



(19) **HU**

MAGYAR KÖZTÁRSASÁG
Magyar Szabadalmi Hivatal

(11) Lajstromszám: **225 342**

(13) **B1**

SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: **P 03 01425**

(22) A bejelentés napja: **1993. 07. 26.**

(40) A közzététel napja: **1995. 11. 28.**

(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlöny és Védjegyértesítőben: **2006. 10. 30.**

(51) Int. Cl.: **C07D 498/22** (2006.01)

A61K 31/40 (2006.01)

C07D 519/00 (2006.01)

A61K 31/55 (2006.01)

(86) A nemzetközi (PCT) bejelentési szám:

PCT/US 93/06974

(87) A nemzetközi közzétételi szám: **WO 9402488**

(30) Elsőbbségi adatok:

07/920,102 **1992. 07. 24.** **US**

(62) Megosztási adatok:

P 95 00192 **1993. 07. 26.** **HU**

(72) Feltalálók:

Lewis, Michael E., Landenberg,
Pennsylvania (US);

Roberts-Lewis, Jill, Landenberg,
Pennsylvania (US);

Murakata, Chikara, Tokió (JP);

Saito, Hiromitsu, Mishima-shi,

Shizuoka-ken (JP);

Matsuda, Yuzuru, Tokió (JP);

Kauer, James C., Kennett Square,

Pennsylvania (US)

(73) Jogosultak:

Cephalon Inc., West Chester,

Pennsylvania (US);

Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd., Tokió (JP)

(74) Képviselő:

dr. Fehérvári Flóra, DANUBIA Szabadalmi és

Védjegy Iroda Kft., Budapest

(54)

**K-252a-származékok, és ezeket tartalmazó
gyógyászati készítmények és az új vegyületek**

(57) Kivonat

A találmány szerinti K-252a-származékok emlősök
neuronfunkciójának erősítésére alkalmas gyógyszerké-
szítmények előállítására alkalmazhatóak.

HU 225 342 B1

A leírás terjedelme 20 oldal (ezen belül 9 lap ábra)

A találmány a (III) és (IV) általános képletű K-252a-származékoknak neuronfunkció erősítésére alkalmas gyógyszerkészítmények előállítására történő alkalmazására vonatkozik. A találmány kiterjed az új (IV) általános képletű vegyületekre és az ezeket tartalmazó gyógyszerkészítményekre is. A bejelentés a P9500192 alapszámú bejelentés megosztása.

A proteinkinázok az enzimek nagy csoportját képezik, ezen enzimek az aminosavak foszforilezése révén számos, sejtben lévő fehérjét képesek kémiai módon módosítani.

A proteinkinázok inhibitorai szerkezetileg igen eltérőek, és számos (néhány esetben ellentmondó) hatást fejtenek ki az idegrendszerre és egyéb szövetekre. Egy adott proteinkináz-inhibitor képes arra, hogy több proteinkináz is befolyásoljon. Így például a K-252a jelű inhibitorról, amely egy alkaloid típusú anyag, amit a *Nocardiaopsis* sp. és *Actinomadula* sp. táptalajából különítettek el, eredetileg azt állapították meg, hogy proteinkináz C inhibitor, de a továbbiak során azt tapasztalták, hogy ezen anyag a proteinkináz A és G, a miozin könnyű láncú kináz és a trk inhibálására is képes [a trk rövidítés jelentése az idegsejt-növekedési faktor (NGF) által aktivált tirozinkináz; az idegsejt-növekedési faktor pedig egy neurotróf fehérje, amely a perifériális, érzékszervi és szimpatikus neuronok – idegsejtek – túlélését segíti elő]. Ezen utóbb említett hatással összhangban a K-252a jelű anyag blokkolja az NGF neurotróf hatását a PC-12 jelzésű sejteken [ezek patkányok mellékvesévelősejt-daganataiból levett kromafin sejtek (pheocromocytomák)], és elősegíti a hátsó gyöki ganglionneuronok és a hippocampalis neuronok túlélését. Azonban ez az anyag széles koncentrációtartományban citotoxikusnak mutatkozott, aminek következtében több kutató arra a véleményre jutott, hogy ezen anyagnak *in vivo* alkalmazása igen korlátozott.

Ismeretes, hogy a staurosporin, ami egy mikrobás eredetű alkaloid típusú, a K-252a anyaggal rokon termék, szintén többféle hatást fejt ki a proteinkinázokra és a különböző típusú sejtekre. Azt találták, hogy a staurosporin az NGF-hez hasonló hatást fejt ki a PC-12 jelzésű sejtek esetében, és védőhatást mutat, megakadályozza, hogy az ischaemiás állapotokat követően károsodás lépjen fel a hippocampusban. Ez az anyag (a staurosporin) képes arra, hogy a patkányok bazális előagyában a kolinerg neuronokban keletkezett károsodást megszüntesse.

A K-252a jelű anyagot és a staurosporint tumorinhibitoroként ajánlják. Ezenkívül a staurosporint inszekticid anyagként is javasolják alkalmazni. A staurosporin-származékokat, mint például a metil-amin-csoportot tartalmazó vegyületeket a következő célokra javasolják alkalmazni: tumorinhibálásra, gyulladásos állapotok inhibálására, az immunrendszer befolyásolására, valamint a kardiovaszkuláris és központi idegrendszer megbetegedéseinek kezelésére.

A találmány tárgyát képező új (IV) általános képletű K-252a-származékok képletében

R^1, R^2, R^4, Z^1 és Z^2 jelentése hidrogénatom és R^3 jelentése $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ képletű csoport (IV-1 jelű vegyület);

R^1, R^2, R^3, R^4, Z^1 és Z^2 jelentése hidrogénatom (IV-2 jelű vegyület);

R^1, R^2, Z^1 és Z^2 jelentése hidrogénatom és R^3 és R^4 jelentése $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ képletű csoport (IV-3 jelű vegyület); vagy

R^1, R^2, R^3, Z^1 és Z^2 jelentése hidrogénatom és R^4 jelentése $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ képletű csoport (IV-4 jelű vegyület).

Az új (IV) általános képletű vegyületek lehetnek gyógyszeratilag megfelelő sók formájában is. A (IV) általános képletű vegyületeknek gyógyszeratilag megfelelő sói közül említjük meg a gyógyszeratilag megfelelő savaddíciós sókat, fém sókat, ammónium sókat, a szerves aminvegyületekkel képzett addíciós sókat, továbbá az aminosavakkal képzett addíciós sókat.

A gyógyszeratilag megfelelő savaddíciós sók közül példaként említjük meg a szerves savakkal képzett addíciós sókat, mint például a sósavas sókat, kénsavval és foszforsavval képzett sókat, továbbá a szerves savakkal képzett addíciós sókat, mint például az acetátokat, maleátokat, fumarátokat, tartarátokat és citrátokat.

A gyógyszeratilag megfelelő fém sók közül említjük meg az alkálifém sókat, mint például a nátrium sókat és kálium sókat, az alkálifém- és alkáliföldfém sókat, mint például a magnézium sókat és kalcium sókat, továbbá az alumínium sókat és cink sókat. A gyógyszeratilag megfelelő ammónium sók közül említjük meg az ammónium sókat, valamint a tetraetil-ammónium sókat. A gyógyszeratilag megfelelő szerves aminvegyületekkel képzett addíciós sókra példaként említjük meg a morfolinnal és piperidinnel képzett sókat. A gyógyszeratilag megfelelő aminosavakkal képzett addíciós sók közül példaként említjük meg a lizinnel, glicinnel, valamint fenil-alaninnal képzett sókat.

A találmány tárgyához tartozik a (III) és (IV) általános képletű vegyületek alkalmazása gyógyszerkészítmények előállítására, továbbá az új (IV) általános képletű vegyületeket tartalmazó gyógyszerkészítmények is – a képletekben a helyettesítők jelentése az 1., 2., 3. és 4. táblázatban meghatározott –, amelyek a kolinerg neuronok, striatumneuronok, érzékszervi neuronok, így például a hátsóidegygyökér-ganglionneuronok funkcióját fokozzák. Az ezekkel végzett kezelés során emlősöknek, ideértve a humán betegeket is, terápiás mennyiségű új diszubsztituált staurosporin-származékot tartalmazó gyógyszerkészítményt adunk be. A gyógyszerkészítmény egy neurotróf faktort is tartalmazhat; neurotróf faktorként szerepelhet e családhoz tartozó vegyületek valamelyike, legelőnyösebben idegsejt-növekedési faktor (NGF). A neurotrófcsalád olyan fehérjecsoportot jelent, amely az NGF jelentős homológjait magában foglalja; ide tartozik az NGF mellett az agyból nyert neurotróf faktor is [BDNF; Leibrock és munkatársai: *Nature*, 341, 149–152, (1989)]; továbbá a neutrofil-3 [NT-3; Hohn és munkatársai: *Nature* 344, 339–341 (1990)]; valamint a neurotróf-5 [NT-5; Berke-meier és munkatársai: *Neuron* 7, 857–866 (1991)].

A találmányunk szerinti gyógyszerkészítményekkel és a találmányunk szerint előállított gyógyszerkészítményekkel (továbbiakban: találmányunk szerinti gyógyszerkészítmények) a kolinerg neuronok, a corpus striatum neuronjai, az érzékszervi neuronok, így például a hátsó gyöki ganglionneuronok funkciói erősíthetők. Ennek megfelelően ezek a gyógyszerkészítmények például az alábbi betegségek kezelésére alkalmasak: Alzheimer-kór, motorosneuron-megbetegedés, agyérrendszeri betegség, AIDS-szel kapcsolatos demencia, epilepszia, Huntington-kór, az agy vagy gerinc-agy rázkódásos vagy behatoló sérülésével kapcsolatos betegségek.

A fenti gyógyszerkészítmények terápiás mennyiségű K-252a jelű hatóanyag-származékot tartalmaznak, amely származékokat a (III) és (IV) általános képlettel írhatjuk le, a képletekben a szubsztituensek jelentését az alábbi táblázat foglalja össze.

1. táblázat

Vegyület	R ¹	R ²	X	R	Z ¹⁽¹⁾ Z ²
III-1	-	-	-	-	H
III-2	-	-	-	-	O
IV-1 ^(4,9)	H	H	-	-	H
IV-2 ⁽⁵⁾	Br	H	-	-	H
IV-3 ⁽⁶⁾	H	H	-	-	H
IV-4 ^(8,9)	H	H	-	-	H

(1) Z¹ és Z² jelentése egyaránt hidrogénatom, vagy együttes jelentésük egy oxigénatom;

(4) R³ jelentése -CH₂CH=CH₂; R⁴ jelentése hidrogénatom;

(5) R³ és R⁴ jelentése egyaránt hidrogénatom;

(6) R³ és R⁴ jelentése egyaránt -CH₂CH=CH₂ csoport;

(7) a vegyület sósavas só formájában van;

(8) R³ jelentése hidrogénatom és R⁴ jelentése -CH₂CH=CH₂ csoport;

(9) IV-1 és IV-4 jelentése e két komponens 1,5-1,0 arányú elegye.

