



(19) REPUBLIKA HRVATSKA
DRŽAVNI ZAVOD ZA
INTELEKTUALNO VLASNIŠTVO



(10) Identifikator
dokumenta:

HR P20050133 A2

HR P20050133 A2

(12) PRIJAVA PATENTA

(51) Int. Cl.⁷: A 61 K 31/4439
A 61 P 17/00

(21) Broj prijave u HR: P20050133A
(22) Datum podnošenja prijave patenta u HR: 11.02.2005.
(43) Datum objave prijave patenta u HR: 30.04.2005.
(86) Broj međunarodne prijave: PCT/EP03/007514
Datum podnošenja međunarodne prijave 10.07.2003.
(87) Broj međunarodne objave: WO 04/006920
Datum međunarodne objave 22.01.2004.

(31) Broj prve prijave: 60/395,221 (32) Datum podnošenja prve prijave: 11.07.2002. (33) Država ili organizacija podnošenja prve prijave: US

(71) Podnositelj prijave:

(72) Izumitelj:

Elbion AG, Meissner Strasse 191, 01445 Radebeul, DE
Chris Rundfeldt, Melanchthonstr. 11, 01640 Coswig, DE
Manfred Kietzmann, Memeler Strasse 2, 30938 Grossburgwedel, DE
Joachim Hoppmann, Bernhard-Voss-Str. 19, 01445 Radebeul, DE
Wolfgang Bäumer, Grosse Bartlinge 34, 30171 Hannover, DE
Hildegard Kuss, Kieler Strasse 6, 01109 Dresden, DE
Norbert Höfgen, Hufenweg 1, 01458 Ottendorf-Okrilla, DE
Mladen Vukmir, Zagreb, HR

(74) Punomoćnik:

(54) Naziv izuma: **LOKALNO LIJEČENJE KOŽNIH BOLESTI**

(57) Sažetak: Predmetni izum se odnosi na metodu za liječenje upalnih i/ili alergijskih kožnih bolesti i sastoji se od lokalne primjene supstituiranog hidroksi indola.

HR P20050133 A2

OPIS IZUMA

Predmetni se izum odnosi na postupak liječenja upalnih i/ili alergijskih kožnih bolesti koji uključuje lokalnu primjenu jednog supstituiranog hidroksi indola.

Izoenzimi fosfodiesteraze (PDE) sudjeluju u regulaciji kaskada transdukcije staničnih signala putem modulacije cikličkih razina nukleotida. Do danas je identificirano 11 genskih obitelji PDE izoenzima (Giembycz, 2000). Ti izoenzimi posjeduju različite biokemijske funkcije i staničnu distribuciju. U leukocitima bolesnika od atopijskog dermatitisa, posebice u djece, otkrivena je visoka razina aktivnosti PDE4 (Butler i dr., 1983; Cooper i dr., 1985). PDE4 je glavni izoenzim kod upalnih stanica, poput monocita i makrofaga izvedenih iz monocita (Gantner i dr., 1997), eozinofila (Dent i dr. 1994) i B limfocita (Cooper i dr., 1985). Inhibitori PDE4 pokazuju vrlo snažne protu-upalne učinke povećanjem međustanične cAMP razine. Putem inhibicije propadanja cAMP inhibitori PDE4 moduliraju međustanične funkcije (npr. prigušivanje tvorbe superoksida) i prepisivanje gena (npr. inhibiciju sinteze i/ili oslobađanje upalnih citokina) (Giembycz, 2000, Kuss i dr., 2002). Budući da se PDE4 također eksprimira u keratinocitima, te bi stanice također mogle biti dodatni potencijalni farmakološki cilj za kontrolu upalnih poremećaja na koži uporabom inhibitora PDE4 (Chujor i dr., 1998).

Hidroksi indoli, njihova uporaba kao inhibitora PDE4 i postupci njihove pripreme opisani su u WO99/55696. Ti se spojevi mogu koristiti kod poremećaja koji su povezani s djelovanjem eozinofila, posebice upalnih poremećaja dišnih puteva, poput primjerice bronhalne astme, alergijskog rinitisa, alergijskog konjunktivitisa, atopijskog dermatitisa, ekcema, alergijskog anginitisa, upala i proliferativnih poremećaja kože, poput psorijaze ili keratoze. Mogući oblici za primjenu rečenih spojeva su peroralni, parenteralni, intravenski, transdermalni, lokalni, inhalacijski ili intranazalni pripravci. Posebice poželjan spoj je AWD 12-281.

Inhibitor PDE4 AWD 12-281 (N-(3,5-dikloro-4-piridinil)-2-[1-(4-fluoro-benzil)-5-hidroksi-1H-indol-3-il]-2-oksoacetamid) uspješno je testiran na modelu alergijske bronhokonstrikcije. Znatno je smanjio bronhospazmogeni učinak alergena kod pasivno senzibiliziranih humanih dišnih puteva (Schmidt i dr., 2000). AWD 12-281 je inhibirao oslobađanje upalnih medijatora u antigen stimuliranim humanim stanicama iz nazalnih polipa poput GM-CSF (čimbenik stimulacije kolonija granulocit-makrofaga), TNF- α (čimbenik tumorske nekroze α) i histamina (Kuss i dr., 2002). Osim toga, AWD 12-281 je inhibirao degranulaciju humanih eozinofila *in vitro* (Ezeamuzie, 2001). *In vivo*, AWD 12-281 je značajno smanjio nakupljanje eozinofila kod bronhoalveolarnog ispiranja u kasnoj fazi reakcije dišnih puteva na antigen u senzibiliziranih smedih norveških štakora. Isti je spoj također iskazao inhibicijske učinke kod LPS-om inducirane plućne neutrofilije kod domaćih svinja (Kuss i dr., 2002).

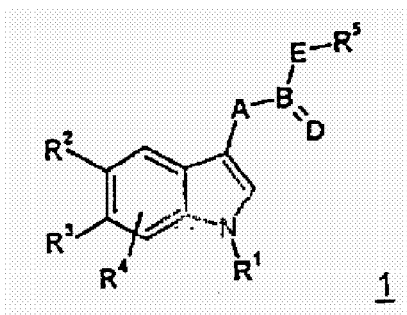
Sljedeći inhibitor PDE4 je cilomilast, koji se trenutno ispituje za liječenja astme (Griswold i dr., 1988, Giembycz, 2000) i kronične opstruktivne bolesti pluća. Posebice su Faze II/III kliničkog testiranja kronične opstruktivne bolesti pluća pokazale klinički značajno povećanje funkcije pluća (Giembycz, 2001, Dyke & Montana, 2002).

Kako bi se stimulirala imunološka upala, korišten je već uvriježeni (Ehinger i dr., 2000) test oticanja mišjeg uha (*mouse ear swelling test*, MEST) s miševima koji su bili senzibilizirani prema Gad i dr. (1986) na toluen-2,4-diizocijanat (TDI). Dcarman i dr. (1996) su pokazali kako senzibilizacija kože putem TDI-ja dovodi do proizvodnje Th-2 citokina u BALB/c miševa. Aktivirane stanice limfnih čvorova od životinja izloženih djelovanju TDI-ja proizvode znatne količine interleukina 4 i 10, ali samo niske razine interferona γ . Ovisno o režimu senzibilizacije, kontaktni alergen TDI inducira IgE-neovisni (kratkotrajno izlaganje) ili IgE-ovisni (dugotrajno izlaganje) alergijski dermatitis (Scheerens i dr., 1999). Kako se visoke vrijednosti IgE dobivaju samo senzibilizacijom putem dugotrajna izlaganja, u jednoj je studiji senzibilizacija izvedena tijekom perioda od 120 dana.

Izvedene su studije s ciljem pridobivanja informacija o učinkovitosti različitih inhibitora PDE4 glede njihova terapijskog učinka na alergijske i/ili upalne reakcije. Kako bi se poboljšala karakterizacija TDI-ijem inducirano oticanja uha, izmjerena je razina citoleukina interleukina (IL) 4, IL-6 i MIP-2 u tretiranim mišjim ušima.

Utvrđeno je kako je lokalna primjena AWD 12-281 u svrhu terapijske intervencije nakon aplikacije TDI dovela do značajne inhibicije oticanja uha. Nasuprot tomu, inhibitor PDE4 citomilast (SB207499), koji je korišten kao referentni lijek, u tome nije uspio. Taj rezultat ukazuje kako su lokalno primijenjeni hidroksi indoli, poput AWD 12-281, potentni u sprječavanju i liječenju alergijskih ili upalnih bolesti kože.

Prema tome, predmetni se izum odnosi na postupak za liječenje kožne bolesti koji uključuje lokalnu primjenu subjektu kojem je to potrebno terapijski učinkovitih količina spoja formule (I) ili njegove farmaceutske prihvatljive soli:



pri čemu
R¹ je

- 5 (i) -C₁-C₁₂-alkil, ravnolančani ili razgranani ili -C₂-C₁₂-alkenil, mono- ili polinezasićeni,
po izboru mono- ili polisupstituiran s -OH, -SH, -NH₂, -NHC₁₋₆-alkil, -N(C₁₋₆-alkil)₂, -NHC₆₋₁₄-aril, -N(C₆₋₁₄aril)₂,
-N(C₁₋₆alkil) (C₆-C₁₄aril), -NHCOR⁶, -NO₂, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -O-C₁₋₆-alkil, -O-C₆₋₁₄-aril, -O(CO)R⁶, -S-C₁₋₆-alkil,
-S-C₆₋₁₄-aril, -SOR⁶, -SO₃H, -SO₂R⁶, -OSO₂C₁₋₆ alkil, -OSO₂C₆₋₁₄ aril, -(CS)R⁶, -COOH, -(CO)R⁶, mono-, bi- ili
10 tricikličkim zasićenim ili mono- ili polinezasićenim karbociklima koji imaju 3 - 14 članova prstena, mono-, bi- ili
tricikličkim zasićenim ili mono- ili polinezasićenim heterociklima koji imaju 5 - 15 članova prstena i 1 - 6 heteroatoma,
koji su poželjno N, O i S, pri čemu skupine C₆₋₁₄aril i karbociklički i heterociklički supstituenti mogu po izboru biti
mono- ili polisupstituirani s R⁴,

- (ii) mono-, bi- ili triciklički zasićeni ili mono- ili polinezasićeni karbocikl koji ima 3 - 14 članova prstena, ili mono-, bi-
15 ili triciklički zasićeni ili mono- ili polinezasićeni heterocikl koji ima 5 - 15 članova prstena i 1 - 6 heteroatoma, koji su
poželjno N, O i S, ili karbo- ili heterociklički zasićeni ili mono- ili polinezasićeni spirocikl koji ima 3 - 10 članova
prstena, pri čemu heterociklički sustavi sadrže 1 - 6 heteroatoma, koji su poželjno N, O i S,
po izboru mono- ili polisupstituiran s -OH, -SH, -NH₂, -NHC₁₋₆-alkil, -N(C₁₋₆-alkil)₂, -NHC₆₋₁₄-aril, -N(C₆₋₁₄aril)₂,
-N(C₁₋₆alkil) (C₆-C₁₄aril), -NHCOR⁶, -NO₂, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -O-C₁₋₆-alkil, -O-C₆₋₁₄-aril, -O(CO)R⁶, -S-C₁₋₆-alkil,
20 -S-C₆₋₁₄-aril, -SOR⁶, -SO₃H, -SO₂R⁶, -OSO₂C₁₋₆ alkil, -OSO₂C₆₋₁₄ aril, -(CS)R⁶, -COOH, -(CO)R⁶, mono-, bi- ili
triciklički zasićeni ili mono- ili polinezasićeni karbocikli koji imaju 3 - 14 članova prstena, mono-, bi- ili triciklički
zasićeni ili mono- ili polinezasićeni heterocikli koji imaju 5 - 15 članova prstena i 1 - 6 heteroatoma, koji su poželjno N,
O i S, pri čemu skupine C₆₋₁₄aril i karbociklički i heterociklički supstituenti mogu po izboru biti mono- ili
polisupstituirani s R⁴,

