38 sejtek esetén. Az eredmények felvetik, hogy az ajuleminsav toxikusabb a daganatsejtek, mint a normál sejtek számára.



Annak megítélésre, hogy az ajuleminsav hatása receptoron keresztül jön-e létre, az ajuleminsav D-izomerjének 95%-ban dúsított készítményét alkalmaztuk a fentiekben megfigyelt hatások sztereospecifitásának vizsgálatára. Az ajuleminsav D-izomerjének 25 μM -os dózisa jelentősen kisebb hatással bírt az L-izomerhez képest ($p < 0,001$, t-teszt) (2. ábra). Utóbbi eredmény azt a feltételezést erősíti, amely szerint az ajuleminsav aktivitása sztereospecifikus és ezért nagy valószínűséggel receptorközvetített.

Az ajuleminsav daganatsejtekre kifejtett hatásának három jellegzetessége azt sugallta, hogy ezt a hatást a Δ^9 -THC-től eltérő mechanizmus közvetíti. *Először:* a vegyület sejtburjánzást gátló hatását nem lehetett reverzibilisen felfüggeszteni egy CB1-antagonistával. A C6 gliomasejtek együttes inkubációja egy specifikus antagonistá 3,2 μM -os koncentrációjával a THC aktivitását 150%-kal csökkentette, míg az ajuleminsav hatását kis mértékben növelte (3. ábra). Ezek az eredmények azt jelzik, hogy míg a THC daganatellenes hatásának jelentős része a CB1-receptoron keresztül jön létre, addig az ajuleminsavé viszont nem.

Másodszor: az ajuleminsav daganatellenes aktivitását a sejtméret jelentős növekedése kísérte a vegyülettel való 48 órás kezelést követően. Ezen hatás további vizsgálatának érdekében meghatároztuk az ajuleminsavnak a sejtciklus kinetikájára kifejtett hatását. A C6 gliomasejteket 24 órán át 0,5% szérumot tartalmazó közegben inkubáltuk a sejtek G1/G0 fázisban való szinkronizálása céljából. A sejteket ezután 10%-os szérumot tartalmazó médiumba helyeztük 25 μM ajuleminsavval együtt vagy annak hiányában 2 napig. A 2. táblázat eredményei szerint a kezelt sejtek fokozott mértékben voltak egyrészt S-fázisban (4,4-13%, $p = 0,003$, t-teszt), másrészt G2/M fázisban (21,9-32,3%, $p = 0,005$, t-teszt), amely arra utalt, hogy a kezelt sejtek képesek DNS-t szintetizálni, de nem tudják befejezni a mitozist. Kiemelendő, hogy az apoptózis üteme – melyet a szub-G0 fázisú sejtek hiánya mutatott mind a kontroll, mind a kezelt sejtekben – nem emelkedett.



2. táblázat

Kontroll és AJA-kezelt C6-gliómasejtek sejtciklus-vizsgálata

	G0/G1 (átlag% $\pm$ SD)	S (átlag% $\pm$ SD)	G2/M (átlag% $\pm$ SD)
Kontroll	46,3 $\pm$ 3,6	4,4 $\pm$ 0,3	21,9 $\pm$ 1,1
AJA-kezelt	39,1 $\pm$ 1,3*	13,0 $\pm$ 2,3**	32,3 $\pm$ 3,0***

*p < 0,02, ** p = 0,003, *** p = 0,005, valamennyi t-tesztel meghatározva.

Harmadszor pedig, az ajuleminsav daganatellenes hatásának egy további jellegzetessége fénytörő testek megjelenése volt, amely könnyen látható volt fáziskontraszt mikroszkóppal. Mind a fénytörő testeket tartalmazó sejtek száma, mind az egy sejtre vonatkoztatott fénytörő testek száma az idővel növekedett. 48 óra után az ajuleminsavval kezelt C6-sejtek 83%-ban egy vagy több fénytörő testet észleltünk, szemben a THC-val kezelt sejtekben levő 27%-kal (p < 0,001, khi-négyzet analízis). A sejtenként észlelhető fénytörő testek számának átlaga szintén jelentősen magasabb volt az ajuleminsavval kezelt sejtekben, összehasonlítva a THC-val kezelt sejtekben észlelttel (1,78 $\pm$ 1,6/sejt a 0,22 $\pm$ 0,5/sejt értékhez képest, p < 0,001, t-teszt). Érdekes, hogy fénytörő testeket nem észleltünk ennél a dózissal megegyező időtartamig ajuleminsavval kezelt WI38 sejtekben, vagy 25 μ M THC-karbonsavval kezelt C6-gliómasejtben.

