

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: 19.07.2000
(32) Datum podání prioritní přihlášky: 23.07.1999
(31) Číslo prioritní přihlášky: 1999/9917405
(33) Země priority: GB
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: 13.11.2002
(Věstník č. 11/2002)
(86) PCT číslo: PCT/EP00/06986
(87) PCT číslo zveřejnění: WO01/007066

(21) Číslo dokumentu:

2002 -247

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl. ⁷:

A 61 K 45/00
A 61 P 35/00
A 61 P 7/02
A 61 P 25/28

(71) Přihlašovatel:
THE UNIVERSITY OF DUNDEE, Dundee, GB;

(72) Původce:
Palmer Colin Neil Alexander, Dundee, GB;
Vosper Helen, Dundee, GB;
Wolf Charles Roland, Dundee, GB;

(74) Zástupce:
Zelený Pavel JUDr., Hálkova 2, Praha 2, 12000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Léčivo pro prevenci nebo snižování rozvoje
pěnových buněk nebo jejich odstraňování, pro
prevenci nebo léčbu choroby krevních cév, pro
prevenci nebo snižování proliferace buněk, pro
léčbu nebo prevenci rakoviny nebo Alzheimerovy
choroby, inhibitor aktivity PPARdelta,
farmaceutický prostředek a způsob identifikace
sloučeniny a tato sloučenina**

(57) Anotace:

Je popsáno použití inhibitoru aktivity PPARδ pro výrobu léčiva pro prevenci nebo snižování rozvoje pěnových buněk z makrofágů nebo jiných buněk nebo odstraňování pěnových buněk, pro prevenci nebo léčbu choroby krevních cév spjaté s tvorbou plátu a/nebo trombotické blokády krevních cév, pro prevenci nebo snižování proliferace buněk a pro léčbu nebo prevenci rakoviny nebo Alzheimerovy choroby. Dále je popsán inhibitor aktivity PPARδ pro použití v lékařství a farmaceutický prostředek s jeho obsahem, jakož i způsob identifikace sloučeniny, která může být vodící sloučeninou nebo kterou lze použít jako vodící sloučeninu nebo která inhibuje aktivitu PPARδ a sloučenina takto identifikovatelná.

CZ 2002 - 247 A3

Léčivo pro prevenci nebo snižování rozvoje pěnových buněk nebo jejich odstraňování, pro prevenci nebo léčbu choroby krevních cév, pro prevenci nebo snižování proliferace buněk, pro léčbu nebo prevenci rakoviny nebo Alzheimerovy choroby, inhibitor aktivity PPAR δ , farmaceutický prostředek a způsob identifikace sloučeniny a tato sloučenina

Oblast techniky

Tento vynález se týká použití inhibitoru aktivity PPAR δ pro výrobu léčiva pro prevenci nebo snižování rozvoje pěnových buněk z makrofágů nebo jiných buněk nebo odstraňování pěnových buněk, pro výrobu léčiva pro prevenci nebo léčbu choroby krevních cév spjaté s tvorbou plátu a/nebo trombotické blokády krevních cév, pro výrobu léčiva pro prevenci nebo snižování proliferace buněk a pro výrobu léčiva pro léčbu nebo prevenci rakoviny nebo Alzheimerovy choroby. Vynález se dále týká inhibitoru aktivity PPAR δ pro použití v lékařství a farmaceutického prostředku s jeho obsahem, jakož i způsobu identifikace sloučeniny, která může být vodící sloučeninou nebo kterou lze použít jako vodící sloučeninu nebo která inhibuje aktivitu PPAR δ a sloučeniny takto identifikovatelné.

Dosavadní stav techniky

Homeostáza lipidů je během normálního vývoje a ve stavu zdraví důsledně řízena, avšak dysfunkce homeostázy lipidů vede k rozvoji chorob, jako je ateroskleróza, obezita, diabetes a rakovina. Kritické regulátory v homeostáze lipidů zahrnují rodinu transkripčních faktorů vnímajících lipidy

- 1a -

(lipid sensing transcription factors), známých jako peroxisomovým proliferátorem aktivované receptory (Peroxisome Proliferator Activated Receptors = PPAR). PPAR jsou členy podrodiny steroidní hormon/jaderný receptor, které jsou aktivovány strukturně rozličnými chemikáliemi, jako jsou mastné kyseliny, prostanoidy, hypolipidemika, nesteroidní protizánětlivá léčiva, senzitivizéry inzulinu a látky znečišťující životní prostředí (1, 2). První popsany PPAR, PPAR α , řídí metabolismus lipidů v játrech a je aktivován léčivy snižujícími lipidy, jako je klofibrát (3, 4). Myši s narušeným genem kódujícím PPAR α mají deficit schopnosti metabolizovat a secernovat hepatické lipidy, přičemž hepatocyty v odpověď na hypolipidemická léčiva akumulují velké lipidové kapky (4). Další isoforma, PPAR-gamma, je vyžadována pro lipidy stimulovaný vývoj adipocytů. PPAR-gamma je nukleární receptor pro prostanoidy s vysokou afinitou (5) a je farmakologickým cílem thiazolidindionové skupiny

antidiabetických činidel, jako je rosiglitazon (BRL49653) (6), mezinárodní patentová přihláška publikačního čísla WO 94/05659 (SmithKline Beecham PLC). Genetická ablace tohoto genu je letální (7).

Funkce další formy PPAR, PPAR δ , není známa. O PPAR δ existují zprávy, že je ve všech vyšetřovaných tkáních exprimován na velmi nízkých hladinách (8), původci však nyní našli, že PPAR δ je exprimován selektivně v buňkách monocytární/makrofágové linie a je upregulován, spolu s PPAR γ , během forbolesterem indukované diferenciaci makrofágů. PPAR δ je senzorem mastných kyselin a je aktivován nenasycenými kyselinami kyselinou linoleovou a kyselinou olejovou, přičemž u těchto kyselin se uvažuje, že jsou důležitými signálními sloučeninami při diferenciaci monocytů (9, 10, 11). PPAR δ není aktivován fibrátovými léčivy, jako je klofibrát, nebo thiazolidindiony, jako je BRL49653.

WO 97/28149 (Merck & Co, Inc.) popisuje agonisty PPAR δ , o nichž se má za to, že jsou užitečné při zvyšování plasmatických hladin lipoproteinů s vysokou hustotou (HDL) u savců a při prevenci, zastavení nebo zpomalení progresu aterosklerotických kardiovaskulárních chorob.

O dietách s vysokým obsahem tuků je známo, že jsou hlavním faktorem při rozvoji aterosklerózy, přičemž mnohá léčiva používaná při léčbě aterosklerózy modifikují metabolismus lipidů. Lipidy jsou v pěnové buňce odvozené z makrofágu, což jsou vysoce aktivované makrofágy, které jsou vyplněny kapkami lipidů, fyzicky spjaté s patologií aterosklerózy. Tyto pěnové buňky jsou ve vysokých koncentracích přítomny ve vaskulárních lézích známých jako

pláty (ateromy), které eventuálně praskají, což vede k trombotické blokádě cév. Tato blokáda se může klinicky manifestovat jako infarkt myokardu, mrtvice nebo periferní arteriální choroba. Původci nyní ukázali, že myší makrofágy a lidská linie monocytárních buněk THP-1 exprimují PPAR δ při aktivaci forbolestery. Aktivované buňky THP-1 se stávají adherentními a rozprostírají se po plastických kultivačních miskách. Za příhodných podmínek mastných kyselin se tyto buňky naplní lipidy, jak se detekuje barvením Oil Red O a přemění se na pěnové buňky. Tyto buňky exprimují geny, které jsou in vivo spjaty s pěnovými buňkami, jako je IL-1 β , TNF α , IGF-1, CD36, MPC-1 a tromboxansyntáza. Tyto buňky poskytují model pro lipidy navozenou tvorbu pěnových buněk. Tato akumulace zamezena kandidátskými anti-sklerotickými léčivy, jako je BRL49653, čímž se vykazuje antisklerotická vlastnost léčiva a to, že tento model je užitečný při identifikaci antisklerotických léčiv. Toto stanovení se může provádět ve formátu mikrotitrových desek a lipidové barvení kvantifikováno opticky na čítači mikrotitrových desek.

Za použití volitelného expresního vektoru modifikovali původci buňky THP-1 k expresi RNA komplementární k RNA kódující PPAR δ (PPAR δ antisense RNA) Tato buněčná linie roste normálně v kultuře, avšak při ošetření forbolesterem se dále nediferencuje. Barvení této buněčné linie po ošetření forbolesterem odhalí, že buňky zahynuly. Inhibice funkce PPAR δ tedy změni odpověď na zánětlivý podnět z diferenciaci na smrt. Aterosklerotický plát je vyplněn pěnovými buňkami odvozenými z vysoce aktivovaných makrofágů, přičemž lokální koncentrace mediátorů zánětu jsou v plátu velmi vysoké. Aniž by byli vázáni nějakou teorií původci mají za to, že inhibice funkce PPAR δ

v pěnových buňkách, například v ateromových lézích, bude užitečná k iniciaci samodestrukční kaskády uvnitř plátu. Řízené odstranění pěnových buněk bez zánětu nebo nekrózy bylo v současnosti ukázáno jako účinný způsob navození regrese plátu za použití protismyslové terapie proti BCL-X (Pollman a kol., Nature Medicine, 4, 222 až 227 (1998)). Cílení PPAR δ v aktivovaných makrofázích je, jak původci věří, pravděpodobně vysoce specifické, jelikož je odpovědí, které záleží na specifickém fenotypovém stavu aktivované pěnové buňky.

Podstata vynálezu

Předmětem tohoto vynálezu je použití inhibitoru aktivity PPAR δ pro výrobu léčiva pro prevenci nebo snižování rozvoje pěnových buněk z makrofágů nebo jiných buněk nebo odstraňování pěnových buněk.

Předmětem tohoto vynálezu také je použití inhibitoru aktivity PPAR δ pro výrobu léčiva pro prevenci nebo snižování rozvoje pěnových buněk z makrofágů nebo jiných buněk nebo odstraňování pěnových buněk u pacienta.

Předmětem tohoto vynálezu dále je použití inhibitoru aktivity PPAR δ pro výrobu léčiva pro prevenci nebo léčbu choroby krevních cév spjaté s tvorbou plátu a/nebo trombotické blokády krevních cév.

Předmětem tohoto vynálezu rovněž je použití inhibitoru aktivity PPAR δ pro výrobu léčiva pro prevenci nebo snižování proliferace buněk jakož i léčiva pro léčbu nebo prevenci rakoviny.

Předmětem tohoto vynálezu též je použití inhibitoru aktivity PPAR δ pro výrobu léčiva pro léčbu nebo prevenci Alzheimerovy choroby.

Předmětem tohoto vynálezu také je použití inhibitoru aktivity PPAR δ pro výrobu léčiva pro některou z výše uvedených aplikací, kde inhibitorem aktivity PPAR δ je sloučenina, která brání expresi PPAR δ v buňce.

Předmětem tohoto vynálezu taktéž je použití inhibitoru aktivity PPAR δ pro výrobu léčiva pro některou z výše uvedených aplikací, kde inhibitorem aktivity PPAR δ je sloučenina, která blokuje účinek agonisty PPAR δ .

Předmětem tohoto vynálezu je inhibitor aktivity PPAR δ pro použití v lékařství.

Dalším předmětem tohoto vynálezu je farmaceutický prostředek, který obsahuje inhibitor aktivity PPAR δ a farmaceuticky přijatelný nosič.

Předmětem tohoto vynálezu je způsob identifikace sloučeniny, která může být vodící sloučeninou nebo kterou lze použít jako vodící sloučeninu k přípravě sloučeniny, která může být užitečná v lékařství, jehož podstata spočívá v tom, že zahrnuje selekci sloučeniny, která inhibuje aktivitu PPAR δ .

Předmětem tohoto vynálezu také je způsob identifikace sloučeniny, která může být vodící sloučeninou nebo kterou lze použít jako vodící sloučeninu k přípravě sloučeniny, která může

1) zabraňovat nebo snižovat rozvoj pěnových buněk z makrofágů nebo jiných buněk nebo odstraňovat pěnové buňky,

2) zabraňovat nebo být užitečná při léčbě cévní choroby spjaté s tvorbou plátu a/nebo trombotické blokády krevních cév,

3) zabraňovat nebo být užitečná při léčbě rakoviny nebo

4) zabraňovat nebo být užitečná při léčbě Alzheimerovy choroby,

jehož podstata spočívá v tom, že zahrnuje selekci sloučeniny, která inhibuje aktivitu PPAR δ .

Předmětem tohoto vynálezu rovněž je způsob identifikace sloučeniny, která inhibuje aktivitu PPAR δ , jehož podstata spočívá v tom, že z knihovny testovaných sloučenin se vybere jakákoli sloučenina, která inhibuje aktivitu PPAR δ .

Předmětem tohoto vynálezu také je způsob identifikace sloučeniny, která může být vodící sloučeninou nebo kterou lze použít jako vodící sloučeninu k přípravě sloučeniny, která může

1) zabraňovat nebo snižovat rozvoj pěnových buněk z makrofágů nebo jiných buněk, nebo odstraňovat pěnové buňky nebo

2) zabraňovat nebo být užitečná při léčbě cévní choroby spjaté s tvorbou plátu a/nebo trombotické blokády krevních cév,

jehož podstata spočívá v tom, že zahrnuje kroky selekce:

- a) vhodné populace primárních buněk nebo buněčné linie,
- b) dodání buněčné linii zánětlivého podnětu nebo růstového faktoru, který usnadňuje diferenciaci na prekurzor pěnové buňky,
- c) dodání k prekurzoru pěnové buňky vhodné koncentrace mastné kyseliny a
- d) změření akumulace mastné kyseliny v buňce za přítomnosti nebo nepřítomnosti této sloučeniny.

Předmětem tohoto vynálezu je sloučenina, která je identifikovatelná způsoby popsány výše.

Dalším předmětem tohoto vynálezu je bezprostředně výše zmíněná sloučenina pro použití v lékařství, jakož i farmaceutický prostředek, jehož podstata spočívá v tom, že obsahuje tuto sloučeninu a farmaceuticky přijatelný nosič.

Předmětem tohoto vynálezu také je použití sloučeniny takto identifikovatelné pro výrobu léčiva pro prevenci nebo snižování rozvoje pěnových buněk z makrofágů nebo jiných buněk nebo odstraňování pěnových buněk nebo prevence nebo léčby cévní choroby spjaté s tvorbou plátu a/nebo trombotické blokády krevních cév.

Předmětem tohoto vynálezu konečně je jakékoli nové použití pro výrobu léčiva pro léčbu nebo prevenci choroby krevních cév spjaté s tvorbou plátu a/nebo trombotické blokády krevních cév, jak je zde popsáno, dále jakékoli nové

použití pro identifikaci sloučeniny užitečné při prevenci nebo léčbě choroby krevních cév spjaté s tvorbou plátu a/nebo trombotické blokády krevních cév, jak je zde popsáno a dále rovněž použití inhibitoru aktivity PPAR δ pro výrobu léčiva pro prevenci nebo léčbu zánětlivých poruch.

Dále se uvádí podrobnější popis tohoto vynálezu v širších souvislostech.

Jak již bylo uvedeno, jedním z předmětů tohoto vynálezu je poskytnutí sloučenin, nebo prostředků hromadného vyšetřování (dále jen screeningu) těchto sloučenin, které interferují s tvorbou vývoje pěnové buňky nebo vedou k řízenému odstranění potenciálních pěnových buněk. O těchto sloučeninách se má za to, že jsou užitečné při navození regrese plátu a tudíž snížení rizika choroby srdce, mrtvice nebo trombózy.

Původci nyní ukázali, že PPAR δ hraje při aktivaci makrofágů kritickou roli a že selektivní inhibice aktivity PPAR δ může zabránit tvorbě pěnových buněk.

Původci také ukázali, že agonisté PPAR-gamma inhibují akumulaci lipidů a že PPAR δ a PPAR-gamma hrají v procesu tvorby pěnových buněk protichůdnou roli.

Způsob prevence nebo snižování rozvoje pěnových buněk z makrofágů nebo jiných buněk nebo odstraňování pěnových buněk spočívá v tom, že se kontaktují uvedené makrofágy nebo jiné buňky nebo pěnové buňky s účinným množstvím inhibitoru aktivity PPAR δ .

- 8a -

Vhodně jsou makrofágy nebo jinými buňkami makrofágy a jiné buňky účastníci se aterosklerotického patologického procesu.

Ačkoliv tento způsob má využití ve vztahu ke studiu makrofágů a pěnových buněk v kultuře, je tento způsob obzvláště vhodný k prevenci nebo snížení rozvoje pěnových buněk nebo odstraňování pěnových buněk in vivo, obzvláště v těle člověka nebo jiného savce. Pěnové buňky jsou lipidy naložené buňky, jako jsou leukocyty, obvykle makrofágy. Obsahují internalizované lipidy a skladují je jako cytoplasmatické kapky, což těmto buňkám ve světelném mikroskopu dodává jejich charakteristický pěnovitý vzhled.

Způsob prevence nebo snížení rozvoje pěnových buněk z makrofágů nebo jiných buněk nebo odstraňování pěnových buněk u pacienta zahrnuje podávání pacientovi účinného množství inhibitoru aktivity PPAR.

Vhodně jsou makrofágy nebo jinými buňkami makrofágy a jiné buňky účastníci se aterosklerotického patologického procesu.

Buňky, které se mohou vyvinout do pěnových buněk nezahrnují pouze makrofágy, ale také buňky hladkého svalu. Výhodně je inhibitorem aktivity PPAR δ inhibitor aktivity PPAR δ , který brání nebo snižuje rozvoj pěnových buněk z makrofágů nebo odstraňuje pěnové buňky odvozené z makrofágů. Výhodněji je způsobem prevence nebo snižování rozvoje pěnových buněk odvozených z makrofágů.

- 8b -

Bez závaznosti pro další aspekty tohoto vynálezu a bez vztahu k jakékoli teorii týkající se tohoto vynálezu mají původci za to, že rozvoj pěnových buněk z makrofágů je spjat s různými chorobnými stavy a že inhibitor aktivity PPAR δ bude bránit nebo snižovat, alespoň žádoucí měrou, rozvoj pěnových buněk z makrofág. Choroby, které jsou spjaty s rozvojem pěnových buněk zahrnují aterosklerózu, srdeční chorobu, mrtvici, choroby periferních arterií a anginu, na které však výčet není omezen.

Tyto způsoby mohou být rovněž použity k prevenci restenózy a k regresi ateromu.

Zjištění, že inhibice aktivity PPAR δ zabraňuje aktivaci makrofágů rovněž naznačuje, že tyto způsoby mohou být také použity při léčbě zánětlivých poruch. Příklady zánětlivých poruch zahrnují revmatoidní artritidu, systémovou sklerózu a lupus. Na podporu role PPAR δ při zánětu je nesteroidní protizánětlivé léčivo sulindak, které inhibuje transkripční aktivitu PPAR δ a není schopno zabránit epidermální hyperplasii a zánětu navozeným PMA (forbol-myristat-acetat) u myši s deplecí PPAR δ (Peters J. M. a kol., Mol. and Cell Biol. 20, 5119 až 5128 (2000)).

Způsob prevence nebo léčby zánětlivých poruch tudíž zahrnuje podávání pacientovi účinného množství inhibitoru aktivity PPAR δ .

Existuje široká paleta poruch, které vznikají patologickými procesy aterosklerózy a zahrnují anginu,

koronární srdeční chorobu, mrtvici, periferní vaskulární chorobu, Alzheimerovu chorobu, vaskulární demenci, systémovou sklerózu a retinální vaskulární degeneraci.

Dále způsob prevence nebo léčby vaskulární choroby spjaté s tvorbou plátu a/nebo trombotické blokády krevních cév u pacienta zahrnuje podávání pacientovi účinného množství inhibitoru aktivity PPAR δ . Má se za to, že tento způsob je obzvláště vhodný k prevenci nebo léčbě aterosklerózy, koronární srdeční choroby, mrtvice nebo periferní srdeční choroby.

Původci nyní našli, že inhibice aktivity PPAR δ inhibuje proliferaci buněk stimulovanou PMA. Tak způsob prevence nebo snižování proliferace buněk zahrnuje kontakt buněk s inhibitorem aktivity PPAR δ . Buňky, které jsou stimulovány k proliferaci prostřednictvím PMA, zahrnují kožní buňky, buňky tračníku, prsní buňky a prostatické buňky. Na podporu role PPAR δ v tumorigenezi bylo v současné době ukázáno, že nesteroidní protizánětlivá činidla vykazují protirakovinnou aktivitu u buněk odvozených z tračníku prostřednictvím blokády transkripční aktivity PPAR δ a usnadněním apoptózy (He T-C. a kol., Cell, 99, 335 až 343 (1999)).

PPAR δ se účastní působení tumorového promotoru, kterým je PMA.

Způsob léčby nebo prevence rakoviny u pacienta zahrnuje podávání pacientovi účinného množství inhibitoru

- 8d -

aktivity PPAR δ .

Způsob je obzvláště vhodný pro použití v souvislosti s rakovinami kůže.

