



(12) PATENT

(19) NO

(11) 333437

(13) B1

NORGE

(51) Int Cl.

C07K 14/47 (2006.01)
C07K 1/00 (2006.01)
C07K 1/02 (2006.01)
C07K 1/14 (2006.01)
C07K 1/16 (2006.01)
C07K 1/22 (2006.01)
C07K 1/26 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
G01N 33/92 (2006.01)

Patentstyret

| | | | | | |
|------|------------|--|------|---------------------------|--------------------------------|
| (21) | Søknadsnr | 20051169 | (86) | Int.inng.dag og søknadsnr | 2003.07.28 PCT/EP2003/08290 |
| (22) | Inng.dag | 2005.03.04 | (85) | Videreføringsdag | 2005.03.04 |
| (24) | Løpedag | 2003.07.28 | (30) | Prioritet | 2002.08.06, EP, 02017504 |
| (41) | Alm.tilgj | 2005.05.02 | | | |
| (45) | Meddelt | 2013.06.03 | | | |
| (73) | Innehaver | Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Brüningstrasse 50, DE-65926 FRANKFURT AM MAIN, Tyskland | | | |
| (72) | Oppfinner | Wendelin Frick, Schornmühlstrasse 3, DE-65510 HÜNSTETTEN-BEUERBACH, Tyskland | | | |
| (74) | Fullmektig | Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge | | | |

| | | | | | |
|------|-----------------------|---|--|--|--|
| (54) | Benevnelse | Fremgangsmåte for å isolere et intestinalt kolesterolbindende protein, sammensetning samt anvendelse av sammensetningen | | | |
| (56) | Anførte publikasjoner | WO 0218432 A2 KRAMER et al; Identification of binding proteins for cholesterol absorption inhibitors as components of the intestinal cholesterol transporter; FEBS letters, vol. 487, nr. 2, 2000, s. 293-297, ISSN 0014-5793. KRAMER et al; Intestinal cholesterol absorption: identification of different binding proteins for cholesterol and cholesterol absorption inhibitors in the enterocyte brush border membrane; Biochimica et Biophysica Acta, vol. 1633, nr. 1, 2003, s. 13-26, ISSN 1388-1981. WO 0063703 A1 | | | |
| (57) | Sammendrag | | | | |

Oppfinnelsen beskriver en fremgangsmåte for å isolere et intestinalprotein som er i stand til å binde kolesterol og/eller hemmere av kolesterolopptak.

Fremgangsmåte for å isolere et intestinal kolesterolbindende protein.

Oppfinnelsen vedrører en fremgangsmåte for å isolere et intestinalprotein som er involvert i intestinalkolesterolabsorpsjon og evnen til å binde kolesterol absorpsjons-
5 hemmere.

Hos mennesker er i gjennomsnitt ca. 50% av kolesterolet til stede i lumen av tarmen. Det intraluminale kolesterolet kommer hovedsakelig fra kosten og fra gallen. Ca. 2 g kolesterol blir hver dag utskilt fra gallen. Intestinal kolesterolabsorpsjonen avhenger i
10 stor grad av tilstedeværelsen av gallelsalter. Effekten av administreringen av hemmere av reopptaket av gallelsalter eller av gallelsalt kompleksdannere er dermed å hemme intestinalkolesterolabsorpsjon.

Hemming av intestinalkolesterolabsorpsjon er et viktig formål for behandlingen av lipid
15 forstyrrelse, arteriosklerose og kardiovaskulære forstyrrelser. Den alminnelige meningen blant eksperter er at tramkolesterolabsorpsjon finner sted ved fysiokjemisk diffusjon.

En rekke observasjoner i sammenheng med kolesteroltransport som indikerer at et
20 protein er involvert er kjente. Intestinalkolesterolabsorpsjon er utsatt for individuell variabilitet. Biokjemiske data fra in vitro eksperimenter indikerer at proteiner er involvert i kolesterolutbytting mellom små unilamellære vesikler og børstekant-vesiklene i tarmen. Det var mulig å observere store forskjeller i den intestinale absorpsjonen av plantesteroler slik som β -sitosterol og campesterol som avviker bare i
25 en metylgruppe (β -sitosterol) og en etylgruppe (campesterol). Hos mennesker så viste β -sitosterol blant annet en hemming av kolesterolabsorpsjon. Det finnes to svært aktive klasser med forbindelser som hemmer intestinalkolesterolabsorpsjon ved luminal administrering. Forbindelsene er på den ene siden forbindelser utledet fra saponin, slik som tiquesid og pamaquesid, og på den annen side visse derivater av 2-azetidiner.
30 Derivater av 2-azetidiner som hemmere av kolesterolabsorpsjon er beskrevet i Clader et al., J. Med. Chem. 39, 3684-3693, 1996. For formålene i den oppfinnelsen, er absorpsjon ment å bety festing av en substans til et protein og transport av denne substans ved hjelp av dette protein.

35 WO02/18432 A2 er søkers egen publikasjon og omhandler på samme måte som foreliggende søknad et protein på 150-150 kDa isolert fra tarm hos pattedyr. Proteinet er tenkt anvendt som et verktøy for å identifisere nye inhibitorer av kolesterolabsorpsjon

og - transport i tarmen. Det blir vist i eksemplene at et protein på 145 kDa kan identifiseres fra pattedyrstarmer ved binding til radioaktivt merket azetidinonforbindelser som er en inhibitor av kolesterol absorpsjon.

- 5 Kramer et al., Intestinal cholesterol absorption: identification of different binding proteins of cholesterol and cholesterol absorption inhibitors in the enterocyte brush border membrane; Biochemica et Biophysica Acta, vol. 1633, nr.1, 2003, s.13-26, ISSN 1388-1981 beskriver identifisering av ulike kolesterol bindingsproteiner og kolesterol absorpsjonsinhibitorer over den luminalebørstekant membranen fra
10 tynntarmsenterocytter.

WO 00/63703 A1 omhandler bruk av azetidinonforbindelser. Slike substanser er kjent som inhibitorer av kolesterolabsorpsjon og kan brukes som verktøy for å oppdage og karakterisere proteiner involvert i transport og absorpsjon av kolesterol i biologiske
15 systemer.

Intestinal absorpsjon av kolesterol bidrar signifikant til serum-kolesterolhomeostase. Hemmere av intestinal kolesterolabsorpsjon som Ezetimbe eller Pamaqueside har vist deres effektivitet som nye kolesterolsenkende midler i kliniske utprøvinger. Deres
20 molekylære virkningsmåte så vel som mekanismene for intestinalkolesterolabsorpsjon er til tross for enorme vitenskapelige anstrengelser fremdeles ukjente og blir diskutert kontroversielt. Generelt så antas en passiv diffusjon av kolesterol over plasmamembranene og intestinal børstekant cellemembranen, men det er økende bevis for en proteinstyrt prosess for intestinalkolesterolabsorpsjon: Kolesterolabsorpsjon viser
25 en sterk artsforskjell og strukturell tett relaterte plantesteroler som β -sitosterol eller campesterol med sammenliknbare fysiokjemiske karakteristika blir i motsetning til kolesterol bare dårlig absorbert, noe som gjør en enkel diffusjonsprosess usannsynlig. Eksistensen av spesifikke transporthemmere for kolesterol, 2-azetidinoide og sterol glykosider, med uttalt struktur-aktivitets-slekstsskap tyder sterkt på en proteinstyrt
30 prosess for intestinalkolesterolabsorpsjon.

