



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2222291 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.

A61K 31/196 (2006.01)
A61K 31/606 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2012.07.16
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2012.03.21
(86)	Europeisk søknadsnr	08863709.5
(86)	Europeisk innleveringsdag	2008.12.23
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2010.09.01
(30)	Prioritet	2007.12.24 IT MI20072429
(84)	Utpekte stater	AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MT NL NO PL PT RO SE SI SK TR
(60)	Utskilt fra	10188940.0 / 2 279 733
(73)	Innehaver	Giuliani International Limited, 33 Sir John Rogerson's Quay, Dublin, Irland
(72)	Oppfinner	BARONI, Sergio, Via Piazzolo 3 Villa d'Adda, Bergamo, Italia BELLINVIA, Salvatore, Via Brusafiera 12, Pordenone, Italia
(74)	Fullmektig	Onsagers AS, Postboks 1813 Vika, 0123 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	Forbindelser for den selektive behandlingen av den intestinale immuninflammatoriske komponenten i cøliakisydom
(56)	Anførte publikasjoner	US-A1- 2006 270 635 B1, WO-A-2005/072113 B1, WO-A-2007/010516 B1, HUSOVA L ET AL: "Hepatopathy, coeliac disease and lymphocytic colitis" CESKA A SLOVENSKA GASTROENTEROLOGIE A HEPATOLOGIE - CZECH AND SLOVAK GASTROENTEROLOGY AND HEPATOLOGY, CESKA LEKARSKA SPOLECNOST J.E. PURKYNE, PRAGUE, CZ, [Online] vol. 61, no. 6, 1 January 2007 (2007-01-01), pages 309-313, XP008105161 ISSN: 1213-323X Retrieved from the Internet: URL: http://www.csgh.info/detail.php?stat=2 89>

Oppfinnelsens område

Den foreliggende oppfinnelse angår forbindelser til selektiv behandling av den intestinale immuninflammatoriske komponent til cøliaki.

- 5 Den foreliggende oppfinnelse har sin opprinnelse i området for medikamenter til behandling av sykdommer som har en inflammatorisk komponent, og lokalisert på slimhinnenivå i den første traktus til tynntarmen, så som cøliaki.

Oppfinnelsens bakgrunn

- 10 Den foreliggende oppfinnelse angår spesielt en gruppe molekyler som er egnet for selektivt å redusere inflammasjonen som utvikles på duodenumnivået og i den proksimale jejunum hos individer som lider av cøliaki.

Cøliaki, også kjent som cøliakis sprue, er en meget vanlig autoimmunsykdom som har genetiske, immunologiske og miljømessige komponenter.

- 15 Grunnlaget for cøliaki er en permanent intoleranse for gliadin, en proteinfraksjon av gluten som er inneholdt i hvete, til lignende proteinfraksjoner som er løselige i alkohol (prolaminer), som er inneholdt i bygg, rug, spelt, khorasanhvete og i andre mindre betydelige kornsorter.

- 20 I cøliaki blir slimhinnen i tynntarmen ødelagt etter eksponering til antigenet (gliadin). I sykdommen vil tarmtottene ha en tendens til å bli flate, og kryptene hyperprolifererer for å kompensere, enterocytene får en kubisk istedenfor en sylindrisk fasong, og antall lymfocytter i tarmlumen øker.

- 25 Symptomatologien som følger sykdommen er meget kompleks, og ikke begrenset til det gastroenteriske området. Faktum er at de typiske symptomene på et lokalt nivå som vanligvis omfatter diaré, abdominal smerte med mulig blødning, laktoseintoleranse, blir fulgt av en ekstra intestinal symptomatologi som kan omfatte aftøs stomatitt, bensmerte, progressivt vekttap med svekkelse. Videre, i tilfelle ved ubehandlet eller refraktær cøliaki, er det i tillegg risiko for å utvikle gastrointestinalt lymfom eller karsinom.

- 30 Ikke sjelden kan videre individer med cøliaki utvise jernmangel eller mangel på ferritin, sammen med mulig mangel på vitaminer A, B12, D, E, K og folinsyre, forårsaket av intestinal malabsorpsjon. Videre kan kontinuerlig tap av fettstoffer gjennom avføring forårsake en kalsiumsvikt som utvikler to mulige komplikasjoner, den ene på nyrenivå med dannelse av kalsiumoksalatstener, og på den annen side på bennivå, med utvikling av stumalasi, en sykdom som forårsaker svekkelse i benstrukturen.

- 35 I en prosentandel av individene kan sykdommen til og med være fullstendig eller delvis asymptomatisk, dvs. ikke utvise noen klare symptomer, eller være i en latent form, klar til å bryte ut etter spesielle hendelser.

Siden antigenet som utløser sykdommen er kjent, er det mulig å oppnå en full remisjon av de korrelerte symptomer ved ganske enkelt å unngå inntak av glutenholdige matvarer.

5 Siden sykdomskontroll er basert på overholdelse av en streng diett, er det ikke tilstrekkelig å unngå inntak av matvarer som alle vet inneholder gluten, så som pasta, brød, bygg, spelt, men det er også essensielt å unngå inntak av matvarer som kan inneholde dette i små mengder, f.eks. som et fortykningsmiddel eller struktureringsmiddel, eller som sporstoff tatt i fremstillingen.

10 F.eks. må en pasient med cøliaki unngå å drikke espressokaffe på baren (denne kan være kontaminert med bygg), krydder, sukkerglasur, enkelte farmasøytiske preparater, og være oppmerksom på limet funnet f. eks på frimerker og postkonvolutter.

15 Dietten til pasienter med cøliaki kan i ethvert tilfelle være tilstrekkelig variert og godt balansert ved å spise bare matvarer så som ris, mais, bokkhvete, hisje, amarant, kjøtt, fisk, grønnsaker, frukt, ost og belgplanter.

20 I henhold til noen nylige undersøkelser er det en kritisk terskelverdi på 20 ppm gluten pr. matvare, over hvilke matvareinnholdet blir toksisk for individer med cøliaki. Codex Alimentarius ser for seg to typer av terskelverdier for å merke matvarer som glutenfrie. Den første er fastsatt til 100 ppm, og angår "detoksifiserte" matvarer, som i utgangsmaterialene også inneholder toksiske kornderivater, så som f.eks. hvetestivelse, og en 20 ppm terskelverdi for matvarer frie for ingredienser avledet fra toksiske kornsorter.

25 Den strenge oppmerksomheten på dietten og noen grunnleggende adferdsregler forhindrer igangsettelse av nye symptomer, og forårsaker generelt, på en mer eller mindre markert måte i henhold til den individuelle reaksjonen, remisjon av de utviklede symptomer. Dietten må imidlertid være under observasjon gjennom hele livet, på tross av mangel på symptomer, og til og med mangel på antistoffer i serum.

30 Ved siden av dietten er imidlertid ingen form for behandling for tiden tilgjengelig for individer med cøliaki, særlig er det ingen produkter som kan begrense de inflammatoriske symptomer som følger inntak, til og med tilfeldig, av glutenholdige matvarer.

De få terapeutiske intervensjonsmetoder som er forsøkt så langt, førte ikke til oppnåelse av signifikante resultater.

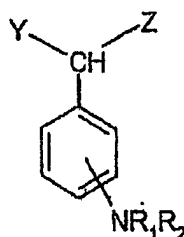
35 Siden sykdommen er strengt korrelert til noen gener som koder for antigenene til humane leukocytter (HLA) DQ2 og DQ8, er noen former for behandlinger rettet på å inhibere bindingen av peptidene i gluten på HLA DQ2/DQ8. Særlig har noen HLA-DQ2-blokkerende forbindelser blitt testet, men uten å oppnå signifikante resultater.

Anvendelse av zonulinantagonister, et protein involvert i regulering av de intercellulære sammenføyningene i tynntarmen, ekspresjon øker under sykdommens akutte fase, har blitt beskrevet i litteraturen for behandling av cøliakisyndromet. Intet legemiddel basert på dette proteinet er imidlertid for tiden tilgjengelig på markedet.

Videre har antiinflammatoriske medikamenter for topisk slimhinneanvendelse ikke funnet noen anvendelse til dags dato, utover ved behandling av kroniske intestinale inflammatoriske former, lokalisert på tykktarmnivå, den distale traktus til tarmen. Av denne grunn er preparatene tilgjengelig på markedet for å behandle Crohns sykdom, og ulserøs kolitt solgt som stikkpiller eller løsninger for rektal anvendelse. Tvert imot, når disse preparatene er ment for oral administrering, blir de formulert for forsinket frigjøring av det aktive prinsipp, slik at det kan passere intakt gjennom fordøyelsessystemet, og tillate frigjøring av det aktive prinsipp bare på kolon eller tykktarmnivå.

Disse medikamentene har derfor ingen effekt på den duodenale del av tarmen hvor det inflammatoriske fokus i cøliaki er lokalisert.

WO 2007/010516 beskriver en forbindelse med følgende formel



hvor R_1 og R_2 kan være identiske eller forskjellige, og er valgt fra gruppen som omfatter H eller lineær eller grenet alkylgruppe, som har fra 1-6 karbonatomer, eller sammen danner en aromatisk eller alifatisk ring; Y og Z, som kan være identiske eller forskjellige, er valgt fra gruppen som omfatter H, -OH, -COOH, -OR₃, -CH(OR₃)COOH, hvor R_3 er valgt fra H, fenyl, benzyl, -CF₃, eller -CF₂CF₃, vinyl, alyl og en lineær eller forgrenet alkylgruppe som har fra 1-6 karbonatomer. Slike forbindelser er blitt beskrevet for anvendelse til å forhindre og behandle tumorer som uttrykker PPAR γ -reseptorene, og EGF-reseptorene, og for behandling av kroniske inflammatoriske sykdommer. Ingen referanse til cøliaki er gjort.

WO 2005/072113 beskriver sammensetning for inflammatoriske tarmsykdommer eller andre inflammatoriske sykdommer, som omfatter 5-aminosalicylsyre eller farmasøytisk akseptabelt salt eller ester derav; minst én antioksidant; og en farmasøytisk akseptabel bærer. Søknadsgjenstanden til en slik patentsøknad avviker fra den foreliggende bare ved at den basiske fenylstrukturen er substituert med -CH(Y)(Z) og ikke med -COOH.

US 2006/270635 beskriver derivater av 4- eller 5-aminosalicylsyre og en farmasøytisk sammensetning som inneholder disse derivater med 4- eller 5-aminosalicylsyre som aktive ingredienser, nyttig til behandling av intestinale sykdommer som inflammatorisk tarmsykdom (IBD) og irritabel tarmsykdom (IBS) og til å forhindre/behandle tykktarmskreft. Referanse til cøliaki er gjort bare som en mulig sykdom blant forskjellige andre.

