

(11) Patent numeris: **4516** (51) Int. Cl.<sup>6</sup>: **A61K 31/495**

(21) Paraiškos numeris: **98-002**

**A61K 31/50**

**A61K 31/44**

**A61K 31/445**

(22) Paraiškos padavimo data: **1998 01 06**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1999 02 25**

(45) Patent paskelbimo data: **1999 06 25**

(86) Tarptautinės paraiškos numeris: **PCT/US96/09561**

(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: **1996 06 05**

(85) Nacionalinės procedūros pradžia: **1998 01 06**

(31, 32, 33) Prioritetas: **474072, 1995 06 07, US**  
**653905, 1996 05 28, US**

(72) Išradėjas:

**Joseph P. Steiner, US**  
**Solomon Snyder, US**  
**Gregory S. Hamilton, US**  
**Ted Dawson, US**

(73) Patent savininkas:

**GUILFORD PHARMACEUTICALS INC.,**  
**6611 Tributary Street, Baltimore, Maryland 21224, US**  
**JOHNS HOPKINS UNIVERSITY SCHOOL OF MEDICINE,**  
**2024 East Monument, Suite 72-100, Baltimore, MD 21205, US**

(74) Patentinis patikėtinis:

**Rita Laurinavičiūtė, 5, UAB "Metida", Pilies g. 8/1-2, 2600 MTP Vilnius, LT**

---

(54) Pavadinimas:

**Rotamazės fermento inhibitoriai**

(57) Referatas:

Išradimas yra susijęs su neurotrofinių pipekolinės rūgšties darinių, pasižyminčių afiniškumu FKBP tipo imunofilinams, panaudojimo kaip fermentinio aktyvumo, susijusio su imunofiliniais baltymais, inhibitorių, ypač kaip peptidilprolilizomerazės arba rotamazės fermentinio aktyvumo inhibitorių, būdu, siekiant skatinti arba greitininti neuronų augimą arba regeneraciją.

Ši paraiška iš dalies yra tęsinys paraiškos JAV patentui Nr. 08/474072, paduotos 1995 m. birželio 7 d.

## Išradimo prielaidos

### 1. Išradimo sritis.

Šis išradimas susijęs su neurotrofinių pipekolinės rūgšties darinių - junginių, pasižyminčių afiniškumu FKBP tipo imunofilinams, panaudojimu kaip fermentinio aktyvumo, susijusio su imunofiliniais baltymais, inhibitorių, ir ypač kaip peptidil-prolilizomerazės arba rotamazės inhibitorių.

### 2. Technikos lygis

Terminas imunofilinai reiškia keletą baltymų, kurie yra pagrindinių imunosupresinių vaistų, ciklosporino A (CsA), FK506 ir rapamicino receptoriai. Žinomos imunofilinų klasės yra ciklofilinai ir FK506 surišantys baltymai, tokie kaip FKBP. Ciklosporinas A rišasi su ciklofilinu, tuo tarpu rapamicinas jungiasi su FKBP. Šie imunofilino-vaisto kompleksai sąveikauja su įvairiomis signalo perdavimo ląstelės viduje sistemomis, ypač imuninėje ir nervų sistemose.

Žinoma, kad imunofilinai pasižymi peptidilprolilizomerazės (PPlase) arba rotamazės fermentiniu aktyvumu. Nustatyta, kad rotamazės aktyvumas vaidina tam tikrą vaidmenį imunofilinų baltymų cis ir trans izomerų tarpusavio virsmų katalizėje.

Imunofilinai pirmiausia buvo atrasti ir ištirti imunoaudiniuose. Iš pradžių tos srities specialistai postulavo, kad imunofilinų rotamazės aktyvumo inhibavimas sukelia T-ląstelių proliferacijos inhibiciją, tokiu būdu sąlygodamas imunosupresinių vaistų, tokių kaip ciklosporinas A, FK506, rapamicinas, imunosupresinį veikimą. Tolimesni tyrimai parodė, kad rotamazės aktyvumo inhibicijos savaime nepakanka sukelti imunosupresiniam aktyvumui; Schreiber et al. *Science* 1990, 250, 556-559. Atrodo, kad imunosupresinis aktyvumas

kyla veikiant imunosupresinių vaistų komplekso ir imunofilinų kompozicijai. Buvo parodyta, kad imunofilino-vaisto kompleksas savo veikimo eigoje sąveikauja su trinariais baltymais; Schreiber et al., *Cell* 1991, 66, 807-815. FKBP-FK506 ir FKBP-CsA atvejais vaisto-imunofilino kompleksas jungiasi su fermentu kalcineurinu, inhibuodamas T-ląstelės receptoriaus signalą, kuris sukelia T-ląstelės proliferaciją. Panašiai, rapamicino ir FKBP kompleksas sąveikauja su RAFTI/FRAP baltymu ir inhibuoja signalą nuo IL-2 receptoriaus.

Nustatyta, kad imunofilinai didelėmis koncentracijomis randami centrinėje nervų sistemoje. Centrinėje nervų sistemoje yra 10-50 kartų daugiau imunofilinų, negu imuninėje sistemoje. Atrodo, kad nerviniuose audiniuose imunofilinai įtakoja azoto oksido sintezę, neurotransmiterių atpalaidavimą ir neuroninio proceso išplitimą.

Azoto oksidas organizme atlieka keletą vaidmenų. Smegenyse azoto oksidas, atrodo, yra neurotransmiteris. Jis susidaro iš arginino, veikiant azoto oksido sintetazei, kuri oksiduoja arginino guanidino grupę, susidarant azoto oksidui ir citrulinui. Glutamato receptoriaus N-metil-d-aspartato subtipo stimuliavimas greitai ir žymiai aktyvuoja azoto oksido sintetazę ir stimuliuoja cGMP susidarymą. Azoto oksido sintetazės inhibavimas arginino dariniais, tokiais kaip nitroargininas, blokuoja glutamato indukuojamą cGMP kiekio padidėjimą. Azoto oksido sintetazė yra su kalcio kalmodulinu susijęs fermentas, ir N-metil-d-aspartato receptoriaus aktyvavimas stimuliuoja azoto oksido sintetazės aktyvumą, kadangi N-metil-d-aspartato receptorius turi kalcio kanalą, kuris atveriamas stimuliuojant glutamatu, įgalinantį kalcį įsilieti į ląsteles ir aktyvuoti azoto oksido sintetazę.

Glutamatas yra fiziologinis neurotransmiteris. Tačiau, išsiskyręs su pertekliumi, jis sukelia neurotoksiškumą per N-metil-d-aspartato receptorius. Paveikus smegenų žievės neuronų kultūras glutamatu arba N-metil-d-aspartatu, užmušama iki 90 % neuronų, ir šiuos efektus blokuoja vaistai - N-metil-d-aspartato antagonistai. Manoma, kad šis N-metil-d-aspartato neurotoksiškumas yra pagrindinė neuroninio pažeidimo po kraujagyslių insulto priežastis. Glutamatas išsiskiria dideliais kiekiais po smegenų kraujagyslių

užsikimšimo, ir daugelis N-metil-d-aspartato antagonistų blokuoja insulto pavojų. Azoto oksido sintetazės fosforilinimas inhibuoja jos katalitinį aktyvumą. Didinant azoto oksido sintetazės fosforilinimo laipsnį, FK506 galėtų funkcionaliai inhibuoti azoto oksido susidarymą ir tokiu būdu blokuoti glutamato neurotoksiškumą. Iš tikrųjų, žemos FK506 ir ciklosporino A koncentracijos blokuoja N-metil-d-aspartato neurotoksiškumą kortikalinėse kultūrose. FKBP, kaip mediatoriaus, vaidmuo yra akivaizdus, kadangi rapamicinas panaikina terapinį FK506 efektą. Matyt, FK506, jau pasižymėjęs kaip imunosupresantas, galėtų būti naudojamas kliniškai pacientams, nukentėjusiems dėl insulto.

FK506 taip pat didina su augimu susijusio baltymo 43 (GAP43) fosforilinimą. GAP43 dalyvauja neuroninių procesų išplitime ir atrodo, kad jo fosforilinimas didina šį aktyvumą. Atitinkamai, FK506, rapamicino ir ciklosporino įtaka neuroninių procesų išplitimui buvo tirta naudojant PC12 ląsteles. PC12 ląstelės yra į neuronus panašių ląstelių tęstinė linija, kurioje išplinta neuritai, stimuliuojant nervų augimo faktoriu (NGF).

Keista, bet buvo nustatyta, kad imunosupresantų, tokių kaip FK506 ir rapamicino, pikomolinės koncentracijos stimuliuoja neuritų ataugas PC12 ląstelėse ir sensoriniuose nervuose, būtent dorsalinio šaknelės ganglijaus ląstelėse (DRGs); Lyons et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91, 3191-3195. Visuose eksperimentuose su gyvuliukais parodyta, kad FK506 stimuliuoja nervo regeneraciją po veidinio nervo pažeidimo ir duoda funkcinį atsistatymą gyvuliukų su sėdmeninio nervo pažeidimu atvejais.

Konkrečiau, nustatyta, kad vaistai, pasižymintys aukštu afiniškumu FKBP atžvilgiu, yra galingi rotamazės inhibitoriai ir demonstruoja puikų neurotrofinį efektą; Snyder et al., "Immunophilins and the Nervous System", *Nature Medicine*, Volume 1, No. 1, January 1995, 32-37. Šie atradimai duoda mintį naudoti imunosupresantus įvairių periferinių neuropatijų gydymui ir neuronų ataugimo centrinėje nervų sistemoje (CNS) didinimui. Tyrimai parodė, kad neurodegeneraciniai susirgimai, tokie kaip Alzheimerio liga, Parkinsono liga ir šoninė amiotrofinė sklerozė (ALS) gali kilti dėl neurotrofinių medžiagų,

specifinių tam tikros paveiktų susirgimo neuronų populiacijos atžvilgiu, netekimo arba sumažėjusio kiekio.

Buvo nustatyta keletas neurotrofinių faktorių, veikiančių specifines neuronų populiacijas centrinėje nervų sistemoje. Pavyzdžiui, buvo iškelta hipotezė, kad Alzheimerio liga kyla dėl nervų augimo faktoriaus (NGF) sumažėjimo arba praradimo. Tokiu būdu, buvo pasiūlyta gydyti Alzheimerio ligą egzogeniniu nervų augimo faktoriumi arba kitais neurotrofiniais baltymais, tokiais kaip smegenų kilmės augimo faktoriumi, neuroglijos kilmės augimo faktoriumi, ciliariniu neurotrofiniu faktoriumi ir neurotrofinu-3, siekiant padidinti degeneruojančios neuronų populiacijos išgyvenimą.

Šių baltymų klinikinį pritaikymą įvairioms neurologinių ligų būsenoms trukdo sunkumai dėl didelių baltymų bioprieinamumo ir transporto į norimas nervų sistemos vietas. Priešingai, imunosupresiniai vaistai, pasižymintys neurotrofiniu aktyvumu, yra santykinai maži ir demonstruoja puikų bioprieinamumą bei specifiškumą. Tačiau, skiriant juos pastoviai, imunosupresantai demonstruoja keletą potencialiai rimtų pašalinių efektų, tame tarpe nefrotoksiškumą, tokį kaip glomerulinio filtravimo pablogėjimas ir negrįžtama tarpaudininė fibrozė (Kopp et al., 1991, *J. Am. Soc. Nephrol.* 1:162); neurologinis nepakankamumas, toks kaip nevalingas drebinėjimas, arba nespecifinė smegenų angina, tokia kaip nelokaluoti galvos skausmai (De Groen et al., 1987, *N. Engl. J. Med.* 317:861); ir vaskuliarinė hipertenzija su iš jos kylančiomis komplikacijomis (Kahan et al., 1989, *N. Engl. J. Med.* 321:1725).

Šis išradimas pateikia neimunosupresinius, o taip pat imunosupresinius pipekolino rūgšties darinius, kurie yra mažamolekuliniai FKBP rotamazės inhibitoriai, kurie yra ypač galingi atauginant neuritines ataugas ir skatinant neuronų augimą bei regeneraciją įvairiose neuropatologinėse situacijose, kur gali paskatinti neuronų atsistatymą, įskaitant periferinio nervo pažeidimą, sužeidus fiziniu būdu arba dėl ligos, tokios kaip diabetas, fizinį centrinių nervų sistemos (stuburo ir galvos smegenų) pažeidimą, galvos smegenų pažeidimą,

susijusį su insultu, ir įskaitant neurologinių ligų, susijusių su neurodegeneracija, tokių kaip Parkinsono, Alzheimerio ligos, šoninė amiotropinė sklerozė, gydymą.

### **Išradimo santrauka**

Išradimas susijęs pipekolino rūgšties darinių - junginių, pasižyminčių afiniškumu FKBP tipo imunofilinams ir esančių fermentinio aktyvumo, susijusio su imunofiliniais baltymais, inhibitoriais, ir ypač peptidilprolilo izomerazės arba rotamazės inhibitoriais, panaudojimo būdu.

Išradimo įgyvendinimo būdas, kuriam teikiama pirmenybė, yra gyvūnų neurologinio susirgimo gydymo būdas, apimantis:

pipekolino rūgšties darinio, pasižyminčio afiniškumu FKBP tipo imunofilinams, efektyvaus kiekio skyrimą gyvūnui, siekiant skatinti pažeistų periferinių nervų augimą arba pagreitinti neuronų regeneraciją, kuriame FKBP tipo imunofilinas demonstruoja rotamazinį aktyvumą, o pipekolino rūgšties darinys inhibuoja minėtą rotamazinį imunofilino aktyvumą.

Kitas išradimo įgyvendinimo būdas, kuriam teikiama pirmenybė, yra gyvūnų neurologinio susirgimo gydymo būdas, apimantis:

pipekolino rūgšties darinio, pasižyminčio afiniškumu FKBP tipo imunofilinams, efektyvaus kiekio skyrimą gyvūnui kartu su efektyviu kiekiu neurotrofinio faktoriaus, parinkto iš grupės, susidedančios iš neurotrofinio augimo faktoriaus, smegenų kilmės augimo faktoriaus, neuroglijos kilmės neurotrofinio faktoriaus, ciliarinio neurotrofinio faktoriaus ir neurotrofino-3, siekiant skatinti pažeistų periferinių nervų augimą arba pagreitinti neuronų regeneraciją, kuriame FKBP tipo imunofilinas demonstruoja rotamazinį aktyvumą, o pipekolino rūgšties darinys inhibuoja minėtą rotamazinį imunofilino aktyvumą.

Kitas išradimo įgyvendinimo būdas, kuriam teikiama pirmenybė, yra pažeisto periferinio nervo augimo skatinimo būdas, apimantis:

pipekolino rūgšties darinio, pasižyminčio afiniškumu FKBP tipo imunofilinams, efektyvaus kiekio skyrimą į pažeistus periferinius nervus, siekiant skatinti pažeistų periferinių nervų augimą arba jį pagreitinti, kuriame

FKBP tipo imunofilinas demonstruoja rotamazinį aktyvumą, o pipekolino rūgšties darinys inhibuoja minėtą rotamazinį imunofilino aktyvumą.

Kitas išradimo įgyvendinimo būdas, kuriam teikiama pirmenybė, yra pažeisto periferinio nervo augimo skatinimo būdas, apimantis:

pipekolino rūgšties darinio, pasižyminčio afiniškumu FKBP tipo imunofilinams, efektyvaus kiekio skyrimą į pažeistus periferinius nervus, siekiant skatinti pažeistų periferinių nervų augimą, kuriame FKBP tipo imunofilinas demonstruoja rotamazinį aktyvumą, o pipekolino rūgšties darinys inhibuoja minėtą rotamazinį imunofilino aktyvumą.

Kitas išradimo įgyvendinimo būdas, kuriam teikiama pirmenybė, yra neuronų regeneracijos ir augimo pagreitinimo gyvūnuose būdas, apimantis:

pipekolino rūgšties darinio, pasižyminčio afiniškumu FKBP tipo imunofilinams, efektyvaus kiekio skyrimą gyvūnui, siekiant pagreitinti neuronų regeneraciją, kuriame FKBP tipo imunofilinas demonstruoja rotamazinį aktyvumą, o pipekolino rūgšties darinys inhibuoja minėtą rotamazinį imunofilino aktyvumą.

Dar vienas išradimo įgyvendinimo būdas, kuriam teikiama pirmenybė, yra gyvūnų neurodegeneracijos profilaktikos būdas, apimantis:

pipekolino rūgšties darinio, pasižyminčio afiniškumu FKBP tipo imunofilinams, efektyvaus kiekio skyrimą gyvūnui, siekiant išvengti neurodegeneracijos, kuriame FKBP tipo imunofilinas demonstruoja rotamazinį aktyvumą, o pipekolino rūgšties darinys inhibuoja minėtą rotamazinį imunofilino aktyvumą.

### Trumpas brėžinių aprašymas

**Fig. 1.** FKBP12 ir GAP43 ekspresija veidinio nervo branduolyje po nervo traumos. Hibridizacija *in situ*, palyginant iRNR ekspresijos laikus veidinio nervo branduolyje FKBP12 (kairėje) ir GAP43 (dešinėje) atvejais. Dešinysis veidinis nervas yra toje pačioje pusėje, kur buvo trauma, o kairė pusė yra nepatyrusi poveikio kontrolinė (Fig. 1B). Kairėje: FKBP12 *in situ* hibridizacija nepaveiktoje kontrolėje; dešinėje: kalcineurino A $\alpha$  po 7 dienų nuo nervo traumos.



Eksperimentai pakartoti mažiausiai 3 kartus, gaunant panašius rezultatus.

**Fig. 2.** FKBP12 lokalizacija veido judinamuosiuose neuronuose po nervo traumos. Mikrofotografijos šviesiame fone: FKBP12 *in situ* hibridizacija veidinio nervo branduolių judinamuosiuose neuronuose, 7 dienos po traumos (Fig. 2A) ir kontroliniuose veidinio nervo branduolių judinamuosiuose neuronuose (Fig. 2B).

**Fig. 3.** FKBP12 iRNR reguliacija juosmens stuburo smegenų judinamuosiuose neuronuose po sėdmeninio nervo traumos. Viršutinis vaizdas (Fig. 3A) rodo žemesnės srities juosmens stuburo smegenų priekinės ataugos judinamųjų neuronų atsaką (parodyta strėle). Žemiau parodyta atitinkamų judinamųjų neuronų sankaupos mikrofotografijos šviesiame fone: (Fig. 3B) - kairės pusės, priešingoje pusėje nei nervo trauma; (Fig. 3C) - dešinės pusės, toje pačioje pusėje kaip nervo trauma. Šis eksperimentas pakartotas 3 kartus su panašiais rezultatais.

**Fig. 4.** FKBP ir FKBP12 iRNR indukcija į dorsalinį šaknelės ganglijų po 1 ir 6 savaičių nuo sėdmeninio nervo traumos. Mikrofotografijos tamsiame fone vaizduoja L4 dorsalinio šaknelės ganglijaus toje pačioje pusėje kaip sėdmeninio nervo trauma pjūvius - kairysis vaizdas FKBP *in situ* hibridizacija; dešinysis vaizdas [<sup>3</sup>H] FK506 autoradiografija. Šie rezultatai pakartoti 3 kartus kiekvienam laiko matavimui.

**Fig. 5.** Dešiniojo veidinio nervo pažeidimas ricinu. Nissl dažas (Fig. 5A, apatinis vaizdas) išryškina intensyvių judinamųjų neuronų dešiniajame veidiniame branduolyje išsigimimą ir jį lydintį neuroglijos išvešėjimą po 7 dienų nuo ricino injekcijos į veidinį nervą. FKBP iRNR *in situ* hibridizacija po 7 dienų nuo veidinio nervo/branduolio pažeidimo ricinu parodyta viršutiniame (Fig. 5B). Šis eksperimentas pakartotas 3 kartus su panašiais rezultatais.

**Fig. 6.** [<sup>3</sup>H]FK506 surišimas sėdmeninio nervo segmentuose po 7 dienų nuo traumos. Diagrama iliustruoja paimtus 3 mm segmentus: konstrikcijos parodo perrišimų vietas, padarytas 7 dieną, 6 val. surinkimui, kaip aprašyta eksperimentinėje dalyje. Distalinė perrišimo vieta yra 10 mm proksimaliai nuo

pradinės traumos vietos. FKBP pirmesnis transportavimas yra 124 mm/dieną. Duomenys yra vidurkiai  $\pm$  SEM (standartinė matavimo paklaida) ( $n=3$ ).

**Fig. 7.** FKBP transportas sėdmeniniame nerve. Mikrofotografijos tamsiame fone vaizduoja kontrolinio (nepaveikto) sėdmeninio nervo pjūvius ir 7 d. Sėdmeninio nervo traumos vietą, apdorotą FKBP12 *in situ* hibridizacijai (Fig. 7A, Fig. 7B) ir [ $^3$ H]FK506 autoradiografijai (Fig. 7C, Fig. 7D). Strėlės rodo nervo traumos vietą. Šis eksperimentas buvo pakartotas 3 kartus su panašiais rezultatais.

**Fig. 8.** [ $^3$ H] FK506 surišimo PC12 ląstelėse lygiai, palaikomi esant arba nesant NGF (50 ng/ml).  $n=3$  iekvienam laiko taškui. Stulpeliai vaizduoja SEM.

**Fig. 9.** Imunosupresantų medijuojamas neuritų ataugų PC12 ląstelėse padidėjimas. Hofmano kontrastinės mikrofotografijos (64) kultūrų, augintų 48 val., esant NGF su pridėtu FK506 arba rapamicinu, arba be jų. Fig. 9A: PC12 ląstelės augintos esant 1,0 ng/ml NGF. Fig. 9B: PC12 ląstelės augintos esant 50 ng/ml NGF. Fig. 9C: PC12 ląstelės augintos esant 1,0 ng/ml NGF ir 100 nM FK506. Fig. 9D: PC12 ląstelės augintos esant 1,0 ng/ml NGF ir 100 nM rapamicino. Didinimas 200 kartų.

**Fig. 10.** FK506 įtaka neuritų augimui PC12 ląstelėse. Kultūros paveiktos skirtingomis NGF koncentracijomis, esant arba nesant 100 nM FK506, ir neuritų vystymasis įvertintas po 48 val. Ataugos įvertintos kaip aprašyta Eksperimentinėje dalyje, suskaičiuojant ląsteles su neuritų pakitimais, didesniais nei 5  $\mu$ m.  $n=4$  atskiri eksperimentai kiekvienam taškui, o paklaidų stulpeliai reiškia SEM.

**Fig. 11.** Neuritų ataugų PC12 ląstelėse skatinimo FK506 koncentracijos-atsako priklausomybė. Ląstelės paveiktos 48 val. 1 ng/ml NGF ir skirtingomis FK506 koncentracijomis. Neuritų ataugų atsakas išmatuotas kaip aprašyta Fig. 10 ir Eksperimentinėje dalyje.  $n=4$  atskiri eksperimentai kiekvienam duomenų taškui. \* $P < .001$  Stjudento t teste.

