P03 02732

29857

76.981/SZE

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

KIVONAT

ÉRPROLIFERÁCIÓT GÁTLÓ GYÓGYSZERÉSZETI KÉSZÍTMÉNYEK, ÉS ELJÁRÁS AZOK ALKALMAZÁSÁRA

A jelen találmány tárgyát egy olyan eljárás képezi, amely arra szolgál, hogy egy arra rászoruló betegben az érproliferációt kezeljük. Ezen eljárás során az említett beteget egy olyan vegyületnek a terápiásan hatékony mennyiségével kezeljük, amely vegyület az 1-es típusú szomatosztatin-receptor agonistája.

P03 02732

S. B. G. & K.
Szabadalmi Ügyvivői Iroda
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
Telefon: 461-1000, Fax: 461-1099

A2

29857

76.981/SZE

ÉRPROLIFERÁCIÓT GÁTLÓ GYÓGYSZERÉSZETI KÉSZÍTMÉNYEK, ÉS ELJÁRÁS AZOK ALKALMAZÁSÁRA

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

Az angiogenezis, azaz az új kapillárisok fejlődése a meglévő véredényekből, egy kritikus folyamat a szolid neoplazmák és számos, egyéb patologikus állapot –mint például a diabetikus retinopátia és a reumatoid arthritis– progressziója során [J. Folkman: Nature Medicine, 1: 27-31, (1995)]. Széleskörűen vizsgálták azokat a különféle stratégiákat, amelyekkel az érfejlődést befolyásolható; a megbízható *in vitro* modell-rendszereknek alapvető jelentőségük van az érképződéssel kapcsolatos kutatások, a specifikus inhibitorok vizsgálata során [R.K. Jain és mtsai.: Nature Medicine, 3: 1203-1208, (1997)].

Manapság széleskörűen elfogadott álláspont, hogy egy daganat azon képessége, hogy a gazdaszervezetből származó új véredények kialakulását indukálja, alapvető fontosságú a rák-növekedés és az áttétképződés szempontjából. A tumor-angiogenezis folyamatát a mikro-véredény–növekedés pozitív és negatív regulátorainak az egyensúlya határozza meg; az új véredények kialakulását három különböző, egymást követő lépésre bonthatjuk: 1) a bazális membrán sejtközvetítette, proteolitikus degradációja; 2) az endoteliális sejteknek az erekből történő kivándorlása a környező extracelluláris mátrixba, és az endoteliális sejtek proliferációja; 3) a sejteknek csőszerű szerkezetekbe történő rendeződése [J. Folkman: Nature Medicine, 1: 27-31, (1995)].

A szomatosztatinnak (azaz a szomatotropin-felszabadulást gátló faktornak, vagyis a SRIF-nek) egy 14 aminosavas (szomatosztatin-14) és egy 28 aminosavas (szomatosztatin-28) izoformája létezik [J. Wilson és D. Foster: „Williams Textbook of Endocrinology", 510. oldal, 7. kiadás, (1985)]. Ez a vegyület a növekedési hormon szekréciójának az inhibitora, és azt eredetileg a hipotalamuszból izolálták [Brazeau és mtsai.: Science, 179: 77, (1973)]. A natív szomatosztatin *in vivo* hatásideje nagyon rövid, mivel gyorsan inaktiválódik, endo- és exopeptidázok által. Számos újfajta analógot (mint például peptid- és nem-peptid-típusú vegyületet) fejlesztettek ki, azért hogy növeljék ezen hormon hatásidejét, biológiai aktivitását és szelektivitását (például egy meghatározott szomatosztatin-receptorra). A szomatosztatin ezen analógjait itt „szomatosztatin-agonistáknak" fogjuk nevezni.

Sokféle szomatosztatin-receptort (SSTR) izoláltak, ilyen például az SSTR-1, az SSTR-2, az SSTR-3, az SSTR-4 vagy az SSTR-5. Egy szomatosztatin-agonista tehát például egy SSTR--1- és/vagy egy SSTR-2- és/vagy egy SSTR-3- és/vagy egy SSTR-4- és/vagy egy SSTR-5-agonista lehet.

A szomatosztatin-analógok antiangiogén aktivitását néhány *in vitro* és *in vivo* kísérleti modell segítségével már korábban kimutatták [R. Danesi és mtsai.: Clinical Cancer Research, 3: 265-272, (1997); E.A. Woltering és mtsai.: Investigational New Drug, 15: 77-86, (1997)]. Ezenkívül, a hosszú távú oktreotid-kezelés cukorbetegekben képes csökkenteni a súlyos proliferatív retinopátiával kapcsolatos neovaszkularizáció progresszióját [Mallet és mtsai., (1992)].

Ha meg tudnánk határozni, hogy mely szomatosztatin-altípus(ok) felelős(ek) a szomatosztatin antiangiogén tulajdonságá-

ért, akkor lehetővé válna a leghatékonyabb, és ugyanakkor a legkevesebb mellékhatással rendelkező, terápiásan alkalmazható készítmények kifejlesztése. Azonban az ezen a területen elvégzett korábbi vizsgálatok ellentmondásos és/vagy nem meggyőző eredményeket szolgáltattak arra vonatkozóan, hogy az öt szomatosztatin-receptor altípus közül az egyes altípusok milyen szerepet játszanak a szomatosztatin antiangiogén aktivitásában.

A jelen találmány tárgyát olyan készítmények képezik, amelyek tartalmaznak egy olyan vegyületet, amely az 1-es típusú szomatosztatin-receptor agonistája, ahol az említett készítmények alkalmasak arra, hogy egy betegben meggátolják az érproliferációt. A jelen találmány tárgyát képezi továbbá egy olyan eljárás, amely arra szolgál, hogy egy arra rászoruló betegben (például egy emlősben, mint például emberben) az érproliferációt (mint például az angiogenezist vagy a resztenózist) kezeljük. Ezen eljárás során az említett beteget egy olyan vegyületnek a terápiásan hatékony mennyiségével kezeljük, amely vegyület az 1-es típusú szomatosztatin-receptor (SSTR-1) agonistája (ilyen például egy, az 1-es típusú szomatosztatin-receptorra szelektív agonista).

A jelen találmány tárgyát képezi egy olyan eljárás is, amely alkalmas arra, hogy egy arra rászoruló betegben gátoljuk a simaizom-proliferációt, az endoteliális sejtek proliferációját és az új véredények kialakulását. Ezen eljárás során az említett beteget egy olyan vegyületnek a terápiásan hatékony mennyiségével kezeljük, amely vegyület az 1-es típusú szomatosztatin-receptor (SSTR-1) agonistája (ilyen például egy, az 1-es típusú szomatosztatin-receptorra szelektív agonista).

Azon állapotok közé, amelyek a jelen találmány szerinti készítmények és eljárások segítségével kezelhetők, többek kö-

zött, de nem kizárólag, az alábbiak tartoznak: autoimmun betegségek (pl. arthritis, szklerodermia, stb.), rákos daganatok, az átültetett szaruhártya neovaszkularizációja, diabetikus retinopátia, hemangióma, hipertrófiás hegek, pikkelysömör, valamint műtéti eljárásokkal, mint például érplasztikával vagy AV--shunttel kapcsolatos érproliferáció.

Azon, további betegségek közé, amelyek esetén szóba jöhet a jelen találmány szerinti készítményekkel és eljárásokkal történő kezelés, például az alábbiak tartoznak: bőrbetegségek: szemölcsök, granulómák, Kaposi-szarkóma, allergikus ödéma, és így tovább; a méh és a petefészek betegségei: endometriózis, rendellenes méhvérzés, follikuláris ciszták, és így tovább; szembetegségek: a koraszülöttek retinopátiája (ROP), az érhártya rendellenességei és egyéb intraokuláris rendellenességek, macula-degeneráció, korral járó macula-degeneráció, és így tovább.

További példák azon betegségekre és állapotokra, amelyek esetén szóba jöhet a jelen találmány szerinti készítményekkel és eljárásokkal történő kezelés, az alábbi műben találhatók: J. Folkman: Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston, 333(26): 1757-1763.

Amint az a szakemberek számára köztudott, azon ismert betegségek és állapotok listája, amelyek kezelése során alkalmazható egy, az angiogenezist, a simaizom-proliferációt, az endoteliális sejtek proliferációját és/vagy az új véredények kialakulását gátló anyag, nagyon hosszú; ezen betegségek és állapotok közé többek között, de nem kizárólag, az alábbiak tartoznak: szolid tumorok, daganat-áttétek, jóindulatú daganatok (mint például a VIII. agyideg neurómája, és a neurofibrómák), trachoma, leukémia, granuloma pyogenicum, miokardiális an-

giogenezis, plakk-neovaszkularizáció, ateroszklerózis, koszorúsér-kollaterálisok, cerebrális kollaterálisok, arteriovenózus torzulások, isémiás végtagban végbemenő angiogenezis, a szemben és a szaruhártyában fellépő angiogenetikus állapotok (mint például a beültetett szaruhártya kilökődése), Osler-Webber-szindróma, rubeózis, neovaszkuláris glaukóma, retrolentális fibroplázia, diabetikus retinopátia, diabetikus neovaszkularizáció, sebgyógyulás, törések, vaszkulogenezis, hemopoézis, ovuláció, menstruáció, placentáció, macskakarmolási betegség (Rochele minalia quintosa), fekélyek (gyomorfekély; Helicobacter pylori), pikkelysömör (beleértve például a telangiectasiás pikkelysömört is), reumatoid arthritis, Crohn-betegség, bélösszenövések, hegesedés (azaz sejteket és kötőszövetet tartalmazó sűrű szövet képződése), hipertrófiás hegek (azaz keloidok), telangiectasia, vérzékeny izületek, angiofibróma és sebgranuláció. Ezek a betegségek és állapotok részletesen le vannak írva az irodalomban, mint például az alábbi, amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásokban és nemzetközi közzétételi iratokban: 6,323,228, 6,294,532, 6,288,228, 6,288,024, 6,284,726, 6,280,739, 6,265,407, 6,265,403, 6,258,812, 6,255,355, 6,255,353, 6,251,867, 6,242,481, 6,235,756, 6,235,741, 6,228,879, 6,228,871, 6,225,340, 6,214,800, 6,201,104, 6,177,401, 6,174,861, 6,150,407, 6,150,362, 6,117,862, 6,114,355, 6,090,794, 6,086,865, 6,071,948, 6,057,290, 6,057,122, 6,028,061, 6,025,353, 6,025,331, 6,024,688, 6,017,949, 5,997,868, 5,994,388, 5,994,292, 5,990,280, 5,985,878, 5,985,330, 5,981,484, 5,972,922, 5,972,896, 5,948,403, 5,932,611, 5,902,790, 5,874,081, 5,847,002, 5,843,925, 5,837,680, 5,807,731, 5,801,146, 5,766,591, 5,753,230, 5,744,492, 5,733,876, 5,721,226, 5,712,291,

