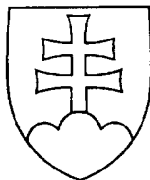


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

284 334

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁷:

A61K 31/18
C12N 9/02

- (21) Číslo prihlášky: **671-99**
(22) Dátum podania prihlášky: **19. 11. 1997**
(24) Dátum nadobudnutia účinkov patentu: **4. 2. 2005**
Vestník ÚPV SR č.: **2/2005**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **60/033 332, 08/831 402**
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **21. 11. 1996, 1. 4. 1997**
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **US, US**
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **18. 1. 2001**
Vestník ÚPV SR č.: **01/2001**
(47) Dátum sprístupnenia patentu verejnosti: **27. 12. 2004**
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **PCT/US97/21484**
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **WO98/22104**

(73) Majiteľ: **The Mount Sinai School of Medicine of the City University of New York, New York, NY, US;**

(72) Pôvodca: **Pasinetti Giulio Maria, New York, NY, US;**
Alsen Paul S., Scarsdale, NY, US;

(74) Zástupca: **Bušová Eva, JUDr., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Farmaceutická kompozícia na liečenie neurodegeneratívnej choroby**

(57) Anotácia:
Použitie nimesulidu na výrobu farmaceutickej kompozície na liečenie neurodegeneratívnej choroby, vrátane Alzheimerovej choroby, epilepsie a amyotrofickej laterálnej sklerózy.

SK 284334 B6

Oblasť techniky

Vynález sa týka farmaceutickej kompozície na liečenie neurodegeneratívnej choroby, vrátane Alzheimerovej choroby, epilepsie a amyotrofickej laterálnej sklerózy.

Doterajší stav techniky

Alzheimerova choroba

Sporadická Alzheimerova choroba je závažné neurodegeneratívne ochorenie spojené so starnutím. Riziko prepuknutia choroby sa zvyšuje exponenciálne vo veku 65 až 85 rokov s tým, že sa zdvojnásobuje každých päť rokov. Z histologickej stránky je charakteristickým znakom Alzheimerovej choroby ukladanie amyloidu v senilných plakoch a v stenách mozgových ciev, prítomnosť neurofibrilárnych pletencov (tangles) a neurodegradácie. Etiológia Alzheimerovej choroby však nie je dobre preštudovaná. Predpokladá sa, že úlohu zohrávajú genetické faktory vrátane trizómie 21, mutáciou génu kódujúceho APP (amyloid β -protein precursor), génov presenilin-1 (PS1) a presenilin-2 (PS2) a prítomnosti apolipoproteínovej 4 alely E typu (Younkin, 1995, *Ann. Neurol.* 37: 287 - 88, Lendon et al., 1997, *JAM A* 277: 825). Niekoľko štúdií ukázalo, že β -amyloid indukuje apoptózu pri neuronálnych kultúrach (Loo et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 7951 - 7955, Li et al., 1996, *Brain Res.* 738: 196 - 204). Takáto indukcia môže zahŕňať priame rané génové proteíny (immediate early gene proteins) c-jun a fos (Anderson et al., 1995, *J. Neurochemistry* 64: 1487 - 1489, Anderson et al., 1996, *J. Neurosci.* 16: 1710 - 1719).

Bola prednesená teória, že apoptóza môže byť zahrnutá v patogenéze Alzheimerovej choroby (Smale et al., 1995 *Exp. Neurol.* 133: 225 - 230, Anderson et al., 1996, *J. Neurosci.* 16: 1710 - 1719, Anderson et al., 1994, *Experimental Neurology* 125: 286 - 295). Uvažuje sa taktiež nad zápalovým mechanizmom (Pasinetti, 1996, *Neurobiol. Ageing.* 17: 707 - 716). Tento mechanizmus podporujú pozorovania, pri ktorých sa v sére pacientov trpiacich Alzheimerovou chorobou nachádza zvýšená hladina proteínov akútnej fázy (acute phase proteins) a že sa ukladajú v amyloidných plakoch. Aktivované mikrogliové bunky majú tendenciu sa nachádzať v blízkosti senilných plakov a látky komplexu boli nájdené okolo dystrofických neuritov a neurofibrilárnych pletencov (Aisen and Davis, 1994, *Am. J. Psychiatry* 151: 1105 - 1113). Protizápalové látky boli navrhnuté ako potenciálne terapeutické prostriedky (Aisen et al., 1996, *Dementia* 7: 201 - 206, McGeer et al., 1996, *Neurology* 47: 425 - 432). Ako látky na ošetrovanie takýchto zápalov boli selektívne inhibítory enzýmu cyklooxygenázy - 2, z dôvodov, vo väčšine prípadov menšieho množstva nepriaznivých vedľajších efektov, zlepšované (International Publication No. WP 94/13635, Merck Frosst Canada Inc.). Do predloženia tohto vynálezu sa však neverilo, že by sa tieto látky mohli použiť na potlačenie nezápalových aspektov neurodegenerácie v súvislosti s Alzheimerovou chorobou a pod.

Cyklooxygenáza - 2

Cyklooxygenázy (COXs) sú enzýmy, ktoré katalyzujú vznik prostaglandínu (PG)-H₂ z arachidónovej kyseliny (AA). PG-H₂ je ďalej metabolizovaný na fyziologicky aktívne prostaglandíny (napr. PG-D₂, PG-E₂ a PG-F₂ α), prostacyklín (PG-I₂) a tromboxány. Špecifické prostaglandíny majú široké, často protichodné vplyvy na rôzne tkanivá. Napr. PG-I₂ a PG-E₂ sú silné vazodilatátory, ktoré mô-

žu prispievať k zápalovej reakcii, aj keď PG-F₂ je vazokonstriktor.

Existujú dve izoformy COX, COX-1 a COX-2, ktoré aj keď sa predpokladá ich fyziologická rozdielnosť, majú podobnú aminokyselinovú sekvenciu i enzymatickú funkciu. COX-1 je konštitutívne exprimovaná na rozdielnej úrovni v rôznych typoch buniek. COX-2 nie je konštitutívne exprimovaná a je všeobecne nedetegovateľná v normálnych periférnych tkanivách (Kujubu et al., 1991, *J. Biol. Chem.* 266: 12866 - 12872; O'Banion et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 4888 - 4892). Expresia COX-2 je indukovateľná (napr. mitogénmi) a bolo zistené, že hladina mRNA COX-2 rýchlo rastie pri reakcii na glukokortikoidy. Po aplikácii rovnakých faktorov zostáva hladina mRNA COX-1 v podstate nezmenená, z čoho sa vyvodzuje, že COX-2 je izoforma, ktorá sprostredkovaná zápal (Cao et al., 1995, *Brain Res.* 697: 187 - 196; O'Banion et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 4888 - 4892).

Nedávne dôkazy naznačujú, že COX-2 môžu zohrávať úlohu v mechanizme prežitia buniek a bunkovej adhézie v periférnych bunkách (Lu et al., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92: 7961 - 7965; Tsujii et al., 1995, *Cell* 83: 493 - 501). Tsujii a spolupracovníci ukázali, že epiteliálne bunky pozmenené tak, aby exprimovali zvýšenú hladinu COX-2 boli odolné proti apoptóze indukovanej butyrátom, mali zvýšenú expresiu proteínu BCL2 a zníženú hladinu receptora transformačného rastového faktora β 2 (Tsuiji et al., 1995, *Cell* 83: 493 - 501). Lu a spolupracovníci objavili, že nesteroidné protizápalové látky môžu indukovať apoptický mechanizmus zahrnujúci COX systém.

Úloha COX-1, COX-2 a syntézy PG v normálnom mozgu a v kontexte Alzheimerovej nebola dodnes úplne charakterizovaná. Dôležitosť prostaglandínov vo fyziológii mozgu môže byť nezávislá od zápalového mechanizmu. V mozgu boli receptory prostaglandínov identifikované v hypothalamu, thalamu a limbickom systéme (Watanabe et al., 1989, *Brain Res.* 478: 143 - 148). Prostaglandíny zohrávajú úlohu v mechanizme sekrécie hormónov v hypothalamo-hypofýze (Kinoshita et al., 1982, *Endocrinol.* 110: 2207 - 2209), v regulácii teploty a spánkového cyklu (Hayaishi, 1988, *J. Biol. Chem.* 263: 14593 - 14596). Nedávne práce dokazujú, že mRNA COX-2 je exprimovaná a regulovaná v mozgu potkanov synaptickou aktivitou aglukokortikoidov (Adams et al., 1996, *J. Neurochem.* 66: 6 - 13; Kaufmann et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 2317 - 2321; Yamagata et al., 1993, *Neuron* 11: 371 - 386). Tieto štúdie naznačujú, že COX-2 je v mozgu regulovaná ako okamžitý „skorý“ a gén a predpokladajú, že prostaglandíny môžu byť dôležité v transsynaptickej signalizácii a dlhodobej reakcii. Chang a spolupracovníci (1996, *Neurobiol. of Aging* 17: 801 - 808) uvádzajú, že expresia mRNA COX-2 je pri Alzheimerovej chorobe znížená.

Podstata vynálezu

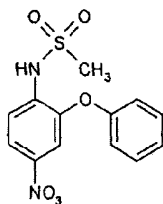
Predkladaný vynález sa vzťahuje na použitie nimesulidu a štruktúrne podobných látok k prevencii a liečeniu neurodegeneratívnych stavov. Je založený, aspoň sčasti, na objave, že 1. expresia COX-2 je pri neurodegeneratívnych modeloch zvýšená v neurónoch a nie v gliových bunkách (čo je v súlade s nezápalovým mechanizmom) a 2. nimesulid má neuroprotektívne vlastnosti proti β -amyloidom indukovanej smrti neuronálnych buniek. Toto neskoršie zistenie je veľmi neočakávané v súvislosti so schopnosťou inhibítorov COX zvýšiť apoptózu iných než neuronálnych buniek. Bez akéhokoľvek viazania sa na určitú teóriu je

zjavné, že nimesulid inhibuje nezápalový mechanizmus neurodegenerácie.

Predmetom vynálezu je použitie nimesulidu na výrobu farmaceutickej kompozície na liečenie neurodegeneratívnej choroby, vrátane Alzheimerovej choroby, epilepsie a amyotrofickej laterálnej sklerózy.

Predkladaný vynález sa teda vzťahuje na použitie selektívneho inhibítora cyklooxygenázy (COX-2) nimesulidu a štruktúrne príbuzných látok k prevencii a (alebo) liečbe neurodegeneratívnych stavov. Vynález je založený, prinajmenšom sčasti, na objave, že sa spoločne s neuronálnymi léziami vyvolanými kyselinou kainikovou (kainic acid) a s indukciou neuronálnej apoptózy (ako bolo zistené v *in vitro* systémoch, pozri príklady uskutočnenia vynálezu) zvyšuje expresia COX-2. Oproti predošlým pozorovaniam, že COX-2 má primárnu úlohu pri zápaloch a môže mať úlohu v zápalovej zložke neurodegenerácie (napr. v súvislosti s Alzheimerovou chorobou), bolo ďalej objavené, že v ľudskom mozgu je zrejme expresia COX-2 obmedzená na neuróny a nie na gliové bunky (v prípade, že by platil zápalový mechanizmus, predpokladala by sa expresia práve v gliových bunkách - pozri príklady uskutočnenia vynálezu). Boli pozorované korelácie medzi expresiou COX-2 a charakteristickými patologickými zmenami (amyloidné plaky) spojenými s Alzheimerovou chorobou. Ďalej bolo ukázané, že nimesulid má neuroprotektívne účinky oproti β -amyloidom indukovanej bunkovej smrti pri neuronálnych kultúrach. Vo svetle týchto objavov, podľa tohto vynálezu môže byť nimesulid a príbuzné látky použité k zásahom do procesu apoptickej neuronálnej bunkovej smrti spojené s Alzheimerovou chorobou a ďalšími neurodegeneratívnymi stavmi. Bez väzby na akúkoľvek špeciálnu teóriu môže byť účinok nimesulidu a príbuzných látok sprostredkovaný znížením apoptických účinkov oxidatívneho stresu.

Termín „nimesulid“, ako je tu použitý, sa vzťahuje na 4-nitro-2-fenoxymetansulfonaninidu, ktorého štruktúra je zobrazená ďalej vo vzorci (1):



Látky, ktoré sú považované za štruktúrne príbuzné, sú látky majúce podobnú bicyklickú štruktúru a ktoré selektívne inhibujú COX-2. Napríklad substituenty, analógy a enantioméry nimesulidu sú považované za štruktúrne príbuzné látky. Ďalším príkladom môže byť to, že štruktúrne príbuzné látky môžu súťažiť s nimesulidom o väzbu na COX-2 alebo sa môžu viazať na rovnaké miesto COX-2 ako bolo stanovené kryštalograficky. Okrem toho je nimesulid konjugovaný s inou látkou taktiež považovaný za štruktúrne príbuznú látku, ako je tu definovaná.

Nimesulid alebo štruktúrne príbuzná látka môže byť podávaná tak, aby bola zaistená účinná koncentrácia v nervovom systéme objektu, ktorý je ošetrovaný. Účinná koncentrácia je tu definovaná ako koncentrácia, ktorá inhibuje neuronálnu bunkovú smrť z minimálne 20 %. V špecifických, nelimitujúcich uskutočneniach vynálezu je koncentrácia nimesulidu aspoň 1 nanomolárna a lepšie 1 mikromolárna v oblasti neuronálnych buniek, ktoré majú byť ošetrované. Vhodné je, aby koncentrácia nimesulidu bola niž-

šia než 10^{-3} molárna (s cieľom obmediť toxické účinky nimesulidu). V tak špecifických realizáciách vynálezu ako je ošetrovanie neurodegeneratívnych stavov, ktorými je Alzheimerova choroba, koncentrácia nimesulidu v hippocampickej formácii postihnutej by mala byť aspoň 1 pikomolárna, vhodnejšie aspoň 1 nanomolárna a ešte lepšie 1 mikromolárna. Zodpovedajúca koncentrácia v sére musí byť najmenej 10 pikomolárna, lepšie 10 nanomolárna a ešte lepšie 10 mikromolárna. Ekvivalentné množstvo štruktúrne príbuzných látok (prispôsobené na vyrovnanie rozdielov v účinnosti) môže byť taktiež použité.

Nimesulid alebo štruktúrne príbuzné látky môžu byť podávané akýmkoľvek spôsobom, ktorým bude dosiahnutá požadovaná účinná koncentrácia. Vhodné spôsoby podávania zahŕňajú napríklad orálne, intravenózne, subkutánne, intramuskulárne, transdermálne a intratekálne.

Nimesulid alebo štruktúrne príbuzné látky môžu byť obsiahnuté vo vhodnom farmaceutickom nosiči. Zloženie môže zaistiť predĺžené uvoľňovanie.

Nimesulid môže byť podávaný napr. (nie však limitujúcim spôsobom) orálne v dávkach 2 - 800 mg/deň, vhodnejšie 50 - 400 mg/deň, najvhodnejšie 200 mg/deň.

Neurodegeneratívne stavy, ktoré môžu byť liečené podľa vynálezu zahŕňajú (ale nie sú tým limitované) na Alzheimerovu chorobu, Parkinsonovu chorobu, neurodegeneráciu spojenú so záchvatom, amyotropickú laterálnu sklerózu, poranenie miechy a ďalšie choroby, kde stavy nie sú bežne považované za spôsobené zápalom alebo autoimúnnou chorobou.

Prehľad obrázkov na výkresoch

Obr. 1: Miestna expresia mRNA COX-2 v kontrolnom nepoškodenom mozgu samca potkana. Expresia mRNA COX-2 bola stanovená *in situ* hybridizáciou a vizualizovaná X-ray autorádiografiou. Skratky: SC, dentate gyrus - „zúbkované brázdy“; CA1, CA2 a CA3 podoblasti neuronálnej pyramídovej vrstvy vznikajúceho hippocampu; PAC, mozgová kôra; PYC, pyrimorfny kortex; AC, amygdaloidný komplex; THAL, ventroposterior thalamic nucleic. Upravené podľa ilustrácie 24, Paxinos and Watson, 1986 (The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, Academic Press, NY).