**Fig. 12.** [ $^3$ H] FK506 autoradiografija dorsalinių šaknelės ganglijų eksplantų kultūroje. Po 26 dienų kultivavimo su 100 ng/ml NGF ekstensyvus

procesas pasireiškia su FKBP susijusių sidabro grūdelių gausiu kiekiu. Autoradiografijos grūdeliai panaikinti 1  $\mu$ M nežymėtu FK506.

**Fig. 13.** Dorsalinių šaknelės ganglijų auginimo su įvairiomis medžiagomis kontrastinės fazės mikrofotografijos. Fig. 13A: NGF 100 ng/ml, Fig. 13B: FK506 1  $\mu$ M, Fig. 13C: FK506 1  $\mu$ M ir anti-NGF antikūnas, Fig. 13D: nepridėta augimo faktoriaus, Fig. 13E: FK506 1 pM, Fig. 13F: FK506 1  $\mu$ M ir rapamicinas 1  $\mu$ M. Mastelis: stulpelis - 205  $\mu$ m. NGF sukelia gausų aksonų ataugimą (Fig. 13A), taip pat ir 1  $\mu$ M FK506 (Fig. 13B). FK506 įtaka žymiai sumažėja, sumažinus koncentraciją iki 1 pM (Fig. 13E). Tačiau neuritinės ataugos su 1 pM FK506 yra didesnės, negu jam nesant (Fig. 13D). FK506 įtaka taip pat sumažinama, pridėjus anti-NGF antikūno, siekiant eliminuoti ne neuroninių ląstelių kilmės NGF įtaką. Gausių neuritų, kurie pasireiškia dideliais pluoštais NGF (100 ng/ml) arba 1  $\mu$ M FK506 (Fig. 13B) įtakoje, vaizdas yra baltas, tuo tarpu mažų pluoštelių arba atskirų neuritų vaizdas yra juodas. Ne neuroninės ląstelės, Švano ląstelės ir fibroblastai geriau matomi su 1 pM FK506 (Fig. 13E) arba anti-NGF antikūnu (Fig. 13C), negu su 1  $\mu$ M FK506 (Fig. 13B). Ne neuroninių ląstelių kilmės NGF kultūroje duoda ribotą aksonų ataugimą, matomą nepridėjus jokio augimo faktoriaus (Fig. 13D). Didelis skaičius laužiančių spindulius ne neuroninių ląstelių, matomų baltai, perkloja keletą neuritų (Fig. 13D). Rapamicinas esant FK506 visiškai inhibuoja aksonų ataugas. Mikrofotografijos atspindi 12-30 ganglijų iš kiekvienų eksperimentinių sąlygų. Skirtumai tarp eksperimentų grupių gerai atsikartoja.

**Fig. 14.** FK506 ir rapamicino įtaka į NGF medijuojamą neuritų išplitimą PC12 ląstelėse. PC12 ląstelės (60 persėjimas) veikiamos įvairiomis NGF koncentracijomis arba NGF su 100 nM FK506, 100 nM rapamicino arba 100 nM WAY-124,466. Neuritų ataugos įvertintos po 96 val. ląstelėse, kuriose efektas didesnis negu ląstelių diametras.  $n=3$  atskiri eksperimentai kiekvienam taškui ir paklaidų stulpelis yra SEM.

**Fig. 15.** Pikomolinės FK506 (A) ir rapamicino (B) koncentracijos sustiprina NGF (0,5 ng/ml) sukeltą neuritų išplitimą PC12 ląstelėse. Mažo pasažo PC12 ląstelės veiktos 4 dienas 0,5 ng/ml NGF, esant įvairioms FK506

(□), rapamicino (•) ar WAY-124,466 (o) koncentracijoms. Neuritų ekspresija įvertinta kaip aprašyta aukščiau Fig. 14 atveju. Neuritų gaminimosi lygiai, esant 0,5 ng/ml NGF (pažymėta L) ir 50 ng/ml NGF (pažymėta H) nurodyti palyginimo tikslu.

**Fig. 16.** PC12 ląstelių, veiktų imunofilino ligandais + 0,5 ng/ml NGF arba 50 ng/ml NGF mikrofotografijos.

**Fig. 17.** Imunofilinų ligandai sumažina NGF kiekį, reikalingą sukelti maksimalų neuritų išvystymą viščiuko sensoriniuose ganglijuose. Visi dorsalinio šaknelės ganglijaus eksplantai buvo išskirti iš 9-10 dienos viščiuko embrionų ir kultivuoti Matri geliu padengtose lėkštelėse su L15 terpe plius dideliu kiekiu gliukozės, su 10 % fetalinio veršelio serumo, papildyto 10 μM Ara C penicilino ir streptomicino, 37 °C temperatūroje 5 % CO<sub>2</sub> aplinkoje. Sensoriniai ganglijai buvo veikiami 1 ng/ml NGF, 1 ng/ml NGF plius 100 nM FK506 arba 100 ng/ml NGF 48 val., ir neuronų kitimai buvo skaičiuojami ir fotografuojami.

**Fig. 18.** FK506, rapamicinas ir WAY-124,466 stiprina nuo NGF priklausantį neuritų gaminimąsi sensoriniuose ganglijuose. Viščiuko DRG eksplantai, kultivuoti kaip aprašyta aukščiau Fig. 17 atveju. Į DRG eksplantų kultūras pridėta FK506, rapamicino ir WAY-124,466 (100 nM kiekvieno jų plius arba minus 0,1 ng/ml NGF). Po 48 val. įvertintos neuritinės ataugos ir kultūros nufotografuotos.

**Fig. 19.** 111 pavyzdžio, skatinančio neuritų ataugas viščiuko dorsaliniuose šaknelės ganglijuose, mikrofotografija. Trys vaizdai rodo neuritines ataugas esant 1 pM (kairysis vaizdas), 100 pM (centrinis) ir 100 nM (dešinysis) 111 pavyzdžio junginio koncentracijai.

**Fig. 20.** 17 pavyzdžio, skatinančio neuritų ataugas viščiuko dorsaliniuose šaknelės ganglijuose, mikrofotografija. Trys vaizdai rodo neuritines ataugas esant 1 pM (kairysis vaizdas), 100 pM (centrinis) ir 100 nM (dešinysis) 17 pavyzdžio junginio koncentracijai.

**Fig. 21.** 102 pavyzdžio, skatinančio neuritų ataugas viščiuko dorsaliniuose šaknelės ganglijuose, mikrofotografija. Trys vaizdai rodo

neuritines ataugas esant 1 pM (kairysis vaizdas), 100 pM (centrinis) ir 100 nM (dešinysis) 102 pavyzdžio junginio koncentracijai.

### **Smulkus išradimo aprašymas**

Šio išradimo nauji junginiai - pipekolino rūgšties dariniai yra afiniški FK506 surišamiems baltymams, tokiems kaip FKBP12. Kai išradimo neurotrofiniai junginiai yra surišti su FKBP, nustatyta, kad jie inhibuoja surišto baltymo peptidilprolilo cis-trans izomerazės arba rotamazės aktyvumą ir netikėtai skatina neuritų augimą.

Šio išradimo junginiai gali būti naudojami druskų, sudarytų su neorganinėmis ar organinėmis rūgštimis ir bazėmis, formoje. Tarp tokių rūgščių druskų įeina šios: acetatai, adipatai, alginatai, aspartatai, benzoatai, benzensulfonatai, bisulfatai, butiratai, citratai, kamparatai, kamparsulfonatai, ciklopentanpropionatai, digliukonatai, dodecilsulfatai, etansulfonatai, fumaratai, gliukoheptanoatai, glicerofosfatai, hemisulfatai, heptanoatai, heksanoatai, hidrochloridai, hidrobromidai, hidrojodidai, 2-hidroksietansulfonatai, laktatai, maleatai, metansulfonatai, 2-naftalensulfonatai, nikotinatai, oksalatai, pamoatai, pektinatai, propionatai, sukcinatai, tartratai, tiocianatai, tozilatai ir undekanoatai. Bazių druskos apima amonio druskas, šarminių metalų, tokių kaip natriis ir kalis, druskas, šarminių žemės metalų, tokių kaip kalcis ir magnis, druskas, druskas su organinėmis bazėmis, tokias kaip dicikloheksilamino druskos, N-metil-D-glutamino, ir druskos su aminorūgštimis, tokiomis kaip argininas, lizinas ir t.t. Taip pat, bazinės azotą turinčios grupės gali būti pervestos į ketvirtinį pavidalą su tokiais agentais kaip žemesniųjų alkilų halogenidai, tokie kaip metilo, etilo, propilo ir butilo chloridai, bromidai ir jodidai; dialkilsulfatais, tokiais kaip dimetilo, dietilo, dibutilo ir diamilo sulfatai, ilgos grandinės halogenidais, tokiais kaip decilo, laurilo, miristilo ir stearilo chloridai, bromidai ir jodidai, arilalkilo halogenidais, tokiais kaip benzilo ir fenetilo bromidai ir kitais. Tokiu būdu gaunami vandenyje arba aliejuje tirpstantys arba disperguojami produktai.

Šio išradimo neurotrofiniai junginiai gali būti periodiškai skiriami pacientui, gydomam nuo neurologinių susirgimų arba dėl kitų priežasčių, dėl kurių naudinga stimuliuoti neuronų regeneraciją ir augimą, tokių kaip įvairūs periferiniai neuropatiniai ir neurologiniai susirgimai, susiję su neurodegeneracija. Šio išradimo junginiai taip pat gali būti skiriami kitiems žinduoliams, ne žmonėms, įvairių neurologinių susirgimų gydymui.

Šio išradimo nauji junginiai yra stiprūs rotamazės aktyvumo inhibitoriai ir pasižymi puikiu neurotrofiniu aktyvumu. Šis aktyvumas yra naudingas stimuliuojant pažeistus neuronus, padedant neuronų regeneracijai, užkertant kelią neurodegeneracijai ir gydant keletą neurologinių ligų, kurios, yra žinoma, susijusios su neuronų degeneracija ir periferinėmis neuropatijomis. Neurologiniai susirgimai, kurie gali būti gydomi, apima šiuos susirgimus, bet jais neapsiriboja: trišakio nervo neuralgija, liežuvio-ryklės neuralgija, Belio paralyžius, miastenija, raumenų distrofija, šoninė amiotrofinė sklerozė, progresuojanti raumenų atrofija, progresuojanti paveldėta bulbarinė raumenų atrofija, susijęs su išvarža, trūkiu ar prolapsu stuburo disko sindromas, kaklo slankstelio irimas, rezginio susirgimai, torakalinio iškrypimo sindromas, periferinės neuropatijos, tokios, kaip neuropatijos, sąlygotos švino, dapsono, erkių, porfirijos arba Gijeno-Bare sindromas, Alzheimerio liga ir Parkinsono liga.

Tokiu tikslu šio išradimo junginiai gali būti skiriami peroraliai, parenteraliai, inhaliaciniu purškimu, vietiniu būdu, rektaliai, per nosį, per burną, vaginaliai arba per implantuotą rezervuarą dozuotomis vaistų formomis, turinčiomis įprastinių netoksiškų farmaciškai priimtinių nešiklių, pagalbinių medžiagų ir skiediklių. Čia vartojamas terminas "parenteraliai" apima įvedimo po oda, į veną, į raumenis, intraperitoniškai, į nugaros smegenų dangalą, intraventrikuliariai, intrasternaliai ir intrakranialiai injekcijomis arba infūzijomis metodiką.

Kad terapiškai efektyviai veiktų centrinę nervų sistemą, imunofilino-vaisto kompleksas turėtų lengvai prasiskverbti pro hemato-encefalinį barjerą, paskyrus juos periferiniu būdu. Šio išradimo junginiai, kurie negali prasiskverbti

pro hemato-encefalinį barjerą, gali būti sėkmingai skiriami intraventrikuliariniu būdu.

Farmacinės kompozicijos gali būti sterilių injekuojamų preparatų pavidale, pavyzdžiui, sterilios injekuojamos vandeninės arba aliejinės suspensijos pavidale. Ši suspensija gali būti paversta į vaisto formą pagal žinomas toje srityje metodikas, naudojant tinkamus disperguojančius arba drėkinančius ir suspenduojančius agentus. Sterilūs injekuojami preparatai taip pat gali būti sterilūs injekuojami tirpalai arba suspensijos netoksiškuose parenteraliai tinkamuose skiedikliuose ar tirpikliuose, pavyzdžiui, kaip tirpalai 1,3-butandiolyje. Tarp priimtinių skiediklių ir tirpiklių, kurie gali būti vartojami, yra vanduo, Ringerio tirpalas ir izotoninis natrio chlorido tirpalas. Be to, sterilūs nelakūs aliejai paprastai naudojami kaip tirpikliai ar suspenduojanti terpė. Šiuo tikslu gali būti naudojamas bet kuris švelnus nelakus aliejus, įskaitant sintetinius mono- ar digliceridus. Riebalų rūgštys, tokios kaip oleino rūgštis ir jos gliceridai, naudojami injekuojamuose preparatuose, alyvų ir ricinų aliejus, ypač polietoksilintoje formoje. Šie aliejaus tirpalai ar suspensijos gali turėti ilgos grandinės alkoholį kaip skiediklį ar disperguojantį agentą.

Junginiai gali būti skiriami peroraliai, pavyzdžiui kapsulių ar tablečių pavidale, arba vandeninės suspensijos arba tirpalo pavidale. Tablečių peroraliniam naudojimui atveju nešiklis, kuris paprastai vartojamas, apima laktozę ir kukurūzų krakmolą. Tipiniu atveju taip pat įdedama tepančio agento, tokio kaip magnio stearatas. Peroraliniam vartojimui kapsulių forma, naudingas skiediklis apima laktozę ir sausą kukurūzų krakmolą. Kai peroraliniam vartojimui reikia vandeninės suspensijos, aktyvus ingredientas derinamas su emulsikliais ir suspenduojančiais agentais. Jei pageidautina, tam tikri saldikliai ir/arba kvapiosios ir/arba dažančios medžiagos gali būti pridedamos.

Šio išradimo junginiai taip pat gali būti skiriami žvakučių pavidale rektaliniam vaisto įvedimui. Tos kompozicijos gali būti pagamintos maišant vaistą su tinkamu neerzinančiu užpildu, kuris yra kietam pavidale kambario temperatūroje, bet skystas rektalinėje temperatūroje ir todėl gali išsilydyti

tiesiojoje žarnoje, išlaisvindamas vaistą. Tokios medžiagos apima kakavos sviestą, bičių vašką ir polietilenglikolius.

Šio išradimo junginiai taip pat gali būti skiriami optiškai, ypač tais atvejais, kai gydymo reikalinga vieta apima sritis arba organus, lengvai pasiekiamus, skiriant vietiniu būdu, įskaitant akies neurologinius susirgimus, odą ir apatinį virškinimo traktą. Tinkamos vietinio vartojimo vaistų formos yra nesunkiai pagaminamos kiekvienai tų sričių.

Oftalmologiniam vartojimui junginiai gali būti pavidale mikrono dydžio dalelių suspensijos izotoniniame, steriliame, su suderintu pH natrio chlorido tirpale, tiek turinčiame, tiek neturinčiame prezervantų, tokių kaip benzalkonio chloridas. Alternatyviai, oftalmologiniam vartojimui junginiai gali būti tepalo formoje, tokio kaip vazelinai.

Panaudojant vietiniu būdu odai, junginiai gali būti formoje tinkamo tepalo, turinčio junginį, suspenduotą arba ištirpintą viename iš šių medžiagų: mineralinėje alyvoje, skystame vazeline, baltame vazeline, propilenglikolyje, polioksietilene, polioksipropilene, emulsuojančiame vaške ir vandenyje. Alternatyviai, junginiai gali būti tinkamo losjono arba kremo formoje, turinčioje aktyvų junginį suspenduotą arba ištirpintą, pavyzdžiui, mišinyje iš vieno ar daugiau šių medžiagų: mineralinės alyvos, sorbitano monostearato, polisorbato 60, cetilo esterių vaško, cetearilo alkoholio, 2-oktildodekanolio, benzilo alkoholio ir vandens.

Vietinis vartojimas žemesniajam virškinimo traktui gali būti įgyvendintas rektalinės žvakutės vaisto formoje (žiūr. aukščiau), arba tinkamoje klizmos vaisto formoje.

Aukščiau paminėtų susirgimų gydymui tinkami dozių dydžiai yra intervale nuo 0,1 mg iki 10 000 mg aktyvaus ingrediento junginio, teikiama pirmenybė dydžiams nuo 0,1 mg iki 1000 mg. Aktyvaus ingrediento kiekis, kuris gali būti derinamas su nešiklio medžiagomis, kad sudarytų vienos dozės formą, skirsis priklausomai nuo gydomo paciento ir tam tikro skyrimo būdo.

Tačiau suprantama, kad specifinis dozės kiekis bet kuriam konkrečiam pacientui priklausys nuo įvairių faktorių, įskaitant tam tikro vartojamo junginio



aktyvumą, paciento amžių, kūno svorį, bendrą sveikatos būklę, lytį, dietą, vartojimo laiką, pašalinimo iš organizmo greitį, vaistų derinį ir nuo gydomos ligos rimtumo bei vaisto formos.

Junginiai gali būti skiriami su kitais neurotrofiniais agentais, tokiais kaip neurotrofinis augimo faktorius (NGF), neuroglijos kilmės augimo faktorius, smegenų kilmės augimo faktorius, ciliarinis neurotrofinis faktorius ir neurotrofinas-3. Kitų neurotrofinių vaistų dozės kiekis priklausys nuo aukščiau išvardintų faktorių ir vaistų derinio neurotrofinio efektyvumo

### **Eksperimentinė dalis**

#### **Sėdmeninio nervo trauma.**

Šis pavyzdys rodo didelius FKBP kiekius normaliaame periferiniame nerve ir tai, kaip tie kiekiai didėja po nervo traumos.

Jei FKBP būtų fiziologiškai susijęs su neuroninio proceso išplitimu veikiant GAP43, tuomet galima būtų numatyti pagrindinius FKBP kiekius periferiniame nerve. Atitinkamai, mes išmatavome [<sup>3</sup>H]FK506 surišimą žiurkės sėdmeniniame nerve, taip pat augimo kolbelėse, išskirtose iš 2 dienų amžiaus žiurkiukų, ir palyginome su dydžiais iš smegenų žievės ir keleto periferinių audinių.

[<sup>3</sup>H]FK506 autoradiografija atlikta kaip aprašyta, nefiksuotuose pjūviuose, kurie atitirpinti ir išdžiovinti ore prieš inkubuojant juos 1 val. buferyje, susidedančiame iš 50 mM Hepes, 2 mg/ml jaučio serumo albumino, 5 % etanolio ir 0,02 % Tween 20, pH 7,4. Po to pjūviai veikiami 1 nM [<sup>3</sup>H]FK506 (86,5 Ci/mMol; DuPont-NEN, Boston, MA) 1 val. kambario temperatūroje ankstesnio inkubavimo buferyje. Nespecifinis surišimas nustatytas pridedant 1 μM FK506. Po inkubacijos, plokštelės praplautos 4x5 min. lediniame ankstesnio inkubavimo buferyje ir išdžiovinamos ore. Radioaktyviai pažymėti pjūviai sustatyti greta su tričiui jautriais filmais arba plokštelėmis, padengtomis Kodak NTB-2 emulsija.

## 1 LENTELĖ

[<sup>3</sup>H] FK506 surišimas sėdmeniniame nerve ir augimo kolbelėse(A) [<sup>3</sup>H] FK506 surišimas sėdmeniniame nerve

| Audinys            | B <sub>max</sub><br>(pmol/mg baltymo) |
|--------------------|---------------------------------------|
| Suaugusi žiurkė    |                                       |
| Sėdmeninis nervas  | 22,1                                  |
| Smegenų žievė      | 38,0                                  |
| Užkrūtis           | 9,5                                   |
| Blužnis            | 8,0                                   |
| Naujagimė žiurkė   |                                       |
| Priekinės smegenys | 25,5                                  |
| Augimo kolbelės    | 10,2                                  |

(B) [<sup>3</sup>H] FK506 surišimas po sėdmeninio nervo traumos

| baltymas            | B <sub>max</sub><br>fmol/5 mm segmentą | B <sub>max</sub><br>pmol/mg |
|---------------------|----------------------------------------|-----------------------------|
| Nepaveiktas         | 31,8 ± 2,1                             | 21,2 ± 1,4                  |
| 7 dienos po traumos | 136,5 ± 15,7*                          | 40,1 ± 2,0*                 |

[<sup>3</sup>H] FK506 surišimas buvo tirtas kaip aprašyta eksperimentinėje dalyje. 1A lentelės eksperimentai buvo pakartoti 3 kartus su mažesniu nei 10 % išsibarstymu. 1B lentelėje dydžiai pateikti kaip vidurkiai ±SEM (n = 3). \*P ≤ 0,05 Stjudento t-teste nepriklausomoms reikšmėms.

Iš visų tirtų audinių, surišimo reikšmės sėdmeniniame nerve yra didžiausios, kažkiek didesnės negu smegenų žievėje ir 10 kartų didesnės, negu reikšmės užkrūčio liaukoje ir blužnyje, kurie turi asocijuotą su limfocitais FKBP (žiūr. 1A lentelę).

Apie FKBP vaidmenį nervo regeneracijoje sprendžiama iš eksperimentų, kuriuose sužalojome suaugusios žiurkės sėdmeninį nervą ir po 7 dienų

išmatavome [ $^3\text{H}$ ]FK506 surišimą 5 mm segmentuose proksimaliai nuo traumos vietos.

Sprague-Dawley žiurkės (175-200 g) anestezuotos Rompun (12 mk/kg) ir Ketamino (50 mg/kg) mišiniu. Naudojant aseptines metodikas, veidinis nervas sužalotas juvelyrinėmis replėmis 2x30 s per 2 mm distaliai nuo jo išėjimo iš ylinio spenelio angos. Tokia pati procedūra naudota sėdmeninio nervo sužalojimui vidinėje šlaunies pusėje.

Visas surišimas segmente, proksimaliame nuo traumos vietos buvo keturis kartus didesnis, palyginus su kontroliais dydžiais. Nors bendras baltymo kiekis proksimaliame segmente yra žymiai padidintas, [ $^3\text{H}$ ]FK506 surišimas/mg baltymo proksimaliame segmente yra tik dvigubai didesnis.

#### **Veidinio nervo trauma.**

Šis pavyzdys rodo, kad veidinio nervo pažeidimai didina vienu metu vykstančią FKBP ir GAP43 ekspresiją.

Po veidinio nervo traumos veidinio nervo branduolyje padidėja GAP43 iRNR kiekis. Naudojant *in situ* hibridizaciją, mes ištyrėme iRNR FKBP, GAP43 ir kalcineurino kiekius po veidinio nervo traumos.

Žiurkėms atlikta perfuzija 150-200 ml ledinio fosfatinio buferio (PBS) (0,1 M, pH 7,4). Audiniai išpjauti ir nedelsiant atšaldyti izopentane (-80 °C). Išpjauti kriostatuoti pjūviai (18  $\mu\text{m}$  storio) ir atitirpinus patalpinti ant želatina padengtų plokštelių.

