



PDE4 alkalmazása
~~ELJÁRÁS~~ COPD KEZELÉSÉRE

A2

P_0200288

KIVONAT

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

A találmány olyan vegyületekre vonatkozik, amelyek elsődlegesen egy foszfodiészteráz izozim (PDE4) egyik formáját gátolják vagy kötik, míg az enzimnek egy második formáját az előbbinél kisebb mértékben kötik vagy gátolják. A vegyületek a mellékhatások csökkenése mellett használhatók fel a krónikus obstruktív tüdőbetegség (COPD) megelőzésére vagy kezelésére.

FK

73.215/DE

S.B.G. & K.
Szemétkönyv
Szabó István Iróda
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
Központi telefon: 34-24-223



P 0200288

PDE4 alkalmazása
~~ELJÁRÁS~~ COPD KEZELÉSÉRE

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

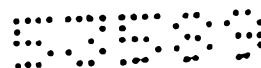
A találmány olyan vegyületekre vonatkozik, amelyek elsődlegesen egy 4-es számmal jelzett foszfodiészteráz izozim (a továbbiakban PDE4) egyik formáját gátolják vagy kötik, míg az enzimnek egy második formáját az előbbivel azonos vagy előnyösen annál kisebb mértékben kötik vagy gátolják, és amely vegyületek ily módon felhasználhatók krónikus obstruktív tüdőbetegség (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) kezelésére. Az említett izoenzim formák — amelyekről bár nem bizonyított, de feltételhető, hogy ugyanazon enzim nem-interkonvertálható konformációinak az eltérő formái — egy archetípusos PDE4 inhibitor, a rolipram iránti kötési affinitás alapján különböztethetők meg egymástól. A rolipram nagy affinitással köti az egyik formának egy helyét, de a másik forma katalitikus helyéhez csak affinitással kötődik. A jelen leírásban az egyik formát a nagy affinitású rolipram kötő helynek, a másik formát pedig a kis affinitású rolipram kötő helynek nevezzük. A találmány tárgyát képezi továbbá egy eljárás krónikus obstruktív tüdőbetegség szelektív kezelésére, amelynek során elsődlegesen a PDE4 izozimben lévő katalitikus helynek a kis affinitású formáját gátoljuk. Ugyancsak a találmány tárgyát képezi egy eljárás COPD kezelésére, amelynek során egy olyan vegyületet adunk be, amely vegyület elsődlegesen a kis affinitású kötési helyhez kötődik. A találmány tárgyát képezi továbbá egy eljárás terhelés által indukált asztma (exercise induced asthma, EIA) kezelésére, amelynek során elsődlegesen a PDE4 izozimben lévő katalitikus



helynek a kis affinitású formáját gátoljuk.

A ciklikus nukleotid foszfodiészterázok (PDE-k) egy olyan enzimcsaládot alkotnak, amelynek tagjai a mindenütt előforduló intracelluláris második messenger adenzin-3',5'-monofoszfátot (cAMP) és guanozin-3',5'-monofoszfátot (cGMP) a megfelelő inaktív 5'-monofoszfát metabolittá hidrolizálják. A PDE izozimek legalább kilenc eltérő osztályának a létezését valószínűsítik, amelyek mindegyike egyedi fizikai és kinetikai jellemzőkkel rendelkezik, és amelyek mindegyike egy eltérő géncsaládnak a terméke. Az említett hét osztályt 1-től 9-ig tartó arab számok alkalmazásával különböztetik meg egymástól.

A találmány szerinti készítmény alkalmazásával megcélzott (target) enzim a PDE4 izozim, magában foglalva az izozim valamennyi eltérő formáját és eloszlásának teljes tartományát az összes sejtben. Az izozim egy kis K_m értékű cAMP-szelektív enzim (cAMP $K_m = 1-5 \mu M$), amely a cGMP-vel szemben csak csekély aktivitást mutat ($K_m > 100 \mu M$). Az említett izozimosztály tagjainak érdekes jellemzője, hogy két vagy több nem-interkonvertálható vagy egymásba csak lassan átalakítható formában léteznek, amely formák eltérő mértékű hatékonysággal kötik a rolipramot és más PDE4 inhibitorokat. Tehát ugyanaz a géntermék egynél több katalitikusan aktív konformációs állapotban létezhet. Lényeges, hogy az eltérő kötő formák egymáshoz viszonyított részaránya a szöveti sejtípustól függően változhat. Például a gyulladáscsökkentő sejtek viszonylag nagy részarányban tartalmazhatják azt a formát, amely csak kis affinitással köti a rolipramot, míg az agysejtek és a parietalis sejtek azt a formát



tartalmazhatják viszonylag nagy részarányban, amely nagy affinitással köti a rolipramot.

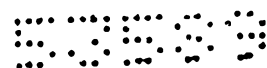
A találmány szempontjából különösen lényeges az izozimek említett osztályának a gyulladásban és a légúti simaizomban játszott szerepe. A vizsgálatok azt mutatják, hogy ez az izozimosztály különleges szerepet játszik a cAMP szabályozásában különféle gyulladásos sejtekben (például hízósejtekben, bazofilekben, eozinofilekben, neutrofilekben és monocitákban) és a légúti simaizomban. A találmány szerinti megoldás különösen jól alkalmazható gyulladásos sejtek és légúti simaizom esetén; a humán monocitákban expresszált izozim típus különösen jelentős. Ezt az magyarázza, hogy a ciklikus AMP egy, a kemotaxis gátlására és a gyulladásos sejtek aktivációjára szolgáló második messengerként funkcionál. Ezenkívül a cAMP a légúti simaizom relaxációt is mediálja. Az előbbieket, valamint a PDE4-nek a cAMP metabolizációjában játszott jelentős szerepe indokolja a PDE4 inhibitorok további vizsgálatát; annak alapján, hogy a PDE4 inhibitorok fokozni képesek a leukocitákban és a légúti simaizomban a cAMP-tartalmat, a PDE4 inhibitorok gyulladásellenes és bronchodilatator aktivitással rendelkezhetnek.

A gyulladás kezelésére, illetve a bronchodilatatorokként jelenleg alkalmazott PDE inhibitorok, például az olyan hatóanyagok mint a theophylline és a pentoxyfyllin, minden megkülönböztetés nélkül valamennyi szövetben gátolják a PDE izozimeket. Ezeknek a vegyületeknek súlyos mellékhatásaik vannak, valószínűleg azért, mert szelektivitás nélkül gátolják az összes PDE izozimosztályt valamennyi szövetben. Ezt figyelembe kell



venni az említett vegyületek terápiás profiljának az értékelésénél. A megcélzott betegség hatékonyan kezelhető az ilyen vegyületekkel, azonban a vegyületek másodlagos hatásokat mutathatnak, amelyek ha elkerülhetők vagy minimalizálhatók lennének, a hatóanyagok jelentősen mértékben növelhetnék bizonyos betegségek ily módon történő kezelésének a terápiás hatékonyságát. Összességében a fenti információk arra utalnak, hogy az adott szövetben vagy sejtben lévő elsődleges PDE új izozim-szelektív inhibitorokkal történő megcélzásával a standard nem-szelektív PDE inhibitor használatával kapcsolatos mellékhatások csökkenthetők. Bár az izozim-szelektív PDE inhibitorok elvileg jobbak, mint a nem-szelektív inhibitorok, az edigiekben tesztelt szelektív inhibitoroknak is vannak mellékhatásaik, mivel a kérdéses izozim gátlása kiterjed más vagy nem célzott szövetekre is. Például az anitdepresszánsként kifejlesztett szelektív PDE4 inhibitor rolipram klinikai vizsgálatai azt mutatják, hogy a hatóanyag pszichotrop aktivitással rendelkezik, valamint gastro-intestinalis effektusokat, például gyomorégést, hányást és émelygést vált ki. Egy másik, a multiinfraktusos demencia kezelését célzó PDE4 inhibitor, nevezetesen a denbufylline mellékhatásaiként is gyomorégést, hányást és émelygést figyeltek meg. Feltételezhető, hogy ezeket a mellékhatásokat a PDE4-nek a központi idegrendszer és a gastrointestinalis rendszer specifikus területein történő gátlása okozza.

Schneider és munkatársai 1986-ban beszámoltak arról, hogy patkányagy homogenizátumokban nagy affinitású, sztereoszelektív [³H]-rolipram kötőhelyek vannak, és leírták ezek jellemzőit is.



Bár azt feltételezték, hogy ezek a kötőhelyek reprezentálják a patkányagy "nem-kalcimodulin-függő, cAMP foszfodiészteráz" (azaz PDE4) katalitikus helyét, az adatokban feltűnő anomália látszott. Hasonló, bár nem azonos kísérleti körülmények között nyert adatok azt mutatták, hogy a rolipram $K_d = 1$ nM értékkel rendelkezett, miközben a rolipram $K_i = 1$ μ M aktivitással gátolta a patkányagy PDE4 aktivitást. Tehát ezerszeres eltérés volt a rolipramnak a kötőhely iránti affinitása, illetve a katalitikus aktivitást befolyásoló hatása között. Bár a PDE gátlás és a [³H]-rolipram kötésért folyó versengés között minden részletre kiterjedő szerkezet/aktivitás összefüggést (structure activity relationship; SAR) nem állapítottak meg, a rolipramnak mint PDE4 inhibitornak a hatékonysága és a kötőhelynél kifejtett hatékonysága közötti lényeges különbség kérdésessé teszi annak a megállapításnak a helytállóságát, miszerint mindkét aktivitást ugyanazon molekuláris hely foglalja magában.