Způsob je zvláště vhodný pro použití v souvislosti s rakovinami prsu.

Způsob je také obzvláště vhodný pro použití v souvislosti s rakovinami tračnicku.

Způsob je rovněž zvláště vhodný pro použití v souvislosti s rakovinami prostaty.

Způsob léčby nebo prevence Alzheimerovy choroby u pacienta zahrnuje podávání pacientovi účinného množství inhibitoru aktivity PPAR δ .

Inhibice PPAR δ může zabránit neurodegeneraci zapříčiněné gliálními buňkami, které tvoří během normálního stárnutí pěnové buňky. U těchto pěnových buněk se má za to, že jejich vznik je usnadněn dietami s vysokým obsahem tuku (Mato M. a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 3269 až 3274 (1996)).

Je známo, že ApoE (apolipoprotein E) má protektivní účinek u Alzheimerovských chorob a původci v příkladech provedení vynálezu ukazují, že ApoE je reprimován mastnými kyselinami a PPAR δ . Aniž by byli vázáni

nějakou teorií, původci věří, že toto může být mechanismem, kterým diety s vysokým obsahem tuku usnadňují demenci, přičemž antagonizace tohoto procesu může být přínosná (Kamijn S. a kol., *Annals of Neurology*, 42, 776 až 782 (1997)).

Do pojmu „účinné množství inhibitoru aktivity PPAR“, původci zahrnují význam množství, které je účinné k prevenci nebo snížení rozvoje pěnových buněk z makrofágů nebo jiných buněk nebo k odstranění pěnových buněk, obzvláště množství, které je účinné k prevenci choroby (do čehož původci zahrnují prevenci progresu z asymptomatického stavu do symptomatického stavu) nebo k léčbě choroby (do čehož původci zahrnují zlepšení symptomů a zpomalení jejich progresu) klinicky užitečnou měrou. Klinicky užitečnou míru snadno určí lékař.

Pojmem „inhibitor aktivity PPAR δ “ původci míní jakýkoli vhodný inhibitor, který může snížit aktivitu PPAR δ v buňce, například v buňce pacienta. Je obzvláště výhodné, když inhibitorem aktivity PPAR δ je inhibitor, který inhibuje aktivitu PPAR δ v makrofágové buňce nebo pěnové buňce odvozené z makrofágové buňky. Pojem „inhibitor aktivity PPAR δ “ zahrnuje sloučeniny, které blokují účinek agonistů PPAR δ .

Je výhodné, když je inhibitor aktivity PPAR δ selektivní vůči PPAR δ . Obzvláště je výhodné, když je inhibitor účinný při inhibici aktivity PPAR δ , ale je v podstatě neúčinný při inhibici aktivity jiných isoform PPAR, jako je PPAR α nebo PPAR γ . Ačkoliv je výhodné, když inhibitor aktivity PPAR δ nemodifikuje aktivitu jiných

isoformem PPAR, může být výhodné, pokud molekula je agonistou nebo aktivátorem aktivity PPARy. Je také výhodné, když inhibitor aktivity PPAR δ nemodifikuje aktivitu jiných receptorů rodiny steroidních hormonů. Pojmem „selektivní“ původci míní, že sloučenina je alespoň desetinásobně účinnější při inhibici aktivity PPAR δ než při modifikaci jiné isoformy PPAR. Výhodně je alespoň 100-násobně selektivnější.

Inhibitorem může být inhibitor, který zabraňuje expresi PPAR δ v buňce. Pojmem „zabraňuje expresi“ původci míní že v podstatě zabraňuje expresi nebo alespoň snižuje hladinu exprese PPAR δ na užitečnou míru. Obvykle je sloučeninou, která zabraňuje expresi PPAR δ v buňce molekula založená na nukleové kyselině.

Jak je ukázáno v příkladech provedení vynálezu původci demonstrovali, že použití komplementární sekvence celé lidské PPAR δ , včetně částí netranslatovaných oblastí, je schopno inhibovat tvorbu pěnových buněk z makrofágů. Zjistí se, že menší části cDNA kódující PPAR δ mohou být využity jako komplementární činidla (antisense agents), obzvláště činidla odpovídající počátku translace proteinu PPAR δ .

Komplementární molekuly mohou být sestaveny podle sekvence PPAR δ , což je sekvence lidské cDNA, kterou uvádí Schmidt a kol., Mol. Endocrinol., 6, 1634 až 1641 (1992) a která je uložena v genetické bance GenBank přístupové číslo L07592.

Činidla komplementární k PPAR δ zahrnují činidla, která se váží na mRNA PPAR δ a, výhodně, inhibují její translaci. Do pojmu „komplementární činidlo (antisense agent)“ původci zahrnují molekuly založené na nukleové kyselině, které jsou schopny vytvořit s genomovou sekvencí PPAR δ triplexy a selektivně zabránit transkripci nebo translaci tohoto genu.

Komplementární molekulou může být RNA (v kterémžto případě je transkribována z vektoru sestrojeného k vytvoření komplementárních transkriptů) nebo to mohou být molekuly DNA nebo molekuly podobné DNA, jako jsou komplementární oligonukleotidy.

Má se za to, že nadměrná exprese komplementární RNA z vhodných dílů lidských genomových sekvencí odpovídajících polohám 67886 až 139948 lidského klonu PAC č. 109F14 bude účinná při inhibici aktivity PPAR δ . Klon PAC č. 109F14 je dostupný u HGMP Resource Centre, Genome Campus, Hinxton, Cambridgeshire, CB10 1AB, UK. Sekvence genu PPAR δ má přístupové číslo AL022721.

Komplementární oligonukleotidy mohou být sestrojeny s odkazem na sekvenci cDNA PPAR δ nebo na sekvenci genu PPAR δ .

U oligonukleotidů se předpokládá, že jsou degradovány nebo inaktivovány endogenními buněčnými nukleázami. K vyřešení tohoto problému je možné použít modifikovaných oligonukleotidů, např. nukleotidů, které mají pozměněné mezinukleotidové vazby, v nichž jsou přirozeně se vyskytující fosfodiesterové vazby nahrazeny jinými vazbami. například Agrawal a kol., Proc. Natl. Acad.



Sci. USA, 85, 7079 až 7083 (1988) ukázal zvýšenou inhibici HIV-1 v tkáňové kultuře za použití fosforamidátů a fosforothioátů oligonukleotidů. Sarin a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 7448 až 7451 (1988) demonstroval zvýšenou inhibici HIV-1 za použití methylfosfonátů oligonukleotidů. Agrawal a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 7790 až 7794 (1989) ukázal inhibici replikace HIV-1 jak v časně infikované tkáňové kultuře, tak v chronicky infikované tkáňové kultuře za použití fosforothioátů oligonukleotidů specifických k nukleotidové sekvenci. Leither a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 3430 až 3434 (1990) uvádí inhibici replikace viru chřipky v tkáňové kultuře za použití fosforothioátů oligonukleotidů.

U oligonukleotidů s umělými vazbami bylo ukázáno, že jsou odolné vůči degradaci in vivo. Například Shaw a kol., Nucleic Acids Res., 19, 747 až 750 (1991) uvádí, že jinak nemodifikované oligonukleotidy se stávají odolnějšími vůči nukleázám in vivo když jsou blokovány na 3'-konci jistými zakrývacími strukturami a že nezakryté fosforothioaty oligonukleotidů nejsou in vivo degradovány.

Detailní popis H-fosfonátového přístupu k syntéze fosforothioátových oligonukleosidů je poskytnut v Agrawal a Tang, Tetrahedron Letters, 31, 7541 až 7544 (1990), jejichž poznatky jsou zde zahrnuty formou odkazu. Syntézy methylfosfonátů, fosforothioátů, fosforamidátů, fosfatesterů, přemostěných fosforamidátů a přemostěných fosforothioátů oligonukleotidů jsou v oboru známy. Viz například Agrawal a Goodchild, Tetrahedron Letters, 28, 3539 (1987), Nielsen a kol., Tetrahedron Letters, 29, 2911 (1988), Jager a kol., Biochemistry, 27, 7237 (1988), Uznanski a kol., Tetrahedron

Letters, 28, 3401 (1987), Banwarth, Helv. Chim. Acta, 71, 1517 (1988), Crossick a Vyle, Tetrahedron Letters, 30, 4693 (1990) a Agrawal a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 1401 až 1405 (1990), jejichž poznatky jsou zde zahrnuty formou odkazu. jsou možné také jiné způsoby syntézy nebo výroby. Ve výhodném ztělesnění je oligonukleotidem kyselina deoxyribonukleová (DNA), ačkoliv sekvence ribonukleové kyseliny (RNA) mohou být rovněž syntetizovány a aplikovány.

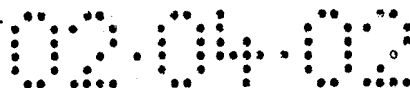
Oligonukleotidy užitečné podle tohoto vynálezu jsou výhodně sestrojeny tak, že odolávají degradaci endogenními nukleolytickými enzymy. Degradace oligonukleotidů in vivo vede ke vzniku produktů degradace oligonukleotidů, které jsou kratší. Takovéto produkty rozkladu se zúčastní nespecifické hybridizace s větší pravděpodobností a jsou s větší pravděpodobností méně účinné, než jejich protějšky s plnou délkou. Je tedy žádoucí používat oligonukleotidy, které jsou odolné vůči degradaci v těle a které jsou schopny dosáhnout cílových buněk. Předložené oligonukleotidy mohou být učiněny odolnějšími vůči degradaci in vivo než substitucí jedné nebo více přirozených fosfodiesterových vazeb umělými internukleotidovými vazbami, například nahrazením fosforu ve vazbě sírou. Příklady vazeb, které mohou být použity zahrnují fosfothioaty, methylfosfonaty, sulfony, sulfáty, ketyl, fosforodithioaty, různé fosforamidaty, fosfatestery, přemostěné fosforothioaty a přemostěné fosforamidaty. Takové příklady jsou ilustrativní nikoli omezující, jelikož internukleotidové vazby jsou v oboru známy. Viz například Cohen, Trends in Biotechnology, (1990). Syntéza oligonukleotidů, které mají jednu nebo více těchto vazeb místo fosfodiesterových internukleotidových vazeb je v oboru dobře známa, včetně syntetické cesty k výrobě

oligonukleotidů, které mají smíšené internukleotidové vazby.

Oligonukleotidy mohou být učiněny resistantními vůči prodloužení endogenními enzymy „zakrytím“ nebo inkorporací podobných skupin na nukleotidech na 5' nebo 3' konci. Činidlo pro zakrytí je komerčně dostupné jako Amino-Link IITM firmy Applied BioSystems Inc. Foster City, CA. Způsoby zakrytí jsou popsány například v Shaw a kol., *Nucleic Acids Res.*, 19, 747 až 750 (1991) a Agrawal a kol., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88 (17), 7595 až 7599 (1991), jejichž poznatky jsou zde zahrnuty formou odkazu.

Dalším způsobem výroby oligonukleotidů odolných vůči útokům nukleázy je jejich „samostabilizace“, jak popsal Tang a kol., *Nucl. Acids Res.*, 21, 2729 a 2735 (1993), což je zde zahrnuto formou odkazu. Samostabilizované oligonukleotidy mají na svých 3'-koncích vlásníčkovou smyčku a vykazují zvýšenou odolnost vůči degradaci fosfodiesterázami hadího jedu, DNA polymerázou I a fetálním hovězím sérem. Samostabilizovaná oblast oligonukleotidu neinterferuje při hybridizaci s komplementárními nukleovými kyselinami, přičemž farmakokinetické a stabilitní studie u myši ukázaly u samostabilizovaných zvýšenou persistenci in vivo s ohledem na jejich lineární protějšky.

V souladu s tímto vynálezem je inherentní vazebná specifita komplementárních oligonukleotidů charakteristická pro párování bází usnadněna omezením dostupnosti komplementární sloučeniny na její zamýšlený lokus in vivo, což umožňuje použití nižších dávek a minimalizaci systémových účinků. Oligonukleotidy se tedy aplikují lokálně k dosažení požadovaného účinku. Koncentrace



oligonukleotidů v požadovaném místě je mnohem vyšší než pokud se oligonukleotidy podávají systémově, přičemž terapeutického účinku se může dosáhnout za použití významně nižšího celkového množství. Místní vysoká koncentrace oligonukleotidů usnadňuje penetraci cílových buněk a účinně blokuje translaci cílových sekvencí nukleové kyseliny.

Oligonukleotidy mohou být do místa dodány jakýmkoli prostředkem příhodným k místnímu podávání léčiva. Například roztok oligonukleotidů může být injikován přímo do místa nebo dodáván infuzí za použití infuzní pumpy. Tyto oligonukleotidy mohou být rovněž inkorporovány do implantabilního prostředku, který při umístění na požadované místo, umožňuje oligonukleotidům uvolnění do okolního místa.

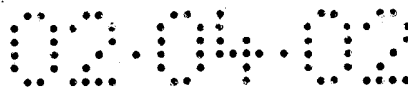
Oligonukleotidy se nejvýhodněji podávají prostřednictvím hydrogelového materiálu. Hydrogel je nezápálivý a biologicky degradovatelný. Dnes je známo mnoho takových materiálů, včetně materiálů, které jsou vyrobeny z přírodních a syntetických polymerů. Ve výhodném ztělesnění tento způsob využívá hydrogel, který je při teplotách pod tělesnou teplotou kapalný, ale který při teplotě blízké tělesné teplotě geluje k vytvoření polotuhého hydrogelu držícího tvar. Výhodnými hydrogely jsou polymery opakujících se jednotek ethylenoxid-propylenoxid. Vlastnosti polymeru jsou závislé na molekulové hmotnosti polymeru a relativním procentu polyethylenoxidu a polypropylenoxidu v polymeru. Výhodné hydrogely obsahují od asi 10 do asi 80 % hmotnostních ethylenoxidu a od asi 20 do asi 90 % hmotnostních propylenoxidu. Obzvláště výhodný hydrogel obsahuje okolo 70 % polyethylenoxidu a 30 % propylenoxidu. Hydrogely, které lze použít jsou dostupné



například od BASF Corp., Parsippany, NJ pod ochrannou
známkou Pluronic™.

V tomto ztělesnění je hydrogel ochlazen na
kapalný stav a oligonukleotidy se přimísí do kapaliny
v koncentraci okolo 1 mg oligonukleotidu na gram hydrogelu.
Výsledná směs se poté aplikuje na ošetřovaný povrch,
například rozprašováním nebo natíráním během chirurgického
zákroku nebo za použití katetrizačních nebo endoskopických
postupů. Jak se polymer zahřívá dochází k jeho tuhnutí
k vytvoření gelu, přičemž oligonukleotidy po dobu
definovanou přesným složením gelu difundují z gelu do
okolních buněk.

Oligonukleotidy lze podávat prostřednictvím
jiných implantátů, které jsou komerčně dostupné nebo
popsané ve vědecké literatuře, včetně liposomů, mikrokapslí
a imlantabilních prostředků. Například implantáty vyrobené
z biologicky degradovatelných materiálů, jako jsou
polyanhydridy, polyorthoestery, kyselina polyaktová a
kyselina polyglokolová a jejich kopolymery, kolagen a
proteinové polymery nebo biologicky nedegradovatelné
materiály, jako je ethylvinylacetat (EVAc), poly-
vinylacetat, ethylvinylalkohol a jejich deriváty mohou
být použity k lokálnímu podávání oligonukleotidů. Tyto
oligonukleotidy mohou být inkorporovány do materiálu při
jeho polymeraci nebo tuhnutí za použití technik tavení nebo
odpařování rozpouštědla, nebo mohou být s materiálem
smíseny mechanicky. V jednom ztělesnění se oligonukleotidy
smísí s a aplikují na povlaky implantabilních prostředků,
jako jsou dextranskem potažené kuličky z oxidu křemičitého,
stenty nebo katetry.

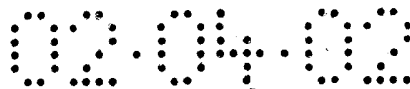


Dávka oligonukleotidů je závislá na velikosti oligonukleotidů a účelu, pro nějž jsou podávány. Obecně se rozmezí vypočítá ve vztahu k povrchu léčené tkáně. Účinná dávka oligonukleotidu je do určité míry závislá délce a chemickém složení oligonukleotidu, ale obecně je v rozmezí od asi 30 do 3000 μg na čtvereční centimetr plochy tkáně.

Oligonukleotidy se mohou podávat pacientovi systémově jak k terapeutickým, tak k profylaktickým účelům. Oligonukleotidy se mohou podávat jakýmkoli účinným způsobem, například parenterálně (např. intravenózně, subkutánně, intramuskulárně) nebo orálně, nasálně nebo jinými prostředky, které umožní oligonukleotidům přístup do pacientova krevního oběhu a cirkulaci v něm. Oligonukleotidy podávané systémově se výhodně podávají spolu s lokálně podávanými oligonukleotidy, ale mají rovněž využití při absenci lokálního podávání. K tomuto účelu bude obecně účinná dávka v rozmezí od asi 0,1 do 10 gramů na podání dospělému člověku.

Vedle komplementárních činidel popsaných výše mohou být sestaveny ribozymy, obzvláště ribozymy ze žraloka kladivouna, založené na cDNA PPAR δ nebo genové sekvenci PPAR δ , o nichž se má za to, že jsou užitečné jako inhibitory aktivity PPAR δ .

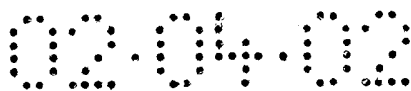
Ribozymy, které mohou být kódovány v nukleové kyselině k dodání do cíle jsou popsány v Cech a Herschlag „Site-specific cleavage of single stranded DNA“ US patent č. 5 180 818, Altman a kol. „Cleavage of targeted RNA by RNase P“, US patent č. 5 168 053, Cantin a kol. „Ribozyme cleavage of HIV-1 RNA“ US patent č. 5 149 796, Cech a kol. „RNA ribozyme restriction endoribonucleases and methods“ US



patent č. 5 116 742, Been a kol. „RNA ribozyme polymerases, dephosphorylases, restriction endonucleases and methods“ US patent č. 5 093 246 a Neen a kol. „RNA ribozyme polymerases, dephosphorylases, restriction endonucleases and methods, cleaves single-stranded RNA at specific site by transesterification“ US patent č. 4 987 071, všechny jsou zde zahrnuty formou odkazu. Vhodné cíle pro ribozymy zahrnují transkripční faktory, jako je c-fos a c-myc a bcl-2. Durai a kol., Anticancer Res., 17, 3307 až 3312 (1997) popisuje ribozym žraloka kladivouna proti bcl-2.

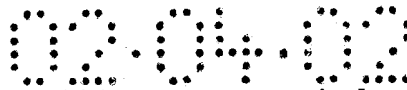
Genetické konstrukty, které exprimují ribozymy nebo komplementární sloučeniny užitečné ve způsobech podle tohoto vynálezu se mohou snadno připravit. Vhodně jsou genetickými konstrukty konstrukty, které jsou upraveny k dodání a expresi ribozymu nebo komplementární molekuly v cílové buňce. Způsob podle tohoto vynálezu tedy zahrnuje způsob genové terapie.

Genová terapie se může provádět podle obecně přijímaných způsobů, například jak popsal Friedman, 1991. Připraví se virus nebo plasmidový vektor (viz dále uvedené detaily) obsahující kopii genu kódujícího ribozym nebo komplementární molekulu navázanou na prvky řízení exprese a schopnou replikace uvnitř cílových buněk. Vhodné vektory jsou známy, jako jsou vektory popsané v US patentu č. 5 252 479 a mezinárodní patentové přihlášce publikačního čísla WO 93/07282 (Boehringer Ingelheim International GmbH). Vektor se poté injikuje pacientovi, buď lokálně do cílového místa nebo systémově. Pokud není transfekovaný gen trvale inkorporován do genomu každé z cílových buněk, může být nutné opakovat léčbu periodicky.



Při provádění způsobů genové terapie podle tohoto vynálezu mohou být užitečné systémy přenosu genu známé v oboru. Ty zahrnují virové a neviróvé způsoby přenosu. Jako vektory přenosu genu se používají četné viry včetně papovavirů, např. SV40 (Madzak a kol., 1992), adenoviru (Berkner, 1992, Berkner a kol., 1988, Gorziglia a Kapikian, 1992, Quantin a kol., 1992, Rosenfeld a kol., 1992, Wilkinson a kol., 1992, Stratford-Perricaudet a kol., 1990), viru kravských neštovic (Moss, 1992), viru spjatého s adenomem (Muzyczka, 1992, Ohi a kol., 1990) herpesvirů včetně HSVa EBV (Margolskee, 1992, Johnson a kol., 1992, Fink a kol., 1992, Breakfield a Geller, 1987, Freese a kol., 1990) a retrovirů ptačího (Brandyopadhy a Temin, 1984, Petropoulos a kol., 1992), myšího (Miller, 1992, Miller a kol., 1985, Sorge a kol., 1984, Mann a Baltimore, 1985, Miller a kol., 1988) a lidského původu (Shimada a kol., 1991, Helseth a kol., 1990, Page a kol., 1990, Buchschacher a Panganiban, 1992). Dosud je většina protokolů lidské genové terapie založena na inaktivovaných myších retrovirách. Výhodné jsou vektory založené na lentivirech.

