



HU000229474B1

(19) **HU**(11) Lajstromszám: **229 474**(13) **B1****MAGYARORSZÁG**
Szellemi Tulajdon Nemzeti Hivatala

SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: **P 07 00718**(51) Int. Cl.: **C07C 211/27** (2006.01)(22) A bejelentés napja: **1995. 10. 23.****A61K 311/35** (2006.01)(40) A közzététel napja: **1999. 03. 01.**

(87) A nemzetközi közzétételi szám:

(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlöny és Védjegyértesítőben: **2014. 01. 28.****WO 9612697**(65) Közzétételi szám: **T/77 980**

(62) Megosztás esetén a korábbi bejelentés ügyszáma: 08/353,784 1994. 12. 08. US PCT/US94/12117 1994. 10. 21. WO P9802491 1995. 10. 23. HU	(73) Jogosult(ak): NPS Pharmaceuticals, Inc., Salt Lake City, Utah (US)
(72) Feltaláló(k): Van Wagenen, Bradford C., Salt Lake City, Utah (US) Moe, Scott T., Salt Lake City, Utah (US) Balandrin, Manuel F., Sandy, Utah (US) Delmar, Eric G., Salt Lake City, Utah (US) Nemeth, Edward F., Salt Lake City, Utah (US)	(74) Képviselő: dr. Molnár István, DANUBIA Szabadalmi és Jogi Iroda Kft., Budapest

(54) **Kalciumreceptor-aktív vegyületek**

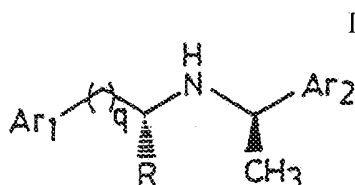
(57) Kivonat

A találmány szervesion-receptorok egy vagy több aktivitását szabályozni képes vegyületekre, ezeket hatóanyagként tartalmazó gyógyszerkészítményekre, valamint ezeknek a gyógyszerkészítményeknek az alkalmazására vonatkozik. A találmány szerinti vegyületek (I) általános képletében

- Ar1 jelentése 1 szubsztituenssel - mégpedig perfluor-metil- vagy halogén-metoxi- vagy fenilcsoport;
- Ar2 jelentése 1 szubsztituenssel - mégpedig metoxicsoporttal helyettesített naftil - vagy fenilcsoport;
- q jelentése 2 és
- R jelentése hidrogénatom vagy alkilcsoport.

A találmány szerinti gyógyszerkészítmények farmakológiailag elfogadható hordozóanyag mellett hatóanyagként a találmány tárgyát képező vegyületek valamelyikét tartalmazzák.

A találmány szerinti gyógyszerkészítmények elsősorban a mellékpajzsmirigy-túlműködés, a Paget-kór, a túl nagy vércalciumtűkörrrel összefüggő betegségek, a csontritkulás, a magas vérnyomás és a renális csontképződési rendellenességek kezelésére használhatók eredményesen.



Képviseelő: Danubia Szabadalmi és
Jogi Iroda Kft., Budapest

Kalciumreceptor-aktív vegyületek

NPS PHARMACEUTICALS, INC., Salt Lake City, UT, US

Feltalálók:

VAN WAGENEN Bradford C., Salt Lake City, UT,

MOE Scott T., Salt Lake City, UT,

BALANDRIN Manuel F., Sandy, UT,

DELMAR Eric G., Salt Lake City, UT,

NEMETH Edward F., Salt Lake City, UT,

Amerikai Egyesült Államok

A nemzetközi bejelentés napja: 1995. 10. 23.

Elsőbbségei: 1994. 10. 21. (PCT/US94/12117, US)

1994. 12. 08. (08/353 784, US)

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/US95/13704

A nemzetközi közrebocsátás száma: WO 96/12697

Aktaszámunk: 103615-6824 / MOI

A találmány szervetlenion-receptorok egy vagy több aktivítását szabályozni képes vegyületekre, ezeket hatóanyagként tartalmazó gyógyszerkészítményekre, valamint ezeknek a gyógyszerkészítményeknek az alkalmazására vonatkozik.

A test bizonyos sejtjei nemcsak a tisztán kémiai jelekre, hanem az ionokra, például az extracelluláris kalciumionokra (Ca^{2+}) is reagálnak. Az extracelluláris kalciumionok koncentrációjának a változásai - az extracelluláris kalciumion-koncentrációt a továbbiakban $[\text{Ca}^{2+}]$ -val jelöljük - megváltoztatják ezeknek a sejteknek a működésbeli válaszreakcióit. Egy ilyen differenciálódott sejt a mellékpajzsmirigy hormonját (PTH) kiválasztó mellékpajzsmirigysejt. A PTH a legfontosabb belső elválasztású faktor, amely a Ca^{2+} -homöosztázist a bélben és a sejten kívüli testnedvekben szabályozza.

A PTH a csontsejtekre és a vesesejtekre kifejtett hatásával megnöveli a vérkalcium-koncentrációt. A $[\text{Ca}^{2+}]$ -nak ez a növekedése azután negatív visszacsatoló jelként működve csökkenti a PTH-kiválasztást. A kalciumion-koncentráció és a PTH-kiválasztás közötti fordított függvénykapcsolat az alapja annak a fontos mechanizmusnak, amely fenntartja a testben a kalciumionok homöosztázisát.

Az extracelluláris kalciumionok a mellékpajzsmirigy-sejtekre közvetlenül hatva szabályozzák a PTH-kiválasztást. Bebizonyosodott, hogy létezik a mellékpajzsmirigy-sejtek felületén egy fehérje, amely észleli a $[\text{Ca}^{2+}]$ -ban bekövetkezett változásokat [Brown és munkatársai: Nature, **366**, 574. (1993)]. Ez a fehérje a mellékpajzsmirigysejtekben az extracelluláris kalciumionok receptoraként működve (ez a fehérje a "kalcium-receptor") "észleli" a $[\text{Ca}^{2+}]$ változásait és "kezdemenyezi" a sejt működésbeli válaszreakcióját, a PTH-kiválasztást.

Amint ez a Nemeth és munkatársai által elkészített szakirodalmi szemléből [Cell Calcium, **11**, 319 (1990)] kitűnik, az extracelluláris kalciumionok hatást gyakorolnak a különböző sejtfunkciókra. Nemeth egy másik cikkben [Cell Calcium, **11**,

323 (1990)] a parafollikuláris sejtekben (a C-sejtekben) és a mellékpajzsmirigysejtekben levő extracelluláris kalciumionok szerepét vizsgálja. Ezekről a sejtekről korábban már kimutatták, hogy hasonló kalciumion-receptorokkal rendelkeznek [Brown és munkatársai: *Nature*, **366**, 574 (1993); Mithal és munkatársai, 9. Suppl. 1 *J. Bone and Mineral Res.*, s282 (1994) és Garrett és munkatársai: 9. Suppl. 1 *J. Bone and Mineral Res.* s409 (1994)]. Zaidi cikkéből [*Bioscience Reports*, **10**, 493 (1990)] kitűnik, hogy milyen hatást gyakorolnak az extracelluláris kalciumionok a csontlebontó sejtekre. Ezenkívül a keratinociták, a juxtaglomeruláris sejtek, a trofoblasztok, a hasnyálmirigy béta-sejtjei, valamint a zsír/háj sejtek valamennyien reagálnak az extracelluláris kalciumkoncentráció növekedésére, ami valószínűleg azzal van összefüggésben, hogy az említett sejtek kalciumreceptorai aktiválódnak.

Számos szakirodalmi hely foglalkozik különböző vegyületeknek azzal a képességével, hogy *in vitro* körülmények között képesek szimulálni az extracelluláris kalciumionokat [Nemeth és munkatársai: "Calcium-Binding Proteins in Health and Disease" (A kalcium megkötésére alkalmas fehérjék szerepe az egészség megőrzésében és a betegségek kialakulásában), Academic Press, Inc., 1987, 33.-35. oldalak (spermin és spermidin); Brown és munkatársai: *Endocrinology*, **128**, 3647 (1991) (például neomicin); Chen és munkatársai: *J. Bone and Mineral Res.*, **5**, 581 (1990) (diltiazem és analogonja, TA-3090); Zaidi és munkatársai: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **167**, 807 (1990) (verapamil); Nemeth és munkatársai: PCT/US93/01642. sz. nemzetközi bejelentés (a nemzetközi közreboocsátási irat száma: WO 94/18959) és Nemeth és munkatársai: PCT/US92/07175. sz. nemzetközi bejelentés (a nemzetközi közreboocsátási irat száma: WO 93/04373)]. A felsorolt szakirodalmi helyeken olyan vegyületeket ismertetnek, amelyek ké-

pesek szabályozni egy szervetlen ionnak a szervetlenion-receptorral rendelkező sejtekre gyakorolt hatását.

A felsorolt szakirodalmi helyeket nem tekintjük a találmány leírását kiegészítő referenciának.

A találmány szervetlenion-receptorok egy vagy több aktivitását szabályozni képes vegyületekre, valamint olyan, betegségek vagy rendellenességek kezelésére alkalmas eljárásokra vonatkozik, amelyek a szervetlenion-receptorok aktivitásának a szabályozásán alapulnak. Előnyösen azok a vegyületek alkalmazhatók, amelyek szimulálni vagy blokkolni képesek az extracelluláris kalciumnak a sejtek felületén lévő kalciumreceptorokra gyakorolt hatását.

A szervetlenion-receptorok aktivitásának a szabályozásával kezelhető betegségekre, illetve rendellenességekre a következő típusú jellegzetességek legalább egyike jellemző: (1) rendellenes szervetlenion-homöosztázis, előnyös esetben kalcium-homöosztázis; (2) rendellenes mennyiségű extracelluláris vagy intracelluláris hírvivő, amelynek a termelődése szervetlenion-receptorok - előnyös esetben kalciumreceptorok - aktivitásával befolyásolható; (3) egy intracelluláris vagy extracelluláris hírvivő rendellenes - például jellegében vagy nagyságában eltérő - hatása, amely szervetlenion-receptorok - előnyös esetben kalciumreceptorok - aktivitásának köszönhetően javulhat; és (4) a szervetlenion-receptorok - előnyös esetben a kalciumreceptorok - aktivitásának a szabályozása pozitív hatást gyakorol, mint például olyan betegségek, illetve rendellenességek esetében, amelyeknél egy intracelluláris vagy extracelluláris hírvivőnek a receptor aktivitásának köszönhetően fokozott mértékű termelődése kompenzálja egy másik hírvivő rendellenes mennyiségét. Azokra az extracelluláris hírvivőkre, amelyeknek a kiválasztása és/vagy a hatása befolyásolható a szervetlenion-receptorok aktivitásának a szabályozásával, példaként megemlítjük a szervetlen ionokat, a hormonokat, a neurotranszmittereket, a növekedési

faktorokat és a kemokinokat. Az intracelluláris hírvivők közé tartozik a cAMP, a cGMP, az IP_3 és a diacil-glicerín.

A találmány szerinti vegyületek tehát előnyösen szabályozzák a kalciumreceptor aktivitását, és olyan betegségek vagy rendellenességek kezelésére alkalmazhatók, amelyek a kalciumreceptor egy vagy több aktivitásának a szabályozásával befolyásolhatók. A kalciumreceptor fehérjéi képessé tesznek bizonyos speciális sejteket arra, hogy reagáljanak az extracelluláris kalciumion-koncentráció változásaira. Így például az extracelluláris kalciumion gátolja a mellékpajzsmirigy-hormon kiválasztódását a mellékpajzsmirigysejtekből, akadályozza, hogy a csont a csontlebontó sejtek hatására felszívódjék és serkenti a C-sejtekből a kalcitonin kiválasztódását.

A találmány egyik előnyös megvalósítási módja szerint a találmány szerinti vegyületeket olyan betegség vagy rendellenesség kezelésére alkalmazzuk, amely betegségre vagy rendellenességre a csontnak és az ásványi anyagoknak a megszokottól eltérő homöosztázisa, előnyösebb esetben kalcium-homöosztázisa jellemző. A szigorú homöosztatikus ellenőrzés alatt lévő extracelluláris kalciumionok különböző folyamatokat szabályoznak, így a véralvadást, az idegek és az izmok ingerlési folyamatát, valamint a megfelelő csontképződést. A kalcium-homöosztázis rendellenességét a következő jelenségek közül legalább egy jelzi: (1) a vérszérum kalciumkoncentrációjának rendellenes növekedése vagy csökkenése; (2) a kalciumkoncentráció rendellenes növekedése vagy csökkenése a kiválasztott vizeletben; (3) a kalciumkoncentráció rendellenes növekedése vagy csökkenése a csontokban (ezt például a csontban lévő ásványianyagok sűrűségének a mérése alapján lehet megállapítani); (4) az elfogyasztott ételben levő kalcium rendellenes felszívódása; (5) a vérszérum kalciumszintjét befolyásoló hírvivők - például a mellékpajzsmirigy-hormon és a kalcitonin - termelődésének és/vagy felszabadulásának rendel-

lenes növekedése vagy csökkenése; és (6) a vérszérum kalciumszintjét befolyásoló hírvivők által kiváltott válaszreakciókban bekövetkező rendellenes változás. A kalcium-homöosztázisnak ezekben az eltérő megjelenési formáiban tapasztalható, a normálistól eltérő növekedés vagy csökkenés általában előfordul a lakosságnál, és rendszerint betegséggel vagy rendellenességekkel függ össze.

A normálistól eltérő kalcium-homöosztázisban megnyilvánuló betegségek és rendellenességek a sejtek különböző hiányosságainak, például a kalciumreceptorok hibás működésének, a kalciumreceptorok csökkent számának vagy hatását egy kalciumreceptor mellett kifejtő hibás intracelluláris fehérjének tulajdoníthatók. Így például a mellékpajzsmirigysejtekben a kalcium-receptor a G_i -fehérjéhez kapcsolódik, amely viszont gátolja a ciklusos AMP termelődését. A G_i -fehérjében előforduló hibák befolyásolhatják a G_i -fehérjének a ciklusos AMP termelődését gátló képességét.

A találmány először is olyan, szervetlenion-receptorokat szabályzó vegyületekre vonatkozik, amelyek (I) általános képletében

- Ar_1 jelentése egy szubsztituenssel - mégpedig perfluorometil-csoporttal vagy rövid szénláncú halogén-metoxi-csoporttal helyettesített fenilcsoport;
- Ar_2 jelentése egy szubsztituenssel - mégpedig metoxi-csoporttal helyettesített fenilcsoport vagy naftilcsoport;
- q jelentése 2; és
- R jelentése hidrogénatom vagy metilcsoport.

A találmány tárgyát képezik az (I) általános képletű vegyületek farmakológiai szempontból elfogadható sói, valamint komplexei is.

A találmány szerinti vegyületek kedvező sztereokémiájú vegyületek. Az (I) képletben a metilcsoport egy királis centrumhoz kapcsolódik, így α -(R)-metil-szerkezet jön létre. Az

(I) általános képletben az R szubsztituens szintén királis centrumhoz kapcsolódik, így - amennyiben R jelentése metilcsoport - (R)-metil-szerkezet alakul ki. Abban az esetben tehát, ha R jelentése metilcsoport, az (I) általános képletű vegyület sztereokémiai szempontból (R,R)-vegyület.

A szervetlenion-receptor aktivitásai olyan folyamatokban nyilvánulnak meg, amelyek szervetlenion-receptor aktiválásának az eredményeként mennek végbe. Ilyen folyamatok közé sorolható azoknak a molekuláknak a termelődése, amelyek intracelluláris vagy extracelluláris hírvivőként működhetnek.

A szervetlenion-receptorokat szabályozó vegyületek közé tartoznak az ionomimetikumok, az ionolitikumok, a kalcimimetikumok és a kalcilitikumok. Az ionomimetikumok olyan vegyületek, amelyek hozzákötődnek egy szervetlenion-receptorhoz és szimulálják (vagyis kiváltják vagy fokozzák) egy szervetlen ion hatásait a szervetlenion-receptoron. A vegyület előnyös esetben a kalciumionreceptor egy vagy több aktivitását befolyásolja. A kalcimimetikumok olyan ionomimetikumok, amelyek befolyásolják a kalciumreceptorok egy vagy több aktivitását és hozzákötődnek a kalciumreceptorokhoz.

Az ionolitikumok olyan vegyületek, amelyek hozzákötődnek egy szervetlenion-receptorhoz és blokkolják (vagyis gátolják, illetve csökkentik) a szervetlenion-receptoron egy szervetlen ion által kiváltott egy vagy több aktivitást. A vegyület előnyös esetben egy vagy több kalciumreceptor-aktivitást befolyásol. A kalcilitikumok olyan ionolitikumok, amelyek blokkolják a kalciumreceptor extracelluláris kalcium által kiváltott egy vagy több aktivitását és hozzákötődnek a kalciumreceptorhoz.

Az ionomimetikumok és az ionolitikumok megkötődhetnek a receptornak ugyanazon a helyén, ahol a természetes szervetlenion-ligandum megkötődik, de megkötődhetnek attól eltérő - például alloszterikus - helyen is. Így például a kalciumreceptorhoz kötődő NPS R-467 kalciumreceptor-aktivitást ered-

ményez, és így az NPS R-467-et a kalcimimetikumok csoportjába sorolják. Az NPS R-467 azonban az extracelluláris kalcium kötéshelyétől eltérő helyen - vagyis alloszterikus helyen - kötődik a kalciumreceptorhoz.

Egy vegyület hatásosságának a mértékét úgy lehet meghatározni, hogy az adott vegyületre kiszámítják az EC_{50} vagy az IC_{50} értéket. Az EC_{50} az a koncentráció, amelyben egy vegyületnek jelen kell lennie ahhoz, hogy a maximális szimuláló hatás felét kifejtse. Az IC_{50} az a koncentráció, amelyben egy vegyületnek jelen kell lennie ahhoz, hogy a maximális blokkoló hatás felét kifejtse. Kalciumreceptoron levő vegyületekre az EC_{50} és az IC_{50} értékeket úgy határozzák meg, hogy mérik a kalciumreceptoron levő extracelluláris kalcium egy vagy több aktivitását. Az EC_{50} és az IC_{50} értékek mérésére szolgáló mennyiségi elemzésre vonatkozó példák találhatók Nemeth és munkatársai szabadalmi bejelentéseiben [PCT/US93/01642. sz. nemzetközi bejelentés (nemzetközi közrebocsátási száma: WO 94/18959.) és PCT/US92/07175. sz. nemzetközi bejelentés (nemzetközi közrebocsátási száma WO 93/04373.)], valamint a leírás további részében. (Az előbb említett két nemzetközi bejelentést a találmány ismertetését kiegészítő referenciának tekintjük.) Ezekhez a mennyiségi elemzésekhez hozzátartozik az oocita-expresszió vizsgálata és egy intracelluláris kalciumion-koncentrációnál ($[Ca^{2+}]_i$) a kalciumreceptor aktivitásának köszönhetően tapasztalható növekedés mérése is. Ezeknek a vizsgálatoknak a keretében előnyös esetben egy kalciumreceptor aktivitásával kapcsolatos jellemző hormon felszabadulását vagy gátlását mérik.

Egy szervetlenion-receptort szabályzó vegyület előnyös esetben szelektíven "célozza meg" egy adott sejten a szervetlenion-receptor aktivitását. Egy kalciumreceptor-aktivitás például szelektíven "megcélozható" egy olyan vegyülettel, amely adott koncentrációban alkalmazva egy bizonyos típusú sejten nagyobb hatást gyakorol a kalciumreceptor-aktivi-

tásra, mint egy másik típusú sejtben. *In vivo* vagy *in vitro* körülmények között mérve a differenciális hatás legalább tízszeres. Még előnyösebb, ha a differenciális hatást *in vivo* körülmények között, a vegyület koncentrációját pedig a vérplazmában vagy az extracelluláris fluidumban mérik, és a mért hatás extracelluláris hirtívóktól - például vérplazmában lévő kalcitonintól, mellékpajzsmirigy-hormontól vagy vérplazmában levő kalciumtól - származik. Így például az egyik előnyös megoldás szerint olyan vegyületet alkalmaznak, amely a kalcitoninrelválasztás helyett a PTH-szekréción befolyásolja szelektíven.

A vegyület előnyös esetben olyan kalcímimetikum vagy kalcilitikum, amelynek a kalciumreceptoron az EC_{50} - vagy IC_{50} -értéke a későbbiekben ismertetésre kerülő mennyiségi elemzések egyikével meghatározva legfeljebb $5 \mu\text{M}$, még előnyösebb esetben pedig legfeljebb $1 \mu\text{M}$, például 100 nM , 10 nM vagy 1 nM . Még előnyösebb, ha az intracelluláris kalciumionokat a humán mellékpajzsmirigy kalciumreceptorát manifesztáló és fura-2-vel feltöltött nukleinsavval átalakított HEK 293-as sejtekben határozzuk meg mennyiségileg. A kisebb EC_{50} - és IC_{50} -értékek előnyösek, mert lehetővé teszik a vegyületek kisebb koncentrációban való alkalmazását *in vivo* vagy *in vitro* körülmények között. Kis EC_{50} -értékekkel vagy IC_{50} -értékekkel rendelkező vegyületek felfedezése lehetővé teszi további, hasonló vagy még jobb hatékonysággal és/vagy szelektivitással rendelkező vegyületek tervezését és szintetizálását.

A találmány tárgyát képezik továbbá - farmakológiai szempontból elfogadható sóikkal és komplexeikkel együtt - azok a szervetlenion-receptorok szabályozására alkalmas vegyületek, amelyek (II) általános képletében

- Ar₃ jelentése legfeljebb 5, egymástól függetlenül kiválasztott szubsztituenssel - mégpedig rövid szénláncú alkilcsoporttal, halogénatommal, rövid szénláncú alkoxycsoporttal, rövid szénláncú tio-alkil-csoporttal, metilén-dioxi-cso-

porttal, rövid szénláncú halogén-alkil-csoporttal, rövid szénláncú halogén-alkoxi-csoporttal, OH csoporttal, CH₂OH csoporttal, CONH₂ csoporttal, CN csoporttal, acetoxicsoporttal, benzilcsoporttal, benzil-oxi-csoporttal, α,α-dimetil-benzil-csoporttal, NO₂ csoporttal, CHO csoporttal, CH₃CH(OH) csoporttal, N(CH₃)₂ csoporttal, acetylcsoporttal és/vagy etilén-dioxi-csoporttal - adott esetben helyettesített naftil- vagy fenilcsoport;

- Ar₄ jelentése legfeljebb 5, egymástól függetlenül kiválasztott szubsztituenssel - mégpedig rövid szénláncú alkil-csoporttal, halogénatommal, rövid szénláncú alkoxicsoporttal, rövid szénláncú tio-alkil-csoporttal, metilén-dioxi-csoporttal, rövid szénláncú halogén-alkil-csoporttal, rövid szénláncú halogén-alkoxi-csoporttal, OH csoporttal, CH₂OH csoporttal, CONH₂ csoporttal, CN csoporttal és/vagy acetoxicsoporttal - adott esetben helyettesített naftil- vagy fenilcsoport;

- R₉ jelentése hidrogénatom vagy fenilcsoport;

- R₉ jelentése hidrogénatom vagy metilcsoport;

- R₁₀ jelentése hidrogénatom, metilcsoport vagy fenilcsoport, feltéve, hogy ha Ar₄ jelentése 3-metoxifenil-csoport, akkor Ar₃ jelentése olyan helyettesített fenilcsoport, amelyben a helyettesítő jelentése nem 2-metoxi-, 3-metil-, 2-metil-, 4-metil-, 2,4-dimetil-, 2,4,6-trimetil- vagy 4-izopropilcsoport; és ha Ar₄ jelentése helyettesítetlen fenilcsoport, akkor Ar₃ jelentése olyan helyettesített fenilcsoport, amelyben a helyettesítő jelentése nem 2-nitrofenil-, 4-nitrofenil- vagy 4-dimetil-aminofenil-csoport.

A találmány tárgyát képezik továbbá azok a gyógyszerkészítmények, amelyek találmány szerinti szervetlenion-receptor szabályzó vegyület mellett fiziológiailag elfogadható hordozóanyagot tartalmaznak. "Gyógyszerkészítmények"-nek említsük - mindenekelőtt emberek - szervezetébe való bejuttatásra alkalmas készereelési formájú kompozíciókat nevezünk. A farmakoló-

gial kompozíciók előnyös esetben megfelelő kiszerezési formában elegendő mennyiségű kalciumreceptor-szabályozó vegyületet tartalmaznak ahhoz, hogy az emberi szervezetben gyógyító hatást fejtsenek ki.

A szakemberek tisztában vannak azzal, hogy milyen szempontok figyelembevételével lehet előállítani a szervezetbe való bejuttatásra alkalmas kiszerezési formákat. Figyelembe kell venni például a mérgező hatásokat, az oldhatóságot, az adagolás módját és az aktivitás megőrizhetőségét. Így például a véráramba injektált farmakológiai kompozícióknak oldhatóknak kell lenniük.

A gyógyhatású vegyületek farmakológiai szempontból elfogadható sók (például savaddíciós sók) és komplexek alakjában is formálhatók. Ilyen sók előállításával meg lehet könnyíteni egy hatóanyag gyógyszerként való alkalmazását: a fizikai tulajdonságok megváltoztathatók a fiziológiai hatás befolyásolása nélkül.

A találmány tárgyát képezi továbbá egy olyan eljárás is, amely szerint a szervetlenion-receptor aktivitásának a szabályozásával lehet kezelni betegeket a találmány szerinti ionreceptor-szabályozó vegyületek alkalmazása által. Az eljárás keretében olyan gyógyszerkészítményt juttatunk be a beteg szervezetébe, amely a gyógyító hatáshoz elegendő mennyiségben tartalmaz szervetlenion-receptort szabályozó vegyületet. Az eljárás egyik előnyös megvalósítási módja szerint a betegséget vagy a rendellenességet a kalciumreceptor aktivitásának a szabályozásával kezeljük olyan módon, hogy a beteg szervezetébe a gyógyító hatáshoz megfelelő mennyiségben kalciumreceptor-szabályozó vegyületet juttatunk.

A betegek kezelésére szervetlenion-receptort szabályozó vegyületek, valamint ilyen vegyületeket tartalmazó készítmények használhatók fel. A "beteg" kifejezést olyan emlősök megjelölésére használjuk, amelyeknek az állapotát előnyösen lehet befolyásolni egy szervetlenion-receptor szabályozásá-

val. Azokat a betegeket, akiknek szükségük van a szervetlen-ion-receptorok szabályozásán alapuló gyógykezelésre, a gyógyító munkában jártas szakemberek számára ismert, szokásosan alkalmazott módszerekkel azonosítani lehet.

Előnyös esetben a beteg olyan ember, akinél olyan rendellenességet állapítottak meg, amelyre a következő szabálytalanságok legalább egyike jellemző: (1) szabálytalan szervetlen-ion-homöosztázis, előnyösebb esetben szabálytalan kalcium-homöosztázis; (2) a normálistól eltérő koncentrációban van jelen az a hírvivő, amelynek a termelődését vagy elválasztását befolyásolja a szervetlen-ion-receptor aktivitása, előnyösebb esetben a kalciumreceptor aktivitása; és (3) a normálistól eltérő koncentrációjú vagy aktivitású azon hírvivő, amelynek a működését befolyásolja a szervetlen-ion-receptor aktivitása, előnyösebb esetben a kalciumreceptor aktivitása.

A normálistól eltérő kalcium-homöosztázisban megnyilvánuló betegségek közé tartozik például a mellékpajzsmirigy-túlműködés, a csonttritkulás és más, csonttal és ásványianyagokkal összefüggő rendellenességek, amelyeket például a szokásos gyógyászati szövegekben - így például a "Harrison's Principles of Internal Medicine" (Harrison: A belgyógyászat alapelvei) - ismertetnek. Ezeket a betegségeket olyan, kalciumreceptor-szabályozó vegyületekkel kezelik, amelyek a kalciumreceptoron az extracelluláris kalciumion legalább egy hatását szimulálják vagy blokkolják, és ezáltal közvetlenül vagy közvetve befolyásolják a beteg szervezetében a fehérjék vagy más vegyületek koncentrációját.

"Gyógyászati szempontból hatásos mennyiség"-nek nevezzük egy vegyületnek azt a mennyiségét, amely bizonyos mértékben enyhíti a páciensnél diagnosztizált betegségnek vagy rendellenességnek egy vagy több körtünetét; részben vagy teljes mértékben visszaállít a normális szintre egy vagy több olyan fiziológiai vagy biokémiai paramétert, amely összefüggésben van a betegséggel vagy a rendellenességgel, illetve amelyek

a megváltozása kiváltotta a betegséget vagy a rendellenességet.

Előnyösen alkalmazható a találmány szerinti eljárás például olyan betegek esetében, akiknek a betegségére vagy a rendellenességére egy vagy több kalciumreceptor-szabályozó komponens normálistól eltérő koncentrációja utal, és a vegyület hatást fejt ki a következő sejtek valamelyikének kalciumreceptorán: mellékpajzsmirigysejt, csontlebontó sejt, juxtaglomeruláris vesesejt, a test középpontjához közel eső veseacsatornából származó sejt, a test középpontjától távol eső veseacsatornából származó sejt, a központi idegrendszerből származó sejt, a perifériás idegrendszerből származó sejt, a vesében lévő, úgynevezett Henle-kacs vastag felszálló ágából és/vagy gyűjtő vesevezetékéből származó sejt, a felhából származó szarusejt, a pajzsmirigyből származó parafollikuláris sejt (C-sejt), bélsejt, vérlemezke, vaszkuláris simaizomsejt, szívpitvarból származó sejt, gasztrint kiválasztó sejt, glükagont kiválasztó sejt, mezangiális vesesejt, emlősejt, béta-sejt, zsír/háj sejt, immunsejt, a gyomor- és béltraktusból származó sejt, bőrsejt, mellékvesesejt, agyfüggelék-mirigy-sejt, hipotalamuszsejt, és a szubfornikális szervből származó sejt.

Előnyösebb esetben a sejtek a következők lehetnek: mellékpajzsmirigysejtek, a központi idegrendszerből származó sejtek, a perifériás idegrendszerből származó sejtek, a vese Henle-kacsának a vastag felszálló ágából és/vagy a vese gyűjtővezetékéből származó sejtek, a pajzsmirigyből származó parafollikuláris sejtek (C-sejtek), bélből származó sejtek, a gyomor- és béltraktusból származó sejtek, az agyfüggelék-mirigyből származó sejtek, hipotalamuszsejtek és a szubfornikális szervből származó sejtek.

A találmány szerinti eljárás egyik előnyös megvalósítási módja szerint olyan vegyületet alkalmazunk, amely kalciummimetikus hatást gyakorol a mellékpajzsmirigysejt kalcium-

receptorára és csökkenti a mellékpajzsmirigy-hormon szintjét a beteg vérszérumában. Még előnyösebb esetben a mellékpajzsmirigy-hormon szintje olyan mértékben csökken, amely elegendő ahhoz, hogy kiváltsa a vérplazma kalciumion-koncentrációjának a csökkenését. A legelőnyösebb esetben a mellékpajzsmirigy-hormon szintje az egészséges embereket jellemző koncentrációértékre csökken.

Egy másik előnyös esetben a vegyület valamilyen kalcilitikum, amely hat a mellékpajzsmirigysejt kalciumreceptorára és megnöveli a beteg vérszérumában a mellékpajzsmirigy-hormon szintjét. Még előnyösebb esetben a mellékpajzsmirigy-hormon szintje olyan mértékben növekszik, amely elegendő ahhoz, hogy előidézzék a beteg csontjában az ásványi anyagok sűrűségének a növekedését.

Az ilyen kezelésre szoruló betegeket szokásos orvosi módszerekkel - így vérelemzéssel vagy vizeletelemzéssel - azonosíthatjuk, például olyan módon, hogy méréssel megállapítjuk annak a fehérjének a hiányát, amelynek a termelődését vagy szekrécióját befolyásolják a szervezetlénion-koncentrációkban bekövetkező változások, illetve az elemzési eredmények alapján megállapítjuk, hogy a szervezetlénion-homöosztázist befolyásoló szervezetlénionok vagy hormonok koncentrációi eltérnek a szokásos értékektől.

Különböző példákat közlünk valamennyi alkalmazási lehetőség ismertetésére. A közölt példák azonban semmilyen vonatkozásban nem korlátozzák a találmányt.

A találmány többi jellegzetessége és előnye nyilvánvalóan kitűnik a következő ábrákból, a találmány részletes ismertetéséből, a példákból, valamint az igénypontokból.

A rajzmellékletek rövid ismertetése

Az 1.a)-1.r) ábrákon különböző vegyületek kémiai szerkezetét szemléltetjük.

A 2.-131. ábrákon a leírásban szereplő jellegzetes vegyületek fizikai adatait közöljük.

A találmány előnyös megvalósítási formáinak ismertetése

A találmány szerinti vegyületek képesek szabályozni egy szervetlenion-receptor egy vagy több aktivitását. Ezek a vegyületek előnyös esetben szimulálni vagy blokkolni tudják egy extracelluláris ionnak egy szervetlenion-receptorral rendelkező sejtre gyakorolt hatását. Még előnyösebb esetben az extracelluláris ion kalciumion és a hatás egy kalciumreceptorral rendelkező sejtre gyakorolt hatás. A kalciumaktivitással, a kalciumreceptorral és/vagy a kalciumreceptor-szabályozó vegyületekkel foglalkozó szakirodalmi helyek közül megemlítjük a következőket: Brown és munkatársai: *Nature*, **366**, 574 (1993); Nemeth és munkatársai: PCT/US943/01642. sz. nemzetközi szabadalmi leírás (nemzetközi közzétételi száma: WO 943/18959); Nemeth és munkatársai: PCT/US92/07175. sz. nemzetközi szabadalmi leírás (nemzetközi közzétételi száma: WO 93/04373); Shoback és Chen: *J. Bone Mineral Res.*, **9**, 293 (1994), valamint Racke és munkatársai: *FEBS Lett.*, **333**, 132 (1993). A felsorolt szakirodalmi helyek szövegét nem tekintjük a találmány leírását kiegészítő referenciaanyagnak.

I. Kalciumreceptorok

A kalciumreceptorok eltérő típusú sejteken lehetnek jelen, és a különböző típusú sejteken eltérő lehet az aktivitásuk. A következő sejteknek a kalciumionokra reagálva kifejtett farmakológiai hatásai összefüggésben vannak a kalciumreceptor jelenlétével: mellékpajzsmirigysejt, csontlebontó sejt, juxtaglomeruláris vesesejt, a test középpontjához közel eső vese-satornából származó sejt, a test középpontjától távol eső vese-satornából származó sejt, a központi idegrendszerből származó sejt, a perifériás idegrendszerből származó sejt, a vesében lévő úgynevezett Henle-kacs vastag felszálló ágából és/vagy a vese gyűjtővezetékéből származó sejt, a felhamból származó szarusejt, a pajzsmirigyből származó parafollikuláris sejt (C-sejt), bélsejt, vérlemezke, vaszkuláris simaizomsejt, szívpitvarból származó sejt, gasztrint kivá-

lasztó sejt, glükagont kiválasztó sejt, mezangiális vesesejt, emlősejt, béta-sejt, zsír/háj sejt, immunsejt, a gyomor- és béltraktusból származó sejt, bőrsejt, mellékvesesejt, agyfüggelékmirigy-sejt, hipotalamuszsejt, és a szubfornikális szervből származó sejt.

Ezenkívül megemlítjük, hogy fizikai adatokkal már igazolták a kalciumreceptorok jelenlétét a következő sejteken: mellékpajzsmirigysejt, a központi idegrendszerből származó sejt, a perifériás idegrendszerből származó sejt, a vese Henle-kacsának a vastag felszálló ágából és/vagy a vese gyűjtővezetékéből származó sejt, a pajzsmirigyből származó parafollikuláris sejt (C-sejt), bélből származó sejt, a gyomor- és béltraktusból származó sejt, az agyfüggelékmirigyből származó sejt, hipotalamuszsejt és a szubfornikális szervből származó sejt.

Ezekben az eltérő típusú sejteken különböző kalciumreceptorok lehetnek jelen. Az is lehetséges, hogy egy sejten egynél több típusba sorolható kalciumreceptor van. A kalciumreceptor-aktivitások és az eltérő sejtekből származó aminosav-szekvenciák összehasonlítása alapján megállapítható, hogy különféle kalciumreceptor-típusok léteznek. A kalciumreceptorok például különböző kétértékű és háromértékű kationokra reagálhatnak. A mellékpajzsmirigysejt kalciumreceptora Ca^{2+} -ra és Gd^{3+} -ra egyaránt reagál, míg a csontlebontó sejtek kalciumreceptora a kétértékű ionokra - például a kalciumionra - reagál, de a Gd^{3+} -ra nem. A mellékpajzsmirigysejt kalciumreceptora tehát farmakológiai szempontból különbözik a csontlebontó sejt kalciumreceptorától.

Más részről azonban a mellékpajzsmirigysejtekben és a C-sejtekben jelenlevő, kalciumreceptorokat kódoló nukleinsav-szekvenciák azt mutatják, hogy ezek a receptorok nagyon hasonló aminosav-szerkezettel rendelkeznek. A kalcimimetikus vegyületek azonban farmakológiai szempontból különböznek, és a mellékpajzsmirigysejteken, valamint a C-sejteken eltérő ak-

tivításokat szabályoznak. A kalciumreceptorok farmakológiai tulajdonságai tehát jelentős mértékben függhetnek annak a sejtnek vagy szervnek a típusától, amelyben ezek a receptorok manifesztálódnak, így a kalciumreceptorok szerkezetei hasonlóak, sőt azonosak is lehetnek.

A kalciumreceptoroknak általában kicsi az affinitásuk az extracelluláris kalciumionokhoz (a látszólagos K_d rendszerint nagyobb mint körülbelül 0,5 mM). Cooper, Bloom és Roth meghatározása szerint ["The Biochemical Basis of Neuropharmacology" (A neurofarmakológia biokémiai alapjai), Ch., 4.] a kalciumreceptorok szabadeffektoros vagy kötötteffektoros mechanizmussal működhetnek, így tehát különböznek az intracelluláris kalciumreceptoroktól, például a kalmodulintól és a troponinektől.

A kalciumreceptorok reagálnak az extracelluláris kalciumszintek változásaira. Hogy pontosan milyen változások következnek be, az az adott receptortól és a receptort tartalmazó sejtvonaltól függ. Így például a kalciumnak a mellékpajzsmirigysejtben lévő kalciumreceptorra *in vitro* körülmények között gyakorolt hatása következtében:

1. növekszik a belső kalciumion-koncentráció. A növekedés a külső kalciumionok beáramlásának és/vagy a belső kalciumtartalom mobilizálásának tulajdonítható. A belső kalciumion-koncentráció növekedése a következőkben nyilvánul meg:

(a) gyorsan, a csúcserteket 5 másodpercen belül elérve átmenetileg nő a $[Ca^{2+}]_i$, a növekedés 1 μM La^{3+} -nal vagy 1 μM Gd^{3+} -nal nem gátolható meg, de ionomicines előkezeléssel - extracelluláris kalciumionok távollétében - megakadályozható;

(b) a növekedést dihidropiridinszármazékok nem gátolják;

(c) az átmeneti növekedés megszüntethető 10 mM nátrium-fluoriddal való 10 perces előkezeléssel;

(d) az átmeneti növekedés mérsékelhető a C-protein-

kináz (PKC) valamelyik aktivátorával - például forbol-mirisztát-acetáttal (PMA), mezereinnel vagy (-)-V-indolaktámmal - végzett előkezeléssel. A C-protein-kináz aktivátora végül is a kalciumkoncentráció/válaszreakció görbéjét jobbra tolja anélkül, hogy ez a változás a válaszreakció maximális értékét befolyásolná; és

(e) a 100 ng/ml pertusszisz-toxinnal legalább 4 órán át végzett előkezelés nem befolyásolja a növekedést;

2. gyorsan - 30 másodpercen belül - fokozódik az inozit-1,4,5-trifoszfát vagy a diacil-glicerín képződése. A 100 ng/ml koncentrációban alkalmazott pertusszisz-toxinnal több mint 4 órán át végzett előkezelés ezt a növekedést nem befolyásolja;

3. a ciklusos AMP dopaminnal és izoproterenollal stimulált képződése gátolt; ezt a hatást blokkolni lehet 100 ng/ml koncentrációban alkalmazott pertusszisz-toxinnal több mint 4 órán át végzett előkezeléssel; és

4. a PTH-kiválasztás gátolt; a PTH-kiválasztás gátlását a 100 ng/ml koncentrációban alkalmazott pertusszisz-toxinnal több mint 4 órán át végzett előkezelés nem befolyásolja.