Ennek a rejtélynek a megoldására számos vizsgálat indult. Az egyik ilyen vizsgálatban annak az eldöntését tűzték ki célul, hogy a rolipram nagy affinitású kötőhelye ugyanazon a proteinen helyezkedik-e el, mint amelyiken a cAMP katalitikus hely van. Egy másik vizsgálatban azt kívánták meghatározni, hogy a PDE4 gátlása esetén ugyanaz a szerkezet/aktivitás összefüggés (SAR) áll-e fenn, mint amilyen SAR a nagy affinitású rolipram kötőhellyel történő versengést jellemzi. Egy harmadik vizsgálatban arra próbáltak magyarázatot találni, hogy — ha van egyáltalán — milyen biológiai szignifikancia lehet a fenti megfigyelések mögött, különös tekintettel ezek új hatóanyag-terápiák kifej-



lesztésére történő felhasználására.

A nagyszámú vizsgálatból nyert adatok összegzését követően nyilvánvaló vált, hogy a humán monocita rekombináns PDE4-en (hPDE4) legalább két olyan kötőforma van, amelyen az inhibitorok megkötődnek. Ezeknek a megfigyelésnek az egyik magyarázata az, hogy a hPDE4 két eltérő formában létezik. Az egyik nagy affinitással köti meg a rolipram- és a denbufylline-szerű anyagokat, míg a másik ezeket a vegyületeket kis affinitással köti meg. A jelen leírásban a két formát a nagy (high) affinitású rolipram kötő forma (HPDE4), illetve a kis (low) affinitású rolipram kötő forma (LPDE4) jelöléssel különböztetjük meg egymástól.

Ezeknek a megfigyeléseknek a jelentősége annak felismerésében mutatkozik meg, hogy azok a vegyületek, amelyek hatékonyan versengenek a nagy affinitású rolipram kötő formáért (HPDE4), több mellékhatásuk van vagy intenzívebb mellékhatásaik vannak, mint azokénak, amelyek az LPDE4-gyel (kis affinitású rolipram kötő formával) versengenek. További adatok azt jelzik, hogy a vegyületeket a PDE4 kis affinitású kötő formájához irányíthatjuk, és hogy ez a forma különbözik attól a kötő formától, amelynek esetén a rolipram egy nagy affinitással kötődő anyag. Eltérő szerkezet/aktivitás összefüggés található a hatásukat a nagy affinitású rolipram kötő formánál, illetve a kis affinitású rolipram kötő formánál kifejtő inhibitorok esetén. Ezenkívül az említett két forma funkcionális szerepe is különbözik. Azok a vegyületek, amelyek a kis affinitású rolipram kötő formával lépnek kölcsönhatásba, gyulladáscsökkentő hatásúak, míg azok,



míg azok, amelyek a nagy affinitású rolipram kötő formával lépnek kölcsönhatásba, mellékhatásokkal járnak vagy lényegesen erősebb mellékhatásokat okoznak.

Ezekre a megfigyelésekre nincs egyértelmű magyarázat. Valószínűsíthető azonban, hogy a PDE4 két eltérő tercier vagy kvaterner állapokban létezik. Feltételezhető, hogy mindkét forma katalitikusan aktív. A rolipram az egyik forma egyik katalitikus helyéhez nagy affinitással kötődik, ahol a jelen leírásban a nagy affinitást 10 nanomolnál kisebb K_i értékkel definiáljuk, és a másik formához kis affinitással kötődik, ahol a jelen leírásban a kis affinitást legalább 100 nanomol K_i értékkel definiáljuk.

Az előbbi megfigyelésekből az a hasznos következtetés vonható le, hogy lehetőség van azoknak a vegyületeknek az azonosítására, amelyek a cAMP katalitikus aktivitást elsődlegesen ott gátolják, ahol az enzim a rolipramot kis affinitással kötő formában van, miáltal mérséklődnek azok a mellékhatások, amelyek a rolipramot nagy affinitással kötő forma gátlásával állnak kapcsolatban.

A krónikus obstruktív tüdőbetegség (COPD) egy összefoglaló elnevezés, amelyet gyakran használnak a rögzült légúti betegségek két állapotának, nevezetesen a krónikus bronchitisnek és az emphysemának a leírására. A krónikus bronchitist és az emphysemát leggyakrabban a dohányzás okozza; a COPD-ben szenvedő betegek hozzávetőleg 90 %-a dohányzik, illetve dohányzott. Bár a dohányosok körülbelül 50 %-ánál alakul ki krónikus bronchitis, csak a dohányosok 15 %-ánál fejlődik ki munkaképtelenséggel já-



ró légúti obstrukció. Néhány más emlős esetén, különösen a lovaknál is előfordul a COPD.

A COPD-vel kapcsolatos légúti obstrukció progresszív, amely légúti hiperaktivitással járhat együtt, és amely részlegesen reverzibilis lehet. Nem-specifikus légúti hiperérzékenység is szerepet játszhat a COPD kialakulásában, valamint dohányosokban a tüdőfunkció csökkenésének felgyorsulása is utalhat a COPD kialakulására.

A COPD az elhalálozások és a munkaképtelenné válások egyik szignifikáns okozója. Az Amerikai Egyesült Államokban és Európában ma a COPD az elhalálozások negyedi leggyakoribb oka. Az említett betegséggel összefüggő morbiditás és mortalitás csökkentésének elősegítésére a kezelési tanácsadók a korai felismerésnek és a dohányzásról leszoktató programok végrehajtásának a fontosságát hangsúlyozzák. A korai felismerés és diagnózis azonban számos ok miatt bonyolult.

A COPD kifejlődése évekig tart, és a dohányosok gyakran nem akarják tudomásul venni a dohányzásból származó betegségek hatásait, például a fokozott fulladás korai figyelmeztető jeleit a kornak tulajdonítják. Hasonló módon gyakran előfordul, hogy az általános gyakorlattal rendelkező orvos a bronchitises akut epizódokat nem a COPD korai jeleinek tekinti. Számos beteg egynél több betegség (például krónikus bronchitis vagy asztmikus bronchitis) jeleit mutatja, ami jelentősen megnehezíti a pontos diagnózis felállítását, különösen a betegség korai fázisában. Ezenkívül sok beteg mindaddig nem keres orvosi segítséget, amíg nem észlel a csökkent tüdőműködéssel kapcsolatos több



súlyos tünetet, amilyen például a dyspnoe, az állandó köhögés és a köpetképződés. Az előbbieket következményeként a betegek túlnyomó többsége esetén a betegség csak akkor diagnosztizálható, illetve kezelhető, amikor a betegség már előrehaladott stádiumban van.

A jelen találmány célja az, hogy a COPD, illetve a mellékhatások vonatkozásában a korábbiaknál lényegesen jobb terápiás indexet biztosítsunk.

A találmány tárgya tehát eljárás COPD megelőzésére vagy kezelésére a gastrointestinalis és pszichotrop effektusok egyidejű minimalizálása mellett, amely eljárás során egy ilyen kezelést igénylő alanyban hatásos mennyiségben beadunk egy olyan vegyületet, amely vegyület legalább körülbelül 0,1 értékű IC_{50} aránnyal rendelkezik, ahol az arány a rolipramot nagy affinitással kötő PDE4 katalitikus forma IC_{50} értékének és a rolipramot kis affinitással kötő kötő forma IC_{50} értékének a hányadosa.

A krónikus obstruktív tüdőbetegséget (COPD) egy, a tüdőben lejátszódó, az alveoláris makrofágok, a $CD8^+$ T-sejtek és a neutrofilek fokozott aktivációja és/vagy száma által jelzett krónikus gyulladáshoz vezető folyamat jellemzi. A COPD gyógyításának szempontjából legfontosabb az, hogy módosítható legyen a neutrofilek forgalma és aktivációja. A neutrofilek valószínűleg központi szerepet játszanak a COPD patofiziológiájában. A neutrofil aktiváció számos gyulladáshoz vezető mediátor és proteín felszabadulását eredményezi, amelyek közül a legfontosabb neutrofil elasztáz jelentős mértékben hozzájárul a progresszív fibrosis,



a légúti stenosis kialakulásához, valamint a tüdő parenchima destrukciójához, és ily módon a légúti funkció egyre gyorsabb csökkenéséhez. A neutrofil elasztáz ezenkívül erőteljes mucus secretagog is, és ily módon jelentősen hozzájárul a COPD-re jellemző mucus hypersecretio kialakulásához. A találmány szerinti vegyületek *in vitro* erőteljes hatást gyakorolnak a neutrofilekre, például gátolják a neutrofil kemotaxist és degranulációt. A találmány szerinti vegyületek állatmodellekben *in vivo* csökkentik a keringésből származó neutrofil extravasatiót, a pulmonalis sequestratiót és a különféle gyulladásos bántalmakra adott oedematosus válaszreakciókat.

A PDE4 inhibitoroknak a COPD-ben kifejtett terápiás aktivitásához hozzájárulhatnak még az inhibitorok olyan további hatásai is, amilyen például a bronchodilatatiós, valamint a pulmonalis neuronális aktivitást módosító hatás. Bár a COPD-ben a csökkent mértékű légáramlás reverzibilitásának mértéke csekély, ennek akár kismértékű növelése is akut pozitív hatást válthat ki, valamint a hanyatlás meredekségének fokozatos csökkentése is alapvetően javíthatja a COPD betegek életminőségét. A belélegzett muszkarin antagonisták klinikailag jelentős mértékben képesek javítani COPD-ben a légzésműködést, ami arra utal, hogy a betegségben a reverzibilis légúti obstrukciók nagy része a pulmonalis idegek szabályozatlanságával áll kapcsolatban. Bár részleteiben még nem vizsgálták, a PDE4 inhibitorok módosíthatják a környezeti bántalmak (például dohányzás) hatására felszabaduló proinflammatoricus mediátorok gazdag forrásaként funkcionáló légúti epithelialis sejtek aktivitását is, és gátolhatják



a vascularis simaizom hyperplasiát, a COPD végső stádiumában fellépő, szívbénulással együtt járó struktúrális elváltozást.

