



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2504005 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.
A61K 31/192 (2006.01)
A61K 31/216 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2014.03.10
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2013.11.06
(86)	Europeisk søknadsnr	10787363.0
(86)	Europeisk innleveringsdag	2010.11.26
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2012.10.03
(30)	Prioritet	2009.11.26, EP, 09306146
(84)	Utpekte stater	AL AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL PT RO RS SE SI SK SM TR
(73)	Innehaver	Genfit, Parc Eurasanté Lille Métropole 885, Avenue Eugène Avinée, 59120 Loos, FR-Frankrike
(72)	Oppfinner	DARTEIL, Raphaël, 17 rue Saint François, F-59000 Lille, FR-Frankrike HANF, Rémy, 10 rue Saint André, F-59000 Lille, FR-Frankrike HUM, Dean, 38 Parc Saint Georges, F-59910 Bondues, FR-Frankrike DUFOUR, Ingrid, 119, rue Voltaire, 59139 WATTIGNIES, FR-Frankrike
(74)	Fullmektig	Bryn Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	Anvendelse av 1,3-difenyprop-2-en-1-on derivater for behandling av leverforstyrrelser
(56)	Anførte publikasjoner	US-A- 5 691 373 WO-A1-2004/005233 WO-A1-2007/147879 WO-A1-2008/077618 WO-A2-01/98291

Beskrivelse

TEKNISK OMRÅDE

Oppfinnelsen angår anvendelse av forbindelser som har hepatoprotektive effekter ved fremstilling av farmasøytiske preparater og i fremgangsmåter for behandling av leverforstyrrelser.

BAKGRUNN

I henhold til "Washington Manual of Medical Therapeutics" (31. ed.; 2004; Lippincott Williams & Wilkins), kan leversykdommer kategoriseres i forskjellige grupper av sykdommer, spesielt virale sykdommer, medikament- og alkoholrelaterte leversykdommer, immunmedierte leversykdommer, metabolske leversykdommer, diverse sykdommer slik som ikke-alkoholisk fettleversykdom, og komplikasjoner ved hepatisk insuffisiens (slik som fulminant leversvikt eller hepatocellulært karsinom) og ved levertransplantasjon.

Spesielt er ikke-alkoholisk fettleversykdom (NAFLD) en vanlig leverlidelse med histologiske trekk av alkoholindusert fettleversykdom hos individer som konsumerer lite eller ingenting alkohol (Yeh M et al., 2007; Marchesini G et al., 2003). NAFLD skyldes unormal retensjon av lipider inni celler (vanligvis definert som steatose), en hendelse hyppigere i leveren siden dette organet er primært ansvarlig for lipidmetabolisme. NAFLD har et spekter av histologiske former inkludert hepatisk steatose, og ikke-alkoholisk steatohepatitt (NASH), som er karakterisert ved leverinflammasjon, steatose, nekrose og fibrose på grunn av ødeleggelse av leverceller. Lidelser assosiert med NAFLD er varierte, og omfatter type 2 diabetes, fedme, dyslipidemi, metabolsk syndrom, behandling med hepatotoksiske medikamenter, toksiner, infeksiose midler, eller andre eksogene årsaker.

Selv om NAFLD typisk følger et godartet, ikke-progressivt klinisk forløp, er NASH en potensielt alvorlig lidelse; så mange som 25 % av pasientene kan utvikle avansert fibrose, cirrhose og oppleve komplikasjoner med portal hypertensjon, leversvikt og hepatocellulært karcinom, hvilket gjør en tidlig og korrekt bedømmelse obligatorisk (Yeh M et al, 2007).

Systemer for avbildning av leveren er anvendelige også for å vurdere leverstruktur og tilstedeværelse av steatose. Imidlertid er leverbiopsi fortsatt gullstandard for vurdering av leverfibrose, men denne analysemetoden kunne ikke utføres for hver enkelt studie på grunn av dens invasivitet. Ikke-invasiv vurdering av leverbiokjemi og metabolisme blir ofte anvendt for å definere leversykdommer, slik som ved NAFLD og NASH (Gressner A et al., 2009; Vuppalanchi R og Chalasani N, 2009). Ved

anvendelse av plasma, blir høyt nivå av enzymer slik som alanin-aminotransferase (ALAT), aspartat-aminotransferase (ASAT), alkalisk fosfatase (AP), og/eller gamma-glutamyl transpeptidase (GGT), så vel som tilstedeværelse av andre proteiner av leveropprinnelse (inkludert haptoglobin, total bilirubin, alfa-2-mikroglobulin, resistin, kløyyet eller intakt cytokeratin-18) vanligvis målt i tillegg til serum-glukose og insulinresistensparametere. Siden nivået av ALAT-aktivitet ofte er økt hos NASH-pasienter (Angulo P et al, 2002), anses dette kriteriet som en surrogatmarkør for bedømmelse av leverskade. Faktisk er det ikke tilgjengelig ikke-invasive metoder for korrekt diagnostisering av NAFLD eller NASH og til og med de histologiske trekkene er ikke alltid tilstrekkelige til å skjelne NAFLD eller NASH ordentlig fra andre lidelser slik som alkoholisk leversykdom (Yeh M et al., 2007, Vuppalanchi R og Chalasani N, 2009).

Midler for effektiv behandling av leverfibrose-sykdommer, og NAFLD og NASH spesielt, er fortsatt utilstrekkelige. Ingen behandling er etablert for pasienter med NASH, og flere terapeutiske muligheter er testet i kliniske forsøk (Vuppalanchi R og Chalasani N, 2009, Dowman J.K et al., 2009). Disse studiene omfatter anvendelse av mange forskjellige familier av kjemiske forbindelser (fibrater, tiazolidindioner, biguanider, statiner, cannabinoider) og terapeutiske mål (nukleære reseptorer, angiotensinreseptorer, cannabinoide reseptorer, HMG-CoA reduktase). Nylig har studier omfattende tiazolidindioner (rosiglitazon og pioglitazon) vist at disse medikamentene kan forbedre leverforstyrrelse men behandling med disse medikamentene er ikke uten uønskede effekter slik som høyere risiko for kongestiv hjertesvikt og osteoporose, så vel som vektøkning med psykologiske virkninger på pasienten (Dowman J.K et al., 2009; Shiri-Sverdlov R et al., 2006; Neuschwander-Tetri et al., 2003). Kliniske forsøk som omfatter administrering av cannabinoider har vakt bekymring angående nevropsykiatrisk forstyrrelse (Vuppalanchi R og Chalasani N, 2009). Andre behandlinger som for øyeblikket pågår søker å vurdere i NASH-medikamenter som antioksidanter men ingen av disse behandlingene har hittil vist overbevisende resultater (Nelson A et al., 2009).

Internasjonal søknad WO2008/077618 beskriver forbindelser for behandling av leverforstyrrelser.

Internasjonal søknad WO01/98291 beskriver forbindelser anvendt for behandling av VCAM-1-medierte lidelser, spesielt post-translasjons sen og kronisk fast organavstøtning slik som ved hjerte, lunge, kombinert hjerte-lunge, lever, nyre, pankreas, hud, milt, tynntarm og hornhinnetransplantasjon.

Behovet for nye terapeutiske muligheter for behandling av leverforstyrrelser, spesielt slike som angår leverfibrose og/eller steatose, er fortsatt tydelig og viktig.

OPPSUMMERING AV OPPFINNELSEN

En klinisk studie har overraskende vist at behandlingen av pasienter med et 1,3-difenylprop-2-en-1-on-derivat gir en statistisk relevant reduksjon av leverspesifikke biokjemiske markører i plasma, hvilket viser de leverbeskyttende egenskapene av en familie av forbindelser som er definert ved hjelp av en Generell Formel (I).

Foreliggende beskrivelse tilveiebringer nye 1,3-difenylprop-2-en-1-on-derivater med Generell Formel (I) (nevnte derivater er annetsteds også referert til som "forbindelsene") eller farmasøytiske preparater omfattende disse for anvendelse i en fremgangsmåte for behandling av leverforstyrrelser, spesielt slike som fører til økning i plasmanivået av biokjemiske markører slik som aminotransferaser. 1,3-difenylprop-2-en-1-on-derivatene med Generell Formel (I) og farmasøytiske preparater omfattende disse har leverbeskyttende egenskaper og kan anvendes i fremgangsmåter for behandling av leverforstyrrelser som innebærer patologisk nedbrytning, inflammasjon, degenerering og/eller proliferasjon av leverceller, slik som leverfibrose, fettleversykdom og ikke-alkoholisk steatohepatitt.

Formål ifølge foreliggende oppfinnelse, inkludert spesifikke generelle formler for forbindelsene av interesse, er gitt i den detaljerte beskrivelsen.

BESKRIVELSE AV FIGURENE

Forkortelser anvendt i figurene og i teksten:

- ALAT = alanin aminotransferase
- CCL5 = kjemokin (C-C-motiv) ligand 5
- Col1a1 = kollagen, type I, alfa 1
- Forbindelse 1 = forbindelse 1 fra WO2007/147879
- Forbindelse 29 = forbindelse 29 fra WO2004/005233
- Kontr. = kontroll
- Feno = Fenofibrat
- HDL = High density lipoprotein
- LDL = Low density lipoprotein
- NAFLD = Ikke-alkoholisk fettleversykdom
- NASH = Ikke-alkoholisk steatohepatitt
- PPAR = Peroxisom proliferator aktivert reseptor
- Rosi = Rosiglitazon
- RT-PCR= Revers transkripsjon polymerasekjedereaksjon
- TGFβ = Transformerende vekstfaktor beta

- TNF α = Tumornekrosefaktor alfa

Figur 1 : Struktur av eksempler på forbindelser med Generell Formel (I)

Eksempler på forbindelser med generell Formel (I) er gruppert i henhold til de mer spesifikke definisjonene i henhold til Generell Formel (II) (Panel A), Generell Formel (IV) (Panel B) og Generell Formel (V) (Panel C).

Figur 2 *In vivo* evaluering, i ob/ob-mus, av de anti-inflammatoriske egenskapene av forbindelser med Generell Formel (I)

Forbindelsene ifølge Generell Formel (I) ble testet i en murin modell av type II diabetes, ob/ob-musene. Mus ble behandlet daglig oralt med forbindelse 29 fra WO2004/005233 ved to forskjellige doser (10 og 30 mg/kg/dag) og med de prototypiske PPARalfa- og PPARgamma-spesifikke referanseforbindelsene (fenofibrat ved 100 mg/kg/dag og rosiglitazon ved 10 mg/kg/dag henholdsvis). Etter 26 dagers behandling ble dyr avlivet og plasmaprøver og lever ble høstet. Hepatisk ekspresjon av gener som er kjent å være implisert i leverinflammasjonsprosessen ble evaluert og plasmanivåer av ALAT ble målt (Panel A-C). Statistisk analyse ble utført ved anvendelse av uparet T-test med tre p-verdier som definerer statistisk relevans (* betyr $p < 0,05$; ** betyr $p < 0,01$; *** betyr $p < 0,001$).

Figur 3: *In vivo* evaluering, i hApoE2 KI-musene, av de anti-inflammatoriske og anti-fibrotiske egenskapene av forbindelser med Generell Formel (I)

Forbindelsene med Generell Formel (I) ble testet *in vivo* i en høy-fett diett musemodell. "Humaniserte" ApoE2 knock-in mus med dyslipidemi (hApoE2 KI) ble gitt en "vestlig" diett ("Western diet") og behandlet i 12 uker. Forbindelsene av interesse, inkludert forbindelse 29 fra WO2004/005233 ved 0,3 mg/kg/dag og fenofibrat ved 100 mg/kg/dag (anvendt som en referanseforbindelse) ble innlemmet i dietten. Ved slutten av forsøket ble dyr avlivet, lever ble høstet og hepatisk ekspresjon av gener som er kjent å være implisert i leverinflammasjons- og fibroseprosessene ble evaluert ved kvantitativ RT-PCR (Panel A-D). Statistisk analyse ble utført som angitt for Figur 1.

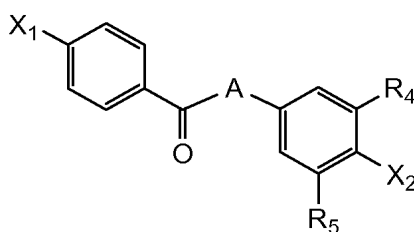
Figur 4. *In vivo* evaluering, i hApoE2 KI og i hApoE2 KI / PPARalfa KO-mus, av anti-inflammatoriske og anti-steatose-egenskaper av forbindelser med Generell Formel (I).

