SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**

ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(22) Dátum podania: 10.05.95

(31) Číslo prioritnej prihlášky: 08/240 858, 08/317 399

(32) Dátum priority: 10.05.94, 04.10.94

(33) Krajina priority: US, US

(40) Dátum zverejnenia: 11.01.99

(86) Číslo PCT: PCT/US95/05880, 10.05.95

(21) Číslo dokumentu:

1364-96

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.[6]:
A 61K 31/21
A 61K 31/40
A 61K 38/06
C 07C 327/00
C 07C 327/36
C 07C 333/16
C 07C 333/20
C 07C 333/24
C 07C 333/32
C 07D 207/04

(71) Prihlasovateľ: EMORY UNIVERSITY, Atlanta, GA, US;

(72) Pôvodca vynálezu: Medford Russell M., Atlanta, GA, US;
Alexander R. Wayne, Atlanta, GA, US;
Parthasarathy Sampath, Atlanta, GA, US;
Khan Bobby V., Dunwoody, GA, US;
Offermann Margaret K., Atlanta, GA, US;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Použitie látky, ktorá zabraňuje alebo minimalizuje oxidáciu polynenasýtenej mastnej kyseliny na výrobu liečiva na liečbu a predikciu aterosklerózy a iných kardiovaskulárnych a zápalových chorôb**

(57) Anotácia:
Je opísané použitie ditiokarboxylátov všeobecného vzorca ASC(S)B, kde A je vodík alebo farmaceuticky akceptovateľný katión, B je NR^2R^3, kde R^2 a R^3 sú nezávisle -$(CHOH)_n(CH2)_nOH$, kde n je 0, 1, 2, 3, 4, 5 alebo 6, -$(CH_2)_nCO_2A$, -$(CH_2)_nCO_2R^4$, pričom R^4 je alkyl, aryl, alkaryl alebo aralkyl hydroxy(C_{1-6})alkyl-, R^2 a R3 môžu byť nezávisle C_{1-10} alkyl alebo R^2 a R^3 môžu spolu vytvárať most majúci vzorec -$(CH_2)_m$-, kde m je 3 až 6, ktoré zahŕňajú ditiokarbamáty a ktoré blokujú indukovanú expresiu endoteliálnej bunkovej povrchovej adhéznej molekuly VCAM-1 a sú preto vhodné na liečenie kardiovaskulárnych chorôb, ktoré zahŕňajú aterosklerózu, ako aj nekardiovaskulárnych zápalových chorôb, ktoré sú sprostredkované VCAM-1.

Použitie látky, ktorá zabraňuje alebo minimalizuje oxidáciu polynenasýtenej mastnej kyseliny na výrobu liečiva na liečbu a predikciu aterosklerózy a iných kardiovaskulárnych a zápalových chorôb

Oblasť techniky

Vynález sa týka použitia látky, ktorá zabraňuje alebo minimalizuje oxidáciu polynenasýtenej mastnej kyseliny na výrobu liečiva na liečbu a predikciu aterosklerózy a iných kardiovaskulárnych a zápalových chorôb.

Doterajší stav techniky

Adhézia leukocytov na endotel predstavuje základnú, častú udalosť v širokom rozsahu zápalových stavov, vrátane aterosklerózy, autoimúnnych chorôb a bakteriálnych a vírusových infekcií. Nahromadenie leukocytov na endotele sa začne vtedy, keď indukujúce adhézne molekuly receptorov na povrchu buniek endotelu reagujú s opačnými receptormi na imunitných bunkách. Vaskulárne endoteliálne bunky determinujú, aký typ leukocytov (monocyty, lymfocyty alebo neutrofily) je povolaný a to selektívnou expresiou špecifických adhéznych molekúl, ako je vaskulárna bunková adhézna molekula 1 (VCAM-1), intracelulárna adhézna molekula 1 (ICAM-1) a E-selektín. V ranných štádiách aterosklerotických lézií je lokalizovaná endoteliálna expresia VCAM-1 a selektívne hromadenie mononukleárnych leukocytov, ktoré exprimujú integrinový protireceptor VLA-4. Vzhľadom na selektívnu expresiu VLA-4 na monocytoch a lymfocytoch, ale nie na neutrofiloch, je VCAM-1 dôležitá v sprostredkovaní selektívnej adhézie mononukleárnych leukocytov. Následná konverzia leukocytov na penovité makrofágy vedie k syntéze s veľkou šírkou zápalových cytokínov, rastových faktorov a chemoatraktantov, ktoré pomáhajú rozširovať hromadenie leukocytov a doštičiek, pomáhajú proliferácii buniek hladkého svalu, aktivácii endoteliálnych buniek a syntéze extracelulárnej matrice charakteristickej pre zrejúci aterosklerotický plát.

VCAM-1 je exprimovaná v kultivovaných ľudských vaskulárnych

endoteliálnych bunkách po aktivácii lipolysacharidom (LPS) a cytokínmi ako je interleukin-1 (IL-1) a tumor nekrosis faktor (TNF-a). Tieto faktory nie sú selektívne pre aktiváciu expresie

bunkových adhéznych molekúl. Schéma 1 ilustruje proces cytokínovej aktivácie VCAM-1 génovej expresie vo vaskulárnych endoteliálnych bunkách.

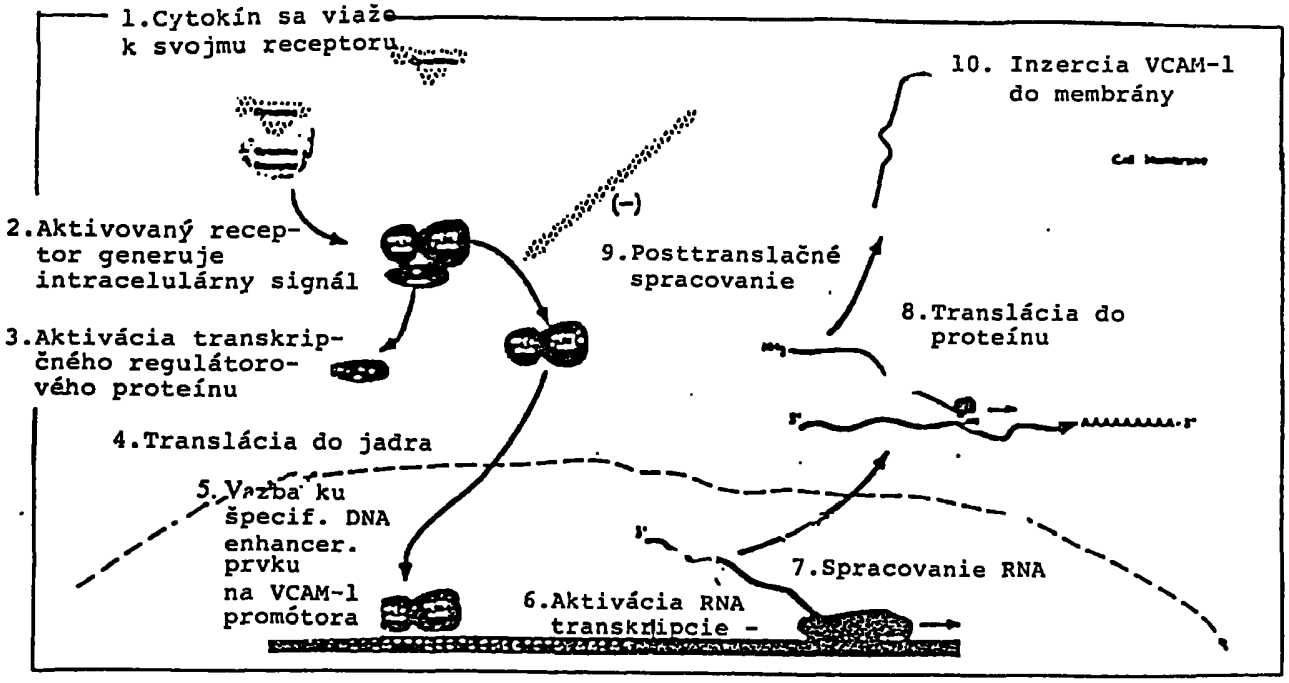


Schéma 1

Regulačná schéma pre cytokínovú aktiváciu génovou expresiou vaskulárnej bunkovej adhéznej molekuly - 1.

(VCAM-1), cez redox senzitívne regulačné faktory ako je NF-kβ, vo vaskulárnych endoteliálnych bunkách (IkB je inhibičná podjednotka, NF-kB je nukleárny faktor - kB, NH_3 označuje aminokoniec proteínu a RNA Pol II je RNA polymeráza II)

Molekulárna analýza regulačných elementov na ľudskom VCAM-1 géne, ktorý kontroluje jeho expresiu naznačuje dôležitú úlohu nukleárneho faktora -kB (NF-kB), transkripčného regulačného faktora, alebo NF-kB podobného väzbového proteínu v oxidačno-redukčnej senzitívej regulácii VCAM-1 génovej expresie. Transkripčné faktory sú proteíny, ktoré aktivujú (alebo reprivujú) génovú expresiu vnútri bunkového jadra väzbou na špecifické DNA sekvencie nazývané "enhancer elementy", ktoré sú zvyčajne blízko regiónu génu nazývaného "promótor", z ktorého je iniciovaná syntéza RNA. Nukleárny faktor - kB je ubikvitne exprimovaný multipodjednotkový transkripčný faktor aktivovaný

v mnohých bunkových typoch širokou a rôznorodou skupinou inflamatórnych agens ako je TNF-a, IL-1β, bakteriálny endotoxín a RNA vírusy. Hrá kľúčovú úlohu pri sprostredkovaní zápalových a iných stresových signálov jadrovému regulačnému aparátu. Aj keď presné biochemické signály, ktoré aktivujú NF-kB nie sú známe, môže byť transkripčný faktor integrovaný do spoločnej molekulárnej dráhy mnohých rizikových faktorov a "kauzatívnych" signálov aterosklerózy, ako je hyperlipidémia, fajčenie, hypertenzia a diabetes mellitus.

Dôležité je, že aktivácia NF-kB vo vaskulárnych endoteliálnych bunkách rôznymi signálmi sa môže inhibovať antioxidantami ako je N-acetylcysteín a pyrolidínditiokarbamát (viď U.S.S.N. 07/969,934, teraz dostupný). To viedlo k hypotéze, že kyslíkové radikály majú dôležitú úlohu v aktivácii NF-kB nedefinovaným oxidačno-redukčným mechanizmom. Pretože NF-kB podobný enhancer element tiež reguluje transkripciu VCAM-1 promótora oxidačno-redukčným senzitívnym spôsobom, môže oxidačný stres v aterosklerotickej lézii hrať úlohu v regulácii VCAM-1 génovej expresie cestou tohto oxidoredukčno senzitívneho transkripčného regulačného proteínu.

Vyvodilo sa, že modifikácie lipoproteínov s nízkou hustotou (LDL) do oxidačne modifikovaných LDL (ox-LDL) reaktívnymi druhmi kyslíka je centrálnou udalosťou, ktorá iniciuje a propaguje aterosklerózu. Steinberg et al., N. Engl. J. Med. 1989, 320:915-924. Oxidovaný LDL je komplexná štruktúra, ktorá pozostáva z aspoň niekoľkých odlišných oxidovaných materiálov, z ktorých každý, či už sám alebo v kombinácii, môže modulovať cytokínmi modulovanú génovú expresiu adhéznych molekúl. Hydroperoxidy mastných kyselín ako je linoleyl hydroperoxid (13-HPODE) sú produkované z voľných mastných kyselín lipooxygenázami a sú dôležitými komponentami oxidovaných LDL.

Predpokladalo sa, že generovanie oxidovaných lipidov sa uskutočňuje akciou bunkového lipooxygenázového systému a že oxidované lipidy sú ďalej trasferované do LDL. Tam je potom propagačná reakcia vnútri LDL v médiu katalyzovanom prechodový-

mi kovmi a/alebo sulfhydryl zlúčeninami. V minulosti výskumníci demonštrovali, že modifikácia mastných kyselín kultivovaných endoteliálnych buniek môže zmeniť ich náchylnosť na oxidačné poškodenie. Suplementácia nasýtených alebo mononasýtených mastných kyselín u kultivovaných endoteliálnych buniek redukuje ich citlivosť na oxidačné poškodenie, zatiaľ čo suplementácia polynenasýtenými mastnými kyselinami (PUFA) zvyšuje citlivosť na oxidačné poškodenie.

Použitím HPLC analýzy s reverznými fázami natívnych a saponifikovaných lipidovaných extraktov LDL sa demonštrovalo, že 13-HPODE je predominantná oxidovaná mastná kyselina v LDL oxidovaná aktivovanými ľudskými monocytmi. Chronická expozícia oxidovanému LDL poskytuje oxidačný signál vaskulárnym endoteliálnym bunkám, možno cestou špecifického hydroperoxidu mastnej kyseliny, ktorý selektívne zvyšuje cytokínmi indukovanú VCAM-1 génovú expresiu.

Vďaka mechanizmom, ktoré nie sú dobre definované, sekvestrujú oblasti cievnej steny predisponované k ateroskleróze preferenčne cirkulujúce LDL. Prostredníctvom zle opísanej metabolickej dráhy potom endoteliá, hladké svaly a/alebo zápalové bunky konvertujú LDL na ox-LDL. V porovnaní s LDL, ktorý je vychytávaný vďaka LDL receptoru, vychytávajú monocyty dychtivo ox-LDL vďaka "scanvenger" receptoru, ktorého expresia, na rozdiel od LDL receptoru neinhibuje nárast obsahu intracelulárnych lipidov. Tak monocyt pokračuje vo vychytávaní ox-LDL a stáva sa lipid-preplnený penovitým makrofágom, ktorý formuje tukový pás.

Kardiovaskulárne choroby sú teraz hlavnou príčinou úmrtí v Spojených štátoch a deväťdesiat percent kardiovaskulárnych chorôb sa teraz diagnostikuje ako ateroskleróza a preto je tu silná potreba identifikovať nové metódy a farmaceutické agens na jej liečbu. Vzhľadom na tento cieľ je dôležitá identifikácia a manipulácia špecifických oxidovaných biologických zlúčenín, ktoré účinkujú ako selektívne regulátory expresie mediátorov zápalových procesov a predovšetkým VCAM-1. Všeobecnejším cieľom je identifikácią selektívnych metód na supresiu expresie na re-

dukciu senzitívnych génov alebo aktivácia na redukciu senzitívnych génov, ktoré sú suprivované.

Poskytnutie liečby na aterosklerózu a iné kardiovaskulárne a zápalové choroby je teda predmetom predkladaného vynálezu.

Iným predmetom predkladaného vynálezu je poskytnutie metód na selektívnu inhibíciu VCAM-1.

Ešte iným predmetom predkladaného vynálezu je poskytnutie metód na liečbu chorôb alebo porúch, ktoré sú sprostredkované expresiou alebo supresiou na redukciu senzitívnych génov.

Iným predmetom predkladaného vynálezu je poskytnutie farmaceutických kompozícií na liečbu aterosklerózy a iných kardiovaskulárnych a zápalových chorôb.

Podstata vynálezu

Zistilo sa, že polynenasýtené mastné kyseliny ("PUFA") a ich hydroperoxidy ("ox-PUFA"), ktoré sú dôležitým komponentom oxidačne modifikovaných lipoproteínov s nízkou hustotou (LDL) indukujú expresiu VCAM-1 ale nie intracelulárne adhézne molekuly - 1 (ICAM-1) alebo E-selektínu v ľudských aortálnych endoteliálnych bunkách vďaka mechanizmu, ktorý nie je sprostredkovaný cytokínmi alebo inými necytokínovými signálmi. To je základným objavom v dôležitej a dosiaľ neznámej biologickej metabolickej dráhe vo VCAM-1 sprostredkovanej imunitnej odpovedi.

Ako nelimitujúce príklady, kyselina linolová, kyselina linolénová, kyselina arachidónová, hydroperoxid kyseliny linoleovej (13-HPODE) a hydroperoxid kyseliny arachidónovej indukujú génovú expresiu VCAM-1 na povrchu buniek, ale nie expresiu ICAM-1 a E-selektínu. Nenasýtené mastné kyseliny (ako je kyselina stearová) a mononenasýtené mastné kyseliny (ako je kyselina oleová neindukujú expresiu VCAM-1, ICAM-1 ani E-selektínu.

Indukcia VCAM-1 PUFA a ich hydroxyperoxidmi mastných kyse-

lín je suprivovaná antioxidačným pyrolidínditiokarbamátom (PDTC). Toto indikuje, že indukcia je médiovaná oxidujúcou signálnou molekulou a že indukcii je zabránené, ak je blokovaná oxidácia molekuly (t.j. oxidácia sa nevyskytne), ak je revertovaná (t.j. signálna molekula je redukovaná), alebo ak je redukčne modifikovanému signálu inak zabránené v interakcii s jeho regulačným cieľom.

Bunky, ktoré sú chronicky exponované vyšším ako normálnym hladinám polynenasýtených mastných kyselín alebo ich oxidovaným náprotivkom, môžu iniciovať imunitnú odpoveď, ktorá nie je normálna a ktorá je nepomerná vzhľadom na prítomné ohrozenie a ktorá vedie k chorobnému stavu. Nadmerná senzitivita vaskulárnych endoteliálnych buniek k PUFAS a ox-PUFAS môže akcelerovať formovanie, napríklad aterosklerotického plátu.

Na základe týchto objavov je poskytnutá metóda na liečbu aterosklerózy, postangioplastických restenóz, koronárnej arteriálnej choroby, angíny a iných kardiovaskulárnych chorôb, ako aj nekardiovaskulárnych zápalových chorôb, ktoré sú médiované VCAM-1, ktorá zahŕňa odstránenie, zníženie koncentrácií, alebo prevenciu vytvárania oxidovaných polynenasýtených mastných kyselín vrátane, ale nie len, oxidovanej linolovej ($C_{18}\,\Delta^{9,12}$), linolénovej ($C_{18}\,\Delta^{6,9,12}$), arachidónovej ($C_{20}\,\Delta^{5,8,11,14}$) a eikozatriénovej ($C_{20}\,\Delta^{8,11,14}$) kyseliny.

Neobmedzujúce príklady nekardiovaskulárnych zápalových chorôb, ktoré sú médiované VCAM-1 zahŕňajú reumatické artritis a osteoartritis, astma, dermatitis a roztrúsenú sklerózu.

Táto metóda predstavuje signifikantnú výhodu pri liečbe kardiovaskulárnych chorôb, ktorá ide ďalej ako terajšia terapia, ktorá len inhibuje proces choroby a ak sa použije vhodne, tak poskytuje možnosť preliečby aterosklerózy zabránením vývoja nových lézií a spôsobením regresie už vzniknutých lézií.

V alternatívnom uskutočnení je poskytnutá metóda pre supresiu expresie génov senzitívnych na redukciu alebo aktiváciu

génov, ktoré suprivujú redox senzitívnu dráhu, ktorá zahŕňa podanie efektívneho množstva substancie, ktorá zabraňuje oxidácii oxidačného signálu, typicky oxidácii polynenasýtených mastných kyselín.

Reprezentatívnymi génmi senzitívnymi na redukciu, ktoré sú zahrnuté do imunitnej odpovede, sú (bez obmedzenia) tie, ktoré exprimujú cytokíny, ktoré pôsobia v iniciácii imunitnej odpovede (t.j. IL-1β), chemoatraktanty, ktoré spôsobujú migráciu zápalových buniek na miesto poškodenia (t.j. MCP-1), rastové faktory (t.j. IL-6 a trombínový receptor) a adhézne molekuly (t.j. VCAM-1 a E-selektín).

Vyšetrenia chorôb médiovaných VCAM-1 alebo génmi senzitívnymi na redukciu sú tiež poskytnuté a zahŕňajú kvantifikáciu prítomných markerov choroby. V jednom uskutočnení je hodnotená hladina oxidovaných polynenasýtených mastných kyselín, alebo iných markerov, napríklad v tkanivách alebo krvi hostiteľa ako prostriedok na odhad "oxidačného prostredia" hostiteľa a hostiteľovej citlivosti na VCAM-1 a génmi senzitívnymi na redukciu sprostredkovaným chorobám.

V inom uskutočnení sa kvantifikuje hladina cirkulujúcich VCAM-1 a VCAM-1 na povrchu buniek, alebo iného vhodného markera a efekt podania vhodného antioxidantu na túto hladinu.

V ešte ďalšej skúške sa hodnotí senzitivita vaskulárnych endotelových buniek hostiteľa na polynenasýtené mastné kyseliny alebo ich oxidované náprotivky. Toto sa môže uskutočniť napríklad vystavením hostiteľa PUFA alebo ox-PUFA a porovnaním výsledných koncentrácií na povrchu buniek alebo cirkulujúceho VCAM-1 alebo iného prítomného markera k populačnej norme.

V ďalšom uskutočnení, in vivo modely aterosklerózy alebo iných srdcových alebo zápalových chorôb, ktoré sú médiované VCAM-1, môžu byť poskytnuté podaním nadmerného množstva PUFA alebo oxidovaných polynenasýtených mastných kyselín hostiteľským zvieratám na vyvolanie choroby. Tieto zvieratá sa môžu

použiť v klinických výskumoch na ďalšie pochopenie týchto chorôb. V ešte ďalšom uskutočnení vynálezu sa môžu zlúčeniny skúšať na schopnosť liečby chorôb sprostredkovaných VCAM-1 na základe ich schopnosti inhibovať oxidáciu polynenasýtených mastných kyselín alebo interakcie PUFA alebo ox-PUFA s proteínovým cieľom.

Toto sa môže uskutočniť vystavením hostiteľa, napríklad človeka alebo zvieraťa ako je myš, vysokým hladinám PUFA alebo ox-PUFA a potom určením terapeutickej účinnosti testovanej zlúčeniny založenej na jej schopnosti znižovať koncentrácie cirkulujúceho alebo povrchového VCAM-1. Alternatívne, sa môže použiť in vitro prieskum na základe schopnosti testovanej zlúčeniny zabrániť oxidácii PUFA alebo ox-PUFA, alebo interakcii PUFA alebo ox-PUFA s proteínovým cieľom v prítomnosti oxidujúcej substancie ako je kov, napríklad meď, alebo enzýmov ako je peroxidáza, lipooxygenáza, cyklooxygenáza, alebo cytochróm P450.

V inom uskutočnení sa vaskulárne endotelové bunky vystavia TNF-α alebo inému VCAM-1 indukujúcemu materiálu počas vhodného času a potom odoberú vhodnými prostriedkami, napríklad soniká-ciou alebo zmrazením-roztopením. Izoluje sa cytozolový a membránový kompartment. Rádioznačená PUFA sa pridá k definovanému množstvu kompartmentov. Skúma sa schopnosť roztoku konvertovať PUFA na ox-PUFA v prítomnosti alebo neprítomnosti testovanej zlúčeniny. Intaktné bunky sa môžu použiť na mieste rozrušeného bunkového systému.

Pyrolidínditiokarbamát (PDTC), orálne podaný v dávke 25 až 50 mg/kg/deň dramaticky inhibuje formovanie aterogénnych mastných pásov, arteriálny monocyt-makrofágový zápal, endoteliálnu VCAM-1 expresiu a esenciálne normalizuje na endoteli depedentnú relaxačnú funkciu u diétou indukovanej hypercholesterolémie u králikov so sérovou hladinou cholesterolu nad 1000 mg/dl. V rovnakých dávkach nemajú iné teraupetické agens ako sú antioxidanty probucol a vitamín E žiadny efekt na tvorbu lézií v tomto modele.

Na endotele dependentná arteriálna relaxácia sa nastolí u experimentálnej aterosklerózy podaním PDTC. U diétou indukovanej hypercholesterolémie u králičieho modelu orálne podaný PDTC (25 až 50 mg/kg/deň) reštauruje na endoteli dependentnú vazoreaktivitu. Toto sa stanovilo štúdiami kontraktivity krúžkov excidovaných aort od kontrolných a testovaných zvierat. U pacientov s aterosklerózou sa toto manifestuje samé ako normalizácia periférnej vaskulárnej reaktivity v odpovedi na hyperémiu meranú neinvazívnou Dopplerovou prietokovou štúdiou. Toto je štandardizovaný, všeobecne vhodný a ľahko uskutočniteľný spôsob, ktorý sa môže použiť na titráciu funkčnej hladiny lieku pri orálnom podaní. PDTC spôsobuje v antiischemickej terapii rapídnu normalizáciu patologicky stratenej na endoteli závislej arteriálnej vazodilatácie charakteristickej pre kardiovaskulárne choroby a aterosklerózu. Zlepšenie vaskulárneho prietoku krvi je manifestované ako zlepšenie symptómov a ischémií obmedzených výkonnostných funkcií a poskytuje neinvazívne hodnotenie vaskulárnej protekcie. Iné klinické indikácie abnormalít v endotel-odvodenej vazorelaxácii zahŕňajú impotenciu.

Molekulárny genetický faktor, ktorý kontroluje VCAM-1 génovú transkripciu, je nový komplex transkripčných faktorov, ktorý pozostáva z p65 a p50 podjednotiek NF-kB/Rel rodiny párovanej k c-fos a c-jun podjednotkám AP-1 rodiny. Podľa štruktúrálnych a funkčných štúdií sa stanovilo, že tieto AP-1 faktory majú dôležitú úlohu v regulácii VCAM-1 promótorov, ktoré sú pravdepodobne centrálne v terapeutickej regulácii VCAM-1 génovej expresie. Toto je prvá demonštrácia funkčnej úlohy tohto krížom-párovaného transkripčného komplexu v regulácii endogénnych génov.

Opis obrázkov na výkresoch

Obr. 1 je graf expresie VCAM-1 na povrchu buniek (O.D. 450 nm) ako funkcie času v ľudských aortálnych endoteliálnych bunkách pri expozícii cytokínu TNF-α (plné krúžky), kyseline linolevej (plné trojuholníky) a linolovému hydroperoxidu (13-HPODE, plné štvorčeky) a v neprítomnosti týchto substancií

(kontrola, prázdne štvorčeky).

Obr. 2 je graf expresie VCAM-1 na povrchu buniek (O.D. 450 nm) v ľudských aortálnych endoteliálnych bunkách pri expozícii linolovej kyseline (plný trojuholník) a linolovému hydroperoxidu (13-HPODE, plný štvorček) ako funkcie koncentrácie mastných kyselín (μM).

Obr. 3 je graf expresie (O.D. 450 nm) VCAM-1, ICAM-1 a E-selektínu na povrchu buniek ľudských aortálnych endoteliálnych buniek pri expozícii citokínu TNF-α, kyseline stearovej, kyseline linolénovej a kyseline arachidónovej.

Obr. 4 je graf expresie (O.D. 450 nm) VCAM-1 na povrchu buniek ľudských aortálnych endoteliálnych buniek pri expozícii kyseline linolénovej, 13-HPODE, kyseline arachidónovej a hydroperoxidu kyseliny arachidónovej (15-HPETE), s (plná čiara) alebo bez (prerušovaná čiara) antioxidantom pyrolidínditiokarbamátom.