A jelen leírásban a cAMP-nek azt a katalitikus helyét, amelyik a rolipramot kis affinitással köti, "kis (low) affinitású" kötőhelyként (LPDE4), míg a katalitikus helynek azt a formáját, amelyik a rolipramot nagy affinitással köti, "nagy (high) affinitású" kötőhelyként (HPDE4) jelöljük.

Az első kísérletekben a [³H]-rolipram kötés megállapítása és értékelése érdekében végeztünk vizsgálatokat. Ennek részleteit az alábbi 1. példában ismertetjük.

Annak érdekében, hogy eldönthessük, a nagy affinitású kötési aktivitás és a kis affinitású kötési aktivitás ugyanahhoz a géntermékhez kapcsolódik-e, ismert eljárásokkal élesztőt transzformáltunk, majd a rekombináns PDE4 expresszálasát követően hatórás fermentációs periódust alkalmaztunk. Egy PDE4 ellen irányuló antitest alkalmazásával végzett Western-blot analízis azt jelezte, hogy az expresszált PDE4 mennyisége az idő előrehaladásával növekszik, és maximális értékét háromórás tenyésztés után éri el. Ezenkívül az immunoreaktív termék több mint 90 %-a az élesztő lizátumok nagy sebességű (100 000 × g) felülúszójában volt. A protein expresszió folyamata során mindig nyomon követtük a [³H]R(-)-rolipram kötetést és a PDE aktivitást. A PDE4 aktivitás a rolipram kötési aktivitással együttesen expresszáldott, ami azt jelzi, hogy mindkét aktivitás ugyanahhoz a géntermékhez kapcsolódik. Hasonló eredményeket nyertünk a Western-blot analízissel is, ahol a roliprammal gátolható PDE aktivitás és a [³H]-rolipram kötési aktivitás több



mint 85 %-a volt megtalálható az élesztő felülúszó frakcióban.

Összeségében a fenti rendszerben expresszálódott rekombináns PDE4 legnagyobb része LPDE4, és csak egy kis töredéke HPDE4. Ebből következően a rekombináns PDE4 katalitikus aktivitás gátlása elsődlegesen a vegyületeknek az LPDE4-nél kifejtett hatását tükrözi vissza. A PDE4 katalitikus aktivitás gátlását ily módon a vegyületek LPDE4-nél kifejtett hatékonyságának az mérőszámaként (indexeként) alkalmazhatjuk. A vegyületeknek a HPDE4-nél kifejtett hatékonyságát úgy értékelhetjük, hogy megvizsgáljuk, milyen mértékben képesek a vegyületek versengeni a [³H]R(-)-rolipramért. Annak érdekében, hogy mind a kis affinitású, mind pedig a nagy affinitású rolipram kötőhelyek esetén szerkezet/aktivitás összefüggést (SAR) találjunk, két vizsgálati rendszerben meghatároztuk a kiválasztott vegyületek hatékonyságát. A standard vegyületek alkalmazásával végzett kísérletek eredményeit táblázatban foglaltuk össze. Amint az várható volt, bizonyos vegyületek egyértelműen hatásosabbak voltak a [³H]-roliprammal folytatott versengésben azon a helyen, amelynél a rolipram bizonyítottan nagy affinitással kötődik, mint azon a helyen, amelynél a rolipram kis affinitással kötődik. A nagy affinitású kötés és a kis affinitású kötés közötti szerkezet/aktivitás összefüggés csak igen kevés közös jellemzőt mutat, amiből azt a következtetést vontuk le, hogy a nagy affinitású [³H]-rolipram kötés gátlásának szerkezet/aktivitás összefüggése eltér a kis affinitású rolipram kötőhelynél történő kötés szerkezet/aktivitás összefüggésétől. A szerkezet/aktivitás összefüggésre vonatkozó vizsgálat eredményeit az I. táblázatban



foglaljuk össze.

I. táblázat

Vegyület	Kis affinitású IC₅₀	Nagy affinitású IC₅₀	Nagy/kicsi arány
1-(5-tetrazolil)-3-[3-(ciklopentil-oxi)-4-metoxi-fenil]-ciklopentán	1,1	0,002	0,0018
<i>cisz</i> -{3-[3-(ciklopentil-oxi)-4-metoxi-fenil]-1-ciklopentánkarboxilát}	2,7	0,021	0,0078
<i>N</i> -{2-[3-(ciklopentil-oxi)-4-metoxi-fenil]-etil}-oxamid	0,89	0,012	0,013
R-rolipram	0,31	0,004	0,013
<i>N</i> -{3-[3,4-bisz(difluor-metoxi)-fenil]-etil}-oxamid	1,6	0,4	0,25
Ro 20-1724	2,6	0,19	0,07
S-rolipram	1,1	0,095	0,086
(<i>R</i>)-(+)-1-(4-bróm-benzil)-4-[3-(ciklopentil-oxi)-4-metoxi-fenil]-2-pirrolidon	4,0	0,45	0,11
1-(4-amino-benzil)-[3-(ciklopentil-oxi)-4-metoxi-fenil]-2-imidazolidinon	1,4	0,1	0,07
denbufylline	0,29	0,05	0,17



I. táblázat (folytatás)

Vegyület	Kis affinitású IC ₅₀	Nagy affinitású IC ₅₀	Nagy/kicsi arány
3-[(ciklopentil-oxi)-4-metoxi- -fenil]-1-[4-N'-(N ² -ciano-S- -metil-tioureido)-benzil]-2- -pirrolidon	0,1	0,03	0,30
(R)-(+)-1-(4-bróm-benzil)-4- -[3-(ciklopentil-oxi)-4- -metoxi-fenil]-2-pirrolidon	0,06	0,02	0,33
IBMX	29,1	20,3	0,698
(S)-(-)-etil-{4-[3- -(ciklopentil-oxi)-4-metoxi- -fenil]-2-pirrolidinilidén}- -acetát	0,46	0,45	0,98
Papaverin	10	10	1,0
cisz-{4-ciano-4-[3- -(ciklopentil-oxi)-4-metoxi- -fenil]-1-ciklohexán- karboxilát}	0,095	0,110	1,1
cisz-{4-ciano-4-[3- -(ciklopropil-metoxi)-4- -(difluor-metoxi)-fenil]-1- -ciklohexanol}	0,021	0,04	2,0
(R)-(+)-etil-{4-[3- -(ciklopentil-oxi)-4-metoxi- -fenil]-2-pirrolidinilidén}- -acetát	0,14	0,3	2,143



I. táblázat (folytatás)

Vegyület	Kis affinitású IC ₅₀	Nagy affinitású IC ₅₀	Nagy/kicsi arány
2-(metoxi-karbonil)-4-ciano-4- -[3-(ciklopropil-metoxi)-4- -(difluor-metoxi)-fenil]-1- -ciklohexanon	0,140	0,5	3,571
trequinsin	1,6	5,0	3,125
dipyridamole	5,2	32,5	6,25

A denbufylline-t, azaz a 7-acetonil-1,3-dibutil-xantint a SmithKline Beecham állította elő. A papaverin az 1-[(3,4-dimetoxi-fenil)-metil]-6,7-dimetoxi-izokinolin. A trequinsin kémiai neve 2,3,6,7-tetrahidro-2-(mezitil-imino)-9,10 dimetoxi-3-metil-4*H*-pirimido[6,1-*a*]izokinolin-4-on. A dipirimadole generikus elnevezése 2,2',2'',2'''-[(4,8-dipiperidino-pirimido[5,4-*d*]pirimidin-2,6-diil)-dinitrilo]-tetraetanol.

Ezek az eredmények azt mutatják, hogy bizonyos vegyületek a nagy affinitású formával összehasonlítva szelektíven a kis affinitású formát gátolják, illetve más vegyületek esetén a szelektivitás fordított. Ennek a megfigyelésnek az a jelentősége, hogy lehetővé teszi a mellékhatások oly módon történő minimalizálását, hogy olyan vegyületeket tervezünk vagy választunk ki, amelyek szelektíven (elsődlegesen) az egyik helyet gátolják, miáltal a kívánt reakciót egy másik, nemkívánt válasz kizárásával váltják ki, illetve a nemkívánt választ legalább

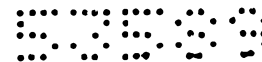


annyira minimalizálják, amely mértékben a nemkívánt mellékhatás már nem befolyásolja el nem fogadható mértékben a kívánt terápiát.

Az előbbi vizsgálatok ellenére még nem határoztuk meg a PDE4 izozimben lévő nagy affinitású kötés és kis affinitású kötés egymástól eltérő szerkezet/aktivitás összefüggésének az alapját. Felismertük azonban, hogy ha egy vegyület legalább körülbelül 0,1 értékű IC_{50} arányt mutat, ahol az arány a rolipramot nagy affinitással kötő PDE4 katalitikus forma IC_{50} értékének és a rolipramot kis affinitással kötő kötő forma IC_{50} értékének a hányadosa, akkor a vegyületnek elfogadható terápiás indexe lesz. Más szavakkal ez azt jelenti, hogy az ilyen vegyülettel eredményesen kezelhetünk különféle immunológiai és gyulladásos betegségeket, ugyanakkor a vegyülettel egyáltalán nem vagy el nem fogadható mértékben nem okozunk más élettani jelenséget. A legelőnyösebb találmány szerinti megoldás értelmében gyulladásos vagy allergiás betegségek kezeléséhez a kis affinitású rolipram kötő helyet gátoljuk.