5,698,586, 5,696,147, 5,677,181, 5,646,136, 5,629,340, 5,629,327, 5,610,166, 5,593,990, 5,574,026, 5,567,693, 5,567,417, 5,563,130, 5,512,550, 5,506,208, WO 02/02609, WO 02/02593, WO 02/00877, WO 02/00690, WO 02/00017, WO 01/93806, WO 01/85796, WO 01/81579, WO 01/81311, WO 01/79157, WO 01/74299, WO 01/72699, WO 01/72297, WO 01/66127, WO 01/62799, WO 01/62725, WO 01/59100, WO 01/58899, WO 01/51048, WO 01/46110, WO 01/45751, WO 01/35977, WO 01/34195, WO 01/29085, WO 01/28577, WO 01/25433, WO 01/23375, WO 01/21831, WO 01/19987, WO 01/19868, WO 01/12809, WO 01/12226, WO 01/12210, WO 01/10859, WO 01/09113, WO 01/07057, WO 01/04157, WO 01/03720, WO 01/00201, WO 00/75124, WO 00/73445, WO 00/73340, WO 00/59532, WO 00/54770, WO 00/54762, WO 00/53757, WO 00/53753, WO 00/53752, WO 00/52158, WO 00/48591, WO 00/47212, WO 00/47193, WO 00/43393, WO 00/40597, WO 00/35407, WO 00/32221, WO 00/32180, WO 00/30628, WO 00/27866, WO 00/27415, WO 00/27340, WO 00/24415, WO 00/21561, WO 00/20577, WO 00/20026, WO 00/19995, WO 00/15792, WO 00/12089, WO 00/10507, WO 00/10506, WO 00/09657, WO 00/09495, WO 00/05356, WO 00/02902, WO 00/02871, WO 00/02585, WO 00/01383, WO 99/62549, WO 99/61590, WO 99/61432, WO 99/60984, WO 99/58139, WO 99/48495, WO 99/45909, WO 99/37776, WO 99/31088, WO 99/26622, WO 99/26480, WO 99/23105, WO 99/22760, WO 99/16755, WO 99/16465, WO 99/14234, WO 99/10349, WO 99/09982, WO 99/04806, WO 99/04803, WO 98/58929, WO 98/58919, WO 98/54093, WO 98/51326, WO 98/41205, WO 98/36760, WO 98/35958, WO 98/31688, WO 98/19712, WO 98/19649, WO 98/17796, WO 98/13071, WO

98/12226, WO 98/05323, WO 98/05293, WO 97/45137, WO 97/41824, WO 97/35567, WO 97/32583, WO 97/30085 és WO 97/26258. A fent említett, összes szabadalmi leírás és közzétételi irat tartalma teljes egészében a jelen kitanítás részét képezi.

Az „1-es típusú szomatosztatin-receptor agonistája" és az „1-es típusú szomatosztatin-receptorra szelektív agonista" kifejezések definícióit az alábbiakban adjuk meg. A terápiásan hatékony mennyiség függ a kezelendő állapottól, a választott beadási módtól, és az alkalmazott vegyület specifikus aktivitásától; és azt végső soron a gyakorló orvos vagy állatorvos határozza meg (ez a mennyiség például napi 5 mg és 5 g között lehet). Az egyik kiviteli forma szerint a beteget addig kezeljük a szomatosztatin-agonistával, amíg a kezelendő állapot meg nem szűnik. Egy másik kiviteli forma szerint a beteget az élete végéig kezeljük a szomatosztatin-agonistával.

A szomatosztatin-agonista a kezelendő beteg vérkeringésébe parenterális injekció formájában adható be (pl. intravénásan). A szakember számára azonban nyilvánvaló, hogy a beadás módja [mint például az intravénás, a szubkután, az intramuszkuláris, az intraperitoneális, az enterális, a transzdermális, a transzmukozális, a nazális és az orális beadás, vagy a profúzió formájában történő beadás, illetve az elnyújtott idejű felszabadulást biztosító polimer-készítmények (mint például tejsav-polimert vagy tejsav és glikolsav kopolimert tartalmazó mikrorészecskék vagy implantátumok) alkalmazása, és így tovább] a kezelendő állapottól, továbbá az alkalmazott szomatosztatin-agonista aktivitásától és biológiai hozzáférhetőségétől függően változhat.

A szomatosztatin-agonista egy, a szervezetbe beültetett eszköz bevonatát is alkothatja, vagy ezen bevonat részét képezheti. Például, a szomatosztatin-agonista alkalmazása egy vaszkuláris stenten belül, vagy annak felszínén hasznos lehet a resztenózis kezelésében, ahol gyakran végeznek stent-beültetést.

Az SSTR-1-agonista igény szerint szisztémásan és/vagy helyileg adható be. Az összenövések megakadályozására az SSTR-1-agonistát általában a műtét idején alkalmazzuk, előnyösen kontrollált felszabadulást biztosító készítmények formájában és/vagy barrier-technológiát alkalmazva.

A szomatosztatin-agonistát alkalmazhatjuk a tiszta vagy a lényegében tiszta vegyület formájában, illetve gyógyszerészeti készítmény formájában. A jelen találmány szerint alkalmazott készítmények –mind az embereknek, mind az állatoknak szánt készítmények– tartalmaznak egy bármilyen, alább ismertetett szomatosztatin-agonistát, továbbá tartalmazzák ezen agonista egy vagy több, gyógyszerészetileg elfogadható hordozóanyagát, és opcionálisan még egyéb, terápiás hatású összetevőket is tartalmazhatnak.

A hordozóanyagnak „elfogadhatónak" kell lennie, abban az értelemben, hogy kompatibilisnek kell lennie a készítmény aktív összetevőjével/összetevőivel (például alkalmasnak kell lennie arra, hogy stabilizálja a peptideket), valamint abban az értelemben, hogy a kezelendő betegre nincsen káros hatással. Fontos, hogy a készítmény ne tartalmazzon oxidáló anyagokat vagy egyéb olyan összetevőket, amelyekről tudjuk, hogy nem kompatibilisek a peptidekkel. Például, a gyűrűs formájú szomatosztatin-agonisták (például a belső cisztein-diszulfid-kötéseket tartalmazók) redukálhatók, így tehát a redukáló anyagok segédanyagokként való jelenléte a cisztein-diszulfid-kötések felnyí-

2987

lását eredményezheti. Az erősen oxidáló körülmények hatására viszont cisztein-szulfoxid alakulhat ki, és a triptofán oxidálódhat. Az előzőekből következik, hogy fontos a segédanyagok gondos megválasztása. A pH egy további fontos tényező, és szükséges lehet, hogy a termék kémhatását puffer segítségével enyhén savanyúan (5 és 6 közötti pH-n) tartsuk.

Kényelmes lehet, ha a készítmények egységadagok formájában állnak rendelkezésre, ezek a készítmények a gyógyszerészetben jól ismert eljárások bármelyike szerint előállíthatók. Ezen eljárások mindegyike magába foglalja azt, hogy az aktív összetevő(ke)t egyesítjük a hordozóanyaggal, amely egy vagy több járulékos összetevőt tartalmaz.

A tablettákat és a porokat általában úgy állítjuk elő, hogy az aktív összetevőt egyenletesen és alaposan összekeverjük a finomszemcsés, szilárd hordozóanyaggal, majd ha szükséges, mint például a tabletták esetében, a terméket a kívánt formára és méretre alakítjuk.

A parenterális (pl. intravénás) beadásra alkalmas készítmények általában az aktív összetevő(k) steril, vizes oldatait tartalmazzák. Az oldatok előnyösen izotóniásak a kezelendő beteg vérével. Az ilyen készítmények kényelmesen úgy állíthatók elő, hogy a szilárd aktív összetevő(ke)t vízben oldjuk, hogy egy vizes oldatot kapjunk, majd az említett oldatot sterilezzük. A készítményt olyan tartályokban tárolhatjuk, amelyek egységadagokat vagy több adagot tartalmaznak, ilyen tartály lehet például egy lezárt ampulla vagy fiola.

Az elnyújtott idejű felszabadulást biztosító, parenterális beadásra alkalmas készítmények (például a biológiailag lebontható polimer-készítmények, mint például a tejsav- vagy glikolsav-egységeket tartalmazó poliészterek) szintén jól ismertek a

szakemberek számára (lásd például a 3,773,919 és a 4,767,628 számú, amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásokat, valamint a WO 94/15587 számú, nemzetközi közzétételi iratot).

A műtéti stentek kezelésére és/vagy bevonására alkalmas eljárások és készítmények –ahol az említett bevonat tartalmazhat egy gyógyszerészetileg aktív vegyületet– szintén jól ismertek a szakmában (lásd például a 6,214,115, a 6,090,901 és a 6,083,257 számú, amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásokat, valamint a WO 01/01957 és a WO 00/02599 számú, nemzetközi közzétételi iratokat).

A szomatosztatin vagy a szomatosztatin-agonista olyan, egyéb anyagokkal együtt is beadható, amelyek képesek csökkenteni a vér triglicerid-, koleszterin- vagy glicerin-szintjét, ilyen anyagok például a fibrátok (mint például a bezafibrát, a gemfibrozil és a klofibrát), a HMG-CoA-reduktáz inhibitorok (mint például a pravasztatin, a szimvasztatin, a fluorasztatin, az atorvasztatin és a lovasztatin), az epesavkötő gyanták (mint például a kolesztiramin és a kolesztipol), a nikotinsav-vegyületek (mint például a nikotinsav és a niceritrol) és a halolajak [lásd: „Workshop Treatment of Hyperlipidemia 1996-2" (Lakemedelsverket, Uppsala, Svédország, 1996)].