Obr. 2: Regulácia expresie mRNA COX-2 v mozgu potkana. Optické hustoty boli kvantifikované z autorádiografických obrázkov. Skratky pozri skôr a nasledujúce: PYC/AC, pyrimorfny a amygdaloidný komplex, v ktorom bola expresia mRNA COX-2 kvantifikovaná ako v jednej oblasti mozgu. N=5-8 na jeden časový bod.

Obr. 3: Vplyv na expresiu mRNA COX-2 počas reakcie na záchvat indukovaný KA. Mikrografy boli vytvorené z autorádiografických obrázkov. Zmeny v anatomickej distribúcii pozri obr. 1. Control-kontrola, nepoškodené potkany (injektovaný nosič); KA 8H, potkany ošetrované KA osem hodín pred usmrtením, postnatálne dni p-7, p-14 a p-21.

Obr. 4 A-D: Časová závislosť zmien mRNA COX-2 v mozgu potkana počas reakcie na aplikáciu KA: vplyvy a lokálne zmeny v distribúcii. Optické hustoty boli kvantifikované z autorádiografických obrázkov. Dáta sú vyjadrené ako priemery plus-minus smerodajná odchýlka, N=4-6 na skupinu. *P<0,01 vs skupina OH (skupina ktorej bol injektovaný fyziologický roztok); 4h, 8h, 16h, 30h, 120h, čas v hodinách po začiatku záchvatu indukovaného KA.

Obr. 5: A-D: Vplyv na distribúciu expresie mRNA COX-2 a indukcie v hippocampu potkana. mRNA COX-2

v P21 (A, B) a dospelom (C, D) hippocampe. Stanovené *in situ* hybridizáciou a vizualizáciou emulznou autorádiografiou s použitím darf-field osvetlenia. Na A a C, expresia mRNA COX-2 pri kontrolných potkanoch (injektovaný nosič); na B a D, mRNA COX-2 osem hodín po začiatku záchvatu indukovaného KA. Šípky ukazujú na povrchovú vrstvu DG (stratum granulosum). Meradlo = 200 μ m.

Obr. 6: Selektívna indukcia hippocampickej mRNA COX-2 (mRNA COX-1 nebola indukovaná) počas reakcie na záchvat indukovaný KA. Stanovené pomocou hybridizácie na blote. CTL, kontrolné potkany injektované fyziologickým roztokom; KA, potkany ošetrované KA 12 hodín po poškodení.

Obr. 7: A-I: COX-2 a apoptóza indukovaná KA v dospelom mozgu potkanov. Na (A, B), expresia mRNA COX-2 v hippocampických pyramídálnych neurónoch CA3 kontrolných potkanov a potkanov ošetrovaných KA; na (C) subregión CA3 hippocampického útvaru pri potkanoch poškodených KA zobrazujúca neuróny s apoptickými vlastnosťami (šípky). Na (D,E), expresia mRNA COX-2 v prípade pyriformu cortexu kontrolných potkanov a potkanov ošetrovaných KA. Na (F), šípky smerujú k apoptickým bunkám pyriformného cortexu potkanov ošetrovaných KA. Na (G, H), expresia mRNA COX-2 v bunkách amygdaloidného komplexu kontrolných potkanov a potkanov ošetrovaných KA. Na (I), šípky smerujú k apoptickým bunkám amygdaloidného komplexu potkanov ošetrovaných KA. mRNA COX-2 bola stanovená *in situ* hybridizáciou a vizualizovaná emulznou autorádiografiou s použitím „temného“ osvetlenia. *In situ* značenie 3' konca bolo použité na stanovenie apoptických vlastností nasledujúceho ošetrovania KA. Meradlo: na A, B, D, E, G a H = 200 μ m; na C, F a I = 40 μ m.

Obr. 8: A-D: Imunocytochemické dôkazy exprese a regulácie neuronálnej COX-2 v reakcii na glutamát *in vitro*. COX-2 like imunoreaktivita monotypických kultúr potkaních primárnych hippocampických neurónov. Na (A) kontrola, na (B) po 12 hodinách expozície glutamátu. Na (C,D) kontrolné bunky a bunky ošetrované glutamátom po imunoreakcii s imunoabsorbantmi COX-2 protilátkami. Meradlo = 50 μ m.

Obr. 9: A-C: Vplyv nimesulidu na endotoxínom sprostredkovanú sekréciu cytokínov a nitritov v gliách. Vplyv nimesulidu (10-9) na syntézu a sekréciu TNF (A), NO intermediátov (Griessova reakcia) (B) a PGE₂ (C) ako bolo stanovené v nesmrteľných BV2 mikrogliových bunkách. Priemer plus-minus štandardná odchýlka, n=8-10 na skupinu. Lipopolysacharidy („LPS“) = 5 μ m/ml. LPS a nimesulid boli pridané spolu ku kultúram. Čas inkubácie 24 hodín. Na štatistické spracovanie použitá ANOVA, p<0,05.

Obr. 10: A-E: Časové zmeny proteínu COX-2 v bunkách P19 počas reakcie na podmienky vedúce k apoptickej smrti. Na (A), kvantitatívna analýza indukcie COX-2 v bunkách P19, n=4-6 na skupinu, p<0,05 versus t=0. Na (B), zmeny boli stanovené western analýzou s použitím chemiluminiscenčnej detekcie. Na (C,D), morfológické sledovanie apoptických jadier buniek P19 bolo uskutočnené pomocou Hoechst H33258 24 hodín po odobratí séra (a nahradení médiom N2). Na (E), elektroforetický profil DNA ukazujúci DNA rebríčkovitú (laddering) degradáciu bol stanovený 14 hodín po odňatí séra (prúžok 1 - kontrolné bunky v t=0; prúžok 2, DNA laddering 14 hodín po vybratí séra; prúžok 3, markery DNA). Polyklonálne protilátky proti COX-2 použité v týchto štúdiách sú opísané v príkladoch uskutočnenia vynálezu. Špecifické protilátky proti COX-2 rozpoznali v celkových homogenátoch v ľudskom mozgu a mozgu potkanov a myši dva hlavné prúžky majúce odhadnutú molekulovú váhu 70 a 65 kDa.

Obr. 11 A-E: Regulácia COX-2 počas reakcie na oxidatívny stres neuronálnych buniek SH-SY5Y spôsobený A β 1-40. (A) Stĺpik grafov zobrazuje relatívne množstvo prítomnej imunoreaktivity COX-2 vzhľadom na kontrolu („CTL“). Meranie imunoreaktivity bolo odvodené z dát zobrazených na obr. (B). (B) Western blot proteínov pripravených z kontrolných buniek SH-SY5Y a buniek vystavených pôsobeniu A β peptidov. (D) Imunoblot zobrazený na obr. (B) rozdelený na prúžky s následným použitím protilátok proti aktínu. (E) Kultúry SH-SY5Y boli sledované z hľadiska apoptických mechanizmov.

Obr. 12: Ochranný vplyv nimesulidu proti neurotoxite vyvolanej A β 1-40. Stanovené meraním MTT s použitím neuronálnych buniek SH-SY5Y.

Skratky: CTL - kontrola; NEM/nimesulid; A- β -amyloid(1-40). *P<0,01 verus CTL, **P<0,05 verus CTL.

Obr. 13: Mikrofotografie zobrazujúce selektívnu indukciu imunoreaktivity COX-2 v temporálnom kortexe AD a k tomu vhodne starej neurologickej kontrole. Mikrofotografie zobrazujúce selektívnu indukciu imunoznačenia COX-2 v oblastiach šedej hmoty bohatej na neuróny („gm“), ale nie v oblasti bielej hmoty bohatej na gliu („wm“).

Obr. 14: A-D: Imunoznačenie COX-2 neurónov v prednej kôre AD mozgu a kolokalizácia imunoznačenia COX-2 s AD plakmi v prednej kôre AD mozgu. Na (A, B) je zobrazené imunoznačenie COX-2 neurónov AD (A, nízka energia; B, vysokoenergetické zväčšenie). Na C je zobrazené imunoznačenie difúzných plakov. Na (D) je zobrazená COX-2 v neuritických plakoch ako bolo stanovené imunoznačením A β v susediacich vrstvách tkaniva.

Obr. 15: Expresia COX-2 v prednej kôre mozgov. (A) Northern bloty mRNA COX-2 a COX-1 v AD prednej kôre vzťahujúcej ku kontrolám+ kvantitatívna analýza dát je na obr. (B). (C) Western bloty proteínu COX-2 v AD prednej kôre a kontrole; kvantitatívna analýza dát je na obr. (D).

Obr. 16: Regulácia mRNA COX-2 v neurónoch predného a zadného miechového rohu miechy of ALS a neurologických kontrol. Autorádiografické obrázky boli vizualizované röntgenovým filmom. Šípka smerujúca na ventrálny roh ukazuje intenzívnu indukciu signálu mRNA COX-2 v prípade ALS.

Obr. 17 A-D: Zvýšenie mRNA COX-2 v biopsii ľudskej kortikálnej epileptickej ako bolo stanovené pomocou *in situ* hybridizácie. Autorádiografické obrázky boli vizualizované pomocou röntgenového filmu. Šípky smerujúce smerom ku kortikálnym vrstvám ukazujú intenzívny signál mRNA COX-2 v epileptickej mozgu (A) a v kontrole (B). Časť (C) a (D) ukazuje analýzy zobrazených dát vzťahujúcich sa k hladinám mRNA COX-2 a COX-1.

Obr. 18: Zosilnenie aktivít cyklooxygenázy a peroxidázy nahromadenými A β peptidmi.

Obr. 19 A-B: Prechodná expresia COX-2 v neuronálnych bunkách zosilňuje zhoršenie redox aktivity vyvolanej A β . Neuronálne bunky SH-SY5Y boli transfekované buď ľudským génom COX-2 (A), alebo COX-1 (B) a ošetrované A β 25-35. Následne bola stanovená metódou MTT redox aktivita.

Obr. 20 A-B: Vytvorenie transgénnych myši exprimujúce COX-2. (A) *In situ* hybridizácia demonštrujúca expresiu mRNA COX-2 v myši TgNHC32, ale nie v kontrole (wikld type) (myši sú len jeden mesiac staré). (B) Miestna expresia mRNA hCOX-2v NHC32 a NHC5 vzhľadom na kontrolu, ako bolo stanovené s použitím analýzy obrazu Bioquant.

Obr. 21: Overexpresia hCOX-2 zosilňuje oxidatívne poškodenie spôsobené A β pri primárnych myšiacich neuronálnych kultúrach.

Obr. 22: Nimesulid chráni neuronálne bunky B12 proti oxidatívne stresu spôsobenému glutamátom.

Obr. 23: Kontrolné štúdie k obr. 22. Oxidatívne poškodenie spôsobené glutamátom (merané LDH stanovením) v závislosti od veľkosti dávky (A) a od času (B). (C) ukazuje netoxicitu nimesulidových kultúr B12.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Regulácia a oblastná indukcia cyklooxygenázy-2 v mozgu potkana

Materiál a metódy

Zvieratá a excitotoxické lézie

Dospelé samce Sprague-Dawleyho potkanov rôzneho veku boli chované v prostredí s kontrolovaným svetlom, teplotou, jedlom a pitím *ad libitum*. Pri dospelých samcoch (250 - 300 g) boli indukované hippocampálne excitologické lézie podkožnou injekciou kyseliny kainikovej („KA“; 10 mg/kg, Sigma). Pretože príjem KA je relatívne vyšší pri mladých potkanoch vzhľadom na dospelé potkany (Berger et al., 1986, in Schwartz and Ben-Ari, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Plenum, N Y, pp. 129 - 209), boli dávky prispôbené tak, aby bola dosiahnutá maximálna excitotoxicita bez toho, aby boli dosiahnuté letálne dávky (od 2 mg/kg v postnatálnom dni P-7 do 6 mg/kg v postnatálnom dni P25). Na kontrolu boli použité injekcie fyziologického roztoku (v časovom bode 0 hodín).

COX-1 a COX-2 cDNA próby. Plazmid Bluescript (Stratagene) obsahujúci cDNA COX-1 plnej dĺžky (2,7 kb) bol linearizovaný štiepením *ClaI*. Plazmid PCRII (Invitrogen) obsahujúci kódujúcu sekvenciu potkanej COX-2 (1,8 kb) bol linearizovaný štiepením pomocou *PfMI* (Feng et al., 1993, *Arch. Biochem. Biophys.* 307: 361 - 368). Linearizované plazmidy boli purifikované pri použití Elu-Quick (Schleider & Schuell) po gélovej agarózovej elektroforéze.

In situ hybridization. V rôznych intervaloch po začiatku poškodenia indukovaných KA boli potkany usmrtené a ich mozgy im boli rýchlo vybrané, opláchnuté v studenom fosfátovom pufrí (PBS, 10 mM, pH 7,4) a ponorené do metylbutánu pri -25 °C na tri minúty. Mozgy boli narezané na 10 µm preparáty. Tieto boli potom zmrazené a výsledné zmrazené preparáty boli pripevnené na sklička potiahnuté polylyzínom. Takéto preparáty boli potom skladované pri -70 °C. Pre imunocytochémiu (ICC) alebo *in situ* hybridizáciu (ISH) boli zmrazené preparáty ďalej fixované v PBS obsahujúcej 4 percentný paraformaldehyd (30 minút pri laboratórnej teplote) a potom opláchnuté v 0,1 M trietanolamínu (TEA), pH 8,0, inkubované v anhydride kyseliny octovej (AAH; 0,25 % v/v v TEA, 10 minút) a opláchnuté v TEA a PBS. Po tomto kroku s AAH boli tkanivové preparáty hybridizované s [³⁵S]-cRNA próbami (0,3 µg/ml. 2 x 10⁹ dpm µg⁻¹) pripravenými z linearizovaných cDNA COX-2 transkripčných vektorov (Feng et al., 1993, *Arch. Biochem. Biophys.* 307: 361 - 368). Hybridizácie so sense vláknom boli použité ako kontroly, ktorých výsledkom boli negatívne výsledky. Nasledovala hybridizácia po 3 hodiny pri 50 °C, stringentné premytie (0,1 x SSC pri 60 °C) a vysušenie. Na kvantifikáciu boli preparáty exponované na X-ray film na sedem dní. Preparáty boli potom exponované na NTB-2 emulzii (Kodak, Rochester, NY) k mikroskopickému analýze distribúcie mRNA COX-2. Nasledovalo vyvolanie - tkanivové preparáty boli ofarbené kresyl-fialovou. Autorádiogramy boli kvantitatívne analyzované použitím softvéru na analýzu obrazu z Drexel University (Tocco et al., 1992, *Eur. J. Neurosci.* 4: 1093 - 1103). Merania boli

vyhodnotené pomocou štatistiky ANOVA a následnou posthoc analýzou.

Koncové *in situ* značenie. V paralelných pozorovaniach boli tkanivové preparáty mozgu fixované paraformaldehyd-om dehydratované, vysušené na vzduchu a inkubované s dATP, dCTP, dGTP (0,2 mM), dTTP (13 µM), digoxigenin-11-dUTP a DNA polymerázou I (Boehringer manheim) (10 jednotiek/100 µl) pri teplote 37 °C po dve hodiny. Reakcia bola zastavená pridaním 20 mM EDTA, pH 8,0. Preparáty boli inkubované pri laboratórnej teplote cez noc s protilátkami proti digoxigenínu konjugovanými s alkalickou fosfatázou (Genius System, Boehringer Mannheim) riedenými 1 : 200 v 5 % ovčom sére riedenom v 150 mM NaCl, 100 mM TRIS-HCL, pH 7,5. Kolorimetrická detekcia nitro-blue-tetrazóliom a 5-bróm-4-chlór-3-indolylfosfátom bola realizovaná použitím Genius Systemu podľa návodu výrobcu (Sakhi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 7525 - 7529).