- 25 R⁵ je
mono-, bi- ili triciklički zasićeni ili mono- ili polinezasićeni karbocikl koji ima 3 - 14 članova prstena, ili mono-, bi- ili
triciklički zasićeni ili mono- ili polinezasićeni heterocikl koji ima 5 - 15 članova prstena i 1 - 6 heteroatoma, koji su
poželjno N, O i S, ili karbo- ili heterociklički zasićeni ili mono- ili polinezasićeni spirocikl koji ima 3 - 10 članova
30 prstena, pri čemu heterociklički sustavi sadrže 1 - 6 heteroatoma, koji su poželjno N, O i S,
po izboru mono- ili polisupstituiran s -OH, -SH, -NH₂, -NHC₁₋₆-alkil, -N(C₁₋₆-alkil)₂, -NHC₆₋₁₄-aril, -N(C₆₋₁₄aril)₂,
-N(C₁₋₆alkil) (C₆-C₁₄aril), -NHCOR⁶, -NO₂, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -O-C₁₋₆-alkil, -O-C₆₋₁₄-aril, -O(CO)R⁶, -S-C₁₋₆-alkil,
-S-C₆₋₁₄-aril, -SOR⁶, -SO₃H, -SO₂R⁶, -OSO₂C₁₋₆ alkil, -OSO₂C₆₋₁₄ aril, -(CS)R⁶, -COOH, -(CO)R⁶, mono-, bi- ili
35 triciklički zasićeni ili mono- ili polinezasićeni karbocikli koji imaju 3 - 14 članova prstena, mono-, bi- ili triciklički
zasićeni ili mono- ili polinezasićeni heterocikli koji imaju 5 - 15 članova prstena i 1 - 6 heteroatoma, koji su poželjno
N, O i S, pri čemu skupine C₆₋₁₄aril i karbociklički i heterociklički supstituenti mogu po izboru biti mono- ili
polisupstituirani s R⁴,
uz uvjet da R⁵ sadrži najmanje jedan supstituent koji je odabran između -F, -Cl, -Br, -I;
R², R³ su vodik ili -OH, pri čemu najmanje jedan od dva supstituenta mora biti -OH;

- 40 R⁴ je
-H, -OH, -SH, -NH₂, -NHC₁₋₆-alkil, -N(C₁₋₆-alkil)₂, -NHC₆₋₁₄-aril, -N(C₆₋₁₄aril)₂, -N(C₁₋₆alkil) (C₆-C₁₄aril), -NHCOR⁶, -
NO₂, -CN, -COOH, -(CO)R⁶, -(CS)R⁶, -F, -Cl, -Br, -I, -O-C₁₋₆-alkil, -O-C₆₋₁₄-aril, -O(CO)R⁶, -S-C₁₋₆-alkil, -S-C₆₋₁₄-aril,
-SOR⁶, -SO₂R⁶, -C₁₋₆ alkil, pri čemu svaki aril ili alkil može biti mono- ili polisupstituiran s -OH, -F, -Cl, -Br, -I;

- 45 R⁶ je
-H, -NH₂, -NHC₁₋₆-alkil, -N(C₁₋₆-alkil)₂, -NHC₆₋₁₄-aril, -N(C₆₋₁₄aril)₂, -N(C₁₋₆alkil) (C₆-C₁₄aril), -O-C₁₋₆-alkil, -O-C₆₋₁₄-
aril, -S-C₁₋₆-alkil, -S-C₆₋₁₄-aril, -C₁₋₁₂alkil, ravnolančani ili razgranani;
-C₂₋₁₂alkenil, mono- ili polinezasićeni, ravnolančani ili razgranani, mono-, bi- ili triciklički zasićeni ili mono- ili
50 polinezasićeni karbocikli koji imaju 3 - 14 članova prstena;
mono-, bi- ili triciklički zasićeni ili mono- ili polinezasićeni heterocikli koji imaju 5 - 15 članova prstena i 1 - 6
heteroatoma, koji su poželjno N, O i S;

A je ili veza, ili

$-(CH_2)_m-$, $-(CH_2)_m-(CH=CH)_n-(CH_2)_p-$, $-(CHOZ)_m-$, $-(C=O)-$, $-(C=S)-$, $-(C=N-Z)-$, $-O-$, $-S-$, $-NZ-$,

pri čemu $m, p = 0 - 3$, a $N = 0 - 2$, a

5 Z je

$-H$, ili

$-C_{1-12}$ alkil, ravnolančani ili razgranani;

$-C_{2-12}$ alkenil, mono- ili polinezasićeni, ravnolančani ili razgranani, mono-, bi- ili triciklički zasićeni ili mono- ili polinezasićeni karbocikli koji imaju 3 – 14 članova prstena;

10 mono-, bi- ili triciklički zasićeni ili mono- ili polinezasićeni heterocikli koji imaju 5 – 15 članova prstena i 1 – 6 heteroatoma, koji su poželjno N, O i S;

B je ili ugljik ili sumpor, ili $-(S=O)-$;

D je kisik, sumpor, CH_2 ili N-Z,

pri čemu, ako B predstavlja ugljik, D je ili S ili CH_2 ;

15 E je veza ili

$-(CH_2)_m-$, $-O-$, $-S-$, $-NZ-$, pri čemu m i Z imaju značenja istovjetna gore opisanima.

Predmetni izum se nadalje odnosi na farmaceutski prihvatljive soli spoja sukladno formuli (I).

20 U spojevima formule (I), R^5 je poželjno odabran između monocikličkih zasićenih ili mono- ili polinezasićenih karbocikla i heterocikla koji imaju najmanje jedan halogeni supstituent, poželjnije između monocikličkih aromatskih karbocikala i heterocikala koji imaju najmanje jedan, npr. 2 ili 3 halogena supstituenta. Posebice su poželjni primjeri R^5 piridinski ili fenilni prstenovi koji imaju najmanje jedan halogeni supstituent, poput 3,5-dikloro-4-piridila, 2,6-diklorofenila, 2,6-dikloro-4-trifluorometilfenila, 2,6-dikloro-4-trifluorometoksi fenila itd.

25

R^1 je poželjno odabran između C_1-C_{12} alkila, npr. C_1-C_4 alkila, koji je po izboru supstituiran karbocikličkim prstenom, npr. fenilnim prstenom. Posebice poželjni primjeri R^1 su etil, propil (n-propil ili izopropil), benzil i halogenom supstituirani benzil, poput 4-fluorobenzila, 2,6-difluorobenzila itd. Nadalje, R^1 može biti odabran između monocikličkih zasićenih ili mono- ili polinezasićenih karbocikala ili heterocikala, koji su po izboru supstituirani.

30

R^2 je poželjno OH, a R^3 je poželjno H. A je poželjno odabran između $-(C=O)-$ i $-(CHOH)-$. B je poželjno C, D je poželjno O, a E je poželjno $-(N-H)-$. Posebice poželjan primjer spoja (I) je AWD 12-281 (N-(3,5-dikloro-4-piridinil)-2[1-(4-fluorobenzil)-5-hidroksi-1H-indol-3-il]-2-oksoacetamid) ili njegova farmaceutski prihvatljiva sol.

35 Spojevi prema predmetnom izumu posebice su prikladni za liječenje upalnih i/ili alergijskih bolesti kože, preciznije bolesti kože koje su povezane s patološki povećanom aktivnosti PDE-4, primjerice alergijskih bolesti, poput alergijskog dermatitisa.

Općenito se spojevi formule (I) ili njihove farmaceutski prihvatljive soli mogu koristiti u proizvodnji lijekova za profilaktičko ili terapijsko liječenje bilo kojeg bolesnog stanja u ljudi, ili drugih sisavaca, koje je uzrokovano upalnim reakcijama kože, kao i poremećenom proliferacijom i diferencijacijom stanica kože. Spojevi formule (I) mogu se koristiti u liječenju upalnih reakcija kože kao što su skleritis, scleroderma circumscripita, erizipel, pemphigus vulgaris, pemphigus foliaceus i pemphigoid bullosus. Predmetni spojevi također imaju koristan učinak na upalne kožne bolesti (npr. lichen ruber planus) koje su uzrokovane aktiviranim T-stanicama ili drugim stanicama imuno-sustava, poput granulocita, mastocita, makrofaga ili oslobođenih medijatora rečenih imunskih stanica, poput citokina. Nadalje, predmetni su spojevi djelatni u liječenju kožnih manifestacija auto-imunoloških oboljenja, poput dermatomiozitisa, lupus erythematosusa itd.

Budući da su predmetni spojevi sposobni podići razine cikličke AMP, oni su prema tome korisni u liječenju benignih i malignih proliferativnih bolesti kože kod humanih i ne-humanih sisavaca. Kada se rabi ovdje, izraz "proliferativna oboljenja kože" označava benigne i maligne kožna bolesti koje karakterizira ubrzana stanična dioba u epidermi, dermi ili povezanim tkivima, a povezana je s nepotpunom diferencijacijom tkiva. Takove bolesti uključuju: psorijazu, atopijski dermatitis, ne-specifični dermatitis, primarni iritantni kontaktni dermatitis, alergijski kontaktni dermatitis ili alergijske poremećaje poput atopije, urtikarije, ekcema, keratokonjunktivitisa, karcinoma kože skvamoznih ili bazalnih stanica, lamelarne ihtioze, epidermolitske hiperkeratoze, epidermolysis bullosa simplex, predmaligne keratoze inducirane suncem, ne-maligne keratoze, akne i seboreični dermatitis, Lyellov sindrom, granulatomazne lezije kože u ljudi, te atopijski dermatitis, svrbež i šuga u domaćih životinja.

Budući da su predmetni spojevi sposobni smanjiti upalne reakcije, oni su korisni u liječenju kožnih bolesti koje su izazvane bakterijskom, virusnom, gljivičnom ili parazitskom upalom. Primjeri takovih bolesti su erythema migrans, tuberculosis cutis, Lyme bolest, dermalna leišmanijaza, toksična nekroliza epiderme, pioderma, tineja i hemoroidi.

Spojevi formule (I) također se mogu rabiti za liječenje upalnih reakcija kože poput skleritisa, scleroderma circumscripta, erizipela, pemphigus vulgaris, pemphigus foliaceus i bullus pemphigoid.

Budući da se na proliferaciju stanica kože utječe putem razina međustaničnih cAMP, spoj formule (I) pomaže zacjeljivanju rana.

Spojevi (I) se primjenjuju kao lokalni, npr. transdermalni pripravci, a poželjno je u obliku vodenih ili uljnih suspenzija koje sadrže djelatni sastojak i prikladne farmaceutski prihvatljive nosače, razrjeđivače i pomoćne tvari.