A jelen találmány további jellemzői és előnyei az előnyös kiviteli formák alábbi leírásából és a szabadalmi igénypontokból lesznek világosak.

Úgy gondoljuk, hogy a szakemberek a jelen találmányt ezen leírás alapján teljes mértékben hasznosítani tudják. Ezért a következőkben ismertetett, jellegzetes kiviteli formák pusztán illusztratív célt szolgálnak, és semmilyen módon sem korlátozzák a jelen találmányt.

Hacsak másként nem definiáljuk, az összes itt előforduló technikai és tudományos kifejezést ugyanúgy kell értelmezni, mint ahogyan azt az általános esetben azok a szakemberek értelmezik, akiknek a jelen találmány a szakterületéhez tartozik. Ezenfelül, az összes itt idézett publikáció, szabadalmi bejelentés, szabadalom és egyéb hivatkozás a jelen kitanítás részét képezi.

Az 1-es típusú szomatosztatin-receptor agonistáján (azaz az SSTR-1 agonistáján) egy olyan vegyületet értünk, (1) amelynek nagy a kötési affinitása (pl. amelynek a K_i értéke kisebb, mint 1000 nM, vagy előnyösen kisebb, mint 100 nM, vagy kisebb, mint 10 nM) az SSTR-1-hez (amint az például az alábbiakban ismertetett receptor-kötési vizsgálattal határozható meg), és (2) amely csökkenti az érproliferáció sebességét vagy mértékét (amint az például az alábbiakban ismertetett biológiai vizsgálat alapján látható).

Az 1-es típusú szomatosztatin-receptorra szelektív agonistán egy olyan szomatosztatin-agonistát értünk, (1) amelynek az SSTR-1-hez nagyobb a kötési affinitása (amelyet a K_i érték fejez ki), mint az SSTR-2-höz, az SSTR-3-hoz, az SSTR-4-hez vagy az SSTR-5-höz (amint az például az alábbiakban ismertetett receptor-kötési vizsgálattal határozható meg), és (2) amely csökkenti az érproliferáció sebességét vagy mértékét (amint az például az alábbiakban ismertetett biológiai vizsgálat alapján látható).

Az 1-es típusú szomatosztatin-receptorra szelektív agonista az egyik kiviteli forma szerint egyben egy SSTR-1-agonista is.

A szomatosztatin-agonisták például azon vegyületek közül kerülhetnek ki, amelyeknek a képlete szerepel ebben a leí-

rásban, vagy amelyek kifejezetten szerepelnek az alább felsorolt publikációkban, amely publikációk mindegyike a jelen kitanítás részét képezi:

G. Van Binst és mtsai.: Peptide Research, 5: 8, (1992);

A Horvath. és mtsai.: Abstract, „Conformations of Somatostatin Analogs Having Antitumor Activity", 22. Európai Peptid-Szimpózium, 1992. szeptember 13-19., Interlaken, Svájc;

Curtis és mtsai.: Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol., 278: H1815, (2000);

Nicolaou és mtsai.: „Design and synthesis of a peptidomimemetic employing β-D-glucose for scaffolding", a „Peptides" című műben, szerk.: Rivier és Marshall, ESCOM, (1990);

Papageorgiou és mtsai.: „Design, synthesis, and binding affinity of a non peptide mimic of somatostatin", Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2: 135-140, (1992);

R. Hirschmann és mtsai.: „De novo design and synthesis of a somatostatin non-peptide peptidomimetics utilizing beta--D-glucose as a novel scaffolding", J. Am. Chem. Soc., 115: 12550-12568, (1993);

a WO 91/09056 (1991) számú, nemzetközi közzétételi irat;

a 0 363 589 A2 (1990) számú, európai szabadalmi bejelentés;

a P5 164 EU számú, európai szabadalmi bejelentés, (feltaláló: G. Keri);

a 6,262,229;

a 6,197,963;

a 6,159,941;

a 6,127,343;

a 6,083,960;

a 6,020,349;

az 5,552,534;

az 5,817,879;

az 5,811,512;

a 4,904,642 (1990);

a 4,871,717 (1989);

a 4,853,371 (1989);

a 4,725,577 (1988);

a 4,684,620 (1987);

a 4,650,787 (1987);

a 4,603,120 (1986); és

a 4,585,755 (1986) számú, amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírások;

a 0 203 031 A2 (1986) számú, európai szabadalmi bejelentés;

a 4,522,813 (1985);

a 4,486,415 (1984);

a 4,485,101 (1984);

a 4,435,385 (1984);

a 4,395,403 (1983);

a 4,369,179 (1983);

a 4,360,516 (1982);

a 4,358,439 (1982);

a 4,328,214 (1982);

a 4,316,890 (1982);

a 4,310,518 (1982);

a 4,291,022 (1981);

a 4,238,481 (1980);

a 4,235,886 (1980);

a 4,224,199 (1980);

a 4,211,693 (1980);

a 4,190,648 (1980);

a 4,146,612 (1979);

a 4,133,782 (1979);

az 5,506,339 (1996);

a 4,261,885 (1981);

a 4,728,638 (1988);

a 4,282,143 (1981);

a 4,215,039 (1980);

a 4,209,426 (1980); és

a 4,190,575 (1980) számú, amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírások;

a 0 389 180 (1990) számú, európai szabadalmi leírás;

a 0 505 680 (1982);

a 0 083 305 (1982); és

a 0 030 920 (1980) számú, európai szabadalmi bejelentések;

a WO 88/05052 (1988),

a WO 90/12811 (1990);

a WO 97/01579 (1997),

a WO 91/18016 (1991); és

a WO 00/75186 (2000) számú, nemzetközi közzétételi iratok;

a GB 2,095,261 (1981) számú, nagy-britanniai szabadalmi bejelentés; és

az FR 2,522,655 (1983) számú, francia szabadalmi bejelentés.

Az SSTR-1-re szelektív szomatosztatin-agonisták közé többek között, de nem kizárólag, az alábbi szomatoszatin-analógok tartoznak, amely analógok szerepelnek a fent idézett közleményekben:

H-Cys-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Cys-NH_2;

H-D-Phe-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-NH_2;

H-Cys-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Ser-Phe-Cys-NH_2;

H-Cys-Phe-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Cys-NH_2;

H-Cys-Phe-Tyr(I)-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Cys-NH_2;

az (a) képletű vegyület; és

Caeg-c(D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-D-Cys)-Thr(Bzl)-Tyr-NH_2,

ahol a „Caeg" a (b) képletű csoportot jelenti.

Megjegyezzük, hogy az összes itt szereplő szomatosztatin-agonista esetében minden egyes aminosav az -NH-C(R)H--CO- szerkezettel írható le, ahol az R az oldalláncot jelenti (pl. Ala esetén a jelentése CH_3). Az aminosavak közötti vonalak peptidkötéseket ábrázolnak, amelyek összekötik az aminosavakat. Ezenkívül, abban az esetben, ha az aminosav optikailag aktív, az aminosavon annak L-formáját értjük, hacsak nem jelöltük kifejezetten a D-formát. A két cisztein tiol-csoportja között diszulfid-kötés (más szóval diszulfid-híd) van, ámbár ezt nem jelöltük.

A szomatosztatin-agonisták előállítása

A szomatosztatin-agonisták előállítására szolgáló eljárások jól dokumentáltak, és azokat a szakember képes alkalmazni. A fent említett H-D-Phe-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-NH_2 például a 0 395 417 A1 számú, európai szabadalmi bejelentés I--es Példájában leírt eljárás szerint állítható elő. A szubsztituált N-terminálissal rendelkező szomatosztatin-agonisták például a WO 88/02756 és a WO 94/04752 számú, nemzetközi közzétételi iratokban, valamint a 0 329 295 számú, európai szabadalmi bejelentésben ismertetett eljárások szerint állíthatók elő.

Szomatosztatin-receptor–kötési vizsgálatok

A humán SSTR-1, SSTR-2, SSTR-3, SSTR-4 és SSTR-5 cDNS-klónok le vannak írva [az SSTR-1 és az SSTR-2 a következő publikációban: Y. Yamada és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 251-255, (1992); az SSTR-3 a következő publikációban: Yamada és mtsai.: Mol. Endocrinol., 6: 2136-2142,

(1993); az SSTR-4 és az SSTR-5 pedig a következő publikációban: Yamada és mtsai.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 195: 844-852, (1993)], és azok az „American Type Culture Collection"-től (ATCC, Rockville, MD) is beszerezhetők [ATCC-számok: 79044 (SSTR-1), 79046 (SSTR-2) és 79048 (SSTR-3)]. A restrikciós endonukleázos térképek alapján, megfelelő restrikciós endonukleázos emésztéssel minden egyes SSTR cDNS teljes kódoló régiója kivágható (T. Maniatis és mtsai.: Molecular Cloning – A Laboratory Manual, CSHL, 1982). A restrikciós endonukleázok a New England Biolabs-től (Beverly, MA) szerezhetők be. Ezt a cDNS-fragmenst standard molekuláris biológiai technikák segítségével (lásd például: T. Maniatis és mtsai.: Molecular Cloning – A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982) a pCMV jelű emlős expressziós vektorba [D. Russel és mtsai.: J. Biol. Chem., 264: 8222-8229, (1989)] építettük be, hogy megkapjuk a pCMV-humán SSTR-1, a pCMV--humán SSTR-2, a pCMV-humán SSTR-3, a pCMV-humán SSTR-4 és a pCMV-humán SSTR-5 expressziós plazmidokat. Az egyéb, emlős expressziós vektorok közé tartozik például a pcDNA1/Amp (Invitrogen, Sandlesy, CA). Az expressziós plazmidokat a megfelelő baktérium-gazdába, azaz az *E. coli* HB101-be (Stratagene, La Jolla, CA), vittük be, majd a plazmid-DNS-eket, amelyeket transzfektáláshoz kívántunk használni, cézium-klorid–grádienseken preparáltuk.