Ahogy fentebb említettük, a találmányunk szerinti gyógyszerkészítmények tartalmazhatnak egy neurotróf faktort is, erre a célra a neurotrofincsalád valamely tagját választjuk, legelőnyösebb az idegnövekedési faktor (NGF). Ezek a készítmények Huntington-kór kezelésére is alkalmasak.

Találmányunk egyik előnyös kiviteli alakja olyan (III) általános képletű K-252a-származékot tartalmazó gyógyszerkészítményre vonatkozik, amellyel a hátsó gyöki ganglion idegsejt funkciói erősíthetők. Az ezzel végzett kezelés során valamely emlősnek, ideértve a humán betegeket is, ezen származékok terápiásan hatásos mennyiségét adjuk be. A (III) általános képletben a szubsztituensek jelentését a 2. táblázatban foglaljuk össze.

2. táblázat

Vegyület	R ¹	X	R	Z ¹⁽¹⁾ Z ²
III-1	-	-	-	H
III-2	-	-	-	O

(1) Z¹ és Z² jelentése egyaránt hidrogénatom, vagy együttes jelentésük egy oxigénatom.

A találmányunk szerinti gyógyszerkészítmény neurotróf faktorként előnyösen a neurotrofincsalád valamely tagját tartalmazza, előnyösen idegsejt-növekedési faktort (NGF) tartalmaz.

A neurotróf faktorként előnyösen a neurotrofincsalád valamelyik tagját, legelőnyösebben idegsejt növekedési faktort (NGF) tartalmazó gyógyszerkészítmények Huntington-kór gyógyítására alkalmasak.

Találmányunk egy másik megvalósítási módja szerint a corpus striatum-idegsejtek funkcióit javító és/vagy emlősöknél (ideértve a humán betegeket is) e sejtek túlélését fokozó hatású gyógyszerkészítményt állítunk elő, amely terápiás mennyiségben egy (III) vagy (IV) általános képletű K-252a-származékot tartalmaz;

a képletben a szubsztituensek jelentését a 3. táblázat foglalja össze.

3. táblázat

Vegyület	R ¹	R ²	X	R	Z ¹⁽¹⁾ Z ²
III-1	H	H	-	-	H
IV-1 ⁽²⁾	-	H	-	-	H

(1) Z¹ és Z² jelentése egyaránt hidrogénatom;

(2) R³ jelentése CH₂-CH=CH₂ képletű csoport és R⁴ jelentése hidrogénatom.

Találmányunk egy másik kiviteli alakját képezi a K-252a jelű speciális funkciós származékok olyan neurológiai betegségek vagy zavarok kezelésére alkalmas gyógyászati készítmények előállítására történő alkalmazása, amely betegségekre jellemző, hogy sérült neuronok, axonális degenerációt mutató neuronok vagy olyan neuronok keletkeznek, amelyeknél a pusztulás veszélye áll fenn. Ezen funkciós származékokat adhatjuk önmagukban vagy egy neurotróf faktoral együtt [előnyösen a neurotrofincsalád egy tagját adjuk, legelőnyösebb az az eset, amikor az idegnövekedési faktoral együtt (NGF) adjuk]. Funkcionális származék alatt olyan K-252a-származékokat értünk, ahol ezen molekula módosított származékáról van szó, ahol a származék kedvező biológiai hatást mutat, amit a továbbiakban neuroprotektív hatásnak nevezünk, ilyen hatás például az idegsejtek túlélését fokozó képesség, vagy az idegszálak (így például axonális) növekedését fokozó képesség, vagy pedig a kolinerg idegsejtek funkcióit javító hatás, vagy az érzékelősejtek, mint például hátsó gyöki ganglionidegsejtek funkcióit javító ké-

pesség, vagy a corpus triatum neuronjainak túlélését és/vagy funkcióját fokozó képesség. A molekula ilyen módosítása javíthatja egyidejűleg a vegyület oldékonyságát, abszorpcióját, szállíthatóságát (így például a véráram korlátján és a sejtmembránon keresztül történő szállítását), továbbá növelheti a vegyület biológiai felezési idejét és így tovább. Másik lehetőségként vagy pluszhatásként némely csoportnak a vegyületbe való bevitel csökkentheti a vegyület toxicitását, vagy pedig a vegyület valamely nemkívánatos mellékhatását mérsékelheti, vagy teljesen kiküszöbölheti.

Az ezen kiviteli alakban alkalmazott vegyületeket a (III) és (IV) általános képlettel írhatjuk le; e képletekben lévő szubsztituensek jelentését az alább következő 4. táblázat sorolja fel, szemléltetve a találmány oltalmi köréhez tartozó vegyületeket. A K-252a jelű vegyületnek találmány szerinti funkciók származékait új eljárással, egy kémiai szintézis segítségével állíthatjuk elő, amelynek során ismert módszereket alkalmazunk. Így például a (III) képletű vegyület előállítására ismert módszerekkel történik [Moody és munkatársai: J. Org. Chem. 57, 2105–2114. oldal (1992); Steglich és munkatársai: Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 19, 459–460 (1980); Nakanishi és munkatársai: J. Antibiotics 39, 1066–1071 (1986); a 60-295172 számú japán szabadalmi bejelentés (1985)].

4. táblázat

A K-252a¹⁰ jelű vegyület funkciók származékai

Vegyület	R ¹	R ²	X	R	Z ¹⁽¹⁾ Z ²
III-1	–	H	–	–	H
III-2	–	H	–	–	O
IV-1 ^(4,9)	H	H	–	–	H
IV-2 ⁽⁵⁾	Br	H	–	–	H
IV-3 ⁽⁶⁾	H	H	–	–	H
IV-4 ^(8,9)	H	H	–	–	H

(1) Z¹ és Z² jelentése egyaránt hidrogénatom, vagy együttes jelentésük egy oxigénatom;

(4) R³ jelentése –CH₂CH=CH₂; R⁴ jelentése hidrogénatom;

(5) R³ és R⁴ jelentése egyaránt hidrogénatom;

(6) R³ és R⁴ jelentése egyaránt –CH₂CH=CH₂ csoport;

(8) R³ jelentése hidrogénatom és R⁴ jelentése –CH₂CH=CH₂ csoport;

(9) IV-1 és IV-4 jelentése e két komponens 1,5–1,0 arányú elegye;

(10) a K-252a jelű vegyületben R¹ és R² jelentése hidrogénatom, X jelentése CO₂CH₃ csoport, R jelentése hidroxilcsoport, Z¹ és Z² jelentése hidrogénatom.

A találmány szerinti gyógyszerkészítményekkel fokozható a kolinerg neuronok funkciója is, az ezekkel végzett kezelés során terápiásan hatásos mennyiségben K-252a hatóanyag-származékot adunk a betegnek; e vegyületet a (III) és (IV) általános képlettel írhatjuk le; a szubsztituensek jelentését a 4. táblázatban adjuk meg (a K-252a jelű vegyületre vonatkozik a 10. láb-

jegyzet). E vegyületet a szakirodalomban ismertetett módszerekkel állítjuk elő [lásd Matsuda és munkatársai: 4 554 402 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás; Kase és munkatársai: J. Antibiotics 37:1059–1065 (1986)]. A leírásban alkalmazott „kolinerg neuronok funkcióinak fokozása” kifejezés azt jelenti, hogy elősegítjük a kolinerg idegsejtek túlélését és/vagy az idegszálak (mint például az axonális szálak) növekedését, és/vagy fokozzuk az idegsejtek kolinerg tevékenységét. A K-252a jelű vegyületet alkalmazhatjuk önmagában vagy egy neurotróf faktorral együtt, célszerűen a neurotrofincsalád egy tagja jön számításba, legelőnyösebb, ha az idegnövekedési faktort (NGF) használjuk.

K-252a jelű vegyület funkciók származékait alkalmazhatjuk önmagukban vagy valamely neurotróf faktorral, mint például NGF-fel kombinálva; e vegyületeket terápiás célokra használhatjuk neurológiai betegségek kezelésénél, elsősorban olyan betegségek jöhetnek itt figyelembe, amelyekre jellemző, hogy a sérült, korlátozott, axonális degenerációban szenvedő, vagy pusztulás veszélyének kitétt neuronsejtek fokozott szerepet játszanak, vagy olyan neuronsejtek vannak jelen, amelyek csökkent kolinerg hatást mutatnak. E betegségekhez tartoznak azok is, amelyeket a serkentőaminosavak idéznek elő. A találmány szerinti vegyületek bioaktivitását, ideértve a neurotróf faktorokkal való kombinációk bioaktivitását is, ismert módon vizsgáljuk PC-12 jelzésű sejtek tenyésztésében az ornitin-dekarboxiláz-módszerrel, továbbá gerincagysejtek tenyésztésében kolin-acetil-transzferáz-vizsgálattal, a hátsó gyöki ganglionneuronok túlélésének vizsgálatával, corpus triatum-tenyésztésben végzett neurontúlélési vizsgálattal vagy az in vivo körülmények között végzett excitotoxin neurop vizsgálattal, e módszereket az alábbiakban részletezzük. A találmány szerinti vegyületek előnyösen alkalmazhatók a humán páciensek kezelésére vagy egyéb emlősöknél, amelyek neurológiai betegségekben vagy zavarokban szenvednek, amely betegségekre jellemző a neuronsejtek pusztulásának vagy téves működésének fokozott veszélye a fentiekben ismertettek szerint. Ezen neurológiai betegségek és zavarok közül említjük meg nem korlátozó értelemben az alábbiakat: az Alzheimer-kór; motorosneuron-megbetegedés, ideértve az izomsorvadásos laterális szklerózist; továbbá Parkinson-kór, agyvérzés és az egyéb ischaemiás károsodások; Huntington-féle kór; AIDS-szel kapcsolatos demencia, epilepszia, rázkódásból vagy behatolásból eredő agyi vagy gerincvelő-károsodás, valamint a perifériális neuropátiák.

A találmány szerinti vegyületeket gyógyászati készítményekké alakíthatjuk oly módon, hogy ezeket gyógyászatilag megfelelő nem toxikus segéd- és vivőanyagokkal elegyítjük. Ezen készítményeket alkalmazhatjuk parenterális beadásra, elsősorban folyékony oldatok vagy szuszpenziók formájában; készíthetünk orális beadásra szánt készítményeket, elsősorban tablettákat vagy kapszulákat; továbbá előállíthatunk orron keresztül beadható készítményeket, így például porokat, nazális cseppeket vagy aeroszolokat.

A készítményeket előnyösen egységdózis formájában adjuk, előállításuk a gyógyszerészeti technológia ismert módszerei szerint történik, lásd például Remington's Pharmaceutical Sciences [Mack Pub. Co, Easton, PA, 1980]. A parenterális beadásra szánt készítmények tartalmazhatnak olyan általánosan használt vivőanyagokat, mint steril víz vagy sóoldatok, polialkilénlikolok, mint például polietilénlikol, növényi eredetű olajok, hidrogénezett naftalinszármazékok és így tovább. Különösen előnyös a biokompatibilis, biológiailag lebontható laktidpolimerek, laktid/glikolid kopolimerek vagy poli(oxi-etilén)-poli(oxi-propilén) kopolimerek alkalmazása, amelyek a hatóanyag szabályozott leadását képesek biztosítani. Ezen hatóanyagokhoz alkalmazható egyéb parenterális célra szánt vivőanyagok közül említjük meg az etilén-vinil-acetát kopolimer részecskéket, az implantálható infúziós rendszereket, az ozmotikus szivattyúkat és a liposzómákat. Az inhalálás céljára szánt készítmények tartalmazhatnak vivőanyagként például laktózt, vagy készíthetünk vizes oldatokat, amelyek például poli(oxi-etilén)-9-lauril-étert, glikokolátot vagy dezoxikolatot tartalmaznak, vagy készíthetünk olajos oldatokat, amelyeket nazális cseppek formájában adhatunk a betegeknek, vagy készíthetünk intranazális alkalmazásra szánt géleket. A parenterálisan beadásra szánt készítmények mellett megemlítjük a szájon keresztül beadandó, glikokolátot tartalmazó készítményeket, a metoxi-szalicilátot tartalmazó rektális készítményeket és a citromsavat tartalmazó vaginális készítményeket.