Kolesterol er en allsidig forbindelse som er vital (i små mengder) for funksjoneringen av den humane kroppen. Kun dyr produserer dette; ingen planteprodukt inneholder kolesterol med mindre et dyrebasert produkt, slik som flekk, er blitt tilsatt til det i
35 prosesseringen. Hos mennesker tjener kolesterol tre hovedfunksjoner. Det blir anvendt av visse kjertler for å produsere steroider eller kortisonliknende hormoner, inkludert kjønnshormoner. Det hjelper leveren til å produsere gallesyre, som er essensielt for

fordøyelsen av fett. Sist men ikke minst så er det en hovedkomponent i cellemembraner og strukturer, en type byggesteiner for kroppsvev. Uten kolesterol ville ikke pattedyrliv kunne eksistere.

- 5 Problemet med kolesterol oppstår når kroppen har for mye av det, eller har deponeringer av det på gale stedene. Koronar hjertesykdom er et resultat når kolesterol er deponert på innsiden av veggene av hjertets koronararterier, hovedleverandørene av oksygen til hjertets eget muskelvev. Der bidrar det til dannelsen av fettliknende, seige blokkeringer kalt plakk. Denne oppbygging av plakk blir kalt arteriosklerose, herding av arteriene, og
- 10 arteriosklerose. Kolesterol kan også deponeres innen arteriene andre steder i kroppen, hvor det kan bidra til at slag oppstår (fra blokkerte arterier i hjernen) og perifer vaskulær sykdom (fra arterieblokkering i bena).

For å reise gjennom kroppen må kolesterol pakkes i spesielle molekyler som kalles

15 lipoproteiner. Lipidene eller fettkolesterolkomponentene er pakket på innsiden av en vannløselig proteinkappe. Forskjellige typer lipoproteiner inneholder forskjellige lipoproteiner fra en dynamisk økonomi inne i kroppen, transporterer kolesterol til noe vev og fjerner det fra andre. Den hovedkolesterolbærende forbindelsen i kroppen er lavtetthetsprotein, eller LDL-kolesterol. LDL blir ofte referert til som det "dårlige

20 kolesterol" fordi det synes å spille en nøkkelrolle i å deponere kolesterol innen arteriene. Det blir kalt lavtetthets fordi det har veldig lite protein, det mest tette innholdet av molekylet, og er sammensatt hovedsakelig av fett. Høye nivåer av LDL er koplet til en øket risiko for koronar hjertesykdom. Høytetthets lipoprotein, eller HDL, blir ofte kalt "godt kolesterol" fordi det synes som om det hjelper til med å fjerne kolesterol fra

25 arterieveggene og transporterer det til leveren for utskilling. I motsetning til LDL-kolesterol, er lave nivåer av HDL assosiert med en øket risiko for koronar hjertesykdom mens høyere nivåer av HDL synes å beskytte mot sykdommen.

Andre undergrupper av kolesterolpartikler inkluderer chylomikroner som blir produsert

30 av tarmcellene når fett blir fordøyet, og veldig lav tetthetsprotein (VLDL), produsert av leveren som en viktig forløper for LDL-kolesterol produksjon. VLDL er hovedlipoproteinet som transporterer triglyseridene som produseres av leveren.

For formålet med å bestemme hjertesykdomsrisiko, er LDL og HDL nøkler.

35

Når man har alle bevisene for at høyfett, høykolesteroldiett bidrar til forhøyede nivåer av kolesterol i blodet og at høyt blodkolesterol er en bestemt risikofaktor for

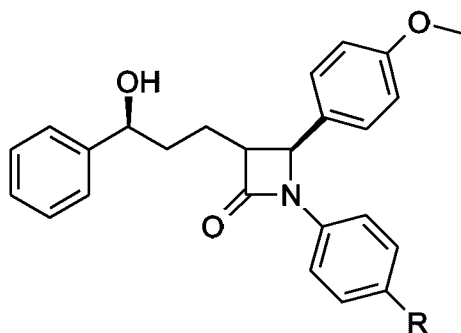
hjertesykdom, kan det synes naturlig å anta at å senke blodkolesterol ved diett eller på andre måter vil redusere den risikoen.

Det er et tema i oppfinnelsen å tilveiebringe en fremgangsmåte for å isolere et protein som er involvert i intestinal kolesterolabsorpsjon og som er det molekylære proteinmålet for kolesterolabsorpsjonshemmere. En slik fremgangsmåte er ment å bidra med store fordeler for terapeutiske innsatser for å kontrollere forhøyede kolesterolnivåer.

Foreliggende oppfinnelse omfatter fremgangsmåte for å isolere et glykosylert protein med en størrelse på 145 kDa +/- 7,55 kDa som bestemt ved SDS polyakrylamid gelelektroforese, kjennetegnet ved at

- a) børstekantvev fra tynntarmen blir tilveiebrakt,
- b) børstekantvevet fra a) blir inkubert med en fotoreaktiv 2-azetidinon forbindelse som er radioaktivt merket,
- c) det biologiske materialet er løselig og celledbris blir fjernet
- d) supernatanten blir tilsatt til en innretning som innehar hvetekimlektinagarose,
- e) eluatet fra hvetekimlektinagarosen fra d) anvendes på en hydroksylapatittkolonne,
- f) de radioaktivt merkede fraksjonene fra e) settes på en preparativ SDS-PAGE,
- g) de radioaktivt merkede fraksjonene blir samlet og muligens presipitert, hvori den fotoreaktive 2 azetidinone forbindelsen har den følgende struktur av formel I:

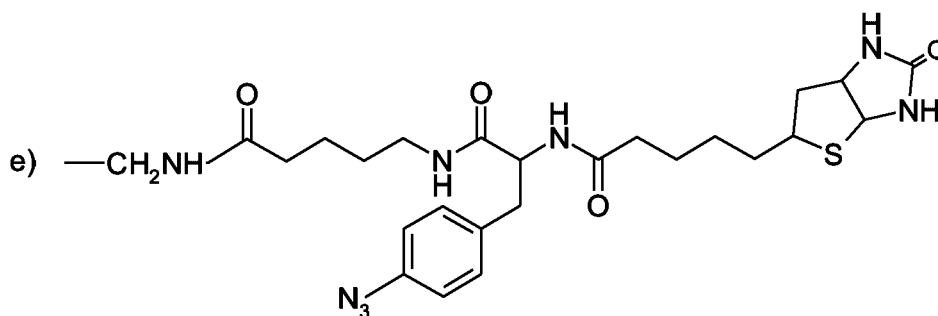
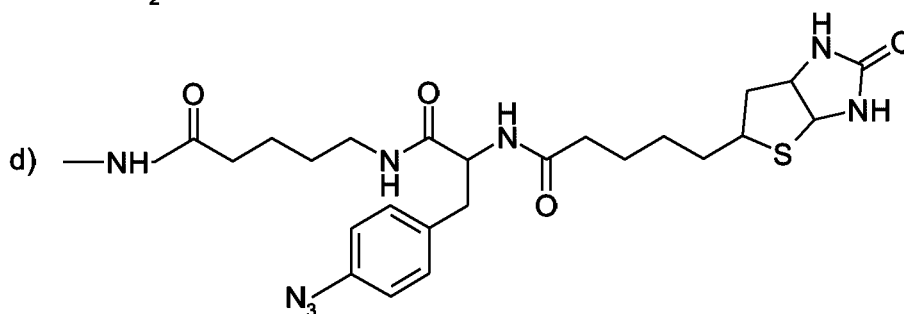
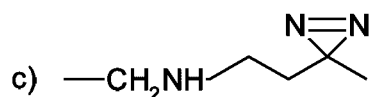
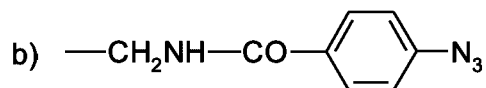
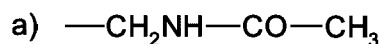
Formel 1



