



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101969943 A

(43) 申请公布日 2011. 02. 09

(21) 申请号 200880122554. 1

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2008. 12. 23

*A61K 31/196* (2006. 01)

(30) 优先权数据

*A61K 31/606* (2006. 01)

MI2007A002429 2007. 12. 24 IT

*A61P 1/00* (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 06. 23

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2008/068265 2008. 12. 23

(87) PCT申请的公布数据

W02009/080828 EN 2009. 07. 02

(71) 申请人 朱利亚尼国际有限公司

地址 爱尔兰都柏林

(72) 发明人 塞尔吉奥·巴罗尼

塞尔瓦托·贝林维亚

(74) 专利代理机构 北京市德恒律师事务所

11306

代理人 孙征 陆鑫

权利要求书 6 页 说明书 17 页 附图 8 页

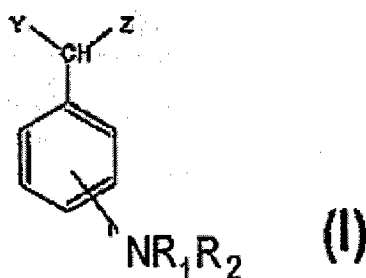
(54) 发明名称

用于选择性治疗乳糜泻中肠免疫性炎症成分的化合物

(57) 摘要

一方面, 本发明涉及氨基-水杨酸-氨基丙酸化合物用于治疗乳糜泻中的炎症成分。这些化合物通过阻断乳糜泻中释放的细胞因子而发挥作用, 且在治疗对饮食不耐受的患者、在饮食紊乱 (dietary error) 以及在减少乳糜泻消退时间方面特别有用。

1. 一种分子式为 ( I ) 的化合物, :



其中, R1 和 R2 彼此相同或不同, 选自包括 -H 或具有 1 至 6 个碳的直链烷基或分支烷基的组, 或者其共同构成含 5 或 6 个原子的芳香环或脂肪族环,

Y 和 Z, 彼此相同或不同, 选自包括 -H、-OH、-COOH、-OR3、-CH(OR3)COOH 的组,

其中, R3 选自 H、酚基、苯基、-CF3、-CF2CF3、乙烯基、烯丙基、具有 1 至 6 个碳的直链烷基或分支烷基,

或其混合物以及药用可受盐或酯, 用于治疗乳糜泻的炎症成分。

2. 根据权利要求 1 所述的化合物, 其中所述具有 1 至 6 个碳的直链烷基或分支烷基选自 -CH3、-CH2CH3、-CH(CH3)2、-CH2CH2CH3、-CnH2n-1, 其中 n 是 1 至 6 的整数。

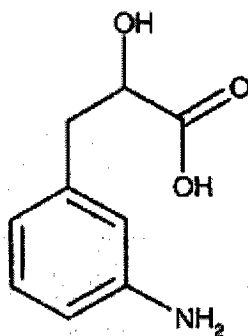
3. 根据权利要求 1 或 2 所述的化合物, 其中 Y 是 H。

4. 根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的化合物, 其中 Z 是 -CH3(OR3)COOH。

5. 根据权利要求 1 至 4 中任一项所述的化合物, 其中 R3 选自 H、-CH3、-CH2CH3。

6. 根据权利要求 1 所述的化合物, 其中所述化合物选自下列组, 包括:

-(±)-3-(3'-氨基苯基)-2-羟基-丙酸, 分子式为

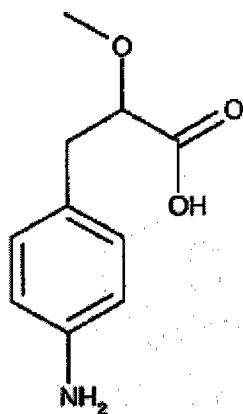


2-(4-氨基苯基)-2-甲氧基乙酸,

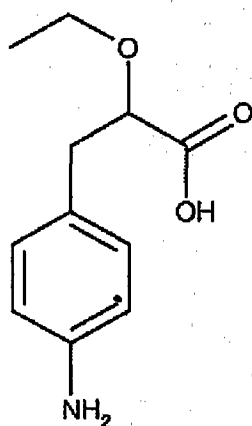
2-(3-氨基苯基)-2-乙氧基乙酸,

2-(4-氨基苯基)-2-乙氧基乙酸,

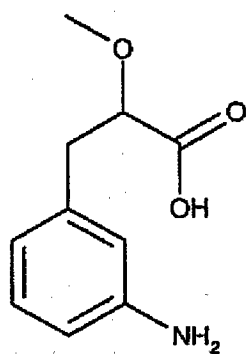
3-(4'-氨基苯基)-2-甲氧基丙酸, 分子式为



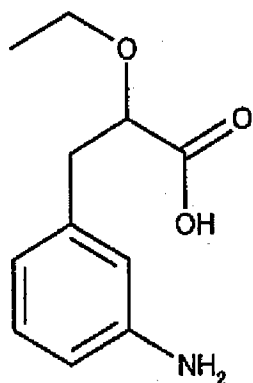
3-(4'-氨基苯基)-2-乙氧基丙酸,分子式为



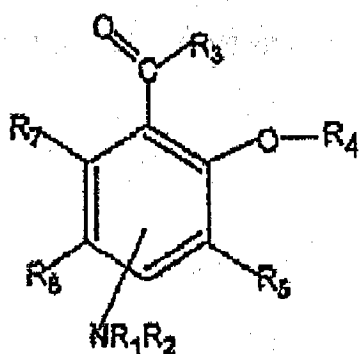
3-(3'-氨基苯基)-2-甲氧基丙酸,分子式为



3-(3'-氨基苯基)-2-乙氧基丙酸,分子式为



7. 一种分子式为 (II) 的化合物：



(II)

其中, R1 和 R2 彼此相同或不同,选自包括 -H、-CO-CH<sub>3</sub>、-C<sub>n</sub>H<sub>2n-1</sub> 其中 n = 1 至 6、具有 1 至 6 个碳的直链烷基或分支烷基的组,或者它们共同构成一个具有 5 或 6 个碳原子的芳香环或脂肪族环;

R3 选自 -H、-CO-CH<sub>3</sub>、-NHOH、-OH、-OR<sub>6</sub>, 其中 R<sub>6</sub> 是具有 1 至 6 个碳的直链烷基或分支烷基;

R4 选自 H、具有 1 至 6 个碳的直链烷基或分支烷基、酚基、苯基、-CF<sub>3</sub>、-CF<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>、乙烯基或烯丙基;

R5、R7、R8 是 H 原子;

或者

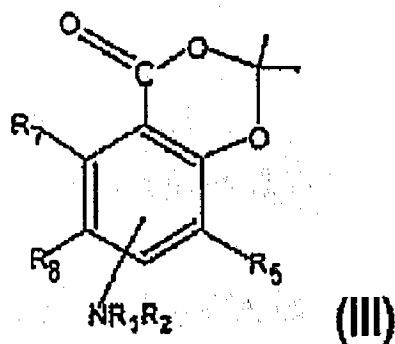
R3 与 R4、R4 与 R5、或 R7 与 R8 共同构成一个环,融合于苯环,含 5 个或 6 个原子的芳香环或脂肪族环包括 1 至 2 个独立地选自 N、O 组成的组的杂原子,

或其混合物以及其药用可受盐或酯,

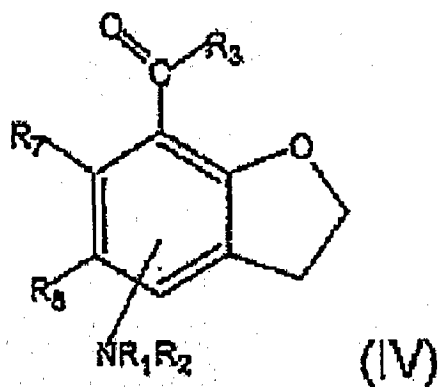
用于治疗乳糜泻的炎症成分。

8. 根据权利要求 7 所述的化合物,其中所述具有 1 至 6 个碳的直链烷基或分支烷基选自 -CH<sub>3</sub>、-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>、异丙基、丙基、-C<sub>n</sub>H<sub>2n-1</sub>。

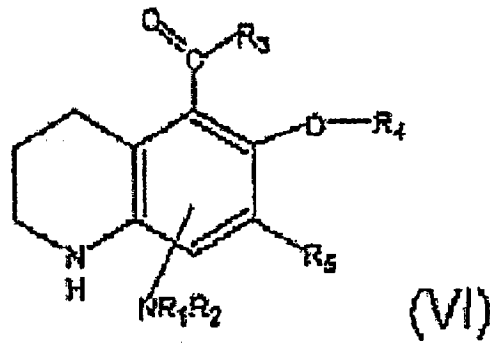
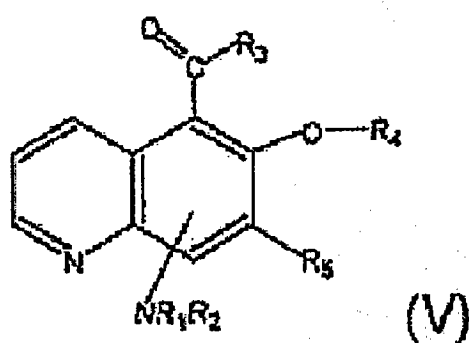
9. 根据权利要求 7 所述的化合物,其中 R3 与 R4 根据如下分子式 (III) 构成一个环:



10. 根据权利要求 7 所述的化合物,其中 R4 与 R5 根据如下分子式 (IV) 构成一个环:



11. 根据权利要求 7 所述的化合物,其中 R7 与 R8 根据如下分子式 (V) 或 (VI) 构成一个环:



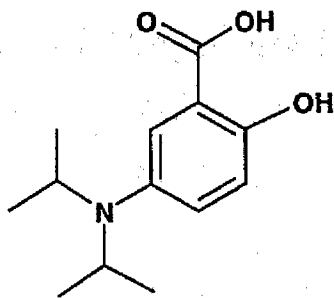
12. 根据权利要求 7 所述的化合物,其中所述化合物选自以下组:

- 4-氨基-N-羟基-2-甲氧基苯甲酰胺
- 5-氨基-N-羟基-2-甲氧基苯甲酰胺
- 5-氨基-2,3-二羟基苯并呋喃-7-羧酸
- 5-氨基-2-乙氧基-N-水杨酰胺
- 6-氨基-2,2-二甲基-4H-苯[1,3]二氧亚乙基噻吩-4-酮
- 1,2,3,4-四氢-6-羟基喹啉-5-羧酸
- 5-氨基-2-异丙氧基苯甲酸
- 6-甲氧喹啉-5-羧酸
- 6-甲氧-1,2,3,4-四氢喹啉-5-羧酸
- 5-二异丙基氨基水杨酸

4- 二异丙基氨基水杨酸。

13. 根据权利要求 7 所述的化合物,其中 R1 和 R2 都是  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 。

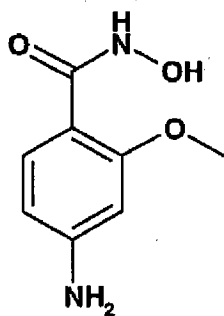
14. 根据权利要求 13 所述的化合物,其中所述化合物包括下列结构



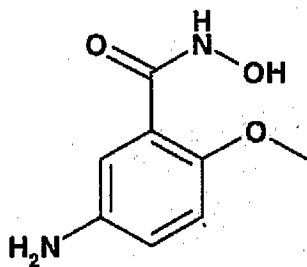
15. 根据权利要求 7 所述的化合物,其中 R1 和 R2 都是  $-\text{H}$ 。