Neviróvé způsoby přenosu genu známé v oboru zahrnují chemické techniky jako je koprecipitace s fosforečnanem vápenatým (Graham a van der Eb, 1973, Pellicer a kol., 1980), mechanické techniky, například mikroinjekci (Anderson a kol., 1980, Gordon a kol., 1980, Brinster a kol., 1981, Constantini a Lacy, 1981) membránovou fúzí zprostředkovaný přenos pomocí liposomů (Felgner a kol., 1987, Wang a Huang, 1989, Kaneda a kol., 1989, Stewart a kol., 1992, Nabel a kol., 1990, Lim a kol., 1992) a přímý příjem DNA a receptorem zprostředkovaný přenos DNA (Wolff a kol., 1990, Wu a kol., 1991, Zenke a kol.,

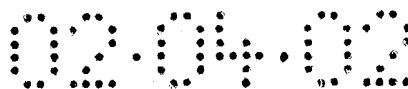


1990, Wu a kol., 1989b, Wolff a kol., 1991, Wagner a kol., 1990, Wagner a kol., 1991, Cotten a kol., 1990, Curiel a kol., 1991a, Curiel a kol., 1991b). Virem zprostředkované přenosy genu se mohou kombinovat s přímým přenosem genu in vivo za použití dodání liposomy, což umožňuje zaměřit virové vektory do nádorových buněk a nikoli do okolních nedělících se tkání. Alternativně může být buněčná linie produkující retrovirový vektor injikována do tumorů (Culver a kol., 1992). Injekce produkčních buněk poté poskytne kontinuální zdroj vektorových částic. Tato technika byla schválena k použití při inoperabilních tumorech mozku.

Další vhodné systémy zahrnují hybridní retrovirový-adenovirový systém, který popsal Feng kol., *Nature Biotechnology*, 15, 866 až 870 (1997) nebo virové systémy s cílicími ligandy, jako jsou vhodné jednořetězcové fragmenty Fv.

V přístupu, který kombinuje biologické a fyzikální způsoby přenosu genu se kombinuje plasmidová DNA jakékoli velikosti s protilátkou spojenou s polylysinem specifickou pro hexonový protein adenoviru, přičemž výsledný komplex je navázán na adenovirový vektor. Tento trimolekulární komplex se poté použije k infikaci buněk. Adenovirový vektor umožňuje účinné navázání, internalizaci a degradaci endosomu předtím, než se napojená DNA poškodí.

U komplexů liposom/DNA bylo ukázáno, že jsou schopny zprostředkování přímého přenosu genu in vivo. Zatímco ve standardních liposomových prostředcích je proces přenosu genu nespecifický, byl u tumorových depozit, například po přímém podání in situ popsán lokalizovaný in vivo příjem a exprese (Nabel, 1992).

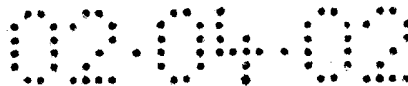


Techniky přenosu genu, které cílí DNA přímo do makrofágů jsou výhodné. Receptory zprostředkovaný přenos genu, například provedený konjugací DNA (obvykle ve formě kovalentně uzavřeného superzavinutého plasmidu) na proteinový ligand pomocí polylysinu. Ligandy se zvolí na základě přítomnosti odpovídajících ligandových receptorů na buněčném povrchu cílové buňky/typu tkáně. Mannózový receptor je do jisté míry specifický pro makrofágy, přičemž bylo ukázáno specifické cílení konjugátů DNA/mannóza. Tyto konjugáty ligand-DNA mohou být injikovány přímo do krve, pokud je to potřebné a jsou zaměřeny na cílovou tkáň, kde proběhne vazba na receptor a internalizace komplexu DNA-protein. K překonání problému intracelulární destrukce DNA může být zahrnuta koinfekce adenovirem k porušení funkce endosomu.

V dalším ztělesnění je sloučeninou sloučenina, která inhibuje aktivitu proteinu PPAR δ .

Vhodné sloučeniny mohou být zvoleny za použití některých ze způsobů popsaných dále.

Zjistí se, že účinné množství inhibitoru aktivity PPAR δ se pacientovi může podat jakýmkoli vhodným způsobem a jakémkoli vhodném prostředku. Vhodnost jakéhokoli způsobu podání nebo jakéhokoli prostředku může odborník v oboru snadno zjistit odkazem na povahu inhibitoru. Například inhibitory založené na nukleové kyselině mohou být formulovány a podávány jinými způsoby než inhibitory založené na malých molekulách, jak je v oboru známo.

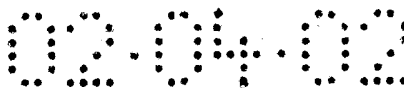


Výše uvedené sloučeniny podle tohoto vynálezu nebo sloučeniny pro použití ve způsobech podle tohoto vynálezu nebo prostředky s jejich obsahem mohou být podávány jakýmkoli obvyklým způsobem včetně orálního a parenterální (např. subkutánní, intravenózní nebo intramuskulární) injekce. Léčba může sestávat z jediné dávky nebo četných dávek podávaných po určitou dobu.

Obvykle se očekává, že dávky budou v rozmezí od 0,01 do 20 mg/kg.

Zatímco je možné, že sloučenina podle tohoto vynálezu bude podávána samotná, je výhodné ji předložit jako farmaceutický prostředek spolu s jedním nebo více přijatelnými nosiči. Nosič(e) musí být „přijatelný (přijatelné)“ v tom smyslu, že je (jsou) kompatibilní se sloučeninou podle tohoto vynálezu a není (nejsou) pro jejího (jejich) příjemce škodlivý (škodlivé). Obvykle budou nosiči voda nebo roztok chloridu sodného, které budou sterilní a apyrogenní.

Prostředky mohou být příhodně předloženy ve formě dávkové jednotky a mohou se připravit kterýmkoli ze způsobů v oboru farmacie dobře známých. Takovéto způsoby zahrnují krok spojení aktivní složky (sloučeniny podle tohoto vynálezu nebo sloučeniny k použití podle tohoto vynálezu) s nosičem, který zahrnuje jednu nebo více přídavných složek. Obecně se prostředky připraví jednolitým a důkladným spojením aktivní složky s kapalnými nosiči nebo jemně dělenými tuhými nosiči nebo oběma a poté, pokud je to nezbytné, vytvarováním produktu.



Prostředky podle předloženého vynálezu vhodné k orálnímu podání mohou být předloženy jako oddělené jednotky, jako jsou kapsle, sáčky nebo tablety, z nichž každá obsahuje předem určené množství aktivní složky, jako prášky nebo granule, jako roztok nebo suspenze ve vodné kapalině nebo nevodné kapalině, nebo jako kapalná emulze olej ve vodě nebo kapalná emulze voda v oleji. Aktivní složka může také být předložena jako bolus, lektvar nebo pasta.

Tableta se může vyrobit lisováním nebo tvarováním, případně s jednou nebo více pomocnými látkami. Lisované tablety mohou být připraveny lisováním aktivní složky ve formě volně tekoucí látky, jako je prášek nebo granule, ve vhodném stroji, případně smísené s pojivem (např. povidonem, želatinou nebo hydroxypropylmethylcelulózou), mazadlem, inertním ředidlem, konzervanciem, desintegranciem (např. natriumglykolatem škrobu, zesítním povidonem nebo zesítnou natriumkarboxymethylcelulózou) nebo povrchově aktivním či dispergačním činidlem. Tvarované tablety mohou být vyrobeny tvarováním směsi práškové sloučeniny navlhčené inertním kapalným ředidlem ve vhodném stroji. Tablety mohou případně být potaženy nebo vrubovány a mohou být formulovány tak, že poskytnou pomalé nebo řízené uvolňování aktivní složky použitím například hydroxypropylmethylcelulózy v různých dávkách k poskytnutí požadovaného profilu uvolňování.

Prostředky vhodné k parenterálnímu podání zahrnují vodné a nevodné sterilní injekční roztoky, které mohou obsahovat antioxidanta, pufrы, bakteriostatika a roztoky, které učiní prostředek isotonický s krví zamýšleného příjemce, a vodné a nevodné sterilní suspenze,



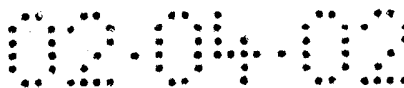
které mohou obsahovat suspenzační činidla a zahušťovací činidla. Prostředky mohou být předloženy v nádobách dávkové jednotky nebo mnohodávkových jednotek, například uzavřených ampulích a skleničkách, a mohou být skladovány za lyofilizačních podmínek vyžadujících pouze přidání sterilního kapalného nosiče, například vody pro injekce, bezprostředně před použitím. Injekční roztoky a suspenze k rekonstituci mohou být připraveny ze sterilních prášků, granulí a tablet výše popsaných.

Výhodnými prostředky dávkové jednotky jsou ty prostředky, které obsahují denní dávku nebo jednotku, denní poddávku nebo její příhodnou část, aktivní složky.

Má se za to, že vedle složek jednotlivě zmíněných výše mohou prostředky podle tohoto vynálezu obsahovat další činidla obvyklá v oboru s ohledem na typ příslušného prostředku, například prostředky vhodné k orálnímu podání mohou obsahovat příchutě.

Prostředky zde uvedené se vyrobí za použití standardních způsobů, jako jsou způsoby popsané nebo uvedené v referenčních textech, jako je britský a US lékopis, Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co.), Martindale The Extra Pharmacopoeia (London, The Pharmaceutical Press).

Terapeutické způsoby podle tohoto vynálezu mohou být použity k léčbě jakéhokoli savce včetně člověka. Předpokládá se tedy, že způsob může být použit k léčbě, například, domácích zvířat, jako jsou kočky a psi, hospodářských zvířat, jako jsou koně, krávy, ovce, kozy a prasata, nebo jiných komerčně důležitých zvířat. Pokud je



inhibitorem aktivity PPAR δ molekula založená na nukleové kyselině, zjistí se, že bude sestavena s odkazem na savčí gen PPAR δ nebo cDNA.

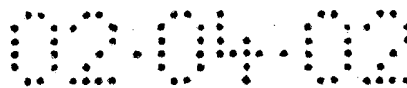
Je výhodné, když léčeným pacientem je člověk.

Další aspekt tohoto vynálezu poskytuje inhibitor aktivity PPAR δ k použití v lékařství.

Inhibitor je zabalen a předložen k použití v lékařství. Obzvláště může být zabalen a předložen k použití při léčbě aterosklerózy nebo při léčbě srdeční choroby nebo při léčbě mrtvice nebo při léčbě periferní arteriální choroby nebo při léčbě cévní choroby spjaté s tvorbou plátu nebo při léčbě trombotické blokády cév nebo při léčbě Alzheimerovy choroby nebo při léčbě rakoviny.

Ještě další aspekt tohoto vynálezu poskytuje farmaceutický prostředek obsahující inhibitor aktivity PPAR δ a farmaceuticky přijatelný nosič.

Další ještě další aspekt tohoto vynálezu poskytuje použití inhibitoru aktivity PPAR δ k výrobě léčiva pro prevenci nebo snížení tvorby pěnových buněk z makrofágů nebo jiných buněk, nebo k odstranění pěnových buněk u pacienta, použití jako inhibitoru aktivity PPAR δ k výrobě léčiva k prevenci nebo léčbě vaskulární choroby spjaté s tvorbou plátu a/nebo trombotické blokády cév, použití inhibitoru aktivity PPAR δ k výrobě léčiva k léčbě nebo prevenci rakoviny a použití inhibitoru aktivity PPAR δ k výrobě léčiva k léčbě nebo prevenci Alzheimerovy choroby.



Vhodně jsou makrofágy nebo jinými buňkami makrofágy nebo jiné buňky účastníci se aterosklerotického patologického procesu.

Až do vykonání předložené práce nebylo zřejmé, že inhibitory aktivity PPAR δ by mohly být užitečné, obzvláště v lékařství. Tento vynález také zahrnuje způsoby identifikace sloučenin, které inhibují aktivitu PPAR δ a, obzvláště, které inhibují aktivitu PPAR δ v makrofázích nebo pěnových buňkách. Takto identifikované sloučeniny mohou samy být užitečné v lékařství nebo mohou být užitečné jako vodící sloučeniny pro další vývoj lékařsky užitečných sloučenin. Tyto způsoby podle tohoto vynálezu nebo prostředky provádění těchto způsobů mohou být považovány za „způsoby screeningu léčiv“ nebo za „screeningová stanovení léčiv.“

Jeden aspekt tohoto vynálezu poskytuje způsob identifikace sloučeniny, která může být použita jako sloučenina, která může být užitečná v lékařství, nebo kterou lze použít jako vodící sloučeninu k získání takové sloučeniny, kterýžto způsob zahrnuje selekci sloučeniny, která inhibuje aktivitu PPAR δ . Obvykle tento způsob může zahrnovat screening četných testovaných sloučenin, které jsou zachyceny v knihovně testovaných sloučenin. Další aspekt tohoto vynálezu tedy poskytuje způsob identifikace sloučeniny, která inhibuje aktivitu PPAR δ , kterýžto způsob zahrnuje selekci jakékoli sloučeniny z knihovny testovaných sloučenin, která inhibuje aktivitu PPAR δ .

Výše uvedené způsoby mohou být použity k selekci sloučenin, které inhibují expresi genu PPAR δ nebo proteinu

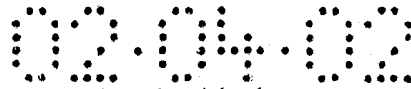


PPAR δ (tj. translaci) v buňce nebo které inhibují aktivitu proteinu PPAR δ .

Vhodné formáty stanovení jsou odborníky v oboru dobře známy, přičemž některé z nich jsou detailněji popsány v příkladu 3.

Ve vztahu k identifikaci sloučenin, které inhibují aktivitu PPAR δ zahrnuje výhodné ztělesnění použití promotoru genu PPAR δ operativně spojeného s reporterovým genem, jako je například luciferáza, δ -galaktosidáza, alkalická fosfatáza apod. Expresi reporterového genu v buňce může být měřena za přítomnosti nebo nepřítomnosti testované sloučeniny. Testované sloučeniny, které selektivně snižují expresi reporterového genu jsou vybrány jako sloučeniny, které mohou být užitečné při inhibici nebo snížení exprese genu PPAR δ podle toho, že dochází k inhibici aktivity PPAR δ .

Ve vztahu ke sloučeninám, které inhibují aktivitu proteinu PPAR δ , je jistou aktivitou, kterou je žádoucí inhibovat, schopnost proteinu PPAR δ transkripčně aktivovat geny pod jeho kontrolou. Tedy jedno ztělesnění tohoto vynálezu, reporterový gen, jako je jeden z těch, které jsou uvedeny výše, se operativně spojí s promotorem nebo navozující sekvencí, která je pod kontrolou PPAR δ . Geny, které jsou pod kontrolou PPAR δ zahrnují CYP4A6, acylCoA-oxidázu, a lipoproteinlipázu, o promotorech tohoto genu se tedy má za to, že jsou v tomto ztělesnění vynálezu užitečné. Syntetické navozovací prvky odvozené od těchto genů, spojené s heterologními promotory, jako jsou promotory genu HSV thymidinkinázy, mohou v tomto ztělesnění

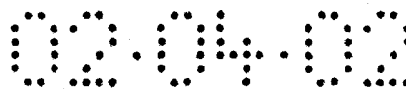


být rovněž užitečné. Genetický konstrukt obsahující promotor nebo navozovací/reporterový gen se transfekuje do vhodné buňky, jako je monocytární nebo makrofágová buňka. Buňky COS-1 nebo CV-1, obojí podlinie ledvinných buněk africké Green Monkey, mohou být rovněž použity. Genetický konstrukt kódující PPAR δ se do buňky rovněž transfekuje a stanoví se schopnost testované sloučeniny inhibovat expresi reporterového genu. V obzvláště výhodném ztělesnění se transfekované buňky inkubují se známým agonistou PPAR δ , jako je sloučenina F, jak je popsána na str. 9 dokumentu WO 97/28149 (dále označována jako sloučenina F) v kombinaci s testovanou sloučeninou, přičemž může být stanovena schopnost testované sloučeniny interferovat s působením agonisty. Sloučeniny, které snižují nebo inhibují expresi reporterového genu jsou vybrány k dalším studiím.

V dalším ztělesnění se může použít CARLA (stanovení interakce koaktivátor/receptor/ligand) jak je popsáno v příkladu 3. Tato stanovení spočívají v závislosti vazby koreceptorů na přítomnosti vhodného ligandu PPAR δ . Ve stanoveních CARLA je přítomen agonista a stanovuje se schopnost testované sloučeniny interferovat s působením tohoto agonisty.

Obzvláště výhodné sloučeniny, které mohou být zvoleny způsoby podle tohoto vynálezu jsou sloučeniny, které se váží na část PPAR δ vážící ligand transkripčně zanedbatelným způsobem a tím zabraňují působení agonistických ligandů PPAR δ .

V jednom ztělesnění tohoto vynálezu je výhodné, pokud se provede „pre-screeningový“ krok k identifikaci sloučenin, které se váží na PPAR δ před stanovením, zda jsou



inhibitorem nebo antagonistou aktivity PPAR δ . Vazebná stanovení receptor-ligand jsou v oboru dobře známa a odborník v oboru je snadno navrhne a provede.

V dalším výhodném ztělesnění se může provést „pre-screeiningový“ krok, který je v podstatě stanovením pěnových buněk popsaným dále. Takto tedy mohou být selektovány sloučeniny, které jsou aktivní při prevenci nebo snižování rozvoje pěnových buněk z makrofágů nebo jiných buněk nebo při odstraňování pěnových buněk a které jsou inhibitory PPAR δ .

Vhodně jsou makrofágy nebo jinými buňkami makrofágy nebo jiné buňky účastníci se aterosklerotického patologického procesu.

V dalším ztělesnění mohou být identifikovány inhibitory PPAR δ za použití dvouhybridového přístupu k monitorování interakce PPAR δ a koaktivátorů, jako je SRC-1. V tomto případě se fúzuje PPAR δ (nebo jeho funkční část) na protein vážící DNA (jako je doména GAL4 vážící DNA) a koaktivátorová molekula nebo její funkční část (jako je SRC-1) se fúzuje s transaktivujícím proteinem (jako je transaktivující doména VP16). Vytvoří se kvasinky exprimující obě tyto fúze a mající integrovaný reporterový gen (jako je β -galaktosidáza) pod kontrolou promotoru závislého na proteinu vážícím DNA (např. závislý na GAL-4).

Kvasinky se pěstují za přítomnosti agonisty PPAR δ a široké palety testovaných sloučenin. Kultury s nízkou aktivitou β -galaktosidázy indikují přítomnost antagonisty PPAR δ .



Zjistí se, že způsoby identifikace sloučeniny podle výše uvedeného popisu jsou užitečné při identifikaci sloučenin nebo které mohou být použity jako vodící sloučeniny k výrobě sloučenin, které mohou

- 1) zabraňovat nebo snižovat rozvoj pěnových buněk z makrofágů nebo odstraňovat pěnové buňky,
- 2) zabraňovat nebo být užitečné při léčbě cévní choroby spjaté s tvorbou plátu a/nebo trombotické blokády cév,
- 3) zabraňovat nebo být užitečné při léčbě rakoviny nebo
- 4) zabraňovat nebo být užitečné při léčbě Alzheimerovy choroby.

V dalších ztělesněních tohoto vynálezu jakmile je sloučenina vybrána pro svou schopnost inhibovat nebo snižovat aktivitu PPAR δ , může být příhodně použita v dalším screeningu ke stanovení například toho, zda může zabraňovat nebo snižovat rozvoj pěnových buněk z makrofágů nebo odstraňovat pěnové buňky, zda může zabraňovat nebo být užitečná při léčbě cévní choroby spjaté s tvorbou plátu a/nebo trombotické blokády cév, zabraňovat nebo být užitečná při léčbě rakoviny nebo zabraňovat nebo být užitečné při léčbě Alzheimerovy choroby.

Vhodně jsou makrofágy nebo jinými buňkami makrofágy nebo jiné buňky účastníci se aterosklerotického patologického procesu.

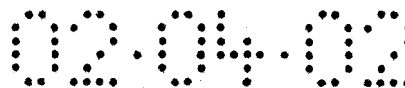
Screeningové metody ke stanovení těchto vlastností jsou známy z této přihlášky (ve vztahu k rozvoji pěnových buněk z makrofágů) nebo jsou známy v oboru.



Jiná, další užitečná vyšetření mohou být provedeny ke stanovení například jeho rozpustnosti, farmakologického profilu a profilu lékového metabolismu. Podobně mohou být provedena vyšetření ke stanovení selektivity sloučenin s ohledem na inhibici aktivity PPAR δ . Například mohou být provedena vyšetření zda jistá sloučenina může modifikovat aktivitu jiné isoformy PPAR. Obvykle je výhodné, když jsou vybrány sloučeniny, které v podstatě nemodifikují aktivitu jiných isoform PPAR. Může však být užitečné, když vybraná sloučenina je sloučeninou, která inhibuje aktivitu PPAR δ , ale je agonistou nebo aktivátorem aktivity PPAR γ . Stejně tak může být výhodné, pokud vybraná sloučenina je sloučeninou, která inhibuje aktivitu PPAR δ , ale je aktivátorem nebo agonistou aktivity PPAR α .