30

hvor R skal velges fra en av de følgende gruppene a) til e):

5



- 5 Videre omfatter oppfinnelsen sammensetning som omfatter et glykosylert protein med evnen til spesifikt å binde kolesterolabsorpsjonshemmere, kjennetegnet ved at proteinet er blitt isolert ved en fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 4.
- 10 Omfattet av oppfinnelsen er også anvendelse av sammensetningen i følge krav 5 for å identifisere en forbindelse som hemmer kolesterolgjenopptak hvor
- biologisk materiale blir tilveiebrakt som inneholder proteinet som definert i krav 5,
 - en forbindelse blir tilveiebrakt,
 - det biologiske materiale fra a) og forbindelsen fra b) blir brakt i kontakt med hverandre,
 - mengde av kolesterol tatt opp ved det biologiske materialet fra c) blir bestemt,

6

- e) resultatet fra d) blir sammenliknet med resultater fra et kontrollleksperiment hvori kolesterolopptaket blir bestemt fra biologisk materiale som har det samme arts og/eller vevsspesifisiteten som det biologiske materialet fra a) men som ikke blir brakt i kontakt med en forbindelse i b),
- 5 f) resultatene fra e) indikerer en forbindelse som hemmer kolesterolgjenopptak når nedsatt kolesterolopptak fra cellene som er blitt brakt i kontakt med en forbindelse fra b) blir bestemt.

En fremgangsmåte for å isolere et protein kan være der

10

- a) biologisk materiale blir tilveiebrakt,
- b) det biologiske materialet fra a) blir inkubert med en fotoreaktiv 2-azetidinon forbindelse som er radioaktivt merket og som er i stand til spesifikt å binde seg til nevnte protein,
- 15 c) det biologiske materialet er løselig og celledbris blir fjernet,
- d) supernatanten blir tilsatt til en innretning som innehar hvete, spire lektinagarose,
- e) eluatet av hvete spire lektinagarosen fra d) blir applisert på en hydroksylapatitt kolonne som blir eluert ved hjelp av en for svak
- 20 buffergradient
- f) de radioaktivt merkede fraksjonene fra e) blir lagt på en preparativ SDS-PAGE,
- g) de radioaktivt merkede fraksjonene ble samlet og muligens presipitert.

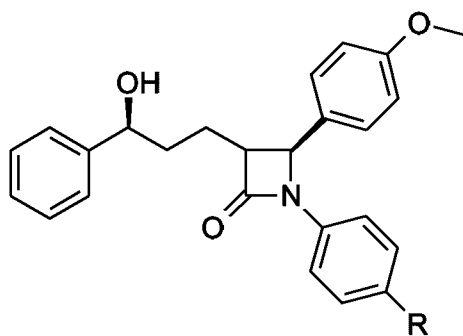
25 Det biologiske materialet blir helst tatt fra intestinalvev eller celler fra en intestinal cellekultur eller ideelt børstekantceller fra et menneske, en rotte, en mus eller en kanin.

De fotoreaktive 2-azetidinon forbindelsene har helst den følgende strukturen (Kramer, W. et al. (2000) FEBS Letters 487, 293-297)

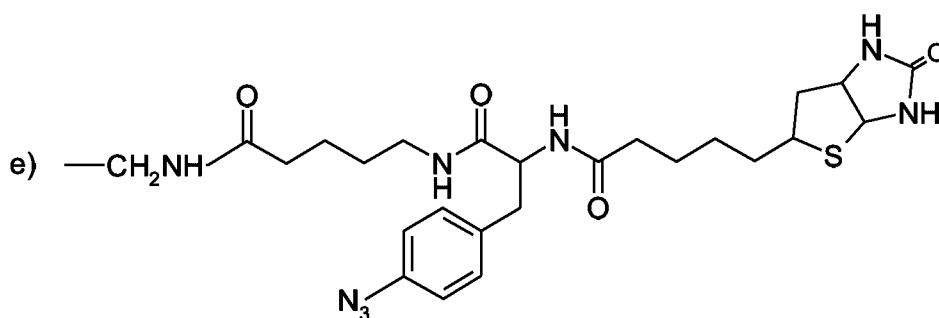
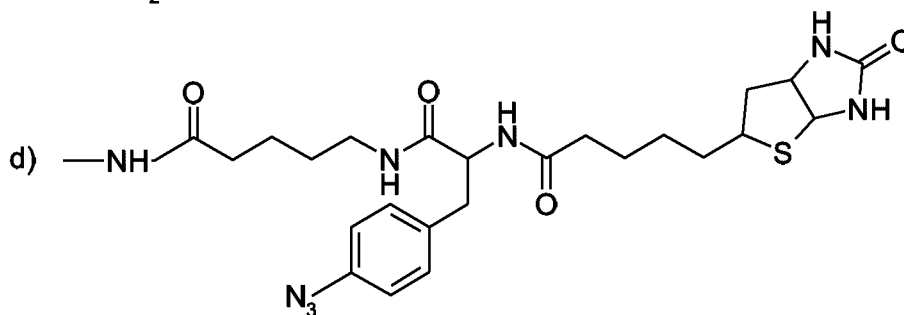
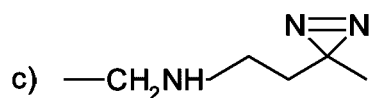
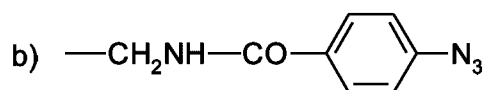
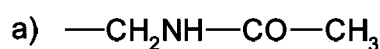
30

Formel 1

7



hvor R velges fra en av de følgende gruppene a) til e):



5

Forbindelsene i formel 1a, b og c er blitt omtalt i DE 10042447 A1 som ble publisert den 28. mars 2002. Syntese av forbindelsen av formel 1d og e er beskrevet i de etterfølgende eksemplene.

- 10 En fotolabil gruppe i et molekyl kan anvendes for å produsere kovalente bindinger til et molekyl, helst et protein, som er lokalisert i den direkte nærheten. For dette formål blir en forbindelse med den fotolabile gruppen initialt brakt i den direkte nærhet av

molekylet som den kovalente forbindelsen skal produseres med. Dette kan for eksempel finne sted gjennom en annen del av forbindelsen som tjener som en spesifikk hemmer av et protein, helst en hemmer av kolesterolabsorpsjon. Etter kontakten mellom forbindelsen og molekylet bestråles det med UV-lys. Strålingen med UV-lys aktiverer den fotolabile gruppen og initierer produksjonen av en kovalent forbindelse til det interagerende molekylet, spesielt til et protein. Passende som fotolabil gruppe er for eksempel diazirin, azido eller karbonylfunksjonelle grupper.