A sejtméretnövekedés és a fénytörő testek természetének további vizsgálata érdekében a sejteket elektronmikroszkóppal vizsgáltuk. Az ajuleminsavval kezelt sejtekben sem apoptózist, sem nekrozist nem észleltünk. Ezen sejtek metabolikusan aktívnak tűntek, amely megegyezik azzal a megfigyeléssel, hogy noha az ajuleminsav jelentősen gátolta a sejtburjánzást, a kezelt sejtek igen magas százalékban életképesek voltak (> 95%) a tripánkék-kiszorítási vizsgálat alapján, és gyorsan regenerálódtak a gyógyszer eltávolítását követően. Ezen kívül az ajuleminsavval kezelt sejtek megnagyobbodtak és nagy lipidcseppeket tartalmaztak, melyek azonosságát



tartalmaztak, melyek azonosságát ozmium-tetrakloriddal való festéssel igazoltunk.

A fokozott lipidtartalom eredetének vizsgálatára a C6-sejteket $25\ \mu\text{M}$ kannabinoid vegyület jelenlétében növesztettük ^{14}C -arachidonsav jelenlétében. 48 órás inkubáció után (3. ábra) a hordozóanyaggal (kannabinoid nélkül), THC-vel vagy THC-11-karbonsavval kezelt sejtekhez képest a bazális szintet meghaladó szignifikáns emelkedést csak az ajuleminsavval kezelt sejtekben észleltünk ($p < 0,05$, többszörös összehasonlítás Dunner-tesztel a kontrollal szemben). Az ajuleminsav fenti dózisa esetén a sejtek di- és trigliceridtartalma több, mint háromszorosa volt a kontrollokénak. Ezzel ellentétben egyik kannabinoid vegyülettel való kezelés sem okozott szignifikáns emelkedést a foszfaditilkolin szintjében. Hasonló eredményre jutottunk az inkubáció során ^{14}C -jelzett oleinsav használatakor.

Tekintettel arra, hogy a diacilglicerol (DAG) a protein kináz-C hatás fontos jelátvivő molekulája, megvizsgáltuk C6-sejtekben az ajuleminsav kezelés hatását a protein kináz-C aktivitásra. Az ajuleminsavval való kezelés után a PKC-aktivitása 5 percen belül emelkedett és kb. egy órán át a kontroll érték kétszeresén maradt, amely azt jelezte, hogy a PKC szerepet játszik a sejtburjánzás ajuleminsav általi gátlásában. Ezen megfigyelésnek legalább két lehetséges magyarázata lehet: 1) a serkentett PKC-izoenzimek az alacsony növekedésű csoporthoz – pl. a PKC δ -hoz – tartoztak; és 2) a fokozott DAG jelentősebb mértékben módosíthat néhány lefelé ható mediátort – pl. a β -kimerint – úgy, hogy az egyensúly a sejtburjánzás gátlása irányában tolódik el.

Az ajuleminsav in vivo daganatellenes aktivitásának eldöntése céljából egy „meztelen egér” daganatmodellt használtunk. A „meztelen egérnek” szubkután injektált humán U87-gliómasejtvonal növekedését vizsgáltuk ajuleminsav adagolása esetén, illetve annak hiányában. Ezekben a kísérletekben az ajuleminsav kezelést két nappal az egerek 10^6 daganatsejttel való beoltását követően kezdtük. A heti három alkalommal $0,1\ \text{mg/kg}$ dózisban adott ajuleminsavval kezelt csoportban a daganatok később és kisebb méretben jelentkeztek (4. ábra). A daganatbeoltás után 25 nappal 5 kontroll állatból 5-ben észleltünk daganatot – átlagos átmérő $16,3 \pm 3,2\ \text{mm}$ – míg a kezelt csoport-

ban ezen átlagérték $3,8 \pm 8,5$ mm volt ($n = 5$, $p = 0,015$, t-teszt). Utóbbi in vivo eredmények bizonyítják, hogy az ajuleminsav képes a sejtburjánzás – jelen esetben egy daganatban való – gátlására.