16. 根据权利要求 7 或 15 所述的化合物,其中 R3 是  $-\text{NHOH}$ 。

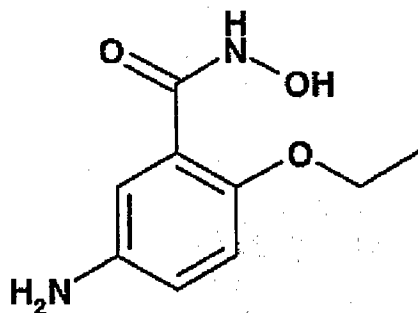
17. 根据权利要求 16 所述的化合物,其中所述化合物包括下列结构



18. 根据权利要求 16 所述的化合物,其中所述化合物包括下列结构

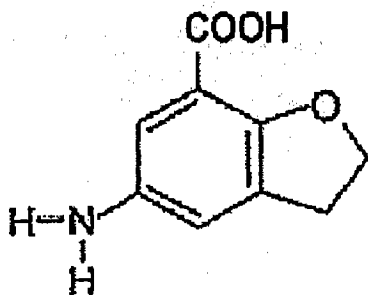


19. 根据权利要求 16 所述的化合物,其中所述化合物包括下列结构

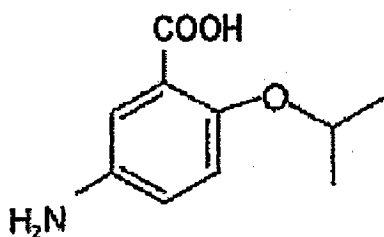


20. 根据权利要求 15 所述的化合物,其中 R3 是  $-\text{OH}$ 。

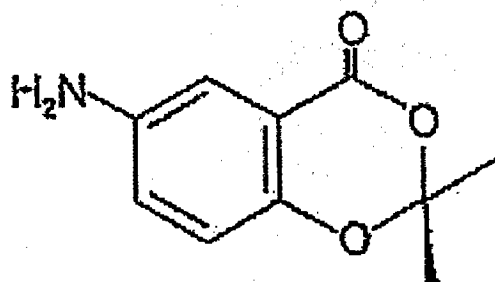
21. 根据权利要求 20 所述的化合物,其中所述化合物包括下列结构



22. 根据权利要求 20 所述的化合物,其中所述化合物包括下列结构



23. 根据权利要求 9 所述的化合物,其中所述化合物包括下列结构



24. 根据权利要求 7 所述的化合物,其中所述化合物是美沙拉秦或 5-氨基水杨酸。

25. 根据权利要求 1-24 中任一项所述的化合物,用于治疗难治性乳糜泻患者的免疫性炎症。

26. 根据权利要求 1-24 中任一项所述的化合物,用于治疗节食的乳糜泻患者由于饮食紊乱引发的免疫性炎症反应。

27. 根据权利要求 1-24 中任一项所述的化合物,用于治疗乳糜泻的免疫性炎症成分,来缩短临床和 / 或组织学消退时间。

28. 根据权利要求 1-24 中任一项所述的化合物,用于选择性阻断乳糜泻中的细胞因子释放。

## 用于选择性治疗乳糜泻中肠免疫性炎症成分的化合物

### 技术领域

[0001] 本发明涉及到用于选择性治疗乳糜泻患者肠免疫性炎症成分的化合物。

[0002] 本发明源自于用于治疗具有炎症成分且局限于小肠第一段粘膜水平的疾病诸如乳糜泻的药物领域。

### 背景技术

[0003] 特别的,本发明涉及一组适于选择性减弱炎症的分子,所述炎症发生于乳糜泻患者的十二指肠和近端空肠水平。

[0004] 乳糜泻,也称为口炎性腹泻,是一种相当常见的与遗传、免疫和环境相关的自身免疫疾病。

[0005] 乳糜泻的基础是由于对麦醇溶蛋白(其是大麦中所包含的一种麸质蛋白成分)或对大麦、黑麦、斯卑尔脱小麦(spelt)、卡姆小麦(kamut)以及其他小杂粮中所含可溶于醇的类似蛋白成分(谷醇溶蛋白)的永久性不耐受。

[0006] 在乳糜泻中,小肠粘膜暴露于所述抗原(麦醇溶蛋白)后发生损伤。该疾病中,小肠粘膜易于变得扁平,隐窝则增生进行补偿,肠上皮细胞呈立方形而非圆柱形,小肠壁中淋巴细胞数目增加。

[0007] 该疾病伴随的症状非常复杂,不限于胃肠区域。实际上,局部水平的典型症状包括腹泻、腹痛(可能出血)、乳糖不耐受,伴随肠外症状,可包括溃疡性口炎、骨痛、进行性体重下降以及衰弱。而且在不可治或难治性乳糜泻患者中,还可能胃肠部淋巴瘤或癌症。

[0008] 而且,由于肠吸收不良,乳糜泻患者常常可表现出离子或铁蛋白的缺乏,同时可能出现维生素A、B12、D、E、K和叶酸的缺乏。由于排便引起的持续脂肪丢失可引起钙缺失,并出现两种可能的并发症,一种是在肾脏水平形成草酸钙结石,另一种是在骨水平形成骨软化症,引起骨质疏松。

[0009] 在一定百分比的个体中,该疾病甚至完全或部分无症状,也就是说,不表现出明显的症状或处于潜伏期,易于在特定事件后爆发。

[0010] 因为触发该疾病的抗原是已知的,因此可能通过简单的避免摄入含麸质的食物而达到相关症状的完全消退。

[0011] 因为该疾病的控制基于对严格饮食的依从性,因此尽管避免摄入人人尽知的包含麸质的食物如糊剂、面包、斯卑尔脱小麦等尚不足够,但避免摄入可能包含少量麸质(例如作为增稠剂或成形剂或者作为加工过程中会丢失的痕量物质)的食物也是必要的。

[0012] 例如,乳糜泻患者必须避免摄入酒吧的卡布奇诺咖啡(其可能污染大麦)、调味剂、糖粉、某些药物制剂,还要注意例如邮票和信封中存在的胶水。

[0013] 任何情况下,通过仅摄入诸如大米、玉米、荞麦、小米、苋属、肉类、鱼肉、蔬菜、水果、乳酪和豆类等的食物,足可 vary 并很好的平衡乳糜泻患者的饮食。

[0014] 根据最近的一些研究,发现存在一个关键的阈值为每餐饭 20ppm 麸质,食物的含量超过这个阈值则对乳糜泻患者有毒。Codex Alimentarius 设想了两种阈值用于将食物标

记为无麸质,第一种设定为 100ppm,涉及的是“去毒”食物,其原材料中还包含有毒的谷类衍生物诸如小麦淀粉,另一个阈值是 20ppm,用于不含源自有毒谷类的成分。

[0015] 严格遵守饮食以及某些基本的行为准则,避免了触发新症状,且通常或多或少的引起已出现症状的消退。然而,即使不出现症状或者甚至血清中已无抗体,也必须终生遵循该饮食。

[0016] 然而,除了饮食之外,目前尚不存在用于乳糜泻患者的治疗形式,特别是不存在可限制当摄取含麸质食物时(即使是偶尔的)所伴随炎症性症状的产品。

[0017] 目前为止已尝试的少数几种治疗性干预未获得显著的效果。

[0018] 因为该疾病与某些编码人白细胞抗原(HLA)DQ2和DQ8的基因严格相关,因此,某些形式的治疗旨在HLA DQ2/DQ8处抑制麸质中的肽键。特别的,已测试了一些阻断HLA-DQ2的化合物,但未获得显著的结果。

[0019] 小带素(zonulin)是一种调节小肠细胞内连接的蛋白,在该疾病的急性期其表达增加,目前文献中已经描述了采用小带素的拮抗剂用于治疗乳糜泻综合征。然而,市场上还没有基于该蛋白的药物。

[0020] 此外,迄今为止,用于局部粘膜的抗炎药物尚未发现除治疗结肠(位于肠远端)水平慢性肠炎之外的应用。因此,市场上用于治疗Crohn病和溃疡性结肠炎的制剂以直肠应用的栓剂或溶液形式出售。相反,当这些制剂用于口服时,则将其配制成有效成分的缓释剂型,使其可完整的通过消化道而仅在结肠水平释放有效成分。

[0021] 因此,这些药物对于乳糜泻中的炎症病症所主要局限的十二指肠部分不具有作用。

[0022] 因此,目前临床需求的物质应具有可抑制乳糜泻中在小肠十二指肠粘膜出现的基于免疫性炎症的症状的药理学活性。

## 发明内容

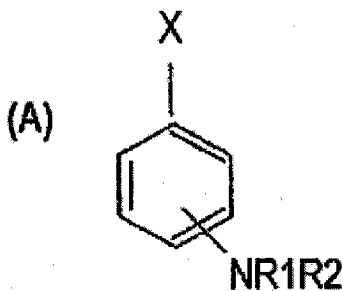
[0023] 本发明的一般目标在于针对具有药理学活性的化合物应用提供新的恰当适应证。

[0024] 因此,本发明的主要目标之一是提供对乳糜泻的局部免疫性炎症成分具有选择性作用的化合物。

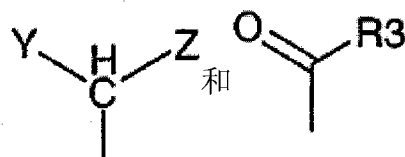
[0025] 考虑到这些目标,根据本发明的一般方面,提供具有以下共有化学结构的化合物

[0026] (A)

[0027]



[0028] 其中, R1 和 R2 在下文中加以定义, X 选自



[0029] 其中 Y、Z 和 R3 在下文进行定义,

[0030] 用于选择性治疗乳糜泻中的免疫性炎症成分。

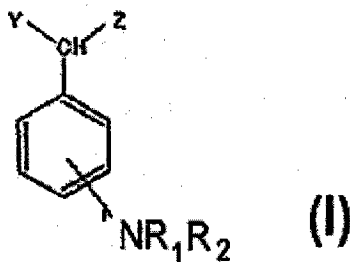
[0031] 一方面, 申请者发现具有分子式 (A) 的化合物以及下文所述具有分子式 (I) 和 (II) 的化合物, 均对例如 PPAR  $\gamma$  受体具有特异亲和性, 是其激动剂可使其激活。特别的, 在患乳糜泻的患者中, 在十二指肠上皮细胞水平检测到了这种受体的存在, 其中通过炎症性细胞因子的生成减少来证实分子式为 (A)、I 和 II 的化合物的抗炎作用。

[0032] 典型的, 分子式为 (I) 和 (II) 的化合物具有分别具有氨基苯甲酸和氨基水杨酸样结构, 通过阻断乳糜泻中释放的细胞因子发挥作用。

[0033] 一方面, 分子式为 (I) 和 (II) 的化合物在治疗对饮食不耐受、在饮食紊乱以及减少乳糜泻消退 (缓解) 时间方面特别有用。

[0034] 根据本发明的一方面, 提供分子式为 (I) 的化合物的用途

[0035]



[0036] 其中, R1 和 R2 彼此相同或不同, 选自包括 -H 或具有 1 至 6 个碳的线性或分支烷基的组, 或者其共同构成一个含 5 或 6 个原子的芳香或脂肪族环,

[0037] Y 和 Z, 彼此相同或不同, 选自包括 -H、-OH、-COOH、-OR3、-CH(OR3)COOH 的组,

[0038] 其中, R3 选自 H、酚基、苯基、-CF<sub>3</sub>、-CF<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>、乙烯基、烯丙基、具有 1 至 6 个碳的线性或分支烷基, 优选 3 或 6 个 C,

[0039] 或其混合物以及药用盐或酯, 用于制备选择性治疗乳糜泻中免疫性炎症成分的药剂。

[0040] 在一个实施方式中, 分子式为 (I) 的化合物中,

[0041] R1 和 R2 彼此相同或不同, 选自包括 -H 或具有 1 至 6 个碳的线性或分支烷基的组, 优选 1 至 3 个 C,

[0042] Y 和 Z, 彼此相同或不同, 选自包括 -H、-OH、-COOH、-OR3、-CH(OR3)COOH 的组,

[0043] 其中, R3 选自 H、具有 1 至 6 个碳的线性或分支烷基, 优选 3 或 6 个 C。

### 具体实施方式

[0044] 在本发明的范围内, 所述具有分子式 (I) 的化合物的实施方式在附属权利要求 2-6 中提供。

[0045] 例如, 实施例 7 中阐述的化合物 H 至 Q, 以及

[0046] (±)-2-羟基-3-(3'-氨基苯)丙酸

[0047] (±)-2-甲氧基-2-(4'-氨基苯)乙酸

[0048] (±)-2-乙氧基-2-(3'-氨基苯)乙酸

[0049] (±)-2-乙氧基-2-(4'-氨基苯)乙酸

[0050] (±)-2-甲氧基-3-(4'-氨基苯)丙酸

[0051] (±)-2-乙氧基-2-(4'-氨基苯)丙酸

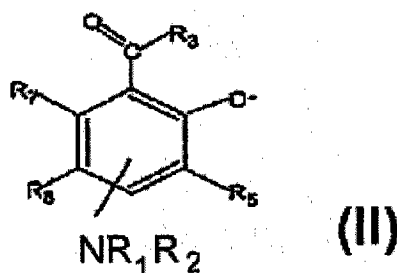
[0052] (±)-2-乙氧基-3-(3'-氨基苯)丙酸

[0053] 均适于本发明所述用途,特别是丙酸衍生物。

[0054] 一方面,在申请 WO 2007/010516 中描述了适于本发明用途的具分子式 (I) 的化合物的其他实例,其全部内容结合于此供参考。

[0055] 根据本发明的另一方面,提供具有分子式 (II) 的化合物的用途

[0056]



[0057] 其中, R1 和 R2 彼此相同或不同,选自包括 -H、-CO-CH<sub>3</sub>、-C<sub>n</sub>H<sub>2n-1</sub> (n 是 1 至 6 的整数,优选 1 至 3)、具有 1 至 6 个碳的线性或分支烷基的组,或者它们共同构成一个具有 5 个或 6 碳原子的芳香环或脂肪族环;