Obr. 5 je ilustráciou autorádiogramu, ktorý indikuje akútnu indukciu VCAM-1 mRNA linolovou kyselinou a 12-HPODE. HAEC boli alebo neboli vystavené kyseline linolovej (7,5 μM), 13-HPODE (7,5 μM), alebo TNF-α (100 U/ml). Celková RNA sa izolovala a 20 μg sa frakciovalo podľa veľkosti denaturačnou 1% agaróza-formaldehyd gélovou elektroforézou, transferovalo do nitrocelulózy a hybridizovalo do ^{32}P-značenej ľudskej buď A) VCAM-1 špecifickej alebo B) β-aktín špecifickej cDNA. Po premytí sa filtre exponovali na RTG filme pri teplote -70 °C s jedným intenzifikovaným premietnutím počas 24 hodín. Identifikácia línií: 1) kontrola, 2) kyselina linolová (akútna, 8 hodinová expozícia), 3) kyselina linolová (48 hodinová expozícia), 4) 13-HPODE (akútna, 8 hodinová expozícia), 5) TNF-α (100 U/ml, 4 hodinová expozícia).

Obr. 6 je ilustráciou autorádiogramu, ktorý indikuje, že indukcia VCAM-1 mRNA polynenasýtenými mastnými kyselinami je nezávislá na bunkovej proteínovej syntéze. HAEC sa vystavili

buď linolovej (7,5 μM) alebo arachidónovej (7,5 μM) kyseline v prítomnosti alebo neprítomnosti cykloheximidu (10 μg/ml) počas 4 hodinovej periódy a potom sa ošetrili ako opisuje obr. 5.

Obr. 7 je ilustráciou autorádiogramu, ktorý indikuje, že linolová kyselina indukuje transkripčnú aktiváciu VCAM-1 promótora prostredníctvom na redukciu senzitívneho NF-kB podobného faktora. HAEC sa rozdelili v takom pomere, aby dal približne 60 % konfluenciu v 100-mm platniach tkanivových kultúr. HEAC sa transfektovali s 30 μg buď p288 VCAMCAT, alebo p85 VCAMCAT, alebo pSV_2CAT plazmidom koprecipitačnou technikou fosforečnanom vápenatým s použitím štandardnej techniky. Po 24 hodinovej zotavovacej perióde boli, alebo neboli HAEC ošetrené 50 μM PDTC a po 30 minútach sa exponovali kyseline linolovej (7,5 μM) alebo TNF-α (100 U/ml) priamo pridaním do platní. Po 18 hodinách sa bunkový extrakt pripravil rýchlym zmrazením-topením v 0,25 Tris, pH 8,0. Proteíny každého bunkového extraktu sa skúšali na chloramfenikolacetyltransferázovú aktivitu, ako bolo skôr opísané (Ausubel, 1989) (Ac, acetylovaný, N, neacetylovaný chloramfenikol).

Obr. 8 je ilustráciou akrylamidových gélových rezov, ktoré indikujú, že polynenasýtené mastné kyseliny aktivujú väzbové aktivity NF-kB-podobnej DNA, ktoré sú blokované antioxidantami PDTC. Konfluentný HAEC v médiu s obsahom 4 % FBS (ako opisuje obr. 1) bol alebo nebol ošetrený PDTC (50 μM) počas 30 minút a potom vystavený na 3 hodiny kyseline linolovej (7,5 μM) alebo TNF-α (100 U/ml), respektíve. 5 mikrogramov nukleárneho extraktu sa inkubovalo s dvojreťazcovou ^{32}P-značenou wtVCAM, frakcionovalo podľa veľkosti na 4 % prirodzenom akrylamidovom géli a exponovalo sa na autorádiografickom filme pri teplote -70 °C počas 18 hodín. Dva pásiky A a C, ktoré reprezentujú NF-kB podobnú väzbovú aktivitu, sú označené. Široký pásik B sa pozoroval v kontrolných (neošetrených) bunkách.

Obr. 9A a 9B sú stĺpcové grafy pomerov reaktívnych substancií kyseliny tiabarbiturovej (O.D.532 nm), kyseliny arachidónovej a 15-HPETE v prítomnosti alebo neprítomnosti PDTC.

Skúška reaktivity kyseliny tiobarbiturovej (TBARS) meria oxidačnú schopnosť materiálu v prostredí bez buniek a bez média.

Obr. 10 je ilustráciou autorádiogramu mRNA, získanej ako je opísané ďalej, hybridizovanej na ^{32}P-značenú buď VCAM-1 špecifickú cDNA (Panel A) alebo na E-selektín (ELAM-1) špecifickú cDNA (Panel B) alebo ICAM-1 špecifickú cDNA (Panel C). Po predošetrení počas 30 minút 50 µM pyrolidínditiokarbamátu sodného (PDTC) sa HUVE (ľudské bunky umbilikálnej vény) bunky vystavili IL-1b (10 U/ml) v kontinuálnej prítomnosti 50 µM PDTC. Paralelné kontroly sa uskutočnili identicky v neprítomnosti PDTC. V určenom čase sa celková RNA izolovala a 20 µg materiálu sa frakcionovalo podľa veľkosti denaturačnou 1 % agaróza-formaldehyd gélovou elektroforézou, transferovalo do nitrocelulózy, hybridizovalo ako sa opisuje vyššie a vizualizovalo autorádiografiou. Dráha 1-0 hodina; dráha 2,4,6,8 - OL-1 samotný po 2, 4, 8 a 24 hodín, dráha 3, 5, 7, 9 - IL-1 s PDTC po 2, 4, 8 a 24 hodín.

Obr. 11 ilustruje autorádiogram mRNA, získaný ako je opísané ďalej, hybridizovanej na ^{32}P-značenú buď VCAM-1 špecifickú cDNA (Panel A), alebo na E-selektín (ELAM-1) špecifickú cDNA (Panel B), alebo na ICAM-1 špecifickú cDNA (Panel C). HUVE bunky sa predošetrili určenou koncentráciou PDTC a potom vystavili IL-1b v prítomnosti PDTC počas 4 hodín a skúšali na VCAM-1 mRNA akumuláciu Northern filter hybridizačnou analýzou. Dráha 1 - kontrola, dráha 2 - IL-1 (10 µM/ml), dráha 3 - IL-1b + PDTC (0,05 µM), dráha 4 - IL-1b LB + PDTC (0,5 µM), dráha 5 - IL-1b + PDTC (5,0 µM), dráha 6 - IL-1b + PDTC (50 µM), dráha 7 - IL-1b + PDTC (100 µM).

Obr. 12 ilustruje autorádiogram mRNA, získaný ako je opísané ďalej, hybridizovanej na ^{32}P-značenú buď VCAM-1 špecifickú cDNA (Panel A), alebo na E-selektín (ELAM-1) špecifickú cDNA (Panel B), alebo na ICAM-1 špecifickú cDNA (Panel C). HUVE bunky sa predošetrili ako opisuje obr. 9 50 µM PDTC, vystavili agens opísaným nižšie a skúšali na VCAM-1 (Panel A) a ICAM-1 (Panel B) mRNA akumuláciu. Dráha 1 - TNFa (100 U/ml), dráha

2 - TNFA + PDTC, dráha 3 - lipopolysacharid (LPS) (100 ng/ml), dráha 4 - LPS + PDTC, dráha 5 - poly (I:C) (100 mg/ml), dráha 6 - poly (I:C) + PDTC.

Obr. 13 je grafom relatívnej povrchovej expresie VCAM-1 a ICAM-1 v prítomnosti (tmavé pásiky), alebo neprítomnosti (svetlé pásiky) PDTC a v prítomnosti mnohých typov indukujúcich stimulov. Rozpustené HUVEC boli, alebo neboli (len CTL) predošetrené počas 30 minút 50 μM PDTC a potom vystavené počas určitého času určitému agens v prítomnosti alebo neprítomnosti (len CTL) PDTC. Expresia na bunkovom povrchu sa determinovala primárnou väzbou VCAM-1 špecifických (4B9) a ICAM-1 špecifických (84H10) myších monoklonálnych protilátok nasledovanou sekundárnou väzbou kozou antimyšou (IgG) protilátkou s pripojenou chrenovou peroxidázou. Kvantifikácia sa uskutočnila určením kalorimetrickej konverzie pri 450 nm TBM.

Obr. 13 indikuje, že mnohé regulačné signály indukujú VCAM-1, ale nie ICAM-1 cez spoločnú ditiokarbamát - senzitívnu dráhu v ľudských vaskulárnych endoteliálnych bunkách.

Obr. 14 je grafom relatívnej povrchovej expresie (O.C.595 nM) v ľudských bunkách z umbilikálnej vény, aktivovanej TNFa, versus koncentrácie rôznych antioxidantov. (PDTC je N-pyrolidínditiokarbamát sodný; DETC je N,N-dietyl-N-karbotiolát sodný, tiež nazývaný ako dietylditiokarbamát sodný; NAC je acetylcysteín a DF je desferoximín).

Obr. 15 je grafom relatívnej povrchovej VCAM-1 expresie (O.D.595 nM) v ľudských endoteliálnych bunkách umbilikálnej žily, aktivovanej TNF-α, v prítomnosti špecifického množstva antioxidantu. (PDTC je N-pyrolidínditiokarbamát sodný; DIDTC je N,N-dietyl-N-karboditioát sodný; SarDTC je N-metyl-N-karboxymetyl-N-karboditioát sodný; IDACTC je N,N-di(karboxymetyl)-N-karboditioát trojsodný; MGDTC je N-metyl-D-glukamín-N-karboditioát sodný; MeOBGDTC je N-(4-metoxybenzyl)-D-glukamín-N-karboditioát sodný; DETC je N,N-dietyl-N-karboditioát sodný; DiPDTC je N,N-diizopropyl-N-karboditioát sodný; NAC je N-acetylcysteín).

Obr. 16 je percentuálnym grafom Molt-4 buniek naviazaných na HUVE bunky stimulované alebo nestimulované TNF-α (100 U/ml) počas 6 hodín v prítomnosti alebo neprítomnosti PDTC.

Obr. 17 ilustruje chemickú štruktúru nasledujúcich aktívnych ditiokarbamátov: pyrolidín-N-karboditioát sodný, N-metyl--N-karboxymetyl-N-karboditioát sodný, N,N-di(karboxymetyl)-N--karboditioát trojsodný, N-metyl-D-glukamín-N-karboditioát sodný, N,N-dietyl-N-karboditioát sodný (dietylditiokarbamát sodný) a N,N-diizopropyl-N-karboditioát sodný.

Obr. 18 je stĺpcový graf efektu PDTC na formovanie fluorescenčných aduktov BSA a 13-HPODE, ako sa meria vo fluorescenčných jednotkách versus mikromolárna koncentrácia PDTC. Jeden mikromól 13-HPODE sa inkuboval s 200 mikrogramami BSA v prítomnosti PDTC počas 6 dní. Fluorescencia sa merala pri 430 až 460 nm s excitáciou pri 330 až 360 nm.

Obr. 19 je grafom vplyvu PDTC na formovanie fluorescenčných aduktov BSA a ox-PUFA ako funkcie vlnovej dĺžky (nm) a koncentrácie PDTC. So zvyšovaním koncentrácie PDTC sa kvantita fluorescenčných aduktov znižuje.

Obr. 20 je grafom vplyvu PDTC na oxidáciu LDL chrenovou peroxidázou (HRP), ako sa meria zvýšením O.D. (234 nm) versus čas (minúty) pre rôzne koncentrácie PDTC. Pozoruje sa, že po inkubačnej perióde PDTC inhibuje oxidáciu LDL HRP spôsobom, ktorý závisí na koncentrácii.

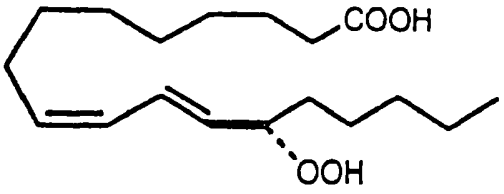
Obr. 21 je diagramom vplyvu PDTC na cytokínmi indukované formovanie ox-PUFA v ľudských aortálnych endoteliálnych bunkách. Ako je naznačené, ako TNF-α, tak IL-1β spôsobujú oxidáciu linolovej kyseliny na ox-linolovú kyselinu. Oxidácii je signifikantne zabránené PDTC.

Podrobný opis vynálezu

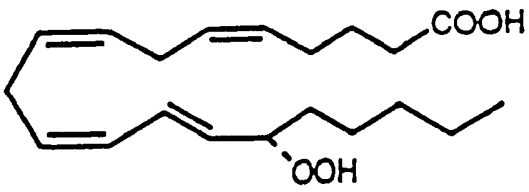
I. Definícia

Tak, ako je tu použitý, označuje výraz polynenasýtené mastné kyseliny (tu tiež uvádzané ako "PUFA"), mastné kyseliny (typicky od C_8 do C_{24}), ktoré majú aspoň dve alkenyl väzby a zahŕňajú, ale nie sú týmto obmedzené, linolovú ($C_{20}\Delta^{9,12}$), linolénovú ($C_{18}\Delta^{6,9,12}$), arachidónovú ($C_{20}\Delta^{5,8,11,14}$) a eikozatriénovú ($C_{20}\Delta^{8,11,14}$) kyselinu.

Výraz oxidovaná polynenasýtená mastná kyselina označuje nenasýtenú mastnú kyselinu, v ktorej aspoň jedna z alkenylových väzieb bola konvertovaná na hydroperoxid. Nelimitujúcimi príkladmi sú:



13-HPODE



15-HPETE

Výraz alkyl ako je tu použitý, zahŕňa, ak nie je uvedené inak, nasýtený priamy, rozvetvený alebo cyklický (v prípade C_5 alebo väčšieho) uhľovodík s C_1 až C_{10} (alebo nižší alkyl, t.j. C_1 až C_5), ktorý špecificky zahŕňa metyl, etyl, propyl, izopropyl, butyl, izobutyl, terc-butyl, pentyl, cyklopentyl, izopentyl, neopentyl, hexyl, izohexyl, cyklohexyl, cyklohexylmetyl, 3-metylpentyl, 2,2-dimetylbutyl a 2,3-dimetylbutyl. Alkylová skupina môže byť prípadne substituovaná na ktoromkoľvek z uhlíkov jednou alebo viac skupinami vybranými zo skupiny, ktorá zahŕňa hydroxyl, amino alebo mono alebo disubstituovaný amino, kde substituentová skupina je nezávisle alkyl, aryl, alkaryl alebo aralkyl; aryl, alkoxy, aryloxy, nitro, kyano, kyselina

sulfónová, sulfát, kyselina fosfónová, fosfát alebo fosfonát, buď nechránený alebo chránený podľa potreby, ako je známe odborníkom v odbore, ako uvádza Greene a kol., "Protective Groups in Organic Synthesis", John Wiley and Sons, druhé vydanie, 1991.

Výraz alkenyl, ako je tu uvedený a ak nie je uvedené inak, označuje priamy, rozvetvený alebo cyklický uhľovodík s C_2 až C_{10} s aspoň jednou dvojitou väzbou.

Výraz alkinyl, ako je tu uvedený a ak nie je uvedené inak, označuje priamy, rozvetvený alebo cyklický uhľovodík s C_2 až C_{10} s aspoň jednou trojitou väzbou.

Výraz aralkyl označuje arylovú skupinu s aspoň jedným alkylsubstituentom.

Výraz alkaryl označuje alkylovú skupinu, ktorá má aspoň jeden arylový substituent.

Výraz halogén(alkyl, alkenyl alebo alkinyl) označuje alkylovú, alkenylovú alebo alkinylovú skupinu, v ktorej aspoň jeden z vodíkov v skupine bol nahradený atómom halogénu.

Výraz aryl ako je tu použitý a ak nie je uvedené inak, označuje fenyl, bifenyl alebo naftyl a s výhodou fenyl. Arylová skupina môže byť prípadne substituovaná jednou alebo viac skupinami zvolenými zo skupiny, ktorá zahŕňa alkyl, hydroxyl, amino, alkylamino, arylamino, alkoxy, aryloxy, nitro, kyano, kyselinu sulfónovú, sulfát, kyselinu fosfónovú, fosfát alebo fosfonát, CO_2H alebo jeho farmaceuticky prijateľnú soľ, CO_2 (alkyl, aryl, alkaryl alebo aralkyl), alebo glukamín, buď nechránený alebo chránený podľa potreby ako je to známe odborníkom v odbore, napríklad ako uvádza Greene a kol., "Protective Groups in Organic Synthesis", John Wiley and Sons, druhé vydanie, 1991.

Výraz alkoxy ako je tu použitý a ak nie je uvedené inak, označuje skupinu vzorca -O-alkyl.

Výraz acyl ako je tu použitý, označuje skupinu vzorca C(O)R', kde R' predstavuje alkyl, aryl, alkaryl alebo aralkylskupinu.

Výraz heteroaryl alebo heteroaromatický, ako je tu použitý, zahŕňa aromatickú skupinu, ktorá obsahuje aspoň jeden atóm síry, kyslíka alebo dusíka v aromatickom kruhu. Neobmedzujúce príklady sú fenazín, fenotiazín, furyl, pyridyl, pyrimidyl, tienyl, izotiazolyl, imidazolyl, tetrazolyl, pyrazinyl, benzofuranyl, benzotiofenyl, chinolyl, izochinolyl, benzotienyl, izobenzofuryl, pyrazolyl, indolyl, izoindolyl, benzimidazolyl, purinyl, morfolinyl, karbozolyl, oxazolyl, tiazolyl, izotiazolyl, 1,2,4-tiadiazolyl, izooxazolyl, pyrolyl, pyrazolyl, chinazolinyl, pyridazinyl, pyrazinyl, cinolinyl, ftalazinyl, chinoxalinyl, xantinyl, hypoxantinyl, pteridinyl, 5-azacytidinyl, 5-azauracilyl, triazolopyridinyl, imidazopyridinyl, pyrolopyrimidinyl, pyrazolopyrimidinyl, adenín, N^6-alkylpuríny, N^6-benzylpurín, N^6-halogénpurín, N^6-vinylpurín, N^6-acetylpurín, N^6-acylpurín, N^6-hydroxyalkylpurín, N^6-tioalkylpurín, tymín, cytozín, 6-azapyrimidín, 2-merkaptopyrimidín, uracil, N^6-alkylpyrimidíny, N^6-benzylpyrimidíny, N^6-halogénpyrimidíny, N^6-vinylpyrimidín, N^6-acetylpyrimidín, N^6-acylpyrimidín, N^6-hydroxyalkylpurín a N^6-tioalkylpurín a izoxazolyl. Heteroaromatická skupina môže byť prípadne substituovaná ako je opísané vyššie pre aryl. Heteroaromatická skupina môže byť čiastočne alebo úplne hydrogenovaná podľa potreby. Ako neobmedzujúce príklady sa môžu použiť dihydropyridín namiesto pyridínu. Funkčné kyslíkové a dusíkové skupiny na heterocyklickej báze môžu byť chránené podľa potreby alebo požiadaviek počas reakčného postupu. Vhodné chrániace skupiny sú dobre známe odborníkom v odbore a zahŕňajú trimetylsilyl, dimetylhexylsilyl, terc.-butyldimetylsilyl a terc.-butyldifenylsilyl, tritylmetyl, alkylskupiny, acylskupiny ako je acetyl a propionyl, metylsulfonyl a p-toluylsulfonyl.

Výraz hydroxyalkyl ako je tu použitý označuje C_1 až C_6 alkylskupinu, v ktorej je aspoň jeden z vodíkov pripojených ku ktorémukoľvek z atómov uhlíka nahradený hydroxyskupinou.

Výraz tiolový antioxidant označuje zlúčeninu, ktorá obsahuje síru, ktorá spomaľuje oxidáciu.

Výraz farmaceuticky prijateľný derivát označuje derivát aktívnej zlúčeniny, ktorý po podaní príjemcovi, je schopný poskytnúť priamo alebo nepriamo, pôvodnú zlúčeninu alebo sám vykazuje jej aktivitu.

Výraz "farmaceuticky prijateľný katión" označuje organickú alebo anorganickú skupinu, ktorá nesie pozitívny náboj a ktorá sa môže podať v spojení s farmaceutickým činidlom, napríklad ako protikatión v soli. Farmaceuticky prijateľné katióny sú známe odborníkovi v odbore a zahŕňajú, ale nie sú tak obmedzené, sodík, draslík a kvartérne amíny.

Výraz "fyziologicky odštiepiteľná skupina" označuje skupinu, ktorá môže byť odštiepená in vivo z molekuly, ku ktorej je pripojená a zahŕňa, ale nie je tak obmedzený, organický alebo anorganický anión, farmaceuticky prijateľný katión, acyl (ktorý zahŕňa, ale bez obmedzenia, (alkyl)C(O), ktorý zahŕňa acetyl, propionyl a butyryl), alkyl, fosfát, sulfát a sulfonát.

Výraz "enantiomérne obohatená kompozícia alebo zlúčenina" označuje kompozíciu alebo zlúčeninu, ktorá obsahuje aspoň 95 % a s výhodou aspoň 97, 98, 99 alebo 100 % hmotn. jediného enantioméru zlúčeniny.

Výraz aminokyselina zahŕňa syntetické a prirodzene sa vyskytujúce aminokyseliny, ktoré zahŕňajú, ale sa tak neobmedzujú, alanyl, valinyl, leucinyl, izoleucinyl, prolinyl, fenylalaninyl, tryptofanyl, metioninyl, glycinyl, serinyl, treoninyl, cysteinyl, tyrozinyl, asparaginyl, glutaminyl, aspartoyl, glutaoyl, lyzinyl, argininyl a histidinyl.

Výraz "spojovacia skupina" ako je tu použitý je akákoľvek dvojväzbová skupina, ktorá spája dva chemické zvyšky a zahŕňa, ale bez obmedzenia, alkyl, alkenyl, alkinyl, aryl, polyalkylénoxy (napríklad $-[(CH_2)_nO-]_n-$), $-C_{1-6}$alkoxy-C_{1-10}alkyl-,

$-C_{1-6}$alkyltio-C_{1-10}alkyl-, $-NR^3-$ a $-(CHOH)_nCH_2OH$, kde n je nezávisle 0, 1, 2, 3, 4, 5 alebo 6.

II. Identifikácia oxidovaných a neoxidovaných polynenasýtených mastných kyselín ako priamych mediátorov VCAM-1 expresie.

Na stanovenie, či PUFA alebo oxidované PUFA majú úlohu ako priame imunomodulátory génovej expresie endoteliálnych buniek sa ranne pasážované ľudské aortálne endoteliálne bunky (HAEC) kultivovali počas 8 hodín v médiu a sére a vystavili sa nasýteným (stearovej), mononenasýteným (olejovej) a polynenasýteným (linolová a arachidónová) kyselinám; rovnako ako hydroperoxidom mastných kyselín linolovej (13-HPODE) alebo arachidónovej (15-HPETE). HAEC sa tiež alternatívne exponovali cytokínovému tumor nekrotizujúcemu faktoru-α.

HAEC sa vystavili linolovej kyseline alebo 13-HPODE počas rôzneho času viackrát až do 48 hodín a potom sa skúšali na bunkovú povrchovú expresiu VCAM-1 ELISA skúškou. Výsledky sa porovnali s HAEC vystaveným cytokínu TNF-α (100 U/ml) počas rovnakej časovej periódy. VCAM-1 expresia v HAEC inkubovanými s buď linolovou kyselinou alebo 13-HPODE je prechodne indukovaná. Expresia narastá približne pri 8 až 9 hodinách so signifikantnou expresiou pri 24 hodinách a znižuje sa pri 48 hodinách. Kinetika VCAM-1 indukcie ako kyselinou linolovou, tak 13-HPODE odráža kinetiku TNF-α a tak sa mechanizmus, ktorým polynenasýtené mastné kyseliny indukujú VCAM-1 zdá byť rovnakým ako u TNF-α.

Štúdie odpovedi závislosti dávky linolovej kyseliny a 13-HPODE na VCAM-1 génovej expresii pri 8 hodinách sa tiež uskutočnili. Pozorovalo sa, že 7,5 μM je najnižšia vrcholová dávka, pri ktorej linolová kyselina a 13-HPODE indukujú signifikantnú VCAM-1 génovú expresiu.

Potom sa skúmalo, či krátkodobá inkubácia endoteliálnych buniek s polynenasýtenými mastnými kyselinami indukuje tiež ICAM-1 a E-selektín expresiu. Zistilo sa, že polynenasýtené

mastné kyseliny linolová a arachidónová indukujú povrchovú génovú expresiu približne 59 % k TNF indukovanej génovej expresii VCAM-1. Pozoruhodné je, že ani ICAM-1 ani E-selektín neboli indukované týmito mastnými kyselinami. Naopak, nasýtená mastná kyselina - kyselina stearová a mononenasýtená mastná kyselina - kyselina olejová neindukovali expresiu VCAM-1, ICAM-1 alebo E-selektínu. VCAM-1 génová expresia bola tiež pozorovaná pri inkubácii HAEC s oxidovanými metabolitmi kyseliny linolovej (13-HPODE) a kyseliny arachidónovej (15-HPETE).

Na zistenie, či oxidačný stres v endoteliálnych bunkách spôsobený polynenasýtenými mastnými kyselinami a ich oxidovanými metabolitmi indukuje VCAM-1 mechanizmom citlivým na redukciu sa HAEC vopred vystavili antioxidantu pyrolidínditiokarbamátu (PDTC, 50 μM) počas 30 minút a potom sa bunky nezávisle inkubovali s kyselinou linolovou, kyselinou arachidónovou, 13-HPODE a 15-HPETE (všetko 15 μM) počas 8 hodín. Zistilo sa, že PDTC suprivuje génovú expresiu VCAM-1 indukovanú polynenasýtenými kyselinami a ich oxidovanými náprotivkami. Toto ukazuje na to, že indukcia je sprostredkovaná oxidovanou molekulou a že indukcii je zabránené, ak je oxidácia molekuly blokovaná (t.j. oxidácia nenastane), revertovaná (t.j. signálna molekula je redukovaná), alebo je zabránené jej interakcii s cieľovým proteínom, snáď vďaka redox komplexu.

Na určenie toho, či selektívna indukcia VCAM-1 PUFA a ich oxidovanými metabolitmi je pozorovateľná na mRNA úrovni sa HAEC inkubovali s kyselinou linolovou alebo 13-HPODE. Kyselina linoleová a 13-HPODE indukovali VCAM-1 mRNA akumuláciu, ktorá bola podobná hladine indukovanej TNF-α. Naproti tomu tu nebola žiadna indukcia ICAM-1 alebo E-selektín génovej expresie pri hladine mRNA v HAEC inkubovanou s kyselinou linolovou alebo 13-HPODE. Tieto zistenia sú podobné tým, ktoré sa zistili na úrovni bunkového povrchu.

Tieto výsledky naznačujú, že pretranslačný regulačný mechanizmus sprostredkuje indukciu VCAM-1 génovej expresie po-

lynenasýtenými mastnými kyselinami a ich oxidovanými metabolitmi.