A találmány szerinti hatóanyagokat alkalmazhatjuk egyedüli vegyületként vagy egyéb hatóanyagokkal kombinálva gyógyászati készítmények formájában, így például használhatunk egyéb hatóanyagként növekedést elősegítő faktorokat, amelyek elősegíthetik a neuronális túlélést, vagy a neurológiai betegségek és rendellenességek esetében az axonális növekedést, így például a perifériás neuropátia kezelésénél.

A találmány szerinti vegyületeket tartalmazó gyógyászati készítményekben a hatóanyagok koncentrációja több tényezőtől függ, ezek közül említjük meg a beadandó gyógyszer dózsisát, az alkalmazott vegyület kémiai jellemzőit (így például hidrofób jellegét), továbbá a beadás útját. Általában a találmány szerinti vegyületeket vizes, fiziológiás pufferoldatban adjuk, ahol az oldat 0,1–10 tömeg/térfogat%-os parenterális célra szánt készítmény. Általában a beadandó dózis értéke mintegy 1 µg/kg-tól 1 g/kg testtömeg/nap között változhat; az előnyös dózis mennyisége mintegy 0,01 mg/kg és 100 mg/kg testtömeg/nap érték között van. Az előnyös dózis nagysága több tényezőtől függ, így például a neurológiai betegség mértékétől és előrehaladott állapotától, a kezelt beteg általános egészségi állapotától, valamint a kiválasztott vegyület relatív biológiai hatásától, továbbá a választott készítményformától, a vivőanyagoktól és a beadás módjától.

A találmány szerinti megoldást az alább következő példák szemléltetik. A példákat a korlátozás szándéka nélkül ismertetjük; az oltalmi kört az igénypontok határozzák meg.

Az ábrák ismertetése

- Az 1. ábra szemlélteti a K-252a, az 1,6-hexametilén-bisz(karbamoil-staurosporin) (HBCS) és a staurosporin hatását a bazális ornitin-dekarboxiláznak (ODC) a PC-12 jelzésű sejtekben kifejtett működésére. Az ábrán feketével jelöljük az alapszintet, majd felváltva csíkozott és fekete kockával jelöljük a 2 nmol, 20 nmol és 200 nmol/l koncentrációjú oldatokban kapott értékeket.
- A 2. ábra szemlélteti a staurosporin, HBCS és a K-252a-nak az NGF-fel stimulált ODC-re kifejtett hatását a PC-12 jelzésű sejtekben. Az ábrákon a jelölések az 1. ábránál megadottal azonosak.
- A 3. ábra szemlélteti az NGF-fel fokozott HBCS-hatást az ODC vonatkozásában a PC-12 jelzésű sejtekben, az ábrán négyzettel jelöljük az NGF nélkül végzett kísérleteket, és rombuszsal az NGF jelenlétében végzett kísérleteket.
- A 4. ábra szemlélteti a K-252a által a kolin-acetil-transzferázra (ChAT) kifejtett hatást patkányoktól levett embrionális gerincagysejt-tenyészetekben. A vízszintes tengelyen a K-252a növekvő koncentrációját tüntetjük fel. A függőleges tengelyen a ChAT-hatást tüntetjük fel.
- Az 5. ábra szemlélteti a K-252a-nak a ChAT-re kifejtett hatását patkányoktól levett embrionális gerincagysejt-tenyészetben az idő függvényében. A vízszintes tengelyen a tenyésztés idejét adjuk meg napokban. A függőleges tengelyen a ChAT-hatást tüntetjük fel.
- A 6. ábra szemlélteti a K-252a hatását a csirkeembrió hátsó gyöki ganglionneuronok túlélése tekintetében. A vízszintes tengelyen a K-252a koncentrációját tüntetjük fel. A függőleges tengelyen a relatív fluoreszcenciaértékek láthatók.
- A 7. ábra mutatja be a K-252a funkciók származékainak a csirkeembrió hátsó gyöki ganglionneuronok túlélésére kifejtett hatását. A vízszintes tengelyen az NGF-fel indukált hatásvnövekedés látható %-ban. A függőleges tengelyen a vizsgált vegyületek szerepelnek. Az ábrán szereplő (II) általános képletű alá tartozó vegyületeket a P9500192 alapszámú magyar bejelentésben ismertették.
- A 8. ábra szemlélteti a K-252a funkciók származékainak a ChAT-re kifejtett hatását patkányembrióktól levett gerincagysejt-tenyészetekben. A vízszintes és függőleges tengelyen a 7. ábránál megadott adatok szerepelnek.
- A 9. ábra mutatja be a K-252a hatását a kainát által a patkányhippocampusban létre-

- hozott károsodás vonatkozásában. A függőleges tengelyen a károsított területek száma látható.
- A 10. ábra mutatja be a K-252a által kifejtett hatást a kainát által a patkányoktól levett hippocampusban előidézett spektrinproteolízis vonatkozásában. A függőleges tengelyen a spektrinproteolízis %-os értéke látható a kontrollhoz viszonyítva.
- A 11. ábra mutatja be a HBCS hatását a kainát által a hippocampusban előidézett károsodás vonatkozásában. A függőleges tengelyen a károsított területek száma látható.
- A 12. ábra szemlélteti a K-252a-analógok hatását a kainát által a patkányoktól levett hippocampusban előidézett spektrinproteolízisre. A függőleges tengelyen láthatjuk a spektrinproteolízis mértékét; a vízszintes tengelyen a kísérlethez használt vegyületek szerepelnek.
- A 13. ábra szemlélteti a corpus triatum neuronjainak túlélését K-252a jelenlétében. A függőleges tengelyen a sejttúlélés látható (szoros növekedés). A vízszintes tengelyen a K-252a koncentrációja van feltüntetve.
- A 14. ábra mutatja be a corpusstriatum-sejtek túlélését K-252a jelenlétében. A függőleges tengelyen a sejtszám látható. A vízszintes tengelyen a tenyésztés időtartamát tüntetjük fel napokban. Feketével jelöljük a kontrollértékeket, vonalkázva jelöljük a K-252a-val kapott eredményeket.
- A 15. ábra szemlélteti a corpusstriatum-neuronok túlélését K-252a jelenlétében és anélkül. A 15a. ábrán a kontroll látható, a 15b. ábrán a 75 nmol/l koncentrációjú K-252a jelenlétében kapott eredmény van feltüntetve.

1. példa

A PC-12 jelzésű sejtek patkányok mellékvesevélő-daganatából származó klónozott sejtenyészet, ezen tenyészetet eredményesen alkalmazzák az NGF hatásának tanulmányozására [Guroff: Cell Culture in the Neurosciences, Plenum Publishing Corporation, 8. fejezet, 245-272. oldal (1985)]. Ezen sejtenyészetekben az NGF hatása elsősorban abban nyilvánul meg, hogy az NGF az ornitin-dekarboxiláz (ODC) tevékenységét nagymértékben stimulálja; ezen tevékenységről megállapították, hogy ez 200 nmol/liter koncentrációjú K-252a segítségével eredményesen blokkolható [Koizumi és munkatársai, 1988]. Jelen példában ismertetett kísérleteink során PC-12 jelzésű sejteket [amelyeket Dr. Guroff G.-tól kaptunk] tenyésztünk 48 nyílású lemezekben, a nyílásokba 6×10^4 sejt/cm² sűrűségű szuszpenziót adunk. A nyílásokba staurosporint vagy

HBCS-t, valamint a gyógyszerekhez használt vivőanyagot (0,5 tömeg% DMSO) adunk. A K-252a jelű vegyületet és staurosporint a kereskedelmi forgalomban Kamiya Biomedical cégtől szereztük be. Négy órával a gyógyszer hozzáadása után a sejteket összegyűjtjük ODC-vizsgálat céljára; a vizsgálatot Huff és munkatársai által ismertetett módszer szerint [J. Cell. Biol. 88, 189-198 (1981)] végezzük.

- Mindhárom vegyület fokozza az ODC hatását, azonban a három vegyület hatásossága között lényeges differenciák mutatkoztak (lásd az 1. ábrát). A K-252a jelű vegyület a dózistól függően fokozza az ODC hatását, ami 2 nmol/l koncentrációnál jól észlelhető. A hatás fokozódik egészen a 200 nmol/liter koncentrációnál mért maximumig (36,3-szeres indukálás). Hasonlóképpen a staurosporin hatása jól észlelhető volt 2 nmol/l koncentrációnál, azonban a csúcserteket már 20 nmol/l koncentrációnál elérjük (34,7-szeres indukálás), és 200 nmol/l koncentrációnál a hanyatlás már jelentősnek mutatkozott. Hasonlóképpen a HBCS 2 nmol/l koncentrációnál észlelhető hatást mutatott, azonban a magasabb koncentrációértékeknél a hatás nem fokozódott, így a maximális hatásosság lényegesen kisebb volt, mint amit a másik két vegyületnél észleltünk (6,5-szeres indukálás). Egy másik kísérletsorozatban összehasonlítottuk a PTCS, PCS és ECS-nek a PC-12 jelzésű sejtekben mért, ODC-re kifejtett aktivitását, és a kapott eredményeket összehasonlítottuk a K-252a jelű vegyülettel elért eredményekkel. Amennyiben a K-252a jelű vegyület 200 nmol/l koncentrációértéknél észlelt hatását 100%-nak vesszük, úgy a PTCS által mutatott érték a K-252a-hoz viszonyítva mindössze 71,4% volt; ugyanakkor a PCS és ECS által mutatott hatás 88,9%-osnak, illetőleg 61,9%-osnak mutatkozott a K-252a-hoz viszonyítva. Meg kell jegyezni azonban, hogy a proteinkináz C H-7 inhibitor 30 μ mol/l koncentrációértéknél nem indukálta az ODC aktivitását, amely koncentrációról az vált ismertté, hogy a proteinkináz C aktivitását inhibálja [Nakadate és munkatársai, Biochem. Pharmacol. 37, 1541-1545. oldal (1988)].