[0058] R3 选自 -H、-CO-CH<sub>3</sub>、-NHOH、-OH、-OR<sub>6</sub>, 其中 R<sub>6</sub> 是具有 1 至 6 个碳的线性或分支烷基;

[0059] R4 选自 H、具有 1 至 6 个碳的线性或分支烷基; R5、R7、R8 是 H 原子;

[0060] 或者

[0061] R3 与 R4、R4 与 R5、或 R7 与 R8 共同构成一个环,融合于苯环,含 5 个或 6 个原子的芳香环或脂肪族环,包括 1 至 2 个杂原子,其独立的选自由 N、O 组成的组,或其混合物以及其药用盐或酯,用于制备治疗乳糜泻中的免疫性炎症成分的药剂。

[0062] 所述具有分子式 (II) 的化合物的实施方式在附属权利要求 8-24 中提供。

[0063] 例如,实施例 5 中阐述的化合物 A 至 G 适于本发明所述的用途。

[0064] 在申请 WO 2007/010514 中描述了适于本发明用途的具分子式 (II) 的化合物的其他实例,其全部内容结合于此供参考。

[0065] 申请者已注意到,具有分子式 I 和 II 的化合物对乳糜泻患者的肠粘膜水平特别是十二指肠第二部分的水平观察到的免疫性炎症成分具有特异活性。

[0066] 申请者还注意到,具分子式 (I) 和 (II) 的化合物所表现出抗炎活性与对细胞因子的抑制活性有关,而细胞因子是在炎性过程和 / 或其转变为慢性的过程中发挥重要作用。

[0067] 特别的,申请者吃惊的发现,具分子式 I 和 II 的化合物仅以实质性方式阻断或以任何情况下的实质性且显著的抑制乳糜泻中的细胞因子,然而,其对患除乳糜泻之外累及特定胃肠道的炎症疾病的患者不具有明显活性。

[0068] 特别的,因为其有利于在损伤部位招募免疫和炎症细胞,因此具分子式 I 和 II 的化合物适于阻断所谓的炎症原 Th1(1 型 T 辅助细胞) 细胞因子。

[0069] 该特异活性可归于一个事实,即乳糜泻中,Th1 型炎症的持续反映了免疫系统的激活,以抵抗不能被清除且系统不能对其形成耐受的抗原(麸质中的麦醇溶蛋白成分)。

[0070] 乳糜泻的免疫发病机制中涉及的典型炎症原-细胞因子(Th1) 包括 IL-1、IL-2、IL-6(白介素 1、2、6)、IFN(干扰素)。此外,与 Th2(2 型 T 辅助细胞) 相关的细胞因子以及来自巨噬细胞的细胞因子诸如 TNF- $\alpha$ (肿瘤坏死因子) 也与乳糜泻有关。特别的,TNF- $\alpha$  在慢性炎症疾病形成的过程中具有重要作用,因为其能够增加炎症原-细胞因子的生成,其中一些细胞因子具有相当的毒性。

[0071] 特别的,已利用有机培养系统验证了具分子式 (I) 和 (II) 的化合物对细胞因子的生成以及从肠粘膜样品(患乳糜泻) 释放的影响。特别的,在培养的肠粘膜活检样品中应用分子式为 (I) 或 (II) 的化合物中的一个或多个,已注意到有效的炎症减少,如通过 IFN- $\gamma$ 、IL-2、TNF- $\alpha$  值的显著降低所表明的。

[0072] 根据本发明的另一方面,如之前所述,提供了具分子式 I 或 II 的化合物及其混合物用于制备治疗难治性乳糜泻患者中炎症的药剂。

[0073] 根据本发明的另一方面,如之前所述,提供了具分子式 I 或 II 的化合物及其混合物用于制备治疗节食患者由饮食紊乱触发的乳糜泻中炎症的药剂。

[0074] 根据本发明的另一方面,提供了具分子式 I 或 II 的化合物及其混合物用于制备治疗乳糜泻中免疫性炎症成分的药剂,典型的,结合一种或多种药用性赋形剂或佐剂,用于缩短临床和/或组织学消退时间。

[0075] 制备本发明一个或多个方面所述药剂时,除了一种或多种药用性赋形剂,还可能采用润滑剂、保湿剂、悬浮剂、分散剂、防腐剂,通常在药用制剂的范围内应用。

[0076] 在一个实施方式中,分子式为 (I) 和/或 (II) 的化合物可以多种方式给予,例如片剂、胶囊、颗粒制剂、分散剂以及药学领域常用的其他剂型。

[0077] 典型的,活性成分 (I) 和 (II) 可包括入适于以有效量给予以实现乳糜泻中抗炎反应的制剂中。

[0078] 例如,活性成分包括入药物组合物中的量可处于 50mg 至 2000mg 之间的范围,优选 200 至 600mg、较优选 250 至 500mg 的范围内。

[0079] 已证实,采用基于分子式为 (I) 和/或 (II) 的化合物中一个或多个的药剂可改善患者和医生的依从性,从而缩短消退时间。

[0080] 另一个实施方式中,分子式为 (I) 和/或 (II) 的化合物进一步用于耐药性和/或难治性乳糜泻的治疗性应用中。

[0081] 给出下列实施例仅为了阐述本发明,而非将保护范围限制为附属权利要求。

[0082] 实施例 1

[0083] 本实施例评估了本发明所优选化合物之一美沙拉秦(Mesalazine) 对乳糜泻中观察到的炎症成分的作用。

[0084] 为此,选择了 16 个处于疾病活性期的患者以及 6 个处于临床消退期、正实行无麸质饮食的患者。

[0085] 通过 EGDS 手术采取每一个研究对象的 5 个活检组织块。

- [0086] 将每一个肠粘膜组织块置于含和不含美沙拉秦 (5ASA) 的恰当培养基中进行培养。
- [0087] 随后,在培养液中观察下列指标:
- [0088] 不同培养基中释放的细胞因子水平
- [0089] 相同细胞因子在恰当匀浆化的活检粘膜中的存在量
- [0090] 材料和方法
- [0091] 方法
- [0092] 本实施例评估了 3 组对象。
- [0093] 第 1(萎缩)组包括 29 个对象,抗肌内膜和抗转谷氨酰胺酶抗体的血清学检测阳性,刚诊断出乳糜泻,含麸质饮食。
- [0094] 第 2(消退)组包括 17 个乳糜泻处于临床消退期的乳糜泻个体,无麸质饮食持续至少 6 个月。
- [0095] 第 3(健康)组包括的对象未患乳糜泻,但患有胃肠道的炎症。
- [0096] 培养液中的细胞因子检测
- [0097] 器官培养:
- [0098] 通过 EGDS 检查,采取所研究患者十二指肠粘膜的 5 块活检组织:1 块用于进行组织学检测,其余 4 块(每一块均分为两部分)分别单独用含麦醇溶蛋白肽的培养基(培养基 C)以及在存在美沙拉秦的情况下用含麦醇溶蛋白的培养基(培养基 +5ASA C)进行培养。
- [0099] 活检组织在盐水中冲洗 2 分钟,至少 3 次,并将活检组织置于培养基中,含 1ml 体积的下列物质:
- [0100] MEDIUM(PRM11860+ 胎牛血清 + 青霉素 / 链霉素)
- [0101] MEDIUM+ 麦醇溶蛋白或 31-43 或其他谷类的胃蛋白酶 - 胰蛋白酶消化产物
- [0102] MEDIUM+ 美沙拉秦 (5-ASA)
- [0103] MEDIUM+ 麦醇溶蛋白或 5-ASA(每毫升培养基 1.5-8.0mg)的胃蛋白酶 - 胰蛋白酶消化产物
- [0104] 将活检组织在含 O<sub>2</sub>(95%)和 CO<sub>2</sub>(5%)的环境中于 37°C 孵育 4h 至 72h。
- [0105] 3 种不同量的培养基均用于进行培养基中所释放 Th1 和 Th2 细胞因子的 ELISA 检测。
- [0106] 匀浆的细胞因子检测
- [0107] 于 37°C 孵育达 4h 至 72h 的时间后:
- [0108] - 将活检组织块在盐水中冲洗 3 次,每次 2 分钟
- [0109] - 将活检组织通过机械或化学分解而匀浆化
- [0110] 离心,收集上清并转移入 1.5ml Eppendorf 管中
- [0111] 通过 Elisa 检测分析粘膜组织中固定的细胞因子。
- [0112] 结果
- [0113] 所得到的数据表明,培养基中的美沙拉秦仅阻断乳糜泻患者中的细胞因子,从而选择性测定取自乳糜泻患者的样品中的炎症成分(表 1)。
- [0114] 表 1:培养基 C/ 培养基 +5ASA. C
- [0115]

组别	细胞因子	参数	N	标准差		标准误		最小值	中位数	最大值	Wilcoxon 号秩检验
				均值							
萎缩	IFN	培养基 C	22	0.198	0.197	0.0420	0.0450	0.119	0.916	p=0.08	
		培养基+5ASA C	22	0.136	0.165	0.0351	0.0300	0.0670	0.790		
		差值	22	0.0601	0.250	0.0533	-0.549	0.0260	0.877		
	IL-2	培养基 C	15	0.175	0.136	0.0351	0.0100	0.161	0.569	p=0.03	
		培养基+5ASA C	15	0.119	0.0978	0.0252	0.0130	0.0910	0.355		
		差值	15	0.0559	0.0557	0.0221	-0.060	0.0490	0.258		
TNF	培养基 C	21	0.477	0.585	0.128	0.0550	0.174	2.077	p=N.S.		
	培养基+5ASA C	21	0.472	0.651	0.142	0.0590	0.204	2.134			
	差值	21	0.0048	0.447	0.0974	-1.398	0.0150	0.972			
消退	IFN	培养基 C	15	0.240	0.154	0.0398	0.0610	0.209	0.534	p=N.S.	
		培养基+5ASA C	15	0.201	0.135	0.0348	0.0390	0.208	0.429		
		差值	15	0.0383	0.123	0.0317	0.262	0.0500	0.209		
	IL-2	培养基 C	12	0.315	0.176	0.0509	0.0420	0.284	0.732	p=N.S.	
		培养基+5ASA C	12	0.309	0.223	0.0644	0.0500	0.253	0.737		
		差值	12	0.0061	0.147	0.0425	0.314	5E-4	0.201		
TNF	培养基 C	15	0.948	0.796	0.206	0.0830	0.578	2.477	p=N.S.		
	培养基+5ASA C	15	0.894	0.889	0.178	0.249	0.571	2.301			
	差值	15	0.0541	0.297	0.0767	0.480	0.0790	0.728			
阳性对照	IFN	培养基 C	7	0.145	0.0843	0.0243	0.102	0.112	0.281	p=N.S.	
		培养基+5ASA C	7	0.149	0.0480	0.0182	0.111	0.140	0.252		
		差值	7	0.004	0.0398	0.0150	0.047	0.029	0.0510		
	IL-2	培养基 C	7	0.532	0.171	0.0659	0.223	0.535	0.730	p=0.07	
		培养基+5ASA C	7	0.356	0.140	0.0530	0.189	0.379	0.529		
		差值	7	0.118	0.169	0.0638	-0.028	0.247	0.351		
TNF	培养基 C	7	0.253	0.129	0.0486	0.105	0.220	0.489	p=N.S.		
	培养基+5ASA C	7	0.259	0.105	0.0397	0.127	0.229	0.434			
	差值	7	0.005	0.201	0.0761	0.260	0.0040	0.362			

[0116] 表 2 :PT C/PT+5ASA C

[0117]