Szabadalmi igénypontok

1. Módszer sejtburjánzás csökkentésére emlősben, amely a következő lépéseket tartalmazza: azonosítunk egy olyan emlőst, amelynél előnyös a sejtburjánzás mérséklése, majd az emlősnek a sejtburjánzást hatékonyan csökkentő mennyiségben egy (II) általános képletű vegyületet adagolunk, ahol a képletben

R^1 jelentése hidrogénatom, $-\text{COCH}_3$ vagy $-\text{COCH}_2\text{CH}_3$;

R^2 jelentése egy elágazó szénláncú C_{5-12} alkilcsoport, mely egy terminális aromás gyűrűt tartalmaz, vagy egy elágazó $-\text{OCHCH}_3(\text{CH}_2)_m$ alkil-csoport, mely egy terminális aromás gyűrűt tartalmaz, és ahol $m = 0-7$;

R_3 jelentése hidrogénatom, C_{1-8} alkil- vagy C_{1-8} alkanolcsoport;

Y jelentés nélküli vagy jelentése egy áthidaló NH-csoport vagy oxigénatom;

azzal a kikötéssel, hogy amennyiben Y jelentése oxigénatom és R_2 jelentése elágazó C_{5-12} alkilcsoport, akkor R_3 jelentése $-\text{CHCH}_3$ csoporttól eltérő.

2. Az 1. igénypont szerinti módszer, melyben egy (III) képletű vegyületet alkalmazunk.

3. A 2. igénypont szerinti módszer, melyben R jelentése hidrogénatom, elágazó vagy egyenes szénláncú C_{1-8} alkil- vagy elágazó vagy egyenes szénláncú C_{1-8} alkanolcsoport.

4. A 2. igénypont szerinti módszer, melyben R jelentése metil- vagy metanolcsoport vagy egy elágazó vagy egyenes szénláncú etil-, propil-, etanol- vagy propanolcsoport.

5. Az 1. igénypont szerinti módszer, melyben az emlős egy ember.

6. Az 1. igénypont szerinti módszer, melyben a vegyületet szájon át adagoljuk.

7. Az 1. igénypont szerinti módszer, melyben a vegyületet szisztémásan adagoljuk.

8. Az 1. igénypont szerinti módszer, melyben a vegyületet egy implantátumon át adagoljuk.



9. A 7. igénypont szerinti módszer, melyben az implantátum a vegyület lassú leadását biztosítja.

10. Az 1. igénypont szerinti módszer, melyben a vegyületet intravénásan adagoljuk.

11. Az 1. igénypont szerinti módszer, melyben a vegyületet bőrön át adagoljuk.

12. Az 1. igénypont szerinti módszer, melyben a sejtburjánzás daganatos betegséggel kapcsolatos.

13. Az 1. igénypont szerinti módszer, melyben az emlősnek adagolt vegyület mennyisége 0,1-20 mg/kgtesttömeg.

14. Az 1. igénypont szerinti módszer, melyben az emlősnek adagolt vegyület mennyisége 0,2-2 mg/kgtesttömeg.

A meghatalmazott:

DANUBIA

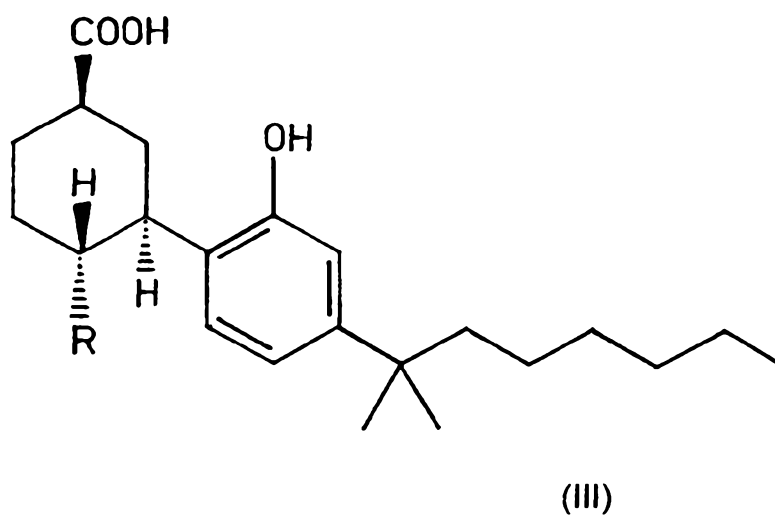
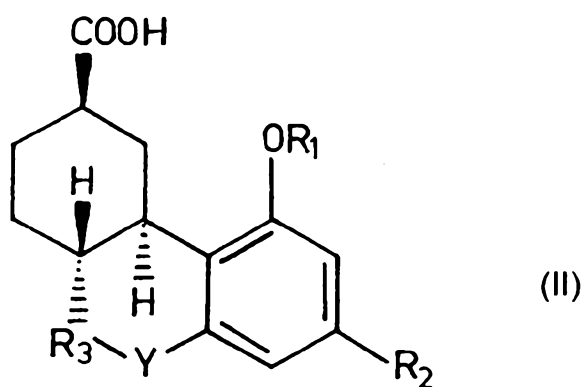
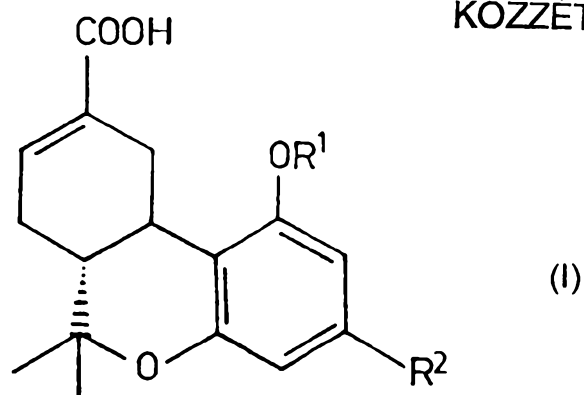
Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