Sloučenina vybraná screeningovými metodami podle tohoto vynálezu může být „sloučeninou charakteru léčiva.“

Pojem „sloučenina charakteru léčiva“ je odborníkovi v oboru dobře znám a může zahrnovat význam sloučeniny, která má takové charakteristiky, které ji činí vhodnou pro použití v lékařství, například jako aktivní složku léčiva. Například tedy sloučeninou charakteru léčiva může být molekula, která může být syntetizována postupy organické chemie, méně výhodně postupy molekulární biologie nebo biochemie, a která je výhodně malou molekulou, která může mít molekulovou hmotnost nižší než 5000 daltonů a která může být rozpustná ve vodě. Sloučenina charakteru léčiva může dále vykazovat rysy selektivní interakce s určitým proteinem nebo s určitými proteiny a být biologicky dostupná a/nebo schopná penetrace membrán



cílových buněk, bude však zjištěno, že tyto rysy nejsou nezbytné.

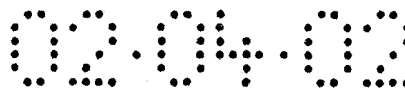
Pojem „vodící sloučenina“ je odborníkovi v oboru podobně znám a může zahrnovat ten význam, že sloučenina, zatímco sama není vhodná pro použití jako léčivo (například z toho důvodu, že je pouze slabě mocná vůči zamýšlenému cíli, neselektivní ve svém účinku, nestabilní, špatně rozpustná, obtížně syntetizovatelná nebo má špatnou biologickou dostupnost) může poskytnout výchozí bod k přípravě jiných sloučenin, které mohou mít více žádoucí charakteristiky.

Pojmy „sloučenina charakteru léčiva“ a „vodící sloučenina“ se obvykle týkají relativně malých organických molekul spíše než například relativně velkých molekul založených na nukleové kyselině. Zjistí se však, že mnohá ztělesnění screeningových způsobů podle tohoto vynálezu jsou vhodná pro identifikaci molekul založených na nukleové kyselině, obzvláště molekul, které vykazují expresi genu PPAR δ nebo translaci proteinu PPAR δ .

Jak je v oboru vynalézání léčiv dobře známo, může být vodící sloučenina nalezená při screeningu modifikována a modifikovaná sloučenina podrobena screeningu k určení její aktivity.

Tento vynález se také týká in vitro modelu tvorby pěnových buněk navozené tukem z potravy a jeho použitím při identifikaci užitečných sloučenin.

Tvorba pěnových buněk je prvním krokem dvojstupňového procesu, ve kterém se buňky převedou na

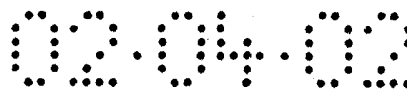


prekurzor pěnové buňky podrobením zánětlivému podnětu, jako je PMA, nebo kontaktem s vhodným růstovým faktorem, jako je GMCSF (faktor stimulující kolonii granulocyt makrofág - granulocyta macrophage colony stimulating factor). V druhém kroku se z prekurzorových buněk stanou pěnové buňky za přítomnosti vhodné koncentrace mastných kyselin.

Další aspekt předloženého vynálezu tedy poskytuje způsob identifikace sloučeniny, která může být užitečná při identifikaci sloučenin nebo která může být použita jako vodící sloučenina k výrobě sloučenin, která může

- 1) zabraňovat nebo snižovat rozvoj pěnových buněk z makrofágů nebo jiných buněk, vhodně těch makrofágů nebo jiných buněk účastnících se aterosklerotického patologického procesu nebo odstraňovat pěnové buňky nebo
- 2) zabraňovat nebo být užitečná při léčbě cévní choroby spjaté s tvorbou plátu a/nebo trombotické blokády cév, přičemž tento způsob zahrnuje krok selekce:
 - a) vhodné populace primárních buněk nebo buněčné linie
 - b) dodání buněčné linii zánětlivého podnětu nebo růstového faktoru, který usnadňuje diferenciaci na prekurzor pěnové buňky
 - c) dodání k prekurzoru pěnové buňky vhodné koncentrace mastné kyseliny a
 - d) změření akumulace mastné kyseliny v buňce za přítomnosti nebo nepřítomnosti sloučeniny.

Vhodnou populací primárních buněk nebo buněčnou linií je populace nebo linie účastnící se aterosklerotického patologického procesu.



Buněčným typem může být jakýkoli vhodný buněčný typ. Výhodně jde o leukocytovou buňku. Je obzvláště výhodné, když leukocytovou buněčnou linií je makrofág buněčná linie prekursoru makrofágu.

Obvykle buňkami jsou THP-1 nebo U937. THP-1 je dostupný jako buněčný deposit ECACC č. 8501144 a U937 je dostupný jako buněčný deposit č. 88081201. Může však být použita jakákoli vhodná leukocytová buňka, ačkoliv je výhodné pokud se použije buňka monocytárního nebo makrofágového charakteru. Buňky THP-1 jsou „monocytárního charakteru“ a mohou se diferencovat na buňky makrofágového charakteru forbolesterem (PMA)

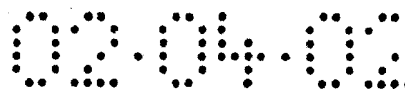
Pojmem „dodání zánětlivého podnětu buňce“ původci rozumějí dodání jakéhokoli vhodného zánětlivého podnětu, který usnadňuje stimulaci buněk na pěnové buňky.

Pojmem „růstový faktor, který usnadňuje diferenciaci na pěnové buňky“ původci rozumějí jakýkoli vhodný růstový faktor, jako je GM-CSF a, v kontextu tohoto vynálezu, PMA. Výhodný je PMA nebo funkčně ekvivalentní forbolester.

Obvykle je esterem PMA, ale může jím být jakýkoli vhodný forbolester, který usnadňuje diferenciaci buněk.

Obvykle se PMA použije v koncentraci od asi 0,1 do asi 10 ng/ml.

Mastná kyselina může být do buňky dodána v séru, v němž buňka roste. Původci našli, že teplem inaktivované fetální telecí sérum firmy Gibco BRL poskytuje nízké pozadí



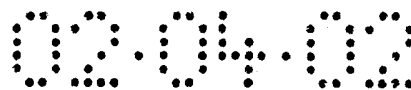
akumulaci lipidů, zatímco vysoké hladiny akumulace lipidů se dosáhne za použití přípravku Controlled Process Serum Replacment (CPSR-3) firmy Sigma. Alternativně se může dodat (například přidáním do media růstové kultury) ve vhodné koncentraci. Vhodné mastné kyseliny zahrnují mono- a polynenasycené mastné kyseliny s délkou řetězce 18 až 2, včetně kyseliny linoleové. vhodně se mastné kyseliny dodávají v koncentraci od 10 do 100 μM .

Akumulace mastné kyseliny v buňce se může měřit za použití jakéhokoli vhodného způsobu. Obzvláště příhodné způsoby zahrnují použití barviv mastných kyselin, jako je nilská červeň (Nile Red) nebo Oil Red O, která mohou být použita in situ a odečtena na čítači desek. Další způsoby, které mohou být použity k měření akumulace mastných kyselin, zahrnují PLC, HPLC a LC-MS.

Stanoví se akumulace mastných kyselin v buňce za přítomnosti nebo nepřítomnosti testované sloučeniny a sloučeniny, které vedou ke snížení akumulace mastných kyselin v buňce se vyberou pro další testování.

Snadno se zjistí, že jelikož buňky lze pěstovat v mnohokomůrkových kultivačních nádobách (např. 64-komůrkových kultivačních nádobách) a jelikož barvení lipidů lze kvantifikovat, například opticky v mikrotitrovém deskovém čítači, lze screeningový způsob snadno automatizovat k dosažení screeningu s velkým výkonem.

Další aspekty tohoto vynálezu poskytují sloučeniny identifikovatelné screeningovými způsoby podle tohoto vynálezu, jako jsou sloučeniny identifikovatelné těmito způsoby podle tohoto vynálezu k použití v lékařství



a farmaceutické prostředky s takovými sloučeninami dále obsahující farmaceuticky přijatelný nosič.

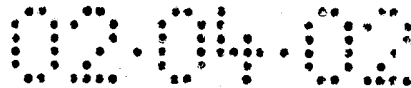
U sloučenin identifikovaných a identifikovatelných screeningovými způsoby podle tohoto vynálezu se má za to, že jsou užitečné při způsobech léčby podle tohoto vynálezu.

Vynález bude nyní popsán detailněji odkazem na následující popis, příklady a obrázky.

Přehled obrázků na výkresech

Obr.1

Obr. 1 ukazuje expresi PPAR δ v buňkách THP-1. Na celkové RNA se provede RNAázová expresní analýza mRNA PPAR α a PPAR δ z myších a lidských jaterních a z několika lidských buněčných linií. Buněčná linie Huh7 je buněčná lidská jaterní linie, která obsahuje identická množství mRNA PPAR δ (černé sloupce) a PPAR α (bílé sloupce) ve srovnání s celkovou RNA izolovanou z lidských jater (více než 1 % aktinu). Jak Huh7, tak lidská játra neodpovídají na peroxisomové proliferátory zvýšením lipidového metabolismu a transkripce reporterových konstruktů obsahujících PPRE. Monocytární buněčné linie, jako jsou buňky U937 a THP-1, exprimují relativně vysoké hladiny PPAR δ (5 až 6 % aktinu). Na expresi PPAR α a PPAR δ byly analyzovány další lidské tkáně, jako je tračník, ovária, testes, ledviny a nadledviny. Ve všech případech byly expresní hladiny nižší než 1 % aktinu (data nejsou uvedena). Je však možné, že jednotlivé buněčné složky těchto komplexních tkání exprimují významné hladiny těchto receptorů.



Obr. 2

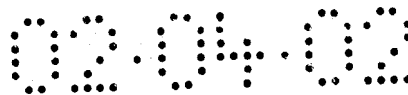
Obr. 2 ukazuje expresi aterogenního genu v buňkách THP-1. Pomocí RT-PCR se analyzuje celková RNA z buněk THP- na expresi různých genových produktů spjatých s aterogenním procesem. Ukázány jsou agarózové gely barvené bromidem ethidia z analýzy buněk THP-1 za normální růstových podmínek (-PMA), adherentní buňky THP-1 po ošetření forbolesterem (+PMA) a ošetření forbolesterem za přítomnosti 100 μ M kyseliny linoleové. Všechny sondy jsou sestrojeny k přechodu hranic intron/exon a neamplifikují genomovou DNA.

Obr. 3

Obr. 3 ukazuje, že mastné kyseliny a rexinoidy navozují tvorbu pěnových buněk, která je inhibována rosiglitazonem. Rexinoidy jsou léčiva specifická pro RXR, jako je kyselina 9-cis-retinoová a sloučenina firmy Ligand Pharmaceutical LG100268 (Murkherjee R. a kol., Nature, 386, 407 až 410 (1997)). Rosiglitazon připravila firma SmithKline Beecham a je rovněž znám jako Avandia a BRL49653.

A. Mastné kyseliny kooperují s rexinoidy při tvorbě pěnových buněk

Buňky THP-1 se ošetří 5 ng/ml PMA a 0,5% dimethylsulfoxidem (DMSO), 30 μ M kyselinou linoleovou, 5 μ M LG 100268 a kyselinou linoleovou s LG 100268. V ošetřování se pokračuje 3 dny a buňky se fixují v 0,66M paraformaldehydu, barví nasyceným roztokem Oil Red O a poté se



protibarví haematoxylinem. U ošetření buď kyselinou linoleovou nebo LG 100268 se pozoruje zvýšená akumulace lipidů. Přidání obou sloučenin vede k aditivnímu účinku na kumulaci lipidů.

B. Rosiglitazon navozuje clearance lipidů

Buňky ošetřené PMA se 3 dny ošetřují 20 μ M BRL49653 a podle výše uvedeného popisu se barví na akumulaci lipidů.

Obr. 4

Obr. 4 ukazuje, že rosiglitazon moduluje v buňkách THP-1 genovou expresi.

A. Expese IL-1 β je rosiglitazonem snížena

RNázová protekční analýza hladin mRNA interleukinu 1 β u buněk THP-1 ošetřených PMA (+PMA), buněk ošetřených PMA a kyselinou linoleovou (+PMA+FA) a buněk ošetřených PMA a BRL49653 (+PMA+BRL). Ukázán je rovněž aktinový normalizační signál.

B. Expese TNF α je rosiglitazonem snížena

RNázová protekční analýza hladin mRNA TNF α u kontrolních buněk THP-1 (-PMA), buněk THP-1 ošetřených PMA (+PMA), buněk ošetřených PMA a kyselinou linoleovou (+PMA+FA) a buněk ošetřených PMA a BRL49653 (+PMA+BRL). Ukázán je rovněž aktinový normalizační signál.

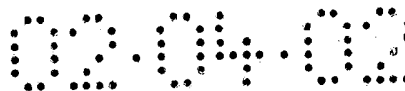
C. Expese CD36 je rosiglitazonem zvýšena



Analýza pomocí třídění fluorescencí aktivovaných buněk (FACS - Fluorescence Activated Cell Sorting) exprese antigenu CD36 u kontrolních buněk THP-1(-PMA) a buněk ošetřených PMA a BRL49653 (+PMA+BRL). Ošetřování probíhá 48 hodin při koncentraci 50 μ M BRL49653. Buňky se seškrábou z kultivačních desek, fixují a inkubují s protilátkou CD36 konjugovanou s FITC (fluoresceinisothiokyanat) (Coulter Immunotech). Analýza FACS se provede za použití buněčného třídiče Coulter EPIC V.

Obr. 5

Obr. 5 ukazuje generaci buněčných linií konstitutivně exprimujících PPAR δ . Celá kódující sekvence lidského PPAR δ se subklonuje do eukaryotického expresního vektoru pCLDN (Brighty D. W. a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 7802 až 7805 (1991)). Výsledné plasmidy se transfekují do buněk THP-1 za použití modifikovaného postupu DEAE-Dextran (Fujita a kol., Cell, 46, 401 až 407 (1986)). Buňky se uchovávají v médiu obsahujícím 1 mg/ml G418 a 10% THP-1 upravovaném mediu s přísnými postupy promývání k odstraňování mrtvých buněk. V tom se pokračuje až se úhyn buněk zastaví a pozoruje se silný růst. Původci získali 6 linií, každou s pCLDN (prázdný vektor), pCLDNPPAR δ , pCLDNPPAR δ AS, pCLDNPPAR α a pCLDNPPAR α AS. „AS“ znamená komplementární (antisense) konstrukt. Všechny z těchto buněčných linií jsou v podstatě identické v růstu a životaschopnosti. Provedou se úvodní diferenciacní experimenty s buněčnými liniemi s PPAR δ v selekčním mediu. Ty jsou pro všechny konstrukty negativní s výjimkou kontrolní linie s prázdným vektorem. Buňky se všemi konstrukty byly po ošetření PMA stále živé kromě linií



s komplementární PPAR δ , které všechny vykazaly příjem trypanové modři. Buňky se poté kultivují bez G418 až kontrolní linie s prázdným vektorem odpoví na PMA podobným způsobem jako rodičovská kontrola. Tímto se pak odhalí, že všechny linie pCLDNPPAR δ diferencovaly podobným způsobem, ale že žádná z linií pCLDNPPAR δ AS nediferencovala.

Z buněčných linií s PPAR δ se připraví RNA a protein a analyzuje se na mRNA PPAR δ RNázovou protekcí (B) a na protein PPAR δ western blottingem (C). Všech 6 linií vykazuje více než 10-násobné zvýšení mRNA PPAR δ oproti rodičovské linii. Tyto hladiny jsou mnohem vyšší než hladiny pozorované u buněk ošetřených PMA. Vysoké hladiny proteinu PPAR δ jsou pozorovány u linií označených delta-1 a delta-2. Ostatní 4 linie nebyly western blottingem analyzovány. Všechny následující experimenty se provádějí na těchto liniích.

Obr. 6

Obr. 6 ukazuje že nadměrná exprese PPAR δ navozuje tvorbu pěnových buněk.

A. Rodičovské buňky THP-1 a buňky pCLDNPPAR δ se ošetřují 5 ng/ml PMA a 0,5% DMSO nebo 50 μ M BRL49653. Ošetřování probíhá 3 dny a buňky se fixují 0,66M paraformaldehydem, barví se nasyceným roztokem Oil Red O a poté se protibarví haematoxylinem. Následné experimenty ukazují, že působení BRL49653 je účinné při submikromolárních koncentracích.

B. Kultury se ošetří způsobem uvedeným výše a poté se extrahují směsí methanol/chloroform/PBS (1 : 1 : 1,



objemově). Organická fáze se nechá projít přes síli-
kagelovou desku pro chromatografii na tenké vrstvě (Merck.
Kieselgel 60 s koncentrační zónou) se směsí 80 % heptanu,
18 % diethyletheru a 2 % kyseliny octové jako rozpouštědla.
Lipidy se poté barví aerosolem kyseliny fosfomolybdenové
v methanolu. Ukázána je relativní mobilita volného
cholesterolu (FCHOL), volné kyseliny arašídové (FFA),
vysoce nasyceného triacylglycerolu (TG), methylesterů
mastných kyselin (FAME), esterů cholesterolu (CE) a také
butylovaného hydroxyanisolu (BHT), který je přítomen
v systému rozpouštědel.

Obr. 7

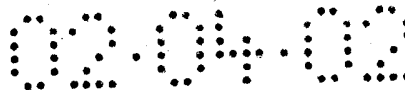
Obr. 7 ukazuje, že výdej (eflux) mastných kyselin
je v aktivovaných buňkách na nadměrnou expresi PPAR δ
potlačen.

A. Příjem mastných kyselin

1 milion buněk ve 2 ml media se přes noc inkubuje
s kyselinou olejovou značenou ^3H s aktivitou 185 kBq se 100
 μM kyseliny linoleové (HIGH FAT) nebo bez ní (LOW FAT).
Buňky se poté peletují, promyjí a resuspendují v čerstvém
mediu bez značených mastných kyselin. Procento inkorporace
se stanoví čítáním scintilace alikvotu media a promytých
buněk. Všechna stanovení se provedou v triplikátech.

B. Výdej (eflux) mastných kyselin

Promyté buňky se inkubují dalších 50 hodin,
přičemž se během této doby monitoruje uvolňování
radioaktivity. Rodičovské buňky s HIGH FAT mediem jsou



ukázány jako kosočtverce a s LOW FAT médiem jsou ukázány jako čtverce. Buňky nadměrně exprimující PPAR δ s HIGH FAT médiem jsou ukázány jako trojúhelníky a s LOW FAT médiem jako kruhy.

C. Výdej mastných kyselin u buněk aktivovaných PMA

Buňky se ošetří PMA a inkubují se s radioaktivně značenou kyselinou olejovou podle výše uvedeného popisu. Adherující buňky se promývají a během času se měří uvolňování radioaktivity z těchto buněk. Linie rodičovských buněk (čtverce) vykazuje vyšší hladiny uvolňování radioaktivity než buňky nadměrně exprimující PPAR δ (kosočtverce).

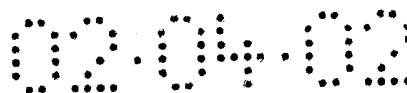
Obr. 8

Obr. 8 ukazuje, že exprese genu ApoE je regulována mastnými kyselinami prostřednictvím PPAR δ

Připraví se celková RNA z rodičovských buněk THP-1 ošetřených PMA (THP-1) nebo PMA a kyselinou linoleovou (THP-1+FA) a z buněčné linie nadměrně exprimující PPAR δ (DELTA). Z těchto vzorků RNA se připraví cDNA a tato cDNA se analyzuje na sekvence ApoE za použití postupů TAQMAN. Ukázaný výsledek je relativní exprese normalizovanou na expresi β -aktinu, přičemž úsečky představují standardní odchylku v duplikátových vzorcích.

Obr. 9

Obr. 9 ukazuje, že inhibice PPAR δ zabraňuje tvorbě pěnových buněk. Buňky se přes noc ošetřují 5 ng/ml



PMA a odečítají se na diferenciaci (adherence ke kultivační misce) a životaschopnost (vylučování trypanové modři).

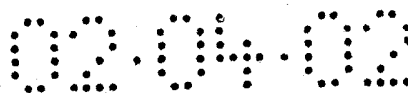
Rodičovské buňky THP-1 a buňky nadměrně exprimující PPAR δ (Sense) za přítomnosti PMA dobře diferencují. Avšak buňky exprimující molekuly komplementární k PPAR δ (Anti-sense) nediferencují vůbec a jsou pro trypanovou modř vysoce permeabilní. Tyto buňky exprimující molekuly komplementární k PPAR δ rostou za nepřítomnosti PMA normálně s velkou životaschopností.