A CHO-K1 sejteket (kínai hörcsög petefészek-sejtek) az ATCC-től szereztük be (ATCC-szám: CCL 61). A sejteket standard szövettenyésztési körülmények mellett 10 % magzati borjú-szérummal kiegészített Ham-féle F12 közegben (Gibco BRL, Grand Island, NY) tenyésztettük. A transzfektáláshoz 1 x 10^6 sejtet raktunk egy 60 cm-es tenyésztőlemezre (Baxter Scientific

20857

Products, McGraw Park, IL). A DNS-közvetítette transzfektálást a kalcium-foszfátos ko-precipitációs módszer szerint végeztük (F.M. Ausubel és mtsai.: Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 1987). A pRSV-neo jelű plazmidot (ATCC; ATCC-szám: 37198) szelektálható markerként használtuk, az expressziós plazmidhoz képest 1/10 koncentrációban. Azokat a CHO-K1 klonális sejtvonalakat, amelyek stabilan örökölték a transzfektált DNS-t, a növekedés szempontjából 10 % magzati borjú-szérumot és 0,5 mg/ml G418-at (Sigma) tartalmazó Ham-féle F12 közegben szelektáltuk. A sejteket úgynevezett „ring-cloning"-nak vetettük alá, és azokat analízis céljára ugyanebben a közegben szaporítottuk fel.

A humán SSTR-1-nek, a humán SSTR-2-nek, a humán SSTR-3-nak, a humán SSTR-4-nek és a humán SSTR-5-nek a CHO-K1 sejtekben történő expresszióját a sejtekből preparált teljes RNS Northern-blot analízisével (J.E. Sambrook és mtsai.: Molecular Cloning – A Laboratory Manual, 2. kiadás, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989), és receptor-kötési vizsgálattal –ligandként (^{125}I-Tyr^{11})szomatosztatin-14-et használva– detektáltuk. A humán SSTR-eket expresszáló, transzfektált sejtvonalakat sejttenyészetben klonálisan felszaporítottuk, és azokat az alábbi SSTR-kötési vizsgálat során felhasználtuk.

Nyers membrán-preparátumot állítottuk elő, úgy hogy a transzfektált sejteket egy POLYTRON nevű homogenizáló-készülékkel (a 6-os értéket beállítva; 15 másodperc) 20 ml jéghideg, 50 mM koncentrációjú Tris-HCl-pufferben homogenizáltuk. Ezután a homogenizátumhoz annyi puffert adtunk, hogy a végtérfogat 40 ml legyen, majd azt egy Sorval SS-34-es rotorban 39000 g-n, 0-4°C-on 10 percig centrifugáltuk. Ezután a fe-

lülúszót leöntöttük, és kidobtuk, majd a csapadékot jéghideg pufferben újrahomogenizáltuk, hígítottuk, majd ugyanúgy centrifugáltuk, ahogyan az előbb. A végső csapadékot 10 mM koncentrációjú Tris-HCl-pufferben újraszuszpendáltuk, majd a szuszpenziót a receptor-kötési vizsgálathoz jégen tároltuk.

A membrán-preparátum alikvotjait 30°C-on 30 percig inkubáltuk 0,05 nM koncentrációjú (^{125}I-Tyr^{11})szomatosztatin-14-gyel (2000 Ci/mmol; Amersham Corp., Arlington Heights, IL), 50 mM koncentrációjú HEPES-pufferben (pH 7,4), amely puffer még az alábbiakat is tartalmazta: a vizsgálandó szomatosztatin-agonista, különböző koncentrációkban (pl. 10^{-11}-10^{-6} M); 10 mg/ml szarvasmarha szérum-albumin (V frakció) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO); $MgCl_2$ (5 mM); Trasylol (200 KIU/ml); bacitracin (0,02 mg/ml) és fenil-metil-szulfonil-fluorid (0,02 mg/ml). A vizsgálathoz használt elegy végtérfogata 0,3 ml volt. Az inkubációt úgy fejeztük be, hogy a vizsgálati elegyeket egy Brandel márkájú, sokágú, filtrációs csőszerkezet felhasználásával GF/C filtereken (amelyeket előzőleg 0,3 %-os polietiléniminben 30 percig áztattunk) gyorsan átszűrtük. Ezután minden egyes csövet és filtert 3 x 5 ml jéghideg pufferrel mostunk. A specifikus kötést az alábbiak szerint definiáltuk: a teljes kötött (^{125}I-Tyr^{11})SRIF-14 mínusz ami 1000 nM jelenlétében kötődött. A szomatoszatin-agonisták K_i-értékeit az alábbi képlet alapján számoltuk ki: $K_i=IC_{50}/[1+(LC/LEC)]$, ahol az IC_{50} a vizsgálandó szomatoszatin-agonista azon koncentrációja, amely ahhoz szükséges, hogy a (^{125}I-Tyr^{11})szomatosztatin-14 radioligandum specifikus kötődését 50 százalékkal gátolja, az LC a radioligandum koncentrációja (0,05 nM), az LEC pedig a radioligandum egyensúlyi disszociációs állandója (0,16 nM).

A proliferáció és a kapilláris-cső–kialakulás gátlása

Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk a szomatosztatin--analógok antiproliferatív hatását az endoteliális sejtekre, valamint a szomatosztatin-analógoknak az endoteliális sejtekből történő kapilláris-cső–kialakulásra gyakorolt gátló hatását, kétfajta humán *in vitro* modellt használtunk. Ezen modellek segítségével vizsgálni tudtuk a szomatosztatin-analógok hatásait egy kétdimenziós endoteliális sejt rétegre, valamint az endoteliális sejtek háromdimenziós növekedésére egy extracelluláris mátrixban, ami modellezi az *in vivo* kapilláris-fejlődést. Ezen vizsgálatok alkalmazásával ráadásul lehetővé vált az emberi szövetek nagyon hosszú ideig történő kezelése (72 órás, illetve 28 napos kezelés), ami hasonlít az antiangiogén terápia lehetséges krónikus klinikai alkalmazásához.

Anyagok és módszerek

Anyagok

A rekombináns humán epidermális növekedési faktort (EGF) és a rekombináns humán vaszkuláris endoteliális növekedési faktort (VEGF) a PeproTechEC LTD-től (London, Nagy--Britannia) szereztük be. Az EGF-et és a VEGF-et a termékek adatlapján szereplő információ alapján steril desztillált vízben oldottuk, úgy hogy a koncentrációjuk 100 μg/ml legyen.

A 199-es jelű sejttenyésztő-közeg, és a fenolvörös nélküli, 199-es jelű sejttenyésztő-közeg a Gibco BRL-től (Paisley, Nagy-Britannia) származik. A sertésbőr-pótlékból származó A--típusú zselatint, és az összes többi, itt fel nem sorolt vegyszert a Sigma Chemical Co.-től (St. Louis, MO, USA) vásároltuk. A sejttenyésztéshez használt műanyag eszközöket a Costartól (Cambridge, MA, USA) szereztük be.

A szomatosztatin-14-et, a BIM-23014C, a BIM-23120C, a BIM-23190C, a BIM-23197C, a BIM-23206C, a BIM-23268C, a BIM-23745C és a BIM-23926C jelű vegyületet (amelyek mindegyikét a Biomeasure Incorporated-től (Milford, MA, USA) vásároltuk) 0,1 % zsírsavmentes szarvasmarha szérum-albumint (BSA-t) tartalmazó, 0,01 N ecetsav-törzsoldatban oldottuk, majd az oldatokat -80°C-on tároltuk.

Az előbb említett vegyületek relatív affinitását a különböző szomatosztatin-receptorokhoz a következő táblázat mutatja:

Vegyület	SSTR-1	SSTR-2	SSTR-3	SSTR-4	SSTR-5
Szomatosztatin-14	nagyon magas	nagyon magas	nagyon magas	nagyon magas	nagyon magas
BIM-23014C	nagyon alacsony	nagyon magas	alacsony	nagyon alacsony	magas
BIM-23120C	nagyon alacsony	nagyon magas	nagyon alacsony	nagyon alacsony	alacsony
BIM-23190C	nagyon alacsony	nagyon magas	alacsony	nagyon alacsony	magas
BIM-23197C	nagyon alacsony	nagyon magas	közepesen magas	nagyon alacsony	magas
BIM-23206C	nagyon alacsony	alacsony	nagyon alacsony	nagyon alacsony	nagyon magas
BIM-23268C	magas	közepesen magas	magas	közepesen magas	nagyon magas
BIM-23745C	közepes	nagyon alacsony	nagyon alacsony	nagyon alacsony	nagyon alacsony
BIM-23926C	nagyon magas	nagyon alacsony	nagyon alacsony	nagyon alacsony	nagyon alacsony

Az SU5416 jelű vegyület, vagyis a 3-[(2,4-dimetil-pirrol--5-il)-metilidenil]-2-indolinon, a Sugen Inc. (San Francisco, CA, USA) ajándéka volt.

A sejttenyésztés körülményei

A HMEC-1 jelű, immortalizált humán mikrovaszkuláris endoteliális sejtvonalat –amelyet Ades és mtsai. jellemeztek (Journal of Investigative Dermatology, 99: 683-690, (1992)]– 10 % magzati borjú szérumot (FBS; hővel inaktivált), 50 NE/ml penicillint és 100 µg/ml hidrokortizont tartalmazó, 199-es jelű sejttenyésztő-közegben tartottuk. A sejteket rutinszerűen 75 cm^2-es, zselatinnal bevont szövettenyésztő palackokban tenyésztettük, nedves, 5 % CO_2-t tartalmazó atmoszférában, 37°C-on. A sejteket a növekedés log-fázisában 025 % tripszint és 0,03 % EDTA-t tartalmazó oldattal szedtük föl, majd azokat az összes kísérlethez a fent leírt tenyésztési körülmények között tartottuk.