Vegyületek

A találmány olyan vegyületekre vonatkozik, amelyek legalább körülbelül 0,1 értékű IC_{50} aránnyal (nagy/kis kötés) rendelkeznek. Ebbe a körbe tartozik bármely, illetve valamennyi olyan vegyület, amely a jelen leírásban ismertetett teszt alapján PDE4 inhibitor, és amelynek IC_{50} aránya — a jelen leírásban ismertetett vagy más hasonló vizsgálattal — bizonyítottan a meghatározott tartományba esik. Különösen fontosak azok a ve-



gyületek, amelyek a jelen találmány bejelentési napja előtt nem voltak szabadon felhasználhatók és/vagy amelyek nem voltak ismertek, illetve amelyeket az említett időpont előtt PDE4 inhibitorokként még nem teszteltek.

A találmány szerinti megoldásban alkalmazható vegyületek kiválasztásának az egyik előnyös módszere értelmében meghatározzuk azokat a vegyületeket, amelyek legalább körülbelül 0,1 értékű IC_{50} aránnyal rendelkeznek; ahol az arány egyik tagja az 1 nM [3H]R-rolipramnak a rolipramot nagy affinitással kötő PDE4 formához történő kötésének az IC_{50} értéke, míg másik tagja a rolipramot kis affinitással kötő forma PDE4 katalitikus aktivitásának 1 μM [3H]-cAMP mint szubsztráttal történő gátlásának az IC_{50} értéke.

Az előbbi IC_{50} arány standardnak megfelelő vegyületek példáit az I. táblázatban ismertetjük, illetve további példák találhatóak az 5 448 686., az 5 605 923. és az 5 552 438. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban.

Előnyösek azok a vegyületek, amelyek 0,5-nél nagyobb IC_{50} aránnyal rendelkeznek, és különösen azok a vegyületek, amelyeknek IC_{50} aránya 1,0-nél nagyobb. A túlnyomórészt a kis affinitású kötési helyhez kötődő és 0,1-nél nagyobb IC_{50} aránnyal rendelkező vegyületek példái közé tartoznak — egyebek mellett — a következő vegyületek: *cisz*-{4-ciano-4-[3-(ciklopentil-oxi)-4-metoxi-fenil]-1-ciklohexánkarboxilát}, 2-(metoxi-karboxil)-4-ciano-4-[3-(ciklopropil-metoxi)-4-(difluor-metoxi)-fenil]-1-ciklohexanon és *cisz*-{4-ciano-4-[3-(ciklopropil-metoxi)-4-(difluor-metoxi)-fenil]-1-ciklohexanol}.



A találmány szerinti vegyületeket és gyógyászatiilag elfogadható sóikat a jelzett betegség kezelésére szolgáló szokásos módokon, például orális, parenteralis, sublingualis, transdermalis, rectalis, inhalációs vagy buccalis beadással alkalmazhatjuk.

Az orális beadáskor aktív találmány szerinti vegyületeket szirupokká, tablettákká, kapszulákká, szabályozott hatóanyag-felszabadítású készítményekké vagy gyógycukorkákká formálhatjuk. A szirupkészítmények általában a vegyületnek vagy sójának egy folyékony hordozóval, például etanollal, mogyoróolajjal, glicerinnel vagy vízzel készített szuszpenziójából vagy oldatából, valamint ízesítő- vagy színezőszerekből állnak. Ahol a kompozíció tablettáformában van, a szilárd készítmények előállítására szokásosan alkalmazott bármilyen gyógyszerészeti hordozót felhasználhatunk. Az ilyen hordozók körébe — egyebek mellett — például a következők tartoznak: magnézium-sztearát, gipsz, talkum, zselatin, akácmézga, sztearinsav, keményítő, laktóz és szacharóz. Ahol a kompozíció kapszulaformában van, bármely szokásos kapszulázási módszert felhasználhatjuk, például az előbbi hordozók alkalmazásával előállított kompozíciót kemény zselatin kapszulahéjba tölthetjük. Ahol a kompozíció lágy zselatin kapszula formájában van, a diszperziók vagy szuszpenziók előállítására szokásosan alkalmazott gyógyszerészeti hordozókat használhatunk, amilyenek — egyebek mellett — például a vizes gumik, cellulózok, szilikátok vagy olajok, majd az így előállított kompozíciókat lágy zselatin kapszulákba építjük be.



A jellegzetes parenteralis kompozíciók egy vegyületnek vagy sójának steril vizes vagy nemvizes hordozóval készített, adott esetben parenteralisan elfogadható olajokat, például poli-etilénglikolt, poli(vinil-pirrolidon)-t, lecitint, arachiszolajat vagy szezámolajat tartalmazó oldatából vagy szuszpenziójából állnak.

A tipikus inhalációs kompozíciók oldatok, szuszpenziók vagy emulziók formájában vannak, amelyeket száraz porként vagy hagyományos propellánsok, például diklór-difluor-metán vagy triklór-fluor-metán alkalmazásával aeroszol formájában adhatunk be.

A jellegzetes dermalis vagy transdermalis készítmények szokásos vizes vagy nemvizes vivőanyagot tartalmazó krémek, kenőcsök, lóciók vagy paszták, illetve a készítmények hatóanyagot tartalmazó tapaszok, flastromok vagy membránok is lehetnek.

A kompozíciók előnyösen egységdózisformában vannak, amelynek például a tabletták, a kapszulák vagy az adagolt aeroszol dózisok, így a beteg egyszerűen tud egyetlen dózist bevenni.

Az orális beadásra szolgáló dózisegységek egyenként alkalmasan 0,3-60 mg/kg, előnyösen 1-30 mg/kg mennyiségben tartalmazzák a vegyületet vagy gyógyászatilag elfogadható sóját. COPD kezelése esetén az előnyös dózisok 10-15 mg/kg mennyiségű hatóanyagot tartalmaznak. A parenteralis beadásra szolgáló dózisegységek egyenként alkalmasan 0,1-100 mg/kg mennyiségben tartalmazzák a vegyületet vagy gyógyászatilag elfogadható sóját. Az intranasalis beadásra szolgáló dózisegységek egyenként és



személyenként alkalmasan 1-400 mg, előnyösen 10-200 mg mennyiségben tartalmazzák a vegyületet vagy gyógyászatilag elfogadható sóját. A topikális készítmények alkalmasan 0,01-5,0 tömeg% vegyületet tartalmaznak.

A hatóanyagot a kívánt aktivitás eléréséhez elegendő gyakorisággal, például naponta 1-6 alkalommal adhatjuk be. A hatóanyagot előnyösen naponta 1-2 alkalommal, még előnyösebben naponta kétszer adjuk be.

A találmány szerinti megoldás szerinti alkalmazás esetén nem várhatók el nem fogadható toxikológiai hatások.

A következő példák azt kívánják bemutatni, hogy hogyan valósíthatjuk meg és hogyan alkalmazhatjuk a találmány szerinti megoldást. A példák illusztratív jellegűek, a találmány oltalmi körét, illetve terjedelmét nem korlátozzák. Az oltalmi kört a mellékelt igénypontok határozzák meg.

Példák

Az alábbi, öt speciesre kiterjedő nyolc vizsgálatot alkalmaztuk a legalább körülbelül 0,1 IC₅₀ arányú vegyületek kiválasztásához. A vizsgálatok a következők voltak: az izolált nyúl paretális mirigyből származó savtermelés sitmulálása; az FMLP-indukált degranuláció (myeloperoxidáz felszabadulás) gátlása humán neutrofilekben; az FMLP-indukált O₂⁻ képződés gátlása tengerimalac eizinofilekben; az LPS-indukált TNF_α-termelés gátlása humán monocitákban; a hányás gátlása kutyaokban; az anti-gén-indukált bronchoconstrictio gátlása tengerimalacokban; a reserpine-indukált hypothermia visszafordítása egerekben; és az



egerekbe adoptívan transzferált humán monocitákból származó LPS-indukált TNF_α -termelés gátlása. A vizsgálatokat és az adatokat az alábbiakban részletezzük.

Statisztikai analízis

Annak a hipotézisnek a vizsgálatához, miszerint a PDE4 kis affinitású hely gátlása az ebbe az osztályba tartozó vegyületek gyulladáscsökkentő hatásával áll összefüggésben, míg a nagy affinitású hely gátlásához bizonyos mellékhatások kialakulása társul, meghatároztuk különféle PDE4 inhibitoroknak a gyulladáscsökkentő sejtműködést *in vitro* és *in vivo* blokkoló képességét, valamint *in vitro* és *in vivo* modellekben a vegyületeknek a mellékhatásokat okozó képességét. Annak összehasonlításához, hogy a PDE4 inhibitorok milyen mértékben képesek egy adott terápiás hatást vagy mellékhatást kiváltani attól függően, hogy a PDE4 kis affinitású kötőhelyét vagy nagy affinitású kötőhelyét gátolják, *in vitro* vagy *in vivo* vizsgálatokban (r^2) lineáris korrelációval vagy rangsorolási (rank-order) korrelációval (Spearman-féle Rho) összehasonlítottuk a vegyületeknek az izolált enzim katalitikus aktivitással vagy a nagy affinitású hellyel szembeni hatékonyságát. A lineáris korrelációval eldönthető, hogy egy vegyület a kis affinitású helynél vagy a nagy affinitású helynél kifejtett gátló képessége alapján felhasználható-e egy adott gyulladáscsökkentő vagy mellékhatás kiváltására. A rangsorolási korreláció azt vizsgálja, hogy egy adott gyulladáscsökkentő vagy mellékhatást kiváltó hatékonysági rangsor hasonlít-e a kis affinitású vagy a nagy affinitású hely gátlásánál észlelt



hatékonysági rangsorhoz. Az r^2 és a Spearman-féle Rho értékeket a STAT View II számítógépes programmal (Macintosh) számítottuk ki.