Derfor er det for tiden opplevd et klinisk behov for å ha stoffer tilveiebrakt med farmakologisk aktivitet som ville tillate gjenvinning av de immunoinflammatoriske baserte symptomer som utvikles på nivået til duodenale slimhinner i tynntarmen i cøliaki.

Oppsummering av oppfinnelsen

En generell hensikt med foreliggende oppfinnelse består i å tilveiebringe nye egnede indikasjoner på anvendelse av forbindelser tilveiebrakt med en farmakologisk aktivitet.

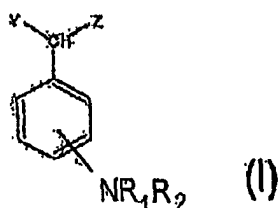
En av hovedhensiktene til foreliggende oppfinnelse er derfor å tilveiebringe forbindelser tilveiebrakt med en selektiv virkning på den lokale immunoinflammatoriske komponent i cøliaki.

På én side har søkeren funnet at forbindelser med formel (I) beskrevet heri nedenfor, har spesifikk affinitet, og er f.eks. agonist for PPARgamma (PPAR γ) reseptorer, og tilveiebringer aktivering derav. Særlig har nærvær av en slik reseptor blitt oppdaget på nivået til duodenale epitelceller hos pasienter påvirket av cøliaki, hvor den antiinflammatoriske virkning av forbindelse med formel (I) ble vist ved en reduksjon av produksjon av inflammatoriske cytokiner.

Typisk har forbindelsene med formel (I) aminofenylpropionliknende struktur, og virker ved å blokkere cytokinene frigjort under cøliaki.

I én utforming er forbindelsene med formel (I) spesifikt nyttig ved behandling av cøliaki refraktært til dietten, ved diettfeil, og for å redusere remisjonstiden for cøliaki.

I henhold til en side av foreliggende oppfinnelse er det tilveiebrakt anvendelse av en forbindelse med formel (I)



hvor

R1 og R2, like eller forskjellige fra hverandre, er valgt fra gruppen som består av -H eller en lineær eller forgrenet alkylgruppe som har 1-6 karbonatomer,

Y og Z, like eller forskjellige fra hverandre, er valgt fra gruppen som omfatter -H, -OH, -COOH, -OR₃, -CH(OR₃)COOH,

- 5 hvori R₃ er valgt fra H, en lineær eller forgrenet alkylgruppe som har 1-6 karbonatomer, og

farmasøytisk akseptable salter eller estere derav, for anvendelse til behandling av den immuninflammatoriske komponent i cøliaki.

10 **Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen**

På én side er ytterligere eksempler på forbindelse med formel (I) egnet for anvendelse i oppfinnelsen beskrevet i søknaden WO 2007/010516.

- 15 Søkeren har notert seg at forbindelse med formel I har en spesifikk aktivitet på den immuninflammatoriske komponent observert på nivået til tarmslimhinnen, særlig på nivået til den andre duodenale del hos individ med cøliaki.

- 20 Søkeren har videre notert seg at den lokale antiinflammatoriske aktivitet utvist av forbindelsen med formel (I) kan refereres til en inhibitorisk aktivitet på frigjøring av cytokiner, stoffer som har en viktig rolle i betennelsesprosesser og/eller at de blir kroniske. Særlig er det overraskende blitt funnet at forbindelsene med formel I på en vesentlig måte, eller i alle fall vesentlig og signifikant inhiberer cytokinene bare hos pasienter med cøliaki, mens de ikke har en signifikant aktivitet hos individer som lider av inflammatoriske sykdommer som påvirker en spesifikk gastrointestinal traktus utover cøliaki.

- 25 Særlig er forbindelsen med formel I egnet for å blokkere de såkalte probetennelses Th1 (T-hjelpeceller type 1) cytokiner, siden de favoriserer rekruttering av immun- og inflammatoriske celler på lesjonsstedet.

- 30 Denne spesifikke aktiviteten kan tilskrives det faktum at i cøliaki reflekterer hardnakketheten til en type Th1 flogose eller betennelse, aktivering av immunsystemet mot antigenet (gliadinfraksjonen til gluten) som ikke kan elimineres, og mot hvilke systemet ikke er i stand til å utvikle toleranse.

- 35 Typiske proflogogenet eller probetennelsescytokiner (Th1) involvert i immunopatogenesen til cøliaki omfatter (L-1, IL-2, IL-6 (interleukiner 1, 2, 6), IFN (interferon). Videre er cytokinene assosiert til Th2 (T-hjelpecelle type 2), så vel som cytokinene avledet fra makrofager så som TNF- α (tumornekrosefaktor) også involvert i cøliaki. Særlig har TNF- α en viktig rolle i utvikling av kronisk inflammatoriske sykdommer på grunn av dens evne til å forsterke produksjonen av proflogogene cytokiner, hvorav noen er tilveiebrakt med betydelig toksisitet.

Særlig har virkningen av forbindelsene med formel (I) på produksjon og frigjøring av cytokiner fra intestinale slimhinneprøver som lider av cøliaki blitt verifisert ved å bruke et organisk kultursystem. Særlig har en effektiv reduksjon av flogose eller betennelse blitt fremhevet ved en signifikant reduksjon av IFN- γ , IL-2, TNF- α verdier ved å bruke én eller flere av forbindelsene med formel (I) i biopsier av intestinal slimhinne utsatt for dyrking.

I henhold til en annen side av oppfinnelsen er det tilveiebrakt anvendelse av en forbindelse med formel I som beskrevet tidligere, til fremstilling av et legemiddel for å behandle inflammasjon hos individer med refraktær cøliaki.

- 10 I henhold til en annen side av oppfinnelsen er det tilveiebrakt anvendelse av en forbindelse med formel I som beskrevet tidligere, til fremstilling av et legemiddel for å behandle en inflammatorisk reaksjon hos et individ med cøliaki på en diett, utløst av en diettfeil. I henhold til en annen side av oppfinnelsen er det tilveiebrakt anvendelse av en forbindelse med formel I til fremstilling av et medikament, typisk
- 15 i kombinasjon med én eller flere farmasøytisk akseptable eksipienter eller adjuvanser, til å behandle den immunoinflammatoriske komponent i cøliaki for å forkorte den kliniske og/eller histologiske remisjonstid.

- Til fremstilling av medikamenter i henhold til én eller flere av sidene til oppfinnelsen er det også mulig å anvende, i tillegg til én eller flere farmasøytisk akseptable eksipienter, også smøremidler, fuktighetsmidler, oppslemmingsmidler, dispergeringsmidler, preservevende midler typisk brukt innenfor området til preparater for farmasøytisk anvendelse.
- 20

- I én utforming kan forbindelser med formel (I) administreres i forskjellige former så som tabletter, kapsler, granulære formuleringer, dispersjoner, og andre formuleringer som er typisk i det farmasøytiske området.
- 25

Typisk kan de aktive ingredienser (I) inkorporeres i formuleringen som er egnet for administrering i en mengde som er effektiv til å oppnå en antiinflammatorisk respons i cøliaki.

- Ved hjelp av et eksempel kan den aktive ingrediens inkorporeres i den farmasøytiske sammensetning i en mengde som varierer fra 50 mg til 2000 mg, fortrinnsvis i området fra 200-600 mg, mer fortrinnsvis fra 250-500 mg.
- 30

Det har blitt vist at anvendelse av medikamenter basert på én eller flere forbindelser med formel (I) gir en forbedring av overensstemmelsen mellom pasient og doktor, og reduserer remisjonstiden.

- 35 I en annen utforming har forbindelsen med formel (I) funnet ytterligere terapeutisk anvendelse ved behandling av resistent og/eller refraktær cøliaki.

De følgende eksempler er gitt bare som en illustrasjon av foreliggende oppfinnelse, og er ikke ment til å begrense området til beskyttelsen som gis av de vedlagte krav.

Referanseeksempel 1

Virkningen av mesalazin på den inflammatoriske komponent observert i cøliaki ble evaluert.

5 I dette tilfellet ble 16 individer med sykdommen i aktiv fase, og 6 pasienter i klinisk remisjonsfase på en glutenfri diett valgt.

5 biopsifragmenter for hvert undersøkte individ ble tatt ved EGDS-undersøkelse.

5 biopsifragmenter for hvert undersøkte individ ble tatt med EGDS-undersøkelse.

Hvert fragment av tarmslimhinnen ble plassert i kultur med et egnet medium, både med og uten mesalazin (5ASA).

10 Det følgende ble deretter observert i kulturvæskene:
nivået til cytokiner frigjort i de forskjellige kulturmedia og
mengden av de samme cytokiner tilstede i den egnet homogeniserte
biopsislimhinnen.

Materialer og metoder

15 Metode

3 grupper av individer ble evaluert.

Den første (atrofiske) gruppe inkluderte 29 individer med serumtester som var positive til antiendomysium og antitransglutaminaseantistoffer, med en neodiagnose av cøliaki og glutenholdig diett.

20 Den andre (remisjon) gruppen inkluderte 17 individer med cøliaki i klinisk remisjon og glutenfri diett for minst 6 måneder.

Den tredje (friske) gruppe inkluderte individer som ikke led av cøliaki, men led av inflammasjon i den gastroenteriske traktus.

Cytokinassay i kulturvæsker

25 Organkulturer:

Pasientene som ble undersøkt ble utsatt for 5 biopsier av duodenal mukosa eller slimhinne, med EGDS-undersøkelse: én for histologisk undersøkelse, og de andre fire (hver oppdelt i to deler) utsatt i kultur, henholdsvis med bare ett kulturmedium (medium C) og med gliadinpeptid, og med kulturmedium med gliadin i nærvær av
30 mesalazin (medium+5ASA C).

Biopsiene ble vasket i saltløsning i 2 minutter minst tre ganger. Biopsiene ble plassert i kulturmedia som har et volum likt 1 ml:

MEDIUM (RPM11860 + føtalt kalveserum + penicillin/streptomycin)

MEDIUM + peptisk-tryptisk fordøyelse av gliadin eller 31-43 eller andre kornsorter

35 MEDIUM + mesalazin (5-ASA)

MEDIUM + peptisk-tryptisk fordøyelse av gliadin + 5-ASA (1,5-8,0 mg pr. ml medium)

Biopsiene blir inkubert i en O₂ (95 %) og CO₂ (5 %) atmosfære ved en temperatur på 37°C over en periode som varer fra 4 timer til 72 timer.

Tre forskjellige mengder av medium blir delt for ELISA-assayet Th1 og Th2 cytokiner frigjort i kulturmediene.

5 Cytokinassay fra homogenat

Etter en inkubasjonstid som varer fra 4 timer til 72 timer, ved en T på 37°C;

- ble det biopiske fragmentet vasket tre ganger i saltløsning for 2 minutter
- biopsiene blir homogenisert med mekanisk eller kjemisk disintegrering.