Forbindelsene ifølge Generell Formel (I) ble testet *in vivo* i en høy-fett diett musemodell. Dyslipidemiske "humaniserte", PPARalfa-manglende, hApoE2 KI, ble gitt en "vestlig" diett og behandlet i 6 uker. Forbindelsene av interesse, inkludert forbindelse 29 ifølge WO2004/005233 ved 30 mg/kg/dag og forbindelse 1 ifølge WO2007/147879 ved 30 mg/kg/dag ble oralt administrert ved sonde. Ved slutten av forsøket ble dyrene avlivet, leveren ble høstet og ekspresjon i leveren av relevante gener implisert i leverinflammasjon og fibroseprosessene ble evaluert ved kvantitativ RT-PCR. Parallelt ble innholdet av lever-triglyserider evaluert (Panel A-D). Statistisk analyse ble utført som angitt for Figur 1.

DETALJERT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

Foreliggende søknad beskriver nye terapeutiske anvendelser og fremgangsmåter for administrering av 1,3-difenyprop-2-en-1-on-derivater med Generell formel (I) og farmasøytiske preparater omfattende disse for behandling av leverforstyrrelser. Spesifikke 1,3-difenyprop-2-en-1-on-derivater som er substituert ved begge fenylgruppene kan defineres i henhold til eksemplene som anvendelige for behandling av leverforstyrrelser, siden slike forbindelser på en overraskende måte reduserer spesifikke markører for leverinflammasjon så vel som for nedbrytning, degenerering, og/eller proliferasjon av leverceller hos human subjekter og i dyremodeller, og følgelig kan de gi en hepatoprotektiv effekt.

Forbindelsene som skal anvendes og administreres i henhold til oppfinnelsen og omfattes i preparatene ifølge oppfinnelsen har følgende Generelle Formel (I):



i hvilken:

X1 er et halogen, en R1, eller G1-R1 gruppe;

A er en CH=CH eller en CH2-CH2-gruppe;

X2 er en G2-R2 gruppe;

G1 og G2 er, identiske eller forskjellige, et atom av oksygen eller svovel;

R1 er en usubstituert alkylgruppe, en arylgruppe eller en alkylgruppe som er substituert med ett eller flere halogenatomer, en alkoksy eller en alkyltio-gruppe,

sykloalkylgrupper som er substituert eller ikke med ett eller flere halogenatomer, sykloalkyltiogruupper eller heterosykliske grupper;

R2 er en alkylgruppe substituert med minst en -COOR₃-gruppe, hvori R₃ er et hydrogenatom, eller en alkylgruppe som er substituert eller ikke med ett eller flere halogenatomer, sykloalkylgrupper, eller heterosykliske grupper.

R4 og R5 er, identiske eller forskjellige, en usubstituert lineær eller forgrenet alkylgruppe med fra ett til fire karbonatomer.

I en bestemt utførelsesform er forbindelser med Generell Formel (I) substituert med minst en alkyloksigruppe eller en alkyltiogruppe i X1 og X2-stillingene. Videre kan derivatene være i form av substituerte 1,3-difenypropanoner som er oppnådd ved reduksjon av de tilsvarende 1,3-difenyprop-2-en-1-on-derivatene.

I en bestemt utførelsesform er X1 en G1-R1-gruppe, og mer foretrukket er G1 et svovelatom og R1 er en lineær eller forgrenet alkylgruppe som er substituert eller ikke med ett eller flere halogenatomer, sykloalkylgrupper, heterosykliske grupper. Enda mer foretrukket er X1 en alkyltiogruppe som omfatter en alkylgruppe som er lineær eller forgrenet, som har fra ett til sju karbonatomer som er substituert eller ikke med ett eller flere halogenatomer. I en foretrukket utførelsesform er X1 en metyltiogruppe.

I en bestemt utførelsesform er X2 en G2-R2-gruppe hvori G2 er et oksygenatom og R2 er en alkylgruppe substituert med en -COOR₃-gruppe, hvori R₃ er et hydrogenatom eller en usubstituert lineær eller forgrenet alkylgruppe som har fra ett til sju karbonatomer, og mer foretrukket fra ett til fire karbonatomer. I en foretrukket utførelsesform er både R4 og R5 metylgrupper.

I konteksten til foreliggende oppfinnelse refererer betegnelsen "alkyl" til et mettet hydrokarbonradikal som er lineært eller forgrenet, som har foretrukket fra ett til tjuefire, og enda mer foretrukket fra ett til sju karbonatomer, slik som metyl, etyl, n-propyl, isopropyl, n-butyl, isobutyl, tertibutyl, sec-butyl, pentyl, neopentyl eller n-heksyl.

Betegnelsen "alkyloksi" refererer til en alkylgruppe som er forbundet med resten av forbindelsen ved et oksygenatom.

Betegnelsen "alkyltio" refererer til en alkylgruppe som er forbundet til resten av forbindelsen med et svovelatom (tioeterbinding).

Betegnelsen "sykloalkyl" angir en alkylgruppe som danner én syklus med foretrukket fra tre til fjorten karbonatomer, og mer foretrukket tre til åtte karbonatomer, slik som syklopropyl, syklobutyl, syklopentyl, sykloheksyl, sykloheptyl og syklooktyl.

Betegnelsen "sykloalkyltio" refererer til en sykloalkylgruppe som er forbundet med resten av forbindelsen ved et svovelatom (tioeterbinding).

Betegnelsen "aryl" angir en aromatisk gruppe, substituert eller ikke som foretrukket har fra seks til fjorten karbonatomer slik som fenyl, a-naftyl, b-naftyl, bifenyl

eller antracenyl.

Betegnelsen "heterosyklisk" refererer til en heterosykloalkylgruppe eller en heteroarylgruppe.

Betegnelsen "heterosykloalkyl"-gruppe refererer til et sykloalkyl som angitt ovenfor som videre omfatter ett eller flere heteroatomer valgt fra nitrogen, oksygen eller svovel. De omfatter generelt fra fire til fjorten karbonatomer, slik som morfolinyl, piperidinyl, tetrahydropyranyl, ditiolanyl.

Betegnelsen "heteroaryl" refererer til en arylgruppe som angitt ovenfor som videre omfatter ett eller flere heteroatomer valgt fra nitrogen, oksygen eller svovel. De omfatter generelt fire til fjorten karbonatomer, slik som furanyl, tiofenyl, pyridinyl, pyrimidinyl, quinoleinyl, isoquinoleinyl.

Med halogenatom forstås et atom av brom, klor, fluor eller iod.

Forskjellige familier av 1,3-difenylprop-2-en-1-on-derivater og 1,3-difenylpropanoner som er substituert ved begge fenylgruppene kan finnes i tidligere kjent teknikk (WO2003/037315, WO2001/046110, JP2006-303800, JP04-202129). Imidlertid viser ingen av disse dokumentene at spesifikke hepatoprotektive effekter er forbundet med forbindelser som definert i Generell Formel (I).

Strukturen, syntese, og noen aktiviteter av forbindelsene som er omfattet av Generell Formel (I) har blitt beskrevet i en rekke patentsøknader (WO2004/005243, WO2004/005233, WO2005/005369, US20070032543, WO2005/073184, WO2007/147879 og WO2007/147880) som ikke beskriver anvendelse av slike forbindelser i fremgangsmåter for behandling av leverforstyrrelser.

Spesifikke 1,3-difenylprop-2-en-1-on-derivater ifølge Generell Formel (I) som kan anvendes i foreliggende oppfinnelse og som kan innbefattes i preparater i henhold til oppfinnelsen kan velges fra slike som er beskrevet i WO2004/005243 og WO2004/005233, og spesielt:

1-[4-klorfenyl]-3-[3,5-dimetyl-4-isopropylloksykarbonyldimetylmetyloksyfenyl]-prop-2-en-1-on, beskrevet som forbindelse 15;

1-[4-klorfenyl]-3-[3,5-dimetyl-4-tertbutylloksykarbonyldimetylmetyloksyfenyl]-prop-2-en-1-on, beskrevet som forbindelse 16;

1-[4-klorfenyl]-3-[3,5-dimetyl-4-karboksydimetylmetyloksyfenyl]prop-2-en-1-on som forbindelse 17;

1-[4-metyltiofenyl]-3-[3,5-dimetyl-4-tertbutylloksykarbonyldimetylmetyloksyfenyl]prop-2-en-1-on, beskrevet som forbindelse 27;

1-[4-metyltiofenyl]-3-[3,5-dimetyl-4-isopropylloksykarbonyldimetylmetyloksyfenyl]prop-2-en-1-on, beskrevet som forbindelse 28;

1-[4-metyltiofenyl]-3-[3,5-dimetyl-4-karboksydimetylmetyloksyfenyl]prop-2-en-

1-on, beskrevet som forbindelse 29;

1-[4-heksyloksyfenyl]-3-[3,5-dimetyl-4-tertbutyloksykarbonyldimetylmetyloksyfenyl]prop-2-en-1-on, beskrevet som forbindelse 32;

1-[4-heksyloksyfenyl]-3-[3,5-dimetyl-4-karboksydimetylmetyloksyfenyl]prop-2-en-1-on, beskrevet som forbindelse 33;

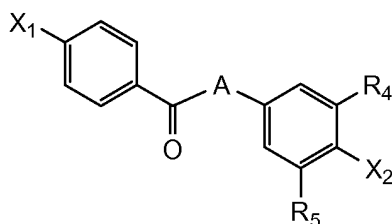
1-[4-heptylphenyl]-3-[3,5-dimetyl-4-tertbutyloksykarbonyldimetylmetyloksyfenyl]prop-2-en-1-on, beskrevet som forbindelse 38;

1-[4-heptylphenyl]-3-[3,5-dimetyl-4-karboksydimetylmetyloksyfenyl]prop-2-en-1-on, beskrevet som forbindelse 39;

1-[4-bromfenyl]-3-[3,5-dimetyl-4-tertbutyloksykarbonyldimetylmetyloksyfenyl]prop-2-en-1-on, beskrevet som forbindelse 40;

1-[4-bromfenyl]-3-[3,5-dimetyl-4-karboksydimetylmetyloksyfenyl]prop-2-en-1-on, beskrevet som forbindelse 41.

I en ytterligere utførelsesform av oppfinnelsen har forbindelsene som beskrevet i WO2004/005243 og WO2004/005233 (heri referert til som forbindelser med Generell Formel (II)) som kan anvendes og administreres og som kan innbefattes i preparater i henhold til oppfinnelsen, følgende generelle Formel (I):



i hvilken:

X1 er et halogen, en R1, eller en G1-R1-gruppe;

A er en CH=CH-gruppe;

X2 er en G2-R2-gruppe;

G1 og G2 er, identiske eller forskjellige, et atom av oksygen eller svovel;

R1 er en alkyl eller sykloalkylgruppe med fra ett til sju karbonatomer, spesielt er alkyl eller sykloalkylgruppen substituert eller ikke med ett eller flere halogenatomer;

R2 er en alkylgruppe substituert med en -COOR3-gruppe, hvori R3 er et hydrogenatom eller en alkylgruppe med fra ett til fire karbonatomer.

R4 og R5 er en alkylgruppe med fra ett til fire karbonatomer.

WO2005/005369 og US20070032543 beskriver også strukturen og alternativ fremgangsmåte for syntese av forbindelser i henhold til Generell Formel (I) så vel som til Generell Formel (II), spesielt:

1-[4-trifluormetylphenyl]-3-[3,5-dimetyl-4-tertbutyloksykarbonyldimetylmetyloksy-phenyl]prop-2-en-1-on (forbindelse 57 ifølge US20070032543)

1-[4-trifluormetylphenyl]-3-[3,5-dimetyl-4-karboksydimetylmetyloksyphenyl]prop-2-en-1-on (forbindelse 58 fra US20070032543)

1-[4-trifluormetyloksyphenyl]-3-[3,5-dimetyl-4-tertbutyloksykarbonyldimetylmetyloksy-phenyl]prop-2-en-1-on (forbindelse 61 fra US20070032543)

1-[4-trifluormetyloksyphenyl]-3-[3,5-dimetyl-4-karboksydimetylmetyloksyphenyl]prop-2-en-1-on (forbindelse 62 fra US20070032543).