Općenito se spojevi formule (I), ili, ako je to prikladno, njihove farmaceutski prihvatljive soli, mogu primjenjivati kao lokalni pripravci u kombinaciji s uobičajenim lokalnim ekscipijensima. Lokalni pripravci mogu imati oblik, primjerice, masti, paste, obloga, kapi, krema ili losiona, impregniranih obloga, gelova, gel stikova, raspršivača i aerosola, a mogu sadržavati uobičajene prikladne aditive, poput konzervansa, otapala koja potpomažu prodiranje lijeka i omekšivače u mastima i kremama. Ti pripravci mogu sadržavati kompatibilne uobičajene nosače, poput baza za kreme i masti, te etanol ili oleilni alkohol za losione. Prikladni pripravci u obliku krema, losiona, gela, stika, masti, raspršivača ili aerosola mogu se koristiti za spojeve formule I, ili, ako je to prikladno, njihove farmaceutski prihvatljive soli. Ako je indicirano liječenje rektalne ili analne kože, odnosno mukoza, spojevi formule (I) mogu se primjenjivati u obliku supozitorija.

Doziranje djelatne tvari varira ovisno o dobi i težini bolesnika, prirodi i težini oboljenja koje treba liječiti i sličnim čimbenicima. Dnevna doza koja se može primijeniti kao pojedinačna doza ili razdijeljeno na dvije ili više dnevnih doza, a može biti u rasponu od 0,01 do 5000 mg.

U posebice poželjnom utjelovljenju predmetnog izuma, predmetni se spoj primjenjuje na ono područje kože koje je već zahvaćeno bolešću. Na primjer, predmetni se spoj primjenjuje nakon izazivanja alergijske reakcije, tj. nakon što je bolesnik kojeg treba liječiti bio izložen alergenu, a poželjno nakon što su uočeni prvi simptomi alergije. Konkretno, prva primjena predmetnog spoja može se izvršiti do 48 sati, poželjno do 24 sata nakon izlaganja alergenu. Potom će se primjena nastaviti sve dok se ne postigne željeni učinak.

Spoj (I) može se primijeniti kao jedini djelatni sastojak ili u kombinaciji s najmanje jednim dodatnim farmaceutskim djelatnim sredstvom. Na primjer, spojevi formule (I) mogu se kombinirati s lijekovima koji potiču proizvodnju cAMP, na primjer simpatomimetički amini, poput primjerice izoprenalina, izoetarina, salbutamola, fenilefrina i efedrina; derivatima ksantina, poput teofilina i aminofilina, te kortikosteroidima, poput prednisona i adrenalnih stimulansa, poput ACTH, koji mogu biti uključeni. Kombinacija farmaceutskih sredstava koji mogu utjecati na imuno sustav poput steroida, imuno-supresiva (npr. takrolimus, sirolimus, ciklosporin, pimekrolimus), inhibitora ciklooksigenaze (npr. indometacin, diklofenak, ibuprofen) ili antihistaminika (difenhidramin, hidroksizin, loratadin, cetirizin). Spoj formule (I) se može davati istovremeno s drugim sredstvima korisnim za liječenje ili nadzor kožnih oboljenja poput retinoida, ditranola, derivata vitamina D, alefacepta, declizumaba, etanercepta i slično. Liječenje kožnih bolesti koje su uzrokovane bakterijskim, virusnim, gljivičnim ili parazitskim infekcijama, može biti potpomognuto antibioticima poput sulfonamida, eritromicina i tetraciklina. Budući da proteini poput kemokina (IP-10) ili citokina (npr. IL-1 β , IL-2) utječu na diferencijaciju i proliferaciju stanica kože, nadopunjavanje s ovim medijatorima ili s protutjelima može doprinijeti boljem liječenju kožnih bolesti.

Nadalje, predmetni će izum biti detaljnije objašnjen u slijedećim Slikama i Primjerima.

Slika 1: Prodiranje ^{14}C AWD 12-281 u kožu mjeri se uporabom "Franz" difuzijske ćelije i kože s leđa štakora. Djelovanje ^{14}C AWD 12-281 mjereno je u plazmi tijekom 360-minutne inkubacije. Rezultati dva neovisna pokusa. 15 μl (110322970 dpm) ^{14}C AWD 12-281 (otopljenog u acetonu/DMSO 1:1) nanoseno je na obrijani dio kože.

Slika 2: Učinak jedne lokalne primjene AWD 12-281, cilomilasta i diflorasona na uši miševa senzibiliziranih na TDI dva sata prije izazivanja reakcije na TDI. Histogrami predstavljaju oticanje uha 1, 5 i 24 h nakon izlaganja, povezane s vrijednostima koje su dobivene prije izazivanja reakcije na TDI. Pokazalo se je značajno povećanje oticanja uha kod miševa koji su tretirani s TDI (crne kolone) u usporedbi s netretiranim kontrolnim skupinama (bijele kolone). AWD 12-281 (1 %, vertikalno iscrtane kolone), kao i cilomilast (3 %, poprečno iscrtane kolone) i diflorason (0,05 %, sive kolone) znatno su inhibirali oticanje pri svakom mjerenju. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ u usporedbi sa životinjama koje su tretirane s TDI ($n = 6$ (TDI = 12) svaka skupina).

Slika 3: Učinak jedne lokalne primjene AWD 12-281, cilomilasta i diflorasona na uši miševa senzibiliziranih na TDI jedan sat nakon izazivanja reakcije na TDI. Nije bilo značajne razlike između tretiranih skupina 5 h nakon izazivanja reakcije. U usporedbi s kontrolnim skupinama miševa kod kojih je izazvana reakcija na TDI, AWD 12-281 (1 %, bijele kolone) kao i diflorason (0,05%, sive kolone) značajno su spriječili oticanje 24 h nakon izazivanja reakcije. Cilomilast (3 %, poprečno iscrtane kolone) nije uzrokovao značajnu inhibiciju. ** $P < 0,01$, ($n = 6$ (TDI = 12) svaka skupina).

Slika 4: Učinak AWD 12-281 na oticanje uha uzrokovano TDI-jem u miševa senzibiliziranih na TDI korištenjem dugotrajnog (120 dana) ponavljano modela senzibilizacije. Histogrami predstavljaju oticanje uha 1, 5 i 24 h nakon izazivanja reakcije na TDI. Nije bilo značajne razlike između skupina 1 i 5 h nakon izazivanja reakcije. U usporedbi s kontrolnim skupinama miševa tretiranih s TDI (bijele kolone), AWD 12-281 (3 %, crne kolone) koji je davan 1 h nakon izazivanja reakcije na TDI značajno je inhibirao oticanje 24 h nakon izazivanja reakcije. $**P<0,01$, ($n = 5$ svaka skupina).

Slika 5: Koncentracija interleukina 4 (A), interleukina 6 (B) i upalni protein makrofaga 2 (C) u homogeniziranim mišjim ušima 24 sata nakon izazivanja reakcije na TDI. Uzorci su uzeti iz pokusa s lokalnim liječenjem (vidi sliku 2). Postoji značajan porast interleukina 4, interleukina 6 i upalnog proteina makrofaga 2 u mišjim ušima kod kojih je izazvana reakcija na TDI. AWD 12-281 (1 %) polagano smanjuje porast (IL-4, MIP-2) ili značajno slabi (IL-6). Cilomilast (3 %), kao i diflorason (0,05 %) značajno su smanjili koncentraciju svih medijatora. $*P<0,05$, $**P<0,01$, $***P<0,001$ u usporedbi sa životinjama koje su tretirane s TDI ($n = 6$ (TDI = 12) svaka skupina).

Slika 6: Učinak PDE 4 inhibitora na oticanje mišjeg uha izazvanog TDI. Mišje uši su tretirane s 0,5 % TDI. Nakon 1 h (sive kolone) skupine miševa su tretirane s 3 % AWD 12-281, 10 %-tnim cilomilastom ili nisu uopće tretirane (TDI). Nakon 24 h, uočeno je oticanje uha (crne kolone). Pri čemu je AWD 12-281 znatno smanjio oticanje uha, a cilomilast nije pokazao značajan inhibicijski učinak ($p = 0,09$).

PRIMJER

Materijali i postupci

Postupak senzibilizacije

Ženke BALB/c-miševa dobivene su od Charles River (Sulzfeld, Germany) u dobi od 8 tjedana (20 g tjelesne težine). Sve su životinje bile zdrave i držane u skupinama od 6 miševa po kavezu na 22 °C uz 12-satni ciklus svjetlo/mrak. Voda i uobičajena dijeta (Altromin, Lage/Lippe, Germany) bili su dostupni *ad libitum*.

Nakon privikavanja u trajanju od tjedan dana, koža abdomena miševa je obrijana i depilirana s Veet®-om. Naknadno se s ljepljivim trakama skidaju rožnati dijelovi kože abdomena 10 puta. Za aktivnu senzibilizaciju, 4 dana za redom se na голу epidermu primjenjuje 100 µl 5% TDI u acetonu.

Nakon 21 dana, alergijska reakcija bila je pojačana primjenom 10 µl 0,5% TDI-a u acetonu i na unutarnju i na vanjsku površinu lijevog uha, kako bi se ispitalo stanje senzibilizacije. Prije izlaganja, kao i 24 h nakon, debljina uha je izmjerena kutimetrom (model 7309, Mitutoyo, Neuss, Germany). Oticanje je izračunato uspoređivanjem vrijednosti prije izlaganja, odnosno 24 h nakon izlaganja. Životinje kod kojih je prosječna razlika oticanja iznosila manje od 20 % 24 sata nakon izlaganja alergenu u usporedbi s prethodno utvrđenom pojedinačnom bazalnom vrijednosti (cca. 230 µm) isključeni su kao nesenzibilizirani. Preostali miševi su ravnomjerno raspoređeni u skupine za tretiranje ($N = 6$) sukladno njihovom intenzitetu oticanja, tako da je svaka skupina sadržavala životinje koje su reagirale u različitom opsegu. Životinje su se morale odmarati sve dok debljina uha nije dosegla gotovo normalnu razinu nakon 7 dana. Kako bi se isključili ostaci alergena na ušima, netretirane desne uši su korištene za glavni pokus.

Lokalna primjena

Jedna skupina miševa ($n = 6$) nije bila senzibilizirana niti izložena alergenu. Druga skupina ($n = 12$) izložena je alergenu lokalnom primjenom 20 µl (10 µl na svaku, unutarnju i vanjsku površinu) 0,5 % -tnog TDI u acetonu na desne uši. Dva sata prije izlaganja TDI-ju, treća i četvrta skupina (svaka $n = 6$) tretirane su s 20 µl (10 µl na svaku, unutarnju i vanjsku površinu) AWD 12-281 (1 % = 200 µg) ili 20 µg cilomilasta (3 % = 600 µg; svaki u acetonu/DMSO 9:1) nanešeno na desne uši. Diflorason (20 µl, 0,05 % = 10 µg u acetonu) je poslužio kao kortikoidna pozitivna kontrolna ($n = 6$). Rečeni se miševi usmrte dislokacijom cerviksa 24 sata nakon izlaganja TDI-ju, a uši se prikupe (vidi dolje).

Kako bi se simulirali terapijski uvjeti, tri su dodatne skupine ($n = 6$) primile AWD 12-281 (1 %), cilomilast (3 %) ili diflorason (0,05 %) lokalno 1 sat nakon izlaganja TDI-ju, tj. odmah nakon mjerenja debljine uha. Debljina uha je također određena 5 i 24 sata nakon izlaganja TDI-ju.