10 Sentrifugering ble utført, supernatanten blir oppsamlet, og overført til en 1,5 ml Eppendorf.

Fikserte cytokiner i slimhinnevevet blir assayet med Elisa-assayet.

Resultater

15 Dataene som ble funnet viser at nærværet av mesalazin i kulturmediene blokkerer cytokinene bare hos individer med cøliaki, og viser således selektivt en reduksjon av den inflammatoriske komponenten i prøver tatt fra individer med cøliaki (tabell 1).

Tabell 1: medium C/medium+5ASA. C

				Std Dev		Std feil				Wilcoxon signed Rank Test
Populasjon	Cytokin	Parameter	N	Gj sn			Min	Median	Maks	
Atrofisk	IFN	Medium C	22	0,196	0,197	0,0420	0,0450	0,119	0,916	p=0,08
		Medium + 5ASA C	22	0,138	0,165	0,0351	0,0330	0,0670	0,780	
		Forskjell	22	0,0601	0,250	0,0533	-0,549	0,0260	0,877	
	IL-2	Medium C	15	0,175	0,138	0,0351	0,0100	0,161	0,589	p=0,08
		Medium + 5ASA C	15	0,119	0,0978	0,0252	0,0130	0,0910	0,355	
		Forskjell	15	0,0559	0,0657	0,0221	-0,060	0,0490	0,258	
	TNF	Medium C	21	0,477	0,585	0,128	0,0550	0,174	2077	p=N S
		Medium + 5ASA C	21	0,472	0,651	0,142	0,0590	0,204	2134	
		Forskjell	21	0,0048	0,447	0,0974	-1,396	0,0150	0,972	
		Medium C	15	0,240	0,154	0,0398	0,0610	0,209	0,534	
		Medium + 5ASA C	15	0,201	0,135	0,0348	0,0390	0,208	0,429	
		Forskjell	15	0,0383	0,123	0,0317	0,262	0,0500	0,209	

Remisjon	IFN								p=N S
		Medium C	12	0,315	0,176	0,0509	0,0420	0,284	0,732
		Medium + 5ASA C	12	0,309	0,223	0,0644	0,0500	0,253	0,737
		Forskjell	12	0,0061	0,147	0,0425	0,314	5E-4	0,201
	IL-2								p=N S
		Medium C	15	0,948	0,796	0,206	0,0830	0,579	2477
		Medium + 5ASA C	15	0,894	0,689	0,178	0,249	0,571	2301
		Forskjell	15	0,0541	0,297	0,0767	0,460	0,0790	0,728
	TNF								p=N S
		Medium C	7	0,145	0,0643	0,0243	0,102	0,112	0,281
		Medium + 5ASA C	7	0,149	0,0480	0,0182	0,111	0,140	0,252
		Forskjell	7	0,004	0,0398	0,0150	0,047	0,029	0,050
Positiv kontroll	IFN								p=N S
		Medium C	7	0,532	0,171	0,0659	0,223	0,835	0,790
		Medium + 5ASA C	7	0,356	0,140	0,0530	0,169	0,379	0,529
		Forskjell	7	0,116	0,169	0,0638	-0,028	0,247	0,351
	IL-2								p=0,07
		Medium C	7	0,253	0,129	0,0486	0,105	0,220	0,489
		Medium + 5ASA C	7	0,259	0,105	0,0397	0,127	0,229	0,434
		Forskjell	7	0,005	0,201	0,0761	0,260	0,0040	0,362
	TNF								p=N S

Tabell 2: PC C/PT+5ASA C

Populasjon	Cytokinn	Parameter	N	Gj.sn	Std Dev		Std feil		Wilcoxon signed Rank Test
							Min	Median	Maks
Atrofisk		PT C	22	0,211	0,213	0,0454	0,0400	0,128	0,849
		PT+5ASA C	22	0,145	0,195	0,0416	0,0270	0,0545	0,816
		Differanse	22	0,0657	0,178	0,0379	-0,244	0,0505	0,563
	IFN								p=0,05
		PT C	15	0,151	0,124	0,0320	0,0100	0,124	0,507
		PT+5ASA C	15	0,124	0,137	0,0355	0,0070	0,0770	0,440
	IL-2	Differanse	15	0,0270	0,0749	0,0193	-0,217	0,0410	0,0900
									p=0,012
		PT C	21	0,600	0,788	0,172	0,0550	0,200	2,725

[illegible]

Tabell 3: medium O/medium+5ASA O

					Std Dev	Std fejl				Wilcoxon signed Rank Test
Populasjon	Cytokin	Parameter	N	Gj sn			Min	Median	Maks	
Atrofisk	IFN	Medium O	9	0,277	0,0561	0,0187	0,212	0,274	0,361	p=0,003
		Medium+5ASA	9	0,202	0,0585	0,0195	0,125	0,193	0,311	
		Differanse	9	0,0951	0,0594	0,0198	0,0270	0,0560	0,227	
		Medium O	0							
		Medium+5ASA	0							

		Differanse	0						
Remisjon	IL-2								
	Medium O	11	0,138	0,0548	0,0165	0,0710	0,115	0,233	
	Medium+5ASA	11	0,123	0,0395	0,0199	0,0660	0,106	0,174	
	Differanse	11	0,0154	0,0297	0,0089	-0,035	0,0100	0,640	
	TNF								p=N S
	Medium O	4	0,252	0,0748	0,0374	0,183	0,251	0,324	
	Medium+5ASA	4	0,133	0,0577	0,0289	0,0490	0,151	0,174	
	Differanse	4	0,120	0,0505	0,252	0,0440	0,142	0,150	
	IFN								p=N S
	Medium O	0							
	Medium+5ASA	0							
	Differanse	0							
Positiv kontroll	IL-2								
	Medium O	5	0,122	0,0331	0,0118	0,0800	0,133	0,159	
	Medium+5ASA	5	0,122	0,0230	0,0103	0,0960	0,114	0,154	
	Differanse	5	-0,00	0,0371	0,0169	-0,057	0,0050	0,0370	
	TNF								p=N S
	Medium O	0							
	Medium+5ASA	0							
	Differanse	0							
	IFN								
	Medium O	0							
	Medium+5ASA	0							
	Differanse	0							
	IL-2								
	Medium O	0							
	Medium+5ASA	0							
	Differanse	0							
	TNF								

Tabell 4: PT O/PT+5ASA O

				Std Dev	Std feil					Wilcoxon signed Rank Test
Populasjon	Cytokin	Parameter	N	Gj sn			Min	Median	Maks	
Atrofisk	IFN	PT O	9	0,223	0,0496	0,0165	0,151	0,223	0,287	p=0,019
		PT+5ASA O	9	0,179	0,0589	0,0196	0,100	0,193	0,243	

12

		Differanse	9	0,0437	0,0409	0,0136	-0,009	0,0380	0,0980	
		PT O	0							
		PT+5ASA O	0							
	IL-2									
		Differanse	0							
		PT O	11	0,156	0,0627	0,0189	0,0680	0,134	0,254	
		PT+5ASA	11	0,101	0,0483	0,0140	0	0,0980	0,160	
	TNF									p=0,002
		Differanse	11	0,0554	0,0735	0,0222	-0,004	0,0270	0,254	
		PT O	4	0,200	0,0931	0,0466	0,120	0,172	0,334	
		PT+5ASA	4	0,177	0,0692	0,0346	0,120	0,161	0,264	
Remisjon	IFN									p=N S
		Differanse	4	0,0230	0,0411	0,206	-0,021	0,0215	0,0700	
		PT O	0							
		PT+5ASA O	0							
	IL-2									
		Differanse	0							
		PT O	5	0,126	0,0276	0,0123	0,0840	0,127	0,158	
		PT+5ASA O	5	0,107	0,0310	0,0139	0,0630	0,110	0,1480	
	TNF									p=N S
		Differanse	5	0,0194	0,0089	0,0040	0,0100	0,0210	0,310	
Positiv kontroll	IFN									
		PT O	0							
		PT+5ASA O	0							
		Differanse	0							
		PT O	0							
		PT+5ASA O	0							
	IL-2									
		Differanse	0							
		PT O	0							
		PT+5ASA O	0							
	TNF									
		Differanse	0							

Den oppnådde reduksjon av den inflammatoriske komponenten tillater anvendelse av mesalazin alene eller som en terapeutisk støtte i alle sene eller vanskelige kliniske problemtilfeller.

Referanseeksempel 2

Genekspresjon av cytokiner

Biopsifragmentene fra duodenum tatt fra pasienten under gastroskopi prosedyren har blitt plassert i kultur ved 37°C i 48 timer i fravær og nærvær av 5-ASA-

5 medikamentet. Etter kulturen har fragmentene blitt homogenisert i en enkeltfaseløsning, sammensatt av fenol og guanidinium (Isol-RNA lysereagens).

En homogenisator IKA T10-Ultra Turrax er blitt brukt for homogeniseringen.

Alt uoppløselig materiale er blitt separert fra løsningen ved sentrifugering, og supernatanten er blitt overført til et rent reagensrør, til hvilket 200 µl kloroform pr. 10 ml av lyse er blitt tilsatt.

Etter en kort mekanisk risting er prøvene hensatt for setting i noen minutter ved omgivelsestemperatur, og senere sentrifugert på 12000 rpm i 15 min. ved 4°C. Det uorganiske trinnet som inneholder RNA er blitt overført til et rent reagensrør.

RNA har blitt gjort til et bunnfall ved å tilsette 500 µl isopropylalkohol pr. ml lyse. 15 Prøvene er blitt inkubert ved omgivelsestemperatur i 10 min., og deretter sentrifugert på 12000 rpm i 15 min. ved 4°C.

Etter å ha fjernet supernatanten er RNA-sedimentet blitt vasket med 1000 µl 75 % etanol pr. ml lyse, ristet mekanisk og sentrifugert på 7500 rpm i 5 min. ved 4°C. Avslutningsvis er etanolen fjernet, og RNA-sedimentet er blitt lufttørket under en 20 kjemisk hette.

RNA er blitt resuspendert i en egnet mengde av RNasi-fritt vann.

Konsentrasjonen av RNA er blitt bestemt ved å måle absorpsjonen på 260 nm i spektrofotometeret; i tillegg til at forholdet A260/A280 for forskjellige RNA-templater er blitt evaluert.

25 RT-PCR

cDNA er blitt syntetisert ved å begynne med forskjellige mengder av ekstrahert RNA fortynnet i egnede volumer av RNasi-fritt vann. cDNA til de angitte gener (cytokiner) er blitt amplifisert ved PCR med anvendelse av spesifikke primere.

Masterskript-RT-PCR-system (5 PRIME) er blitt brukt for RT-PCR.