Nothern blot hybridizácia. Extrakcia RNA bola realizovaná nasledovne. Po usmrtení bol potkaní mozog rozpitvaný a skladovaný pri 75 °C pred použitím. Celková RNA bola extrahovaná z hippocampického tkaniva (Passinetti et al., 1994, *J. Comp. Neurol.* 339: 387 - 400). Skrátené: Tkanivá boli homogenizované jednu minútu v celkovo 5 ml 4 M guanidíniumtiokyanátu, 25 mM citronanu sodnom, (pH 7,5), 0,5 % sarkosyle a 0,1 M β-merkaptotetanole. Po kyslej fenol-chloroformovej extrakcii a vyzrážaní etanolom bola RNA peleta opláchnutá postupne 70 % a 100 % etanolom. Purifikovaná RNA bola potom rozpustená v 0,5 % sodium dodecyl sulfátu (SDS) a skladovaná pri -75 °C. Celková RNA bola kvantifikovaná UV spektrometrom. Celková tkanivová RNA (5 µg) bola nanesená na denaturujúci (0,2 M formaldehyd) agarózový gél a potom bola realizovaná elektroforéza. Po elektroforéze bola RNA prenesená na nylonovú membránu (Nylon 66 plus, Hoeffer, San Francisco, CA) v 2 x SSC. Hybridizácia na blote bola realizovaná pri použití 10⁶ cpm/ml antisence próby COX-1 alebo COX-2 [³²P]-cRNA v 50 % formamide, 1,5 x SSPE, 1 % SDS, 0,5 % sušenom mlieku, 100 µg/ml celkovej kvasinkovej RNA a 500 mg/ml lososovej spermiovej DNA pri 53 °C po 15 hodín. Blot bol premytý do celkovej stringencie 0,2 x SSC, 2,0 % SDS pri 72 °C. Blot bol exponovaný na röntgenový film (X-ray film XAR-5, Kodak) s použitím zosilujúcej clony pri -70 °C.

Bunkové kultúry. Hipokampálne neurónové kultúry boli odvodené z embryonálnych potkaních mozgov. E16-E18 embryá boli rozpitvané v Hanksovom soľnom roztoku a prenesené do kultúry (Pasinetti et al., 1994, *J. Comp. Neurol.* 339: 387 - 400; Peterson et al., 1989, *Dev. Brain Res.* 48: 187 - 195). Médiá boli menené každý tretí deň. K štúdiu neurotoxicity glutamátu boli osem dní staré kultúry ošetrované glutamátom (250 µM, Sigma) v prítomnosti 2,4 mM vápenatých iónov a 0,8 mM horečnatých iónov. Po 6 hodinách pôsobenia glutamátu bolo médium vymenené za čerstvé médium. COX-2-like imunoreaktivita bola v neurónoch stanovená po 12 hodinách.

Imunocytochemická detekcia COX-2 v monotypických kultúrach primárnych potkaních neurónov. Kontrolné a glutamátom ošetrované kultúry boli fixované v PBS obsahujúcom 4 % paraformaldehyd (30 minút, laboratórna teplota), premyté v PBS, ošetrované normálnym sérom a inkubované cez noc pri 4 °C s primárnymi protilátkami. Protilátky COX-2 (kráľčie IgG) boli produkované proti syntetickému peptidu (CNASASHSRLDDINPT; SEQ ID NO: 1), ktorý zahŕňa C-koncový región myši COX-2. Ako bolo stanovené analýzou pomocou Western blotu, antiséra reagujú s ľudskou a potkanou COX-2, ale nie s COX-1. Vectastain

ABC kit (Vector, Burlingame, CA) bol použitý v nasledujúcom kroku na zakončenie farbenia diaminobenzenom (Pasinetti et al., 1994, J. Comp. Neurol. 339: 387 - 400). Kontrola na špecificitu bola realizovaná imunoabsorpciou COX-2 antiséra so syntetickým COX-2 peptidom. Adsorpcia bola realizovaná cez noc pri 4 °C syntetickým COX-2 peptidom pri 30 µL/ml.

Výsledky

Expresia COX-2 v dospelých potkaních mozgoch. Obrázok 1 ukazuje (s použitím ISH), že distribúcia mRNA COX-2 bola najviac pozorovateľná v limbických štruktúrach, ale bola tiež prítomná v neokortexe (v súlade s výsledkami Kaufmanna et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91: 2317 - 2321 a Yamagaty et al., 1993, Neuron 11: 371 - 386).

V hippocampickej formácii bola mRNA COX-2 selektívne exprimovaná v bunkách granulóvných a pyramídálnych neurónových vrstiev. Expresia mRNA COX-2 bola tiež nájdená vo vonkajšej vrstve parietálneho kortexu, v pyriformnom kortexe a amygdaloidnom komplexe.

Regulácia hippocampálnej mRNA COX-2 počas dozrievania. ISH výsledky naznačujú, že počas dozrievania je expresia mRNA COX-2 diferencielne regulovaná v podskupinách buniek neuronálnych vrstiev hippocampickej formácie (obr. 2, obr. 3, horná časť). mRNA COX-2 má po dňoch P7-P14 viac ako dvojnásobné zvýšenie v granulóvných vrstvách buniek dentate gyrus a v CA3 sekciách pyramídálnych vrstiev buniek ($p < 0,001$, obr. 2). I keď bola expresia mRNA COX-2 v ďalších skúmaných oblastiach mozgu nižšia, bol obraz exprese počas dozrievania podobný (obr. 2). Okolo postnatálneho dňa P21 sa expresia mRNA COX-2 blížila k hladine dospelých jedincov vo všetkých skúmaných subregiónoch (obr. 2, obr. 3 horná časť).

Reakcia na poškodenie indukované KA. K ďalšiemu sledovaniu regulácie COX-2 v mozgu počas zrenia bola postnatálne skúmaná expresia mRNA COX-2 počas reakcie na poškodenie indukované KA. Napriek veľkej zachvatej aktivite pri nasledujúcom ošetrovaní nebola detegovaná žiadna zmena v expresii mRNA COX-2 v žiadnej sledovanej oblasti mozgu v dni P7 (obr. 3, obr. 4A). Zmeny v expresii mRNA COX-2 v 120 hodine po ošetrovaní KA v skupine P7 (obr. 4A) indukujú vývojové zrenie skôr než reakciu na toxicitu KA (obr. 4A). Oproti skupine P7 sa v dňoch P14 a P21 zvýšila mRNA COX-2 počas 4 - 8 hodín po počiatku záchvatu vyvolaného KA vo všetkých skúmaných hippocampálnych suboblastiach (obr. 4B a 4C). Hladina exprese mRNA COX-2 sa vrátila na hladinu kontroly počas 120 hodín po ošetrovaní pri P14, P21 a dospelých potkaních mozgoch.

Vnútri dentate gyrus bola kontrolná expresia COX-2 pri P14 a P21 potkanoch nesúmerná, selektívne lokalizovaná na povrchovejšie neuróny stratum granulosum skôr než na hlbšie sa nachádzajúce granulóvé bunky dentate gyrus blade (obr. 5). V reakcii na ošetrovanie KA má indukcia mRNA COX-2 podobnú nesúmernosť v expresii (obr. 5). Oproti tomu bola nesúmernosť vnútri dentate gyrus menej pozorovateľná pri kontrolných zvieratách a pri dospelých skupine po indukcii KA (obr. 5C a 5D).

V paralelných pozorovaniach bola pomocou northern blot hybridizácie celkovej RNA z hipokampu dospelých potkanov potvrdená indukcia mRNA COX-2 12 hodín po záchvate vyvolanom KA (obr. 6). Detegovateľná indukcia mRNA COX-2 nebola nájdená v rovnakých potkaních mozgoch (obr. 6).

COX-2 indukovaná KA a apoptóza pri dospelom potkanovi. Osem hodín po počiatku záchvatu vyvolanom KA

bola indukcia mRNA COX-2 v bunkách v oblasti CA3 hipokampálneho útvaru (obr. 7B), pyriformného kortexu (obr. 7E) a amygdaloidného komplexu (obr. 7H) dospelého mozgu dočasne súbežná a prekryva sa s počiatkom apoptózy ako bolo stanovené pomocou *in situ* koncového značenia v rovnakých oblastiach mozgu (obr. 7C-CA3 oblasť hippocampus, obr. 7F - pyriformný kortex, obr. 7I - amygdaloidný komplex). Expresia mRNA COX-2 pri dospelých jedincoch kontrolnej skupiny potkanov (obr. 7A, 7D a 7G) a pri potkanoch ošetrovaných KA (obr. 7B, 7E a 7H) bola identifikovaná s použitím emulznej autorádiografie pri využití ISH stanovenia.

Imunochemický dôkaz exprese/regulácie neuronálnych COX-2 pri odpovedi na glutamát *in vitro*. Primárne kultúry potkaních hipokampálnych neurónov boli vystavené glutamátu *in vitro*. Základná hladina - konštitutívna expresia COX-2 bola demonštrovaná imunocytochemicky (obr. 8B). Dvanásť hodín po pôsobení glutamátu bolo pozorované zvýšenie imunoreaktivity COX-2, ktoré sa zhoduje s výrazným znížením počtu neurónov (obr. 8D).

Expresia COX-2 pri ľudskej epilepsii. Zvýšená expresia mRNA COX-2 bola detegovaná ISH v biopsickom tkanive ľudského mozgu v epileptickej foci (obr. 17A-D). Bolo zistené, že sa mRNA COX-2 oproti mRNA COX-1 výrazne zvýšila v kortexe epileptických pacientov (hodnota $p < 0,05$).

Príklad: Nimesulid znižuje produkciu cytokínov a nitritu v mikrogliových kultúrach.

V experimentoch realizovaných *in vitro* bolo zistené, že nimesulid v nízkych koncentráciách (1 nanomolárna) účinne potlačuje indukciu TNF (tumor necrosis factor) tak, že imortalizuje mikrogliu odvodenú z mozgu (BV-2) a astrocyty (obr. 9A). Súčasne bol nimesulid rovnako účinný v blokovaní tvorby dusitanov (Griessova reakcia, obr. 9B). Toto neskoršie pozorovanie je zvlášť dôležité vo svetle dôkazov ukazujúcich, že zablokovanie neuronálnej NO-syntázy (syntázy oxidu dusného) vedie k ochrane pred neurotoxicitou glutamátu. Bolo tiež zistené, že nimesulid účinne blokuje indukciu prostaglandínu PGE₂ vyvolanú endotoxínom v mikrogliách odvodených z mozgu (obr. 9C).

Expresia COX-2 v apoptických bunkách

Expresia COX-2 bola študovaná s použitím zavedených *in vitro* modelov apoptózy. Konkrétne bola regulácia COX-2 študovaná na embryonálnych rakovinových bunkách P19 počas reakcie na nedostatok séra. Za týchto podmienok bunky P19 prekonávajú apoptickú bunkovú smrť majú charakteristickú fragmentáciu DNA a nukleárnu morfológiu. S použitím tohto systému je na obr. 10 ukázaný náhodný počiatok k apoptóze a vzrast exprese COX-2.

Táto štúdia bola rozšírená o ľudskú bunkovú líniu SH-SY5Y. Ukázalo sa, že v procese indukcie neurodegenerácie buniek SH-SY5Y má úlohu β -amyloid (Oda et al., 1995, Alzheimers Res. 1: 29 - 34). Bunky SH-SY5Y boli ošetrované syntetickými peptidmi A β 1-40 s koncentráciou 20 µM rôzne dlhý čas. Analýza pomocou Western blotu bola uskutočnená s bunkovými extraktmi s použitím antiséra COX-2 alebo aktívneho antiséra ako kontroly (obr. 11B a D - v tomto poradí). Na obrázku 11 bol proteín COX-2 z kontrolných a A β ošetrovaných neuronálnych buniek SH-SY5Y kvantifikovaný na imunoblotoch ukázaných na obr. 11B (v bode 72 hr. bol kvantifikovaný len proteín s molekulovou hmotnosťou 70 kDa). Signál COX-2 bol zrušený imunoabsorpciou antiséra COX-2 s purifikovanými ľudskými rekombinantnými peptidmi COX-2 (hrCOX-2). Na obr. 11C je ukázaná znížená bunková redox aktivita 72 hodín po o-

šetrení buniek A β 1-40 (20 μ m) ako bolo stanovené pomocou MTT v paralelných kultúrach. Stĺpkový graf znázorňuje aritmetický priemer + smerodajná odchýlka (SEM), $n=4-5$ na skupinu, $p<0,05$ (t-test). Optické denzity COX-2 boli integrované a analyzované z digitalizovaných obrázkov s použitím systému Bioquant image analysis (Biometrics, Nashville, TN). Bolo tiež zistené, že sa expresia objavuje súčasne s rebričkováním DNA (obr. 11E) - známou apóptózy. Obr. 12 ukazuje schopnosť nimesulidu (pri koncentráciách 10^{-6} a 10^{-9} molárnych) blokovať toxické pôsobenie A β 1-40 ako bolo stanovené pomocou MTT.

V prípade, že boli agregované syntetické peptidy A β 1-40 (150 μ M) inkubované spolu s purifikovaným hr-holoCOX-2 (COX-2 s hernom (kofaktorom), 50 nM) po 16 hodín pri 37 °C v 1x PBS a boli stanovené aktivity cyklooxygenázy a peroxidázy (Murphy et al., 1989, Neuron 2: 1547 - 1558), ukázalo sa, že sa aktivity cyklooxygenázy a peroxidázy vzhľadom na tieto enzýmové aktivity v neprítomnosti A β (obr. 18) zvýšili. Hladina aktivity cyklooxygenázy a peroxidázy v neprítomnosti hemu bola nulová.

Expresia COX-2 pri Alzheimerovej chorobe

Bola študovaná expresia COX-2 v normálnych mozgoch ľudí a v mozgoch pacientov trpiacich Alzheimerovou chorobou (AD). Imunocyklcké dáta ukazujú, že expresia COX-2 je v ľudskom mozgu primárne lokalizovaná do buniek s neuronálnou morfológiou. Vo všetkých skúmaných oblastiach bolo najnižšie imunofarbenie COX-2 lokalizované v bunkách s gliovou morfológiou. Tieto výsledky vedú k predpokladu, že COX-2 má nezápalovú funkciu. Zatiaľ čo v temporálnom kortexe neurologických kontrolných prípadov bol imunocytochemický signál COX-2 na hladine detekčného limitu, pri AD mozgoch mal tento signál zvýšenie (obr. 13A, 13B). Selektívna indukcia imunoreaktivity COX-2 v šedej hmote je zhodný s pozorovaním ukazujúcim neuronálnu indukciu COX-2 v mozgu potkana počas reakcie na lézie vedúce k neuronálnej smrti (pozri sekcia 6).

Bola tiež sledovaná bunková imunodistribúcia COX-2 v mozgu AD. Bolo zistené, že neuronálna COX-2 nie je lokalizovaná iba v perikáliu (obr. 14A), ale bola nájdená tiež v neuronálnych projekciách (obr. 14B). Okrem toho bolo intenzívne imunozafarbenie identifikované pomocou A β imunofarbenia tiež nájdené v difúzných plakoch (obr. 14C) a v neuritických plakoch AD pacientov na susediacich tkanivových rezoch hippocampálnych útvarov. Tieto pozorovania predpokladajú úlohu COX-2 v mechanizme neuronálnej smrti alebo prežitia.

Boli realizované štúdie, v ktorých bola kvantifikovaná expresia COX-2 v mozgoch AD a kontrol, ktoré dosiahli príslušný vek. Použili sme kvantitatívnu dot-blot analýzu a chemiluminiscenčnú detekciu. Na kvantitatívne zhodnotenie bola použitá western analýza. Viac než dvojnásobné zvýšenie obsahu COX-2 bolo nájdené v hippocampálnych homogenátoch AD mozgov v porovnaní s neurologickými kontrolami, ktoré dosiahli príslušný vek.