A kalciumnak a különböző sejtekben levő más kalcium-receptorokra gyakorolt hatását a szakterületen ismert módszerekkel könnyen meg lehet határozni. Ezek a hatások hasonlóak lehetnek a belső kalciumion-koncentrációnak a mellékpajzsmirigysejtekben megfigyelt növekedéséhez. Más vonatkozásokban viszont a hatások várhatóan eltérnek, például abban a tekintetben, hogy kiváltják-e vagy akadályozzák egy, a mellékpajzsmirigytől eltérő hormon felszabadulását.

II. Szervetlenion-receptorokat szabályozó vegyületek

A szervetlenion-receptorokat szabályozó vegyületek egy a szervetlenion-receptorok egy vagy több aktivitását szabályozzák. Kalciumreceptor-szabályozó vegyületeként előnyösen alkalmazhatók a kalcimimetikumok és a kalcilítikumok. A szervetlenion-receptorokat szabályozó vegyületeket olyan vegyületek

szűrővizsgálata alapján lehet azonosítani, amelyeket egy jellegzetes aktivitást mutató vegyület - az úgynevezett vezérvegyület - szerkezetének az ismeretében "terveztek meg" és állítottak elő.

Az egyik előnyösen alkalmazható módszer szerint a $[Ca^{2+}]_i$ változásának mérése alapján lehet meghatározni a kalciumreceptor aktivitását. A $[Ca^{2+}]_i$ változását különböző módszerekkel lehet mérni. Így például a humán mellékpajzsmirigy kalciumreceptorát manifesztáló és fura-2-vel feltöltött nukleinsavval átalakított HEK 293-as sejtek alkalmazásával, valamint egy kalciumreceptor genetikai kódját tartalmazó nukleinsavval injektált *Xenopus oocyte*-ben a kloridion-áramlás fokozódásának a mérésével [Nemeth és munkatársai: PCT/US93/01642. sz. nemzetközi bejelentés (a nemzetközi közrebocsátási irat száma: WO 94/18959)]. Így például poli(A)⁺ mRNS-t lehet kinyerni olyan, kalciumreceptort manifesztáló sejtekből, mint a mellékpajzsmirigysejt, a csontlebontó sejt, a juxtaglomeruláris vesesejt, a test középpontjához közel eső veseacsatornából származó sejt, a test középpontjától távol eső veseacsatornából származó sejt, a vesében lévő úgynevezett Henle-kacs vastag felszálló ágából és/vagy gyűjtő vesevezetékéből származó sejt, a felhából származó szarusejt, a pajzsmirigyből származó parafollikuláris sejt (C-sejt), a bélsejt, a központi idegrendszerből származó sejt, a perifériás idegrendszerből származó sejt, a vérlemezke, a vaszkuláris simaizomsejt, a szívpitvarból származó sejt, a gasztrint kiválasztó sejt, a glükagont kiválasztó sejt, a mezangiális vesesejt, az emlősejt, a béta-sejt, a zsír/háj sejt, az immunsejt, a gyomor- és béltraktusból származó sejt. A nukleinsav előnyös esetben mellékpajzsmirigysejtből, C-sejtből vagy csontlebontó sejtből származik. Még előnyösebb, ha a nukleinsav kódol egy kalciumreceptort és jelen van egy plazmidban vagy egy vektorban.

A találmány előnyösen valósítható meg, ha a kalciumreceptor-szabályozó vegyület olyan kalcimimetikum, amely *in vivo*

körülmények között megakadályozza, hogy a csontlebontó sejtek hatására a csont felszívódjék, *in vitro* körülmények között megakadályozza, hogy csontlebontó sejtek hatására a csont felszívódjék, *in vitro* vagy *in vivo* körülmények között serkenti a kalcitonin kiválasztódását a C-sejtekből, *in vitro* körülmények között gátolja a mellékpajzsmirigy-hormon kiválasztódását a mellékpajzsmirigysejtekből és *in vivo* körülmények között mérsékli a PTH-kiválasztódást, *in vivo* körülmények között növeli a kalcitoninszinteket, illetve *in vitro* körülmények között blokkolja a csontlebontó sejtek hatására végbemenő csontfelszívódást és *in vivo* körülmények között gátolja a csontfelszívódást.

Egy másik előnyös megvalósítási mód szerint a kalciumreceptor-szabályozó vegyület olyan kalciolitikum, amely *in vitro* körülmények között kiváltja a mellékpajzsmirigy-hormon kiválasztódását a mellékpajzsmirigysejtekből és *in vivo* körülmények között fokozza a mellékpajzsmirigy-hormon koncentrációját.

Előnyös esetben a vegyület egy jellegzetes sejtben szelektíven befolyásolja a szervetlenion-receptor aktivitását, még előnyösebb esetben a kalciumreceptor aktivitását. A "szelektíven" szó azt jelenti, hogy a vegyület egy adott koncentrációban nagyobb hatást gyakorol egy bizonyos típusú sejtben levő szervetlenion-receptor aktivitására, mint egy másik típusú sejtben levő szervetlenion-receptorára. Előnyös esetben az egyik hatás legalább 10-szer akkora, mint a másik. A koncentráció előnyös esetben vérplazmabeli koncentrációt jelent, a mért hatás pedig extracelluláris hírvivők - például a vérplazmában levő kalcitonin, a mellékpajzsmirigy-hormon vagy a vérplazmában lévő kalcium - képződése. Az egyik előnyös megvalósítási módot például az jellemzi, hogy a vegyület a kalcitoninkiválasztással szemben szelektíven befolyásolja a PTH-kiválasztást.

Egy másik előnyös kiviteli mód szerint a vegyület EC_{50} -

értéke vagy IC_{50} -értéke a következő sejtek közül legalább egy-nél - de nem valamennyinél - legfeljebb $5 \mu M$: mellékpajzsmirigysejt, csontlebontó sejt, juxtaglomeruláris vesesejt, a test középpontjához közel eső veseacsatornából származó sejt, a test középpontjától távol eső veseacsatornából származó sejt, a központi idegrendszerből származó sejt, a perifériás idegrendszerből származó sejt, a vesében lévő úgynevezett Henle-kacs vastag felszálló ágából és/vagy gyűjtő vesevezetékéből származó sejt, a felhamból származó szarusejt, a pajzsmirigyből származó parafolikuláris sejt (C-sejt), bélsejt, vérlemezke, vaszkuláris simaizomsejt, szívpitvarból származó sejt, gasztrint kiválasztó sejt, glükagont kiválasztó sejt, mezangiális vesesejt, emlősejt, béta-sejt, zsír/háj sejt, immunsejt, a gyomor- és béltraktusból származó sejt, bőrsejt, mellékvesesejt, agyfűggelékmirigy-sejt, hipotalamuszsejt, és a szubfornikális szervből származó sejt. Még előnyösebb esetben a sejtek a következők közül kerülnek ki: mellékpajzsmirigysejt, központi idegrendszerből származó sejt, a perifériás idegrendszerből származó sejt, a vese Henle-kacsának vastag felszálló ágából és/vagy gyűjtő vesevezetékéből származó sejt, a pajzsmirigyből származó parafolikuláris sejt (C-sejt), bélből származó sejt, a gyomor- és béltraktusból származó sejt, az agyfűggelékmirigyből származó sejt, hipotalamuszsejt és a szubfornikális szervből származó sejt. Az ebbe a csoportba tartozó sejteknél a kalciumreceptor jelenlétét fizikai módszerekkel - például *in situ* hibridizálással és antitestes színezéssel - már igazolták.

A szervesetlenion-receptort szabályozó vegyületek előnyös esetben olyan módon szimulálják vagy blokkolják a szervesetlenion-receptorral rendelkező sejten az extracelluláris ion hatásait, hogy gyógyhatást fejtenek ki. A szervesetlenion-receptorokat szabályozó vegyületek a morfológiai szempontból különböző típusú szervesetlenion-receptorokkal rendelkező sejtekre - így például a szabályos szervesetlenion-receptorokkal ren-

delkező sejtekre, a szokásos számú szervetlenion-receptort tartalmazó sejtekre, a szabálytalan szervetlenion-receptorokkal rendelkező sejtekre és a szokásostól eltérő számú szervetlenion-receptort tartalmazó sejtekre - azonos vagy eltérő módon hathatnak.

A kalciumreceptor-szabályozó vegyületek a kalciumreceptorral rendelkező sejtben előnyös esetben az extracelluláris ion valamennyi hatását szimulálják vagy blokkolják. Ezzel kapcsolatban azonban megjegyezzük, hogy a kalcimimetikumoknak nem kell rendelkezniük az extracelluláris kalciumionok valamennyi biológiai aktivitásával. Ehhez hasonlóan a kalcilitikumokról is elmondhatjuk, hogy nem kell blokkolniuk az extracelluláris kalciumionok által létrehozott aktivitások mindegyikét. Ehhez még azt is hozzátehetjük, hogy a különböző kalcimimetikumok és különböző kalcilitikumok nemcsak akkor tudják kifejteni a hatásukat, ha a kalciumreceptornak ugyanahhoz a helyéhez kötődnek, mint az extracelluláris kalciumionok.

A szervetlenion-receptorokat szabályozó vegyületeknek nem szükséges ugyanolyan mértékben vagy ugyanolyan módon befolyásolniuk a szervetlenion-receptor aktivitását, mint a természetes ligandumnak. Egy kalcimimetikum például - azáltal, hogy más kötőhelyhez kapcsolódik vagy más affinitással rendelkezik, mint a kalciumreceptorra hatást gyakorló kalciumion - a kalciumionhoz képest eltérő mértékben és eltérő ideig befolyásolhatja a kalciumreceptor aktivitását.

A) Kalcimimetikumok

1. (I) általános képletű vegyületek

A kalciumreceptorok aktivitását szabályozni képes vegyületek (I) általános képletében

- Ar₁ jelentése egy szubsztituenssel - mégpedig metilcsoporttal vagy halogén-metoxi-csoporttal helyettesített fenilcsoport;
- Ar₂ jelentése egy szubsztituenssel - mégpedig metoxi-

csoporttal adott esetben helyettesített fenilcsoport vagy naftilcsoport;

- q jelentése 2; és
- R jelentése hidrogénatom vagy metilcsoport.

A kalciumreceptor aktivitását szabályozni képes vegyületek közé tartoznak az (I) általános képletű vegyületek farmakológiailag elfogadható sói, valamint komplexei is.

a) Ar₁ helyén és Ar₂ helyén egyaránt adott esetben szubsztituált fenilcsoportot tartalmazó (I) általános képletű vegyületek

Az előnyösen alkalmazható vegyületek egyik csoportját képezik az Ar₁ helyén és Ar₂ helyén egyaránt adott esetben helyettesített fenilcsoportot tartalmazó vegyületek. Ezeknek a vegyületeknek a köre az (Ia) általános képlettel adható meg, amelyben

- R jelentése hidrogénatom vagy metilcsoport;
- m és n jelentése - egymástól függetlenül - 0 vagy 1;
- az X szubsztituensek jelentése - egymástól függetlenül - CF₃- vagy CF₃O-csoport; és
- a Z szubsztituens jelentése metoxícsoport.

Még előnyösebbek azok a vegyületek, amelyekben a Z szubsztituense meta-helyzetben van. Még előnyösebben alkalmazhatók azok a vegyületek, amelyek (Ib) általános képletében

- R jelentése hidrogénatom vagy metilcsoport;
- és
- az X szubsztituensek jelentése - egymástól függetlenül - CF₃O- vagy CF₃-csoport.

c) Ar₂ helyén naftilcsoportot, q helyén pedig 2-t tartalmazó (I) általános képletű vegyületek

Az előnyösen alkalmazható vegyületek egy másik csoportját az Ar₁ helyén helyettesített fenilcsoportot, Ar₂ helyén naftilcsoportot, q helyén pedig 2-t tartalmazó (I) általános

képletű vegyületek alkotják. Ezeknek a vegyületeknek (I_g) általános képletében

- R jelentése hidrogénatom vagy metilcsoport;
- n jelentése 1; és
- az X szubsztituensek jelentése - egymástól függetlenül - CF₃O- vagy CF₃-csoport lehet.

2. (II) általános képletű vegyületek

A (II) általános képletben

- Ar₃ jelentése legfeljebb 5, egymástól függetlenül kiválasztott szubsztituenssel - mégpedig rövid szénláncú alkilcsoporttal, halogénatommal, rövid szénláncú alkoxicssoporttal, rövid szénláncú tio-alkil-csoporttal, metilén-dioxi-csoporttal, rövid szénláncú halogén-alkil-csoporttal, rövid szénláncú halogén-alkoxi-csoporttal, OH csoporttal, CH₂OH csoporttal, CONH₂ csoporttal, CN csoporttal, acetoxicssoporttal, benzilcsoporttal, benzil-oxi-csoporttal, α,α-dimetil-benzil-csoporttal, NO₂ csoporttal, CHO csoporttal, CH₂CH(OH) csoporttal, N(CH₃)₂ csoporttal, acetyl-csoporttal és/vagy etilén-dioxi-csoporttal, előnyös esetben dimetil-amino-csoporttal, rövidszénláncú alkoxicssoporttal vagy rövidszénláncú alkilcsoporttal - adott esetben helyettesített naftil- vagy fenilcsoport;

- Ar₄ jelentése legfeljebb 5, egymástól függetlenül kiválasztott szubsztituenssel - mégpedig rövid szénláncú alkilcsoporttal, halogénatommal, rövid szénláncú alkoxicssoporttal, rövid szénláncú tio-alkil-csoporttal, metilén-dioxi-csoporttal, rövid szénláncú halogén-alkil-csoporttal, rövid szénláncú halogén-alkoxi-csoporttal, OH csoporttal, CH₂OH csoporttal, CONH₂ csoporttal, CN csoporttal és/vagy acetoxicssoporttal, előnyös esetben rövidszénláncú alkoxicssoporttal, még előnyösebb esetben metoxicssoporttal - adott esetben helyettesített naftil- vagy fenilcsoport;

- R₆ jelentése hidrogénatom vagy fenilcsoport, előnyös esetben hidrogénatom;

- R₃ jelentése hidrogénatom vagy metilcsoport; és
- R₁₀ jelentése hidrogénatom, metilcsoport vagy fenilcsoport; feltéve hogy ha Ar₄ jelentése 3-metoxifenil-csoport, akkor Ar₃ jelentése olyan helyettesített fenilcsoport, amelyben a helyettesítő jelentése nem 2-metoxi-, 3-metil-, 2-metil-, 4-metil-, 2,4-dimetil-, 2,4,6-trimetil- vagy 4-izopropilcsoport; és ha Ar₄ jelentése helyettesítetlen fenilcsoport, akkor Ar₃ jelentése olyan helyettesített fenilcsoport, amelyben a helyettesítő jelentése nem 2-nitrofenil-, 4-nitrofenil- vagy 4-dimetil-aminofenil-csoport, még előnyösebb, ha R₁₀ metilcsoport és a hozzá kapcsolódó királis szénatom az (R)-sztereocizomer.

A (II) általános képletű vegyületekben az α -metil-csoport előnyös esetben (R)- α -metil-csoport.

4. Kalcimimetikus aktivitás

A vegyületeknek azt a képességét, hogy szimulálni tudják a kalciumionoknak a kalciumreceptorokon mutatott aktivitását, a szakmában ismert és Nemeth, valamint munkatársai által leírt módszerrel [Nemeth és munkatársai: PCT/US93/01642. sz. nemzetközi bejelentés (a nemzetközi közrebocsátási irat száma: WO 94/18959)] lehet meghatározni. Így például *in vitro* körülmények között mellékpajzsmirigysejteken vizsgálva a kalcimimetikumok a következő aktivitások közül eggyel vagy többel - előnyös esetben valamennyivel - rendelkeznek:

1. Gyorsan, a csúcserőérték 5 másodpercen belül elérve átmenetileg növelik az intracelluláris kalciumkoncentrációt, és a növekedés 1 μM La³⁺-nal vagy 1 μM Gd³⁺-nal nem gátolható meg. A [Ca²⁺]_i növekedése intracelluláris kalciumionok távollétében folytatódik, de ionomicines előkezeléssel - extracelluláris kalciumionok távollétében - kiküszöbölhető.

2. Fokozzák a [Ca²⁺]_i-nek a maximális koncentrációknak megfelelő mennyiségeknél kisebb mennyiségben jelenlévő extracelluláris kalciumionok által kiváltott növekedését.

3. A dihidropiridinszármazékok nem gátolják a $[Ca^{2+}]_i$ -nek az extracelluláris kalciumionok által kiváltott növekedését.

4. A $[Ca^{2+}]_i$ általuk kiváltott átmeneti növekedése 10 nM nátrium-fluoriddal 10 percig végzett előkezeléssel kiküszöbölhető.

5. A $[Ca^{2+}]_i$ általuk kiváltott átmeneti növekedése mérsékelhető a C-protein-kináz (PKC) valamelyik aktivátorával - például forbol-mirisztát-acetáttal (PMA), mezereinnel vagy (-)-V-indolaktámmal - végzett előkezeléssel; a C-protein-kináz aktivátora végül is a koncentráció/válaszreakció görbéjét jobbra tolja anélkül, hogy ez a változás a válaszreakció maximális értékét befolyásolná.

6. Gyorsan - 30 másodpercen belül - fokozzák az inozit-1,4,5-trifoszfát vagy a diacil-glicerin képződését.

7. Gátolják a ciklusos AMP dopaminnal és izoproterenollal stimulált képződését.

8. Gátolják a PTH-szekréciót.

9. A ciklusos AMP-képződésre gyakorolt gátlóhatásukat a 100 mg/ml pertusszisz-toxinnal legalább 4 órán át végzett előkezelés blokkolja, de a $[Ca^{2+}]_i$, az inozit-1,4,5-trifoszfát vagy a diacil-glicerin koncentráció-növekedése, illetve a PTH-szekréció csökkenése nem befolyásolja.

10. Szarvasmarha vagy ember mellékpajzsmirigysejtjeiből származó, poli(A)⁺-szal dúsitott mRNS-sel injektált Xenopus oocytes-ben kiváltják a kloridion-áramlás fokozódását, de a vízzel vagy májból származó mRNS-sel injektált Xenopus oocytes-ben hatástalanok.

11. Mellékpajzsmirigyből származó, klónozott kalciumreceptor alkalmazása esetén hasonló módon váltanak ki válaszreakciót a receptor génállományát tartalmazó, speciális cDNS-sel vagy mRNS-sel injektált Xenopus oocytes-ből.

A különböző kalciumaktivitások mérhetők a rendelkezésre álló módszerekkel [v.ö. Nemeth és munkatársai: PCT/US93/01642 sz. nemzetközi bejelentés (a nemzetközi közrebecsátási irat

száma: WO 94/18959)]. A leírás példái, valamint Nemeth és munkatársai [Nemeth és munkatársai: PCT/US93/01642 sz. nemzetközi bejelentés (a nemzetközi közreboocsátási irat száma: WO 94/18959)] kutatásai alapján nyilvánvaló, hogy hasonló módon definiálhatók a kalciumionok aktivitását más, kalciumra reagáló sejteken szimuláló vegyületek.

A vegyület a leírásban ismerttetett biológiai vizsgálatok vagy a Nemeth és munkatársai által leírt mérések [Nemeth és munkatársai: PCT/US93/01642 sz. nemzetközi bejelentés, (a nemzetközi közreboocsátási irat száma: WO 94/18959)] szerint meghatározva a következő aktivitások közül előnyös esetben legalább eggyel, még előnyösebb esetben valamennyi felsorolt aktivitással rendelkezik: kiváltja - előnyös esetben a belső kalciumtartalom mobilizálásával - a belső kalciumkoncentráció átmeneti - 30 másodpercnél rövidebb ideig tartó - növekedését; kiváltja a $[Ca^{2+}]_i$ gyors - 30 másodpercnél rövidebb ideig tartó - növekedését; kiváltja - célszerűen a belső kalciumtartalom beáramlásának előidézésével - a $[Ca^{2+}]_i$ tartós (30 másodpercet meghaladó ideig tartó) növekedését; kiváltja - célszerűen 60 másodpercen belül - az inozit-1,4,5-trifoszfát vagy a diacil-glicerol koncentrációjának a növekedését; és gátolja a dopaminnal vagy az izoproterenollal serkentett ciklusos AMP-képződést.

A $[Ca^{2+}]_i$ átmeneti növekedését előnyös esetben a sejt 10 percen át tartó, 10 mM nátrium-fluoriddal végzett előkezelésével megszüntetjük vagy csökkentjük olyan módon, hogy a sejtet rövid - 10 percet meg nem haladó - ideig a C-protein-kináz enzim valamelyik aktivátorával - előnyösen forbol-mirisztát-acetáttal (PMA), mezereinnel vagy (-)-V-indolektámmal - előkezeljük.

C) Kalcilitikumok

Egy vegyületnek azt a képességét, amellyel blokkolni tudja egy kalciumreceptoron az extracelluláris kalcium aktivitá-

sát, ennek a leírásnak az alapján szokásos módszerekkel meg lehet határozni. [Ezzel kapcsolatban felhívjuk még a figyelmet Nemeth és munkatársai PCT/US93/01642 sz. nemzetközi bejelentésére (a nemzetközi közreboocsátási irat száma: WO 94/18959)]. Így például azok a vegyületek, amelyek mellékpajzsmirigysejtek esetében blokkolják az extracelluláris kalcium hatását, mellékpajzsmirigysejteken *in vitro* körülmények között vizsgálva a következő jellemzők közül legalább eggyel, előnyös esetben valamennyi felsorolt jellemzővel rendelkeznek:

1. Részlegesen vagy teljesen blokkolják a megnövekedett koncentrációban jelen levő extracelluláris kalciumionoknak azt a képességét, hogy:

- (a) növelik a $[Ca^{2+}]_i$ -t;
- (b) mobilizálják az intracelluláris kalciumionokat;
- (c) fokozzák az inozit-1,4,5-trifoszfát-képződést;
- (d) csökkentik a ciklusos AMP-nek a dopaminnal vagy izoproterenollal serkentett képződését; és
- (e) gátolják a PTH kiválasztódását.

2. Szarvasmarha vagy ember mellékpajzsmirigysejtjeiből extracelluláris kalciumionokkal vagy kalcimimetikus vegyületekkel kiváltott poli(A)⁺-mRNS-sel injektált *Xenopus* oocytés-ben akadályozzák, vízzel vagy máj-mRNS-sel injektált *Xenopus* oocytés-ben azonban nem gátolják a kloridionáram növekedését.

3. Mellékpajzsmirigyből származó kalciumreceptor alkalmazása esetén hasonló módon blokkolják az extracelluláris kalciumionokkal vagy kalcimimetikus vegyülettel kiváltott válaszreakciót olyan *Xenopus* oocytés-ben, amelybe a kalciumreceptor génállományát tartalmazó speciális cDNS-t, mRNS-t vagy cRNS-t fecskendeztünk be.

A leírás példái, valamint Nemeth és munkatársai [PCT/US93/01642. sz. nemzetközi bejelentés (a nemzetközi közreboocsátási irat száma: WO 94/18959)] alapján nyilvánvaló, hogy a kalciumionokra válaszreakciót adó sejteken a kalcium-

ionok aktivitását blokkoló vegyületeket hasonló módon lehet definiálni.

III. BETEGSÉGEK VAGY RENDELLENESÉGEK KEZELÉSE

A szakemberek ismerik azokat a betegségeket és rendellenességeket, amelyeket a kalciumreceptor aktivitásának a szabályozásával kezelni lehet. A kalciumreceptor aktivitásának a szabályozásával kezelhető betegségeket például a kalciumreceptorok aktivitásával szabályozott sejtek funkcionális válaszreakcióinak az alapján lehet azonosítani. A kalciumreceptor által szabályozott sejtek funkcionális válaszreakciói - beleértve a mellékpajzsmirigysejtek általi PTH-kiválasztást, a C-sejtek általi kalcitoninkiválasztást és a csontlebontható sejtek által előidézett csontfelszívódást - a szakemberek ismerik.

Az ilyen funkcionális válaszreakciók különböző betegségekkel vagy rendellenességekkel kapcsolatosak. Így például a mellékpajzsmirigy-túlműködés eredményeként megnő a vérplazmában a PTH koncentrációja. A vérplazmabeli PTH-szintek csökkentése lehetőséget nyújt a mellékpajzsmirigy-túlműködés hatásos kezeléséhez. Hasonló módon, a kalcitonin-koncentráció vérplazmabeli növekedése a csontfelszívódás gátlásával van összefüggésben. A csontfelszívódás gátlásával hatásosan kezelhető a csonttritkulás. A kalciumreceptor aktivitásának a szabályozásával tehát kezelni lehet olyan betegségeket, mint amilyen a mellékpajzsmirigy túlzott működése és a csonttritkulás.

A szervetlenion-receptorok - előnyös esetben a kalciumreceptor - aktivitásának a szabályozásával kedvező módon lehet befolyásolni igen különböző betegségekben vagy rendellenességektől szenvedő betegek állapotát. A csonttritkulás például az öregedéssel összefüggő rendellenesség, amelyre az jellemző, hogy csökken a csonttömeg és nő a csonttörések kockázata. A csontromboló csontfelszívódás megakadályozása céljából a vegyületeket - például csontlebontható ionomimetikus ve-

gyület esetén - közvetlenül vagy - például C-sejtes kalcimimetikum esetén - közvetetten, az endogén kalcitoninszintek növelésével lehet alkalmazni. A mellékpajzsmirigysejtek kalciumreceptorával szemben aktív kalcilitikumok is növelik a keringő mellékpajzsmirigy-hormon koncentrációját és serkentik a csontképződést. Mind a három módszer alkalmazása jótékonyan hat a csontritkulásban szenvedő betegekre.

Ezenkívül az is ismert, hogy a PTH időszakonkénti adagolása anabolikus hatással van a csonttömegre és a csont megfelelő újjászerveződésére. Így a mellékpajzsmirigy-hormon termelődését átmenetileg fokozó vegyületekkel és étrenddel - például valamilyen mellékpajzsmirigysejt-ionolitikum időszakos adagolásával - növelhető a csontritkulásban szenvedő betegek csonttömege.

További betegségeket és rendellenességeket lehet azonosítani a sejtek kalciumreceptor-aktivitással szabályozott és a betegséggel vagy a rendellenességgel összefüggő további funkcionális válaszreakcióinak a felismerése alapján. A más szervetlenion-receptorok szabályozásával kezelhető betegségeket vagy rendellenességeket hasonló módon lehet meghatározni.

A találmány szerinti, szervetlenion-receptorokat szabályozó vegyületek képesek egy vagy több celluláris hatást és ezzel végül is gyógyhatást kiváltó módon befolyásolni egy szervetlenion-receptort. A találmány szerinti kalciumreceptor-szabályozó vegyületek olyan módon képesek hatást gyakorolni a kalciumreceptorokra, hogy a sejtek szintjén egy vagy több, végül is gyógyhatást eredményező aktivitást váltanak ki. A különböző betegségeket a találmány szerint a kalciumreceptorral rendelkező sejtek "célbavételével" lehet kezelni.

Így például az elsődleges mellékpajzsmirigy-túlműködést (HPT) az emelkedett vérkalciumtűkőr és a keringő PTH-nak a normálistól eltérő mértékben megnövekedett koncentrációja jellemzi. A HPT egyik fő típusára jellemző hiányosság abban

nyilvánul meg, hogy csökken a mellékpajzsmirigysejteknek az extracelluláris kalciumionok által végzett negatív visszacsatolási szabályozásra való érzékenysége. Az elsődleges mellékpajzsmirigy-túlműködésben szenvedő betegekből származó szövetben tehát az extracelluláris Ca^{2+} "névleges értéke" jobbra tolódik, és így a szokásosnál magasabb extracelluláris kalciumkoncentrációk szükségesek a PTH-kiválasztás csökkentéséhez. Sőt, elsődleges mellékpajzsmirigy-túlműködés esetén az extracelluláris kalciumionok még nagy koncentrációkban alkalmazva is gyakran csak részben csökkentik a PTH kiválasztását. Másodlagos (urémiás) mellékpajzsmirigy-túlműködés esetén az extracelluláris kalciumionokra vonatkozóan a névleges érték hasonló növekedése figyelhető meg annak ellenére, hogy a kalciumionoknak a mellékpajzsmirigy-hormon kiválasztásának a megszüntetéséhez csak szokásos koncentrációban kell jelen lenniük. A PTH-kiválasztás változásai hasonlóak a $[Ca^{2+}]_i$ változásaihoz: a $[Ca^{2+}]_i$ -nek az extracelluláris kalciumionok által indukált növekedéseihez tartozó névleges értékek jobbra tolódnak, és ezeknek a növekedéseknek a nagysága csökken.

A betegek a másodlagos mellékpajzsmirigy-túlműködés mellett veseműködésre visszavezethető csontképződési zavaroktól is szenvedhetnek. Úgy tűnik, hogy ilyen betegeknél a kalcimimetikumok eredményesen használhatók fel mind a szabályostól eltérő PTH-kiválasztás, mind a csontképződési zavarok kezelésére.

Az extracelluláris kalciumionok hatását szimuláló vegyületek eredményesen használhatók fel mind az elsődleges, mind a másodlagos mellékpajzsmirigy-túlműködés hosszútávú kezelésére. Ezek a vegyületek szolgáltatják azt a pluszhatást, amely szükséges a mellékpajzsmirigy-hormon-kiválasztás elfojtásához (ez önmagában a vérkalciumtűköz emelésével nem érhető el), és ezáltal ezek a vegyületek segítik a hiperkalcémiás állapot enyhítését. Az extracelluláris kalciumionoknál nagyobb hatékonyságú vegyületek elfojthatják a PTH-kiválasztó-

dás látszólag kiküszöbölhetetlen komponensét is, amely különösen a mellékpajzsmirigy daganata által okozott elsődleges mellékpajzsmirigy-túlműködésnél - HPT megjelenési formájánál - kellemetlen. Ezeket vagylagosan vagy kiegészítésként alkalmazva csökkenteni lehet a szintézis útján létrejött PTH mennyiségét. Kimutatták, hogy tartósan magas vérkalciumtűkór esetén csökken a marha és az ember daganatos mellékpajzsmirigy-szövetében a preproPTH mRNS szintje. A hosszú ideig fenntartott magas vérkalciumtűkór in vitro körülmények között csökkenti a mellékpajzsmirigysejtek burjánzását is, így a kalcimimetikumok hatásosan korlátozhatják a mellékpajzsmirigysejteknek a másodlagos HPT-re jellemző túlzott mértékű szövetszaporodását is.

A mellékpajzsmirigysejtektől eltérő sejtek közvetlenül reagálhatnak az extracelluláris kalciumionok koncentrációjában végbemenő fiziológiai változásokra. Például a kalci-tonin kiválasztását a mellékpajzsmirigy parafollikuláris sejtjeiből (a C-sejtekből) az extracelluláris kalciumionok koncentrációjának a változásai szabályozzák.

Az izolált csontlebontó sejtek az extracelluláris kalciumionok koncentrációjának a növekedésére úgy reagálnak, hogy - részben az intracelluláris kalciumionok mobilizálásával - megfelelő mértékben növelik a $[Ca^{2+}]_i$ -t. A csontlebontó sejtekben a $[Ca^{2+}]_i$ növekedése összefüggésben van a csontfelszívódás gátlásával. A kalcium közvetlenül serkenti a lúgos foszfatáz enzim felszabadulását a csontképző sejtekből.

Az extracelluláris kalciumionok koncentrációjának a növekedésével csökken - a kiválasztott PTH mennyiségéhez hasonlóan - a vesében lévő juxtaglomeruláris sejtekből kiválasztott renin enzim mennyisége is. Az extracelluláris kalciumionok ezekben a sejtekben előidézik az intracelluláris kalciumionok mobilizálódását. A kalciumra más vesesejtek a következőképpen reagálnak: a kalciumionok megnövekedett koncentrációja gátolja a test középpontjához közelebb eső vese-csatorna sejtjeit

az 1,25(OH)₂-D-vitamin képzésében, serkenti a kalciummegkötő fehérje termelődését a test középpontjától távolabb eső vese-csatorna sejtjeiben, gátolja a kalciumionok és a magnéziumok ismételt felszívódását a vesevezetékekben, valamint a vazopresszin hatását a Henle-kacs vastag felszálló ágára (MTAL), csökkenti a vazopresszin hatását a kéreg gyűjtőcsatornájának a sejtjeiben és befolyásolja a vaszkuláris simaizomsejtek működését a vese glomeruluszában levő véredényekben.

A kalcium ezenkívül elősegíti a bél nyálkasejtjeinek, az emlősejteknek, valamint a bőrsejteknek a differenciálódását, megakadályozza a pitvari nátriuretikus peptid kiválasztódását a szívpitvarból, csökkenti a vérlemezkékben a cAMP felhalmozódását, megváltoztatja a gasztrin- és a glukagonelválasztást, arra készíti a vaszkuláris simaizomsejteket, hogy módosítsák az erekre hatást gyakorló faktorok sejtbeli kiválasztódását és befolyásolják a központi idegrendszer, valamint a perifériális idegrendszer sejtjeit.

Elég sok minden utal tehát arra, hogy a kalciumionok - azon kívül, hogy a sejteken belül mindenhol jelzőszerepet játszanak - extracelluláris jelként is működve szabályozzák bizonyos speciális sejtek válaszreakcióit. A találmány szerinti vegyületeket fel lehet használni olyan betegségek és rendellenességek kezelésére, amelyek azzal függnek össze, hogy ezekben a sejtekben megszűntek a válaszreakciók.

Az érintett sejtekre alapozva kezelhető vagy megelőzhető jellegzetes betegségek és rendellenességek közé tartoznak a következők: a központi idegrendszer betegségei és rendellenességei - például a rohamok, az agyvérzés, a fejsérülések, a gerincvelő sérülései és az oxigénhiány - például a szív működés megszűnése vagy a szülési bonyodalmak miatt fellépő oxigénhiány - következtében fellépő idegsejtkárosodások, epilepszia, az idegrendszer elfajulásos betegségei - például az Alzheimer-kór, a Huntington-kór és a Parkinson-kór -, elmebaj, izomfeszülés, depresszió, szorongás, pánikbetegség, rög-

eszmés és kényszerképzetes rendellenességek, baleset által okozott stressz miatt kialakuló rendellenességek, tudathasadás, rosszindulatú neuroleptikus tünetegyüttes, Tourette-tünetegyüttes, a vese által újra abszorbeált, fokozott mennyiségű víz miatt kialakuló betegségek - így például a nem-megfelelő ADH-kiválasztást (SIADH) kísérő tünetegyüttes, a cirrhózis, a pangásos szívkárosodás és a nefrózis -, magas vérnyomás, kationos antibiotikumok - például aminoglükozid antibiotikumok - alkalmazása után fellépő mérgezettségi állapot, a belek mozgékonyásával kapcsolatos rendellenességek - például a hasmenés és a vastagbélgörcs -, a gyomor- és béltraktus fekélyes betegségei, a gyomor- és béltraktusnak a túlzott mértékű kalciumfelszívódás miatt kialakuló betegségei - például a szarkoidózis -, autoimmun betegségek és a beültetett szerv kilökődésével fenyegető állapotok.

Bár a találmány szerinti kalciumreceptor-szabályozó vegyületek tipikus felhasználási területe az embergyógyászat, az említett vegyületek más melegvérű állatfajták - például egyéb főemlősök, háziállatok, így például disznók, szarvasmarhák és háziszárnyasok, továbbá sportoláshoz igénybe vett állatok és állatkedvencek, például lovak, kutyák és macskák - hasonló vagy azonos betegségeinek a kezelésére is felhasználhatók.

IV. Alkalmazás

A találmány szerinti különböző vegyületeket - annak a tulajdonságuknak köszönhetően, hogy szabályozzák a szervetlen-ion-receptorok, előnyös esetben a kalciumreceptorok aktivitását - fel lehet használni különféle betegségek és rendellenességek kezelésére. A találmány szerinti vegyületeket a különböző adagolási módoknak - például a szisztémás, a nem általános vagy a helyi adagolási módoknak - megfelelően lehet formálni. A formálási eljárások és a kiszerezési formák általános ismertetése megtalálható a szakirodalomban [Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA,

USA]. Az ionomimetikumok és az ionolitikumok alkalmazását Nemeth és munkatársai [PCT/US93/01642 sz. nemzetközi bejelentés (a nemzetközi közrebocsátási irat száma: WO 94/18959)] tárgyalják.

Hogy milyen adagolási formák megfelelőek, az részben az alkalmazás vagy a szervezetbe juttatás módjától függ, tehát például attól, hogy a készítményt szájon keresztül, bőrön keresztül vagy injektálással juttatjuk be a szervezetbe. Ezeknek az adagolási formáknak lehetővé kell tenniük, hogy a vegyület elérje a célsejtet, függetlenül attól, hogy a célsejt multicelluláris bacilusgazda vagy tenyészet formájában van-e jelen. Így például a véráramba fecskendezett, farmakológiai szempontból aktív vegyületeknek vagy kompozícióknak oldhatónak kell lenniük. Más, a szakterületen ismert szempontokat is figyelembe kell venni, így például a toxicitást és olyan adagolási formák alkalmazhatóságát, amelyek késleltetik a vegyület vagy a kompozíció hatásának a kifejtését.

A vegyületeket farmakológiai szempontból elfogadható sóik - például savaddíciós sóik - és komplezeik alakjában is lehet formálni. Farmakológiai szempontból elfogadható sóknak azokat a sókat nevezzük, amelyek az alkalmazott koncentrációban nem mérgezőek. Ilyen sók előállítására megkönnyítheti a hatóanyag gyógyászati célú alkalmazását, mert a sóképzés anélkül változtatja meg a hatóanyag fizikai jellemzőit, hogy gátolná a fiziológiai hatások kifejtését. A fizikai tulajdonságok előnyös változásai közé tartozik az olvadáspont csökkentése (könnyebbé válik a gyógyszer alkalmazása a nyálkahártyán keresztül) és az oldhatóság növekedése (könnyebb nagy koncentrációkban alkalmazni a gyógyszert).