PDE4 versus rolipram nagy affinitású kötés

1. példa

Foszfodiészteráz és rolipram kötési vizsgálatok

1A. példa

Meghatároztuk, hogy az izolált humán monocita PDE4 és a hrPDE (humán rekombináns PDE4) elsődlegesen a kis affinitású formában van. Így a szubsztrátként $1 \mu\text{M}$ [^3H]cAMP alkalmazásával végzett standard PDE4 katalitikus aktivitás vizsgálatok alkalmazásával értékelhetjük a tesztvegyületeknek a PDE4 kis affinitású formájával szembeni aktivitását [Torphy et al., J. OF BIOL. CHEM., 267 (3), 1798-1804 (1992)].

Proteinforrásként patkányagy nagy sebességű felülúszókat használtunk. $25,6 \text{ Ci/mmol}$ fajlagos aktivitású [^3H]-rolipram enantiomereket állítottunk elő. Az ismert eljárás [Torphy et al., J. OF BIOL. CHEM., 267 (3), 1798-1804 (1992)] standard vizsgálati körülményeit úgy módosítottuk, hogy azonosak legyenek a PDE vizsgálati körülményeivel, kivéve a cAMP utolsó esetében: 50 mM Tris HCl (pH 7,5), 5 mM MgCl_2 , és 1 nM [^3H]-rolipram. A vizsgálatot egy órán át $30 \text{ }^\circ\text{C}$ -on végeztük. A reakciót leállítottuk, majd egy Brandel sejtleválasztó alkalmazásával elválasztottuk a kötött ligandot a szabad ligandtól. A nagy affinitású kötőhely esetén a versengést ugyanolyan körülmények között értékeltük, mint amilyeneket a kis affinitású PDE aktivitás mérésére alkal-



maztunk, kivéve, hogy [^3H]-cAMP és [^3H]5'-AMP nem volt jelen. Az I. táblázatban bemutatott adatokat az 1A. példában ismertetett protokoll alkalmazásával nyertük.

1B. példa

A foszfordiészteráz aktivitás mérése

A PDE aktivitást [^3H]cAMP szcintillációs közelségi vizsgálattal (scintillation proximity assay, SPA) vagy [^3H]cGMP SPA enzim vizsgálattal, a gyártó (Amersham Life Sciences) használati utasításának megfelelően vizsgáltuk. A reakciókat 96-vájatú lemezekon, szobahőmérsékleten, 0,1 ml reakciópufferben hajtottuk végre, ahol a puffer összetétele a következő volt (végkoncentrációk): 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 8,3 mM MgCl₂, 1,7 mM EGTA, [^3H]cAMP vagy [^3H]cGMP (hozzávetőleg 2000 dpm/pmol), enzim és az inhibitorok változó koncentrációi. A vizsgálatot egy órán keresztül folytattuk, majd 50 μl SPA ittrium-szilikát-gyöngy cink-szulfát jelenlétében végzett hozzáadásával leállítottuk a reakciót. A lemezeket összeráztuk, majd 20 percen keresztül szobahőmérsékleten állni hagytuk. A radioizotóppal jelzett termék képződését szcintillációs spektrometriával értékeltük. A PDE3 és PDE7 aktivitást szubsztrátként 0,05 μM [^3H]cAMP alkalmazásával, míg a PDE4 aktivitást szubsztrátként 1 μM [^3H] cAMP alkalmazásával mértük. A PDE1B, PDE1C, PDE2 és PDE5 aktivitást 1 μM [^3H]cGMP mint szubsztrát alkalmazásával mértük.

[^3H]R-rolipram kötési vizsgálat

A [^3H]R-rolipram kötési vizsgálatot a Schneider és munkatársai által kidolgozott vizsgálatnak egy módosított változatá-



val [lásd: Nicholson et al., TRENDS PHARMACOL. SCI., 12, 19-27 (1991); és McHale et al., MOL. PHARMACOL., 39, 109-113 (1991)] hajtottuk végre. Az R-rolipram hozzákötődik a PDE4 katalitikus helyéhez [lásd: Torphy et al., MOL. PHARMACOL., 39, 376-384 (1991)]. Ebből következően a [³H]R-rolipram kötésért történő versengés a jelzetlen versenytársak PDE4 inhibitor erősségének egy független megerősítését biztosítja. A vizsgálatot 30 °C-on egy órán át, 0,5 µl pufferben hajtottuk végre, ahol a puffer összetétele a következő volt (végkoncentrációk): 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 5 mM MgCl₂, 0,05 % bovin-szérumalbumin, 2 nM [³H]R-rolipram (5,7 × 10⁴ dpm/pmol), és a radioizotóppal nem jelzett inhibitorok változó koncentrációi. A reakciót 2,5 ml jéghideg {[³H]R-rolipramot nem tartalmazó} reakciópuffer hozzáadásával állítottuk le, majd előzetesen 0,3 % poli(etilén-imin)-be mártott Whatman GF/B filtereken gyors vákuumszűrést végeztünk (Brandel Cell Harvester). A filtereket további 7,5 ml hideg pufferrel mostuk, szárítottuk, majd folyadékszintillációs spektrometriával számlálást végeztünk.

2. példa

Amino-pirin akkumuláció

Bizonyos metil-xantinok és más nem-szelektív PDE inhibitorok különféle speciekben fokozzák a savszekréciót. Bizonyos PDE4 inhibitorok, amilyen például a rolipram és a Ro 20-1724, patkányokban fokozzák a savkiválasztást, különösen ha az említett inhibitorokat az adenilát-cikláznak egy aktivátorával, például hisztaminnal kombinálva alkalmazzuk. A savszekréciónak



ez a növekedése együtt jár a hisztamin-indukált cAMP akkumuláció fokozódásával. A vegyületek savszekréciót indukáló képessége összefüggésben áll (korrelál) a vegyületeknek a kis affinitású hellyel, illetve a nagy affinitású hellyel szembeni képességével. A vizsgálat egy gyenge bázis, a radioizotóppal jelzett amino-pirin akkumulációjára irányult. A korábbiakban már beszámoltak arról, hogy az amino-pirin a fokozott savszekréció biológiai markereként funkcionál. A vizsgálatot az alábbiak szerint végeztük.

Gyomormirigy-preparálás

Mindkét nemhez tartozó nyulakat cervicalis dislocatióval euthanizáltunk, majd eltávolítottuk a gyomrot. A corpusról leválasztottuk a nyálkahártyát; a gyomor cranialis és antralis részét félretettük. A gyomormirigyeket a Berghlind és Obrink (1976), valamint a Sack és Spenny által ismertetett eljárások módosított változatával izoláltuk. A gyomormirigyek izolálásához a nyálkahártyát felaprítottuk, majd kollagenázzal emésztettük. A feltárt mirigyeket szűrtük, mostuk, majd 1:15 térfogatarányban a következő összetételű inkubációs közegben szuszpendáltuk: NaCl, 132,4 mM; KCl, 5,4 mM; Na₂HPO₄, 5,0 mM; NaH₂PO₄, 1,0 mM; MgSO₄, 1,2 mM; CaCl₂, 1,0 mM; NaHCO₃, 12,0 mM; nyúl szérumalbumin, 2 mg/ml; dextróz, 2 mg/ml; pH 7,4.

Amino-pirin akkumuláció

A sav szekréció meghatározásához Sack és Spenny (1982) eljárásának megfelelően a [¹⁴C]-amino-pirinnel, szelektív PDE4



inhibitor különböző koncentrációival és küszöbkonzentrációjú (0,3-1,0 μM) hisztaminnal kombinált gyomormirigyeket 20 percen keresztül 37 °C-on egy vízszintes rázógépen (110 ciklus/perc) inkubáltuk. A mintákat ezt követően centrifugáltuk, majd a felülúszókból és az üledékekből vett részletekben meghatároztuk a radioaktivitást. A Sack és Spinney (1982) által leírtaknak megfelelően kiszámítottuk az amino-pirin arányokat. Az adatokat a maximális koncentrációjú (100 μM) hisztamin által kiváltott válasz százalékaként fejeztük ki. Az egyes vegyületek esetén nyert maximális válasz alkalmazásával, lineáris interpolációval határoztuk meg az EC_{50} értékeket.

3. példa

A szelektív PDE inhibitorok kutyákban kifejtett emeticus potenciáljának az értékelése

Az állattelepről kan és szuka korcs kutyákat szereztünk be (minden egyes vizsgálat esetén $n = 5$). Az állatokat egy éjszakan keresztül koplaltattuk, majd a vizsgálat előtt legalább 30 perccel fél konzervdoboznyi kutyaeledelt (Big Bet) adtunk minden egyes kutyának. A hatóanyag beadásához az egyik mellső láb cephalicus vénájába kanült helyzetünk be. A kísérleti vegyület beadása előtt a kanült átöblítettük 1 ml izotóniás sóoldattal (0,9 tömeg%-os, vizes nátrium-klorid-oldattal). A vegyületeket vagy polietilén-glikolból és izotóniás sóoldat elegyében, vagy pedig tiszta polietilén-glikolban oldottuk, majd az így nyert oldatokat 1,0-2,0 ml/10 kg térfogatnak megfelelő mennyiségben adtuk be. Annak érdekében, hogy a teljes dózis bekerüljön a



vérkeringésbe, a kanült átöblítettük további 0,5-1,0 ml izotóniás sóoldattal. A ketrecbe visszahelyezett állatokat további egy órán keresztül megfigyeltük. Minden egyes kutyanál megfigyeltük az öklendezés és a hányás jeleit, valamint feljegyeztük, hogy az ilyen jelek a vegyület beadása után mennyi idő elteltével fordulnak elő. A megfigyelési időszak végén az állatokat visszatettük a saját ketrecükbe. Az egyes vizsgálati napokat hét nap választotta el egymástól. Minden egyes vegyületet növekvő dózisban adtunk be a kutyáknak az egymást követő vizsgálati napokon, egészen addig, amíg emeticus effektusokat észleltünk. Ennél az időpontnál az egyedi kutyákat kivettük a vizsgálatból, és a nagyobb dózisokat csak azokban az állatokban értékeltük, amelyek még nem adtak válaszreakciót.