dr. Török Ferenc
szabadalmi ügyvivő

+ 3 lap rajz.

MC

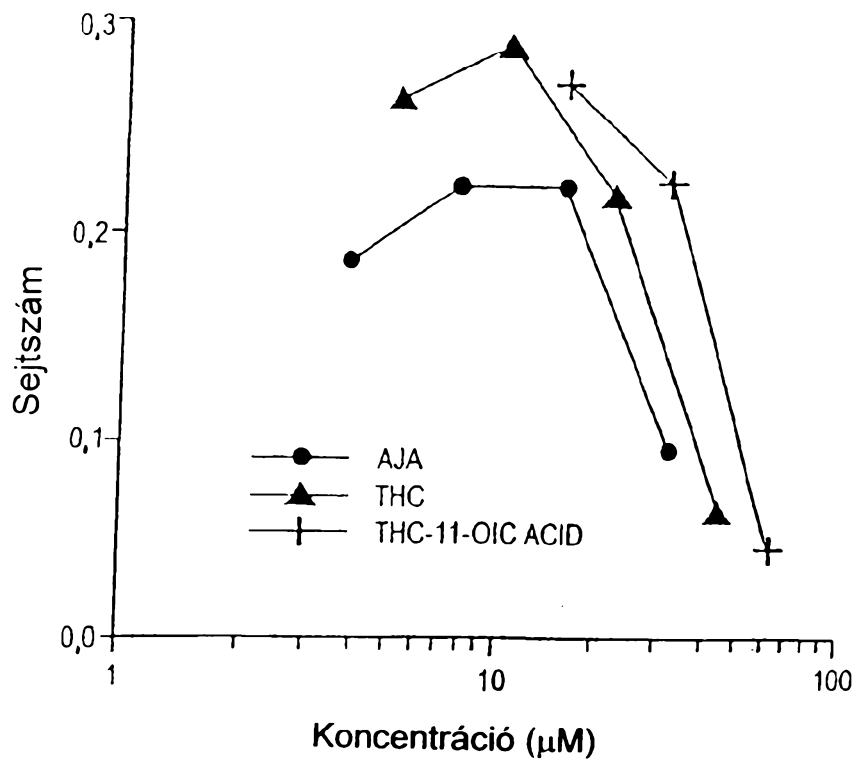
KÖZZÉTETELI PÉLDÁNY