Pet tjedana nakon prvog izlaganja, životinje koje su bile "terapijski" tretirane s AWD 12-281 (1 %) i cilomilastom (3 %) ponovno su izložene alergenu. Prije izlaganja, jedna je skupina bila tretirana s AWD 12-281 (3 %).

Nadalje, izveden je i pokus u svrhu prikupljanja informacija o terapijskim učincima AWD 12-281 u modelu dugotrajnog izlaganja TDI-ju. Deset miševa je tretirano sa 100 µl 0,5 %-tnog TDI na koži abdomena u razmacima od 10 dana

tijekom 120 dana. Deset dana nakon posljednjeg tretmana TDI-jem na abdomenu, miševima je aplicirano 20 µl 0,5 %-tnog TDI na lijevo uho, razdijeljeno na po 10 µl na vanjsku, odnosno unutarnju površinu uha. Jedan sat nakon aplikacije TDI 5 miševa je tretirano s AWD 12-2181 (3 %), a 5 miševa je lažno tretirano. Debljina ušiju se izmjeri prije, kao i 1, 5 i 24 sata nakon izlaganja.

1.3 Utvrđivanje citokina

Jedan dio prikupljenih ušiju fiksira se u 4 %-tnom formaldehidu kao histološki presjeci i oboji s hematoksilin-eozinom uzimajući u obzir debljinu kože i nakupljanje granulocita. Ti su parametri izmjereni u 10 polja pri 40-erostrukom povećanju. Preostalo tkivo se naglo smrzne i pohrani u tekućem dušiku odmah nakon uzorkovanja. U svrhu određivanja biokemijskih parametara, miše uši se homogeniziraju pod tekućim dušikom. Homogenati se stave u 200 µl RPMI 1640 medija, doda se inhibitor proteaze Pefabloc® (1 mmol) i uzorci se intenzivno promiješaju. Nakon centrifugiranja (10000 g, 10 min, 40 °C), prikupi se supernatant i odredi sadržaj bjelančevina. Uzorci se pohrane na –80 °C sve do određivanja citokina. U uzorcima se mjeri Interleukin (IL) 4, IL-6 i MIP-2 putem ELISA-e uporabom komercijalno dostupnog pribora uz pridržavanje proizvođačevih uputa.

Prodiranje ¹⁴C AWD 12-281 kroz lednu kožu miševa

Sposobnost ¹⁴C AWD 12-281 da prodre kroz lednu kožu miševa testirana je u difuzijskoj ćeliji (Franzove ćelija). Suho obrijana ledna koža miša se postavi na difuzijsku ćeliju tako da je 1,5 cm (promjer) dermalne strane u kontaktu sa zagrijanim (34 °C) puferom (govedi serum). 15 µl (110322970 dpm) ¹⁴C AWD 12-281 (otopljenog u acetonu/DMSO 1:1) se nanese na obrijanu kožu. Uzorci su uzeti nakon 15, 60, 120, 180, 240, 300 i 360 min, a radioaktivnost se mjeri u β brojaču (Beckman, Minhen, Njemačka). Pokus je izveden dvaput.

25 Reagensi

TDI je dobavljen od tvrtke Sigma-Aldrich Chemie (Deisenhofen, Njemačka). AWD 12-281, ¹⁴C AWD 12-281 i cilomilast su dobavljeni od tvrtke AWD (Dresden, Njemačka). Aceton, PEG200 i DMSO su kupljeni od tvrtke Merck (Darmstadt, Njemačka); formaldehidna otopina od tvrtke Fluka (Deisenhofen, Njemačka), Miglyol i hidrosiletil celuloza od tvrtke Caesar & Loritz (Hilden, Njemačka), a medij RPMI 1640 od tvrtke Biochron (Berlin, Njemačka). ELISA testovi za određivanje citokina su kupljeni od tvrtke R&D Systems (Wiesbaden, Njemačka). Pefabloc® je kupljen od tvrtke Boehringer Mannheim (Njemačka). Krema za depilaciju (Veet®) zaštićeni je robni žig tvrtke Reckitt & Colman (Hamburg, Njemačka). Ljepljiva traka (TesaFilm®) je dobavljena od tvrtke Beiersdorf (Hamburg, Njemačka). Sadržaj bjelančevina je izmjeren uporabom Biorad® testa (Minhen, Njemačka).

35 Statistička ocjena

Rezultati su prikazani kao prosječna i standardna greška (*standard error*, SE). Različite tretirane skupine su provjeravane glede znatnih razlika pomoću Mann-Whitney testa (U-test). Budući da su kontrolni miševi tretirani TDI-jem bili uspoređivani s 3 do 5 različitih skupina, broj miševa tretiranih TDI-jem je u većini pokusa udvostručen (n = 12).

40 2. Rezultati

2.1 Prodiranje ¹⁴C AWD 12-281 kroz kožu leđa miševa

U oba je pokusa izmjeren porast radioaktivnosti u puferu koji indicira prodiranje u kožu AWD 12-281. Količina radioaktivnosti izmjerena 360 minuta nakon aplikacije iznosila je oko 0,22 i 0,08 % cjelokupne aktivnosti (Slika 1).

2.2 Lokalna primjena

50 Oticanje mišjih ušiju

Kod kontrolnih je miševa uočeno prosječno povećanje od oko 30 %, 20 % i 60 % debljine uha 1 h, 5 h i 24 h nakon aplikacije TDI-ja. Kada se primijene 2 h prije izlaganja TDI-ju, lokalno primijenjeni AWD 12-281 (1 %), cilomilast (3 %) i diflorason (0,05 %) značajno su, u svim izmjerenim razmacima, inhibirali oticanje inducirano TDI-jem (Slika 2).

Kod skupina koje su korištene za testiranje terapijskog učinka AWD 12-281 uočeno je oticanje između 25 – 30 % 1 sat nakon aplikacije TDI-ja, tj. neposredno prije primjene lijeka. Nakon davanja lijeka, pet sati nakon aplikacije TDI, nije uočeno nikakvo daljnje oticanje, a različite tretirane skupine se nisu značajno razlikovale. Međutim, 24 sata nakon aplikacije, AWD 12-281 je, kao i diflorason, značajno inhibirao oticanje uha inducirano TDI-jem. Cilomilast je pokazao malo, ali ne značajno, smanjenje oticanja (Slika 3).

U posljednjem pokusu s dugotrajnom (120 dana) senzibilizacijom, aplikacija TDI-ja na uši je izazvala povećanje debljine uha od gotovo 40 % 1 sat nakon izlaganja. Lokalno primijenjeni AWD 12-281 (3 %), "terapijski" primijenjen 1 sat nakon izlaganja alergenu, izazvao je laganu inhibiciju 5 sati nakon izlaganja. U usporedbi s netretiranim skupinama, 24 sata nakon izlaganja alergenu, oticanje je gotovo u cijelosti potisnuto s AWD 12-281 (Slika 4).

Histološko ispitivanje

Histološko ispitivanje kože mišjeg uha 24 sata nakon izlaganja TDI-ju pokazuje jasan edem i pritjecanje upalnih stanica (uglavnom granulocita). AWD 12-281, cilomilast i diflorason su primjetno inhibirali rečene upalne procese (Tablica 1).

Upalni medijatori u mišjoj koži

Koncentracija citokina je općenito viša u ušima miševa kod kojih je izvršeno ponovno izlaganje 5 tjedana nakon prvog tretmana. To je očito posljedica ostataka upalnih stanica u koži uha. Ti su rezultati (TDI uspoređen s AWD 12-281 3 %) prikazani odvojeno u Tablici 2.

Došlo je do značajnog povećanja IL-4 u mišjoj koži tretiranoj s TDI-jem 24 sata nakon izlaganja (Slika 5a). 1 %-tni AWD 12-281 je pokazao lagani inhibicijski učinak, dočim su 3 %-tni AWD 12-281 (Tablica 2), cilomilast (3 %) i diflorason (0,05 %) značajno inhibirali povećanje.

Koncentracija IL-6 također je značajno povećana TDI-jem 24 sata nakon izlaganja. AWD 12-281 (1 %, 3 %), cilomilast (3 %) i diflorason (0,05 %) su značajno inhibirali rečeni odgovor. Inhibicijski učinak AWD 12-281 (3 %), cilomilasta i diflorasona bio je usporediv, dok je AWD 12-281 (1 %) iskazao tek lagani učinak (Slika 5b i Tabela 2).

MIP-2, funkcionalni homolog humanog IL-8, također je bio povećan nakon aplikacije TDI. Dok je AWD 12-281 (1 %) tek lagano smanjio rečeno povećanje, AWD 12-281 (3 %), cilomilast (3 %) i diflorason (0,05 %) su značajno smanjili povećanje koncentracije MIP-2 (Slika 5c i Tabela 2).

3. Rasprava

Provedena je studija kako bi se proučio učinak inhibitora PDE4 na oticanje mišjih ušiju izazvano TDI-jem. TDI, apliciran na kožu, izaziva uglavnom reakciju posredovanu citokinom tipa Th-2, koju obilježavaju visoke razine interleukina 4 i 10 u aktiviranim stanicama limfnih čvorova životinja izloženih TDI-ju, ali samo niske razine interferona α (Dearman i dr., 1996, Hayashi i dr., 2001). Naši vlastiti rezultati upućuju kako drugi citokini, poput IL-1 β , IL-6 i MIP-2 također sudjeluju u alergijskim/upalnim reakcijama kože na TDI. Povećanje proupalnih citokina je praćeno pritjecanjem upalnih stanica, poput neutrofila i eozinofila (Tablica 1) i distinktivnim edemom. Prema tome, oticanje uha je korisno kao funkcionalni parametar.

Izveden je test propusnosti kože na AWD 12-281. U našem se pokusu AWD 12-281 jako dobro apsorbirao i mogao je prodrijeti u pufer. Zabilježena kumulativna apsorpcija od 0,08 %, odnosno 0,22 % nakon 6 sati odgovara deset puta većoj apsorpciji u usporedbi s hidrokortizonom, mjereno za ljudsku kožu u Franzovoj difuzijskoj ćeliji (Hueber i dr., 1994).

Rezultati koji se odnose na lokalno liječenje inhibitorima PDE4 prije aplikacije TDI potvrđuju gornje rezultate (Ehinger i dr., 2000). U toj je studiji AWD 12-281 primijenjen u nižoj dozi kako bi se u obzir uzeli različiti IC₅₀ za PDE4. IC₅₀ za AWD 12-281 je oko 10 puta niži nego kod cilomilasta (Griswold i dr., 1998, Kuss i dr., 2002).