Ytterligere eksempler på forbindelser for anvendelse og administrering og som kan omfattes i preparater i henhold til oppfinnelsen kan velges fra slike som er beskrevet i WO2005/073184, og spesielt:

1-(4-(Pentytioetyloksy)phenyl)-3-(4-tert-butyloksykarbonyldimetylmetyloksy-3,5-dimetylphenyl)prop-2-en-1-on, beskrevet som forbindelse 1;

1-(4-(Pentytioetyloksy)phenyl)-3-(4-karboksydimetylmetyloksy-3,5-dimetylphenyl)prop-2-en-1-on, beskrevet som forbindelse 2;

1-(4-((R,S)-5-[1,2]ditiolan-3-ylpentyloksy)phenyl)-3-(4-tert-butyloksykarbonyldimetylmetyloksy-3,5-dimetylphenyl)prop-2-en-1-on, beskrevet som forbindelse 5;

1-(4-((R,S)-5-[1,2]ditiolan-3-ylpentyloksy)phenyl)-3-(4-karboksydimetylmetyloksy-3,5-dimetylphenyl)prop-2-en-1-on, beskrevet som forbindelse 6;

1-(4-Sykloheksyletyloksyphenyl)-3-(4-tert-butyloksykarbonyldimetylmetyloksy-3,5-dimetylphenyl)prop-2-en-1-on, beskrevet som forbindelse 10;

1-(4-Sykloheksyletyloksyphenyl)-3-(4-karboksydimetylmetyloksy-3,5-dimetylphenyl)prop-2-en-1-on, beskrevet som forbindelse 11;

1-(4-sykloheksyltioetyloksyphenyl)-3-(4-tert-butyloksykarbonyldimetylmetyloksy-3,5-dimetylphenyl)prop-2-en-1-on, beskrevet som forbindelse 22;

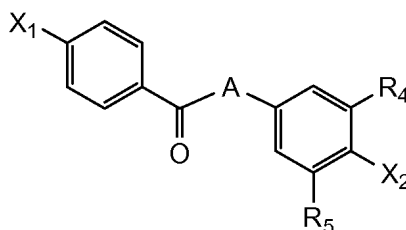
1-(4-Sykloheksyltioetyloksyphenyl)-3-(4-karboksydimetylmetyloksy-3,5-dimetylphenyl)prop-2-en-1-on, beskrevet som forbindelse 23;

1-(4-Fenyloksyphenyl)-3-(4-tert-butyloksykarbonyldimetylmetyloksy-3,5-dimetylphenyl)prop-2-en-1-on, beskrevet som forbindelse 32;

1-(4-Fenyloksyphenyl)-3-(4-karboksydimetylmetyloksy-3,5-dimetylphenyl)prop-2-en-1-on, beskrevet som forbindelse 33.

I en ytterligere utførelsesform av oppfinnelsen har forbindelsene som beskrevet i WO2005/073184 (heri referert til som forbindelser med Generell Formel (III)) som kan

anvendes og administreres, og som kan omfattes i preparater i henhold til oppfinnelsen, følgende Generelle Formel (I):



i hvilken:

X1 er en G1-R1 gruppe;

A er en CH=CH gruppe;

X2 er en G2-R2 gruppe;

G1 og G2 er et atom av oksygen;

R1 er en sykloalkyl, en aryl eller en alkylgruppe som er substituert eller ikke med én eller flere alkyltio, sykloalkyl, sykloalkyltiogrupper eller heterosykloalkylgrupper eller en alkyltiogruppe;

R2 er en alkylgruppe substituert ved minst en -COOR3-gruppe, hvori R3 er et hydrogenatom eller en alkylgruppe som har fra ett til fire karbonatomer;

R4 og R5 er en alkylgruppe som har fra ett til fire karbonatomer.

Ytterligere eksempler på forbindelser anvendt og administrert ifølge oppfinnelsen og som kan omfattes i preparater ifølge oppfinnelsen kan velges fra slike beskrevet i WO2004/005243, WO2004/005233, WO2005/005369, US20070032543 eller WO2005/073184, og redusert i form av de korresponderende substituerte 1,3-difenylpropanonene.

Følgelig kan forbindelser som kan anvendes og administreres ifølge oppfinnelsen og som kan omfattes i preparater ifølge oppfinnelsen velges fra de beskrevet i WO2007/147879, og spesielt:

2-[2,6-dimetyl-4-[3-[4-(metyltio)fenyl]-3-okso-propyl]fenoksy]-2-metylpropionsyre, beskrevet som forbindelse 1;

2-[2,6-dimetyl-4-[3-[4-(metoksy)fenyl]-3-okso-propyl]fenoksy]-2-metylpropionsyre, beskrevet som forbindelse 6;

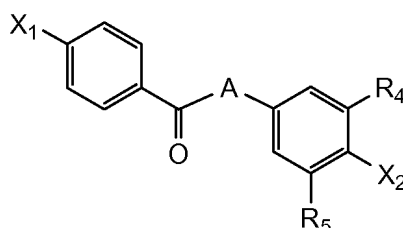
2-[2,6-dimetyl-4-[3-[4-(metyltio)fenyl]-3-okso-propyl]fenoksy]etansyre, beskrevet som forbindelse 7;

2-[2,6-dimetyl-4-[3-[4-(propyloksy)fenyl]-3-okso-propyl]fenoksy]-2-metylpropionsyre, beskrevet som forbindelse 8;

2-[2,6-dimetyl-4-[3-[4-(metyltio)fenyl]-3-okso-propyl]fenoksy]-2-

metylpropionsyre-isopropylester, beskrevet som forbindelse 13.

I en ytterligere utførelsesform av oppfinnelsen har forbindelsene som beskrevet i WO2007/147879 (heri referert til som forbindelser med Generell Formel (IV)) som kan anvendes og administreres og som kan omfattes i preparater i henhold til oppfinnelsen, følgende Generelle Formel (I):



i hvilken:

X1 er en R1 eller en G1-R1-gruppe;

A er en CH₂-CH₂-gruppe;

X2 er en G2-R2-gruppe;

G1 er et atom av oksygen eller svovel og G2 er et atom av oksygen;

R1 er en alkyl eller sykloalkylgruppe som har fra ett til sju karbonatomer;

R2 er en alkylgruppe substituert ved minst en -COOR₃-gruppe, hvori R₃ er et hydrogenatom eller en alkylgruppe som har fra ett til fire karbonatomer;

R4 og R5 er en alkylgruppe som har fra ett til fire karbonatomer.

På lignende måte som WO2007/147879 beskriver WO2007/147880 forbindelser som kan omfattes i preparater i henhold til oppfinnelsen som svarer til reduserte, substituerte 1,3-difenylpropanon-derivater av forbindelser som ble beskrevet i WO2004/005243, WO2004/005233, WO2005/005369, US20070032543 eller WO2005/073184, og spesielt:

2-[2,6-dimetyl-4-[3-[4-(trifluormetyloksy)fenyl]-3-okso-propyl]fenoksy]-2-metylpropionsyre, beskrevet som forbindelse 1;

2-[2,6-dimetyl-4-[3-[4-(trifluormetyltio)fenyl]-3-okso-propyl]fenoksy]-2-metylpropionsyre, beskrevet som forbindelse 2;

2-[2,6-dimetyl-4-[3-[4-bromofenyl]-3-okso-propyl]fenoksy]-2-metylpropionsyre, beskrevet som forbindelse 3;

2-[2,6-dimetyl-4-[3-[4-(trifluormetyl)fenyl]-3-okso-propyl]fenoksy]-2-metylpropionsyre, beskrevet som forbindelse 4;

2-[2,6-dimetyl-4-[3-[4-(3,3,3-trifluorpropyloksy)fenyl]-3-okso-propyl]fenoksy]-2-metyl propionsyre, beskrevet som forbindelse 11;

2-(2,6-dimetyl-4-(3-okso-3-(4-(2,2,2-trifluoretoksy)fenyl)propyl)fenoksy)-2-metylpropionsyre, beskrevet som forbindelse 12;

2-(2,6-dimetyl-4-(3-okso-3-(4-(2,2,2-trifluoretyltio)fenyl)propyl)fenoksy)-2-metylpropionsyre, beskrevet som forbindelse 13

2-(2,6-dimetyl-4-(3-okso-3-(4-(trifluormetoksy)fenyl)propyl)fenoksy)propionsyre, beskrevet som forbindelse 29;

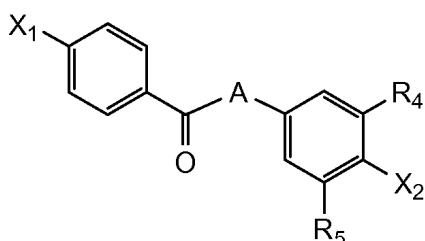
4-(2,6-dimetyl-4-(3-okso-3-(4-(trifluormetoksy)fenyl)propyl)fenoksy)-2,2-dimetylsmørsyre, beskrevet som forbindelse 34;

2-(2,6-dimetyl-4-(3-okso-3-(4-(trifluormetoksy)fenyl)propyl)fenoksy)-2-metylpropionsyre tertibutylester, beskrevet som forbindelse 35;

2-(2,6-dimetyl-4-(3-okso-3-(4-(trifluormetoksy)fenyl)propyl)fenoksy)-2-metylpropan isopropylester, beskrevet som forbindelse 36;

2,2-difluor-2-(2,6-dimetyl-4-(3-okso-3-(4-trifluormetoksy)fenyl)propyl)fenoksy)eddiksyre, beskrevet som forbindelse 37.

I en ytterligere utførelsesform av oppfinnelsen har forbindelsene som beskrevet i WO2007/147880 (heri referert til som forbindelser med Generell Formel (V)) som kan anvendes og administreres og som kan omfattes i preparater i henhold til oppfinnelsen, følgende Generelle Formel (I):



i hvilken:

X_1 er et halogenatom eller en R_1 eller G_1 - R_1 -gruppe;

A er en CH_2 - CH_2 -gruppe;

X_2 er en G_2 - R_2 -gruppe;

G_1 er et atom av oksygen eller svovel og G_2 er et atom av oksygen;

R_1 er en alkyl eller sykloalkylgruppe som er substituert ved ett eller flere halogenatomer;

R_2 er en alkylgruppe substituert eller ikke ved ett eller flere halogenatomer og substituert ved minst en $-COOR_3$ -gruppe, hvori R_3 er et hydrogenatom eller en alkylgruppe som har fra ett til fire karbonatomer.

R_4 og R_5 er en alkylgruppe som har fra ett til fire karbonatomer.

Forbindelsene som mest foretrukket kan bli anvendt og administrert i henhold til

oppfinnelsen og omfattet i preparater ifølge oppfinnelsen er slike som er definert i henhold til Generell Formel (II), Generell Formel (IV) eller Generell Formel (V), og spesielt:

1-[4-metyltiofenyl]-3-[3,5-dimetyl-4-karboksydimetylmetyloksyfenyl]prop-2-en-1-on (forbindelse 29 fra WO2004/005233);
 1-[4-metyltiofenyl]-3-[3,5-dimetyl-4-isopropylloksykarbonyldimetylmetyloksyfenyl]prop-2-en-1-on (forbindelse 28 fra WO2004/005233);
 1-[4-metyltiofenyl]-3-[3,5-dimetyl-4-tertbutylloksykarbonyldimetylmetyloksyfenyl]prop-2-en-1-on (forbindelse 27 fra WO2004/005233);
 1-[4-trifluormetylfenyl]-3-[3,5-dimetyl-4-tertbutylloksykarbonyldimetylmetyloksyfenyl] prop-2-en-1-on (forbindelse 57 fra US20070032543)
 1-[4-trifluormetylfenyl]-3-[3,5-dimetyl-4-karboksydimetylmetyloksyfenyl]prop-2-en-1-on (forbindelse 58 fra US20070032543)
 1-[4-trifluormetyloksyfenyl]-3-[3,5-dimetyl-4-tertbutylloksykarbonyldimetylmetyloksy-fenyl]prop-2-en-1-on (forbindelse 61 fra US20070032543)
 1-[4-trifluormetyloksyfenyl]-3-[3,5-dimetyl-4-karboksydimetylmetyloksyfenyl] prop-2-en-1-on (forbindelse 62 fra US20070032543)
 2-[2,6-dimetyl-4-[3-[4-(metyltio)fenyl]-3-okso-propyl]fenoksy]-2-metylpropionsyre (forbindelse 1 fra WO2007/147879);
 2-[2,6-dimetyl-4-[3-[4-(metyltio)fenyl]-3-okso-propyl]fenoksy]-2-metylpropionsyre isopropylester (forbindelse 13 fra WO2007/147879);
 2-[2,6-dimetyl-4-[3-[4-(trifluormetyloksy)fenyl]-3-okso-propyl]fenoksy]-2-metylpropionsyre (forbindelse 1 fra WO 2007147880);
 2-[2,6-dimetyl-4-[3-[4-(trifluormetyltio)fenyl]-3-okso-propyl]fenoksy]-2-metylpropionsyre (forbindelse 2 fra WO 2007147880);
 2-(2,6-dimetyl-4-(3-okso-3-(4-(trifluormetyloksy)fenyl)propyl)fenoksy)-2-metylpropionsyre tert-butylester (forbindelse 35 fra WO 2007147880).