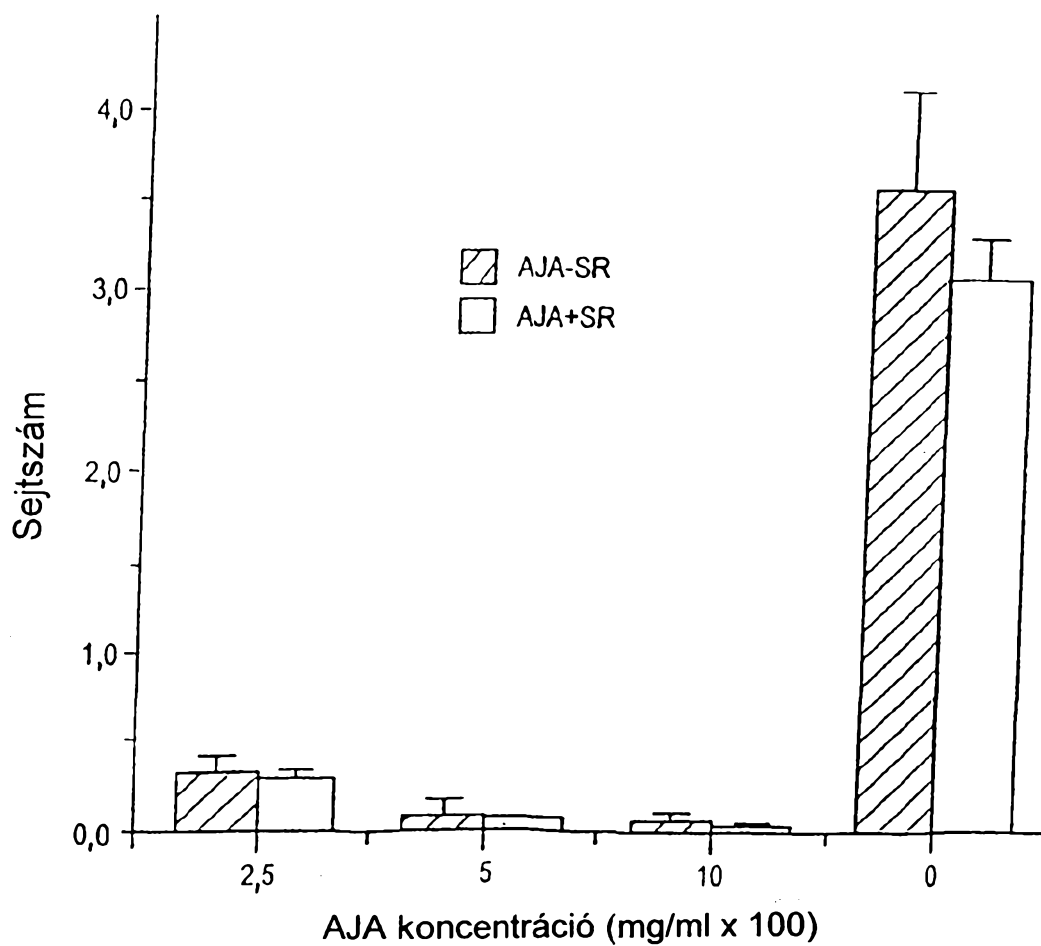
P0700038



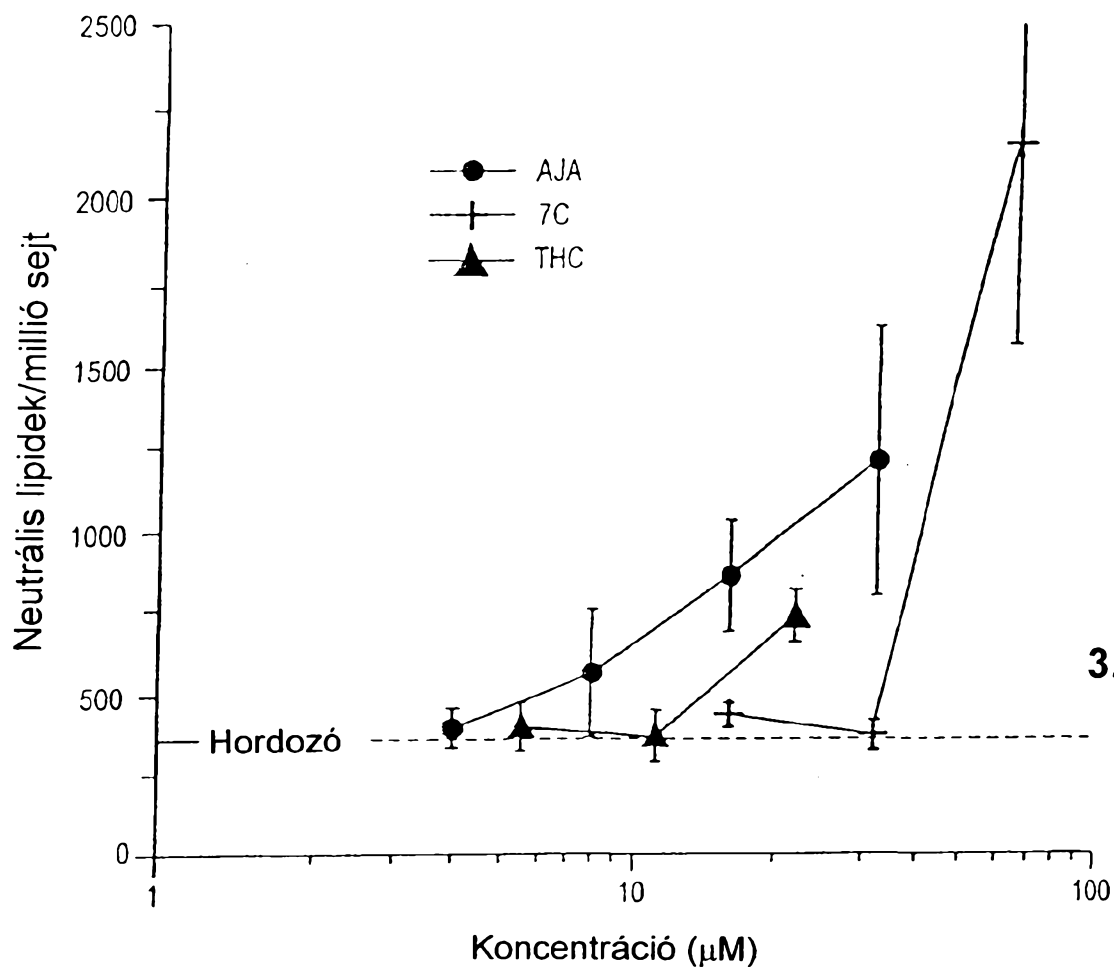
2/3
KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