Det er mulig å bruke for stråling en konvensjonell UV-lampe lik den som for eksempel anvendes for å visualisere polynukleotider med interkalerende etidiumbromid eller for å sterilisere laboratorieoverflater, eller en fotokjemisk reaktor som er mulig og skaffe til veie for eksempel fra "The Southern Ultraviolet Company, Hamden, CT". Ødeleggelsen av celler etter stråling med UV-lys ble utført ved å anvende konvensjonelle fremgangsmåter. Eksempler på det er repetert frysing og tining, behandling av cellene med ultralyd, anvendelsene av en fransk presse eller tilsetningen av en detergent og enzymer. Fraksjoneringen av proteinene av cellelysate kan utføres for eksempel ved presipitering med ammoniumsulfat, ved differensial sentrifugering eller ved å bruke kromatografiske teknikker. Kromatografiske teknikker som er passende for dette formål er for eksempel denaturering eller ikke-denaturerende polyakrylamid gelelektroforese i en eller to dimensjoner, høyt trykk flytende kromatografi, ionutbyttekromatografi eller affinitetskromatografi. Disse teknikkene er kjent for fagfolk og behandles i detalj for eksempel i "Current Protocols in Protein Science", John E. Caligan; Ben M. Dunn; Hidde L. Ploegh; David W. Speicher; Paul T. Wingfield; Wiley and Sons; ISBN0-471-11184-8.

Helst så finner deteksjonen av et protein etter en fraksjonering sted ved hjelp av radioaktiv merking av forbindelsen som inneholder en hemmer av intestinal kolesterolabsorpsjon og en fotolabil gruppe. En radioaktiv isotop som kan anvendes for dette formål er for eksempel ^3H eller ^{14}C . En passende deteksjonsmetode er for eksempel deteksjon av proteinet som inneholder en kovalent bundet forbindelse ved hjelp av et filmmateriale anvendt for røntgenfotografering etter at proteinet er blitt introdusert på en polyakrylamid gel ved hjelp av polyakrylamid gelelektroforese. Andre passende deteksjonsmetoder er flytende scintillasjonstelling eller flatsengsskanning.

Biologisk materiale består fortrinnsvis av tarmceller. De intestinale cellene kan tilveiebringes for eksempel ved disseksjon av tarm fra dyr og etterfølgende rensing, enzymatisk ødeleggelse av bindevevet og suspensjon av enkle celler i isotone

bufferløsninger. Intestinalt vev som er passende for tilveiebringelsene av intestinale celler er blant annet de korresponderende delene av dyrene som er igjen etter slakting. Intestinale celler kan også tilveiebringes fra humant tarmvev etter at deler av tarmen er blitt ervervet ved operasjon. De intestinale cellene kan også bestå av intestinale
 5 cellekulturer tilveiebrakt for formålet i oppfinnelsen ved bruk av celledyrkingsteknikker. Deler av intestinale celler kan være organeller fra de intestinale cellene. Organellene er helst membraner av de intestinale cellene. Membraner av de intestinale cellene kan skaffes til veie ved differensial sentrifugering etter ødeleggelse av disse cellene. Deler av cellene er helst også proteinfraksjoner. Tilveiebringelse av
 10 intestinale celler eller deler av intestinale celler er intestinale celler som helst består av celler fra børstekanten til det intestinale vevet hos pattedyrorganismer.

Pattedyrorganismer som disse intestinale cellene skaffes til veie fra inkluderer helst men er ikke begrenset til mennesker, aper, storfe, griser, rotter, mus, kaniner, hamstere og
 15 andre virveldyrarter. Disse cellene kan tilveiebringes ved å lage cellesuspensjoner fra børstekantvevet i tarmen hos slike organismer. Passende tarmmateriale blir for eksempel skaffet til veie ved kirurgiske prosedyrer. Andre kilder kan komme fra deler av dyr som blir igjen etter slakting. Celler fra en tarmcellelinje er likeverdig passende. For å lage passende cellepreparasjoner, så kan tarmvevet utsettes for enzymbehandling
 20 for å frigjøre enkle celler og deretter gjennomgå differensial sentrifugering. De resulterende cellene eller organellene blir deretter tatt opp i passende vandig medium. Disse vandige mediene kan inneholde buffersubstanser, salter, proteiner og i tillegg hjelpemidler.

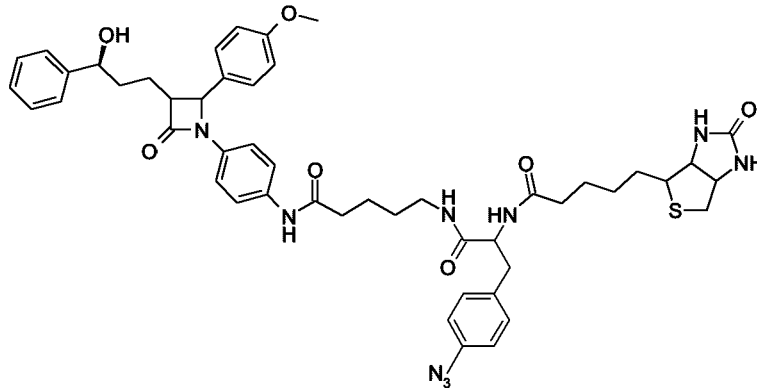
25 Oppfinnelsen vedrører også en fremgangsmåte for å isolere et bindende protein for kolesterolabsorpsjonshemmere som er involvert i intestinal kolesterolabsorpsjon hvor

- a) biologisk materiale blir tilveiebrakt,
- b) det biologiske materialet fra a) blir inkubert med en fotoreaktiv hemmer av
 30 kolesterolopptak som er radioaktivt merket eller som er merket med biotin.
- c) det biologiske materialet fra b) er løselig og celledetruelse blir fjernet,
- d) supernatanten blir utsatt for kromatografiske prosedyrer eller blir tilsatt til streptavidin-agarose,
- e) eluatet blir tilsatt til en SDS-PAGE,
- 35 f) proteiner som vandrer i et størrelsesområde på 140 til 150 kDa blir skåret ut, eluert og muligens refoldet.

Det biologiske materialet blir helst tatt fra tarmvev eller celler fra en intestinal cellekultur eller ideelt børstekantceller fra et menneske, en rotte, en mus eller en kanin.

Hemmeren av kolesterolopptak som er biotinmerket har helst strukturen:

5



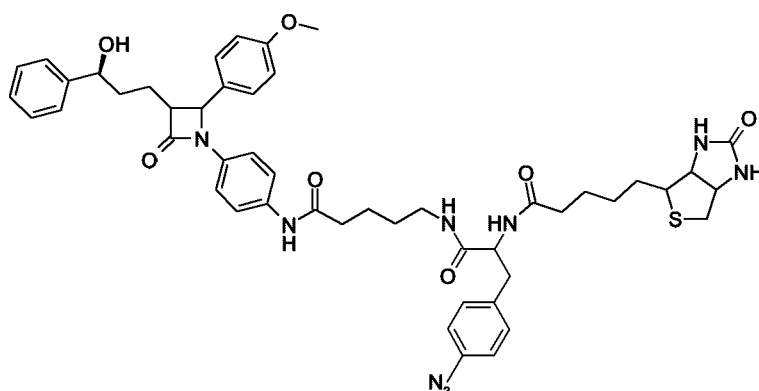
Oppfinnelsen vedrører også et protein med evnen til spesifikt å binde kolesterolabsorberende hemmere som er blitt isolert ved hjelp av en fremgangsmåte i oppfinnelsen som tidligere nevnt. Proteinet har helst en størrelse på 140 til 150 kDa og
10 aller helst en størrelse på 145 kDa. Proteinet er muligens glykosylert.