*In situ* hibridizacija atlikta kaip anksčiau aprašyta, naudojant antiprasmės oligonukleotidinius zondus, gale pažymėtus [ $^{35}\text{S}$ ]dATP. FKBP atveju buvo panaudoti trys atskiri oligonukleotidai, komplementarūs šioms klonuotos kDNR, aprašytos Maki et al., (1990) *Proc. Natl. Acad.-Sci. USA* 87, 5440-5443, ir Standaert, R.F., et al. (1990) *Nature* 346, 671-674, kurie įtraukti čia kaip nuorodos, sritys: 70-114, 214-258, 441-485. GAP43 atveju buvo naudoti trys antiprasmės oligonukleotidai, komplementarūs 961-1008, 1081-1128, 1201-1248 klonuotos kDNR nukleotidams, kuri aprašyta Rosenthal A., et al., (1987) *EMBO J.* 6, 3641-3646; įtraukta čia kaip nuoroda. Kalcineurino A $\alpha$  atveju buvo

naudoti antiprasmės oligonukleotidai, komplementarūs 1363-1410 ir 1711-1758 nukleotidams, aprašytiems Ito et al., (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163, 1492-1497, įtraukta čia kaip nuoroda, ir kalcineurino Aβ atveju - oligonukleotidai 1339-1386 ir 1569-1616, aprašyti Kuno T., et al. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 165, 1352-1358, įtraukta čia kaip nuoroda. Pjūviai atitirpinti ir palikti išdžiūti, po to fiksuojami 5 min. šviežiai depolimerizuotame 4 % paraformaldehide PBS. Du kartus perplovus PBS, pjūviai acetilinti 0,25 % acto rūgšties anhidridu 0,1 M trietanolamine ir 0,5 % NaCl (pH 8,0), po to dehidratuojami alkoholiuose, nuriebinami chloroforme 5 min., rehidratuojami 95 % etanolyje ir paliekami džūti ore. Hibridizacija vyksta per naktį 37 °C temperatūroje buferyje, turinčiame 50 % dejonizuoto formamido, 10 % dekstrano sulfato, 4xSSC, 1 x Denhardt'o tirpalo, 20 mM fosfatinio buferio, 0,1 mg/ml lašišos spermos DNR, 0,1 mg/ml mielių pernešimo DNR, 10 mM ditiotreitolio, 2,0 % beta-merkaptoetanolio (BMD), 1,0 mM EDTA ir pažymėtą probą (2000000 dpm/pjūviui). Po hibridizacijos pjūviai perplaunami 1 x SSC, 1,0 % BME 15 min. kambario temperatūroje, po to du kartus po 10 min. 55 °C temperatūroje, išdžiovinami ore ir dedami ant juostos arba įmerkiami į Kodak NTB-2 emulsiją.

Stebimas netikėtas FKBP ir GAP43 ekspresijos padidėjimas, tuo tarpu jokių pakitimų nestebima kalcineurino ekspresijoje. Kaip ir po 24 val. nuo veidinio nervo traumos, FKBP ekspresija yra padidėjusi kiekiu, matomu ir po 1-2 savaičių, tuo tarpu iRNR koncentracijos žymiai sumažėja po 3 savaičių. Tyrimas esant stipresniam didinimui atskleidė, kad padidėję sidabro grūdelių kiekia iRNR FKBP atveju yra apsprendti neuroninėmis ląstelėmis (Fig. 2). Atskirtų veidinių branduolių Nothérn blot analizė patvirtina padidėjusius FKBP iRNR kiekius. GAP43 iRNR kiekiai kinta laike labai panašiai kaip FKBP. Priešingai, nepastebėta jokių pakitimų nė vienu tirtu laiko momentu kalcineurino ekspresijoje.

Išskirta visa ląstelių RNR iš atskirtų veidinių branduolių. Atlikta RNR 10 arba 20 µg pavyzdžių elektroforezė 1 % agarozės, 2,0 % formaldehido gelyje ir perkelta ant nailono membranos 10 nM NaOH. KDNR probos FKBP, pažymėto

[<sup>35</sup>S]dCTP, specifinis aktyvumas  $1 \times 10^9$  cpm/ $\mu$  atsitiktiniu praimingu hibridizuotos per naktį 42 °C temperatūroje buferyje, susidedančiame iš 50 % formamido, 2 x SSPE, 7 % SDS, 0,5 % Blotto ir 100  $\mu$ g/ml lašišos spermos DNR. Dėmės praplautos 20 min. kambario temperatūroje ir 2 x 15 min 65 °C temperatūroje 0,15 x SSC, 0,15 % SDS tirpalu ir po to eksponuojama į juostą 48096 val.

Nesužeistoje pusėje stebimas nežymus sidabro grūdelių pagausėjimas palyginus su kontroliniais pjūviais. Tai suderinama su aiškinimais, kad kontralateralūs neuronai taip pat reaguoja į aksotomiją.

Po veidinio nervo traumos žiurkėms išsivysto nervo paralyžius, matomas iš ūsų judinimo nebuvimo, kas funkciškai atsistato per 3 savaites, kartu su nervo regeneracija. Mūsų žiurkėse mes irgi stebėjome ūsų judinimo nebuvimą po nervo traumos, atgaunant šią funkciją per 3 savaites. Taigi, GAP43 ir FKBP ekspresijos padidėjimas laike koreliuoja su nervo regeneracijos procesu.

### **Sėdmeninio nervo regeneracija.**

Šis pavyzdys FKBP ir GAP43 kiekio padidėjimą, susijusį su sėdmeninio nervo regeneracija.

Po sėdmeninio nervo sužeidimų iRNR GAP43 kiekiai yra padidėję tiek nugaros smegenų judinamuosiuose neuronuose, tiek dorsalinių šaknelių ganglijų neuroninėse ląstelėse. Žiurkėse, kurios turėjo sėdmeninio nervo traumą, mes stebėjome nepaprastą iRNR FKBP kiekio padidėjimą judinamuosiuose neuronuose ties L-4, 5 (Fig. 3) ir dorsalinių šaknelių ganglijų neuroninėse ląstelėse, kartu su aprašytu GAP43 ekspresijos padidėjimu (Fig. 4). Esant stipriam didinimui, mes stebėjome iRNR FKBP sidabro grūdelius, lokalizuotus neuronų ląstelių kūne (Fig. 3). Mes stebėjome FKBP baltymo kiekius pagal [<sup>3</sup>H]FK506 surišimo autoradiografiją sąlygose, kai jis selektyviai susiriša su FKBP (Fig. 4). Padidėjęs FKBP kiekis nustatomas pirmiausia sensoriniuose neuronuose dorsalinių šaknelių ganglijuose, nors nepastebima jokio padidėjimo judinamųjų neuronų ląstelėse po sėdmeninio nervo traumos.

Padidėjusios FKBP ekspresijos ryšį su regeneracija toliau palaiko eksperimentai su ricinu. Injektuotas į periferinį nervą, ricinas transportuojamas atgal į somatinę ląstelę, kuri suardoma be susijusio nervo regeneracijos. Mes injekuojame 0,5 µg ricino (RCA 60, Sigma, St. Louis, MO) 0,5 µl PBS ir 0,1 % Fast Green į veidinį nervą toje pačioje vietoje, kur padaryta trauma, kituose eksperimentuose pagal Streit ir Kreutzberg metodiką; Treit et al., (1988) *J. Comp. Neurol.* 268, 248-263.

Mes įvykdėme *in situ* hibridizacijos lokalizacijos tyrimus iRNR FKBP atžvilgiu po 2, 4 ir 7 dienų paveikus ricinu (Fig. 5). Nepastebėta jokio FKBP iRNR kiekio padidėjimo po veikimo ricinu ir nervo traumos. Tai, kad paveikus ricinu nevyksta iRNR FKBP padidėjimas, sutampa su iRNR FKBP selektyvia neuronine lokalizacija veidiniuose branduoliuose.

#### **FKBP transportas sėdmeniniame nerve.**

Šis pavyzdys rodo, kad FKBP greitai transportuojamas sėdmeniniame nerve.

Tai, kad po sėdmeninio nervo traumos FKBP baltymo kiekis nepadidėja nepaisant FKBP iRNR padidėjimo, rodo, kad baltymas greitai transportuojamas iš ląstelės kūno į nervinius procesus. Tai sutampa su mūsų ankstesniais pastebėjimais, kad FKBP iRNR sukoncentruota smegenėlių ląstelių granulėse, tuo tarpu FKBP baltymo kiekiai sukoncentruoti molekuliniame lygyje smegenėlėse susiję su paraleliais pluoštais, kylančiais iš granulinių ląstelių. Kad ištirtume galimą FKBP transportą, mes traumavome sėdmeninį nervą ir po 7 dienų padarėme ligatūras 10 ir 20 mm proksimaliai nuo traumos vietos. Po 6 val. mes stebėjome [<sup>3</sup>H]FKBP surišimą 3, mm segmentuose apimančiuose ligatūrų plotą (Fig. 6).

Aksonų transporto tyrimuose naudota klasikinė ligatūrų metodika pagal Tetzlaff et al. Po savaitės padarytos dvi surinkimo ligatūros (510 siūlų) nerve per apytikriai 10 mm, išskyrus distaliai labiausiai nutolusią ligatūrą, padarytą 10 mm proksimaliai nuo pradinės traumos vietos. Po 6 val. paimti 5-3 mm nervo segmentai iš sričių proksimaliai, distaliai ir viduje ligatūrų, kaip parodyta Fig. 5.

Nervo segmentai paruošti [ $^3\text{H}$ ]FKBP surišimo tyrimui, homogenizuojant juos 10 tūrių 50 mM Tris-HCl, pH 7,4. Homogenatai centrifuguoti 15 000 x g 20 min. 4 °C temperatūroje, supernatantas atskirtas ir nustatyta bendra baltymo koncentracija, naudojant Kumasi mėlio surišimo metodiką (Pearce). [ $^3\text{H}$ ]FKBP surišimas įvykdytas kaip aprašyta (4) alikvuotose, turinčiose 2 µg bendro tirpaus baltymo galutiniame tyrimo tūryje 0,4 ml buferio, susidedančio iš 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 2 mg/ml jaučio serumo albumino, 250 pM [ $^3\text{H}$ ]FK506 ir skirtingų nežymėto FK506 koncentracijų. Po 60 min. inkubacijos 25 °C temperatūroje, 0,35 ml praleista per 0,8 ml LH-20 Sephadex (Pharmacia LKB) kolonėlę ir praplauta 0,4 ml tyrimo buferio. Eliuatai surinkti ir įvertinti scintiliaciniame skaitiklyje.

Rezultatai pateikti Fig. 5. [ $^3\text{H}$ ]FK506 surišimo kiekiai yra didžiausi segmentuose, proksimaliai nuo ligatūros 20 cm nuo traumos vietos, jie yra maždaug keturis kartus didesni negu kituose segmentuose. [ $^3\text{H}$ ]FK506 surišimo kiekių segmentuose A-D pagrindu mes apskaičiavome FKBP transporto greitį. Šis 240 mm per dieną greitis yra iš esmės toks pat kaip GAP43 transporto greitis, atstovaujantis didžiausią neurono baltymo transporto greitį.

FKBP susikaupimo po nervo traumos vizualizavimui mes naudojome laisvą ligatūrą sėdmeninio nervo traumos vietos pažymėjimui ir atlikome *in situ* hibridizaciją FKBP iRNR bei autoradiografiją [ $^3\text{H}$ ]FK506 surišimui (Fig. 7). Didžiausias FKBP ir [ $^3\text{H}$ ]FK506 surišimo kiekis susirenka iškart proksimaliai nervo traumos atžvilgiu. Šie kiekiai yra žymiai didesni negu kontroliniame nepatyrusiame traumos sėdmeniniame nerve. Tiriant *in situ* hibridizaciją, esant dideliame stiprinimui autoradiografijos preparatuose parodo sidabro grūdelius, susijusius su neuronų pluoštais. Taip pat yra sidabro grūdelių, kurių identiteto mes negalėjome galutinai nustatyti, taigi jie galėtų atspindėti Švano ląsteles, makrofagus ar fibroblastus.

#### **FKBP PC12 ląstelėse.**

Šis pavyzdys rodo, kad PC12 ląstelėse yra FKBP ir jo kiekius didina nervų augimo faktorius. Mes tyrėme PC12 ląsteles dėl FKBP buvimo,

stebėdami [ $^3\text{H}$ ]FK506 surišimą ląstelėse bazinėse sąlygose ir apdorojus nervų augimo faktoriumi (NGF).

FKBP kiekiai PC12 ląstelėse nustatyti iš [ $^3\text{H}$ ]FK506 surišimo kreivių Sketčardo (Scatchard) analizės duomenų. Kultūros nukrapštytos nuo sienelių ir homogenizuotos 10 tūrių 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 1 mM EDTA, 100  $\mu\text{g/ml}$  fenilmetilsulfonilfluorido, ir centrifuguota 40 000 x g 20 min. 4 °C temperatūroje. Baltymas nustatytas pagal Kumasi mėlio surišimo testą, naudojant jaučio serumo albuminą kaip standartą. Pavyzdžiams, turintiems 5  $\mu\text{g}$  tirpaus baltymo galutiniame 0,4 ml tūryje tyrimo buferio, turinčio 50 mM Tris-HCl, pH 7,7, 2 mg/ml BSA ir kintamas nežymėto FK506 koncentracijas, nustatyta 250 pM [ $^3\text{H}$ ]dihidro FK506 surišimas (86,5 Ci/mmol, DuPont/NEN). Po 60 min. inkubavimo 25 °C temperatūroje, 0,35 ml praleista per 0,8 ml LH-20 Sephadex (Pharmacia LKB) kolonėlę, prieš tai supusiausvyrintą tyrimo buferiu. Toliau kolonėlė praplauta 0,4 ml tyrimo buferio, eliuatai surinkti, sumaišyti su Formula 963 (DuPont/NEN) ir įvertinti Beckman scintiliaciniu skaitikliu. Specifinis surišimas nustatytas iš bendro surišto [ $^3\text{H}$ ]FK506 kiekio atėmus surišimą, gautą esant 1  $\mu\text{M}$  nežymėto FK506.

Rezultatai pateikti Fig. 8. [ $^3\text{H}$ ]FK506 susiriša iki prisotinimo su nepaveiktų PC12 ląstelių homogenatu. Tipiniuose eksperimentuose yra surišta apie 1000 cpm, tuo tarpu nespecifinis surišimas esant 1  $\mu\text{M}$  FK506 yra apie 150 cpm. [ $^3\text{H}$ ]FK506 surišimo penkiasdešimt procentų inhibicija, pasireiškianti su 1-2 nM FK506 rodo, kad surišimo vietos atitinka autentišką FKBP. Paveikus NGF, [ $^3\text{H}$ ]FK506 surišimas žymiai padėja. Žymus padidėjimas matomas 10-15 val. Surišimas padidėja trigubai po 20 val., ir toliau saikingas didėjimas stebimas 100 val.

#### **Padidėjęs neuritų išplitimas PC12 ląstelėse.**

Šis pavyzdys rodo, kad FK506 ir rapamicinas didina neuritų ekspresiją PC12 ląstelėse.

PC12 ląstelės laikomos 37 °C temperatūroje 5 %  $\text{CO}_2$ , Dulbecc'o terpėje, modifikuotoje Eagle (DMEM), papildytoje 10 % kaitinimu inaktyvuoto arklio



serumo ir 5 % kaitinimu inaktyvuoto fetalinio veršelio serumo. Diferencijuojant NGF, ląstelės išsėjamos po  $1 \times 10^5$  35 mm lėkštelėse, padengtose žiurkės uodegos kolagenu  $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ir leidžiama prikibti, prieš pakeičiant terpę DMEM, papildyta 2 % fetalinio veršelio serumo, NGF ir/arba FK506 ar rapamicinu. Neuritinių ataugų įvertinimui padarytos atsitiktinės fotografijos (3-4 lėkštelei) ir įskaityti tie neuritų pakitimai, kur pakitimai didesni nei  $5 \mu\text{m}$ . Eksperimento sąlygos buvo nežinomos fotografui ir ląstelių skaičiuotojui. Atlikti keturi atskiri eksperimentai, dukart pakartojant kiekvieną duomenų tašką. Neuritai identifikuoti ir suskaičiuoti iš apytikriai 100 ląstelių fotografijai. Tokiu būdu, duomenų taškui suskaičiuota neuritų iš 1200-1600 ląstelių.

Pastebėta, kad NGF stipriai skatina neuritų ataugimą, pusė maksimalaus skatinimo, esant 1 ng/ml ir maksimalus pagausėjimas, esant 50-100 ng/ml (Fig. 9, 10). FK506 (100 nM) žymiai padidina NGF įtaką, sustiprindamas jautrumą NGF. Tokiu būdu, FK506 20-50 kartų sumažina NGF koncentraciją, reikalingą išgauti maksimaliam ataugimui. Pusė maksimalaus ataugimo, nesant FK506, pasireiškia su 5 ng/ml, o esant FK506 su 0,1 ng/ml. Esant maksimalioms NGF koncentracijoms FK506 negamina papildomų neuritinių ataugų.

FK506 ypač stipriai pasireiškia savo neurotrofine įtaka. Esant submaksimalioms NGF koncentracijoms (1 ng/ml), FK506 su 1 nM iššaukia tokį patį maksimalų ataugimą, kaip stebima su 50 ng/ml NGF (Fig. 11). Pusė maksimalaus FK506 efekto pasireiškia su apytikriai 100 pM. Nesant NGF, FK506 neiššaukia neuritinių ataugų susidarymo (Fig. 10).

Rapamicinas yra stiprus imunosupresantas, kuris, manoma, veikia ne per kalcineuriną, bet kuris gali įtakoti kitas fosforilinimo reakcijas. Rapamicinas stipriai blokuoja FK506 veikimą, kas pasireiškia per FKBP ir kalcineuriną, tikriausiai veikiant kaip FK506 antagonistas su FKBP. Rapamicinas ( $1 \mu\text{M}$ ) neblokuoja FK506 neurotrofinio veikimo. Vietoj to, rapamicinas pats veikia neurotrofiškai, skatindamas pagrindinai neuritų ataugas su 1 nM. Atrodo, kad rapamicinas ir FK 506 veikia per skirtingus mechanizmus. Taigi, rapamicinas padidina ataugų skaičių ir jų ilgį, tuo tarpu FK506 pirmiausia didina neuritų ilgį. Be to, pasirodo, kad FK506 įtaka yra adityvi.

### Dorsalinių šaknelių ganglijai (DRG).

Šis pavyzdys rodo, kad FK506 veikia neuritrofiškai sensorinius ganglijus. Mes tyrėme FK506 įtaką dorsalinių šaknelių ganglijų iš 16 dienų žiurkės embriono pirminėms kultūroms.

E16 stadijos embrionai pašalinti iš vaikingų Sprague-Dawley žiurkių ir išpreparuoti dorsalinių šaknelių ganglijai. Viso ganglijaus eksplantai kultivuoti kolagenu padengtose 35 mm lėkštelėse (Falcon), naudojant N2 terpę (Dulbecco'o modifikuota Eagle terpė ir Ham'o terpė, sumaišytos 1:1 ir papildytos progesteronu, selenu, insulinu, putrescinu, gliukoze ir penicilinu-streptomycinu) 37 °C temperatūroje 15 % CO<sub>2</sub> aplinkoje. Sensoriniai ganglijai paveikti įvairiomis NGF ir/arba FK506 arba rapamicino arba anti-NGF antikūno koncentracijomis. Ganglijai buvo stebimi kas 2-3 dienas kontrastinėje fazėje, naudojant Olympus IMT-2 mikroskopą, ir buvo matuojamas aksonų ilgis. Kiekvieno ganglijaus aksonų plotas padalintas į keturias dalis, kiekviename ketvirtadalyje mikrometru išmatuotas ilgiausių aksonų ilgis mikronais. Šių matavimų vidurkis laikomas ganglijaus aksono ilgiu.

[<sup>3</sup>H]FK506 autoradiografijai dorsalinių šaknelių ganglijų kultūros auginamos ant kameros plokštelių, padengtų kolagenu, 5 μg/cm<sup>2</sup>. Kultūros fiksuojamos ant plokštelių ledu atšaldytu 4,0 % šviežiai depolimerizuotu paraformaldehidu 0,1 M natrio fosfato buferyje, pH 7,4 1 val., po to du kartus praplaunama fosfatinio buferiu. Fiksuotos kultūros pažymėtos [<sup>3</sup>H]FK506, prieš tai inkubuojant plokšteles buferyje, susidedančiame iš 50 mM Hepes, 2 mg/ml jaučio serumo albumino, 0,02 % Tween-20 pH 7,4. Po to buvo inkubuojama tokia pačia tyrimo buferyje, turinčiame 1 nM [<sup>3</sup>H]FK506. Nespecifinis surišimas nustatytas, pridedant 1 μM nežymėto FK506. Po to plokštelės plautos 4 x 5 min., išdžiovinamos ir suglaudžiamos su tričiui jautria fotojuosta 10 dienų.

[<sup>3</sup>H]FK506 surišimo vietų autoradiografija atskleidė žymius su FKBP susijusių sidabro grūdelių kiekius šiuose ganglijuose (Fig. 12). Esant 1 μM nežymėto FK506, autoradiografijos grūdeliai išnyksta, kas rodo surišimo specifiškumą. Kaip pranešta anksčiau, NGF (100 ng/ml) žymiai padidina

procesų ganglijuose skaičių ir dydį (Fig. 13). Vienas FK506 (1  $\mu$ M) duoda panašų neurotrofinį efektą, tuo tarpu 1 nM FK506 duoda žymų augimo padidėjimą. Rapamicinas (1  $\mu$ M), kuris veikia kaip FK506 antagonistas, visiškai blokuoja FK506 (1  $\mu$ M) efektą, tokiu būdu, FK506 veikimas rodo vaisto specifiškumo charakteristikas FKBP.

Kadangi FK506 nestimuliuoja neuritinių ataugų PC12 ląstelėse nepridėjus NGF, sensoriniuose ganglijuose vienas FK506 veikia neurotrofiškai. Švano ląstelės ganglijuose gali gaminti NGF, ir ši NGF gamyba Švano ląstelėse yra reguliuojama baltymo fosforilavimo reakcija. Kad įsitikintume, ar vieno FK506 veikimas apima endogeninio NGF sustiprinimą, mes tyrėme antikūnų įtaką NGF (Fig. 13). Anti-NGF žymiai sumažina neurotrofinį FK506 efektą (1  $\mu$ M). Anti-NGF neveikia toksiškai, kadangi mes nepastebėjome jokio morfologinio toksiškumo įrodymo ląstelėse, kontaktuojančiose su anti-NGF esant arba nesant pridėto NGF.

FK506 yra ypač galingas neuritinių ataugų stimulatorius. Jau 1 pM FK506 duoda pastebimą padidėjimą. Progresuojančiai didėjančios ataugos pasirodo esant 0,1 ir 10 nM FK506 (duomenys neparodyti), tuo tarpu maksimalus ataugimas reikalauja 1  $\mu$ M FK506.