Citotoxicitási vizsgálat

In vitro kemoszenzitivitási tesztet végeztünk, ehhez HEMC-1 sejtek egysejt-szuszpenzióit használtuk, a szuszpenziókat 5 x 10^3 sejt/lyuk sűrűségben 96-lyukú, zselatinnal bevont, steril műanyag lemezekre raktuk, majd a sejteket egy éjszakán keresztül hagytuk letapadni. A kezelési protokoll (1. ábra) úgy nézett ki, hogy 24 óra múlva 10^{-10}-10^{-6} M koncentrációban szomatosztatin-14-et vagy szomatosztatin-analógokat, vagy 10^{-6} M koncentrációban SU5416-ot + 10 ng/ml koncentrációban VEGF-et (pozitív kontrollként), illetve vivőanyagot adtunk, majd a lemezeket további 72 órán keresztül inkubáltuk (a további részletekért lásd az 1. ábrát). A kezeléseket úgy terveztük meg, hogy minden peptidet legalább kilenc lyuk képviselt. A kísérlet végén a sejteket foszfáttal pufferolt sóoldattal (PBS-

-sel) mostuk, majd tripszint és EDTA-t tartalmazó oldattal fölszedtük az aljzatról, és végül azokat egy hemocitométerrel megszámoltuk. Az eredményeket a kontrollokhoz képest megfigyelt sejtproliferáció százalékos értékeivel fejeztük ki, és azokat három különálló kísérlet adatai alapján átlag ± standard hiba formájában adtuk meg.

Emberi méhlepényből származó véredények in vitro tenyészetei

Az emberi méhlepényből származó explantátumok kísérleti modelljének az alkalmazását –amelyet az alábbiakban ismertetünk részletesen– a Pisai Egyetemi Kórház Etikai Bizottsága engedélyezte (protokoll-szám: 005567).

A jelen vizsgálat során a Brown és mtsai. által leírt [Laboratory Investigation, 75: 539-555, (1996)] kísérleti eljárást követtük, némiképpen módosítva azt. A spontán szülést követően azonnal begyűjtöttük a méhlepényt, steril körülményeket biztosítva, majd kivágtuk a körülbelül 1-1,5 mm átmérőjű és 1--5 cm hosszúságú, felszíni véredényeket. Az ér-explantátumokat 2,5 mg/ml amfotericin B-t és 50 μg/ml gentamicint tartalmazó, foszfáttal pufferolt sóoldatba (PBS-be) raktuk, majd azokat körülbelül 1 mm-es darabokra vágtuk. A tenyésztéshez 24--lyukú tenyésztőlemezeket használtunk; minden egyes lyukba 0,5 ml-t adtunk az alábbi összetételű oldatból: 3 mg/ml fibrinogén, fenolvörös nélküli, 199-es jelű tenyésztőközegben oldva; majd ezután gyorsan minden egyes lyukba 15 μl trombint (50 NIH U/ml, 0,15 M koncentrációjú NaCl-ban oldva) adtunk. Az alvadékképződés után az ér-explantátumokat gyorsan a lyukak közepére helyeztük, majd azokat lyukanként 0,5 ml fibrinogén--oldattal fedtük, majd a lyukakba további 15 μl trombint adtunk, azért hogy az ér-explatátumok mindegyikét azonos szinten tartsuk a két alvadék között. A gélképződés után minden

egyes lyukba 1 ml-t adtunk az alábbi összetételű oldatból: 10 % FBS-t (hővel inaktiválva), 0,1 % ε-amino-kapronsavat, 2 mM koncentrációjú L-glutamint és antibiotikumokat (50 μg/ml streptomicint, 50 NE/ml penicillint és 2,5 mg/ml amfotericin B-t) tartalmazó, fenolvörös nélküli, 199-es jelű tenyésztőközeg. A véredényeket tenyésztettük, és azokat minden második nap 10^{-10}-10^{-6} M koncentrációjú szomatosztatin-14-gyel, vagy 10^{-10}-10^{-6} M koncentrációjú, valamilyen szomatosztatin-analóggal, vagy 10^{-6} M koncentrációjú SU5416-tal, illetve vivőanyaggal kezeltük; a tenyésztés 28 napig tartott, és azt nedves, 95 % levegőt és 5 % CO_2-t tartalmazó atmoszférában, 37°C-on végeztük (2. ábra). Az ér-explantátumokat a 28. napon egy Leitz MD IL típusú fáziskontraszt-mikroszkóppal (Leica, Heerbrugg, Svájc) lefényképeztük, majd képanalízist végeztünk.

Képanalízis

A jelen vizsgálathoz a Bocci és mtsai. által leírt [Cancer Chemotherapy Pharmacology, 43: 205-212, (1999)] képanalízis-módszert használtuk. Röviden, a méhlepény eredetű fragmens vizsgálata során kapott képeket egy 512 x 512 képpontból álló mátrix formájában digitalizáltuk, egy TK-1280E típusú színes videokamerát (JVC, Tokió, Japán) és egy mikroszámítógép-processzort használva. A digitalizált képeket egy nagy felbontású színes monitoron jelenítettük meg. Az interaktív manipulációhoz, a képek kvantitatív elemzéséhez és az adatgyűjtéshez a KS 300 v.1.2 jelű, true-color képanalizáló szoftvercsomagot (Kontron Elektronik GmbH, Eching, Németország) használtuk. A geometriai kalibrációhoz egy ismert méretű mintát használtunk, ezenkívül szürkeségi-skála analízist is végeztünk, hogy megmérjük a kép denzitását, amelynek értéke 0 és 255 között lehet, ahol a 0 jelenti a feketét (érkinövések jelenléte), a 255 pedig a

fehéret (érkinövések hiánya). A méhlepény-ér–explantátumok fibrin-tenyészetében megmértük a kinövési terület átlagos szürkeségi szintjét, ezen adat felhasználásával a kinövési indexet (KI) az alábbi képlet alapján számoltuk ki:

Kinövési index = [(kinövési terület/a kinövési terület átlagos szürkeségi szintje)/az explantátum kerülete] x 100

Az eredményeket az alábbi formában adtuk meg: a kinövési index százaléka (a kontrollokhoz viszonyítva) ± standard hiba.

Eredmények

Citotoxicitási vizsgálat

Az összes eredmény az I. táblázatban látható:

I. táblázat: HEMC-1 jelű, humán endoteliális sejtek *in vitro* proliferációja

Koncentráció	BIM-23120C	BIM-23197C	BIM-23206C	BIM-23190C	BIM-23268C
	% a kontroll-hoz képest	% a kontroll-hoz képest	% a kontroll-hoz képest	% a kontroll-hoz képest	% a kontroll-hoz képest
0 M	100	100	100	100	100
10^{-6} M			122,58 ± 7,3	113,55 ± 6,5	118,06 ± 8,2
10^{-7} M	103,97 ± 2,07	87,61 ± 3,6	81,29 ± 3,2	92,26 ± 3,1	87,74 ± 3,7
10^{-8} M	74,27 ± 4,5	78,25 ± 2,5	68,38 ± 3,9	60,0 ± 2,2	111,61 ± 2,5
10^{-9} M	88,01 ± 3,7	73,39 ± 2,1	77,42 ± 4,0	87,74 ± 2,5	94,19 ± 4,2
10^{-10} M	102,39 ± 5,2	83,96 ± 3,2			

I. táblázat (folytatás)

Koncentráció	BIM-23745C	BIM-23014C	BIM-23926C	Szomatosztatin-14
	% a kontroll-hoz képest	% a kontroll-hoz képest	% a kontroll-hoz képest	% a kontrollhoz képest
0 M	100	100	100	100
10^{-6} M	40,0 ± 2,0	80,0 ± 3,2	56,78 ± 4,9	73,3 ± 4,1
10^{-7} M	46,55 ± 2,3	51,2 ± 4,7	55,33 ± 3,3	71,25 ± 2,1
10^{-8} M	49,7 ± 1,9	65,05 ± 3,1	65,54 ± 3,5	69,7 ± 2,5
10^{-9} M	56,79 ± 2,7	78,0 ± 2,7	79,95 ± 4,6	77,85 ± 3,3
10^{-10} M			88,10 ± 5,3	

A kezelést az 1. napon kezdtük, 24 órával azután, miután a sejteket ráraktuk a lemezekre, majd a kezelést 48 óra múlva megismételtük; a sejteket további 24 óra múlva számoltuk meg. A szomatosztatin-14-et minden nap adtuk. Az SU5416 jelű vegyületet más lyukak tenyésztőközegéhez adtuk, 10^{-6} M koncentrációban, ebben az esetben a kezeletlen kontrollokhoz képest 43,85 $\pm$ 3,02 %-os túlélést figyeltünk meg.

A vizsgált koncentrációknál az összes szomatosztatin-analóg antiproliferatív hatást fejtett ki az immortalizált humán mikrovaszkuláris endoteliális HMEC-1 sejtekre, a maximális hatékonyság 10^{-7} és 10^{-8} M közötti koncentrációnál volt megfigyelhető. A pozitív kontroll –az SU5416 jelű vegyület (10^{-6} M koncentrációban alkalmazva), amely egy specifikus VEGF-receptor inhibitor– a sejtek növekedését 56,2 %-osan gátolta.

Emberi méhlepényből származó véredények in vitro tenyészetei

A fibrin-mátrixban kinövéseket növesztő explantátumra az volt a jellemző, hogy a méhlepény eredetű fragmens körül számos mikroeret lehetett megfigyelni. A vaszkuláris sejtek sugárirányban rendeződtek, hogy mikroereket képezzenek, amelyek folyamatosan újrarendeződtek (3. ábra). A háromdimenziós mikrovaszkuláris hálózat maximális növekedése a harmadik-negyedik héten volt megfigyelhető, és a platót 27 nappal a szövet kihelyezése után érte el. Hisztológiailag, a fibrin-gélben az endoteliális sejteknek egy olyan, finom szerkezete volt megfigyelhető, amely immunreaktivitást mutatott a von Willebrand-faktorral (4. és 5. ábra). A legtöbb esetben a mikroereknél látható volt egy kezdeti lumen, más esetekben a lumen hiányzott, és csak endoteliális sejtek voltak megfigyelhetőek (5. ábra).

A méhlepényből származó explantátumok mikroszkópos képe a tenyésztés első napján a 6.A ábrán látható (vonal: 2 mm); körülbelül a tenyésztés hatodik napján figyeltük meg azt, hogy a méhlepényből származó, tenyésztett ér-darabkákból endoteliális sejtek kezdenek kinőni (KI=0,055 ± 0,004 (mm/átlagos szürkeség) x 100; 6.D ábra).

A II. táblázatban foglaltuk össze azokat a kísérleti adatokat, amelyek a szomatosztatin-analógoknak a kapilláris-kinövésre gyakorolt hatására vonatkoznak.

