



NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **317335**

(13) **B1**

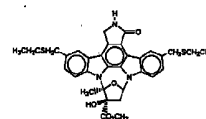
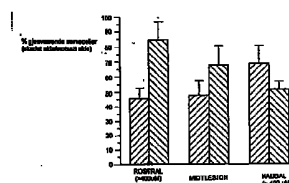
(51) Int Cl⁷

A 61 K 31/55

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19986111	(86)	Innt.inng.dag og søknadsnr	1997.06.24 PCT/US97/10898
(22)	Inng.dag	1998.12.23	(85)	Videreføringsdag	1998.12.23
(24)	Løpedag	1997.06.24	(30)	Prioritet	1996.06.25, US, 20406
(41)	Alm.tilgj	1999.02.23			
(45)	Meddelt:	2004.10.11			
(71)	Søker	Cephalon Inc , 145 Brandywine Parkway, PA19380-4245 WEST CHESTER, US			
(72)	Oppfinner	Thomas M. Engber, Berwyn, PA, US Forrest A. Haun, Wyncote, PA, US Michael S. Saporito, Westmont, NJ, US Lisa D. Aimone, Reading, PA, US Matthew S Miller, 2120 Dawn Lane, PA18940 NEWTON, US Ernest Knight Jr, 2604 Calibogue Club, Hilton Head Island, SC 29928, US			
(74)	Fullmektig	Bryn Aarflot AS , Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO, NO			
(54)	Benevnelse	Anvendelse av K-252A derivat for behandling av perifere og sentrale nerveforstyrrelser og cytokinoverproduksjon			
(56)	Anførte publikasjoner	WO-A1-94/02488			
(57)	Sammendrag				

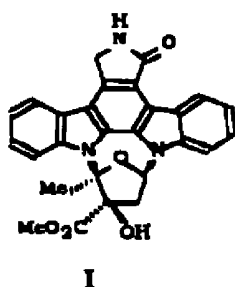
Her blir beskrevet terapeutiske metodologier som benytter et ringsubstituert derivat av indolkarbazolet K252a, der derivatet er representert av formelen (A). Forbindelsen er hensiktsmessig for å behandle perifere nevropatier, sentral nevroneal degenerasjon og cytokinoverproduksjon. Typiske sykdommer relatert til dette er perifer nevropati, Alzheimers sykdom, Parkinsons sykdom og autoimmune og allergiske tilstander.



Oppfinnelsen dreier seg om anvendelse av et ringsubstituert derivat av K-252a for fremstilling av en farmasøytisk blanding for behandling eller lindring av en betennelsestilstand ved inhibering av cytokinoverproduksjon, eller for lindring av de skadelige virkningene av overproduksjon av cytokin.

I. Indolkarbazolet K-252a

K-252a er en forbindelse som har et indolkarbazolskjelett [japansk publisert ikke-undersøkt patentsøknad nr. 41489/85 (US nr. 4555402)] med stereokjemien som er vist i formel I.



Det har blitt rapportert at K-252a er en potent hemmer av proteinkinase C (PKC) som spiller en sentral rolle i å regulere cellefunksjoner, med en rekke ulike aktiviteter slik som evnen til å hemme glatt muskelsammentrekning (Jpn. J. Pharmacol. 43 (suppl.):284, 1987), evnen til å hemme sekresjon av serotonin (Biochem. Biophys. Res. Commun., 144:35, 1987), evnen til å hemme forlengelse av nervecelleakson (J. Neuroscience, 8: 715, 1988), evnen til å hemme histaminfrisetting (Allergy, 43: 100, 1988), evnen til å hemme glatt muskel MLCK (J. Biol. Chem., 263: 6215, 1988), anti-inflammatorisk virkning (Acta Physiol. Hung., 80:423, 1992), og celleoverlevelse (J. Neurochemistry, 64:1502, 1995). Det har også blitt demonstrert i Experimental Cell Research, 193:175-182, 1991, at K-252a har evne til å hemme produksjon av IL-2.

I tillegg har det blitt rapportert at derivater av K-252a har evne til å hemme PKC, evnen til å hemme histaminfrisetting (japansk publisert ikke-undersøkt patentsøknad nr. 295588/88), anti-tumoraktivitet (japansk publisert ikke-undersøkt patentsøknad nr. 168689/89 (US 4.877.776), WO 88/07045 (US 4.923.986), WO 94/04541], evnen til å øke blodplater [WO 94/06799 (EP 630898A)], blodtrykks-senkende virkning (japansk publisert ikke-undersøkt patentsøknad nr. 120388/87),

evnen til å akselerere funksjoner til kolinerge nerveceller [WO 94/02488 (US 5.461.146 og US 5.621.100)] og kurativ virkning på prostatakreft [WO 94/27982 (US 5.516.771)]. Utvalgt aminoinneholdende trindenforbindelser har blitt produsert via Beckmanns omdannelse av de korresponderende staurosporin-oksimer (WO 97/05140).

Indolkarbazolene er generelt lipofile. Basert på dette har indolkarbazolene evne til å gå gjennom biologiske membraner relativt enkelt, sammenlignet med proteiner. Indolkarbazoler har også generelt lengre halveringstider *in vivo* enn proteiner har.

I tillegg til K-252a selv har ulike derivater av K-252a blitt syntetisert og analysert med henblikk på biologisk aktivitet. Blant K252a derivatene som er vist å ha biologisk aktivitet er en forbindelse beskrevet i Lewis et al., US patent nr. 5.461.146 og 5.621.100 og PCT Publication WO 94/02488, og der gitt navnet "forbindelse II-51". Forbindelse II-51 har blitt vist å forsterke funksjonen til kolinerge nerveceller, striatum nerveceller og sensoriske nerveceller.

II. Nevrodegenerative sykdommer og tilstander

Parkinsons sykdom er en nevrodegenerativ sykdom som består av progredierende og selektivt tap av dopaminerge nerveceller i den nigro-striatale bane (Agid, Lancet: 337:1991). Tilførsel av 1-metyl-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydro-pyridin (MPTP) til mus fører til degenerasjon av dopaminerge nevroner og fungerer som en dyremodell for det tap av dopaminerge nevroner og de adferdsmessige mangler som observeres i Parkinsons sykdom. Perifer tilførsel av MPTP fører til en meget selektiv degenerasjon av det nigro-striatale dopaminerge nevronele system hos mennesker, aper og mus (Heikkila et al., Science 224:1451-1453, 1984; Burns et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:4546-4550, 1983).

Nevrodegenerasjon i MPTP musemodellen har blitt godt karakterisert. Systemisk tilførsel av MPTP fører til selektivt tap av dopamininnhold (og nedbrytningsprodukter), tyrosin, hydroksylaseaktivitet, og dopaminopptak i dopaminerge nevroner i striatum hos mus (Heikkila et al., Nature 311:467-469, 1984a,b; Tipton et al., J. Neurochem. 61:1191-1206, 1993). Denne effekt er doseavhengig. Maksimalt tap oppstår mellom 3 og 7 dager etter lesjonen (Jackson-Lewis et al., Neurodegeneration 4:257-269, 1995). De dopaminerge cellelegemer i substantia nigra er mindre følsomme overfor MPTP toksisitet enn

deres tilsvarende nerveterminaler. Ved høye doser av MPTP, eller multiple injeksjoner av MPTP oppstår et betydelig tap av TH-immunopositive celler i substantia nigra innen en uke (Heikkila et al., *Science* 224:1451-1453, 1984; Jackson-Lewis et al., *Neurodegeneration* 4:257-269, 1995). Ved lavere doser MPTP eller med en enkel injeksjon oppstår tap av tyrosinhydroksylase-positive celler i nigra senere (Tatton et al., *J. Neuroscience Res.* 30:666-672, 1991). Således kan skade i striatum observeres i fravær av tap av tyrosinhydroksylase-positive celler i nigra ved lavere doser MPTP og i kortere tidsperioder etter lesjonen. Denne nevrodegenerative sekvens er lignende den som observeres i sykdommen. MPTP musemodellen er en velkjent og generelt brukt modell for å studere Parkinsons sykdom.

Ikke-kolinerge nevroner som bruker γ -aminosmørsyre (GABA) som en neurotransmitter (dvs GABA-erge nevroner) er vidt utbredt i hele hjernen. For eksempel finnes de i nukleus basalis magnocellularis hos gnagere (den tilsvarende region i den human hjerne kalles for nukleus basalis Meynert), en region i den basale forhjerne som er viktig for oppmerksomhet og hukommelsesfunksjoner. Skade til GABA-erge nevroner i den basale forhjerne kan også bidra til adferdssvikt i nevrodegenerative sykdommer slik som Alzheimers sykdom (Dekker et al., *Neurosci. and Biobehav. Rev.*, 15:299-317, 1991; Gallagher et al., *Seminars in Neuroscience*, 6:351-358, 1994; Torres et al., *Neuroscience*, 63:95-122, 1994).

Nevroner i den basale forhjerne dør i en rekke ulike sentralnervøse sykdommer, spesielt Alzheimers sykdom (Arendt et al., *Acta Neuropathol. (Berl.)* 61:101-108, 1983; Iraizoz et al., *Neuroscience*, 41:33-40, 1991; Vogels et al., *Neurobiol. Aging*, 11:3-13, 1990). En medvirkende faktor i slik nevronal celledød er eksitotoksitet induisert av glutamat, dvs overstimulering av nevroner fremkalt av overskudd av glutamat (Choi, *Neuron*, 1:623-634, 1988). Således benytter en rekke dyremodeller av Alzheimers sykdom glutamat eller en glutamat analog for å fremskaffe eksitotoksisk celledød i den basale forhjernerregion der nevrontød forekommer, dvs nukleus basalis magnocellularis (Wenk, *Beh. Brain Res.*, 72:17-24, 1996).

Neuronal patologi i Alzheimers sykdom blir først sett i den entorhinale hjernebark, og tap av nevroner i denne region progredierer etter hvert som sykdommen utvikles (Braak et al., *Acta Neuropathol.* 82:239-259, 1991; Hyman et al.,

Ann. Neurol. 20:472-481, 1986). Nevroner i lag 2 i entorhinalbarken projiserer til gyrus dentatus i hippocampus, og denne nevronale bane spiller en viktig rolle i hukommelsesproduksjon (Levisohn et al., Brain Res., 564:230-244, 1991; Olton et al., Brain Res. 139:295-308, 1978, Steward et al., Brain Res. Bull. 2:41-48, 1977).

- 5 Nevroner i lag 2 i entorhinalbarken bruker, som mange andre nevroner i hjernebarken, glutamat som en neurotransmitter (Mattson et al., Neuron 1:865-876, 1988; White et al., Nature 270:356-357, 1977). Således bidrar tap av glutamaterge nevroner i entorhinalbarken til de adferdsmessige utfall som man ser i Alzheimers sykdom og i andre nevrologiske tilstander.