Neuritinių ataugų kitimas laike yra panašaus pobūdžio esant visoms NGF ir FK506 koncentracijoms. Keletas ataugų matomos 1 dieną, o augimo plato pasiekiamas 5-6 dieną.

FK506 neurotrofiniai efektai apima FKBP (FK506 surišantį baltymą) sensoriniuose ganglijuose, kadangi FK506 įtaka tampa priešinga, esant mažoms rapamicino koncentracijoms, kuris yra žinomas FK506 ir FKBP antagonistas. Tai, kad rapamicinas neblokuoja FK506 įtakos PC12 ląstelėse, tikriausiai atspindi atskirą rapamicino stimuliuojantį efektą. Neuritinių ataugų PC12 ląstelėse stimulavimo rapamicinu mechanizmas nėra visiškai aiškus. Manoma, kad jo imunosupresinis veikimas apima skirtingus mechanizmus, nei yra FK506 atveju. Rapamicinas gali inhibuoti S6 kinazę, kuri fosforilina S6 ribosomos subvienetą. Rapamicinas taip pat inhibuoja fosfatidilinozitol-3-kinazę.

Baltymo kinazės C (PKC) medijuojamas fosforilimas priklauso ataugų susidarymo neuronų regeneracijos metu procesui. Kiti įrodymai sukelia minčių apie PKC inhibitorinį veikimą neuroninių procesų išplitime.

GAP43 yra plačiai žinomas kalcineurino substratas, kuris koncentruojasi neurituose, o jo fosforilimą reguliuoja FKBP. GAP43 gali nebūti tiesiogiai įtrauktas į neuritų išplitimą, kadangi PC12 ląstelių linijos su mažais GAP43 kiekiais demonstruoja normalų neuritų ataugimą. Tačiau GAP43 ir jo fosforilimas gali būti įtraukti į tikslinius neuritus, kadangi fosforilinto GAP43 kiekiai padidėja, kai neuritai pasiekia savo taikinį. GAP43 fosforilimas taip pat gali įtakoti  $\text{Ca}^{2+}$  mobilizavimą, kas reguliuoja neuritų išplitimą. Fosforilintas GAP43 inhibuoja fosfatidilinozitolio bis-fosfato susidarymą, kas turėtų sumažinti inozitolo 1,4,5-trifosfato kiekį ir asocijuoto  $\text{Ca}^{2+}$  atpalaidavimą. Be to, GAP43 fosforilimas sumažina jo afiniškumą kalmodulinui, susidarant daugiau laisvo kalmodulino, galinčio surišti  $\text{Ca}^{2+}$ .

Imunofilinai gali veikti tose vietose šalia kalcineurino, kurios įtakoja  $\text{Ca}^{2+}$ , kas reguliuoja neuritines ataugas. FKBP susiriša su rianodino receptorium, kuris yra  $\text{Ca}^{2+}$  atpalaidavimo kanalas. Skeleto raumenyse sarkoplazminis retikulinis FK506 atskiria FKBP nuo rianodino receptoriaus, kad pagreitintų  $\text{Ca}^{2+}$  indukuotą  $\text{Ca}^{2+}$  atpalaidavimo mechanizmą. Be to, FK506 veikia kitose vietose, įskaitant FKBP25 steroidinius receptorius ir kitus neidentifikuotus objektus, įskaitant susijusius su FKBP13. Taigi, neuritų išplitime tam tikrą vaidmenį gali vaidinti kiti stipriai pasireiškiantys mechanizmai.

**Ne imunosupresiniai ir imunosupresiniai imunofilinų ligandai stimuliuoja neuritines ataugas PC12 ląstelėse.**

Šiame darbe mes detalai ištyrėme daugelio imunofilinų ligandų įtaką neuritų išplitimui PC12 ląstelėse ir neliestuose viščiuko sensoriniuose ganglijuose. Mes pranešame, kad neimunosupresiniai, taip pat imunosupresiniai ligandai yra labai stiprūs neuritinių ataugų didintojai tiek PC12 ląstelėse, tiek sensoriniuose ganglijuose.

Mūsų ankstesniame darbe mes nustatėme, kad imunosupresantai stimuliuoja neuritines ataugas PC12 ląstelėse, didindami nervų augimo faktoriaus (NGF) pajėgumą apie 10 kartų (Lyons et al., 1994). Nesant pridėto NGF, nepastebėta jokie neurotrofinio efekto. Šiame darbe mes įvertinome imunosupresinių vaistų FK506 ir rapamicino įtaką PC12 neuritinėms ataugoms, esant 0,1-100 ng/ml NGF.

Nesant pridėto NGF, nė vienas iš vaistų nestimuliuoja neuritinių ataugų. Esant vieno NGF 0,1 ng/ml, pasireiškia nedidelis neuritų išplitimo padidėjimas, tik maždaug 15 % nuo maksimalaus efekto, kuris matomas esant 50 ng/ml (Fig. 14). Rapamicinas stimuliuoja neuritines ataugas didesniu laipsniu negu kiti vaistai, didindamas 3-4 kartus, esant 0,1-0,5 ng/ml NGF. Rapamicino sukeltas padidėjimas sumažėja, esant aukštesnėms NGF koncentracijoms, ir tampa statistiškai nereikšmingu, esant 5-50 ng/ml NGF. FK506 taip pat veikia neurotrofiškai, efektas labiausiai matomas, esant žemesnėms NGF koncentracijoms ir maksimalus 2,5 karto neuritinių ataugų padidėjimas matomas esant 0,5 ng/ml NGF.

Yra trys imunosupresinių vaistų klasės pagal struktūrą, susiję su ciklosporinu A, FK506 ir rapamicinu. Nors FK506 ir ciklosporinas A rišasi su skirtingais imunofiliniais baltymais, jie abu veikia kaip imunosupresantai, inhibuodami kalcineuriną. Rapamicinas labai afiniškai rišasi su FKBP12, bet vaisto-imunofilino kompleksas savo ruožtu nesijungia su kalcineurinu. Vietoj to, imunosupresinis veikimas atsiranda dėl rapamicino-FKBP12 komplekso susirišimo su neseniai identifikuotu ir klonuotu baltymu, žymimu RAFT-1 (rapamicino ir FK506 taikinio) ir taip pat žymimu FRAP (Sabatini and Snyder, 1994; Bron et al., 1994; Chen et al., 1994). Kadangi rapamicinas stipriai susiriša su FKBP12, bet neinhibuoja kalcineurino, jis gali būti FK506 antagonistu. Egzistuoja neimunosupresiniai rapamicino dariniai. Vienas iš jų, WAY-124,466, trieninis rapamicino darinys, su dideliu afiniškumu jungiasi prie FKBP12 ir inhibuoja rotamazinį aktyvumą, bet nepasižymi imunosupresiniu veikimu. Ciklosporinas A yra didelis ciklinis undekapeptidas. Paprastas metilo grupės įvedimas į alanino 6 padėtį duoda agentą, kuris neinhibuoja

kalcineurino ir nepasižymi imunosupresiniu veikimu, nors jis inhibuoja rotamazinį ciklofilino aktyvumą panašiu laipsniu kaip ciklosporinas A (žymima Me CsA). Kad nustatytume, ar imunosupresinis aktyvumas reikalingas neurotrofiniam veikimui, mes palyginome neurotrofinius FK506, rapamicino ir ciklosporino A efektus su neimunosupresantu WAY-124,466, vertindami plačiame PC12 ląstelių koncentracijų intervale (Fig. 15, 16). Visi tyrimai atlikti esant 0,5 ng/ml NGF. Kaip stebėta anksčiau, FK506 labai stipriai stimuliuoja neuritų išplitimą, esant pusei maksimalaus stimuliavimo su 0,5 nM ir maksimaliam efektui su 5-100 nM.

Rapamicinas yra stipriausias ištirtas agentas ir duoda didžiausius maksimalius neuritų išplitimo lygius. Pakartotiniuose eksperimentuose 50 % maksimalaus išplitimo stebima su maždaug 0,2-0,4 nM, tuo tarpu maksimalus efektas stebimas su maždaug 10-100 nM. Maksimalus neuritų išplitimas su rapamicinu yra sulyginamas su 50 ng/ml NGF maksimaliais efektais. WAY-124,466 taip pat veikia neurotrofiškai, bet yra ne toks stiprus ir duoda mažesnius maksimalius efektus nei rapamicinas. Pusė maksimalaus stimuliavimo su WAY-124,466 pasireiškia su maždaug 10 nM ir maksimalūs efektai pasireiškia su 100-1000 nM. Taigi, rapamicinas yra maždaug 100 kartų stipresnis, negu WAY-124,466, kas atitinka jo 40 kartų didesnę susirišimą su FKBP12 (II lentelė).

Ciklosporinas A yra žymiai silpnesnis, negu FK506 arba rapamicinas, stimuliuojant neuritines ataugas, kas atitinka jo žymiai mažesnę pajėgumą inhibuojant rotamazinį aktyvumą. Penkiasdešimt procentų maksimalaus neuritinių ataugų stimuliavimo ciklosporinu A pasireiškia su 50 nM, esant maksimaliam efektui su 100 nM ir neuritinių ataugų sumažėjimui su didesnėmis ciklosporino A koncentracijomis. Maksimalus stimuliavimas ciklosporinu A yra maždaug 60 % nuo 50 ng/ml NGF efekto.

Bendra išplitimo eiga su įvairiais imunofilinų ligandais ir su NGF yra panaši. Esant koncentracijoms, kurios sukelia 50 % maksimalaus efekto, NGF (1-5 ng/ml) 40-50 % ląstelių duoda ataugas mažiausiai tokio didumo kaip ląstelės kūnas, tuo tarpu 15 % ląstelių duoda ilgesnes ataugas, iki 3-5 kartų

viršijančias ląstelės kūno ilgį. Eiga yra labai panaši įvairių tirtų vaistų atveju. Rapamicinas ir WAY-124,466 turi tendenciją duoti daugiau ataugų ląstelei, negu FK506. Ataugų skaičiaus požiūriu ciklosporinas yra vidutinis.

**Nervų išplitimas, sukeltas neimunosupresinių ir imunosupresinių imunofilinų ligandų viščiuko dorsalinių šaknelių ganglijuose.**

Mūsų ankstesniame darbe mes stebėjome neurotrofinius imunosupresinių vaistų efektus žiurkės dorsalinių šaknelių ganglijų eksplantuose su žymiu nervinių ataugų padidėjimu, esant FK506 koncentracijoms ne žemesnėms kaip 1 pM (Lyons et al., 1994). Žiurkių ganglijuose neurotrofiniai efektai buvo stebimi su FK506 netgi nesant NGF. Šiame darbe mes naudojome viščiuko dorsalinių šaknelių ganglijas, kuriuos yra lengviau naudoti nervinių ataugų tyrimuose. Nesant pridėto NGF, mes stebėjome minimalius imunofilinų ligandų efektus. Viščiuko ląstelės yra jautresnės NGF negu PC12 ląstelės, taigi mes naudojome 0,1 ng/ml NGF, kad gautume minimalias neuritines ataugas ir kad pademonstruotume imunofilinų ligandų neurotrofinį veikimą (Fig. 17, 18).

Dorsalinių šaknelių ganglijai preparuoti iš dešimties dienų nėštumo viščiuko embriono. Viso ganglijaus eksplantai buvo kultivuoti plonu sluoksniu Matrigel padengtose 12 lėkštelių su terpe Liebovitz L15 plus didelė gliukozės koncentracija, papildyta 2 mM glutamino ir 10 % fetalinio veršelio serumo, taip pat turinčioje 10  $\mu$ M citozino  $\beta$ -D arabinofuranozido (Ara C) 37 °C temperatūroje, aplinkoje, turinčioje 5 % CO<sub>2</sub>. Po 24 val. DRG paveikti įvairiomis nervų augimo faktoriaus koncentracijomis, imunofilinų ligandais arba NGF ir vaisto deriniais. Po 48 val. nuo poveikimo vaistu, ganglijai vizualizuoti kontrastinėje fazėje arba Hoffman Modulation kontraste su Zeiss Axiovert mikroskopu. Padarytos eksplantų mikrofotografijos ir įvertintos neuritų ataugos. Neuritai, ilgesni negu DRG diametras, skaičiuojami kaip teigiami, nustatant bendrą neuritų skaičių kiekvienoms eksperimento sąlygoms. Lėkštelėje kultivuojama 3-4 DRG, ir kiekvienas apdorojimas atliktas du kartus.

Santykinis įvairių imunofilino ligandų pajėgumas stimuliuojant nervines ataugas ganglijuose panašus į jų santykinį pajėgumą PC12 ląstelėse. Taigi, rapamicinas yra stipriausias agentas, kurio  $EC_{50}$  yra 1 nM, 10 kartų stipresnis negu WAY-124,466, tuo tarpu FK506  $EC_{50}$  yra 1-2 nM.

Maksimalus ataugų skaičiaus, jų ilgio ir išsišakojimo padidėjimas yra labai panašus efektyviausiems imunofilinų ligandų ir NGF (100 ng/ml) atvejais. Progresuojančiai didėjant įvairių vaistų koncentracijoms, stebimas didelis ataugų skaičius, ekstensyvesnis išsišakojimas ir didesnis individualių ataugų ilgis.

Mes įvertinome vaistų susirišimo su FKBP12 stiprumą, tirdami [ $^3H$ ]-FK506 susirišimo su rekombinantiniu FKBP12 inhibiciją. Egzistuoja stebinanti paralelė tarp vaistų afiniškumo FKBP12 ir jų pajėgumo stimuliuoti neuritines ataugas bei inhibuoti rotamazinį aktyvumą. Aišku, nervinių ataugų stimuliavimas nesusijęs su kalcineurino inhibicija. Kalcineurino inhibicija gerai sutampa su imunosupresiniu veikimu, WAY-124,466 nėra imunosupresantas ir neinhibuoja kalcineurino. Rapamicinas yra stiprus imunosupresantas, bet rapamicino-FKBP12 kompleksas jungiasi su RAFT-1, inicijuodamas imunosupresinį procesą (Sabatini and Snyder, 1994; Snyder and Sabatini, 1995). Rezultatai pateikti 2 lentelėje.

**2 lentelė. Imunofilino ligando neurotrofinės savybės atitinka rotamazės, bet ne kalcineurino, inhibiciją.**

| Vaistas                  | [ $^3H$ ]FK506-FKBP12<br>( $IC_{50}$ ) | Kalcineurino, ro-<br>tamazės inhibicija | Neuritinės<br>ataugos |           |
|--------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------|-----------|
|                          |                                        |                                         | $K_i$                 | $ED_{50}$ |
| FK506                    | 0,6 nM                                 | taip 0,4 nM                             |                       | 0,5 nM    |
| Rapamicinas              | 0,5 nM                                 | ne                                      | 0,2 nM                | 0,5 nM    |
| WAY-124466               | 10,0 nM                                | ne                                      | 12,0 nM               | 10 nM     |
| Ciklosporinas A<br>(CsA) | ne                                     | taip 20 nM                              |                       | 50 nM     |



Mes palyginome neimunosupresinių imunofilino ligandų sugebėjimą duoti neuritines ataugas viščiuko dorsalinių šaknelių ganglijų eksplantų kultūrose (3 lentelė). Kiekvienas iš šių junginių nepajėgia inhibuoti kalcineurino, bet jie sąveikauja su imunofilinu FKBP12, inhibuodami jo rotamazinį aktyvumą ir turi įvairias inhibicijos konstantas, kurios pateiktos 3 lentelėje. Šių junginių sugebėjimas duoti neuritines ataugas DRG gerai koreliuoja su jų sugebėjimu inhibuoti FKBP12 rotamazinį aktyvumą.

**3 lentelė. Imunofilino ligando neurotrofinės savybės koreliuoja su rotamazės , bet ne kalcineurino, inhibavimu.**

| Vaistas     | [ <sup>3</sup> H]FK506-FKBP12 (IC <sub>50</sub> ) | Kalcineurino inhibicija | Rotamazės (K <sub>i</sub> ) | Neuritinės ataugos (ED <sub>50</sub> ) |
|-------------|---------------------------------------------------|-------------------------|-----------------------------|----------------------------------------|
| 12 pavyzdys | 8 μM                                              | nėra                    | 250 nM                      | 300 nM                                 |
| 13 pavyzdys | 4 μM                                              | nėra                    | 25 nM                       | 80 nM                                  |

Labai gera koreliacija tarp vaisto sugebėjimo susiristi su imunofilinais, inhibuoti jų rotamazinį aktyvumą ir stimuliuoti neuritines ataugas reiškia, kad rotamazinio aktyvumo inhibicija yra atsakinga už vaisto neurotrofinį veikimą. Ypatingai aukštas vaistų sugebėjimas stimuliuoti neuritines ataugas ir susiristi su imunofilinais duoda pagrindo manyti, kad joks kitas objektas negalėtų paaiškinti neurotrofinių efektų. Suprantama, kad vaistai galėtų veikti ir kitą, ne rotamazinį, imunofilinų biologinį aktyvumą, sukeldami neurotrofinį poveikį. Tačiau apie tokį aktyvumą kol kas nepranešta.

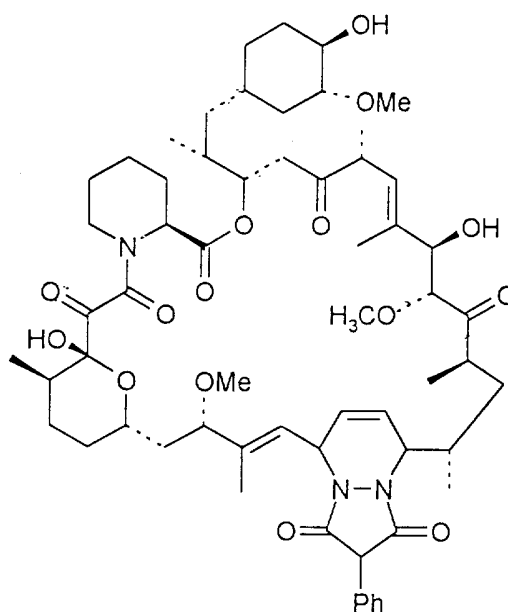
Dėl ypatingo vaistų pajėgumo ir artimos koreliacijos tarp rotamazės inhibavimo bei neurotrofinio veikimo mes padarėme išvadą, kad rotamazės inhibicija, tikriausiai, įeina į neurotrofinį veikimą. Aprašyta keletas baltymų, esančių imunofilinų rotamazinio aktyvumo substratais, įskaitant kolageną (Steinmann et al., 1991) ir transferiną (Lodish ir King, 1991). Neseniai pranešta, kad labai išgryninti rianodino receptoriaus ir IP-43 receptoriaus, gerai žinomų intalastelinių kalcio kanalų, preparatai egzistuoja komplekse su FKBP12. FKBP12 disocijacija iš šių kompleksų sąlygoja, kad kalcio kanalas

tampa "takiu" (Cameron et al., 1995). Kalcio svyravimai dalyvauja neuritų išplitime, taigi IP-43 receptoriaus ir rianodino receptoriaus galėtų dalyvauti vaistų neurotrofiniame veikime. Kadangi vaistai susiriša ta pačia FKBP12 vieta tiek IP-43 receptoriuje, tiek rianodino receptoriuje, galima būtų postuliuoti, kad vaistas pakeičia kanalą iš FKBP12. Nepranešta apie jokią sąveiką tarp šių kalcio kanalų ciklofilinuose, taigi, šis modelis nepaaiškintų neurotrofinio ciklosporino A poveikio.

Čia ištirtas vaistų neurotrofinis veikimas stebėtas, esant ypač žemoms koncentracijoms, kas rodo jų pajėgumą, sulysinamą su neurotrofinių baltymų, tokių kaip smegenų kilmės augimo faktorius, neurotrofinas-3 ir neurotrofinis augimo faktorius, pajėgumu.

Toliau pateikti pavyzdžiai iliustruoja išradimo įgyvendinimo būdus, kuriems teikiama pirmenybė, bet jais išradimas neapribojamas. Visos polimerų molekulinės masės reiškia vidutinės molekulines mases. Visos procentinės dalys yra masės procentinės dalys nuo galutinės paskirstymo sistemos arba pagamintos kompozicijos, jei nenurodyta kitaip, o bendri kiekiai reiškia 100 masės %. Pavyzdžių pipekolinės rūgšties dariniai, kurie gali būti naudojami šio išradimo tikslu, apima:

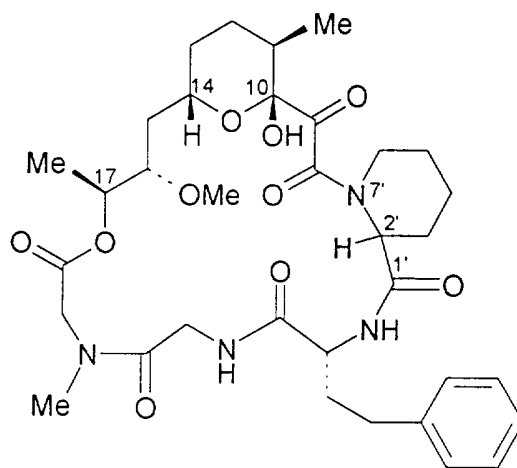
#### 1 PAVYZDYS



WAY-123,466

Šio pavyzdžio pipekolinės rūgšties darinys aprašytas Ocain et al., *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 192, Nr. 3, 1993. Junginį susintetino dr. Phil Hughes Wyeth-Ayerst'e, reaguojant 4-fenil-1,2-triazolin-3,5-dionui su rapamicinu.

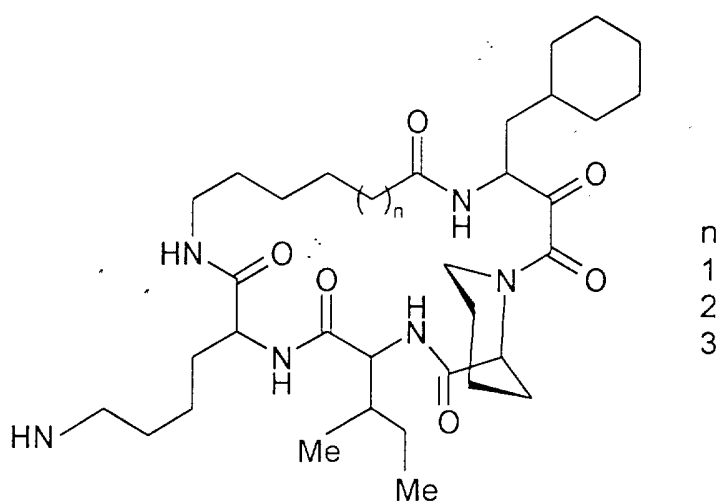
## 2 PAVYZDYS



RAP-Pa

Šis pipekolinės rūgšties darinys aprašytas Chakraborty et al., *Chemistry and Biology*, March 1995, 2:157-161.