30 For å verifisere nærvær og mengde av mRNA som koder for cytokinene i biopsiprøvene er det blitt utført en 1 % agarosegelelektroforese i 1X TBE.

Resultatene som ble oppnådd er vist i referanseeksemplet i fig. 1.

Referanseeksempel 3

35 Nærvær av PPARgamma-reseptor i duodenalepitelialceller fra pasienter med cøliaki

Peroksisom proliferatoraktivert peceptor-gamma tilhører superfamilien til nukleære

reseptorer som inkluderer reseptorer for østrogener, glukokortikoider, tyroidhormoner, vitamin D3 og retinsyre, så vel som reseptorer som er i stand til å binde forskjellige produkter fra lipidmetabolismen, så som PPAR- og LXR-reseptoren.

- 5 Spesifikt inkluderer PPAR-familien tre undertyper (PPAR alfa, beta eller delta, og gamma) med forskjellig vevsdistribusjon og forskjellig ligandspesifisitet.

Både PPAR gamma og alfa er blitt uttrykt i differensierte humane makrofager, hvor de regulerer genene implisert i den inflammatoriske respons, og modulerer makrofagdifferensiering.

- 10 Forskjellige PPARgamma agonister inhiberer produksjonen av inflammatoriske cytokiner i humane monocytter, og reduserer genekspresjonen for TNF-alfa, IL-6, IL-1b, iNOS, gelatinøs B, renovasjonsreseptor A og COX-2 i aktiverte makrofager, noe som konfirmerer den antiinflammatoriske rollen til PPARgamma.

- 15 En av de viktigste hensiktene var å detektere nærvær av en slik reseptor i duodenale epitelceller hos pasienter med cøliaki, hvor den antiinflammatoriske effekten av forbindelsen med formel I, og spesifikt 5-ASA vist med en reduksjon av produksjon av inflammatoriske cytokiner, er tidligere blitt konfirmert.

Immunofluorescens

- 20 Et duodenalt biopsifragment er blitt tatt ved EGDS-prosedyre, både fra pasienter med cøliaki på glutenholdig diett, og fra individer som ikke er affisert av cøliaki (kontrollgruppe). Biopsifragmentene er blitt vasket, orientert i OCT, og lagret ved -80°C. Noen snitt på 5 µm er blitt oppnådd fra hvert frosne biopsistykke (tatt i EGDS-trinnet både fra pasienter med cøliaki og fra individer som ikke er affisert av sykdommen), slike snitt er blitt eksponert for PPARgamma primære antistoff natten over (etter egnet fiksering og spesifisitetselimineringsbehandlinger).

- 25 Etter å ha blitt vasket i PBS ble prøvene inkubert i ca. 1 time ved sekundære fluorescenserte antistoff ALEXA 488. I tilfelle av binding av det primære antistoff til PPARgamma-reseptoren, hvis den er tilstede, blir et primært/sekundært antistoffkompleks dannet, synlig som fluorescens på snittet, og observerbart med et mikroskop.

- 30 Nærvær av PPARgamma-reseptoren, vist ved et fluorescensmikroskop, er klart fra fig. 2 og 3 (diagnosefotografier).

- Særlig i bildene i fig. 2 og 3 blir nærvær av reseptoren vist ved fluorescenssignalet som er detekterbart i den perifere del av snittet. Fluorescensen demonstrerer nærvær av PPARgamma på nivået til enterocytter, intestinale epitelceller på overflaten, 35 snudd mot tarmlumen.

Biopsier av pasientene som ikke er affisert av cøliaki har blitt brukt som negativ kontroll: resultatet er fravær av signal, og følgelig, av reseptorfravær på snittene

analysert med mikroskop. Særlig i referanseeksempel i fig. 4 og 5 (kontroller) vises at ingen fluorescens er blitt detektert: dette er tegnet på reseptorfravær på nivået til den samme intestinale del, i en frisk kontrollgruppe.

5 På samme måte ble forbindelsene detaljbeskrevet heri nedenfor testet, og lignende resultater ble oppnådd:

Referanseeksempel 4

Genekspresjonen (mRNA) til de proinflammatoriske cytokinene IL-2, TFN-alfa og IFN-gamma, som er frigjort i sykdommens akutfase ble overvåket.

10 Særlig illustrerer diagrammene i referanseeksemplet i fig. 6-8, som viser de optiske tetthetsverdiene (IMAGE J) ekstrapolert fra forskjellige bånd, oppnådd med elektroforetisk kjøring med 1x agarosegel, relatert til cytokinamplifiseringene som ble utført i undersøkelsen.

15 Genekspresjonen til cytokinene er blitt vurdert med RT-PCR av RNA ekstrahert ved duodenale biopsier fra pasientene affisert av cøliaki. Slike biopsier er blitt opprettholdt for dyrking ved 37°C i 48 timer, både i et kulturmedium som inneholder en tryptisk fordøyelse av gliadin (PT) og i et PT-medium til hvilke 5-ASA-medikamentet er blitt tilsatt.

Resultater

20 De tre diagrammene viser at i biopsifragmentene holdt i kultur i nærvær av medikamentet er genekspresjonen (mRNA) til de proinflammatoriske cytokinene IL-2, TFN-alfa og IFN-gamma, som frigjøres i sykdommens akutfase, godt redusert.

Reduksjonen øker når pasienten blir utsatt for en lengre varende og konstant behandling med medikamentet.

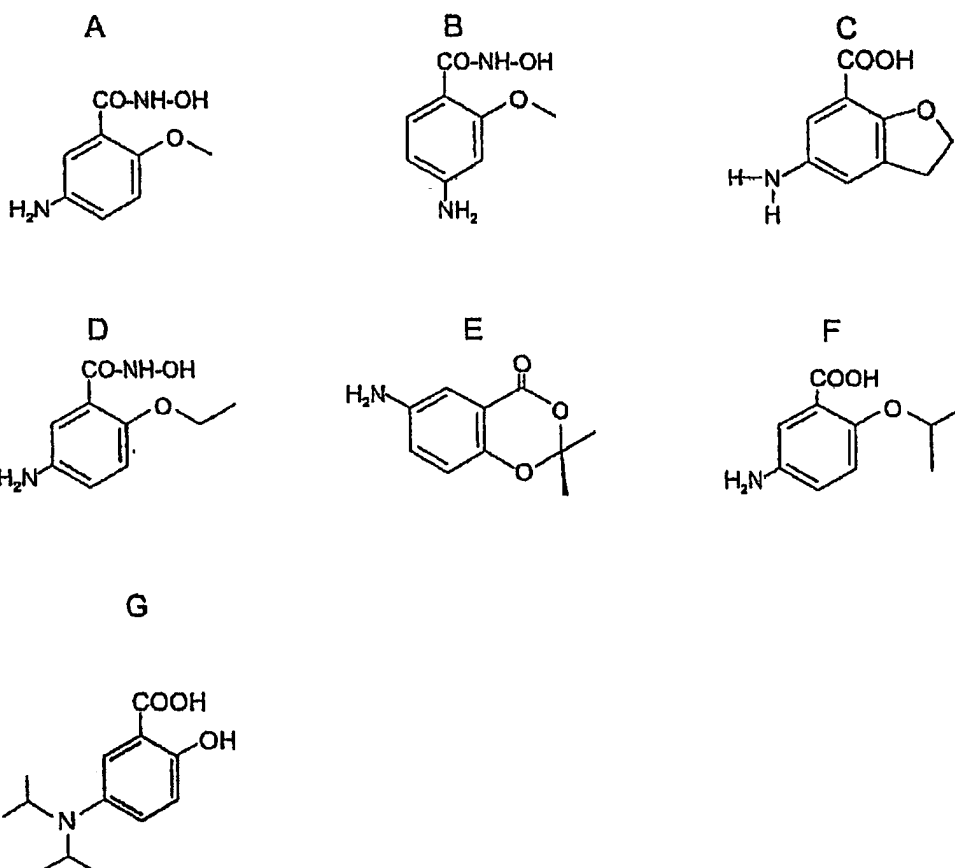
25 Referanseeksempel 5

Undersøkelse av effektene av referanseforbindelsene på PPAR γ aktivering/ekspresjon, og regulering av celleproliferasjon og apoptose

MATERIALER OG METODER

Forbindelsene A-G

30 5-ASA ble kjøpt fra Sigma-AldrichTM (St Quentin Fallavier, Frankrike). Rosiglitazon ble oppnådd fra Spi BioTM (Massy, Frankrike). De følgende forbindelser A-G ble undersøkt:



Cellelinjer

5 Tykktarmcellelinjen HT-29 STD (ATCC HTB-38) ble rutinemessig dyrket i DMEM
supplementert med 10 % varme-FCS, og antibiotika. Cellene ble dyrket i monolag,
inkubert ved 37°C i 5 % CO₂ og 95 % relativ fuktighet.

Transient transfeksjon med PPAR γ og stimulering av celler

10 TH-29 STD-celler ble transient transfektert ved å bruke EffecteneTM
transfeksjonsreagens (QiagenTM) i henhold til instruksjoner fra produsenten. For å
testes PPAR γ -aktivering utførte vi transfeksjon med 500 ng av et minimalt
promoterkonstrukt som inneholder to kopier av PPRE oppnådd fra cytochromet p450
4A (2XCYP). Renilla luciferase plasmidet (0,1 μ g/brønn) ble også transfektert som
en indre kontroll for å overvåke transfeksjonseffektivitet, og for å normalisere
15 ildflue luciferaseaktiviteten. Transfektete celler ble etterlatt i 48 timers inkubering
ved 37°C. Stimuleringer ble utført etter inkubering av celler under 3-6-9-12-15-18-
24 timer med forbindelsene A-G i en konsentrasjon på 30 mM, og sammenlignet
med de to PPAR γ syntetiske ligander 5-ASA 30 mM, og rosiglitazon 10⁻⁵ M, brukt
som positive kontroller. pH-verdien i medikamentløsningene ble justert til 7,4 med
NaOH. Totale celleekstrakter ble fremstilt ved å bruke Passiv lysebuffer
20 (PromegaTM, Madison, Wis.). Luciferaseaktivitet ble assayet i 20 μ l av ekstraktet

ved å bruke Promega™ Dual Luciferase assaysystemet, i henhold til produsentens protokoll. Transfeksjoner ble assayet i triplikat i minst tre separate eksperimenter. Luciferaseaktiviteten ble uttrykt som antall ganger av aktiviteten oppnådd i celler behandlet med forskjellige molekyler dividert med luciferaseaktiviteten fra ikke-stimulerte celler.