Za razliku od prethodnih rezultata, bilo je moguće postići jasniju pozitivnu kontrolu modifikacijom protokola senzibilizacije. Opetovanom uporabom protokola senzibilizacije opisanog u ovoj studiji omogućena je ponovljivost i standardizacija visokog odziva na TDI 24 sata nakon izlaganja (podaci nisu prikazani). Kao posljedica visokog odziva u toj vremenskoj točki, bili smo u mogućnosti otkriti visoke količine citokina. Kako bi se što više približili kliničkim uvjetima, odlučili smo ispitati učinke inhibitora PDE4 kod liječenja alergijske/upalne reakcije koja je već započela. Iz tog su razloga inhibitori PDE4 davani 1 sat nakon izlaganja TDI, pri čemu se početak upalnog procesa odražava u prosječnom oticanju uha u iznosu od 30 %. Iako je primijenjen u nižoj dozi (1 %) AWD 12-281 je značajno smanjio upalnu reakciju na TDI 24 sata nakon izlaganja. To je potvrđeno i studijom u kojoj su ispitani učinci dugotrajne izloženosti na TDI. Jedan od učinaka rečene dugotrajne izloženosti bilo je i pojačano oticanje uha 1 sat nakon izlaganja (Slika 4) koja je možda posljedica odgovora koji je više posredovan putem IgE (Scheerens i dr., 1999). Kada je primijenjen u većoj koncentraciji (3 %) AWD 12-281 je gotovo u cijelosti potisnuo oticanje izazvano TDI-jem u rečenoj studiji dugotrajne izloženosti (Slika 4). Histološko ispitivanje mišjih ušiju tretiranih s AWD 12-281 je pokazalo – u značajnoj opreci spram kontrolne skupine – gotovo potpunu odsutnost upalnih stanica i vaskularnog istjecanja (nije prikazano).

U svrhu ispitivanja upalnih medijatora koji su odgovorni za oticanje uha inducirano TDI-jem, izvršena su mjerenja citokina interleukina (IL) 4, IL-6 i MIP-2 u tretiranim mišjim ušima.

Prekomjerna produkcija IL-4 je očita kod akutno afektiranih lezija kože bolesnika koji pate od atopijskog dermatitisa (Hanifin i dr., 1996, Spergel i dr., 1999). Zanimao nas je utjecaj TDI na proizvodnju IL-4 u mišjoj koži. Izvori za IL-4 u koži su ograničeni, budući da keratinociti i Langerhansove stanice ne proizvode taj citokin (Shreedhar i dr., 1998, Morita i dr., 2001). Iz tog je razloga zanimljivo što je takav snažan učinak zabilježen u pozitivnoj kontroli. Očito je da su mastociti (Harvima i dr., 1994; Dastyh i dr., 1999) i pritjecanje Th₂ stanica (Shreedhar i dr., 1998) izvor IL-4 u koži. Sposobnost cilomilasta za inhibiciju IL-4 *in vivo* također je pokazana u modelu kronične kontaktne osjetljivosti izazvane oksazolonom (Griswold i dr., 1998). Nedovoljni modulatoreni učinak ADW 12-281 (1 %) posljedica je niže doze, budući 3 %-tni AWD 12-281 postiže 80 %-tnu inhibiciju koncentracije IL-4 (Tablica 2B).

Opisano je kako je razina IL-6 povišena zbog TDI *in vitro* (Matolli i dr., 1991). IL-6 izlučuju keratociti nakon upalnog poticaja (McKenzie i dr., 1990). Također je opisana inhibicija oslobađanja IL-6 putem inhibitora PDE4 kod makrofaga stimuliranih putem LPS (Kambayashi i dr., 1995).

MIP-2 je ključni citokin kod kemotakse neutrofila. Ovdje je pokazano kako se oticanje uha izazvano TDI-jem javlja zajedno sa snažnim pritjecanjem neutrofila. Inhibicijskim bi se učinkom cilomilasta, diflorasona i AWD 12-281 (3 %) moglo objasniti smanjeno pritjecanje neutrofila nakon tretmana s inhibitorom PDE4 ili glukokortikoidom.

Uzeti zajedno, gornji rezultati upućuju kako AWD 12-281, kao i cilomilast, mogu inhibirati upalne reakcije u modelu alergijskog dermatitisa. Protuupalni odgovor AWD 12-281 je pouzdan kada se isti primjenjuje lokalno, a inhibicija je očito poboljšana primjenom 3 %-tne koncentracije umjesto 1 %-tne (Slike 3 i 4). Iako je cilomilast (3 %) također pokazao inhibicijske učinke primjenom peroralnom i intraperitonealnom rutom, njemu nedostaju značajni inhibicijski učinci kada se primjenjuje nakon izlaganja TDI-ju (Slika 3). Uzimajući u obzir kako je liječenje alergijskih reakcija klinički važnije od preventivnog davanja, gornji podaci upućuju na prednost AWD 12-281 i srodnih hidroksi indolnih spojeva u liječenju kožnih oboljenja, posebice alergijskih/upalnih reakcija na koži.

Tablica 1

Histološko ispitivanje pritjecanja stanica u mišjim ušima 24 sata nakon izlaganja TDI-ju. Uzorci tkiva uzeti su iz pokusa s lokalnom primjenom (vidi Sliku 2).

netretirani		toluen-2,4-diizocijanat			
kontrola		vehikul	AWD 12-281 (1 %)	cilomilast (3 %)	diflorason (0,05 %)
Zabilježeni granulociti u dermi	-	+++	+	-/+	-/+

Tablica 2

Oticanje uha 24 h nakon izlaganja TDI-ju i prosječne vrijednosti ($\pm$ s.e. prosjek) za IL-4, IL-6 i MIP-2 (pg/400 μ g protein) u homogeniziranim mišjim ušima 24 sata nakon izlaganja TDI-ju i nakon tretmana s AWD 12-281 (3 %), ** P < 0,01.

Usporedba inhibicijskog učinka (prosječna inhibicija (%) TDI inducirane sinteze) AWD 12-281 (3 %), cilomilasta (3 %) i diflorasona (0,05 %).

A)

Izlaganje djelovanju TDI

5		Vehikul (kontrola)	AWD 12-281 (3 %)
10	Oticanje uha (%)	51 ± 7	1 ± 2 **
	IL-4	67 ± 2	12 ± 3 **
15	IL-6	89 ± 5	42 ± 6 **
	MIP-2	286 ± 39	72 ± 8 **

B)

20	Citokin	AWD 12-281 (3 %)	cilomilast (3 %)	diflorason (0,05 %)
25	IL-4	81	74	50
	IL-6	52	49	52
30	MIP-2	75	66	76

Referencije

- BUTLER, J.M., CHAN, S.C., STEVENS, S.R. & HANIFIN, J.M. (1983). Increased leukocyte histamine release with elevated cyclic AMP-phosphodiesterase activity in atopic dermatitis. J. Allergy Clin. Immunol. 71, 490-497.
- COOPER, K.D., KANK, K., CHAN, S.C. & HANIFIN, J.M. (1985). Phosphodiesterase inhibition by Ro 20-1724 reduces hyper-IgE synthesis by atopic dermatitis cells in vitro. J. Invest. Dermatol. 84, 477-482.
- DASTYCH, J., WALCZAK-DRZEWIECKA, A., WYCZOLKOWSKA, J. & METCALFE, D.D. (1999). Murine mast cells exposed to mercuric chloride release granule-associated N-acetyl-beta-D-hexosaminidase and secrete IL-4 and TNF-alpha. J. Allergy Clin. Immunol. 103, 1108-1114.
- DEARMAN, R.J., BASKETTER, D.A. & KIMBER, I (1996). Characterisation of chemical allergens as a function of divergent cytokine secretion profiles induced in mice. Toxicol. Appl. Pharmacol. 138, 308-316.
- DENT, G., GIEMBYCZ, M.A., EVANS, P.M., RABE, K.F. & BARNES, P.J. (1994). Suppression of human eosinophil respiratory burst and cyclic AMP hydrolysis by inhibitors of type IV phosphodiesterase: interaction with the beta adrenoreceptor agonist albuterol. J. Pharmacol. Exp. Ther. 271, 1167-1174.
- DYKE, H.J. & MONTANA, J.G. (2002): Update on the therapeutic potential of PDE4 inhibitors. Expert. Opin. Investig. Drugs 11, 1-13.
- EHINGER, A.M., GORR, G., HOPPMANN, J., TESLER, E., EHINGER, B. & KIETZMANN, M. (2000). Effects of the phosphodiesterase 4 inhibitor RPR 73401 in a model of immunological inflammation. Eur. J. Pharmacol. 392, 93-99.
- ENK, A.H. & KATZ, S.I., (1992). Early molecular events in the induction phase of contact sensitivity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 1398-1402.
- EZEAMUZIE, C.I. (2001). Requirement of additional adenylate cyclase activation for the inhibition of human eosinophil degranulation by phosphodiesterase IV inhibitors. Eur. J. Pharmacol. 417, 11-18.

- GAD, S.C., DUNN, B.J., DOBBS, D.W., REILLY, C. & WALSH, R.D. (1986). Development and validation of an alternative dermal sensitization test: the mouse ear swelling test (MEST). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 84, 93-114.
- 5 GANTNER, F., KUPFERSCHMIDT, R., SCHUDT, C., WENDEL, A. & HATZELMANN, A. (1997). In vitro differentiation of human monocytes to macrophages: change of PDE and its relationship to suppression of tumor necrosis factor (release by PDE inhibitors. *Br.J. Pharmacol.* 121, 221-231.
- GIEMBYCZ, M.A. (2000). Phosphodiesterase 4 inhibitors and the treatment of asthma: where are we now and where do we go from here? *Drugs* 59, 193-212.
- 10 GIEMBICZ, M.A. (2000). Cilomilast: a second generation phosphodiesterase 4 inhibitor for asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Expert Opin. Investig. Drugs* 10, 1361-1379.
- GRISWOLD, D.E., WEBB, E.F., BADGER, A.M., GORYCKI, P.D., LEVANDOSKI, P.A., BARNETTE, M.A., GROUS, M., CHRISTENSEN, S. & TORPHY, T.J. (1998). SB 207499 (Ariflo), a second generation phosphodiesterase 4 inhibitor, reduces tumor necrosis factor and interleukin-4 production in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 287, 705-711.
- 15 HANIFIN, J.M., CHAN, S.C., CHENG, S.B., TOFTE, S.J., HENDERSON, W.R., KIRBY, D.S. & WEINER, E.S. (1996). Type 4 phosphodiesterase inhibitors have clinical and in vitro anti-inflammatory effects in atopic dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* 107, 51-56.
- HARVIMA, I.T., HORSMANHEIMO, L., NAUKKARINEN, A. & HORSMANHEIMO, M. (1994). Mast cell proteinase and cytokines in skin inflammation. *Arch. Dermatol. Res.* 287, 61-67.
- 25 HATZELMANN, A. & SCHUDT, C. (2001). Anti-inflammatory and immuno-modulatory potential of the novel PDE4 inhibitor roflumilast in vitro. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 297, 267-279.
- HAYASHI, M., HIGASHI, K., KATO, H. & KANEKO, H. (2001). Assessment of potential Th1 or Th2 induction by low-molecular-weight compounds using a reverse transcription-polymerase chain reaction method: Comparison of two mouse strains, C57BL/6 and Balb/c. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 177, 38-45.
- 30 HEER, S., KAUSTERS, S. & SZELENYI, I. (1999). In-vitro effect of the selective phosphodiesterase 4 inhibitor AWD 12-281 and of glucocorticoids on lipopolysaccharide (LPS)-induced TNF(-release in diluted and undiluted human blood of healthy volunteers. *N.-S. Archiv Pharmacol.* 359 (Suppl. 3), 327.
- 35 HUEBER, F., SCHAEFER, H. & WEPIERRE, J. (1994). Role of trans-epidermal and transfollicular routes in percutaneous absorption of steroids: In vitro studies on human skin. *Skin Pharmacol.* 7, 237-244.
- KAMBAYASHI, T., JAKOB, C.O., ZHOU, D., MAZUREK, N., FONG, M. & STRASSMANN, G. (1995). Cyclic nucleotide phosphodiesterase type IV participates in the regulation of IL-10 and in the subsequent inhibition of TNF- (and IL-6 release by endotoxin-stimulated macrophages. *J. Immunol.* 155, 4909-4916.
- 40 KAROL, M.H., TOLLERUD, D.J., CAMPBELL, T.P., FABBRI, L., MAESTRELLI, P., SAETTA, M. & MAPP, C.E. (1994). Predictive value of airways hyperresponsiveness and circulating IgE for identifying types of responses to toluene diisocyanate inhalation challenge. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 149, 611-615.
- 45 KONDO, S., PASTORE, S., SHIVJI, G.M., MCKENZIE, R.C. & SAUDER D.N. (1994). Characterisation of epidermal cytokine profiles in sensitization and elicitation phases of allergic contact dermatitis as well as irritant contact dermatitis. *Lymphok. Cytok. Res.* 13, 367-375.
- 50 KUSS, H., HÖFGEN, N., EGERLAND, U., HEER, S., MARX, D., SZELENYI, I., SCHUPKE, A., GASPARIC, M., OLBRICH, M., HEMPEL, R., HARTENHAUER, H., KRONE, D., BERTHOLD, K., KRONBACH, T. & RUNDFELDT, C. (2002). AWD 12-281. *Drug Future* 27, 111-116.
- 55 MAESTRELLI, P., DI STEFANO, A., OCCARI, P., TURATO, G., MILANI, G., PIVIROTTI, F., MAPP, C.E., FABBRI, L.M. & SAETTA, M. (1995). Cytokines in the airway mucosa of subjects with asthma induced by toluene diisocyanate. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 151, 607-612.
- 60 MCKENZIE, R.C. & SAUDER, D.N. (1990). The role of keratinocyte cytokines in inflammation and immunity. *J. Invest. Dermatol.* 95 (Suppl.) 105S-107S.