## 3-5 PAVYZDŽIAI

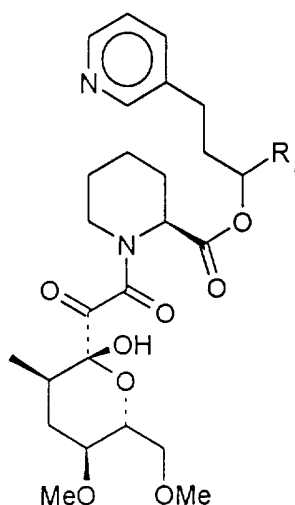


Pipekolinės rūgšties dariniai aprašyti Ikeda et al., *J. Am. Chem. Soc.* 1994, 116, 4143-4144, ir čia įtraukti kaip nuorodos.

## 6-9 PAVYZDŽIAI

Šių pavyzdžių pipekolinės rūgšties dariniai aprašyti Wang et al., *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, Vol. 4, No. 9, p.p. 1161-1166, 1994, konkrečiai, junginiai 2a-2d, ir čia įtraukti kaip nuorodos.

## 10 PAVYZDYS



Šio pavyzdžio pipekolinės rūgšties darinys, 10 junginys, aprašytas Birkenshaw et al., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Vol. 4, No. 21, p.p. 2501-2506, 1994, ir čia įtrauktas kaip nuoroda.

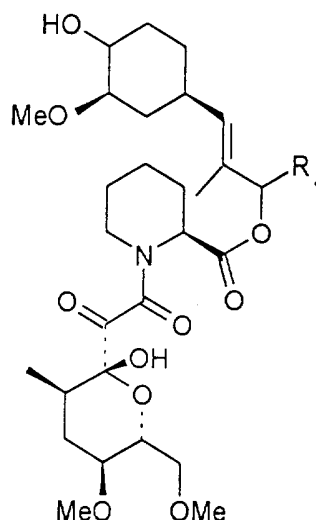
## 11-21 PAVYZDŽIAI

Pavyzdžių pipekolinės rūgšties dariniai aprašyti Holt et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, 115, 9925-9938, konkrečiai, junginiai 4-14, ir jie čia įtraukti kaip nuoroda.

## 22-30 PAVYZDŽIAI

Šių pavyzdžių pipekolinės rūgšties dariniai aprašyti Caffery et al., *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, Vol. 4, No. 21, p.p. 2507-2510, 1994, ir jie įtraukti čia kaip nuorodos.

## 31 PAVYZDYS



Šio pavyzdžio pipekolinės rūgšties darinys, 31 junginys, aprašytas Teague et al., *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, Vol. 3, No. 10, p.p. 1947-1950, 1993, ir įtrauktas čia kaip nuoroda.

## 32-34 PAVYZDŽIAI

Šių pavyzdžių pipekolinės rūgšties dariniai aprašyti Yamashita et al., *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, Vol. 4, No. 2, p.p. 325-328, 1994, konkrečiai, 11, 12 ir 19 junginiai, ir jie įtraukti čia kaip nuorodos.

## 35-55 PAVYZDŽIAI

Šių pavyzdžių pipekolinės rūgšties dariniai aprašyti Holt et al., *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, Vol. 4, No. 2, p.p. 315-320, 1994, konkrečiai, 3-21, ir 23-24 junginiai, ir jie įtraukti čia kaip nuorodos.

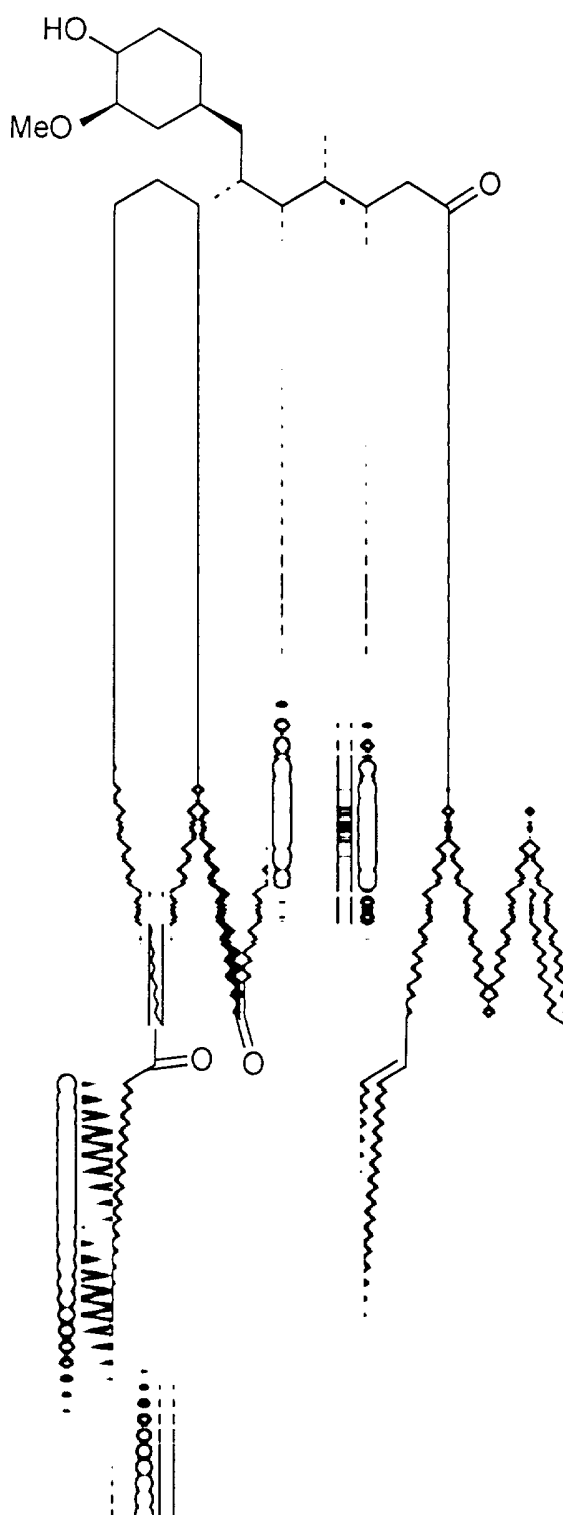
## 56-68 PAVYZDŽIAI

Šių pavyzdžių pipekolinės rūgšties dariniai aprašyti Holt et al., *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, Vol. 3, No. 10, p.p. 1977-1980, 1993, konkrečiai, 3-15 junginiai, ir jie įtraukti čia kaip nuorodos.

## 69-83 PAVYZDŽIAI

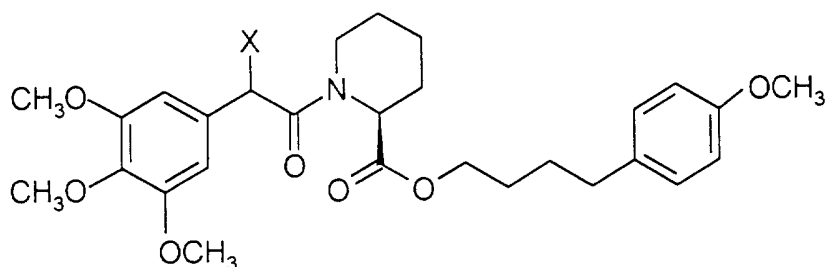
Šių pavyzdžių pipekolinės rūgšties dariniai aprašyti Hauske et al., J. Med. Chem. 1992, 35, 4284-4296, konkrečiai, junginiai 6, 9-10, 21-24, 26, 28 31-32 ir 52-55, ir jie įtraukti čia kaip nuorodos.

## 84 PAVYZDYS



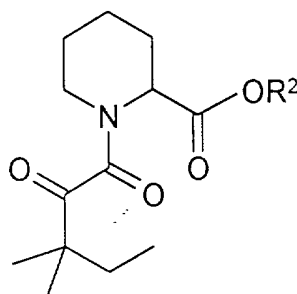
Šių pavyzdžių papildomi pipekolinės rūgšties dariniai parodyti 10 schemų, 1-5 lentelėse.

01 schema



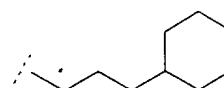
| Pavyzdys/Junginys | Struktūra              |
|-------------------|------------------------|
| 6                 | X = H <sub>2</sub>     |
| 7                 | X = CH <sub>2</sub>    |
| 8                 | X = H, CH <sub>3</sub> |
| 9                 | X = O                  |

2 schema

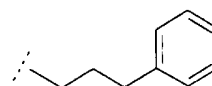


Pavyzdys/Junginio Nr.

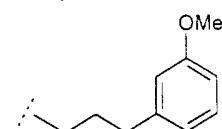
11



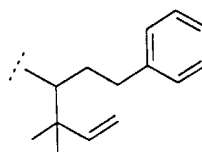
12



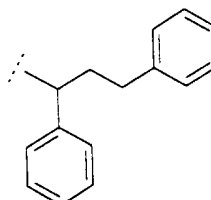
13



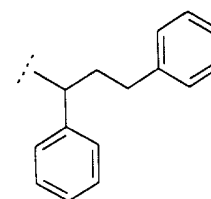
14



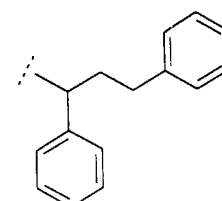
15



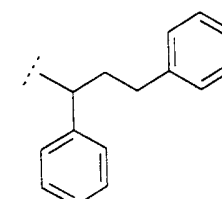
16



17



18

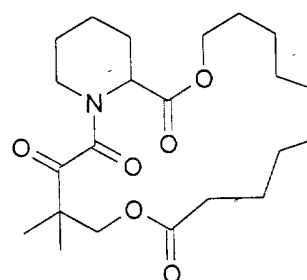


3 schema

Pavyzdys/Junginio Nr.

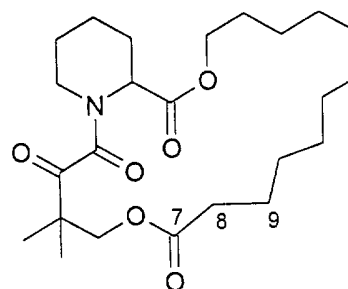
19

Struktūra

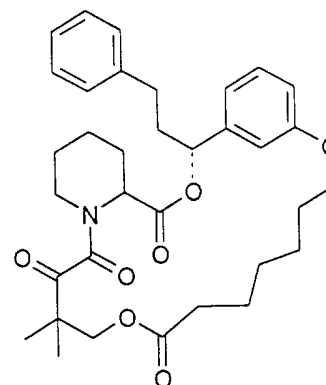




20

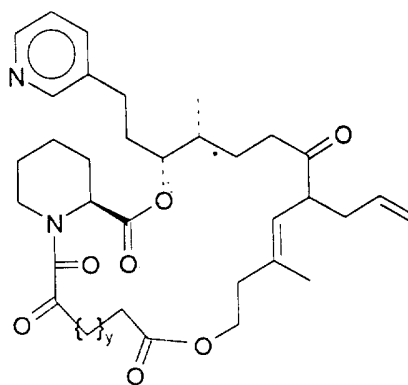


21



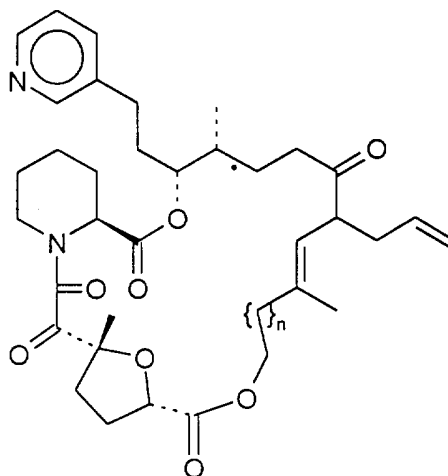
4 schema

1LENTELĖ



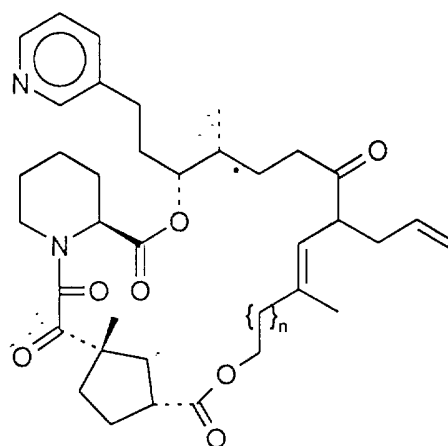
| Pavyzdys/Junginio Nr. | Struktūra |
|-----------------------|-----------|
| 24                    | y = 1     |
| 23                    | y = 2     |
| 24                    | y = 3     |

## 2 LENTELE



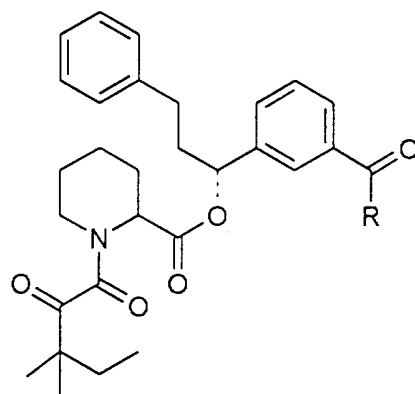
| Pavyzdys/Junginio Nr. | Struktūra |
|-----------------------|-----------|
| 25                    | $n = 1$   |
| 26                    | $n = 2$   |
| 27                    | $n = 3$   |

## 3 LENTELE



| Pavyzdys/Junginio Nr. | Struktūra |
|-----------------------|-----------|
| 28                    | $n = 1$   |
| 29                    | $n = 2$   |
| 30                    | $n = 3$   |

5 schema



Pavyzdys/Junginio Nr.

32

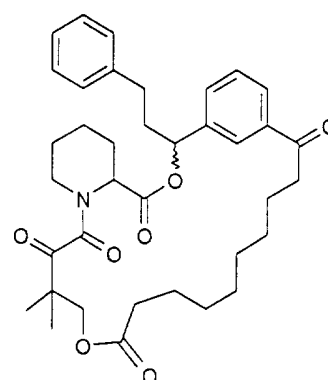
Struktūra

R = fenilas

33

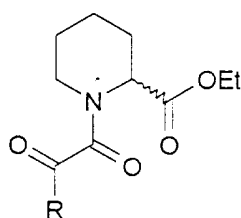
R = N(alil)<sub>2</sub>

34



6 schema

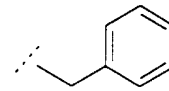
1 LENTELE



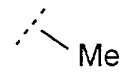
Pavyzdys/Junginio Nr.

Struktūra R

35



36



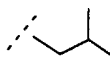
37



38



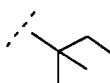
39



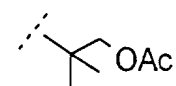
40



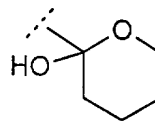
41



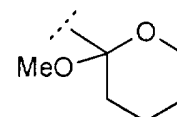
42



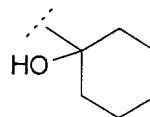
43



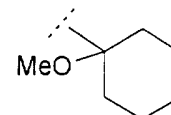
44



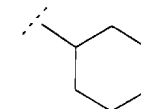
45



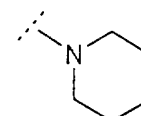
46



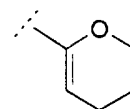
47



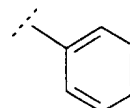
48



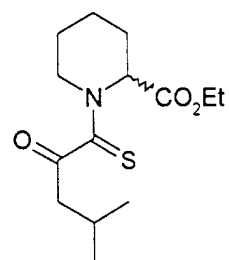
49



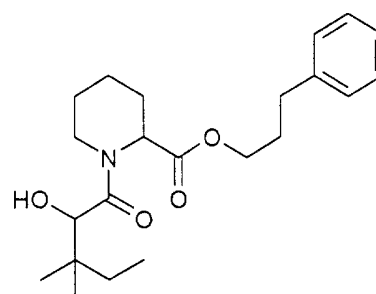
50



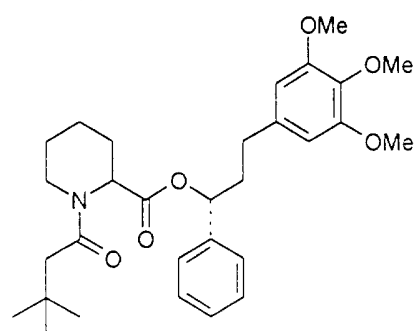
51



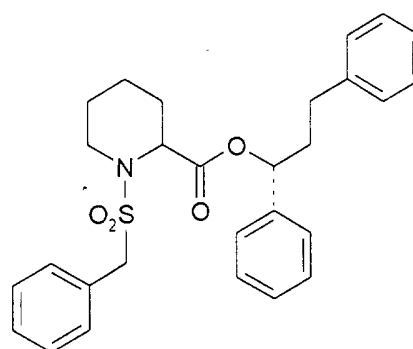
52



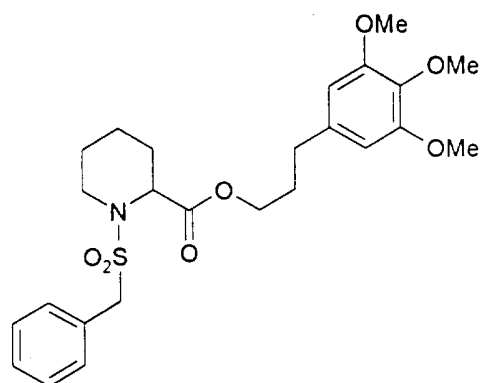
53



54

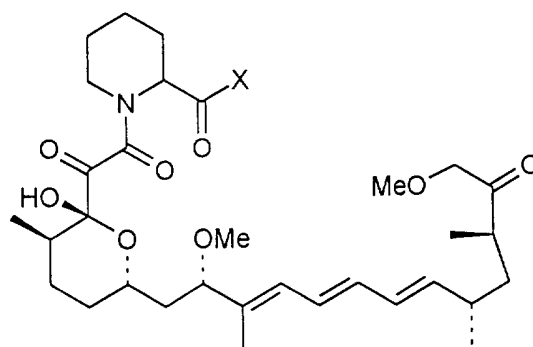


55



7 SCHEMA

1 LENTELE



56

X = OH

57

X = OMe

58

X = Oi Pr

59

X = OBn

60

X = OCH MePh

61

X = OCH<sub>2</sub>CHCHPh

62

X = OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(3,4-OMe<sub>2</sub>)Ph

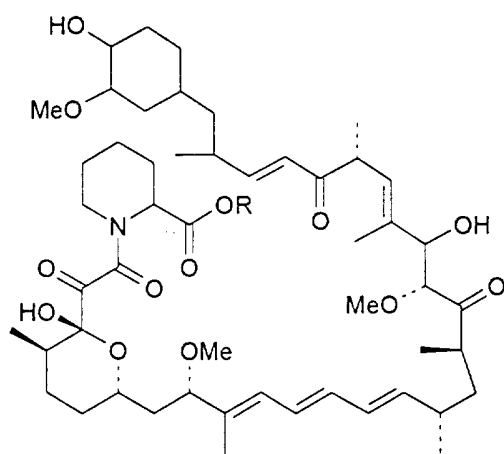
63

X = NHBn

64

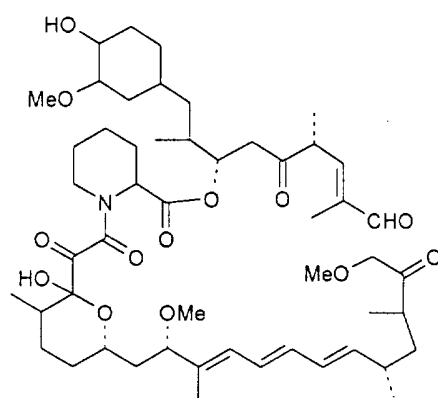
X = NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph

## 2 LENTELE

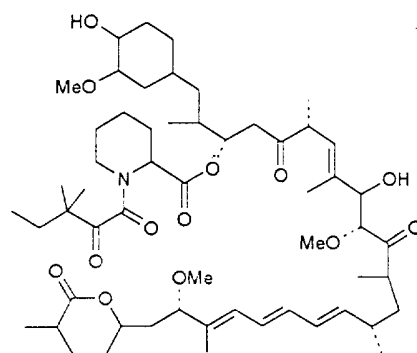
65  $R = \text{Me}$ 66  $R = \text{Bn}$ 

## 3 LENTELE

67

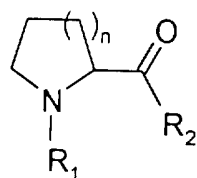


68



8 schema

1 LENTELĖ

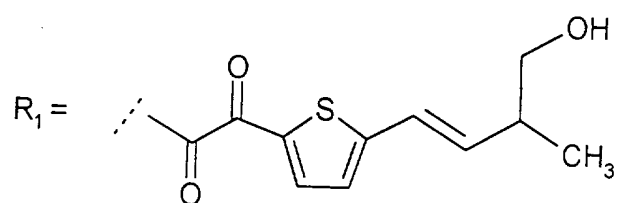


Pavyzdys/Junginio Nr.

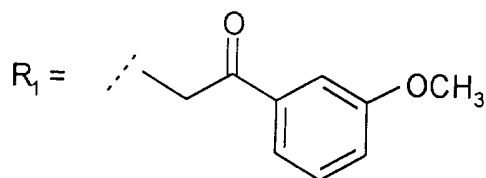
Struktūra

 $n = 2,$ 

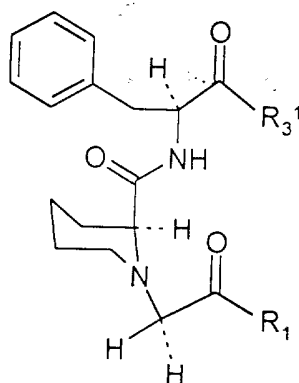
69

 $R_2 = \text{Phe-o-tret.-butil}$  $n = 2,$ 

70

 $R_2 = \text{Phe-o-tret.-butil}$ 

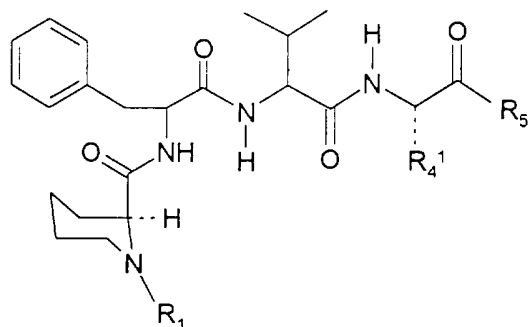
2 LENTELĖ

71  $R_1 = m\text{-OCH}_3\text{Ph}; R_3' = \text{Val-o-tret.-butil}$ 72  $R_1 = m\text{-OCH}_3\text{Ph}; R_3' = \text{Leu-o-tret.-butil}$ 73  $R_1 = m\text{-OCH}_3\text{Ph}; R_3' = \text{Ileu-o-tret.-butil}$



- 74  $R_1 = m\text{-OCH}_3\text{Ph}$ ;  $R_3^1 = \text{heksahidro-Phe-o-tret.-butil}$   
 75  $R_1 = m\text{-OCH}_3\text{Ph}$ ;  $R_3^1 = \text{alilalanin-Phe-o-tret.-butil}$   
 76  $R_1 = \text{B-naftil}$ ;  $R_3^1 = \text{Val-o-tret.-butil}$

## 3 LENTELE



Pavyzdys/Junginio Nr.