Evaluerings av PPAR γ og β -aktin med Western blot analyse

De totale proteiner ble oppnådd med cellehomogenisering i en ekstraksjonsbuffer som består av PBS med 2 % Triton™, fenylmetylsulfonylfluorid (PMSF) 100 mM, og en klassisk protease inhibisjonscocktail. Totalproteinene ble deretter separert med polyakrylamidgelelektroforese, og elektroblottet. Polyvinylidendifluorid (PVDF) membraner ble inkubert natten over med kanin polyklonalt primært antistoff, rettet mot PPAR μ (fortynning 1/500, TEBU, Le Perray en Yveline, Frankrike). β -aktin ble detektert ved å bruke et kanin monoklonalt primært antistoff, fortynnet tilsvarende 1/10000 (Sigma). Immunodeteksjon med et sekundært peroksidasekonjugert antistoff (1/1000, Dako™, Trappes, Frankrike), og kjemiluminescens ble utført i henhold til produsentens protokoll (ECL™, Amersham Pharmacia Biotech™, Orsay, Frankrike). Verdier for optisk tetthet av PPAR γ ble gitt for hver tilstand i forhold til mengden av det interne kontroll β -aktin i den samme prøven.

Analyse av celleproliferasjon med Ki-67 immunofarging

Etter 24 timers dyrking ble HT-29 STD-celler behandlet i 24 timer med forbindelsene A, B, C, D og F i en konsentrasjon på 30 mM. 5-ASA (30 mM) og rosiglitazon (10⁻⁵ M) ble brukt som positive kontroller. Molekylet G ble ikke inkludert i dette eksperimentet på grunn av dets dårlige løselighet. pH-verdien til medikamentløsningene ble justert til 7,4 med NaOH. Cellene ble fiksert i PFA 4 %, permeabilisert i PBS som inneholdt 0,1 % Triton-X.100™ ved 4°C, og deretter inkubert med normalt geiteserum og blokkerende buffer (1 % BSA i PBS) for å minimalisere ikke-spesifikk adsorpsjon av antistoffet.

Celleproliferasjon ble vurdert med nukleær Ki-67-farging ved å bruke mus monoklonalt primært antistoff rettet mot Ki-67 (fortynning 1:50 natten over; ZYMED™, Clinisciences™, Montrouge, Frankrike). Primært antistoff ble vist med Alexa 594 esel anti-mus IgG konjugert til akridin rødt fluorokrom (fortynning 1:100, Molecular Probes™, Invitrogen™, Cergy Pontoise, Frankrike). Kjerner ble farget med Hoescht 33342 løsning (0,125 mg/ml) (Sigma-Aldrich™) og visualisert under et fluorescensmikroskop (Leica™, Bensheim, Tyskland). Negative kontroller bestod av farging med et ikke-spesifikt museserum istedenfor det spesifikke antistoffet. Tellinger på minst 500 celler/prøve ble systematisk utført blindt i ett eksperiment. Resultatene ble uttrykt som gjennomsnitt $\pm$ SEM av antall fargede celler.

Deteksjon av apoptose

Etter 24 timers dyrking ble HT-29 STD-celler behandlet i 24 timer med forbindelsene A, B, C, D, F, i en konsentrasjon på 30 mM. 5-ASA (30 mM) og rosiglitazon (10⁻⁵ M) ble brukt som positive kontroller. Molekylene E og G ble ikke inkludert i dette eksperimentet på grunn av deres dårlige løselighet. pH-verdien til medikamentløsningene ble justert til 7,4 med NaOH. Celler som gjennomgikk ble identifisert ved enzymatisk merking av DNA-tråder ved å bruke en Terminal Transferase dUTP Nick End Labelling Assay (TUNELL assay, Roche DiagnosticsTM, Meylan, Frankrike). Tellingene på minst 500 celler/prøve ble systematisk utført blindt i ett eksperiment. Resultatene ble uttrykt som gjennomsnitt $\pm$ SEM av antall fargede celler.

Resultater

Det er blitt observert at molekylene C og F induserer PPAR γ -aktivering. Forbindelsen D induserer også PPAR γ , men i noe mindre grad. Aktivering av PPAR γ resulterer i en kaskade av reaksjoner som fører til en binding til spesifikk DNA-sekvenser betegnet peroksysom proliferatorresponsselementer (PPRE).

Vi undersøkte PPAR γ transkripsjonell aktivitet ved transiente transfeksjoner av epitelceller med renilla luciferase PPRE-plasmidene. Cellene ble stimulert med de forskjellige molekylene i 24 timer. Analyse av PPAR γ -aktivitet i transfekterte HT-29-celler viste at forbindelsen C og F, i en konsentrasjon på 30 mM, øket rapportørgenaktiviteten to ganger, for derved å vise en aktivitet lik 5-ASA og rosiglitazon. Forbindelsene A, B og G utviste i en konsentrasjon på 30 mM hurtig cytotoxisk virkning på epitelceller som begrenser undersøkelsen av PPAR γ -aktivering etter 6 timer.

Særlig induserer molekylene C, D og F PPAR γ -ekspresjon. Generelt viser alle forbindelsene A-G kapasitet til å indusere PPAR γ -ekspresjon på proteinnivåene i HT-29-cellelinjen. Spesielt ble en gjennomsnittlig to ganger induksjon av PPAR γ -proteinnivå kvantifisert med Western blot observert i celler behandlet i 24 timer med molekylene C, D og F.

Særlig inhiberer molekylene C og F epitelcelleproliferasjon. Vi evaluerte i HT-29 STD-cellelinjen rollen til molekylene i regulering av celleproliferasjon. Celleproliferasjon ble med kjerneregulering av celleproliferasjon. Celleproliferasjon ble vurdert ved kjerneprotein Ki-67-farging uttrykt i prolifererende celler, hvor nærværet av Ki-67 er nødvendig for å opprettholde celleproliferasjonen.

Sammenlignet med ubehandlede celler resulterte inkubering av HT-29-celler i 24 timer med molekylene C og F (30 mM) i en 67-75 % inhibisjon av celleproliferasjon.

Lignende resultater ble oppnådd med de to positive kontrollene rosiglitazon (10⁻⁵ M) og 5-ASA (30 mM) brukt i sine optimale konsentrasjoner. Demonstrasjon av den

potensielle antimitogene effekt av molekylene A, B og D ble begrenset av deres hurtige cytotoxiske virkning på epitelcellene i denne konsentrasjonen.

Forbindelsen F induserte også epitelcelleapoptose gjennom PPAR γ . På samme måte som rosiglitazon og 5-ASA viste molekylet F apoptose i 80 % av epitelcellene
 5 identifisert ved å merke DNA-trådbrudd ved å bruke en terminal transferase dUTP nick end-merking (TUNELL). På samme måte som i det tidligere eksperiment, induserte molekylene A, B og D en hurtig cytotoxiske effekt ved 30 mM, og hindret celleapoptoseanalyse.

Konklusjon

10 Dette eksemplet viser spesifikt evnen til forbindelsene C og F til å stimulere PPAR γ -ekspresjon og aktivering, og å regulere epitelcelleproliferasjon og apoptose. I tillegg kan de cytotoxiske virkningene på epitelcellene av forbindelsene A, B, D (så vel som E-G) ved 30 mM, være relatert til nærvær i deres struktur av en meget reaktiv hydroksaminsyregruppe kjent for å vise stor affinitet for mange forskjellige
 15 enzymer.

Referanseeksempel 6

Molekylære modelleringsundersøkelser ble utført ved å bruke SYBYL programvare versjon 6.9.1 (Tripos Associates Inc.TM, St Louis, MO) kjørt på Silicon GraphicsTM arbeidsstasjoner. Tredimensjonal modell av zwitterioner dannet av 5-ASA ble
 20 bygget fra et standard fragmentbibliotek, og dets geometri ble deretter optimalisert ved å bruke Tripos kraftfelt. Idet kPa til forbindelsene fremdeles er ukjent, ble SPARC online kalkulator brukt til å bestemme elementene som oppstod ved fysiologisk pH (7,4). Tredimensjonale modeller av ioniserte forbindelser ble bygget fra et standard fragmentbibliotek, og deres geometri ble deretter optimalisert ved å
 25 bruke Tripos kraftfelt inkludert en elektrostatiske benevnelse kalkulert fra Gasteiger og Hückel atomladninger. Metoden til Powell som er tilgjengelig i Maximin2-prosedyren ble brukt for energiminimalisering inntil gradientverdien var mindre enn 0,001 kcal/mol.Å. Strukturen til det humane PPAR γ ligandbindende domenet ble oppnådd fra dets komplekserte røntgenstrålekristallstruktur med tesaglitazar (AZ
 30 242) tilgjengelig i RCSB proteindatabanken (1I7I) (4,5). Fleksibel dokking av forbindelsene i det reseptoraktive setet ble utført ved å bruke GOLD programvare. De mest stabile dokkingmodeller ble selektert i henhold til den beste skårede konformasjon prediktert av GoldScore og X-score skåringsfunksjoner. Kompleksene ble energiminimalisert ved å bruke Powell-metoden tilgjengelig i
 35 Maximin2-prosedyren, med Tripos kraftfelt, og en dielektrisk konstant på 4,0, inntil gradientverdien nådde 0,01 kcal/mol.Å. Sammenføyningsfunksjonen ble brukt ved å definere liganden en varm region (10 Å).

Dokkingundersøkelser

40 Forbindelsene A-G passet godt med PPAR γ -LBD gjensidig påvirkning via hydrogenbinding med de vurderte His-323, His-449, Tyr-473 og Ser-289.

Forbindelsene A-G passet godt med PPAR γ -LBD ved gjensidig påvirkning via hydrogenbinding med de vurderet His-323, His-449, Tyr-473 og Ser-289, som nøkkeldeterminanter nødvendig for molekylær gjenkjennelse, og PPAR γ -aktivering.

5 Det har vist at antiinflammatoriske virkninger av forbindelsene med aminosalicylstruktur ble mediert gjennom PPAR γ hovedsakelig uttrykt av epitelceller. Dokkinganalysen viste at de nevnte forbindelser, brukt i en konsentrasjon på 30 mM, aktiverer PPAR γ , induserer dets ekspresjon av tarmepitelceller, og utviser en farmakologisk virkning på den immunoinflammatoriske komponent i cøliaki.