Molekylvekten til proteinene blir bestemt til et visst område med usikkerhet som er forårsaket av SDS-polyakrylamid gelelektroforesefremgangsmåten som anvendes, men er også kjent for andre korresponderende fremgangsmåter. Variasjonene i
15 molekylvektene er i området opp til $\pm 10\%$. De bestemte verdiene representerer gjennomsnittet av flere eksperimenter. I tilfelle med proteinet med den bestemte molekylvekten på 145 kDa, ble bestemmelsene av molekylvekten i 10 eksperimenter utført uavhengig av hverandre ved hjelp av SDS-polyakrylamid gelelektroforese og resulterte i et gjennomsnitt på 145,3 kDa med et standard avvik på $\pm 7,55$ kDa.

20

Detaljer av passende fremgangsmåter for å sjekke glykosylering kan finnes av fagfolk i "Carbohydrate Biotechnology Protocols, Methods in Biotechnology, 10 (1999) Humana Press, ISBN 0-89603-563-8, red. C. Bucke".

25 Oppfinnelsen vedrører videre et kompleks som er dannet av et protein ifølge oppfinnelsen og en forbindelse som har den følgende strukturen.



Det er videre mulig å fremskaffe en farmasøytisk sammensetning som omfatter et protein ifølge oppfinnelsen og farmasøytiske akseptable forbindelser og/eller hjelpemidler for formulering av et medikament. Slike substanser er vanligvis kjent og beskrevet for eksempel i Remingtons Pharmaceutical Sciences, femte utgave av Mack Publishing Company.

Også en farmasøytisk sammensetning som omfatter et kompleks av et protein i følge oppfinnelsen og en forbindelse som tidligere nevnt så vel som farmasøytisk akseptable forbindelser for formulering av et medikament er mulig og tilveiebringe.

Det er også mulig å anvende et protein ifølge oppfinnelsen for produksjonen av en farmasøytisk sammensetning for behandling av en sykdom som er koblet til forhøyede kolesterolnivåer. Slike sykdommer er for eksempel overvekt, arteriosklerose, høyt blodtrykk, hjertefeil og andre. Et kolesterolnivå på 199 mg/dl er å betrakte som forhøyet.

Videre er det mulig å anvende et kompleks av et protein ifølge oppfinnelsen og en forbindelse som tidligere nevnt for å produsere en farmasøytisk sammensetning for behandling av en sykdom som er koblet til forhøyede kolesterolnivåer.

Oppfinnelsen vedrører også anvendelsen av et protein ifølge oppfinnelsen for å identifisere en forbindelse som hemmer kolesterolgjenopptak hvor

- a) biologisk materiale blir tilveiebrakt som inneholder proteinet ifølge oppfinnelsen,
- b) en forbindelse blir tilveiebrakt,
- c) det biologiske materialet og forbindelsen blir brakt i kontakt,

- d) mengden av kolesterol tatt opp av det biologiske materialet fra c) blir bestemt.
- e) resultatet fra d) blir sammenliknet med resultatene fra et kontroll eksperiment hvori kolesterolopptaket blir bestemt fra biologisk materiale som har det samme slaget og/eller vevsspesifisiteten som det biologiske materialet fra a) men som ikke blir brakt i kontakt med en forbindelse i b),
- f) resultatene fra e) indikerer en forbindelse som hemmer kolesterolgjenopptak når redusert kolesterolopptak fra cellene som er brakt i kontakt med en forbindelse fra b) blir bestemt.

10

Det er også mulig å tilveiebringe et medikament som omfatter en forbindelse som er identifisert ved en slik fremgangsmåte så vel som farmasøytiske akseptable hjelpemidler for behandling av en sykdom som er koplet til forhøyede kolesterolnivåer.

15

Molekylvekten av en slik forbindelse er helst i området fra 100 til 50000 Da og mer ønskelig mellom 100 og 5000 Da. Denne forbindelse kunne være en kolesterolanalog, et protein, et peptid eller en fettsyre inneholdende en forbindelse.

20

Tilveiebringelsen av en forbindelse finner for eksempel sted ved kjemisk syntese.

25

Forbindelsen kan være del av en samling med kjemiske forbindelser lik de som er et resultat fra oppbevaring og katalogiseringen av de kjemiske forbindelsene fra fullstendige synteseprogrammer ("forbindelsesbiblioteker"). Forbindelsen kan i andre tilfeller være produsert ved hjelp av en mikroorganisme, spesielt en bakterie, en sopp eller en dyre- eller planteart (naturlige substanser). I tilfellet med en naturlig substans, så kan tilveiebringingen også finne sted ved isolering fra de passende organismene.

30

Kontakten mellom et protein og en forbindelse finner i de fleste tilfellene sted i vandige løsninger som en viss del av et løsemiddel slik som for eksempel dimetylsulfoksid eller etanol er blitt tilsatt. De vandige løsningene kan også inneholde buffersubstanser, ioner eller stabiliserende tilsetninger slik som proteiner, glyserol eller andre. Spesielt

35

konstante betingelser, for eksempel temperaturen, pH, ionebetingelsene, konsentrasjonen av proteinet eller forbindelsen, eller volumet, kan være fordelaktige for kontakten. For eksempel så det dermed være ønskelig å holde temperaturen konstant ved 37°C i løpet av kontakten. Bestemmelsen av bindingen av forbindelsen til proteinet etter at kontakten har funnet sted, for eksempel ved interaksjon med kolesterol eller kolesterolabsorpsjonshemmere som er radioaktivt merket på en annen måte, ved å anvende erstatning av kolesterolet eller kolesterolabsorpsjonshemmere som et mål for affiniteten av forbindelsen for proteinet.

Eksempler

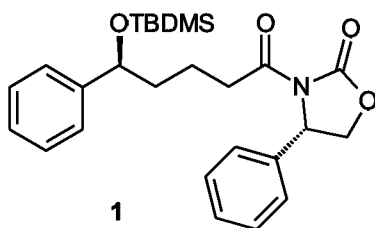
- 5 Syntese av 5-(2-okso-heksahydro-tieno[3,4-d]imidazol-6-yl)-pentansyre[2-(4-azido-fenyl)-1-(4{4-3-(3-hydroksy-3-fenylpropyl)-2-(4-metoksyfenyl)-4-okso-azetidin-1-yl]-fenylkarbamoyl}-butylkarbamoyl)-etyl]amid.

10 Numrene 1 til 14 innen den følgende passasjen refererer seg til det generelle reaksjonsskjema i figur 1.

15 Syntese av den biotinmerkede fotoreaktive kolesterolhemmeren (5-(2-okso-heksahydro-tieno[3,4-d]imidazol-6-yl)-pentansyre[2-(4-azido-fenyl)-1-(4-{4-3-(3-hydroksy-3-fenylpropyl)-2-(4-metoksyfenyl)-4-okso-azetidin-1-yl]-fenylkarbamoyl}-butylkarbamoyl)-etyl]-amid).

20 Numrene 1 til 14 innen den følgende passasjen vedrørende syntesen av nevnte biotinmerkede fotreaktive kolesterolhemmer refererer seg til reaksjonsskjemaet i figur 1 og figur 2.