A farmakológiai szempontból elfogadható sók közé tartoznak a savaddíciós sók, például a szulfátok, a hidrokloridok, a maleátok, a foszfátok, a szulfamátok, az acetátok, a citrátok, a laktátok, a tartarátok, a metánszulfonátok, az etánszulfonátok, a benzolszulfonátok, a p-toluolszulfonátok,

a ciklohexil-szulfamátok és a kininsav sói [lásd például a PCT/US92/03736. sz. nemzetközi bejelentést, amelynek a szövegét a találmány ismertetését kiegészítő referenciaanyagnak tekintjük]. A farmakológiai szempontból sókat savakból, például sósavból, maleinsavból, kénsavból, foszforsavból, szulfamid-savból, ecetsavból, citromsavból, tejsavból, borkősavból, malonsavból, metánszulfonsavból, etánszulfonsavból, benzolszulfonsavból, p-toluolszulfonsavból, ciklohexil-szulfaminsavból és kininsavból lehet előállítani.

A farmakológiai szempontból elfogadható sók előállíthatók a szokásos eljárásokkal. A vegyületet szabad bázis formájában például feloldjuk valamilyen oldószerben - például a megfelelő savat tartalmazó vagy vizes-alkoholos oldatban -, majd a sót az oldat bepárlásával elkülönítjük. Egy másik megoldás szerint úgy állítjuk elő a sót, hogy a szabad bázist szerves oldószerben savval reagáltatjuk.

Fel lehet használni hordozóanyagokat vagy kötőanyagokat is a hatóanyag alkalmazásának a megkönnyítése céljából. A hordozóanyagokra és a kötőanyagokra példaként megemlítjük a kalcium-karbonátot, a kalcium-foszfátot, a különböző cukrokat - így a laktózt, a glükózt és a szacharózt -, a különböző típusú keményítőket, a cellulózszármazékokat, a zselatint, a növényolajokat, a polietilén-glikolokat és a fiziológiai szempontból kompatibilis oldószereket. A hatóanyagokat és a gyógyszerkészítményeket különböző módokon, például vénába fecskendezve, a hasüregbe fecskendezve, bőrön át fecskendezve, izomba fecskendezve, szájon keresztül, helyileg és nyálkahártyán keresztül - lehet alkalmazni.

A szisztémás alkalmazások közül az orális alkalmazás előnyös. Alternatív megoldásként injekciót is lehet adni, például izomba, vénába, a hasüregbe és bőr alá. Az injektáláshoz a találmány szerinti vegyületeket cseppfolyós oldatokkal, előnyösen fiziológiai szempontból kompatibilis pufferoldatokkal - például Hank-féle oldattal vagy Ringer-féle oldat-

tal - lehet formálni. A hatóanyagokból ezenkívül szilárd készere-
szere-
lési formákat is elő lehet állítani, amelyekből közvet-
lenül a felhasználás előtt lehet újra oldatokat vagy szusz-
penziókat készíteni. Elő lehet állítani liofilizált készere-
lési formákat is.

Szisztémás hatás elérése céljából a hatóanyagokat a nyál-
kahártyán vagy a bőrön keresztül is be lehet juttatni a szer-
vezetbe és - amint ezt már említettük - szájon keresztül is
lehet alkalmazni. A nyálkahártyán vagy a bőrön keresztüli al-
kalmazás esetén a gáton való áthatolás elősegítésére alkalmas
adalékokat alkalmazunk a formáláshoz. Az ezen a szakterületen
dolgozók általában ismerik az erre a célra alkalmas adalék-
anyagokat, amelyek közé tartoznak például a transzmukozális
alkalmazáshoz megfelelő epesavas sók és fuzidénsavszármazé-
kok. Az áthatolás megkönnyítése céljából ezenkívül deter-
genseket is fel lehet használni. A nyálkahártyán keresztüli
alkalmazáshoz megfelelőek például az orrpermetek és a kúpok.
Szájon keresztüli alkalmazáshoz a hatóanyagokból a szokásos
orális adagolási formákat, például kapszulákat, tablettákat
és cseppfolyós készítményeket állíthatunk elő.

Helyi alkalmazási célra a találmány szerinti vegyületek-
ből - amint ez a szakterületen általánosan ismert - kenőcsö-
ket, keneteket, géleket és krémeket lehet formálni.

Szokásos eljárásokkal meg lehet határozni, hogy a talál-
mány szerinti különböző vegyületekből milyen mennyiségeket
kell a szervezetbe juttatni. A hatóanyagnak a gyógyhatás ki-
fejtéséhez szükséges mennyisége rendszerint körülbelül 1 nM
és 3 μ M, előnyös esetben 0,1 nM és 1 μ M között van, a ható-
anyag EC_{50} vagy IC_{50} értékétől, a kezelt beteg korától és
testtömegétől, valamint a paciens betegségétől vagy rendelle-
nességétől függően. A kezelt ember vagy állat 1 kg testtöme-
gére vonatkoztatva a szükséges hatóanyagmennyiség általában
körülbelül 0,1 és 50 mg között, előnyös esetben 0,01 mg és 20
mg között van.

V. Példák

A következő példák a találmány különböző lehetőségeinek és megvalósítási formáinak a szemléltetésére szolgálnak. A közölt példák tehát semmilyen vonatkozásban sem korlátozzák a találmányt.

1. példa

Emberi mellékpajzsmirigy-daganatból származó humán mellékpajzsmirigy-kalciumreceptor klónozása

Ezzel a példával ismertetjük az emberi mellékpajzsmirigy-daganatból származó humán mellékpajzsmirigy-kalciumreceptor klónozását, amelyhez hibridizációs mintaként pBoPCaR1-et használunk fel [v.ö. Nemeth és munkatársai: PCT/US93/01642 sz. nemzetközi bejelentés (a nemzetközi közrebocsátási irat száma: WO 94/18959)]. A mintát úgy használtuk fel az emberi mellékpajzsmirigy kalciumreceptorának a génállományát tartalmazó nukleinsav azonosítására, hogy kevésbé szigorú kereszt-hibridizálást hajtottunk végre.

Hírvivő RNS-t készítettünk emberi mellékpajzsmirigy-daganatból, amelyet egy olyan, 39 éves kaukázusi férfiből távolítottunk el, akinél elsődleges mellékpajzsmirigy-túlműködést diagnosztizáltunk. Hibridizációs mintaként pBoPCaR1-t használva, ennek az mRNS-nek a "Northern" feltelemzésével körülbelül 5 kilobázisos és körülbelül 4 kilobázisos kalciumreceptor-transzkriptumokat azonosítottunk. Az mRNS-ből cDNS-könyvtárat állítottunk össze. 3 kilobázispárnál többet tartalmazó, kettős szálú cDNS-t különítettünk el méret szerint agarózgélen, és kapcsoltunk hozzá a lambda - ZapII klónozóvektorhoz. Elvégeztük ötszázezer primer rekombináns fág szűrővizsgálatát olyan módon, hogy hibridizációs mintaként a pBoPCaR1 5,2 kilobázispáros cDNS inszerciós szekvenciát alkalmaztunk. A pBoPCaR1 inszerciós szekvenciát az 1×10^5 beütés/(min \times μ g) fajlagos aktivitás eléréséhez megfelelő mennyiségű [32 P]-dCTP felhasználásával a statisztikus rendezet-

lenség állapotából kiindulva végrehajtott szintézis útján radioaktív izotóppal jelöltük.

Genomkönyvtár-szűrést hajtottunk végre 38 °C-on végzett hibridizálással (400 mM Na⁺, 50 tömeg% formamid). Vérlemezke foltból álló szűrőket hibridizáltunk 20 órán át 500 000 beütés/(min x ml) koncentrációjú mintával. A hibridizálást követően a szűrőket 40 °C-on 1 órán át egyszer mostuk SSC-ben.

Az első szűrővizsgálat során körülbelül 250, pBoPCaR1-gyel végzett keresztezéssel azonosított pozitív klónt határoztunk meg. Ezek közül a klónok közül hetet egy második és egy harmadik szűrővizsgálatnak vetettünk alá, hogy elkülönítsük a pBoPCaR1-mintával kereszteződött egyes klónokat. Ezt a hét klónt restriktációs enzimes feltérképezéssel és Southern folt-analizissal elemeztük. A klónok közül három körülbelül 5 kilobázispáros cDNS inszerciós szekvenciákat tartalmazott, és úgy tűnik, hogy ezek a teljes hosszúságú klónok az 5 kilobázisos mRNS-nek felelnek meg. A klónok közül kettő körülbelül 4 kilobázispáros cDNS inszerciós szekvenciákat tartalmazott, és úgy tűnik, hogy ezek teljes hosszúságú klónok, amelyek a 4 kilobázisos mRNS-nek felelnek meg.

A két különböző méretű inszerciós szekvencia restriktációs enzimmel való feltérképezése azt mutatja, hogy ezek az inszerciós szekvenciák 5'-végeiken hasonló szekvenciájú régiókkal, 3'-végeiken azonban eltérő szekvenciákkal rendelkeznek. A DNS-szekvenciaanalízisek eredményeiből azt a következtetést lehet levonni, hogy a kisebb inszerciós szekvencia a nagyobb inszerciós szekvenciában lévő poliadenilezési helytől "felfelé" átmeneti módon végbemenő poliadenilezésből származhat.

A két méretosztály tipikus cDNS inszerciós szekvenciáit SK-pBluescript plazmidvektorba szubklónoztuk. A lineárisított tételt követően T7-es RNS-polimeráz-enzim felhasználásával *in vitro* körülmények között végzett átírással cRNS-transzkriptumokat kaptunk. Funkcionális elemzés elvégzése céljából

a cRNS-transzkriptumokat *Xenopus* oocytaiba injektáltuk (150 ng/ μ l RNS; 50 nl/oocyta). 2-4 nap inkubálási idő eltelte után vizsgáltuk, hogy vannak-e az oocytaiban jelen funkcionális kalciumreceptorok. Mindkét klóntípusnál létrejöttek funkcionális kalciumreceptorok. Erre abból lehet következtetni, hogy megfelelő kalciumreceptor-agonisták hozzáadása serkenti a kalcium által aktivált kloridáramokat. Az ismert kalciumreceptor-agonisták - beleértve az NPS R-467-et és az NPS R-568-at [v.ö. Nemeth és munkatársai: PCT/US93/01642 sz. nemzetközi bejelentés (a nemzetközi közrebocsátási irat száma: WO 94/18959)] - az oocyta által manifesztált receptort körülbelül ugyanolyan koncentrációkban alkalmazva aktiválták, mint amilyen koncentrációkban ismereteink szerint hatásosak a már a születéskor meglévő mellékpajzsmirigysejt-receptorokkal szemben. Így tehát mindkét klón tartalmazza egy funkcionális humán mellékpajzsmirigysejt kalciumreceptorának a génállományát.

Plazmidokat készítettünk olyan módon, hogy az egyes, méret szerint osztályozott inszerciós szekvenciákat pBluescript-be szubklónoztuk, és ennek eredményeként pHuPCaR5.2-t és pHuPCaR 4.0-t kaptunk. Az inszerciós szekvenciák nukleinsav-szekvenciája és aminosav-szekvenciája az 1. és a 2. szekvenciaazonosítási listán látható.

A két cDNS inszerciós szekvencia nukleinsav-szekvenciái között megfigyeltünk néhány eltérést. A két cDNS inszerciós szekvenciaelemzéseiből arra lehet következtetni, hogy legalább két, egymástól a transzláció által nem érintett 3'- régióban eltérő szekvenciaváltozat létezik, és ennek az oka alternatív poliadenilezés lehet. Ezenkívül szekvenciaváltozat létezik az inszerciós szekvencia 5'-végén is. Ezek a különböző szekvenciák a transzláció által nem érintett régióknak felelnek meg, és keletkezésük valószínűleg annak tulajdonítható, hogy a transzkripcióhoz két kiindulási és/vagy kapcsolódási hely áll rendelkezésre.

A pHuPCaR5.2 és a pHuPCaR4.0 cDNS-klónok kódoló tartományain belül további szekvenciavariációs helyeket figyeltünk meg (lásd az 1. és a 2. szekvenciaazonosítási listát), ami arra utal, hogy ezek a cDNS-klónok különféle fehérjék génállományát foglalják magukban. A humán CaR-gén szekvenciaelemzése azt mutatja, hogy a pHuPCaR4.0 cDNS-klónhoz képest a pHuPCaR5.2 cDNS klónban lévő további 30 DNS-bázispár az alternatív mRNS kapcsolódási lehetőségek eredménye. A vagylagos mRNS-illeszkedési lehetőségeknek tulajdonítható 10 további aminosav beékelődése a pHuPCaR5.2 cDNS által kódolt génállományú CaR-polipeptidbe a pHuPCaR5.2 cDNS által kódolt polipeptidben levő aa#536 és aa#537 közötti helyen. Ezenkívül a pHuPCaR4.0 az aa#925. helyen glutamint (Gln), a 990. helyen pedig glicint (Gly) foglal magában, míg a pHuPCaR5.2-ben mindkét megfelelő helyen arginin (Arg) van. A humán CaR ezeken a helyeken - az említés sorrendjében - Gln-t és Arg-t kódol. Úgy tűnik, hogy a pHuPCaR4.0 cDNS és a humán DNS közötti eltérés valóságos szekvenciapolimorfizmust képvisel az emberi populáción belül, míg a pHuPCaR5.2-belüli egyetlen bázisváltozás valószínűleg a klónozás során bekövetkező mutáció eredménye. Mindkét cDNS tartalmazza funkcionális kalciumreceptorok génállományát, amit az bizonyít, hogy az ezekből a cDNS-klónokból készített cDNS-sel injektált *Xenopus oocytes* képes arra - amint ez a kloridion-vezetőképesség mérése alapján megállapítható -, hogy 10 mM extracelluláris kalciumionra reagáljon. Lehetséges azonban, hogy ez a két receptorizoforma funkcionálisan és/vagy farmakológiai szempontból eltérő.

2. példa

Kalciumreceptort expresszáló, stabil rekombináns sejtek kiválasztása

Olyan klonális sejtvonalakat különítettünk el, amelyek stabilan expresszálják a két humán kalciumreceptort és a szarvasmarha-kalciumreceptort. A kalciumreceptorok cDNS-eit

két különböző, kereskedelmi forgalomban lévő expressziós vektorba - a Pharmacia cégtől beszerzett pMSG-be és az Invitrogen cégtől beszerzett Cep4B-be - szubklónoztuk. Az első vektor tartalmazza a szelektálható jelzőgént a xantin/guanin-foszforibozil-transzferázhoz (gpt), amely lehetővé teszi, hogy a stabilan transzfektált sejtek legyőzzék a purinos bioszintetikus mechanizmus 2 µg/ml aminopterin és 25 µg/ml mikofenolsav beadagolásával kialakított blokádját. A második vektor tartalmaz egy olyan gént, amely ellenállóképességet biztosít a 200 µg/ml koncentrációban alkalmazott antibiotikus higromicinnel szemben. A HuPCaR5.2 és a HuPCaR4.0 cNDS-eit (a megemlítés sorrendjében az 1. és a 2. szekvenciaazonosítási listán láthatók) Not I-es és Hind III-as restrikciós enzimekkel távolítottuk el a parentális "bluescript" plazmidból, majd közvetlenül hozzákapcsoltuk őket a Not I és a Hind III enzimmel egyaránt digesztált Cep4B-hez, vagy a DNS-polimeráz klenow fragmentumával kezeltük, majd tompa végű ligáció útján pMSG-vel digesztált Sma I-hez kapcsoltuk őket.

A HuPCaR5.2 inszerciós szekvenciát tartalmazó pMSG-szubklónt a már ismertetett módon CHO-sejtekbe transzfektáltuk. 20 rezisztens klónt különítettünk el, amelyeknek a jellemzése jelenleg folyik. A HuPCaR5.2 inszerciós szekvenciát tartalmazó Cep4B szubklónt a már ismertetett módon HEK 293-as sejtekbe transzfektáltuk. Higromicines szelektálással stabil klónokból álló folyadékot gyűjtöttünk össze. A HuPCaR4.0 receptor izoformát manifesztáló klónokat hasonló módon készítettük el.

HuPCaR5.2 inszerciós szekvenciát tartalmazó Cep4B-vel transzfektált és higromicinnel szelektált HEK 293-as sejteket tartalmazó összegyűjtött folyadékból kinyert sejtekkel kollagénnel bevont Aklar-kockákat fedtünk be, amelyeket előzőleg 12 mérőhelyes szövettenyésztő lemezek külön-külön mérőhelyeire helyeztünk el. A közeget 2-6 nappal később eltávolítottuk, és a sejteket stabilizált sóoldattal és 1 ml mennyiségű, 1 µM

fura-2-AM-et, 1 mM kalcium-kloridot és 0,1 tömeg% BSA-t tartalmazó pufferoldattal mostuk. A kalciumreceptor-agonistákra való reagálásra jellemző fluoreszcenciaértékeket 37 °C-on spektrofluoriméterrel mértük. A gerjesztéshez 340 nm-es hullámhosszúságú fénysugarakat használtunk, a kibocsátott fénysugarak hullámhosszúsága 510 nm volt. A jelkalibráláshoz a F_{max} értékét 40 μ M ionomicin hozzáadása után, a látszólagos F_{min} értékét pedig 0,3 M EGTA és 2,5 M Trisz-HCl hozzáadásával (pH = 10) határoztuk meg. A $[Ca^{2+}]_i$ nagymértékű növekedését figyeltük meg a következő kalciumreceptor-antagonisták hozzáadását követően: Ca^{2+} (10 mM), Mg^{2+} (20 mM) és NPS R-467. A funkcionális K-receptorokat manifesztáló kontrollsejtek nem reagáltak ezekre a kalcimimetikus vegyületekre.

További klónozó anyagokat különítettünk el pHuPCaR4.0 szekvenciával transzfektált HEK 293-as sejtekből. Vizsgáltuk, hogy ezek az anyagok hogyan reagálnak a kalcimimetikumokra. A vizsgálatokat a már leírt módon végeztük azzal az eltéréssel, hogy a sejteket szuszpendált állapotban teszteltük.

3. példa

Fura-2-vel feltöltött mellékpajzsmirigysejtek felhasználása a kalciumreceptor-aktivitás méréséhez

Ebben a példában azt ismertetjük, hogy miként lehet kinyerni mellékpajzsmirigysejteket borjakból és emberekből, továbbá hogyan lehet felhasználni a mellékpajzsmirigysejteket a kalciumreceptor-aktivitás méréséhez.

Friszen levágott 12-15 hetes borjakból a helyi vágóhídon eltávolítottuk a mellékpajzsmirigyeket, majd a laboratóriumba szállítottuk őket 126 mM nátrium-kloridot, 4 mM kálium-kloridot, 1 mM magnézium-kloridot, 20 mM Na-HEPES-t, 5,6 mM glükózt és változó mennyiségű - például 1,25 mM - kalcium-kloridot tartalmazó, jéghideg mellékpajzsmirigysejt-pufferoldatban (PCB) (pH=7,4). A humán mellékpajzsmirigyek olyan betegekben származtak, akiknek elsődleges mellékpajzsmirigy-túlműködés vagy urémiás mellékpajzsmirigy-túlműködés (urémiás

HPT) miatt eltávolították a mellékpajzsmirigy-szövetét. Ezeket a mirigyeket a borjakból származó szövetekhez hasonlóan kezeltük.

A mirigyekről lenyestük a zsírfelületet, valamint a kötőszövetet, majd a mirigyeket éles ollóval körülbelül 2-3 mm élhosszúságú kockákra vágjuk. Kollagenáz enzim digestióval elkülönítettük, majd Percoll-pufferben való centrifugálással tisztítottuk az elkülönült mellékpajzsmirigysejteket. Fáziskontrasztos mikroszkóppal és E-szudánfeketéssel való megfestéssel kimutattuk, hogy a kapott mellékpajzsmirigysejt-készítmény vörösvérsejtektől és zsírsejtektől gyakorlatilag mentes volt. A disszociált és tisztított mellékpajzsmirigysejtek 5-20 sejtet tartalmazó kis halmazokban voltak jelen. Rutinszerűen végzett munka esetén a tripánkékes vagy etidium-bromidos kizárással megállapított jelzőszám alapján a sejtek 95 %-a volt életképes.

Bár a sejteket ebben az állapotban fel lehet használni kísérleti célokra, a fiziológiai válaszreakciókat - például a PTH-szekréció elfojthatóságát és a szövetek $[Ca^{2+}]_i$ maradékkoncentrációját a sejtek egy éjszakán át való tenyésztése után kell meghatározni. A primer tenyészetnek megvan az az előnye is, hogy a sejtek radioizotópos megjelölésekor majdnem el lehet érni az izotópegyensúlyt, ami az inozit-foszfátos metabolizmusra vonatkozó mérésekre kiterjedő vizsgálatokhoz szükséges.

A sejteket tisztítás után (Percoll-gradiensek) a Ham-féle F12 és 50 $\mu\text{g/ml}$ mennyiségű sztreptomocinnal, 100 E/ml mennyiségű penicillinnel, 5 $\mu\text{g/ml}$ mennyiségű gentamicinnel és ITS⁻-szal kiegészített, Dulbecco által módosított Eagle-féle közeg (GIBCO) 1:1 arányú elegyével többször mostjuk. Az ITS⁺ egy keveréssel előkészített oldat, amely inzulint, transferint, szelént, valamint marhaszérum-albuminból (BSA) és linolén-savból álló elegyet (Collaborative Research, Bedford, MA, USA) tartalmaz. A sejteket ezután áttöltöttük Falcon-

-gyártmányú, 75 vagy 150 cm³-es edényekbe, majd egy éjszakán át 37 °C-on, 5 % szén-monoxidot tartalmazó nedves légkörben inkubáltuk őket. Ezekhez a tenyészetekhez az éjszaka folyamán nem adtunk szérumot, minthogy a szérum jelenléte lehetővé teszi, hogy a sejtek a műanyaghoz tapadjanak, elszaporodjanak és dedifferenciálódjanak. Az ismertetett körülmények között tenyésztett sejteket dekantálással könnyen el lehetett távolítani az edényekből. Az eltávolított sejtek ugyanolyan életképességet mutattak, mint a frissen kipreparált sejtek.

Tisztított mellékpajzsmirigysejteket újra szuszpendáltunk 1 µM fura-2-acetoxi-metil-észtert tartalmazó 1,25 mM CaCl₂- 2 % BSA-CPB-ben, majd a szuszpenziót 37 °C hőmérsékleten 20 percig inkubáltuk. A sejteket ezután pelleteztük, ugyanabban a pufferoldatban - de az észterkomponens nélkül - újra szuszpendáltuk, majd további 15 percig 37 °C-on inkubáltuk. A sejteket ezt követően 0,5 mM kalcium-kloridot és 0,5 tömeg% BSA-t tartalmazó PCB-vel kétszer mostuk és szobahőmérsékleten - körülbelül 20 °C-on - tartottuk. Közvetlenül a felhasználás előtt a sejteket ötszörös mennyiségű, előmelegített 0,5 mM CaCl₂-PCB-vel hígítottuk, hogy a BSA végkoncentrációja 0,1 tömeg% legyen. A fluoreszcenciás méréshez felhasznált küvettában jelenlévő sejtek koncentrációja (1-2) x 10⁶/ml volt.

Az indikátorral töltött sejtek fluoreszcenciáját 37 °C-on mértük egy termosztált küvettatartóval és mágneses keverővel felszerelt spektrofluoriméterrel (Biomedical Instrumentation Group, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA). A gerjesztéshez 340 nm hullámhosszúságú fénysugarakat használtunk, a kibocsátott sugárzás hullámhosszúsága pedig 510 nm volt. A fluoreszkálás mutatja a sejtplazmában levő kalciumionok koncentrációját. A fluoreszcencia-jeleket digitoninnal kalibrálva (50 µg/ml, végső érték) megkaptuk a fluoreszcencia-maximumot (F_{max}), EGTA-val kalibrálva pedig (10 mM, pH = 8,3, végső érték) a fluoreszcencia-minimumot (F_{min}), továbbá a

224 nM-es disszociációs állandót. A színezékveszteség függ a hőmérséklettől. A legnagyobb veszteség a kuvettában lévő sejtek melegítését követő első két percen belül következik be. Ezt követően a színezékveszteség csak nagyon lassan növekszik. A kalibrálásnak a színezékveszteséggel való korrigálása céljából egy kuvettában sejteket helyeztünk el, amelyeket 37 °C-on 2-3 percig kevertünk. A sejtszuspenziót ezután eltávolítottuk, a sejteket pelleteteltük, és a felülúszót visszavezettük a kuvetta tisztítása céljából. A felülúszót ezután a színezékveszteség meghatározása céljából digitonines EGTA-val kezeltük. A színezékveszteség tipikus esetben a teljes Ca^{2+} -függő fluoreszcens jel 10-15 %-a volt. Ezt a becsült értéket kivontuk a látszólagos F_{min} -értékből.

4. példa

Fura-2-vel feltöltött HEK 293/pHuPCaR4.0 sejtek felhasználása a kalciumreceptor-aktivitás mérése céljából

Ebben a példában azokat az eljárásokat ismertetjük, amelyek keretében fura-2-vel feltöltött HEK 293/pHuPCaR4.0 sejtek felhasználásával vizsgálni lehet a kalciumreceptor aktivitását. Fura-2-vel töltöttünk fel pHuPCaR4.0-val transzfektált HEK 293-os sejteket olyan módon, hogy a környezet hőmérsékletén 1 órán keresztül inkubáltuk őket körülbelül 5 μ M fluo-3/AM-t tartalmazó, 20 mM mennyiségű HEPES-szel pufferolt, Dulbecco által módosított Eagle-féle közegben. A sejteket ezután Hank-féle stabilizált sóoldattal öblítettük, majd 1 mM kalcium-kloridot és 1 mM magnézium-kloridot tartalmazó, 20 mM mennyiségű HEPES-szel pufferoltuk. Ezután a vizsgálandó vegyületeket hozzáadtuk a sejtekhez, és fluoreszcenciaméréseket végeztünk (a gerjesztést 340 nm hullámhosszúságú fénysugarakkal hajtottuk végre, az emittált fénysugarak hullámhosszúsága pedig 510 nm volt).

5. példa

A vegyületek kalciumreceptor-aktivitás-szabályozó képességének mérése

Különböző vegyületeknek a kalciumreceptor-aktivitás szabályozására való képességét vizsgáltuk olyan módon, hogy fura-2-vel feltöltött sejteket vagy fura-2-vel feltöltött sejtek alkalmazásával feltöltött mellékpajzsmirigysejteket felhasználva a pHuPCaR4.0 génállományát tartalmazó nukleinsavval transzfektált HEK 293-as sejtekben mértük a $[Ca^{2+}]_i$ növekedését. A különböző kísérletek eredményeit az 1.a), az 1.b)1., az 1.b)2., az 1.c) és a 2. táblázatokban foglaljuk össze. Az 1.a), az 1.b), az 1.b)1., az 1.b)2. és az 1.c) táblázatokban található adatok a különböző koncentrációkban alkalmazott vegyületeknek a kalciumreceptor-aktivításra gyakorolt hatásait mutatják a 4. példában ismertetett vizsgálat alapján, azaz a pHuPCaR4.0 génállományát tartalmazó nukleinsavval transzfektált, fura-2-vel feltöltött Hek 293-as sejtek alkalmazása esetén.

A 2. táblázatban különböző kísérletek eredményeit foglaljuk össze. Az EC_{50} -értékeket fura-2-vel feltöltött mellékpajzsmirigy vagy Hek 293/pHuPCaR4.0-sejtekre számítottuk ki. A sejteket fura-2-vel töltöttük fel, és olyan módon vizsgáltuk, ahogy a 2. példában (mellékpajzsmirigysejtekre vonatkozóan), vagy a 3. példában (HEK 293/pHuPCaR4.0-sejtekre vonatkozóan) leírtuk.

1a) táblázat: Kalcimimetikus vegyületek, amelyek 3,3 ng/ml koncentrációban alkalmazva 40 %-osnál nagyobb válaszreakciót váltanak ki a humán kalciumreceptort expresszáló HEK 293-as sejtekben

A vegyületek kódszáma	Aktivitás négy koncentrációértéknél (%)			
	3300 ng/ml	330 ng/ml	33 ng/ml	3,3 ng/ml

Referenciavegyületek

R-568		95	69	24
17P		101	86	54
17X		105	93	51
24X	126	109	124	109
24Y	119	120	127	102
17J	116	118	122	102
25A	122	120	114	92
17E	116	110	110	92
24Z	138	138	135	90
14S	116	106	105	88
25E	132	129	122	85
17G	125	128	119	77
14T	126	125	117	77
17H	126	124	111	74
14O	119	119	102	74
25I	119	113	114	74
12J	131	130	113	68

A vegyületek kódszáma	Aktivitás négy koncentrációértéknél (%)			
	3300 ng/ml	330 ng/ml	33 ng/ml	3,3 ng/ml
12I	115	111	93	68
25G	130	115	99	66
9R		108	101	64
12F	118	110	101	63
12O	110	117	94	62
23Z	129	126	100	61
17M		115	99	59
16V		114	102	58
25O	126	115	96	57
25J	119	123	105	56
16L	146	138	98	56
12N	115	106	102	55
16T		97	88	55
25U	107	107	95	55
17P		101	86	54
16Q		110	88	53
23E	137	113	102	53
17C	113	120	99	52
25L	97	97	85	52
8Z		101	97	52
17X		105	93	51
13R		132	98	51
17O		112	96	51
23Q	122	114	98	51
16X		111	86	51
24V	127	98	71	50
13O		115	94	50
17N		108	86	49
21V	122	116	99	48
24M	132	134	99	48
13U		108	79	47

A vegyületek kódszáma	Aktivitás négy koncentrációértéknél (%)			
	3300 ng/ml	330 ng/ml	33 ng/ml	3,3 ng/ml
24P	140	138	110	46
17Y	109	94	79	46
11X		100	76	45
25H	115	107	89	45
22J		99	71	45
9C		104	82	45
13S		102	87	45
10Q	103	100	84	44
13P		110	83	44
8K		98	81	44
13N		114	88	43
10N	106	97	77	43
12H	114	115	94	43
25P	90	81	75	41
18A		111	88	40
14L		109	78	40

1.b.1. táblázat: Kalcimimetikus vegyületek, amelyek 33 ng/ml koncentrációban alkalmazva 40 %-osnál nagyobb válaszreakciót váltanak ki a humán kalciumreceptort expresszáló HEK 293-as sejtekben

A vegyületek kódszáma	Aktivitás négy koncentrációértéknél (%)			
	3300 ng/ml	330 ng/ml	33 ng/ml	3,3 ng/ml

Referenciavegyületek

R-568		95	69	24
17P		101	86	54
17X		105	93	51
12C	134	125	98	39
16I	121	117	96	36

A vegyületek kódszáma	Aktivitás négy koncentrációértéknél (%)			
	3300 ng/ml	330 ng/ml	33 ng/ml	3,3 ng/ml
17D		108	91	38
17F		111	90	28
24C	116	113	87	32
25K	124	107	86	35
13P	125	122	85	38
21F		109	85	36
21S	132	131	85	34
10F		96	84	27
14R	106	107	84	37
13G	111	128	82	29
14Z	118	103	82	20
16N	122	159	82	8
8U	123	129	82	11
23W	117	97	81	25
12G	139	139	81	35
15G		113	80	32
25M	118	100	79	25
13V		110	79	33
14P	112	103	78	30
6T	123	129	78	15
14Q		101	78	35
17L	111	104	78	31
24K		106	78	30
24U	106	106	78	25
25Q	116	95	77	20
8J		104	77	39
23H	121	114	77	28
21C-4U	134	114	76	17
25F	97	85	76	28
16R		100	76	25
17I	118	97	76	18

A vegyületek kódszáma	Aktivitás négy koncentrációértéknél (%)			
	3300 ng/ml	330 ng/ml	33 ng/ml	3,3 ng/ml
24J		103	75	31
21O		109	75	37
24G	109	94	75	22
15I	111	93	75	24
21D		104	75	17
20Y	117	95	74	24
10P		102	74	8
23M	113	97	74	26
14Y		109	73	17
17X	98	97	73	37
12E	117	121	73	23
17Z		99	73	37
16W		102	73	4
23K	106	107	72	24
25X	96	94	72	22
13W		109	71	12
23P	125	99	70	22
18B	111	96	69	26
21Y		100	68	36
17W		92	67	13
23A		103	67	24
23G	127	93	67	13
13M		92	66	15
21U	104	104	66	18
21R		100	66	15
10S/10T		86	65	13
17R		98	65	13
13X		102	65	13
4N		100	65	13
21E		94	64	4
15J	80	75	64	13

A vegyületek kódszáma	Aktivitás négy koncentrációértéknél (%)			
	3300 ng/ml	330 ng/ml	33 ng/ml	3,3 ng/ml
22Y		114	64	28
21G		88	63	18
24L		105	62	10
10V		99	62	8
10W/10X		98	61	9
17B		92	61	19
23Y	106	87	61	16
11Y		103	61	20

1.b.2. táblázat: Kalcimimetikus vegyületek, amelyek 33 ng/ml koncentrációban alkalmazva 40 %-osnál nagyobb válaszreakciót váltanak ki a humán kalciumreceptort expresszáló HEK 293-as sejtekben

A vegyületek kódszáma	Aktivitás négy koncentrációértéknél (%)			
	3300 ng/ml	330 ng/ml	33 ng/ml	3,3 ng/ml

Referenciavegyületek

R568		95	69	24
17P		101	86	54
17X		105	93	51
18C	99	87	60	18
23T	102	74	60	31
4V		93	59	
8G		84	59	6
23I		102	58	3
21M		102	58	17
24O	137	114	58	8
3U		89	57	
9A		82	56	6
12M	98	86	56	11
12B	130	110	56	4

A vegyületek kódszáma	Aktivitás négy koncentrációértéknél (%)			
	3300 ng/ml	330 ng/ml	33 ng/ml	3,3 ng/ml
21P		92	56	13
8T		85	55	13
10L/10M		99	55	4
24I	109	84	55	11
14N		89	55	15
23R	104	86	54	12
23S		97	53	3
21T	133	112	53	3
10W/10X		81	53	4
13T		90	53	6
6R		94	52	7
20I		87	52	12
24A	122	85	52	9
12D	128	109	52	5
6X		84	52	10
18T	99	74	52	14
21X	119	101	51	2
23J	102	61	51	29
10Z		95	51	5
16Z		88	51	9
23N		95	50	2
16U		85	50	4
11D		96	50	4
23X		94	49	1
17A		88	49	7
20J		80	48	8
22X		86	48	10
23U		87	48	3
9Z		74	48	4
16G	92	76	47	31
25N	94	73	46	8
4P		81	46	8

A vegyületek kódszáma	Aktivitás négy koncentrációértéknél (%)			
	3300 ng/ml	330 ng/ml	33 ng/ml	3,3 ng/ml
	230	111	79	46
13Q		95	46	5
4G		83	46	
12Y		80	46	10
12L		88	45	10
23F		82	45	5
11W		81	44	2
8H		88	44	7
25V	89	59	43	26
25W	95	69	42	8
10R		82	42	7
21N	124	98	42	4
8S		73	42	7
8X		75	40	19
13E	123	94	40	2

1.c) táblázat: Kalcimimetikus vegyületek, amelyek 330 ng/ml koncentrációban alkalmazva 40 %-osnál nagyobb válaszreakciót váltanak ki a humán kalciumreceptort expresszáló HEK 293-as sejtekben

A vegyületek kódszáma	Aktivitás négy koncentrációérték- nél (%)			
	3300 ng/ml	330 ng/ml	33 ng/ml	3,3 ng/ml
	Referenciavegyületek			
R568		95	69	24
17P		101	86	54
17X		105	93	51
7X		85		
3H		84		
3L		81	28	
16O	129	81	21	2
80/8Q	124	80	14	0

A vegyületek kódszáma	Aktivitás négy koncentrációérték- nél (%)			
	3300 ng/ml	330 ng/ml	33 ng/ml	3,3 ng/ml
14A	98	78	10	7
23L	107	77	37	9
1T		76		
7W		76		
4H		77	37	
8D		75		
5M		73	21	
4U		72		
24E	94	71	35	6
16M	130	68	11	4
4M		68	34	
2S		67	28	
17V	91	66	27	-1
2X		66	15	
23D	91	66	35	13
4F		65	32	
5B/5C		65	20	
3M		64	19	
16K	78	62	36	8
5D		62	18	
4D		61	13	
24B	76	61	34	11
24H	81	60	32	13
5L		60	16	
2Y		59	10	
5G		58	16	
3V		58	14	
2Q		56	4	
14B	75	55	11	4
13Z	93	54	22	5
8A		54		
24D	87	53	34	36

A vegyületek kódszáma	Aktivitás négy koncentrációérték- nél (%)			
	3300 ng/ml	330 ng/ml	33 ng/ml	3,3 ng/ml
1D		53		
13I	85	52	3	1
3B		52	15	
8C		51		
14H	112	49	5	5
7U		49		
8E		48	7	
13H	88	48	36	12
13Y	106	47	2	4
4J		47	8	
14I	80	45	11	7
4B		45	8	
3D		45	4	
1E		45	2	
3A		41	7	
14J	55	41	6	5
4I		40	9	

2. táblázat: A mellékpajzsmirigysejt kalciumreceptorán in vitro körülmények között aktív aril-alkil-amin-származék kalcimimetikumok az 1. ábráról ($EC_{50} \leq 5 \mu M$)

A vegyületek kódszáma (az 1. ábráról)	EC_{50} (μM)	A vegyületek kódszáma (az 1. ábráról)	EC_{50} (μM)
NPS R-467	2.0	11X	0.83
NPS R-568	0.60	11Y	2.8
3U	0.64	12L	1.7
3V	1.8	12U	1.2
4A	1.4	12V	0.42
4B	2.0	12W	3.2

4C	2.0	12Y	2.0
4D	4.4	12Z	0.11
4G	1.8	13Q	ca. 0.8
4H	≥3.0	13R	0.25
4J	2.2	13S	<0.13
4M	2.1	13U	0.19
4N	0.8	13X	<0.75
4P	1.6	14L	0.26
4R/6V	4.2	14Q	0.47
4S	3.3	14U	0.13
4T/4U	1.6	14V	1.7
4V	2.5	14Y	0.38
4W	2.3	15G	ca. 0.5
4Y	1.3	16Q	0.04
4Z/5A	4.4	16R	0.35
5B/5C	2.8	16T	0.04
5W/5Y	3.6	16V	<0.13
6E	2.7	16W	0.59
6F (R, R-)	0.83	16X	0.10
6R	3.4	17M	0.15
6T	2.9	17O	0.04
6X	2.5	17P	0.04
7W	3.2	17R	0.39
7X	1.1	17W	0.43
8D	2.5	17X	0.02
8J	0.78	20F	<1.0
8K	1.3	20I	>1.0
8R	2.6	20J	>3.0
8S	1.7	20R	2.4
8T	1.8	20S	4.2
8U	0.44	21D	3.0
8X	0.75	21F	0.38
8Z	0.40	21G	1.1

9C	0.60	21O	0.26
9D	1.4	21P	0.43
9R	0.25	21Q	1.4
9S	4.8	21R	0.37
10F	0.89	25C	> 2
11D	1.8	25D	0.019

5A Példa

A következő példában bemutatjuk, hogy a találmány szerinti, 21M jelű (1n ábra), a 21Y és 21J jelű (1o ábra) és a 25C jelű (1q ábra) vegyületek a korábban ismert vegyületekhez képest nagyobb aktivitást mutatnak. A hivatkozott vegyületek biológiai adatait az NPS 568 jelű (WO A 9418959 nemzetközi közzétételi számú szabadalmi bejelentés 36j ábráján ismertetett) vegyülettel összehasonlításban az alábbi táblázatban mutatjuk be.