Az adatokat a szakirodalomban a kvantális dózis-válasz függvények esetén ismerttetetteknek megfelelően az egyes dózisosokra reagáló kutyák kumulatív százalékanak formájában fejeztük ki. Probit analízis alkalmazásával számítottuk ki az EC_{50} értékét.

4. példa

Tengerimalac eozinofil vizsgálat

Az eozinofil izolálása és tisztítása

Hím (Hartley, Hazelton Labs) tengerimalacoknak a vizsgálat előtt 4-6 héten keresztül hetente 1 ml lószérumot adtunk be injekcióval. A lószérum injekciója után legalább 24 órával ketamin/xilazin keverékkel (88 mg; 12 mg/ml; 0,4 ml/kg) anesztetizáltuk az állatokat. Az anesztezia megkezdése után a peritonea-



lis üreget kimostuk 50 ml meleg, steril 0,9 tömeg%-os vizes nátrium-klorid-oldattal. A mosófolyadékot egy 14 G katéter alkalmazásával összegyűjtöttük, majd egy 50 ml-es kónikus műanyag centrifugacsőbe helyeztük. Miután magukhoz tértek az altatásból, a tengerimalacokat egy kéthetes pihenés után ismét felhasználhattuk a kísérletben.

A mosófolyadék 10 percen keresztül $400 \times g$ értékkel végzett centrifugálásával sejteket izoláltunk, majd a sejteket 35 ml foszfátpufferelt izotóniás sóoldatban (PBS) szuszpendáltuk, végül 10 ml izotóniás Percoll (1,075 g/ml) réteggel fedtuk a szuszpenziót. A szuszpenziót 30 percen keresztül $300 \times g$ értékkel centrifugáltuk. A főként eozinofileket és eritrocitákat tartalmazó üledéket PBS-ben mostuk, majd az eritrocitákat lizáltuk. A sejteket 20 % magzati borjúsérumot (FBS) tartalmazó RPMI 1640 médiumban szuszpendáltuk, majd egy párásított, 5 %-os CO_2 inkubátorban egy éjszakán keresztül $37^\circ C$ -on inkubáltuk. Másnap a sejteket mostuk és PBS-ben szuszpendáltuk a sejtek életképességének (tripán-kék kizárás) és tisztaságának a meghatározásához.

Superoxid-anion (O_2^-) képződés

Tisztított eozinofileket (életképesség $> 95\%$, tisztaság $> 90\%$) 20 mM HEPES puffert (pH 7,4) és 0,1 % zselatint tartalmazó PBS-ben $1-2 \times 10^6$ sejt/ml koncentrációban szuszpendáltunk. 96-vájatú lemezekre (1×10^5) eozinofilt helyeztünk, majd körülbelül egy órán át $37^\circ C$ -on inkubáltuk a lemezeket. A reakció megindítása előtt 10 perccel PDE4 inhibitorokat adtunk a vája-



tokba. A reakciót citokróm C (160 μM) és formil-Met-Leu-Phe (fMLP) 60 egység szuperoxid-dizmutáz (SOD) jelenlétében végzett vagy SOD nélküli hozzáadásával indítottuk meg. A citokróm C redukcióját különböző időperiódusoknál egy Dynatech MR 7000 lemezleolvasóval, 630 nm-es referencia hullámhossz mellett 550 nm-nél követtük nyomon. Az O_2^- képződési sebességét lineáris regressziós analízissel határoztuk meg, amelynek során több időpontban, SOD jelenlétében vagy SOD nélkül a vájatok nettó abszorbanciáját alkalmaztuk. Az eredményeket az alapfelszabadulásra korrigált kontroll O_2^- képződés százalékának a formájában fejeztük ki. A megfigyelt maximális gátlás szinusza 60 % volt, a log IC_{30} értékeket a koncentráció és az összevont 30 % lineáris interpolációjának az alkalmazásával számítottuk ki.

5. példa

Bronchoconstrictio tengerimalacokban

Hím Hartley tengerimalacokat (200-250 g/négyhetes, Hazelton Research, Denver, Pennsylvania, Amerikai Egyesült Államok) oly módon szenzitizáltunk, hogy az 1. és a 4. napon mindkét combba intramuszkuláris injekcióval 0,35 ml izotóniás sóoldattal készített 5 tömeg/térfogat%-os ovalbumin-oldatot adtunk be (összesen 0,7 ml). A 25. nap után a tengerimalacok ismét felhasználhatók voltak.

Kísérleti eljárás

Ovalbuminra aktívan szenzitizált hím Hartley tengerimalacokat (600-800 g, Hazelton) a műtét előtt körülbelül 10-15



perccel nátrium-pentobarbitállal (40 mg/kg i.p.) anesztetizáltunk. A hatóanyag beadásához, a vérnyomás megfigyeléséhez és a lélegeztetéshez a jugularis vénát, a nyaki arétriát és a tracheát kanülláttuk [Deseret Intracath[®] Vialon[®] polimergyanta radiopak katéterek (Deseret Medical, Inc., Sandy, Utah, Amerikai Egyesült Államok), 22 GA és 19 GA, valamint PE tubing 260]. A kolinerg interferencia minimalizálása érdekében bilaterális vagotomiát végeztünk. Az állatokat paralizáltuk (pancuronium-bromid, 0,1 mg/kg i.v.) és egy Harvard Rodent Respirator (model 683, Harvard Apparatus, South Natick, Massachusetts, Amerikai Egyesült Államok) alkalmazásával lélegeztettük (45 lélegzet/perc). A trachealis kanülnek egy oldalágában egy Elcomatic transzduktorral (Buxco Electronics, Sharon, Connecticut, Amerikai Egyesült Államok) mértük a légúti nyomásváltozásokat. Az egyszeri belélegeztetés térfogatát úgy állítottuk be, hogy az oldalkarban a nyomás 8 cmH₂O értékeű legyen (körülbelül 5 cm szobai levegő). A vérnyomást Stathan P23XL Physical Pressure Transducer (Viggo-Spectramed, Oxnard, Kalifornia, Amerikai Egyesült Államok) alkalmazásával mértük. A nyomásértékeket Grass Model 7D Polygraph (Grass Instrument Co., Quincy, Massachusetts, Amerikai Egyesült Államok) segítségével rögzítettük. A testhőmérséklet fenntartása érdekében a kísérlet ideje alatt az állatokat egy melegítőasztalon tartottuk.

Az antigén beadása előtt 10 perccel intravénásan beadtuk a tesztsvegyületeket, illetve a vivőanyagot. A 0. időpontban intravénásan 0,1 mg/kg ovalbumint adtunk be. Az antigén válasz csúcserkénel intravénásan további 0,2 mg/kg ovalbumint adtunk



be. Az összesen 0,3 mg/kg ovalbuminra adott maximális antigén válasz elérése után intravénás úton 1 ml/kg telített, vizes kálium-klorid-oldatot adtunk be, ami kiváltotta a maximális bronchoconstrictiót.

6. példa

Az LPS-indukált TNF α gátlása humán monocitákban

In vitro vizsgálatok

Annak meghatározásához, hogy a TNF α gátlás kapcsolatban áll-e az LPDE4 vagy a HPDE4 gátlással, egy egész sorozat, az LPDE4-re és a HPDE4-re nézve különféle hatékonysággal rendelkező PDE4 inhibitorok szkríneltünk arra vonatkozóan, hogy az inhibitorok *in vitro* milyen mértékben képesek gátolni humán monocitákban a lipopoliszacharidok (LPS) által stimulált TNF α termelést. Rendkívül fontos volt, hogy a vizsgálatban primer humán sejteket alkalmazzunk, mivel a gyulladáscsökkentő sejtekben zajló cAMP hidrolízisnél az LPDE4 és a HPDE4 relatív eloszlása drámai mértékű eltéréseket mutat a különböző speciesekben.

Módszerek

Normál humán donoroktól levett vér buffy coatjaiból vagy plazmaforézis maradékából frissen tisztított (Collata) humán periferális vér monocitákban értékeltük a TNF α gátlást. A monocitákat 1×10^6 sejt/ml sűrűségben 24-vájatú multilemezekre helyeztük. A sejteket egy órán keresztül hagytuk megtaopadni, amelynek képletében a felülúszót leszívattuk, majd a vájatokba 1 ml friss médiumot (1 % magzati borjúsérumot és 10 E/ml penicillin/streptomicint tartalmazó RPMI-1640) adtunk. A sejteket a



100 ng/ml végkoncentráció eléréséhez szükséges mennyiségű LPS (*E. coli* 055:B5, Sigma Chemicals) hozzáadása előtt a tesztvegyületek nélkül vagy 1 nM és 1 mM közötti koncentrációjú tesztvegyület jelenlétében 45 percen keresztül inkubáltuk. A tesztvegyületeket 1:1 térfogatarányú dimetil-szulfoxid/etanol oldószereleggyel szolubilizáltuk, majd oly módon hígítottuk, hogy a monocita tenyésztőközegben a dimetil-szulfoxidnak és az etanolnak is 0,5 % legyen a végkoncentrációja. A tenyészet felülúszókat 14-16 órás, 37 °C-on és 5 %-os CO₂ atmoszférában végzett inkubálás után eltávolítottuk a monocitákról, majd a sejttöredékek eltávolítása érdekében a felülúszókat 100 × g értékkel centrifugáltuk. A citokin vizsgálatot vagy azonnal elvégeztük, vagy pedig a tenyészet felülúszókat -70 °C-on tároltuk a vizsgálatokig.