II. táblázat: emberi méhlepényből explantált erek endoteliális sejtjeinek proliferációja

Koncentráció	BIM-23120C	BIM-23197C	BIM-23206C	BIM-23190C	BIM-23268C
	% a kontroll-hoz képest	% a kontroll-hoz képest	% a kontroll-hoz képest	% a kontroll-hoz képest	% a kontroll-hoz képest
0 M	100	100	100	100	100
10^{-6} M	106,6 ± 10,2	98,99 ± 8,7	93,08 ± 7,8	107,98 ± 8,5	98,14 ± 10,7
10^{-7} M	94,78 ± 8,4	62,72 ± 7,9	83,77 ± 10,2	102,39 ± 7,3	81,12 ± 11,6
10^{-8} M	88,18 ± 11,3	71,54 ± 8,2	72,07 ± 8,5	95,12 ± 10,7	84,31 ± 12,1
10^{-9} M	78,76 ± 7,6	114,23 ± 7,6	97,87 ± 10,9	91,75 ± 10,9	86,97 ± 8,4
10^{-10} M	86,57 ± 9,8	126,65 ± 11,2	105,32 ± 11,3	103,98 ± 12	76,33 ± 7,6

II. táblázat (folytatás)

Koncentráció	BIM-23745C	BIM-23014C	BIM-23926C	Szomatosztatin-14
	% a kontroll-hoz képest	% a kontroll-hoz képest	% a kontroll-hoz képest	% a kontrollhoz képest
0 M	100	100	100	100
10^{-6} M	70,75 ± 7,5	73,66 ± 8,7	38,39 ± 10,6	73,25 ± 7,5
10^{-7} M	62,99 ± 8,2	79,01 ± 8,2	17,18 ± 11,8	44,03 ± 5,2
10^{-8} M	42,84 ± 5,6	80,24 ± 10,1	41,54 ± 7,9	68,72 ± 5,4
10^{-9} M	63,41 ± 6,8	90,53 ± 11,3	55,94 ± 13,6	84,77 ± 7,1
10^{-10} M	82,43 ± 8,5	90,94 ± 12,6	62,32 ± 12	99,18 ± 7

A kezeléseket kétnaponta végeztük, 28 napon keresztül. Az SU5416 jelű vegyületet más explantátumok tenyésztőközegébe minden má-

sodik nap adtuk, 10^{-6} M koncentrációban, ebben az esetben a KI értéke a kezeletlen kontrollokhoz képest 32,92 $\pm$ 9,7 %-os volt.

A szomatosztatin-analógokkal és az SU5416 jelű vegyülettel kezelt tenyészetek képei a 7-16. ábrákon láthatóak, ahol a maximális hatásokat mutattuk be. A BIM-23926C és a BIM-23745C hatékony gátló-tulajdonságokat mutatott egy hosszútávú kezelés során; a kezeletlen kontrollokhoz képest a BIM-23926C 10^{-7} M koncentrációban 17,18 $\pm$ 11,8 %-os KI-t, a BIM-23745C pedig 10^{-8} M koncentrációban 42,84 $\pm$ 5,6 %-os KI-t eredményezett. Az SU5416 jelű vegyület –a pozitív kontroll– 10^{-6} M koncentrációban alkalmazva 32,92 $\pm$ 9,7 %-os KI-t eredményezett.

Az előző leírás a jelen találmány jellegzetes kiviteli formáira korlátozódott. Azonban nyilvánvaló, hogy a jelen találmánynak sokféle olyan változata és módosított formája létezhet, amely által kihasználható a jelen találmány néhány vagy összes előnye. Az ilyen kiviteli formák is az alábbi igénypontok tárgyát képezik.

23857

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás egy beteg érproliferációjának a kezelésére, azzal jellemezve, hogy az említett beteget egy olyan vegyületnek a terápiásan hatékony mennyiségével kezeljük, amely vegyület az 1-es típusú szomatosztatin-receptor agonistája.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett, 1-es típusú szomatosztatin-receptor agonistának az 1-es típusú szomatosztatin-receptorra vonatkozó K_i-értéke kisebb, mint 5 nM.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett, 1-es típusú szomatosztatin-receptor agonista egy, az 1-es típusú szomatosztatin-receptorra szelektív agonista.

4. A 3. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett, 1-es típusú szomatosztatin-receptorra szelektív agonistának az 1-es típusú szomatosztatin-receptorra vonatkozó K_i-értéke legalább 10-szer kisebb, mint a 2-es, a 3-as, a 4-es vagy az 5-ös típusú szomatosztatin-receptorra vonatkozó K_i-értéke.

5. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett, 1-es típusú szomatosztatin-receptor agonista az alábbiak közül kerül ki:

H-Cys-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Cys-NH_2;

H-D-Phe-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-NH_2;

H-Cys-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Ser-Phe-Cys-NH_2;

H-Cys-Phe-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Cys-NH_2;

H-Cys-Phe-Tyr(I)-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Cys-NH_2;

az (a) képletű vegyület;

Caeg-c(D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-D-Cys)-Thr(Bzl)-Tyr-NH_2; vagy

3-[(2,4-dimetil-pirrol-5-il)-metilidenil]-2-indolinon; vagy

ezen vegyületeknek egy gyógyszerészetileg elfogadható sója.

6. Az 5. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az alábbi vegyületnek, vagy annak egy gyógyszerészetileg elfogadható sójának a terápiásan hatékony mennyiségét adjuk:

Caeg-c(D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-D-Cys)-Thr(Bzl)-Tyr-NH_2.

7. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett érproliferáció magába foglalja az angiogenezist, a resztenózist, az endoteliális sejtek proliferációját, a simaizomproliferációt vagy az új véredények kialakulását.

8. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett érproliferáció az alábbi betegségekben vagy állapotokban fordul elő: autoimmun betegségek, arthritis, szklerodermia, rákos daganatok, az átültetett szaruhártya neovaszkularizációja, diabetikus retinopátia, hemangióma, hipertrófiás hegek vagy pikkelysömör.

9. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett érproliferáció az érplasztika vagy az AV-shunt velejárója, illetve ezekkel kapcsolatos.

10. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett érproliferáció az alábbi betegségekben vagy

állapotokban fordul elő: szemölcsök, granulómák, Kaposi-szarkóma vagy allergikus ödéma.

11. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett érproliferáció az alábbi betegségekben vagy állapotokban fordul elő: endometriózis, rendellenes méhvérzés vagy follikuláris ciszták.

12. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett érproliferáció az alábbi betegségekben vagy állapotokban fordul elő: koraszülöttek retinopátiája (ROP), az érhártya rendellenességei, macula-degeneráció vagy korral járó macula-degeneráció.

13. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett érproliferáció az alábbi betegségekben vagy állapotokban fordul elő: szolid tumorok, daganat-áttétek, jóindulatú daganatok, a VIII. agyideg neurómái, neurofibrómák, trachomák, leukémia, granuloma pyogenicum, miokardiális angiogenezis, plakk-neovaszkularizáció, ateroszklerózis, koszorúsér-kollaterálisok, cerebrális kollaterálisok, arteriovenózus torzulások, isémiás végtagban végbemenő angiogenezis, a beültetett szaruhártya kilökődése, Osler-Webber-szindróma, rubeózis, neovaszkuláris glaukóma, retrolentális fibroplázia, diabetikus retinopátia, diabetikus neovaszkularizáció, törések, vaszkulogenezis, hemopoézis, ovuláció, menstruáció, placentáció, macskakarmolási betegség (Rochele minalia quintosa), gyomorfekély, Helicobacter pylori-val kapcsolatos fekély, pikkelysömör, telangiectasiás pikkelysömör, reumatoid arthritis, Crohn-betegség, bélösszenövések, hegesedés, hipertrófiás hegek, ke-

loidok, telangiectasia, vérzékeny izületek, angiofibróma vagy sebgranuláció.

14. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett, 1-es típusú szomatosztatin-receptor agonista egy vaszkuláris stent felszínén, vagy egy vaszkuláris stenten belül van elhelyezve.

15. A 14. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett, 1-es típusú szomatosztatin-receptor agonista egy lassú felszabadulást biztosító készítmény részét képezi.

16. A 14. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett, 1-es típusú szomatosztatin-receptor agonista egy polimer-készítmény részét képezi.

A meghatalmazott

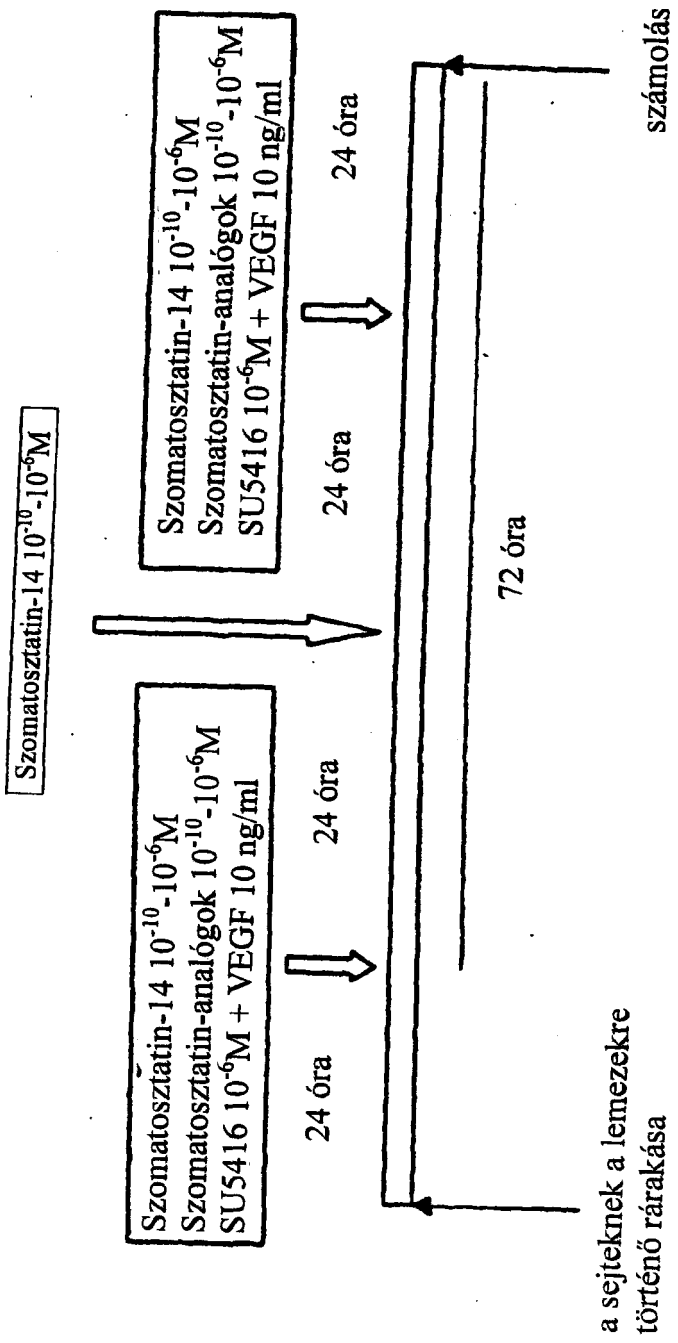
ifj. Szentpéteri Ádám
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Szabadalmi Ügyvivői Iroda
tagja
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
Telefon: 461-1000 Fax: 461-1099

8 oldal rajzzal

2005-09-29.