A számok a szérum mellékpajzsmirigy hormonra (PTH) és a szérum kalcium ionra (Ca++) a görbe alatti területben 0-8 óra alatt bekövetkező, azon %-os változást mutatják be, amelyet az egyes vegyületek az adagolás után a patkányokban a vivőanyaggal kezeléshez képest okoztak. Minél nagyobb a görbe alatti terület, annál nagyobb a PTH és a szérum Ca++ csökkentő hatás.

2/A táblázat

Görbe alatti terület	NPS R-568	21M jelű vegyület	21Y jelű vegyület	22J jelű vegyület	25C jelű vegyület
PTH (ng óra/ml)	15	110	243	160	363
Ca++ (nmól óra/ml)	0,91	1,82	2,11	2,08	2,23

Amint az a fenti táblázatban látható, a találmány szerinti

ti vegyületek az NPS R-568 jelű technika állásához tartozó vegyülethez képest a 21M jelű vegyület esetében körülbelül hétszeres, a 21Y jelű vegyület esetében körülbelül 16-szoros, a 22J jelű vegyület esetében körülbelül 10,5-szeres és a 25C jelű vegyület esetében körülbelül 24-szeres mértékben csökkentették a szérum PTH értékét.

Hasonlóan a találmány szerinti vegyületek a NPS R-568 jelű, technika állásához tartozó vegyülethez képest a 21M jelű vegyület esetében körülbelül kétszeres, a 21Y jelű vegyület esetében körülbelül 2,3-szeres, a 22J jelű vegyület esetében körülbelül 2,3-szeres és a 25C jelű vegyület esetében körülbelül 2,5-szeres mértékben csökkentették a szérum Ca⁺⁺ szintjét.

5B Példa

A következő táblázat a (II) általános képletű vegyületek %-os aktivitását mutatja.

2B táblázat

A vegyület jele (NPS#)	HEK 4,0-7 EC50 (nM)	%-os aktivitás (10 µM)	%-os aktivitás (0,33 µg/ml)	%-os aktivitás (0,033 µg/ml)	%-os aktivitás (0,0033 µg/ml)
NPS1143	-	-	110	56	4
NPS1144	-	-	125	98	39
NPS1145	-	-	109	52	5
NPS1146	-	-	121	73	23
NPS1147	-	-	110	101	63
NPS1418	-	-	115	99	66
NPS1419	-	-	107	89	45

Az adatokból a következők láthatók:

1. Jó %-os aktivitással rendelkeznek a telítetlen sorozatok (szén-szén kettőskötés), ahol R8=R9=R10=H és ahol Ar3 OMe-, alkil-csoporttal vagy Cl-atommal helyettesített (az NPS 1143, NPS 1144, NPS 1145, NPS 1146 és NPS 1147 jelű vegyületek).

A megfelelő telített rendszerekben az alkil helyettesítéssel kisebb agonista hatással rendelkező vegyületeket kapunk.

Más telített rendszerekben az OMe-helyettesítés nagyobb agonista hatással rendelkező analógokat eredményez.

2. Jó %-os aktivitással rendelkeznek azok a telítetlen sorozatok (szén-szén kettőskötés), ahol R8=R10=H és R9=Me (NPS 1418).

A megfelelő telített rendszerekben a vegyületek kisebb agonista hatással rendelkeznek.

3. Jó %-os aktivitással rendelkeznek azok a telítetlen sorozatok (szén-szén kettőskötések), ahol R8=R9=H és R10=Me (NPS 1419).

A megfelelő telített rendszerekben a vegyületek kisebb agonista hatással rendelkeznek.

6-17. példák

A vegyületek szintézise

A leírásban szereplő vegyületek ismert eljárásokkal - például a Nemeth és munkatársai által leírt módon [PCT/US93/01642 sz. nemzetközi bejelentés (a nemzetközi közrebocsátási irat száma: WO 94/18959)] - szintetizálhatók. A továbbiakban példákat közlünk a szövegben szereplő vegyületek tipikus előállítási módszereire.

A 9E, a 14U és a 17P kódszámú vegyületeket kereskedelmi forgalomban levő aldehidből vagy ketonból állítottuk elő redukzív aminálással, az aminálást primer aminnal végeztük nátrium-[ciano-trihidro-borát](1-) vagy nátrium-[triacetoxi-hidro-borát](1-) jelenlétében. Hasonló módon állítottuk elő a 11Y, a 12H, a 12K, a 12M, a 14S, a 14T, a 16L-O, a 17E, a 17G, a 17J, a 24X, a 24Y, a 25A, a 25E-25K és a 25O kódszámú vegyületeket.

Azt tapasztaltuk, hogy az említett három vegyület (9E, 14U és 16P) szintézisekor nátrium-[triacetoxi-hidro-borát]-

(1-) alkalmazása esetén nagyobb diasztereoselektivitással keletkeznek a kívánt diasztereoizomerek, mint nátrium-[ciano-trihidro-borát](1-) alkalmazása esetén. A dúsított elegyből további tisztítással állítjuk elő a kívánt diasztereomert. A készített normálfázisú nagyteljesítményű folyadékkromatográfiás módszerrel vagy szerves oldószerrel való átkristályosítással végezzük.

A 8J, a 8U, a 11K, a 17M és a 25Y kódszámú vegyületeket úgy állítottuk elő, hogy primer aminokat aldehiddel vagy ketonnal titán(IV)-izopropoxid jelenlétében kondenzáltunk. Az így kapott intermedier imineket ezután nátrium-[ciano-trihidro-borát](1-)-szal, nátrium-[tetrahidro-borát](1-)-szal vagy nátrium-[triacetoxi-hidro-borát](1-)-szal *in situ* redukáltuk. A 8U kódszámú vegyület szintetizálásához az intermedier amint szénhordozóra felvitt palládium-dihidroxid alkalmazásával katalitikusan redukáltuk.

A 12U, a 12V és a 12Z kódszámú vegyületeket úgy állítottuk elő, hogy amint diizobutil-alumínium-hidrid (DIBAL-H) közvetítésével nitrillel kondenzáltunk. A keletkezett intermedier imint nátrium-[ciano-trihidro-borát](1-)-szal vagy nátrium-[tetrahidro-borát](1-)-szal *in situ* redukáltuk. Az intermedier alkéneket (a 12U és a 12V kódszámú vegyületeket) szénhordozóra felvitt palládium alkalmazásával etanolban végrehajtott katalitikus hidrogénezéssel redukáltuk. A vegyületeket úgy alakítottuk át a megfelelő hidrokloridokká, hogy a szabad bázisokat éteres sósavval kezeltük, és ennek eredményeként fehér színű szilárd anyagot kaptunk.

Az ezekhez a szintézisekhez felhasznált aminokat az Aldrich Chemical Co.-tól (Milwaukee, WI, USA) vagy a Celgene Corp.-tól (Warren, NJ, USA) szereztük be, illetve hagyományos eljárások alkalmazásával szintetizáltuk. Az összes többi, reagensként használt vegyszert az Aldrich Chemical Co.-tól vásároltuk.

6. példa

A 21Y kódszámú vegyület előállítása

Hasonló módon összekevertünk 1 ekvivalens mennyiségű, m-(trifluor-metil)-benzaldehydből előállított 4-[3-(trifluor-metil)-fenil]-2-butanont, (R)-1-(3-metoxi-fenil)-etil-amint és 1,25 ekvivalens mennyiségű titán(IV)-izopropoxidot, és az intermedier imint nátrium-[ciano-trihidro-borát](1-) alkoholos oldatával redukáltuk. A feldolgozás és az 5 % metanolt, valamint 95 % kloroformot tartalmazó eleggyel végzett ismétléses preparatív vékonyréteg-kromatográfiás eljárás után megkaptuk az (R,R)-N-[4-[3-(trifluor-metil)-fenil]-2-butil]-1-(3-metoxi-fenil)-etil-amint, vagyis a 21Y kódszámú vegyületet [m/z (relatív intenzitás) 351 (M⁺, 2), 336 (18), 216 (4), 202 (3), 178 (45), 135 (100), 105 (13), 91 (9), 77 (8)] és az (S,R)-N-[4-[3-(trifluor-metil)-fenil]-2-butil]-1-(3-metoxi-fenil)-etil-amint, vagyis a 21X kódszámú vegyületet.

A 25C és a 25D kódszámú vegyületek előállítása

Hasonló módon összekevertünk 1 ekvivalens mennyiségű 4-[3-(trifluor-metil)-fenil]-2-butanont, (R)-1-(1-naftil)-etil-amint és 1,25 ekvivalens titán(IV)-izopropoxidot, és az intermedier imint nátrium-[ciano-trihidro-borát](1-) alkoholos oldatával redukáltuk. A feldolgozás és az 5 % metanolt, valamint 95 % kloroformot tartalmazó eleggyel végzett ismétléses preparatív vékonyréteg-kromatográfiás eljárás után megkaptuk az (S,R)-N-[4-[3-(trifluor-metil)-fenil]-2-butil]-1-(1-naftil)-etil-amint, vagyis a 25C kódszámú vegyületet [m/z (relatív intenzitás) 371 (M⁺, 3), 356 (16), 198 (15), 155 (100), 129 (8), 115 (5), 109 (3), 77 (2), 3, 356 (16), 198 (15), 155 (100), 129 (8), 115 (5), 109 (3), 77 (2)] és az (R,R)-N-[4-[3-(trifluor-metil)-fenil]-2-butil]-1-(1-naftil)-etil-amint, vagyis a 25D kódszámú vegyületet [m/z (relatív intenzitás) 371 (M⁺, 3), 356 (16), 198 (15), 155 (100), 129 (8), 115 (5),

109 (3), 77 (2)].

A 12B kódszámú vegyület előállítása

Hasonló módon 4-metil-fahéjsavnitrilt diizobutil-alumínium-hidriddel kezeltünk, és az intermedier alumínium-imino-komplexet (R)-1-(3-metoxi-fenil)-etil-aminnal reagáltattuk. Az intermedier imint etanolos nátrium-[tetrahydro-borát](1)-szal kezeltük. A feldolgozás és a kromatografálás után tiszta, szintelen, olajszerű anyag formájában kaptuk meg az (R)-N-[3-(4-metil-fenil)-prop-2-enil]-1-(3-metoxi-fenil)-etil-amint, vagyis a 12B kódszámú vegyületet: m/z (relatív intenzitás) 281 (M+, 6), 266 (5), 176 (27), 146 (75), 135 (63), 131 (100), 115 (25), 105 (21), 91 (21), 77 (21).

A 12C kódszámú vegyület előállítása

Hasonló módon 2-metil-fahéjsavnitrilt diizobutil-alumínium-hidriddel kezeltünk, és a keletkezett intermedier alumínium-imin-komplexet (R)-1-(3-metoxi-fenil)-etil-aminnal reagáltattuk. Az intermedier imint nátrium-[tetrahydro-borát](1)-szal kezeltük. A feldolgozás és a kromatografálás után tiszta, szintelen, olajszerű anyag formájában kaptuk meg az (R)-N-[3-(2-metil-fenil)-prop-2-enil]-1-(3-metoxi-fenil)-etil-amint, vagyis a 12C kódszámú vegyületet: m/z (relatív intenzitás) 281 (M+, 4), 266 (15), 176 (18), 146 (62), 135 (58), 131 (100), 115 (23), 105 (19), 91 (38), 77 (17).

A 12D kódszámú vegyület előállítása

Hasonló módon 2,4,6-trimetil-fahéjsavnitrilt diizobutil-alumínium-hidriddel kezeltünk, és az intermedier alumínium-imin-komplexet (R)-1-(3-metoxi-fenil)-etil-aminnal reagáltattuk. Az intermedier imint etanolos nátrium-[tetrahydro-borát](1)-szal kezeltük. A feldolgozás és a kromatografálás után tiszta, szintelen, olajszerű anyag formájában megkaptuk az (R)-N-[3-(2,4,6-trimetil-fenil)-prop-2-enil]-1-(3-metoxi-

-fenil)-etil-amint, vagyis a 12D kódszámú vegyületet: m/z (relatív intenzitás) 309 (M⁺, 8), 294 (25), 174 (82), 159 (100), 135 (52), 129 (29), 105 (21), 91 (17), 77 (14).

A 12E kódszámú vegyület előállítása

Hasonló módon 4-izopropil-fahéjsavnitrilt diizobutil-alumínium-hidriddel kezeltünk, és az intermedier alumínium-imin komplexet (R)-1-(3-metoxi-fenil)-etil-aminnal reagáltattuk. Az intermedier imint etanolos nátrium-[tetrahidro-borát](1-)-szal kezeltük. A feldolgozás és a kromatografálás után tiszta, szintelen, olajszerű anyag formájában kaptuk meg az (R)-N-[3-(4-izopropil-fenil)-prop-2-enil]-1-(3-metoxi-fenil)-etil-amint, vagyis a 12E kódszámú vegyületet: m/z (relatív intenzitás) 309 (M⁺, 9), 294 (7), 174 (98), 159 (22), 135 (80), 117 (100), 105 (35), 91 (37), 77 (19).

A 12F kódszámú vegyület előállítása

Hasonló módon 2,4-dimetil-fahéjsavnitrilt diizobutil-alumínium-hidriddel reagáltattunk, és az intermedier alumínium-imin-komplexet (R)-1-(3-metoxi-fenil)-etil-aminnal reagáltattuk. Az intermedier imint etanolos nátrium-[tetrahidro-borát](1-)-szal kezeltük. A feldolgozás és a kromatografálás után tiszta, szintelen, olajszerű anyag formájában kaptuk meg az (R)-N-[3-(2,4-dimetil-fenil)-prop-2-enil]-1-(3-metoxi-fenil)-etil-amint, vagyis a 12F kódszámú vegyületet: m/z (relatív intenzitás) 295 (M⁺, 8), 294 (15), 174 (29), 160 (75), 145 (100), 135 (68), 117 (21), 105 (30), 91 (26), 77 (19).

A 12G kódszámú vegyület előállítása

Hasonló módon 3-metil-fahéjsavnitrilt diizobutil-alumínium-hidriddel kezeltünk, és az intermedier alumínium-imin-komplexet (R)-1-(3-metoxi-fenil)-etil-aminnal reagáltattuk. Az intermedier imint etanolos nátrium-[tetrahidro-borát](1-)-szal kezeltük. A feldolgozás és a kromatografálás után tiszta, szintelen, olajszerű anyag formájában kaptuk meg az (R)-

-N-[3-(3-metil-fenil)-prop-2-enil]-1-(3-metoxi-fenil)-etil-amint, vagyis a 12G kódszámú vegyületet: m/z (relatív intenzitás) 281 (M^+ , 5), 266 (9), 176 (24), 146 (71), 135 (62), 131 (100), 115 (23), 105 (19), 91 (41), 77 (18).

A 25E kódszámú vegyület előállítása

Hasonló módon fahéjsavnitrilt diizobutil-alumínium-hidriddel kezeltünk, és az intermedier alumínium-imin-komplezet (R)-1-(3-metoxi-fenil)-etil-aminnal reagáltattuk. Az intermedier imint etanolos nátrium-[tetrahidro-borát](1-)-szal kezeltük. A feldolgozás és a kromatografálás után tiszta, színtelen, olajszerű anyag formájában kaptuk meg az (R)-N-(3-fenil-prop-2-enil)-1-(3-metoxi-fenil)-etil-amint, vagyis a 25E kódszámú vegyületet: m/z (relatív intenzitás) 267 (M^+ , 3), 252 (14), 176 (17), 135 (62), 117 (100), 105 (28), 91 (56), 77 (33).

A 25G kódszámú vegyület előállítása

Hasonló módon α -metil-fahéjsavnitrilt diizobutil-alumínium-hidriddel kezeltünk, és a keletkezett intermedier alumínium-imin-komplezet (R)-1-(3-metoxi-fenil)-etil-aminnal reagáltattuk. Az intermedier imint etanolos nátrium-[tetrahidro-borát](1-)-szal kezeltük. A feldolgozás és a kromatografálás után tiszta, színtelen, olajszerű anyag formájában kaptuk meg az (R)-N-(2-metil-3-fenil-prop-2-enil)-1-(3-metoxi-fenil)-etil-amint, vagyis a 25G kódszámú vegyületet: m/z (relatív intenzitás) 281 (M^+ , 5), 266 (18), 190 (12), 146 (78), 135 (82), 131 (100), 115 (21), 105 (21), 91 (62), 77 (19).

A 25H és a 25G kódszámú vegyületek előállítása

Hasonló módon, a környezet hőmérsékletén 4 órán át keverttünk egy olyan elegyet, amely 1 mólekvalens mennyiségű (R)-1-(3-metoxi-fenil)-etil-amint, 1 mólekvalens mennyiségű

transz-4-fenil-3-butén-2-ont és 1,25 mólekvivalens mennyiségű titán(IV)-izopropoxidot tartalmazott, majd az intermedier imint 5 ml 1 M etanolos nátrium-[ciano-triizo-borát](1)-oldattal (5 mmol) kezeltük. A feldolgozás és a kromatografálás után olajszerű anyag formájában kaptuk meg az (R,R)-N-(2-metil-4-fenil-but-3-enil)-1-(3-metoxi-fenil)-etil-amint, vagyis a 25H kódszámú vegyületet [m/z (relatív intenzitás) 283 (M+, 4), 268 (13), 178 (40), 135 (100), 105 (15), 91 (47), 77 (13)], valamint az (S,R)-N-(2-metil-4-fenil-but-3-enil)-1-(3-metoxi-fenil)-etil-amint, vagyis a 25I kódszámú vegyületet [m/z (relatív intenzitás) 283 (M+, 4), 268 (13), 178 (40), 135 (100), 105 (15), 91 (47), 77 (13)].

19. példa

Gyógyszerkészítmények

A 3. táblázatban egy olyan gyógyszerkészítmény adatait közöljük, amellyel kalcimimetikum juttatható be beteg ember szervezetébe.

3. táblázat

A komponensek megnevezése	A komponensek mennyisége, mg/kapszula	5000 kapszula elkészítéséhez tipikus esetben szükséges komponensmennyiség, g
NPS R-568	56,0	280,0
Előzselatinált keményítő (NF)	134,0	670,0
Mikrokristályos cellulóz (NF)	34,0	170,0
Kolloid szilícium-dioxid	1,0	5,0
Összesen	225	1125

Az NPS (R)-568-hidroklorid-készítmények és adagolási formák további példái közé tartoznak a szokásos eljárásokkal előállított hosszantartó vagy elnyújtott hatású készítmények.

A készítmények adagolása is szokásos módszerek alkalmazásával történhet. Az egyik kísérletsorozat végrehajtása során például 10 - 400 mg orális dózisban alkalmazva az NPS (R)-568-hidroklorid a kezelt embereknél farmakológiai aktivitást mutatott. Az NPS (R)-568-hidroklorid orális alkalmazását követően az emberi vérplazmában megfigyeléseink szerint nagy volt a 17 kódszámú vegyület O-glükuronid-konjugátumának - az NPS (R)-568 fő anyagcseretermékének - a koncentrációja. A 17Q kódszámú vegyület glükuronid-konjugátuma tehát bizonyos kedvező hatást gyakorolhat.

Az NPS (R)-568-ra szokásos módszerekkel más megfelelő adagolási határértékeket is meg lehet határozni.

A bejelentésben közölt ismeretek alapján az adott területen jártas szakember a leírásban szereplő többi vegyületre vonatkozóan is meg tudja határozni a megfelelő adagolási határértékeket, készítményeket és adagolási formákat.

A leírás végén közölt igénypontok más megvalósítási formákat is meghatároznak. Arról van szó tehát, hogy bár a leírásban számos megvalósítási módot bemutattunk és ismertettünk, azok különbözőképpen módosíthatók anélkül, hogy az új változatok eltérnének a találmány szellemétől és meghaladnák a találmány terjedelmét.

Szekvencia lista

(1) ÁLTALÁNOS INFORMÁCIÓK:

- (i) BEJELENTŐ: NPS Pharmaceuticals, Inc.
- (ii) A TALÁLmány CÍME: KALCIUM RECEPTOR-AKTÍV VEGYÜLETEK
- (iii) A szekvenciák száma: 2
- (iv) LEVELEZÉSI CÍM:

- (A) CÍMZETT: Lyon & Lyon
- (B) UTCA: First Interstate World Center,
Suite 4700
633 West Fifth Street
- (C) VÁROS: Los Angeles
- (D) ÁLLAM: Kalifornia
- (E) ORSZÁG: USA
- (F) IRÁNYÍTÓSZÁM: 90017

(v) SZÁMÍTÓGÉPES LEOLVASÁS:

- (A) ESZKÖZTÍPUS: 3,5" diszkett, 1,44 Mb-
-os tárolási kapacitás
- (B) SZÁMÍTÓGÉP: IBM-kompatibilis szemé-
lyi számítógép
- (C) OPERÁCIÓS RENDSZER: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SZOFTVER: FastSeq

(vi) A JELENLEGI BEJELENTÉSRE VONATKOZÓ ADATOK:

- (A) A BEJELENTÉS SZÁMA:
- (B) A BEJELENTÉS NAPJA:
- (C) OSZTÁLYOZÁS:

(vii) KORÁBBI BEJELENTÉSEK ADATAI:

A korábbi bejelentések száma - az alábbiakban
ismertetett bejelentést is beleértve - összesen: 2

- (A) A BEJELENTÉS SZÁMA: US 08/353 784
- (B) A BEJELENTÉS NAPJA: 1994. december 8.

- (A) A BEJELENTÉS SZÁMA: PCT/US/94/12117
- (B) A BEJELENTÉS NAPJA: 1994. október 21.

(viii) ÜGYVIVŐKKE VONATKOZÓ INFORMÁCIÓK:

- (A) NÉV: Heber, Sheldon O.
- (B) REGISZTRÁCIÓS SZÁM: 38 179
- (C) REFERENCIA/ÉRTÉK SZÁM: 215/304

(1x) TELEKOMMUNIKÁCIÓS INFORMÁCIÓK:

(A) TELEFON: (213) 489-1600
(B) TELEFAX: (213) 955 0440
(C) TELEX: 67-3510

(2) AZ 1. AZONOSÍTÁSI SZÁMÚ SZEKVENCIÁRA VONATKOZÓ
INFORMÁCIÓK:

(1) SZEKVENCIA JELLEMZŐK:

(A) HOSSZÚSÁG: 5006 bázispár
(B) TÍPUS: nukleinsav
(C) SZÁLÚSÁG: egyszálú
(D) TOPOLOGIAI ADAT: lineáris

(ii) MOLEKULA TÍPUS: cDNS - mRNS

(1x) ISMERTETŐJEL:

(A) NÉV/KULCS: CDS
(B) HELYZET: 436..3699
(D) EGYÉB INFORMÁCIÓK:

(xi) AZ 1. AZONOSÍTÁSI SZÁMÚ SZEKVENCIA ISMERTETÉSE:

GCTGCTGTGG CCGGACCCCA AGGCGGGCGC CGGGAGCGCA	40
GCGAGCCAGA CCGCCCTCTC CAAGACCGTG ACCTTGGCAT	80
AGGGAGCGGG GCTGCGCGCA GTCCTGAGAT CAGACCAGAG	120
CTCATCCTCG TGGAGACCCA CCGCCGAGGG GCCCGAGCTG	160
CCTCTGTGGG AGGGAGCCCT GCCCGCGGG CAGAAGGCAT	200
CACAGGAGGC CTCTGCATGA TGTGGCTTCC AAAGACTCAA	240
GGACCACCCA CATTACAAGT CTGGATTGAG GAAGGCAGAA	280
ATGGAGATTC AAACACCACG TCTTCTATTA TTTTATTAAT	320
CAATCTGTAG ACATGTGTCC CCACTGCAGG GAGTGAAGTG	360
CTCCAAGGGA GAAACTTCTG GGAGCCTCCA AACTCCTAGC	400
TGTCTCATCC CTTGCCCTGG AGAGACGGCA GAACC	435
ATG GCA TTT TAT AGC TGC TGC TGG GTC CTC TTG GCA	471
Met Ala Phe Tyr Ser Cys Cys Trp Val Leu Leu Ala	
1 5 10	

CTC	ACC	TGG	CAC	ACC	TCT	GCC	TAC	GGG	CCA	GAC	CAG	507
Leu	Thr	Trp	His	Thr	Ser	Ala	Tyr	Gly	Pro	Asp	Gln	
		15					20					
CGA	GCC	CAA	AAG	AAG	GGG	GAC	ATT	ATC	CTT	GGG	GGG	543
Arg	Ala	Gln	Lys	Lys	Gly	Asp	Ile	Ile	Leu	Gly	Gly	
25					30					35		
CTC	TTT	CCT	ATT	CAT	TTT	GGA	GTA	GCA	GCT	AAA	GAT	579
Leu	Phe	Pro	Ile	His	Phe	Gly	Val	Ala	Ala	Lys	Asp	
			40					45				
CAA	GAT	CTC	AAA	TCA	AGG	CCG	GAG	TCT	GTG	GAA	TGT	615
Gln	Asp	Leu	Lys	Ser	Arg	Pro	Glu	Ser	Val	Glu	Cys	
	50					55					60	
ATC	AGG	TAT	AAT	TTC	CGT	GGG	TTT	CGC	TGG	TTA	CAG	651
Ile	Arg	Tyr	Asn	Phe	Arg	Gly	Phe	Arg	Trp	Leu	Gln	
			65						70			
GCT	ATG	ATA	TTT	GCC	ATA	GAG	GAG	ATA	AAC	AGC	AGC	687
Ala	Met	Ile	Phe	Ala	Ile	Glu	Glu	Ile	Asn	Ser	Ser	
		75					80					
CCA	GCC	CTT	CTT	CCC	AAC	TTG	ACG	CTG	GGA	TAC	AGG	723
Pro	Ala	Leu	Leu	Pro	Asn	Leu	Thr	Leu	Gly	Tyr	Arg	
85					90					95		
ATA	TTT	GAC	ACT	TGC	AAC	ACC	GTT	TCT	AAG	GCC	TTG	759
Ile	Phe	Asp	Thr	Cys	Asn	Thr	Val	Ser	Lys	Ala	Leu	
			100					105				
GAA	GCC	ACC	CTG	AGT	TTT	GTT	GCT	CAA	AAC	AAA	ATT	795
Glu	Ala	Thr	Leu	Ser	Phe	Val	Ala	Gln	Asn	Lys	Ile	
	110					115					120	
GAT	TCT	TTG	AAC	CTT	GAT	GAG	TTC	TGC	AAC	TGC	TCA	831
Asp	Ser	Leu	Asn	Leu	Asp	Glu	Phe	Cys	Asn	Cys	Ser	
				125					130			
GAG	CAC	ATT	CCC	TCT	ACG	ATT	GCT	GTG	GTG	GGA	GCA	867
Glu	His	Ile	Pro	Ser	Thr	Ile	Ala	Val	Val	Gly	Ala	
		135					140					
ACT	GGC	TCA	GGC	GTC	TCC	ACG	GCA	GTG	GCA	AAT	CTG	903
Thr	Gly	Ser	Gly	Val	Ser	Thr	Ala	Val	Ala	Asn	Leu	
145					150					155		
CTG	GGG	CTC	TTC	TAC	ATT	CCC	CAG	GTC	AGT	TAT	GCC	939
Leu	Gly	Leu	Phe	Tyr	Ile	Pro	Gln	Val	Ser	Tyr	Ala	
			160					165				
TCC	TCC	AGC	AGA	CTC	CTC	AGC	AAC	AAG	AAT	CAA	TTC	975
Ser	Ser	Ser	Arg	Leu	Leu	Ser	Asn	Lys	Asn	Gln	Phe	
	170					175					180	

AAG Lys	TCT Ser	TTC Phe	CTC Leu	CGA Arg	ACC Thr	ATC Ile	CCC Pro	AAT Asn	GAT Asp	GAG Glu	CAC His	1011
				185					190			
CAG Gln	GCC Ala	ACT Thr	GCC Ala	ATG Met	GCA Ala	GAC Asp	ATC Ile	ATC Ile	GAG Glu	TAT Tyr	TTC Phe	1047
		195					200					
CGC Arg	TGG Trp	AAC Asn	TGG Trp	GTG Val	GGC Gly	ACA Thr	ATT Ile	GCA Ala	GCT Ala	GAT Asp	GAC Asp	1083
205					210					215		
GAC Asp	TAT Tyr	GGG Gly	CGG Arg	CCG Pro	GGG Gly	ATT Ile	GAG Glu	AAA Lys	TTC Phe	CGA Arg	GAG Glu	1119
			220					225				
GAA Glu	GCT Ala	GAG Glu	GAA Glu	AGG Arg	GAT Asp	ATC Ile	TGC Cys	ATC Ile	GAC Asp	TTC Phe	AGT Ser	1155
	230					235					240	
GAA Glu	CTC Leu	ATC Ile	TCC Ser	CAG Gln	TAC Tyr	TCT Ser	GAT Asp	GAG Glu	GAA Glu	GAG Glu	ATC Ile	1191
				245					250			
CAG Gln	CAT His	GTG Val	GTA Val	GAG Glu	GTG Val	ATT Ile	CAA Gln	AAT Asn	TCC Ser	ACG Thr	GCC Ala	1227
		255					260					
AAA Lys	GTC Val	ATC Ile	GTG Val	GTT Val	TTC Phe	TCC Ser	AGT Ser	GGC Gly	CCA Pro	GAT Asp	CTT Leu	1263
265					270					275		
GAG Glu	CCC Pro	CTC Leu	ATC Ile	AAG Lys	GAG Glu	ATT Ile	GTC Val	CCG Arg	CGC Arg	AAT Asn	ATC Ile	1299
			280					285				
ACG Thr	GGC Gly	AAG Lys	ATC Ile	TGG Trp	CTG Leu	GCC Ala	AGC Ser	GAG Glu	GCC Ala	TGG Trp	GCC Ala	1335
	290					295					300	
AGC Ser	TCC Ser	TCC Ser	CTG Leu	ATC Ile	GCC Ala	ATG Met	CCT Pro	CAG Gln	TAC Tyr	TTC Phe	CAC His	1371
				305					310			
GTG Val	GTT Val	GGC Gly	GGC Gly	ACC Thr	ATT Ile	GGA Gly	TTC Phe	GCT Ala	CTG Leu	AAG Lys	GCT Ala	1407
		315				320						
GGG Gly	CAG Gln	ATC Ile	CCA Pro	GGC Gly	TTC Phe	CGG Arg	GAA Glu	TTC Phe	CTG Leu	AAG Lys	AAG Lys	1443
325					330					335		
GTC Val	CAT His	CCC Pro	AGG Arg	AAG Lys	TCT Ser	GTC Val	CAC His	AAT Asn	GGT Gly	TTT Phe	GCC Ala	1479
			340					345				

AAG GAG TTT TGG GAA GAA ACA TTT AAC TGC CAC CTC	1515
Lys Glu Phe Trp Glu Glu Thr Phe Asn Cys His Leu	
350 355 360	
CAA GAA GGT GCA AAA GGA CCT TTA CCT GTG GAC ACC	1551
Gln Glu Gly Ala Lys Gly Pro Leu Pro Val Asp Thr	
365 370	
TTT CTG AGA GGT CAC GAA GAA AGT GGC GAC AGG TTT	1587
Phe Leu Arg Gly His Glu Glu Ser Gly Asp Arg Phe	
375 380	
AGC AAC AGC TCG ACA GCC TTC CGA CCC CTC TGT ACA	1623
Ser Asn Ser Ser Thr Ala Phe Arg Pro Leu Cys Thr	
385 390 395	
GGG GAT GAG AAC ATC AGC AGT GTC GAG ACC CCT TAC	1659
Gly Asp Glu Asn Ile Ser Ser Val Glu Thr Pro Tyr	
400 405	
ATA GAT TAC ACG CAT TTA CGG ATA TCC TAC AAT GTG	1695
Ile Asp Tyr Thr His Leu Arg Ile Ser Tyr Asn Val	
410 415 420	
TAC TTA GCA GTC TAC TCC ATT GCC CAC GCC TTG CAA	1731
Tyr Leu Ala Val Tyr Ser Ile Ala His Ala Leu Gln	
425 430	
GAT ATA TAT ACC TGC TTA CCT GGG AGA GGG CTC TTC	1767
Asp Ile Tyr Thr Cys Leu Pro Gly Arg Gly Leu Phe	
435 440	
ACC AAT GGC TCC TGT GCA GAC ATC AAG AAA GTT GAG	1803
Thr Asn Gly Ser Cys Ala Asp Ile Lys Lys Val Glu	
445 450 455	
CGG TGG CAG GTC CTG AAG CAC CTA CGG CAT CTA AAC	1839
Ala Trp Gln Val Leu Lys His Leu Arg His Leu Asn	
460 465	
TTT ACA AAC AAT ATG GGG GAG CAG GTG ACC TTT GAT	1875
Phe Thr Asn Asn Met Gly Glu Gln Val Thr Phe Asp	
470 475 480	
GAG TGT GGT GAC CTG GTG GGG AAC TAT TCC ATC ATC	1911
Glu Cys Gly Asp Leu Val Gly Asn Tyr Ser Ile Ile	
485 490	
AAC TGG CAC CTC TCC CCA GAG GAT GGC TCC ATC GTG	1947
Asn Trp His Leu Ser Pro Glu Asp Gly Ser Ile Val	
495 500	
TTT AAG GAA GTC GGG TAT TAC AAC GTC TAT GCC AAG	1983
Phe Lys Glu Val Gly Tyr Tyr Asn Val Tyr Ala Lys	
505 510 515	

AAG Lys	GGA Gly	GAA Glu	AGA Arg 520	CTC Leu	TTC Phe	ATC Ile	AAC Asn	GAG Glu 525	GAG Glu	AAA Lys	ATC Ile	2019
CTG Leu	TGG Trp 530	AGT Ser	GGG Gly	TTC Phe	TCC Ser	AGG Arg 535	GAG Glu	CCA Pro	CTC Leu	ACC Thr	TTT Phe 540	2055
GTG Val	CTG Leu	TCT Ser	GTC Val	CTC Leu 545	CAG Gln	GTG Val	CCC Pro	TTC Phe	TCC Ser 550	AAC Asn	TGC Cys	2091
AGC Ser	CGA Arg	GAC Asp 555	TGC Cys	CTG Leu	GCA Ala	GGG Gly	ACC Thr 560	AGG Arg	AAA Lys	GGG Gly	ATC Ile	2127
ATT Ile 565	GAG Glu	GGG Gly	GAG Glu	CCC Pro	ACC Thr 570	TGC Cys	TGC Cys	TTT Phe	GAG Glu	TGT Cys 575	GTG Val	2163
GAG Glu	TGT Cys	CCT Pro	GAT Asp 580	GGG Gly	GAG Glu	TAT Tyr	AGT Ser	GAT Asp 585	GAG Glu	ACA Thr	GAT Asp	2199
GCC Ala 590	AGT Ser	GCC Ala	TGT Cys	AAC Asn	AAG Lys	TGC Cys 595	CCA Pro	GAT Asp	GAC Asp	TTC Phe	TGG Trp 600	2235
TCC Ser	AAT Asn	GAG Glu	AAC Asn	CAC His 605	ACC Thr	TCC Ser	TGC Cys	ATT Ile	GCC Ala 610	AAG Lys	GAG Glu	2271
ATC Ile	GAG Glu	TTT Phe 615	CTG Leu	TCG Ser	TGG Trp	ACG Thr	GAG Glu 620	CCC Pro	TTT Phe	GGG Gly	ATC Ile	2307
GCA Ala 625	CTC Leu	ACC Thr	CTC Leu	TTT Phe 630	GCC Ala	GTG Val	CTG Leu	GGC Gly	ATT Ile	TTC Phe 635	CTG Leu	2343
ACA Thr	GCC Ala	TTT Phe 640	GTG Val	CTG Leu	GGT Gly	GTG Val	TTT Phe 645	ATC Ile	AAG Lys	TTC Phe	CGC Arg	2379
AAC Asn 650	ACA Thr	CCC Pro	ATT Ile	GTC Val	AAG Lys	GCC Ala 655	ACC Thr	AAC Asn	CGA Arg	GAG Glu	CTC Leu 660	2415
TCC Ser	TAC Tyr	CTC Leu	CTC Leu	CTC Leu 665	TTC Phe	TCC Ser	CTG Leu	CTC Leu	TGC Cys 670	TGC Cys	TTC Phe	2451
TCC Ser	AGC Ser	TCC Ser 675	CTG Leu	TTC Phe	TTC Phe	ATC Ile	GGG Gly 680	GAG Glu	CCC Pro	CAG Gln	GAC Asp	2487

TGG Trp 685	ACG Thr	TGC Cys	CGC Arg	CTG Leu	CGC Arg 690	CAG Gln	CCG Pro	GCC Ala	TTT Phe	GGC Gly 695	ATC Ile	2523
AGC Ser	TTC Phe	GTG Val	CTC Leu 700	TGC Cys	ATC Ile	TCA Ser	TGC Cys	ATC Ile 705	CTG Leu	GTG Val	AAA Lys	2559
ACC Thr 710	AAC Asn	CGT Arg	GTC Val	CTC Leu	CTG Leu 715	GTG Val	TTT Phe	GAG Glu	GCC Ala	AAG Lys 720	ATC Ile	2595
CCC Pro	ACC Thr	AGC Ser	TTC Phe	CAC His 725	CGC Arg	AAG Lys	TGG Trp	TGG Trp	GGG Gly 730	CTC Leu	AAC Asn	2631
CTG Leu	CAG Gln	TTC Phe 735	CTG Leu	CTG Leu	GTT Val	TTC Phe	CTC Leu 740	TGC Cys	ACC Thr	TTC Phe	ATG Met	2667
CAG Gln 745	ATT Ile	GTC Val	ATC Ile	TGT Cys	GTG Val 750	ATC Ile	TGG Trp	CTC Leu	TAC Tyr	ACC Thr 755	GCG Ala	2703
CCC Pro	CCC Pro	TCA Ser	AGC Ser 760	TAC Tyr	CGC Arg	AAC Asn	CAG Gln	GAG Glu 765	CTG Leu	GAG Glu	GAT Asp	2739
GAG Glu 770	ATC Ile	ATC Ile	TTC Phe	ATC Ile	ACG Thr	TGC Cys 775	CAC His	GAG Glu	GGC Gly	TCC Ser	CTC Leu 780	2775
ATG Met	GCC Ala	CTG Leu	GGC Gly	TTC Phe 785	CTG Leu	ATC Ile	GCC Gly	TAC Tyr	ACC Thr 790	TCC Cys	CTG Leu	2811
CTG Leu	GCT Ala	GCC Ala 795	ATC Ile	TGC Cys	TTC Phe	TTC Phe	TTT Phe 800	GCC Ala	TTC Phe	AAG Lys	TCC Ser	2847
CGG Arg 805	AAG Lys	CTG Leu	CCG Pro	GAG Glu	AAC Asn 810	TTC Phe	AAT Asn	GAA Glu	GCC Ala	AAG Lys 815	TTC Phe	2883
ATC Ile	ACC Thr	TTC Phe	AGC Ser 820	ATG Met	CTC Leu	ATC Ile	TTC Phe	TTC Phe 825	ATC Ile	GTC Val	TGG Trp	2919
ATC Ile 830	TCC Ser	TTC Phe	ATT Ile	CCA Pro	GCC Ala	TAT Tyr 835	GCC Ala	AGC Ser	ACC Thr	TAT Tyr	GGC Gly 840	2955
AAG Lys	TTT Phe	GTC Val	TCT Ser	GCC Ala 845	GTA Val	GAG Glu	GTG Val	ATT Ile	GCC Ala 850	ATC Ile	CTG Leu	2991