10

III. Perifer nevropati

- Perifer nevropati dreier seg generelt om en sykdom som affiserer de perifere nerver, mest vanlig manifestert som en eller en kombinasjon av motoriske, sensoriske, sensoriskmotorisk eller autonome nevronale funksjonssviker. De
15 meget variable morfologiske bilder som fremvises ved perifere nevropatier kan hver av dem bli spesifikt forårsaket av en like variabel gruppe årsaker. For eksempel kan perifere nevropatier være arvelige, de kan resultere fra en systemisk sykdom, eller de kan induseres av et toksisk middel. Noen toksiske forbindelser som fremkaller nevrotoksisitet er terapeutiske medikamenter,
20 antikreftmidler, forurensninger i mat og i medisinske produkter, og omgivelses- og industrielle forurensninger.

- Spesifikt inkluderer kjemoterapeutiske midler som man vet kan fremkalle sensorisk og/eller motoriske nevropatier vincristin, et antikreftmedikament som brukes for å behandle hematologiske krefttyper og sarkomer. Nevrotoksisiteten er
25 doseavhengig, og fremstår som redusert tarmbevegelse og som perifer nevropati, spesielt i de distale muskler i hender og føtter, lavt blodtrykk ved stående tilstand og lav spenning i urinblæren. Lignende problemer har blitt dokumentert med taxol og cisplatin (Mollman, 1990, New Eng. Jour. Med. 322:126-127), selv om cisplatin-relatert nevrotoksisitet kan bli dempet med nervevekstfaktor (NGF)
30 (Apfel, et al., 1992, Annals of Neurology 31:76-80). Selv om nevrotoksisiteten noen ganger er reversibel etter at det nevrotoksiske middel fjernes kan helbredelse være en meget langsom prosess (Legha, 1986, Medical Toxicology 1:421-427; Olesen, et al., 1991, Drug Safety 6:302-314).

Det er en rekke nedarvede perifere nevropatier, deriblant Refsums sykdom, A-betalipoproteinemi, Tangiers sykdom, Krabbes sykdom, Metakromatisk leukodystrofi, Fabrys sykdom, Dejerine-Sottas syndrom og andre. Blant de nedarvede nevropatier er den uten sammenligning mest vanlige Charcot-Marie-Tooth sykdommen (se også US patent nr. 5.420.112 for ytterligere informasjon om de perifere nevropatier).

IV. Cytokiner

Tumor nekrosefaktor alfa (TNF- α) og interleukin-1 β (IL-1 β) er polypeptider som man vet er innblandet i en rekke betennelse og metabolske prosesser *in vivo*. En oversikt som beskriver rollen som TNF- α har i betennelsessykdommer, deriblant septisk sjokk, se Ann. Rev. Immunol. 7:625 (1980), og Clinical Trials for the Treatment of Sepsis, Sibbald, W.J. og Vincent, J.-L (Eds.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1995. Det er generelt akseptert at overproduksjon eller upassende produksjon av TNF- α er innblandet i en rekke patologiske tilstander, deriblant septisk sjokk (Spooner et al., Clinical Immunology and Immunopathology, 62:p, S11 (1992)) og en rekke allergiske og betennelses tilstander, deriblant, men ikke begrenset til kronisk leddgikt, slitasjegikt, astma, bronkitt, kronisk obstruktiv luftveissykdom, psoriasis, allergisk rhinitt, dermatitt og betennelses tarmsykdom og andre autoimmune sykdommer. Immunol. Res. 10:122 (1991), Science 229:896 (1985) og Proc. Natl. Acad. Sci. 89:7375 (1992).

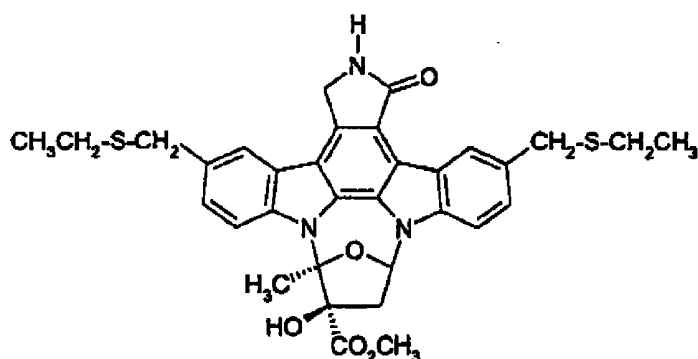
Generelt dreier oppfinnelsen seg om anvendelse av en terapeutisk mengde av forbindelse A for fremstilling av en farmasøytisk blanding for å lindre de skadelige virkningene i en rekke sykdommer og tilstander ved å behandle et individ som har behov av dette.

Mer spesifikt dreier det seg om å behandle de skadelige virkningene av sykdommer og tilstander som fører til eller frembringer celledød av, eller fører til eller forårsaker hemning av funksjonen til visse nevroner ved å øke funksjonen eller overlevelsen av en dopaminerg, GABA-erg eller glutamaterg nervecelle hos et pattedyr, noe som omfatter trinnet å tilføre forbindelse A til nevronet. Vanligvis er pattedyret der nevronet blir funnet et menneske. Vanligvis har det dopaminerge, GABA-erge eller glutamaterge nevroner som blir tilført forbindelse A

en nedsatt funksjon, eller holder på å dø forårsaket av en nevrodegenerativ sykdom.

I et første aspekt av foreliggende oppfinnelse omfattes anvendelse av en terapeutisk effektiv mengde av forbindelse A:

5

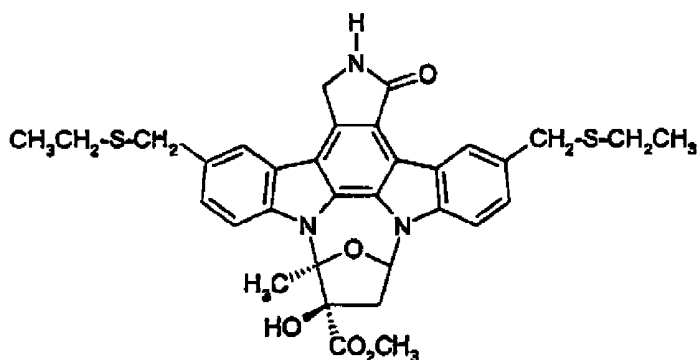


for fremstilling av en farmasøytisk blanding for behandling eller lindring av en betennelsestilstand valgt fra septisk sjokk, reumatoid artritt, osteoartritt, astma, bronkitt, kronisk obstruktiv luftveissykdom, psoriasis, allergisk rinitt, dermatitt og inflammatorisk tarmsykdom, ved å inhibere overproduksjon av tumornekrosefaktor alfa i et pattedyr i behov derav.

10

I et andre aspekt av foreliggende oppfinnelse omfattes anvendelse av en terapeutisk effektiv mengde av forbindelse A:

15



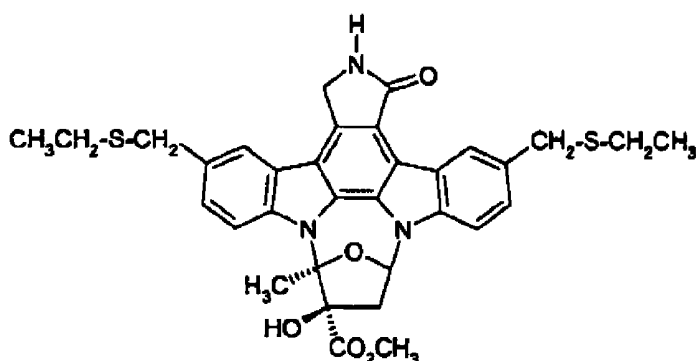
for fremstilling av en farmasøytisk blanding for lindring av de skadelige virkningene av overproduksjon av tumornekrosefaktor alfa i et pattedyr i behov derav, hvor nevnte virkninger er valgt fra gruppen bestående av autoimmun sykdom, septisk

20

sjukk, reumatoid artritt, osteoartritt, astma, bronkitt, kronisk obstruktiv luftveissykdom, psoriasis, allergisk rinitt, dermatitt og inflammatorisk tarmsykdom.

Et tredje aspekt av foreliggende oppfinnelse omfatter anvendelse av en terapeutisk effektiv mengde av forbindelse A:

5

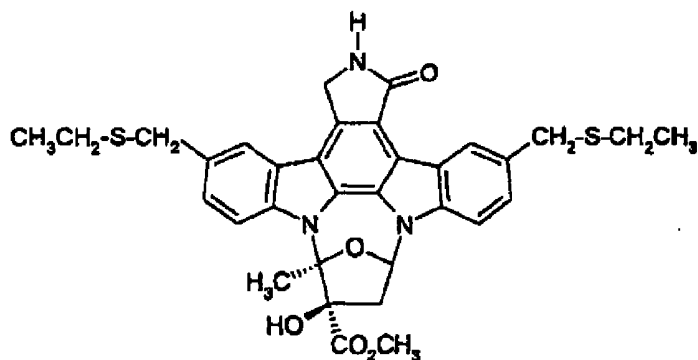


for fremstilling av en farmasøytisk blanding for behandling eller lindring av en betennelsestilstand valgt fra septisk sjukk, reumatoid artritt, osteoartritt, astma, bronkitt, kronisk obstruktiv luftveissykdom, psoriasis, allergisk rinitt, dermatitt og inflammatorisk tarmsykdom, ved inhibering av overproduksjon av interleukin-1 beta i et pattedyr i behov derav.

10

Et fjerde aspekt av foreliggende oppfinnelse involverer anvendelse av en terapeutisk effektiv mengde av forbindelse A:

15



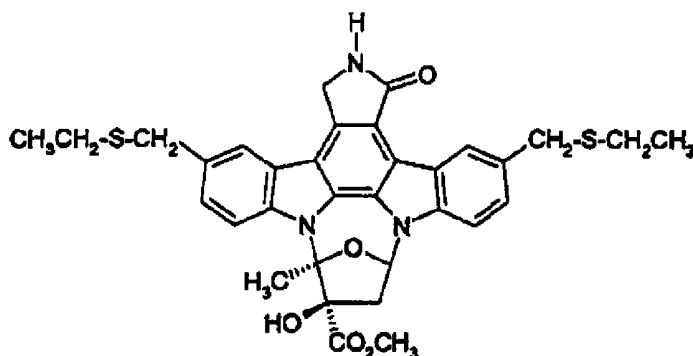
for fremstilling av en farmasøytisk blanding for lindring av de skadelige virkningene av overproduksjon av interleukin-1 beta i et pattedyr i behov derav, hvor nevnte virkninger er valgt fra gruppen bestående av septisk sjukk, reumatoid artritt,

20

osteoartritt, astma, bronkitt, kronisk obstruktiv luftveissykdom, psoriasis, allergisk rinitt, dermatitt og inflammatorisk tarmsykdom.