A TNF_α koncentrációkat egy ELISA (Winston) alkalmazásával mértük, amelynek során befogó antitestként egy rágcsáló (murine) monoklonális anti-humán TNF_α antitestet, második antitestként pedig egy poliklonális nyúl anti-humán TNF_α antitestet használtunk. A detektáláshoz előbb egy peroxidáz-konjugált kecske anti-nyúl antitestet (Boehringer Mannheim, katalógusszám: 605222), majd egy peroxidáz szubsztrátot (1 mg/ml orto-fenilén-diamin 0,1 % karbamid-peroxiddal) adtunk a rendszerhez. A mintákban lévő TNF_α mennyiségeket egy *E. coli*-ban termelődő rekombináns humán TNF_α alkalmazásával felvett standard görbéből számítottuk ki. A humán TNF_α monoklonális antitesteket Kohler és Millstein eljárásának [Kohler and Millstein, *NATURE*, 256, 495-497 (1975)] egy módosított változatával, rekombináns humán



TNF α -val immunizált BALB/c egerek lépjeiből állítottuk elő. A poliklonális nyúl anit-humán TNF α antitesteket komplett Freund-adjuvánsban emulgeált rekombináns humán TNF α -val ismételten immunizált New Zealand fehér nyulakból állítottuk elő.

Humán TNF α termelés *in vivo* szuppresszálása adoptált
peritonitis modellben

Módszerek

Fél egység heparinizált vénás teljes vért vettünk le egészséges, gyógyszerrel nem kezelt önkéntesektől. A vért 25 °C-on 30 percen keresztül 800 × g értékkel végzett centrifugálással Histopaque-1077-en rétegelve elkülönítettük a polimorfonukleáris leukocitákat. Kinyertük a limfocita/onocita részt, majd Ca²⁺ és Mg²⁺ iont nem tartalmazó DPBS-sel (Dulbecco foszfátpufferelt fiziológiás sóoldattal) 25 °C-on 10 percen keresztül 1000 fordulat/perc sebességgel kétszer mostuk. Az üledéket Ca²⁺ és Mg²⁺ iont nem tartalmazó DPBS-ben (5 ml) szuszpendáltuk, a szuszpenziót 25 °C-on 5 ml (szérummentes RPMI 1640 médiummal készített) Percoll-oldatra rétegeltük, majd 25 °C-on 30 percen át 550 × g értékkel centrifugáltuk. A monociták felső rétegét eltávolítottuk, majd Ca²⁺ és Mg²⁺ iont nem tartalmazó DPBS-sel 25 °C-on 10 percen keresztül 1000 fordulat/perc sebességgel kétszer mostuk. A mosott monocita izolátumot 25 °C-on 6-10 × 10⁶ sejt/ml sűrűséggel Ca²⁺ és Mg²⁺ iont nem tartalmazó DPBS-ben szuszpendáltuk. Ugyanezzel az eljárással Source Leucocytes csomagokból is izoláltunk monocitákat. A monocita készítmények 65-90 % monocitát tartalmaztak, és a sejtek életképessé-



ge > 97 % volt (tripán-kék kizárás).

BALB/c egereket (Charles River Laboratories, Wilmington, Massachusettsm Amerikai Egyesült Államok) négyes vagy ötös csoportokba osztottunk. A 18-25 g testtömegű és azonos korú egerek peritoneumába 0,5 ml $6-10 \times 10^6$ monocita/ml monocitát injekcióztunk, amelynek során — annak érdekében, hogy minimalizáltjuk a monocitákat érő nyíróerőket és -feszültséget — 23 ga méretű tűt alkalmaztunk és a fecskendőre csak enyhe nyomást gyakoroltunk. A monociták beadását követően két percen belül elkezdtük az egerek vivőanyaggal vagy tesztvegyülettel 15 percen át végzett orális kezelését. Ezt követően az állatokba intraperitonealis úton 0,2 ml (Ca^{2+} és Mg^{2+} iont nem tartalmazó DPBS-sel készített) 125 mg/ml koncentrációjú endotoxin [*E. coli*, W típus, Difco) oldatot injekcióztunk. Két órával később az állatokat szén-dioxid asphyxiatióval euthanizáltuk, és intraperitonealisan 1,5 ml 4 °C hőmérsékletű, Ca^{2+} és Mg^{2+} iont nem tartalmazó DPBS-t injekcióztunk az állatokba. A peritoneumot óvatosan masszíroztuk, majd a mosófolyadékot eltávolítottuk és jégben hűtött polipropilén csövekbe helyeztük. A mintákat 4 °C-on 5 percen keresztül $12\,500 \times g$ értékkel centrifugáltuk, majd a felülúszókat új csövekbe helyeztük, és vagy -20 °C-on tároltuk, vagy pedig ELISA alkalmazásával a humán és egér TNF_α -ra nézve vizsgáltuk. Standard eljárások alkalmazásával kiszámítottuk az ED_{50} értékeket.



7. példa

Humán neutrofil eljárások

Izolálás és tisztítás

Heparinizált vérből Ficoll (Histopaque 1077) alkalmazásával végzett gradiens centrifugálás, majd az eritrociták eltávolítása érdekében dextransz sedimentációval neutrofileket (PMN-eket) izoláltunk. A még mindig visszamaradt eritrocitákat 30 másodpercen keresztül vízzel lizáltuk, majd (Ca^{2+} és Mg^{2+} iont nem tartalmazó) 10X DB-PBS alkalmazásával helyreállítottuk az izotonicitást. A PMN-eket centrifugálással izoláltuk, ezt követően további egy alkalommal 1X DB-PBS-sel mostuk, majd meghatároztuk a sejtszámot és (tripán kék festék kizárással) az életképességet. Az egyedi donoroktól függően a sejtszámot $0,75-1,5 \times 10^6$ sejt/ml értékre állítottuk be.

Degranuláció (myeloperoxidáz felszabadulás)

A fenti sejtszuszpenzió 0,1 ml-es részletét egy rázó vizfürdőben 5 $\mu\text{g/ml}$ cytochalasin B jelenlétében 20 mM HEPES puffert (pH = 7,4) és 0,1 % zselatint tartalmazó Earles kiegyenlített sóoldatban (Earles Balanced Salt Solution) 5 percen keresztül 37 °C-on inkubáltuk. Az fMLP (30 nM) hozzáadása előtt a sejteket a szelektív PDE4 inhibitorok különböző koncentrációival és PGE_2 -vel (3-10 nM) 5 percen át előkezeltük. Az fMLP hozzáadása után további 30 percen keresztül folytattuk az inkubálást. A reakciót a minták jégre helyezésével és centrifugálásával állítottuk le. A felülúszó frakciót eltávolítottuk, majd a myeloperoxidáz aktivitás vizsgálatáig fagyasztva (-30 °C) tároltuk.



A myeloperoxidáz aktivitás meghatározása

A myeloperoxidázt orto-anizidin szubsztrát és torna-peroxidáz standard alkalmazásával határoztuk meg. A felülúszó 50 μ l-es részletét 50 mM nátrium-foszfát-pufferben (pH 6,0) 100 μ l szubsztráttal (orto-anizidin, 0,53 mM; H₂O₂, 0,147 mM; végkoncentráció) inkubáltuk. A reakciót 50 μ l 4 M kénsavoldat hozzáadásával állítottuk le. A termékképződést a 410 nm hullámhossznál mért abszorbancia alapján, az aktivitást pedig a torna-peroxidáz alkalmazásával flevett standard görbe alapján határoztuk meg. Az adatokat a kontroll (a csak PGE₂ jelenlétében felszabadult myeloperoxidáz-mennyiség) százalékaként fejeztük ki. Mivel a legtöbb vegyület esetén megfigyelt maximális gátlás 30 % volt, a log (IC₁₅) értékeket a 15 %-os koncentrációk lineáris interpolációjával számítottuk ki.

8. példa

A reserpine-indukált hypothermia visszafordítása egerekben

Hím CF-1 vagy BALB/c egereket egyesével drótketrecekbe helyeztünk. A 10 mg/kg intraperitonealis reserpine-nel végzett előzetes kezelést előtt minden egyes egér esetén feljegyeztük a rectalis hőmérsékletet. A reserpine beadása után négy órával ismét feljegyeztük a rectalis hőmérsékletet, majd az egyes állatoknak különböző (orális) dózisban tesztvegyületeket, vivőanyagot vagy rolipramot (10 mg/kg) adtunk be. Ezt követően két órán keresztül 30 percenként feljegyeztük a rectalis hőmérsékleteket. Az adatokat a reserpine beadása után 4 órával megfigyelt értékekhez viszonyított hőmérséklet-változás formájában



fejeztük ki (a testhőmérsékletek hozzávetőleg 10-15 °C-kal az alapértékek alá csökkentek). A kezelés utáni 90 és 120 percnél mért hőmérséklet-változások alkalmazásával dózis/válasz görbéket szerkesztettünk. 6-9 állat átlagértékeinek probit analízisével vagy lineáris regressziójával határoztuk meg az ED₅₀ értékeket. Annak érdekében, hogy összehasonlíthassuk a vegyületeknek a reserpine-indukált hypothermiát viasszafordító képességét és a kis affinitású kötést vagy a nagy affinitású kötést gátló képességét, az ED₅₀ és az IC₅₀ értékeket -log (érték) formában fejeztük ki.