- A K-252a jelű vegyület, a staurosporin és HBCS azon képességét, miszerint ezen anyagok az NGF bioaktivitását potenciózzák és/vagy inhibálják, oly módon vizsgáljuk, hogy 10 μ g NGF/ml sejtenyészethez fenti vegyületeket adjuk az előbbieken megadott koncentrációban; a vizsgálatot a fentiekben leírt, a sejtek ODC-vizsgálata szerint végezzük (az eredményeket a 2. ábra tünteti fel). Az NGF koncentrációját oly módon választjuk meg, hogy az egy közepes indukációs szintet biztosítson, és ezáltal a vizsgált vegyületek inhibitor- vagy potenciózóhatása jól kitűnjön. 200 nmol/l koncentrációjú K-252a jelű vegyület inhibálja az ODC-nek az NGF által előidézett indukációját, mint ahogy azt Koizumi és munkatársai észlelték (1988), de meglepő módon e vegyület az indukációt alacsonyabb koncentrációértékeknél határozottan potenciózza (2 nmol/liter és 20 nmol/liternél). A staurosporin 2 nmol/l koncentrációértéknél szintén potenciózza az NGF indukációs hatását, azonban ez a hatás magasabb

koncentrációértékeknél (20 és 200 nmol/l) eltűnik. A HBCS ezzel szemben az NGF hatását minden koncentrációértéknél potenciórozza. Ezt a meglepő hatást szemlélteti a 3. ábra, ahol feltüntetjük az önmagában adott HBCS-nek kismértékű ODC-indukáló hatását is.

2. példa

A K-252a jelű vegyületnek kolin-acetil-transzferázra (ChAT) kifejtett hatását patkányembriók gerincvelőjéből készített tenyészetben standardmódszerekkel ellenőrizzük (lásd az alábbiakban). A ChAT olyan enzim, amely a neuronátvitelnél szereplő acetil-kolin szintézisét katalizálja, és specifikus biokémiai jelzőanyagként tekinthető a kolinerg neuronok tekintetében. A gerincvelőben a kolinerg neuronok nagyobb része motoros neuron. Ezen enzim vizsgálata tehát felhasználható egy olyan faktor indikátoraként, amely vagy amelyek a kolinerg neuronok túlélését és/vagy ezen enzim szabályozóképességét befolyásolják.

Megadott koncentrációértékben K-252a jelű vegyületet adunk a sejtenyészethez 2-3 óráig tartó inkubációs időt követően, amely idő alatt a sejteknek módjukban állt a szubsztrátumhoz kapcsolódni. 48 óra eltelte után a táptalajban ChAT-aktivitást mérünk. Gerincgaggyenyészetben a K-252a jelű vegyület dózistól függő növekedést idéz elő a ChAT-aktivitásban, a hatásosság maximuma (2-3-szoros növekedés) 200–300 nmol/liter koncentrációnál lép fel (az eredményeket a 4. ábra tünteti fel). A nagyobb koncentrációértékek esetében a ChAT-aktivitás csökkenése észlelhető (lásd a 4. ábrát). Hosszabb ideig tartó inkubációs idők esetében – egészen 7 napig tartóan – a ChAT-aktivitás tekintetében a vizsgált vegyület 4–5-szörös növekedést eredményezett (lásd az 5. ábrát), ami a ChAT-aktivitás csökkent alapszintjének tulajdonítható. Ebben a táptalajrendszerben növekvő számú motoros neuron degenerálódik vagy pusztul el az alap- (kontroll) körülmények között [McManaman és munkatársai: *Developmental Biol.* 125:311–320 (1988)]. A 4. és 5. ábrán feltüntetett eredmények a K-252a jelű vegyülettel egy alkalommal végzett kezeléshez tartoznak, a K-252a jelű vegyületet a táptalaj beoltásának napján adjuk az elegyhez, az eredmények azt mutatják, hogy e vegyület a gerincgaggy kolinerg neuronjainak túlélésére és/vagy magának az enzim szabályozására tartós hatást fejt ki. Módszerek: Patkányembriótól vett gerincgaggysejtekkel készült tenyészetben végzünk kísérleteket, ezeket ismert módon hajtottuk végre [Smith és munkatársai: *J. Cell. Biol.* 101, 1608–1621. oldal (1985)]. A gerincgaggyból nyert sejteket ismert módon tettük a vizsgálathoz alkalmassá, 14 napos patkányembriókból kivett gerincgaggyból ismert módon készítettük el a tenyészetet, tripszint használva a szövet elbontására (Smith és munkatársai, 1985). A sejteket poli-1-ornitinnel bevont műanyag lemezen lévő szövettenyészetekre vittük fel, 6×10^5 sejt/cm² mennyiségben; szérummentes N2 táptalajt alkalmaztunk, és az elegyet 37 °C hőmérsékleten inkubáltuk nedves atmoszférában, amelynek összetétele: 5% CO₂/95% levegő [Bottenstein and Sato, *PNAS* 76, 514–517. oldal (1979)], az inkubálást 48 óra hosszat végeztük.

A ChAT-aktivitást a módosított Fonnum-módszer szerint vizsgáltuk [*J. Neurochem.* 24, 407–409. oldal (1975)], a módosítás Ishida és Deguchi szerint történt [*J. Neurosci.* 3, 1818–1823. oldal (1983)] és McManaman és munkatársai: *supra* (1988)]. Az aktivitást az összfehérjéhez viszonyítottuk, aminek értékét a bichonicsav/Cu⁺⁺ reakcióval állapítottuk meg [a BCA-fehérje-vizsgálathoz használt reagenst Pierce, Rockland, Ill-től szereztük be].

3. példa

A gerincgaggy-ChAT-vizsgálat segítségével több mint száz K-252a jelű vegyület funkciós származékát vizsgáltuk meg, értékelve a vegyületek relatív hatásosságát. A 8. ábrán feltüntetett adatokból kitűnik, hogy 300 és 30 nmol/liter koncentrációértékeknél az ismert funkciós származékok közül 28 mutatott jelentős ChAT-aktivitás-növekedést 300 nmol/liter koncentrációértéknél. [Az ábrákon szereplő, a (II) általános képlet alá tartozó vegyületeket a P9500192 alapszámú magyar szabadalmi bejelentésben ismertettük.] A funkciós származékok közül az egyik, a 11–21. jelzésű vegyület, már 30 nmol/liter értéknél is hatásos volt (a ChAT-aktivitás 30%-os növekedését mértük az alapszint felett). Ez a vegyület hatásosabbnak mutatkozott, mint a K-252a jelzésű vegyület maga, vagy mint a többi analóg származék, minthogy ezen vegyületek egyike sem növelte a ChAT-aktivitást 30 nmol/l értéknél.

Az alábbi 5. táblázatban ismert és új K-252a-származékok hatását mutatjuk be, amit patkány-gerincgaggyenyészetben a ChAT-aktivitás növekedése alapján állapítottunk meg.

5. táblázat

A K-252a-származékoknak a ChAT-tevékenységre kifejtett relatív hatása patkányoktól levett gerincgaggysejt-tenyészetben

Vegyület	Gerincgaggysejtben ChAT-tevékenység	
	300 nmol/l	30 nmol/l
K-252a	100	–
IV-3	77	–
III-1	75	–
IV-1	74	72
IV-2	62	NT
III-2	60	NT

NT: ilyen koncentrációnál nem vizsgáltuk

–: ilyen koncentrációnál nem észleltünk hatást

4. példa

Az alábbiakban a K-252a jelű vegyületet, valamint e vegyület funkciós származékait vizsgáltuk és értékeltük a hátsó gyöki ganglionneuronsejt-túlélés vonatkozásában. A sejt-túlélés méréséhez calcein AM-et használtunk, ami a fluoreszcén-diacetát-színezék analógja.

A calceint az életképes sejtek felveszik, a sejten belül a színezék fluoreszkáló sókká szakad fel, a sók az életképes sejtek intakt sejtfallán belül maradnak. Az életképes neuronok mikroszkópos számlálási eredménye közvetlen összefüggésben áll a fluorimetriás túlélési vizsgálat során kapott relatív fluoreszcenciaértékekkel. Ennek következtében e módszer segítségével egy adott tenyészetben belül megbízható, kvantitatív értéket kapunk a túlélő sejteknek az összsejtszámhoz viszonyított arányáról.

A hátsó gyöki ganglionneuronok túlélését a K-252a jelű vegyület fokozni képes koncentrációtól függő mértékben; a maximális hatást mintegy 100 nmol/liter értéknél észleltük (lásd a 6. ábrát). A megvizsgált 50 analóg vegyület közül azokat, amelyek hatásosnak bizonyultak a DRG-neuron-túlélés elősegítésében, a 7. ábrán szemléltetjük. Mindezen analóg származékok hatásosnak mutatkoztak a gerincagy-ChAT-aktivitás fokozásában is (lásd az 5. példát és a 8. ábrát). Az eredményeket a 6. táblázat szemlélteti. A hátsó gyöki ganglionneuronok mikroszkópos vizsgálata azt mutatja, hogy ezeket hatásos funkciók származékokkal stimulálva az idegszál-növekedés fokozódott.

Módszer: 8 napos csirkeembrióktól levett hátsó gyöki ganglionokat metszünk ki, és diszpázzal (semleges protáz, Collaborative Research gyártmánya) kezelve sejttenyészetet készítünk. 96 nyílású poli-L-oronitinnel és lamininnel bevont lemezekre neuronokat viszünk fel alacsony sűrűségben ($1,8 \times 10^4$ sejt/cm). A sejteket 48 óra hosszat tenyésztjük szérummentes N2 táptalajban [Bottenstein and Sato, (1979)], a tenyésztést 37 °C hőmérsékleten végezzük nedves atmoszférában, ahol az atmoszféra összetétele 5% CO₂/95% levegő. 48 óra eltelté után értékeljük a túlélő sejtek számát, ahol is a fentiekben ismertetett túlélő sejtek fluorometriás vizsgálatát végezzük.

6. táblázat

A K-252a-származékoknak a neuronális túlélésre kifejtett hatása csirke hátsó gyöki ganglionneuron-tenyészetben

Vegyület	DRG-túlélés	
	K-252a %	NGT %
III-1	NT	69
III-2	NT	61

NT: nem vizsgáltuk

5. példa

Kaininsavból (kainát) (ami egy serkentőaminosav) készült infúziót közvetlenül egy rágszáló agykamrájába adagolva a hippocampus piramidális sejtjei neuronális degenerálódása észlelhető. A neuronális pusztulásra jellemző a spektrin (ami egy sejtvezeték) proteolízisének számottevő növekedése. A kainát beadását követően 24 óra eltelté után a spektrin bomlástermékeit ki lehet mutatni a hippocampus-homogenátum-

ban. A spektrinél jelentkező proteolízis nagysága nagymértékben összefügg a hippocampus piramidális sejtjeiben fellépő neuronális pusztulással [Siman és munkatársai, J. Neurosci. 9, 1579-1590. oldal (1989)], így a spektrinél észlelhető proteolízis kiválóan alkalmazható a serkentőaminosav által előidézett neuronális degeneráció biokémiai jelzésére.

Számos neurológiai megbetegedésnél és rendellenességnél, ideértve az agyvérzést és egyéb ischaemiás bántalmakat is, észlelhető az endogén eredetű serkentőaminosavak nagymértékű felszaporodása; e betegségek és rendellenességek közül említjük meg az agyvérzést és egyéb ischaemiás elváltozásokat; az Alzheimer-kórt, a motorosneuron-betegséget, ideértve az izomsorvadásos laterális szklerózist, a Parkinson-kórt; a Huntington-féle megbetegedést; az AIDS-eredetű demenciát; epilepsiát; az agy és gerincagy rázkódásos és behatolásos sérüléseit.