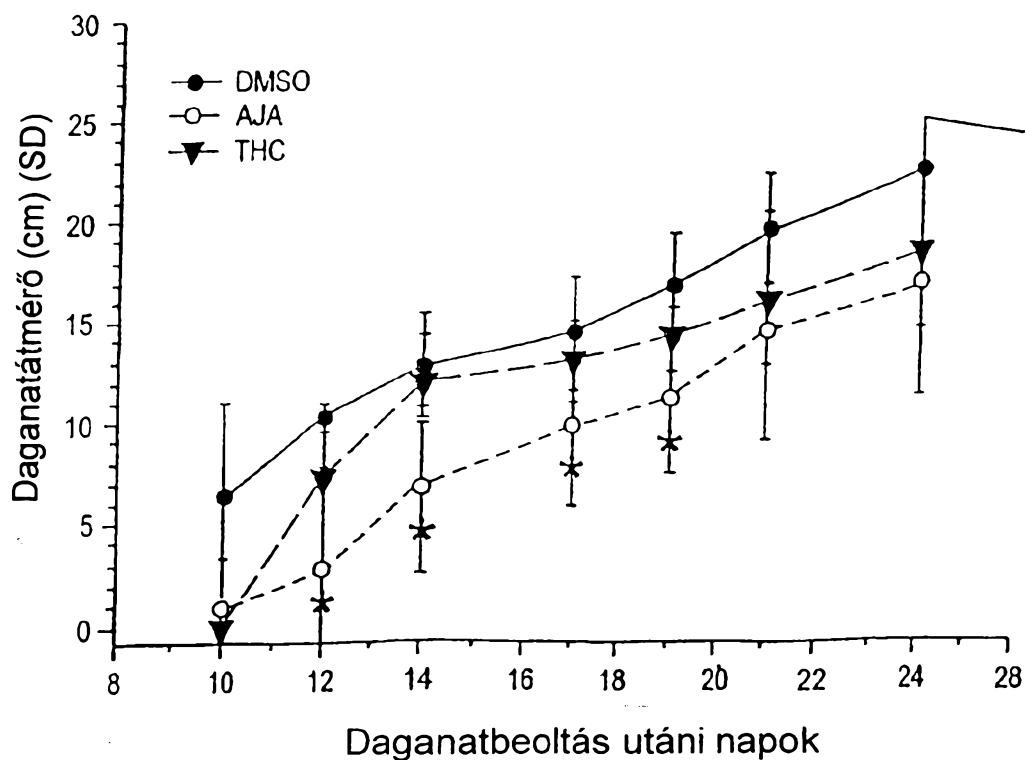
1. ábra



2. ábra



3. ábra



4. ábra

* $p < 0,05$, Dunnett-teszt a THC-vel és a DMSO-val szemben