Obr. 10

Obr. 10 ukazuje, že ochrana PPAR δ před smrtí neprobíhá směrem dolů od PKC. Rodičovské buňky a buňky exprimující molekuly komplementární k PPAR δ se inkubují s PMA a inhibitorem aktivity PKC (Bis) a dvěma inhibitory aktivity PLA2 (OBAA a mepakrin). Tyto inhibitory se použijí v koncentracích použitých v předchozích studiích pro specifickou inhibici.

Bis je bisindolylmaleamid I a je dostupný u firmy Sigma. OBAA je kyselina 3-(4-oktadecyl)benzoylakrylová a je dostupná u firmy Calbiochem. Mepakrin je 6-chlor-9-[(4-diethylamino)-1-methylbutyl]amino-2-methoxyakridin a je dostupný u firmy Calbiochem.

Všechny inhibitory zabraňují diferenciaci rodičovských buněk THP-1 (A). To potvrzuje roli PKC v působení forbolesteru. Působení inhibitorů PLA2 zdá se odhaluje nové aspekty diferenciaci makrofágů. Avšak při vyšetřování životaschopnosti těchto buněk vylučováním trypanové modři (B) původci našli, že neblokuje „smrt“ navozenou PMA u buněčné linie buněk exprimujících molekuly



komplementární k PPAR δ (černé sloupce). Pouze mepakrin vykazuje nějaké známky toxicity u rodičovských buněk (bílé sloupce).

Obr. 11

Obr. 11 ukazuje, že akumulace lipidů je navozena agonistou PPAR δ , sloučeninou F.

Obr. 12

Obr. 12 ukazuje, že sloučenina F, což je agonista PPAR δ , navozuje tvorbu pěnových buněk z gliových buněk THP-1.

Obr. 13

Obr. 13 ukazuje, že sloučenina F navozuje makrofágovou tvorbu pěnových buněk z primárních lidských monocytů.

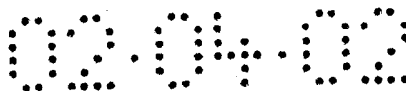
Obr. 14

Obr. 14 ukazuje akumulaci lipidů v gliových buňkách navozenou PPAR δ .

Obr. 15

Obr. 15 ukazuje, že sloučenina F stimuluje proliferaci buněčných linií rakoviny prostaty.

Popis



Role PPAR δ při tvorbě pěnových buněk

Tkáňová kultura

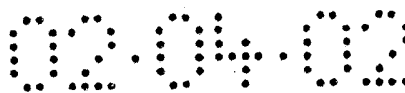
Buňky lidského glioblastomového astrocytomu U373 se pěstují v kultivační mediu RPMI 1640 doplněném 10% (objemově) teplem inaktivovaným fetálním hovězím sérem (GibcoBRL, Paisley, Skotsko), penicilinem (5000 m.j./ml) (GibcoBRL, Paisley, Skotsko) a streptomycinem (5000 μ g/ml) (Gibco, Paisley, Skotsko). Kultury se pěstují při teplotě 37 °C a 5% koncentraci oxidu uhličitého a pasážují se při dosažení 100% pokryvu.

Ošetření buněčných linií léčivy

Souvislá vrstva buněk se umístí do testovacích desek se 6 jamkami ve 2 ml media použitého pro tkáňové kultury v detailu popsaného výše a ošetří se 5 μ M a 10 μ M agonisty specifického pro PPAR δ , sloučeniny F. Jako kontrola se použije DMSO. Sloučenina a medium se obnovují každé 3 dny a buňky se ošetřují po dobu 1 týdne.

Experimenty zahrnující barvení

Experimenty využívající barvení Oil Red O s protibarvením haematoxylinem se provádějí na buňkách z každého ošetření popsaného v předchozím odstavci. Medium se odstraní a jamky se promyjí PBS (2 ml). Buňky se fixují v 10% formalinu (1 ml) 1 hodinu a poté se dvakrát promyjí PBS než se krátce propláchnou 60% isopropanolem. Přidá se roztok Oil Red O (1 ml) (Sigma) a po 3 hodinách se odstraní. Jamky se poté dvakrát promyjí PBS. K protibarvení se přidá haematoxylinové protibarvivo (1 : 10, 1 ml)



(Sigma) a po 5 minutách se odstraní dvojím promytím PBS. Druhá promývací dávka se v jamkách ponechá.

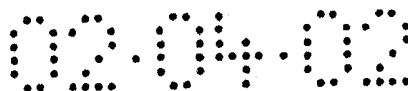
Výsledky

Po 1 týdnu nevykazují kontrolní buňky žádnou kumulaci lipidů. U buněk ošetřených sloučeninou F se pozoruje akumulace lipidů a je výrazně makrovesikulární, tj. akumulace lipidů je přítomna nikoli pouze v perinukleární oblasti, ale také v astrocytárních procesech (viz obr. 14).

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Aktivované makrofágy exprimují všechny 3 formy peroxisomovým proliferátorem aktivovaného receptoru, jmenovitě alfa (α), gama (γ) a delta (δ). V práci popsané v příkladu 1 původci ukazují, že k aktivaci makrofágu forbolestery je potřeba exprese PPAR δ a že PPAR δ navozuje tvorbu pěnových buněk z makrofágů. Bylo již ukázáno, že agonisté PPAR γ negativně regulují aktivaci makrofágu a že mají silné protizánětlivé účinky. V tomto příkladu původci ukazují, že agonista PPAR γ , rosiglitazon, inhibuje tvorbu pěnových buněk z makrofágů. PPAR γ a PPAR δ tudíž zprostředkovávají opačné role v metabolismu lipidů makrofágů a v jejich diferenciaci. Tyto výsledky ukazují, že, překvapivě, antagonistické ligandy PPAR δ jsou silnými kandidáty jako léčiva k prevenci kardiovaskulárních chorob. Experimentální materiály a způsoby jsou popsány v legendách k obrázkům.

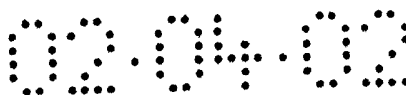


Výsledky

Validace modelu pěnových buněk

Monocytární buněčné linie jsou v základním výzkumu molekulárního základu aterogeneze široce používány. Původci zjišťovali vliv lipidů a tuku z potravy a vliv stresu a zánětu. Nejuniverzálnější buněčnou linií k tomuto výzkumu je lidská buněčná linie THP-1. Tato buněčná linie roste za normálních podmínek v suspenzi, avšak zánětlivé podněty, jako je forbolester, vyvolávají mocnou diferenciaci a zánětlivou odpověď, kdy buňky adherují a získávají „charakter makrofágu.“ Tato buněčná linie je také známa tím, že odpovídá na mastné kyseliny a oxidovaný LDL změnami exprese genu, přičemž u oxidovaného LDL bylo ukázáno, že navozuje cytoplasmatickou akumulaci lipidů. Tento regulační jev je chápán jako počáteční událost, která se objevuje při tvorbě ateromového plátu (12).

Původci nyní našli důležité spojení mezi zánětlivým procesem a lipidovou patologií těchto buněk pozorováním skutečnosti, že stimulace forbolesterem buněk THP-1 vede k velkému zvýšení hladin mRNA PPAR δ . Jiné skupiny ukázaly, že zánětlivé podněty upregulují expresi PPARy u myších a lidských makrofágů, stejně jako u buněčných linií odvozených od monocytů, jako je THP-1 a U937 (13 až 15). Bylo rovněž ukázáno, že PPAR δ je exprimován thioglykolatem stimulovanými peritoneálními myšními makrofágy (13). Původci rovněž ukázali, že aktivované buňky THP-1 exprimují mnoho produktů genů zánětu spjatých s aterogenezí, jako je MCP (monocytární chemoatraktační protein), IL-8, IL-1 β a tromboxansyntázu (obr. 2), přičemž našli, že exprese několika těchto produktů genů zánětu po



aktivaci je modulována mastnými kyselinami. Zjištění, že exprese apolipoproteinu E se po aktivaci zvyšuje a že je silně potlačena mastnými kyselinami je významné. Tyto výsledky ukazují, že tento systém odpovídá na mastné kyseliny a na zánětlivé podněty způsobem vhodným k tomu, že může být považován za dobrý model lidské cévní choroby. Původci rovněž pozorovali, že ošetření adherentních buněk THP-1 polyneenasycenými mastnými kyselinami, jako je kyselina linoleová, vede k akumulaci lipidových kapek v cytoplasmě (obr. 3A). Tyto lipidy naložené makrofágy jsou známy jako pěnové buňky. Účast heterodimeru PPAR/RXR při regulaci tvorby pěnových buněk byla navržena v důsledku pozorování, že aktivující ligand retinoidového receptoru X (LG100268) navozuje tvorbu pěnových buněk v kooperaci s mastnými kyselinami. Kyselina linoleová není velmi specifickým ligandem pro PPAR, bylo však ukázáno, že účinně aktivuje PPAR α a PPAR δ , zatímco je poněkud slabším aktivátorem PPAR γ . Ošetření těchto buněk aktivátorem PPAR α Wy14,643 nemá žádný účinek, což je v souladu s nízkou expresí této isoformy v aktivovaném makrofágu (obr. 1). Použití rosiglitazonu, BRL49653, rovněž nevede k tvorbě pěnových buněk, avšak je známo, že tyto buňky obsahují PPAR γ . Ve skutečnosti ošetření BRL49653 vede ke snížení lipidových depozitů ve srovnání s neošetřenými buňkami (obr. 3A) a může inhibovat navození tvorby pěnových buněk kyselinou linoleovou a retinoidem (data neuvedena). Tato data v souhrnu poprvé naznačují, že PPAR δ je molekulárním cílem pro mastné kyseliny při tvorbě pěnových buněk a že PPAR γ je negativním regulátorem funkce pěnových buněk.

Rosiglitazon (BRL49653) vede ke zvratu pěnových buněk



Data získaná původci podporují roli PPAR γ při antagonizaci aktivace makrofágů a akumulaci lipidů. Původci rovněž pozorovali, že adherence buněk THP-1 po ošetření BRL49653 je pomalejší než je pozorováno u buněk neošetřených (data neuvedena). Tato inhibiční role byla rovněž navržena ve dvou pracích uveřejněných v časopise Nature, ve kterých byla ukázána negativní regulace mediátorů zánětu prostřednictvím PPAR γ (13, 14). Původci potvrdili protizánětlivé působení TZD vyšetřením účinku BRL49653 na expresi IL-1 β . Skutečně ošetření BRL49653 vede k poklesu hladin mRNA IL-1 β (obr. 4A). Pokles mRNA TNF α ve srovnání s aktinem byl rovněž pozorován, avšak toto snížení nebylo tak výrazné (obr. 4B). Bylo ukázáno, že příjem lipidů scavengerovým receptorem CD36 je v buňkách THP-1 regulován PPAR γ (16, 17), přičemž původci našli, že CD36 je v aktivovaných buňkách THP-1 regulován TZD (obr. 3C), avšak tyto buňky nevytvářejí pěnové buňky (obr. 2). Upregulace CD36 tedy není dostačující pro tvorbu pěnových buněk a celkový účinek aktivace PPAR γ je antagonizace tvorby pěnových buněk. TZD jsou thiazolididionovou třídou léčiv, která zahrnuje BRL49653.

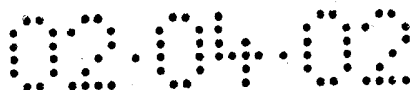
Genetická modulace modelu pěnových buněk

Ke zjištění, zda se PPAR δ účastní tvorby pěnových buněk navozené mastnou kyselinou se z buněk THP-1 generují buněčné linie, které nadměrně exprimují PPAR δ nebo které exprimují komplementární mRNA k PPAR δ . cDNA kódující PPAR δ se klonuje do vektoru (pCLDN), který zaměří transkripci pod kontrolu mocného enhanceru z lidského cytomegaloviru (obr. 5). Tento vektor rovněž obsahuje gen resistance na neomycin k selekci cílových buněk. cDNA se vloží do obou orientací



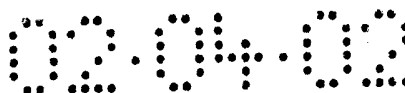
k expresi DNA proteinu PPAR δ (pCLDNPPAR δ -S) (sense DNA) a v opačném směru (antisense direction) k blokádě exprese PPAR δ (pCLDNPPAR-AS). Buňky THP-1 se transfekují pCLDNPPAR δ -S nebo pCLDNPPAR δ -AS a selektují se 1 mg/ml G418 až se pozoruje silný růst v G418. Buňky se poté uvolní ze selekce G418 jelikož kontroly se samotným vektorem za přítomnosti G418 nediferencují. O G418 je známo, že je inhibítorem aktivity proteinkinázy C a tudíž antagonistou působení forbolesteru. Po obnovení po selekci G418 se nadměrná exprese PPAR δ v 6 nezávisle transfekovaných polyklonálních buněčných liniích potvrdí RNázovou protekcí (obr. 5B) a western blottingem (obr. 5C). tyto buněčné linie rostou normálně a nevykazují žádnou adhezenci k lahví tkáňové kultury, avšak při ošetření PMA se stávají adherentními a akumulují velká množství intracelulárních lipidů ve srovnání s buňkami divokého typu, dokonce i v nepřítomnosti přidaných mastných kyselin (obr. 6). Ošetření BRL19653 může zabránit tvorbě pěnových buněk navozené PPAR δ . Analýza mastných kyselin ukáže, že zvýšení buněčných lipidů se účastní hlavně triglyceridy a že tato zásoba se eliminuje působením BRL49653 (obr. 6B). Původci za použití tritiované kyseliny olejové analyzovali příjem a výdej mastných kyselin v rodičovských buněčných liniích a v buněčných liniích s nadměrnou expresí PPAR δ . původci našli, že příjem a výdej jsou v podstatě mezi těmito dvěma buněčnými liniemi v neaktivovaném stavu identické (obr. 7A a obr. 7B). V aktivovaných buňkách je však zřejmé, že výdej je u linií s nadměrnou expresí PPAR δ výrazně nižší (obr. 7C).

Buňky s nadměrnou expresí PPAR δ mají hladiny mRNA ApoE výrazně sníženy (35-násobně) ve srovnání s rodičovskou



buněčnou linií (obr. 8). Je důležité upozornit, že ApoE je po ošetření kyselinou linoleovou snížen na stejné hladiny, jaké se pozorují v rodičovské buněčné linii. Tato data odhalují, že PPAR δ zprostředkovává represi exprese genu ApoE navozenou mastnými kyselinami. Buňky exprimující RNA komplementární k PPAR δ (PPAR δ AS) rovněž rostou normálně, avšak po ošetření PMA tyto buňky nediferencují (obr. 9A). Diferenciace se nepozoruje při žádné koncentraci PMA (0,1 až 25 ng/ml). Barvení trypanovou modří buněk PPAR δ AS ošetřovaných PMA přes noc odhalí, že buňky během ošetřování zahynou (obr. 9B). Není zde žádný důkaz kondenzace DNA jak se posoudí pomocí barvení DAPI (4N,6-diamino-2-fenylindol, Molecular Probes, Oregon) (data neuvedena). Fragmentace DNA se při elektroforéze genomové DNA připravené z těchto mrtvých buněk v agarovém gelu nepozoruje (data neuvedena). Buňky exprimující RNA komplementární k PPAR δ ošetřené PMA tedy zdá se nehynou v důsledku apoptózy. Použitím inhibitorů PKC a fosfolipázy A původci ukázali, že mohou blokovat diferenciaci rodičovských buněk THP-1 (obr. 10A), avšak zdá se, že buňky exprimující RNA komplementární k PPAR δ hynou za přítomnosti forbolesteru a těchto inhibitorů (obr. 10B). To naznačuje, že příčina smrti spočívá v procesu dále od aktivace PKC v diferenciačním procesu.

Původci ukázali, že PPAR δ je vyžadován k zánětlivé aktivaci makrofágů (jak je doloženo aktivací buněk THP-1) a že PPAR δ navozuje tvorbu pěnových buněk. Nadměrná exprese PPAR δ výrazně mění skladování lipidů v těchto buňkách a je zčásti uskutečňována změnou exprese genu kódujícího apolipoprotein E. Inhibice (antagonismus) aktivity PPAR δ může bránit tvorbě pěnových buněk a k vývoji



léčiv, které jsou inhibitory aktivity PPAR δ , která jsou užitečná při prevenci a/nebo léčbě velkého množství poruch, které se objevují v důsledku aterosogeneze.

Příklad 2

Akumulace lipidů je navozena agonistou PPAR δ

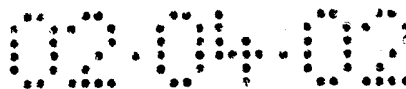
Selektivní agonista PPAR δ (sloučenina F na str. 9 dokumentu WO 97/28149) navozuje akumulaci lipidů a navozuje tvorbu pěnových buněk ve stanovení THP-1 popsaném v příkladu 1. Ačkoliv WO 97/28149 navrhuje použití agonisty PPAR δ (stejně jako jiné popsané sloučeniny) k léčbě kardiovaskulární choroby, původci ukázali, že tato sloučenina navozuje tvorbu pěnových buněk. Tento účinek je zřejmý při koncentraci nižší než 500 nM a je maximální při koncentraci od 5 do 10 μ M (viz obr. 11A). Sloučenina F kooperuje s ligandem RXR LG100268 při navození tvorby pěnových buněk (viz obr. 11B). Tato farmakologická aktivita je tím, co původci předpovídají na základě studií popsaných v příkladu 1. Sloučenina F rovněž navozuje tvorbu pěnových buněk z makrofágů jak u buněk THP-1 (obr. 12), tak u primárních lidských monocytů (obr. 13).

Příklad 3

Screening inhibitorů aktivity PPAR δ

Vazebné studie

Radioligandové filtrační studie



Rekombinantní hPPAR δ se smísí s radioaktivním ligandem [^3H]L-783483 podle popisu ve WO 97/28149 a v Berger a kol., J. Biol. Chem., 274, 6719 až 6725 (1999) za přítomnosti testované sloučeniny. L-783483 má $K_d = 1$ nM. Směs se aplikuje na smíšené celulóžové filtry a kapalina se protáhne přes filtr ve vakuu. Radioaktivita zbývající na filtru představuje L-783483 navázanou na PPAR δ . Snížení navázané radioaktivity indikuje přítomnost sloučeniny kompetující na PPAR δ . Toto stanovení určuje vazebné vlastnosti testované sloučeniny.

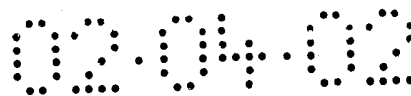
Vytěsnění fluorescenční mastné kyseliny

Vazba kyseliny cis- nebo trans-parinarové poskytuje fluorescenční stanovení ligandů PPAR. „Kyselina cis-parinarová“ je kyselina 9,15-cis 11,13 trans-parinarová. „Kyselina trans-parinarová“ je kyselina 9,11,13,15 trans-parinarová. Obě jsou dostupné u firmy Molecular Probes, Oregon. Rekombinantní PPAR δ se smísí s těmito mastnými kyselinami a pokud dojde k významné vazbě testované sloučeniny, navodí tato testovaná sloučenina menší fluorescenci než při přítomnosti mastné kyseliny/PPAR samotných. Toto stanovení určuje, zda se testovaná sloučenina váže na PPAR δ .

Toto stanovení lze snadno automatizovat tím, že se provádí ve vícejamkovém formátu pomocí příhodného fluorimetru, což poskytne vysoký výkon.

Stanovení interakce koaktivátor/receptor/ligand (CARLA)

Vazba koaktivátorových proteinů, jako je RIP140 nebo SRC-1, na PPAR δ je závislá na přítomnosti ligandu.



RIP140 a SRC-1 jsou proteiny, které se váží na PPAR δ (Krey a kol. Mol. Endocrinol., 11, 779 až 791 (1997)). Koaktivátory se translatují in vitro za přítomnosti methioninu značeného ^{35}S a smísí se s čištěným rekombinantním hPPAR δ za přítomnosti testovaných sloučenin. hPPAR se imunoprecipituje a sraženina se analyzuje SDS/PAGE následovaným autoradiografií, přičemž přítomnost radioaktivního signálu odpovídajícího koaktivátoru bude indikovat přítomnost ligandu PPAR δ . Toho lze využít k identifikaci vazby koaktivátoru, který se může prokázat jako antagonist, toho se dosáhne přítomností známých agonistů v každém stanovení (viz výše).

Funkční stanovení

Stanovení přechodového transfekčního reporterového konstruktu

Buňky Cos-1 a CV-1 se transfekují expresním konstruktem PPAR δ a reporterovým konstruktem s luciferázou pod kontrolou enhanceru závislého na PPAR. Enhancery závislé na PPAR δ zahrnují enhancery odvozené od genů acyl-CoAoxidázy a cytochromu P4504A6. To se může provést v různých formátech mnohojамkové kultury, přičemž transfekované buňky se ošetří známým agonistou PPAR δ a testovanými sloučeninami. Buňky se lýžují in situ a v luminometru se stanoví aktivita luciferázy. Jsou dostupné luminometry, které jsou kompatibilní se screeningem o vysokém výkonu. Výše popsané stanovení určuje schopnost testovaných sloučenin blokovat aktivitu agonisty PPAR δ .