Bolo tiež žiadúce určiť, či polynenasýtené mastné kyseliny účinkujú ako primárny signál alebo operujú cez regulačný proteín, ktorý používa cytokín IL-4 v indukcii VCAM-1 génovej expresie. K výskumu, či novo syntetizované proteíny ako je IL-4 sú použité v syntéze génovej expresie VCAM-1 indukovanej PUFA ako je kyselina linolová, sa HAEC inkubovali s 13-HPODE (7,5 μM) a vystavili inhibítoru proteínovej syntézy, cykloheximidu. Nebola tu žiadna inhibícia mRNA akumulácie VCAM-1 cykloheximidom v HAEC inkubovaných s 13-HPODE. Produkcia IL-4 HAEC inkubovaných s kyselinou linolovou alebo kyselinou arachidónovou a ich oxidovanými metabolitmi, stanovená pomocou ELISA, sa tiež merala. Nebolo tu žiadne zvýšenie v IL-4 produkciou HAEC inkubovanými s týmito PUFA alebo ich oxidovanými metabolitmi.

Predchádzajúce výskumy demonštrovali vďaka štúdiám delécií a heterológnych promótorov, že cytokínmi a non-cytokínmi aktivovaná VCAM-1 génová expresia v endoteliálnych bunkách je aspoň čiastočne transkribovaná vďaka dvom NF-kB podobným DNA väzbovým elementom. Demonštrovalo sa tiež, že PDTC inhibuje VCAM-1 génovú expresiu cez redox-senzitívny NF-kB podobný faktor. Na určenie, či polynenasýtené mastné kyseliny indukujú transkripčnú aktiváciu ľudského VCAM-1 promótora cestou rovnakého mechanizmu, sa chimerický reportér gén p288 VCAM-CAT, ktorý obsahoval koordináty -288 až +22 ľudského VCAM-1 promótora, prechodne transfektoval do HAEC. Pridanie kyseliny linolovej (7,5 μM) indukovalo VCAM-1 promótor. Pridanie kyseliny linolovej (7,5 μM) indukovalo VCAM-1 promótorovú aktivitu, ktorá bola viac ako dvojnásobná ako kontrolná a asi 60 % k maximálnemu signálu produkovanému TNF-α. Podobné výsledky sa získali s minimálnym - cytokínmi indukovateľným promótorom VCAM-1 génu (p85 VCAM-CAT), ktorý obsahoval -77 a -63 bp NF-kB-podobných miest. Ani kyselina linolová, ani TNF-α nemali žiadny vplyv na aktivitu pri použití konštitutívne exprimovaného pSV_2CAT konštruktu. PDTC inhiboval transkripčnú aktiváciu obidvoch VCAM-1 promótorových konštruktov indukovaných kyselinou linolovou.

Údaje ukazujú, že analogicky k TNF-α polynenasýtené mastné kyseliny ako je kyselina linolová indukujú transkripčnú aktiváciu VCAM-1 cez NF-kB-podobný redox-senzitívny mechanizmus.

Na určenie, či polynenasýtené mastné kyseliny a ich oxidované metabolity regulujú aktivitu VCAM-1 promótora cez NF-kB-podobný transkripčný regulačný faktor, sa nukleárne extrakty z HAEC skúšali na DNA väzbovú aktivitu k dvojreťazcovému oligonukleotidu, ktorý obsahoval VCAM-1 NF-kB-podobné promótorové elementy umiestnené v polohách -77 a -63. Ako je ukázané na obr. 7, dva pásiky A a C, ktoré reprezentujú NF-kB-podobnú aktivitu, boli indukované v odpovedi na trojhodinovú expozíciu kyseline linolovej (7,5 μM). Podobné zistenia sa pozorovali pri expozícii cytokínu TNF-α (100 U/ml). Široký pásik B bol pozorovaný pre kontrolu (neošetrené bunky). Žiadna indukcia NF-kB-podobnej väzby sa nezistila pre mononenasýtenú mastnú kyselinu, kyselinu olejovú. Predošetrenie buniek s PDTC počas 30 minút inhibovalo komplexnú A a C DNA väzbovú aktivitu po aktivácii kyselinou linolovou. Tieto zistenia sú v súlade so skôr opísanými zisteniami, že PDTC blokuje aktiváciu VCAM-1 génovej expresie v HUVEC inhibícii aktivácie týchto NF-kB-podobných DNA väzbových proteínov.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1

Vplyv oxidovaných a neoxidovaných polynenasýtených mastných kyselín na kinetiku aktivácie VCAM-1 génovej expresie.

Ľudské aortálne endoteliálne bunky (HAEC) sa umiestnili v 96 jamkových platniach a inkubovali sa s kyselinou linolovou (7,5 μM), 13-HPODE (7,5 μM) alebo TNF-α (100 U/ml) počas piatich rôznych časových období až do 48 hodín. HAEC, získané od Clonetics (Boston, MA), sa kultivovali v Medium 199 suplementovanom fetálnym hovädzím sérom (FBS), 16 U/ml heparínu, 10 U/ml epidermálneho rastového faktora, 50 μg/ml rastového suplementu epidermálnych buniek, 2 mM L-glutamínu, 100 U/ml penicilínu

a 100 µg/ml streptomycínu. Jeden deň pred experimentom sa bunky umiestnili do média s obsahom 4 % FBS. Konfluentné HAEC sa inkubovali až do 48 hodín s TNF-α (100 U/ml) alebo kyselinou stearovou, olejovou, linolovou, linolénovou alebo arachidónovou (7,5 µM). Podobné štúdie sa uskutočnili s odlišnými dávkami kyseliny linolovej alebo 13-HPODE počas 8 hodinovej periódy (1 až 60 µM) (obr. 2). Kvantifikácia sa uskutočnila stanovením kalorimetrickej konverzie pri 450 nm TMB. Štúdie sa uskutočnili trojnásobne (n = 4 pre každú experimentálnu hodnotu).
* - hodnoty sa líšili ($p < 0,05$) od kontroly.

Ako ukazuje obr. 1, ako kyselina linolová tak 13-HPODE indukovali expresiu VCAM-1. Desať hodín po expozícii bolo množstvo VCAM-1 na bunkovom povrchu indukované kyselinou linolovou a 13-HPODE vyššie ako polovičné vzhľadom na množstvo indukované TNF-α.

Ako je ukázané na obr. 2, je indukcia VCAM-1 kyselinou linoleovou a 13-HPODE citlivá na koncentráciu. Pri koncentrácii týchto zlúčenín medzi 2 a 10 µM je tu ostré zvýšenie množstva indukovaného VCAM-1 na povrchu buniek, ktoré pretrváva približne konštantne od koncentrácie aspoň 100 µM. Malo by byť pozorované, že PUFA koncentrácia naznačená na obr. 2 je v spojení s koncentráciou nachádzanou endogénne v HAEC.

Príklad 2

Polynenasýtené mastné kyseliny indukujú génovú expresiu VCAM-1, ale nie ICAM-1 a E-selektínu.

Expresia VCAM-1, ICAM-1 a E-selektínu na povrchu buniek v HAEC sa merala pomocou ELISA. HAEC, získané od Clonetics (California), sa kultivovali v Medium 199 suplementovanom 20 % fetálnym hovädzím sérom (FBS), 16 U/ml heparínu, 10 U/ml epidermálneho rastového faktora, 50 µg/ml rastového suplementu epidermálnych buniek, 2 mM L-glutamínu, 100 U/ml penicilínu a 100 µg/ml streptomycínu. Jeden deň pred experimentom sa bunky umiestnili do média s obsahom 4 % FBS. Konfluentné HAEC boli

alebo neboli inkubované počas 8 hodín s TNF-α (100 U/ml) alebo kyselinou stearovou, olejovou, linolovou, linolénovou alebo arachidónovou (7,5 μM). Povrchová expresia A) VCAM-1, B) ICAM-1 a C) E-selektínu bola určená primárnou väzbou VCAM-1 špecifických, ICAM-1 špecifických a E-selektín špecifických myších protilátok nasledovanou sekundárnym naviazaním kozích antimyších (IgG) protilátok s naviazanou chrenovou peroxidázou. Kvantifikácia sa uskutočnila stanovením kalorimetrickej konverzie pri 450 nm TMB. Štúdie sa uskutočnili trojnásobne (n = 4 pre každú experimentálnu hodnotu).
* - hodnoty sa líšili ($p < 0,05$) od kontroly.

Ako ukazuje obr. 3, kyselina linolová, kyselina linolénová a kyselina arachidónová signifikantne indukujú expresiu VCAM-1, ale neindukujú bunkovú povrchovú expresiu ICAM-1 a E-selektínu. Ani kyselina stearová, ani kyselina olejová neindukovali expresiu VCAM-1, ICAM-1 ani E-selektínu. TNF-α silne indukoval expresiu všetkých troch molekúl bunkového povrchu.

Príklad 3

Antioxidant PDTC suprivuje VCAM-1 indukciu polynenasýtenými mastnými kyselinami a ich oxidovanými metabolitmi

Konfluentné HAEC sa predošetrili v prítomnosti alebo neprítomnosti PDTC (pyrolidínditiokarbamátu sodného, 50 μM) počas 30 minút. Bunky sa potom inkubovali počas 8 hodín s TNF-α (100 U/ml), kyselinou linolovou alebo arachidónovou (7,5 μM), alebo hydroxyperoxidmi mastných kyselín 13-HPODE (7,5 μM) alebo 15-HPETE (7,5 μM). Expresia VCAM-1 na povrchu buniek v HAEC sa merala ELISA, ako opisuje príklad 1. Štúdie sa uskutočnili trojnásobne (n = 4 pre každú experimentálnu hodnotu).
* - hodnoty sa líšili ($p < 0,05$) od kontroly.

Ako ukazuje obr. 4, PDTC suprivuje indukciu VCAM-1 kyselinou linolovou, 13-HPODE, kyselinou arachidónovou a 15-HPETE.

Príklad 4

Akútna indukcia VCAM-1 mRNA kyselinou linolovou a 13-HPODE

HAEC sa vystavili kyseline linolovej (7,5 μM) alebo 13-HPODE (7,5 μM). Celková RNA sa izolovala a 20 μg sa frakcionovalo podľa veľkosti denaturačnou 1 % agaróza-formaldehyd gélovou elektroforézou, transferovalo do nitrocelulózy a hybridizovalo do ^{32}P-značenej buď A) VCAM-1 špecifickej, B) β-aktín špecifickej cDNA a vizualizovalo autorádiografiou. Po premytí sa filtre vystavili RTG filmu pri teplote -70 °C s jedným intenzifikovaným screenom počas 24 hodín. Identifikácia dráh: 1) kontrola, 2) kyselina linolénová (akútna, 8 hodinová expozícia), 3) kyselina linolová (48 hodinová expozícia), 4) 13-HPODE (akútna, 8 hodinová expozícia), 5) TNF-α (100 U/ml, 4 hodinová expozícia).

Ako je ukázané na obr. 5, ako kyselina linolová, tak 13-HPODE indukujú produkciu mRNA pre VCAM-1 v 8 hodinách. Po 48 hodinách kyselina linolová ďalej neindukuje VCAM-1 mRNA.

Príklad 5

Indukcia VCAM-1 mRNA PUFA je nezávislá na bunkovej syntéze proteínov.

HAEC sa exponovali buď kyseline linolovej alebo arachidónovej (7,5 μM) v prítomnosti alebo neprítomnosti cykloheximidu (10 μg/ml). Celková RNA sa izolovala a 20 μg sa frakcionovalo podľa veľkosti denaturačnou 1 % agaróza-formaldehyd gélovou elektroforézou, transferovalo do nitrocelulózy a hybridizovalo do A) ^{32}P-značenej ľudskej VCAM-1 alebo B) β-aktín špecifickej cDNA a potom sa vizualizovalo autorádiografiou. Po premytí sa filtre vystavili RTG filmu pri teplote -70 °C s jedným intenzifikovaným screenom počas 24 hodín.

Ako ukazuje obr. 6, indukcia VCAM-1 kyselinou linolovou a arachidónovou je nezávislá na bunkovej syntéze proteínov.

Príklad 6

Kyselina linolová indukuje transkripčnú aktiváciu VCAM-1 promótora prostredníctvom NF-kB podobného faktora citlivého na redukciu.

HAEC sa rozdelili v takom pomere, aby dal približne 60 % konfluenciu v 100-mm platniach tkanivových kultúr. HAEC sa transfektovali s 30 µg buď p288 VCAMCAT alebo p85 VCAMCAT alebo SV_2CAT plazmidom, koprecipitačnou technikou fosforečnanom vápenatým s použitím štandardnej techniky. Po 24 hodinovej zotavovacej perióde boli alebo neboli, HAEC boli vopred ošetrené 50 µM PDTC a po 30 minútach boli exponované kyseline linolovej (7,5 µM) alebo TNF-α (100 U/ml) priamo pridaným do platní. Po 18 hodinách sa bunkový extrakt pripravil rýchlym zmrazením-topením v 0,25 Tris, pH 8,0. Proteíny každého bunkového extraktu sa skúšali na chloramfenikolacetyltransferázovú (CAT) aktivitu, (Ac, acetylovaný, N, neacetylovaný chloramfenikol).

Obr. 7 ilustruje výsledky tohto experimentu. Kyselina linoleová indukuje transkripčnú aktiváciu VCAM-1 promótora prostredníctvom NF-kB podobného faktora citlivého na redukciu. Tieto výsledky sú podobné tým, ktoré sú pozorované u aktivácie VCAM-1 promótora cytokínmi ako je TNF-α. To naznačuje, že PUFA účinkujú cez oxidovaný medziprodukt, ktorý tiež sprostredkuje cytokínovú aktiváciu VCAM-1.

Príklad 7

Polynenasýtené mastné kyseliny aktivujú NF-kB podobné DNA väzbové aktivity, ktoré sú blokované antioxidantom PDTC.

Konfluentné HAEC v médiu s obsahom 4 % FBS (ako opisuje obr. 1) sa ošetrili PDTC (50 µM) počas 30 minút a potom vystavili na 3 hodiny kyseline linolovej (7,5 µM), kyseline olejovej (7,5 µM) alebo TNF-α (100 U/ml). 5 mikrogramov nukleárneho extraktu sa inkubovalo s dvojreťazcovou ^{32}P-značenou wtVCAM, frakcionovalo podľa veľkosti na 4 % natívnom akrylamidovom géli

a exponovalo na autorádiografickom filme pri -70 °C počas 18 hodín. Dva pásiky A a C, ktoré reprezentujú NF-kB podobnú väzbovú aktivitu, sú označené. Široký pásik B bol pozorovaný v kontrolných (neošetrených) bunkách.

Obr. 8 ilustruje, že kyselina linolová indukuje NF-kβ väzbovú aktivitu k VCAM-1 promótoru spôsobom citlivým na redukciu. Toto je analogické k cytokínu TNF-α a naznačuje to podobný mechanizmus akcie. TNF-α pravdepodobne indukuje VCAM-1 mechanizmom, ktorý je sprostredkovaný ox-PUFA.

Príklad 8

Oxidácia v uskutočnení bez buniek a média ako neoxidovanou, tak oxidovanou (15-HPETE) kyselinou arachidónovou

Obr. 9A a 9B sú stĺpcové grafy pomerov reaktívnych substancií kyseliny tiabarbiturovej (O.D.532 nm), kyseliny arachidónovej a 15-HPETE v prítomnosti alebo neprítomnosti PDTC. Skúška reaktivity kyseliny tiobarbiturovej (TBARS) meria oxidačnú schopnosť materiálu v prostredí bez buniek a média. Ako ukazujú obrázky, ako kyselina arachidónová, tak 15-HPETE vykazujú signifikantnú TBARS aktivitu, ktorá je inhibovaná PDTC.

Príklad 9

Metódy na liečbu VCAM-1 sprostredkovaných chorôb

Objav, že polynenasýtené mastné kyseliny a ich oxidované metabolity sú selektívnymi, na redukciu citlivými modulátormi poskytuje základ na terapiu chorôb, ktoré sú sprostredkované VCAM-1 alebo génmi citlivými na redukciu. Je poskytnutá metóda na liečbu aterosklerózy, post-angioplastickej restenózy, koronárnej arteriálnej choroby a iných kardiovaskulárnych chorôb ako aj nekardiovaskulárnych zápalových chorôb, ktoré sú sprostredkované VCAM-1 a zahŕňa odstránenie, zníženie koncentrácie alebo zabránenie tvorbe oxidovaných polynenasýtených mastných kyselín, vrátane, ale nielen, oxidovanej linolovej, linoléno-

vej a arachidónovej kyseliny. V alternatívnom uskutočnení je poskytnutá metóda na liečbu týchto chorôb, ktorá zahŕňa prevenciu interakcie PUFA alebo ox-PUFA s proteínom alebo peptidom, ktorý médiuje VCAM-1 expresiu.

Inhibícia expresie VCAM-1 sa môže uskutočniť množstvom spôsobov, vrátane podania antioxidantu, ktorý zabráni oxidácii polynenasýtených mastných kyselín in vivo modifikáciou metabolizmu PUFA na ox-PUFA, ako je podrobne opísané ďalej.

1. Podanie antioxidantov

Akákoľvek zlúčenina, ktorá redukuje ox-PUFA alebo ktorá oxiduje PUFA a ktorá je relatívne netoxická a biologicky dostupná alebo ktorá sa môže modifikovať na dosiahnutie biologickej dostupnosti, sa môže použiť v tejto terapii. Odborníci ľahko určia, či zlúčenina redukuje ox-PUFA alebo inhibuje PUFA použitím štandardných techník.

Ditiokarboxylátové antioxidanty

Zistilo sa, že ditiokarboxyláty sú užitočné pri liečbe aterosklerózy a iných kardiovaskulárnych a zápalových chorôb. Ditiokarboxyláty, vrátane ditiokarbamátov, sa môžu využiť na blokovanie schopnosti buniek, vrátane buniek endotelu, exprimovať VCAM-1 alebo suprivovať expresiu génov citlivých na redukciu alebo aktivovať gény, ktoré sú suprivované cez redox senzitívnu dráhu.

Aspoň jedna zo zlúčenín, pyrolidínditiokarbamát (PDTC), inhibuje VCAM-1 génovú expresiu v koncentráciách menších ako 1,0 mikromolárnych. Táto zlúčenina tiež vykazuje preferenčnú toxicitu k proliferujúcim alebo abnormálne sa deliacim bunkám hladkého svalu ciev. Iný ditiokarbamát, N-metyl-N-karboxymetyl--N-karboditioát sodný, tiež inhibuje expresiu VCAM-1 bez signifikantného vplyvu na ICAM-1, ale nevykazuje preferenčnú toxicitu k abnormálne sa deliacim bunkám hladkého svalu ciev. Iný ditiokarbamát, N-metyl-N-karboxymetyl-N-karboditioát sodný, tiež

inhibuje expresiu VCAM-1 bez signifikantného vplyvu na ICAM-1, ale nevykazuje preferenčnú toxicitu k abnormálne sa deliacim bunkám hladkého svalu ciev.

Zistilo sa, že pyrolidínditiokarbamát neblokuje signifikantne ELAM-1 alebo ICAM-1 expresiu a preto liečba týmito zlúčeninami neovplyvňuje nepriaznivé aspekty zápalovej odpovede médiovanej ELAM-1 alebo ICAM-1. Tak je zabránené generalizovanej imunosupresii. To umožňuje vyhnúť sa systémovým komplikáciám z generalizovanej inhibície adhéznych molekúl v mnohých iných typoch buniek, o ktorých je známe, že tieto exprimujú. Iné farmaceuticky akceptovateľné soli PDTC sú tiež účinnými agens pri liečbe kardiovaskulárnych a zápalových chorôb.

Ditiokarbamáty sú chelátory prechodových kovov klinicky používané pri intoxikácii ťažkými kovmi. Baselt, R. C., F. W. J. Sunderman et al., (1977), "Comparisons of antidotal efficacy of sodium diethyldithiocarbamate, D-penicillamine and triethylenetetramin upon acute toxicity of nickel carbonyl in rats" Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 18(4): 677-88; Menne T. and K. Kaaber (1978), "Treatment of pompholyx due to nickel allergy with chelating agens." Contact Dermatitis 4(5): 289-90, Sunderman, F. W. (1978), "Clinical response to therapeutic agens in poissoning from mercury vapor" Ann Clin LAB Sci 8(4): 259-69, Sunderman, F. W. (1979), "Efficacy of sodium diethyldithiocarbamate (dithiocarb) in acute nickel carbonyl poisoning." Ann Clin Lab Sci 9(1): 1-10, Gale, G. R., A. B. Smith, et al., (1981), "Diethyldithiocarbamate in treatment of acute cadmium poisoning." Ann Clin Lab Sci 11(6): 476-83, Jones, M. M. a M. G. Cherian (1990), "The search for chelate antaginists for cadmium intoxication", Toxicology 62(1): 1-25, Jones, S. G., M. A. Basinger, et al., (1982): "A comparisom of diethyldithiocarbamate and EDTA as antidotes for acute cadmium intoxication". Res Commun Chem Pathol Pharmacol 38(2): 271-8, Pages, A., J. S. Casas, et al., (1985), Dithiocarbamates in heavy metal poisoning: complexes of N,N-di(1-hydroxyethyl)dithiocarbamate with Zn(II), Cd(II), Hg(II), CH_3Hg(II) a C_6H_5Hg(II)." J. Inorg. Biochem. 25(1): 35-42, Tandon, S. K., N. S. Hashmi et

al. (1990) "The lead-chelating effects of substituted dithiocarbamates." Biomed Environ Sci 3(3): 299-305.

Ditiokarbamáty sa tiež použili adjuvantne k chemoterapii cis-platinou na prevenciu nefrotoxicity. Hacker, M. P., W. B. Ershler, et al. (1982). "Effects og disulfiram (tetraethylthiuram disulfide) and diethyldithiocarbamate on the bladder toxicity and antitumor activity of cyclophosphamide in mice." Cancer Res. 42(11): 4490-4. Bodenner, 1986 #733, Saran, M. a Bors, W. (1990). "Radical reactions in vivo-an overview." Radiat. Environ. Biophys 29(4):249-62.

Ditiokarbamátom teraz používaným na liečbu abusu alkoholu je disulfiram, dimér dietylditiokarbamátu. Disulfiram inhibuje pečeňovú aldehyddehydrogenázu. Inoue, K. a Fukunaga et al., (1982), "Effects of disulfiram and its reduced metabolite, diethyldithiocarbamate on aldehyde dehydrogenase of human erythrocytes." Life Sci. 30(5): 419-24.

Bolo opísané, že ditiokarbamáty inhibujú replikáciu HIV vírusu a tiež zvyšujú maturáciu špecifických subpopulácií T buniek. To viedlo ku klinickým štúdiám dietylditiokarbamátu u populácie pacientov s AIDS. Reisinger E., et al., (1990). "Inhibition of HIV progression by dithiocarb." Lancet 335:679.

Ditiokarboxyláty sú zlúčeniny štruktúry A-SC(S)-B, ktoré sú členmi všeobecnej skupiny zlúčenín známych ako tiolové antioxidanty a sú alternatívne označované ako karboditioly alebo karboditioláty. Zdá sa, že -SC(S)-skupina je podstatná pre terapeutickú aktivitu a že A a B môže byť akákoľvek skupina, ktorá nemá nepriaznivý vplyv na účinnosť alebo toxicitu zlúčeniny.

V alternatívnom uskutočnení je nahradený jeden alebo obidva atómy síry v ditiokarbamáte atómami selénu. Substitúcia selénu za síru môže v istých prípadoch znižovať toxicitu molekuly a tak môže byť lepšie tolerovaná pacientom.

A a B môže vybrať odborník na dosiahnutie požadovaných

charakteristík zlúčeniny, vrátane veľkosti, náboja, toxicity a stupňa stability, (vrátane stability v kyslom prostredí ako je žalúdok, alebo zásaditom prostredí ako je črevný trakt). Selekcia A a B môže byť tiež dôležitá pre efekt distribúcie v tkanivách a farmakokinetiku zlúčeniny. Vo všeobecnosti, na liečbu kardiovaskulárnych chorôb je potrebné, aby sa zlúčenina akumulovala, alebo lokalizovala, vo vrstve arteriálnej intimy, ktorá obsahuje bunky cievneho endotelu. Zlúčeniny sú výhodne eliminované renálnou exkréciou.

Výhodou farmaceutického podania ditiokarboxylátu je to, že sa nezdá byť enzymaticky štiepený in vivo tioesterázami a tak môže vykazovať predĺžený polčas in vivo.

Vo výhodnom uskutočnení je A vodík alebo farmaceuticky prijateľný katión, ktorý zahŕňa, ale bez obmedzenia, sodík, draslík, vápnik, horčík, hliník, zinok, bizmut, bárium, meď, kobalt, nikel alebo kadmium; soľotvornú organickú kyselinu, typicky kyselinu karboxylovú, ktorá zahŕňa, ale bez obmedzenia, kyselinu octovú, kyselinu šťavelovú, kyselinu vínnu, kyselinu jantárovú, kyselinu jablčnú, kyselinu askorbovú, kyselinu benzoovú, tanín, kyselinu pamoovú, kyselinu algínovú, kyselinu polyglutámovú, kyselinu naftalénsulfónovú, kyselinu naftaléndisulfónovú alebo kyselinu polygalakturónovú; alebo katión vytvorený z amoniaku alebo inej dusíkatej zásady, ktorý zahŕňa, ale bez obmedzenia, dusíkaté heterocykly, alebo skupinu vzorca $NR^4R^5R^6R^7$, kde R^4, R^5, R^6 a R^7 predstavujú nezávisle jeden od druhého vodík, C_{1-6}lineárny, rozvetvený alebo (prípadne C_{4-6}) cyklický alkyl, hydroxy(C_{1-6})alkyl (kde jedna alebo viac hydroxyskupín je umiestnených na ktoromkoľvek z atómov uhlíka), alebo aryl, N,N-dibenzyletyléndiamín, D-glukózamín, cholín, tetraetylamónium alebo etyléndiamín.

V ďalšom uskutočnení môže byť A fyziologicky odštiepiteľná skupina, ktorá môže byť odštiepená in vivo z molekuly, ku ktorej je pripojená a zahŕňa, ale bez obmedzenia, acyl (ktorý zahŕňa acetyl, propionyl a butyryl), alkyl, fosfát, sulfát alebo sulfonát.

V jednom uskutočnení je B alkyl, alkenyl, alkinyl, alkaryl, aralkyl, halogénalkyl, halogénalkenyl, halogénalkinyl, aryl, alkaryl, vodík, C_{1-6}alkoxy-C_{1-10}alkyl, C_{1-6}alkyltio-C_{1-10}alkyl, NR^2R^3, $-(CHOH)_nCH_2OH$, kde n je 0, 1, 2, 3, 4, 5 alebo 6, $-(CH_2)_nCO_2R^1$, ktorý zahŕňa alkylacetyl, alkylpropionyl a alkylbutyryl, alebo hydroxy(C_{1-6})alkyl- (kde jedna alebo viac hydroxylových skupín je umiestnených na ktoromkoľvek z atómov uhlíka).