10 **Konklusjon**

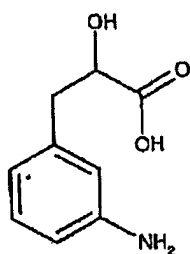
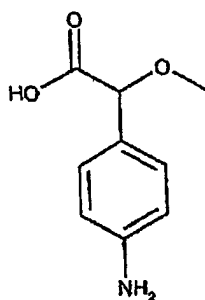
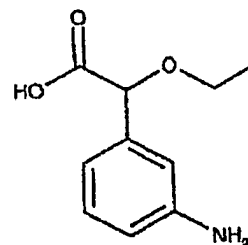
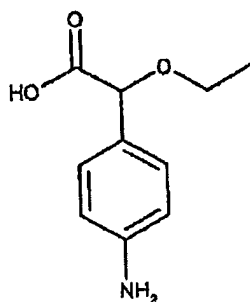
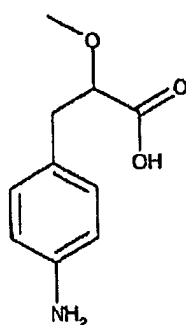
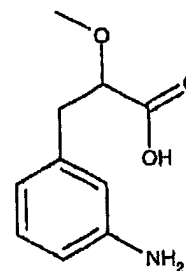
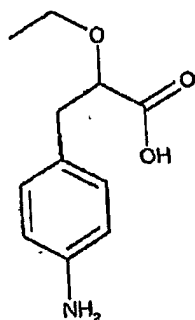
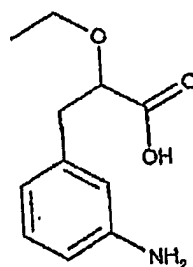
Det har tidligere blitt vist at inflammatoriske virkninger av forbindelsene med formel II med aminosalicylstruktur (5-ASA strukturliknende) ble mediert gjennom PPAR γ , uttrykt i epitelcellene på duodenumnivå. Den rasjonelle utvikling av forbindelsene A-G basert på dokkinganalyse viste at nevnte forbindelser, spesifikt 15 C, F, brukt i en konsentrasjon på 30 mM aktiverer PPAR γ og induserer dets ekspresjon av tarmepitelceller. Forbindelsene inhiberer også epitelcelleproliferasjon, og induserer apoptose, to viktige mekanismer som er tillagt PPAR γ -aktivering. Særlig når det gjelder molekylerne A, B, D, G er det blitt oppdaget at de har direkte cytotoxiske virkninger på epitelceller i en konsentrasjon 20 på 30 mM, noe som hindrer analyse av PPAR γ -aktivering, og regulering og evaluering av celleproliferasjon og apoptose.

EKSEMPEL 7

Virkning av forbindelsene H-Q med formel (I) på PPAR γ -aktivering **MATERIALER OG METODER**

25 **Materialer**

5-ASA ble kjøpt fra Sigma-AldrichTM (St Quentin Fallavier, Frankrike). Rosiglitazon ble oppnådd fra Spi BioTM (Massy, Frankrike). De følgende forbindelser H-Q som faller innenfor formelen (I) ble testet:

H**I****L****M****N****O****P****Q**

Cellelinjer

- 5 Kolonkarsinomcellelinje HT-29 STD (ATCC HTB-38) ble rutinemessig dyrket i DMEM supplementert med 10 % varme-FCS, og antibiotika. Cellene ble dyrket i monolag, inkubert ved 37°C i 5 % CO₂ og 95 % relativ fuktighet.

Transient transfeksjon med PPAR γ og stimulering av celler

HT-29 STD-celler ble transient transfektert ved å bruke EffecteneTM

transfeksjonsreagens (QiagenTM) i henhold til instruksjoner fra produsenten. For å teste PPAR γ -aktivering, utførte vi transfeksjon med 500 ng av et minimalt promoterkonstrukt som inneholdt to kopier av PPRE oppnådd fra cytokromet p450 4A (2XCYP). Renilla luciferaseplasmidet (0,1 μ g/brønn) ble også transfektert som en indre kontroll for overvåking av transfeksjonseffektivitet, og for å normalisere ildflue luciferaseaktiviteten. Transfekterte celler utsatt for 24 timers inkubasjon ved 37°C. Stimuleringer ble utført etter inkubering av cellene i 18 timer med forbindelsene H-Q i en konsentrasjon på 1 mM, og sammenlignet med de to PPAR γ syntetiske ligander 5-ASA (30 mM) og rosiglitazon (10⁻⁵ M) brukt som positive kontroller. pH-verdien til medikamentløsningene ble justert til 7,4 med NaOH. Totale celleekstrakter ble fremstilt ved å bruke Passiv Lysis Buffer (PromegaTM, Madison, Wis.). Luciferaseaktiviteten ble assayet i 20 μ l av ekstraktet ved å bruke Promegas Dual Luciferaseassaysystem i henhold til produsentens protokoll. Transfeksjoner ble assayet i triplikat i minst tre separate eksperimenter. Luciferaseaktiviteten ble uttrykt som antall ganger av aktiviteten oppnådd i celler behandlet med de forskjellige molekylene dividert med luciferaseaktivitet fra ikke-stimulerte celler.

Resultater

Aktivering av PPAR γ resulterer i en kaskade av reaksjoner som fører til en binding til spesifikke DNA sekvenser kalt peroksisom proliferatorresponsselementer (PPRE).

Vi undersøkte PPAR γ transkripsjonell aktivitet ved transiente transfeksjoner av epitelceller med renilla luciferasen og PPRE-plasmider. For å evaluere om forbindelsene H-Q har effektivitet lik eller over den til 5-ASA til å stimulere PPAR γ -aktivering, testet vi disse molekylene i en konsentrasjon på 1 mM. Virkning av de nye molekylene i en konsentrasjon på 1 mM ble sammenlignet med 5-ASA og rosiglitazon, brukt som positive kontroller i optimale konsentrasjoner på henholdsvis 30 mM og 10⁻⁵ M. Celler ble stimulert med de forskjellige molekylene over 24 timer.

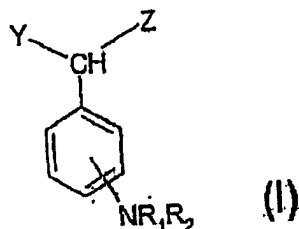
5-ASA ble anvendt til å stimulere PPAR γ -aktivering, og vi testet disse molekylene i en konsentrasjon på 1 mM. Virkningen av de nye molekylene i en konsentrasjon på 1 mM ble sammenlignet med 5-ASA og rosiglitazon, brukt som positive kontroller i optimale konsentrasjoner på henholdsvis 30 mM og 10⁻⁵ M. Celler ble stimulert med de forskjellige molekylene over 24 timer.

Analyse av PPAR γ -aktivitet i transfekterte HT-29-celler viste at nevnte forbindelser ved 1 mM øket rapportørgenaktiviteten med henholdsvis $4,8 \pm 0,71$; $2,73 \pm 0,31$; $2,64 \pm 0,46$; $3,4 \pm 0,97$ ganger, for derved å vise en aktivitet som er lik eller høyere enn 5-ASA ved 30 mM ($2,8 \pm 0,7$) og rosiglitazon ved 10⁻⁵ M ($3,17 \pm 0,29$).

Det er indikasjoner på at evnen til molekylene H-Q som faller innenfor forbindelsene med formel (I) i henhold til oppfinnelsen, øker PPAR γ -aktiviteten i transfekterte HT-29-celler, og viser en aktivitet som er lik eller til og med høyere enn 5-ASA ved 30 mM og rosiglitazon ved 10⁻⁵ M.

PATENTKRAV

1. Forbindelse med formel (I)



hvor

- 5 R1 og R2, like eller forskjellige fra hverandre, er valgt fra gruppen som omfatter -H eller en lineær eller grenet alkylgruppe som 1-6 karbonatomer,

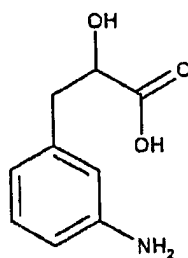
Y og Z, like eller forskjellige fra hverandre, er valgt fra gruppen som omfatter -H, -OH, -COOH, -OR3, -CH(OR3)COOH,

- 10 hvor R3 er valgt fra H, en lineær eller grenet alkylgruppe som har 1-6 karbonatomer, og

farmasøytisk akseptable salter eller estere derav, for anvendelse til behandling av den immunoinflammatoriske komponenten i cøliaki.

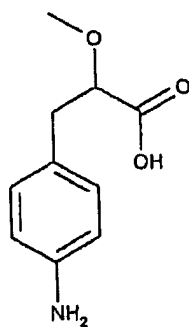
2. Forbindelse som angitt i krav 1, hvor nevnte forbindelse er valgt fra gruppen som omfatter:

- 15 - ($\pm$) 3-(3'-aminofenyl)-2-hydrokso-propionsyre med formel

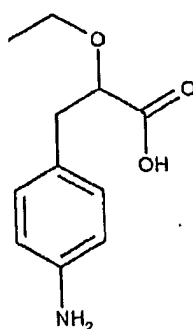


- 2-(4-aminofenyl)-2-metoksyeddiksyre,
 2-(3-aminofenyl)-2-etoksyeddiksyre,
 2-(4-aminofenyl)-2-etoksyeddiksyre,
 20 3-(4'-aminofenyl)-2-metoksypropionsyre med formel