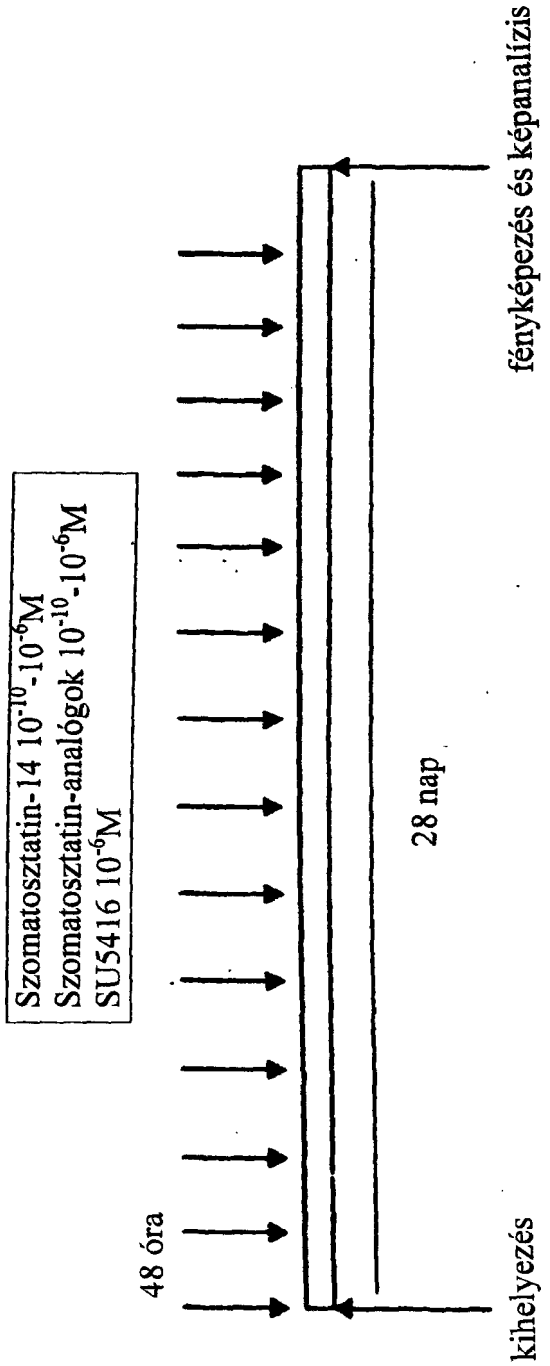
P03 02732

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



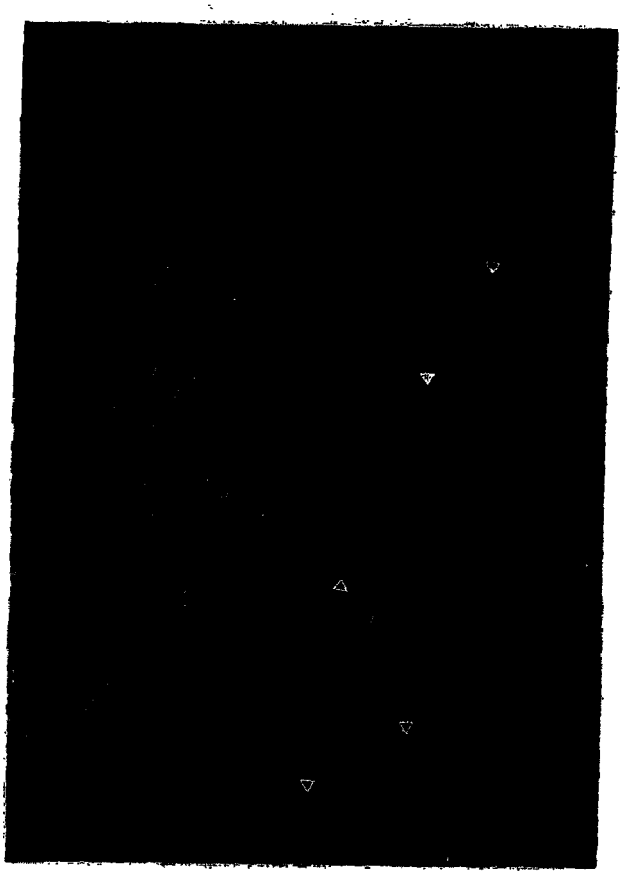
1. ábra: a HEMC-1 sejtek kezelési protokollja