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer spesifikke anvendelser av forbindelser med Generell Formel (I) og relaterte farmasøytiske preparater omfattende disse. Forbindelsen kan, eller kan ikke, være i form av et farmasøytisk akseptabelt salt og anvendes i en terapeutisk effektiv mengde for behandling av leverforstyrrelser. Hvilken som helst forbindelse som er definert i henhold til Generell Formel (II), Generell Formel (III), Generell Formel (IV) eller Generell Formel (V), hvori disse formlene er omfattet av Generell Formel (I), kan anvendes i foreliggende oppfinnelse for behandling av en leverforstyrrelse valgt fra gruppen bestående av leverfibrose eller en fettlevversykdom, spesielt i form av et farmasøytisk preparat som omfatter nevnte forbindelse.

Oppfinnelsen tilveiebringer også en fremgangsmåte for behandling av en leverforstyrrelse valgt fra gruppen bestående av leverfibrose eller en fettlevversykdom omfattende å administrere til en pasient med behov derfor en forbindelse med Generell Formel (I) i hvilken:

X1 er et halogen, en R1 eller G1-R1 gruppe;

A er en CH=CH eller en CH₂-CH₂-gruppe;

X2 er en G2-R2 gruppe;

G1 og G2 er, identiske eller forskjellige, et atom av oksygen eller svovel;

R1 er en usubstituert alkylgruppe, en arylgruppe eller en alkylgruppe som er substituert ved ett eller flere halogenatomer, en alkoksy eller en alkyltiogruppe, sykloalkylgrupper, sykloalkyltiogrupeer eller heterosykliske grupper;

R2 er en alkylgruppe substituert med minst en -COOR₃-gruppe, hvori R₃ er et hydrogenatom, eller en alkylgruppe som er substituert eller ikke ved ett eller flere halogenatomer, sykloalkylgrupper, eller heterosykliske grupper.

R4 og R5 er, identiske eller forskjellige, en usubstituert lineær eller forgrenet alkylgruppe som har fra ett til fire karbonatomer.

Preparater omfattende forbindelser hvori X1, X2, A, G1, G2, R1, R2, R3, R4 og R5 er definert i henhold til Generell Formel (II), Generell Formel (III), Generell Formel (IV), eller Generell Formel (V) kan også anvendes for utførelse av fremgangsmåten for behandling av en leverforstyrrelse valgt fra gruppen bestående av leverfibrose eller en fettlevversykdom.

I henhold til foreliggende beskrivelse omfatter betegnelsen "leverforstyrrelse" enhver lidelse som rammer leveren, og spesielt enhver akutt eller kronisk leversykdom som omfatter patologisk nedbrytning, inflammasjon, degenerering, og/eller proliferasjon av leverceller. Spesielt er leverlidelsen leverfibrose, levercirrhose, eller hvilken som helst annen leversykdom i hvilken nivået i plasma av noen markører for hepatocellulær skade, forandring eller nekrose, er forhøyet sammenlignet med normale plasmanivåer. Disse biokjemiske markørene assosiert med leveraktivitet og status kan velges blant de beskrevet i litteraturen og spesielt alanin aminotransferase (ALAT), aspartat aminotransferase (ASAT), alkalisk fosfatase (AP), gamma-glutamyl transpeptidase (GGT), cytokeratin-18 (CK-18) eller resistin. I en bestemt utførelsesform er leverforstyrrelsen en fettlevversykdom i hvilken økningen av én eller flere av disse markørene er assosiert med en mer eller mindre signifikant steatose i leveren, som kan bekreftes ved en leverbiopsi. En ikke uttømmende liste over fettlevversykdommer omfatter NAFLD, NASH og fettlevversykdom forbundet med lidelser slik som hepatitt eller metabolsk syndrom (fedme, insulinresistens, hypertriglyseridemi og lignende) En leverforstyrrelse valgt fra gruppen bestående av leverfibrose eller en fettlevversykdom

behandles i henhold til foreliggende oppfinnelse.

Betegnelsen "leverbeskyttende" eller "hepatoprotektiv" refererer til evnen av en forbindelse til å redusere, reversere eller forebygge skade på leveren, spesielt ved å redusere, reversere eller forhindre patologisk nedbrytning, inflammasjon, degenerering og/eller proliferasjon av leverceller slik som hepatocytter.

Betegnelsen "behandling" eller "behandle" refererer til behandling, forebygging og profylakse av en lidelse, spesielt av en leverforstyrrelse. Behandlingen omfatter administrering av en forbindelse eller farmasøytisk preparat til pasient med en erklært lidelse for å kurere, forsinke eller stanse utviklingen, og følgelig forbedre tilstanden til pasienter. Behandlingen kan også administreres til friske subjekter som har risiko for å utvikle en leverforstyrrelse.

Innenfor konteksten til oppfinnelsen betyr betegnelsen "subjekt" et pattedyr og nærmere bestemt et menneske. Subjektene som skal behandles i henhold til oppfinnelsen kan hensiktsmessig velges på grunnlag av flere kriterier forbundet med leverforstyrrelse slik som tidligere medikamentbehandlinger, assosierte patologier, genotype, eksponering for risikofaktorer, virusinfeksjon, så vel som hvilken som helst annen relevant biomarkør som kan vurderes ved hjelp av immunologisk, biokjemisk, enzymatisk, kjemisk eller nukleinsyredeteksjonsmetode. I en bestemt utførelsesform er subjektet en overvektig pasient (spesielt en overvektig pasient med prediabetes eller diabetes) eller fet pasient som lider av aterogen dyslipidemi. Disse pasientene er faktisk med risiko for å utvikle en leverforstyrrelse, spesielt NAFLD eller NASH. Oppfinnerene har vist at forbindelser som definert ovenfor har en fordelaktig effekt på leverfunksjoner hos slike pasienter.

Forbindelsene med Generell Formel (I) kan inneholde ett eller flere asymmetriske sentre. Når en enantiomerisk ren (eller anrikt) forbindelse er ønsket, kan den oppnås enten ved rensing av sluttproduktet eller kirale mellomprodukter, eller ved asymmetrisk syntese ifølge de typiske metodene kjent for fagfolk på området (for eksempel ved anvendelse av reaktive og kirale katalysatorer). Noen av disse forbindelsene kan ha ulike stabile tautomere former. Foreliggende oppfinnelse omfatter anvendelse av stereoisomerer (diastereoisomerer, enantiomerer), rene eller blandede, så vel som racemiske blandinger og geometriske isomerer av forbindelser med generell Formel (I).

Forbindelsene med generell Formel (I) kan formuleres som "farmasøytisk akseptable" salter, som er svakt- eller ikke-toksiske salter oppnådd fra organiske eller uorganiske baser eller syrer av forbindelser med generell Formel (I). Disse saltene kan oppnås under det endelige rensetrinnet for forbindelsen eller ved inkorporering av saltet i den tidligere rensede forbindelsen.

De farmasøytiske preparatene omfattende en forbindelse ifølge Generell Formel (I) for behandling av en leverforstyrrelse valgt fra gruppen bestående av leverfibrose

eller en fettlevversykdom kan omfatte ett eller flere hjelpestoffer eller konstituenten, akseptable innenfor en farmasøytisk kontekst (f.eks. saltoppløsninger, fysiologiske løsninger, isotone løsninger, osv., kompatible med farmasøytisk anvendelse og velkjent for fagfolk på området). Disse preparatene kan omfatte ett eller flere midler eller konstituenten valgt fra dispergeringsmidler, solubiliseringssmidler, stabiliseringsmidler, konserveringsmidler, osv. Midler eller konstituenten anvendelige for disse formuleringene (flytende og/eller injiserbare og/eller faste) er spesielt metylcellulose, hydroksymetylcellulose, karboksymetylcellulose, polysorbat 80, mannitol, gelatin, laktose, vegetabiliske oljer, akasie, liposomer, osv. Disse preparatene kan formuleres i form av injiserbare suspensjoner, geler, oljer, piller, suppositorier, pulvere, gelkapsler, kapsler, aerosoler, osv., eventuelt ved hjelp av galeniske former eller anordninger som sikrer langvarig og/eller langsom frigjøring. For denne typen formulering kan midler slik som cellulose, karbonater eller stivelser fordelaktig anvendes.

Forbindelsene med Generell Formel (I) skulle administreres i en effektiv mengde av en forbindelse ved anvendelse av et farmasøytisk preparat som definert ovenfor. Innenfor konteksten til oppfinnelsen refererer betegnelsen "en effektiv mengde" til en mengde av forbindelsen tilstrekkelig til å frembringe det ønskede terapeutiske resultatet.

Forbindelsene med Generell Formel (I) kan administreres på forskjellige måter og i ulike former som tillater administrering av nevnte forbindelser i en terapeutisk effektiv mengde. Følgelig kan de, for eksempel, administreres ved en systemisk administreringsvei, peroralt, parenteralt, ved inhalasjon, eller ved injeksjon, slik som for eksempel intravenøst, ved intra-muskulær administreringsvei, ved subkutan administreringsvei, ved transdermal administreringsvei, ved intra-arteriell administreringsvei, osv. Oral administrering er den foretrukne administreringsveien for farmasøytiske preparater omfattende en forbindelse med generell Formel (I) for behandling av en leverforstyrrelse valgt fra gruppen bestående av leverfibrose eller en fettlevversykdom.

Frekvensen og/eller dosen relativt til administreringen kan tilpasses av fagfolk på området, med hensyn til pasientens funksjon, patologien, administreringsformen, osv. Forbindelsene med Generell Formel (I) kan typisk administreres for behandling av en leverforstyrrelse valgt fra gruppen bestående av leverfibrose eller en fettlevversykdom ved doser som varierer mellom 0,01 mg og 1 g per administrering, foretrukket fra 1 mg til 100 mg per administrering. Administrering kan foretas daglig eller til og med flere ganger per dag, om nødvendig.

Forbindelsene og preparatene ifølge oppfinnelsen kan fordelaktig administreres i kombinasjon med andre terapeutiske midler, som for øyeblikket er tilgjengelig på markedet eller under utvikling for behandling av metabolske og/eller leverforstyrrelser, slik som metformin, insulin, tiazolidindioner, glitazoner, statiner, inhibitorer av kolesterol

og/eller andre lipidsenkende legemidler.

I en ytterligere utførelsesform tilveiebringer foreliggende beskrivelse fremgangsmåter for behandling av en leverforstyrrelse valgt fra gruppen bestående av leverfibrose eller en fettleversykdom omfattende administrering av en forbindelse med Generell Formel (I), spesielt i form av farmasøytiske preparater inneholdende disse forbindelsene. Slike fremgangsmåter kan omfatte administrering av hvilken som helst forbindelse som er definert i henhold til Generell Formel (II), Generell Formel (III), Generell Formel (IV) eller Generell Formel (V).

Forbindelsene og preparatene ifølge oppfinnelsen tilveiebringer fordelaktig terapeutisk verktøy for behandling en leverforstyrrelse valgt fra gruppen bestående av leverfibrose eller en fettleversykdom, og spesielt fettleversykdommer inkludert NAFLD og NASH, på grunn av de hepatoprotektive effektene av forbindelsene med Generell Formel (I). Spesielt kan disse forbindelsene velges blant slike for hvilke X1, X2, A, G1, G2, R1, R2, R3, R4 og R5 er definert i henhold til Generell Formel (II), Generell Formel (III), Generell Formel (IV) eller Generell Formel (V). Et ytterligere formål ifølge foreliggende oppfinnelse angår en forbindelse med Generell Formel (I) som beskrevet ovenfor, og spesielt med Generell Formel (II), (III), (IV) og (V), for anvendelse i en fremgangsmåte for behandling av en leverforstyrrelse valgt fra gruppen bestående av leverfibrose eller en fettleversykdom. Spesifikke leverforstyrrelser ment for behandling er de som er beskrevet ovenfor slik som leverfibrose eller en fettleversykdom. I enda en annen utførelsesform er forbindelsene for anvendelse i nevnte fremgangsmåter de som spesielt er beskrevet ovenfor.

Generelt kan de leverspesifikke egenskapene av forbindelser med Generell Formel (I) evalueres i spesifikke pasientpopulasjoner som fremviser en leverforstyrrelse slik som NAFLD og/eller NASH ved inklusjon. For eksempel kan en dobbeltblindet, placebo-kontrollert og randomisert studie evaluere effekten av oral administrering av forbindelsen (ved en dose på 80 mg/dag eller mer) i 3-12 måneder hos subjekter som har blitt diagnostisert med NAFLD (kun steatose) og /eller NASH (steatose og fibrose) og fremviser økte aminotransferasenivåer. Enhver statistisk relevant forbedring av vesentlige biokjemiske parametere (slik som reduksjon av aminotransferaser, GGT og/eller cytokeratin-18-nivåer og/eller reduksjon av resistin-nivåer), av volum av hepatisk steatose målt ved avbildningsteknikk eller av histologiske trekk av leverbiopsier (måling av steatose, leverinflammasjon og fibrose) kan vurderes regelmessig hos disse pasientene i løpet av studien (på månedlig basis eller hyppigere). Ytterligere parametere slik som totalt/LDL-/HDL-kolesterol, hemodynamiske parametere, kroppsmasseindeks, insulinresistens, markører for inflammatorisk eller oksidativt stress, plasmainsulin og glukose, markører for renal funksjon i urin, leveravbildning ved MRI, og/eller histomorfologi i leverbiopsier kan også måles under studien og/eller ved slutten av

studien for å komplettere effektprofilen for forbindelser for behandling av leverforstyrrelser.