Stanovení reporterového konstruktu stabilních buněčných linií



Buněčné linie se transfekují konstrukty podobnými konstruktům popsaným výše s tím rozdílem, že rovněž kódují markery resistance na antibiotika. To umožňuje selekci buněčných linií, které stabilně exprimují PPAR δ a obsahují reporterové sekvence integrované do genomu. Tato buněčná linie se pěstuje a používá k detekci sloučenin aktivujících PPAR δ bez potřeby opakovaných a nákladných transfekcí.

Příklad 4

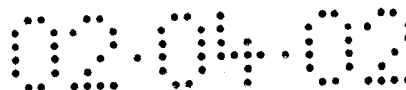
Stanovení pěnových buněk

Stanovení pěnových buněk se používají k identifikaci potenciálních antiaterogenních sloučenin. Buňky THP-1 v kultuře na desce s 96 jamkami se ošetří 0,1 až 10 ng/ml PMA k indukci diferenciaci makrofágu. Buňky THP-1 jsou dostupné jako ECACC přístupové číslo 88081201.

Zdroj mastné kyseliny se dodává buď se sérem (náhražka séra CPSR-3 firmy Sigma) nebo s 20 až 10 μ M kyseliny linoleové.

Akumulace mastné kyseliny v diferencujících se makrofágových buňkách se měří za přítomnosti nebo nepřítomnosti testované sloučeniny po 3 až 7 dnech za použití barviva nilské modři (Nile Red).

Testované sloučeniny, které snižují akumulaci tuku ve srovnání s nepřítomností testované sloučeniny se vyberou jako potenciální antiaterogenní činidla nebo jako vodící sloučeniny.



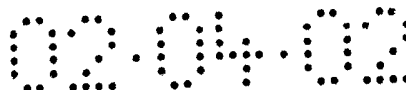
Příklad 5

Testy na buňkách rakoviny prostaty

Původci našli, že agonista PPAR δ , sloučenina F, může stimulovat růst epitelu prostaty. Jak minimálně transformované buňky PNT1A, tak netransformující se rakovinné buňky prostaty (LNCaP) mají růst stimulovaný až o 40 % nízkými koncentracemi sloučeniny F. tento účinek je rovněž pozorován u ligandu RXR LG100268. Rovněž nízké koncentrace jak sloučeniny F, tak LG100268, které významně nezvyšují růst buněk, stimulují buněčný růst pokud jsou do kultivačního media podány společně. Vysoce transformovaná buněčná linie rakovinných buněk prostaty PC3 roste z těchto linií nejrychleji a není stimulována sloučeninou F.

Původci transfekovali buňky PC3 expresními konstrukty pro RNA komplementární k PPAR δ , žádná z nich nerostla. Naproti tomu byly vytvořeny buněčné linie exprimující RNA komplementární k PPAR γ , které vykazují porušený, ale udržitelný růst. Ve všech experimentech byly vytvořeny buněčné linie obsahující prázdný expresní vektor bez fenotypu. tyto experimenty podporují očekávání, že PPAR δ je proliferativní a že antagonisté PPAR δ budou užiteční při léčbě rakoviny.

Buněčné linie se umístí v množství 2 500 na jamku na desku s 24 jamkami a kultivují se v RPMI obsahujícím 5 % dextransu potaženého, aktivním uhlím ošetřeného FCS. Do kultivačního media se zavádějí zvyšující se koncentrace sloučeniny F nebo LG100268 a kultury se udržují 7 dní s výměnami léčiv a media každých 48 hodin. Poté se stanoví konečný počet buněk v každé jamce kolorimetrickým



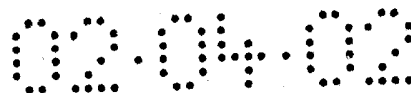
stanovením (Landegreen U. J., Immunol. Meth., 67, 379 až 388 (1984)) a relativní růst se vyjádří jako procento počtu buněk v kontrolních jamkách.

Odkazy

1. Issemann, I. a Green, S. (1990) "Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators," Nature, 347, 645 až 650.
2. Dreyer, C. a kol., (1992) "Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors," Cell, 68, 879 až 887.
3. Palmer, C.N.A. a kol., (1998) "Peroxisome proliferator activated receptor-alpha expression in human liver," Molecular Pharmacology, 53, 14 až 22.
4. Lee, S.S-T. a kol., (1995) "Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators," Mol. Cell. Biol., 15, 3012 až 3022.
5. Forman, B.M. a kol., (1995) "15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J₂ is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma," Cell, 83, 803 až 812.
6. Lehmann, J.M. a kol., (1995) "An anti-diabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for Peroxisome proliferator activated receptor," J. Biol. Chem., 270, 12953 až 12956.



7. Barak, Y. a kol., (1998) "ppAR γ null mice - Early embryonic lethality due to a putative placental defect," Abstract č. 303. Keystone Symposium on The Nuclear Receptor Gene Family. Incline Village, Nevada.
8. Schmidt, A. a kol., (1992) "Identification of a new member of the steroid hormone receptor superfamily that is activated by a peroxisome proliferator and fatty acids," *Molecular Endocrinology*, 6, 1634 až 1641.
9. Saxena, U. a kol., (1992) "Lipoprotein lipase-mediated lipolysis of very low density lipoproteins increases monocyte adhesion to aortic endothelial cells," *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 189, 1653 až 1658.
10. Frostegard, J. a kol., (1990) "Oxidized low density lipoprotein induces differentiation and adhesion of human monocytes and the monocytic cell line U937," *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 87, 904 až 908.
11. Terkeltaub, R. a kol., (1994) "Oxidized LDL induces monocytic cell expression of interleukin-8, a chemokine with T-lymphocyte chemotactic activity," *Arterioscler. Thromb.*, 14, 47 až 53.
12. Ross, R. (1993) "The pathogenesis of atherosclerosis; A perspective for the 1990s," *Nature*, 362, 801.
13. Ricote, M. a kol., (1998) "The peroxisome proliferator activated receptor- γ is a negative regulator of macrophage activation," *Nature*, 391, 79 až 82.



14. Jiang, C. a kol., (1998) "PPAR γ agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines," *Nature*, 391, 82 až 86.

15. Marx. N. a kol., (1998) "Macrophages in human atheroma contain PPAR γ ," *Am. J. Pathol.*, 153, 17 až 23.

16. Tontonoz, P. a kol., (1998) "PPAR γ promotes monocytemacrophage differentiation and uptake of oxidised LDL," *Cell*, 93, 241 až 252.

17. Nagy, L. a kol., (1998) "Oxidised LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPAR γ ," *Cell*, 93, 229 až 240.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Použití inhibitoru aktivity PPAR δ pro výrobu léčiva pro prevenci nebo snižování rozvoje pěnových buněk z makrofágů nebo jiných buněk nebo odstraňování pěnových buněk.
2. Použití inhibitoru aktivity PPAR δ pro výrobu léčiva pro prevenci nebo snižování rozvoje pěnových buněk z makrofágů nebo jiných buněk nebo odstraňování pěnových buněk u pacienta.
3. Použití inhibitoru aktivity PPAR δ pro výrobu léčiva pro prevenci nebo snižování rozvoje pěnových buněk z makrofágů nebo jiných buněk nebo odstraňování pěnových buněk, kde rozvoj pěnových buněk z makrofágů nebo jiných buněk je spjat s aterosklerózou nebo chorobami spjatými s aterosklerózou, chorobou srdce, mrtvicí, periferními arteriálními chorobami, anginou, restenózou a ateromem.
4. Použití inhibitoru aktivity PPAR δ pro výrobu léčiva pro prevenci nebo léčbu choroby krevních cév spjaté s tvorbou plátu a/nebo trombotické blokády krevních cév.
5. Použití inhibitoru aktivity PPAR δ pro výrobu léčiva pro prevenci nebo léčbu choroby cév, kterou je ateroskleróza, choroba srdce, mrtvice nebo periferní arteriální choroba.
6. Použití inhibitoru aktivity PPAR δ pro výrobu léčiva pro prevenci nebo snižování proliferace buněk.
7. Použití inhibitoru aktivity PPAR δ pro výrobu léčiva pro léčbu nebo prevenci rakoviny.

8. Použití inhibitoru aktivity PPAR δ pro výrobu léčiva pro léčbu nebo prevenci rakoviny, kterou je rakovina kůže, rakovina prsu, rakovina tračníku nebo rakovina prostaty.

9. Použití inhibitoru aktivity PPAR δ pro výrobu léčiva pro léčbu nebo prevenci Alzheimerovy choroby.

10. Použití inhibitoru aktivity PPAR δ pro výrobu léčiva pro některou z aplikací uvedených v kterémkoli z předchozích nároků, kde inhibitorem aktivity PPAR δ je sloučenina, která brání expresi PPAR δ v buňce.

11. Použití inhibitoru aktivity PPAR δ pro výrobu léčiva pro některou z aplikací uvedených v kterémkoli z předchozích nároků, kde inhibitorem aktivity PPAR δ je sloučenina, jejíž molekula je založena na nukleové kyselině.

12. Použití inhibitoru aktivity PPAR δ pro výrobu léčiva pro některou z aplikací uvedených v kterémkoli z předchozích nároků, kde inhibitorem aktivity PPAR δ v buňkách založeným na nukleové kyselině je kterákoli komplementární molekula selektivní vůči PPAR δ nebo ribozym selektivní vůči PPAR δ .

13. Použití inhibitoru aktivity PPAR δ pro výrobu léčiva pro některou z aplikací uvedených v kterémkoli z nároků 1 až 9, kde sloučenina inhibuje aktivitu aktivity proteinu PPAR δ .

14. Použití inhibitoru aktivity PPAR δ pro výrobu léčiva pro některou z aplikací uvedených v kterémkoli z předchozích nároků, kde inhibitorem aktivity PPAR δ je sloučenina, která blokuje účinek agonisty PPAR δ .

15. Inhibitor aktivity PPAR δ pro použití v lékařství.
16. Farmaceutický prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje inhibitor aktivity PPAR δ a farmaceuticky přijatelný nosič.
17. Použití inhibitoru aktivity PPAR δ k výrobě léčiva k prevenci nebo snižování rozvoje pěnových buněk z makrofágů nebo odstraňování pěnových buněk u pacienta.
18. Použití inhibitoru aktivity PPAR δ k výrobě léčiva k prevenci nebo léčbě choroby krevních cév spjaté s tvorbou plátu a/nebo trombotické blokády krevních cév.
19. Použití inhibitoru aktivity PPAR δ k výrobě léčiva k léčbě nebo prevenci rakoviny.
20. Použití inhibitoru aktivity PPAR δ k výrobě léčiva k léčbě nebo prevenci Alzheimerovy choroby.
21. Způsob identifikace sloučeniny, která může být vodící sloučeninou nebo kterou lze použít jako vodící sloučeninu k přípravě sloučeniny, která může být užitečná v lékařství, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje selekci sloučeniny, která inhibuje aktivitu PPAR δ .
22. Způsob identifikace sloučeniny, která může být vodící sloučeninou nebo kterou lze použít jako vodící sloučeninu k přípravě sloučeniny, která může
 - 1) zabraňovat nebo snižovat rozvoj pěnových buněk z makrofágů nebo jiných buněk nebo odstraňovat pěnové buňky,

2) zabraňovat nebo být užitečná při léčbě cévní choroby spjaté s tvorbou plátu a/nebo trombotické blokády krevních cév,

3) zabraňovat nebo být užitečná při léčbě rakoviny nebo

4) zabraňovat nebo být užitečná při léčbě Alzheimerovy choroby,

v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje selekci sloučeniny, která inhibuje aktivitu PPAR δ .

23. Způsob podle nároku 22, v y z n a č u j í c í s e t í m, že identifikovaná sloučenina se následně v dalším vyšetření testuje, zda může

1) zabraňovat nebo snižovat rozvoj pěnových buněk z makrofágů nebo odstraňovat pěnové buňky,

2) zabraňovat nebo být užitečná při léčbě cévní choroby spjaté s tvorbou plátu a/nebo trombotické blokády cév,

3) zabraňovat nebo být užitečná při léčbě rakoviny nebo

4) zabraňovat nebo být užitečná při léčbě Alzheimerovy choroby.

24. Způsob podle nároku 22, v y z n a č u j í c í s e t í m, že sloučenina identifikována jako vodící sloučenina je modifikována.

25. Způsob identifikace sloučeniny, která inhibuje aktivitu PPAR δ , v y z n a č u j í c í s e t í m, že z knihovny

testovaných sloučenin se vybere jakákoli sloučenina, která inhibuje aktivitu PPAR δ .

26. Způsob podle kteréhokoli z nároků 22 až 24, v y z n a -
č u j í c í s e t í m, že sloučenina se vybere podle své
schopnosti inhibovat funkci proteinu nebo aktivitu PPAR δ .

27. Způsob podle kteréhokoli z nároků 22 až 25, v y z n a -
č u j í c í s e t í m, že sloučenina se vybere podle své
schopnosti inhibovat v buňce tvorbu PPAR δ .

28. Způsob identifikace sloučeniny, která může být vodící
sloučeninou nebo kterou lze použít jako vodící sloučeninu
k přípravě sloučeniny, která může

1) zabraňovat nebo snižovat rozvoj pěnových buněk
z makrofágů nebo jiných buněk, nebo odstraňovat pěnové buňky
nebo

2) zabraňovat nebo být užitečná při léčbě cévní choroby
spjaté s tvorbou plátu a/nebo trombotické blokády krevních
cív,

v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje kroky
selekce:

a) vhodné populace primárních buněk nebo buněčné linie,

b) dodání buněčné linii zánětlivého podnětu nebo růstového
faktoru, který usnadňuje diferenciaci na prekursor pěnové
buňky,

c) dodání k prekursoru pěnové buňky vhodné koncentrace mastné

kyseliny a

d) změření akumulace mastné kyseliny v buňce za přítomnosti nebo nepřítomnosti této sloučeniny.

29. Způsob podle nároku 28, v y z n a č u j í c í s e t í m, že populace primárních buněk sestává z periferních monocytů a makrofágů a buněčnou linií je leukocytová buněčná linie.

30. Způsob podle nároku 29, v y z n a č u j í c í s e t í m, že leukocytovou buněčnou linií je monocytární buněčná linie nebo buněčná linie makrofágového charakteru.

31. Způsob podle nároku 30, v y z n a č u j í c í s e t í m, že buňkami jsou buňky THP-1 nebo buňky U937.

32. Způsob podle kteréhokoli z nároků 28 až 31, v y z n a - č u j í c í s e t í m, že růstovým faktorem je forbolester nebo GMCSF.

33. Způsob podle nároku 32, v y z n a č u j í c í s e t í m, že forbolesterem je PMA.

34. Způsob podle kteréhokoli z nároků 28 až 33, v y z n a - č u j í c í s e t í m, že mastná kyselina se dodává v séru nebo jako kyselina linoleová.

35. Způsob podle kteréhokoli z nároků 27 až 34, v y z n a - č u j í c í s e t í m, že akumulace mastné kyseliny se měří barvením mastné kyseliny.

36. Sloučenina identifikovatelná způsoby podle kteréhokoli

z nároků 21 až 35.

37. Sloučenina podle nároku 36 pro použití v lékařství.

38. Farmaceutický prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje sloučeninu podle nároku 36 a farmaceuticky přijatelný nosič.

39. Použití inhibitoru aktivity PPAR δ identifikovatelného způsobem podle kteréhokoli z nároků 21 až 26 pro výrobu léčiva pro léčbu podle kteréhokoli z nároků 1 až 12.

40. Použití sloučeniny identifikovatelné způsobem podle kteréhokoli z nároků 27 až 33 pro výrobu léčiva pro prevenci nebo snižování rozvoje pěnových buněk z makrofágů nebo jiných buněk nebo odstraňování pěnových buněk nebo prevence nebo léčby cévní choroby spjaté s tvorbou plátu a/nebo trombotické blokády krevních cév.

41. Použití podle kteréhokoli z nároků 16 až 19, kde inhibitor aktivity PPAR δ je identifikovatelný způsobem podle kteréhokoli z nároků 21 až 26.

42. Použití sloučeniny identifikovatelné způsobem podle kteréhokoli z nároků 28 až 35 k výrobě léčiva pro prevenci nebo snižování rozvoje pěnových buněk z makrofágů nebo jiných buněk nebo odstraňování pěnových buněk nebo pro prevenci nebo léčbu cévní choroby spjaté s tvorbou plátu a/nebo trombotické blokády krevních cév.

43. Jakékoli nové použití pro výrobu léčiva pro léčbu nebo prevenci choroby krevních cév spjaté s tvorbou plátu a/nebo trombotické blokády krevních cév, jak je zde popsáno.

44. Jakékoli nové použití pro identifikaci sloučeniny užitečné při prevenci nebo léčbě choroby krevních cév spjaté s tvorbou plátu a/nebo trombotické blokády krevních cév, jak je zde popsáno.

45. Použití inhibitoru aktivity PPAR δ pro výrobu léčiva pro prevenci nebo léčbu zánětlivých poruch.

46. Použití inhibitoru aktivity PPAR δ pro výrobu léčiva pro prevenci nebo snižování rozvoje pěnových buněk z makrofágů nebo jiných buněk nebo odstraňování pěnových buněk, kde makrofágy nebo jiné buňky jsou makrofágy nebo jiné buňky účastníci se aterosklerotického patologického procesu.

47. Použití inhibitoru aktivity PPAR δ pro výrobu léčiva pro prevenci nebo snižování rozvoje pěnových buněk z makrofágů nebo jiných buněk nebo odstraňování pěnových buněk u pacienta, kde makrofágy nebo jiné buňky jsou makrofágy nebo jiné buňky účastníci se aterosklerotického patologického procesu.

48. Použití podle nároku 17, kde makrofágy jsou makrofágy účastníci se aterosklerotického patologického procesu.

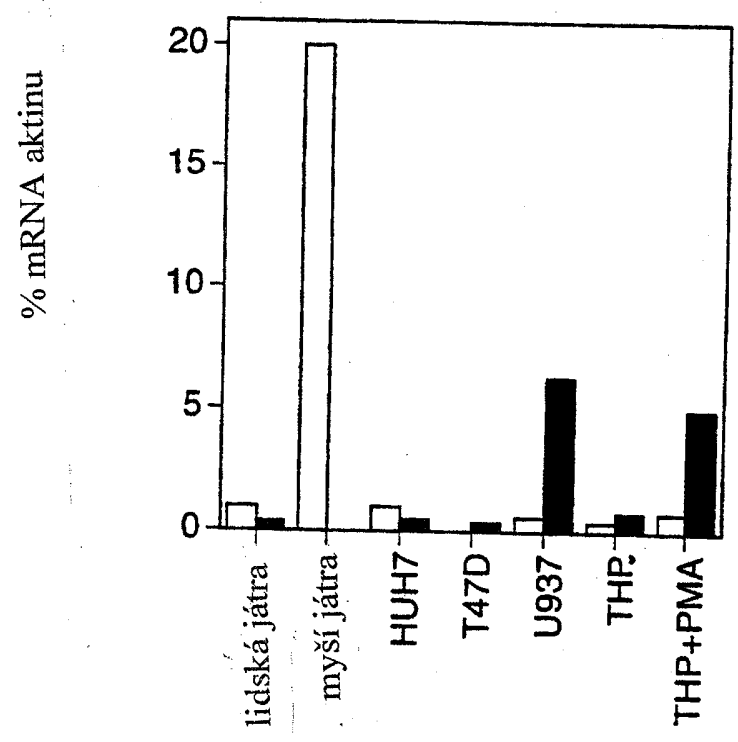
49. Způsob podle nároku 22, v y z n a č u j í c í s e t í m, že makrofágy nebo jiné buňky jsou makrofágy nebo jiné buňky účastníci se aterosklerotického patologického procesu.