Mens det har blitt rapportert at indolkarbazolforbindelsen K-252a reduserer dødelighet som fremkalles av tilførsel av endotoksin, har denne evne blitt tilskrevet evnen som K-252a har i å hemme proteinkinaser, spesielt proteinkinase C (Inaba et al., Jpn. J. Surg. 23:234 (1993)). Det har uventet blitt observert at forbindelse A, som har liten eller ingen inhibitorisk evne mot PKC, fremviser en overraskende aktivitet som en hemmer av produksjon av TNF- α og produksjon av cytokinet IL-1 β . Derfor, med øket spesifisitet, kan forbindelse A også hemme produksjon av TNF- α og IL-1 β hos et pattedyr og anvendes til å behandle eller lindre betennelsestilstander eller sykdommer, deriblant septisk sjokk, kronisk leddgikt, slitasjegikt, astma, bronkitt, kronisk obstruktiv lungesykdom, psoriasis, allergisk rhinitt, dermatitt og betennelsestarmsykdom og andre autoimmune sykdommer, der en effektiv mengde av forbindelse A og farmasøytisk akseptable salter av denne i kombinasjon med en farmasøytisk akseptabel bærer tilføres til et pattedyr i behov derav.

Som benyttet her betyr "forbindelse A" forbindelsen hvis kjemiske struktur blir vist nedenfor.



20

Forbindelse A blir også henvist til som forbindelse II-51 (Lewis et al., US patent nr. 5.461.146 og 5.621.100; WO 94/02488).

Som benyttet her betyr "lindre" og "lindrende" å terapeutisk forbedre og/eller terapeutisk redusere og/eller å gjøre mer terapeutisk akseptabelt.

25

Som benyttet her betyr "skadelig" ødeleggende og/eller farlig og/eller negativt.

Som benyttet her betyr ordet "overproduksjon" når det blir brukt for å modifisere TNF- α og IL-1 β produksjon av TNF- α og/eller IL-1 β som fører til ødeleggende tilstander slik som f.eks septisk sjokk, allergiske tilstander, betennelsestilstander etc.

5 Som benyttet her betyr ordene "hemme" eller "hemmende" at tilstedeværelse av forbindelse A har en til sammenligning større effekt på å redusere og/eller forby og/eller forhindre produksjon av et materiale som har kontakt med forbindelse A enn et tilsvarende materiale som ikke har kontakt med forbindelse A.

Som benyttet her betyr ordene "forsterke" eller "forsterking" når brukt for å
10 modifisere ordene "funksjon" eller "overlevelse" at tidstedeværelse av forbindelse A har en til sammenligning større effekt på funksjon og/eller overlevelse av det spesifiserte nevron enn et tilsvarende nevron som ikke har kontakt med forbindelse A. For eksempel, og ikke for å begrense med henblikk på overlevelse av f.eks et dopaminergt nevron ville forbindelse A fremvise en forsterkning av
15 funksjonen til en dopaminerg nervepopulasjon som risikerer celledød (forårsaket av f.eks skade, en sykdomstilstand, en degenerativ tilstand eller en naturlig utvikling) når sammenlignet med en dopaminerg nevroneal populasjon som ikke har fått kontakt med forbindelse A, dersom den behandlede populasjon har en tilsammenligning større funksjonsperiode enn den ikke-behandlede populasjon.

20 Som benyttet her betyr "dopaminergt nevron" et nevron som bruker dopamin som en nevrotransmitter.

Som benyttet her betyr "GABA-ergt nevron" et nevron som bruker γ -aminosmørsyre som en nevrotransmitter.

Som benyttet her betyr "glutamatergt nevron" et nevron som bruker
25 glutamat som en nevrotransmitter.

Som benyttet her betyr "nbm" nukleus basalis magnocellularis.

Dersom de ikke blir definert på annen måte har alle de tekniske og vitenskapelige ord som benyttes her den samme betydning som vanligvis blir forstått av en med vanlig kunnskap i faget som denne oppfinnelse befinner seg i.
30 Selv om fremgangsmåter og materialer som er lignende eller ekvivalente til de som beskrives her kan benyttes i utførelse eller test av den foreliggende oppfinnelse blir de foretrukne fremgangsmåter og materialer beskrevet under. Alle publikasjoner, patentsøknader, patenter og andre referanser som blir nevnt her blir inkorporert i deres helhet som referanser. Dersom konflikt oppstår vil det

foreliggende dokument deriblant definisjonene avgjøre. Om ikke annet blir spesifisert er fremgangsmåter, materialer og eksempler som beskrives her for illustrasjon. Ulike egenskaper og fordeler ved oppfinnelsen vil bli tydelige fra de følgende detaljerte beskrivelser og fra kravene.

5

Kort beskrivelse av tegningene

Fig. 1 er en grafisk fremstilling av resultater som viser at forbindelse A ikke er en hemmer av monoaminoksydase-A. IC_{50} til clorgylin var 21 nm.

Oppestående trekanten, clorgylin; omvendte trekanten, forbindelse A; firkanten L-deprenyl.

10

Fig. 2 er en grafisk fremstilling av resultater som viser at forbindelse A ikke er en hemmer av monoaminoksydase-B. IC_{50} til clorgylin var 21 nm.

Oppestående trekanten, clorgylin; omvendte trekanten, forbindelse A; firkanten L-deprenyl.

15

Fig. 3 er et søylediagram som viser at dyr som mottok forbindelse A (lyse søyler) hadde signifikant flere nerveceller merket med fluor-gull i den rostrale del av den skadede nbm (mer enn 400 μ m fra lesjonens midtpunkt), sammenlignet med opererte dyr som bare mottok bæremiddel (mørke søyler). * = $P < 0,05$ ved Newman-Keuls test.

20

Fig. 4 er et søylediagram som viser det totale antall feil påvist i T-labyrint belønnet alterneringsoppgave fremvist av normale kontrolldyr, dyr utsatt for imitert kirurgi, kirurgisk skadede dyr som bare mottok bæremiddel ("Les") og kirurgisk skadede dyr som mottok forbindelse A i en dose på 0,1 mg/kg q.o.d. ("0,1"). Antall dyr i hver gruppe blir vist i parenteser. * = $P < 0,05$ sammenlignet med dyr utsatt for imitert kirurgi. $\eta\eta = P < 0,01$ sammenlignet med Les, ved bruk av Newman-Keuls test.

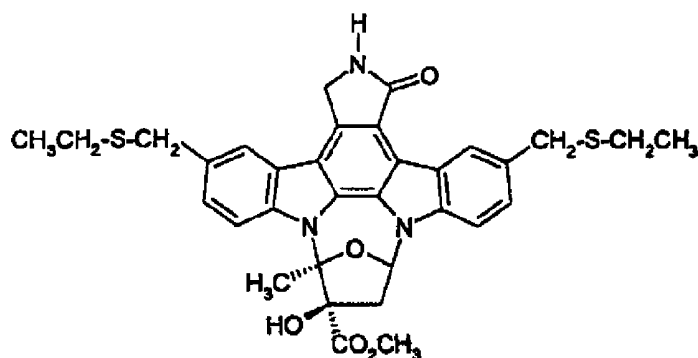
25

Fig. 5 viser virkningen av forbindelse A på perifer nevropati induisert av akrylamid.

30

Generelt dreier oppfinnelsen seg om anvendelser av en terapeutisk effektiv mengde av forbindelse A for fremstilling av en farmasøytisk blanding for å lindre de ødeleggende virkninger av en rekke sykdommer, tilstander og situasjoner ved å behandle et individ som har behov for dette.

Det beskrives behandling av de ødeleggende virkningene av sykdommer, tilstander og situasjoner som har negativ virkning på funksjonen og/eller overlevelsen til nevroner som risikerer å dø forårsaket av slike sykdommer og tilstander ved å forøke funksjonen eller overlevelsen til spesifikke typer av nevroner i pattedyrs sentralnervesystem. Mer spesifikt beskrives det å forsterke funksjonen eller overlevelsen av dopaminerge nevroner, GABA-erge nevroner og glutamaterge nevroner hos et pattedyr ved å tilføre pattedyret forbindelsen A, en ringsubstituert K-252a derivat med den følgende kjemiske struktur:



Dopaminerge nevroner, GABA-erge nevroner og glutamaterge nevroner er spredt over store deler av pattedyrs sentralnervesystem. Hver av disse tre nevronale celletyper lider av svekket funksjon og til og med celledød i en eller flere neurodegenerative sykdommer i sentralnervesystemet. Parkinsons sykdom dreier seg om progressivt tap av dopaminerge nevroner i den nigro-striatale bane. Alzheimers sykdom dreier seg om celledød av en rekke nevrontyper, deriblant GABA-erge nevroner i nukleus basalis Meynert i den basale forhjerne. Alzheimers sykdom dreier seg også om celledød av glutamaterge nevroner i entorhinalbarken.

En fremgangsmåte for å behandle Parkinsons sykdom eller Alzheimers sykdom er å tilføre en forbindelse som forøker funksjonen eller overlevelsen av dopaminerge nevroner, GABA-erge nevroner eller glutamaterge nevroner. Forbindelse A er farmakologisk aktivt i biologiske tester og *in vivo* modeller av forsterket funksjon eller overlevelse av dopaminerge nevroner, GABA-erge nevroner og glutamaterge nevroner. Derfor har den foreliggende oppfinnelse potensiale for behandling av Parkinsons sykdom eller Alzheimers sykdom. Anvendelse av forbindelse A for å forsterke funksjon eller overlevelse av

dopaminerge nevroner, GABA-erge nevroner eller glutamaterge nevroner som har svekket funksjon eller risikerer celledød forårsaket av sykdommer i tillegg til Parkinsons sykdom eller Alzheimers sykdom, beskrives.

Det beskrives en fremgangsmåte for å redusere en perifer nevropati.

- 5 Fremgangsmåten dreier seg om tilførsel av en nevropatireducerende mengde av forbindelse A til et pattedyr. I ulike fortrukne utførelser er pattedyret et menneske, eller et husdyr eller kjæledyr som utvikler en nevropati, f.eks som resultat av behandling av en krefttype med et kjemoterapeutisk middel. Forbindelse A kan bli tilført på en måte som vurderes som effektivt av en som er trenet i faget, en
- 10 foretrukket tilførselsmåte er subkutan injeksjon.

- Som benyttet her henviser "perifer nevropati" til en sykdom som affiserer et segment av det perifere nervesystem. Det beskrives bruk av forbindelse A for å redusere en nevrotoksisitet, deriblant distal sensoriskmotorisk nevropati, eller autonome nevropatier slik som redusert bevegelighet i tarmtraktus eller svekket
- 15 spenning i urinblæren.