Når oppfinnelsen nå er utførlig beskrevet, vil det forstås av fagfolk på området at oppfinnelsen kan utøves innenfor et bredt og ekvivalent spekter av betingelser, parametere og lignende, uten å påvirke oppfinnelsens idé eller omfang eller noen som helst utførelsesform derav. Flere andre fordeler ifølge oppfinnelsen vil fremkomme ved lesing av de følgende eksemplene; de skal betraktes som illustrative data og ikke som begrensende.

EKSEMPLER

Eksempel 1: Effekter av forbindelser med Generell Formel (I) på leverspesifikke biokjemiske indekser

Materialer og metoder

1-[4-metyltiofenyl]-3-[3,5-dimetyl-4-karboksydimetylmetyloksyfenyl]prop-2-en-1-on (Forbindelse 29 fra WO2004/005233) har blitt formulert som kapsler med hardt skall inneholdende 5, 10 eller 20 mg av forbindelsen. Forbindelsen (80 mg) ble administrert oralt én gang daglig i 28 dager. Studien har blitt utført i to parallelle grupper ved dobbelt-blind betingelser: placebo eller Forbindelse 29 fra WO2004/005233.

Tolerabilitet og sikkerhet av administreringer én gang daglig, så vel som effekten med hensyn til å forbedre plasmalipider og glukosehomeostase sammenlignet med placebo, ble evaluert i to pilotforsøk ved anvendelse av relevante biokjemiske parametere. Dataene ble anvendt for å beregne prosentandelen av endring som skyldes forbindelsen sammenlignet med placebo etter 28 dagers behandling.

Resultater og konklusjoner:

En første, dobbeltblindet, placebokontrollert, randomisert studie har blitt utført på pasienter som lider av aterogen dyslipidemi og abdominal fedme for å bedømme tolerabiliteten og sikkerheten av administrering én gang per dag av orale doser av Forbindelse 29 fra WO2004/005233 (ved en dose på 80 mg/dag), så vel som effekten på plasma triglyserider og HDL-kolesterol (primære formål).

Relativt til placebogruppen ble den terapeutiske effekten av denne forbindelsen vist med en statistisk signifikant 21 % ($p < 0,01$) reduksjon av plasmatriglyserider og en 9 % ($p < 0,01$) økning av nivå av det gode kolesterolet (HDL-C). Disse metabolske effektene var sammenlignbare med de publisert med fibratene i samme pasient-

populasjon. Videre avslørte forbindelsen en bemerkelsesverdig mangel på effekt på homocystein (en kjent kardiovaskulær risikofaktor). Forbindelsen viste signifikante effekter på multiple sekundære evalueringskriterier inkludert reduksjon av lever akutt-fase inflammasjonsmarkører slik som fibrinogen og haptoglobin ($p < 0,01$). Effekter på biokjemiske parametere for leverfunksjon ble også målt og administrering av orale doser av Forbindelse 29 fra WO2004/005233 førte uventet til en statistisk signifikant 23 % reduksjon av nivået av gamma-glutamyl transpeptidase ($p < 0,001$) og 13 % reduksjon av nivået av alanin aminotransferase ($p < 0,01$).

En andre dobbeltblind, placebokontrollert, randomisert pilotstudie har blitt utført på pasienter som lider av nedsatt fastende glukose, nedsatt glukosetoleranse og abdominal fedme for å bedømme tolerabiliteten og sikkerheten av administrering én gang per dag av orale doser av Forbindelse 29 fra WO2004/005233 (ved en dose på 80 mg/dag), så vel som effekten på glukose- og lipidmetabolisme.

Relativt til placebogruppen ble den terapeutiske effekten av denne forbindelsen demonstrert med en statistisk signifikant reduksjon av fastende plasmaglukose (-5 %, $p < 0,05$), av fastende insulinemi (-25 %, $p < 0,01$) og av insulinresistensindeks, HOMA-IR (-31 %, $p < 0,01$). Parallelt reduserte Forbindelse 29 fra WO2004/005233 plasma-triglyserider (-25 %, $p < 0,001$) og LDL-C mens den økte HDL-C (+9 %, $p < 0,01$). Forbindelsen viste signifikante effekter på multiple sekundære evalueringskriterier inkludert reduksjon av lever akutt-fase inflammasjonsmarkører slik som haptoglobin ($p < 0,01$). Biokjemiske parametere for leverfunksjon ble også beregnet og administreringene av orale doser av Forbindelse 29 fra WO2004/005233 førte til en statistisk 15 % reduksjon av nivået av gamma-glutamyl transpeptidase ($p < 0,01$).

Disse resultatene viste at en oral formulering av en forbindelse med Generell Formel (I) ikke kun er veltolerert av pasienter men har positive effekter på multiple biokjemiske parametere assosiert med NAFLD og NASH inkludert leverenzymer, insulinfølsomhet, lipidmetabolisme og leverinflammasjonsmarkører. Spesielt reduserer Forbindelse 29 fra WO2004/005233, i betydelig grad, plasmanivåer av ALAT og GGT, to vanlige spesifikke biomarkører for leverdysfunksjon som er forhøyet hos pasienter som lider av NAFLD og NASH.

Eksempel 2: Dyremodeller for testing av leverspesifikke egenskaper av forbindelser med Generell Formel (I)

Materialer og metoder

Dyremodell og behandling: ob/ob-mus

Hann ob/ob-mus (8 uker gamle) ble anskaffet fra Charles River (L'Arbresle, Frankrike) og ble holdt i en 12 timers lys/mørke-syklus ved en konstant temperatur på 20 ± 3 °C. Etter 1 ukes akklimatisering ble musene delt inn i grupper på 8 dyr valgt slik at fordelingen av deres kroppsvekt og deres 6 timers fastende glykemi bestemt før forsøket var jevn. Dyrene ble gitt en standard diett ("chow diet") (R03, SAFE) og behandlet i 26 dager med forbindelsene av interesse. Forbindelser, inkludert forbindelse 29 fra WO2004005233 (Forbindelse 29, ved 10 eller 30 mg/kg/dag), fenofibrat (100 mg/kg/dag) og rosiglitazon (10 mg/kg/dag) ble administrert daglig ved sonde. Kontrolldyr ble behandlet med kun konstituent (karboksymetylcellulose 1 % + Tween-80 0,1 %). Dyrene hadde tilgang til mat og vann *ad libitum*.

Dyremodell og behandling: studie i hApoE2 knock-in-mus

Hunn hApoE2 knock-in (KI) transgene mus (Sullivan et al., 1998) (4 uker gamle). Mus ble holdt i en 12 timers lys/mørke-syklus ved en konstant temperatur på 20 ± 3 °C. Etter 1 ukes akklimatisering ble musene delt inn i grupper på 7-10 dyr valgt slik at fordelingen av deres kroppsvekt og nivå av plasmalipid bestemt før forsøket var ensartet. Dyrene ble gitt en "vestlig" diett ("Western diet") (20 % mettet fett og 0,2 % kolesterol, Harlan Teklad TD88137) ved avvenning og i 12 uker. Forbindelser av interesse (Forbindelse 29 ved 0,3 mg/kg/dag og fenofibrat ved 100 mg/kg/dag) ble inkorporert i den "vestlige" dietten (SAFE, Augy, Frankrike) og administrert til mus i 12 uker. Kontrolldyr mottok kun "vestlig" diett. Dyrene hadde tilgang til mat og vann *ad libitum*.

Dyremodell og behandling: studier på hApoE2 KI og hApoE2 KI PPARalfa KO-mus

Hunn hApoE2 knock-in (KI) og hApoE2 KI / PPARalfa knock-out (KO) aldersmatchede transgene mus (i alderen 8 til 25 uker for det første forsøket og i alderen 10 til 14 uker for det andre forsøket. hApoE2 KI / PPARalfa KO-mus ble alet fram ved kryssning av homozygote hApoE2 KI-mus (Sullivan P et al., 1998) og homozygote PPARalfa-defisiente mus (Lee et al., 1995). Mus ble holdt i en 12 timers lys/mørke-syklus ved en konstant temperatur på 20 ± 3 °C. Etter 1 ukes akklimatisering ble musene delt inn i grupper på 4-6 dyr valgt slik at fordelingen av deres alder, kroppsvekt og nivåer av plasmalipid bestemt før forsøket var ensartet. Dyrene ble gitt en vestlig diett (20 % mettet fett og 0,2 % kolesterol, Harlan Teklad TD88137) i 2 uker i den første studien, som omfattet daglig administrering av Forbindelse 29 (ved 30 mg/kg/dag ved oral sonde), og i 6 uker i den andre studien, som omfattet daglig administrering av Forbindelse 1 fra WO2007147879 (Forbindelse 1, ved 30 mg/kg/dag ved oral sonde).

Kontrolldyr ble behandlet med kun konstituent (karboksymetylcellulose 1 % + Tween-80 0,1 %). Dyrene hadde tilgang til mat og vann *ad libitum*.

Preparering av biologiske prøver oppnådd fra dyremodeller

Ved slutten av studiene ble dyrene veid og avlivet under anestesi. Blod ble oppsamlet fra retro-orbital sinus; plasma ble oppnådd ved sentrifugering (4000 rpm, ved 4 °C i 15 min) og ble deretter frosset og lagret ved -20 °C. Vev og lever ble isolert og hurtig frosset i flytende nitrogen og lagret ved -80 °C for senere analyse (genekspresjon og biokjemi) eller fiksert i 4 % paraformaldehyd for histologi.

Plasmaanalyse

Alanin aminotransferase-nivåer ble bestemt i plasma ved anvendelse av RX Daytona™ automatisk analysator (Randox) og egnet doserings kit (Randox, kat nr AL 3801).

Genekspresjonsanalyse

Totalt RNA ble isolert fra frosset lever ved anvendelse av NucleoSpin® 96 RNA kit (Macherey Nagel), i henhold til produsentens instruksjoner. Revers transkripsjon ble utført på 1 µg totalt RNA ved virkningen av 1 µl MMLV-RT enzym (Invitrogen) i 1 time ved 37 °C i et totalt volum på 30 µl. Reaksjonsbetingelsene var 1 X buffer (Invitrogen), 1,5 mM DTT (Invitrogen), 0,18 mM dNTPs (Promega), 200 ng pdN6 (Amersham), 30U RNase inhibitor (Promega). Kvantitativ PCR ble deretter utført ved anvendelse av MyiQ Single-Color Real-Time PCR Detection System (Biorad). I korthet ble PCR-reaksjoner utført i 96-brønns plater på 5 µl fortynnet revers transkripsjons-blanding ved anvendelse av iQ SYBR Green Supermix kit. Reaksjonsbetingelsene var: 25 µl volum reaksjon, 3 mM MgCl₂ og 0,5 µl av hver revers og forover primer-løsning (10 pMol), Temperatur på 60 °C. Parene av primere som har blitt designet for spesifikk amplifikasjon av hvert målgene er oppsummert i Tabell 1.

Tabell 1

Gener	Revers primer (5'-3')	Forover primer (5'-3')
36B4	GGGAAGGTGTAATCCGTCTCCACAG (SEQ ID NO:1)	CATGCTCAACATCTCCCCCTTCTCC (SEQ ID NO:2)
TNF alfa	AGGTACAACCCATCGGCTGG (SEQ ID NO:3)	CGTCGTAGCAAACCACCAAGTG (SEQ ID NO:4)
TGF beta	TGGTTGTAGAGGGCAAGGAC (SEQ ID NO:5)	TTGCTTCAGCTCCACAGAGA (SEQ ID NO:6)
CCL5	CACACTTGGCGGTTCTTCG (SEQ ID NO:7)	CCCTCACCATCATCCTCACTGC (SEQ ID NO:8)
Col1a1	GCCAGGAGAACCAGCAGAG (SEQ ID NO:9)	AGGCGAACAAGGTGACAGAG (SEQ ID NO:10)

Mengden av fluorescens emittert er direkte proporsjonal med mengden av komplementært DNA til stede ved starten av reaksjonen og amplifisert ved PCR. De relative nivåene av ekspresjon ble bestemt ved anvendelse av standardkurven for hvert transkript. Resultatene ble deretter normalisert med hensyn til signalene oppnådd med 36B4-kontrollen (et referanse-transkript for genekspresjon i leveren). Induksjonsfaktoren, dvs. forholdet mellom det relative signalet induisert av forbindelsen ifølge oppfinnelsen og gjennomsnittet av verdiene vedrørende kontrollgruppen, ble deretter beregnet for hver prøve. Desto høyere denne faktoren er, desto mer fremmer forbindelsen ekspresjon av målgenet. Det endelige resultatet blir beskrevet som gjennomsnittet av induksjonsverdiene i hver eksperimentell gruppe.