V ďalšom uskutočnení je B NR^2R^3, kde R^2 a R^3 predstavujú nezávisle jeden od druhého alkyl; $-(CHOH)_n(CH_2)_nOH$, kde n je 0, 1, 2, 3, 4, 5 alebo 6; $-(CH_2)_nCO_2R^1$, $-(CH_2)_nCO_2R^4$; hydroxy-(C_{1-4})alkyl-; alkenyl (ktorý zahŕňa, ale bez obmedzenia, vinyl, alyl a $CH_3CH=CH-CH_2CH_2$); alkyl(CO_2H), alkenyl(CO_2H), alkinyl(CO_2H) alebo aryl, kde arylová skupina môže byť substituovaná ako je opísané vyššie a to napríklad s NO_2, CH_3, terc-butylom, CO_2H, halogénom alebo p-OH skupinou; alebo R^2 a R^3 môžu spolu tvoriť mostík ako je $-(CH_2)_m-$, kde m je 3, 4, 5 alebo 6 a kde R^4 predstavuje alkyl, aryl, alkaryl alebo aralkyl, pričom zahŕňa acetyl, propionyl a butyryl.

V ešte ďalšom uskutočnení môže byť B heterocyklická alebo alkylheterocyklická skupina. Heterocyklus môže byť prípadne čiastočne alebo úplne hydrogenovaný. Neobmedzujúcimi príkladmi sú tie, ktoré sú uvedené vyššie a zahŕňajú fenazín, fenotiazín, pyridín a dihydropyridín.

V ešte ďalšom uskutočnení je B zvyšok farmaceuticky aktívnej zlúčeniny alebo liečiva. Výraz liečivo, ako je tu použitý, označuje akúkoľvek substanciu používanú vnútorne alebo zvonku ako medicínu na liečbu, ošetrovanie alebo prevenciu choroby alebo poruchy.

Neobmedzujúcimi príkladmi sú liečivá na liečenie alebo prevenciu kardiovaskulárnych chorôb, ktoré zahŕňajú antioxidanty ako je probucol; kyselinu nikotínovú; činidlá, ktoré zabraňujú zhlukovaniu doštičiek ako je aspirín; antitrombotické činidlá ako je coumadin; blokátory vápnikových kanálikov ako je

varapamil, diltiazem a nifedipin; inhibítory angiotenzínkonvertujúceho enzýmu (ACE) ako je captopril a enalopril, β-blokátory ako je propanalol, terbutanol a labetalol, nesteroidné protizápalové činidlá ako je ibuprofen, indomethacin, fenoprofen, kyselina mefenamová, kyselina flufenamová, sulindac alebo kortikosteroidy. Skupina -C(S)SA môže byť priamo pripojená k liečivu alebo môže byť pripojená cez akúkoľvek vhodnú spojovaciu ....

V inom uskutočnení je ditiokarbamát derivát kyseliny vzorca $AO_2C-R^9-NR^{10}-C(S)SA$, kde R^9 predstavuje dvojväzbovú B skupinu, spojovaciu skupinu alebo vnútorný zvyšok akejkoľvek z prirodzene sa vyskytujúcich aminokyselín (napríklad CH_3CH pre alanín, CH_2 pre glycín, $CH(CH_2)_4NH_2$ pre lyzín atď.) a R^{10} predstavuje vodík alebo nižší alkyl.

B môže byť tiež polymér, ku ktorému sú pripojené jedna alebo viac ditiokarbamátových skupín, buď priamo alebo cez akúkoľvek vhodnú spojovaciu skupinu. Ditiokarbamát je s výhodou uvoľňovaný z polyméru za in vivo podmienok počas vhodného časového obdobia s poskytnutím terapeutického prínosu. Vo výhodnom uskutočnení je polymér samotný tiež degradovateľný in vivo. Výraz biodegradovateľný alebo bioerodibilný ako je tu použitý, označuje polymér, ktorý sa rozpustí alebo degraduje počas obdobia, ktoré je prijateľné pri požadovanej aplikácii (obvykle terapia in vivo), obvykle menej ako päť rokov a s výhodou menej ako jeden rok, pri vystavení fyziologickému roztoku s pH 6 až 8, s teplotou medzi 25 a 34 °C. Vo výhodnom uskutočnení polymér degraduje počas obdobia medzi jednou hodinou a niekoľkými týždňami, podľa aplikácie.

Je známych veľa degradovateľných polymérov. Neobmedzujúcimi príkladmi sú peptidy, proteíny, nukleoproteíny, lipoproteíny, glykoproteíny a prírodné polypeptidy a polyaminokyseliny, ktoré zahŕňajú, ale bez obmedzenia, polyméry a kopolyméry lyzínu, arginínu, asparagínu, kyseliny aspartovej, cysteínu, kyseliny glutámovej, glutamínu, hydroxylyzínu, serínu, treonínu a tyrozínu; polyortoestery, ktoré zahŕňajú poly(α-hydroxykyseliny), napríklad kyselinu polymliečnu, kyselinu polyglykolovú,

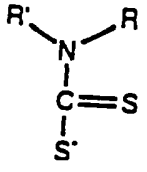
poly(laktid-ko-glykolid), polyanhydridy, albumín alebo kolagén, polysacharidy, ktoré obsahujú cukrové jednotky ako je laktóza a polykaprolaktám. Polymér môže byť náhodný alebo blokový polymér.

B môže byť tiež skupina, ktorá zvyšuje rozpustnosť ditiokarbamátu vo vode, napríklad -nižší alkyl-O-R^8, kde R^8 predstavuje $PO_2(OH)^-M^+$ alebo $PO_3(M^+)_2$, kde M^+ predstavuje farmaceuticky prijateľný katión; $-C(O)(CH_2)_2CO_2^-M^+$, alebo $-SO_3^-M^+$; -nižší alkylkarbonyl-nižší alkyl; -karboxy-nižší alkyl; -nižší alkylamino-nižší alkyl; N,N-disubstituovaný amino-nižší alkyl, kde subsituenty nezávisle jeden od druhého každý predstavujú nižší alkyl; pyridyl-nižší alkyl; imidazolyl-nižší alkyl; imidazolyl--Y-nižší alkyl, kde Y predstavuje tio alebo amino; morfolinyl--nižší alkyl; pyrolidinyl-nižší alkyl; tiazolinyl-nižší alkyl; piperidinyl-nižší alkyl; morfolinyl-nižší hydroxyalkyl; N-pyryl; piperazinyl-nižší alkyl; N-substituovaný piperazinyl-nižší alkyl, kde substituent je nižší alkyl; triazolyl-nižší alkyl; tetrazolyl-nižší alkyl; tetrazolylamino-nižší alkyl; alebo tiazolyl-nižší alkyl.

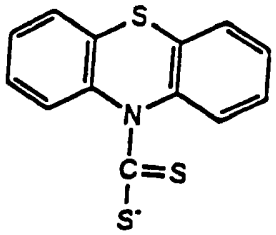
V alternatívnom uskutočnení sa môže podávať dimér ako je B-C(S)S-SC(S)-B.

Neobmedzujúce príklady ditiokarbamátov majú vzorec:

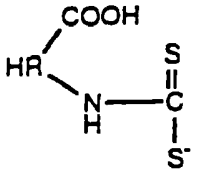
1) alifatický substrát

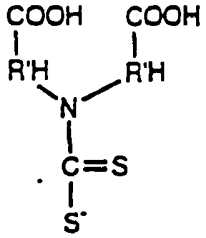


R - CH_2=CH
CH_3-CH=CH

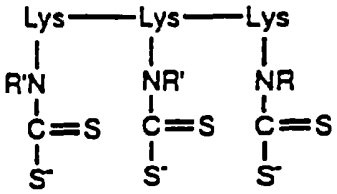


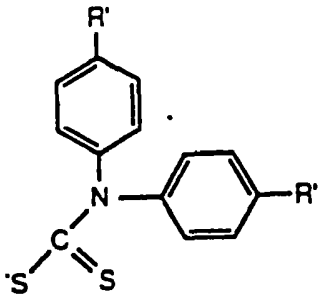
2) aminokyselina



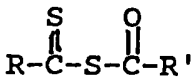


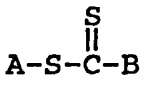
polyaminokyselina

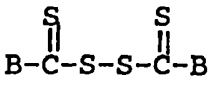




R'	R-
substituenty	R'
NO_2	
CH_3 alebo t-butyl	
COOH	
p-OH	

Na^+	
Ca^+	tioester
NH_4^+	
cholín$^+$ a kvart.amíny	
Mg^{++}	
Al^{+++}	
K^+	
H^+	





Ditiokarboxyláty sa môžu zvoliť na liečbu aterosklerózy a iných kardiovaskulárnych chorôb a zápalových chorôb preto, že majú správnu lipofilitu na umiestnenie v poškodenom mieste. Zlúčenina by sa nemala kompartmentalizovať v regiónoch s nízkym obratom ako sú tukové depozitá. Vo výhodnom uskutočnení na liečbu kardiovaskulárnych chorôb by nemala byť farmakokinetika zlúčeniny dramaticky narušená venostáznym zlyhaním srdca alebo renálnou insuficienciou.

Na umiestnenie aplikácií na liečbu zápalových kožných chorôb by sa mala vybrať zlúčenina formulovaná tak, aby bola absorbovaná kožou v dostatočnom množstve na dosiahnutie terapeutického efektu v postihnutom mieste.

Ditiokarboxyláty musia byť fyziologicky prijateľné. Vo všeobecnosti, zlúčeniny s terapeutickým indexom aspoň 2 a výhodne 5 alebo 10, sú akceptovateľné. Terapeutický index je de-

finovaný ako EC_{50}/IC_{50}, kde EC_{50} je koncentrácia zlúčeniny, ktorá inhibuje expresiu VCAM-1 na 50 % a IC_{50} je koncentrácia zlúčeniny, ktorá je toxická pre 50 % cieľových buniek. Bunková toxicita sa môže merať priamym počítaním buniek, vylúčením trypan blue, alebo rôznymi štúdiami metabolickej aktivity, ako je inkorporácia 3H-tymidínu odborníkom dobre známa. Terapeutický index PDTC v tkanivovej kultúre je väčší ako 100 pri meraní bunkovej toxicity rozdelenej podľa schopnosti inhibovať VCAM-1 expresiu aktivovanú TNF-α v HUVE bunkách. Iniciálna štúdia na rýchlo sa deliacich bunkách typu HT-18 ľudského gliómu nevykazovala žiadnu toxicitu pri koncentráciách 100-krát vyšších ako sú terapeutické koncentrácie. Disulfiram, orálne podávaná forma dietylditiokarbamátu, používaná pri liečbe abusu alkoholu, nevykazuje žiadnu významnú klinickú toxicitu, ak je vhodne podaný.

Je niekoľko ditiokarbamátov, o ktorých je známe, že sú génotoxické. Tieto zlúčeniny nepatria do rozsahu tohto vynálezu, ktorý je limitovaný na podanie fyziologicky akceptovateľného materiálu. Príkladom génotoxického ditiokarbamátu je fungicíd dimetylditiokarbamát zinku. Ďalej anticholínesterázové vlastnosti niektorých ditiokarbamátov môžu viesť k neurotoxickým efektom. Miller, D. (1982). Neurotoxicity of pesticidal carbamates. Neurobehav. Toxicol. Teratol. 4(6): 779-87.

Termín ditiokarboxyláty, ako je tu použitý špecificky zahŕňa, ale nie je obmedzený diokarbamátmi vzorcov:

$R^1SC(S)NR^2R^3$ alebo $R^2R^3N(S)CS\text{-}SC(S)NR^2R^3$

kde R^1 predstavuje H alebo farmaceuticky prijateľný katión, ktorý zahŕňa, ale bez obmedzenia, sodík, draslík alebo $NR^4R^5R^6R^7$, kde R^4, R^5, R^6 a R^7 predstavujú nezávisle jeden od druhého vodík, C_{1-6} lineárny, rozvetvený alebo cyklický alkyl, hydroxy(C_{1-6})alkyl (kde jedna alebo viac hydroxylových skupín je umiestnených na ktoromkoľvek z atómov uhlíka), alebo aryl a R^2 a R^3 predstavujú nezávisle jeden od druhého C_{1-10} lineárny alebo cyklický alkyl; $-(CHOH)_nCH_2OH$, kde n je 0, 1, 2, 3, 4,

5 alebo 6, $-(CH_2)_nCO_2R^1$, $-(CH_2)_nCO_2R^4$; hydroxy(C_{1-6})alkyl-, alebo R^2 a R^3 spolu tvoria mostík ako je $-(CH_2)_m-$, kde m je 3 až 6 a R^4 predstavuje alkyl, aryl, alkaryl, pričom zahrňa acetyl, propionyl a butyryl.

Špecifické príklady vhodných ditiokarbamátov ilustrovaných na obr. 15 zahŕňajú pyrolidín-N-karboditioát sodný, N-metyl-N--karboxymetyl-N-karboditioát sodný, N,N-di(karboxymetyl)-N-karboditioát trojsodný, N-metyl-D-glukamín-N-karboditioát sodný, N,N-dietyl-N-karboditioát sodný (dietylditiokarbamát sodný) a N,N-diizopropyl-N-karboditioát sodný.

Aktívne ditiokarboxyláty a predovšetkým ditiokarbamáty sú obchodne dostupné alebo sa môžu pripraviť s použitím známych metód.

II. Biologická aktivita

Schopnosť ditiokarboxylátov inhibovať expresiu VCAM-1 sa môže merať množstvom spôsobov, vrátane metód podrobne opísaných v príkladoch 9 až 15. Príklady 9 až 11, 14 a 15 opisujú hodnotenie biologickej aktivity pyrolidín-N-karboditioátu sodného (tiež označovaný ako PDTC). Tieto príklady nemajú obmedzovať rozsah vynálezu, ktorý špecificky zahŕňa použitie akejkoľvek z vyššie uvedených kompozícií na liečbu aterosklerózy a iných typov zápalov a kardiovaskulárnych chorôb médiovaných VCAM-1. Akákoľvek zo zlúčenín opísaných vyššie sa môže ľahko nahradiť za PDTC a hodnotiť rovnakým spôsobom.

Príklady 12 a 13 poskytujú porovnávacie údaje na schopnosti množstva ditiokarbamátov inhibovať génovú expresiu VCAM-1. Príklady uvedené nižšie určujú, že chránené ditiokarbamáty špecificky blokujú schopnosť VCAM-1 byť exprimovaná vaskulárnymi endoteliálnymi bunkami v odpovedi na mnohé signály, o ktorých je známe, že sú aktívne v ateroskleróze a zápalovej odpovedi.

Experimentálne postupy

Bunkové kultúry: HUVE bunky sa izolovali z ľudskej umbilikálnej vény, ktorá bola kanylovaná, perfundovali Hankovým roztokom na odstránenie krvi a potom inkubovali s 1 % kolagenázou počas 15 minút pri teplote 37 °C. Po odstránení kolagenázy sa bunky kultivovali v M199 médiu suplementovanom 20 % fetálnym bovinným sérom (HyClone), 16 µg/ml heparínu (ESI Pharmaceuticals, Cherry Hill, NJ), 50 µg/ml suplementu rastu endoteliálnych buniek (Collaborative Research Incorporated, Bedfor MA), 25 mM Hepes pufra, 2 mM L-glutamínu, 100 µg/ml penicilínu a 100 µg/ml streptomycínu a kultivovali pri teplote 37 °C na kultivačných platniach potiahnutých 0,1 % želatínou. Bunky sa pasážovali pri konfluencii rozdelením 1 : 4. Bunky sa použili počas prvých 8 pasáží.

Inkubácia s cytokínmi a inými činidlami

Konfluentné HUVE bunky sa premyli salinickým roztokom fosfátového pufra a potom prechovávali v čerstvom médiu. Určená koncentrácia PDTC sa pridala ako predošetrenie 30 minút pred pridaním cytokínov. Cytokíny a ďalšie induktory sa pridali priamo do média v čase a v koncentrácii určenej pre každý experiment. Ľudský rekombinantný IL-1b bol veľkodušným darom od Upjohn Company (Kalamazoo, Michigan). TNFa sa získal od Bohringer Engelheim. Bakteriálny lipopolysacharid (LPS), kyselina polyinozinová: kyselina polytidilová (Poly I:C) a pyrolidínditiokarbamát (PDTC) sa získali od Sigma Chemical (St. Louis, MO). Všetky ostatné reagens boli čistoty pre reakciu.

RNA izolácia

Celková bunková RNA sa izolovala jedinou extrakciu použitím kyslej zmesi guanidínumtiokyanát - fenol - chloroform. Bunky sa prepláchli salinickým roztokom fosfátového pufra a potom lýzovali 2 ml guanidiniumizokyanátu. Roztok sa okyslil 0,2 ml octanu sodného (pH 4,0) a potom extrahoval 2 ml fenolu a 0,4 ml chloroform:izoamylalkoholu (24 : 1). RNA sa podrobila

dvom etanolovým precipitáciám pred použitím pred Nothern blot analýzou.

Nothern blot analýza

Celková bunková RNA (20 µg) sa frakcionovala podľa veľkosti na 1 % agaróza formaldehydových géloch v prítomnosti 1 µg/ml etidiumbromidu. RNA sa transformovala do nitrocelulózového filtra a kovalentne naviazala ultrafialovým žiarením s použitím Stratlinker UV crosslinkera (Stratagene, La Jolla, CA). Hybridizácia sa uskutočnila pri teplote 42 °C počas 18 hodín v 5X SSC (1X = 150 mM NaCl, 15 mM citrátu sodného), 1 % dodecylsulfátu sodného, 5X Denhartovho roztoku, 50 % formamidu, 10 % dextránsulfátu a 100 µg/ml strihom denaturovanej DNA lososových spermií. Približne 1 až 2X 10^6 cpm/ml značenej próby (špecifická aktivita > 108 cpm/µg DNA) sa použilo na hybridizáciu. Po hybridizácii sa filtre premyli s konečnou presnosťou 0,2 SSC pri teplote 55 °C. Nitrocelulóza sa odstránila horúcou vodou pred hybridizáciou inými próbami. Autorádiografia sa uskutočnila intenzifikovanou expozíciou pri teplote -70 °C.

^{32}Próby

^{32}P značené DNA próby sa vyrobili metódou náhodného primér oligonukleotidu. ICAM-1 próba bola Eco R1 fragmentom ľudskej cDNA. ELAM-1 próba bola 1,85 kb Hind III fragmentom ľudskej cDNA. VCAM-1 próba bola Hind III- Xho I fragmentom ľudskej cDNA, ktorý pozostával z nukleotidov 132-1814.

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

HUVE bunky sa umiestnili do 96 jamkových platní tkanivových kultúr 48 až 72 hodín pred skúškou. Primárne protilátky v M199 s 5 % FBS sa pridali do každej jamky a inkubovali 1 hodinu pri teplote 37 °C. Bunky sa potom premyli a inkubovali jednu hodinu s kozou antimyšou IgG konjugovaným s peroxidázou (Bio Rad) riedenou 1/500 v M199 s 5 % FBS. Jamky sa potom premyli a väzba protilátky sa detegovala pridaním 100 µl 10 µg/ml

3,3,5,5-tetrametyl-benzidínu (Sigma) s 0,003 % H_2O_2. Potom sa reakcia zastavila pridaním 25 µl 8N kyseliny sírovej. Platne sa čítali na ELISA readeri (Bio Rad) pri 450 nm po zatemnení na radoch vyfarbených len s protilátkou z druhého kroku. Údaje sú priemery z trojitých pokusov.

Protilátky

Monoklonálne protilátky (MAb) 4B9, ktoré rozpoznávajú adhéznu molekulu 1 cievnych buniek (VCAM-1), daroval Dr. John Harlan (University of Washington). MAb E9A1F1, ktorá rozpoznáva adhéznu molekulu endoteliálnych buniek (ELAM-1), daroval Dr. Swerlick (Emory University). Hybridné produkty mAb 84H10, ktoré rozpoznávajú intercelulárnu adhéznu molekulu 1 (ICAM-1) sú bežne vyrábané v našich laboratóriách a protilátka sa použila ako supernatant tkanivovej kultúry.

Príklad 9

PDTC blokuje IL-1b sprostredkovanú indukciu HUVEC VCAM-1, ale nie ICAM-1 alebo ELAM-1, mRNA akumuláciu.

Na určenie, či oxidačný stav endoteliálnej bunky môže alterovať základ alebo indukovať expresiu génov bunkových adhéznych molekúl sa kultivované ľudské vaskulárne endoteliálne bunky vystavili indukujúcim cytokínom IL-1b (10 U/ml), v prítomnosti alebo neprítomnosti tiolátovaného kov chelátujúceho antioxidantu, pyrolidínditiokarbamátu (PDTC, 50 µm) počas viac ako 24 hodín. Ako je ukázané na obr. 10, IL-1b sám (dráhy 2, 4, 6, 8) indukuje rýchlu a prechodnú indukciu VCAM-1 (Panel A), E-selektínu (ELAM-1, Panel B) a ICAM-1 (Panel C) mRNA akumulácie, ktorá má u všetkých maximum v 4 hodinách. Avšak, v prítomnosti PDTC je IL-1b indukcia VCAM-1 mRNA akumulácie dramaticky inhibovaná o viac ako 90 % (Panel A, dráhy 3, 5, 7, 9). Naproti tomu, aj keď IL-1b sprostredkovaná indukcia ELAM-1 je ľahko inhibovaná v 2 a 24 hodinách (porovnaj dráhy 2 a 3, 8 a 9 Panelu B), PDTC neinhibuje indukciu v 4 a 8 hodinách (dráhy 5 a 7, Panel B). IL-1b sprostredkovaná indukcia ICAM-1 mRNA akumulácia

nie je ovplyvnená (panel B, dráhy 3, 5, 7, 9). Samozrejme je pozorované mierne zvýšenie IL-1b indukcie ICAM-1 mRNA akumulácie (≈ 30 %) (porovnaj dráhy 4 a 5, panel B). Ekvivalentné množstvo do nitrocelulózy transferovanej RNA na dráhu sa potvrdilo farbením etidiumbromidom a vizualizáciou.

Analýza odpovede na dávku sa uskutočnila kvôli určeniu, či PDTC inhibuje indukciu VCAM-1 génovej expresie IL-1b spôsobom závislým na dávke. Ako ukazuje obr. 11, PDTC inhibuje IL-1b sprostredkovanú indukciu VCAM-1 génovej expresie podľa strmej krivky odpovedí na dávku (obr. 11, Panel A) s vypočítanou EC_{50} približne 10 μM, zatiaľ čo PDTC neinhibuje IL-1b sprostredkovanú indukciu ELAM-1 expresie týmito koncentráciami (obr.11, panel B). IL-1b sprostredkovaná indukcia ICAM-1 mRNA akumulácie je zvýšená PDTC s koncentráciou vyššou ako 0,5 uM (obr. 2, porovnaj dráhu 2 a dráhu 4 až 7, panel C).

Tieto údaje demonštrujú, že IL-1b využíva ditiokarboxylát a predovšetkým ditiokarbamát senzitívny krok ako súčasť jeho signálneho mechanizmu v indukcii VCAM-1 génovej expresie. Tieto údaje tiež naznačujú, že tento ditiokarbamát senzitívny krok nehrá signifikantnú úlohu v indukcii ELAM-1 alebo ICAM-1 génovej expresie.

Príklad 10

PDTC blokuje indukciu HUVEC VCAM-1 mRNA akumulácie mnohými stimulmi

Na určenie, či iné dobre opísané aktivátory VCAM-1 génovej expresie tiež využívajú PDTC senzitívne kroky sa testovali tri odlišné triedy aktivátorov: iné klasické receptorom sprostredkované indukujúce agens (TNFa), non-receptor sprostredkovaný induktor (lipopolysacharid (LPS)) a nedávno opísaný nový induktor (dvojreťazcová RNA, poly (I:C)). Vo všetkých troch prípadoch PDTC dramaticky inhiboval indukciu VCAM-1 mRNA akumulácie v HUVEC po štyroch hodinách (obr. 12, Panel A). Aj keď TNFa sprostredkovaná ELAM-1 génová expresia je suprivovaná v rovna-

kom rozsahu (obr. 12, línie 1 a 2, panel B), LPS a poly (I:C) sprostredkovaná ELAM-1 mRNA akumulácia bola neovplyvnená (obr. 12, línie 3 až 6, panel B). Indukcia ICAM-1 mRNA akumulácie bola neovplyvnená (obr. 12, panel C). Tieto údaje indikujú, že štrukturálne odlišné indukujúce agens, ktoré pôsobia cez rôzne dráhy, majú spoločné regulačné kroky špecifické pre indukciu VCAM-1 génovej expresie.

Príklad 11

PDTC blokuje HUVE bunkovú povrchovú expresiu VCAM-1 indukovanú viacerými stimulmi

Na stanovenie, či by indukcia expresie endoteliálneho bunkového povrchového proteínu VCAM-1 mohla tiež byť inhibovaná PDTC, podobne ako jeho mRNA, sa monoklonálne protilátky použili v ELISA eseji na kvantifikáciu indukcie bunkového povrchového VCAM-1 a ICAM-1 v kultivovaných HUVE bunkách. Ako je uvedené na obr. 13, indukuje mnoho tried aktivačných činidiel, v neprítomnosti PDTC (-PDTC) rýchlu a prechodnú akumuláciu VCAM-1 (horný ľavý panel) pri bunkovom povrchovom vrchole za šesť hodín. V prítomnosti PDTC (+PDTC, horný ľavý panel), indukcia bunkovej povrchovej expresie VCAM-1 všetkými testovanými činidlami je dramaticky inhibovaná (80 až 90 %). Naopak indukovaná expresia bunkového povrchu ICAM-1 nie je ovplyvnená za rovnakých podmienok (horné ľavé a pravé panely).

Tieto údaje demonštrujú, že podobne ako jeho mRNA akumulácia, sú bunkové povrchové VCAM-1 expresie selektívne inhibované ditiokarbamátmi a že mnoho tried aktivačných činidiel využíva podobný, ditiokarbamát citlivý mechanizmus na indukciu VCAM-1 génovej expresie.

Príklad 12

Porovnávacie účinnosti antioxidantov pri blokovaní TNFa indukcie VCAM-1

Na stanovenie, či by štruktúrne podobné alebo odlišné antioxidanty tiež mohli inhibovať VCAM-1 génovú expresiu a s akou potenciou, sa HUVE bunky vystavili TNFa na šesť hodín v prítomnosti alebo neprítomnosti rôznych koncentrácií štyroch rôznych antioxidantov. Ako je uvedené na obr. 14, ako dietylditiokarbamát (DETC) tak N-acetylcysteín (NAC) inhibujú VCAM-1 expresiu v koncentráciách 5 μM a 30 μM. Naopak PDTC (PDTC) bol účinný medzi 5 a 50 μM. Chelátor kovového železa, desferoximín, nemal žiadny vplyv pri testovaných koncentráciách.

Príklad 13

PDTC inhibuje TNF indukciou VCAM-1/VLA-4 sprostredkovanú adhéziu

Schopnosť rôznych antioxidantov inhibovať TNF-α indukciu VCAM-1 v HUVE bunkách sa hodnotila metódou podľa príkladu 12. Obr. 15 je graf relatívnej VCAM-1 bunkovej povrchovej expresie (O.D. 595 nM) v TNF-α aktivovaných HUVE bunkách proti koncentráciám PDTC (N-pyrolidínditiokarbamát sodný), DIDTC (N,N-dietyl-N-karboditioát sodný), SarDTC (N-metyl-N-karboxymetyl-N--karboditioát sodný), IDADTC (N,N-di(karboxymetyl)-N-karboditioát trojsodný), MGDTC (N-metyl-D-glukamín-N-karboditioát sodný), MeOBGDTC (N-(4-metoxybenzyl)-D-glukamín-N-karboditioát sodný), DEDTC (N,N-dietyl-N-karboditioát sodný), Di-PDTC (N,N--diizopropyl-N-karboditioát sodný) a NAC je (N-acetylcysteín).