00.04.02

1/18

PV 2002-244

Obr. 1

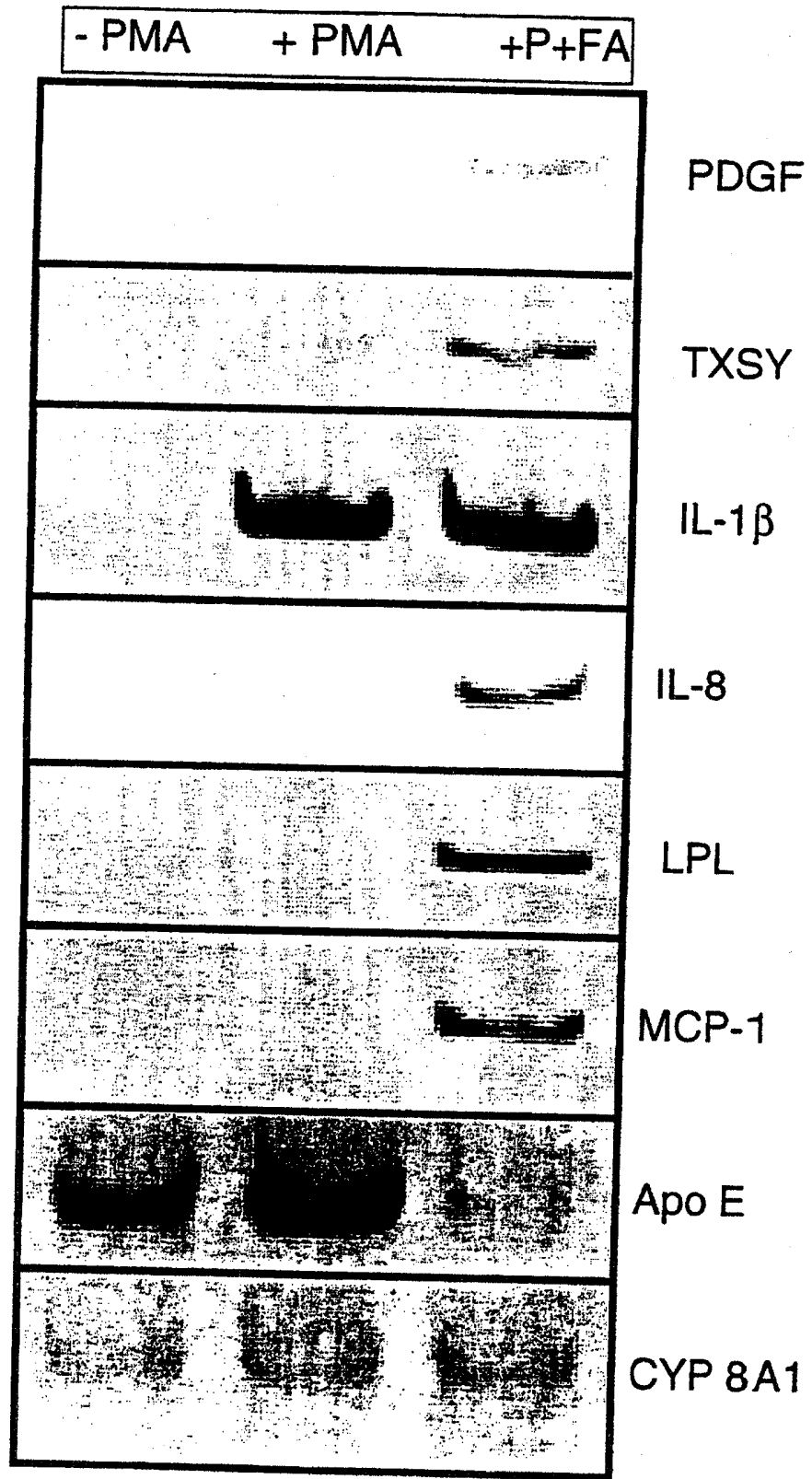


02.04.00

2/18

PV 2002-244

Obr. 2



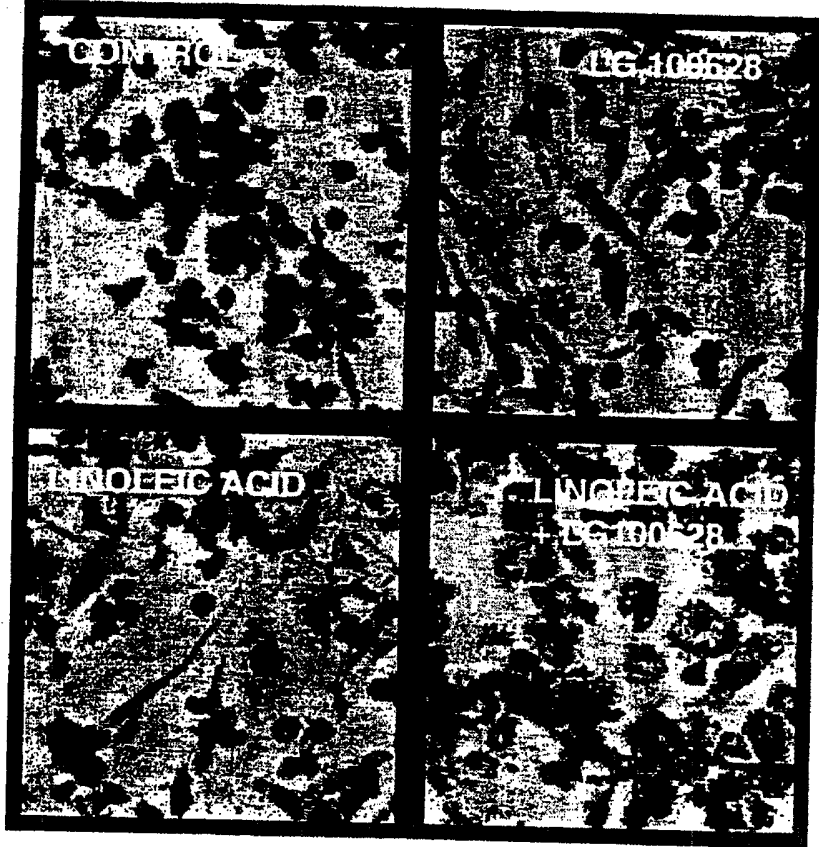
3/18

000400

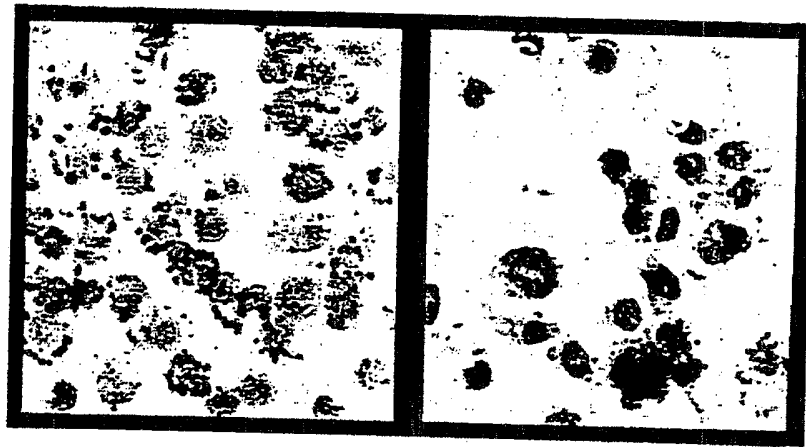
PV 2002-244

A

Obr. 3



B



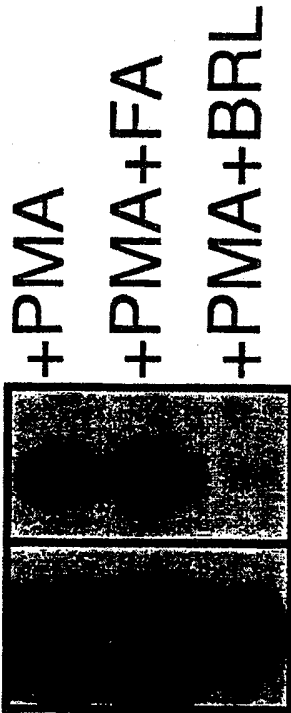
4/18

000400

7V 2002-244

Obr. 4

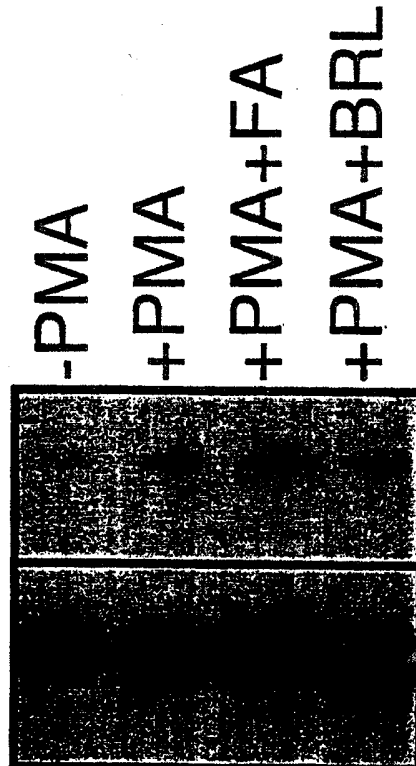
A



IL-1 β

β -aktin

B



TNF- α

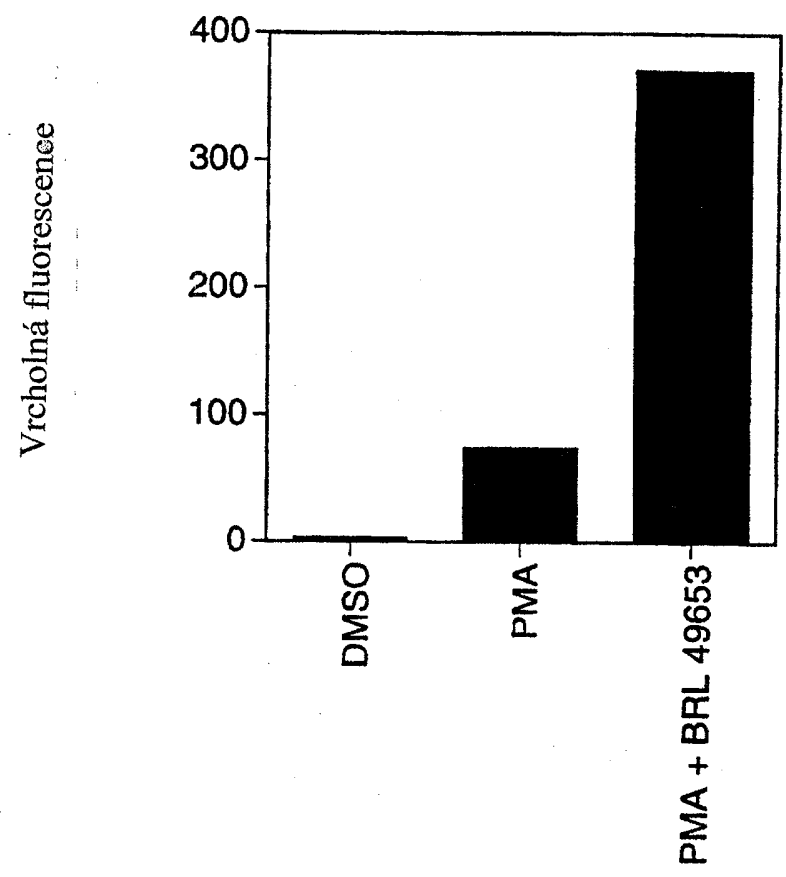
β -aktin

5/18



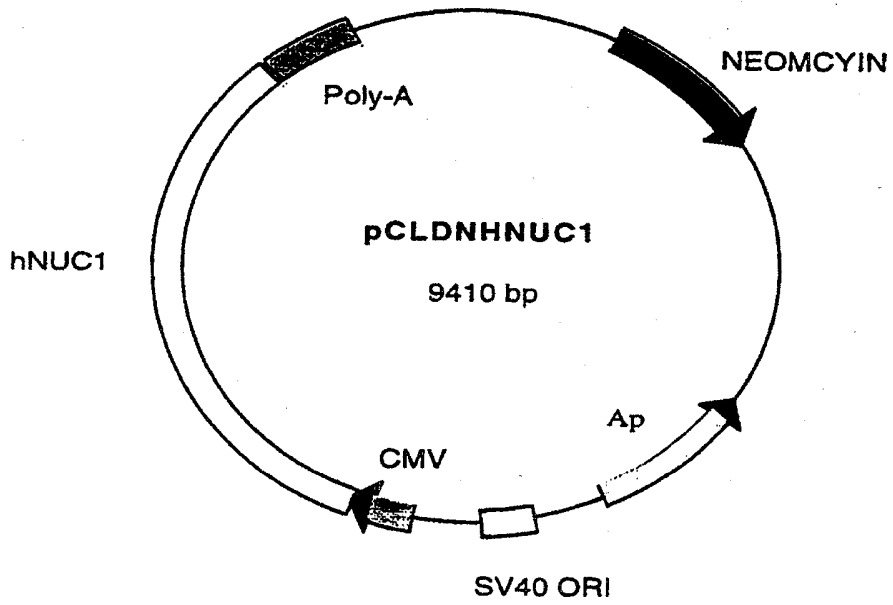
PV 2002 - 247

Obr. 4C



A

Obr. 5

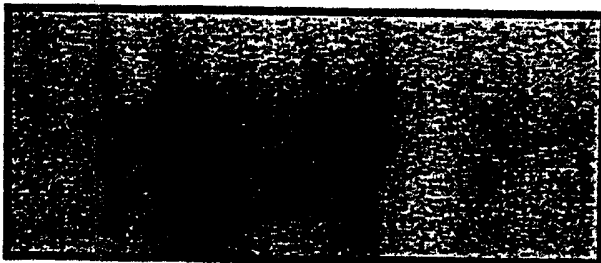


B

Rodičovský

delta-1
delta-2
delta-3
delta-4

delta-5
delta-6



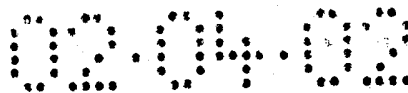
C

delta-1

Rodičovský



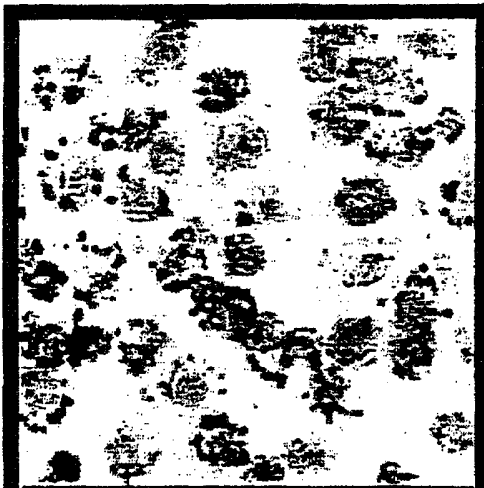
7/18



PV 2002-244

Obr. 6A

WT



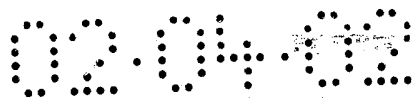
DELTA



**DELTA
+BRL49653**

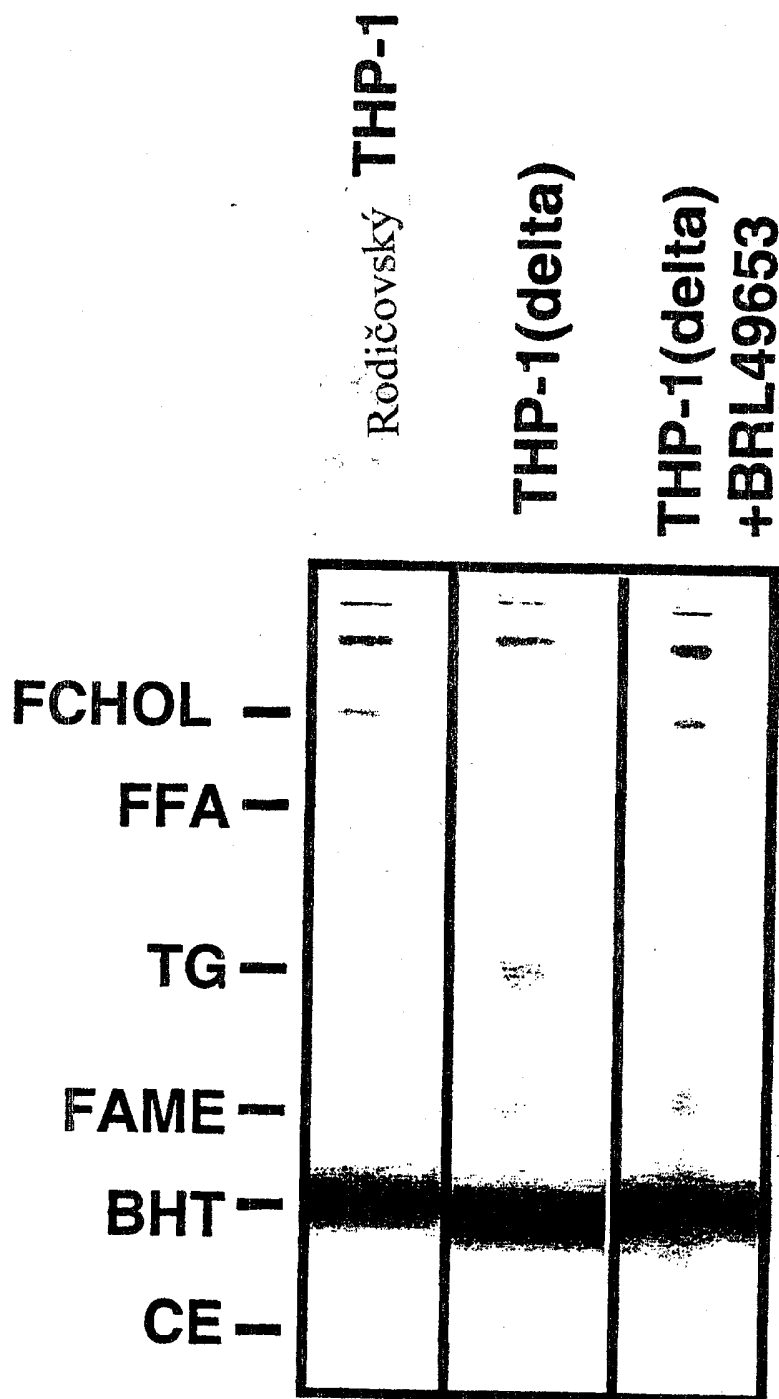


8/12



PV 2002-247

Obr. 6B



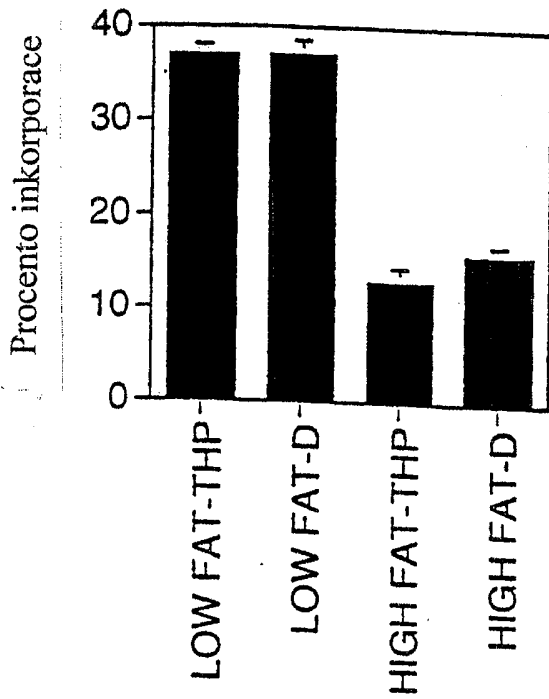
9/18

00:04:05

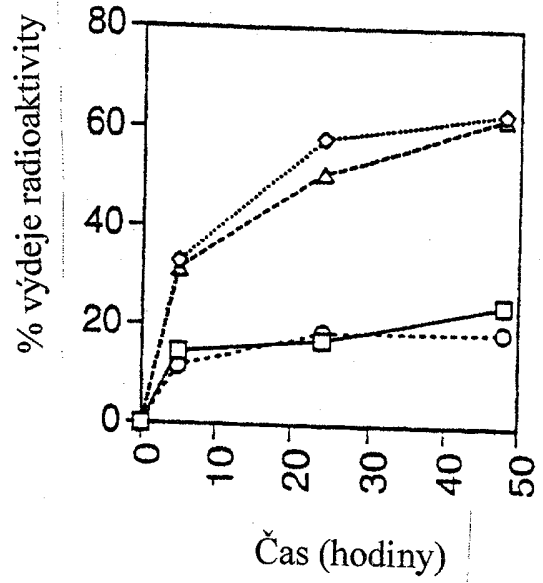
PI 2002 - 244

Obr. 7

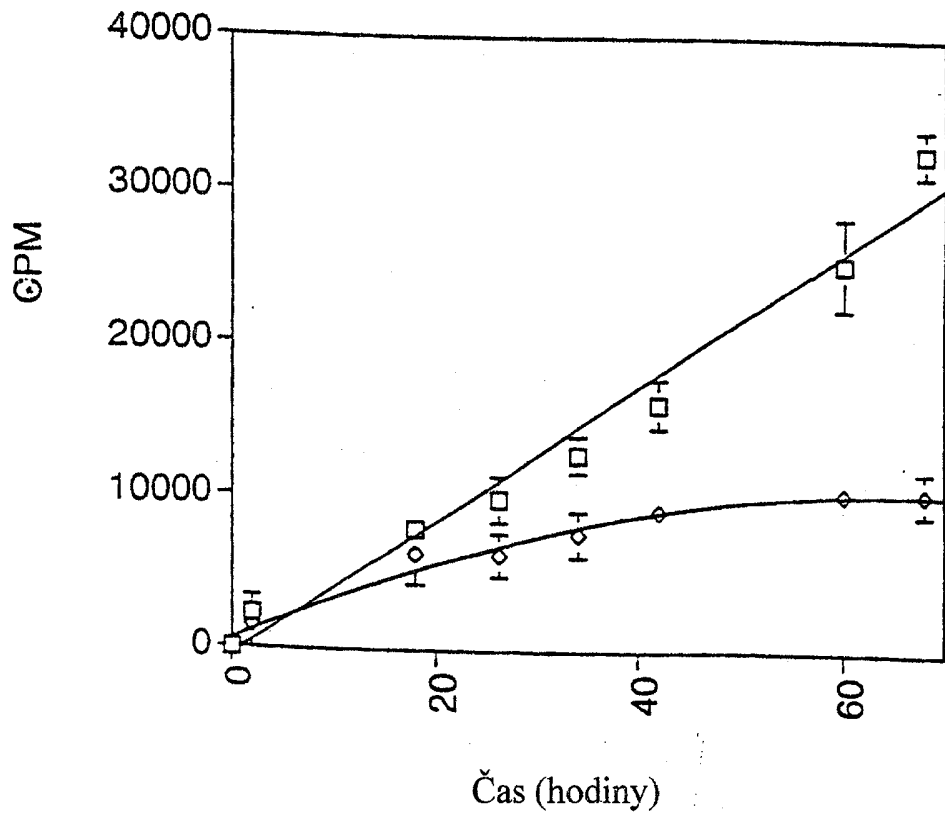
A



B



C



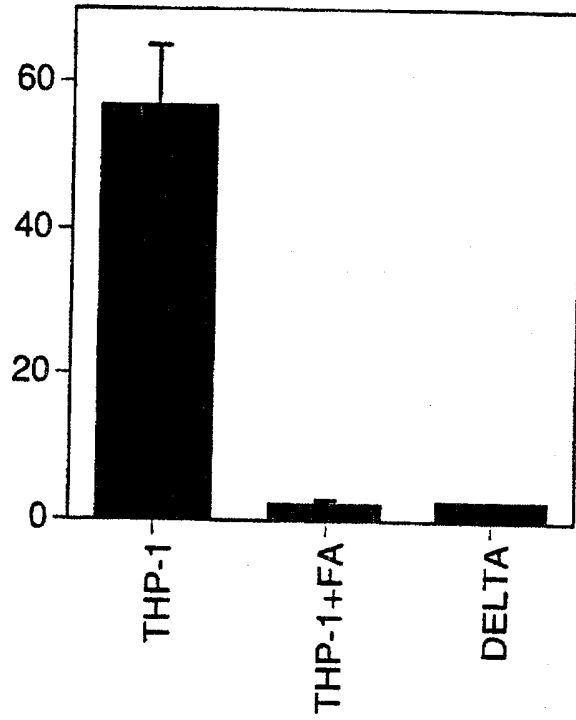
10/18