Struktūra

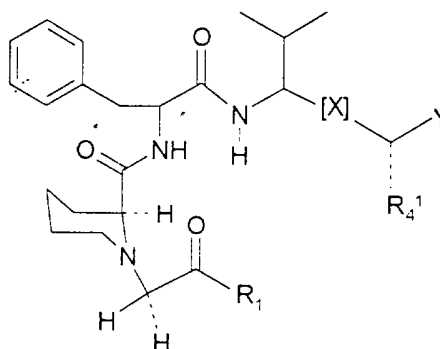
77

 $R_1 = \text{CH}_2(\text{CO})\text{-}m\text{-OCH}_3\text{Ph}$  $R_4^1 = \text{CH}_2\text{Ph}$  $R_5^1 = \text{OCH}_3$ 

78

 $R_1 = \text{CH}_2(\text{CO})\text{-B-naftil}$  $R_4^1 = \text{CH}_2\text{Ph}$  $R_5^1 = \text{OCH}_3$ 

## 4 LENTELE

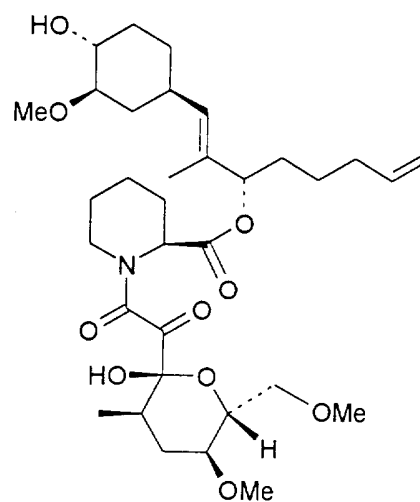


| Pavyzdys/Junginio Nr. | Struktūra                                                                                                                               |
|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 79                    | $R_1 = m\text{-OCH}_3\text{Ph}$<br>$X = \text{trans CH} = \text{CH}$<br>$R_4^1 = \text{H}$<br>$Y = \text{OC(o)Ph}$                      |
| 80                    | $R_1 = m\text{-OCH}_3\text{Ph}$<br>$X = \text{trans CH} = \text{CH}$<br>$R_4^1 = \text{H}$<br>$Y = \text{OC(o)CF}_3$                    |
| 81                    | $R_1 = m\text{-OCH}_3\text{Ph}$<br>$X = \text{trans CH} = \text{CH}$<br>$R_4^1 = -$<br>$Y = -$                                          |
| 82                    | $R_1 = m\text{-OCH}_3\text{Ph}$<br>$X = \text{trans CH} = \text{CH}$<br>$R_4^1 = \text{H}$<br>$Y = \text{OCH}_2\text{CH} = \text{CH}_2$ |
| 83                    | $R_1 = m\text{-OCH}_3\text{Ph}$<br>$X = \text{C} = \text{O}$<br>$R_4^1 = \text{H}$<br>$Y = \text{Ph}$                                   |

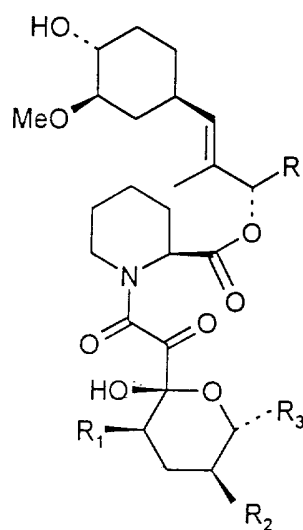
9 schema

1 LENTELE

85



2 LENTELE



86

 $R_1 = H, R_2 = OMe, R_3 = CH_2OMe$ 

87

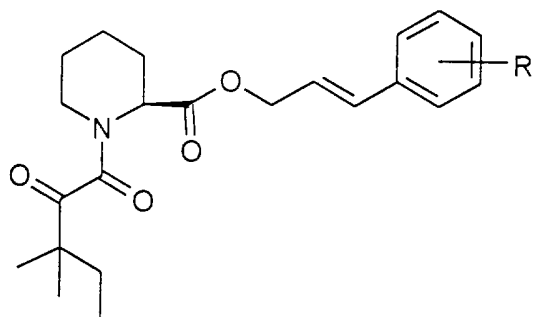
 $R_1 = H, R_2 = R_3 = H$ 

88

 $R_1 = Me, R_2 = R_3 = H$

10 schema

## 1 LENTELE



Pavyzdys

R =

90

3,4-dichlor

91

3,4,5-trimetoksi

92

H

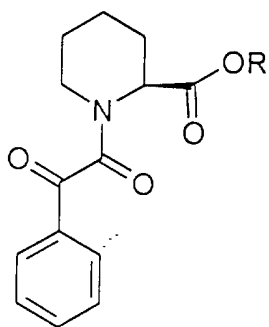
93

3-(2,5-dimetoksi)-fenilpropil

94

3-(3,4-metilen-dioksi)fenilpropil

## 2 LENTELE



Pavyzdys

R =

95

4-(p-metoksi)-butil

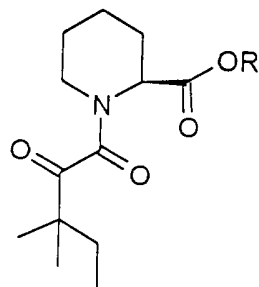
96

3-fenilpropil

97

3-(3-piridil)-propil

## 3 Lentelė

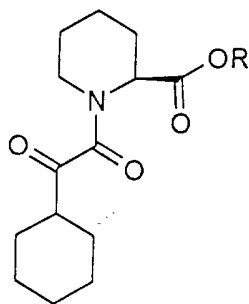


Pavyzdys

R =

|     |                                     |
|-----|-------------------------------------|
| 98  | 3-(3-piridil)-propil                |
| 99  | 1,7-difenil-4-heptil                |
| 100 | 4-(4-metoksi)butil                  |
| 101 | 1-fenil-6-(4-metoksifenil)-4-heksil |
| 102 | 3-(2,5-dimetoksi)fenilpropil        |
| 103 | 3-(3,4-metilendioksi)-fenilpropil   |
| 104 | 1,5-difenilpentil                   |

## 4 LENTELĖ

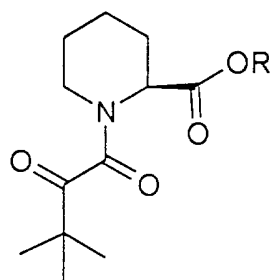


Pavyzdys

R =

|     |                     |
|-----|---------------------|
| 105 | 4-(4-metoksi)butil  |
| 106 | 3-cikloheksilpropil |
| 107 | 3-fenilpropil       |

## 5 LENTELE



Pavyzdys

R =

|     |                      |
|-----|----------------------|
| 108 | 3-cikloheksilpropil  |
| 109 | 3-fenilpropil        |
| 110 | 4-(4-metoksi)butil   |
| 111 | 1,7-difenil-4-heptil |

## Rotamazės inhibitorių neurotrofinis veikimas

I lentelėje pateikti daugumos pareikštų pavyzdžių pajėgumas indukuoti trofinį veikimą sensorinių neuronų kultūroje, kaip aprašyta aukščiau. Fig. 19 ir 20 parodytos 111 ir 17 pavyzdžių mikrofotografijos, skatinant neuritines ataugas dorsalinių šaknelių ganglijų kultūroje.

I LENTELE. Tirtų pavyzdžių pajėgumas *in vitro*

| Pavyzdys | Rotamazės inhibicija, $K_i$ , nM | Neurotrofiškai $ED_{50}$ , nM, ganglijuose |
|----------|----------------------------------|--------------------------------------------|
| 6        | 140                              | 25                                         |
| 9        | 13                               | 0,030                                      |
| 11       | 170                              | 1                                          |
| 12       | 250                              | 300                                        |
| 13       | 25                               | 80                                         |
| 15       | 17                               | 0,30                                       |
| 19       | 12                               | 0,017                                      |
| 36       | >10000                           | >10000                                     |
| 41       | 411300                           | 5000                                       |
| 50       | >10000                           | >10000                                     |
| 90       | 1800                             | 2500                                       |

I lentelės tęsinys

|     |     |       |
|-----|-----|-------|
| 91  | 28  | 200   |
| 92  | 39  | 90    |
| 93  | 75  | 35    |
| 94  | 70  | 8     |
| 95  | 165 | 5-10  |
| 96  | 740 | 10-20 |
| 97  | 725 | 150   |
| 98  | 130 | 75    |
| 99  | 30  | 5     |
| 100 | 60  | 43    |
| 101 | 15  | 0,17  |
| 102 | 12  | 2,5   |
| 103 | 120 | 3     |
| 104 | 20  | 0,016 |
| 105 | 103 | 6     |
| 106 | 760 | 1     |
| 107 | 210 | 0,82  |
| 108 | 32  | 0,29  |
| 109 | 2   | 0,08  |
| 110 | 24  | 0,002 |
| 111 | 5   | 0,08  |

### Pavyzdžių junginių aktyvumas nervo regeneracijos *in vivo* modelyje

#### Sėdmeninio nervo aksotomija.

Šešių savaičių amžiaus vyriškos lyties Sprague-Dawley žiurkės anestezuotos, sėdmeninis nervas atidengtas ir traumuotas replėmis. Tiriamas junginys arba tirpiklis įvesti po oda prieš pat pažeidimą ir kas dieną per kitas 18 dienų. Sėdmeninio nervo pjūviai nudažyti Holmes sidabro dažais aksonų skaičiaus įvertinimui ir Luxol fast blue dažais mielinizacijos lygio įvertinimui. Po 18 dienų nuo pažeidimo gyvuliukuose, paveiktuose tirpikliu, buvo žymus sumažėjimas aksonų skaičiaus (50 % sumažėjimas lyginant su nepažeistu kontroliniu atveju) ir mielinizacijos laipsnio (90 % sumažėjimas lyginant su nepažeistu kontroliniu atveju).

Pavyzdžio 12 (30 mg/kg) ir pavyzdžio 13 (30 mg/kg) įvedimas subkutaniškai prieš pat pažeidimą davė žymią regeneraciją tiek aksonų

skaičiaus (sumažėjimas 25 % ir 5 %, atitinkamai, palyginus su nepažeista kontrole), tiek mielinizacijos laipsnio (sumažėjimas 65 % ir 50 %, atitinkamai, palyginus su tirpikliu veiktais gyvuliukais. Žymus pavyzdžių 12 ir 13 junginių efektyvumas yra suderinamas su jų dideliu aktyvumu inhibuojant rotamazinį aktyvumą ir stimuliuojant neuritines ataugas viščiuko DRG-e, o jų santykinis aktyvumas *in vivo* kinta lygiagrečiai su jų aktyvumu *in vitro* (I lentelė). Šie rezultatai parodyti Fig. 21. "Imitacija" pažymėti kontroliniai gyvuliukai, kurie gavo tirpiklio, bet nebuvo sužeisti; "tirpiklis" reiškia gyvuliukus, kurie buvo sužeisti ir gavo tik tirpiklį (t.y., negavo vaisto). Pavyzdys 12 ir pavyzdys 13 parodė nuostabų panašumą į 'imitacija' veiktus gyvuliukus, pademonstruodami stiprų šių junginių efektą *in vivo*. Kiekybiniai duomenys pateikti II lentelėje.

II LENTELĖ

| Veikimo būdas                    | Aksonų skaičius<br>(% nuo kontrolės) | Mielinizacijos<br>laipsnis |
|----------------------------------|--------------------------------------|----------------------------|
| Imitacija                        | 100                                  | 100                        |
| Sužeidimas:<br>+ tirpiklis       | 50                                   | 10                         |
| + 12 pavyzdys<br>(30 mg/kg s.c.) | 75                                   | 35                         |
| + 13 pavyzdys<br>(30 mg/kg s.c.) | 100                                  | 50                         |

Taip aprašius išradimą, aišku, kad jis gali būti varijuojamas daugeliu būdų. Tokios variacijos nelaikomos nukrypimu nuo išradimo idėjos ir apimties, ir turima mintyje, jog visos tokios modifikacijos įeis į toliau pateikiamos apibrėžties apimtį.



### IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Imunosupresinis arba neimunosupresinis pipekolinės rūgšties  
5 darinys, skirtas panaudoti neuronų augimui ir regeneracijai skatinti  
neuropatologinėse būklėse, kuriose gali būti palengvintas neuronų  
atsistatymas, ir šis pipekolinės rūgšties darinys neapima FK506 arba  
rapamicino.

2. Imunosupresinis arba neimunosupresinis pipekolinės rūgšties  
10 darinys, skirtas panaudoti neurologinio sutrikimo gydymui, ir šis pipekolinės  
rūgšties darinys neapima FK506 arba rapamicino.

3. Imunosupresinis arba neimunosupresinis pipekolinės rūgšties  
darinys, skirtas panaudoti nervų apsaugojimui nuo nervinės degeneracijos, ir  
šis pipekolinės rūgšties darinys neapima FK506 arba rapamicino

15 4. Pipekolinės rūgšties darinys, skirtas panaudoti pagal 1, 2 arba 3  
punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad imunosupresinį arba neimunosupresinį  
pipekolinės rūgšties darinį naudoja kombinacijoje su efektyviu kiekiu  
neurotrofinio faktoriaus, pasirinkto iš grupės, susidedančios iš neurotrofinio  
augimo faktoriaus, smegenų kilmės augimo faktoriaus, neuroglijos kilmės  
20 augimo faktoriaus, ciliarinio neurotrofinio faktoriaus ir neurotrofino-3.

5. Pipekolinės rūgšties darinys, skirtas panaudoti pagal 1, 2, 3 arba 4  
punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad neuropatologinė būklė, nervinė  
degeneracija arba neurologinis sutrikimas apima periferines neuropatijas,  
sukeltas fizinio pažeidimo arba ligos, fizinio galvos smegenų pažeidimo, fizinio  
25 nugaros smegenų pažeidimo, insulto sąlygoto galvos smegenų pažeidimo ir  
neurologinių sutrikimų, susijusių su neurodegeneracija.

6. Pipekolinės rūgšties darinys, skirtas panaudoti pagal 5 punktą,  
b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad neurologinis sutrikimas yra parinktas iš grupės,  
susidedančios iš Alzheimerio ligos, Parkinsono ligos ir šoninės amiotrofinės  
30 sklerozės.

7. Pipekolinės rūgšties darinys, skirtas panaudoti pagal 1, 2, 3 arba 4 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad šis pipekolinės rūgšties darinys yra neimunosupresinis.

5 8. Pipekolinės rūgšties darinys, skirtas panaudoti pagal 7 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad šis pipekolinės rūgšties darinys yra Way-124,666.

9. Pipekolinės rūgšties darinys, skirtas panaudoti pagal 7 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad šis pipekolinės rūgšties darinys yra Rap-Pa.

10 10. Pipekolinės rūgšties darinys, skirtas panaudoti pagal 7 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad šis pipekolinės rūgšties darinys yra SLB-506.

11. Pipekolinės rūgšties darinys, skirtas panaudoti pagal 7 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad šis pipekolinės rūgšties darinys yra parinktas iš grupės, susidedančios iš junginių 3-84, 86-88 ir 90-111.

15 12. Pipekolinės rūgšties darinys, skirtas panaudoti pagal 1, 2, 3 arba 4 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis užtikrina mažiausiai 75 % aksonų kiekio regeneraciją ir mažiausiai 35 % mielinizacijos atstatymą.

13. Pipekolinės rūgšties darinys, skirtas panaudoti pagal 1, 2, 3 arba 4 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis užtikrina mažiausiai 75 % aksonų kiekio regeneraciją ir mažiausiai 50 % mielinizacijos atstatymą.

20 14. Pipekolinės rūgšties darinys, skirtas panaudoti pagal 1, 2, 3 arba 4 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jį naudojant pasiekama neurotrofinė ED<sub>50</sub>, imant ne didesnę nei 200 nM junginio koncentraciją.

25 15. Pipekolinės rūgšties darinys, skirtas panaudoti pagal 1, 2, 3 arba 4 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jį naudojant pasiekama neurotrofinė ED<sub>50</sub>, imant ne didesnę nei 35 nM junginio koncentraciją.

16. Pipekolinės rūgšties darinys, skirtas panaudoti pagal 1, 2, 3 arba 4 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jį naudojant pasiekama neurotrofinė ED<sub>50</sub>, imant ne didesnę nei 1 nM junginio koncentraciją.

30 17. Imunosupresinis arba neimunosupresinis pipekolinės rūgšties darinys, skirtas panaudoti vaisto neuronų augimui ir regeneracijai skatinti neuropatologinėse būklėse, kuriose gali būti palengvintas neuronų

atsistatymas, gamyboje, ir šis pipekolinės rūgšties darinys neapima FK506 arba rapamicino.

18. Imunosupresinis arba neimunosupresinis pipekolinės rūgšties darinys, skirtas panaudoti vaisto neurologinio sutrikimo gydymui gamyboje, ir  
5 šis pipekolinės rūgšties darinys neapima FK506 arba rapamicino.

19. Imunosupresinis arba neimunosupresinis pipekolinės rūgšties darinys, skirtas panaudoti vaisto nervų apsaugojimui nuo nervinės degeneracijos gamyboje, ir šis pipekolinės rūgšties darinys neapima FK506 arba rapamicino

10 20. Pipekolinės rūgšties darinys, skirtas panaudoti pagal 17, 18 arba 19 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad imunosupresinį arba neimunosupresinį pipekolinės rūgšties darinį naudoja kombinacijoje su efektyviu kiekiu neurotrofinio faktoriaus, pasirinkto iš grupės, susidedančios iš neurotrofinio augimo faktoriaus, smegenų kilmės augimo faktoriaus, neuroglijos kilmės  
15 augimo faktoriaus, ciliarinio neurotrofinio faktoriaus ir neurotrofino-3.

21. Pipekolinės rūgšties darinys, skirtas panaudoti pagal 17, 18, 19 arba 20 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad neuropatologinė būklė, nervinė degeneracija arba neurologinis sutrikimas apima periferines neuropatijas, sukeltas fizinio pažeidimo arba ligos, fizinio galvos smegenų pažeidimo, fizinio  
20 nugaros smegenų pažeidimo, insulto sąlygoto galvos smegenų pažeidimo ir neurologinių sutrikimų, susijusių su neurodegeneracija.

22. Pipekolinės rūgšties darinys, skirtas panaudoti pagal 21 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad neurologinis sutrikimas yra parinktas iš grupės, susidedančios iš Alzheimerio ligos, Parkinsono ligos ir šoninės amiotrofinės  
25 sklerozės.

23. Pipekolinės rūgšties darinys, skirtas panaudoti pagal 17, 18, 19 arba 20 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad šis pipekolinės rūgšties darinys yra neimunosupresinis.

24. Pipekolinės rūgšties darinys, skirtas panaudoti pagal 23 punktą,  
30 b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad šis pipekolinės rūgšties darinys yra Way-124,666.

25. Pipekolinės rūgšties darinys, skirtas panaudoti pagal 23 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad šis pipekolinės rūgšties darinys yra Rap-Pa.

26. Pipekolinės rūgšties darinys, skirtas panaudoti pagal 23 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad šis pipekolinės rūgšties darinys yra SLB-506.

5 27. Pipekolinės rūgšties darinys, skirtas panaudoti pagal 23 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad šis pipekolinės rūgšties darinys yra parinktas iš grupės, susidedančios iš junginių 3-84, 86-88 ir 90-111.

28. Pipekolinės rūgšties darinys, skirtas panaudoti pagal 17, 18, 19 arba 20 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis užtikrina mažiausiai 75 % aksonų  
10 kiekio regeneraciją ir mažiausiai 35 % mielinizacijos atstatymą.

29. Pipekolinės rūgšties darinys, skirtas panaudoti pagal 17, 18, 19 arba 20 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis užtikrina mažiausiai 75 % aksonų kiekio regeneraciją ir mažiausiai 50 % mielinizacijos atstatymą.

30. Pipekolinės rūgšties darinys, skirtas panaudoti pagal 17, 18, 19 arba  
15 20 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jį naudojant pasiekama neurotrofinė ED<sub>50</sub>, imant ne didesnę nei 200 nM junginio koncentraciją.

31. Pipekolinės rūgšties darinys, skirtas panaudoti pagal 17, 18, 19 arba 20 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jį naudojant pasiekama neurotrofinė ED<sub>50</sub>, imant ne didesnę nei 35 nM junginio koncentraciją.

20 32. Pipekolinės rūgšties darinys, skirtas panaudoti pagal 17, 18, 19 arba 20 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jį naudojant pasiekama neurotrofinė ED<sub>50</sub>, imant ne didesnę nei 1 nM junginio koncentraciją.