3-[5-(tert-butyl-dimetyl-silanyloksy)-5-fenyl-pentanoyl]-4-fenyl-oksazolidin-2-on(1)



30 g 3-(3-hydroksy-5-fenyl-pentanoyl)-4-fenyl-oksazolidin-2-on blir løst i 50ml DMF. Etter tilsetning av 14,3 g imidazol og 19 g tert-butyl-dimetylsilylchlorid i 25 ml DMF blir reaksjonen rørt ved romtemperatur inntil alle komponentene er løst (2-4 timer).

25 Reaksjonsløsningen blir fordampet, og etter vann blir tilsatt ble den ekstrahert med eddiksyre etylester. Etter tørking av den organiske fasen ved hjelp av magnesiumsulfat og fordamping blir forbindelse 1 skaffet tilveie: $C_{26}H_{35}NO_4Si$ (453,6) MS (ESI⁺) 476 (M + Na⁺).

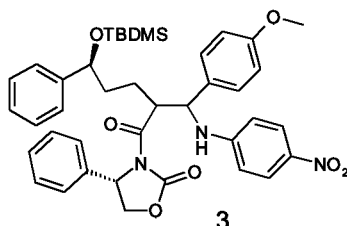
(4-metoksy-benzyliden)-(4-nitro-fenyl)-amin (2).

30

Til 50 g (370 mmol) av anisaldehyd i 160 ml isopropanol blir 51 g (370 mmol) para-nitroanilin tilsatt. Etter 2 timer ved 80°C presipiterte produktet. Reaksjonsblandingen

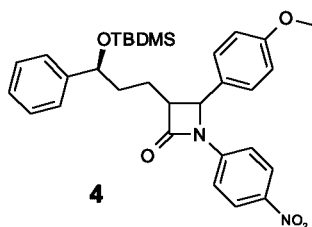
blir nedkjølt til romtemperatur og filtrert. Det gjenværende ble vasket med isopropanol. Etter tørking ble 62,9 g av produkt 2 skaffet til veie (utbytte på 66%) i form av gule krystaller: $C_{14}H_{13}N_2O_3$ (257,27).

- 5 3-{5-(tert-butyl-dimetyl-silanyloksy)-2-[(4-metoksyfenyl)-(4-nitro-fenylamino)-metyl]-5-fenyl-pentanoyl}-4-fenyl-oksazolidin-2-on (3).



- Til 5,4 g (12,0 mmol) av produkt 1 og 6,2 g (24 mmol) av produkt 2 i 135 ml metylenklorid blir 8 ml diisopropyletylamin tilsatt ved 10°C og 4,8 ml trimetylsilylchlorid blir tilsatt dråpevis. Etter 1 time blir 14 ml av en 1 molar løsning av titantetraklorid i metylenklorid tilsatt dråpevis ved -10°C. Det blir rørt 3 timer ved -10°C og videre oppbevart i 12 timer ved -30°C uten røring. Etterpå ble 8 ml eddiksyre og 150 ml av en 7% vandig løsning med vinsyre tilsatt og det ble rørt i videre 2 timer ved romtemperatur. Etter tilsetningen av 50 ml av en 20% vandig løsning av natriumhydrogensulfitt ble det rørt i ytterligere 1 time og ekstrahert med metylenklorid.
- 15 Den organiske fasen blir tørket ved hjelp av magnesiumsulfat, fordampet og renses ved kromatografi på silikagel/etylacetat/heptan = 1/3- > 1/1, 6,3 g (74%) av produkt 3 blir skaffet til veie i form av en lysegul fast forbindelse: $C_{40}H_{47}N_3O_7Si$ (709,92) MS (ESI⁺) 710 (M + H⁺)

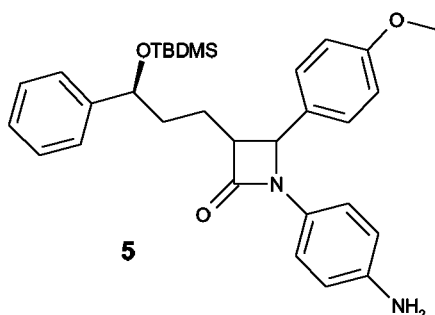
- 20 3-[3-(tert-butyl-dimetyl-silanyloksy)-3-fenylpropyl]-4-(3-metoksyfenyl)-1-(4-nitro-fenyl)-azetid-2-on (4)



- En blanding som omfatter 6,1 g (8,6 mmol) av produkt 3, 7,3 ml bistrimetylsilylacetamid, 0,5 g tetrabutylammoniumfluorid og 100 ml tert-butylmetyler blir omrørt under en argonatmosfære i 10 timer ved romtemperatur. Etter avslutningen av reaksjonen blir 5 ml eddiksyre tilsatt langsomt ved kjøling med is og
- 25

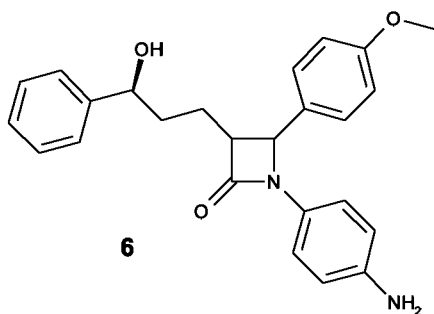
fordampet. Det gjenværende blir separert ved hjelp av kromatografi for silicagel (etylacetat/heptan = 1/2). 3,3 g (70%) av produkt 4 blir skaffet til veie i form av en lys gul forbindelse i fast form: $C_{31}H_{38}N_2O_5Si$ (546,74) MS (ESI^+) 547,3 ($M + H^+$).

- 5 1-(4-amino-fenyl)-3-[3-(tert-butyl-dimetylsilanyloksy)-3-fenylpropyl]-4-(3-metoksyfenyl)-azetidin-2-on (5).



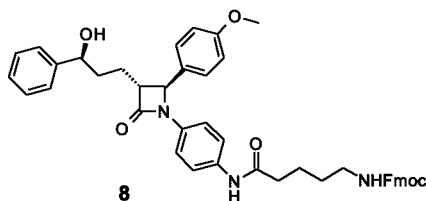
- En reaksjon blir utført med 3,0 g (5,5 mmol) av produkt 4 i 50 ml etylacetat og 1,0 g palladiumtrekull 10% i 2 timer ved 5 bar av en hydrogenatmosfære ved å anvende en autoklave. Reaksjonsløsningen blir filtrert, fordampet og separert ved hjelp av kromatografi på silikagel (metylenklorid/metanol = 10/1). 2,4 g (86%) av produkt 5 blir skaffet til veie i form av en fargeløs forbindels i fast form: $C_{31}H_{40}N_2O_3SDi$ (516,76) MS (ESI^+) 517,4 ($M + H^+$).

1-(4-amino-fenyl)-3-(3-hydroksy-3-fenylpropyl)-4-(3-metoksyfenyl)-azetidin-2-on (6)



- 15 15 ml av 2N vandig saltsyre blir tilsatt til 2,3 g av produkt 5 i 20 ml tetrahydrofuran og omrørt i 2 timer. En vandig løsning av natriumhydrogenkarbonat blir tilsatt i reksjonen og ekstrahert ved etylacetat. Den organiske fasen blir tørket ved hjelp av magnesiumsulfat, fordampet og rensed ved hjelp av kromatografi på silicagel (etylacetat/heptan = 1/1 -> 1/0). 1,1 g av produkt 6 ble skaffet til veie i form av en fargeløs for bindelse i fast form: $C_{25}H_{26}N_2O_3$ (402,50) MS (ESI^+) 403,2 ($M + H^+$).