Príklad 13

PDTC inhibuje TNF indukciou VCAM-1/VLA-4 sprostredkovanú adhéziu

Za účelom definovať, či PDTC inhibícia VCAM-1 regulácie je spojená s funkčnými konsekvenciami, väzba Molt-4 buniek k HUVEC bunkám buď nestimulovaná alebo stimulovaná s TNFa (100 U/ml) sa hodnotila šesť hodín v prítomnosti alebo neprítomnosti PDTC. Molt-4 bunky boli vopred zistené ako viažúce sa k aktivovaným HUVEC cez VCAM-1 závislý mechanizmus. Ako je uvedené na obr.

16, percentá Molt-4 väzby k HUVEC sa zvyšujú v prítomnosti PDTC v médiu.

Príklad 14

PDTC inhibuje monocytovú väzbu ku torakálnej aorte cholesterolom kŕmených králikov

Uskutočnil sa pokus na stanovenie, či by tiolový antioxidant PDTC mohol byť účinný pri blokovaní prvej monocytovej väzbovej zložky aterosklerózy v experimentálnom zvieracom modeli. Jeden dospelý novozélandský biely králik (3,5 kg) dostal intravenóznu injekciu PDTC (20 mg/kg, ako koncentrácii 20 mg/ml v PBS) raz denne počas 5 dní. Injekcie sa podávali počas dlhšieho obdobia zavedenou kanylou do marginálnej ušnej vény, ktorá sa udržiavala prechodnou heparinizovaným salinickým roztokom. PDTC roztok sa miešal denne ako čerstvý alebo na niekoľko dní (uchovávaný chránený pred svetlom pri teplote 4 °C) a filtroval sa (filter s 0,45 mm pórmi) práve pred použitím. Po prvej injekcii, keď bola umiestnená kanyla, sa liečivo podalo králikovi v bdelom stave bez zjavného nepohodlia alebo iného škodlivého vplyvu. Druhý deň po injekcii sa králikovi podala potrava, ktorá obsahovala 1 % hmotn. cholesterolu a počas zvyšku pokusu sa pokračovalo v tejto potrave. Piaty deň sa zviera usmrtilo a torakálna aorta sa vyrezala a fixovala. Po príslušnej preparácii sa vzorka zobrazila na nižšom stupni ISI DS-130 skanovacieho elektrónového mikroskopu vybaveného LaB emitérom. S použitím zobrazenia dual-screen a transparentnej mriežky na CRT screene, sa hodnotilo 64 susedných polí pri 620-násobnom zväčšení, na pokrytie plochy asi 1,3 mm^2. V každom poli sa spočítal a zaznamenal počet adherentných leukocytov (WBC) a erytrocytov (RBC).

Údaje z oblúkových vzoriek sú nasledovné: 5 WBC a asi 25 RBC na 1,3 mm^2 poľa. Táto úroveň WBC adhézie je podobná ako u kontrolných zvierat kŕmených pravidelnou potravou (asi 7 na pole bolo možné vidieť v oblúkových a torakálnych vzorkách z 2 'negatívnych kontrolných' pokusov). 'Pozitívní kontrolní'

králici kŕmení 1 % cholesterolu počas 4 dní ale bez podania antioxidantu vykazujú asi 5-násobné zvýšenie adhézie, na 38 WBC/1,3 mm^2. Značné množstvo väčšinou bunkových zlomov sa pozorovalo adherovaných ku každej oblúkovej vzorke. Nie je jasné, či tento materiál je artifaktom prípravy alebo bol prítomný in vivo a či je teda vztiahnutý k PDTC podaniu. Tieto štúdie naznačujú, že PDTC infúzie môžu účinne blokovať počiatočnú monocytovú adhéziu k aortovému endotelu.

Príklad 15

Inhibícia BSA 13-HPODE aduktov s PDTC

Obr. 18 je stĺpcový graf vplyvu PDTC na tvorbu fluorescenčných aduktov BSA a 13-HPOD merané vo fluorescenčných jednotkách proti mikromolárnej koncentrácii PDTC. Jeden mikromól 13-HPODE sa inkuboval s 200 mikrogramami BSA v prítomnosti PDTC počas 6 dní. Fluorescencia sa merala pri 430 až 460 nm s excitáciou pri 330 až 360 nm. Podrobne viď Freebis J., Parthasarathy S., Steinberg D. Proceedings of National Academy of Sciences 89, 10588-10592, 1992. V typickej reakcii 100 nmol LOOH (generovaný lipoxygenázou katalyzovanou oxidáciou kyseliny linolovej) inkubovaných so 100 µg hovädzieho sérového albumínu počas 48 až 72 hodín a tvorbou fluorescenčných produktov sú nasledované meraním fluorescenčného spektra s excitáciou pri 360 nm a emisiou medzi 390 a500 nm.

Ako je zistené, PDTC znižuje koncentráciu fluorescenčných aduktov BSA a 13-HPODE.

Obr. 13 je graf vplyvu PDTC na tvorbu fluorescenčných aduktov BSA a ox-PUFA ako funkcie vlnovej dĺžky (nm) a koncentrácie PDTC. Ako koncentrácia PDTC stúpa, klesá množstvo fluorescenčných aduktov.

Príklad 16

Vplyv PDTC na oxidáciu LDL chrenovou peroxidázou

Obr. 20 je graf vplyvu PDTC na oxidáciu LDL chrenovou peroxidázou (HRP), meraný proti času (minúty) pre meniace sa koncentrácie PDTC. Po oxidácii LDL nasledovalo meranie oxidácie zložiek mastnej kyseliny LDL ako je stanovené zvýšením optickej hustoty pri 234 nm. Keď sa polynenasýtená mastná kyselina oxiduje, je tu posun dvojitej väzby vedúci k tvorbe konjugovaných diénov, ktoré absorbujú pri 234 nm. Úsek iniciačnej a propagačnej krivky (lag fáza) je považovaný za meranie oxidovateľnosti LDL. Nad lag fázou je LDL odolnejší voči oxidácii. Typicky sa 100 µg ľudského LDL inkubuje s 5 µM H_2O_2 a nasleduje zvýšenie absorpcie 234 nm.

Po inkubačnej perióde sa pozoruje, že PDTC inhibuje oxidáciu LDL u HRP spôsobom, ktorý je závislý na koncentrácii.

Príklad 17

Vplyv PDTC na cytokínom indukovanú tvorbu ox-PUFA

Obr. 21 je graf vplyvu PDTC na cytokínom indukovanú tvorbu ox-PUFA v ľudských endoteliálnych bunkách aorty. Ako je uvedené, ako TNF-α tak IL-1B spôsobuje oxidáciu linolovej kyseliny na ox-linolovú kyselinu. Oxidácii je významne bránené u PDTC.

2. Modifikácia syntézy a metabolizmu PUFA a ox-PUFA

Inhibícia expresie VCAM-1 sa môže uskutočniť cez modifikáciu metabolizmu PUFA na ox-PUFA. Napríklad je známych mnoho enzýmov, ktoré oxidujú nenasýtené materiály, medzi ktoré patria peroxidázy, lipoxygenázy, cyklooxygenázy a cytochróm P450. Inhibícia týchto enzýmov môže byť prevenciou oxidácie PUFA in vivo. PUFA môžu byť tiež oxidované na kove závislými neenzymatickými materiálmi.

IV. Spôsob modifikácie expresie redox-senzitívnych génov

V alternatívnom uskutočnení je poskytnutý spôsob supresie expresie redox-senzitívnych génov alebo aktivácia génu, ktorý

je suprivovaný redox-senzitívnou dráhou, ktorý zahŕňa podanie účinného množstva substancie, ktorá bráni oxidácii oxidačného signálu a typicky oxidácii polynenasýtenej mastnej kyseliny. Reprezentatívne redox-senzitívne gény, ktoré sú zahrnuté v prezentácii imunitnej odpovede zahŕňajú, ale bez obmedzenia, tie, ktoré exprimujú cytokíny zahrnuté v iniciácii imunitnej odpovede (napríklad IL-1β), chemoatraktanty, ktoré promótujú migráciu zápalových buniek do bodu poškodenia (napríklad MCP-1), rastové faktory (IL-6, trombín-receptor) a adhézne molekuly (napríklad VCAM-1 a E-selektín).

Podľa tohto opisu bude odborník v odbore schopný prehľadať veľké množstvo antioxidantov na ich schopnosť potlačiť expresiu redox-senzitívnych génov alebo aktivovať gén, ktorý je suprivovaný redox-senzitívnou dráhou. Všetky tieto uskutočnenia patria do rozsahu predloženého vynálezu.

Na základe výsledkov tohto screeningu sa môžu identifikovať molekuly nukleovej kyseliny, ktorá obsahuje 5' regulačné sekvencie redox-senzitívnych génov, ktoré sa môžu použiť na reguláciu a inhibíciu génovej expresie in vivo. Vektory, ktoré zahŕňajú ako plazmidové tak eukaryotické virálne vektory, sa môžu použiť na expresiu určitého rekombinantného 5' priliehajúceho región-génového konštruktu v bunkách podľa preferencií a hodnotenia odborníkom v odbore (viď napríklad Sambrook a kol., kapitola 16). Ďalej sa vyvinulo veľa virálnych a nevirálnych vektorov, ktoré umožňujú zavedenie nukleokyselinových sekvencií in vivo (viď napríklad Mulligan, 1993, Science, 260, 926-932; US patent č. 4 980 286, US patent č. 4 868 116; zahrnuté tu ako odkaz). V poslednom čase bol vyvinutý dodávací systém, v ktorom je nukleová kyselina enkapsulovaná v katiónových lipozómoch, ktorá môže byť injektovaná intravenózne do cicavca. Tento systém sa použil na zavedenie DNA do buniek viacerých tkanív v dospelej myši, ktoré zahŕňajú endotel a kostnú dreň (viď napríklad Zhu a kol., 1993 Science 261, 209-211; zahrnuté tu ako odkaz).

5' priliehajúce sekvencie redox-senzitívnych génov sa môžu

použiť na inhibíciu expresie redox-senzitívnych génov. Napríklad antisenzia RNA celej alebo časti 5' priliehajúcej oblasti redox-senzitívneho génu sa môže použiť na inhibíciu expresie génu in vivo. Expresné vektory, ktoré sa môžu použiť na generovanie antisenzie RNA vybranej DNA sekvencie, ktorá je exprimovaná v bunke (napr. retrovirálne expresné vektory) sú už v odbore dostupné (viď napríklad US patent č. 4 868 116; US patent č. 4 980 286). V súlade s tým môže byť DNA, ktorá obsahuje celú alebo časť sekvencie 5' priliehajúcej oblasti génu, inzertovaná do vhodného expresného vektora tak, že po pasážovaní do bunky transkripcie inzertovanej DNA poskytne antisenziu RNA, ktorá je komplementárna k mRNA transkriptu génu normálne sa nachádzajúceho v bunke. Tento antisenzia RNA transkript inzertovanej DNA môže tvoriť bázový pár s normálnym mRNA transkriptom, ktorý sa nachádza v bunke a tým brániť mRNA, aby bola translatovaná. Je samozrejme nevyhnutné vybrať 5' priliehajúce oblasti, ktoré sú v smere od miest transkripčného štartu pre redox-senzitívny gén na zabezpečenie toho, že antisenzia RNA obsahuje komplementárne sekvencie prítomné na mRNA. Antisenzia RNA sa môže generovať tiež in vitro a potom inzertovať do buniek. Oligonukleotidy sa môžu syntetizovať na automatickom syntetizátore (napríklad Model 8700 automatizovaný syntetizátor Milligen-Biosearch, Burlington, MA alebo ABI Model 380B).

Okrem toho antisenzie deoxyoligonukleotidy sa ukázali ako účinné pri inhibícii génovej transkripcie a virálnej replikácie (viď napríklad Zamecnik a kol., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 280-284; Zamecnik a kol., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci., 83, 4143-4146; Wickstrom a kol., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 1028-1032; Crooke 1993 FASEB J., 7, 533-539. Okrem toho práce z posledného obdobia ukázali, že zlepšenie inhibície expresie génu antisenzie oligonukleotidov je možné, ak antisenzie oligonukleotidy obsahujú modifikované nukleotidy (viď napríklad Offensperger a kol., 1993 EMBO J., 12, 1257-1262 (in vivo inhibícia virálnej replikácie kačacej hepatitídy B a génovej expresie antisenzie fosforotioát oligonukleotidy); Rosenberg a kol., PCT WO 93/01286 (syntéza sulfurotioátových oligonukleotidov); Agrawal a kol., 1988 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 7079-7083

(syntéza antisenzie oligonukleozidových fosforoamidátov a fosforotioátov na inhibíciu replikácie vírusu-1 ľudskej imunodeficiencie); Sarin a kol., 1989 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 7448-7794 (syntéza antisenzie metylfosfonátových oligonukleotidov); Shaw a kol., 1991 Nucleic Acids Res. 19, 747-750 (syntéza 3' exonukleáza-rezistentných oligonukleotidov, ktoré obsahujú 3' terminálne fosforoamidátové modifikácie); tu zahrnuté ako odkaz.

Sekvencie 5' priliehajúcej oblasti redox-senzitívneho génu sa môžu tiež použiť v génovej terapii trojitým helixom (triplexom). Oligonukleotidy komplementárne ku génovým sekvenciám jedného z reťazcov DNA sa ukázali ako viažúci promótor a regulátorové sekvencie na tvorbu lokálnych trojitých nukleokyselinových helixov, ktoré blokujú transkripciu génu (viď napríklad 1989 Maher a kol., Science 245, 725-730; Orson a kol., 1991 Nucl. Acids Res. 19, 3435-3441; Postal a kol., 1991 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 8227-8231; Cooney a kol., 1988 Science 241, 456-459; Young a kol., 1991 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 10023-10026; Duval-Valentin a kol., 1992 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 504-508; 1992 Blume a kol., Nucl. Acids Res. 20, 1777-1784; 1992 Grigoriev a kol., J. Biol. Chem. 267, 3389-3395).

V poslednom čase boli uvedené ako teoretické výpočty tak empirické nálezy, ktoré poskytujú návod pre vzor oligonukleotidov na použitie v tvorbe oligonukleotidovo riadeného trojitého helixu na inhibíciu génovej expresie. Napríklad by oligonukleotidy mali byť väčšie ako 14 nukleotidov dĺžky na zaistenie špecifity cieľovej sekvencie (viď napríklad Maher a kol., (1989); Grigoriev a kol., (1992)). Tiež veľa buniek lačno prijíma oligonukleotidy, ktoré sú menšie ako 50 nukleotidov v dĺžke (viď napríklad Orson a kol., (1991); Holt a kol., 1988 Mol. Cell. Biol. 8, 963 - 973; Wickstrom a kol., 1988 Proc. Natl. Acad. Sci. Usa, 85, 1028-1032). Na zníženie náchylnosti k intracelulárnej degradácii, napríklad 3' exonukleázami, sa môže voľný amín zaviesť k 3' terminálnej hydroxylovej skupine oligonukleotidov bez straty sekvenčnej väzbovej špecifity (Orson a kol.,

1991). Okrem toho sú triplexy stabilnejšie, ak akékoľvek cytozíny, ktoré môžu byť prítomné v oligonukleotide sú metylované a tiež keď je interkalačné činidlo, ako je akridín, kovalentne pripojené k 5' terminálnemu fosfátu (napríklad cez pentametylénový mostík); opäť bez straty sekvenčnej špecifity (Maher a kol., (1989); Grigoriev a kol. (1992)).

Metódy na produkciu alebo syntézu oligonukleotidov sú v odbore dobre známe. Také metódy môžu zahŕňať metódy od štandardného enzymatického štiepenia, nasledovaného izoláciou nukleotidového fragmentu (viď napríklad Sambrook a kol., kapitola 5,6) až skôr syntetické metódy, napríklad metódu kyanoetylfosforamiditovú s použitím Milligen alebo Beckman System 1Plus DNA syntetizátora (viď tiež Ikuta a kol. v Ann. Rev. Biochem. 1984 53, 323-356 (fosforotriesterová a fosfittriesterová metóda); Narang a kol., v Methods Enzymol., 65, 610-620 (1980) (fosfortriesterová metóda). Podľa toho sa DNA sekvencie 5' priliehajúcej oblasti redox-senzitívneho génu tu opísaného môžu použiť na vytvorenie a konštruktu oligonukleotidov, zahŕňajúcich DNA sekvenciu, ktorá obsahuje aspoň 15 po sebe idúcich nukleotidov, s alebo bez bázových modifikácií alebo derivátov interkalačných činidiel, na použitie v tvorbe trojitých helixov špecificky v 5' priliehajúcej oblasti redox-senzitívneho génu s cieľom inhibície expresie génu.

V niektorých prípadoch môže byť výhodné inzertovať enhancéry alebo násobné kópie regulačných sekvencií do expresného systému na uľahčenie screeningu metód a činidiel na manipuláciu a expresiu.

V. Modely a vyšetrenia

Sú tiež poskytnuté vyšetrenia chorôb sprostredkovaných VCAM-1 alebo redox-senzitívnymi génmi, ktoré zahŕňajú kvantifikáciu zástupcov markerov choroby. V jednom uskutočnení sa hodnotí hladina oxidovaných polynenasýtených mastných kyselín alebo iných vhodných markerov, v tkanive alebo krvi, napríklad sa hostiteľ hodnotí pomocou hodnotenia "oxidačného prostredia"

v hostiteľovi a hostiteľovej náchylnosti k VCAM-1 alebo redox--senzitívnym génom sprostredkovanej choroby.

V inom uskutočnení sa kvantifikuje hladina cirkulujúceho alebo bunkovo-povrchového VCAM-1 alebo iného vhodného markera a vplyv podania vhodného antioxidantu na hladinu.

V ešte ďalšej eseji sa hodnotí citlivosť hostiteľových endoteliálnych buniek na polynenasýtené mastné kyseliny alebo iné oxidované náprotivky. Toto sa môže napríklad uskutočniť podnietením hostiteľa s PUFA alebo ox-PUFA a porovnaním výslednej koncentrácie bunkového povrchového alebo cirkulujúceho VCAM-1 alebo iných zástupcov markerov k populačnej norme.

V inom uskutočnení môžu byť poskytnuté in vivo modely aterosklerózy alebo inej srdcovej alebo zápalovej choroby, ktorá je sprostredkovaná VCAM-1 podaním hostiteľskému živočíchovi účinného množstva PUFA alebo oxidovanej polynenasýtenej mastnej kyseliny na vyvolanie choroby. Tieto živočíchy sa môžu použiť v klinickom výskume na ďalšie pochopenie chorôb.

V ešte ďalšom uskutočnení vynálezu sa môžu zlúčeniny hodnotiť na základe svojej schopnosti liečiť choroby sprostredkované VCAM-1 na báze ich schopnosti inhibovať oxidáciu polynenasýtenej mastnej kyseliny alebo interakcie PUFA alebo ox-PUFA s proteínovým cieľom.

Toto sa môže napríklad uskutočniť podnietením hostiteľa, napríklad človeka alebo zvieraťa ako je myš, k vyššej hladine PUFA alebo ox-PUFA a potom stanovením terapeutickej účinnosti testovanej zlúčeniny založenej na jej schopnosti znižovať koncentráciu cirkulujúceho alebo bunkového povrchového VCAM-1. Alternatívne sa môže použiť in vitro vyšetrenie, ktoré je založené na schopnosti testovanej zlúčeniny brániť oxidácii PUFA alebo interakcii PUFA alebo ox-PUFA s proteínovým cieľom v prítomnosti oxidačnej substancie ako je kov, napríklad meď, alebo enzýmu ako je peroxidáza, lipoxygenáza, cyklooxygenáza alebo cytochróm P450.

V ďalšom uskutočnení sa vaskulárne endoteliálne bunky vystavia TNF-α alebo VCAM-1 indukujúcemu materiálu počas vhodného obdobia a potom rozbijú akýmikoľvek vhodnými prostriedkami, napríklad sonifikáciou alebo mrazením-topením. Cytozólické a membránové kompartmenty sa izolujú. Radioaktívne značená PUFA sa pridá k definovaným množstvám kompartmentov. Hodnotí sa schopnosť kvapaliny konvertovať PUFA na ox-PUFA v prítomnosti alebo neprítomnosti testovanej zlúčeniny. Intaktné bunky sa môžu použiť namiesto bunkových zlomov.

III. Farmaceutické kompozície

Ľudia a zvieratá ako napríklad kone, psi, hovädzí dobytok a predovšetkým cicavci, postihnutí kardiovaskulárnymi chorobami a inými zápalovými stavmi sprostredkovanými VCAM-1 alebo redox-senzitívnymi génmi sa môžu liečiť podaním účinného množstva zlúčeniny pacientovi, ktoré spôsobí odstránenie, zníženie koncentrácie alebo prevenciu tvorby oxidovaných polynenasýtených mastných zlúčenín, ktoré zahŕňajú, ale bez obmedzenia, kyselinu linolovú ($C_{18}\Delta^{9,12}$), linolénovú ($C_{18}\Delta^{6,9,12}$), arachidónovú ($C_{20}\Delta^{5,8,11,14}$) a eikozatriénovou ($C_{20}\Delta^{8,11,14}$); iný oxidačný signál; alebo inú aktívnu zlúčeninu alebo ich farmaceuticky prijateľné deriváty alebo soli vo farmaceuticky prijateľnom nosiči alebo riedidle. Aktívne materiály sa môžu podávať akýmkoľvek vhodným spôsobom, napríklad orálne, parenterálne, intravenózne, intradermálne, subkutánne alebo topicky.

Výraz farmaceuticky prijateľné soli alebo komplexy ako je tu použitý, označuje soli alebo komplexy, ktoré si zachovávajú požadovanú biologickú aktivitu vyššie uvedených zlúčenín a vykazujú minimálne nežiadúce toxikologické účinky. Neobmedzujúcimi príkladmi takých solí sú:

a) adičné soli s kyselinami vytvorené s anorganickými kyselinami (napríklad kyselinou chlorovodíkovou, kyselinou bromovodíkovou, kyselinou sírovou, kyselinou fosforečnou, kyselinou dusičnou a podobne) a soli vytvorené s organickými kyselinami ako je kyselina octová, kyselina šťavelová, kyselina vín-

na, kyselina jantárová, kyselina jablčná, kyselina askorbová, kyselina benzoová, tanín, kyselina pamoová, kyselina alginová, kyselina polyglutámová, kyselina naftalénsulfónová, kyselina naftaléndisulfónová a kyselina polygalakturónová;

b) adičné soli so zásadami vytvorené s polyvalentnými kovovými katiónmi ako je zinok, vápnik, bizmut, bárium, horčík, hliník, meď, kobalt, nikel, kadmium, sodík, draslík a podobne, alebo s organickým katiónom vytvoreným s N,N-dibenzyletylén-diamínom, G-glukózamínom, amóniom, tetraetylamóniom alebo etyldiamínom alebo

c) kombinácia a) a b), napríklad tanátová soľ zinku a podobne.

Aktívna zlúčenina alebo zmes zlúčenín sa podávajú akýmkoľvek vhodným spôsobom, ktorý zahŕňa ale bez obmedzenia, orálne a intravenózne podanie. Všeobecný rozsah dávky pre akýkoľvek z vyššie uvedených stavov bude od 0,5 do 500 mg/kg telesnej hmotnosti s dávkovacím programom v rozsahu raz denne až niekoľkokrát denne. Výhodné denné dávky sú medzi približne 1 a 3000 mg/pacienta/deň, výhodnejšie medzi približne 5 a 500 mg/pacienta/deň a ešte výhodnejšie medzi približne 25 a 500 mg/pacienta/deň.

Aktívna zložka by sa mala podávať na dosiahnutie píkových plazmových koncentrácií aktívnej zlúčeniny asi 0,1 až 100 μM, výhodne asi 1 až 10 μM. Toto sa môže dosiahnuť napríklad pri intravenóznej injekcii roztoku alebo formulácie aktívnej zložky, prípadne v salinickom alebo vodnom médiu alebo podaním ako bolusu aktívnej zložky.

Zlúčeniny sa môžu tiež podať priamo do vaskulárnej steny s použitím perfúzneho balónkového katétra alebo in ileu koronárnou alebo inou arteriálnou angiopatiou. Ako príklad, podáva sa 2 až 5 ml fyziologicky prijateľného roztoku, ktorý obsahuje približne 1 až 500 μM zlúčeniny alebo zmesi zlúčenín pri tlaku 1 až 5 atmosfér. Potom, počas ďalších šiestich mesiacov počas periódy maximálneho rizika restenózy, sa aktívne zlúčeniny po-

dávajú inými vhodnými cestami a dávkovými režimami.

Relatívne krátkodobé ošetrenie s aktívnymi zlúčeninami sa používa na vyvolanie "zmraštenia" chorobných lézií koronárnej artérie, ktorá sa nemôže liečiť ani angioplastiou ani chirurgicky. Neobmedzujúci príklad krátkodobého liečenia je dva až šesť mesiacov dávkovania v rozsahu od 0,5 do 500 mg/kg telesnej hmotnosti podávaných v periódach od jedenkrát denne každý ďalší deň až do trikrát denne.

Dlhodobejšie liečenie sa môže použiť na prevenciu vývoja lézií u vysokorizikových pacientov. Dlhodobé liečenie môže zahŕňať niekoľko rokov s dávkovým rozsahom od 0,5 do 500 mg/kg telesnej hmotnosti podávaných v intervaloch raz denne každý ďalší deň až trikrát denne.

Aktívne zlúčeniny sa môžu podávať v intervaloch bezprostredne pred a po koronárnej angioplastii ako prostriedok na redukciu alebo odstránenie abnormálnej proliferatívnej a zápalovej odozvy, ktorá často vedie ku klinicky významným restenózam.

Aktívne zlúčeniny sa môžu podávať v spojení s inými liečivami používanými pri liečení kardiovaskulárnej choroby, ktoré zahŕňajú činidlá na znižovanie lipidov ako je probucol a kyselina nikotínová; inhibítory agregácie doštičiek ako je aspirín; antitrombotické činidlá ako je coumadin; blokátory vápnikových kanálikov ako je varapamil, diltiazem a nifedipin; inhibítory enzýmu konvertujúceho angiotenzín (ACE) ako je captopril a enalopril, β-blokátory ako je propanalol, terbutanol a labetalol, nesteroidné protizápalové činidlá ako je ibuprofen, indomethacin, feniprofen, kyselina mefenamová, kyselina flufenamová, sulindac alebo kortikosteroidy.