1/21

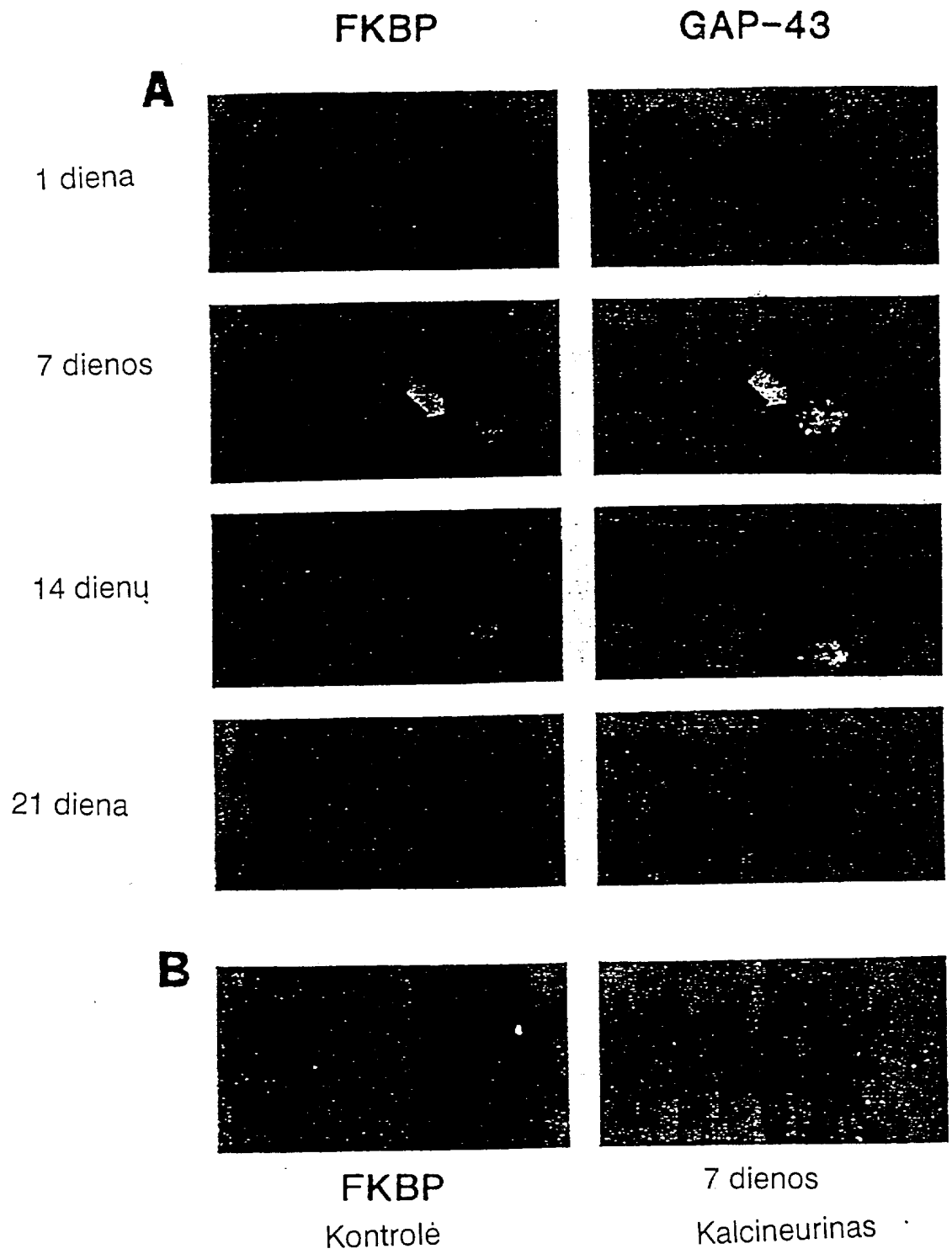


FIG. I

2/21

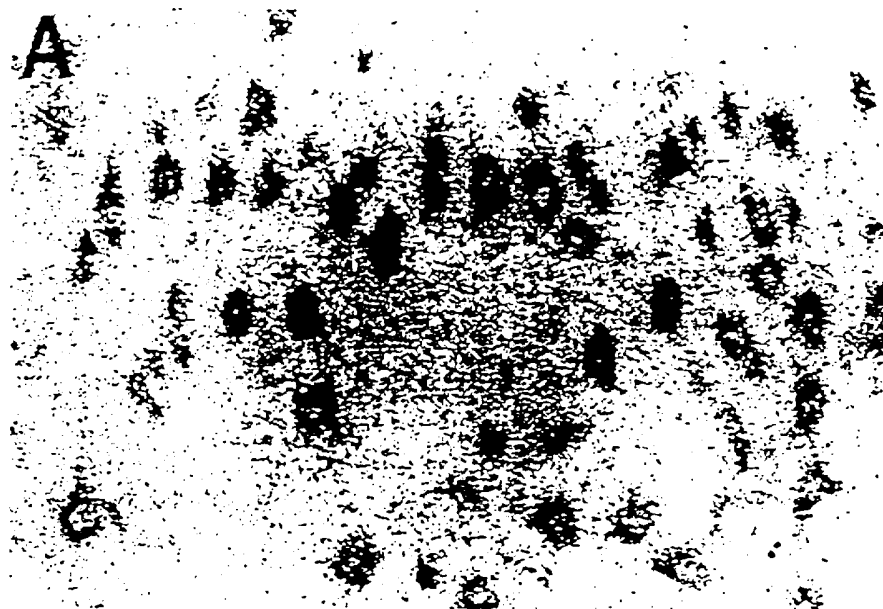


FIG. 2A



FIG. 2B

3/21

FIG. 3A



FIG. 3B



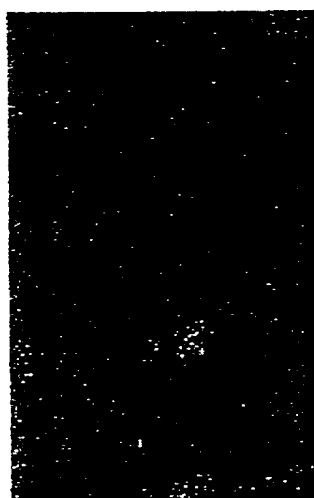
FIG. 3C

4/21

FK-506 AUTORAD



FKBP IN SITU



Kontrolé

1 sav.

6 sav.

FIG. 4



5/21



FIG. 5A

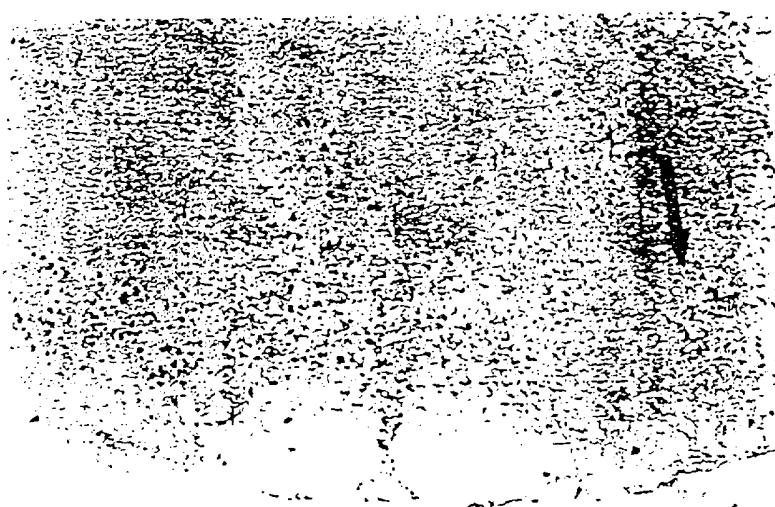
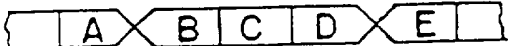


FIG. 5B

6/21

FIG. 6

Proximal  Distal

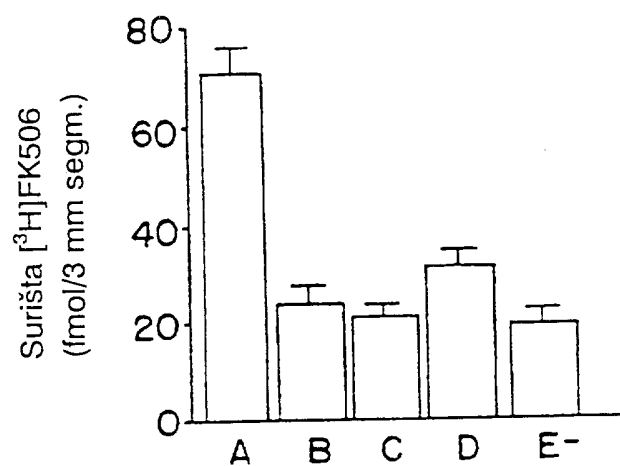
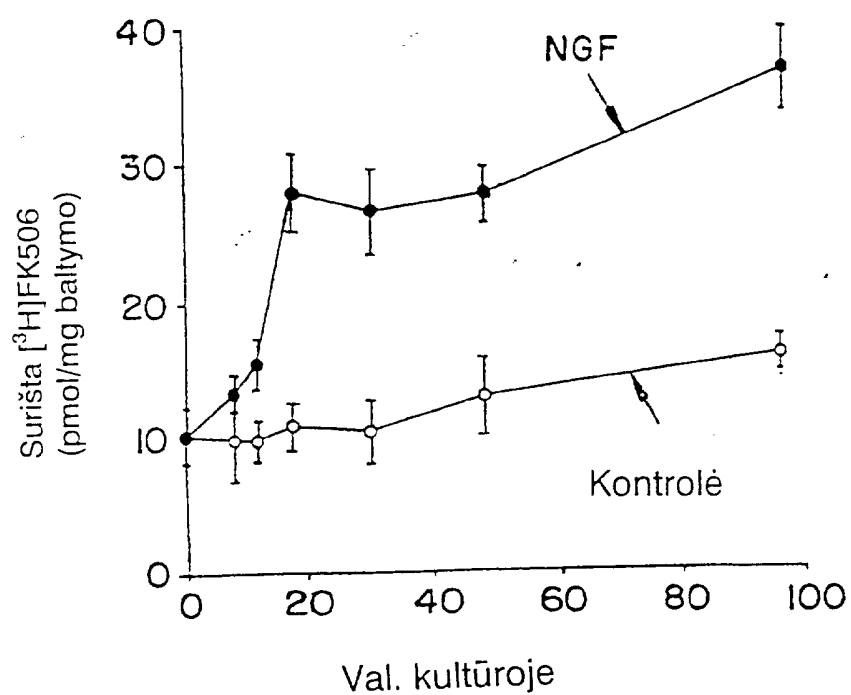


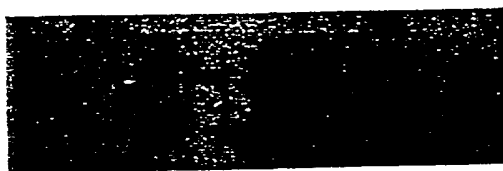
FIG. 8



7/21

FIG. 7A

FKBP IN SITU



Kontrolé

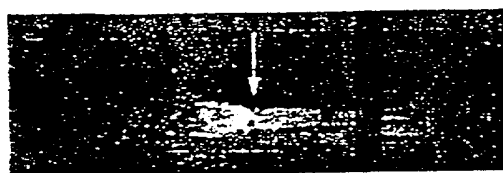
FIG. 7C

FK-506 AUTORAD



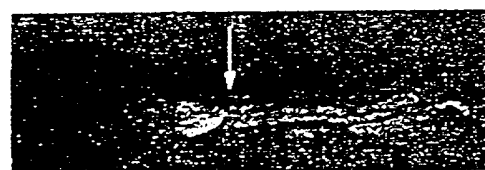
Kontrolé

FKBP IN SITU



Trauma

FK-506 AUTORAD



Trauma

FIG. 7B

FIG. 7D

8/21

FIG. 9B

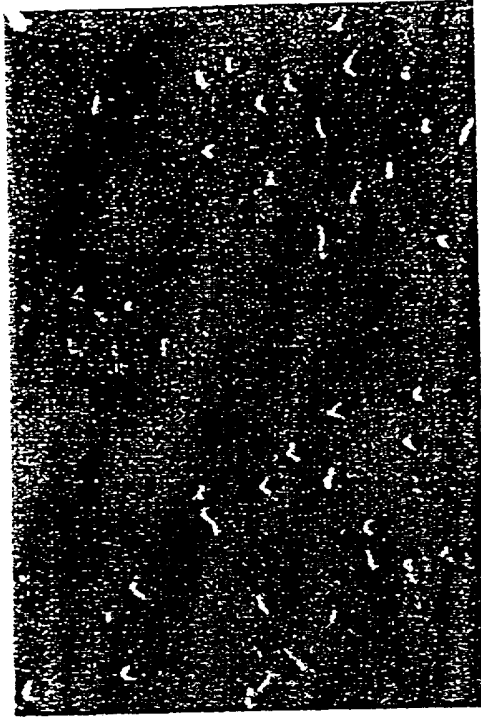


FIG. 9D

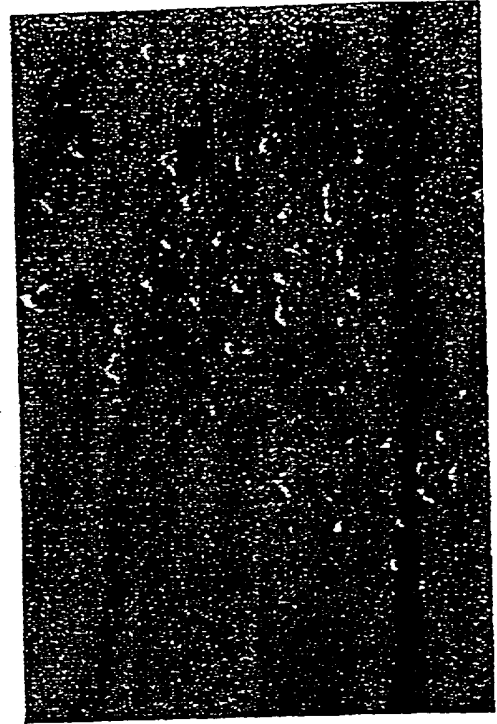


FIG. 9A

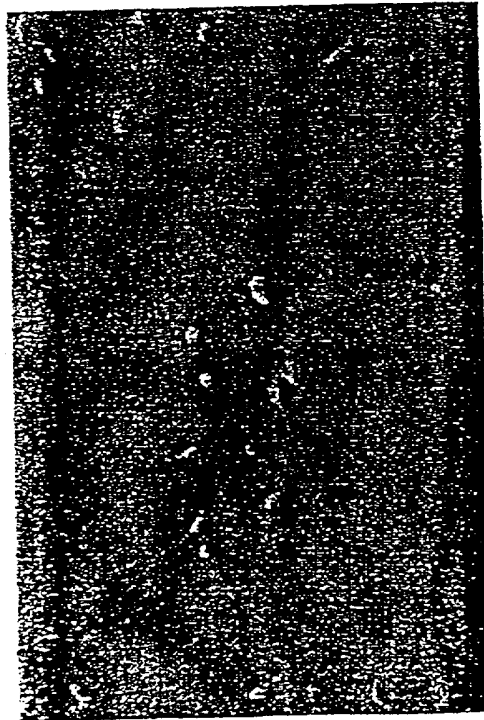
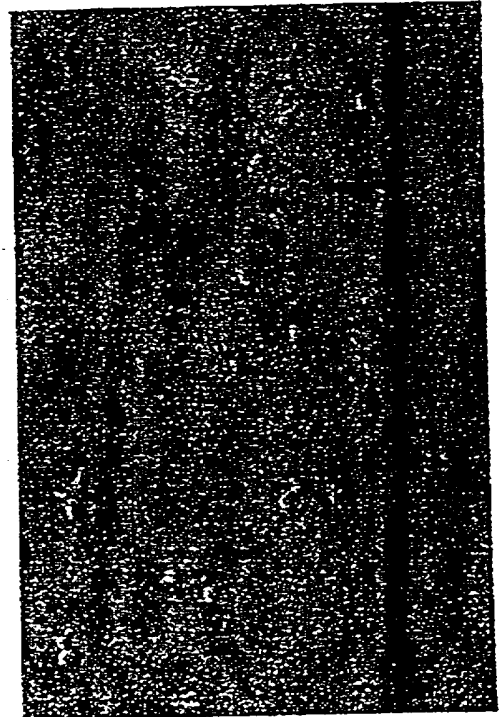


FIG. 9C



9/21

FIG.10

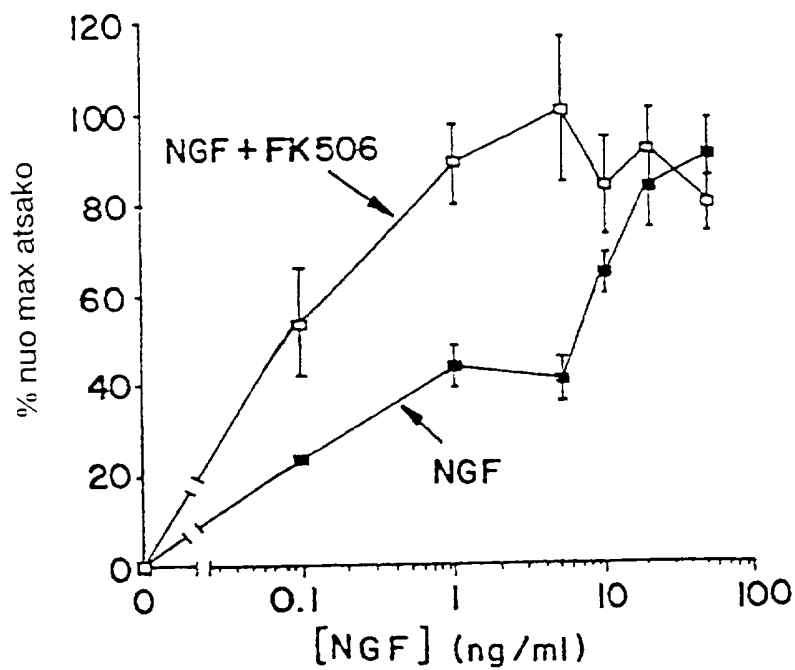
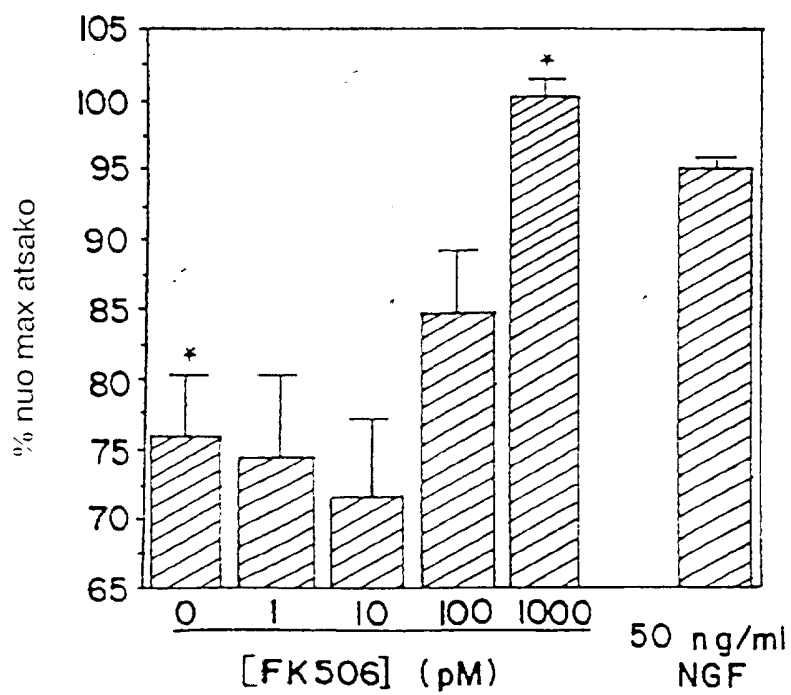


FIG.II



10/21



FIG. 12

11/21

FIG. 13A

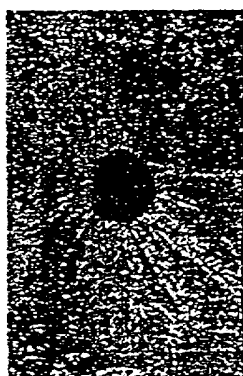


FIG. 13B



FIG. 13C



FIG. 13D

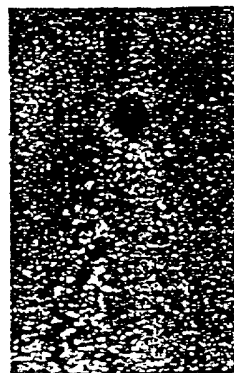


FIG. 13E



FIG. 13F

12/21

FIG. 14

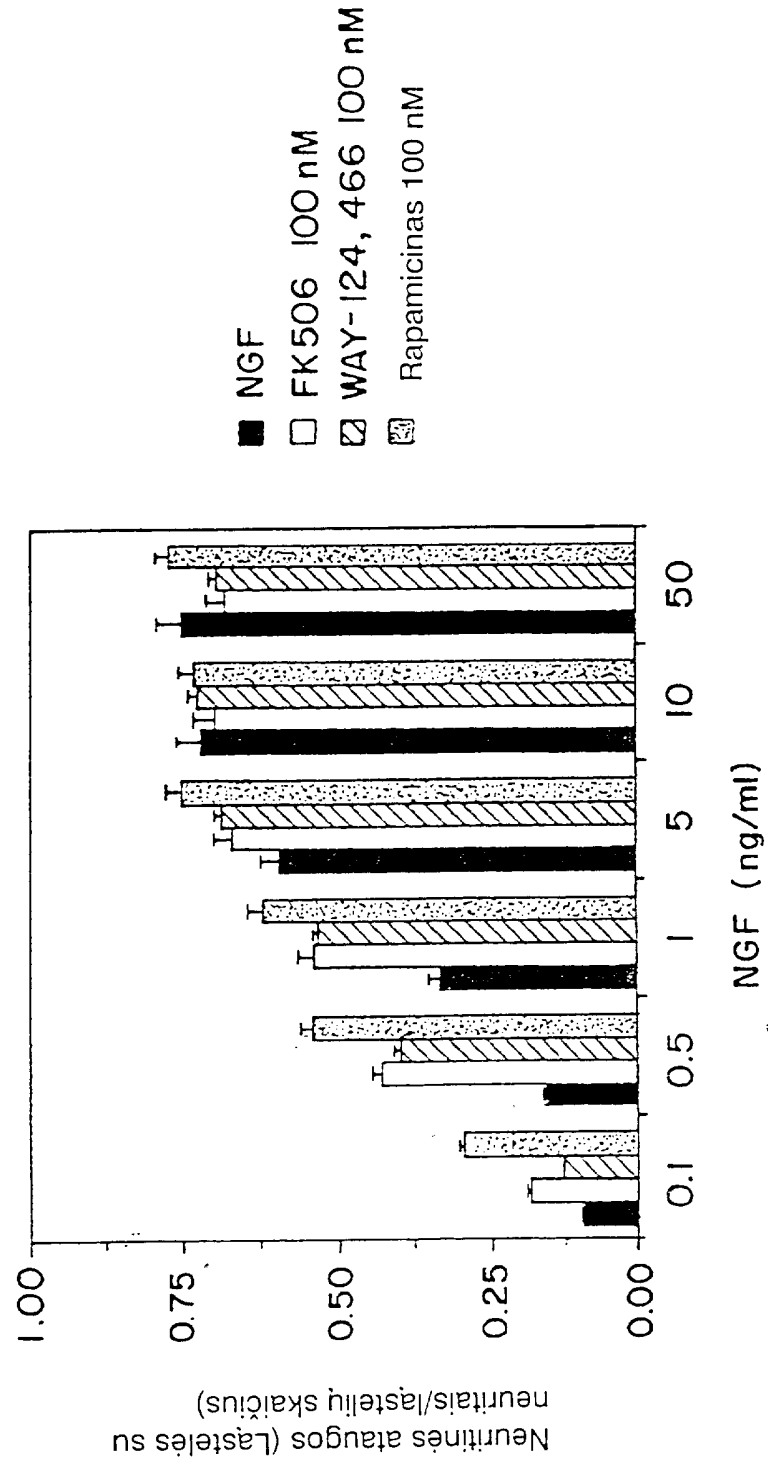
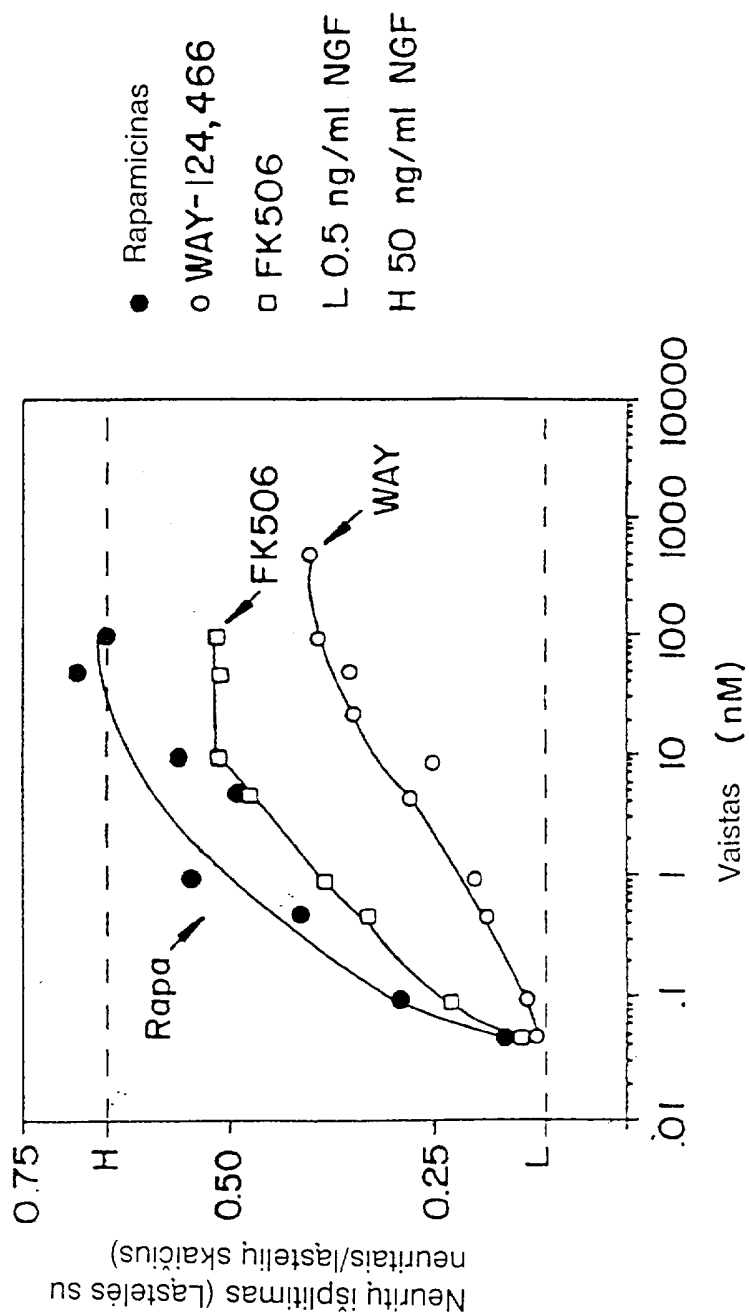