- Foretrukne nevropatier som effekt kan behandles med forbindelse A inkluderer nevropatier som er assosiert med systemisk sykdom, f.eks post-polio syndrom, arvelig nevropatier, f.eks Charcot-Marie-Tooth sykdom, og nevropatier som er fremkallet av et toksisk middel, f.eks akrylamid eller et kjemoterapeutisk
- 20 middel, f.eks vincristin.

- Der forbindelse A blir benyttet for å behandle nevropati som er indusert av et toksisk middel kan forbindelsen bli tilført før, samtidig med eller etter eksponering til det toksiske middel, eller før, under eller etter tilførsel av et kjemoterapeutisk middel. Fortrinnsvis blir forbindelse A og det kjemoterapeutiske
- 25 middel hver tilført i effektive tidsintervaller, under en overlappende behandlingsperiode. Forbindelse A kan tilføres til pattedyret etter eksponering til det nevrotoksiske middel, eller etter kjemoterapi, for å gjenopprette i det minste en del av den nevronale funksjon som er ødelagt av det nevrotoksiske middel eller kjemoterapeutikum. Det kjemoterapeutiske middel kan være et ethvert
- 30 kjemoterapeutisk middel som fremkaller nevrotoksisitet, slik som vincristin, taxol, dideoksyinosin eller cisplatin.

Ved "toksisk middel" eller "neurotoksisk middel" menes en substans som via dets kjemiske effekt skader, hemmer eller induserer svikt i aktiviteten til en del av nervesystemet. Listen med nevrotoksiske midler som fremkaller nevropati er lang,

og inkluderer, men er ikke begrenset til neoplastiske midler slik som vincristin, vinblastin, cisplatin, taxol eller dideoksyforbindelser, f.eks dideoksyinosin, alkohol, metaller, industrielle toksiner innblandet i arbeidsliv eller omgivelseseksponering, forurensninger i mat eller medisinske produkter eller overdoser av vitaminer eller

5 terapeutiske medikamenter, f.eks antibiotika slik som penicillin eller kloramfenikol, eller megadoser av vitaminene A, D eller B₆. En lang, men ikke komplett liste av kjemiske forbindelser med nevrotoksiske bivirkninger blir vist i tabell I. Selv om denne liste fremviser eksempler på nevrotoksiske forbindelser ønskes det at den skal eksemplifisere og ikke begrense oppfinnelsens område. Andre toksiske

10 midler kan fremkalle nevropatier, og kan karakteriseres av fremgangsmåter som er kjent til de som har øvelse i faget. Ved "eksponering til et toksisk middel" menes at det toksiske middel blir gjort tilgjengelig for eller kommer i kontakt med et pattedyr. Eksponering til et toksisk middel kan forekomme ved direkte tilførsel, f.eks ved å svelge eller ved tilførsel av mat, et medisinsk eller terapeutisk middel,

15 f.eks et kjemoterapeutikum, ved uhellsforurensning eller ved eksponering fra omgivelsene, f.eks via luft eller vann.

Til tross for de meget varierende morfologier og årsaker som er knyttet til perifere neuropatier *in vivo* har søkerene som hypotese at forbindelse A kan være en effektiv måte å forhindre eller behandle slike nevropatier hos et pattedyr.

20

Tabell 1

Midler som fremkaller perifer nevropati

	Middel	Aktivitet	Middel	Aktivitet
25	acetazolamid	vanndrivende	imipramin	antidepressiv
	akrylamid	fnokket, fast-gjørende middel	indometacin	anti-inflammatorisk
	adriamycin	antineoplastisk	anorganisk bly	toksisk metall i maling
	etc.			
30	alkohol (etanol)	løsningsmiddel, rusmiddel	isoniazid	antituberkuløst middel
	almitrin	respiratorisk stimulant	litium	antidepressivt
	amiodaron	antiarytmisk	metylkvikksølv	industrielt avfall

35

	Middel	Aktivitet	Middel	Aktivitet
	amfotericin	antimikrobielt middel	metformin	antidiabetisk middel
5	arsenikk	ugressmiddel, insektsdreper	metylhydrazin	syntetisk intermedier
	aurotioglukose	antirevmatisk middel	metronidazol	antiprotozomiddel
	barbiturater	avslappende, krampemiddel	misonidazol	strålingssensitiserende middel
10	bukkehorn	toksisk bær	nitrofurantoin	urinveis antiseptisk middel
	karbamater	insektsdrepende middel	sennepsgass	antineoplastisk, nervegass
15	karbondisulfid (CS ₂)	industrielt middel	nitrogenoksyd	anestetikum
	kloramfenikol	antibakteriell middel	organofosfater	insektsdrepende midler
	klorkin	antimalariamiddel	ospolot	krampemiddel
20	kolestyramin	antihyperlipo-proteinmiddel	penicillin	antibakteriell middel
	cisplatin	antineoplastisk middel	perheksilin	antiarytmisk middel
	cliokinol	amøbedepende middel, antibakteriell	perhexilinmaleat	antiarytmisk
25	colestipol	antihyperlipo-proteinmiddel	fenytoin	antikrampemiddel
	colchicin	giktmiddel	platina	medikamentkomponent
	colistin	antimikrobiell	primidon	krampemiddel
30	cykloserin	antibakteriell middel	procarbazin	antineoplastisk middel
	cytarabin	antineoplastisk middel	pyridoksin	vitamin B ₆
35	dapson	dermatologisk middel deriblant mot lepra	natriumcyanat	sigdcelleanemi-middel
	dideoksytydin	antineoplastisk	streptomycin	antimikrobiell middel

	Middel	Aktivitet	Middel	Aktivitet
	dideoksyinosin	antineoplastisk	sulfonamider	antimikrobielt middel
	dideoksytymidin	antiviralt middel	suramin	antineoplastisk middel
	disulfiram	antialkoholmiddel	tamoksifen	antineoplastisk middel
5	doksorubicin	antineoplastisk	taxol	antineoplastisk middel
	etambutol	antibakterielt middel	thalidomid	middel mot spedalskhet
	etionamid	antibakterielt	thallium	rottegift
	glutetimid	beroligende, sovemiddel	triamteren	vanndrivende middel
10	gull	antirevmatisk middel	trimetyltin	toksisk metall
	heksakarboner	løsningsmidler	L-tryptofan	tilsetning til helsekost
	hormonelle			
15	prevensjonsmidler		vincristin	antineoplastisk middel
	heksametylol- melamin	middel mot krøller, brann	vinblastin	antineoplastisk middel
	hydralazin	blodtrykksmiddel	vindesin	antineoplastisk middel
20	hydroksyklorkin	antirevmatisk middel	vitamin A	megadoser
			vitamin D	megadoser

Forbindelse A har også blitt vist å hemme produksjon av cytokinet TNF- α , til
25 tross for at forbindelsen har liten eller ingen inhibitorisk virkning på PKC.

Forbindelse A hemmer også produksjon av cytokinet IL-1 β . Produksjonen av
TNF- α er knyttet til en rekke sykdommer og tilstander slik at inhibisjon av denne
faktor ved bruk av forbindelse A kan gi god effekt på et individ som har behov for
slik hemning av produksjon av TNF- α .

30 Således kan forbindelse A også bli benyttet for å hemme produksjonen av
TNF- α hos et pattedyr og/eller en fremgangsmåte for å behandle eller lindre
inflammatoriske tilstander eller sykdom, deriblant, men ikke begrenset til septisk
sjukk, leddgikt, slitasjegikt, astma, bronkitt, kronisk obstruktiv lungesykdom,
psoriasis, allergisk rhinitt, dermatitt og inflammatorisk tarmsykdom, og andre auto-

immunsykdommer, der fremgangsmåten omfatter tilførsel til det nevnte formål av en terapeutisk effektiv mengde av forbindelse A.

Til bruk i den foreliggende oppfinnelse kan forbindelse A bli formulert i en farmasøytisk blanding ved tilblending med farmasøytisk akseptable ikke-toksiske bindemidler og bærere. Slik blanding kan fremstilles for tilførsel via en rekke ulike veier. Tilførselsvei og foretrukket doseformer inkluderer de følgende: Parenteralt, fortrinnsvis i form av flytende løsninger eller suspensjoner, oralt, fortrinnsvis i form av tabletter eller kapsler, intranasalt, fortrinnsvis spesielt i form av pulvere, nese-dråper eller aerosoler, og dermalt, via f.eks transdermale plastre.

Forbindelse A kan passende bli tilført i enhetsdoseform og kan fremstilles ved en rekke av fremgangsmåtene som er vel kjent i det farmasøytisk fag, f.eks som beskrevet i Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., Easton, PA, 1980). Formuleringer for parenteral tilførsel kan som felles bindemidler inneholde sterilt vann eller saltvann, polyalkylenglykoler slik som polyetylenglykol, oljer med vegetabilsk opprinnelse, hydrogenerte naftalener og lignende. Spesielt kan biokompatible, biodegraderbare laktidpolymerer, laktid/glykolidkopolymerer, eller polyoksyetylen-polyoksypropylenkopolymerer være hensiktsmessige bindemidler for å kontrollere frisettingen av de aktive forbindelser. Andre potensielt brukbare parenterale leveringssystemer for forbindelse A inkluderer etylen-vinylacetat kopolymerpartikler, osmotiske pumper, implanterbare infusjonssystemer, og liposomer. Inhalasjonstilførselformuleringer inneholder som bindemiddel f.eks laktose, eller de kan være vandige løsninger som inneholder f.eks laktose, eller kan være vandige løsninger som inneholder f.eks polyoksyetylen-9-lauryleter, glykokolat og deoksykolat, eller oljeløsninger som skal tilføres i form av nese-dråper eller som gele som skal tilføres intranasalt. Formuleringer for tilførsel parenteralt kan også inkludere glykokolat for tilførsel via kinnslimhinne, et salicylat med henblikk på endetarmstilførsel, eller sitronsyre for tilførsel via skjeden. Formuleringer benyttet i transdermale plastre er fortrinnsvis lipofile emulsjoner.

Forbindelse A kan benyttes som den eneste aktive ingrediens i en farmasøytisk blanding. Alternativt kan den benyttes i kombinasjon med andre aktive ingredienser, f.eks vekstfaktorer som fasiliterer nevronal overlevelse eller regenerasjon av nervefibre i sykdommer eller sykkelige tilstander.

Konsentrasjonen av forbindelse A som benyttes i denne oppfinnelses praktiske utførelse i en terapeutisk blanding kan variere. Konsentrasjonen vil avhenge av faktorer slik som den totale medikamentdose som skal tilføres og tilførselsveien. Forbindelse A vil typisk bli levert i en vandig fysiologisk bufferløsning som inneholder omtrent 0,1 til 10 % v/v med henblikk på parenteral tilførsel.