A 9. ábra szemlélteti a K-252a jelű vegyületnek a kainát által előidézett neuronális degenerációjára kifejtett hatását a hippocampusban. Hím és nőstény Sprague-Dawley fajtájú patkányokba csövet (kanült) vezetünk be, ezen keresztül az állatoknak 0,4 µg K-252a jelzésű vegyületet vagy a felhasznált vivőanyagot adjuk 30 perccel a kainátinjekció beadása előtt, valamint 3 és 24 órát ezt követően; a kainátból 0,6 µg mennyiséget adagolunk közvetlenül az agy laterális cerebrális kamrájába (icv.). Két héttel a vizsgálatot követően az agyat kiemeljük, fagyasztjuk, felszeleltetjük, és szövettani vizsgálathoz megfestjük az alábbiak szerint. Az itt következő adatok minden egyes állatcsoportnál a hippocampus sérült régióinak átlagszámát jelentik ±standard hibát. A K-252a jelű vegyület beadásával lényeges mértékben csökkenthető a károsodott felület száma a hippocampus területén, a csökkenés mértéke $3,86 \pm 0,78$ (K-252a-val végzett kezelés nélkül) értékről $1,18 \pm 0,4$ értékre (K-252a-val végzett kezelés esetében).

A 10. ábra szemlélteti a K-252a jelű vegyületnek a kainát által indukált spektrinlebomlásra kifejtett hatását a hippocampusban. Nőstény Sprague-Dawley fajtájú patkányoknak 0,4 µg K-252a jelzésű vegyületet, vagy pedig a felhasznált vivőanyagot adjuk; icv. infúzió segítségével az állatoknak neurotoxikus dózisban kainátot (0,6 µg) adunk be. A kontrollállatoknak a vivőanyaggal készült infúziót adjuk kainát vagy K-252a adagolása nélkül. 24 óra eltelté után a hátsó hippocampusból készült homogenátumot vizsgáljuk, és meghatározzuk a spektrinlebomlási termékek mennyiségét. A spektrinproteolízis nagyságát %-ban fejezzük ki, a spektrinlebomlási termékek tömegére számítva, minden egyes vizsgálati csoportra vonatkoztatva megállapítjuk a proteolízis %-át, összehasonlítási alapként a kontrollcsoportban mért értékeket vesszük. A feltüntetett adatok az egyes állatcsoportoknál mért spektrinbomlás átlag százalékos növekedését ±standard hibát mutatja be (ahol a kontrollértékeket 100%-nak vesszük). A K-252a jelzésű vegyületet icv. infúzió formájában beadva a spektrin proteolízise számottevő mértékben csökken $140 \pm 15\%$ -ról (K-252a vegyület adagolása

nélkül) mintegy 102±10%-ra (K-252a jelű vegyülettel való kezelés esetén) az alapkонтроllértékekhez viszonyítva.

6. példa

A 11. ábra szemlélteti a HBCS-nek a kaináttal indukált neuronális degenerációra kifejtett hatását a hippocampusban. Nőstény Sprague-Dawley fajtájú patkányokba bevezetőcsövet (kanült) helyezünk, s ezen keresztül 0,8 µg HBCS-t vagy a felhasznált vívőanyagot adagoljuk 40 perccel a kainát icv. infúziót megelőzően és 4 órával ezt követően; kainátból 0,6 µg dózist adunk be. 2 héttel az infúzió beadását követően a vizsgált állatok agyát kimetsszük, fagyasztiuk, felszeleteljük, és a hisztológiai vizsgálathoz az alábbiak szerint megfestjük. A megadott eredmények minden egyes állatcsoportnál a károsodott hippocampus alrégióinak átlagszámát ±standard hibát jelöl. HBCS adagolásával a károsított területek száma lényegesen csökkenthető a hippocampuson belül, a csökkenés mértéke: 2,5±0,6-ről (HBCS adagolása nélkül) 1,3±0,5-re (HBCS-sel végzett kezelés esetében).

7. példa

A 12. ábra szemlélteti három K-252a funkciós származékunk a kaináttal indukált spektrin lebomlására kifejtett hatását a hippocampusban. Nőstény Sprague-Dawley fajtájú patkányoknak 0,4 µg K-252a jelű vegyületet vagy III-1 vagy II-21 vegyületet vagy a vívőanyagot adjuk, egyidejűleg neurotoxikus dózisban kainátot (0,6 µg) viszünk be icv. infúzió alakjában. A kontrollhoz alkalmazott állatok csak a vívőanyagot tartalmazó infúziót kapják, nem adagolunk azonban sem kainátot, sem K-252a jelű származékot. 24 óra eltelte után a hátsó hippocampusból készült homogenátumot vizsgáljuk, mérve a spektrinlebomlási termékek mennyiségét, a vizsgálatot az alábbiak szerint végezzük. A spektrinproteolízis nagyságát százalékban fejezzük ki, a spektrinbomlási termékek mennyiségét összehasonlítjuk minden egyes állatcsoport esetében a kontrollértékekkel. A feltüntetett adatok a spektrinbomlástermékek százalékos növekedését jelzik minden egyes állatcsoportra vonatkoztatva (kontroll=100%) ±standard hiba. A K-252a jelű vegyület icv. infúzió formájában beadva a spektrinproteolízis mértéke számottevően csökken: mintegy 128±9%-ról (vívőanyaggal végzett kezelés) mintegy 104±4%-ra (K-252a-val végzett kezelés esetében) a kontrollértékekre számítva. A III-1 és a II-21 jelzésű K-252a-származékok nem befolyásolták a kainát által indukált spektrinproteolízist.

A 9–12. ábrák esetében alkalmazott vizsgálati módszerek

Kainátinfúzióval végzett vizsgálat

A K-252a jelű vegyületnek, valamint e vegyület származékainak a kainát által indukált neuronális károsodásra kifejtett hatását a következőképpen értékeljük:

175–250 g testtömegű kifejlett hím vagy nőstény Sprague-Dawley fajtájú patkányokat anesztetizálunk Nembutallal (50 mg/kg, ip.), majd gyógyszert vagy vi-

vőanyagot adunk be 5 µl ösztérfogóban a kaináttal végzett kezelés (5 µl) előtt és ezt követően, a kainátot icv. infúzió formájában adjuk be a fentiekben megadott dózisban és sorrendben. A kontrollállatok vívőanyagot kapnak kainát és gyógyszerinfúzió helyett. Az anatómiai vizsgálatok céljából az icv. infúziókat egy bevezetőcsövön (kanülon) keresztül (Plastic One, Roanoke, VA) adjuk, a bevezetőcsövet mintegy 1 héttel az infúziót megelőzően implantáljuk és helyezük el: a koponyatető elején és hátsó részén, 1,5 mm-re laterálisan a koponyatetőhöz viszonyítva, továbbá 4,4 mm-rel ventrálisan a koponyatetőtől számítva. A kezelés eredményét 2 héttel később állapítjuk meg az alább ismertetett anatómiai vizsgálatok alapján.

A K-252a jelű vegyületnek és e vegyület származékainak a kainát által indukált spektrinproteolízisre kifejtett hatását oly módon vizsgáljuk, hogy anesztetizált patkányoknak 5 µl icv. infúziót adunk, ebben a gyógyszert vagy csak a vívőanyagot adjuk kaináttal egyidejűleg egy 10 µl Hamilton-féle fecskendő segítségével, amelyet fentiekben megadott koordinátákon helyezünk el. 24 órával az infúzió beadását követően a patkányokat leöljük, és biokémiai vizsgálatokat végzünk az alábbiak szerint.

Anatómiai és biokémiai vizsgálatok

Az anatómiai vizsgálatokat az alábbiak szerint végezzük. Az alább következő kezelés után 2 héttel a patkányokat elpusztítjuk fejük levágásával, az agyat gyorsan eltávolítjuk, szárazjégen lefagyasztiuk. Minden egyes agyból koronális metszeteket készítünk, a metszeteket tioninnal megfestjük és mikroszkóp alatt vizsgáljuk. A hippocampus károsodását oly módon határozzuk meg, hogy összegezzük a hippocampus bal és jobb oldalán az agyban a piramidális sejtekben fellépő vesztiséget a hippocampus 4 anatómiailag meghatározott régiójában [CA1–4 Lorente de No klasszifikálása szerint, a közlemény megjelent: Shepard, The Synaptic Organization of the Brain, Oxford, 310. oldal (1979), amely közleményt referenciaként tekintjük].

A biokémiai vizsgálatot az alábbiak szerint végezzük: az agyban lévő spektrin Calpain I-szenzitív proteolízisét a hippocampus homogenátumban értékeljük immunobiológiai analízis segítségével [Siman és munkatársai: Neuron, 1, 279–287. oldal (1988), e közleményt referenciaként tekintjük]. Röviden összefoglalva: a kezelés után 24 órával a patkányok fejét levágjuk, ily módon az állatokat elpusztítjuk, a hátsó hippocampust gyorsan kimetsszük az agyból, és homogenizáljuk 20 mmol/l trisz-HCl-ban (pH: 7,4), ahol az oldat 0,1 mmol/l koncentrációban fenil-metil-szulfonil-fluoridot tartalmaz. Minden egyes aliquot részből a fehérjéket elkülönítjük SDS-PAGE segítségével, és minden egyes mintában meghatározzuk a kainát által indukált spektrinbomlástermékek mennyiségét.

8. példa

Vizsgáljuk, hogy a K-252a jelű vegyületek milyen mértékben segítik elő a striatumtenyészetek túlélését. 17 napos patkányembriók corpus striatumát kimetsszük, a sejteket diszpáz segítségével felbontjuk (semleges proteáz, Collaborative Research). 96 nyílá-

sú lemezre, ahol a nyílásokat előzőleg poli-1-ornitinnel és lamininnel vonjuk be, neuronokat helyezünk 5×10^4 /nyílás mennyiségben ($1,5 \times 10^5$ /cm). A sejteket szérumentes N2 táptalajban tenyésztjük, ahol a táptalaj 0,05% borjúsérum-albumint tartalmaz (Bottens-
5 tein és Sato, 1979). Az inkubálást 37 °C hőmérsékleten nedves atmoszférában végezzük, ahol az atmoszféra összetétele 5% CO₂/95% levegő. A beoltást követő 5 nap eltelte után értékeljük a sejtek túlélését. A túlélést a 8. példában ismertetett calcein fluorometriás vizsgálattal végezzük.

A corpus striatumból származó neuronális sejtek túlélését a K-252a jelű vegyület fokozza, függően a koncentrációtól. A maximális hatást 75 nmol/liter K-252a-koncentrációnál mértük, a kontrollhoz viszonyítva 3-4-szeres hatás jelentkezett (13. ábra). A kontrolltenyészetekben a neuronok 90%-a elpusztult 5 napon belül, ezzel szemben a K-252a-val kezelt sejtek 50%-a életben maradt (14. ábra). A striatumneuron-sejtek túlélése a tenyészetben 3 nap eltelte után értékelhető, a túlélést legalább 7 napig vizsgáljuk a tenyészetben. Ezek az eredmények a K-252a jelű vegyület egy-
25 szeri alkalmazásából származnak, e vegyületet a tenyésztés kezdetének napján adjuk a táptalajhoz, a neuronok bizonyos tenyészetében tartós túlélés jelentkezik.