组别	细胞因子	参数	N	标准差		标准误		最小值	中位数	最大值	Wilcoxon 号秩检验
				均值							
萎缩	IFN	PTC C	22	0.211	0.213	0.0454	0.0400	0.126	0.849	p=0.05	
		PT+5ASA C	22	0.145	0.195	0.0416	0.0270	0.0545	0.816		
		差值	22	0.0657	0.178	0.0379	-0.244	0.0505	0.563		
	IL-2	PTC C	15	0.151	0.124	0.0320	0.0100	0.124	0.507	p=0.012	
		PT+5ASA C	15	0.124	0.137	0.0355	0.0070	0.0770	0.440		
		差值	15	0.0270	0.0749	0.0193	-0.217	0.0410	0.0900		
TNF	PTC C	21	0.800	0.788	0.172	0.0550	0.200	2.725	p<0.0001		
	PT+5ASA C	21	0.414	0.584	0.127	0.0700	0.120	2.163			
	差值	21	0.187	0.272	0.0593	-0.052	0.0580	0.986			
消退	IFN	PTC C	15	0.254	0.210	0.0543	0.0560	0.185	0.870	p=0.022	
		PT+5ASA C	15	0.153	0.120	0.0309	0.0370	0.0960	0.387		
		差值	15	0.101	0.210	0.0541	-0.060	0.0210	0.791		
	IL-2	PTC C	12	0.271	0.218	0.0630	0.0360	0.204	0.815	p=N.S.	
		PT+5ASA C	12	0.234	0.126	0.0363	0.0650	0.194	0.473		
		差值	12	0.0365	0.141	0.0425	-0.187	0.0260	0.342		
TNF	PTC C	15	0.996	0.832	0.215	0.216	0.673	2.951	p=0.005		
	PT+5ASA C	15	0.305	0.708	0.183	0.151	0.545	2.294			
	差值	15	0.191	0.221	0.0599	-0.188	0.221	0.657			
阳性对照	control IFN	PTC C	7	0.141	0.0766	0.0289	0.0700	0.124	0.295	p=N.S.	
		PT+5ASA C	7	0.116	0.0628	0.0237	0.0540	0.121	0.210		
		差值	7	0.0247	0.0505	0.0191	-0.030	0.0090	0.105		
	IL-2	PTC C	7	0.501	0.243	0.0920	0.284	0.469	0.996	p=N.S.	
		PT+5ASA C	7	0.521	0.259	0.0979	0.191	0.468	0.951		
		差值	7	-0.020	0.123	0.0465	-0.184	0.0210	0.144		
TNF	PTC C	7	0.313	0.133	0.0504	0.183	0.280	0.511	p=N.S.		
	PT+5ASA C	7	0.291	0.127	0.0479	0.159	0.274	0.470			
	差值	7	0.0226	0.102	0.0385	-0.190	0.0250	0.110			

[0118] 表 3 :培养基 0/ 培养基 +5ASA 0

[0119]

组别	细胞因子	参数	N	标准差		标准误		最小值	中位数	最大值	Wilcoxon符号秩检验
				均值							
萎缩	IFN	培养基	0	0	0.277	0.0561	0.0187	0.212	0.274	0.361	p = 0.003
		培养基+5ASA	9	0.202	0.0585	0.0195	0.125	0.193	0.311		
		差值	9	0.0951	0.0594	0.0198	0.0270	0.0560	0.227		
	IL-2	培养基	0	0							
		培养基+5ASA	0								
		差值	0								
	TNF	培养基	0	11	0.138	0.0546	0.0165	0.0710	0.115	0.233	p = N.S.
		培养基+5ASA	11	0.123	0.0395	0.0119	0.0660	0.106	0.174		
		差值	11	0.0154	0.0297	0.0089	-0.035	0.0100	0.0840		
消退	IFN	培养基	0	4	0.252	0.0748	0.0374	0.183	0.251	0.324	p = N.S.
		培养基+5ASA	4	0.133	0.0577	0.0289	0.0490	0.151	0.174		
		差值	4	0.120	0.0505	0.0252	0.0440	0.142	0.150		
	IL-2	培养基	0	0							
		培养基+5ASA	0								
		差值	0								
	TNF	培养基	0	5	0.122	0.0331	0.0118	0.0800	0.133	0.159	p = N.S.
		培养基+5ASA	5	0.122	0.0280	0.0103	0.0960	0.114	0.154		
		差值	5	-0.00	0.0371	0.0169	-0.057	0.0050	0.0370		
阳性对照	control IFN	培养基	0	0							
		培养基+5ASA	0								
		差值	0								
	IL-2	培养基	0	0							
		培养基+5ASA	0								
		差值	0								
	TNF	培养基	0	0							
		培养基+5ASA	0								
		差值	0								

[0120] 表 4 :PT 0/PT+5ASA 0

[0121]

组别	细胞因子	参数	N	均值	标准差	标准误	最小值	中位数	最大值	Wilcoxon 号秩检验
萎缩	IFN	PT 0	9	0.223	0.0496	0.0165	0.151	0.223	0.287	p = 0.019
		PT+5ASA 0	9	0.179	0.0589	0.0196	0.100	0.193	0.243	
		差值	9	0.0437	0.0409	0.0136	-0.009	0.0380	0.0980	
	IL-2	PT 0	0							
		PT+5ASA 0	0							
		差值	0							
TNF	PT 0	11	0.156	0.0627	0.0189	0.0680	0.134	0.254	p = 0.002	
	PT+5ASA 0	11	0.101	0.0463	0.0140	0	0.0980	0.160		
	差值	11	0.0554	0.0735	0.0222	-0.004	0.0270	0.254		
消退	IFN	PT 0	4	0.200	0.0931	0.0466	0.120	0.172	0.334	p = N.S.
		PT+5ASA 0	4	0.177	0.0692	0.0346	0.120	0.161	0.264	
		差值	4	0.0230	0.0411	0.206	-0.021	0.0215	0.0700	
	IL-2	PT 0	0							
		PT+5ASA 0	0							
		差值	0							
TNF	PT 0	5	0.126	0.0276	0.0123	0.0840	0.127	0.158	p = N.S.	
	PT+5ASA 0	5	0.107	0.0310	0.0139	0.0630	0.110	0.148		
	差值	5	0.0184	0.0089	0.0040	0.0100	0.0210	0.0310		
阳性 对照	IFN	PT 0	0							
		PT+5ASA 0	0							
		差值	0							
	IL-2	PT 0	0							
		PT+5ASA 0	0							
		差值	0							
TNF	PT 0	0								
	PT+5ASA 0	0								
	差值	0								

[0122] 达到炎症成分减少后,可在全部慢性或难以消除临床症状的病例中仅采用美沙拉秦或作为支持治疗。

[0123] 实施例 2

[0124] 细胞因子的基因表达

[0125] 在 5-ASA 药物缺乏或存在的情况下,将胃镜检查过程中采取的十二指肠活检组织块置于 37℃ 培养 48h。培养后,将组织块在由酚和胍构成的单相溶液 (Isol-RNA 裂解试剂) 中进行匀浆化。

[0126] 匀浆器 IKA T10-Ultra Yurrax 已用于匀浆化。

[0127] 通过离心从溶液中分离所有的不溶性物质,并将上清转移至干净试管中,而试管中已加入了 200 μl 氯仿/ml 裂解物。

[0128] 短暂的机械振动后,将样品于室温留置几分钟,然后以 12000rpm 于 4℃ 离心 15 分钟。将包括 RNA 的无机相转移至干净试管中。

[0129] 通过每 ml 裂解物加入 500  $\mu$  l 异丙醇来沉淀 RNA。将样品于室温孵育 10 分钟,随后以 12000rpm 于 4°C 离心 15 分钟。

[0130] 去除上清后,将 RNA 沉淀用 1000  $\mu$  l 75% 乙醇 /ml 裂解物进行洗涤,机械振动,以 7500rpm 于 4°C 离心 5 分钟。最后,去除乙醇,将 RNA 沉淀在化学通风橱下风干。

[0131] 将 RNA 重悬于恰当量无 RNase 水中。

[0132] 通过在分光光度计中检测 260nm 的吸光度来测定 RNA 浓度,还评价了不同 RNA 模板的 A260/A280 比值。

[0133] RT-PCR

[0134] cDNA 从不同量的已提取 RNA (稀释于恰当体积的无 RNase 水) 合成,所涉及基因 (细胞因子) 的 cDNA 通过 PCR 利用特异性引物而扩增。

[0135] Masterscript-RT-PCR System(5PRIME) 用于实施 RT-PCR。

[0136] 为了验证活检样品中 mRNA 的存在及其含量,在 1×TBE 中进行 1% 琼脂糖凝胶电泳。

[0137] 将得到的结果示于图 1 的示意图中。

[0138] 实施例 3

[0139] PPAR  $\gamma$  受体在乳糜泻患者十二指肠上皮细胞中的存在

[0140] 过氧化物酶体增殖子-激活的受体  $\gamma$  术语核受体超家族,该超家族包括用于雌激素、糖皮质激素、甲状腺激素、维生素 D3 和视黄酸的受体,以及能够结合不同脂质代谢产物的受体,例如 PPAR 和 LXR 受体。

[0141] 特别的,PPAR 家族包括 3 个亚型 (PPAR  $\alpha$ 、 $\beta$  或  $\delta$  以及  $\gamma$ ),具有不同的组织分布以及不同的配体特异性。

[0142] PPAR  $\gamma$  和  $\alpha$  在已分化的人类巨噬细胞内表达,调节与炎性反应有关的基因并调节巨噬细胞分化。

[0143] 不同 PPAR  $\gamma$  激动剂抑制人单核细胞中的炎性细胞因子的生成,并降低已激活巨噬细胞中基因 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1b、iNOS、胶状 B、清道夫受体 A 和 COX-2 的表达,证实了 PPAR  $\gamma$  的抗炎作用。

[0144] 本发明主要目标之一是检测乳糜泻患者十二指肠上皮细胞中这种受体的存在情况,其中通过炎性细胞因子生成减少来揭示具分子式 (A)、I、II 的化合物特别是 5-ASA 的抗炎作用,之前已有证实。

[0145] 免疫荧光

[0146] 通过 EGDS 手术,从实行不含麸质饮食的乳糜泻患者和未患乳糜泻 (对照组) 的对象采取十二指肠活检组织块。冲洗活检组织块,在 OCT 中定向并储存于 -80°C。从每一个冰冻活检块 (EGDS 手术中从乳糜泻患者以及未患该病的对象采取) 获得一些 5  $\mu$  m 的切片,这些切片暴露于 PPAR  $\gamma$  第一抗体过夜 (在恰当固定以及消除特异性 (specificity elimination) 处理后)。

[0147] 在 PBS 中洗涤后,将样品与带荧光素的二抗 ALEXA 488 一起孵育约 1 小时。如果存在第一抗体与 PPAR  $\gamma$  受体的结合,则形成第一 / 第二看抗体复合物,显示为可通过显微镜观察的切片上的荧光。

[0148] PPAR  $\gamma$  受体的存在可通过荧光显微镜显示,从图 2 和 3 明显可见 (照片诊断)。

[0149] 特别的,在图 2 和 3 的图像中,受体的存在通过切片边缘部分中可检测的荧光信号而显示。荧光证实朝向肠腔表面上的肠上皮细胞水平存在 PPAR  $\gamma$ 。

[0150] 未患乳糜泻患者的活检组织用做阴性对照:结果为信号缺失,因此通过显微镜分析的切片上缺乏受体。特别的,图 4 和 5(对照)表明未检测到荧光:这是健康对照组的相同肠部位水平缺乏受体的表现。

[0151] 本文以下详述的化合物以相同的方式进行检测,得到了类似的结果:

[0152] 实施例 4

[0153] 监测疾病急性期中所释放促炎性细胞因子 IL-2、TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  的基因表达(mRNA)。

[0154] 特别的,图 6 至 8 中例举的图引用了不同条带推断出的光密度值(IMAGE J),条带通过用 1x 琼脂糖凝胶电泳而获得,与研究对象的细胞因子扩增产物相关。

[0155] 通过用乳糜泻患者十二指肠活检组织提取的 RNA 进行 RT-PCR,来评估所述细胞因子的基因表达。这些活检组织在 37°C 维持 48h,培养基分别为含麦醇溶蛋白的胰蛋白酶消化产物的培养基(PT)以及加入 5-ASA 药物的 PT 培养基。

[0156] 结果

[0157] 3 个图表明,药物存在时培养的活检组织块中,疾病急性期释放的促炎性细胞因子 IL-2、TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  的基因表达(mRNA)得到显著降低。