SCHEERENS, H., BUCKLEY, T.L., MUIS, T.L., GARSSSEN, J., DORMANS, J., NIJKAMP, F.P. & VAN LOWEREN, H. (1999). Long-term topical exposure to toluene diisocyanate in mice leads to antibody production and in vivo airway hyperresponsiveness three hours after intranasal challenge. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 159, 1074-1080.

SCHMIDT, D.T., WATSON, N., DENT, G., RÜHLMANN, E., BRANSCHIED, D., MAGNUSSEN, H. & RABE, K.F. (2000). The effect of selective and non-selective phosphodiesterase inhibitors on allergen- and leukotriene C4-induced contractions in passively sensitized human airways. *Br. J. Pharmacol.* 131, 1607-1618.

SIKORSKI, E.E., GERBERICK, G.F., LIMARDI, L.C. (1997). Evaluation of cytokine message in the EpiDerm in vitro skin model following application of contact allergens and skin irritants. *J. Invest. Dermatol.* 108, 662.

SPERGEL, J.M., MIZOGUSCHI, E., OETTGEN, H., BHAN, A.K. & GEHA, R.S. (1999). Roles of TH1 and TH2 cytokines in a murine model of dermatitis. *J. Clin. Invest.* 103, 1103-1111.

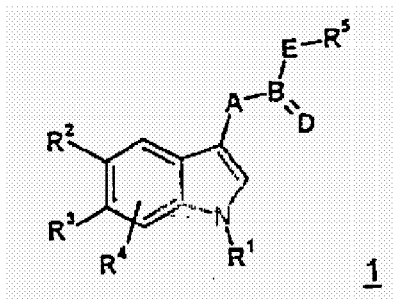
TOFOVIC, S.P., ZACCHARIA, L.C., CARCILLO, J.A. & JACKSON, E.K. (2000). Inhibition of cytokine release by and cardiac effects of type IV phosphodiesterase inhibition in early, profound endotoxaemia in vivo. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 27, 787-792.

TOMINAGA, M., KOHNO, S., TANAKA, K. & OHATA, K. (1985). Studies on toluene diisocyanate (TDI)-induced delayed type hypersensitivity. *Jpn. J. Pharmacol.* 39, 163-171.

VERGHESE, M.W., MCCONNELL, R.T., STRICKLAND, A.B., GOODING, R.C., STIMPSON, S.A., YARNALL, D.P., TAYLOR, J.D. & FURDON, P.J. (1995). Differential regulation of human monocyte-derived TNF (and IL-1) by type IV cAMP-phosphodiesterase (cAMP-PDE) inhibitors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 272, 1313-1320.

PATENTNI ZAHTEJVI

- Metoda za liječenje alergijske i/ili upalne kožne bolesti, **naznačena time**, da obuhvaća lokalnu primjenu, nakon izlaganja alergenu, terapijski učinkovite količine spoja formule (I) ili farmaceutski prihvatljive soli istoga subjekta kojemu je to potrebno:



pri čemu
R¹ je

(i) -C₁-C₁₂-alkil, ravnančani ili razgranani ili -C₂-C₁₂-alkenil, mono- ili polinezasićeni, po izboru mono- ili polisupstituiran s -OH, -SH, -NH₂, -NHC₁₋₆-alkil, -N(C₁₋₆-alkil)₂, -NHC₆₋₁₄-aril, -N(C₆₋₁₄-aril)₂, -N(C₁₋₆-alkil)(C₆₋₁₄-aril), -NHCOR⁶, -NO₂, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -O-C₁₋₆-alkil, -O-C₆₋₁₄-aril, -O(CO)R⁶, -S-C₁₋₆-alkil, -S-C₆₋₁₄-aril, -SOR⁶, -SO₃H, -SO₂R⁶, -OSO₂C₁₋₆ alkil, -OSO₂C₆₋₁₄ aril, -(CS)R⁶, -COOH, -(CO)R⁶, mono-, bi- ili tricikličkim zasićenim ili mono- ili polinezasićenim karbociklima koji imaju 3 – 14 članova prstena, mono-, bi- ili tricikličkim zasićenim ili mono- ili polinezasićenim heterociklima koji imaju 5 – 15 članova prstena i 1 – 6 heteroatoma, koji su poželjno N, O i S, pri čemu skupine C₆₋₁₄aril i karbociklički i heterociklički supstituenti mogu po izboru biti mono- ili polisupstituirani s R⁴,

(ii) mono-, bi- ili triciklički zasićeni ili mono- ili polinezasićeni karbocikl koji ima 3 – 14 članova prstena, ili mono-, bi- ili triciklički zasićeni ili mono- ili polinezasićeni heterocikl koji ima 5 – 15 članova prstena i 1 – 6 heteroatoma, koji su poželjno N, O i S, ili karbo- ili heterociklički zasićeni ili mono- ili polinezasićeni spirocikl koji ima 3 – 10 članova prstena, pri čemu heterociklički sustavi sadrže 1 – 6 heteroatoma, koji su poželjno N, O i S, po izboru mono- ili polisupstituiran s -OH, -SH, -NH₂, -NHC₁₋₆-alkil, -N(C₁₋₆-alkil)₂, -NHC₆₋₁₄-aril, -N(C₆₋₁₄-aril)₂, -N(C₁₋₆-alkil)(C₆₋₁₄-aril), -NHCOR⁶, -NO₂, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -O-C₁₋₆-alkil, -O-C₆₋₁₄-aril, -O(CO)R⁶, -S-C₁₋₆-alkil, -S-C₆₋₁₄-aril, -SOR⁶, -SO₃H, -SO₂R⁶, -OSO₂C₁₋₆ alkil, -OSO₂C₆₋₁₄ aril, -(CS)R⁶, -COOH, -(CO)R⁶, mono-, bi- ili triciklički zasićeni ili mono- ili polinezasićeni karbocikli koji imaju 3 – 14 članova prstena, mono-, bi- ili triciklički zasićeni ili mono- ili polinezasićeni heterocikli koji imaju 5 – 15 članova prstena i 1 – 6 heteroatoma,

koji su poželjno N, O i S, pri čemu skupine C₆₋₁₄aril i karbociklički i heterociklički supstituenti mogu po izboru biti mono- ili polisupstituirani s R⁴,

R⁵ je

mono-, bi- ili triciklički zasićeni ili mono- ili polinezasićeni karbocikl koji ima 3 – 14 članova prstena, ili mono-, bi- ili triciklički zasićeni ili mono- ili polinezasićeni heterocikl koji ima 5 – 15 članova prstena i 1 – 6 heteroatoma, koji su poželjno N, O i S, ili karbo- ili heterociklički zasićeni ili mono- ili polinezasićeni spirocikl koji ima 3 – 10 članova prstena, pri čemu heterociklički sustavi sadrže 1 – 6 heteroatoma, koji su poželjno N, O i S, po izboru mono- ili polisupstituiran s -OH, -SH, -NH₂, -NHC₁₋₆-alkil, -N(C₁₋₆-alkil)₂, -NHC₆₋₁₄-aril, -N(C₆₋₁₄aril)₂, -N(C₁₋₆alkil)(C₆₋₁₄aril), -NHCOR⁶, -NO₂, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -O-C₁₋₆-alkil, -O-C₆₋₁₄-aril, -O(CO)R⁶, -S-C₁₋₆-alkil, -S-C₆₋₁₄-aril, -SOR⁶, -SO₃H, -SO₂R⁶, -OSO₂C₁₋₆alkil, -OSO₂C₆₋₁₄aril, -(CS)R⁶, -COOH, -(CO)R⁶, mono-, bi- ili triciklički zasićeni ili mono- ili polinezasićeni karbocikli koji imaju 3 – 14 članova prstena, mono-, bi- ili triciklički zasićeni ili mono- ili polinezasićeni heterocikli koji imaju 5 – 15 članova prstena i 1 – 6 heteroatoma, koji su poželjno N, O i S, pri čemu skupine C₆₋₁₄aril i karbociklički i heterociklički supstituenti mogu po izboru biti mono- ili polisupstituirani s R⁴, pod uvjetom da R⁵ sadrži najmanje jedan supstituent odabran iz -F, -Cl, -Br, -I;

R², R³ i vodik ili -OH, pri čemu najmanje jedan od dva supstituenta mora biti -OH;

R⁴ je

-H, -OH, -SH, -NH₂, -NHC₁₋₆-alkil, -N(C₁₋₆-alkil)₂, -NHC₆₋₁₄aril, -N(C₆₋₁₄aril)₂, -N(C₁₋₆alkil)(C₆₋₁₄aril), -NHCOR⁶, -NO₂, -CN, -COOH, -(CO)R⁶, -(CS)R⁶, -F, -Cl, -Br, -I, -O-C₁₋₆-alkil, -O-C₆₋₁₄-aril, -O(CO)R⁶, -S-C₁₋₆-alkil, -S-C₆₋₁₄aril, -SOR⁶, -SO₂R⁶, -C₁₋₆-alkil, pri čemu svaki aril ili alkil mogu biti mono- ili polisupstituirani s -OH, -F, -Cl, -Br, -I;

R⁶ je

-H, -NH₂, -NHC₁₋₆-alkil, -N(C₁₋₆-alkil)₂, -NHC₆₋₁₄aril, -N(C₆₋₁₄aril)₂, -N(C₁₋₆alkil)(C₆₋₁₄aril), -O-C₁₋₆-alkil, -O-C₆₋₁₄-aril, -S-C₁₋₆-alkil, -S-C₆₋₁₄aril, -C₁₋₁₂-alkil, ravnolančani ili razgranani, -C₂₋₁₂-alkenil, mono- ili polinezasićeni, ravnolančani ili razgranani, mono-, bi- ili triciklički zasićeni ili mono- ili polinezasićeni karbocikli koji imaju 3 – 14 članova prstena, mono-, bi- ili triciklički zasićeni ili mono- ili polinezasićeni heterocikli koji imaju 5 – 15 članova prstena i 1 – 6 heteroatoma, koji su poželjno N, O i S;

A je ili veza, ili

-(CH₂)_m-, -(CH₂)_m-(CH=CH)_n-(CH₂)_p-, -(CHOZ)_m-, -(C=O)-, -(C=S)-, -(C=N-Z)-, -O-, -S-, -NZ-, pri čemu m, p = 0-3, a n = 0-2, a

Z je

-H, ili -C₁₋₁₂-alkil, ravnolančani ili razgranani, -C₂₋₁₂-alkenil, mono- ili polinezasićeni, ravnolančani ili razgranani, mono-, bi- ili triciklički zasićeni ili mono- ili polinezasićeni karbocikli koji imaju 3 – 14 članova prstena, mono-, bi- ili triciklički zasićeni ili mono- ili polinezasićeni heterocikli koji imaju 5 – 15 članova prstena i 1 – 6 heteroatoma, koji su poželjno N, O i S;

B je ili ugljik ili sumpor, ili (-S=O)-;

D je oksigen sumpor, CH₂ ili N-Z, gdje, ako je B ugljik, D je S ili CH₂;

E je veza, ili

-(CH₂)_m-, -O-, -S-, -(N-Z)-, gdje m i Z imaju već gore opisano značenje.