FIG. 15



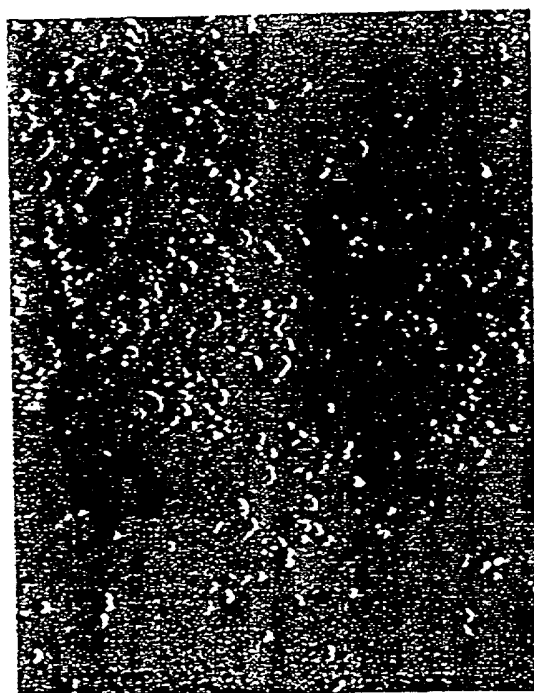


FIG. 16A

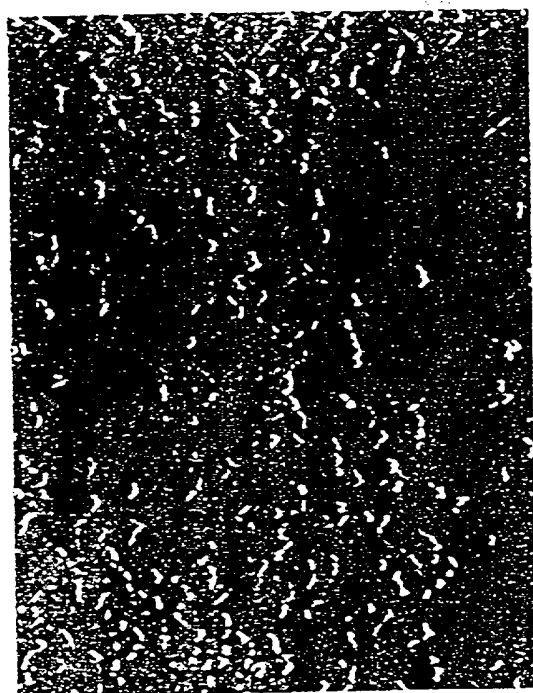


FIG. 16B

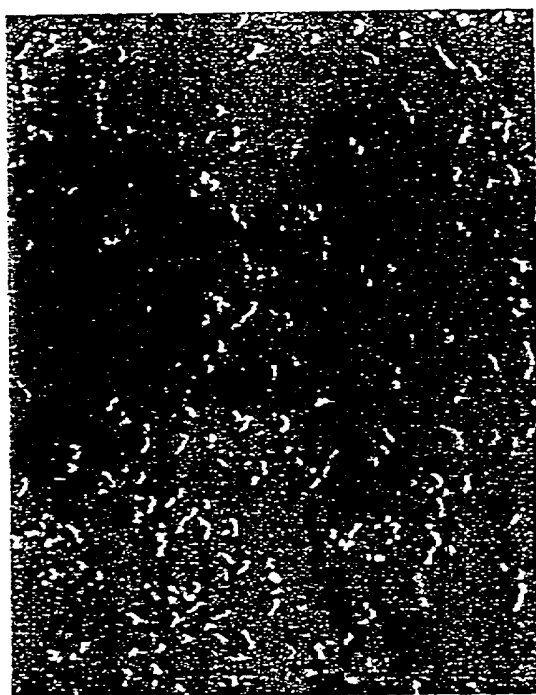


FIG. 16C

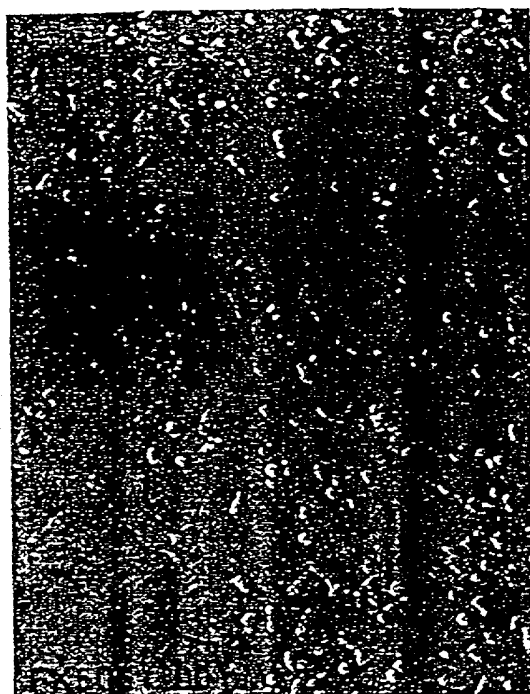


FIG. 16D

16/21

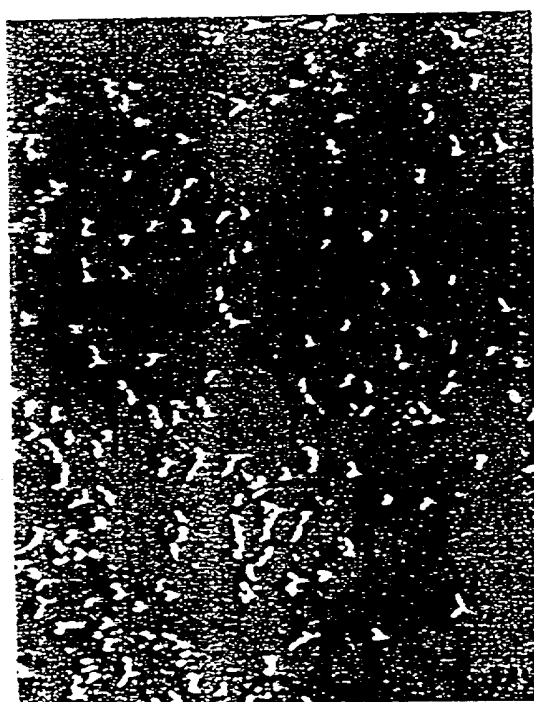


FIG. 16E

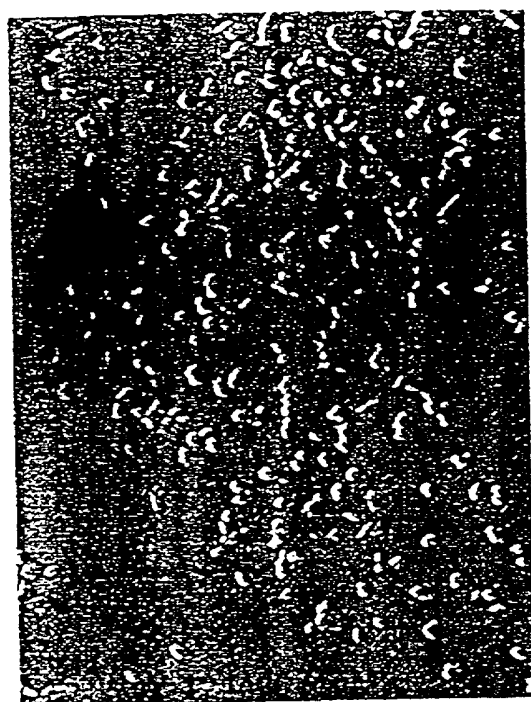


FIG. 16F

17/21

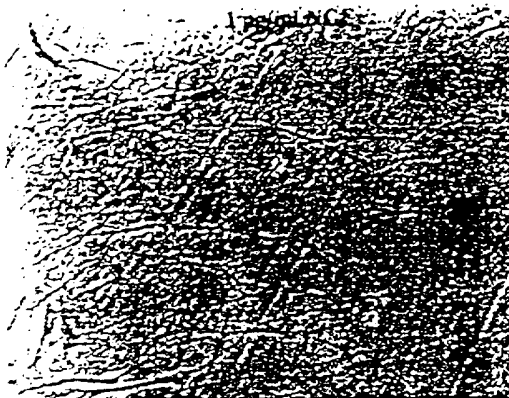


FIG. 17A



FIG. 17B

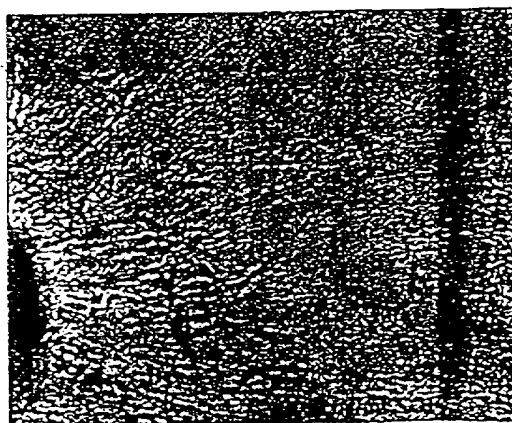
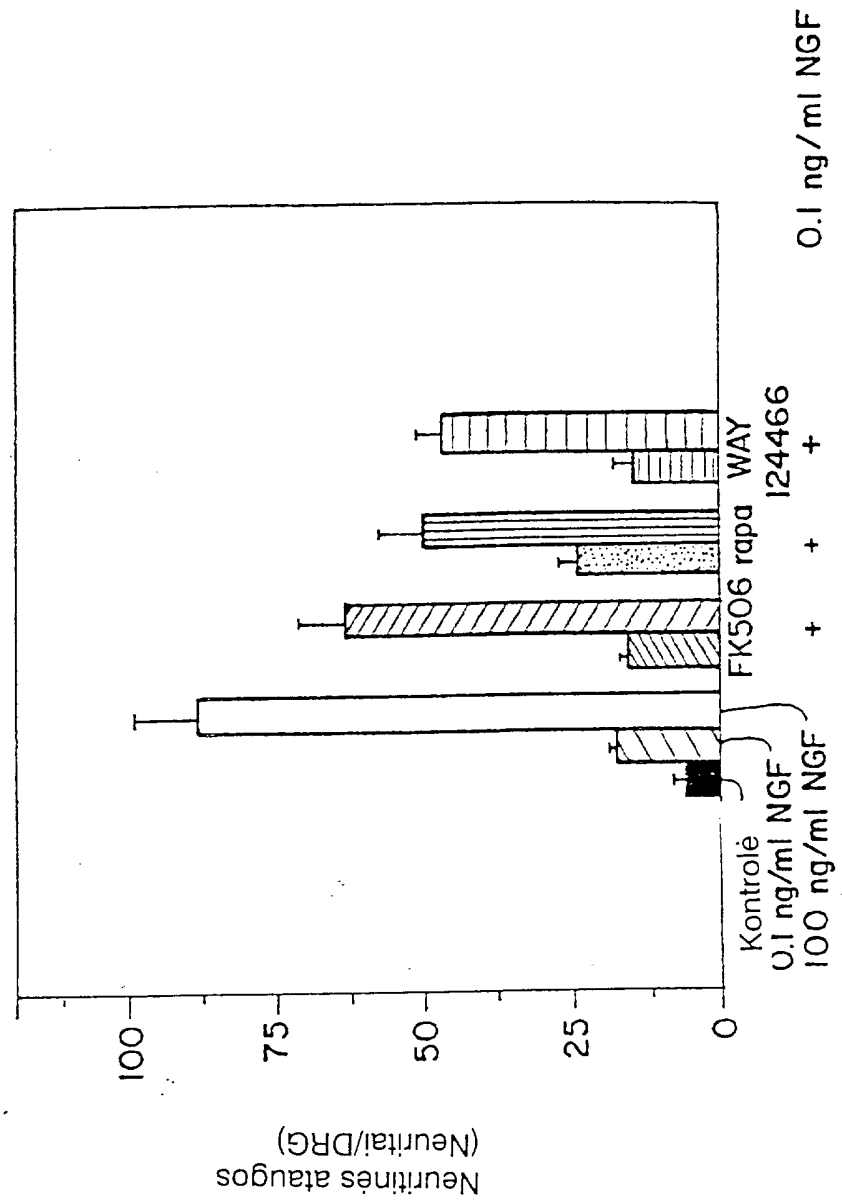


FIG. 17C

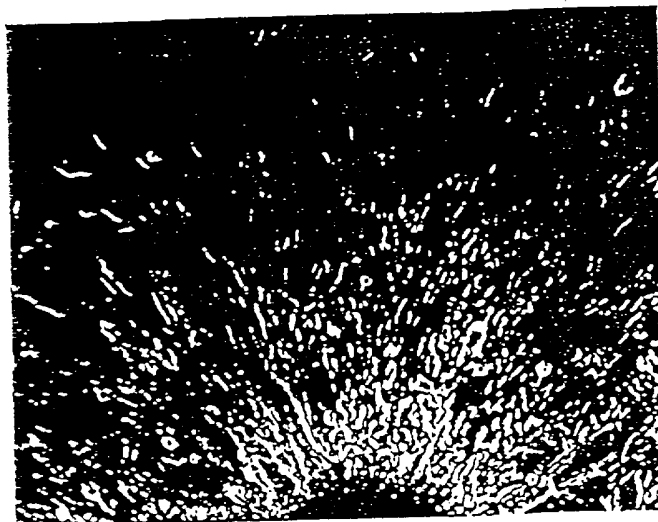
18/21

FIG. 18

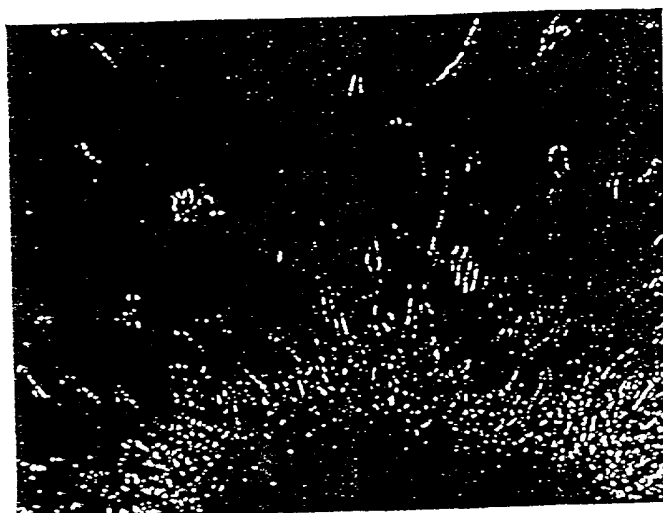


19/21

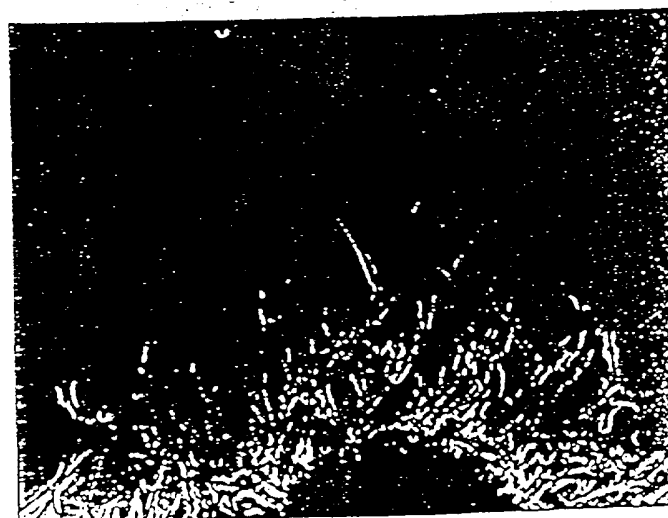
111 PAVYZDYS. Skatina neuritines ataugas  
viščiuko sensoriniuose neuronuose.



100 nM 111pvz.



100 pM 111 pvz.

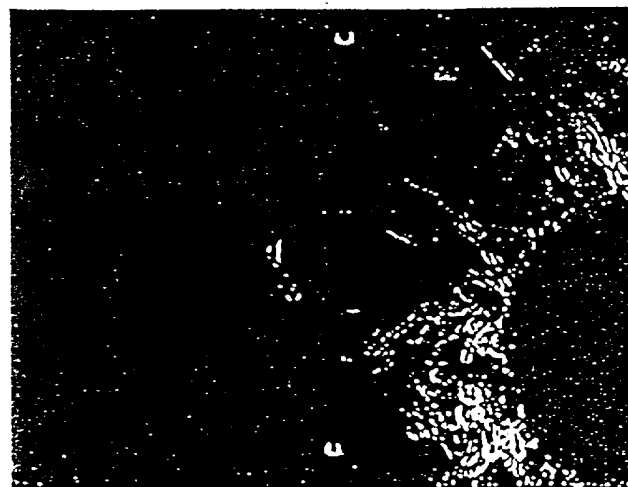


1 pM 111 pvz.

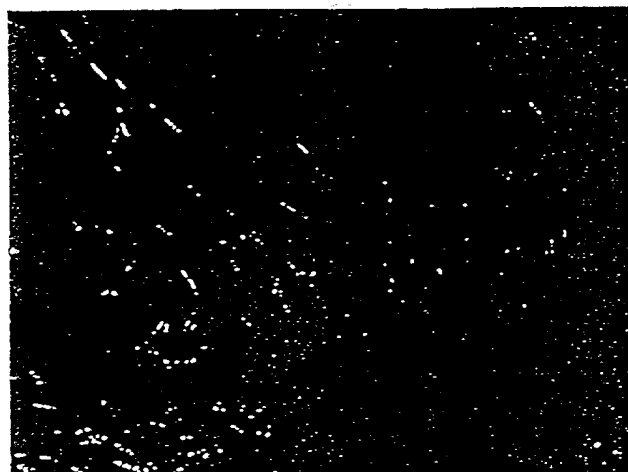
FIG. 19

20/21

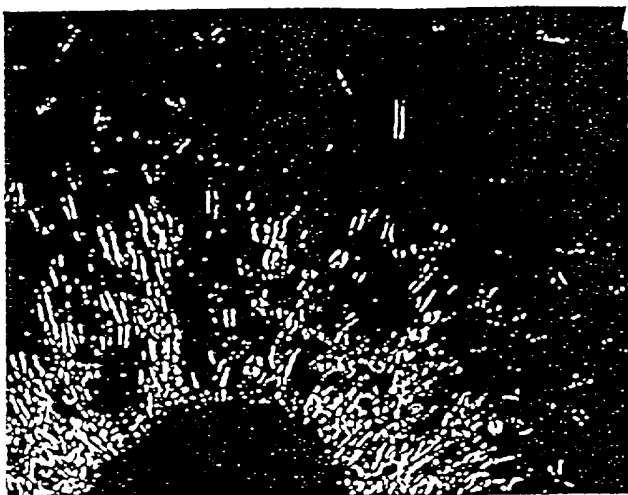
17 PAVYZDYS. Skatina neuritines ataugas viščiuko  
sensorinių neuronų kultūroje.



1 pM 17 pvz.



100 pM 17 pvz.



100 nM 17 pvz.

**FIG. 20**

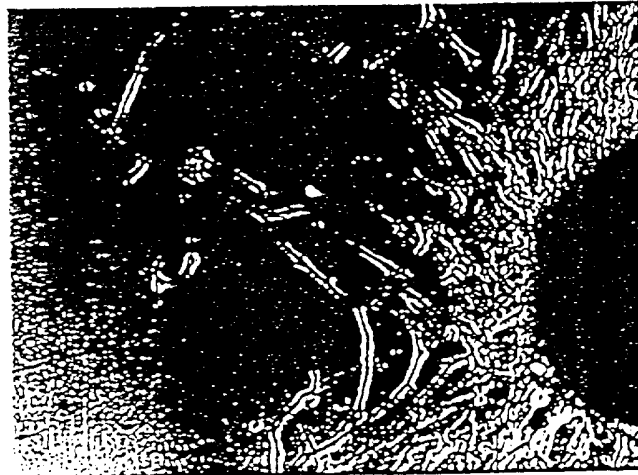


21/21

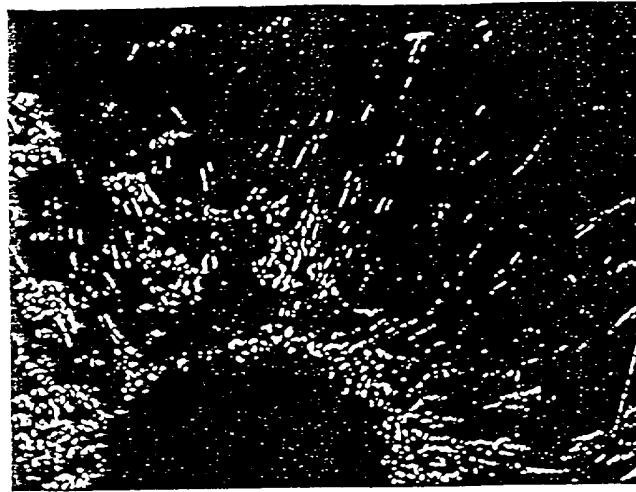
102 PAVYZDYS. Sukelia neuronų ataugas viščiuko  
sensoriniuose neuronuose.



1 pM 102 pvz.



100 pM 102 pvz.



100 nM 102 pvz.

FIG. 21