Pretože boli podané imunocytochemické dôkazy ukazujúce imunoreaktivitu COX-2 v AD plakoch, bola hladina COX-2 a celková hladina A β pri AD prípadoch porovnaná. Priama korelácia nebola nájdená.

V prednom kortexe AD mozgu bola nájdená zvýšená hladina mRNA COX-2 a proteínu. Na obrázku 15A je zobrazený Northern blot celkovej RNA neurologickej kontroly (C) a predného kortexu AD hybridizovaného s [32 P] mRNA COX-2 a COX-1. Druhy mRNA detegované pomocou cRNA COX-2 a COX-1 sond reprezentujú RNA rovnakej veľkosti nájdené v okrajových tkanivách. Obrázok 15B ukazuje kvantifikované výsledky štúdií s Northern blotmi.

Obzvlášť zastúpenie mRNA COX-2 v prednom kortexe bolo pri AD oproti kontrolám zvýšené. Prítomnosť ekvivalentného množstva RNA v oboch líniiach bola potvrdená normalizáciou na 28S rRNA v hybridizačnej membráne. Kompletý prenos RNA do membrány bol potvrdený neprítomnosťou 28S a 18S rRNA v géli po prenose. Integrované optické hustoty boli analyzované z digitalizovaných obrázkov pomocou analýzy obrazu Biquant. Stĺpcové grafy reprezentujú $n = 9$ na skupinu. Výsledky boli významné, t-test mal hodnotu $p<0,05$.

Podobne bolo na základe analýz realizovaných pomocou western blotu zistené zvýšené množstvo proteínu COX-2 v prednej časti kortexu AD oproti kontrole. Obrázok 15C ukazuje výsledky takýchto western blotov. Línia 1 a 2 ukazuje množstvo proteínu COX-2 v rovnakých tkanivách, aké boli použité na Northern analýzy. Línia 3-4 ukazuje neprítomnosť viazaného COX-2, keď antiséra COX-2 boli imunoabsorbované s použitím hrCOX-2 peptidov, čo demonštruje špecifickosť signálu.

Predpokladaný nový druh hrCOX-2 (línia 5 - 70 kDa) bol taktiež neprítomný v prípade, že boli antiséra predabsorbované s hrCOX-2. Tieto výsledky sú kvantifikované na obrázku 15D (so zvláštnym ohľadom na druhy s hmotnosťou 70 kDa). Imunoblots boli ďalej obnažené a imunoreagované s aktívnymi antisérmi na účely overenia špecifickosti zmien (hodnoty aktínu: kontrolná skupina 100 ± 8 , AD 94 ± 7 % kontroly. Stĺpcový graf reprezentuje $n=9$ na skupinu; hodnota t-testu bola $p<0,05$). Obrázok vložený do obrázka 15D ukazuje koreláciu obsahu COX-2 a počtu plakov na mm^2 , $n=8$, $r=0,72$, $p<0,03$. Integrované optické hustoty COX-2 a aktínu boli analyzované z digitalizovaných obrázkov pomocou analýzy obrazu Biquant.

Expresia COX-2 pri amyotropickej laterálnej skleróze

Pomocou *in situ* hybridizácie bolo demonštrované zvýšenie mRNA COX-2 v anterior horn bunkách miechy pacientov trpiacich amyotropickou laterálnou sklerózou (ACS) (obr. 16).

Prechodná expresia COX-2 v neuronálnych bunkách zosilnených zhoršením redox aktivity sprostredkovanej A β .

Úloha COX-2 pri smrti alebo prežití neurónov bola študovaná v kultúre ľudských neurónových buniek SH-SY5Y. Bunky boli prechodne transfekované cicavčím expresným vektorom (pRc/CMV/hCOX, Invitrogen) obsahujúcim buď neskrátenú ľudskú (h) cDNA COX-2 (pRc/CMV/hCOX), alebo gén na bakteriálnu chloramfenikolacetyltransferázu (CAT) (pRc/CMV2/CAT). Následné ošetrenie A β 25-35 posilnilo redox aktivitu (ako bolo zamerané MTT-testom (3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyl-tetrazólium bromidový test (obrázok 19). Overexpresia hCOX2 v bunkách SH-SY5Y transfekovaných pRc/CMV/hCOX-2 bola potvrdená imunocytochemicky na paralelnej dvojici tkanivových kultúr na sklíčku použitím protilátok α -COX-2 tak, ako bolo predtým ukázané. V prípade kontrolných buniek transfekovaných pRc/CMV2/CAT vytvárali rovnaké protilátky α -COX-2 minimálny imunocytochemický signál. Zistili sme, že prechodná overexpresia hCOX-2 v neurónových bunkách SH-SY5Y zosilňuje defekt redox aktivity sprostredkovaný A25-35 (25 μ M, 48 hodín pôsobenia) v porovnaní s kultúrami SH-SY5Y transfekovanými kontrolným vektorom ($\pm p<0,001$ versus CTL). Tieto dáta sú v súlade s dôkazmi ukazujúcimi indukciu mRNA COX-2 zhodou okolností so zvýšenou redox aktivitou v neurónových bunkách SH-SY5Y (obr. 11).

Pokusy s použitím transgénnej myši COX-2

Na základe dôkazov, že overexpresia COX-2 v neurónových bunkách môže zosilňovať A β -sprostredkovaný redox defekt a na základe pozorovania, že neurónová COX-2 je zvýšená v mozgu AD a v experimentálnej neurodegenerácii, sme vytvorili transgénnu modelovú myš s neurónovou overexpresiou ľudskej (h β COX-2). S cieľom dosiahnuť overexpresiu hCOX-2 v neurónoch bol pripravený hybridný gén, v ktorom bola expresia sekvencie cDNA obsahujúcej úplnú kódujúcu oblasť hCOX-2 regulovaná potkaním neurón-špecifickým enolázovým (NSE) promótorom.

Získali sme štyri línie s vysokou expresiou mRNA hCOX-2. V jednej z nich (NHC32) bola stanovená pomocou analýzy *in situ* hybridizácia mRNA hCOX-2 (obr. 20A). Zistili sme, že myšiacia línia NHC32 má vysoké hladiny mRNA hCOX-2 v hipokampálnom útvere, cerebrálnom kortexe ďalších neurónových vrstvách (obr. 20B). V bielej hmote nebola zistená použitím kombinovanej imunocytochémie pre *in situ* hybridizáciu NSE a hCOX-2 hladina mRNA hCOX-2 na rovnakom tkanivovom reťazci. Potvrdili sme selektivitu transgénnej exprese hCOX-2 do neurónových buniek.

Ďalej sa ukázalo použitím neurónových kultúr odvodených od transgénnych myší, že overexpresia hCOX-2 zosilňuje odpoveď sprostredkovanú A β . Ako je vidieť na obrázku 21, ukázala štúdia, že primárne neurónové kultúry odvodené od transgénnej myši s overexpresiou neurónovej COX-2 (NHC32, n=3) sú najviac náchylné na hromadenie peptidov AP-25-35 sprostredkované zvýšením redox aktivity (stanovenie MTT, A β -25-35 25 μ M počas 48 hodín), ak ich porovnáme s rovnako ošetrovanými neurónovými kultúrami odvodenými od divokého typu alebo kontrolného príbuzného (n=4). Ak boli študované morfológicky, odhalili okrem toho neuróny ošetrované A β -25-35 odvodené od transgénnych myší hCOX-2 zvýšenú regresiu neurónových procesov (B, vnútri) v porovnaní s divokým typom - kontrolou neurónových bunkových kultúr ošetrovaných A β -25-35 (A, vnútri).

Nimesulid chráni neurónové bunky B12 proti glutamátovej toxicite

Stanovili sme úlohu nimesulidu, indometacínu a NS398 (ďalší preferenčný inhibítor COX-2) na glutamátom sprostredkovanú toxicitu. V tejto štúdii sme použili neurónové bunky B12. Toxicita bola stanovená meraním zvýšenia hladiny laktátdehydrogenázy (LDH) v médiu po ošetrovaní. LDH je index bunkovej toxicity a jej hladina je všeobecne akceptovaná ako marker neurotoxicity. Ako je ukázané na obrázku 22-23, zistili sme, že nimesulid chráni pred glutamátovou toxicitou (10 mM) v 10-6, 10-9 a 10-12 M s podaním 24 hodín pred a súčasné podanie s glutamátom počas 24 hodín. Indometacín chránil v 10-6M a stratil svoj chrániaci vplyv v 10-9 a 10-12M. Nepodstatný vplyv proti toxicite sprostredkovanej glutamátom bol pozorovaný v prípade indometacínu v 10-9M (pretreatment 24 hodín). Žiadny chrániaci vplyv nebol pozorovaný pri včasnom ošetrovaní NS398. V podmienkach včasného ošetrovania látka počas ošetrovania glutamátom v médiu.

Sú tu citované rôzne publikácie a týmto sú ich obsahy zahrnuté v celom ich rozsahu.

Zoznam sekvencií

(1) Všeobecné informácie:

(i) Žiadateľ: Pasinetti, Giulio M. and Aisen, Paul S'.

(ii) Názov vynálezu:

(iii) Počet sekvencií: 1

(iv) Korešpondenčná adresa:

(A) Adresa: Baker & Botts, L. L. P.

(B) Ulica: 30 Rockefeller Plaza

(C) Mesto: New York

(D) Štát: New York

(E) Krajina: USA

(F) PSČ (ZIP): 10112-0228

(v) Forma vhodná na počítačové spracovanie

(A) Typ média:

(B) Počítač: IBM PC kompatibilný

(C) Operačný systém: DOS

(D) Softvér: FastSEQ Verzia 1.5

(vi) Súčasné údaje o žiadosti

(A) Číslo žiadosti:

(B) Dátum registrácie:

(C) Klasifikácia:

(vii) Predchádzajúce údaje o žiadosti

(A) Číslo žiadosti: 08/831,402

(B) Dátum registrácie: 1. 4. 1997

(viii) Informácie o právnom zástupcovi/agentovi:

(A) Meno: Clark, Richard S.

(B) Číslo registrácie: 26,154

(C) Referencie/počet súdnych prípadov:

(ix) Telekomunikačné informácie:

(A) Telefón: 212-705-5000

(B) Telefax: 212-765-2519

(C) Telex:

(2) Informácie o SEQ ID NO: 1:

(i) Charakteristika sekvencie

(A) Dĺžka: 16 aminoskupín

(B) Typ: aminoskupina

(C) Počet reťazcov: jeden

(D) Topológia: lineárna

(ii) Typ molekuly: peptid

(iii) Hypotetický: Nie

(iv) Antisense (protizmyslová): Nie

(v) Typ fragmentu:

(vi) Pôvodný zdroj:

(x) Opis sekvencie: SEQ ID NO: 1:

Cys Asn Ala Ser Ala Ser His Ser Arg Leu Asp Asp Ile Asn Phe Thr 16
5 10 15

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Použitie nimesulidu na výrobu farmaceutickej kompozície na liečenie neurodegeneratívnej choroby.

2. Použitie nimesulidu na výrobu farmaceutickej kompozície na liečenie Alzheimerovej choroby.

3. Použitie nimesulidu na výrobu farmaceutickej kompozície na liečenie epilepsie.

4. Použitie nimesulidu na výrobu farmaceutickej kompozície na liečenie amyotrofickej laterálnej sklerózy.

5. Použitie nimesulidu na výrobu farmaceutickej kompozície na liečenie neurodegeneratívnej choroby, pričom množstvo nimesulidu obsiahnutého vo farmaceutickej kompozícii má za následok expozíciu postihnutých neurónov miestnej koncentrácie nimesulidu 1 μ M alebo nižšiu koncentráciu, ktorá inhibuje smrť neurónov prinajmenšom z 20 %.

6. Použitie nimesulidu na výrobu farmaceutickej kompozície na liečenie Alzheimerovej choroby, pričom množstvo nimesulidu obsiahnutého vo farmaceutickej kompozícii má za následok expozíciu postihnutých neurónov miest-

nej koncentrácii nimesulidu 1 μM alebo nižšiu koncentráciu, ktorá inhibuje smrť neurónov prinajmenšom z 20 %.

7. Použitie nimesulidu na výrobu farmaceutickej kompozície na liečenie epilepsie, pričom množstvo nimesulidu obsiahnutého vo farmaceutickej kompozícii má za následok expozíciu postihnutých neurónov miestnej koncentrácii nimesulidu 1 μM alebo nižšiu koncentráciu, ktorá inhibuje smrť neurónov prinajmenšom z 20 %.

8. Použitie nimesulidu na výrobu farmaceutickej kompozície na liečenie amyotrofickej laterálnej sklerózy, pričom množstvo nimesulidu obsiahnutého vo farmaceutickej kompozícii má za následok expozíciu postihnutých neurónov miestnej koncentrácii nimesulidu 1 μM alebo nižšiu koncentráciu, ktorá inhibuje smrť neurónov prinajmenšom z 20 %.

9. Použitie nimesulidu na výrobu farmaceutickej kompozície na liečenie neurodegeneratívnej choroby, pričom dávka nimesulidu obsiahnutého vo farmaceutickej kompozícii inhibuje smrť neurónov prinajmenšom z 20 %.

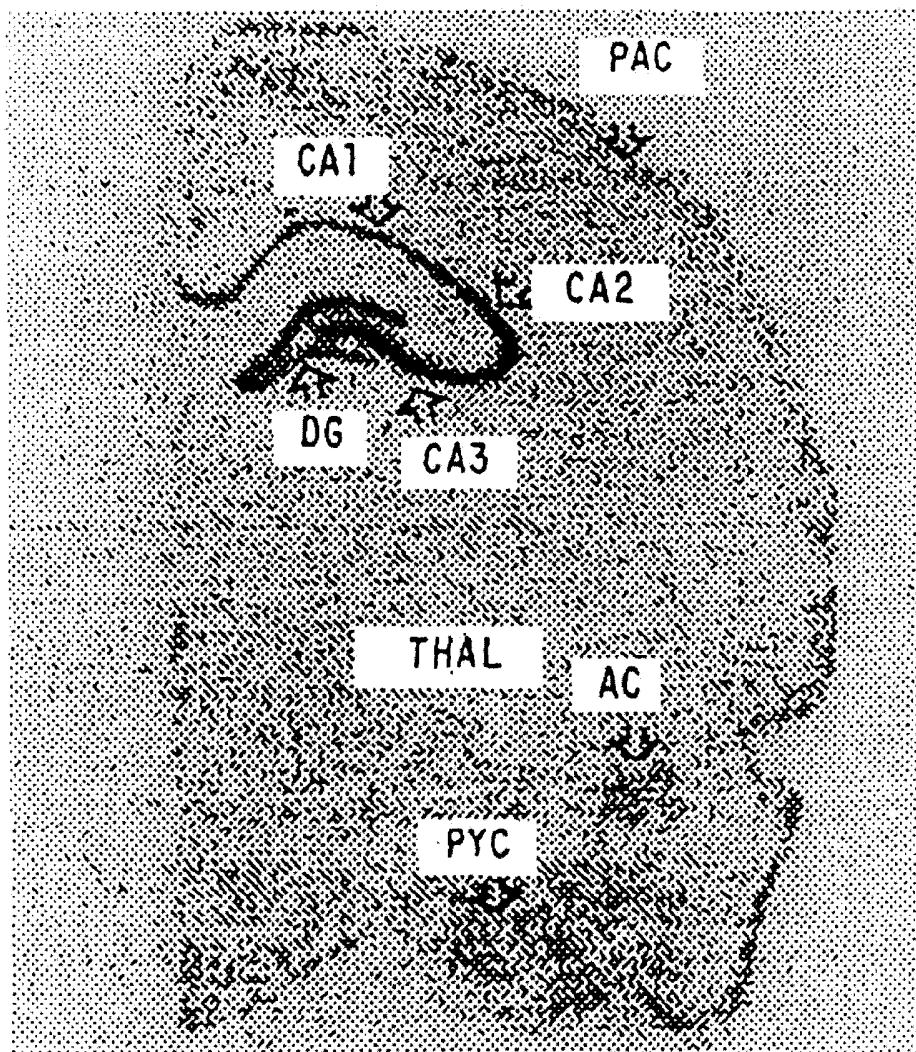
10. Použitie nimesulidu na výrobu farmaceutickej kompozície na liečenie Alzheimerovej choroby, pričom dávka nimesulidu obsiahnutého vo farmaceutickej kompozícii inhibuje smrť neurónov prinajmenšom z 20 %.