GCA Ala	GCC Ala	AGC Ser 855	TTT Phe	GGC Gly	TTG Leu	CTG Leu	GCG Ala	TGC Cys	ATC Ile	TTC Phe	TTC Phe	3027
AAC Asn 865	AAG Lys	ATC Ile	TAC Tyr	ATC Ile	ATT Ile	CTC Leu	TTC Phe	AAG Lys	CCA Pro	TCC Ser	CGC Arg	3063
AAC Asn	ACC Thr	ATC Ile	GAG Glu	GAG Glu	GTG Val	CCT Arg	TGC Cys	AGC Ser	ACC Thr	GCA Ala	GCT Ala	3099
CAC His	GCT Ala	TTC Phe	AAG Lys	GTG Val	GCT Ala	GCC Ala	CGG Arg	GCC Ala	ACG Thr	CTG Leu	CGC Arg	3135
CGC Arg	AGC Ser	AAC Asn	GTC Val	TCC Ser	CGC Arg	AAG Lys	CGG Arg	TCC Ser	AGC Ser	AGC Ser	CTT Leu	3171
GGA Gly	GGC Gly	TCC Ser	ACG Thr	GGA Gly	TCC Ser	ACC Thr	CCC Pro	TCC Ser	TCC Ser	TCC Ser	ATC Ile	3207
AGC Ser 925	AGC Ser	AAG Lys	AGC Ser	AAC Asn	AGC Ser	GAA Glu	GAC Asp	CCA Pro	TTC Phe	CCA Pro	CGG Arg	3243
CCC Pro	GAG Glu	AGG Arg	CAG Gln	AAG Lys	CAG Gln	CAG Gln	CAG Gln	CCG Pro	CTG Leu	GCC Ala	CTA Leu	3279
ACC Thr	CAG Gln	CAA Gln	GAG Glu	CAG Gln	CAG Gln	CAG Gln	CAG Gln	CCC Pro	CTG Leu	ACC Thr	CTC Leu	3315
CCA Pro	CAG Gln	CAG Gln	CAA Gln	CGA Arg	TCT Ser	CAG Gln	CAG Gln	CAG Gln	CCC Pro	AGA Arg	TGC Cys	3351
AAG Lys	CAG Gln	AAG Lys	GTC Val	ATC Ile	TTT Phe	GGC Gly	AGC Ser	GGC Gly	ACG Thr	GTC Val	ACC Thr	3387
TTC Phe 985	TCA Ser	CTG Leu	AGC Ser	TTT Phe	GAT Asp	GAG Glu	CCT Pro	CAG Gln	AAG Lys	AAC Asn	GCC Ala	3423
ATG Met	GCC Ala	CAC His	AGG Arg	AAT Asn	TCT Ser	ACG Thr	CAC His	CAG Gln	AAC Asn	TCC Ser	CTG Leu	3459
GAG Glu	GCC Ala	CAG Gln	AAA Lys	AGC Ser	AGC Ser	GAT Asp	ACG Thr	CTG Leu	ACC Thr	CGA Arg	CAC His	3495

CAG CCA TTA CTC CCG CTG CAG TGC GGG GAA ACG GAC Gln Pro Leu Leu Pro Leu Gln Cys Gly Glu Thr Asp 1025 1030	3531
TTA GAT CTG ACC GTC CAG GAA ACA GGT CTG CAA GGA Leu Asp Leu Thr Val Gln Glu Thr Gly Leu Gln Gly 1035 1040	3567
CCT GTG GGT GGA GAC CAG CCG CCA GAG GTG GAG GAC Pro Val Gly Gly Asp Gln Arg Pro Glu Val Glu Asp 1045 1050 1055	3603
CCT GAA GAG TTG TCC CCA GCA CTT GTA GTG TCC AGT Pro Glu Glu Leu Ser Pro Ala Leu Val Val Ser Ser 1060 1065	3639
TCA CAG AGC TTT GTC ATC AGT GGT GGA GGC AGC ACT Ser Gln Ser Phe Val Ile Ser Gly Gly Gly Ser Thr 1070 1075 1080	3675
GTT ACA GAA AAC GTA GTG AAT TCA TAAAATGGAA Val Thr Glu Asn Val Val Asn Ser 1085	3709
GSAGAAGACT GGGCTAGGGA GAATGCAGAG AGGTTTCTTG	3749
GGGTCCCAGG GATGAGSAAT CGCCCCAGAC TCCTTTCCTC	3789
TGAGGAAGAA GGGATAATAG ACACATCAAA TGCCCCGAAT	3829
TTAGTCACAC CATCTTAAAT GACAGTGAAT TGACCCATGT	3869
TCCCTTTAAA ATTAAAAAAA AGAAGAGCCT TGIGTTTTCTG	3909
TGGTTGCATT TGTCAAAGCA TTGAGATCTC CACGGTCAGA	3949
TTTGCTGTTT ACCCACATCT AATGTCTCTT CCTCTGTTCT	3989
ATCCCACCCA ACAGCTCAGA GATGAAACTA TGGCTTTAAA	4029
CTACCCTCCA GAGTGTGCAG ACTGATGGGA CATCAAATTT	4069
GCCACCACTA GAGCTGAGAG TCTGAAAGAC AGAATGTCAC	4109
CAGTCCTGCC CAATGCCTTG ACAACAGACT GAATTTTAAA	4149
TGTTCAACAAC ATAAGGAGAA TGTATCTCCT CCTATTTATG	4189
AAAACCATAT GATATTTTGT CTCCTACCTG CTGCTGCTAT	4229
TATGTAACAT CCAGAAGGTT TGCACCCCTC CTATACCATA	4269
TGTCTGGTTC TGTCCAGGAC ATGATACTGA TGCCATGTTT	4309
AGATTCCAGG ATCACAAGAA TCACCTCAAA TTGTTAGGAA	4349

GGGACTGCAT AAACCAATGA GCTGTATCTG TAATTAATAT	4389
TCCTATATGT AGCTTTATCC TTAGGAAAAT GCTTCTGTTG	4429
TAATAGTCCA TGGACAATAT AAAGTGAATA ATGTCAGTCT	4469
GGTTTATATA AGGCAGTATT ATTGAGCTCT ATTTCCCCAC	4509
CCCCTATATCC TCACTCCCAT AAGCTAAGCC TTATGTGAGC	4549
CCCTTCAGGG ACTCAAGGGT CCAGAAGTCC CTCCCATCTC	4589
TACCCCAAAG AATTCCTGAA GCCAGATCCA CCCTATCCCT	4629
GTACAGAGTA AGTTCTCAAT TATTGGCCTG CTAATAGCTG	4669
CTAGGSTAGG AAAGCGTGGT TCCAGAAAAG ATCCACCCTC	4709
AAATGTCGGA GCTATGTTCC CTCCAGCAGT GGTATTAATA	4749
CTGCCGGTCA CCCAGGCTCT GGAGCCAGAG AGACAGACCG	4789
GGGTTCAAGC CATGGCTTCG TCATTTGCAA GCTGAGTGAC	4829
TGTAGGCAGG GAACCTTAAC CTCTCTAAGC CACAGCTTCT	4869
TCATCTTTAA AATAAGGATA ATAATCATT CTCCCCCTCA ...	4909
GAGCTCTTAT GTGGATTAAA CGAGATAATG TATATAAGT	4949
ACTTTAGCCT GGTACCTAGC ACACAATAAG CATTCAATAA	4989
ATATTAGTTA ATATTAT	5006

(2) A 2. AZONOSÍTÁSI SZÁMÚ SZEKVENCIAÁRA VONATKOZÓ
INFORMÁCIÓK:

(i) SZEKVENCIA JELLEMZŐK:

(A) HOSSZÚSÁG: 3809 bázispár
(B) TÍPUS: nukleinsav
(C) SZÁLÚSÁG: egyszálú
(D) TOPOLOGIAI ADAT: lineáris

(ii) MOLEKULA TÍPUS: cDNS - mRNS

(ix) ISMERTETŐJEL:

(A) NÉV/KULCS: CDS
(B) HELYZET: 373..3606
(D) EGYÉB INFORMÁCIÓK:

(xi) A 2. AZONOSÍTÁSI SZÁMÚ SZEKVENCIA ISMERTETÉSE:

TTTCGCGCAG GAGAGTGGAA GGAGGGAGCT GTTTGCCAGC	80
ACCGAGGTCT TGCGGCACAG GCAACGCTTG ACCTGAGTCT	120
TGCAGAATGA AAGGCATCAC AGGAGGCCTC TGCATGATGT	160
GGCTTCCAAA GACTCAAGGA CCACCCACAT TACAAGTCTG	200
GATTGAGGAA GGCAGAAATG GAGATTCAAA CACCACGTCT	240
TCTATTATTT TATTAATCAA TCTGTAGACA TGTGTCCCCA	280
CTGCAGGGAG TGAAGTGTCT CAAGGGAGAA ACTTCTGGGA	320
GCCTCCAAAC TCCTAGCTGT CTCATCCCTT GCCCTGGAGA	360
GACGGCAGAA CC ATG GCA TTT TAT AGC TGC TGC TGG	396
Met Ala Phe Tyr Ser Cys Cys Trp	
1 5	
GTC CTC TTG GCA CTC ACC TGG CAC ACC TCT GCC TAC	432
Val Leu Leu Ala Leu Thr Trp His Thr Ser Ala Tyr	
10 15 20	
GGG CCA GAC CAG CGA GCC CAA AAG AAG GGG GAC ATT	468
Gly Pro Asp Gln Arg Ala Gln Lys Lys Gly Asp Ile	
25 30	
ATC CTT GGG GGG CTC TTT CCT ATT CAT TTT GGA GTA	504
Ile Leu Gly Gly Leu Phe Pro Ile His Phe Gly Val	
35 40	
GCA GCT AAA GAT CAA GAT CTC AAA TCA AGG CCG GAG	540
Ala Ala Lys Asp Gln Asp Leu Lys Ser Arg Pro Glu	
45 50 55	
TCT GTG GAA TGT ATC AGG TAT AAT TTC CGT GGG TTT	576
Ser Val Glu Cys Ile Arg Tyr Asn Phe Arg Gly Phe	
60 65	
CGC TGG TTA CAG GCT ATG ATA TTT GCC ATA GAG GAG	612
Arg Trp Leu Gln Ala Met Ile Phe Ala Ile Glu Glu	
70 75 80	
ATA AAC AGC AGC CCA GCC CTT CTT CCC AAC TTG ACG	648
Ile Asn Ser Ser Pro Ala Leu Leu Pro Asn Leu Thr	
85 90	
CTG GGA TAC AGG ATA TTT GAC ACT TGC AAC ACC GTT	684
Leu Gly Tyr Arg Ile Phe Asp Thr Cys Asn Thr Val	
95 100	
TCT AAG GCC TTG GAA GCC ACC CTG AGT TTT GTT GCT	720
Ser Lys Ala Leu Glu Ala Thr Leu Ser Phe Val Ala	
105 110 115	

CAA AAC AAA ATT GAT TCT TTG AAC CTT GAT GAG TTC	756
Gln Asn Lys Ile Asp Ser Leu Asn Leu Asp Glu Phe	
120 125	
TGC AAC TGC TCA GAG CAC ATT CCC TCT ACG ATT GCT	792
Cys Asn Cys Ser Glu His Ile Pro Ser Thr Ile Ala	
130 135 140	
GTG GTG GGA GCA ACT GGC TCA GGC GTC TCC ACG GCA	828
Val Val Gly Ala Thr Gly Ser Gly Val Ser Thr Ala	
145 150	
GTG GCA AAT CTG CTG GGG CTC TTC TAC ATT CCC CAG	864
Val Ala Asn Leu Leu Gly Leu Phe Tyr Ile Pro Gln	
155 160	
GTC AGT TAT GCC TCC TCC AGC AGA CTC CTC AGC AAC	900
Val Ser Tyr Ala Ser Ser Ser Arg Leu Leu Ser Asn	
165 170 175	
AAG AAT CAA TTC AAG TCT TTC CTC CGA ACC ATC CCC	936
Lys Asn Gln Phe Lys Ser Phe Leu Arg Thr Ile Pro	
180 185	
AAT GAT GAG CAC CAG GCC ACT GCC ATG GCA GAC ATC	972
Asn Asp Glu His Gln Ala Thr Ala Met Ala Asp Ile	
190 195 200	
ATC GAG TAT TTC CGC TGG AAC TGG GTG GGC ACA ATT	1008
Ile Glu Tyr Phe Arg Trp Asn Trp Val Gly Thr Ile	
205 210	
GCA GCT GAT GAC GAC TAT GGG CGG CCG GGG ATT GAG	1044
Ala Ala Asp Asp Asp Tyr Gly Arg Pro Gly Ile Glu	
215 220	
AAA TTC CGA GAG GAA GCT GAG GAA AGG GAT ATC TGC	1080
Lys Phe Arg Glu Glu Ala Glu Glu Arg Asp Ile Cys	
225 230 235	
ATC GAC TTC AGT GAA CTC ATC TCC CAG TAC TCT GAT	1116
Ile Asp Phe Ser Glu Leu Ile Ser Gln Tyr Ser Asp	
240 245	
GAG GAA GAG ATC CAG CAT GTG GTA GAG GTG ATT CAA	1152
Glu Glu Glu Ile Gln His Val Val Glu Val Ile Gln	
250 255 260	
AAT TCC ACG GCC AAA GTC ATC GTG GTT TTC TCC AGT	1188
Asn Ser Thr Ala Lys Val Ile Val Val Phe Ser Ser	
265 270	
GGC CCA GAT CTT GAG CCC CTC ATC AAG GAG ATT GTC	1224
Gly Pro Asp Leu Glu Pro Leu Ile Lys Glu Ile Val	
275 280	

CGG Arg 285	CGC Arg	AAT Asn	ATC Ile	ACG Thr	GGC Gly 290	AAG Lys	ATC Ile	TGG Trp	CTG Leu	GCC Ala 295	AGC Ser	1260
GAG Glu	GCC Ala	TGG Trp	GCC Ala 300	AGC Ser	TCC Ser	TCC Ser	CTG Leu	ATC Ile 305	GCC Ala	ATG Met	CCT Pro	1296
CAG Gln 310	TAC Tyr	TTC Phe	CAC His	GTG Val	GTT Val	GGC Gly 315	GGC Gly	ACC Thr	ATT Ile	GGA Gly	TTC Phe 320	1332
GCT Ala	CTG Leu	AAG Lys	GCT Ala	GGG Gly 325	CAG Gln	ATC Ile	CCA Pro	GGC Gly	TTC Phe 330	CGG Arg	GAA Glu	1368
TTC Phe	CTG Leu	AAG Lys 335	AAG Lys	GTC Val	CAT His	CCC Pro	AGG Arg 340	AAG Lys	TCT Ser	GTC Val	CAC His	1404
AAT Asn 345	GGT Gly	TTT Phe	GCC Ala	AAG Lys	GAG Glu 350	TTT Phe	TGG Trp	GAA Glu	GAA Glu	ACA Thr 355	TTT Phe	1440
AAC Asn	TGC Cys	CAC His	CTC Leu 360	CAA Gln	GAA Glu	GGT Gly	GCA Ala	AAA Lys 365	GGA Gly	CCT Pro	TTA Leu	1476
CCT Pro	GTG Val 370	GAC Asp	ACC Thr	TTT Phe	CTG Leu	AGA Arg 375	GGT Gly	CAC His	GAA Glu	GAA Glu	AGT Ser 380	1512
GGC Gly	GAC Asp	AGG Arg	TTT Phe	AGC Ser 385	AAC Asn	AGC Ser	TCG Ser	ACA Thr	GCC Ala 390	TTC Phe	CGA Arg	1548
CCC Pro	CTC Leu	TGT Cys 395	ACA Thr	GGG Gly	GAT Asp	GAG Glu	AAC Asn 400	ATC Ile	AGC Ser	AGT Ser	GTC Val	1584
GAG Glu 405	ACC Thr	CCT Pro	TAC Tyr	ATA Ile	GAT Asp 410	TAC Tyr	ACG Thr	CAT His	TTA Leu	CGG Arg 415	ATA Ile	1620
TCC Ser	TAC Tyr	AAT Asn	GTG Val 420	TAC Tyr	TTA Leu	GCA Ala	GTC Val	TAC Tyr 425	TCC Ser	ATT Ile	GCC Ala	1656
CAC His 430	GCC Ala	TTG Leu	CAA Gln	GAT Asp	ATA Ile	TAT Tyr 435	ACC Thr	TGC Cys	TTA Leu	CCT Pro	GGG Gly 440	1692
AGA Arg	GGG Gly	CTC Leu	TTC Phe	ACC Thr 445	AAT Asn	GGC Gly	TCC Ser	TGT Cys	GCA Ala 450	GAC Asp	ATC Ile	1728

AAG Lys	AAA Lys	GTT Val	GAG Glu	GGG Ala	TGG Trp	CAG Gln	GTC Val	CTG Leu	AAG Lys	CAC His	CTA Leu	1764
		455					460					
CGG Arg	CAT His	CTA Leu	AAC Asn	TTT Phe	ACA Thr	AAC Asn	AAT Asn	ATG Met	GGG Gly	GAG Glu	CAG Gln	1800
465					470					475		
GTG Val	ACC Thr	TTT Phe	GAT Asp	GAG Glu	TGT Cys	GGT Gly	GAC Asp	CTG Leu	GTG Val	GGG Gly	AAC Asn	1836
			480					485				
TAT Tyr	TCC Ser	ATC Ile	ATC Ile	AAC Asn	TGG Trp	CAC His	CTC Leu	TCC Ser	CCA Pro	GAG Glu	GAT Asp	1872
	490					495					500	
GGC Gly	TCC Ser	ATC Ile	GTG Val	TTT Phe	AAG Lys	GAA Glu	GTC Val	GGG Gly	TAT Tyr	TAC Tyr	AAC Asn	1908
				505					510			
GTC Val	TAT Tyr	GCC Ala	AAG Lys	AAG Lys	GGA Gly	GAA Glu	AGA Arg	CTC Leu	TTC Phe	ATC Ile	AAC Asn	1944
		515					520					
GAG Glu	GAG Glu	AAA Lys	ATC Ile	CTG Leu	TGG Trp	AGT Ser	GGG Gly	TTC Phe	TCC Ser	AGG Arg	GAG Glu	1980
525					530					535		
GTG Val	CCC Pro	TTC Phe	TCC Ser	AAC Asn	TGC Cys	AGC Ser	CGA Arg	GAC Asp	TGC Cys	CTG Leu	GCA Ala	2016
			540					545				
GGG Gly	ACC Thr	AGG Arg	AAA Lys	GGG Gly	ATC Ile	ATT Ile	GAG Glu	GGG Gly	GAG Glu	CCC Pro	ACC Thr	2052
	550					555					560	
TGC Cys	TGC Cys	TTT Phe	GAG Glu	TGT Cys	GTG Val	GAG Glu	TGT Cys	CCT Pro	GAT Asp	GGG Gly	GAG Glu	2088
				565					570			
TAT Tyr	AGT Ser	GAT Asp	GAG Glu	ACA Thr	GAT Asp	GCC Ala	AGT Ser	GCC Ala	TGT Cys	AAC Asn	AAG Lys	2124
		575					580					
TGC Cys	CCA Pro	GAT Asp	GAC Asp	TTC Phe	TGG Trp	TCC Ser	AAT Asn	GAG Glu	AAC Asn	CAC His	ACC Thr	2160
585					590					595		
TCC Ser	TGC Cys	ATT Ile	CCC Ala	AAG Lys	GAG Glu	ATC Ile	GAG Glu	TTT Phe	CTG Leu	TCG Ser	TGG Trp	2196
			600					605				
ACG Thr	GAG Glu	CCC Pro	TTT Phe	GGG Gly	ATC Ile	GCA Ala	CTC Leu	ACC Thr	CTC Leu	TTT Phe	GCC Ala	2232
	610					615					620	

GTG	CTG	GCC	ATT	TTC	CTG	ACA	GCC	TTT	GTG	CTG	GGT	2258
Val	Leu	Gly	Ile	Phe	Leu	Thr	Ala	Phe	Val	Leu	Gly	
				625					630			
GTG	TTT	ATC	AAG	TTC	CGC	AAC	ACA	CCC	ATT	GTC	AAG	2304
Val	Phe	Ile	Lys	Phe	Arg	Asn	Thr	Pro	Ile	Val	Lys	
		635					640					
GCC	ACC	AAC	CGA	GAG	CTC	TCC	TAC	CTC	CTC	CTC	TTC	2340
Ala	Thr	Asn	Arg	Glu	Leu	Ser	Tyr	Leu	Leu	Leu	Phe	
645				650						655		
TCC	CTG	CTC	TGC	TGC	TTC	TCC	AGC	TCC	CTG	TTC	TTC	2376
Ser	Leu	Leu	Cys	Cys	Phe	Ser	Ser	Ser	Leu	Phe	Phe	
			660					665				
ATC	GGG	GAG	CCC	CAG	GAC	TGG	ACG	TGC	CGC	CTG	CGC	2412
Ile	Gly	Glu	Pro	Gln	Asp	Trp	Thr	Cys	Arg	Leu	Arg	
	670					675					680	
CAG	CCG	GCC	TTT	GGC	ATC	AGC	TTC	GTG	CTC	TGC	ATC	2448
Gln	Pro	Ala	Phe	Gly	Ile	Ser	Phe	Val	Leu	Cys	Ile	
				685					690			
TCA	TGC	ATC	CTG	GTG	AAA	ACC	AAC	CGT	GTC	CTC	CTG	2484
Ser	Cys	Ile	Leu	Val	Lys	Thr	Asn	Arg	Val	Leu	Leu	
		695					700					
GTG	TTT	GAG	GCC	AAG	ATC	CCC	ACC	AGC	TTC	CAC	CGC	2520
Val	Phe	Glu	Ala	Lys	Ile	Pro	Thr	Ser	Phe	His	Arg	
705					710					715		
AAG	TGG	TGG	GGG	CTC	AAC	CTG	CAG	TTC	CTG	CTG	GTT	2556
Lys	Trp	Trp	Gly	Leu	Asn	Leu	Gln	Phe	Leu	Leu	Val	
			720					725				
TTC	CTC	TGC	ACC	TTC	ATG	CAG	ATT	GTC	ATC	TGT	GTG	2592
Phe	Leu	Cys	Thr	Phe	Met	Gln	Ile	Val	Ile	Cys	Val	
	730					735					740	
ATC	TGG	CTC	TAC	ACC	GCG	CCC	CCC	TCA	AGC	TAC	CGC	2628
Ile	Trp	Leu	Tyr	Thr	Ala	Pro	Pro	Ser	Ser	Tyr	Arg	
				745					750			
AAC	CAG	GAG	CTG	GAG	GAT	GAG	ATC	ATC	TTC	ATC	ACG	2664
Asn	Gln	Glu	Leu	Glu	Asp	Glu	Ile	Ile	Phe	Ile	Thr	
		755					760					
TGC	CAC	GAG	GGC	TCC	CTC	ATG	GCC	CTG	GGC	TTC	CTG	2700
Cys	His	Glu	Gly	Ser	Leu	Met	Ala	Leu	Gly	Phe	Leu	
765					770					775		
ATC	GGC	TAC	ACC	TGC	CTG	CTG	GCT	GCC	ATC	TGC	TTC	2736
Ile	Gly	Tyr	Thr	Cys	Leu	Leu	Ala	Ala	Ile	Cys	Phe	
			780					785				

TTC	TTT	GCC	TTC	AAG	TCC	CGG	AAG	CTG	CCG	GAG	AAC	2772
Phe	Phe	Ala	Phe	Lys	Ser	Arg	Lys	Leu	Pro	Glu	Asn	
	790					795					800	
TTC	AAT	GAA	GCC	AAG	TTC	ATC	ACC	TTC	AGC	ATG	CTC	2808
Phe	Asn	Glu	Ala	Lys	Phe	Ile	Thr	Phe	Ser	Met	Leu	
				805					810			
ATC	TTC	TTC	ATC	GTC	TGG	ATC	TCC	TTC	ATT	CCA	GCC	2844
Ile	Phe	Phe	Ile	Val	Trp	Ile	Ser	Phe	Ile	Pro	Ala	
		815					820					
TAT	GCC	AGC	ACC	TAT	GGC	AAG	TTT	GTC	TCT	GCC	GTA	2880
Tyr	Ala	Ser	Thr	Tyr	Gly	Lys	Phe	Val	Ser	Ala	Val	
825					830					835		
GAG	GTG	ATT	GCC	ATC	CTG	GCA	GCC	AGC	TTT	GGC	TTG	2916
Glu	Val	Ile	Ala	Ile	Leu	Ala	Ala	Ser	Phe	Gly	Leu	
			840					845				
CTG	GCG	TGC	ATC	TTC	TTC	AAC	AAG	ATC	TAC	ATC	ATT	2952
Leu	Ala	Cys	Ile	Phe	Phe	Asn	Lys	Ile	Tyr	Ile	Ile	
	850					855					860	
CTC	TTC	AAG	CCA	TCC	CGC	AAC	ACC	ATC	GAG	GAG	GTG	2988
Leu	Phe	Lys	Pro	Ser	Arg	Asn	Thr	Ile	Glu	Glu	Val	
				865					870			
CGT	TGC	AGC	ACC	GCA	GCT	CAC	GCT	TTC	AAG	GTG	GCT	3024
Arg	Cys	Ser	Thr	Ala	Ala	His	Ala	Phe	Lys	Val	Ala	
		875					880					
GCC	CGG	GCC	ACG	CTG	CGC	CGC	AGC	AAC	GTC	TCC	CGC	3060
Ala	Arg	Ala	Thr	Leu	Arg	Arg	Ser	Asn	Val	Ser	Arg	
885					890					895		
AAG	CGG	TCC	AGC	AGC	CTT	GGA	GGC	TCC	ACG	GGA	TCC	3096
Lys	Arg	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Gly	Ser	Thr	Gly	Ser	
			900					905				
ACC	CCC	TCC	TCC	TCC	ATC	AGC	AGC	AAG	AGC	AAC	AGC	3132
Thr	Pro	Ser	Ser	Ser	Ile	Ser	Ser	Lys	Ser	Asn	Ser	
	910					915					920	
GAA	GAC	CCA	TTC	CCA	CAG	CCC	GAG	AGG	CAG	AAG	CAG	3168
Glu	Asp	Pro	Phe	Pro	Gln	Pro	Glu	Arg	Gln	Lys	Gln	
				925					930			
CAG	CAG	CCG	CTG	GCC	CTA	ACC	CAG	CAA	GAG	CAG	CAG	3204
Gln	Gln	Pro	Leu	Ala	Leu	Thr	Gln	Gln	Glu	Gln	Gln	
		935					940					
CAG	CAG	CCC	CTG	ACC	CTC	CCA	CAG	CAG	CAA	CGA	TCT	3240
Gln	Gln	Pro	Leu	Thr	Leu	Pro	Gln	Gln	Gln	Arg	Ser	
945					950					955		

CAG CAG CAG CCC AGA TGC AAG CAG AAG GTC ATC TTT Gln Gln Gln Pro Arg Cys Lys Gln Lys Val Ile Phe 360 365	3275
GGC AGC GGC ACC GTC ACC TTC TCA CTG AGC TTT GAT Gly Ser Gly Thr Val Thr Phe Ser Leu Ser Phe Asp 970 975 980	3312
GAG CCT CAG AAG AAC GCC ATG GCC CAC GGG AAT TCT Glu Pro Gln Lys Asn Ala Met Ala His Gly Asn Ser 985 990	3348
ACG CAC CAG AAC TCC CTG GAG GCC CAG AAA AGC AGC Thr His Gln Asn Ser Leu Glu Ala Gln Lys Ser Ser 995 1000	3384
GAT ACG CTG ACC CGA CAC CAG CCA TTA CTC CCG CTG Asp Thr Leu Thr Arg His Gln Pro Leu Leu Pro Leu 1005 1010 1015	3420
CAG TGC GGG GAA ACG GAC TTA GAT CTG ACC GTC CAG Gln Cys Gly Glu Thr Asp Leu Asp Leu Thr Val Gln 1020 1025	3456
GAA ACA GGT CTG CAA GGA CCT GTG GGT GGA GAC CAG Glu Thr Gly Leu Gln Gly Pro Val Gly Gly Asp Gln 1030 1035 -1040	3492
CGG CCA GAG GTG GAG GAC CCT GAA GAG TTG TCC CCA Arg Pro Glu Val Glu Asp Pro Glu Glu Leu Ser Pro 1045 1050	3528
GCA CTT GTA GTG TCC AGT TCA CAG AGC TTT GTC ATC Ala Leu Val Val Ser Ser Ser Gln Ser Phe Val Ile 1055 1060	3564
AGT GGT GGA GGC AGC ACT GTT ACA GAA AAC GTA GTG Ser Gly Gly Gly Ser Thr Val Thr Glu Asn Val Val 1065 1070 1075	3600
AAT TCA TAAAATGGAA GGAGAAGACT GGCCTAGCGA Asn Ser	3636
GAATGCAGAG AGGTTTCCTG GGCTCCCAGG GATGAGGAAT	3676
CGCCCCAGAC TCCTTTCCTC TGAGGAAGAA GGGATAATAG	3716
ACACATCAAA TCCCCCGAAT TTAGTCACAC CATCTTAAAT	3756
GACAGTGAAT TGACCCATGT TCCCTTTAAA AAAAAAAAAA	3796
AAAAAGCGGC CGC	3809

Szabadalmi igénypontok

1. A (I) általános képlet szerinti, 21M képletű (67. ábra) vegyület vagy annak gyógyászatilag elfogadható sója vagy komplexé.

2. A (I) általános képlet szerinti, 21Y képletű vegyület (73. ábra) vagy annak gyógyászatilag elfogadható sója vagy komplexé.

3. A (I) általános képlet szerinti, 22J képletű vegyület (74. ábra) vagy annak gyógyászatilag elfogadható sója vagy komplexé.

4. A (I) általános képlet szerinti, 25C képletű vegyület (89. ábra) vagy annak gyógyászatilag elfogadható sója vagy komplexé.

5. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti vegyületet vagy annak gyógyászatilag elfogadható sóját vagy komplexét tartalmazó gyógyászati készítmény kalcium receptor aktivitás befolyásolására.

6. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti vegyületet vagy annak gyógyászatilag elfogadható sóját vagy komplexét tartalmazó gyógyászati készítmény kalcium ion vagy olyan anyagok, abnormális szintjével jellemzett betegségben szenvedő beteg kezelésére, amely anyagok szintjét a kalcium ionok szintje befolyásolja.

7. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti vegyületet vagy annak gyógyászatilag elfogadható sóját vagy komplexét tartalmazó gyógyászati készítmény elsődleges vagy másodlagos mellékpajzsmirigy túlműködés kezelésére.

8. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti vegyületet vagy annak gyógyászatilag elfogadható sóját vagy komplexét tartalmazó gyógyászati készítmény Paget-kór kezelésére.

9. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti vegyületet vagy annak gyógyászatilag elfogadható sóját vagy komplexét tartalmazó gyógyászati készítmény túl magas vérkalcium tükör-

rel összefüggő betegség kezelésére.

10. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti vegyületet vagy annak gyógyászatilag elfogadható sóját vagy komplexét tartalmazó gyógyászati készítmény csontritkulás kezelésére.

11. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti vegyületet vagy annak gyógyászatilag elfogadható sóját vagy komplexét tartalmazó gyógyászati készítmény magas vérnyomás kezelésére.

12. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti vegyületet vagy annak gyógyászatilag elfogadható sóját vagy komplexét tartalmazó gyógyászati készítmény renális csontképződési zavar kezelésére.

13. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti vegyületet vagy annak gyógyászatilag elfogadható sóját vagy komplexét tartalmazó gyógyászati készítmény a vérben PTH-szint csökkentésére.

14. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti vegyületet vagy annak gyógyászatilag elfogadható sóját vagy komplexét tartalmazó gyógyászati készítmény a vérben a Ca^{2+} szintjének csökkentésére.

15. Szervetlenion-receptorokat szabályozó vegyületek, amelyek (II) általános képletében

- Ar3 jelentése legfeljebb 5, egymástól függetlenül kiválasztott szubsztituenssel - mégpedig rövid szénláncú alkilcsoporttal, halogénatommal, rövid szénláncú alkoxicsoporttal, rövid szénláncú tio-alkil-csoporttal, metilén-dioxi-csoporttal, rövid szénláncú halogén-alkil-csoporttal, rövid szénláncú halogén-alkoxi-csoporttal, OH csoporttal, CH_2OH csoporttal, $CONH_2$ csoporttal, CN csoporttal, acetoxicssoporttal, benzilcsoporttal, benzil-oxi-csoporttal, α, α -dimetil-benzil-csoporttal, NO_2 csoporttal, CHO csoporttal, $CH_2CH(OH)$ csoporttal, $N(CH_3)_2$ csoporttal, acetilcsoporttal és/vagy etilén-dioxi-csoporttal - adott esetben helyettesített naftil- vagy fenilcsoport;

- Ar4 jelentése legfeljebb 5, egymástól függetlenül kivá-

lasztott szubsztituenssel - mégpedig rövid szénláncú alkilcsoporttal, halogénatommal, rövid szénláncú alkoxycsoporttal, rövid szénláncú tio-alkil-csoporttal, metilén-dioxi-csoporttal, rövid szénláncú halogén-alkil-csoporttal, rövid szénláncú halogén-alkoxi-csoporttal, OH csoporttal, CH₂OH csoporttal, CONH₂ csoporttal, CN csoporttal és/vagy acetoxycsoporttal - adott esetben helyettesített naftil- vagy fenilcsoport:

feltéve, hogy ha Ar₄ jelentése 3-metoxifenil-csoport, akkor Ar₃ jelentése olyan helyettesített fenilcsoport, amelyben a helyettesítő jelentése nem 2-metoxi-, 3-metil-, 2-metil-, 4-metil-, 2,4-dimetil-, 2,4,6-trimetil- vagy 4-izopropilcsoport; és ha Ar₄ jelentése helyettesítetlen fenilcsoport, akkor Ar₃ jelentése olyan helyettesített fenilcsoport, amelyben a helyettesítő jelentése nem 2-nitrofenil-, 4-nitrofenil- vagy 4-dimetilaminofenil-csoport;

- R₈ jelentése hidrogénatom vagy fenilcsoport;
- R₉ jelentése hidrogénatom vagy metilcsoport; és
- R₁₀ jelentése hidrogénatom, metilcsoport vagy fenilcsoport,

valamint a (II) általános képletű vegyületek farmakológiai szempontból elfogadható sói és komplexei.

16. A 15. igénypont szerinti vegyület, ahol

Ar₃ jelentése vagy adott esetben 0-5 szubsztituenssel helyettesített naftilcsoport vagy 1-5 szubsztituenssel helyettesített fenilcsoport; a szubsztituensek jelentése egymástól függetlenül halogénatom, 1-4 szénatomos alkoxi-, 1-4 szénatomos tioalkil-, metiléndioxi-, 1-4 szénatomos haloalkil-, 1-4 szénatomos haloalkoxi-, OH-, CH₂OH-, CONH₂-, CN-, acetoxi-, benzil-, benziloxi-, dimetilbenzil-, NO₂-, CHO-, CH₃CH(OH)-, N(CH₃)₂-, acetyl- vagy etiléndioxycsoport.

17. A 16. igénypont szerinti vegyület, ahol

Ar₃ jelentése vagy adott esetben 0-5 szubsztituenssel helyettesített naftilcsoport vagy 1-5 szubsztituenssel helyet-

tesített fenilcsoport; a szubsztituensek jelentése egymástól függetlenül 1-3 szénatomos alkilcsoport, halogénatom, 1-3 szénatomos alkoxi-, 1-3 szénatomos tioalkil-, metiléndioxi- 1-3 szénatomos haloalkil-, 1-3 szénatomos haloalkoxi-, OH-, CH₂OH-, CONH₂-, CN-, acetoxi-, benzil-, benziloxi-, dime- tilbenzil-, NO₂-, CHO-, CH₃CH(OH)-, N(CH₃)₂-, acetyl- vagy etiléndioxi-csoport; és

Ar₄ jelentése adott esetben 0-5 szubsztituenssel helyette- sített naftil- vagy fenilcsoport; az említett szubsztituensek jelentése 1-3 szénatomos alkilcsoport, halogénatom, 1-3 szénatomos alkoxi-, 1-3 szénatomos tioalkil-, metiléndioxi-, 1-3 szénatomos haloalkil-, 1-3 szénatomos haloalkoxi-, OH-, CH₂OH-, CONH₂-, CN- vagy acetoxicssoport.

18. Az 15. vagy 17. igénypont szerinti, R-N-[3-(4- -metilfenil)-prop-2-enil]-1-(3-metoxifenil)-etilamin kémiai nevű, (12B jelű) vegyület vagy annak gyógyászatilag elfogad- ható sója vagy komplexe.

19. A 15. vagy 17. igénypont szerinti, (R)-N-[3-(2- metilfenil)-prop-2-enil]-prop-2-enil]-1-(3-metoxifenil)- -etilamin kémiai nevű, (12C jelű) vegyület vagy annak gyógy- ászatilag elfogadható sója vagy komplexe.

20. A 15. vagy 17. igénypont szerinti, (R)-N-[3-(2,4,6- trimetilfenil)-prop-2-enil]-1-(3-metoxifenil)-etilamin kémiai nevű, (12D jelű) vegyület vagy annak gyógyászatilag elfogad- ható sója vagy komplexe.

21. A 15. vagy 17. igénypont szerinti, (R)-[3-(4- -izopropilfenil)-prop-2-enil]-1-(3-metoxifenil)-etilamin ké- miai nevű, (12E jelű) vegyület vagy annak gyógyászatilag el- fogadható sója vagy komplexe.

22. A 15. vagy 17. igénypont szerinti, (R)-N-[3-(2,4- -dimetilfenil)prop-2-enil]-1-(3-metoxifenil)-etilamin kémiai nevű (12F jelű) vegyület vagy annak gyógyászatilag elfogadha- tó sója vagy komplexe.

23. A 15. vagy 17. igénypont szerinti, (R)-N-[3-(3-

-metilfenil)prop-2-enil]-1-(3-metoxifenil)-etilamin kémiai nevű (12G jelű) vegyület vagy annak gyógyászatilag elfogadható sója vagy komplexe.

24. A 15. vagy 17. igénypont szerinti, (R)-N-(3-fenilprop-2-en-1-il)-1-(3-metoxifenil)-etilamin kémiai nevű (25E jelű) vegyület vagy annak gyógyászatilag elfogadható sója vagy komplexe.

25. A 15. vagy 17. igénypont szerinti, (P)-N-(2-metil-3-fenilprop-2-enil)-1-(3-metoxifenil)-etilamin kémiai nevű (25G jelű) vegyület vagy annak gyógyászatilag elfogadható sója vagy komplexe.

26. A 15. vagy 17. igénypont szerinti, (R,R)-N-(2-metil-4-fenilbut-3-enil)-1-(3-metoxifenil)-etilamin kémiai nevű (25H jelű) vegyület vagy annak gyógyászatilag elfogadható sója vagy komplexe.

27. A 15. vagy 17. igénypont szerinti, (S,R)-N-(2-metil-4-fenilbut-3-enil)-1-(3-metoxifenil)-etilamin kémiai nevű (25I jelű) vegyület vagy annak gyógyászatilag elfogadható sója vagy komplexe.