Koncentrácia aktívnej zlúčeniny v liečivej kompozícii bude závisieť na absorpčných, distribučných, inaktivačných a sekrečných rýchlostiach liečiva ako aj iných faktoroch známych odborníkom v odbore. Je potrebné uviesť, že sa hodnoty dávok tiež

môžu meniť podľa obtiažnosti stavu, ktorý sa zmierňuje. Toto je potrebné chápať tak, že pre akýkoľvek jednotlivý subjekt by sa mohol upraviť špecifický dávkový režim počas obdobia podľa individuálnej potreby a profesionálneho hodnotenia odborníka pre podávanie kompozícií a že koncentračné rozsahy tu uvádzané sú len príkladmi a nie sú myslené ako obmedzenia praktického uskutočnenia nárokovanej kompozície. Účinná zložka sa môže podávať naraz alebo sa môže rozdeliť na viac menších dávok na podanie v meniacich sa časových intervaloch.

Orálne kompozície budú obvykle zahŕňať inertné riedidlo alebo poživateľný nosič. Môžu byť uzavreté v želatínových kapsuliach alebo stlačené do tabliet. Na účel orálneho terapeutického podania sa môže aktívna zlúčenina inkorporovať s prísadami a použiť vo forme tabliet, toboliek alebo kapsúl. Farmaceuticky prijateľné spojovacie činidlá a/alebo pomocné látky môžu tvoriť časť kompozície.

Tablety, pilule, kapsule, tobolky a podobne môžu obsahovať akúkoľvek z nasledujúcich prísad alebo zlúčenín podobného charakteru: spojivo ako je mikrokryštalická celulóza, guma tragant alebo želatína; prísadu ako je škrob alebo laktóza, dezintegračné činidlo ako je algínová kyselina, Primogel, alebo kukuričný škrob; lubrikant ako je stearát horečnatý alebo Sterotes; klzné činidlo ako je koloidný oxid kremičitý; sladiace činidlo ako je sacharóza alebo sacharín alebo ochuťovacie činidlo ako je pepermint, metylsalicylát alebo pomarančová príchuť. Ak je dávkovou jednotkovou formou kapsula, môže táto obsahovať, okrem materiálu vyššie uvedeného typu, kvapalný nosič ako je mastný olej. Navyše môžu dávkové jednotkové formy obsahovať rôzne iné materiály, ktoré modifikujú fyzickú formu dávkovej jednotky, napríklad cukrové, šelakové poťahy, alebo iné enterické činidlá.

Aktívna zlúčenina alebo jej farmaceuticky prijateľná soľ alebo derivát sa môžu podávať ako zložka elixíru, suspenzie, sirupu, oblátky, žuvačky alebo podobne. Sirup môže obsahovať okrem účinných látok sacharózu ako sladiace činidlo a určité

ochranné látky, farbivá a farby a príchute.

Aktívna zlúčenina alebo jej farmaceuticky prijateľná soľ alebo derivát sa môžu tiež podávať s inými aktívnymi materiálmi, ktoré nezhoršujú požadované pôsobenie, ako sú antibiotiká, antifungálne, protizápalové alebo antivirálne zlúčeniny.

Roztoky alebo suspenzie použité v parenterálnom, intradermálnom, subkutánnom alebo topickom podaní môžu zahŕňať nasledujúce zložky: sterilné riedidlo ako je voda pre injekcie, salinický roztok, stužené oleje, polyetylénglykoly, glycerín, propylénglykol alebo iné syntetické rozpúšťadlá; antibakteriálne činidlá ako je benzylalkohol alebo metylparabény; antioxidanty ako je kyselina askorbová alebo hydrogénsiričitan sodný; chelatačné činidlá ako je kyselina etyléndiamíntetraoctová; pufry ako sú acetáty, citráty alebo fosfáty a činidlá na úpravu tonicity ako je chlorid sodný alebo dextróza. Parenterálny prípravok môže byť uzavretý v ampuliach, jednorazových striekačkách alebo viacdávkových fľaštičkách vyrobených zo skla alebo plastov.

Vhodné vehikulá na topickú aplikáciu sú známe a zahŕňajú lotiony, suspenzie, masti, krémy, gély, tinktúry, spreje, prášky, pasty, pomaly uvoľňujúce transdermálne náplaste, aerosóly na astmu a čapíky pre aplikáciu na rektálnu, vaginálnu, nasálnu alebo orálnu mukózu.

Zahusťovacie činidlá, zmäkčovadlá a stabilizátory sa môžu použiť na prípravu topických kompozícií. Príklady zahusťovacích činidiel zahŕňajú petrolátum, včelí vosk, xantánovú gumu alebo polyetylénglykol, zvlhčovadlá ako je sorbitol, zmäkčovadlá ako je minerálny olej, lanolín a jeho deriváty, alebo squalén. Veľa roztokov a mastí je komerčne dostupných.

Prírodné alebo umelé príchute alebo sladidlá sa môžu pridať na zvýšenie chuti topických prípravkov, aplikovaných pre lokálny účinok na mukozálne povrchy. Inertné farby alebo farbivá sa môžu pridať, predovšetkým v prípade prípravkov formulova-

ných na aplikáciu na orálne mukozálne povrchy.

Aktívne zlúčeniny sa môžu pripraviť s nosičmi, ktoré chránia zlúčeninu proti rýchlemu uvoľneniu, ako sú formulácie s riadeným uvoľňovaním, ktoré zahŕňajú implanty a mikroenkapsulované dodávacie systémy. Môžu sa použiť biodegradovateľné polyméry ako je etylénvinylacetát, polyanhydridy, kyselina polyglykolová, kolagén, polyortoestery a kyselina polymliečna. Veľa metód na prípravu takých formulácií je patentovaných alebo všeobecne známych odborníkom v odbore.

Pri intravenóznom podaní sú výhodné nosiče fyziologický salický roztok a fosfátom pufrovaný salinický roztok (PBS).

Aktívna zlúčenina sa môže tiež podávať transdermálnou náplasťou. Metódy prípravy transdermálnych náplastí sú známe odborníkom v odbore. Viď napríklad Brown L. a Langer R., Transdermal Delivery of Drugs, Annual Review of Medicine, 39:221-229 (1988), tu zahrnuté ako odkaz.

V inom uskutočnení sú aktívne zlúčeniny pripravené s nosičmi, ktoré budú chrániť zlúčeninu proti rýchlemu uvoľneniu z tela, ako sú formulácie s riadeným uvoľňovaním, ktoré zahŕňajú implanty a mikroenkapsulované dodávacie systémy. Môžu sa použiť biodegradovateľné, biokompatibilné polyméry ako je etylénvinylacetát, polyanhydridy, kyselina polyglykolová, kolagén, polyortoestery a kyselina mliečna. Spôsoby prípravy takých formulácií budú zrejmé odborníkom v odbore. Materiály sa môžu tiež získať komerčne od Alza Corporation a Nova Pharmaceuticals, Inc.

Lipozomálne suspenzie môžu byť tiež farmaceuticky prijateľnými nosičmi. Tieto sa môžu pripraviť metódami známymi odborníkom v odbore, napríklad ako sú opísané v US patente č. 4 522 811 (ktorý je tu zahrnutý ako odkaz v celom svojom rozsahu). Napríklad sa môžu pripraviť lipozómové formulácie rozpustením vhodného lipidu(ov) (ako je stearoylfosfatidyletanolamín, stearoylfosfatidylcholín, arachadoylfosfatidylcholín a choles-

terol) v anorganickom rozpúšťadle, ktoré sa potom odparí a zanechá tenký film sušeného lipidu na povrchu kontajnéru. Vodný roztok aktívnej zlúčeniny alebo jej monofosfátového, difosfátového a/alebo trifosfátového derivátu sa potom zavedie do kontajnera. Kontajner sa potom pomädlí v ruke na uvoľnenie lipidového materiálu zo strán kontajnera a dispergáciu lipidových agregátov, čím sa vytvorí lipozomálna suspenzia.

Modifikácie a variácie predloženého vynálezu budú zrejmé odborníkom v odbore z predchádzajúceho podrobného opisu vynálezu. Také modifikácie a variácie sú považované za patriace do rozsahu pripojených nárokov.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Použitie látky, ktorá zabraňuje alebo minimalizuje oxidáciu polynenasýtenej mastnej kyseliny na výrobu liečiva na potlačenie expresie VCAM-1.

2. Použitie látky, ktorá zabraňuje alebo minimalizuje oxidáciu polynenasýtenej mastnej kyseliny na výrobu liečiva na potlačenie expresie redox-senzitívneho génu.

3. Použitie látky, ktorá zabraňuje alebo minimalizuje oxidáciu polynenasýtenej mastnej kyseliny na výrobu liečiva na aktiváciu génu, ktorý potláča oxidáciu polynenasýtenej mastnej kyseliny.

4. Použitie látky, ktorá zabraňuje interakcii medzi polynenasýtenou mastnou kyselinou a proteínom na výrobu liečiva, ktoré sprostredkúva expresiu VCAM-1, na potlačenia expresie VCAM-1.

5. Použitie látky podľa nároku 2 alebo 3, pričom gén je vybraný zo skupiny pozostávajúcej z génov, ktoré sa exprimujú do cytokínov zúčastňujúcich sa na začiatočnej fáze imunitnej odpovede, do chemoatraktantov, ktoré napomáhajú migrácii zápalových buniek k miestu poranenia, do rastových faktorov, a adhezívnych molekúl.

6. Použitie látky podľa nároku 2 alebo 3 pričom gén je vybraný zo skupiny pozostávajúcej z MCP-1, IL-6 a trombínového receptora.

7. Použitie látky podľa nároku 1 až 6 pričom polynenasýtená mastná kyselina je vybraná zo skupiny pozostávajúcej z linolovej, linolénovej, arachidónovej a eikozatriénovej kyseliny.

8. Použitie látky podľa nároku 1 až 7 pričom látka má všeobecný vzorec ASC(S)B, kde A je vodík alebo farmaceuticky akceptova-

teľný kation, a B je NR^2R^3, kde R^2 a R^3 sú nezávisle $-(CHOH)_n(CH_2)_nOH$, kde n je 0, 1, 2, 3, 4, 5, alebo 6, $-(CH_2)_nCO_2A$, $-(CH_2)_nCO_2R^4$ pričom R^4 je alkyl, aryl, alkaryl alebo aralkyl hydroxy(C_{1-6})alkyl- R^2 a R^3 môžu byť nezávisle C_{1-10} alkyl alebo R^2 a R^3 môžu spolu vytvárať most majúci vzorec $-(CH_2)_m-$ kde m je 3 až 6.

9. Použitie látky podľa nároku 1 až 7 pričom látkou je pyrolidín, ditiokarbamát alebo jej farmaceuticky prijateľná soľ.

10. In vitro spôsob predikcie alebo hodnotenia porúch, ktoré sú in vivo sprostredkované VCAM-1, vyznačujúci sa tým, že zahŕňa kvantifikáciu hladiny oxidovanej polynenasýtenej mastnej kyseliny v tkanive alebo v krvi použitím in vitro analýzu.

11. In vitro spôsob predikcie alebo hodnotenia chorôb, ktoré sú in vivo sprostredkované redox-senzitívnym génom, vyznačujúci sa tým, že zahŕňa kvantifikáciu hladiny oxidovanej polynenasýtenej mastnej kyseliny v tkanive alebo v krvi použitím in vitro analýzu.

12. In vitro spôsob predikcie alebo hodnotenia porúch, ktoré sú in vivo sprostredkované VCAM-1, vyznačujúci sa tým, že zahŕňa kvantifikáciu náhradných markerov hladiny oxidovanej polynenasýtenej mastnej kyseliny v tkanive alebo v krvi použitím in vitro analýzu.

13. In vitro spôsob predikcie alebo hodnotenia chorôb, ktoré sú in vivo sprostredkované redox-senzitívnym génom, vyznačujúci sa tým, že zahŕňa kvantifikáciu náhradných markerov hladiny oxidovanej polynenasýtenej mastnej kyseliny v tkanive alebo v krvi použitím in vitro analýzu.

14. In vitro spôsob hodnotenia citlivosti hostiteľových vyskulárnych endoteliálnych buniek k polynenasýteným mastným kyselinám alebo ich oxidačným náprotivkom, vyznačujúci sa tým, že zahŕňa podnietenie hostiteľa polynenasýtenou mastnou kyselinou alebo oxidovanou polynenasýtenou mastnou kyselinou a po-

rovnanie výslednej koncentrácie VCAM-1 na povrchu buniek alebo cirkulujúceho VCAM-1 alebo iného náhradného markera s normou populácie použitím in vitro analýzy.

15. Spôsob podľa nárokov 10 až 12, vyznačujúci sa tým, že náhradným markerom je cirkulujúci VCAM-1 alebo VCAM-1 na povrchu buniek.

16. Spôsob podľa nárokov 10 až 12, vyznačujúci sa tým, že náhradný marker je vybraný zo skupiny pozostávajúcej z IL-1, MCP-1 a IL-6.

17. Spôsob podľa nárokov 10 až 12, vyznačujúci sa tým, že náhradný marker je cytokín, ktorý iniciuje imunitnú odpoveď.

18. Spôsob podľa nárokov 10 až 12, vyznačujúci sa tým, že náhradný marker je chemoatraktant, ktorý napomáha migrácii zápalových buniek k miestu poranenia.

19. Spôsob podľa nárokov 10 až 12, vyznačujúci sa tým, že náhradný marker je rastový faktor.

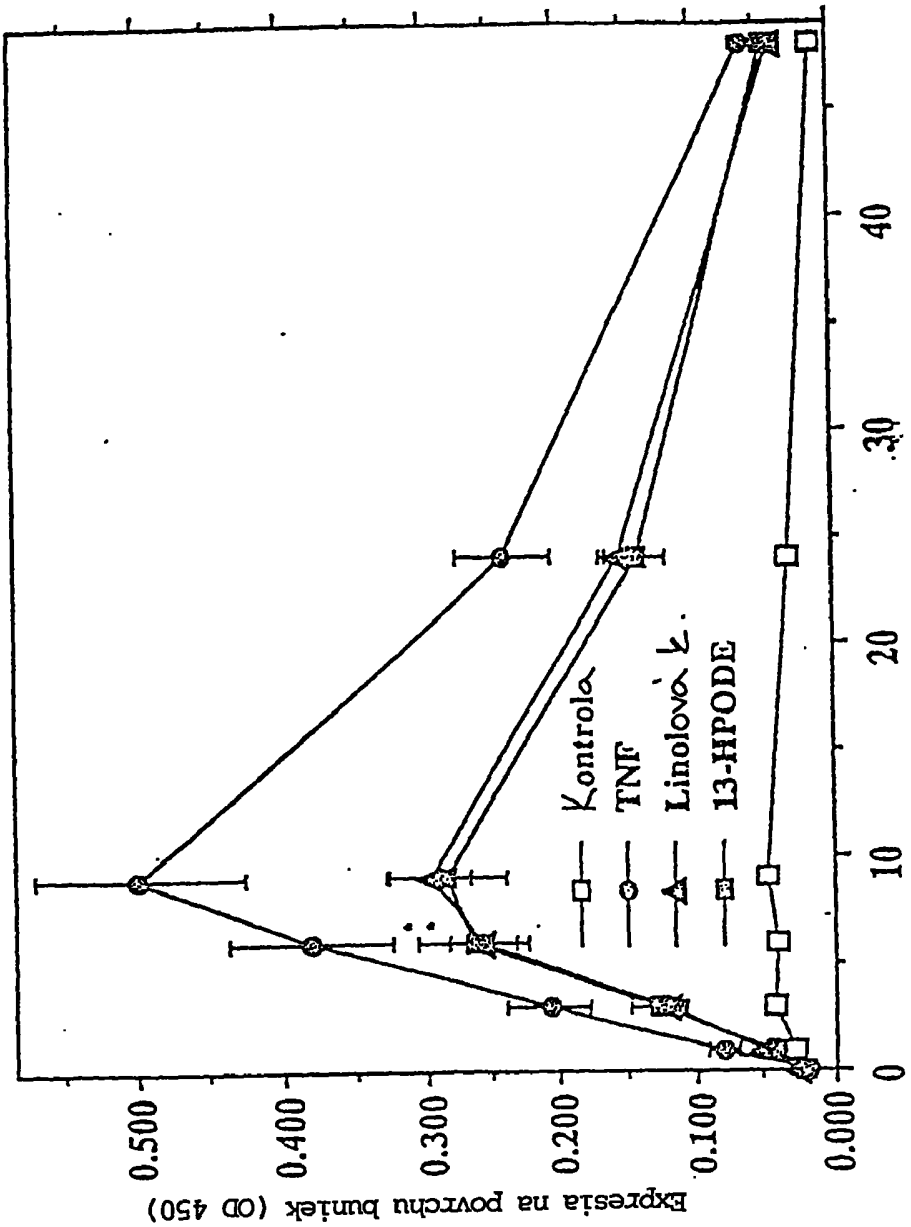
20. Spôsob podľa nárokov 10 až 12, vyznačujúci sa tým, že náhradný marker je adhezívna molekula.

21. Spôsob podľa nárokov 10 až 12, vyznačujúci sa tým, že náhradný marker je receptor trombínu.

22. In vitro spôsob vyhľadávania zlúčenín schopných ošetrovať poruchy sprostredkované VCAM-1, vyznačujúci sa tým, že zahŕňa zhodnotenie schopnosti zlúčeniny inhibovať oxidáciu polynenasýtenej mastnej kyseliny.

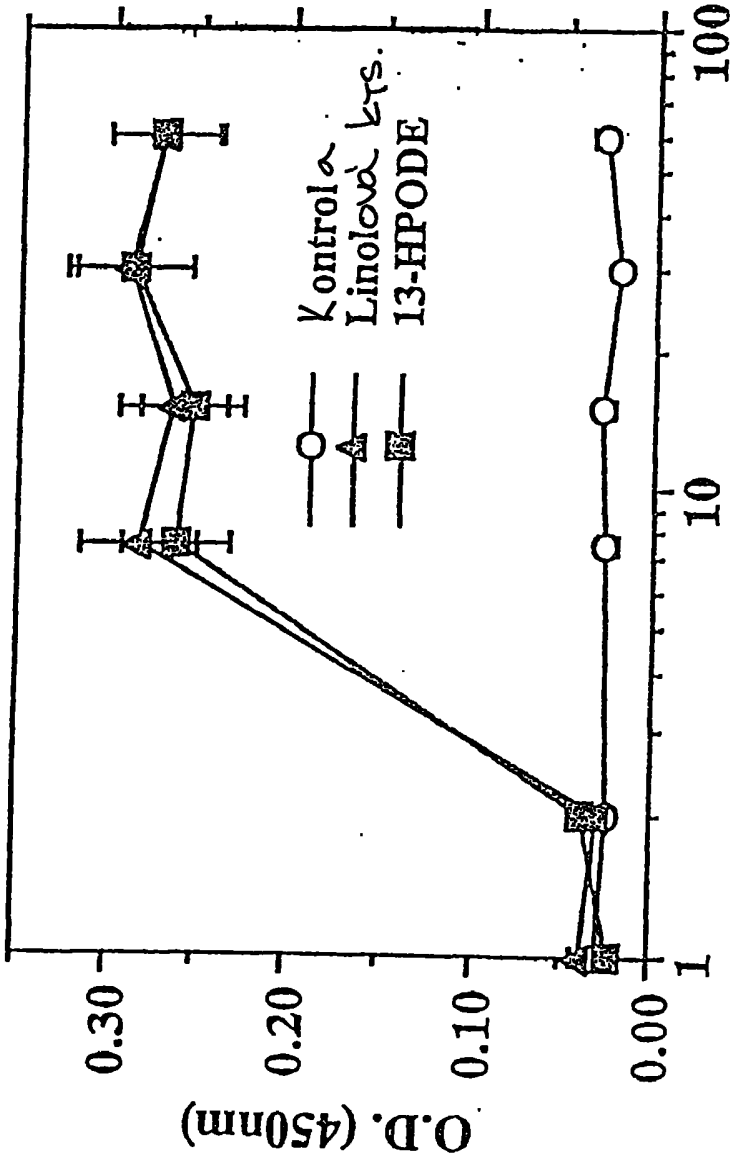
23. In vitro spôsob vyhľadávania zlúčenín schopných ošetrovať poruchy sprostredkované VCAM-1, vyznačujúci sa tým, že zahŕňa zhodnotenie schopnosti zlúčeniny inhibovať interakciiu polynenasýtenej mastnej kyseliny alebo oxidovanej polynenasýtenej mastnej kyseliny s cieľovým proteínom.