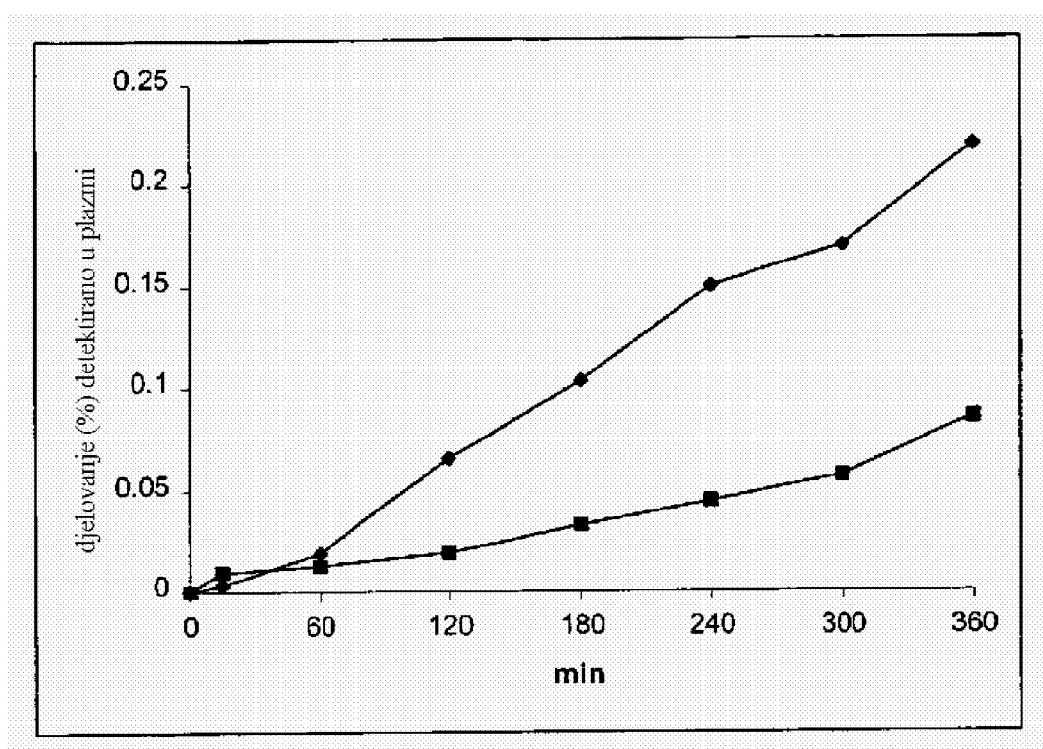
- Metoda prema patentnom zahtjevu 1, **naznačena time**, da je R⁵ odabran iz monociklički zasićenih ili mono- ili polinezasićenih karbocikala i heterocikala koji imaju najmanje jedan halogen kao supstituent.
- Metoda prema patentnom zahtjevu 2, **naznačena time**, da je R⁵ odabran iz monocikličkih aromatskih karbocikala i heterocikala koji imaju najmanje jedan halogen kao supstituent.
- Metoda prema patentnom zahtjevu 3, **naznačena time**, da je R⁵ pridinski prsten koji ima najmanje jedan halogen kao supstituent.
- Metoda prema patentnom zahtjevu 3, **naznačena time**, da je R⁵ fenilni prsten koji ima najmanje jedan halogen kao supstituent.

6. Metoda prema patentnom zahtjevu 1, **naznačena time**, da je R^1 odabran iz C_1 - C_{12} alkil, koji je po izboru supstituiran.
7. Metoda prema patentnom zahtjevu 1, **naznačena time**, da je R^1 odabran iz monociklički zasićenih ili mono- ili polinezasićenih karbocikla ili heterocikla, koji su po izboru supstituirani.
- 5 8. Metoda prema patentnom zahtjevu 1, **naznačena time**, da je R^2 OH, a R^3 je H.
9. Metoda prema patentnom zahtjevu 1, **naznačena time**, da je A odabran iz $-(C=O)-$ i $-(CHOH)-$.
10. Metoda prema patentnom zahtjevu 1, **naznačena time**, da B predstavlja C.
11. Metoda prema patentnom zahtjevu 1, **naznačena time**, da D predstavlja O.
12. Metoda prema patentnom zahtjevu 1, **naznačena time**, da E predstavlja $-(N-H)-$.
- 10 13. Metoda prema patentnom zahtjevu 1, **naznačena time**, da je spoj (I) (N-3,5-dikloro-4-piridinil)-2-[1-(4-fluorobenzil)-5-hidroksi-1H-indol-3-il]-2-oksoacetamid.
14. Metoda prema bilo kojem od zahtjeva 1 – 13, **naznačena time**, da je alergijska bolest alergijski dermatitis.
15. Metoda prema bilo kojem od zahtjeva 1 – 14, **naznačena time**, da se spoj primjenjuje na područje kože koja je zahvaćena bolešću.
- 15 16. Metoda prema bilo kojem od zahtjeva 1 – 15, **naznačena time**, da se spoj primjenjuje do 48 sati nakon izlaganja alergenu.
17. Metoda prema bilo kojem od zahtjeva 1 – 16, **naznačena time**, da se spoj (I) ko-primjenjuje s najmanje jednim drugim farmaceutskim sredstvom.
18. Metoda prema patentnom zahtjevu 17, **naznačena time**, da je drugo farmaceutsko sredstvo lijek koji stimulira proizvodnju cAMP.
- 20 19. Metoda prema patentnom zahtjevu 18, **naznačena time**, da je drugo farmaceutsko sredstvo kortikosteroid.

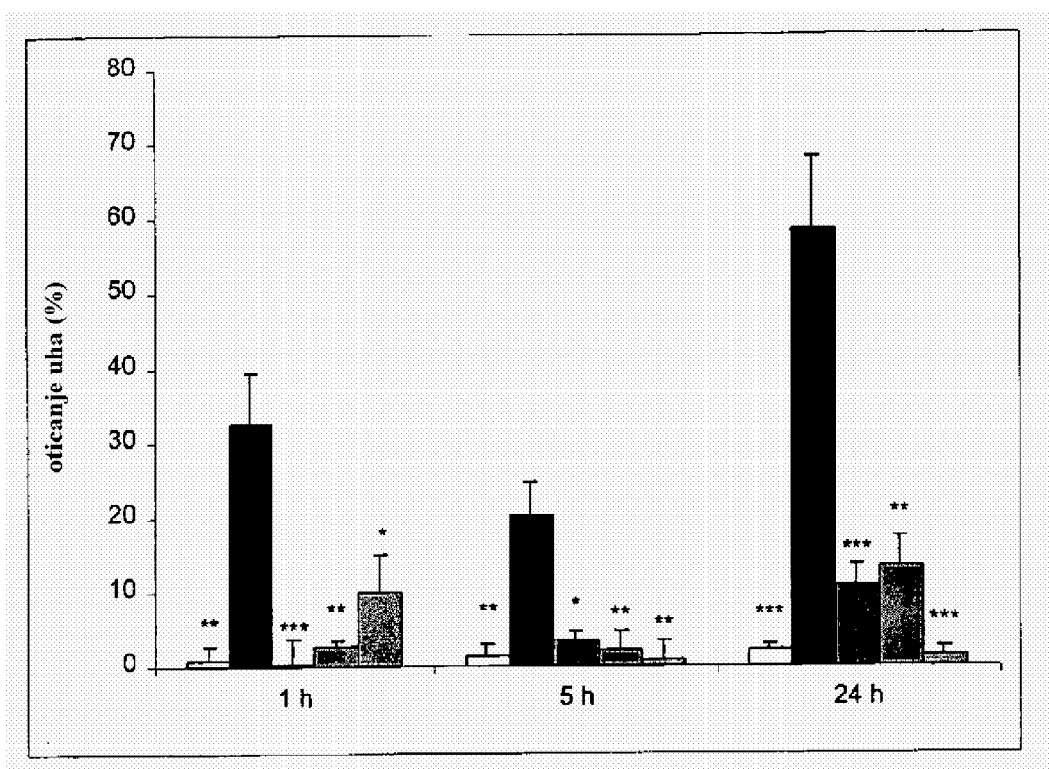
SAŽETAK

25

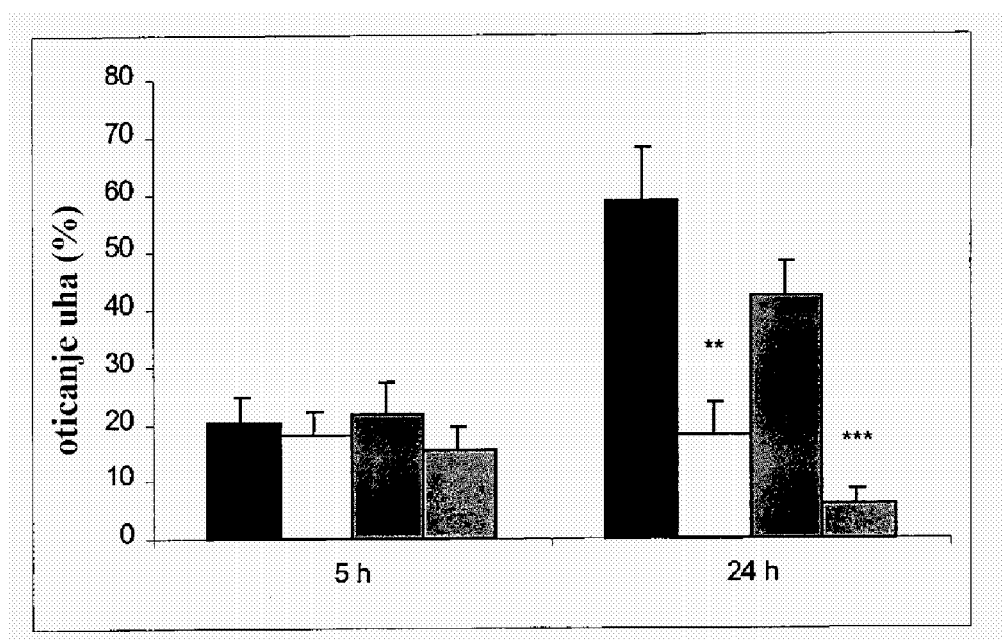
Predmetni izum se odnosi na metodu za liječenje upalnih i/ili alergijskih kožnih bolesti i sastoji se od lokalne primjene supstituiranog hidroksi indola.