[0158] 患者接受较为持久而恒定的药物治疗时,基因表达的降低有所增强。

[0159] 实施例 5

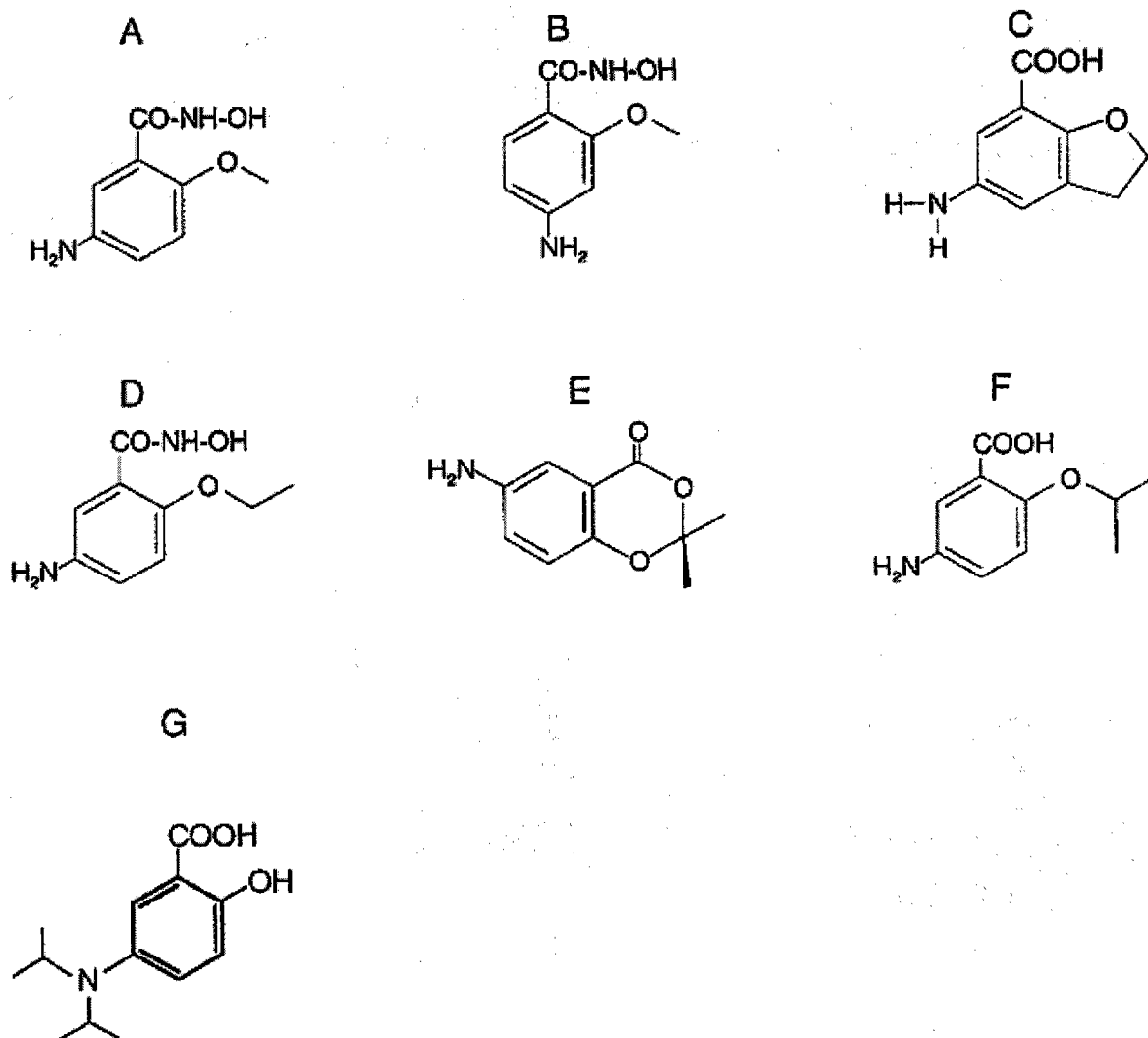
[0160] 关于本发明所述化合物对 PPAR  $\gamma$  激活/表达以及细胞增殖和凋亡调节的作用。

[0161] 材料和方法

[0162] 化合物 A-G

[0163] 5-ASA 购自 Sigma-Aldrich TM(St Quentin Fallavier, France)。罗西格列酮则获自 Spi BioTM(Massy, France)。检测了下列化合物 A 至 G,均属于分子式(II):

[0164]



[0165] 细胞系

[0166] 结肠癌细胞系HT-29STD(ATCC HTB-38)在补充了10%热灭活FCS和抗生素的DMEM中常规培养。细胞单层生长,在5%CO<sub>2</sub>和95%的相对湿度中于37℃孵育。

[0167] 用PPAR $\gamma$ 瞬时转染并刺激细胞

[0168] 利用Effectene™转染试剂(Qiagen™)按照生产商的说明书瞬时转染HT-29STD细胞。为了检测PPAR $\gamma$ 的激活,我们用500ng含2拷贝PPRE的小启动子构建体实施转染,其中PPRE获自细胞色素p450A(2×CYP)。我们还转染了renilla荧光素酶质粒(0.1 $\mu$ g/孔)作为内对照,用于监测转染效率以及用于标准化萤火虫荧光素酶活性。将已转染的细胞于37℃孵育48h。细胞孵育3-6-9-12-15-18-24小时后,用化合物A-G以30nM的浓度实施刺激,并与用做阳性对照的2种合成的PPAR $\gamma$ 配体5-ASA(30mM)和10-5M罗西格列酮进行比较。用NaOH将药物溶液的pH调为7.4。利用PLB裂解液(Promega™, Madison, Wis)制备细胞总提取物。利用Promega™双荧光素酶检测系统按照生产商的流程测定20 $\mu$ l提取物中的荧光素酶活性。在至少3次独立实验中,转染均重复实施3次。荧光素酶活性表示为用所述不同分子处理的细胞所获得的活性除以未刺激细胞的荧光素酶活性得到的倍数。

[0169] 利用Western印迹分析评估PPAR $\gamma$ 和 $\beta$ -actin

[0170] 通过在提取缓冲液中进行细胞匀浆化而得到总蛋白,该缓冲液由含 2% Triton TM、100mM 苯甲基磺酰氟化物 (PMSF) 和经典蛋白酶抑制剂混合物的 PBS 组成,随后通过聚丙烯酰胺凝胶电泳分离总蛋白并进行电转膜。聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜与抗 PPAR  $\gamma$  的兔多克隆第一抗体 (1/500 稀释,TEBU,Le Perray an Yveline,France) 一起孵育过夜。B-actin 利用兔单克隆第一抗体 (1/10,000 稀释,Sigma) 进行检测。按照生产商的流程 (ECL<sup>TM</sup>,Amersham Pharmacia Biotech<sup>TM</sup>,Orsay,France),用耦合物过氧化氢酶的抗体 (1/1000,Dako<sup>TM</sup>,Trappes,France) 进行免疫检测以及化学发光。每一个条件下的 PPAR  $\gamma$  光密度值均以与相同样品的内对照  $\beta$ -actin 量的比例而给出。

[0171] 通过 Ki-67 免疫染色分析细胞增殖

[0172] 培养 24h 后,用 30mM 的化合物 A、B、C、D 和 F 在 24h 期间处理 HT-29STD 细胞。5-ASA (30mM) 和罗西格列酮 (10<sup>-5</sup>M) 用作阳性对照。由于其可溶性较差,因此分子 G 未包括在本实验中。用 NaOH 将药物溶液的 pH 调为 7.4。将细胞在 4% PFA 中固定,在含 0.1% Triton X-100<sup>TM</sup> 的 PBS 中于 4 $^{\circ}$ C 进行透化处理,随后与用正常羊血清和封闭缓冲液 (1% BSA/PBS) 进行孵育以将抗体的非特异性吸附降到最低。

[0173] 利用抗 Ki-67 的小鼠单克隆第一抗体 (1 : 50 稀释过夜;ZYMED<sup>TM</sup>,Clinisciences<sup>TM</sup>,Montrouge,France) 通过核 Ki-67 染色来评估细胞增殖。第一抗体用耦合物于吖啶红荧光染料的 Alexa594 驴抗小鼠 IgG (1 : 100 稀释,Molecular Probes<sup>TM</sup>,Invitrogen<sup>TM</sup>,Cergy Pontoise,France) 进行显色。核用 Hoescht 33342 溶液 (0.125mg/mL) (Sigma-Aldrich<sup>TM</sup>) 进行染色并在荧光显微镜 (Leica<sup>TM</sup>,Bensheim,Germany) 下观察。阴性对照用非特异性小鼠血清而非特异性抗体进行染色。一次实验中,每个样品均系统的随机计数至少 500 个细胞。结果表示为着色细胞数量的均值  $\pm$  SEM。

[0174] 凋亡的检测

[0175] 孵育 24h 后,用浓度为 30mM 的化合物 A、B、C、D、F 在 24h 期间处理 HT-29STD 细胞。5-ASA (30mM) 和罗西格列酮 (10<sup>-5</sup>M) 用作阳性对照。由于其可溶性较差,因此分子 E 和 G 未包括在本实验中。用 NaOH 将药物溶液的 pH 调为 7.4。发生凋亡的细胞通过利用末端转移酶 dUTP 缺口末端标记分析 (TUNEL assay,Roche Diagnostics<sup>TM</sup>,Meylan,France) 进行 DNA 条带的酶标记而加以鉴定。一次实验中,每个样品均系统的随机 (blindly) 计数至少 500 个细胞。结果表示为着色细胞数量的均值  $\pm$  SEM。

[0176] 结果

[0177] 可观察到分子 C 和 F 诱导 PPAR  $\gamma$  的激活。化合物 D 也诱导 PPAR  $\gamma$ ,但程度较弱。PPAR  $\gamma$  的激活引起级联反应,导致与称为过氧化物酶增殖子反应元件 (PPRE) 的特异性 DNA 序列元件结合。

[0178] 我们通过用 renilla 荧光素酶 PPRE 质粒瞬时转染上皮细胞而研究了 PPAR  $\gamma$  转录活性。在 24 小时期间,用不同的分子刺激细胞。分析已转染 HT-29 细胞中的 PPAR  $\gamma$  活性表明,浓度为 30mM 的化合物 C 和 F 将报告子基因的活性增加 2 倍,从而表现出与 5-ASA 和罗西格列酮类似的活性。浓度为 30mM 的化合物 A、B 和 G 对上皮细胞发挥迅速的细胞毒效应,因此限制了研究 6 小时后浓度为 PPAR  $\gamma$  的激活情况。

[0179] 特别的,分子 C、D 和 F 诱导 PPAR  $\gamma$  表达。一般来说,所有化合物 A-G 均表现出在 HT-29 细胞系的蛋白水平诱导 PPAR  $\gamma$  表达的能力。特别的,通过 Western 印迹进行定量,

可观察到在 24 小时期间用分子 C、D 和 F 处理的细胞内出现平均 2 倍的 PPAR  $\gamma$  蛋白水平诱导。

[0180] 特别的,分子 C 和 F 抑制上皮细胞增殖。我们在 HT-29STD 细胞系内评估了所述分子在调节细胞增殖方面的作用。细胞增殖通过增殖细胞中的核蛋白 Ki-67 染色而进行评估,Ki-67 的存在对于保持细胞增殖是必要的。与未处理细胞相比,用分子 C 和 F (30mM) 孵育 HT-29 细胞 24h 导致细胞增殖抑制达 67-75%。

[0181] 以其最佳浓度应用的两种阳性对照罗西格列酮 (10-5M) 和 5-ASA (30mM) 可获得类似结果。由于该浓度时其迅速的细胞毒效应,限制了对分子 A、B 和 D 可能的抗有丝分裂效应的证实。

[0182] 化合物 F 也通过 PPAR  $\gamma$  诱导上皮细胞凋亡。与罗西格列酮和 5-ASA 类似,分子 F 在 80% 的上皮细胞中表现出凋亡,其通过利用末端转移酶 dUTP 缺口末端标记 (TUNEL) 来标记 DNA 条带断裂而鉴定。与之前实验类似的是,30mM 的分子 A、B 和 D 诱发迅速的细胞毒效应,阻碍了细胞凋亡的分析。

[0183] 结论

[0184] 本实施例明确证实了化合物 C 和 F 刺激 PPAR  $\gamma$  表达和激活以及调节上皮细胞增殖和凋亡的能力。此外,30mM 的化合物 A、B、D (以及 E 至 G) 对上皮细胞的细胞毒效应可能与其高反应性的氧脞酸基团结构有关,已知该基团可对多种不同的酶表现出高亲和性。

[0185] 实施例 6

[0186] 分子模拟

[0187] 利用在 Silicon Graphics™ 工作站上运行 6.9.1 版 SYBYL 软件 (Tripos Associates Inc™, St Louis, MO) 而实施分子模拟研究。从标准片段文库构建两性离子形式 5-ASA 的三维模型,随后利用 Tripos force field 优化其几何形状。由于还不知道化合物的 pKa,因此我们利用 SPARC 在线计算器确定生理 pH (7.4) 下存在的种类。从标准片段文库构建离子化化合物的三维模型,随后利用 Tripos force field 优化其几何形状,包括从 Gasteiger 和 Hückel 原子电荷计算的静电项。我们采用 Maximin2 程序中现存的 Powell 法进行能量最低化,直至梯度值小于 0.001 kcal/mol.Å。利用 RCSB 蛋白数据库 (1171) (4,5) 中现存的 tesaglitazar (AZ242) 从其 X-Ray 络合晶体结构中得到人 PPAR  $\gamma$  配体结合结构域的结构。利用 GOLD 软件将所述化合物柔性对接入受体活性位点。根据由 GoldScore 和 X-Score 评分函数预测的评分最高的构象来选择最稳定的对接模型。采用 Maximin2 程序中现存的 Powell 法通过 Tripos force field 和介电常数 4.0 进行络合物的能量最低化,直至梯度值达到 0.01 kcal/mol.Å,并采用退火函数确定配热区 (10 Å)。

[0188] 对接研究

[0189] 化合物 A 至 G 与 PPAR  $\gamma$ -LBD 紧密拟合,通过与 His-323、His-449、Tyr-473 和 Ser-289 形成氢键而相互作用,前述位点被认为是分子识别和 PPAR  $\gamma$  激活所必需的关键决定基。