Histologisk analyse av lever

Formalinfixert levervev ble bearbeidet, og 5 µm tykke parafinsnitt ble farget med hematoksylin og eosin. Den histologiske analysen av fargede leversnitt ble utført ved blindet betingelse for å kvantifisere leversteatose og intralobulær leverinflammasjon. Leversteatose ble skåret fra 0 til 3 som følger: 0 (svært svakt rammet), 1 (svakt rammet), 2 (moderat rammet), 3 (sterkt rammet). Intralobulær leverinflammasjon ble også skåret avhengig av antall inflammatorisk foci tellet ved observasjonsfelt som følger: 0 (<1 foci/felt), 1 (1 til 2 foci/felt), 2 (2 til 4 foci/felt) 3 (mer enn 4 foci/felt).

Hepatisk lipid-analyse

Omtrent 100 mg frosset levervev ble homogenisert med en vevshomogenisator (Precellys®24, Bertin Technologies, Frankrike) i 150 mM NaCl-buffer, inneholdende 15,4 mM Na₃. Lipidfraksjoner i homogenater ble ekstrahert med kloroform-metanol (2:1, vekt/vekt) fulgt av måling av totalt kolesterol (ved anvendelse av Cholesterol RTU™ 61218 kit, Biomerieux, Frankrike) og riktige triglyserider (TR0100 kit, Sigma-Aldrich).

Resultater og konklusjoner

Flere dyremodeller er i litteraturen beskrevet som å reflektere etiologien, sykdomsprogresjonen og patologien til humane leversykdommer. Imidlertid fremviser disse modellene ikke alltid spekteret av histopatologiske og patofysiologiske trekk forbundet med spesifikke leversykdommer. Som nylig gjennomgått (Fan J og Qiao L, 2009), fremgår dette spesielt tydelig med hensyn til NAFLD eller NASH, hvori genetiske (i transgene mus), ernærings- (i rotter eller mus), eller blandete modeller har blitt etablert.

NASH er karakterisert ved patologiske endringer av lever som varierer fra steatose og leverinflammasjon til leverdegenerasjon, fibrose og cirrhose. Patogenesen til NASH er fortsatt dårlig forstått. Det er en komponent av metabolsk syndrom og derfor ofte assosiert med hyperlipidemi. Forskjellige transgene dyremodeller ble anvendt for å karakterisere effektene av eksempler på forbindelser med Generell Formel (I), og nærmere bestemt med Generell Formel (I) og Generell Formel (IV): de insulinresistente, leptin-manglende ("deficient") ob/ob-musene og hApoE2 knock-in musene med dyslipidemi (de sistnevnte med eller uten en ytterligere genomisk modifikasjon som består i inaktivering av PPARalfa-genet).

Leptin-manglende ob/ob-mus er fete, har dyslipidemi, er insulinresistente og utvikler leverskade og steatose. Hepatisk steatose er relativt asymptomatisk men individer med denne lidelsen har større risiko for å utvikle NASH. Denne første protokollen ble utformet for å analysere effektene av Forbindelse 29 og av referanseforbindelsene fenofibrat og rosiglitazon på de tidlige stadiene av NASH, dvs. inflammasjon i steatotisk lever hos ob/ob-mus. I ob/ob-mus induerte 26 dagers behandling med rosiglitazon økning av hepatisk ekspresjon av TNFalfa i ob/ob-musene mens ingen større endring i ekspresjonen av dette cytokinet ble observert hos dyr behandlet med fenofibrat. Derimot hemmet administrering av Forbindelse 29 ekspresjon av dette cytokinet på en dose-respons måte (Fig. 2A). Ved samme behandling, var det hepatiske ekspresjonsnivået av TGFbeta ekvivalent i alle kontroll- og referansegruppene (kontroll, fenofibrat og rosiglitazon). Igjen hemmet administrering av Forbindelse 29 ekspresjonen av denne vekstfaktoren på en dose-respons-måte, en effekt som er mer statistisk relevant når Forbindelse 29 ble administrert ved 30 mg/kg/dag (Fig. 2B).

Plasma ALAT ble målt som en surrogatmarkør for å vurdere leverskade hos disse ob/ob-musene etter 26 dagers behandling med de forskjellige forbindelsene. Når nivået av plasma ALAT sammenlignes med enten kontrollgruppen eller gruppen behandlet med fenofibrat, oppviste gruppen av mus som var behandlet med rosiglitazon en signifikant økning i plasmanivåene av ALAT. Derimot induerte administrering av Forbindelse 29 ved 30 mg/kg/dag en statistisk signifikant reduksjon av plasmanivåer av ALAT (Fig. 2C). En annen *in vivo*-modell ble anvendt for å studere effektene av Forbindelse 29 og av

referanseforbindelsen fenofibrat på fysiologiske parametere som vanligvis anses som relevante for å vurdere NASH. I "humaniserte" ApoE2 knock-in mus (referert til som hApoE2 KI) erstatter det humane ApoE-allelet det murine apoe-genet, slik at disse musene uttrykker human ApoE2 (hApoE2) under kontroll av de endogene promotersekvensene ved fysiologiske nivåer. Imidlertid har hApoE2 en tydelig redusert affinitet for LDL-reseptoren, hvilket fører til en lipoproteinprofil i plasma som ligner human type III hyperlipoproteinemi (Sullivan et al., 1998). I likhet med mennesker, er hApoE2 KI-mus responsive for lipidsenkende medikamenter slik som fibrater (ligander for PPAR α). Denne klassen av medikamenter er vist å reversere steatohepatitt hos mus (Shiri-Sverdlov R et al., 2006) og følgelig kan denne modellen tillate evaluering av leverspesifikke anti-inflammatoriske og anti-fibrotiske effekter av forbindelser med Generell Formel (I). Spesielt er økte TNF α -nivåer relatert til leverinflammasjon, nekrose og fibrose typisk for NASH (Larter et al., 2008). TGF β er et peptid funnet i mange celletyper som regulerer sårheling og apoptose. Isoformen funnet i leverceller, TGF β 1, har blitt funnet i mange modeller av hepatisk fibrose og nivåer øker ved kronisk aktiv hepatitt og fibrotisk alkoholisk leversykdom (Nan et al., 2009).

De ulike hApoE2 KI-musene ble behandlet i 12 uker mens de ble gitt en "vestlig" diett. I denne modellen inhiberte Forbindelse 29 hepatisk ekspresjon av gen som er relevant for leverinflammasjon (TNF α , CCL5, TGF β ; Fig.3A, 3B, 3C henholdsvis) med en effekt lik (om ikke bedre enn) fenofibrat som ble administrert i en høyere dose.

Gruppen av mus behandlet med Forbindelse 29 viste imidlertid en statistisk signifikant inhibering av ekspresjonen av gener som de for spesifikke kollagen-kjeder som er involvert i leverfibrose (Basaranoglu et al., 2010), og spesielt Col1a1 (Fig. 3D). En slik effekt på kollagen-gener ble ikke observert i gruppen av mus behandlet med fenofibrat. Disse resultatene viser at Forbindelse 29 oppviser antiinflammatoriske og antifibrotiske egenskaper i en *in vivo*-modell av NASH.

Eksempler på forbindelser med generell Formel (I) ble testet *in vivo* i en høyfett-diett musemodell. hApoE2 KI og hApoE2 KI/ PPAR α KO ("humanisert" ApoE2 knock-in mus som mangler mPPAR α -genet) ble gitt en Vestlig diett og ble daglig behandlet med Forbindelse 29 ved 30 mg/kg/dag i 2 uker. Ved slutten av forsøket ble leversteatose og intralobulær inflammasjon evaluert i kontrollen og behandlede mus ved hjelp av histologisk analyse og spesifikke score.

Denne studien viste at behandling med Forbindelse 29 hemmer utviklingen av både leversteatose og leverinflammasjon som er induert av dietten hos hApoE2 KI-mus og, enda raskere hos hApoE2 KI / PPAR α KO-mus, hvori det er tydelig en akselerasjon av leverforstyrrelsen på grunn av mangelen på PPAR α (Tabell 2 og Tabell 3).

Tabell 2

Leversteatose (score)	hApoE2 KI		hApoE2 KI / PPARalfa KO	
	Konstituent	Forb. 29 (30 mg/kg/dag)	Konstituent	Forb. 29 (30 mg/kg/dag)
0	17%	83%	0%	0%
1	50%	17%	33%	33%
2	33%	0%	33%	50%
3	0%	0%	33%	17%

Tabell 3

Lever-inflamasjon (score)	hApoE2 KI		hApoE2 KI / PPARalfa KO	
	Konstituent	Forb. 29 (30 mg/kg/dag)	Konstituent	Forb. 29 (30 mg/kg/dag)
0	50%	100%	17%	67%
1	50%	0%	33%	17%
2	0%	0%	33%	17%
3	0%	0%	17%	0%

I en annen studie ble de leverspesifikke antiinflammatoriske og antifibrotiske egenskapene av Forbindelse 29 og Forbindelse 1 fra WO2007/147879 (Forbindelse 1) evaluert i hApoE2 KI / PPARalfa KO-mus som ble gitt en Vestlig diett og daglig behandlet med de valgte forbindelsene i 6 uker.

Både Forbindelse 29 og Forbindelse 1 inhiberte leverekspresjon av TNF α , TGF β og kollagen hos hApoE2 KI / PPARalfa KO-mus (Fig. 4A, 4B, og 4C, henholdsvis), hvilket bekrefter de leverspesifikke (hovedsakelig PPARalfa-uavhengig), antiinflammatoriske og antifibrotiske egenskapene av disse forbindelsene i en relevant *in vivo*-modell for NASH. Leverlipid-analysen viste videre at både Forbindelse 29 og Forbindelse 1 forhindret triglyseridakkumulering i leveren hos hApoE2 KI / PPARalfa KO-mus (Fig. 4D).

Tatt under ett fremhevet disse resultatene de leverspesifikke antiinflammatoriske, anti-steatotiske og antifibrotiske egenskapene av forbindelse 29 fra WO2004/005233 (omfattet i Generell Formel I og II) og forbindelse 1 fra WO2007/147879 (omfattet i Generell Formel (I) og (IV)) *in vivo*.

Ytterligere modell for testing av forbindelsene med Generell Formel (I) er ernærings dyremodeller av NASH slik som den metionin- og kolin-manglende (MCD) modellen som er basert på en diett med høyt sukrose og fettinnhold men som mangler to komponenter, metionin og kolin som er essensielle faktorer for levermetabolisme. Mus eller rotter føret med denne dietten utvikler raskt hepatisk inflammasjon, som videre utvikles til steatose, nekrotisk inflammasjon, fibrose og oksidativt stress. Denne metoden har blitt anvendt for å vise de potensielle terapeutiske effektene på leversteatose,

fibrose, oksidativt stress og/eller inflammasjon som er forbundet med administrering av forbindelser slik som rosiglitazon (Tahan V., et al. 2007), pancaspase-hemmeren VX-166 (Witek R et al., 2009), Zeaxantin (Chamberlain S et al., 2009), Telmisartan (Kudo H et al., 2009) eller Wy-14,643 (Ip E et al., 2004).

Forbindelsene med generell Formel (I) kan testes i en MCD-modell etablert i Sprague Dawley-rotter (8 uker gamle) eller C57BI6-mus som er fôret med den metionin- og kolin-manglende dietten i 4 til 12 uker. Behandling med forbindelsene av interesse, inkludert forbindelser som er valgt som negativ eller positiv kontroll, blir deretter administrert daglig ved ulike doser til grupper på ti eller flere dyr ved sonde i de følgende 4 til 12 ukene. Flere typer målinger kan foretas før, under eller ved slutten av behandlingen, med eller uten avlivning av dyrene. Biokjemiske doser (aspartat aminotransferase og alanin aminotransferase-aktiviteter, total bilirubin, alkalisk fosfatase, LDL/HDL-kolesterol, serum hyaluronat, hepatisk triglyserid og plasmatrighlyserid) og histomorfometrisk analyse (for bestemmelse av leverområde som fremviser fibrose og/eller steatose) er de mest relevante målingene. Dosen av inflammatoriske markører (slik som Interleukin-1a, -1b, -2, -4, -6, -10, interferon gamma, eller TNFalfa) og/eller ekspresjon av relevante gener (slik som type I kollagen eller leverspesifikke kjemokinreseptorer) kan også evalueres.