Účinky kyseliny linolovej a 13-HPODE na kinetiku VCAM-1 génovej expresie



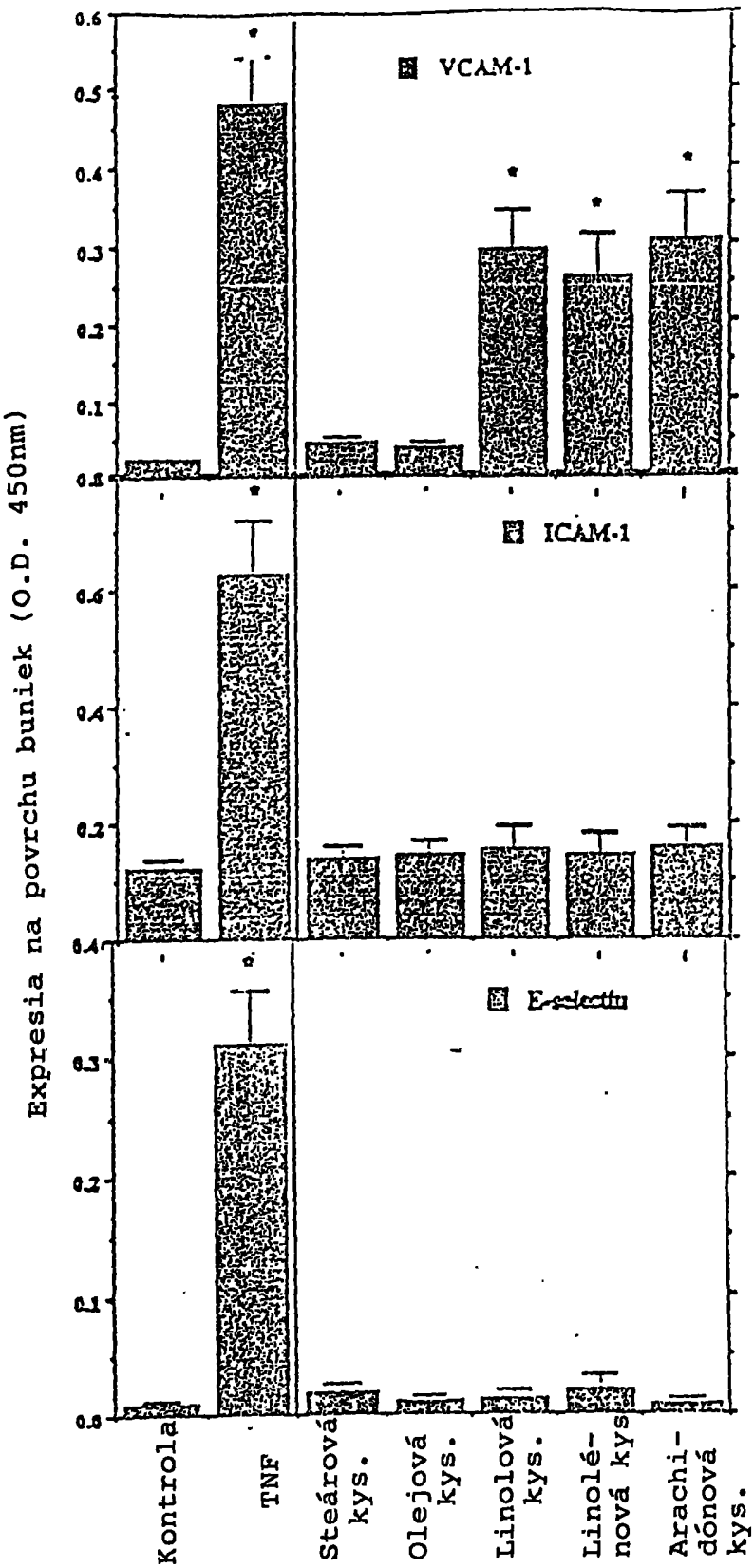
Obrázok 1

Účinok kyseliny linolovej a 13-HPODE dávkovej odpovede na expresiu génu VCAM-1



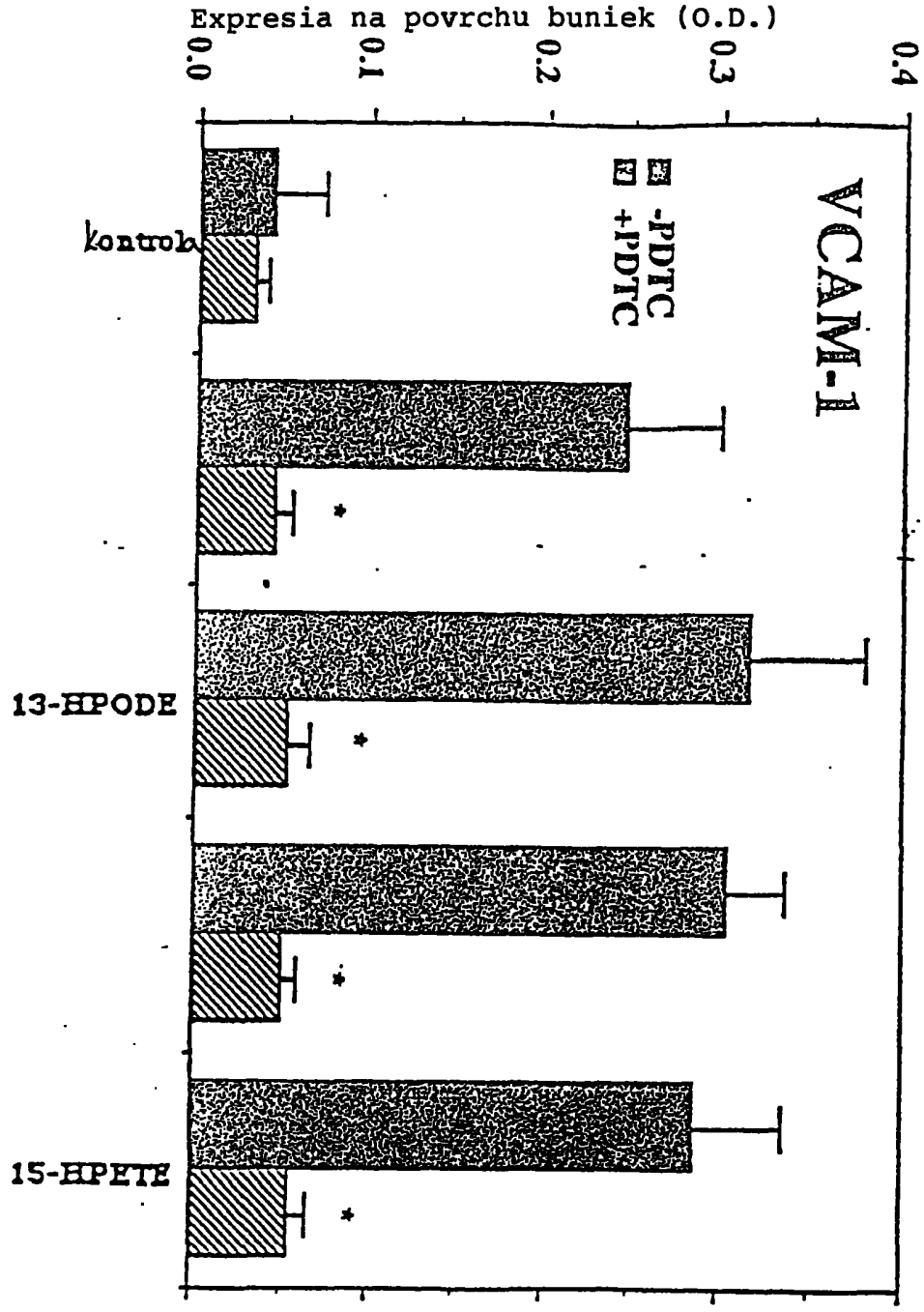
Obrázok 2

PV 1364 - 96

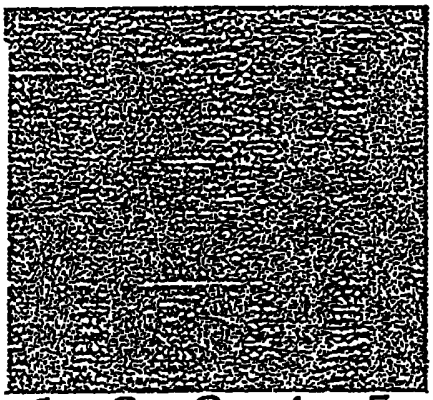


Obrázok 3

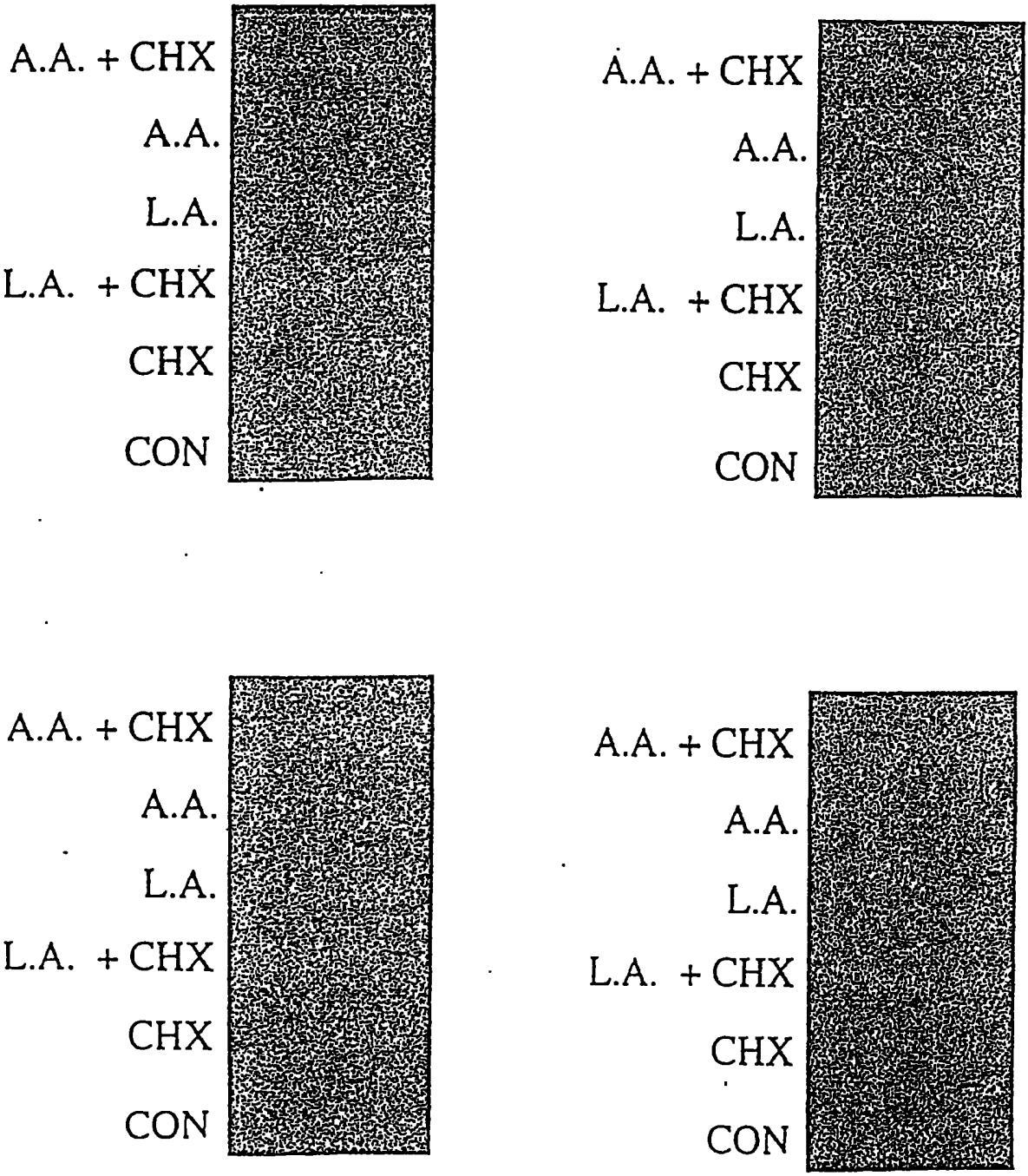
PV 1364-96



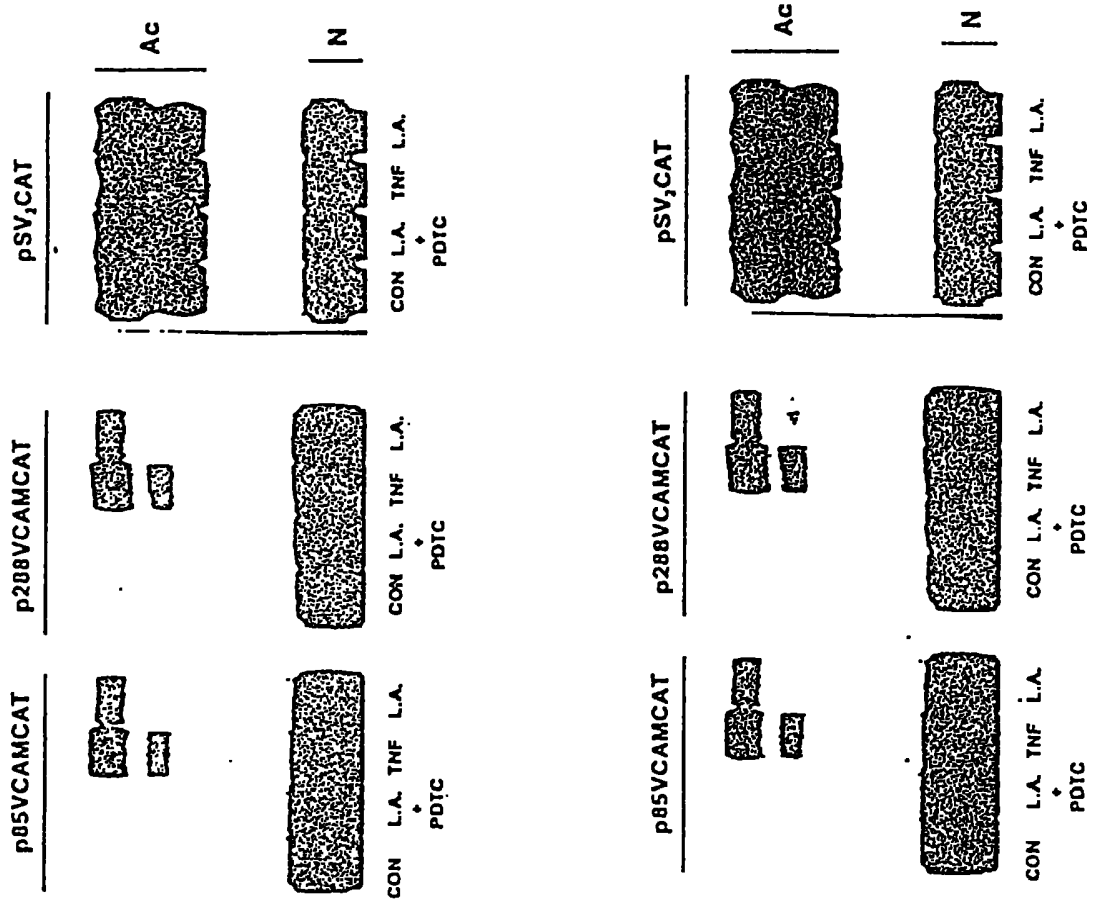
Obrázok 4



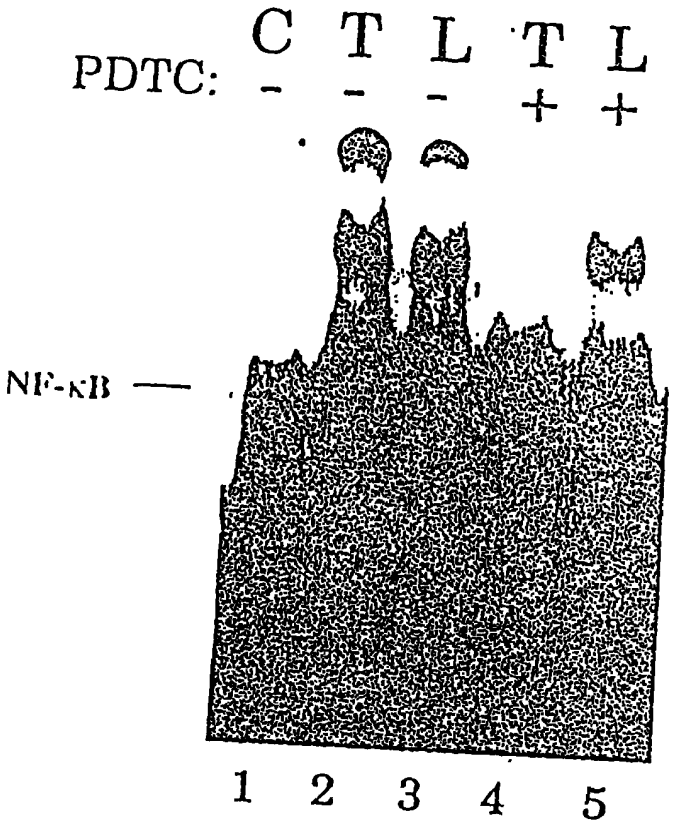
Obrázok 5


A.A. + CHX
A.A.
L.A.
L.A. + CHX
CHX
CON
A.A. + CHX
A.A.
L.A.
L.A. + CHX
CHX
CON
A.A. + CHX
A.A.
L.A.
L.A. + CHX
CHX
CON
A.A. + CHX
A.A.
L.A.
L.A. + CHX
CHX
CON

Obrázok 6

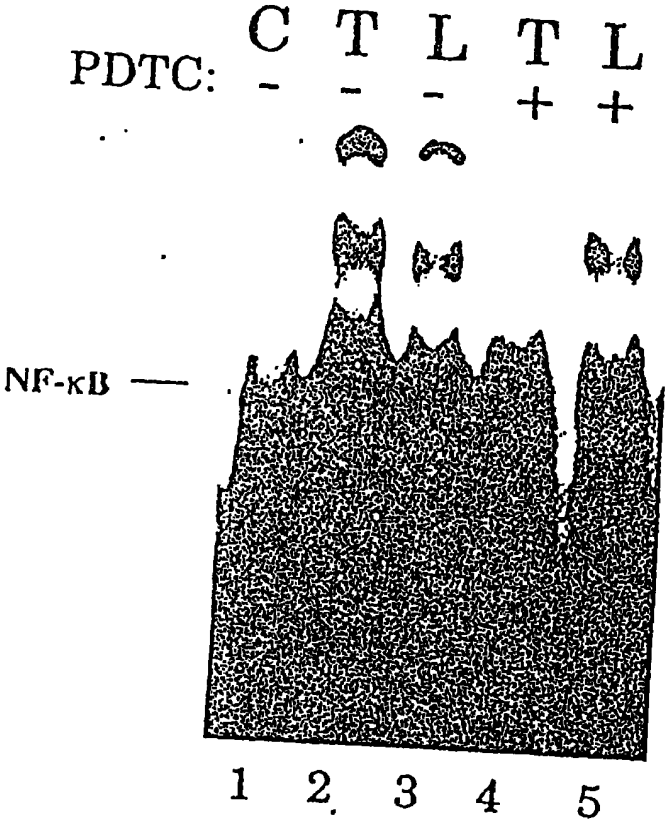


Obrázok 7



C: Kontrola
T: TNFα (100 U/ml)
L: K. LINOLOVÁ (7.5 μM)

Obrázok 8



C: Kontrola
T: TNFα (100 U/ml)
L: K. LINOLOVÁ (7.5 μM)

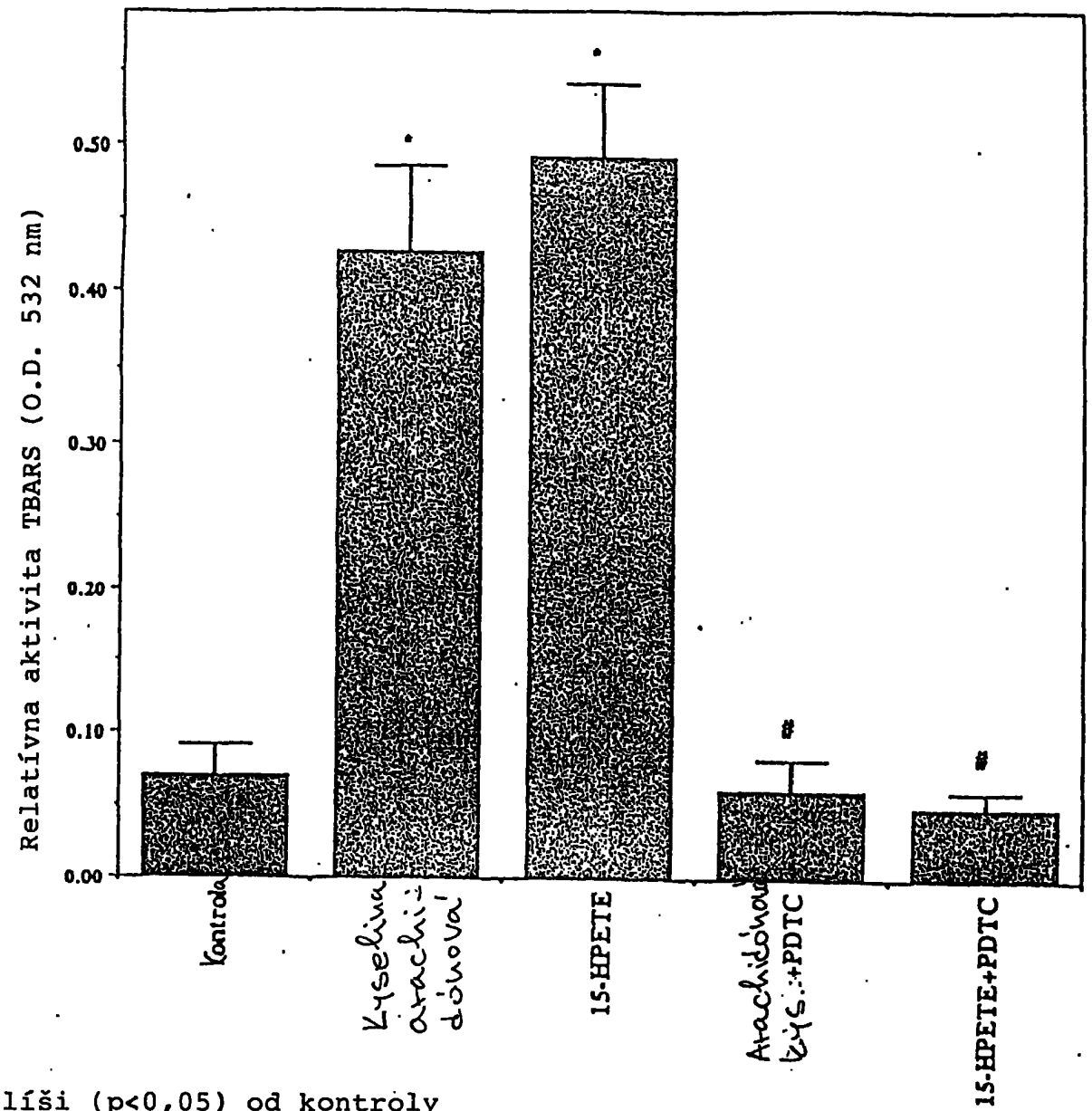
PV 1364 - 96

8/20

PV 1364 -96

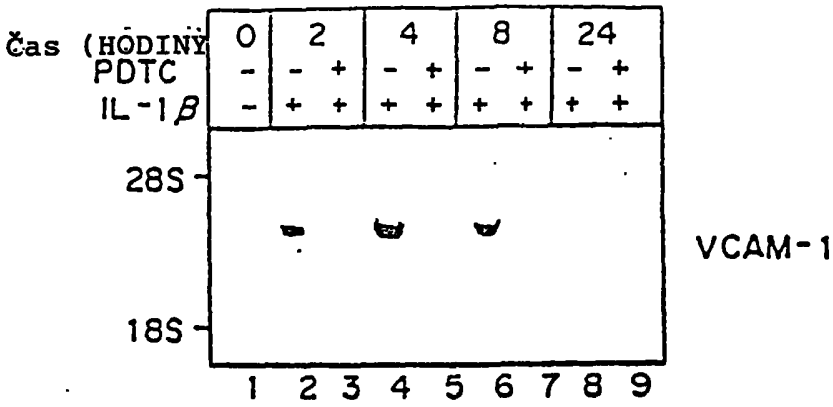
* - hodnota sa líši ($p<0,05$) od kontroly

PV 1364-96

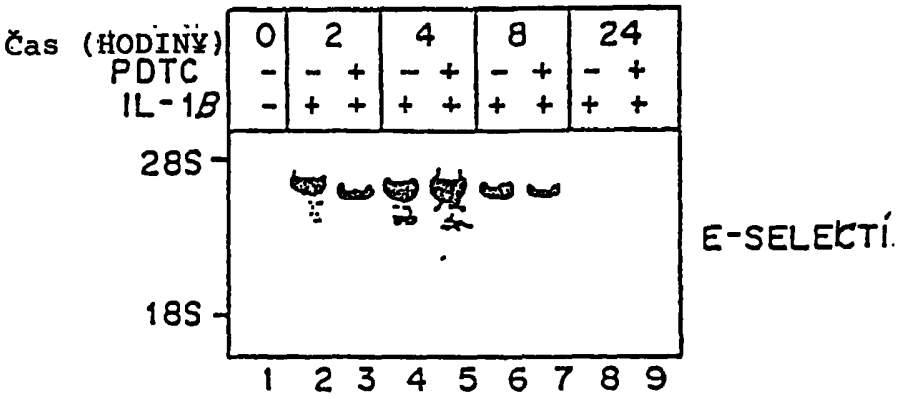


* - hodnota salíši (p<0,05) od kontroly
\# - hodnota sa líši (p<0,05) od zodpovedajúcich mastných kyselín neošetrených PDTC