(4-{4-[3-hydroksy-3-fenylpropyl]-2-(4-metoksyfenyl)-4-okso-azetidin-1-yl]-fenylkarbamoyl}-butyl)-karbamidsyre-9H-fluoren-9-ylmetyler (8).

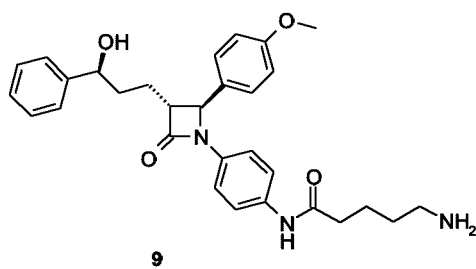


5

0,8 g (2,0 mmol) av produkt 6 og 1,35 g (4,0 mmol) 5-(Fmoc-amino)-valeriansyre 7 (Fluka) blir løst i 15 ml DMF (dimetylformamid). Trinnvis blir det følgende tilsatt: 4,8 g av TOTU (Fluka), 1,6 g av Oxime (hydroksyimino-cyanoucetsyre-etyler; Fluka) og 5,5 ml NEM (4-etyl-morfolin). Etter 1 time ved romtemperatur ble reaksjonen fortynnet med 100 ml etylacetat og vasket i 3 timer med vann. Den organiske fasen blir tørket ved magnesiumsulfat, filtrert og fordampet. Residiene blir rensed ved hjelp av "flash"-kromatografi (etylacetat/n-heptan 2:1). 0,58 g (41%) av produkt 8 blir skaffet til veie i form av en amorf fast forbindelse: $C_{45}H_{45}N_3O_6$ (723,8) MS (ESI⁺) 724,4 (M + H⁺).

15

5-amino-pentansyre-{4-[3-(3-hydroksy-3-fenylpropyl)-2-(4-metoksyfenyl)-4-okso-azetidin-1-yl]-fenyl}-amid (9).

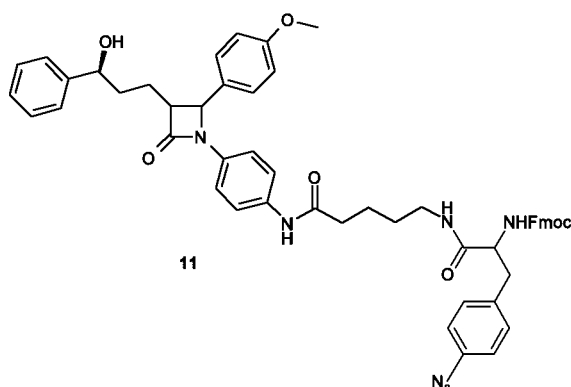


570 mg (0,78 mmol) av produkt 8 og 0,8 ml av dietylamin ble løst i 5 ml DMF (dietylformamid). Den blir fordampet etter 1 time ved romtemperatur. Det gjenværende rensede "flash"-kromatografi (metylenklorid/metanol/kons. ammoniakk 30:10:3) 220 mg (56%) av produkt 9 blir skaffet til veie i form av en amorf fast forbindelse: $C_{30}H_{35}N_3O_4$ (501,63) MS (ESI⁺) 502,3 (M + H⁺).

25

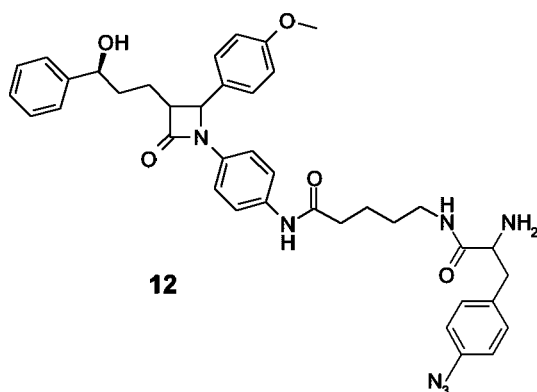
[2-(4-azidofenyl)-1-(4{4-[3-(3-hydroksy-3-fenylpropyl)-2-(4-metoksyfenyl)-4-okso-azetidin-1-yl]-fenykarbamoyl}-butylkarbamoyl)-etyl]-karbamonsyre-9H-fluoren-9-ylmetyler (11).

17



200 mg (0,40 mmol) av produkt 9 og 340 mg (0,79 mmol) av Fmoc-p-azido-Phe-OH 10 (Bachem) blir løst i 4 ml DMF (dimetylformamid) og reagerte ifølge produksjonen av produkt 8. 300 mg (82%) av produkt 11 blir skaffet til veie i form av en amorf fast
5 forbindelse: $C_{54}H_{53}N_7O_7$ (912,7) MS (ESI⁺) 912,5 (M + H⁺).

5-[2-amino-3-(4-azidofenyl)-propionylaino]-pentansyre {4-[3-(3-hydroksy-3-fenylpropyl)-2-(4-metoksyfenyl)-4-okso-azetidin-1-yl]-fenyl}-amid (12)



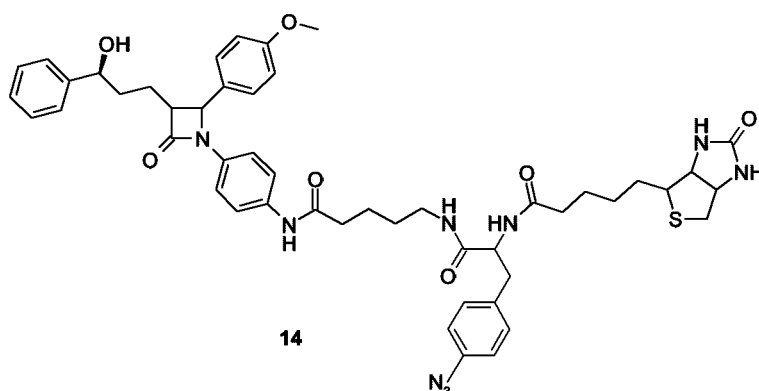
10

300 mg (0,33 mmol) av produktet 11 og 0,8 ml av dietylamin ble løst i 4 ml DMF (dimetylformamid) og reagerte ifølge produksjonen av forbindelse 9. 42 mg (19%) av forbindelse 12 blir skaffet til veie i formen av en amorf fast forbindelse: $C_{39}H_{43}N_7O_5$ (689,82) MS (ESI⁺) 690,3 (M + H⁺).

15

5-(2-okso-heksahydrotieno[3,4-d]imidazol-6-yl)-pentansyre-[2-(4-azidofenyl)-1-(4-{4-[3-(3-hydroksy-3-fenylpropyl)-2-(4-metoksyfenyl)-4-okso-azetidin-1-yl]-fenylkarbamoyl}-butylkarbamoyl)-etyl]-amid (14).

18



40 mg (0,058 mmol) av forbindelse 12 og 60 mg av D-biotinyl-N-hydroksysuccinimid 13 (Bachem) blir løst i 0,5 ml DMF (dimetylformamid). Den ble fordampet etter 1 time ved romtemperatur. Det gjenværende blir rensed ved "flash"-kromatografi
 5 (metylenklorid/metanol/kons. ammoniakk 30:5:1). 29 mg (55%) av forbindelse 14 blir skaffet til veie i form av en amorf fast forbindelse: $C_{49}H_{57}N_9O_7S$ (912,12) MS (ESI⁺ 916,6 (M + H⁺)).