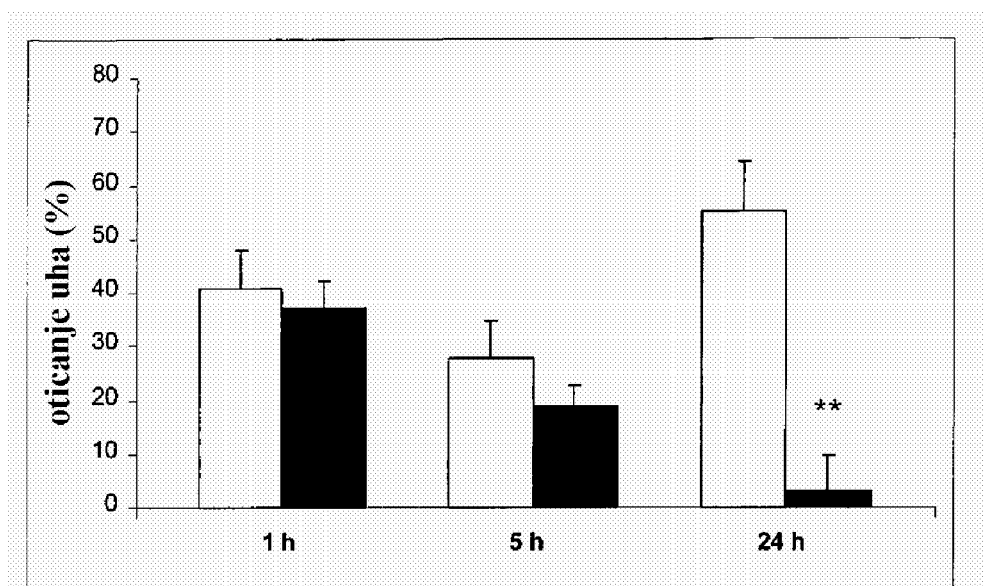
SLIKA 1



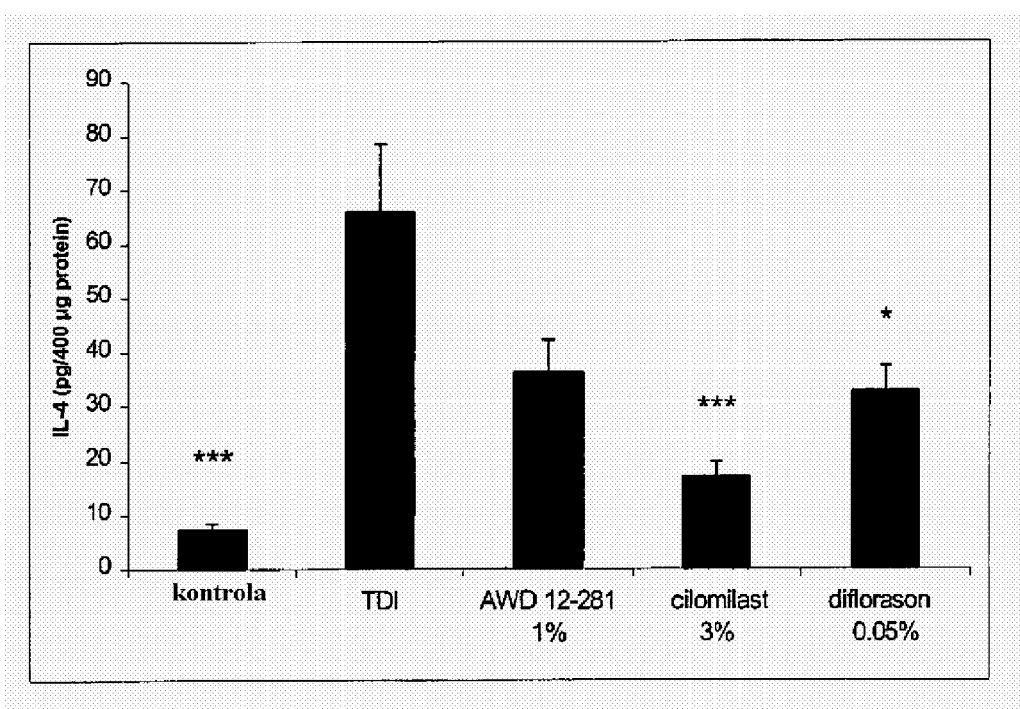
SLIKA 2



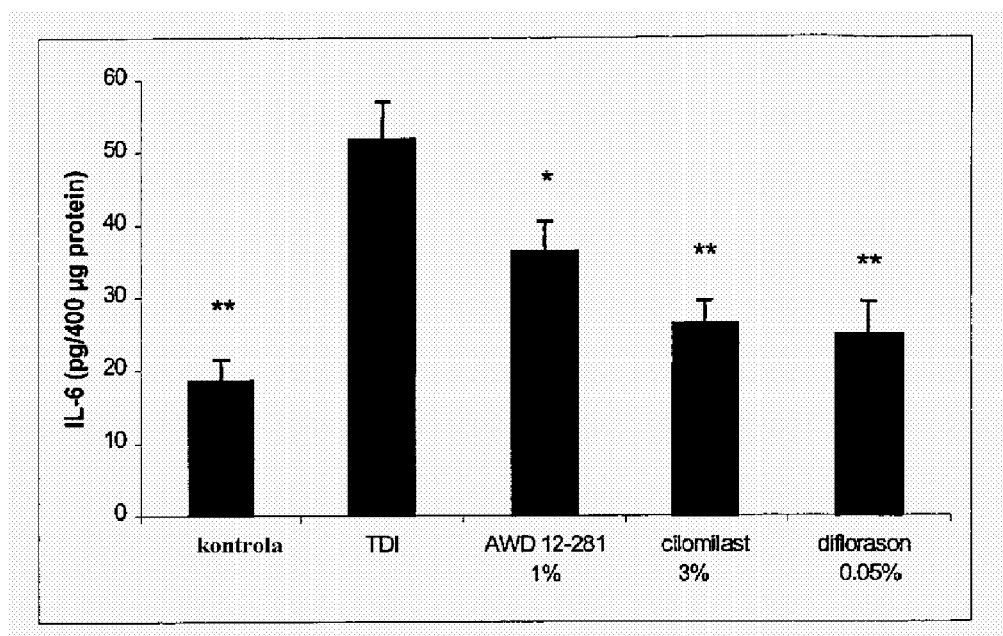
SLIKA 3



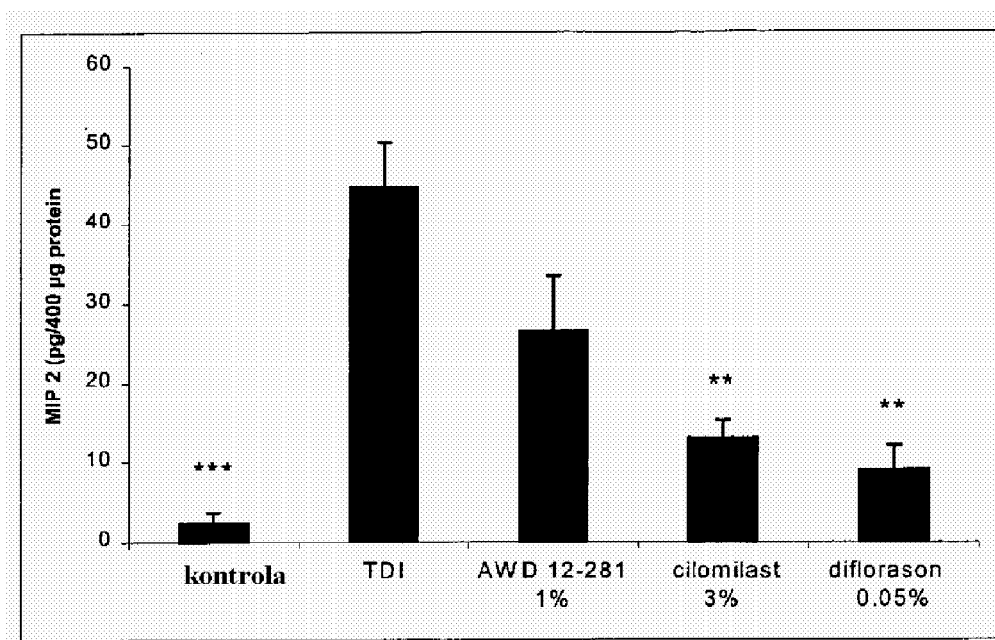
SLIKA 4



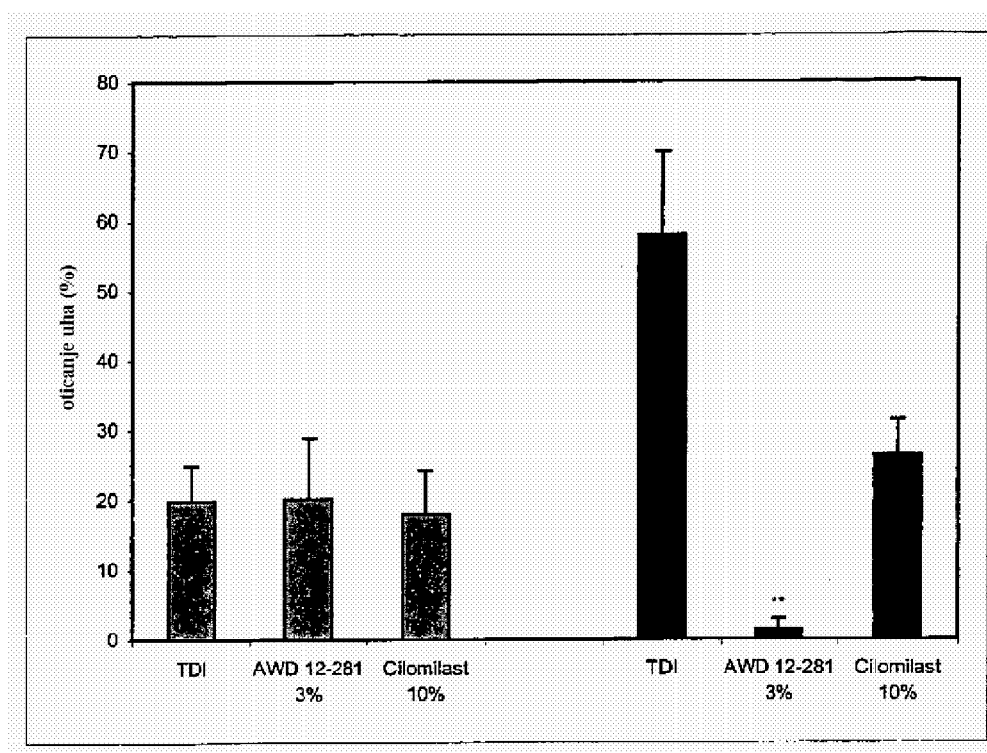
SLIKA 5a



SLIKA 5b



SLIKA 5c



SLIKA 6