28. A 15-27. igénypontok bármelyike szerinti vegyület gyógyászatilag hatásos mennyiségét tartalmazó gyógyászati készítmény.

29. A 15-27. igénypontok bármelyike szerinti vegyület alkalmazása abnormális csont és ásványi homöosztázissal jellemzett betegségben vagy rendellenességben szenvedő beteg kezelésére szolgáló gyógyszerkészítmény előállítására.

30. A 15-27. igénypontok bármelyike szerinti vegyület alkalmazása mellékpajzsmirigy túlműködésben szenvedő beteg kezelésére szolgáló gyógyszerkészítmény előállítására.

31. Az 1-13. igénypontok bármelyike szerinti vegyület alkalmazása Paget-kórban szenvedő beteg kezelésére szolgáló gyógyszerkészítmény előállítására.

32. A 15-27. igénypontok bármelyike szerinti vegyület alkalmazása túl magas vérkalcium tükörrel összefüggő betegség-

ben szenvedő beteg kezelésére szolgáló gyógyszerkészítmény előállítására.

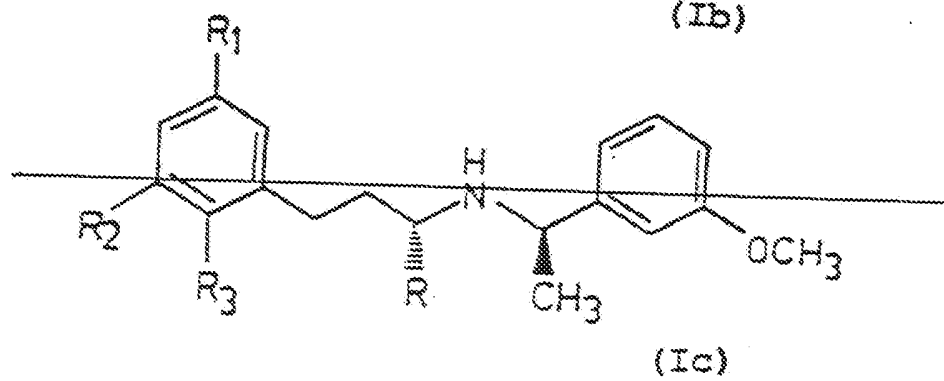
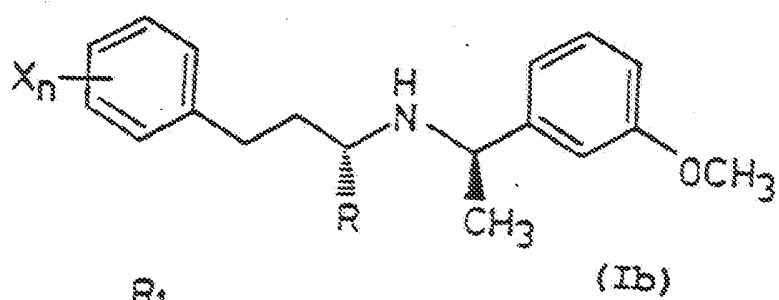
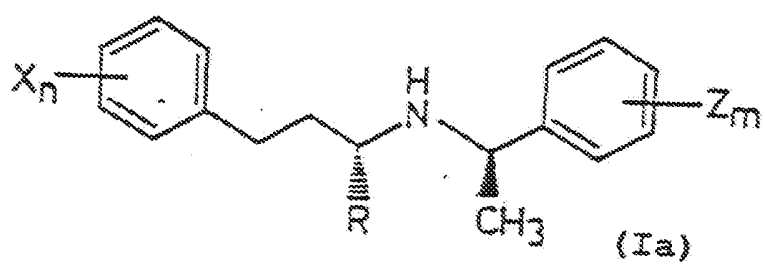
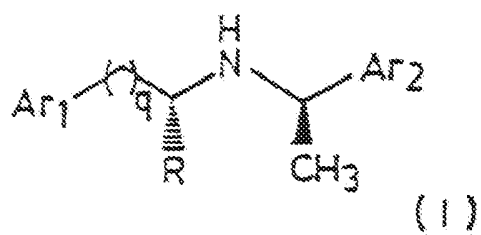
33. A 15-27. igénypontok bármelyike szerinti vegyület alkalmazása csontritkulásban szenvedő beteg kezelésére szolgáló gyógyszerkészítmény előállítására.

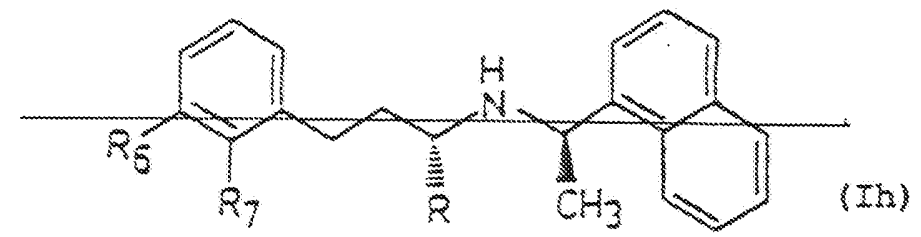
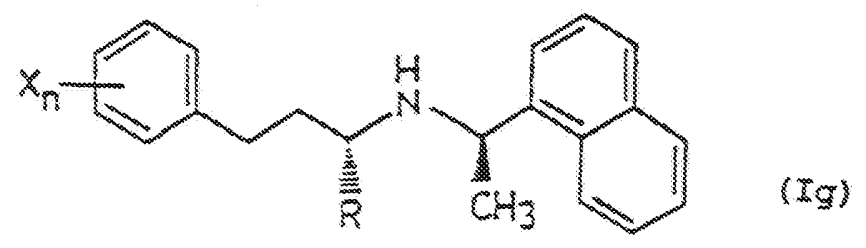
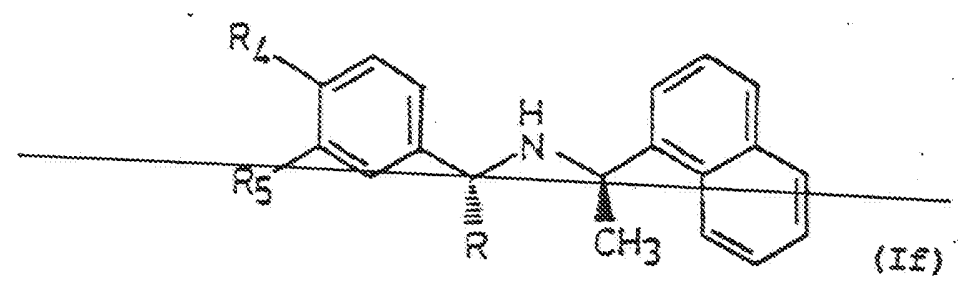
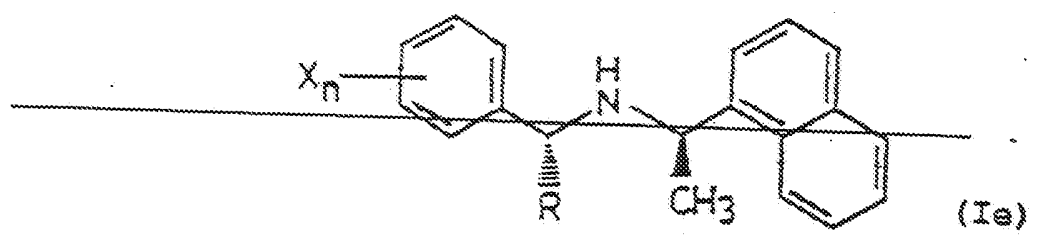
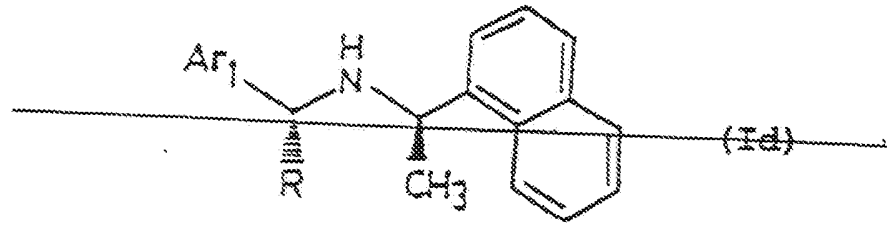
34. A 15-27. igénypontok bármelyike szerinti vegyület alkalmazása magas vérnyomásban szenvedő beteg kezelésére szolgáló gyógyszerkészítmény előállítására.

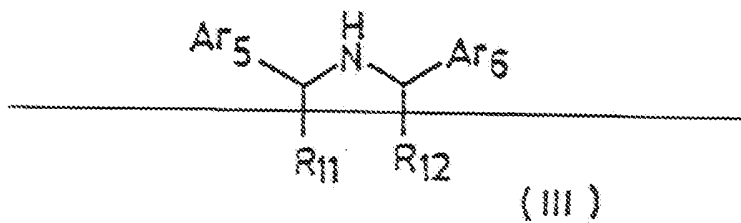
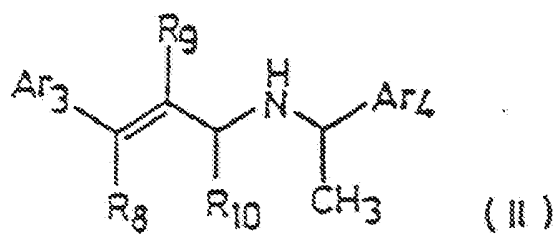
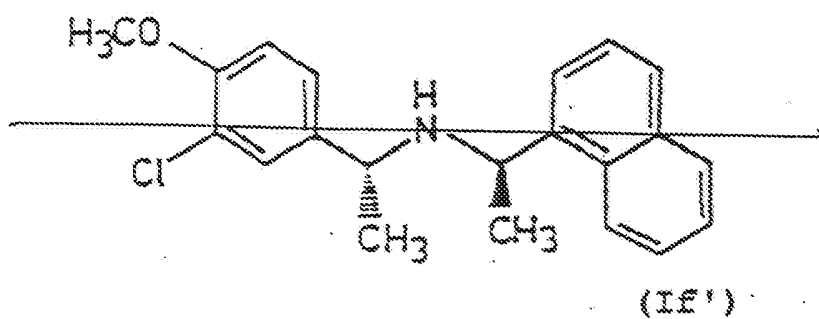
35. A 15-27. igénypontok bármelyike szerinti vegyület alkalmazása renális csontképződési zavarban szenvedő beteg kezelésére szolgáló gyógyszerkészítmény előállítására.

36. A 25E jelű, ((R)-N-(3-fenilprop-2-en-1-il)-1-(3-metoxifenil)-etilamin kémiai nevű vegyület vagy annak gyógyászatiilag elfogadható sója vagy komplexe alkalmazása egy betegben mellékpajzsmirigy hormonszint csökkentésére szolgáló gyógyszerkészítmény előállítására.

37. A 25E jelű, ((R)-N-(3-fenilprop-2-en-1-il)-1-(3-metoxifenil)-etilamin kémiai nevű vegyület vagy annak gyógyászatiilag elfogadható sója vagy komplexe alkalmazása egy betegben csont reszorpció gátlására szolgáló gyógyszerkészítmény előállítására.







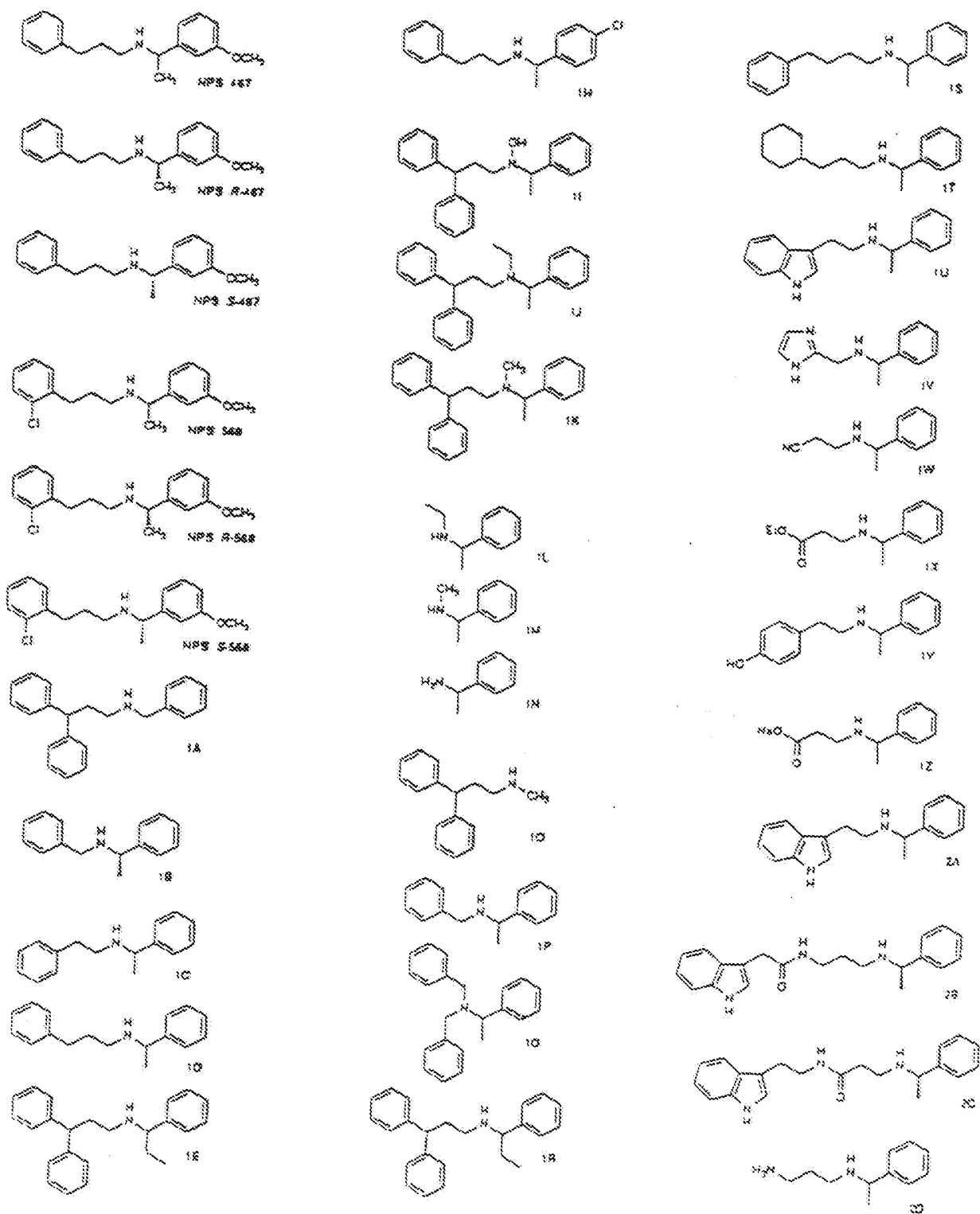


FIG. 1a.

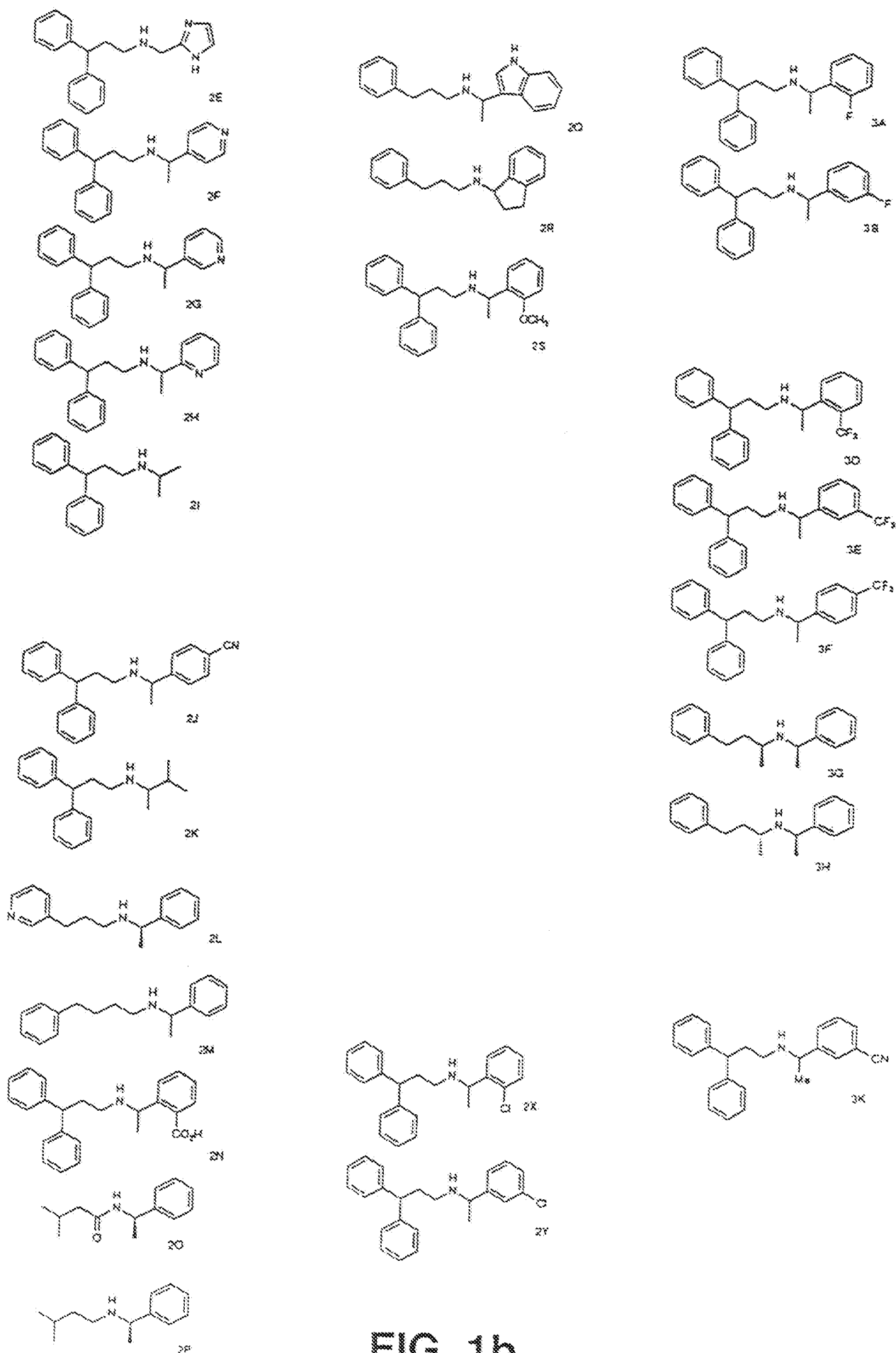


FIG. 1b.

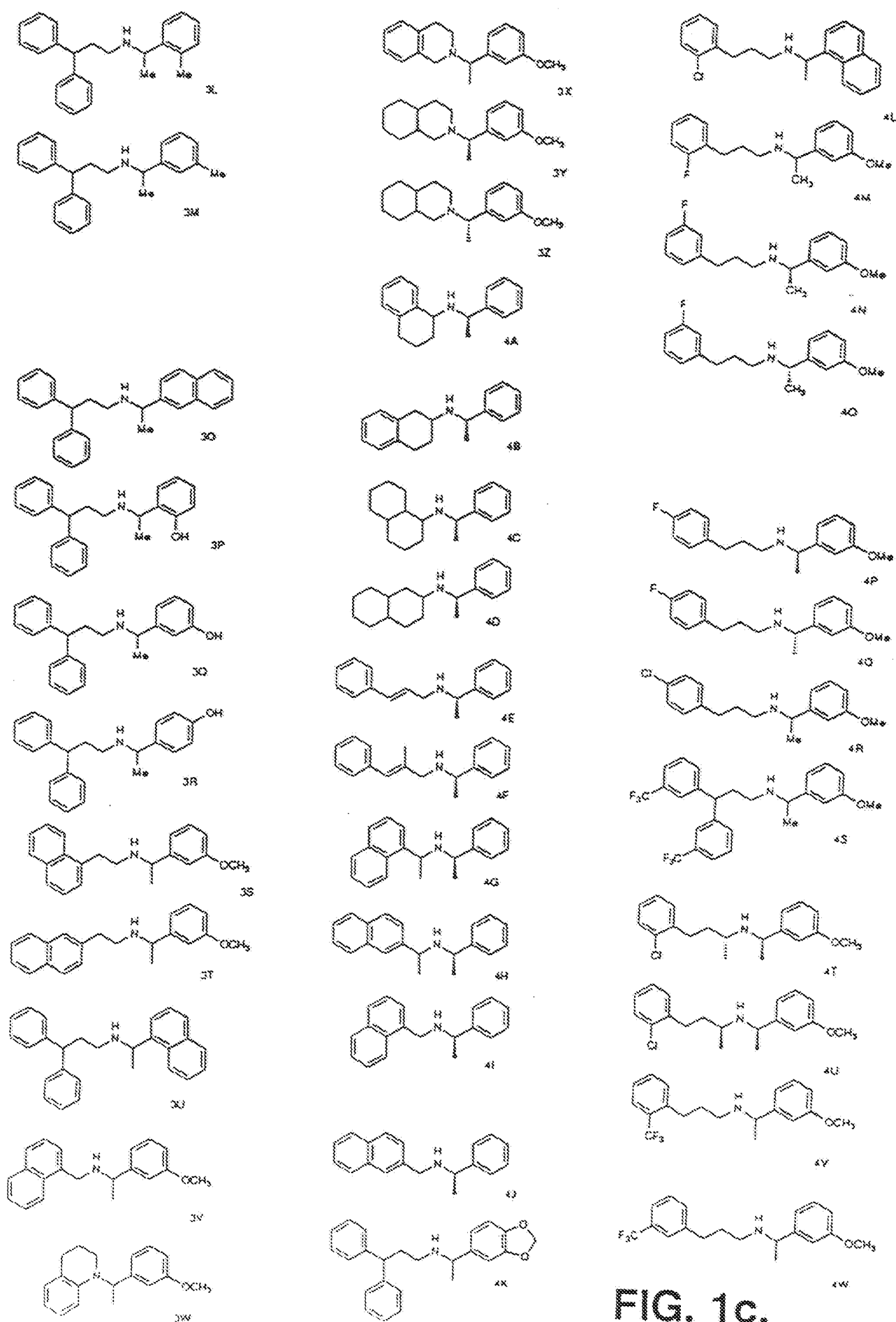


FIG. 1c.

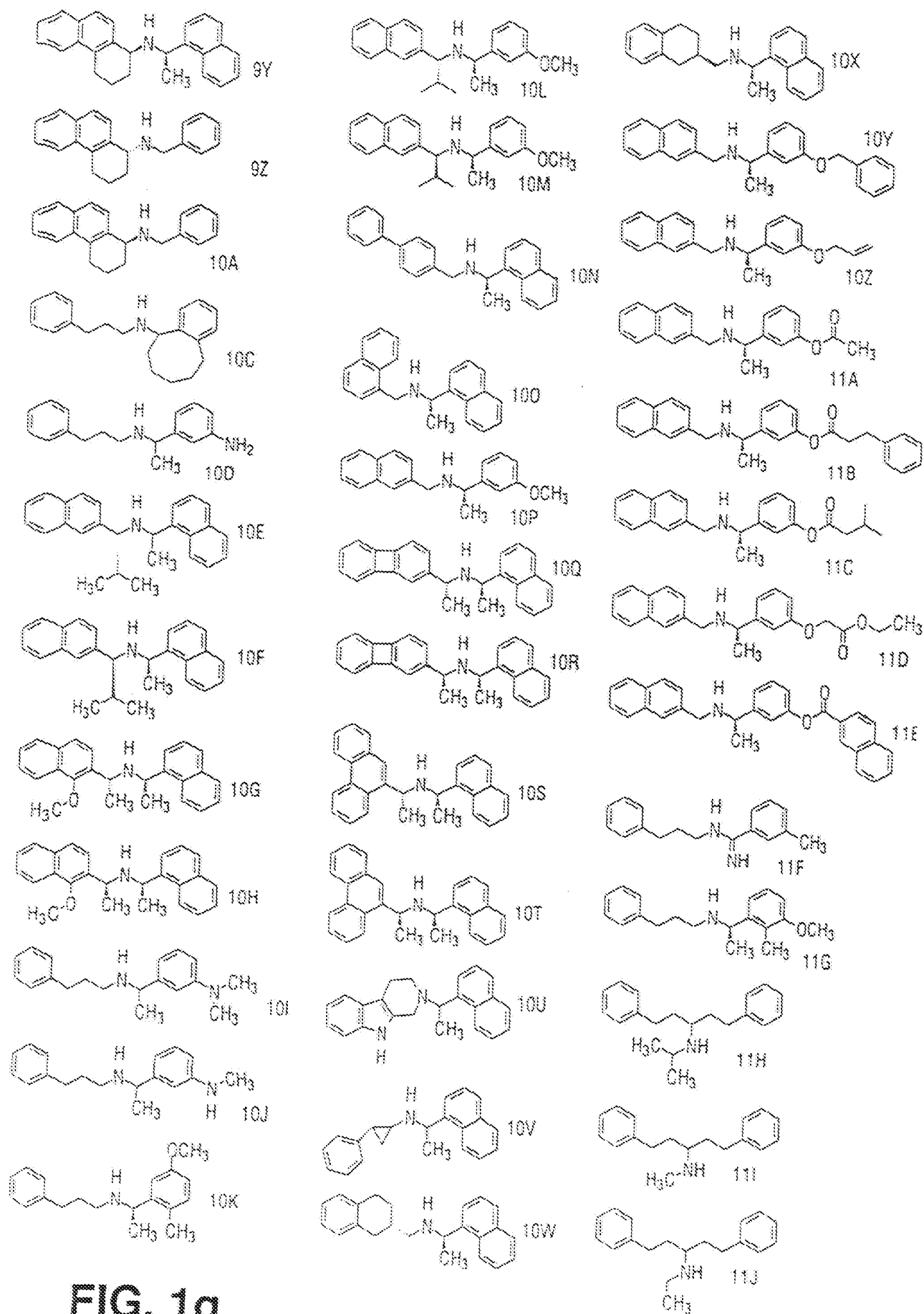


FIG. 1g.

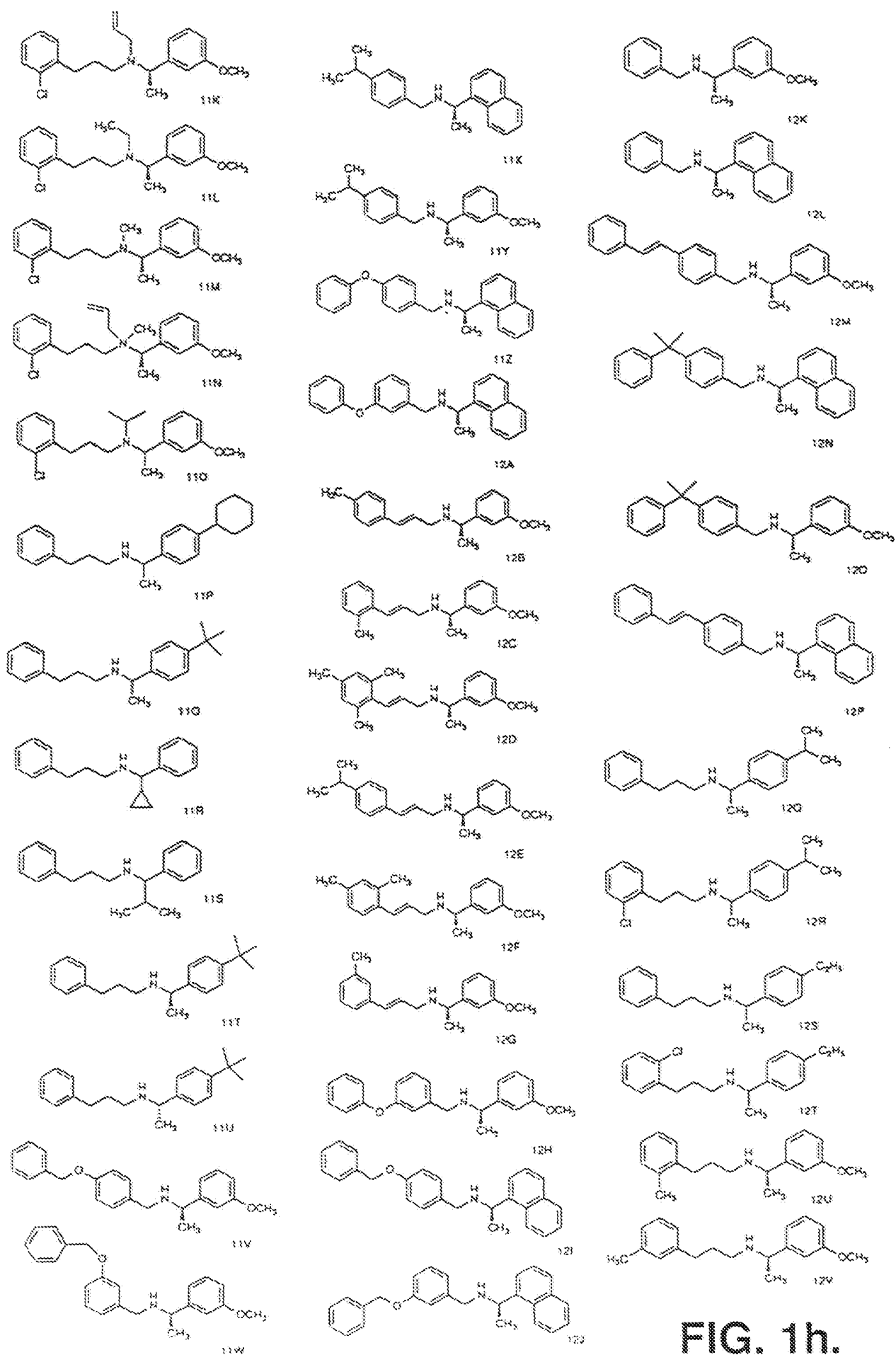


FIG. 1h.

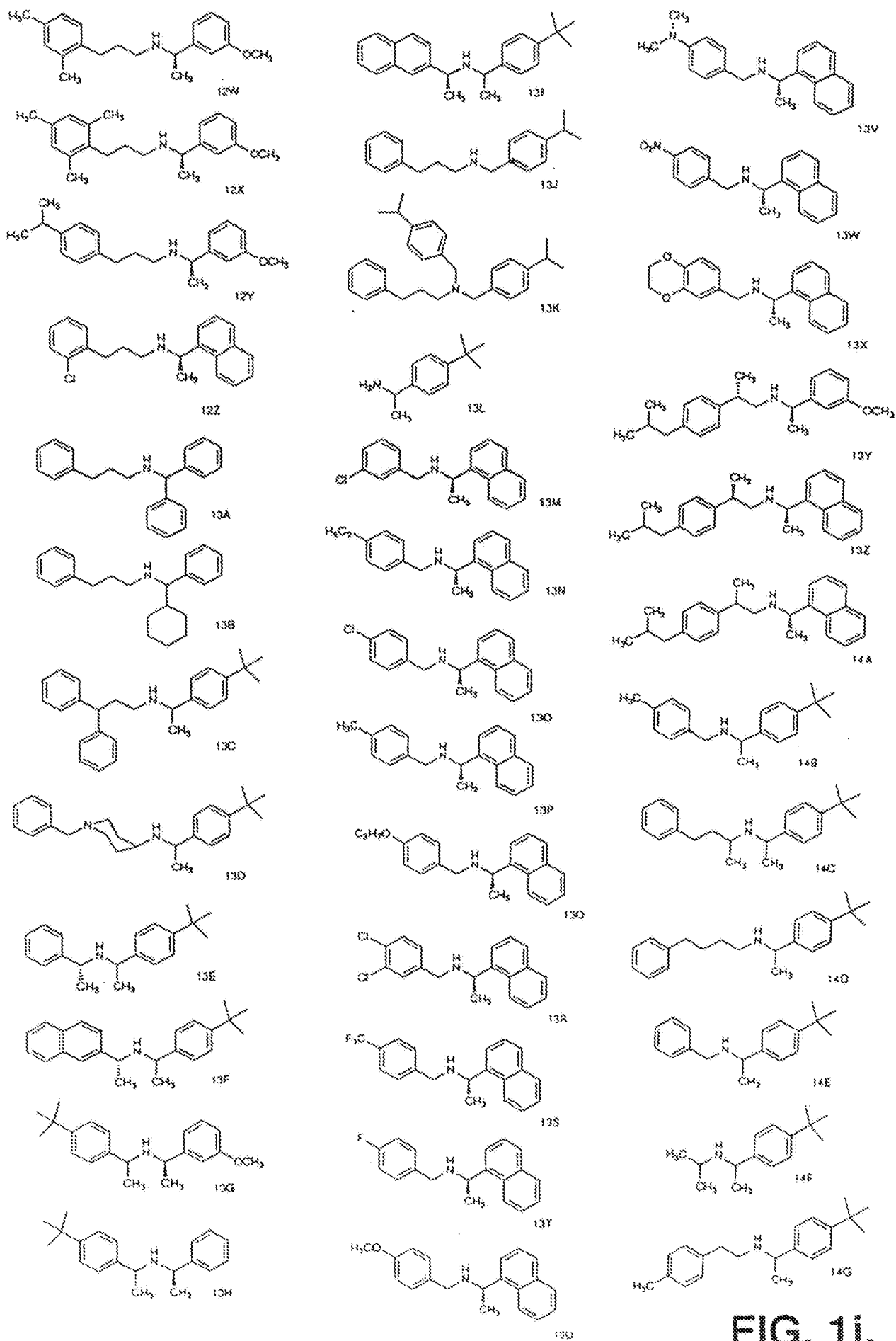


FIG. 1i.

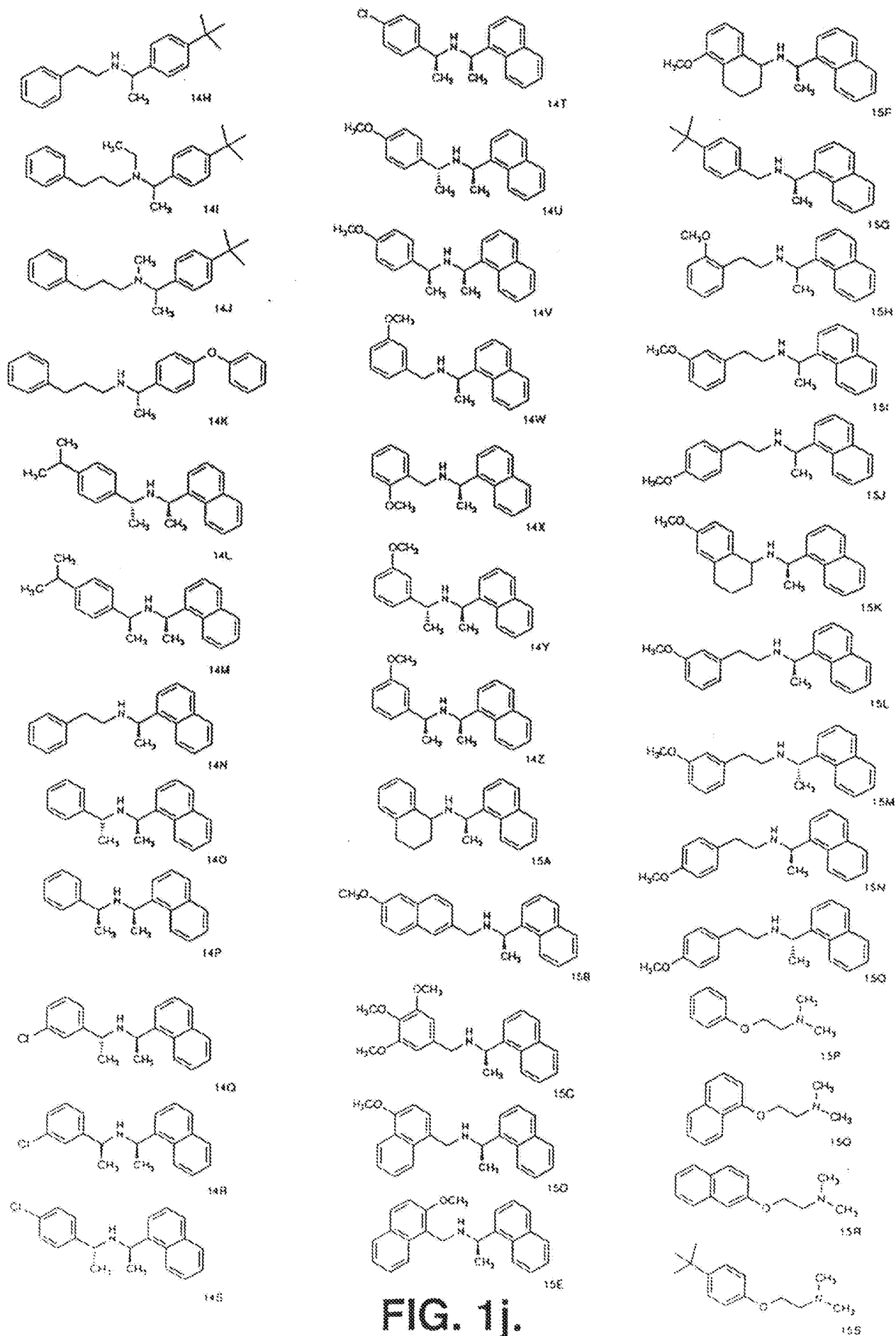


FIG. 1j.

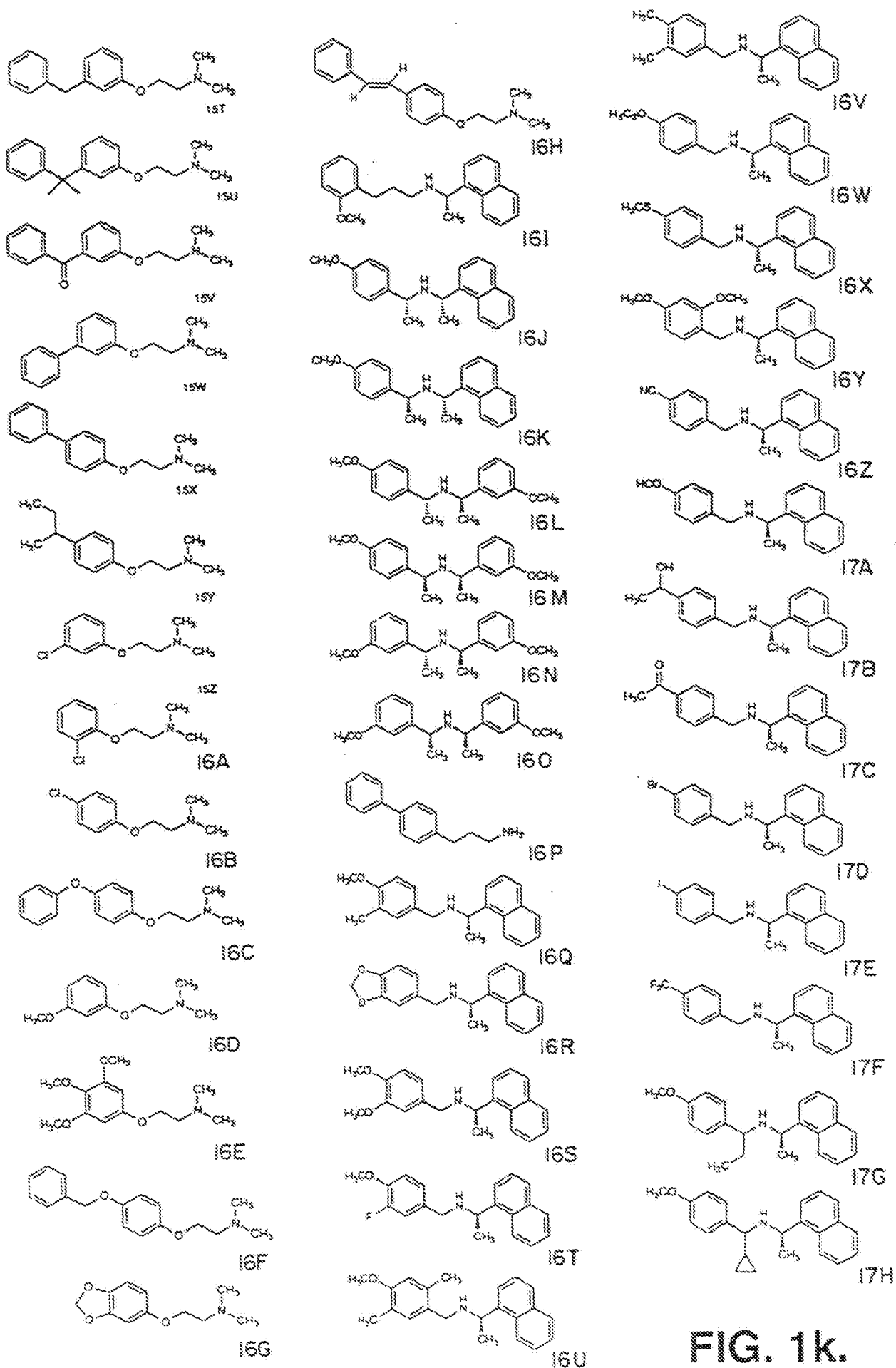


FIG. 1k.