11. Použitie nimesulidu na výrobu farmaceutickej kompozície na liečenie epilepsie, pričom dávka nimesulidu obsiahnutého vo farmaceutickej kompozícii inhibuje smrť neurónov prinajmenšom z 20 %.

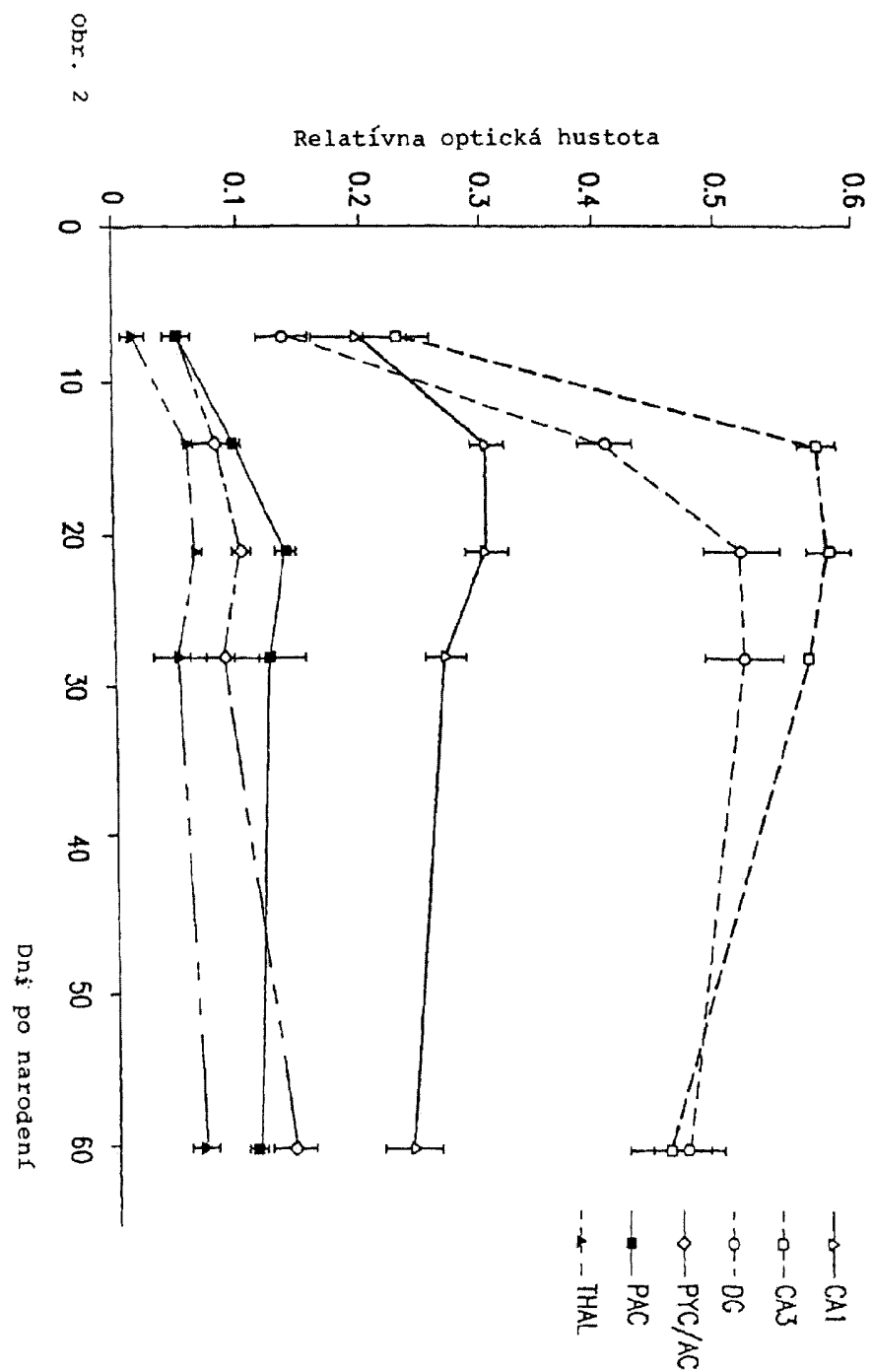
12. Použitie nimesulidu na výrobu farmaceutickej kompozície na liečenie amyotrofickej laterálnej sklerózy, pričom dávka nimesulidu obsiahnutého vo farmaceutickej kompozícii inhibuje smrť neurónov prinajmenšom z 20 %.

13. Použitie nimesulidu podľa niektorého z nárokov 1 až 4 na výrobu farmaceutickej kompozície vhodnej na podávanie nimesulidu v dávke 50 až 200 mg za deň.

32 výkresov



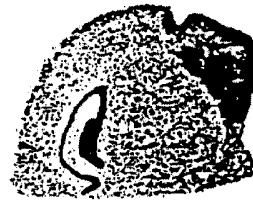
Obr. 1



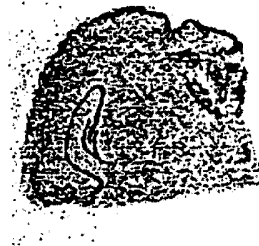
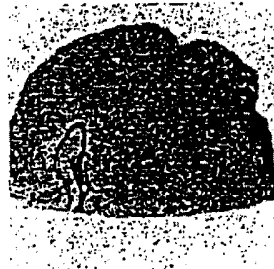
DOSPELEC