[0190] 已证实,属于分子式 (II) 的化合物的抗炎效应通过主要由上皮细胞表达的 PPAR  $\gamma$  而介导。对接分析揭示,已提到的化合物以 30mM 的浓度应用时,激活 PPAR  $\gamma$ ,诱导肠上皮细胞表达 PPAR  $\gamma$ ,并对乳糜泻中的免疫学炎症成分发挥药理学作用。

[0191] 结论

[0192] 之前已证实,包含氨基水杨酸结构(5-ASA 结构样)、分子式为 II 的化合物的抗炎效应通过 PPAR  $\gamma$  介导,PPAR  $\gamma$  在十二指肠水平的上皮细胞内表达。基于对接分析而合理的形成化合物 A 至 G,表明所述化合物特别是 C、F,以 30mM 的浓度应用时,激活 PPAR  $\gamma$ ,诱导肠上皮细胞表达 PPAR  $\gamma$ 。该化合物还抑制上皮细胞增殖并诱导凋亡,这是两种归于 PPAR  $\gamma$  激活的重要机制。特别的,涉及到 A、B、D、G 时,已检测到浓度为 30mM 时其对上皮细胞具有直接的细胞毒效应,阻碍了对 PPAR  $\gamma$  激活以及细胞增殖和凋亡的调节和评估进行分析。

[0193] 实施例 7

[0194] 具分子式 (I) 的化合物 H-Q 对 PPAR  $\gamma$  激活的作用

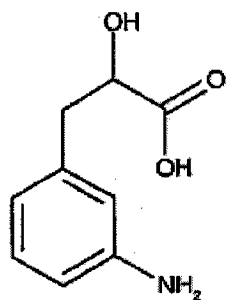
[0195] 材料和方法

[0196] 材料

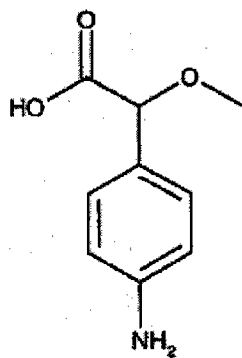
[0197] 5-ASA 购自 Sigma-Aldrich TM(St Quentin Fallavier, France)。罗西格列酮则获自 Spi BioTM(Massy, France)。检测了下列化合物 H 至 Q,均属于分子式 (I) :

[0198]

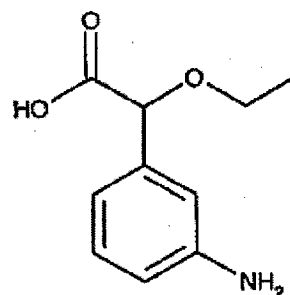
H



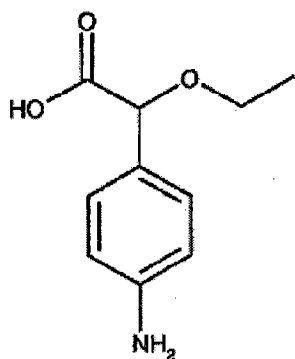
I



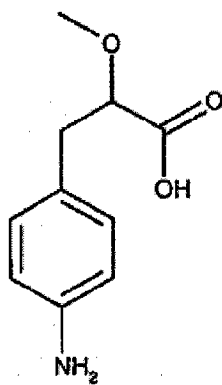
L



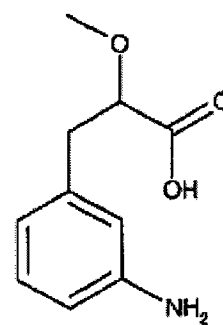
M



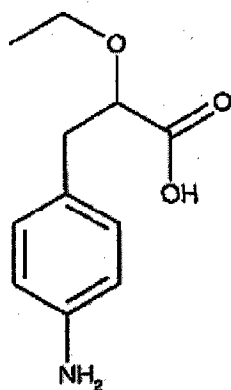
N



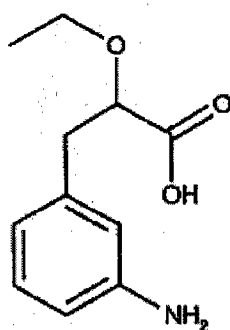
O



P



Q



[0199] 细胞系

[0200] 结肠癌细胞系 HT-29STD (ATCC HTB-38) 在补充了 10% 热灭活 FCS 和抗生素的 DMEM 中常规培养。细胞单层生长, 在 5% CO<sub>2</sub> 和 95% 的相对湿度中于 37°C 孵育。

[0201] 用 PPAR  $\gamma$  瞬时转染并刺激细胞

[0202] 利用 Effectene<sup>TM</sup> 转染试剂 (Qiagen<sup>TM</sup>) 按照生产商的说明书瞬时转染 HT-29STD 细胞。为了检测 PPAR  $\gamma$  的激活, 我们用 500ng 含 2 拷贝 PPRE 的小启动子构建体实施转染, 其中 PPRE 获自细胞色素 p4504A (2  $\times$  CYP)。我们还转染了 renilla 荧光素酶质粒

(0.1  $\mu$ g/孔) 作为内对照,用于监测转染效率以及用于标准化萤火虫荧光素酶活性。将已转染的细胞于 37°C 孵育 48h。细胞孵育 18 小时期间,用化合物 H-Q 以 1mM 的浓度实施刺激,并与用做阳性对照的 2 种合成的 PPAR  $\gamma$  配体 5-ASA (30mM) 和 10<sup>-5</sup>M 罗西格列酮进行比较。用 NaOH 将药物溶液的 pH 调为 7.4。利用 Passive 裂解液 (Promega™, Madison, Wis) 制备细胞总提取物。利用 Promega™ 双荧光素酶检测系统按照生产商的流程测定 20  $\mu$ l 提取物中的荧光素酶活性。在至少 3 次独立实验中,转染均重复实施 3 次。荧光素酶活性表示为用所述不同分子处理的细胞所获得的活性除以未刺激细胞的荧光素酶活性得到的倍数。

[0203] 结果

[0204] PPAR  $\gamma$  的激活引起级联反应,导致与称为过氧化物酶增殖子反应元件 (PPRE) 的特异性 DNA 序列元件结合。

[0205] 我们通过用 renilla 荧光素酶和 PPRE 质粒瞬时转染上皮细胞而研究了 PPAR  $\gamma$  转录活性。为了评估化合物 H-Q 是否具有与 5-ASA 一样或甚至高于 5-ASA 的刺激 PPAR  $\gamma$  激活的效力,我们以 1mM 的浓度检测了这些分子。将这些新分子 (浓度为 1mM) 的作用与用做阳性对照的 5-ASA 和罗西格列酮 (最佳浓度分别为 30mM 和 10<sup>-5</sup>M) 进行比较。在 24 小时期间,采用不同分子刺激细胞。

[0206] 分析已转染 HT-29 细胞中的 PPAR  $\gamma$  活性,表明所述化合物 (1mM) 分别将报告子基因活性增加  $4.8 \pm 0.71$ ;  $2.73 \pm 0.31$ ;  $2.64 \pm 0.46$ ;  $3.4 \pm 0.97$  倍,从而表现出与 30mM 的 5-ASA ( $2.8 \pm 0.7$ ) 和 10<sup>-5</sup>M 的罗西格列酮 ( $3.17 \pm 0.29$ ) 类似或更高的活性。

[0207] 目前已有证据表明,分子 H-Q (属于本发明所述分子式为 (I) 的化合物) 能增加已转染 HT-29 细胞中的 PPAR  $\gamma$  活性,表现出与 30mM 的 5-ASA 和 10<sup>-5</sup>M 的罗西格列酮类似或甚至更高的活性。

[0208] 2007 年 12 月 24 日提交的意大利专利申请 no. MI12007A2429,包括说明书、权利要求和附图 (本申请要求其优先性),全部结合于此供参考。