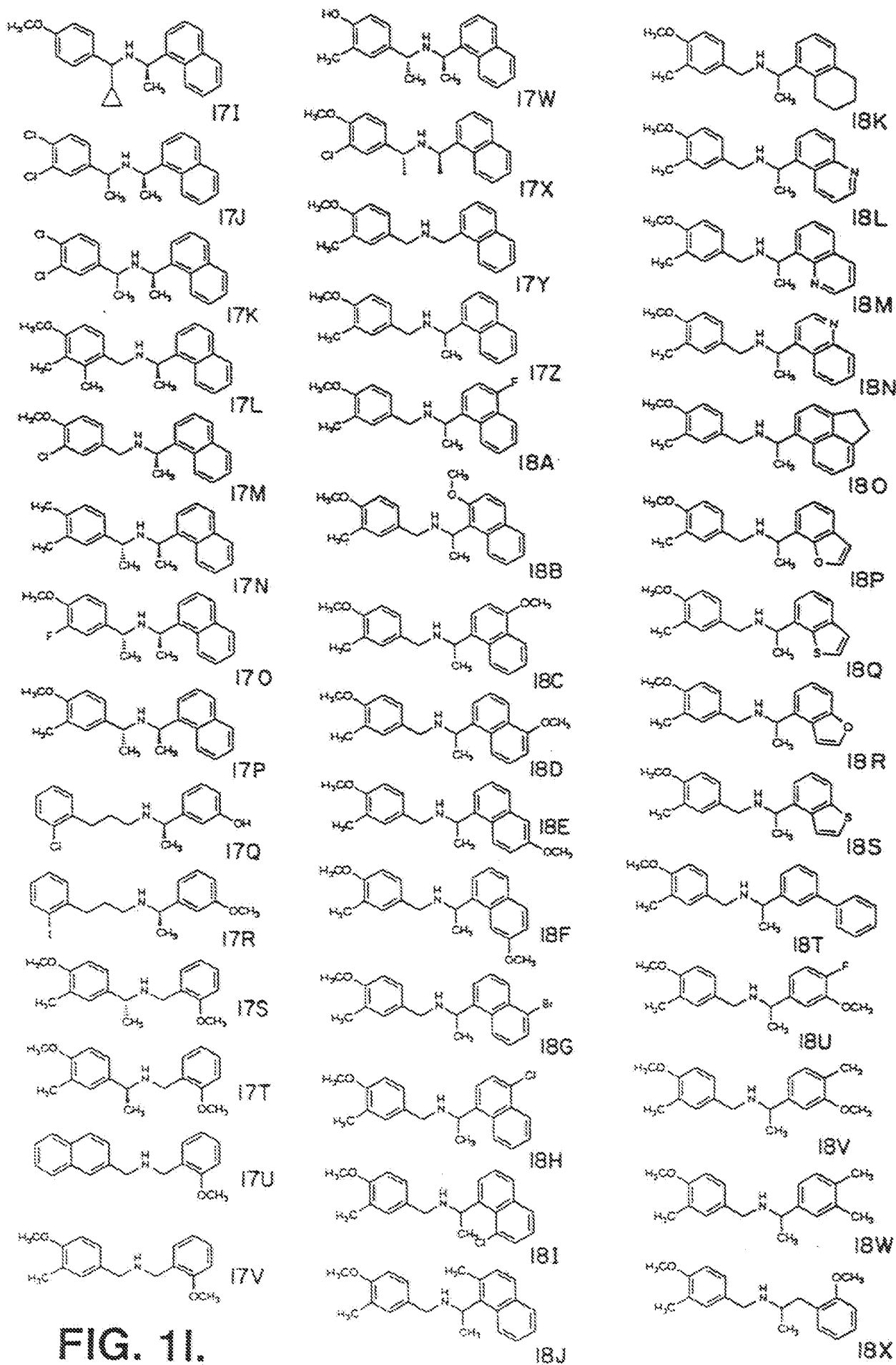


FIG. 11.

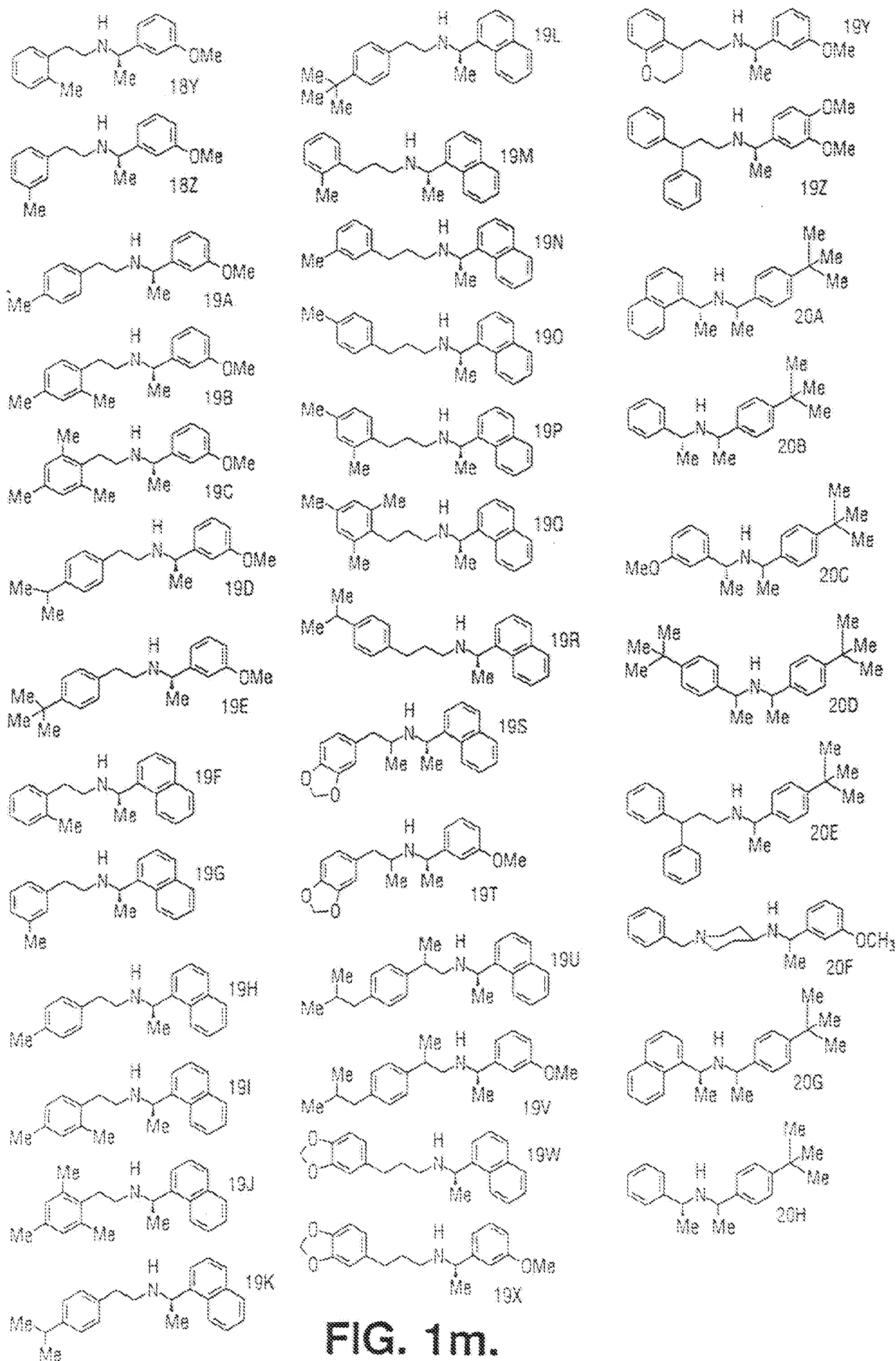


FIG. 1m.

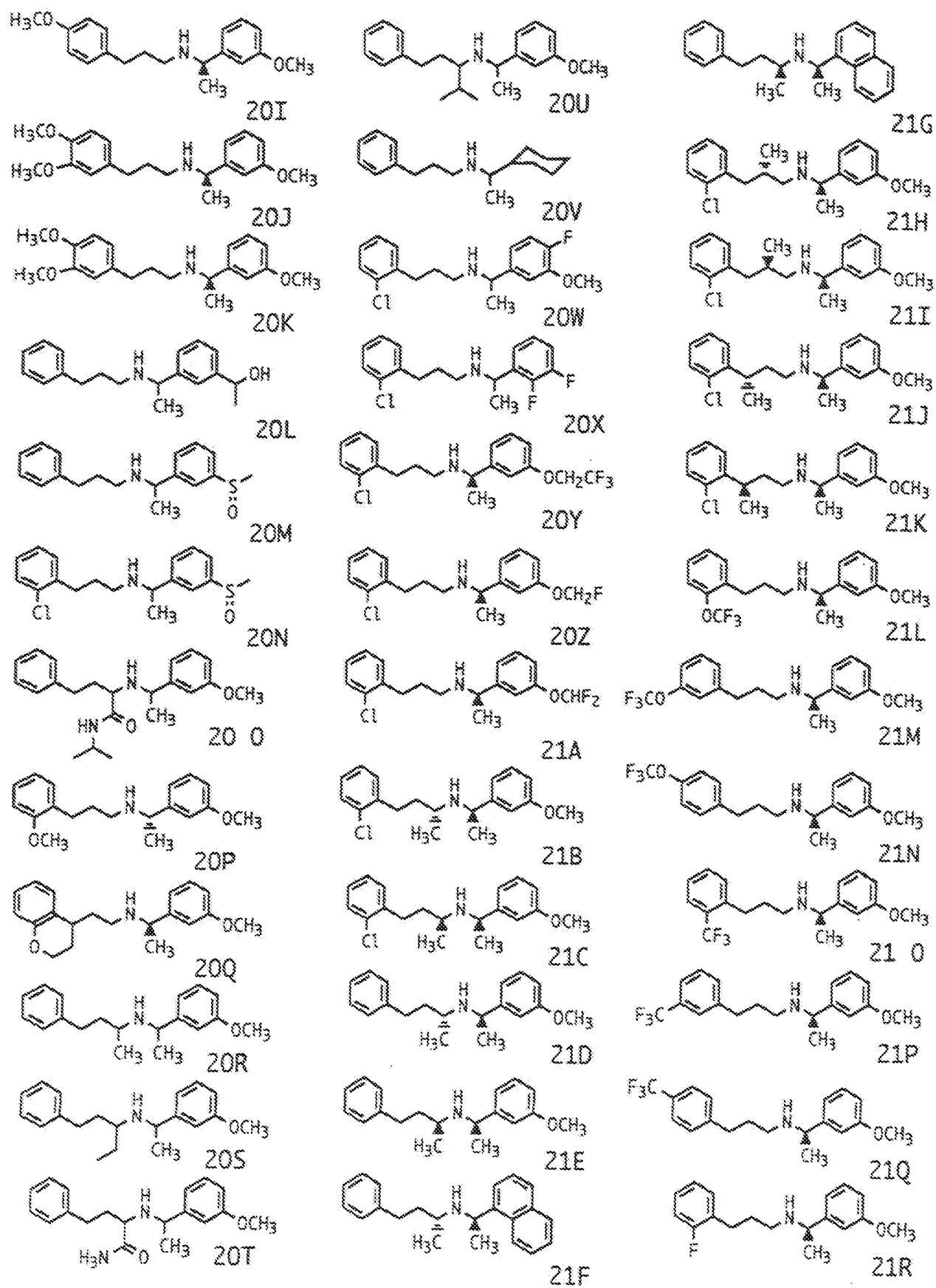


FIG. 1n.

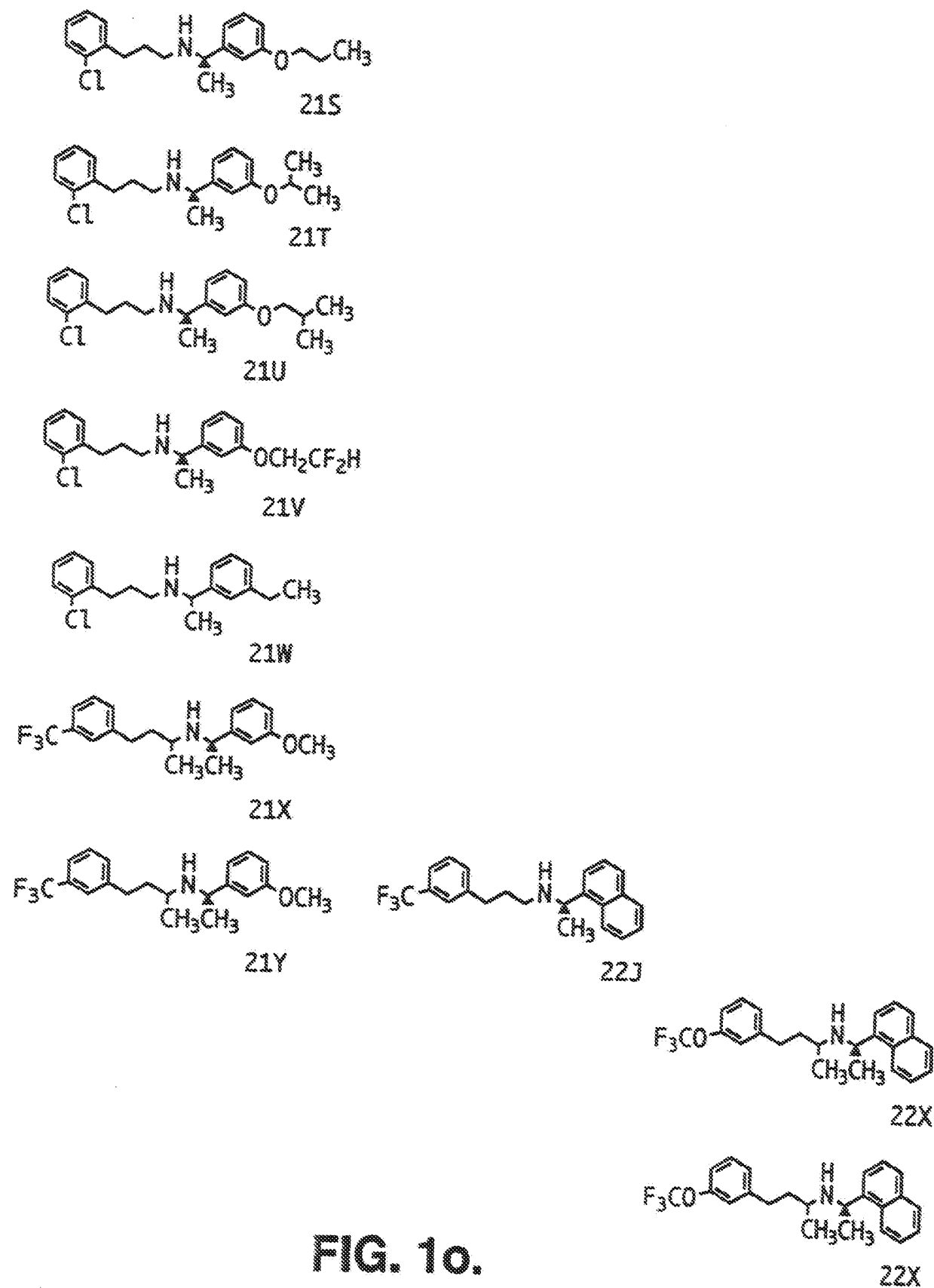


FIG. 1o.

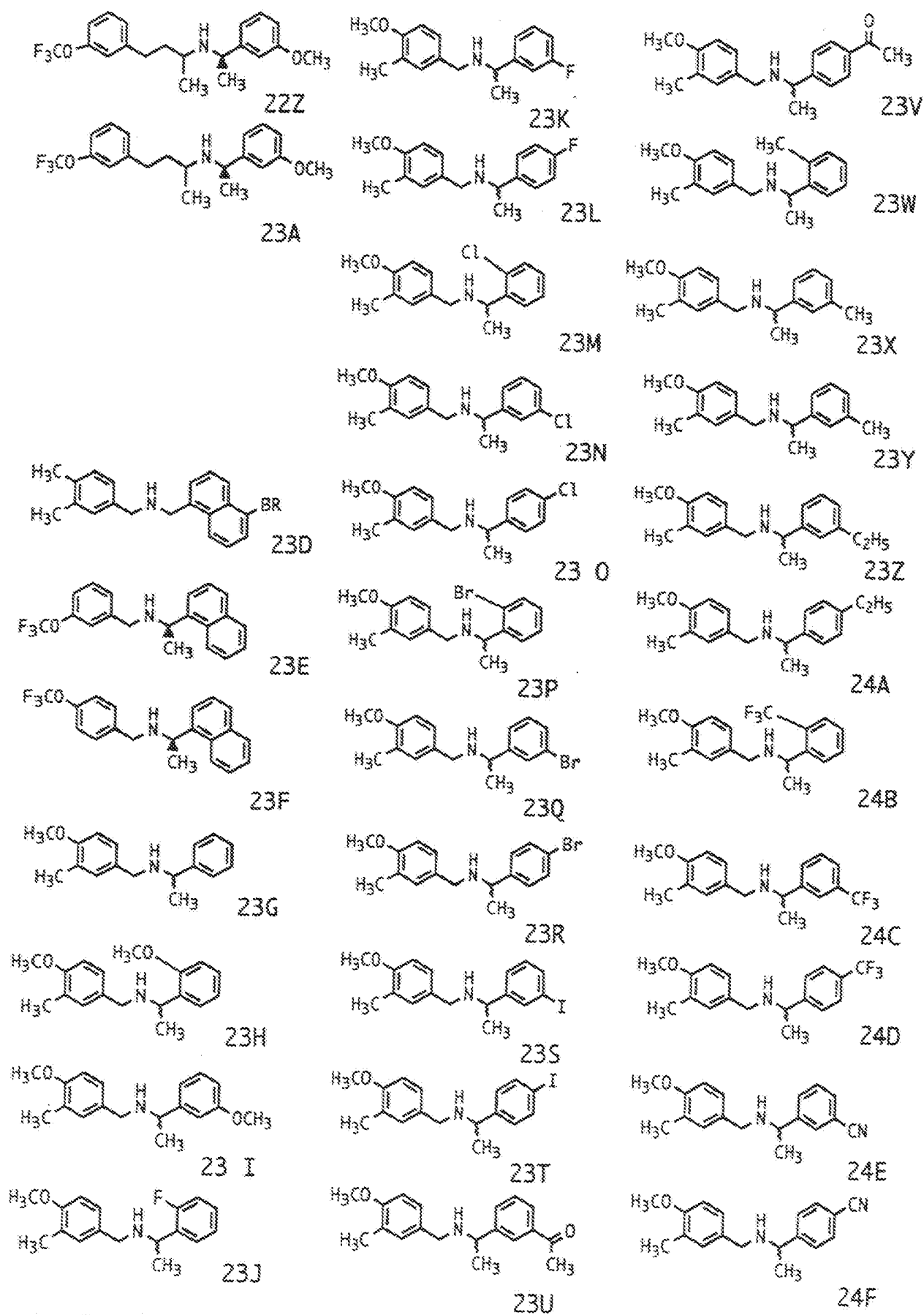


FIG. 1p.

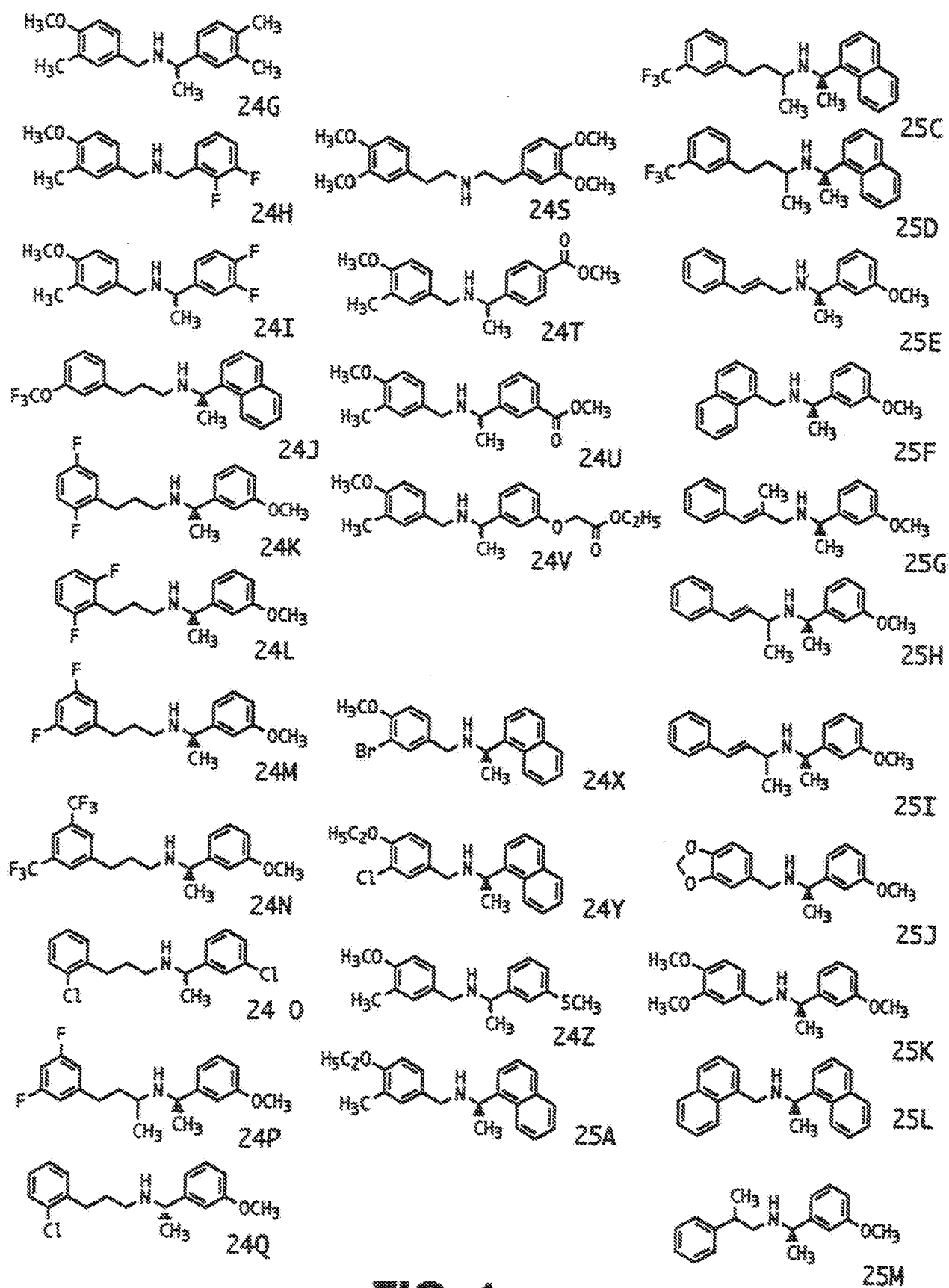


FIG. 1q.

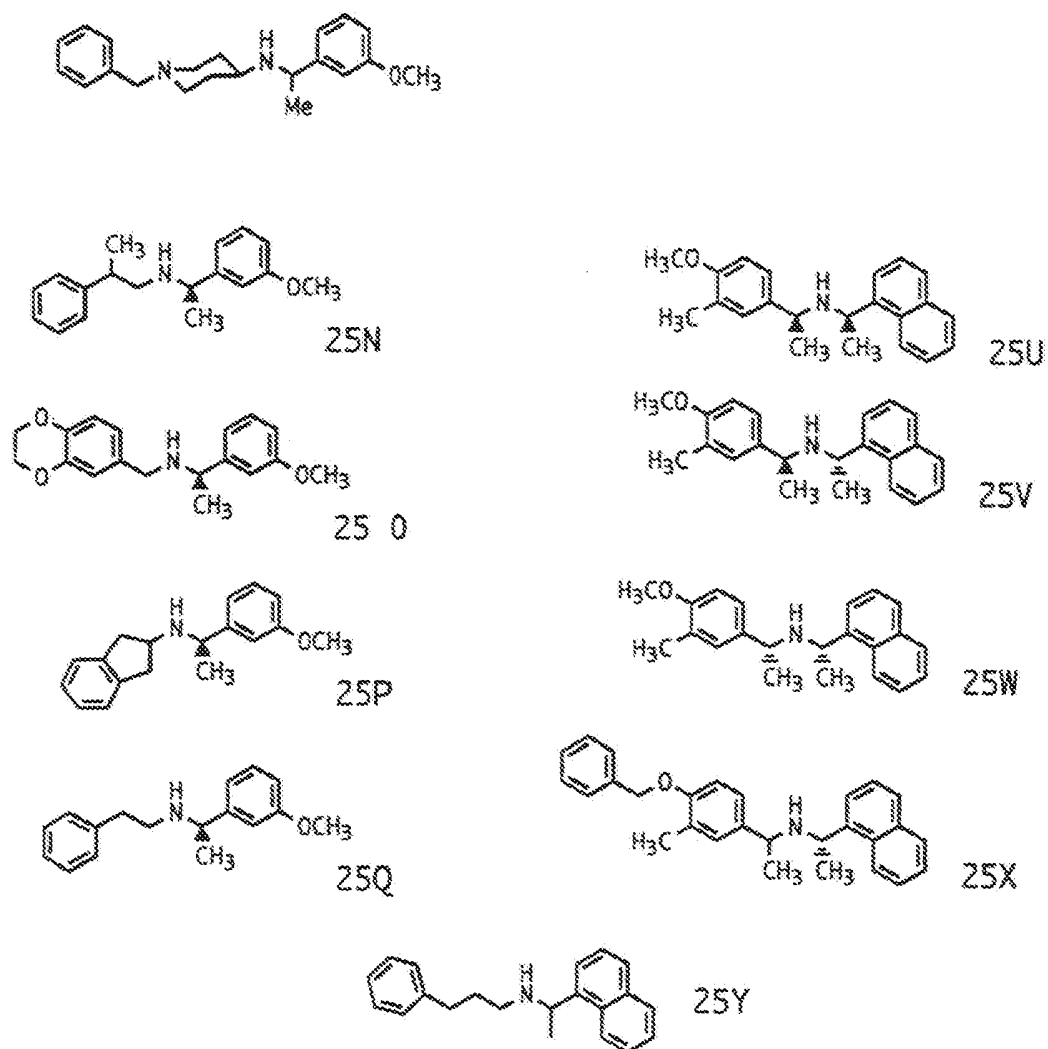


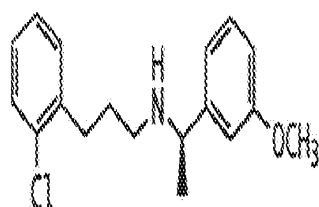
FIG. 1r.



NPS R-467 · HCl

Op: 157.4-158 °C; $[\alpha]_D^{20} +41.7^\circ$ (c 6.11, CHCl₃); UV (EtOH) 276 (ϵ 1900),
 sh 282 nm (ϵ 1700); ¹H NMR (CDCl₃) δ 1.83 (3H, d, J=7, C-CH₃), 2.29 (2H, q,
 J=8), 2.51 (2H, q, J=6), 2.65 (2H, br m), 3.87 (3H, s, -OCH₃), 4.11 (1H, br
 q, CH), 6.91 (1H, dd, J=8, J=2), 7.05-7.07 (3H, m), 7.11-7.21 (3H, m),
 7.27-7.32 (2H, m) 9.8 (1H, br s), 10.2 (1H, br s); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 20.3,
 27.0, 32.3, 44.9, 55.3, 58.8, 111.8, 115.3, 119.7, 125.8, 127.9 (2C), 128.1
 (2C), 130.0, 137.2, 139.6, 161.1; GC/EI-MS
 269 (M⁺, 17), 254 (100), 164 (8), 135 (50), 121 (8), 105 (7), 91 (23), 77
 (7); (M⁺) m/z 269.1796,

FIG. 2.



NPS R-568 · HCl

Op: 188.188.5 °C; $[\alpha]_D^{20} +37.8^\circ$ (c 6.80, CHCl₃); UV (EtOH) 274 (ϵ 2200),
 sh 282 nm (ϵ 1900); ¹H NMR (CDCl₃) δ 1.85 (3H, d, J=7, C-CH₃), 2.24 (2H, q,
 J=8), 2.66 (2H, q, J=7), 2.68 (2H, br q, J=7), 3.87 (3H, s, -OCH₃), 4.15 (1H,
 br t, J=7, CH), 6.90 (1H, dd, J=8, J=2), 7.06-7.15 (4H, m), 7.23-7.32 (3H, m),
 9.85 (1H, br s), 10.2 (1H, br s); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 20.2, 25.2, 30.0, 44.7,
 55.6, 58.6, 112.0, 115.3, 119.7, 126.5, 127.4, 129.1, 129.9, 130.0, 133.4, 137.1,
 137.2, 160.0; GC/EI-MS 303 (M⁺, 2), 288 (100), 268
 (17), 196 (4), 164 (8), 135 (56), 126 (21), 103 (9); 91 (7), 77 (7); HR-EI-MS
 (M⁺) m/z 303.1403,

FIG. 3.

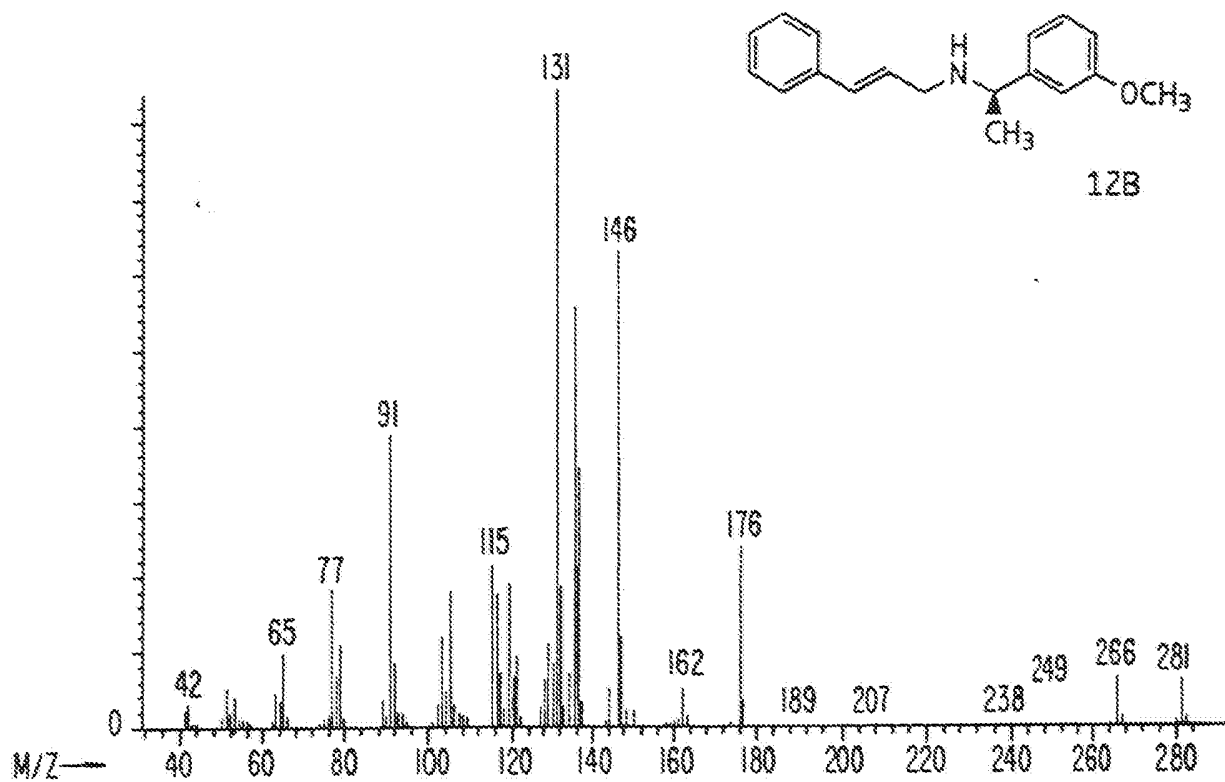


FIG. 30.

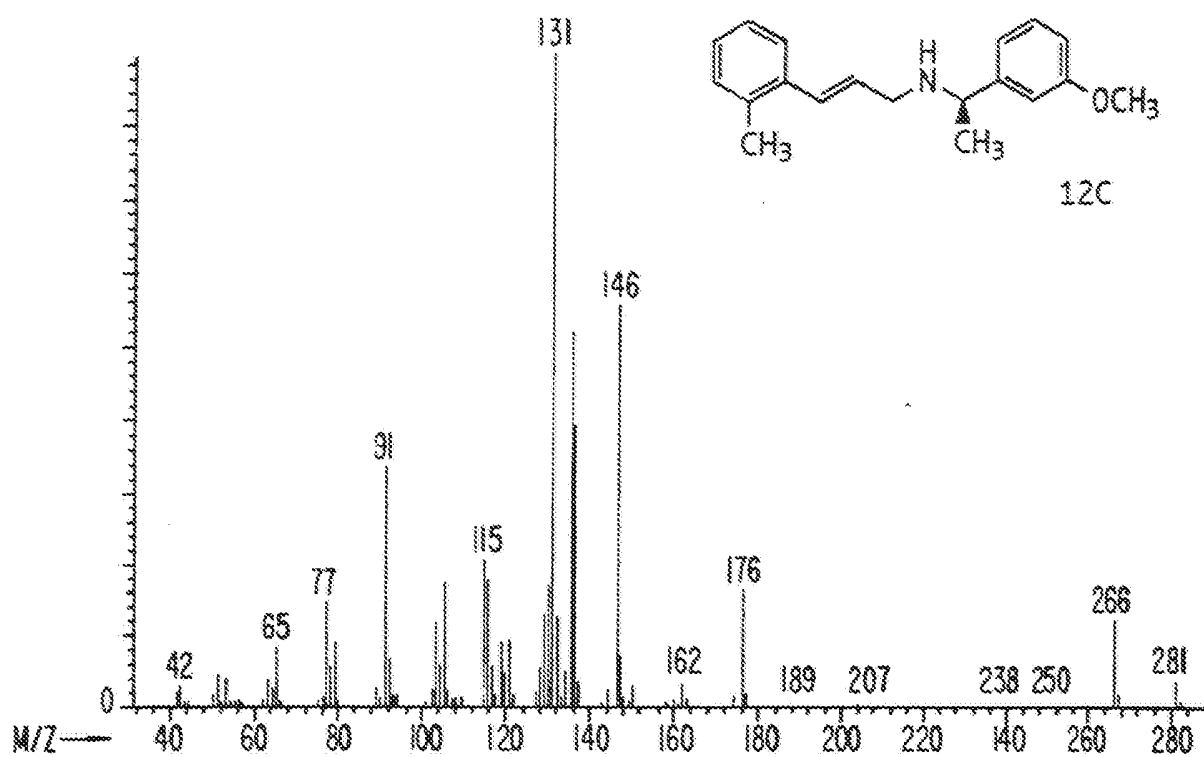


FIG. 31.

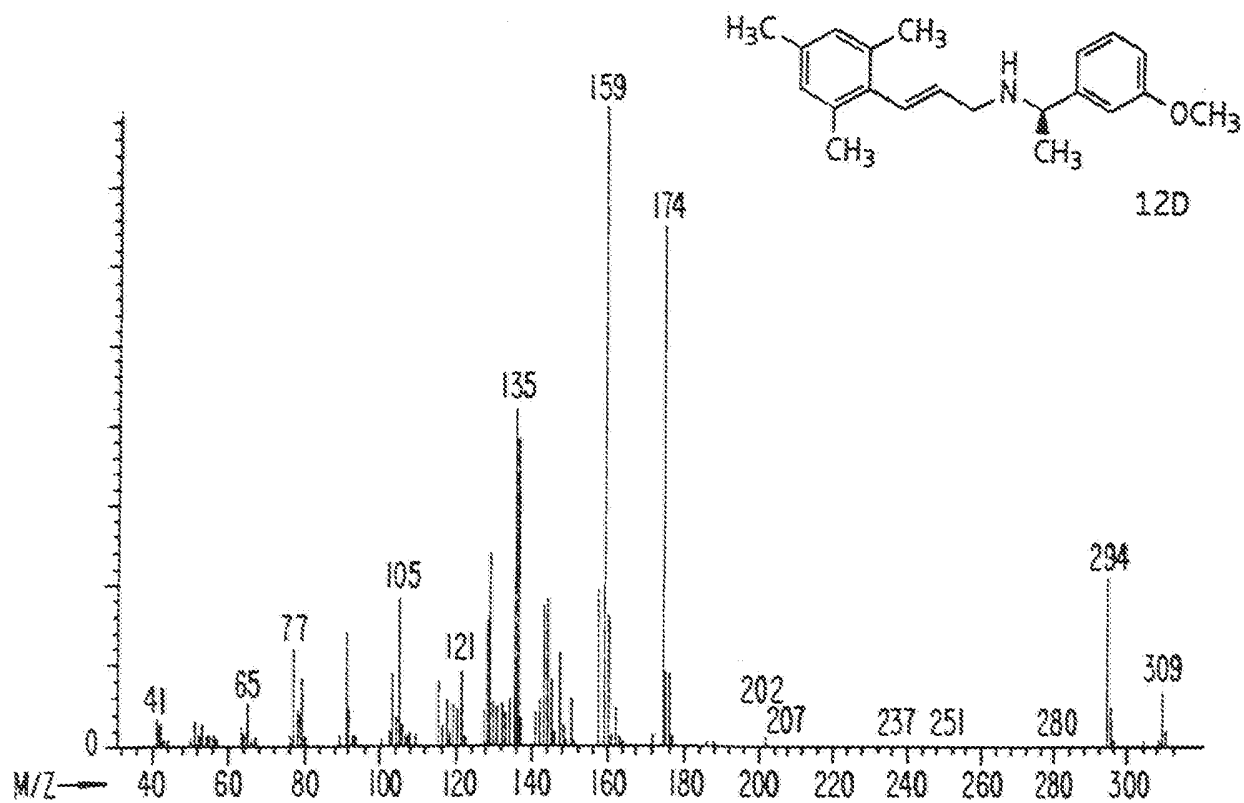


FIG. 32.