P 21



P 14



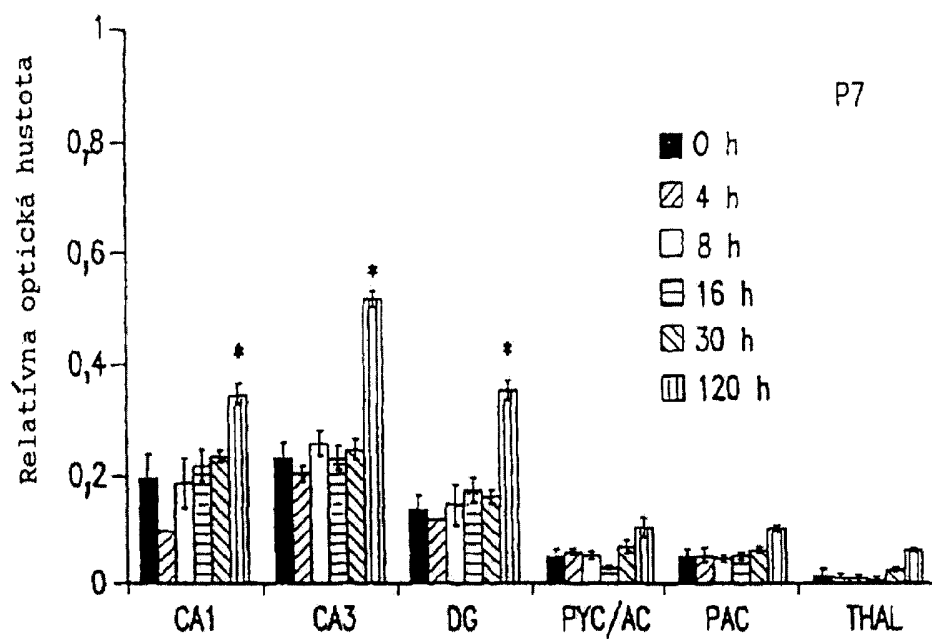
P 7



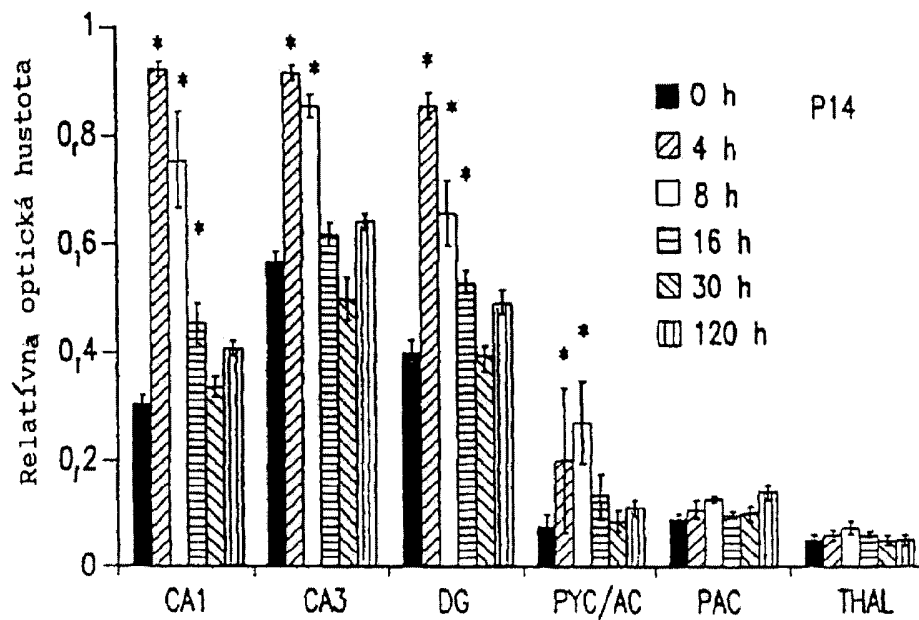
KONTROLA

KA 8 H

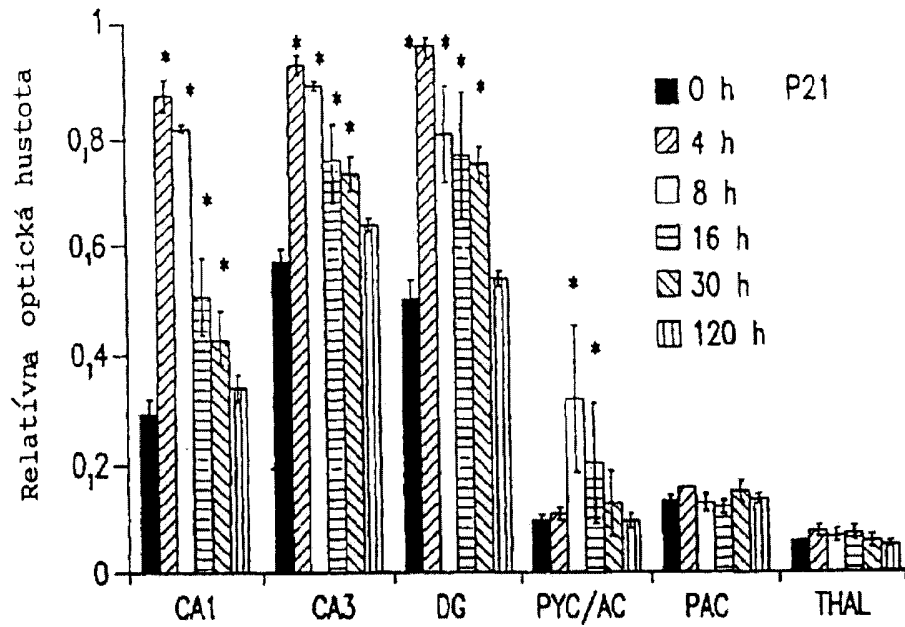
Obr. 3



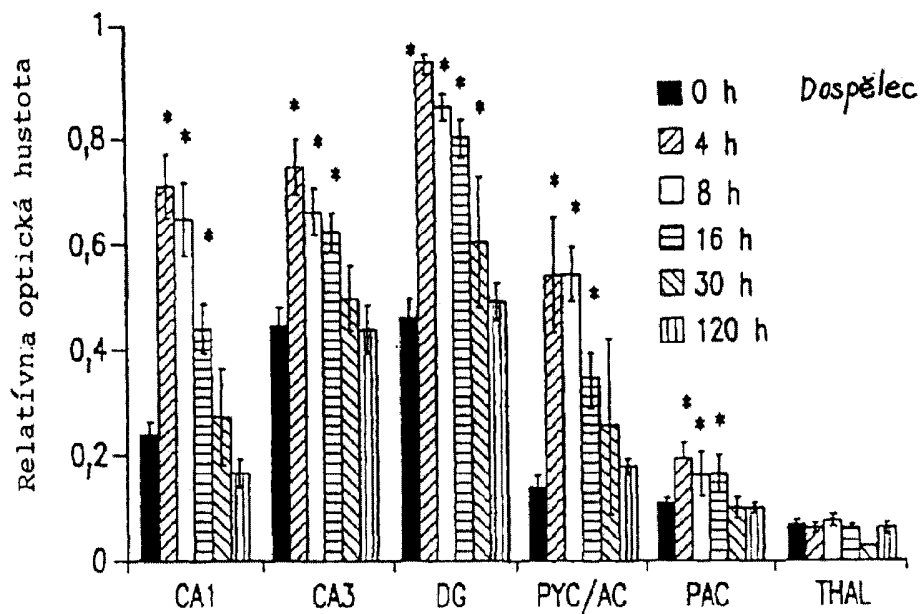
Obr. 4A



Obr. 4B



Obr. 4C



Obr. 4D



Obr. 5A



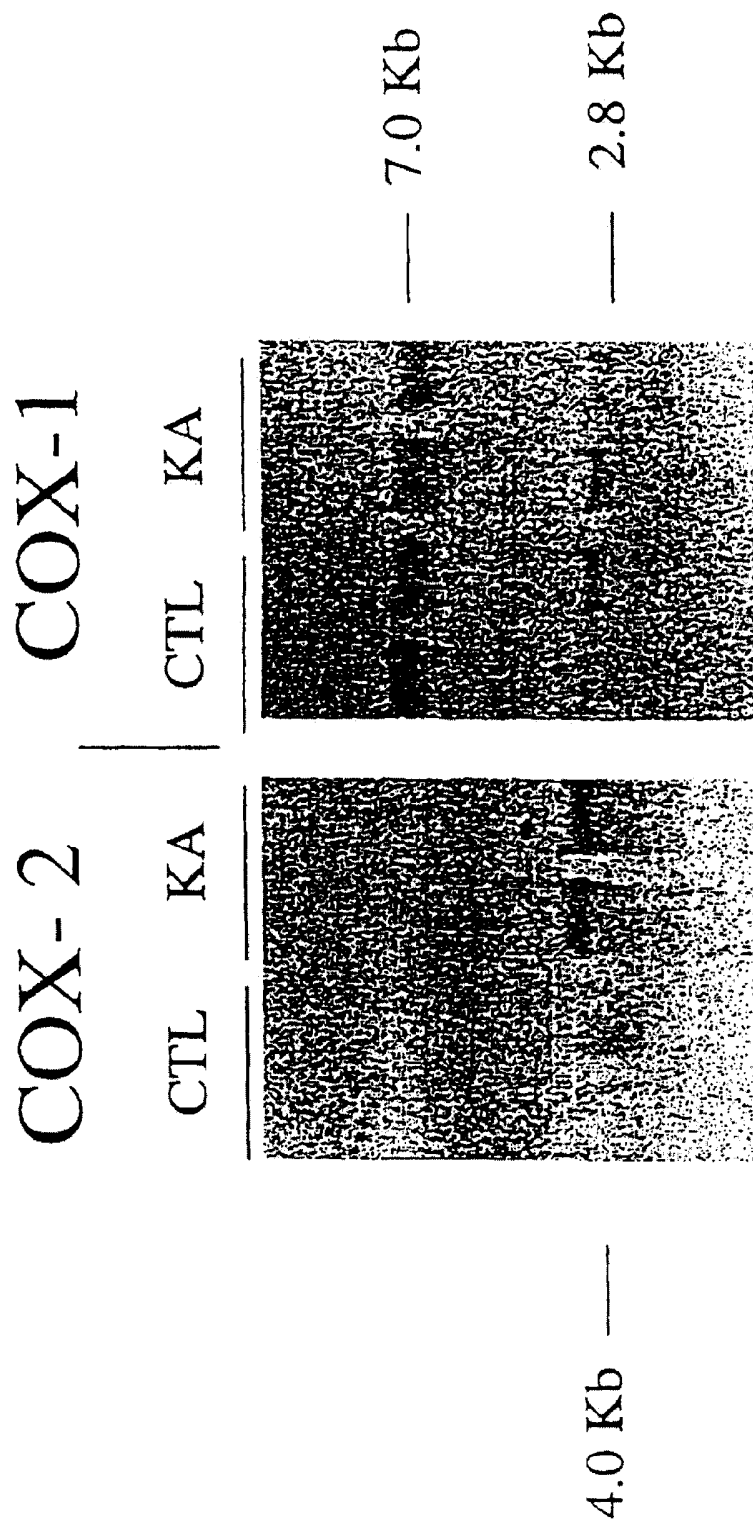
Obr. 5B



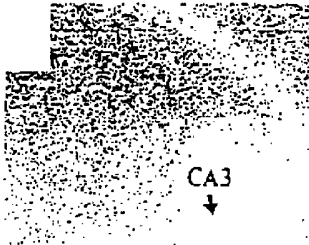
Obr. 5C



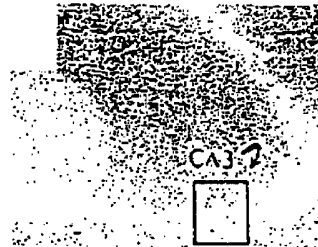
Obr. 5D



Obr. 6



Obr. 7A



Obr. 7B



Obr. 7C



Obr. 7D



Obr. 7E



Obr. 7F



Obr. 7G



Obr. 7H



Obr. 7I



Obr. 8A



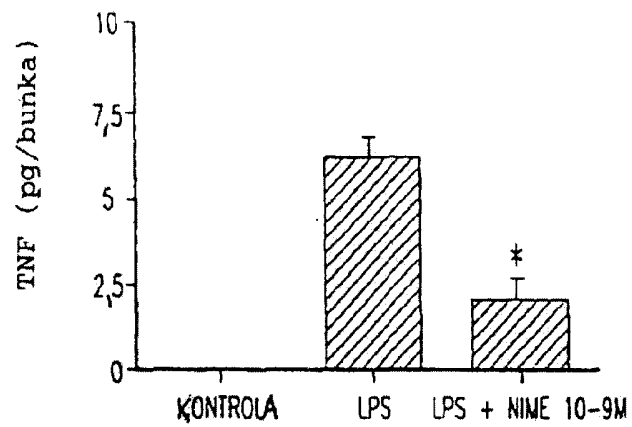
Obr. 8B



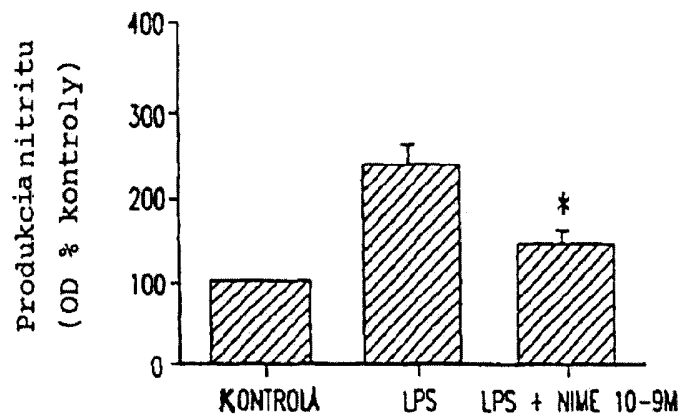
Obr. 8C



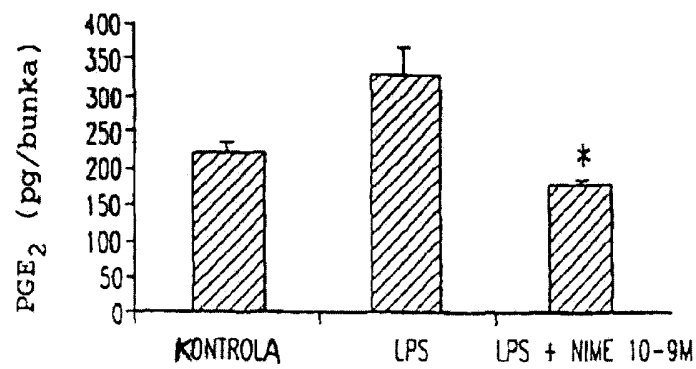
Obr. 8D



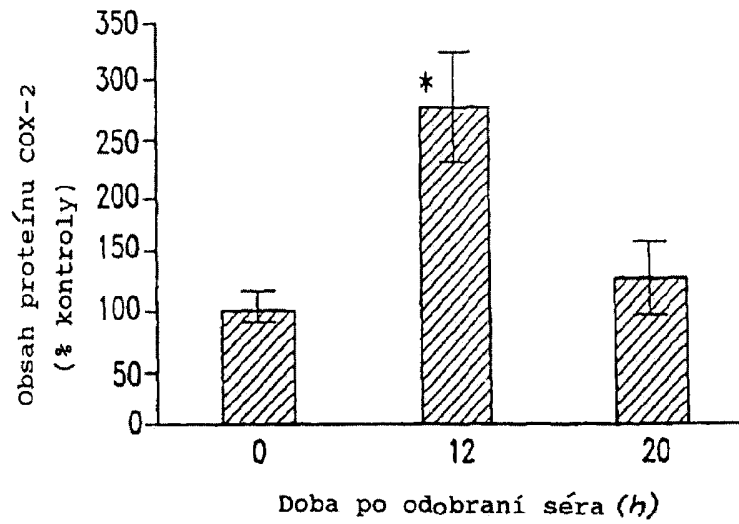
Obr. 9A



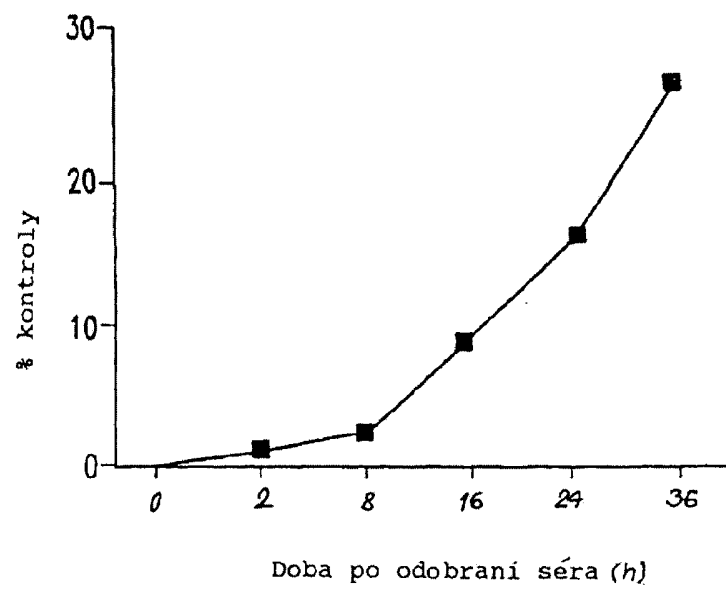
Obr. 9B



Obr. 9C



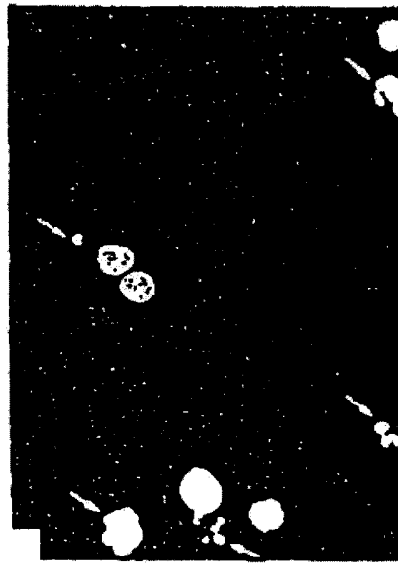