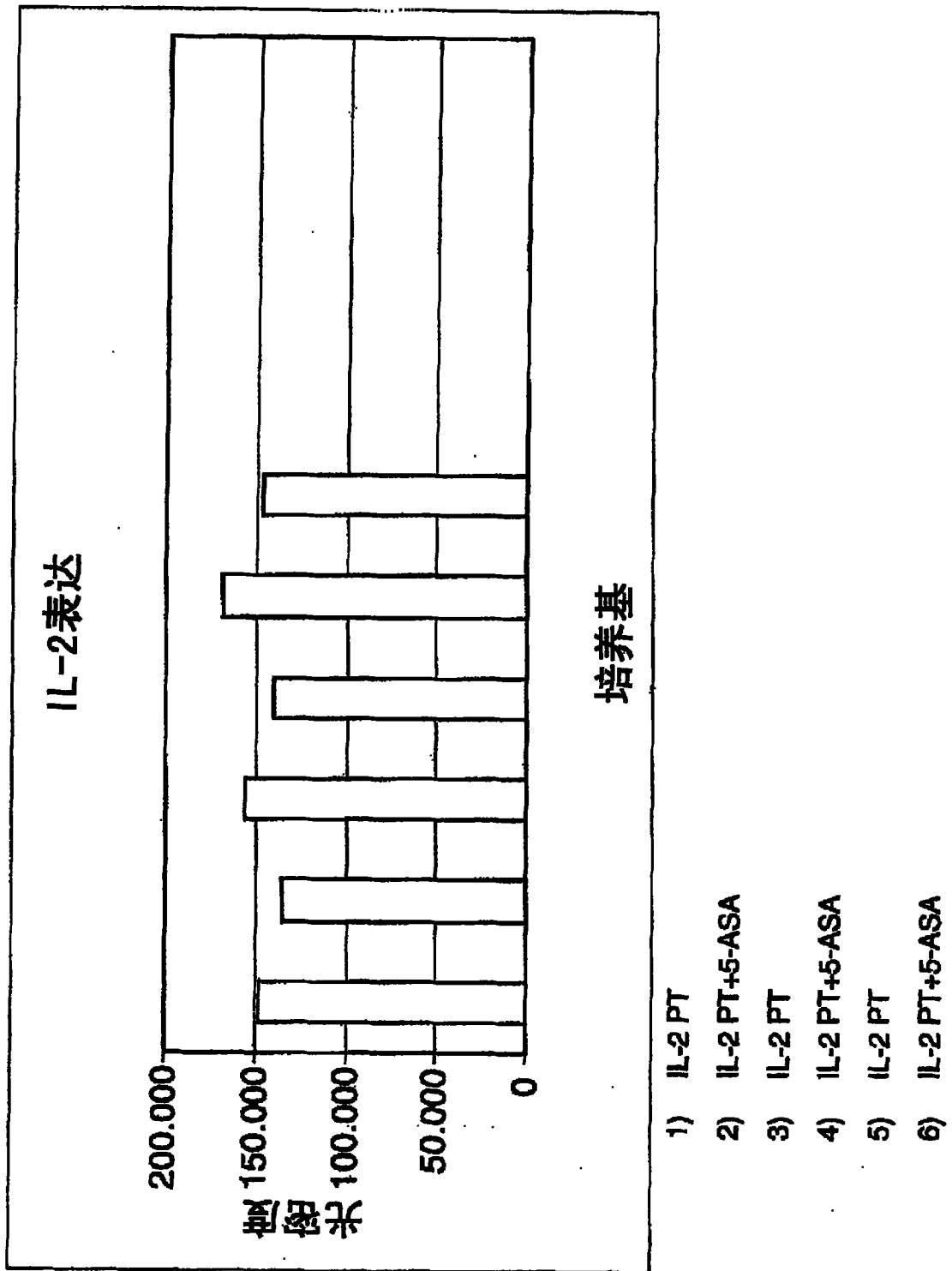


图 1

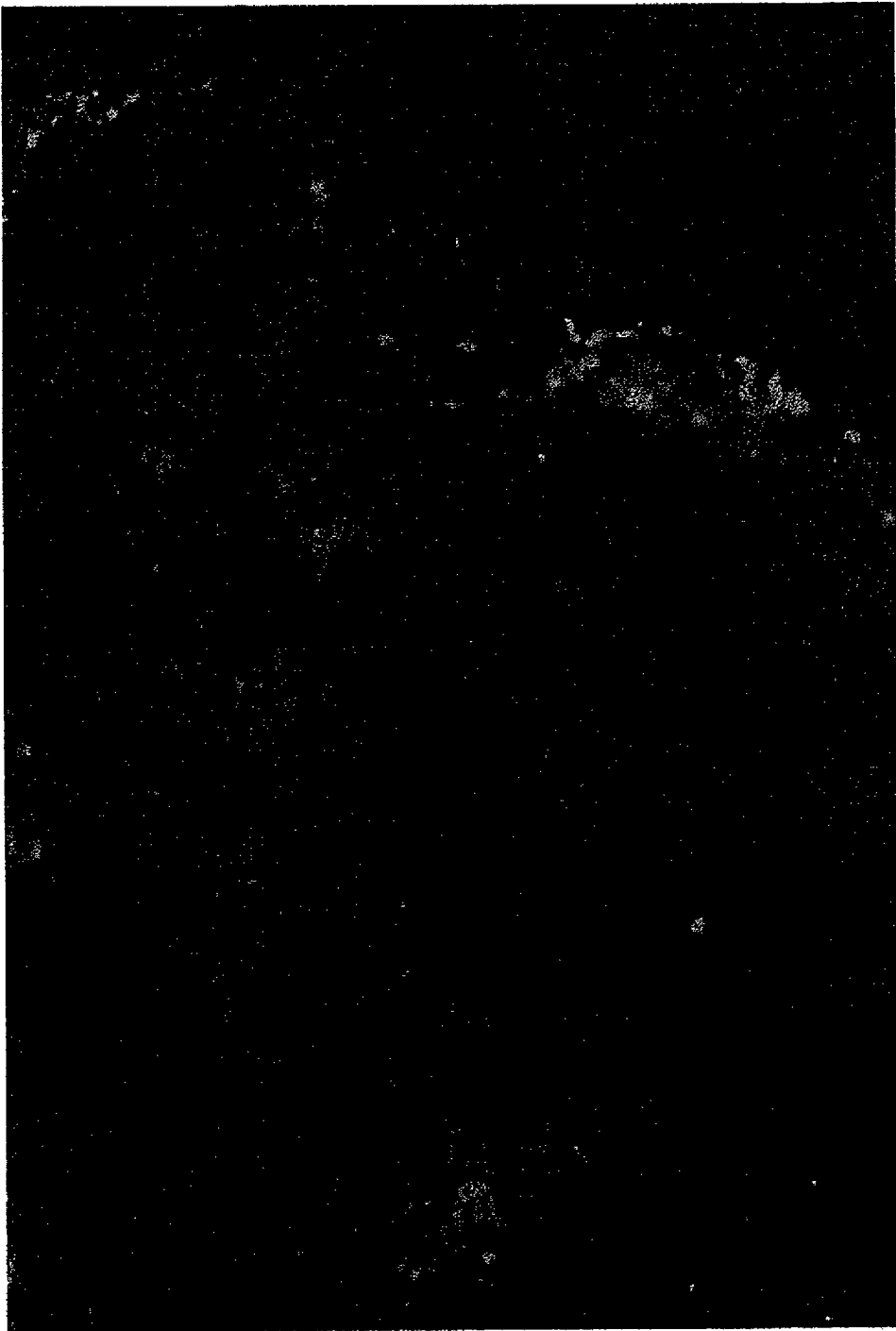


图 2

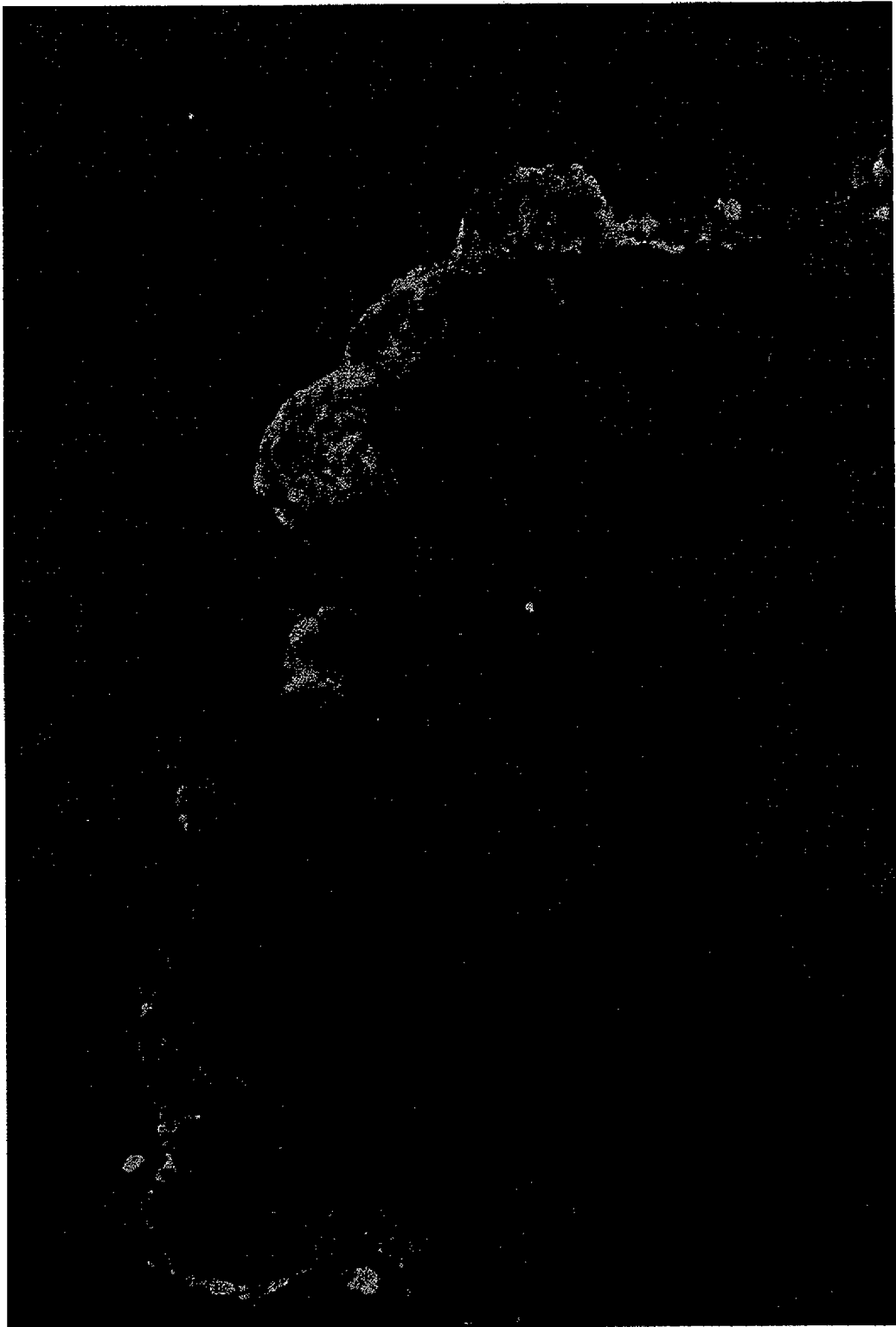


图 3

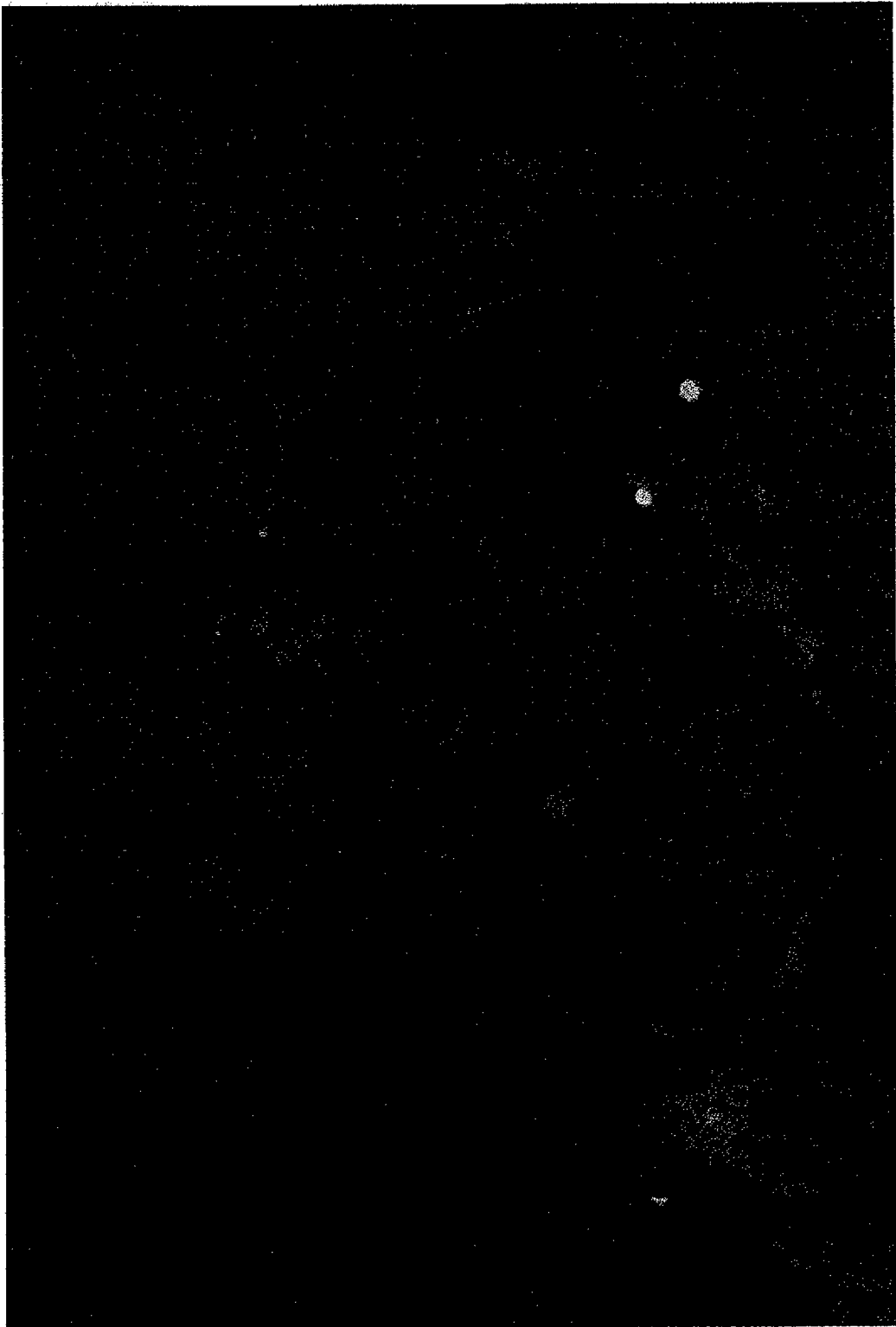


图 4