A 15. ábra két fotomikrogörbét mutat be, ahol az egyik a kontrolltenyészetben kapott eredményeket, a másik 75 nmol/liter koncentrációjú K-252a jelenlétében végzett tenyészetnél kapott eredményeket mutatja be. A 75 nmol/l K-252a vegyület jelenléte esetében a sejt túlélés fokozódása és a neurid elszaporodása volt a tenyészetekben észlelhető.

9. példa

Meghatároztuk a K-252a jelű vegyület funkciószármazékainak a corpusstriatum-sejtek túlélését potenciáló képességét, a vizsgálatot a 6. példában leírtak szerint végezve. A 7. táblázat szemlélteti az eredményeket, vagyis hogy ezen vegyületek milyen mértékben segítették elő a corpus striatumban lévő neuronok túlélését.

7. táblázat

A K-252a-származékok hatása a neuronok túlélésére patkányoktól levett corpusstriatum-táptalajban

Vizsgált vegyület	Corpusstriatum-sejtek túlélése K-252a adott koncentrációja esetén		
	25 nmol/l	75 nmol/l	100 nmol/l
K-252a		100	
III-1	69	NT	–
IV-3	–	NT	47
IV-1	–	NT	66
II-33	–	82	NT
II-34	118	NT	–

NT: nem vizsgáltuk ebben a koncentrációban

–: nem hatásos ebben a koncentrációban

10. példa

IV-2 jelű vegyület

50 mg (0,09 mmol) (J) képletű vegyületet [e vegyületet a 120388/87 számú közzétett, de nem vizsgált japán szabadalmi bejelentésben ismertetik; ezen bejelentést referenciaként tekintjük] 0,5 ml trifluor-ecetsav és 50 µl 3 n sósavoldat elegyében feloldunk, majd az oldatot szobahőmérsékleten 2 napig keverjük. A keletkezett csapadékot szűrővel elkülönítjük, majd nagy teljesítményű folyadékromatográfiának vetjük alá (Unisil 5C₁₈; metanol/víz 8:2 térfogatarányú elegye), így módon 8,4 mg (IV-2) jelű vegyületet kapunk.

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ (ppm): 4,947 (2H, s), 7,300–8,010 (6H, m), 8,249 (1H, s), 9,266 (1H, d, J=2,0 Hz).

FAB-MS (m/z): 390 (M+1)⁺.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. (III) vagy (IV) általános képletű vegyület, a képletben

Z¹ és Z² jelentése hidrogénatom (III-1 jelű vegyület); vagy

Z¹ és Z² együttes jelentése oxigénatom (III-2 jelű vegyület); vagy

R¹, R², R⁴, Z¹ és Z² jelentése hidrogénatom és R³ jelentése –CH₂CH=CH₂ képletű csoport (IV-1 jelű vegyület); vagy

R¹ jelentése brómatom és R², R³, R⁴, Z¹ és Z² jelentése hidrogénatom (IV-2 jelű vegyület); vagy

R¹, R², Z¹ és Z² jelentése hidrogénatom és R³ és R⁴ jelentése –CH₂CH=CH₂ képletű csoport (IV-3 jelű vegyület); vagy

R¹, R², R³, Z¹ és Z² jelentése hidrogénatom és R⁴ jelentése –CH₂CH=CH₂ képletű csoport (IV-4 jelű vegyület);

alkalmazása emlősnél neuronfunkció, mégpedig érzékelési, kolinergiás vagy corpusstriatumneuron-funkció fokozására, továbbá Alzheimer-kór, motorosneuron-megbetegedés, agyérrendszeri betegség, AIDS-szel kapcsolatos elmebaj, epilepszia, Huntington-kór és az agy vagy a gerincagy rázkódásos vagy behatoló sérülésével kapcsolatos sérülések kezelésére alkalmas, adott esetben egy neurotróf faktort is tartalmazó gyógyszerkészítmény előállítására.

2. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás kolinergiás neuronfunkció fokozására alkalmas gyógyszerkészítmény előállítására.

3. Az 1. igénypont szerinti olyan (III) általános képletű vegyület alkalmazása, amelynek a képletében

Z¹ és Z² jelentése hidrogénatom (III-1 jelű vegyület) vagy

Z¹ és Z² jelentése oxigénatom (III-2 jelű vegyület);

55 érzékelési neuron, mégpedig hátsó gyöki ganglionneuron funkciójának fokozására alkalmas gyógyszerkészítmény előállítására.

4. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás neurotróf faktort is tartalmazó gyógyszerkészítmény előállítására.

5. A 3. igénypont szerinti alkalmazás neurotróf faktort is tartalmazó gyógyszerkészítmény előállítására.

6. A 4. vagy 5. igénypont szerinti alkalmazás neurotrofinok családjába tartozó neurotróf faktort is tartalmazó gyógyszerkészítmény előállítására.

7. A 6. igénypont szerinti alkalmazás neurotrofinok családjába tartozó idegnövekedési faktort (NGF) is tartalmazó gyógyszerkészítmény előállítására.

8. Az 1. igénypont szerinti olyan (III) vagy (IV) általános képletű vegyület alkalmazására, amelynek képletében

Z¹ és Z² jelentése hidrogénatom (III-1 jelű vegyület); vagy

Z¹, Z² és R² jelentése hidrogénatom (IV-1 jelű vegyület)

corpus striatum neuronfunkciójának fokozására alkalmas gyógyszerkészítmény előállítására.

9. A 2., 7. vagy 8. igénypont szerinti alkalmazás Huntington-kór kezelésére alkalmas gyógyszerkészítmény előállítására.

10. (IV) általános képletű vegyület, a képletben

R¹, R², R⁴, Z¹ és Z² jelentése hidrogénatom, R³ jelentése $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ képletű csoport (IV-1 jelű vegyület); vagy

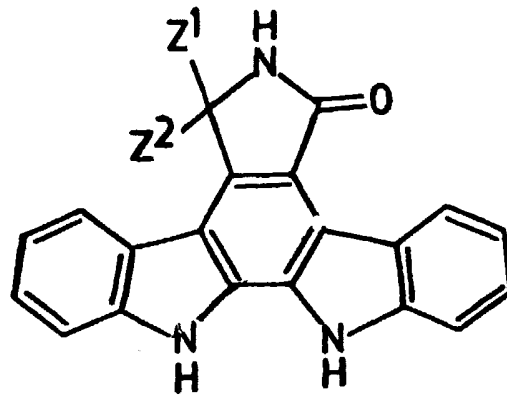
R¹ jelentése brómatom, R², R³, R⁴, Z¹ és Z² jelentése hidrogénatom (IV-2 jelű vegyület);

R¹, R², Z¹ és Z² jelentése hidrogénatom és R³ és R⁴ jelentése $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ képletű csoport (IV-3 jelű vegyület); vagy

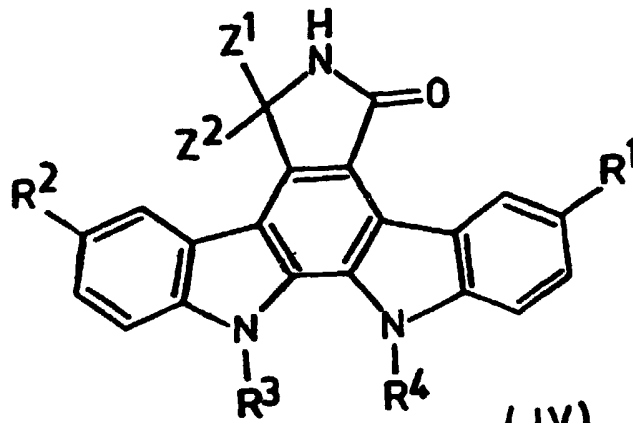
R¹, R², R³, Z¹ és Z² jelentése hidrogénatom és R⁴ jelentése $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ képletű csoport (IV-4 jelű vegyület).

11. Gyógyszerkészítmény, amely egy 10. igénypont szerinti (IV) általános képletű vegyületet, továbbá adott esetben egy neurotróf faktort tartalmaz gyógyászati segédanyagokkal és/vagy adalék anyagokkal összekeverve.

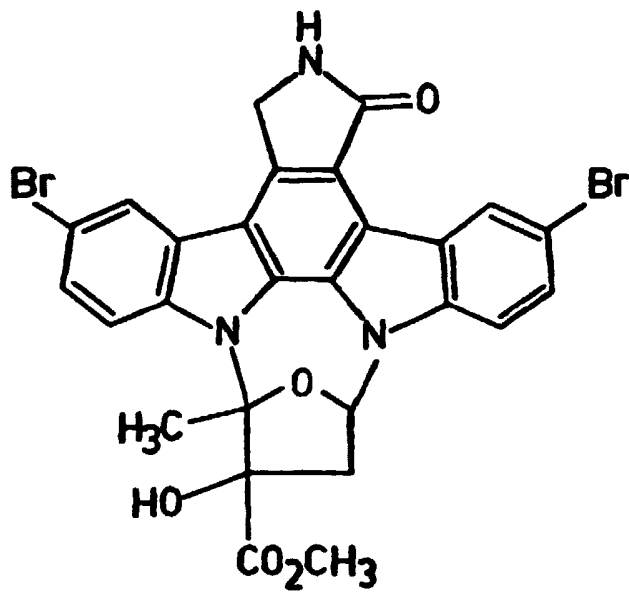
12. A 11. igénypont szerinti gyógyszerkészítmény, emlősöknél neuronfunkció, mégpedig érzékelési, kolinergias vagy corpusstriatumneuron-funkció fokozására, továbbá Alzheimer-kór, motorosneuron-megbetegedés, agyérrendszeri betegség, AIDS-szel kapcsolatos elmebaj, epilepszia, Huntington-kór és az agy vagy a gerincagy rázkódásos vagy behatoló sérülésével kapcsolatos sérülések kezelésére, amely gyógyszerkészítmény adott esetben egy neurotróf faktort is tartalmaz.