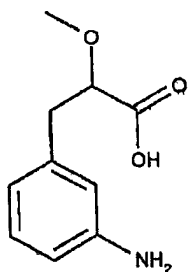
25



3-(4'-aminofenyl)-2-etoksypropionsyre med formel



3-(3'-aminofenyl)-2-metoksypropionsyre med formel



5

3-(3'-aminofenyl)-2-etoksypropionsyre med formel

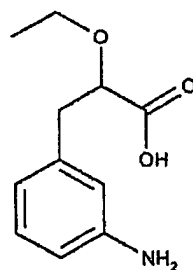


Fig.1 REFERANSEEKSEMPEL

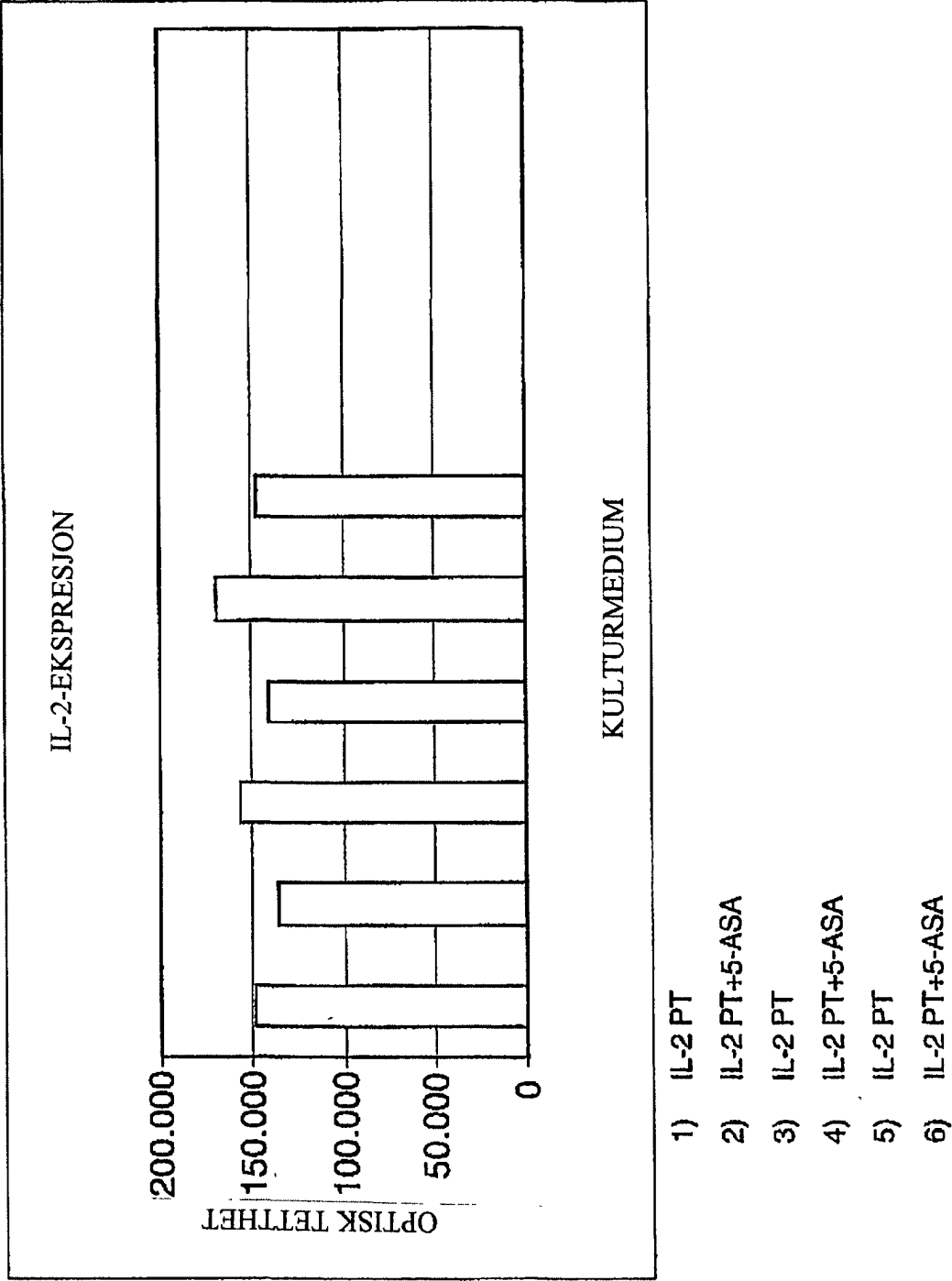


Fig.2 REFERANSEKSEMPEL