Typiske doseområder er omtrent 1 µg/kg til omtrent 1 g/kg kroppsvekt pr dag. Et foretrukket doseområde er fra omtrent 0,01 mg/kg til 100 mg/kg kroppsvekt pr dag. En foretrukket dose av forbindelse A som skal tilføres vil vanligvis avhenge av variabler slik som type sykdom og grad av progresjon av sykdommen eller tilstanden, den generelle helsetilstand hos den spesifikke pasient, den relative effektivitet som forbindelse A har i den spesielle sykdom eller sykdomstilstand som blir behandlet, den spesielle formulering som blir benyttet og tilførselsveien.

Forbindelse A til bruk i den foreliggende oppfinnelse er fortrinnsvis fremskaffet ved å bruke metodene som er beskrevet i Lewis et al., US patent nr. 5.461.146.

Den foreliggende oppfinnelse vil bli videre illustrert ved hjelp av de følgende eksempler.

Eksempel 1

Farmakologisk aktivitet på dopaminerge nevroner

Eksperimenter ble utført ved å benytte forbindelse A i MPTP-skadede dopaminerge nevroner hos mus (MPTP musemodell). En enkel s.c. dose MPTP (20 mg/kg) gitt til C57 svarte mus ga omtrent 60% tap av tyrosinhydroksylaseaktivitet i striatum. Tilførsel av forbindelse A, i daglig doser som varierte fra 0,01 til 10 mg/kg (s.c.), til slike MPTP-behandlede mus reduserte tapet av striatum tyrosinhydroksylaseaktivitet. Disse resultater blir vist i tabell 2.

Tabell 2

Tyrosinhydroksylase (TH) aktivitet i striatum hos mus behandlet med lav dose MPTP ^a

5	<u>Behandling</u>	Striatum TH	% av ubehandlet
		aktivitet ($\pm$ SEM)	kontroll
	Ubehandlet	19,06 $\pm$ 1,06	100 $\pm$ 5,6
	MPTP-behandlet	7,40 $\pm$ 1,07	39 $\pm$ 5,6
	MPTP-behandlet (bærer)	6,99 $\pm$ 0,75	37 $\pm$ 4,0
	MPTP-behandlet + forb. A		
10	(0,01 mg/kg)	7,76 $\pm$ 1,23*	41 $\pm$ 5,3
	(0,03 mg/kg)	10,48 $\pm$ 0,92*	55 $\pm$ 3,9
	(0,10 mg/kg)	11,51 $\pm$ 0,80*	60 $\pm$ 6,5*
	(0,30 mg/kg)	11,89 $\pm$ 1,34*?	62 $\pm$ 5,0*
	(1,0 mg/kg)	10,39 $\pm$ 1,39*	54 $\pm$ 7,0*
15	(3,0 mg/kg)	9,66 $\pm$ 1,0	51 $\pm$ 5,8
	(10,0 mg/kg)	9,77 $\pm$ 0,70	51 $\pm$ 3,7

^a Gjennomsnitt av tre doseavhengighets eksperimenter

20 Mus ble behandlet med MPTP (20 mg/kg; s.c.) 4-6 timer etter den første injeksjon av forbindelse A. Forbindelse A ble deretter injisert hver dag til slutten på eksperimentet, som varte i 7 dager. Striatum ble analysert med henblikk på aktivitet av tyrosinhydroksylase. Stjerne viser statistisk signifikante forskjeller ($p < 0,05$) sammenlignet med MPTP-bærer mediumbehandlede dyr.

25 I et separat eksperiment ble aktivitetene til forbindelse A analysert i en musemodell som brukte høy dose MPTP. En enkel 40 mg/kg injeksjon av MPTP ga en 95% nedgang i striatal tyrosinhydroksylase-aktivitet etter 7 dager. Tilførsel av forbindelse A i daglige doser på mellom 0,03 og 3,0 mg/kg reduserte størrelsen på denne lesjon, på en doseavhengig måte. Disse resultater blir vist i tabell 3.

Tabell 3

Tyrosinhydroksylase (TH) aktivitet i striatum fra høydose MPTP- behandlede mus^a

	Striatal TH aktivitet ($\pm$ SEM)	% av ubehandlet kontroll
5 <u>Behandling</u>		
Ubehandlet	23,1 $\pm$ 1,6	100 $\pm$ 7,0
MPTP-behandlet (bæremiddel)	1,6 $\pm$ 0,6	7 $\pm$ 3,0
MPTP-behandlet + forb. A		
(0,03 mg/kg)	1,8 $\pm$ 0,6	8 $\pm$ 2,5
10 (0,03 mg/kg)	2,7 $\pm$ 0,6	12 $\pm$ 2,5
(3,0 mg/kg)	5,3 $\pm$ 1,8 [*]	23 $\pm$ 8,0 [*]

^a Data er fra et enkelt eksperiment

15 Mus ble behandlet med MPTP (40 mg/kg; s.c.) 4-6 timer etter den første injeksjon av forbindelse A. Forbindelse A ble deretter injisert hver dag til slutten på eksperimentet, som varte i 7 dager. Striatum ble analysert med henblikk på aktivitet av tyrosinhydroksylase. Stjerne viser statistisk signifikante forskjeller ($p < 0,05$) sammenlignet med MPTP-bærer mediumbehandlede dyr.

20 MPTP-mediert dopaminerg toksisitet er avhengig av MAO, som medierer omdannelse av MPTP til MPP⁺ (1-metyl-4-fenylpyridiumion) og opptak av MPP⁺ inn i dopaminerge nerveceller. Forbindelser som har vist seg å være aktive i MPTP-musemodellen bør analyseres med henblikk på å være inhibitorer på MAO eller dopaminopptak. Forbindelse A har blitt funnet å ikke hemme monoaminoksydase
25 A eller B *in vitro* (fig. 1 og 2) eller å blokkere opptak av katekolaminer inn i nerve-ender, noe som indikerer at denne forbindelse ikke hemmer den metabolske overføring av MPTP til MPP⁺ eller hemmer det aktive opptak av MPP⁺ inn i dopaminerge nevroner.

Disse resultater viser effektiviteten som forbindelse A har i den MPTP-muse
30 dopaminerge lesjonsmodellen, noe som antyder at forbindelse A kan benyttes i behandling av nevrodegenerative sykdommer slik som Parkinsons sykdom.

Eksempel 2

Farmakologisk aktivitet på GABA-erge nevroner

Forbindelse ble testet med henblikk på dets evne i å hemme tap (dvs øke
 5 overlevelsen) av GABA-erge nevroner i nukleus basalis magnocellularis, ved bruk
 av den veletablerte ibotensyre lesjonsmodellen. Ibotensyre er et eksitotoksin som
 man vet reduserer antall GABA-erge nevroner i nbm-regionen (Lindfors et al.,
 Neurosci. Lett. 135:262-264, 1992; Shaugnessy et al., Brain Res. 637:15-26,
 1994).

10 Voksne Sprague-Dawley hannrotter mottok injeksjoner av ibotensyre (5,0 g)
 inn i nbm på den ene siden. Rottene fikk deretter tilført doser med forbindelse A
 (0,03 mg/kg) via subkutan injeksjon som begynte 18 timer etter lesjonen, og
 fortsatte til 18 dager etter lesjonen. Vevssnitt ble gjennom hele den rostrokaudale
 utstrekning av nbm ble deretter samlet og behandlet for å påvise glutaminsyre
 15 dekarboksylase, et enzym som er nødvendig for syntese av GABA. Antall
 nevroner som uttrykket glutaminsyre dekarboksylase ble deretter tallet i hele den
 rostrokaudale utstrekning av nukleus basalis magnocellularis i et område der
 glutaminsyre dekarboksylaseuttrykkende nevroner i nbm lett skilles fra
 glutaminsyre dekarboksylase uttrykkende nevroner i nabostrukturer (hvit substans
 20 mediale og ventralt for globus pallidus). Resultatene ble uttrykket som prosent
 glutaminsyre dekarboksylase-uttrykkende nevroner på den skadede side
 sammenlignet med antallet på den motsatt ubehandlede side. Resultatene ble
 også kalkulert separat i den rostrale nbm, midtnivå nbm og kaudale nbm.

Gjennomsnitt på 78 (± 16 s.e.m.) prosent glutaminsyre dekarboksylase
 25 nevroner ble tallet i den rostrale nbm hos dyrene som mottok forbindelse A,
 sammenlignet med 34 (± 19 s.e.m.) prosent i dyrene som bare mottok
 bæremiddel, noe som er en statistisk signifikant forskjell målt med t test ($p < 0,05$).
 Ingen statistisk signifikant forskjell mellom dyr behandlet med forbindelse A og
 behandlet med bare bæremiddel (kontroll) ble sett i midt-nbm eller den kaudale
 30 nbm.

Disse resultater viser at forbindelse A kan beskytte mot et tap av GABA-
 erge nevroner som forårsakes av en eksitotoksinlesjon, og således har en
 nevrotropisk virkning på denne nevronele populasjon.

Eksempel 3

Farmakologisk aktivitet på nbm-nevroner

For direkte å undersøke evnen som forbindelse A har i å forhindre eksitotoksisk nervecelledød ble nbm nerveceller i voksne Sprague-Dawley hannrotter først merket med en langvarig markør. Dette ble gjort ved å injisere fluor-gull (FG), en nevronal markør som blir tatt opp av nerveterminaler og transportert tilbake til cellelegemet (Book et al., J. Neuropath. Exp. Neurology, 53:95-102, 1994), inn i målområder som blir nådd av nbm-nevroner i den frontale og parietale hjernebark. 7-10 dager etterpå fikk dyrene ensidig lesjon av nbm ved å bruke 5 µg ibotensyre. Fra og med 18 timer etter denne lesjon mottok dyrene forbindelse A (0,03 mg/kg) via subkutan injeksjon hver annen dag til 18 dager etter lesjonen. Snitt av vevet ble samlet i hele den rostrokaudale utstrekning av nbm på begge sider av hjernen, og antall nbm nerveceller med FG-merkingen ble tallet. Tellingene ble korrigert med henblikk på størrelsesforskjeller ved å bruke standard prosedyrer, og resultatene ble uttrykket som prosent av merkede nevroner i nbm på den skadede side av hvert dyr, sammenlignet med antall merkede nevroner i nbm på den motsatte uskadede side av hjernen.

Dyr som mottok forbindelse A hadde signifikant flere FG-merkede nerveceller i den rostrale del av den skadede nbm (mer enn 400 µm fra midtpunktet av lesjonen) sammenlignet med skadede dyr som bare mottok bæremiddel (fig. 3). På midtnivå og kaudalt for lesjonen hadde forbindelse A en mindre utpreget virkning.

Disse resultater demonstrerer direkte at forbindelse A kan forhindre tap av på forhånd merkede nerveceller i nbm, fremkalt av eksitotoksisk skade.