Alternativt kan dyremodeller basert på kjemisk induert hepatisk fibrose anvendes for å studere den antifibrotiske effekten av forbindelsene med Generell Formel (I). For eksempel induserer administrering av tioacetamid (TAA) eller karbontetraklorid (CCL4) en økning i reaktive oksygen substanser (ROS) som fremmer lipidperoksidering, hepatisk stellatcelle-proliferasjon og overproduksjon av kollagen, hvilket fører til kronisk leverskade og fibrose hos rotter. Denne metoden har blitt anvendt for å vise den positive effekten på leverfibrose, oksidativt stress, og/eller inflammasjon med forbindelser slik som kurkumin (Fu Y et al., 2008) eller pioglitazon (Yuan G et al., 2004).

Forbindelsene med Generell Formel (I) kan testes i en CCL4-modell som er etablert i Sprague Dawley-rotter (8 uker gamle) som mottar økende doser av CCL4 intraperitonealt fortynnet i flytende parafin (på 50 %) hver femte dag i 4 til 12 uker. Fenobarbital kan også administreres ved å starte fra 10 dager før første dose av CCL4 for å potensierte modellen. Behandling med forbindelsene av interesse, inkludert forbindelser som er valgt som negativ eller positiv kontroll, blir deretter administrert daglig i ulike doser (omfattet mellom 0,01 og 100 mg/kg/dag) til grupper på ti eller flere rotter ved sonde i de følgende 4 til 12 ukene. Som i MCD-modellen kan flere typer målinger foretas før, under eller ved slutten av behandlingen, med eller uten avliving av rottene, for å evaluere effekten av behandlingen på grunnlag av biokjemiske doser og histomorfometrisk analyse, i forbindelse med hemodynamiske indekser og dosen av inflammatoriske markører og/eller av ekspresjon av relevante gener.

Dyremodellene beskrevet ovenfor muliggjør sammenligning av leverspesifikke aktiviteter av forbindelser med generell Formel (I) med hverandre og med forbindelser allerede kjent å ha leverspesifikke (og spesielt NAFLD-/NASH-spesifikke) terapeutiske egenskaper. Spesielt antyder dataene vist i dette eksemplet overlegenheten av forbindelser med generell Formel (I) sammenlignet med referanseforbindelser.

Eksempel 3: *In vitro*/*ex vivo*-modeller for testing av leverspesifikke egenskaper av forbindelser med Generell Formel (I)

Noen *in vitro* / *ex vivo*-modeller har blitt etablert for screening av forbindelser som kan ha positiv effekt på leverfibrose, oksidativt stress, og/eller leverinflammasjon. Faktisk er en hovedbegivenhet i leverfibrose aktiveringen av hepatiske stellatceller (HSC). Etter hepatocyt-skade, blir denne celletypen aktivert og begynner å prolifere (Sato M et al., 2003). Aktiverte HSC (for eksempel, rotte eller human HSC isolert fra lever eller rotte HSC-T6 celledinje) kan aktiveres og produsere overskytende mengder av ekstracellulær matriks-forbindelser og inhibitorer av matriks degenerering. Denne metoden har blitt anvendt for å vise den positive effekten av forbindelser slik som kurkumin (Xu et al., 2003), tiazolidindioner (Miyahara T et al., 2000), eller østradiol-17-beta (Liu Q et al., 2004).

In vitro/*ex vivo*-modellene beskrevet ovenfor muliggjør sammenligning av leverspesifikke aktiviteter av forbindelser med Generell Formel (I) med hverandre og med forbindelser kjent å ha leverspesifikke (og spesielt NAFLD- / NASH-spesifikke) terapeutiske egenskaper.

REFERANSER

- Angulo P et al., 2002. Best Pract Res Clin Gastroenterol; 16: 797-810.
- Basasaranoglu, M et al., 2010. World J Gastroenterol; 16: 2223-6.
- Chamberlain S et al., 2009. Dig Dis Sci ;54: 1460-4.
- Dowman J.K et al., 2010, Q J Med; 103: 71-83
- Fan J og Qiao L, 2009. Hepatobil Pancrat Dis Int; 8: 233-240.
- Fu Y et al., 2008. Mol Pharmacol; 73: 399-409.
- Gressner A et al., 2009. World J Gastroenterol; 15: 2433-2440.
- Ip E et al., 2004. Hepatology; 39: 1286-96.
- Kudo H et al., 2009. Lever Int; 29: 988-96.
- Larter C et al., 2008. J Gastroenterol Hepatol; 23: 1635-48.
- Lee S et al., 1995. Mol Cell Biol; 15: 3012-22.
- Liu Q et al., 2004. World J Gastroenterol; 10: 1315-20.
- Marchesini G et al.2003. Hepatology; 37:917-923.
- Miyahara T et al., 2000. J Biol Chem; 275: 35715-22.
- Nan Y et al., 2009. Scand J Gastroenterol, 44, 1121-31 .
- Nelson A et al., 2009. J Clin Gastroenterol; 43: 990-994
- Neuschwander-Tetri et al., 2003. Hepatology; 38: 1008-1017.
- Sato M et al., 2003. Cell Struct Funct; 28: 105-12.
- Shiri-Sverdlov R et al., 2006. J Hepatol; 44: 732-41 .
- Sullivan P et al., J Clin Invest; 102: 130-5.
- Tahan V et al., 2007 Dig Dis Sci; 52: 3465-3472.
- Vuppalanchi R og Chalasani N, 2009. Hepatology; 49: 306-317.
- Witek R et al., 2009. Hepatology; 50:1421-30.
- Xu et al., 2003. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol; 285 : G20-G30.
- Yeh M et al., 2007. Am J Clin Pathol; 128:837-847.
- Yuan G et al., 2004. World J Gastroenterol; 10: 1047-51.

SEKVENSLISTE

<110> GENFIT
 <120> ANVENDELSE AV 1,3-DIFENYLPROP-2-EN-1-ON-DERIVATER FOR BEHANDLING AV LEVER-
 FORSTYRRELSER
 <130> B972PC00
 <160> 10
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> kunstig
 <220>
 <223> 36B4 revers primer
 <400> 1
 gggaagggtgt aatccgtctc cacag 25
 <210> 2
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> kunstig
 <220>
 <223> 36B4 forover primer
 <400> 2
 catgctcaac atctccccct tctcc 25
 <210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> kunstig
 <220>
 <223> TNFa revers primer
 <400> 3
 aggtacaacc catcggtgg 20
 <210> 4
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> kunstig
 <220>
 <223> TNFa forover primer
 <400> 4
 cgtcgtagca aaccaccaag tg 22
 <210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> kunstig

<220>
 <223> TGFb revers primer

 <400> 5
 tggttgtaga gggcaaggac 20

 <210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> kunstig

 <220>
 <223> TGFb forover primer

 <400> 6
 ttgcttcagc tccacagaga 20

 <210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> kunstig

 <220>
 <223> CCL5 revers primer

 <400> 7
 cacacttggc gggttccttcg 20

 <210> 8
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> kunstig

 <220>
 <223> CCL5 forover primer

 <400> 8
 ccctcaccat catcctcact gc 22

 <210> 9
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> kunstig

 <220>
 <223> Colla1 revers primer

 <400> 9
 gccaggagaa ccagcagag 19

 <210> 10
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> kunstig

 <220>
 <223> Colla1 forover primer

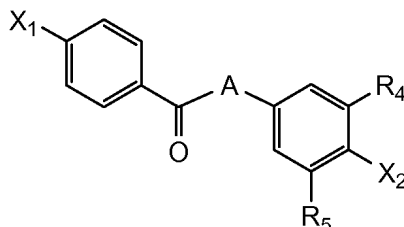
 <400> 10

aggcgaacaa ggtgacagag

20

Patentkrav

1. Forbindelse med Generell Formel (I)



i hvilken:

X1 er et halogen, en R1 eller G1-R1-gruppe;

A er en CH=CH eller en CH₂-CH₂-gruppe;

X2 er en G2-R2-gruppe;

G1 og G2 er, identiske eller forskjellige, et atom av oksygen eller svovel;

R1 er en usubstituert alkylgruppe, en arylgruppe eller en alkylgruppe som er substituert ved ett eller flere halogenatomer, en alkoksy eller en alkyltiogruppe, sykloalkylgrupper som er substituert eller ikke ved ett eller flere halogenatomer, sykloalkyltiogruupper eller heterosykliske grupper;

R2 er en alkylgruppe substituert med minst en -COOR₃-gruppe, hvori R₃ er et hydrogenatom, eller en alkylgruppe som er substituert eller ikke med ett eller flere halogenatomer, sykloalkylgrupper eller heterosykliske grupper.

R4 og R5 er, identiske eller forskjellige, en usubstituert lineær eller forgrenet alkylgruppe som har fra ett til fire karbonatomer;

for anvendelse i en fremgangsmåte for behandling av en leverforstyrrelse valgt fra gruppen bestående av leverfibrose eller en fettlevversykdom.

2. Forbindelse for anvendelse ifølge krav 1, hvori forbindelsen har Generell Formel (I) i hvilken:

X1 er et halogen, en R1 eller en G1-R1-gruppe;

A er en CH=CH-gruppe;

X2 er en G2-R2-gruppe;

G1 og G2 er, identiske eller forskjellige, et atom av oksygen eller svovel;

R1 er en alkyl eller sykloalkylgruppe med fra ett til sju karbonatomer, spesielt er alkyl eller sykloalkylgruppen substituert eller ikke med ett eller flere halogenatomer;

R2 er en alkylgruppe substituert med en -COOR₃-gruppe, hvori R₃ er et hydrogenatom eller en alkylgruppe som har fra ett til fire karbonatomer.

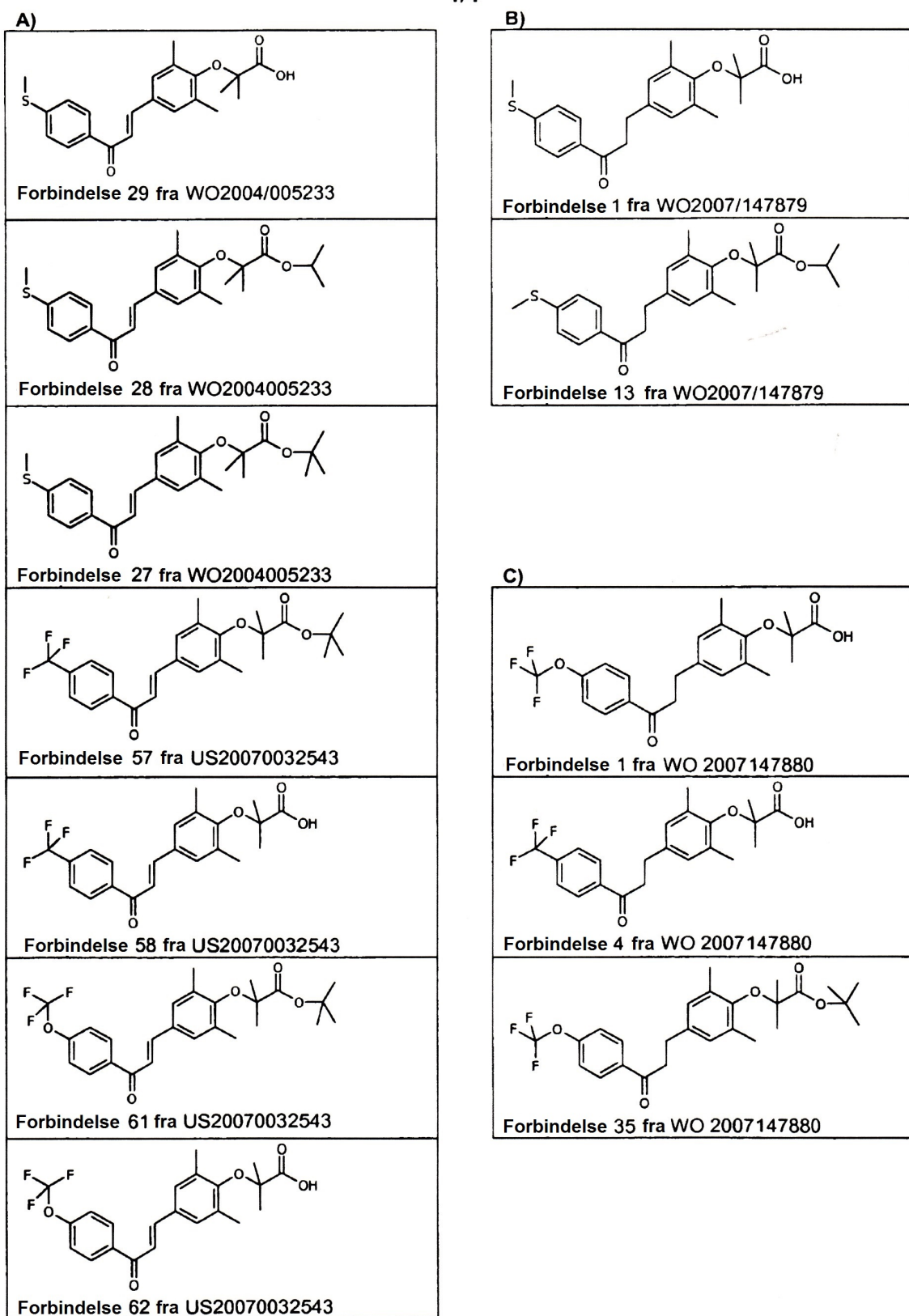
R4 og R5 er en usubstituert alkylgruppe som har fra ett til fire karbonatomer.