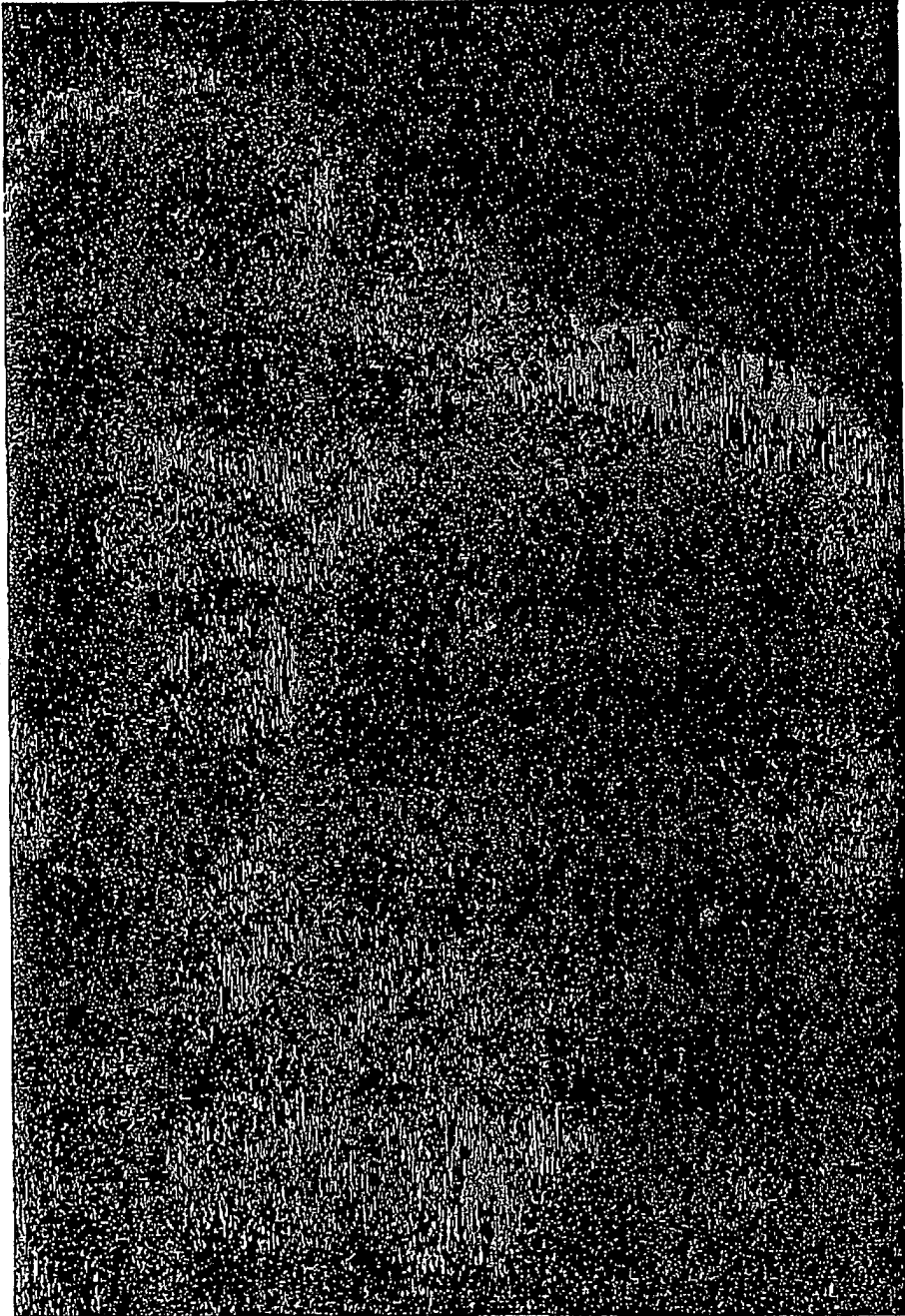


Fig.3 REFERANSEKSEMPEL



Fig.4 REFERANSEKSEMPEL

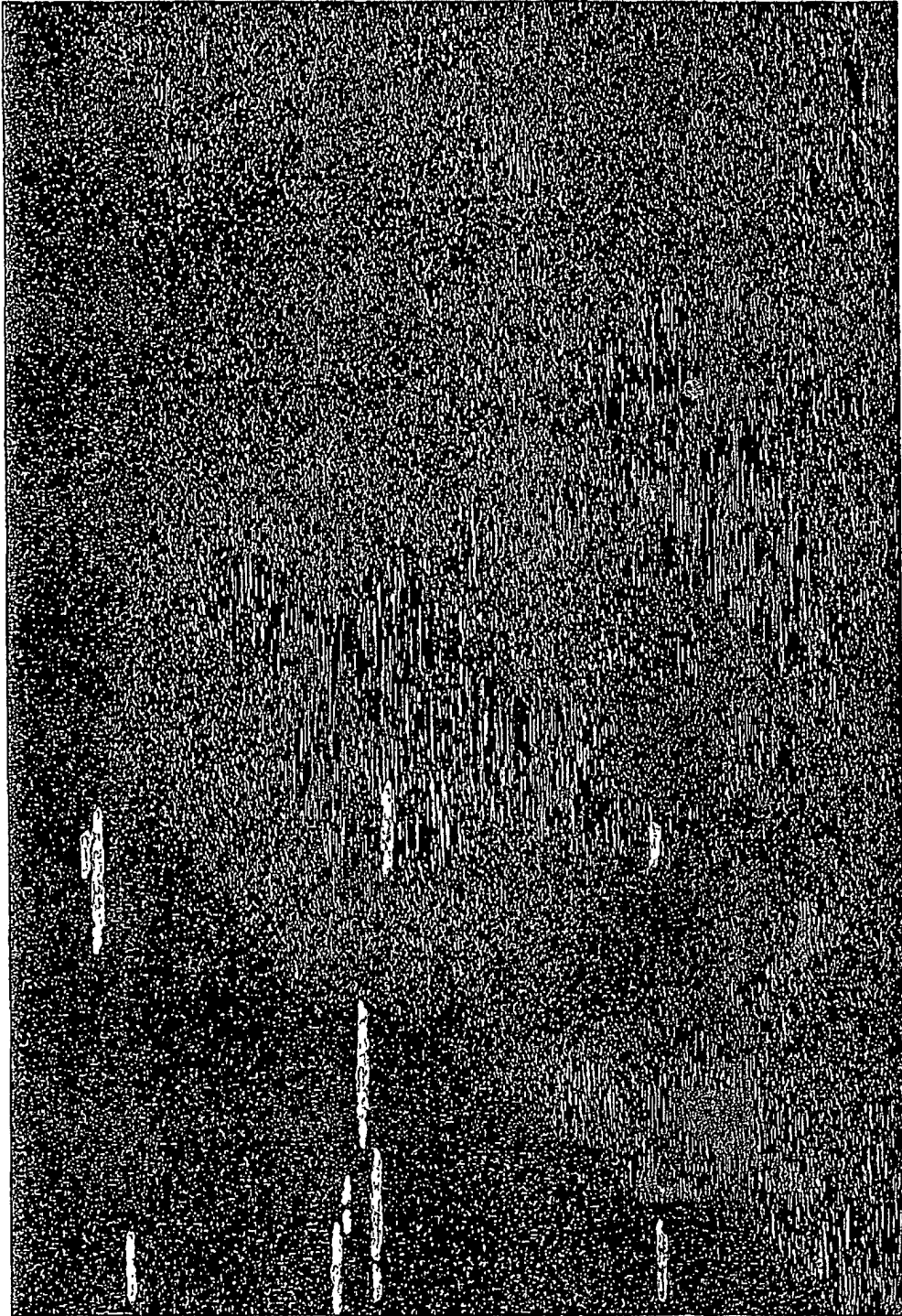


Fig.5 REFERANSEKSEMPEL

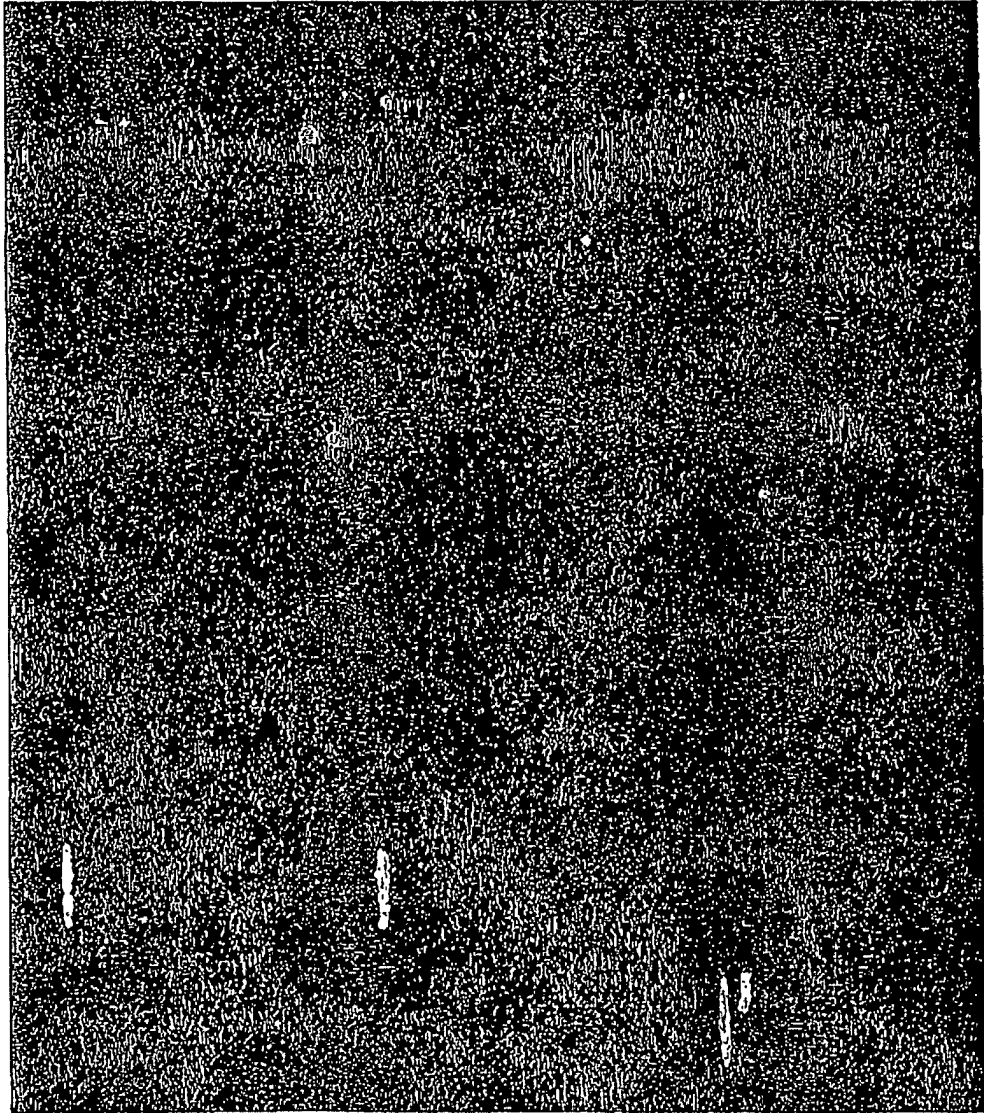


Fig.6 REFERANSEKSEMPEL

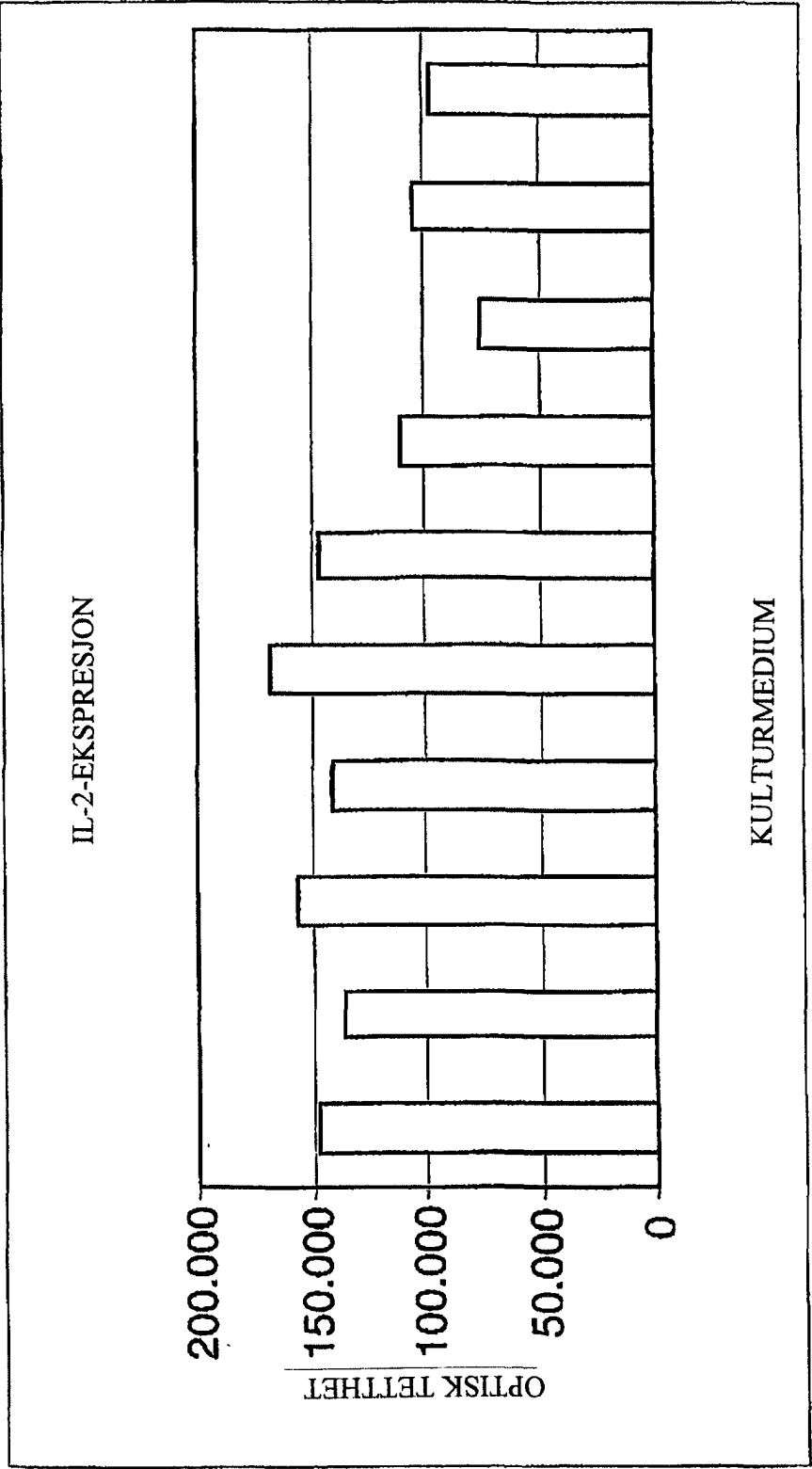


Fig.7 REFERANSEEKSEMPEL

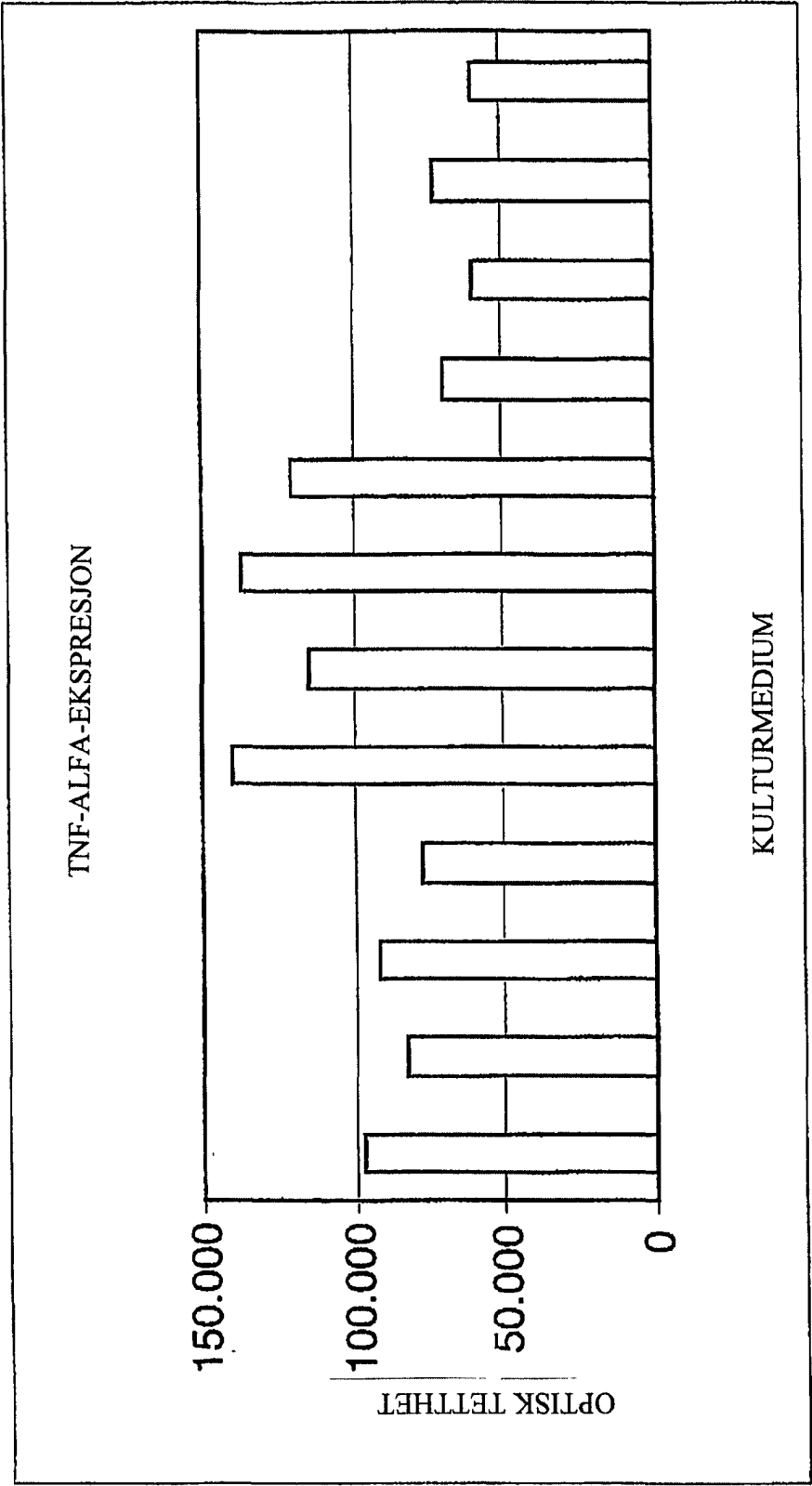


Fig.8 REFERANSEKSEMPEL