PV 2002-247

Obr. 8

Relativní exprese



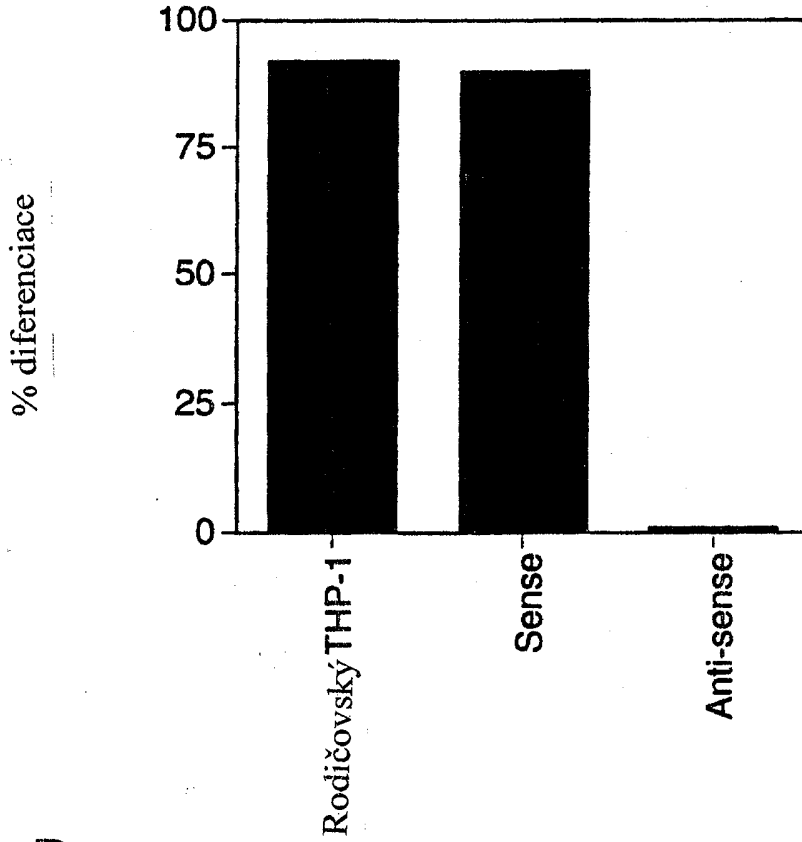
11/12



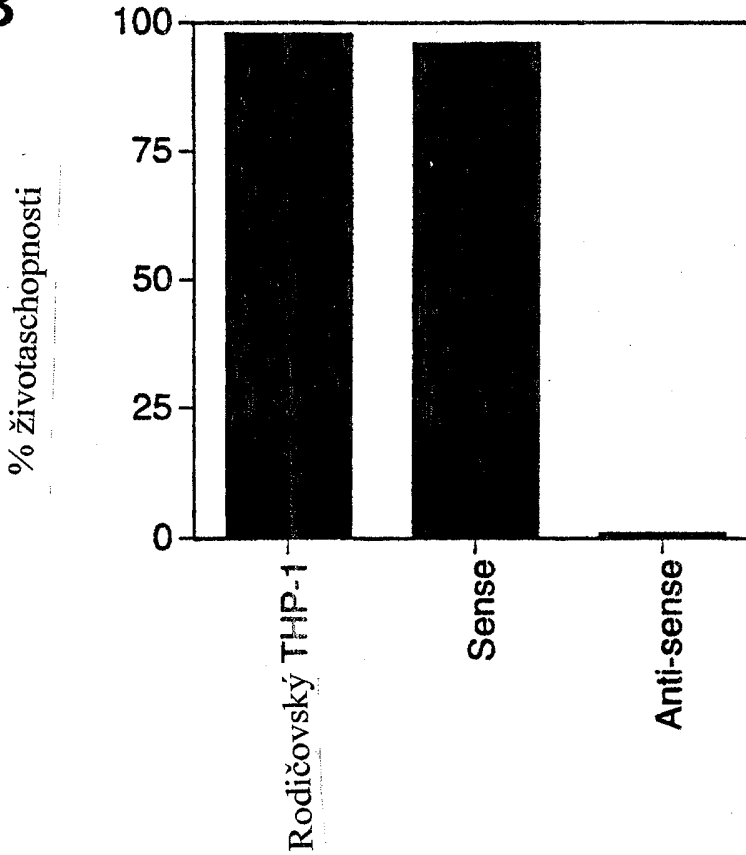
PV 2002 - 247

Obr. 9

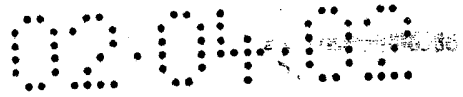
A



B

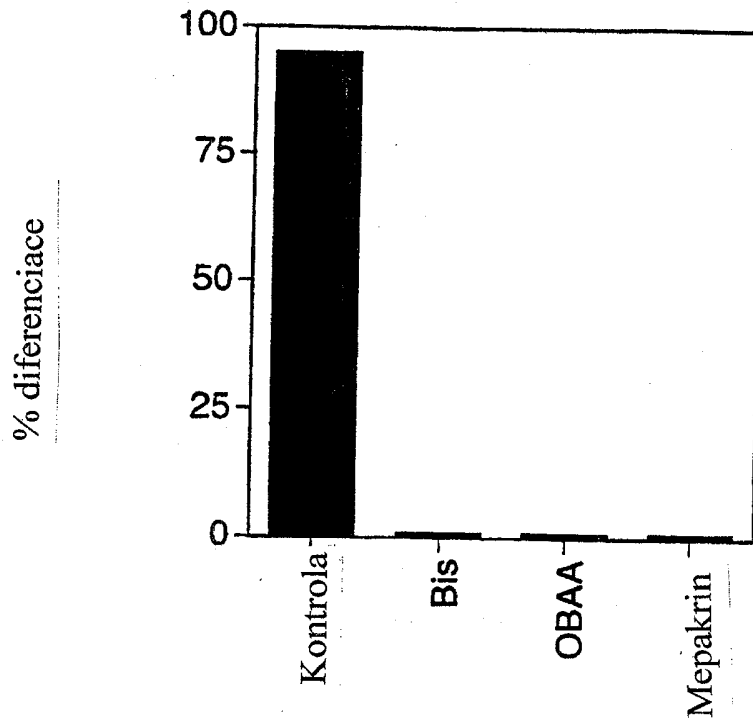


12/18

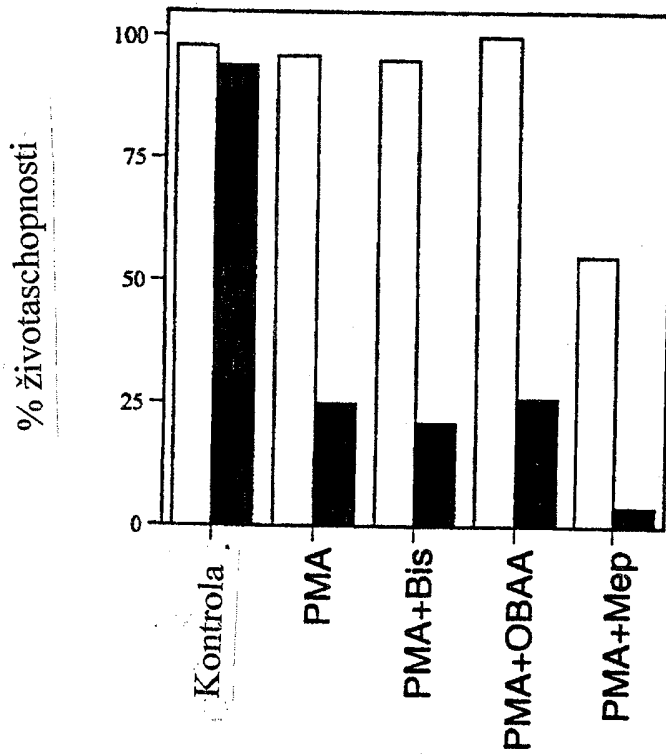


Obr. 10
PV 2002-247

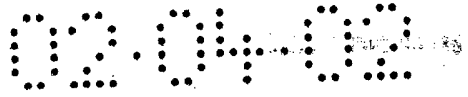
A



B

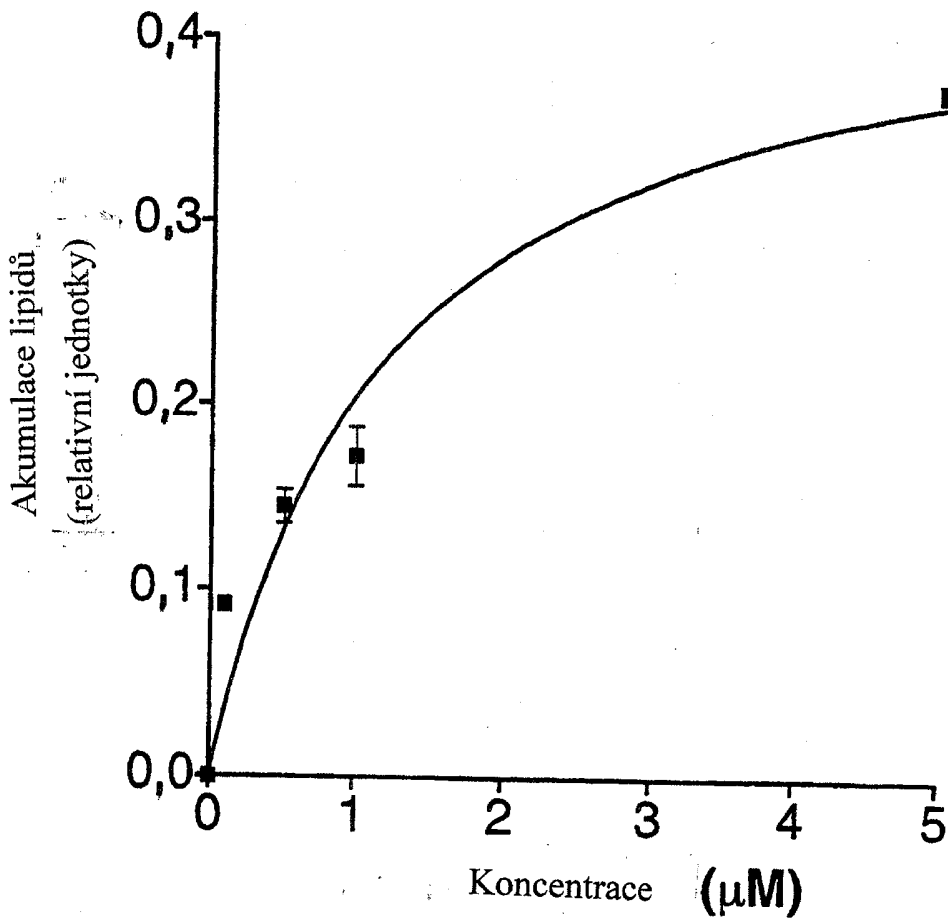


13/18

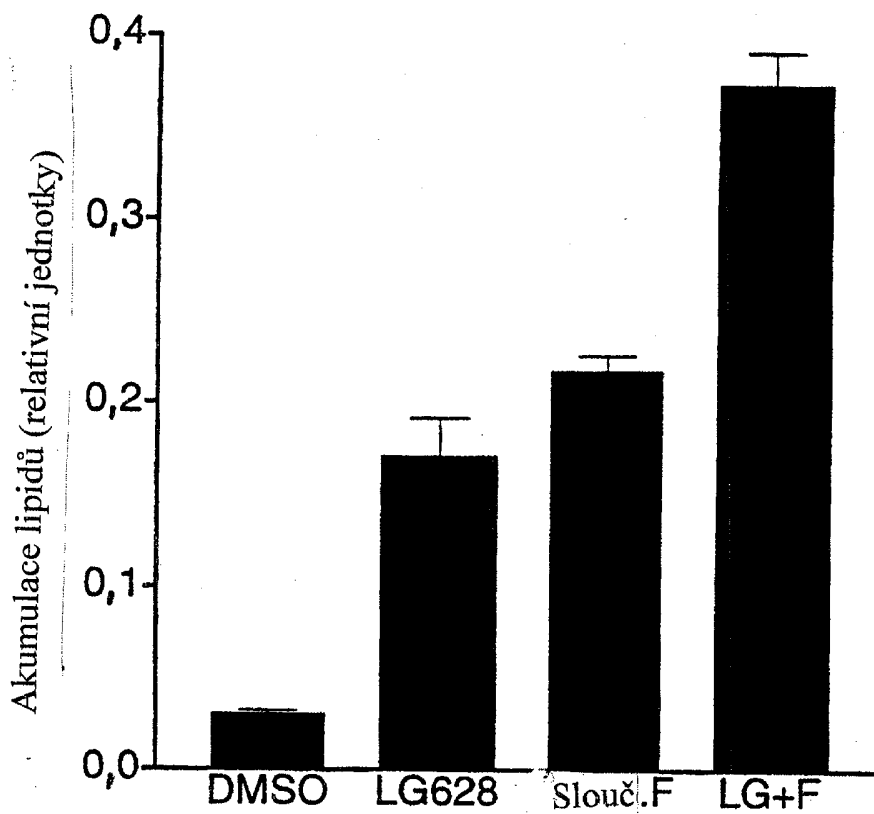


PV 2002-247

Obr. 11A



Obr. 11B



15/11

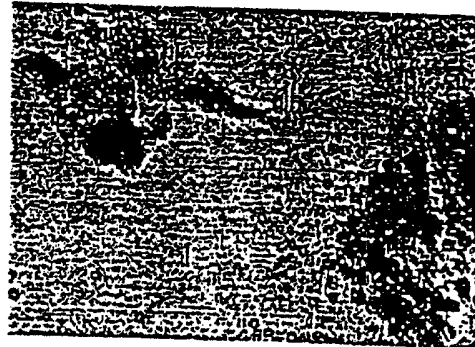


PV 2002-247

Obr. 12



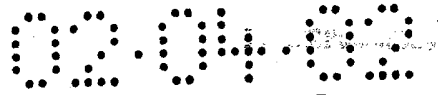
4 dny ošetřování



15 dní ošetřování

DMSO

Sloučenina F



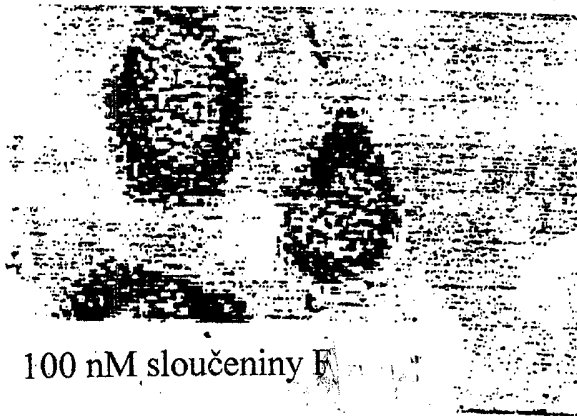
Obr. 13



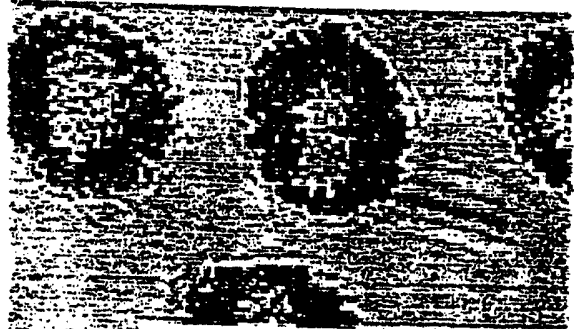
Vehikulum



10 nM sloučeny F

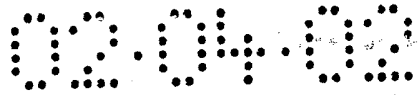


100 nM sloučeny F



1 μM sloučeny F

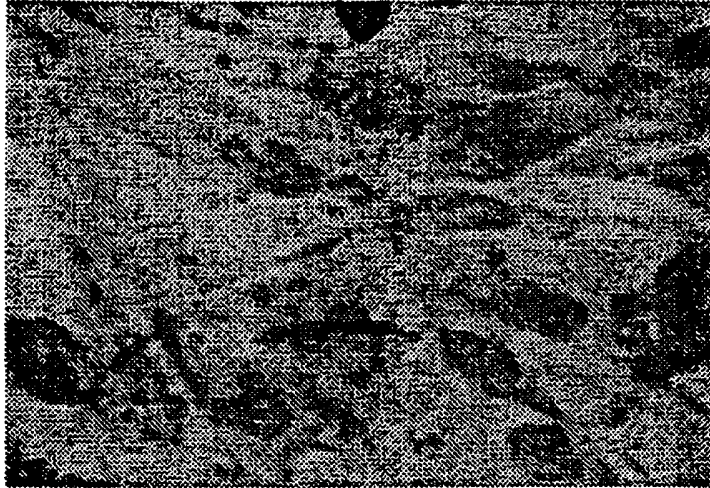
17/18



PV 2002-244

Obr. 14

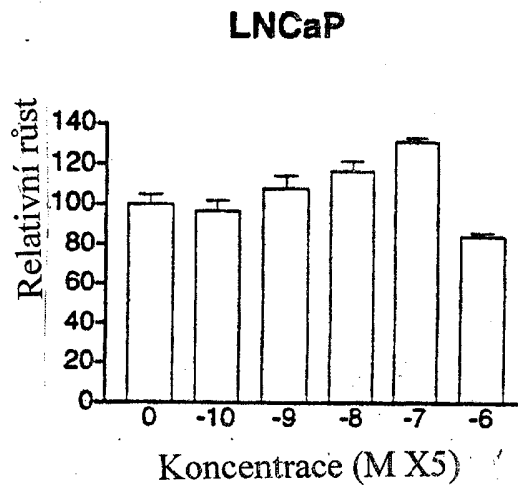
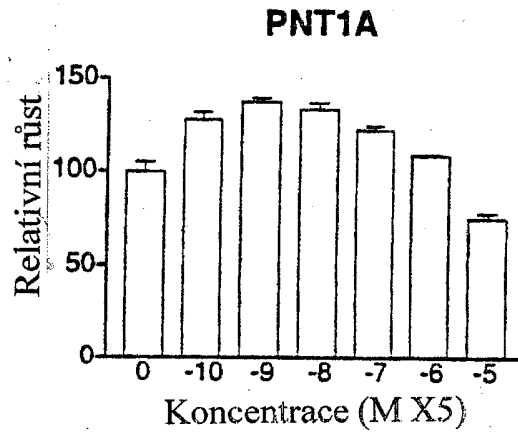
Kontrola



Sloučenina F



Stimulace růstu buněk rakoviny prostaty sloučeninou F

PPAR δ a RXR kooperují při navozování růstu buněk (LNCsP)