Obr. 10A



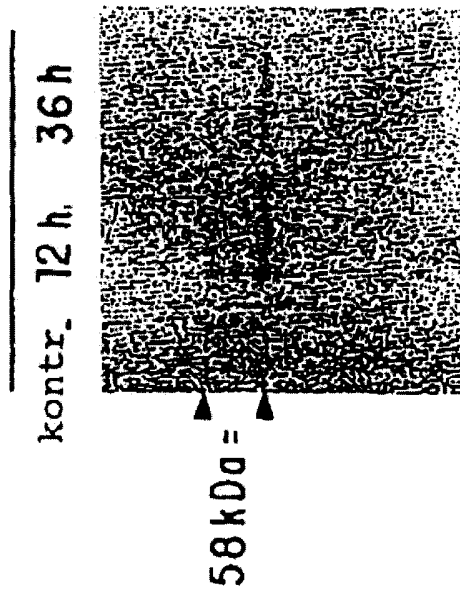
Obr. 10C



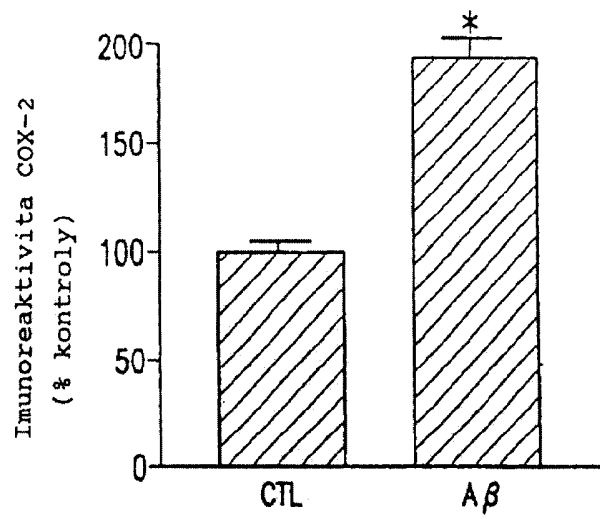
Obr. 10E



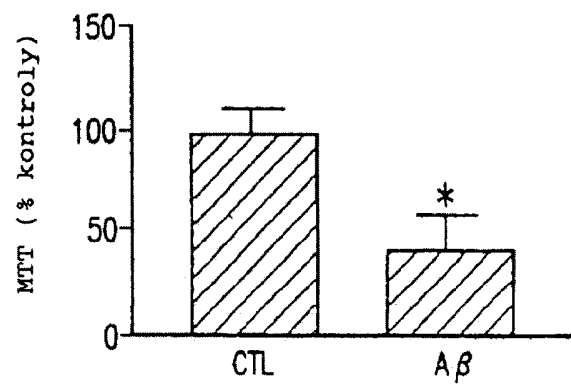
Obr. 10D



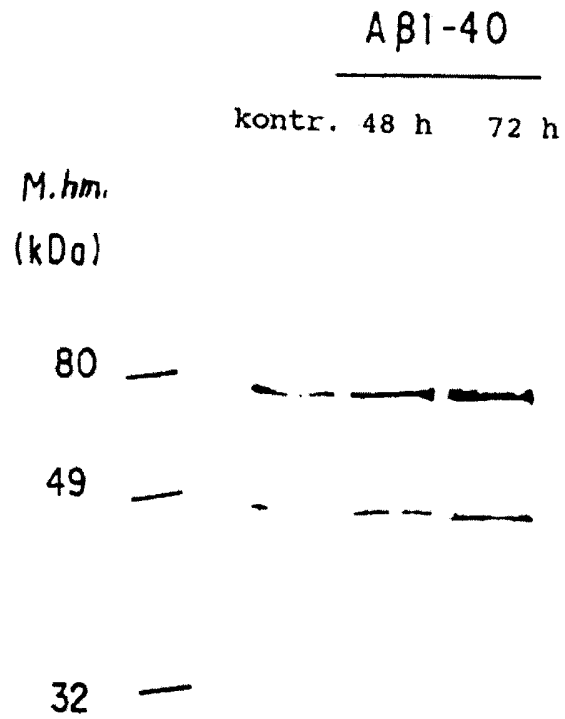
Obr. 10B



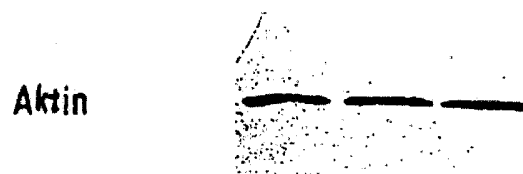
Obr. 11A



Obr. 11C



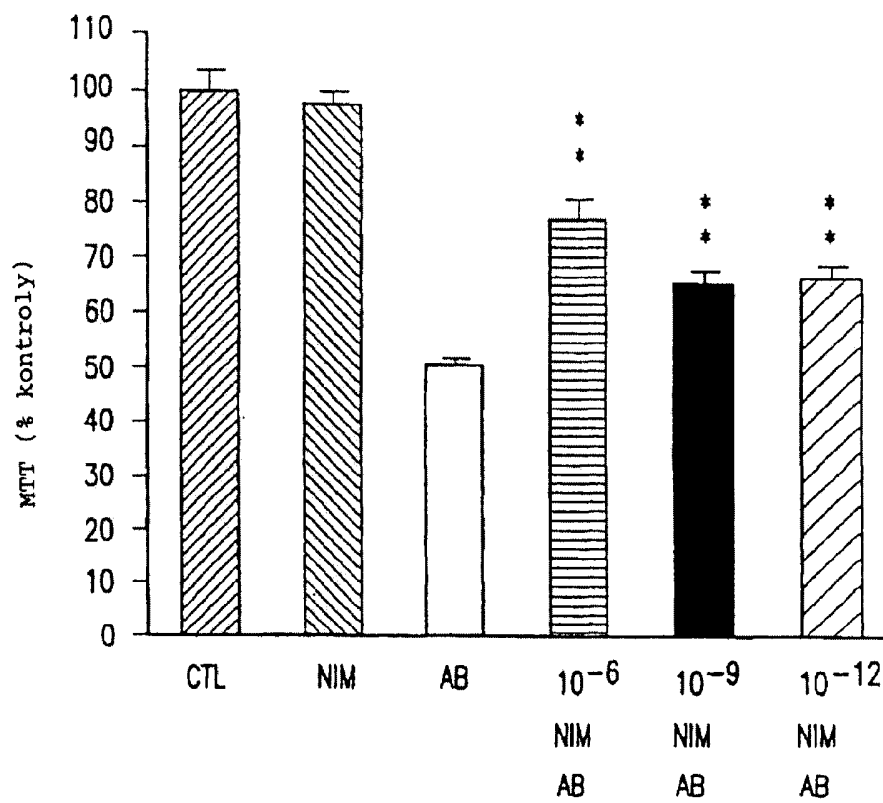
Obr. 11B



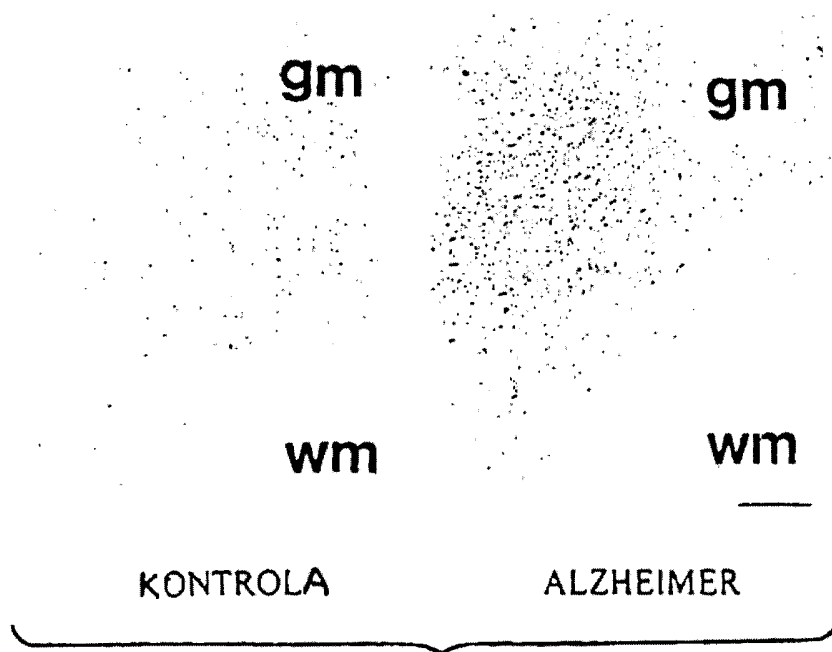
Obr. 11D



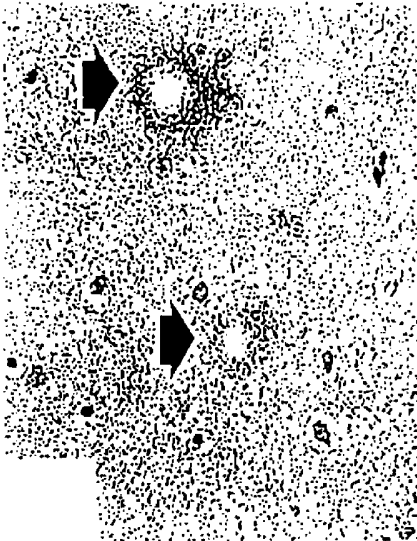
Obr. 11E



Obr. 12



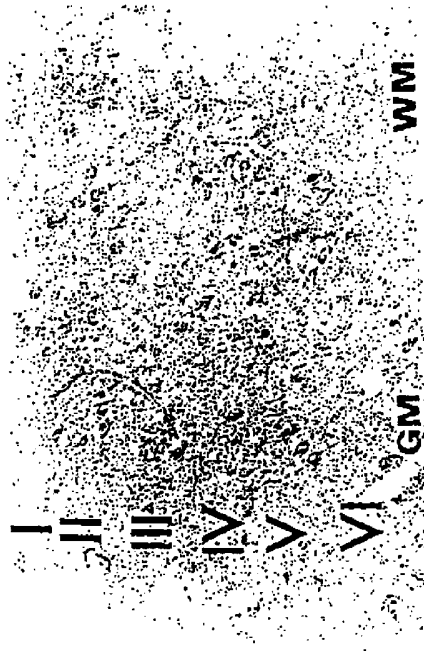
Obr. 13



Obr. 14C



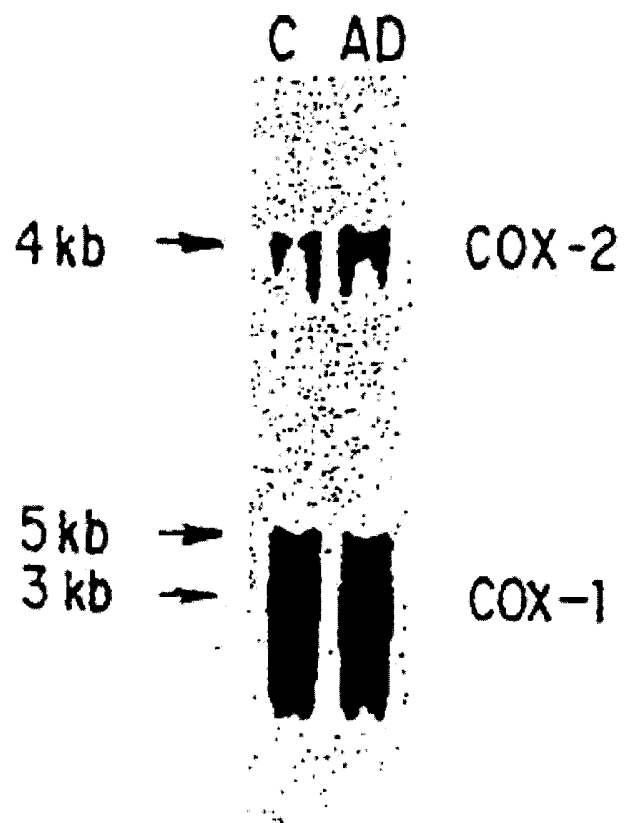
Obr. 14D



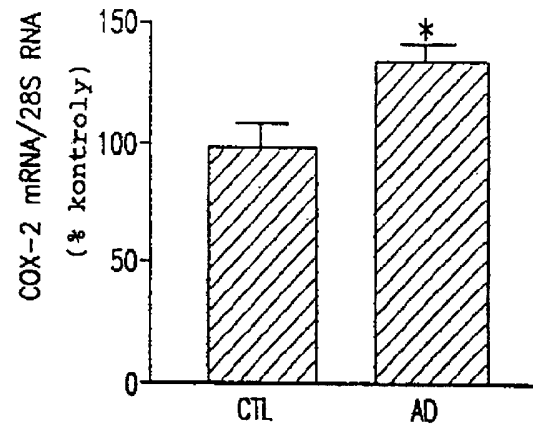
Obr. 14A



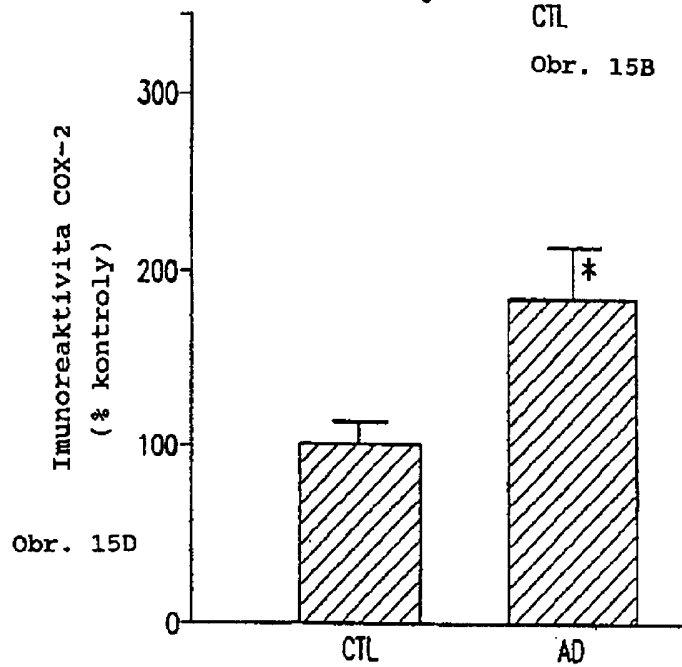
Obr. 14B



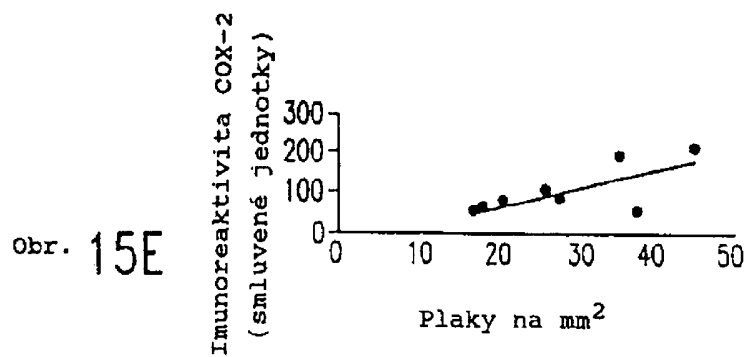
Obr. 15A



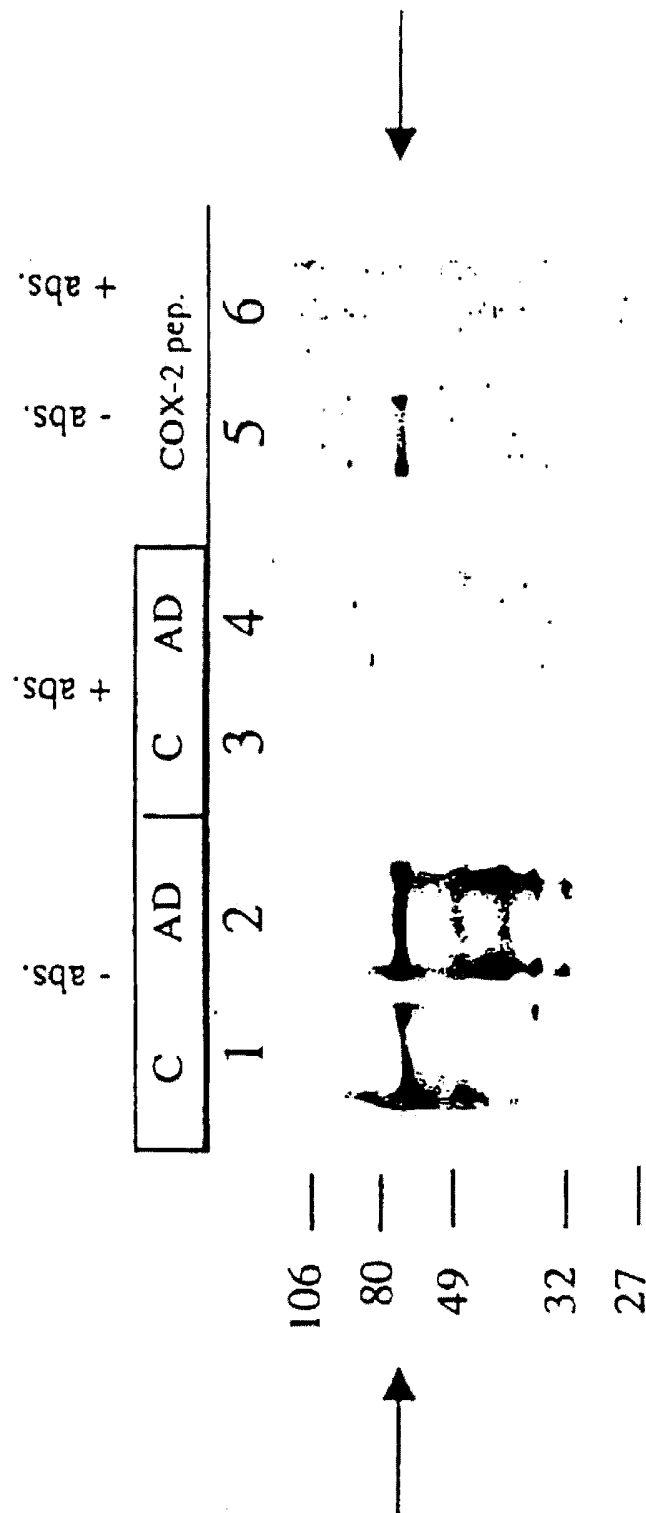
Obr. 15B



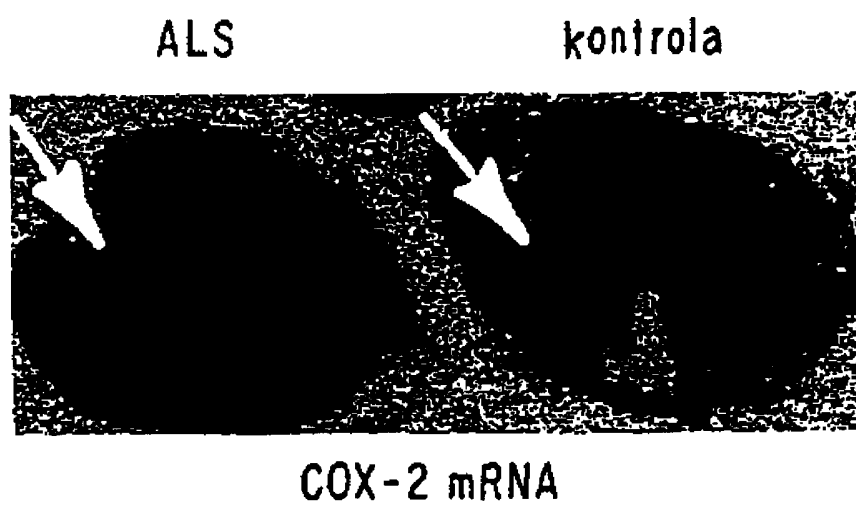
Obr. 15D