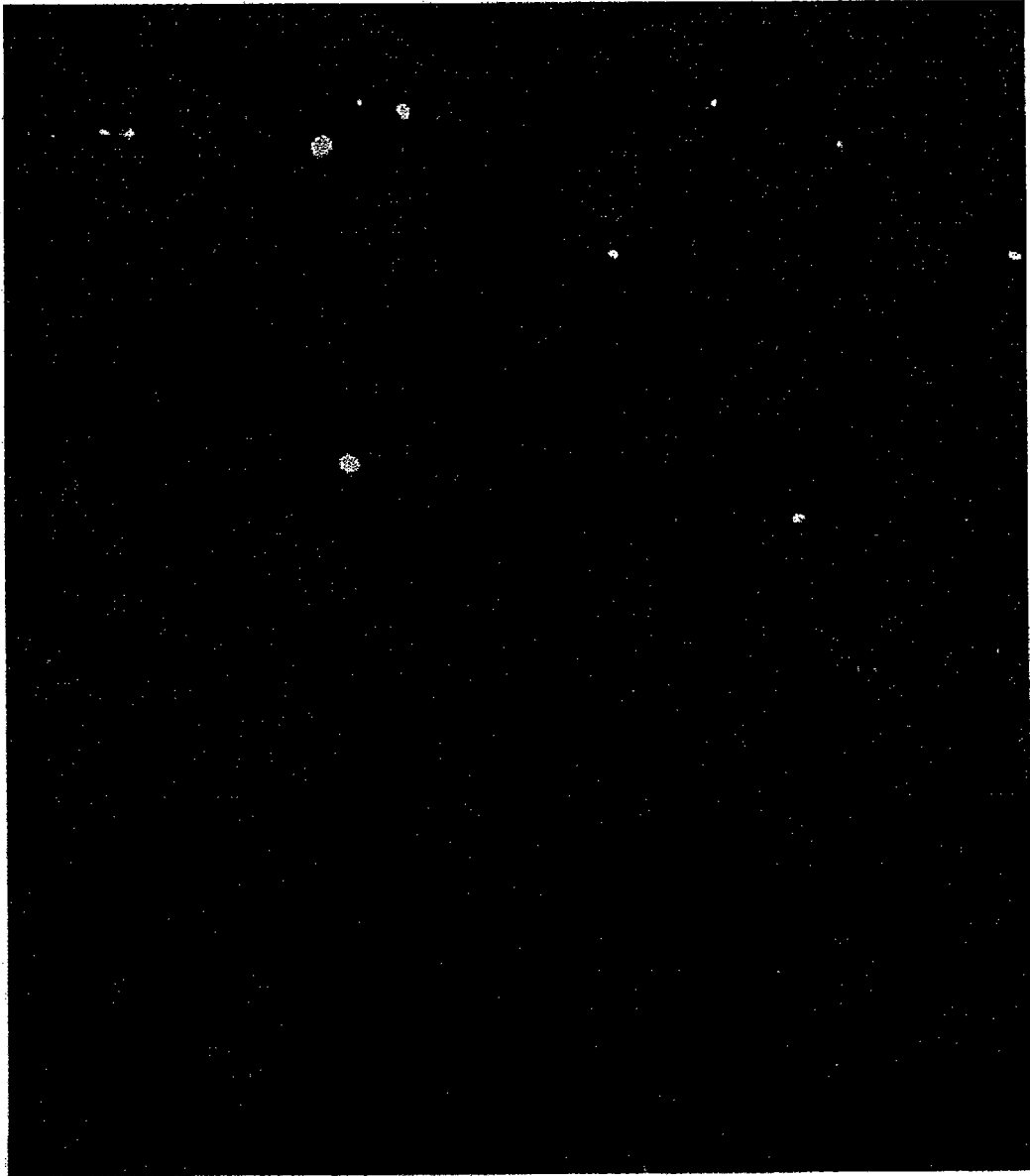


图 5

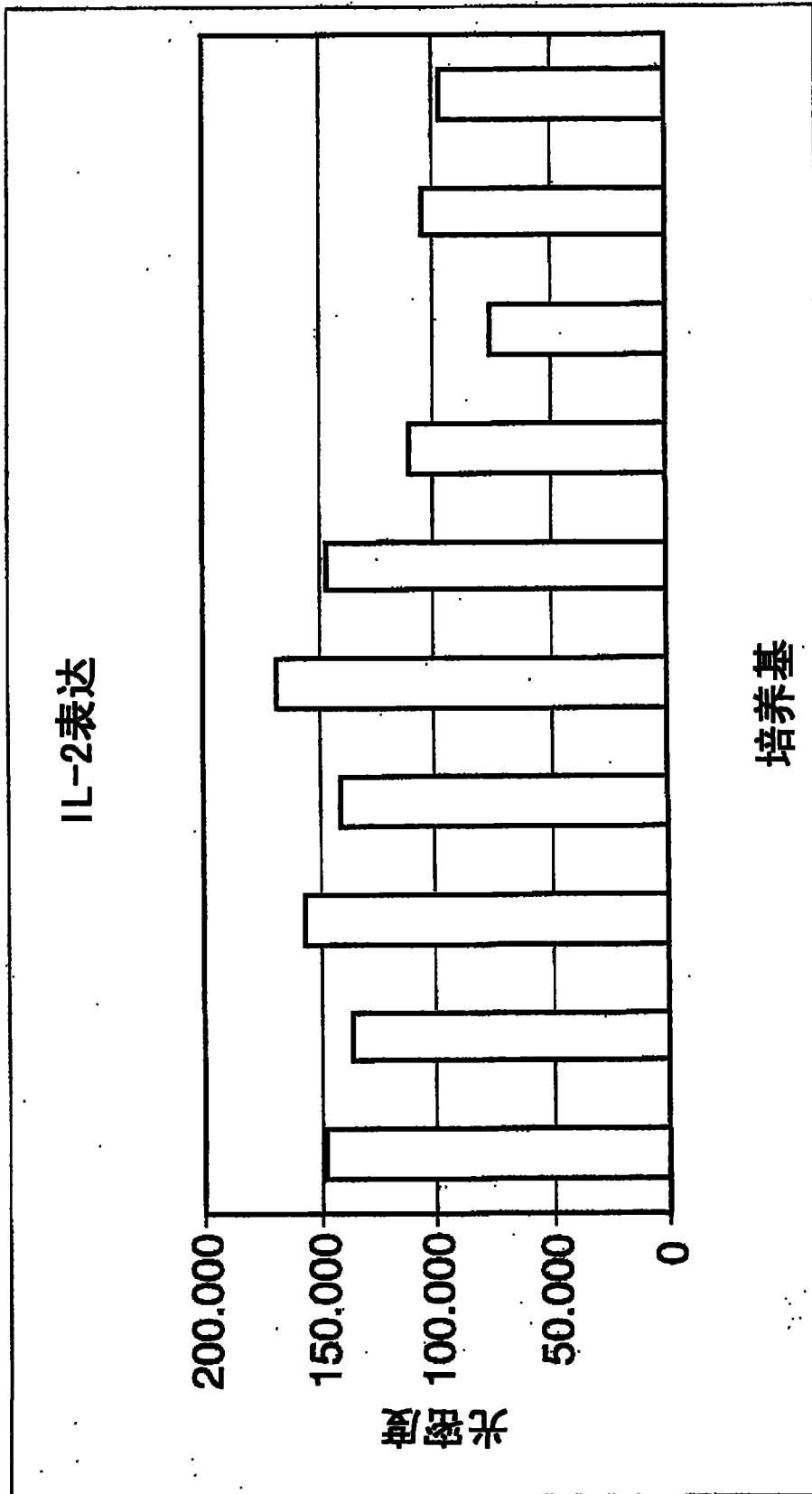


图 6

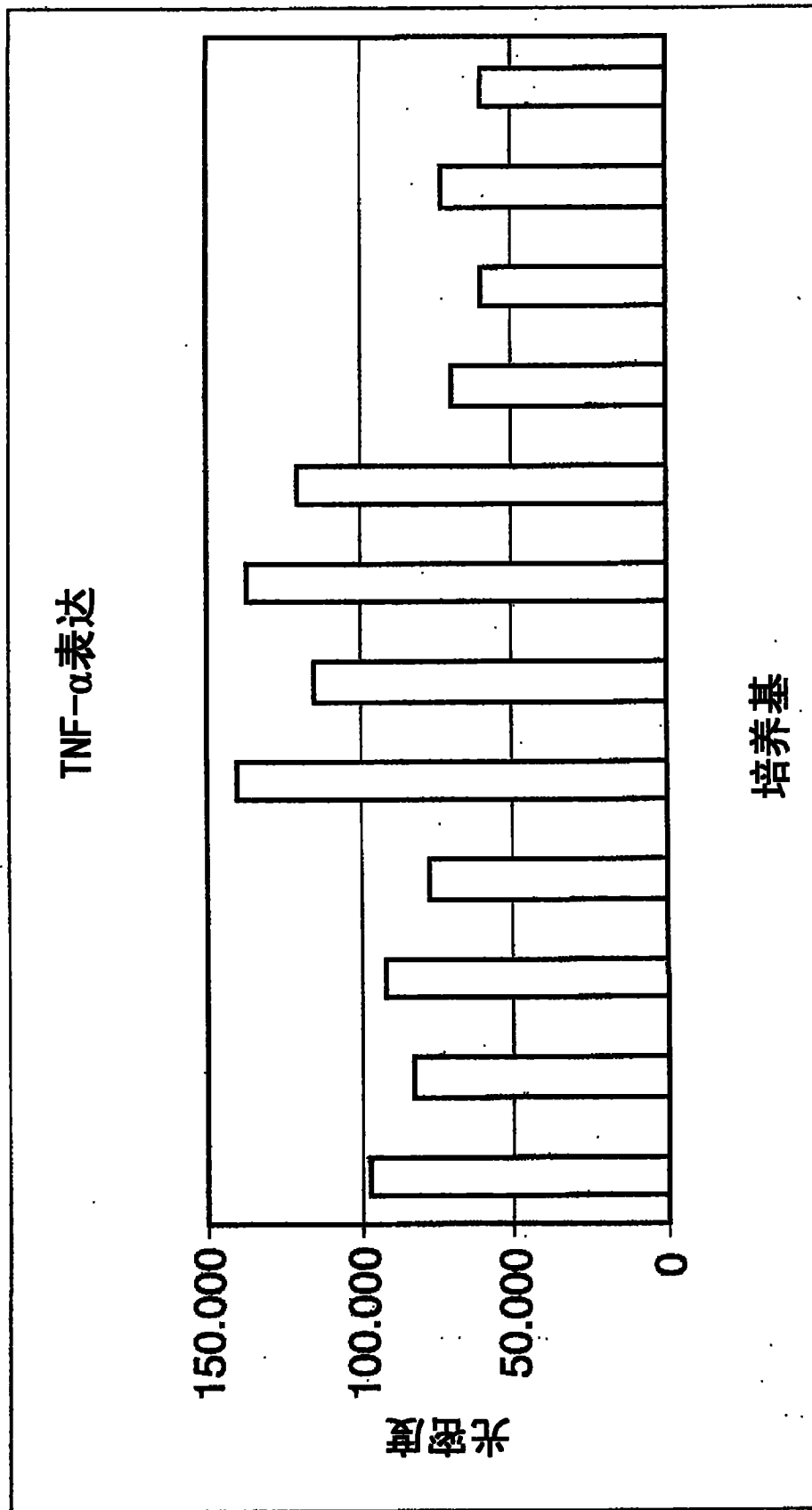


图 7

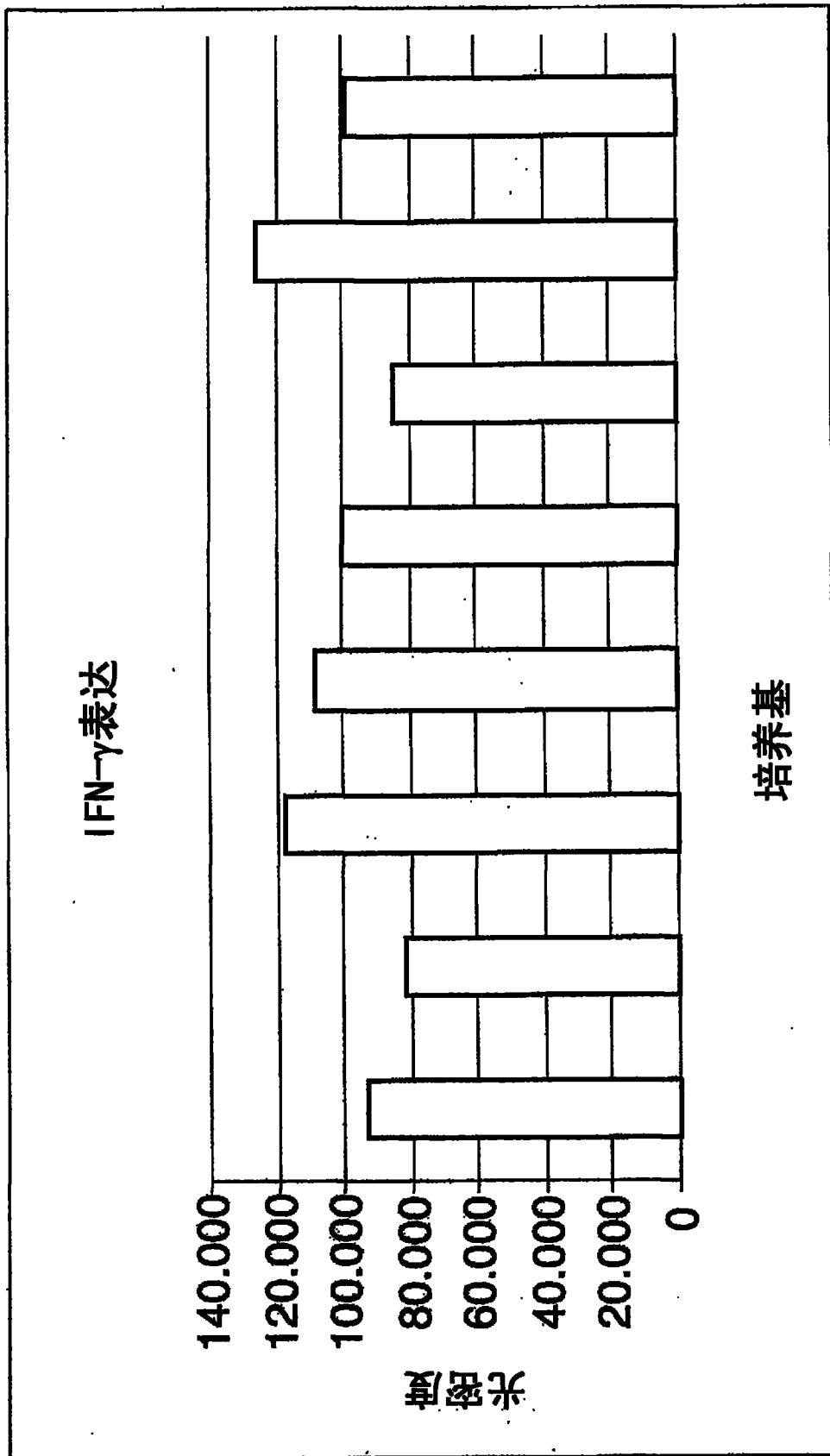


图 8