3. Forbindelse for anvendelse ifølge krav 1, hvori forbindelsen har Generell Formel (I) i hvilken:
X1 er en R1 eller G1-R1-gruppe;
A er en CH₂-CH₂-gruppe;
X2 er en G2-R2-gruppe;
G1 er et atom av oksygen eller svovel og G2 er et atom av oksygen;
R1 er en alkyl eller sykloalkylgruppe med ett til sju karbonatomer;
R2 er en alkylgruppe substituert ved minst en -COOR₃-gruppe, hvori R₃ er et hydrogenatom eller en alkylgruppe som har fra ett til fire karbonatomer;
R4 og R5 er en usubstituert alkylgruppe som har fra ett til fire karbonatomer.
4. Forbindelse for anvendelse ifølge krav 1, hvori forbindelsen har Generell Formel (I) i hvilken:
X1 er et halogenatom eller en R1 eller G1-R1-gruppe;
A er en CH₂-CH₂-gruppe;
X2 er en G2-R2-gruppe;
G1 er et atom av oksygen eller svovel og G2 er et atom av oksygen;
R1 er en alkyl eller sykloalkylgruppe som er substituert med ett eller flere halogenatomer;
R2 er en alkylgruppe substituert eller ikke med ett eller flere halogenatomer og substituert med minst en -COOR₃-gruppe, hvori R₃ er et hydrogenatom eller en alkylgruppe som har fra ett til fire karbonatomer.
R4 og R5 er en usubstituert alkylgruppe som har fra ett til fire karbonatomer.
5. Forbindelse for anvendelse ifølge hvilket som helst av de foregående kravene, hvori G2 er et oksygenatom og R2 er en alkylgruppe substituert med en -COOR₃-gruppe, hvori R₃ er et hydrogenatom eller en usubstituert lineær eller forgrenet alkylgruppe som har fra ett til fire karbonatomer.
6. Forbindelse for anvendelse ifølge hvilket som helst av de foregående kravene, hvori X1 er en alkyltiogruppe som omfatter en alkylgruppe som er lineær eller forgrenet, som har fra ett til sju karbonatomer som er substituert eller ikke ved ett eller flere halogenatomer.
7. Forbindelse for anvendelse ifølge hvilket som helst av de foregående kravene, hvori nevnte forbindelse er valgt fra gruppen bestående av 1-[4-metyltiofenyl]-3-

[3,5-dimetyl-4-karboksydimetylmetyloksy-fenyl]prop-2-en-1-on, 1-[4-metyltiofenyl]-3-[3,5-dimetyl-4-isopropyloksykarbonyldimetylmetyloksyfenyl]prop-2-en-1-on, 1-[4-metyltiofenyl]-3-[3,5-dimetyl-4-tertbutyloksykarbonyldimetylmetyloksyfenyl]prop-2-en-1-on, 1-[4-trifluormetylfenyl]-3-[3,5-dimetyl-4-tertbutyloksykarbonyldimetylmetyloksyfenyl]prop-2-en-1-on, 1-[4-trifluormetylfenyl]-3-[3,5-dimetyl-4-karboksydimetylmetyloksyfenyl]prop-2-en-1-on, 1-[4-trifluormetyloksyfenyl]-3-[3,5-dimetyl-4-tertbutyloksykarbonyldimetylmetyloksyfenyl]prop-2-en-1-on, 1-[4-trifluormetyloksyfenyl]-3-[3,5-dimetyl-4-karboksydimetylmetyloksyfenyl]prop-2-en-1-on, 2-[2,6-dimetyl-4-[3-[4-(metyltio)fenyl]-3-okso-propyl]fenoksy]-2-metylpropionsyre og 2-[2,6-dimetyl-4-[3-[4-(metyltio)fenyl]-3-okso-propyl]fenoksy]-2-metyl-propionsyre isopropylester.

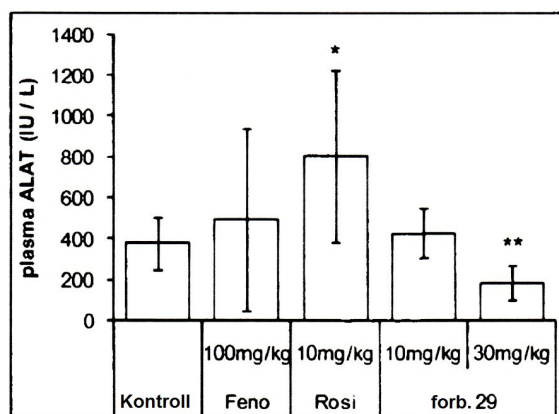
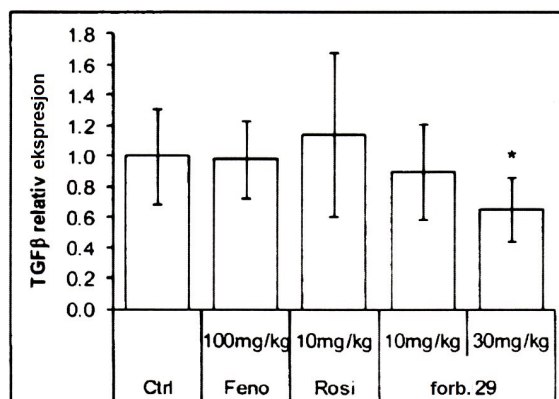
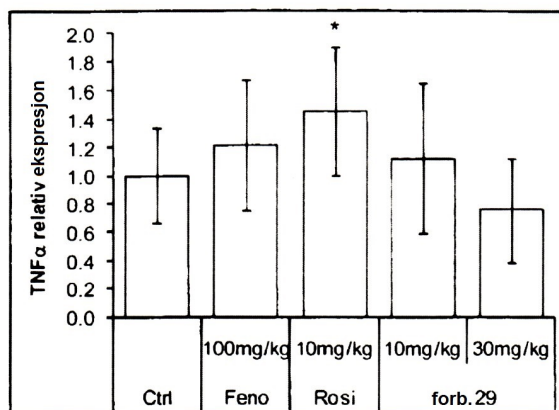
8. Forbindelse for anvendelse ifølge hvilket som helst av de foregående kravene, hvori forbindelsen blir administrert i kombinasjon med metformin, insulin, tiazolidindioner, glitazoner eller statiner.
9. Farmasøytisk preparat omfattende en forbindelse med Generell Formel (I) som definert i hvilket som helst av kravene 1 til 8, for anvendelse i en fremgangsmåte for behandling av leverforstyrrelse valgt fra gruppen bestående av leverfibrose eller en fettlevversykdom.
10. Farmasøytisk preparat ifølge krav 9, hvori nevnte preparat er formulert i form av injiserbare suspensjoner, geler, oljer, piller, suppositorier, pulvere, gelkapsler, kapsler, aerosoler eller ved hjelp av galeniske former eller anordninger som sikrer langvarig eller langsom frigjøring.
11. Forbindelse ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 8 eller farmasøytisk preparat ifølge krav 9 eller 10, for anvendelse i en fremgangsmåte for behandling av en fettlevversykdom valgt fra gruppen bestående av ikke-alkoholisk fettlevversykdom, ikke-alkoholisk steatohepatitt, og en fettlevversykdom assosiert med hepatitt, fedme, insulinresistens eller hypertriglyseridemi.

1/4



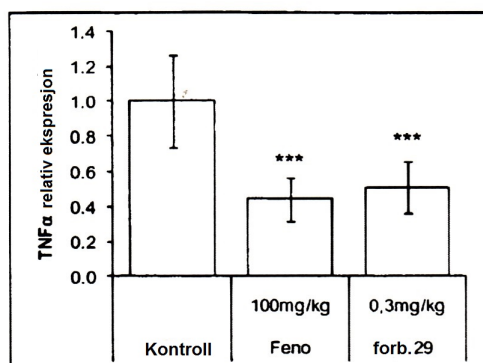
Figur 1

2/4

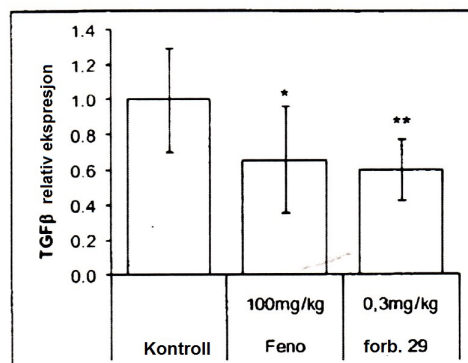


Figur 2

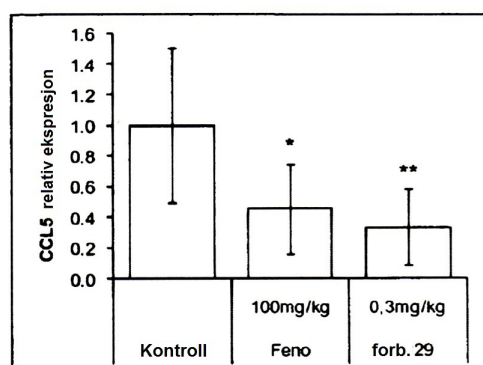
A)



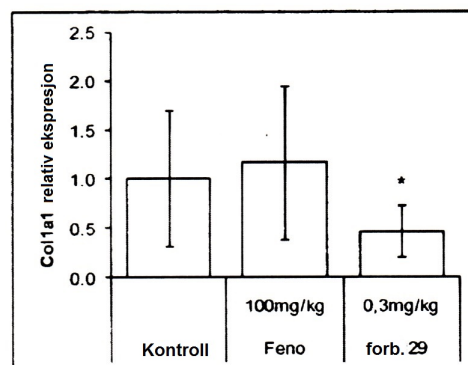
C)



B)



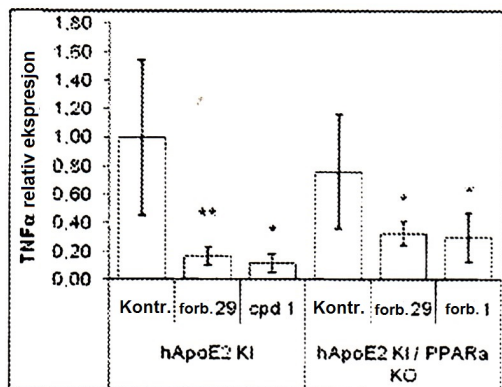
D)



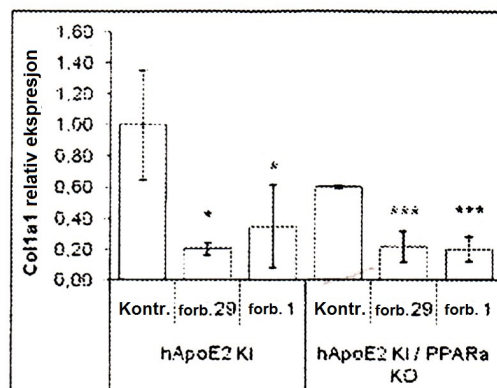
Figur 3

4/4

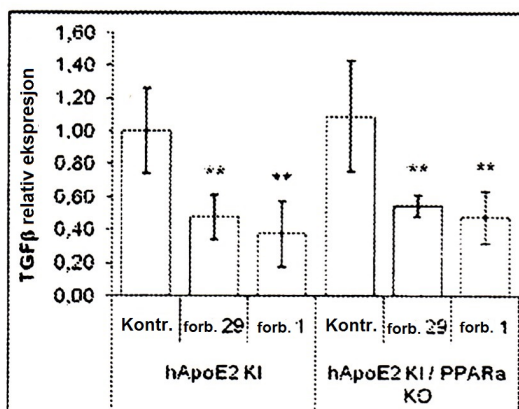
A)



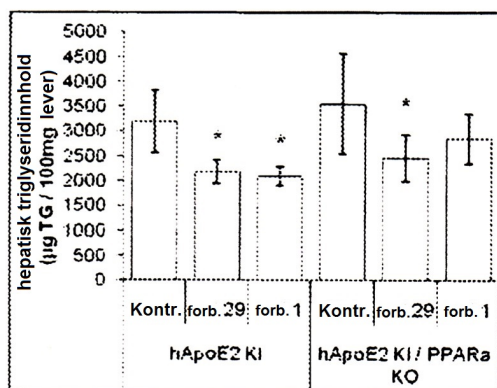
C)



B)



D)



Figur 4