9. példa

Összefüggés a biológiai funkció és a PDE4 gátlás között

Annak érdekében, hogy meghatározhassuk, vajon a PDE4 gátlás bizonyos biológiai effektusai az LPDE4 vagy a HPDE4 gátlásával állnak-e kapcsolatban, lineáris vagy rangsor szerinti korreláció alkalmazásával összehasonlítottuk a vegyületek hatást kiváltó képességét és a vegyületeknek az LPDE4-et vagy a HPDE4-et gátló képességét. A korrelációkat számos tényező befolyásolhatja: a) a vegyületek stabilitása; 2) a vegyületek milyen mértékben képesek belépni a sejtekbe; 3) *in vivo* vizsgálatokban a vegyületek biológiai hasznosíthatósága; 4) a korrelációs értékek, különösen a lineáris korreláció esetén érzékenyek a hatékonyságok eltéréseire: nagyobb potenciaérték-tartományok esetén könnyebben mérhető szignifikáns lineáris korreláció. Ezeket a tényezőket is figyelembe vettük, amikor különféle vizsgálati rendszerekben analizáltuk és összegeztük az LPDE4 vagy a



HPDE4 gátlás és a biológiai funkció közötti összefüggést.

Izolált gyulladáscsökkentő sejtek alkalmazása esetén tengerimalac eozinofilekben a monocita TNF_α -termelés gátlása és a szuperoxid-termelés gátlása az LPDE4 gátlással jobb korrelációt mutatott, mint a HPDE4 gátlással. Ezenkívül az *in vivo* antigén-indukált bronchoconstrictio prevenciója jobb korrelációt mutatott az LPDE4 gátlással, mint a HPDE4 gátlással. Ebben az *in vivo* modellben a PDE4 inhibitorok a hízósejt-degranuláció megakadályozásával fejtik ki a hatásukat (Underwood *et al.*, nyomdában). Azonban a gyulladási sejtműködéshez nem mindig az LPDE4 gátlása kapcsolódott, mivel azt tapasztaltuk, hogy a neutrofil degranuláció gátlása jobban korrelált a HPDE4 gátlásával, mint az LPDE4 gátlásával. A gyulladáscsökkentő sejtaktivitás szuppressziója néhány, de nem az összes esetben az LPDE4 gátlásával járt együtt. Ezzel szemben a savszekréció fokozódása, az emésztés kialakulása és a reserpine-indukált hypothermia visszafordítása (a PDE4 inhibitorok pszichotrop potenciáljának a mérése) jobban korrelált a HPDE4 gátlásával, mint az LPDE4 gátlásával. Tehát az ebbe az osztályba tartozó vegyületek potenciális mellékhatásainak a legtöbbje a HPDE4 gátlásával áll kapcsolatban.

Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy az elsődlegesen az LPDE4-et gátló vegyületek kisebb mértékben fejtenek ki nemkívánt mellékhatásokat, és így előnyösebbek a gyulladáscsökkentő hatásaik. Így az olyan vegyületek kiválasztásával, amelyeknek az IC_{50} aránya, azaz a rolipramot nagy aktivitással kötő PDE4 katalitikus forma IC_{50} értékének és a rolipramot kis affinitással kötő PDE4 katalitikus forma IC_{50} értékének a hányadosa

(HPDE4/LPDE4) legalább körülbelül 0,1-es értékű, fokozott terápiás indexet érhetünk el, azaz ily módon az előnyös hatást maximalizálhatjuk és a káros hatást minimalizálhatjuk.

Annak eldöntése érdekében, hogy a fenti kiválasztási útmutató valóban alkalmas-e a javított terápiás indexű vegyületek kiválasztására, három olyan modellt értékeltünk, amelyben összehasonlítottuk a terápiás hatást és a mellékhatást. Ezek között *in vitro* összehasonlítást végeztünk a vegyületeknek az izolált humán monocitákból származó TNF_α termelést szuppresszálnó képessége és a vegyületeknek az izolált nyúl gyomormirigyekben történő savszekricót stimuláló képessége között, valamint két *in vivo* összehasonlítás során tengerimalacokban megvizsgáltuk a vegyületeknek az antigén-indukált bronchoconstrictiót megakadályozó képességét és kutyákban az emesist kiváltó képességét, valamint egerekben egy adoptált transzfer modellben a vegyületeknek a TNF_α termelést szuppresszálnó képességét, illetve egerekben a reserpine-indukált hypothermiát reverzáló képességét.

A legalább 0,1 értékű szelektivitási aránnyal (HPDE4/LPDE4) rendelkező PDE4 inhibitorok lényeges javulást mutattak a terápiás indexeikben. Például a *cisz*-{4-ciano-4-[3-(ciklopropil-oxi)-4-metoxi-fenil]-1-ciklohexánkarboxilát}, a 2-(metoxi-karbonil)-4-ciano-4-[3-(ciklopropil-metoxi)-4-(difluor-metoxi)-fenil]-1-ciklohexanon és a *cisz*-{4-ciano-4-[3-(ciklopropil-metoxi)-4-(difluor-metoxi)-fenil]-1-ciklohexanol}, amelyek mindegyike $\geq 0,1$ szelektivitási arányú, az archetípusos PDE4 inhibitor R-roliprammal összehasonlítva 100-szor jobb terápiás

indexszel rendelkezik. Ez azt bizonyítja, hogy a HPDE4 $IC_{50}/LPDE4 IC_{50} \geq 0,1$ kiválasztási összefüggés alkalmas azoknak a vegyületeknek az azonosítására, amelyek az *in vitro* összehasonlításban jobb terápiás indexszel rendelkeznek.

A COPD kezelésével kapcsolatban COPD-ben szenvedő humán betegeknek beadtuk a *cisz*-{4-ciano-4-[3-(ciklopentil-oxi)-4-metoxi-fenil]-1-ciklohexánkarboxilát}-ot. A betegekben csökkent a gyulladás, a bronchodilatatio és a pulmonalis neuromodulatio.



SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás humán betegekben a COPD megelőzésére vagy kezelésére egy olyan PDE4-specifikus inhibitor beadásával, amely elsődlegesen az R-rolipramot kis affinitással kötő PDE4 katalitikus katalitikus formát gátolja, **azzal jellemezve**, hogy egy ilyen kezelést igénylő betegnek hatásos mennyiségben egy legalább körülbelül 0,1 IC₅₀ arányú vegyületet adunk be, ahol az IC₅₀ arány a rolipramot nagy aktivitással kötő PDE4 katalitikus forma IC₅₀ értékének és a rolipramot kis affinitással kötő PDE4 katalitikus forma IC₅₀ értékének a hányadosa, azzal a megkötéssel, hogy a vegyület nem lehet *cisz*-{4-ciano-4-[3-(ciklopentil-oxi)-4-metoxi-fenil]-1-ciklohexánkarboxilát}.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy az inhibitor legalább körülbelül 0,1 értékű IC₅₀ aránnyal rendelkezik, ahol az arány számlálója az 1 nM [³H]R-rolipramnak a rolipramot nagy affinitással kötő PDE4 formához történő kötésének az IC₅₀ értéke, míg nevezője a rolipramot kis affinitással kötő forma PDE4 katalitikus aktivitásának 1 μM [³H]-cAMP mint szubsztráttal történő gátlásának az IC₅₀ értéke.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy az IC₅₀ arány értéke legalább 0,5.

4. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy az IC₅₀ arány értéke legalább 1,0.

5. Egy PDE4-specifikus inhibitor alkalmazása COPD megelőzésére vagy kezelésére szolgáló gyógyszerkészítmények előállítására, amelynek során egy legalább körülbelül 0,1 IC₅₀ arányú



inhibítort alkalmazunk, ahol az IC_{50} arány a rolipramot nagy aktivitással kötő PDE4 katalitikus forma IC_{50} értékének és a rolipramot kis affinitással kötő PDE4 katalitikus forma IC_{50} értékének a hányadosa, azzal a megkötéssel, hogy az inhibitor nem lehet *cisz*-{4-ciano-4-[3-(ciklopentil-oxi)-4-metoxi-fenil]-1-ciklohexánkarboxilát}.

6. Az 5. igénypont szerinti alkalmazás, amelynek során az inhibitor legalább körülbelül 0,1 értékű IC_{50} aránnyal rendelkezik, ahol az arány számlálója az 1 nM [3 H]R-rolipramnak a rolipramot nagy affinitással kötő PDE4 formához történő kötésének az IC_{50} értéke, míg nevezője a rolipramot kis affinitással kötő forma PDE4 katalitikus aktivitásának 1 μ M [3 H]-cAMP mint szubsztráttal történő gátlásának az IC_{50} értéke.

7. Az 5. vagy 6. igénypont szerinti alkalmazás, ahol az IC_{50} arány értéke legalább 0,5.

8. Az 5-7. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás, ahol az IC_{50} arány értéke legalább 1,0.

A meghatalmazott:

nyj2 kérték
2002. 02. 24
R

HUNGARIAN PATENT OFFICE
HPO
Központi Irodája
1051 Budapest, Árpád köz. 13.
Tel.: (06) 1 462 2000
Fax: (06) 1 462 2001
E-mail: hpo@hpo.hu