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



2. ábra: a méhlepény-ér explantátumok kezelési protokollja

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



3. ábra

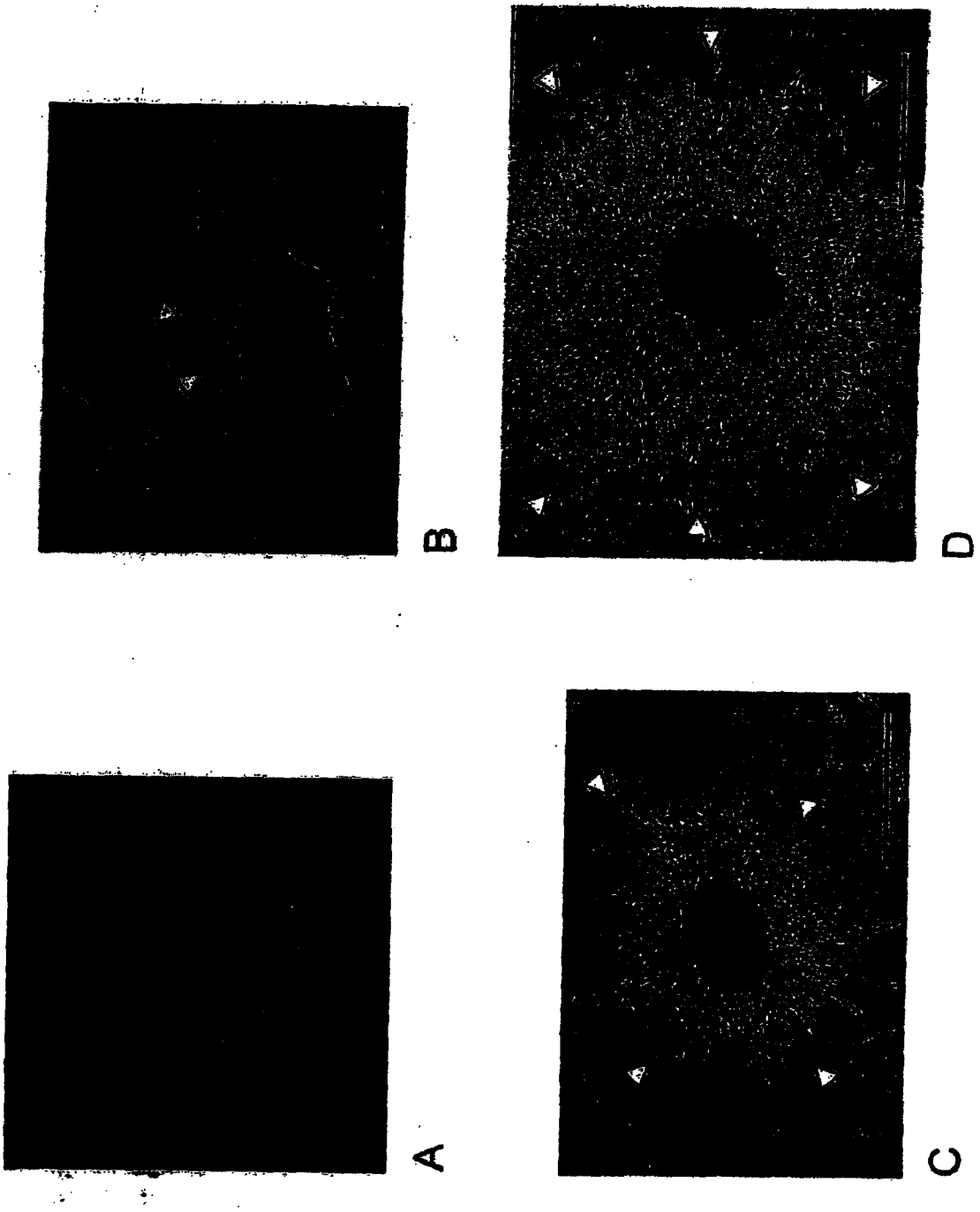


5. ábra



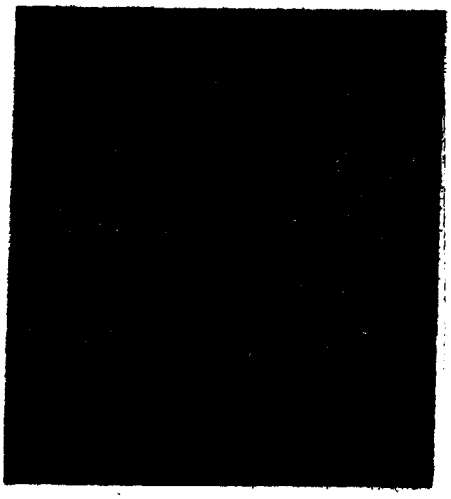
4. ábra

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

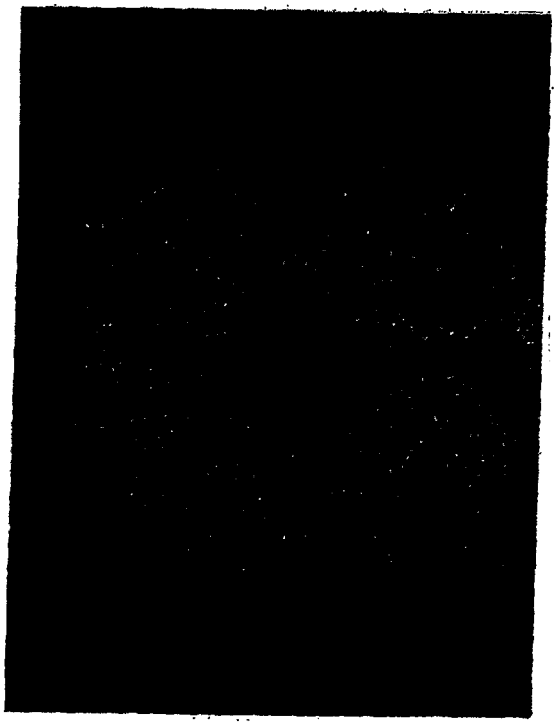


6. ábra

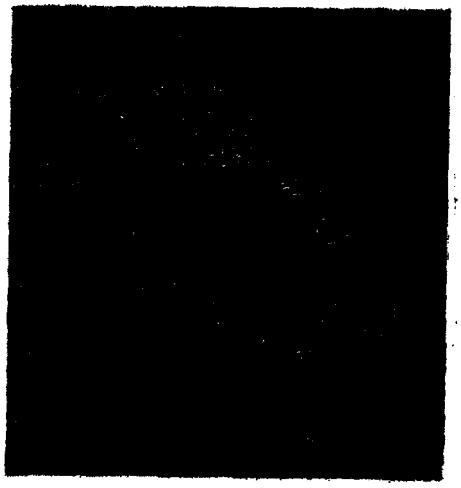
KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



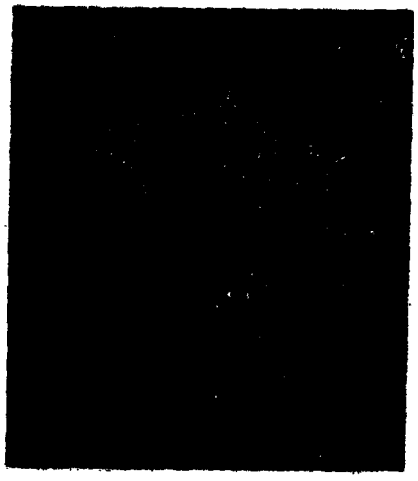
8. ábra BIM23014C 10^{-5}M



10. ábra BIM23190C 10^{-9}M

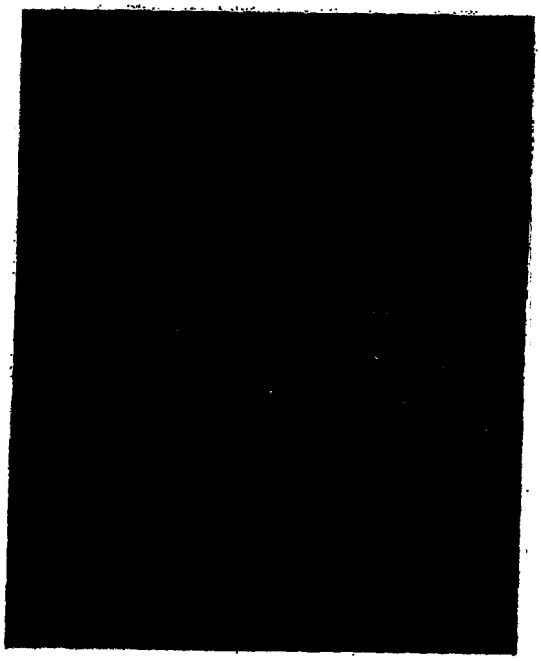


7.ábra Szomatosztatin-14

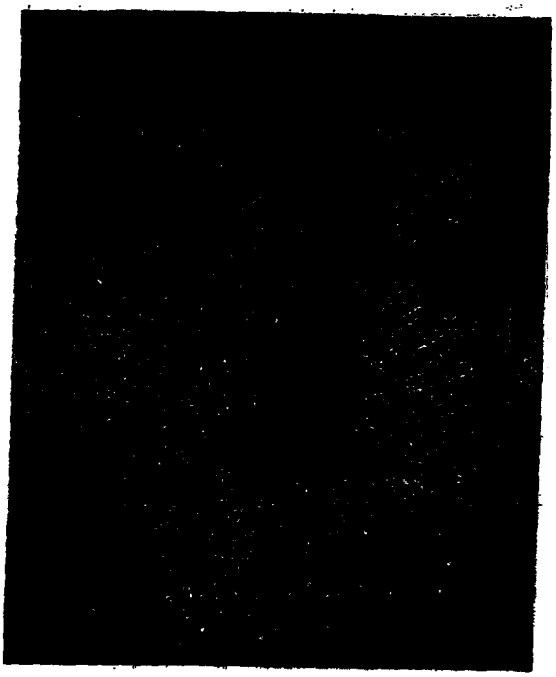


9. ábra BIM23745C 10^{-8}M

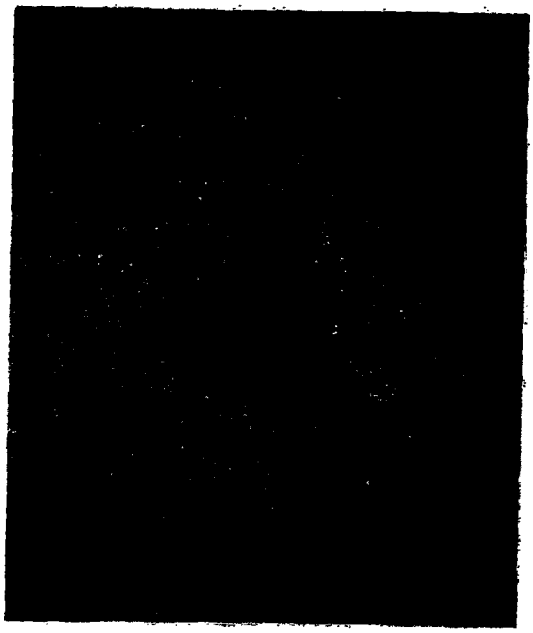
KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



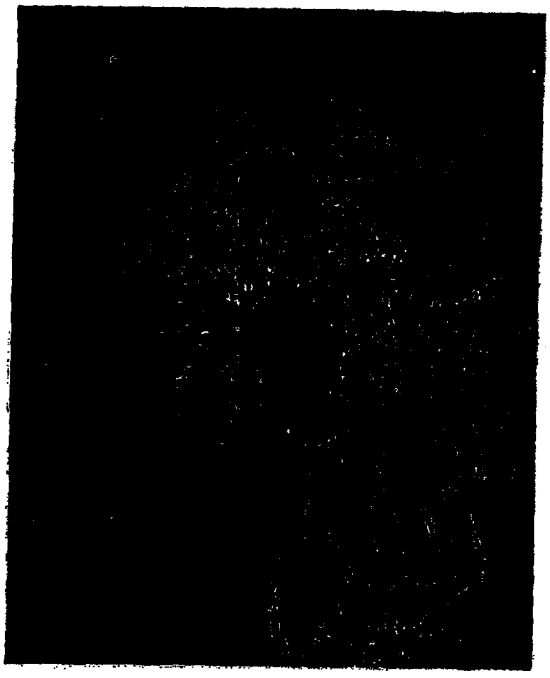
12. ábra BIM23206C 10^{-8}M



14. ábra BIM23120C 10^{-9}N

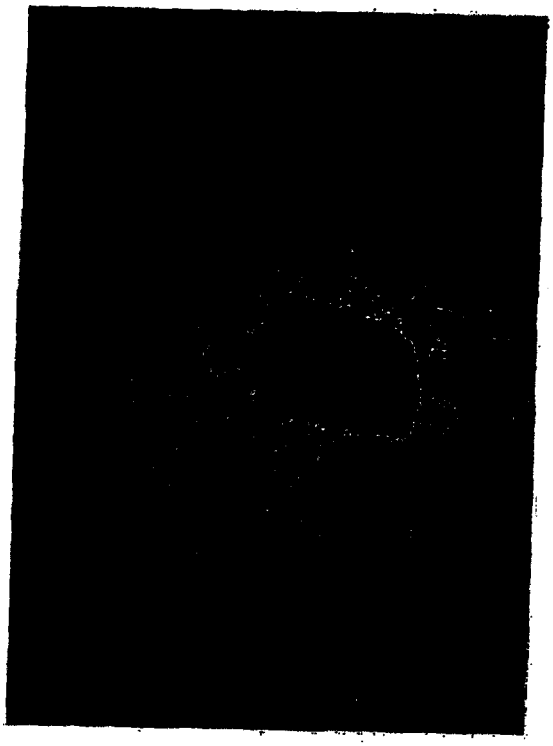


11. ábra BIM232668C 10^{-7}M



13. ábra BIM23197C 10^{-7}M

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

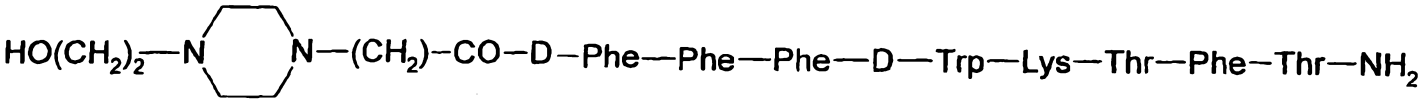


15. ábra BIM23926C 10^{-7}M

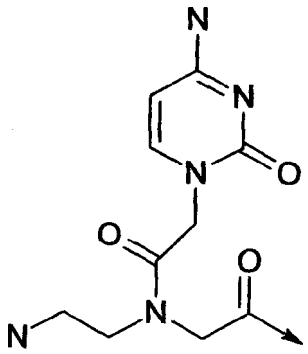


16. ábra SU5416 10^{-6}M

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



(a)



(b)