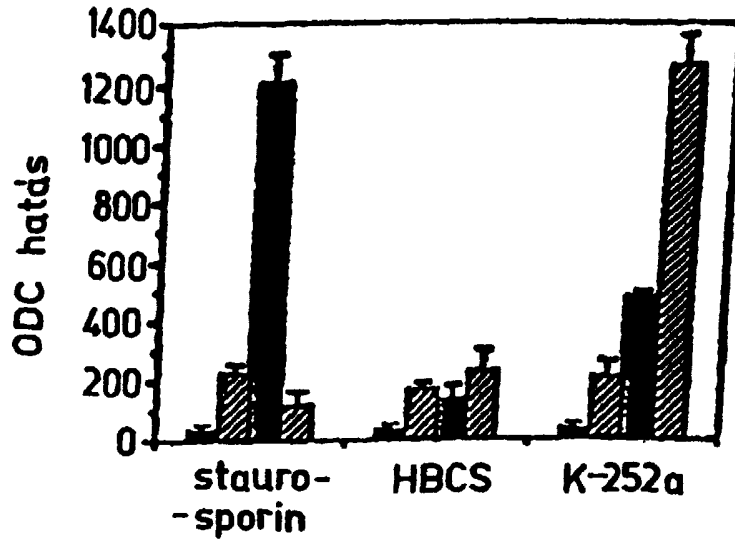
(III)



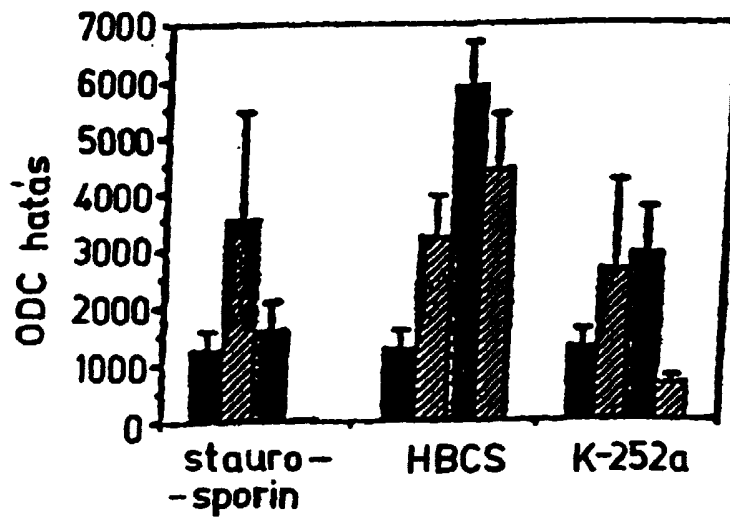
(IV)



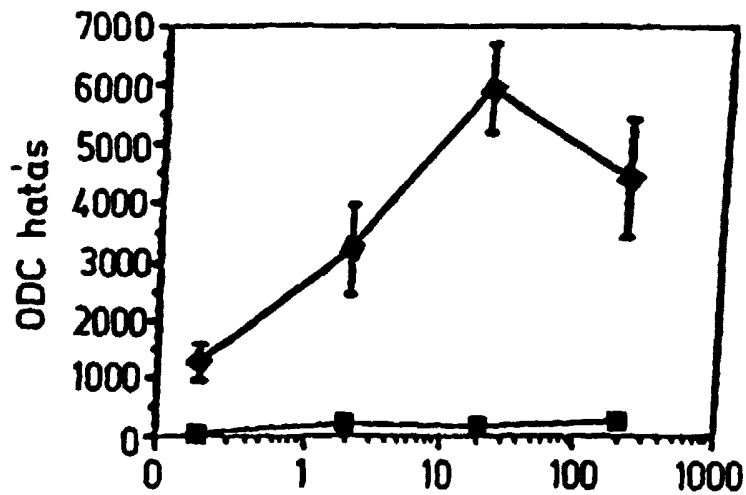
(J)