25

Eksempel 4

Langvarig funksjonell forbedring etter kort tids behandling med forbindelse A

Voksne Spargue-Dawley hannrotter ble først trenet i å alternere responser i en standard belønnet-alternerings T-labyrintoppgave (Hepler et al., J. Neurosci., 5:866-873, 1985). Dyrene fikk deretter lesjoner av nukleus basalis magnocellularis på begge sider for å svekke resultatene i T-labyrint oppgaver, (f.eks Salamone et al., Behav. Brain Res., 13:63-70, 1984). 18 timer etter lesjonen mottok dyrene forbindelse A via subkutan injeksjon (0,1 mg/kg) hver

30

annen dag i 12 dager etter lesjonen. 24 timer etter den siste injeksjon ble alle dyrene plassert i T-labyrinten en gang daglig til deres alterneringsrespons hadde nådd de preoperative nivåer, noe som tok mellom 3 og 10 dager. Etter å ha nådd dette nivå ble dyrene ikke testet videre de neste 8-10 uker. På dette tidspunkt ble

5 dyrene igjen plassert i T-labyrinten en gang om dagen til de nådde den preoperative respons. De totale antall feil som dyrene utførte under denne test vises i fig. 4. De skadede dyrene som bare mottok bæremiddel viste signifikant flere feil enn enten de uopererte normale eller på liksomopererte dyr, mens de skadede dyrene som mottok forbindelse A 10-12 uker tidligere viste samme

10 resultater som normale.

Disse resultater viser at forbindelse A gir en kronisk forbedring i en adferd som reflekterer en forbedring i oppmerksomhet eller hukommelse flere måneder etter at tilførsel av medikament har stoppet.

15 Eksempel 5

Effektivitet til forbindelse A i en entorhinal hjernebark lesjonsmodell.

Glutaminneholdende nevroner i lag 2 i den entorhinale hjernebark sender sine fibre til det molekylære lag i gyrus dentatus, der de danner synapser på dendrittene til korncellene i gyrus dentatus. En lesjon i lag 2 i entorhinal bark kan

20 utføres stereotaktisk injeksjon av eksitotoksinet N-metyl-D-aspartat (NMDA). Rotter ble anestetisert med natriumfenemal og mottok en injeksjon av NMBA (15 nmol/lokalisasjon) 2 steder i entorhinalbarken. To uker senere ble rottene avlivet og perfundert med en 50 nM natriumsulfidløsning. Hjernene ble fjernet, snittet i det horisontale planet med en 40 µm tykkelse og farvet enten med Cresylfiolet eller med Timms farve. Nevronoverlevelse i lag 2 i entorhinalbarken ble undersøkt

25 i de Cresylfioletfarvede snitt, mens deres nervefiberender i molekylærlaget i gyrus dentatus ble målt i annet hvert snitt farvet med Timms farve.

Injeksjon av NMDA ødela $62 \pm 11\%$ (s.e.m.) i entorhinal lag 2, og senket arealet i det midtre molekylære lag i gyrus dentatus med $19 \pm 6\%$ (s.e.m.). Daglig

30 behandling med forbindelse A (1 mg/kg s.c.), der den første injeksjon ble gitt umiddelbart etter injeksjon av NMDA reduserte tap av nerveceller i entorhinal lag 2 til $22 \pm 10\%$ (s.e.m.) ($p < 0,05$, "t"-test) og forhindrede svinn i det midtre molekyl-lags areal ($p < 0,05$, "t"-test). Således beskyttet forbindelse A nerveceller i den

entorhinale bark fra en eksitotoksisk skade og vedlikeholdt deres nervefiberender i gyrus dentatus.

Disse resultater demonstrerer effektiviteten som forbindelse A har i å beskytte glutamaterge nevroner i den entorhinale hjernebark. Lesjoner av entorhinal hjernebark i dyremodeller har blitt vist å fremkalle hukommelsessvikt og alvorlig degenerasjon av disse nerveceller forekommer i Alzheimers sykdom. Dette støtter påstanden om at forbindelse A er hensiktsmessig for å behandle neurologisk sykdommer som inkluderer tap av eller skade av glutamaterge nevroner og nevroner i hjernebarken, deriblant, men ikke begrenset til Alzheimers sykdom, hjerneslag og hjernehodeskade.

Eksempel 6

Effekt av forbindelse A på akrylamid-indusert perifer nevropati

Akrylamid fører til en "bakdøds" sentral-perifere distal nevropati hos mennesker og dyr. Lesjonen er en blandet sensorisk/motorisk nevropati som karakteriseres av svakhet, skjelving og ataksi hos mennesker. Hos dyr gir akrylamid endringer i adferd (sensorisk, motorisk og egne reflekser), histopatologi, elektrofysiologi og vekttap. I det perifere nervesystem er Ab lange nervefibre med stor diameter fortrinnsvis affisert av akrylamid. Hos rotter gir akrylamidtilførsel en aksonopati som kan måles ved øket spredning av fot ved landing (LFS), som er et mål på egenreflekser.

Akrylamidindusert nevropati er en modell på kjemisk indusert toksisitet. Den skiller seg fra andre kjemisk induserte modeller (slik som kjemoterapeutiske modeller) ved at varigheten er relativt kort (3 uker) og dyrene er ved relativ god almentilstand. Akrylamid fører ikke til alvorlig systemisk toksisitet.

Sprague-Dawley hannrotter med 250 gr kroppsvekt i begynnelsen på eksperimentet ble benyttet. Akrylamid (50 mg/kg IP) ble tilført tre ganger pr uke i tre uker. Dyrene ble sluppet ned fra 30 cm høyde og distansen mellom bakbena ble målt (Edwards, P.M. og Parker, V.H. (1977) "A simple, sensitive, and objective method for early assessment of acrylamide neuropathy in rats" Toxicol Appl Pharmacol, 40:589-591). Forbindelse A (0,01, 0,3 eller 1,0 mg/kg, s.c. i 5% solutol) ble tilført en gang om dagen under hele eksperimentets varighet.

Akrylamidbehandlede dyr hadde større distanser i LFS-testen enn de dyr som var behandlet med bæremiddel. Forbindelse A (0,3 mg/kg/dag) reduserte størrelsen av denne økning i LFS som var produsert av akrylamid (fig. 5).

Disse data indikerer at forbindelse A er hensiktsmessig for behandling av
5 perifere nevropatier.

Eksempel 7

Manglende inhibisjon av proteinkinase A, fremkalt av forbindelse A, *in vitro*

Analysen av proteinkinase C og hemning av proteinkinase C med K-252a
10 blir beskrevet i US patent 4.923.986 og Kase, H. Et al., (eds.) Japan Scientific
Societies Press, Tokyo, pp 293-296, (1988). Ved å bruke et i hovedsak identisk
analysesystem ble det funnet at K-252a hemmer proteinkinase C med IC₅₀ på
0,028 µM mens IC₅₀ til forbindelse A er 16,0 µM, dvs 570 ganger mindre aktivt.
Forbindelse A har en IC₅₀ på 139 nM som hemmer av produksjonen av TNF-α, og
15 en IC₅₀-verdi på 261 nM som en hemmer av produksjonen av IL-1β,
konsentrasjoner der forbindelse A ikke har evne til å hemme proteinkinase C.

Eksempel 8

In vitro hemning av TNF-α og IL-1β produksjon av forbindelse A

20 Evnen som forbindelse A har i å hemme induksjon av TNF-α ble
demonstrert ved å bruke en standard *in vitro* farmakologisk testfremgangsmåte
som beskrevet under.

Stamløsninger som inneholdt 4 mM forbindelse A i 100% DMSO ble lagret
ved 4°C. Celledyrkingsmedium RPMI 1640 (Media Tech, Herndon, Va) og føtalt
25 bovint serum (Hyclone, Logan, UT) omfattet testmediet. Lipopolysakkarid (LPS)
(Sigma, St. Louis, MO) fra *E.coli* serotype 0111:B4, ekstrahert med trikloreddik-
syre, ble benyttet. Stammløsning av LPS ble fremstilt og lagret ved 4°C i fosfat-
bufret saltvann (PBS). ELISA-reagenssett for å måle tumornekrosefaktor alfa
(TNF-α) og IL-1β ble kjøpt fra Boehringer-Mannheim, (Indianapolis, IN) og ble
30 benyttet ifølge produsentens instruksjoner. THP-1 celler, en human monocytt-
avledet cellelinje, ble fremskaffet fra American Type Culture Collection (ATCC TIB
202). Celler ble dyrket i RPMI 1640 som inneholdt 10% føtalt bovint serum
(medium) i en fuktig atmosfære med 5% CO₂:95% luft ved 37°C. Eksperimentene

ble utført i 24 brønns dyrkningsplater (Nune) med 5×10^5 THP-1 celler i 1 ml medium. Celler ble inkubert med LPS i en mengde på 2 $\mu\text{g/ml}$ for å inducere TNF- α . Etter en 3 timers inkubering ble cellene og mediet sentrifugert ved 1000 ganger i 5 minutter, og den resulterende supernatantvæske ble enten analysert

5 umiddelbart med henblikk på TNF- α eller lagret ved -70°C og analysert senere. Mediaprøvene ble målt med henblikk på innhold av TNF- α og IL-1 β ved hjelp av ELISA-analyser.

For å vurdere forbindelse A med henblikk på evne til å hemme induksjon av TNF- α ble celler inkubert med ulike konsentrasjoner av forbindelse A i 1 time før

10 tilsetning av LPS. Forbindelsene ble fortynnet slik at DMSO aldri var tilstede i celledyrkningsmediet med en konsentrasjon over 0,1%. Forbindelse A ble analysert som analysert som beskrevet overfor dets evne til å hemme TNF- α og IL-1 β produksjon.

15 Eksempel 9

Inhibisjon av LPS-indusert TNF- α og IL-1 β i museserum

Seksti C57BL hunnmus (4-6 uker gamle) ble delt i 6 grupper, hver med 10 dyr. Tre grupper (1, 3, 5) mottok bæremiddel (PBS som inneholdt 0,1% TEA (tetraetylammoniumhydroklorid)), 200 $\mu\text{l/mus}$ via intraperitoneal (ip) tilførsel. De

20 andre tre gruppene (2, 4, 6) mottok forbindelse A (30 mg/kg i 200 μl , ip) i bæremiddel (PBS med 10% av etylesteren til 12-hydroksystearinsyre, solutol). To timer senere mottok dyrene via ip tilførsel enten 0,1 mg/kg LPS (gruppene 1 & 2), 0,5 mg/kg LPS (gruppene 3 & 4) og 1,0 mg/kg LPS (gruppene 5 & 6). To timer etter tilførsel etter LPS ble alle dyrene avlivet, og plasmaprøver ble samlet og

25 analysert med henblikk på deres TNF- α og IL-1 β innhold. Analyser ble utført som beskrevet i eksempel 8.

Resultatene ble summert i tabell 4. Antall i () er gruppetallet som er beskrevet over. N viser antall dyr der plasmamålinger ble gjort. ND = ikke gjort.