Obr. 15E



Obr. 15C



Obr. 16

Epilepsia

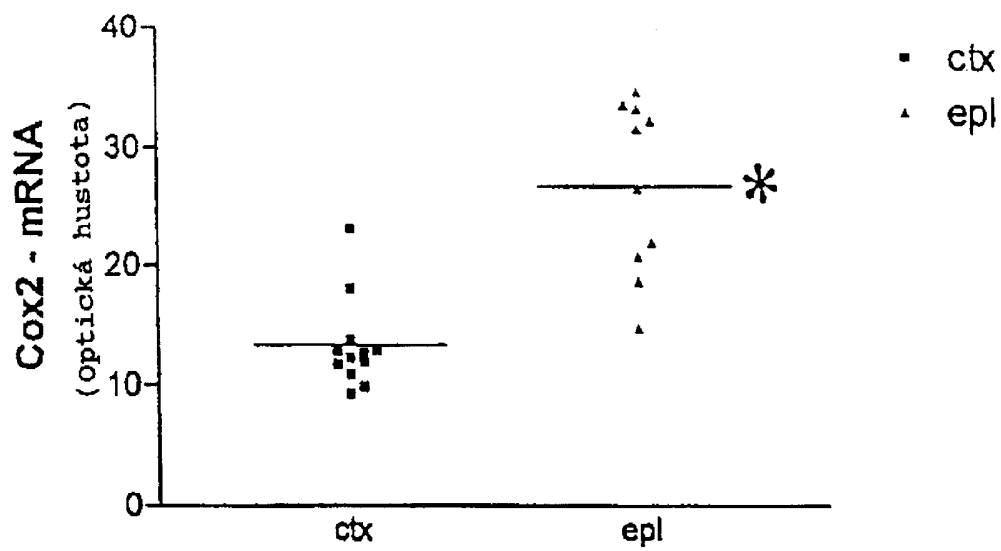


Obr. 17A

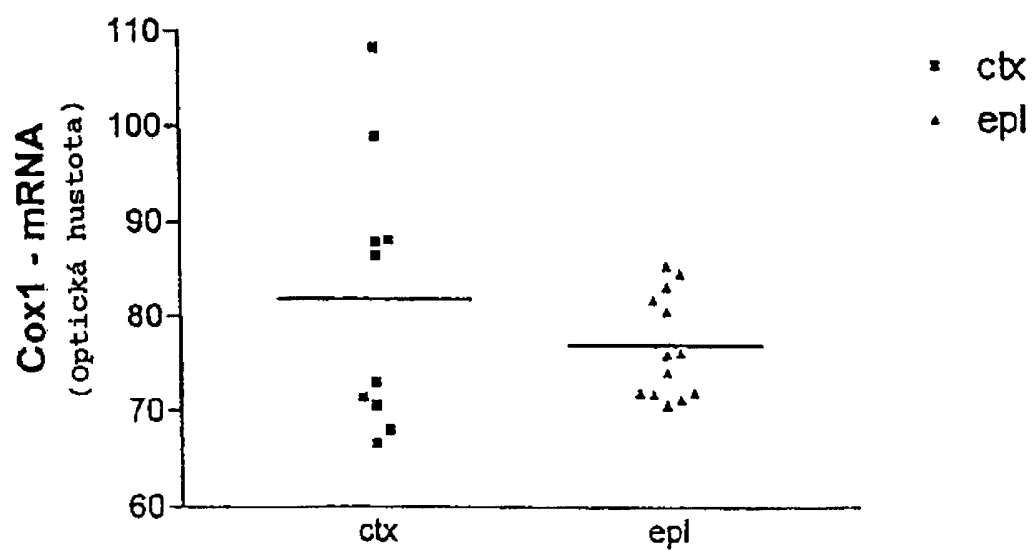
Kontrola



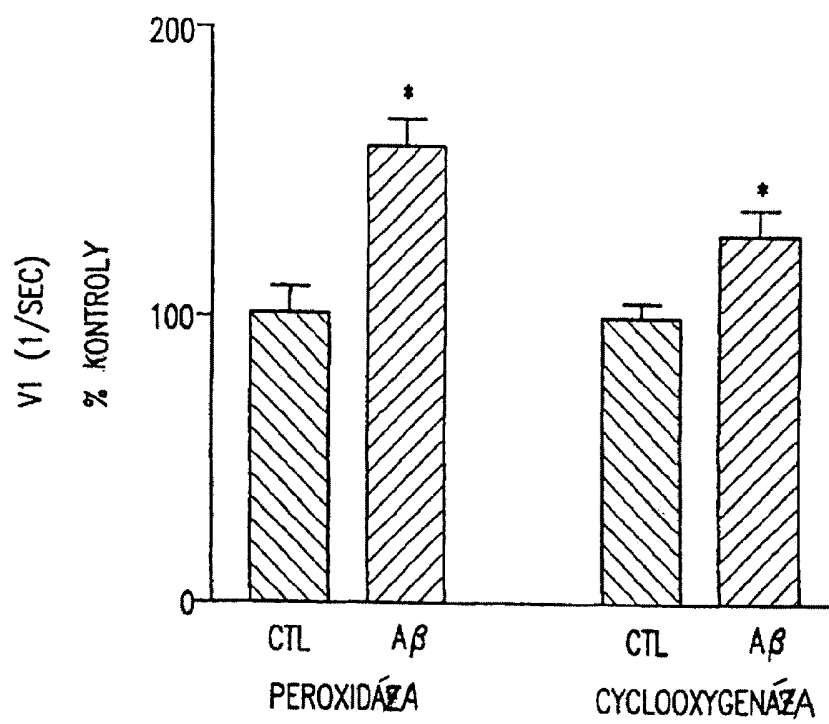
Obr. 17B



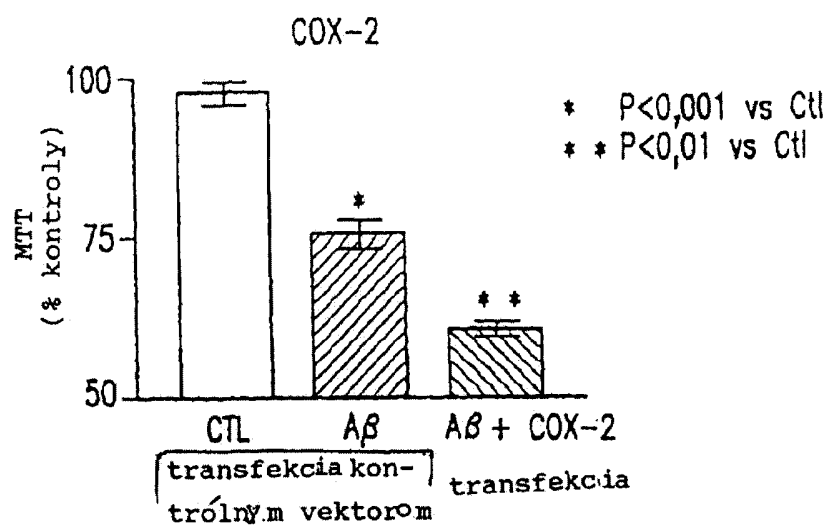
Obr. 17C



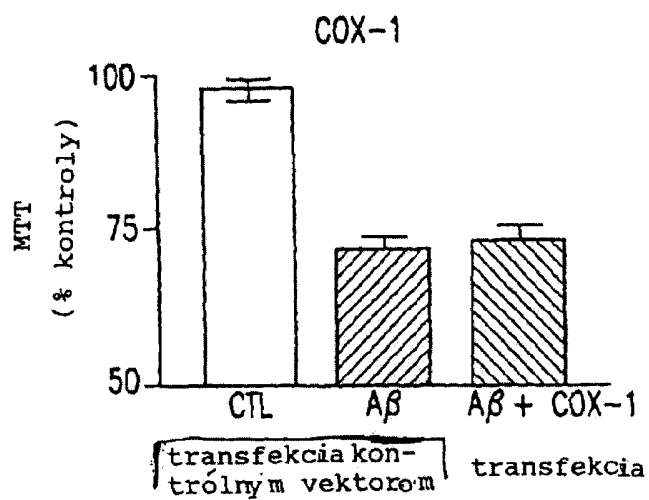
Obr. 17D



Obr. 18

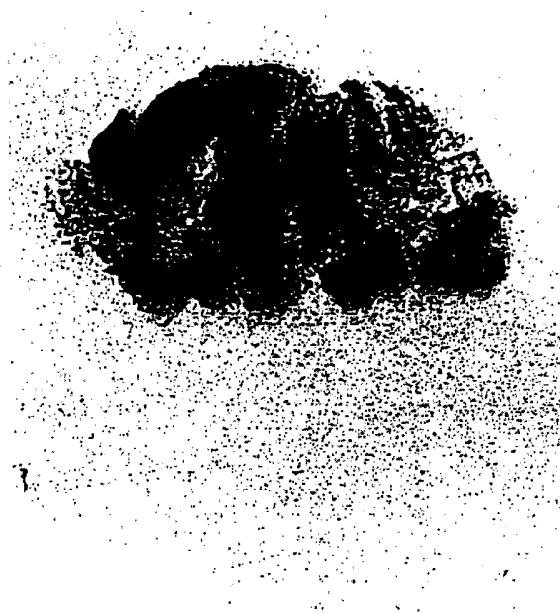


Obr. 19A



Obr. 19B

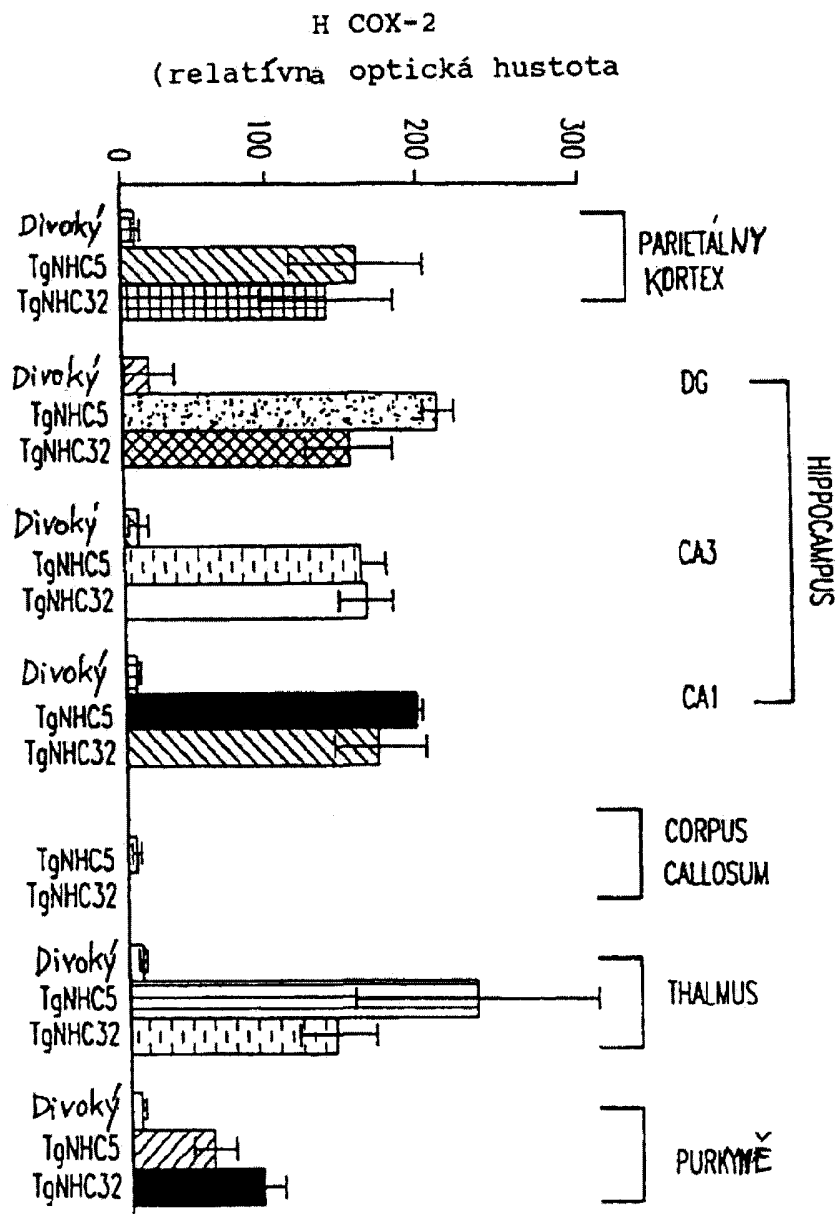
TgNHC32



DIVOKÝ

Obr. 20A

Obr. 20B

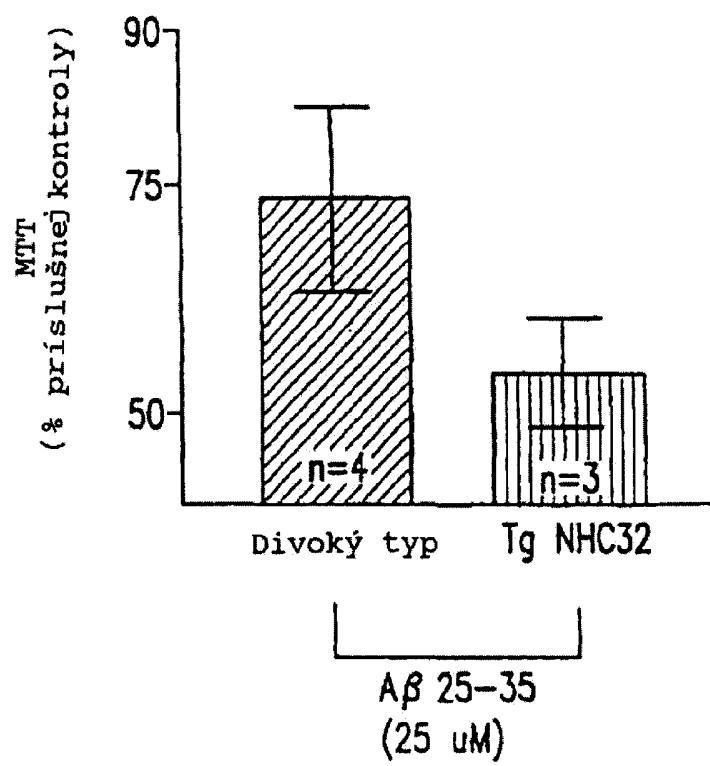




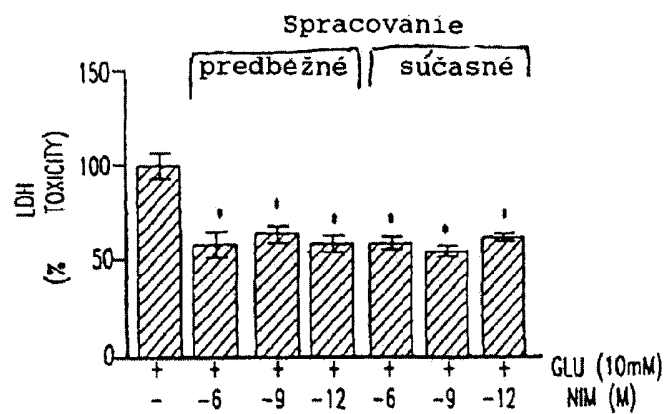
Obr. 21A



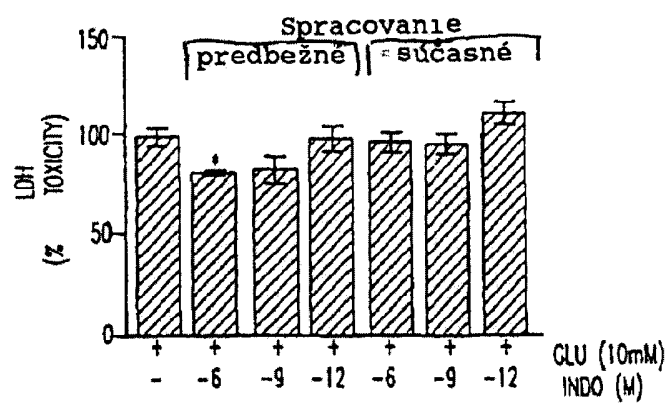
Obr. 21B



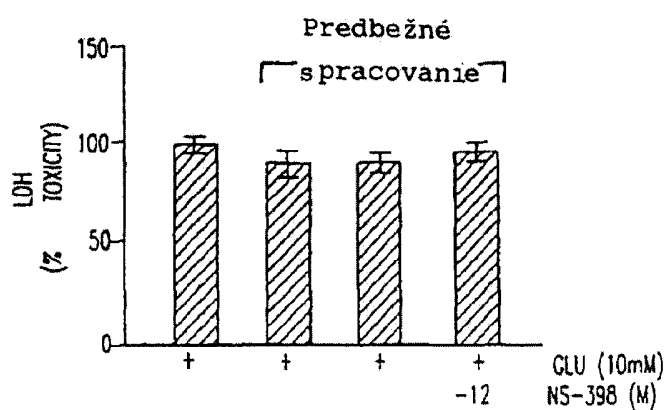
Obr. 21C



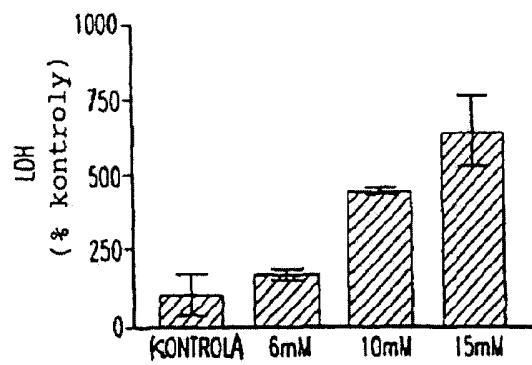
Obr. 22A



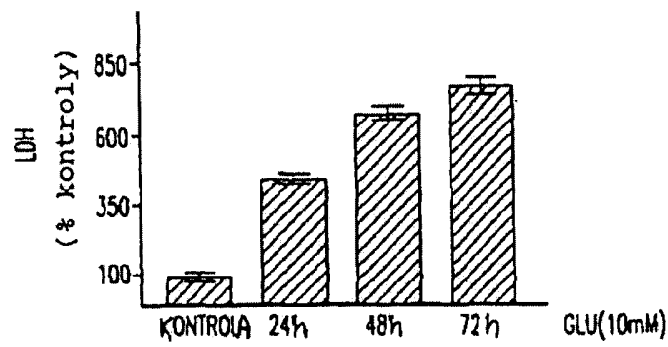
Obr. 22B



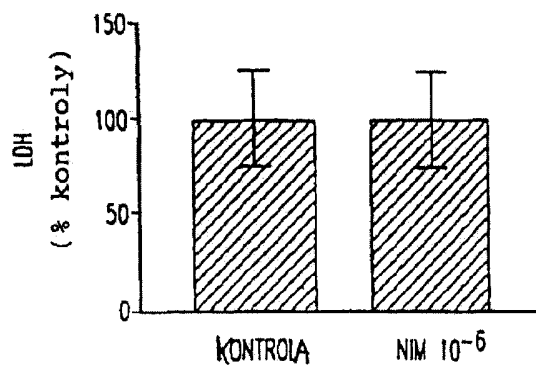
Obr. 22C



Obr. 23A



Obr. 23B



Obr. 23C