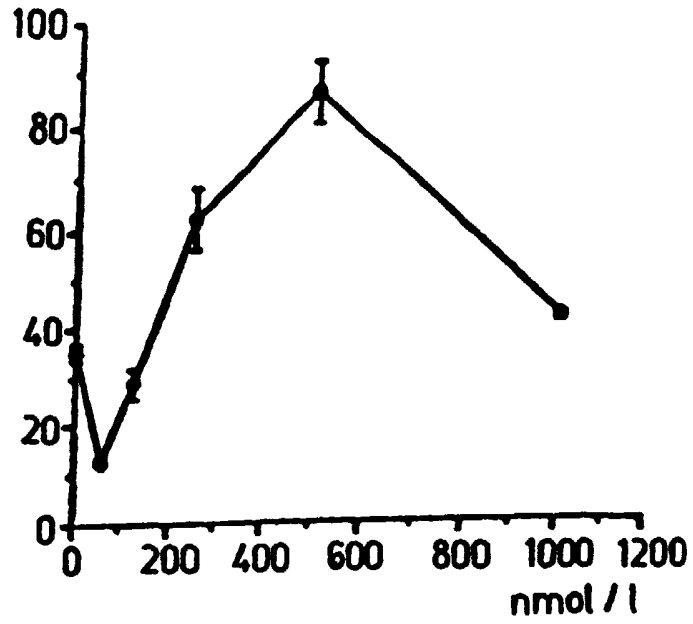
1. ábra



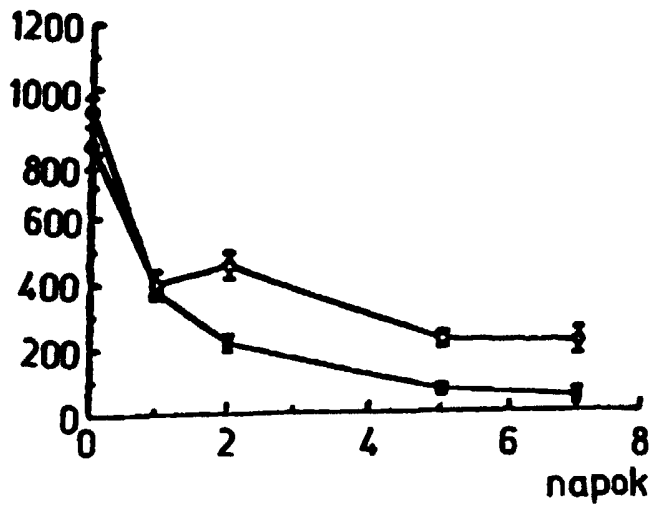
2. ábra



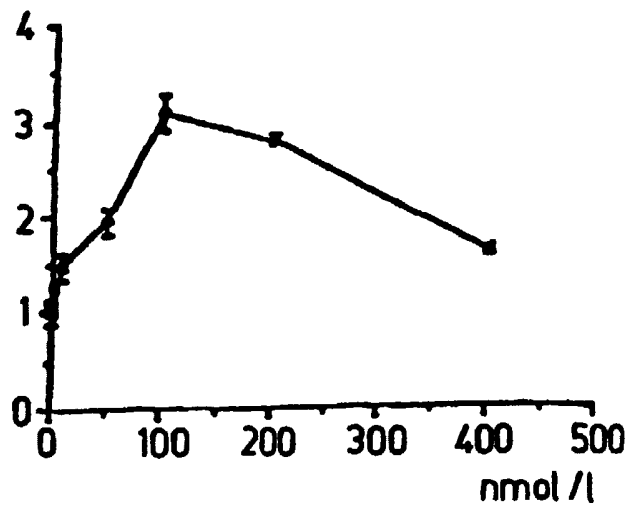
3. ábra



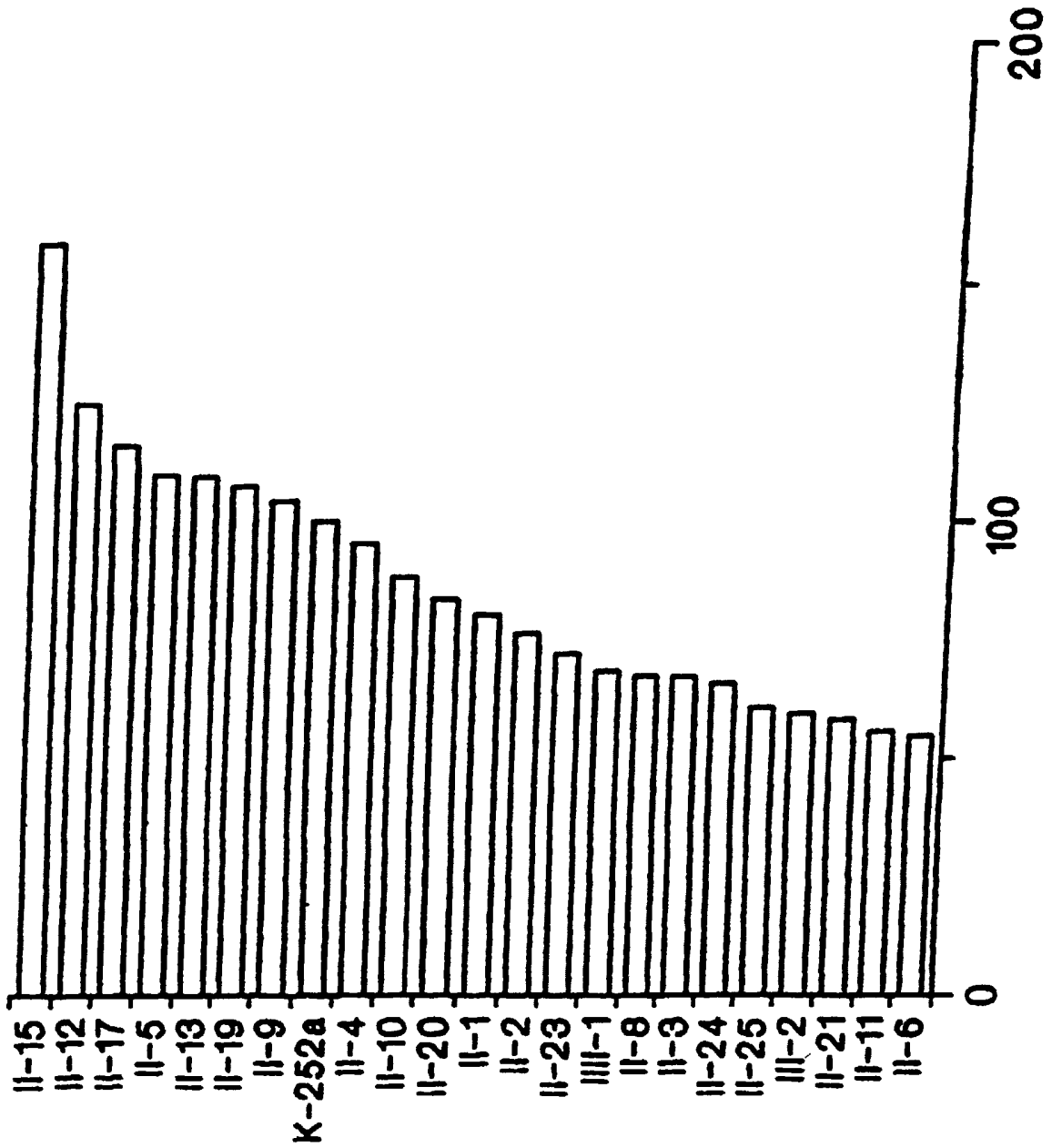
4. ábra



5. ábra



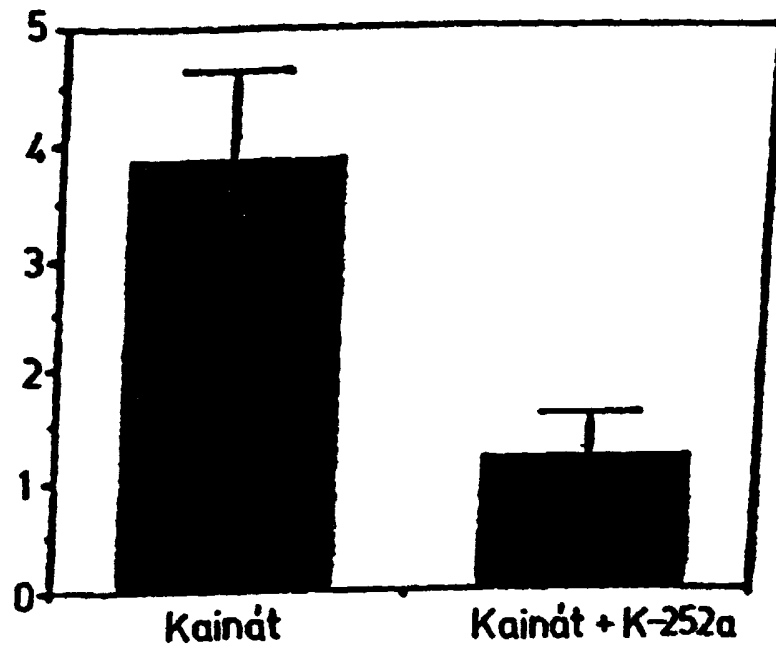
6. ábra



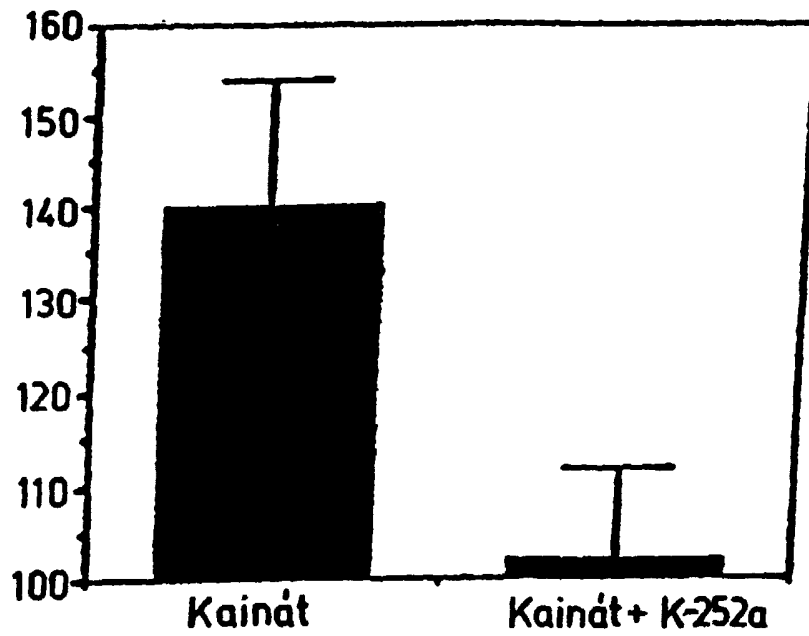
7. ábra



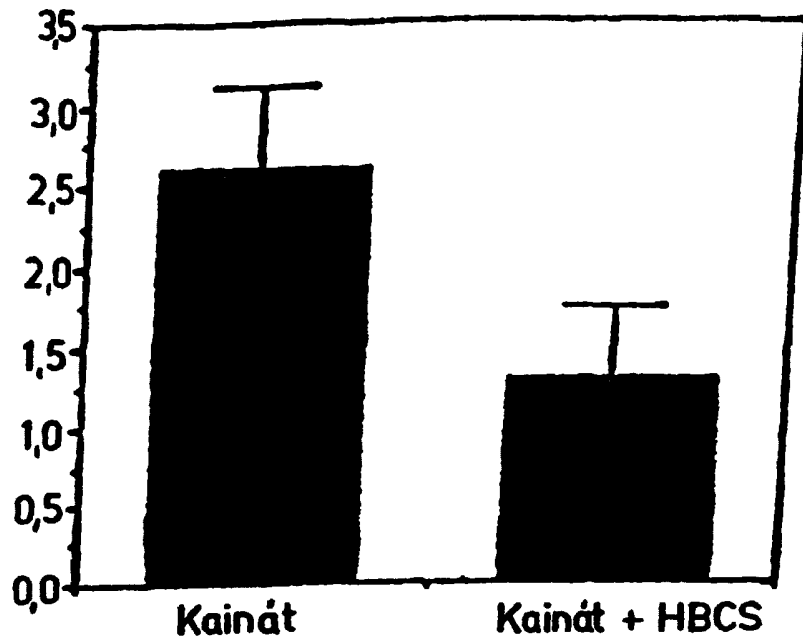
8. ábra



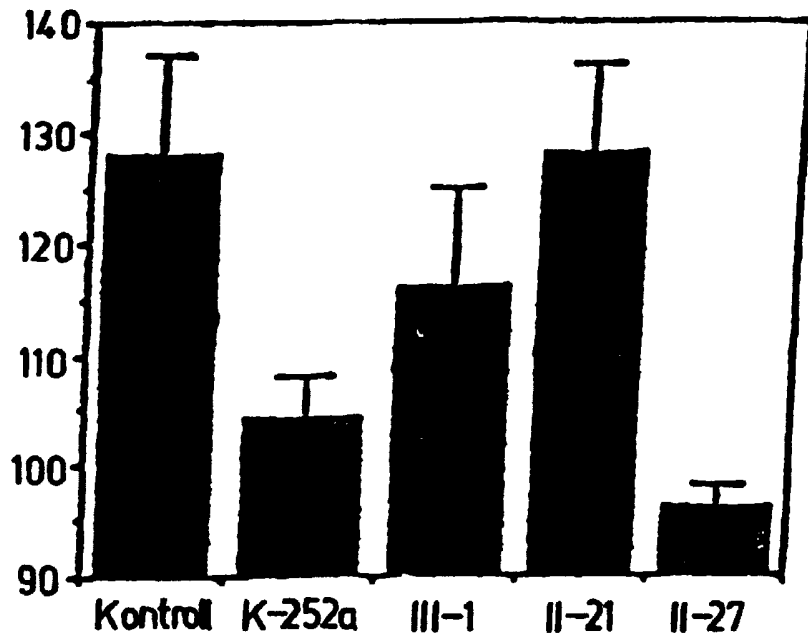
9. ábra



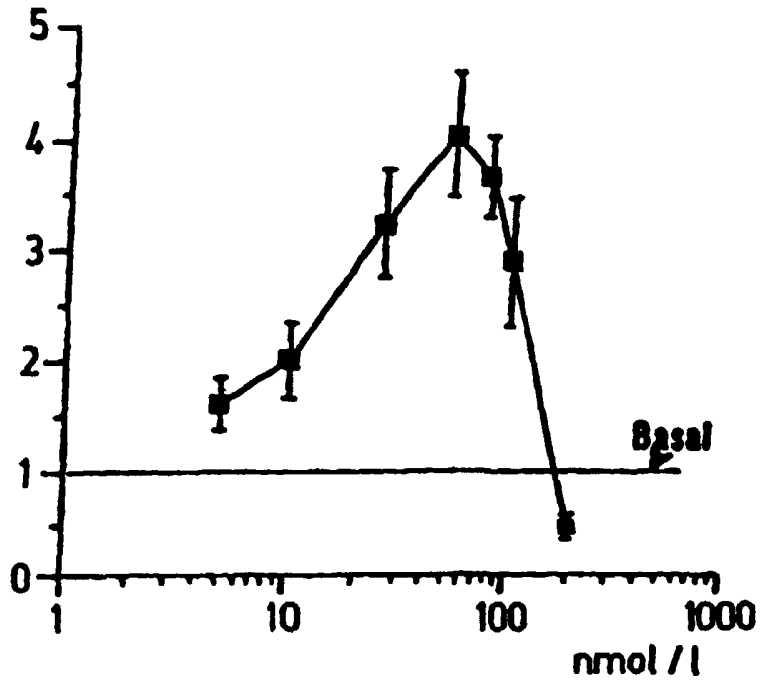
10. ábra



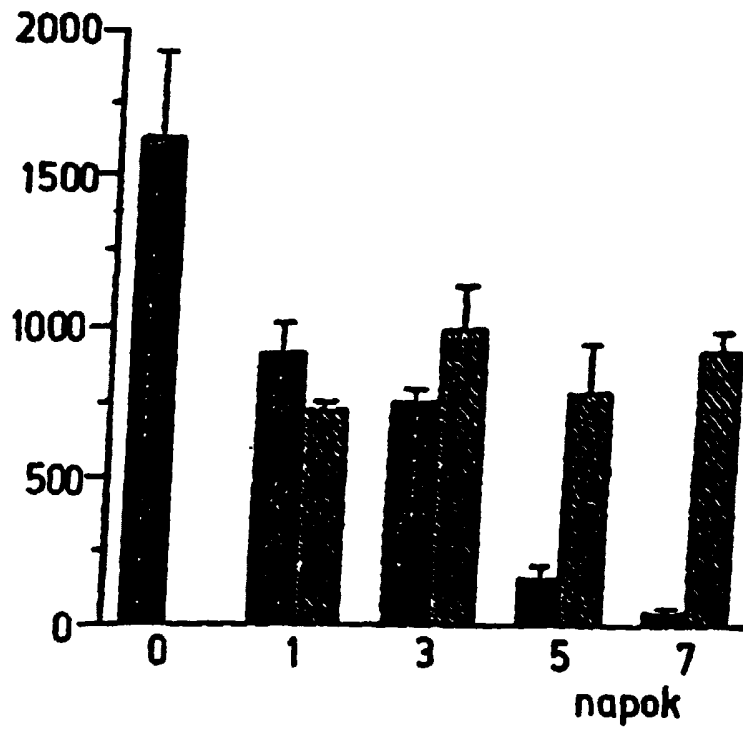
11. ábra



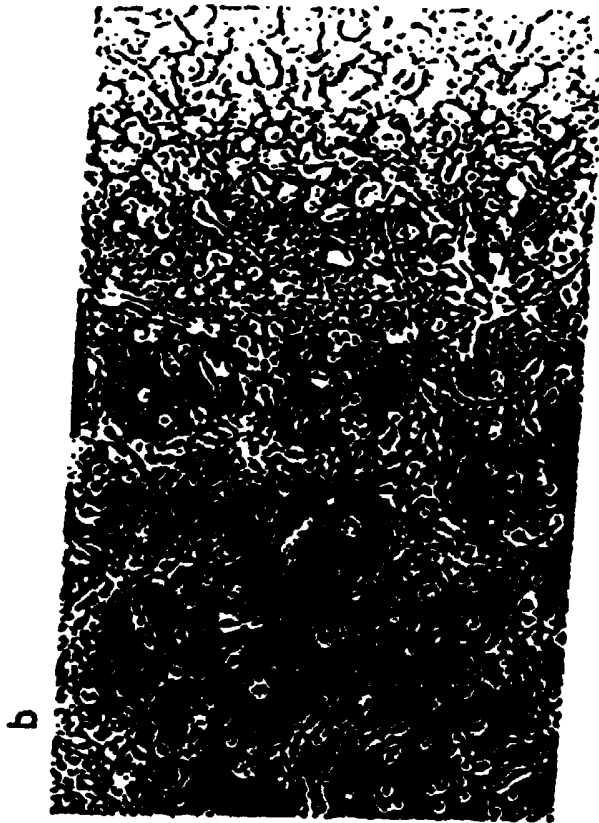
12. ábra



13. ábra



14. ábra



15. ábra

Kiadja a Magyar Szabadalmi Hivatal, Budapest
A kiadásért felel: Törőcsik Zsuzsanna főosztályvezető-helyettes
Windor Bt., Budapest