Tabell 4

	LPS-dose mg/mus, ip	TNF- α (pg/ml)		IL-1 β (pg/ml)	
		Bæremiddel	Forb. A	Bæremiddel	Forb. A
5	0,1	(1) 6129 $\pm$ 676 N=10	(2) 2714 $\pm$ 449 [*] N=10	ND	ND
	0,5	(3) 7141 $\pm$ 1113 N=9	(4) 3766 $\pm$ 375 [*] N=7	ND	ND
10	1,0	(5) 3745 $\pm$ 610 N=8	(6) 2399 $\pm$ 1399 N=9	(5) 300 $\pm$ 87 N=8	(6) 59 $\pm$ 19 [*] N=8

15 ^{*} Indikerer statistisk signifikant forskjell fra kontroller behandlet med bæremiddel (p < 0,05).

Som vist i tabell 4 førte LPS-tilførsel til musene at disse musene produserte TNF- α og mengden av TNF- α som ble produsert ble hemmet i betydelig grad av en 2 timers forbehandling med forbindelse A. Forbehandling med forbindelse A førte også til markert hemning av produksjon av IL-1 β som var produsert i respons til tilførsel av 1,0 mg/LPS.

Eksempel 10

25 Forhindring av LPS-indusert død hos mus

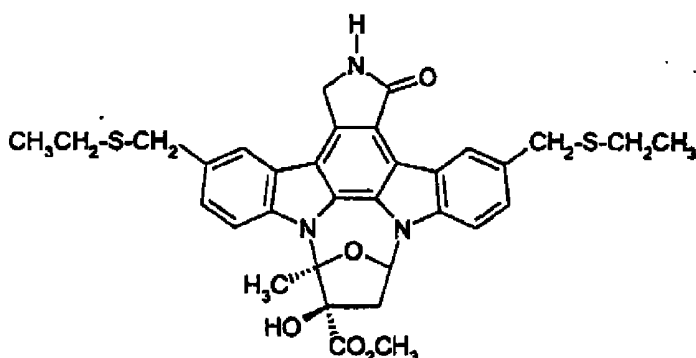
Førti mus ble delt i tre grupper, der to grupper bestod av 10 mus og en gruppe bestod av tyve mus. Tilførsel av bæremiddelet, LPS, og forbindelse A ble gjort intraperitonealt. Gruppe 1 (n=10) mottok bæremiddel (fosfatbufret saltvann for LPS, 200 μ l/mus) ved tidspunkt 0 og bæremiddel istedenfor forbindelse A (200 μ l/mus) 2 timer senere. Gruppe 2 (n=10) mus mottok bæremiddelet istedenfor forbindelse A ved tidspunkt null (200 μ l/mus) og LPS (2 mg i 200 μ l/mus) to timer senere. Gruppe 3 (n=20) mottok forbindelse A (30 mg/kg i 200 μ l bæremiddel) ved tidspunkt null og LPS (2 mg i 200 μ l/mus) to timer senere.

Tilførsel av LPS førte til 90% mortalitet innen 20 timer og 100% mortalitet 42 timer etter tilførsel. I gruppen av dyr som mottok forbindelse A to timer før de fikk LPS var mortaliteten 25% 20 timer etter LPS-tilførsel, 75% mortalitet 42 timer etter LPS, og 80% mortalitet en uke etter LPS-tilførsel. Behandling med

5 bæremiddel ble tolerert bra og førte ikke til noen død.

PATENTKRAV

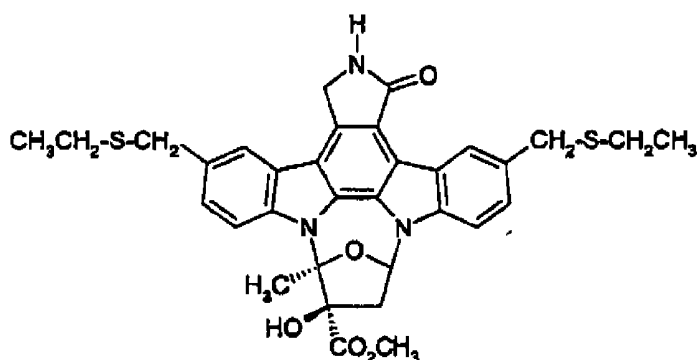
1. Anvendelse av en terapeutisk effektiv mengde av forbindelse A:



5

for fremstilling av en farmasøytisk blanding for behandling eller lindring av en betennelsestilstand valgt fra septisk sjokk, reumatoid artritt, osteoartritt, astma, bronkitt, kronisk obstruktiv luftveissykdom, psoriasis, allergisk rinitt, dermatitt og inflammatorisk tarmsykdom, ved å inhibere overproduksjon av tumornekrosefaktor alfa i et pattedyr i behov derav.

2. Anvendelse av en terapeutisk effektiv mengde av forbindelse A:



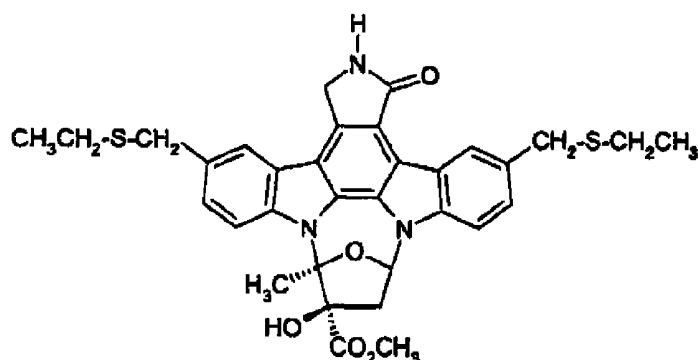
15

for fremstilling av en farmasøytisk blanding for lindring av de skadelige virkningene av overproduksjon av tumornekrosefaktor alfa i et pattedyr i behov derav, hvor nevnte virkninger er valgt fra gruppen bestående av autoimmun sykdom, septisk

sjukk, reumatoid artritt, osteoartritt, astma, bronkitt, kronisk obstruktiv luftveissykdom, psoriasis, allergisk rinitt, dermatitt og inflammatorisk tarmsykdom.

3. Anvendelse av en terapeutisk effektiv mengde av forbindelse A:

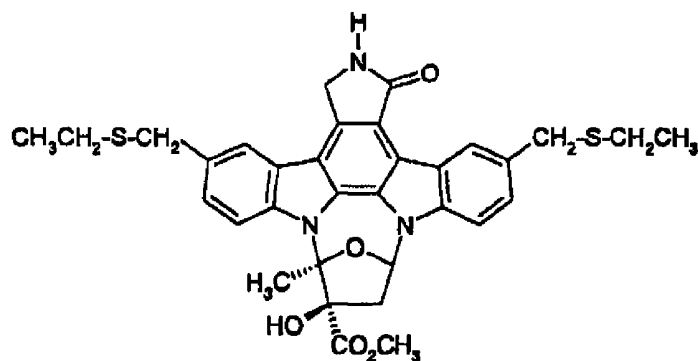
5



for fremstilling av en farmasøytisk blanding for behandling eller lindring av en betennelsestilstand valgt fra septisk sjukk, reumatoid artritt, osteoartritt, astma, bronkitt, kronisk obstruktiv luftveissykdom, psoriasis, allergisk rinitt, dermatitt og inflammatorisk tarmsykdom, ved inhibering av overproduksjon av interleukin-1 beta i et pattedyr i behov derav.

4. Anvendelse av en terapeutisk effektiv mengde av forbindelse A:

15



for fremstilling av en farmasøytisk blanding for lindring av de skadelige virkningene av overproduksjon av interleukin-1 beta i et pattedyr i behov derav, hvor nevnte virkninger er valgt fra gruppen bestående av septisk sjukk, reumatoid artritt,

20

osteoartritt, astma, bronkitt, kronisk obstruktiv luftveissykdom, psoriasis, allergisk rinitt, dermatitt og inflammatorisk tarmsykdom.

5. Anvendelse ifølge krav 2, der nevnte skadelige virkninger blir utvalgt fra
5 gruppen som omfatter septisk sjokk, reumatoid artritt, osteoartritt, astma, bronkitt, kronisk obstruktiv lungesykdom, psoriasis, allergisk rinitt, dermatitt og inflammatorisk tarmsykdom.