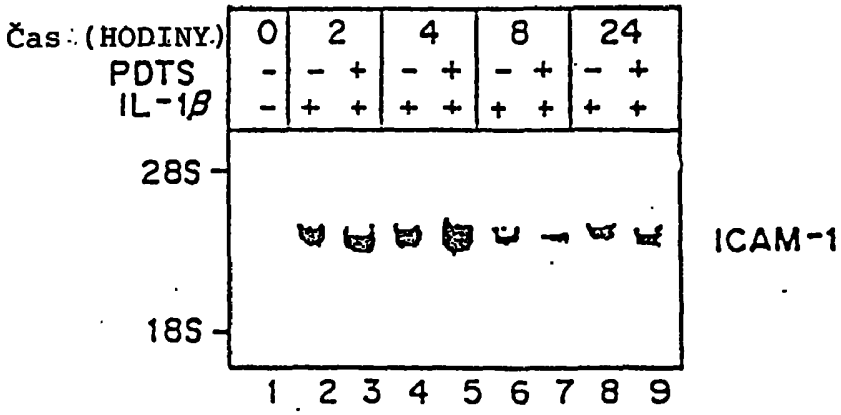
Obrázok 10a



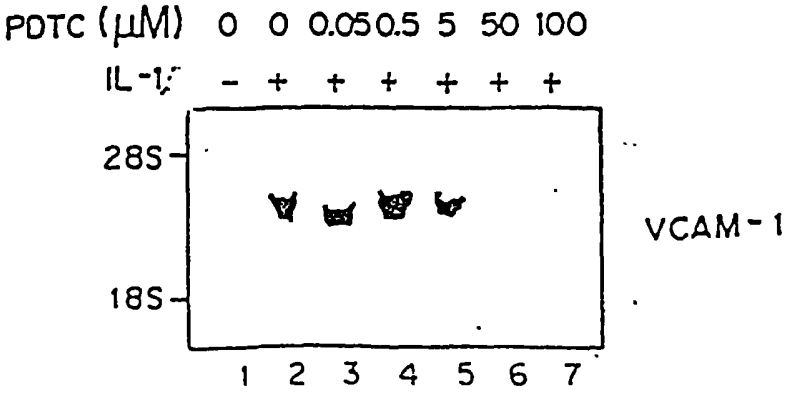
Obrázok 10b

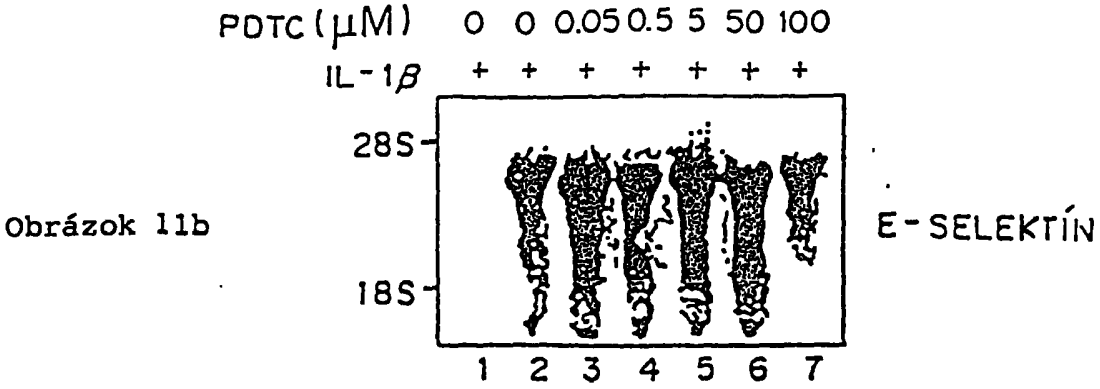


Obrázok 10c



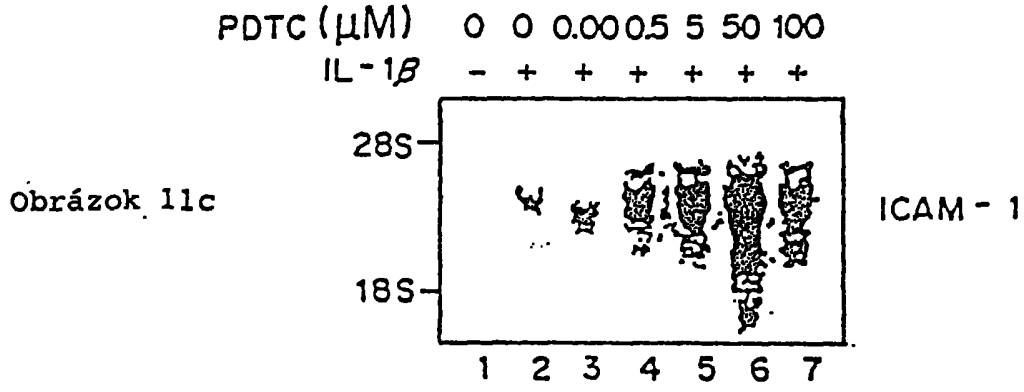
Obrázok 11a





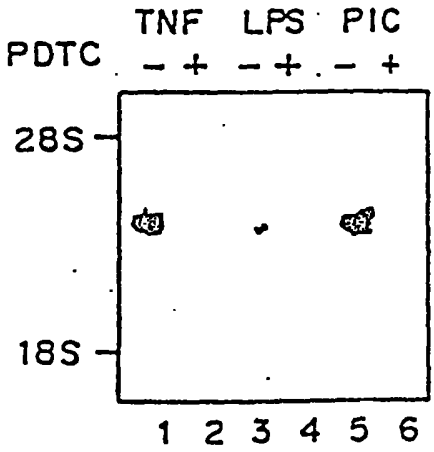
Obrázok 11b

E-SELEKTÍN



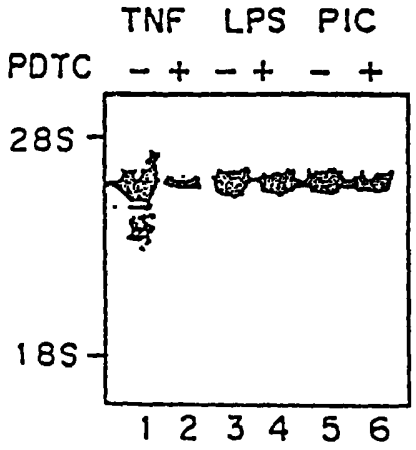
Obrázok 11c

ICAM - 1



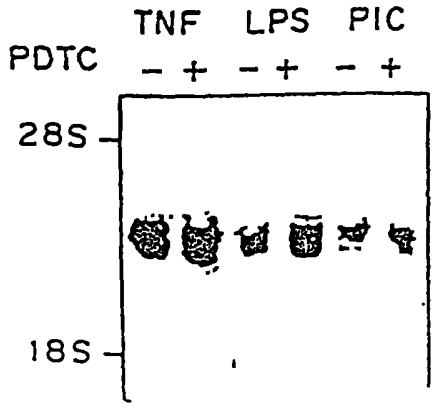
Obrázok12a

VCAM-1



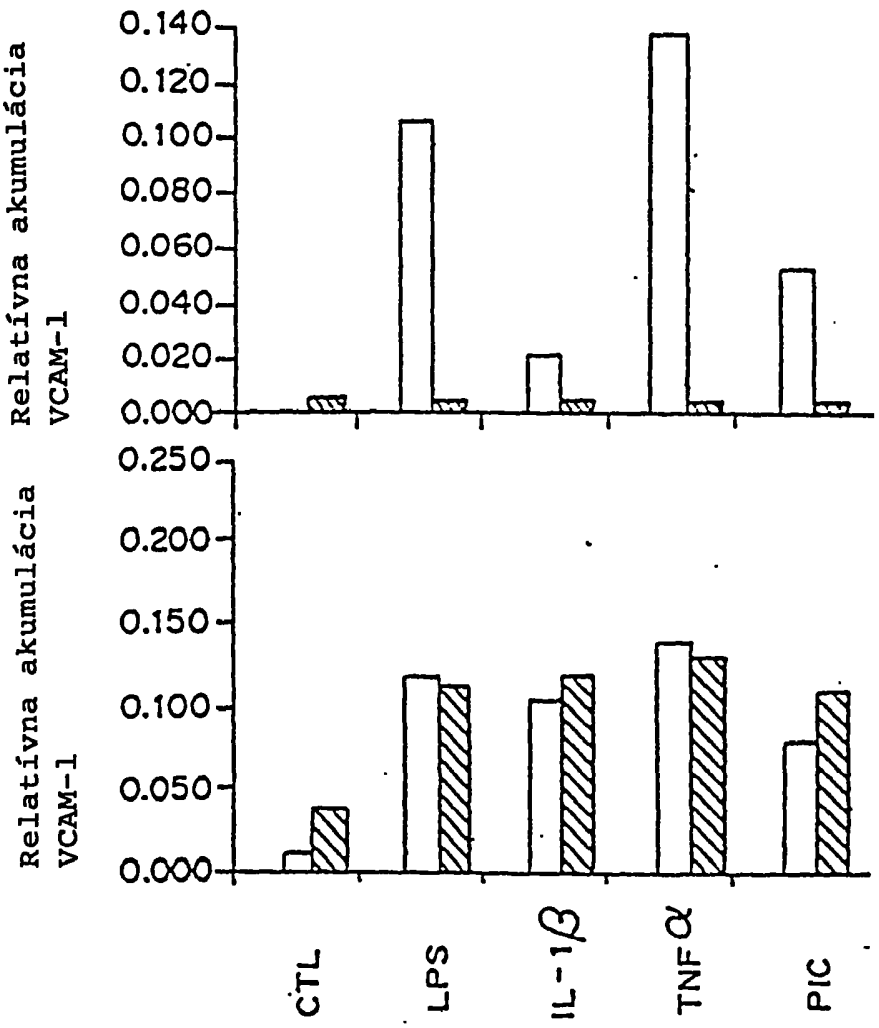
Obr. 12b

E-SELEKTÍI

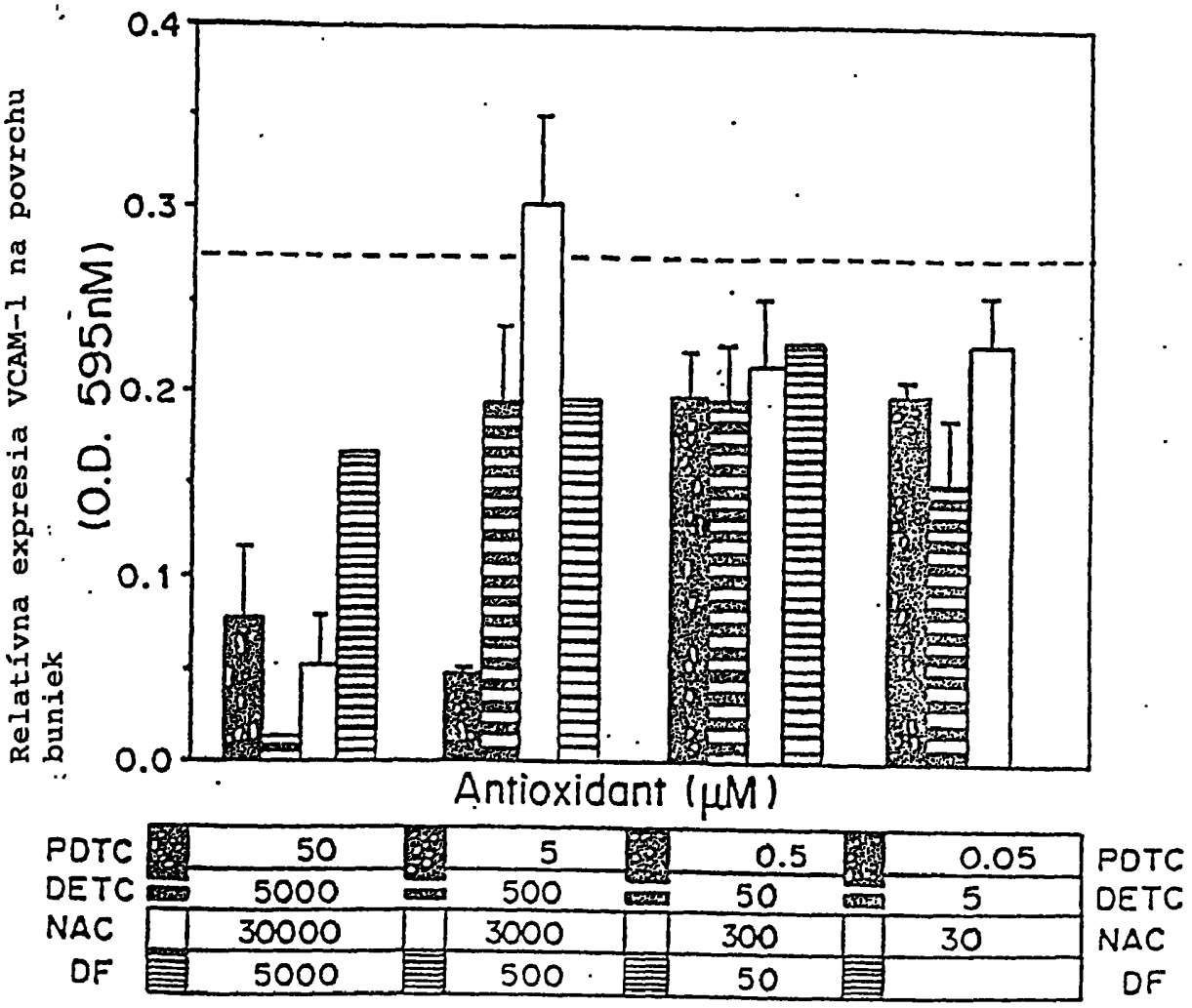


Obr. 12c

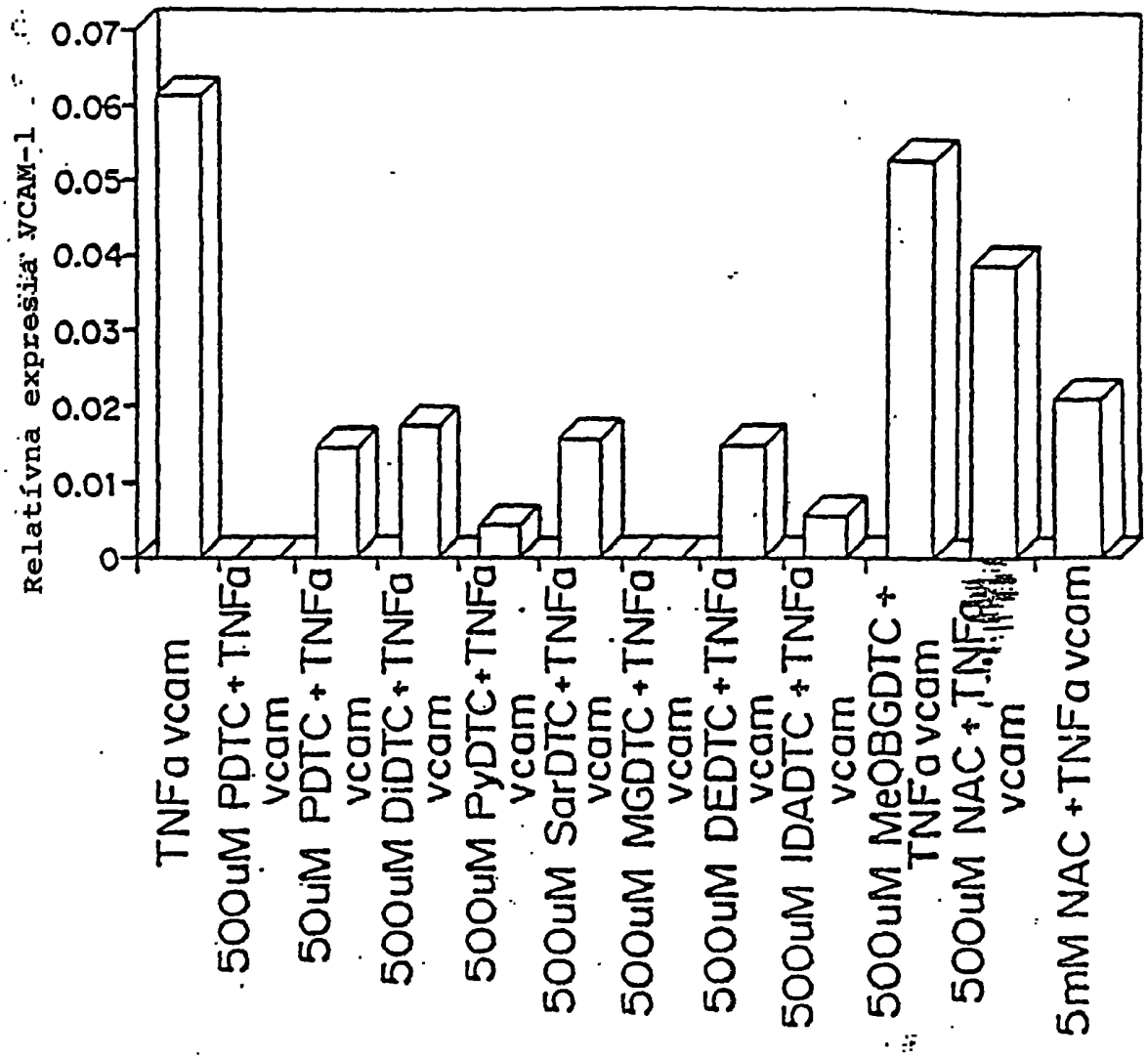
ICAM - 1


Relatívna akumulácia VCAM-1
0.140
0.120
0.100
0.080
0.060
0.040
0.020
0.000
Relatívna akumulácia VCAM-1
0.250
0.200
0.150
0.100
0.050
0.000
CTL
LPS
IL-1β
TNFα
PIC

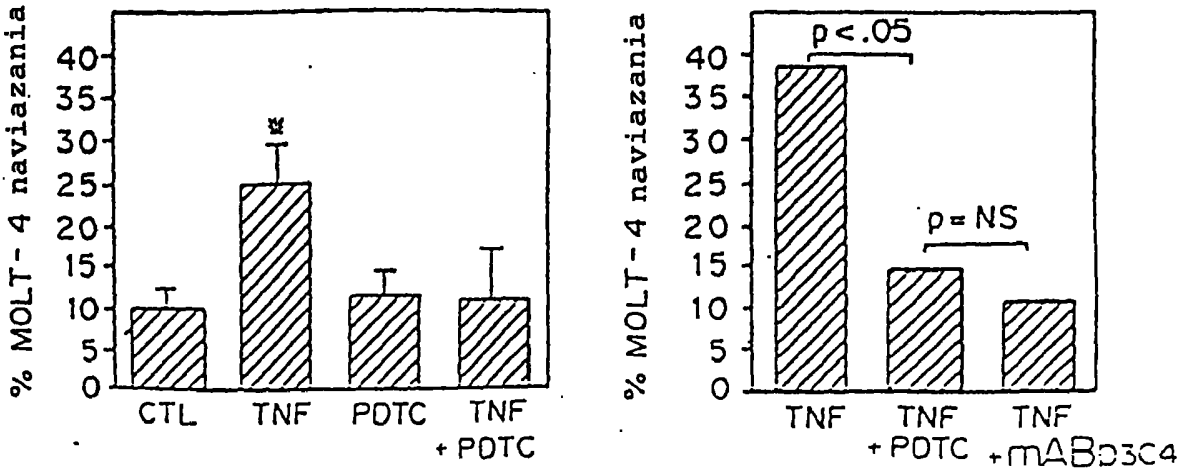
Obrázok 13


Relatívna expresia VCAM-1 na povrchu buniek
(O.D. 595nM)
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
Antioxidant (μM)
PDTC 50 5 0.5 0.05 PDTC
DETC 5000 500 50 5 DETC
NAC 30000 3000 300 30 NAC
DF 5000 500 50 DF

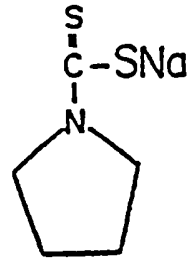
Obrázok 14



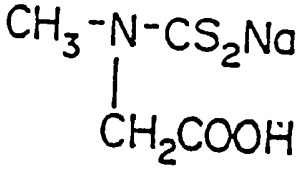
Obrázok 15



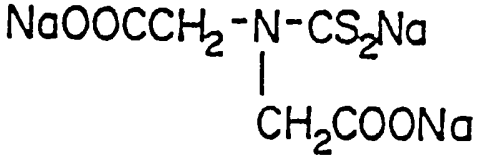
Obrázok 16



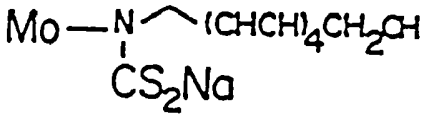
Pyrolidín-N-karboditioát sodný



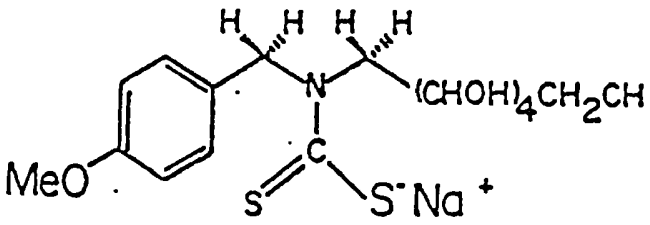
N-metyl-N-karboxymetyl-N--karboditioát sodný (alebo sarkozínditiokarbamát sodný)



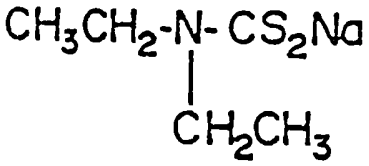
N,N-di(karboxymetyl)-N-karboditioát trojsodný (alebo kyselina iminodiaceto ditiokarbamát trojsodná)



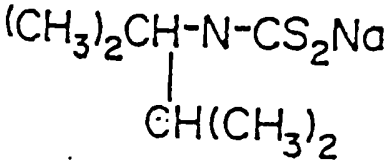
N-metyl-D-glukamín-N-karboditioát sodný



N-(4-metoxybenzyl)-D-glukamín-N--karboditioát sodný

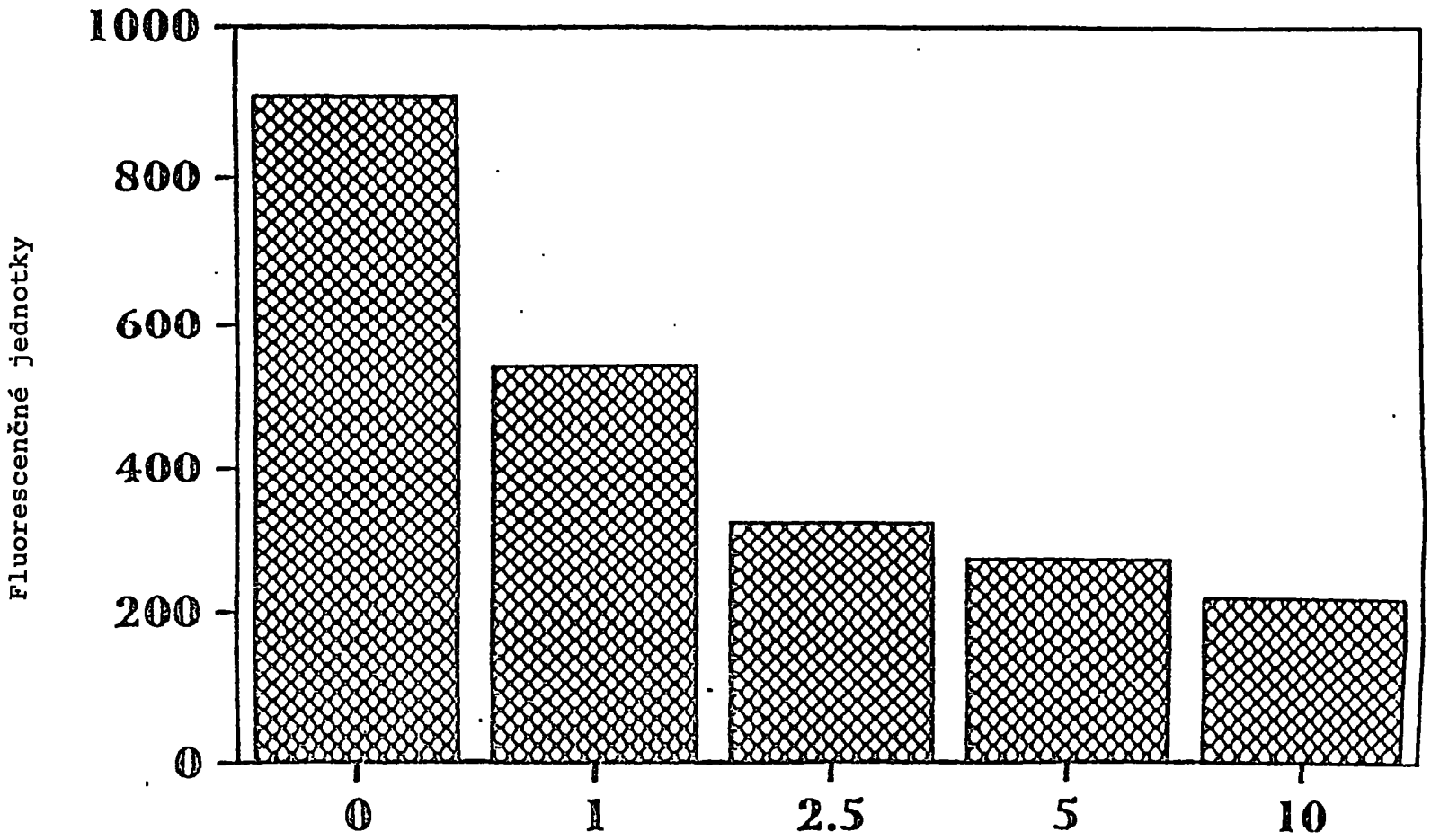


N,N-dietyl-N-karboditioát sodný (alebo dietylditiokarbamát sodný)



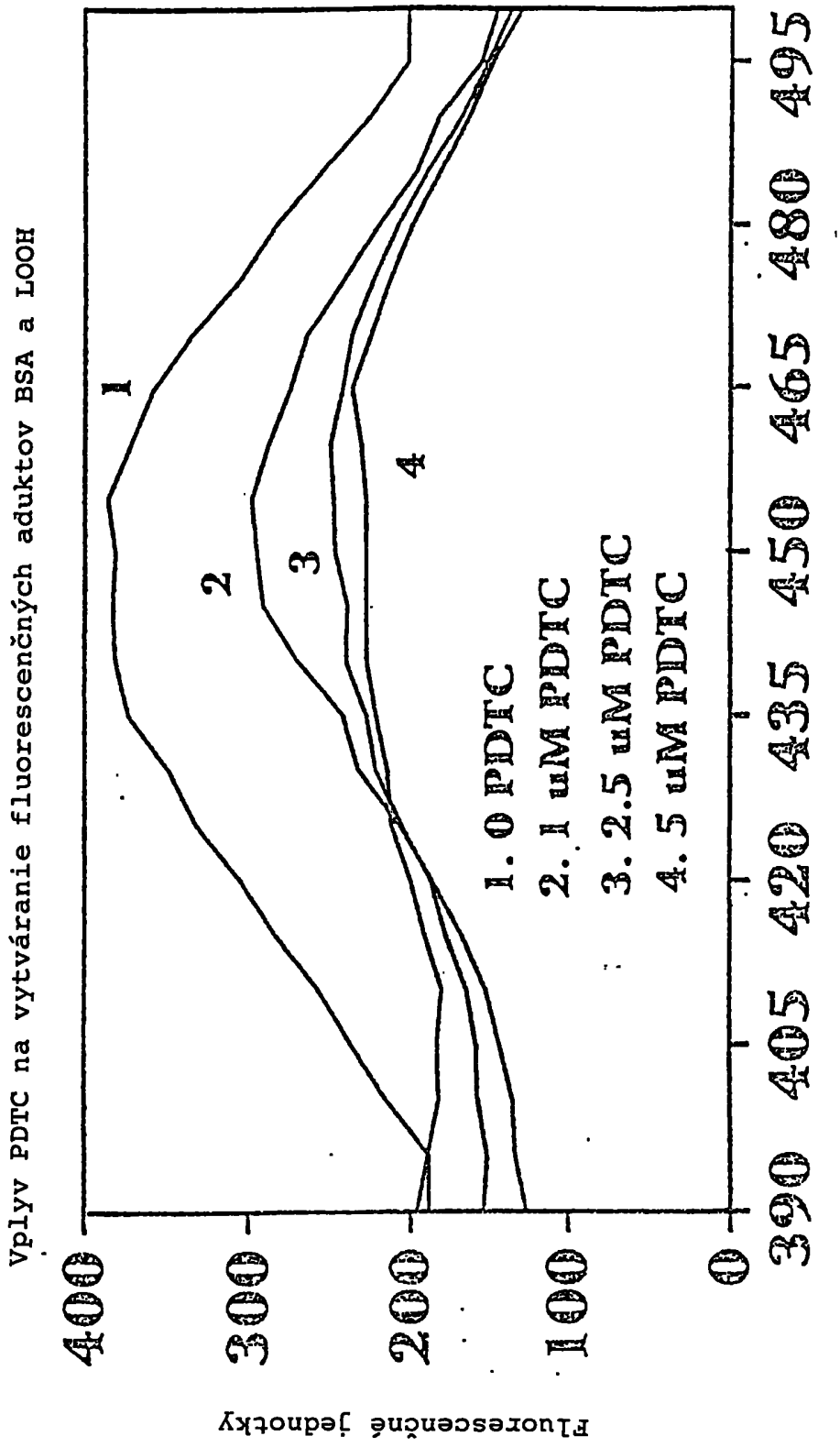
N,N-diizopropyl-N-karboditioá sodný (alebo diizopropylditiokarbamát sodný)

Vplyv PDTC na formovanie fluorescenčných aduktov
(Jeden mikromól 13-HPODE sa inkuboval s 200 mikrogramami BSA v prítomnosti PDTC počas 6 dní. Fluorescencia sa merala pri 430 až 460 nm s excitáciou pri 330 až 360 nm.)



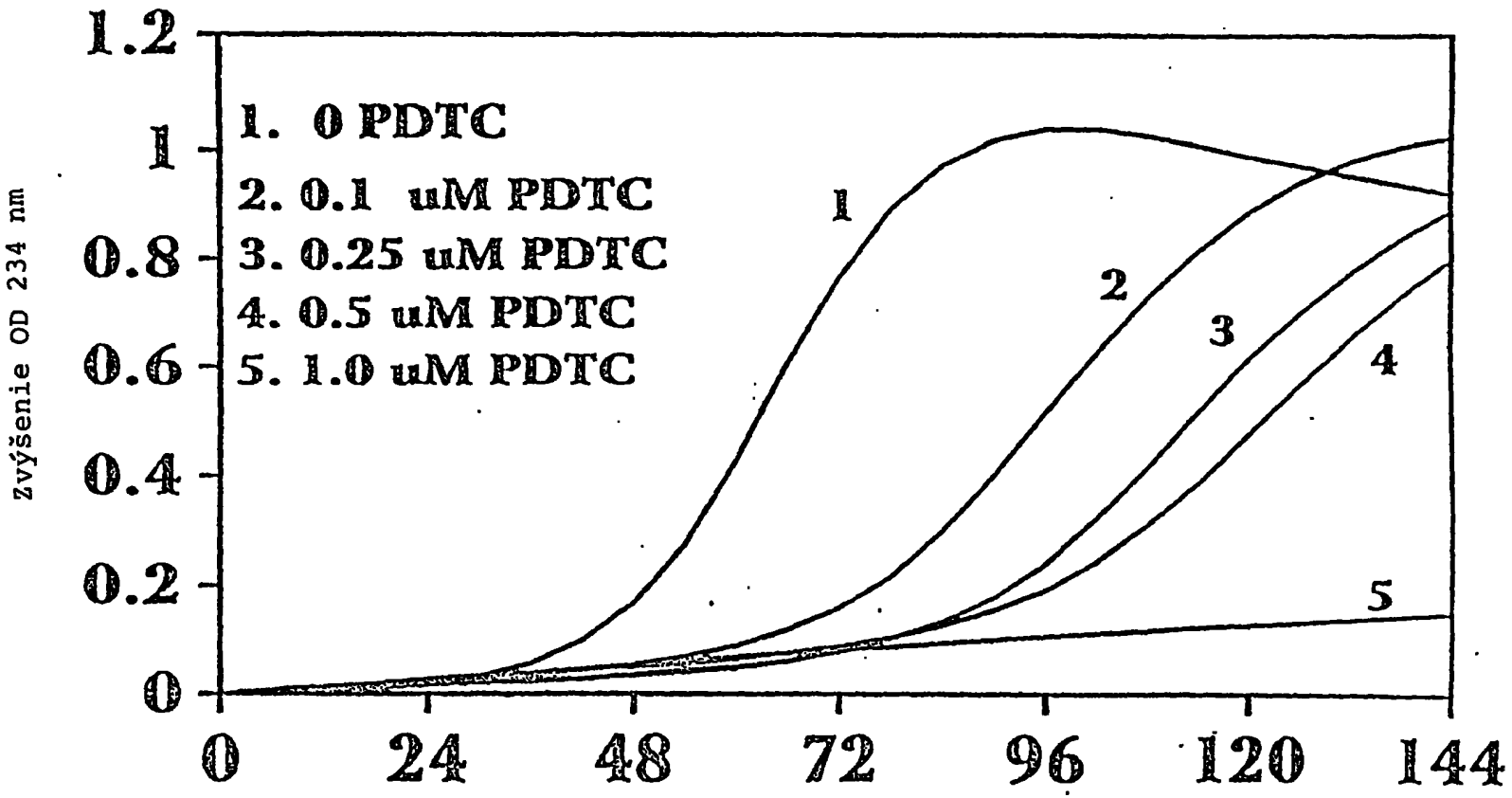
Obrázok 18

PV 4364-96


Vplyv PDTC na vytváranie fluorescenčných aduktov BSA a LOOH
Fluorescenčné jednotky
4000
3000
2000
1000
0
390
405
420
435
450
465
480
495
Vlnová dĺžka (nm)
1
2
3
4
1. 0 PDTC
2. 1 uM PDTC
3. 2.5 uM PDTC
4. 5 uM PDTC

Obrázok 19

Vplyv PDTC na oxidáciu LDL chrenovou peroxidázou (HRP)



Obrázok 20

VPLYV PDTC NA CYTOKÍNMI INDUKOVANÉ FORMOVANIE ox-PUFA

BUNKY	KYSELINA LINOLOVÁ	KYSELINA OX-LINOLOVÁ
Kontrola	9561	11445
TNFα	8874	27894
IL-1β	9134	25813*
TNFα+PDTC	844	7966#
IL-1β+PDTC	8257	8012#

* - hodnota sa líši ($p<0,05$) od kontroly

- hodnota sa líši ($p<0,05$) od zodpovedajúcej skupiny, ktorá nebola ošetrená PDTC

Obrázok 21.

PV 1364 - 96