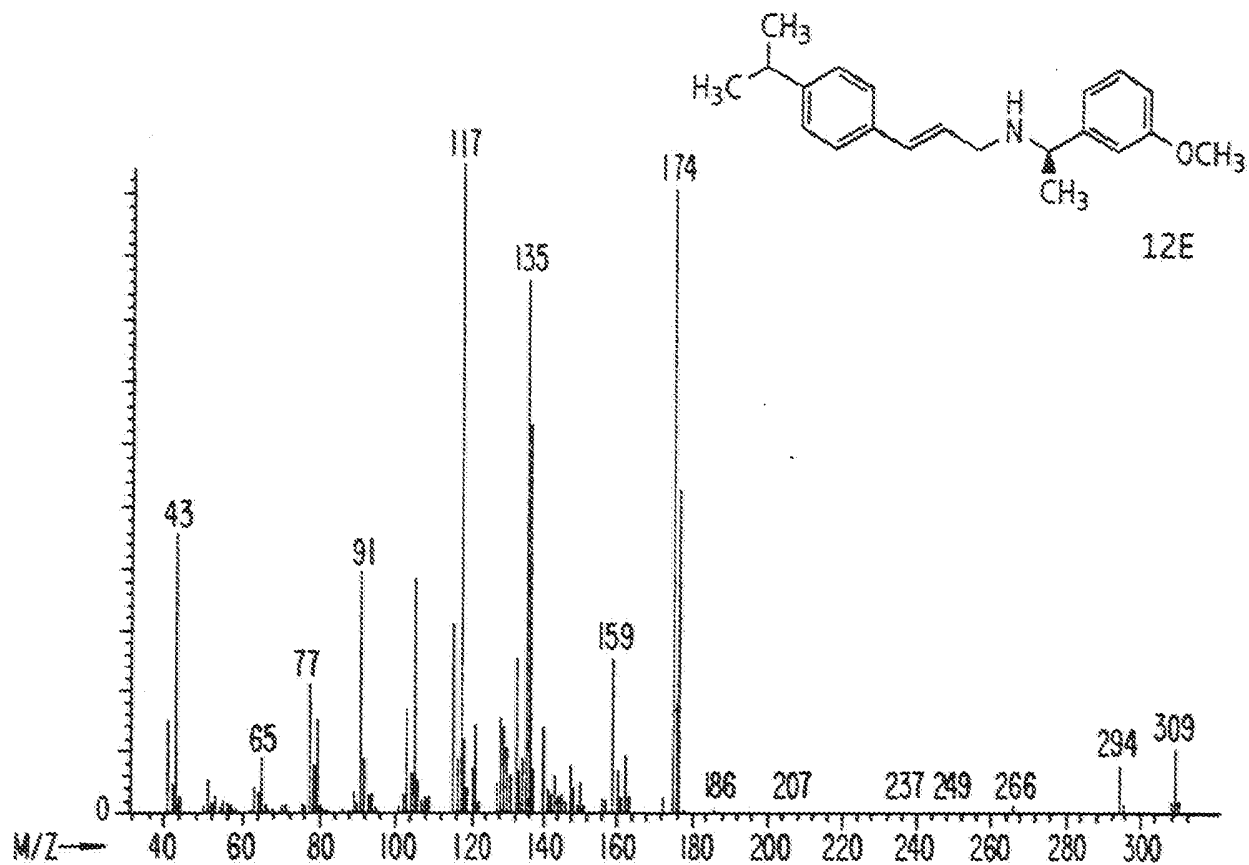


FIG. 33.

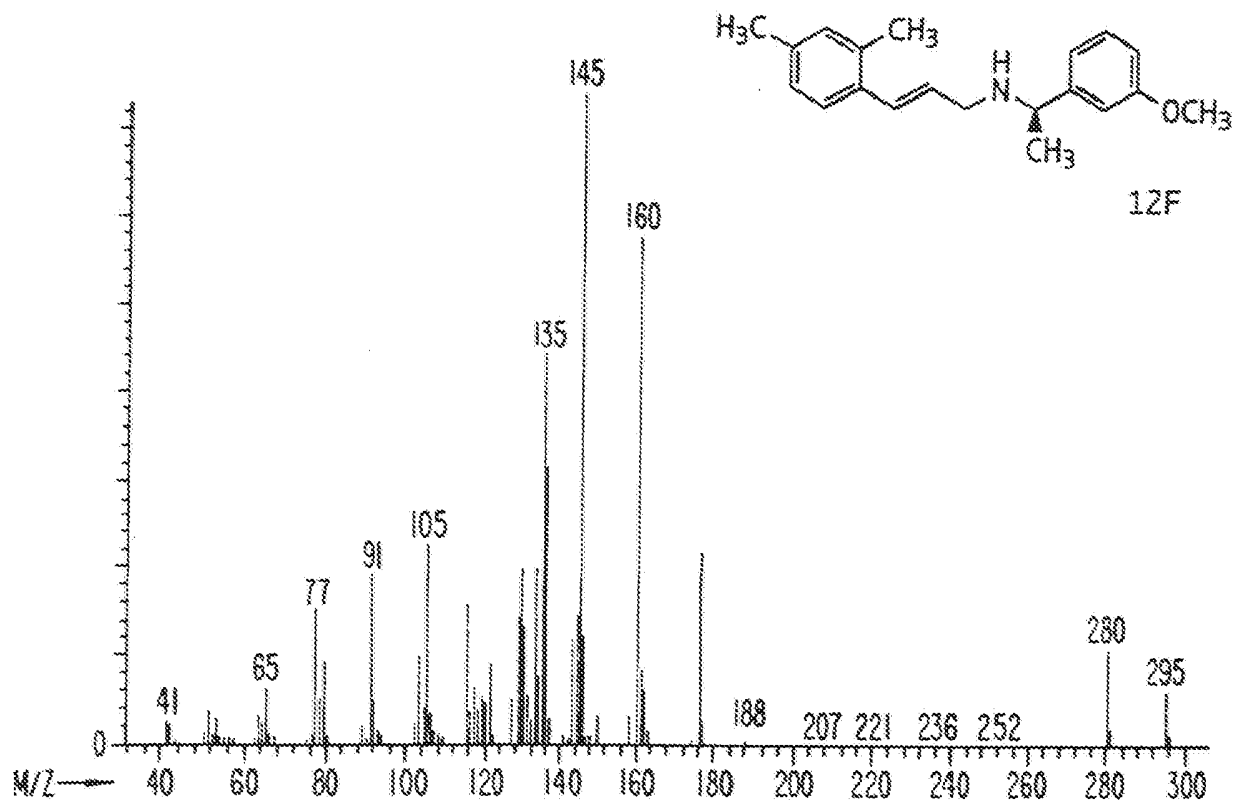


FIG. 34.

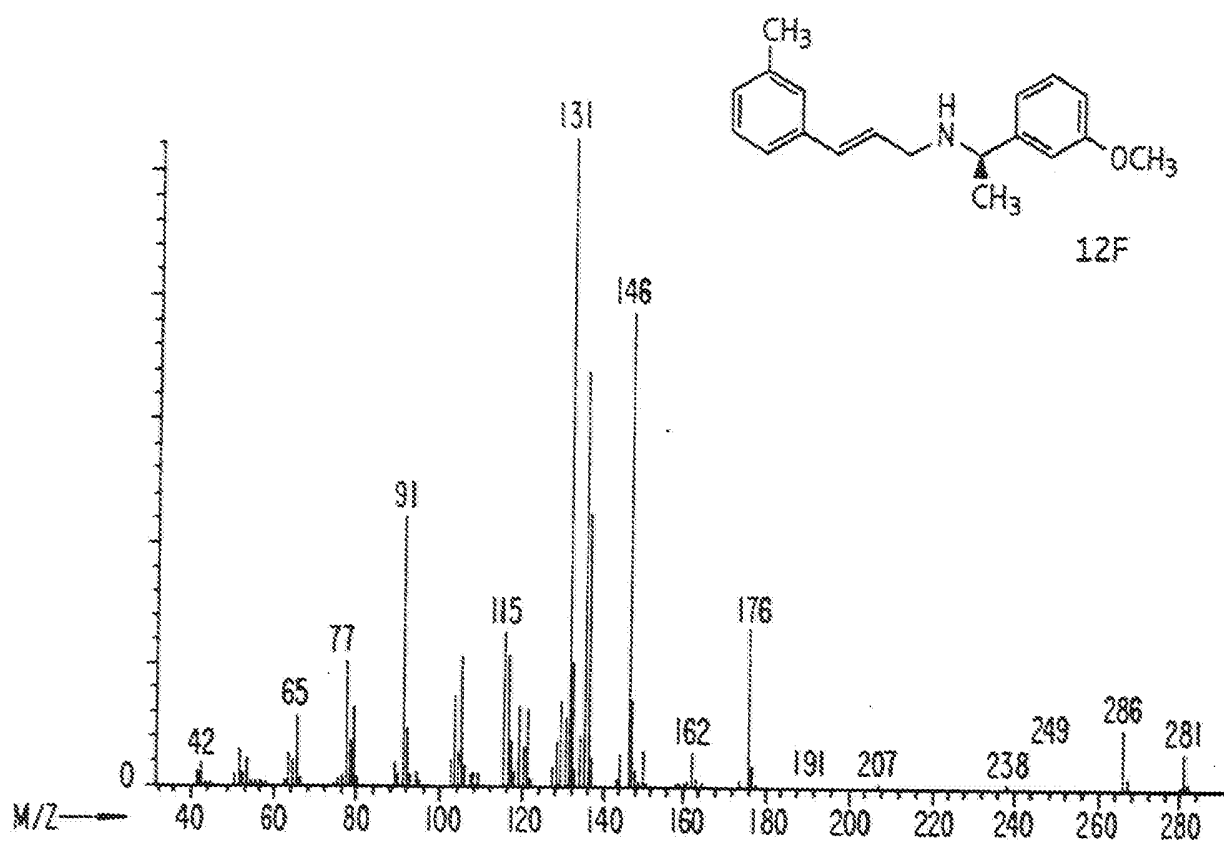
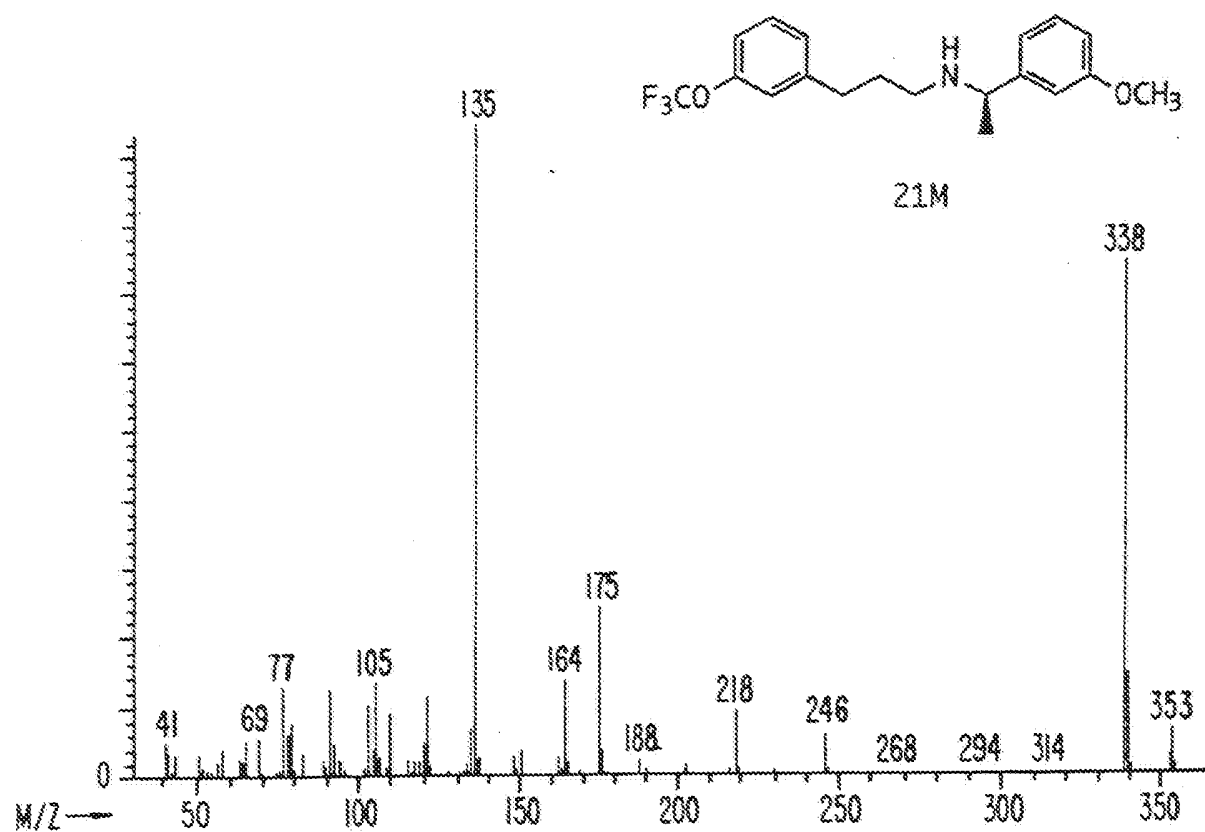


FIG. 35.

**FIG. 68.**

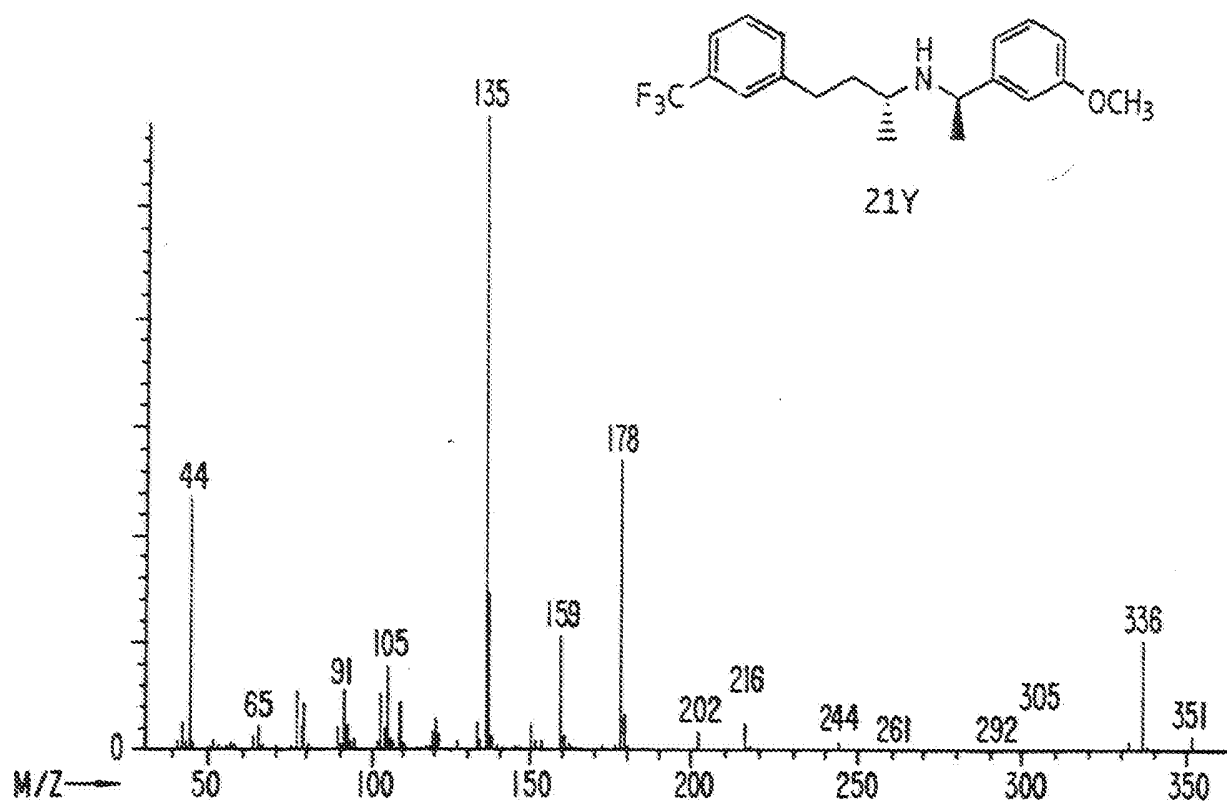


FIG. 73.

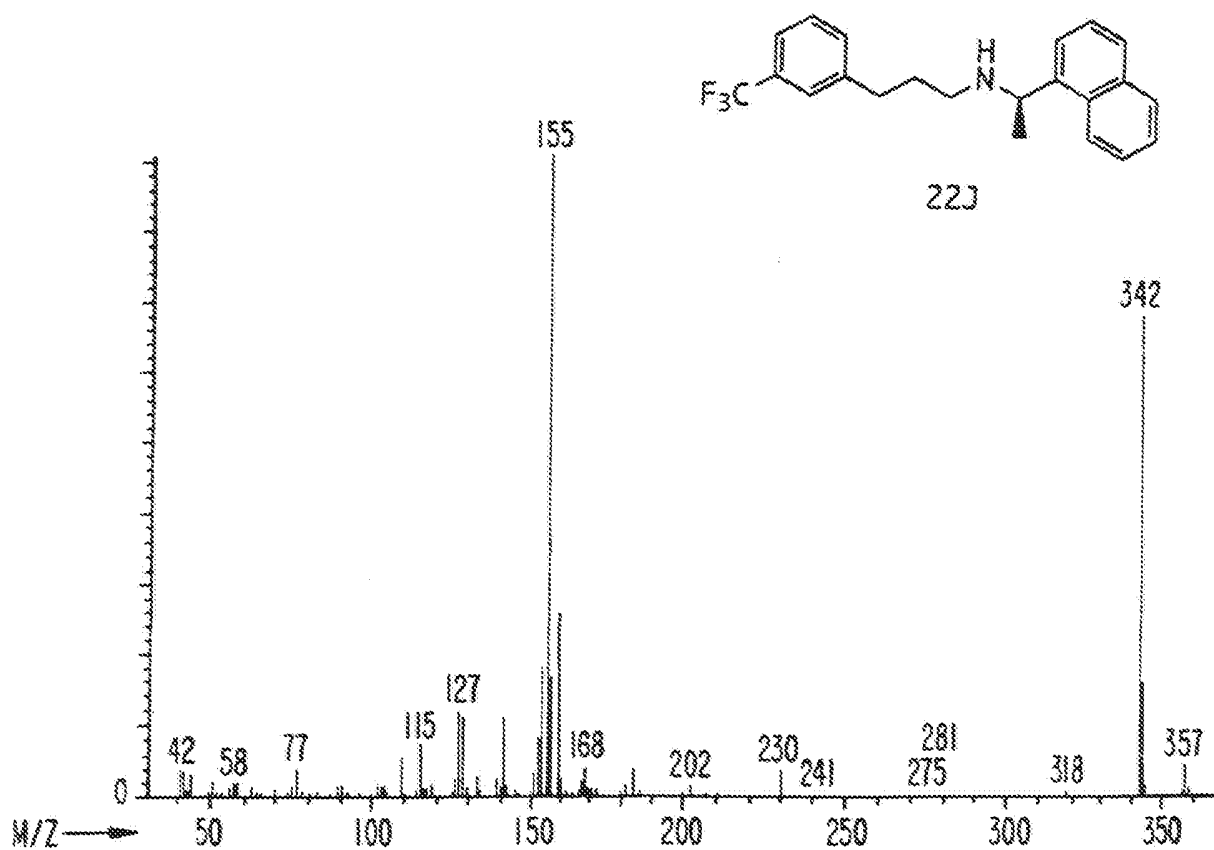


FIG. 74.

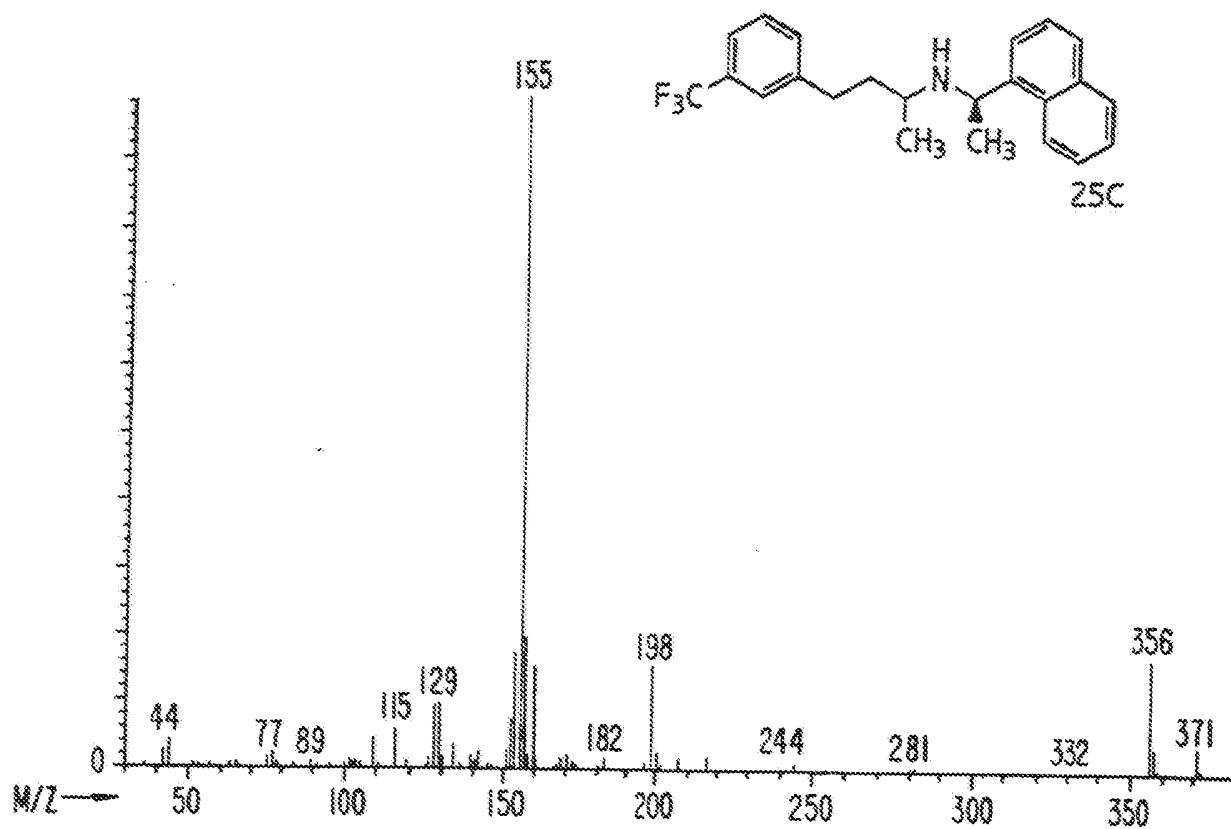


FIG. 89.

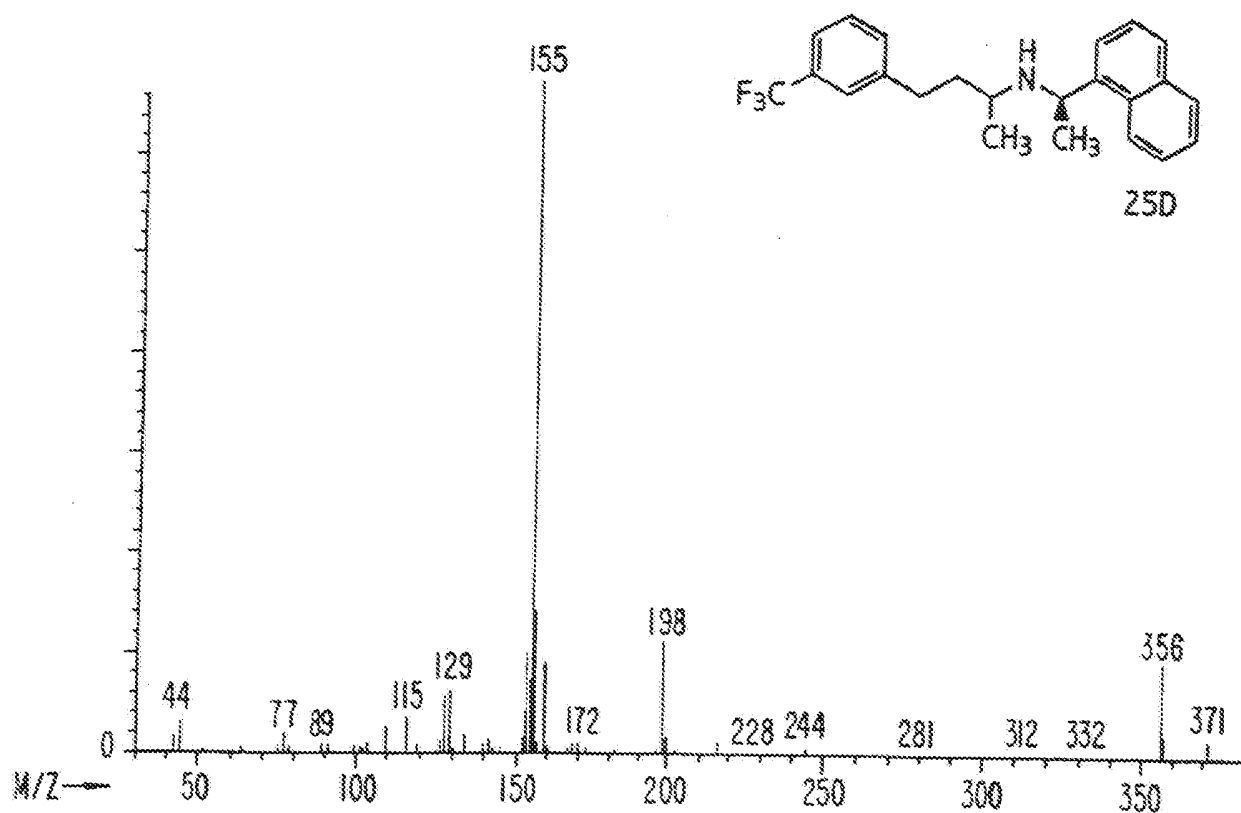


FIG. 90.

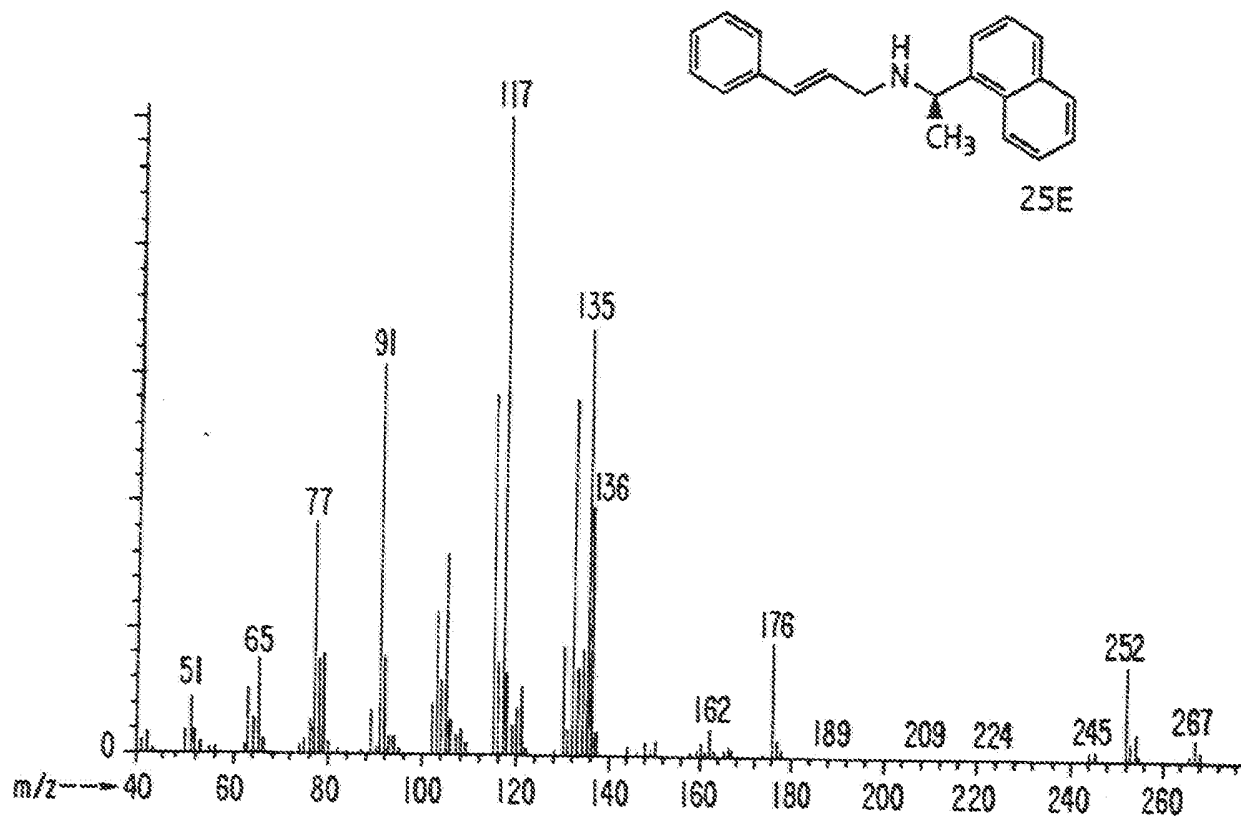


FIG. 91.

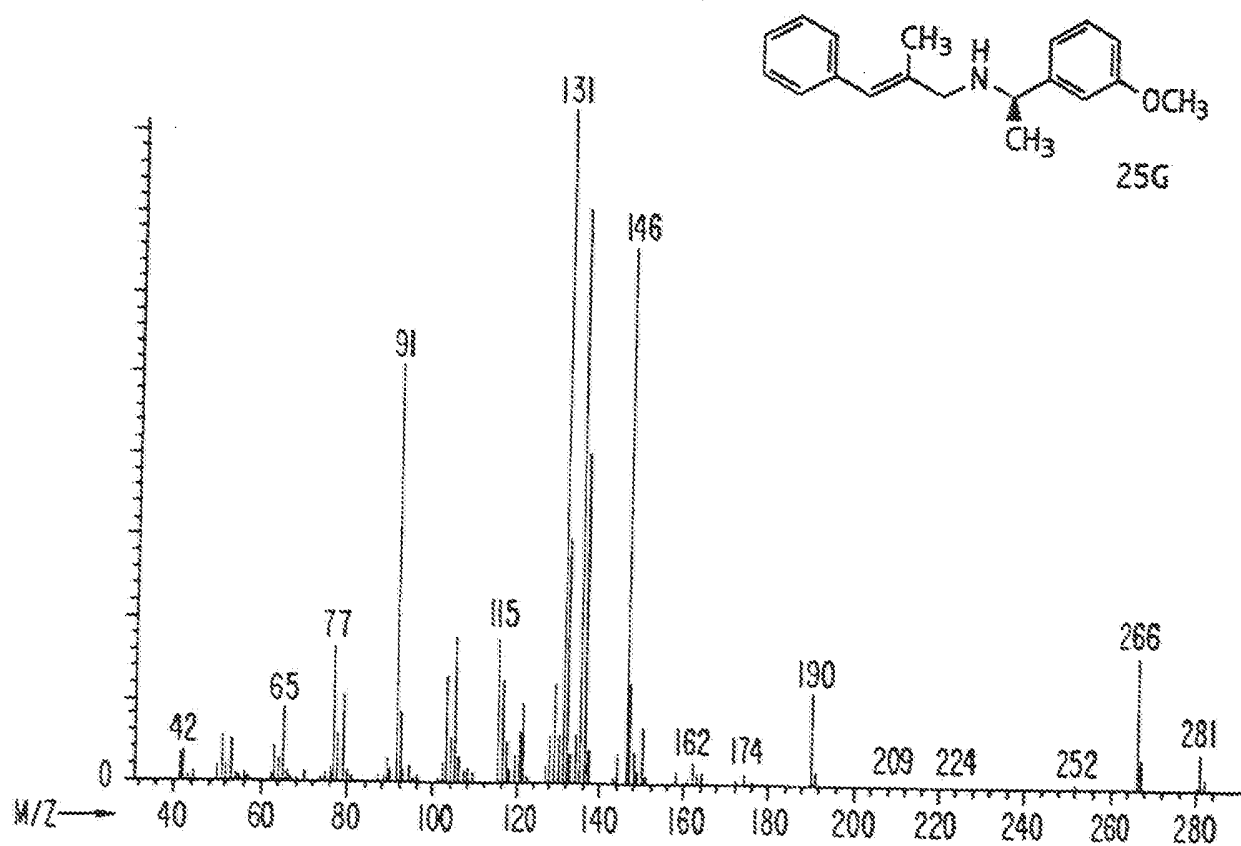


FIG. 92.

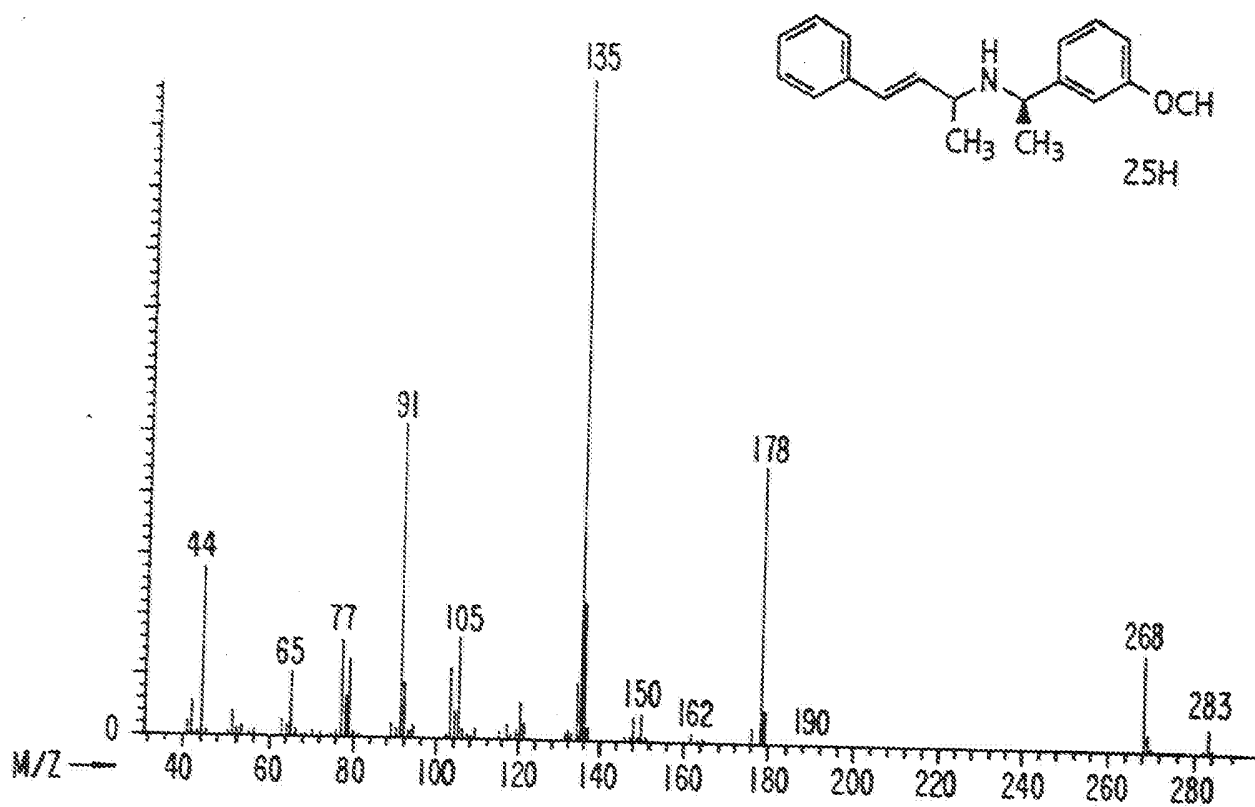


FIG. 93.

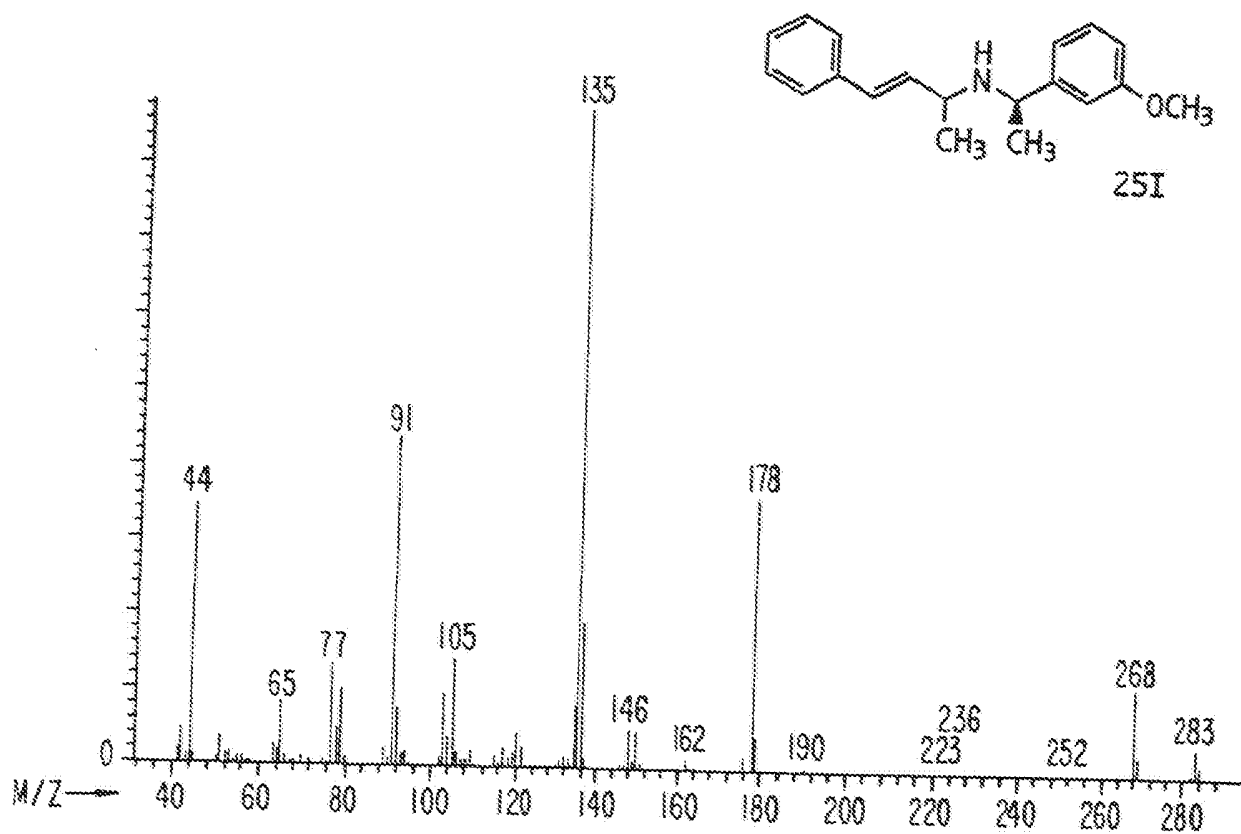


FIG. 94.