6. Anvendelse ifølge krav 2, der nevnte skadelige virkninger er en autoimmun
10 sykdom.

1/4

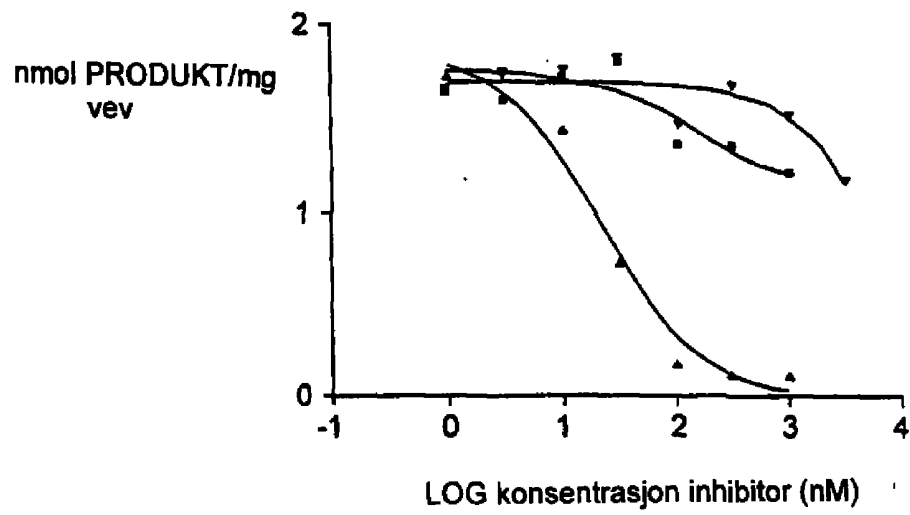


FIG. 1

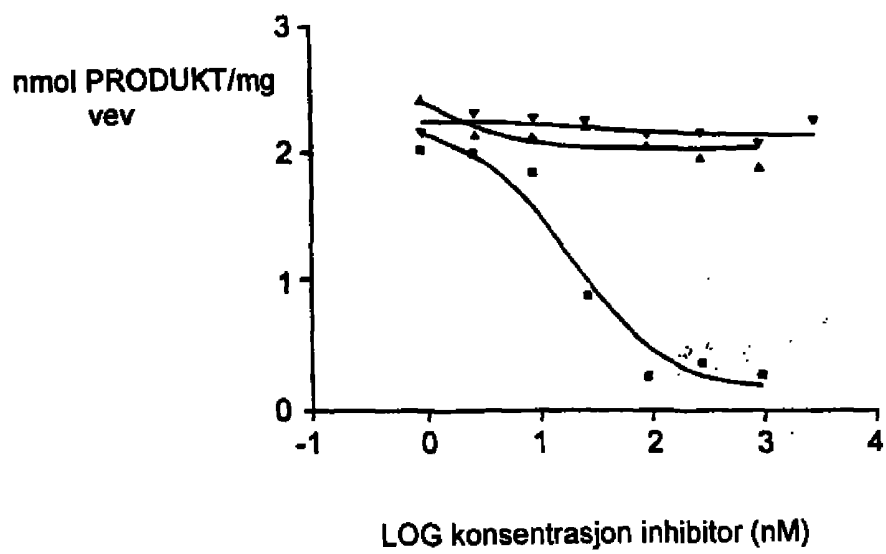


FIG. 2

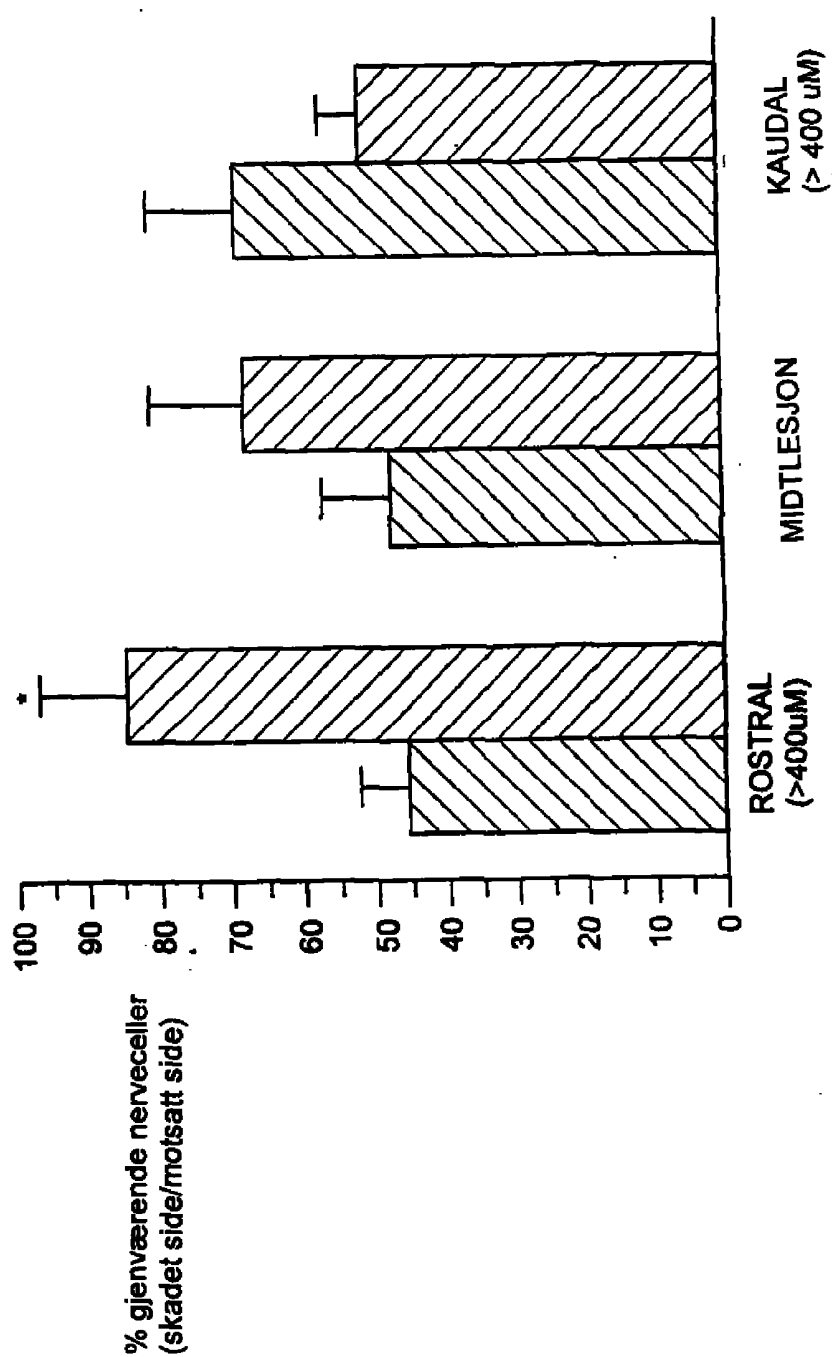


FIG. 3

3/4

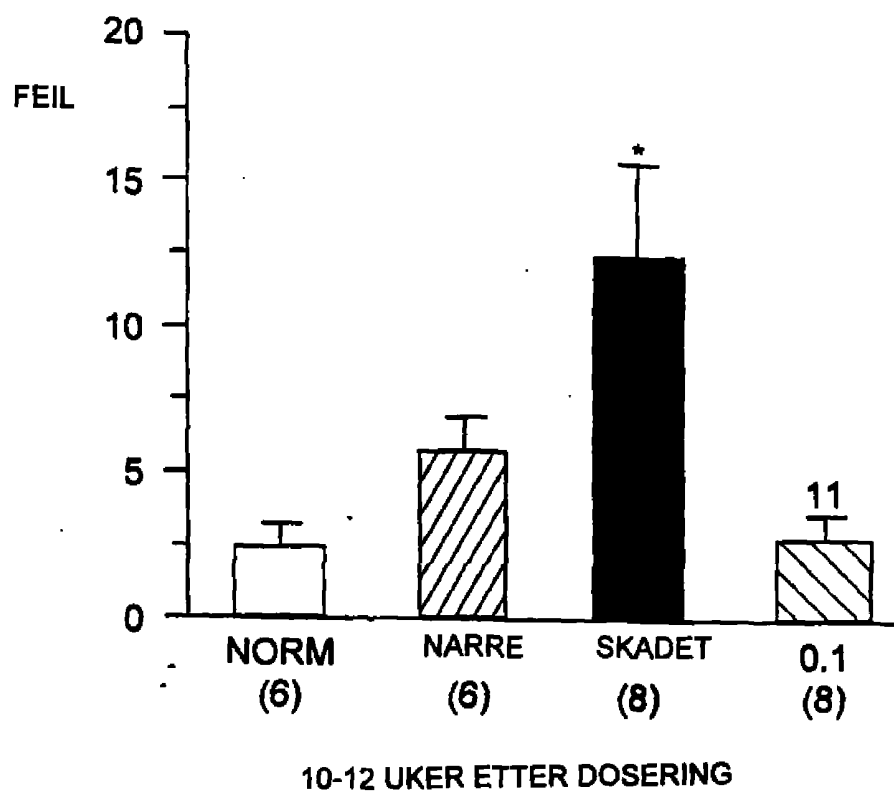
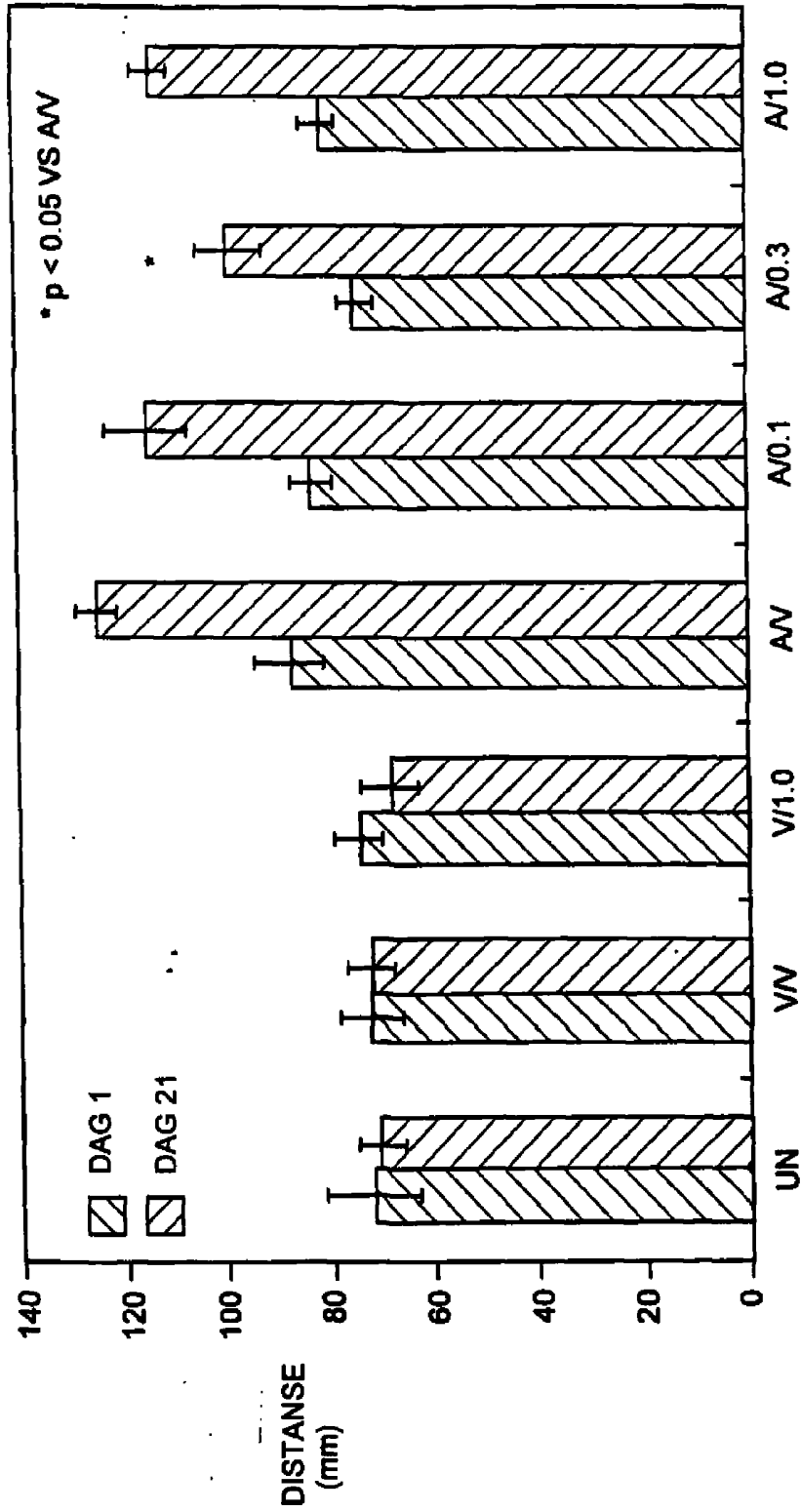


FIG. 4

EFFEKT AV FORBINDELSE PÅ AKRYLAMID-INDUSERT
PERIFER NEVROPATI – FOT-LANDE SPREDNING



UN = UBEHANDLET, V = BÆREMIDDEL, A = AKRYLAMID, DOSE FORBINDELSE A mg/kg

FIG. 5