Fotoaffinitetsmerking og bindingsstudier:

10

Vesikler fra børstekant-vev i tynntarmen hos kaniner ble isolert ved hjelp av fremgangsmåter som er kjent for fagfolk (Kramer et al. J. Biol. Chem. 268, 18035-18046 (1993)). Fotoaffinitetsmerkingen ved å anvende en radioaktiv merket forbindelse i formelen 1 a), eller formel 1 b), eller, formel 1 c), eller formel 1 d), eller formel 1 e), i
 15 oppfinnelsen ble utført i en fotokjemisk reaktor av Rayonet RPR-100-typen (tilgjengelig fra "The Suthern Ultraviolet Company, Hamden, CT").børstekant-membranvesiklene derfra (100 til 200 µg protein) ble inkubert med en av forbindelsene i et volum på 200 µl i 10 mM Tris/Hepesbuffer (pH7,4), 100 mM NaCl, 100 mM mannitol ved 20°C i mørke i 5 minutter. I stedet for børstekant-vesiklene er det også mulig å anvende
 20 organeller, spesielt membranene fra dem. Utsagnene heretter anvendes tilsvarende til dette. Inkubasjonen i mørke ble etterfulgt av stråling med UV-lys på 254 nm i 20 sekunder eller 60 sekunder. Børstekant-vesiklene ble deretter vasket to ganger med det nevnte buffer. Proteinene ble presipitert ved konvensjonelle teknikker slik som for eksempel tilsetning av etanol, tilsetning av et salt eller detergent, varming, repetert
 25 frysing og tining, eller annen passende fremgangsmåte kjent for fagfolk, og fraksjonert ve SDS-polyakrylamid gelelektroforese. De radioaktivt merkede proteinene var detekterbare ved hjelp av LSC eller fluorografi. Affiniteten til de merkede proteinene var børstekant-vevet for forbindelsene var i området fra 1 til 100 nM.

30 Dyr og membranpreparasjoner:

Hannlig New Zealand hvite kaniner som veide 4-5 kg (Harlem Winkelmann, Borchem, Tyskland) ble holdt på "Altronin" standard diett C 2023 ("Altronin" Lage, Tyskland) etter behag. Børstekant-membranvesikler fra magen, duodenum, jejunum, ileum, cecum, colon, rektum og nyre ble laget ved Mg^{2+} -presipiteringsfremgangsmåten. Rottelever mikrosomer og rotteadipocytmembraner ble laget ifølge standard teknikker.

Hemming av kolesterolabsorpsjon:

Intestinal kolesterolabsorpsjon ble bestemt ved hjelp av en modifikasjon av Zilversmit/Hughes-fremgangsmåten. Hannlige NMRI-mus (Charles River Deutschland GmbH, Salzfild, Tyskland) holdt på regulær mat ("Altronin", Lage, Tyskland) ble sultet i 12 timer. 0,5 ml av en løsning på 0,5% metylcellulose/5% Solutol (BASF, Ludwigshafen, Tyskland) som verktøy med eller uten teten 3 mg av den respektive kolesterolabsorpsjonshemmeren ble brukt ved "gavage" til hvert dyr etterfulgt av 0,25 ml av "Intralipid" (Pharmacia & Upjohn, Erlangen, Tyskland) løsning som inneholdt 0,24 μCi [^{14}C]kolesterol og 0,25 μCi [^3H]sitosterol. Dyrene (fem mus per gruppe) ble holdt i metabolismebur og avføring ble samlet. Etter 24 timer ble dyrene avlivet og radioaktiviteten i avføringen og leveren ble bestemt ved forbrenningsanalyse.

20

Løsning av det 145 kDa-bindende proteinet for kolesterolabsorpsjonshemmere:

Kanintynntarmbørstekant-membranvesikler ble vasket flere ganger i 10 mM Tris/Hepes-buffer (pH 7,4)/300 mM mannitol etter fotoaffinitetsmerking. Den resulterende pelleten ble løst ved en proteinkonsentrasjon på 1 mg/ml i 60 minutter ved 4°C i 10 mM Tris/Hepes-buffer (pH 7,4)/75 mM KCl/5 mM $MgCl_2$ /1 nM EGTA/1 mM DTT/1% (w/v) n-oktylglukosid/1% Triton X-100/1% (w/v) ("løsningsbuffer"). Alternativt så kunne membranproteinene løses ved en proteinkonsentrasjon på 10 mg/ml med 1% SDS i 10 mM Tris/Hepes-buffer (pH 7,4) ved 4°C i 10 minutter etterfulgt av en 1:10 fortykning med 10 mM Tris/Hepes-buffer (pH 7,4)/1% n-oktylglukosid. Etter sentrifugering ble supernatantene som inneholdt det løste membranproteinet blandet og fortennet med de passende bufferne for kromatografi, og inneholdt 1% n-oktylglukosid som detergent.

Rensing av det radioaktivt merkede 145 kDa-bindende proteinet for kolesterolabsorpsjonshemmere etter fotoaffinitetsmerking med fotoreaktiv 2-azetidinon C-1:

Fotoaffinitetsmerking

8 prøver med kanin ilealebørstekant-membranvesikler (250 µg protein) ble inkubert
5 med 66 nM (0,3 µCi) av [³H]C-1 i 10 mM Tris/Hepes-buffer (pH 7,4)/100 mM
NaCl/100 mM mannitol i 30 minutter ved 20°C i mørke. Etter stråling i 30 sekunder ved
254 nm i en Rayonet RPR 100 fotokjemisk reaktor utstyrt med 4 RPR 2537 A lamper
(The Southern Ultraviolet Company, Hamden, CT, USA) så ble prøvene samlet og etter
sentrifugering så ble membranvesiklene resuspendert i 2 ml 10 mM Trs/Hepes-buffer
10 (pH 7,4)/300 mM mannitol og sentrifugert etter 20 minutter ved 20°C. Denne
prosedyren ble repetert tre ganger. Den resulterende pelleten ble løst med 2 ml
"løsningsbuffer". Etter sentrifugering ble en 40 µl alikvot med supernatant fjernet og
analysert på SDS PAGE og deretter skåret ut fra gelen for å analysere inkorporering av
radioaktivitet inn i membranproteinene.

15

Hvetekim lektin affinitetskromatografi

Supernatanten som inneholdt løselig membranproteiner ble tilsatt til 0,5 ml hvetekim
lektin agarosegel. Etter 30 minutter ved 20°C ble kulene samlet ved sentrifugering og
20 vasket 3 ganger med 2 ml av 10 mM Tris/Hepes-buffer (pH 7,4)/100 nM NaCl/100 mM
mannitol/1 % (v/v) n-oktylglykosid. Absorberte proteiner ble eluert med 4 deler 2 ml av
10 nM Tris/Hepes-buffer (pH 7,4)/100 mM NaCl/100 mM mannitol/300 mM N-acetyl-
D-glukoseamin; i alle eluatene ble aktivitetene av aminopeptidase N og sukrase målt og
ra 100 µl alikvoter av hver fraksjon ble protein presipitert og analyser ved hjelp av SDS-
25 PAGE.

Hydroksylapatitt kromatografi

N-acetylglykoseamineluatene fra hvetekim lektin kromatografien ble fortynnet 10
30 ganger med mM natriumfosfatbuffer (pH 7,4)/1% (v/v) n-oktylglykosid og applisert på
en hydroksylapatittkolonne (10 cm høy, 1 cm diameter) ekvilibert med 10 mM
natriumfosfatbuffer (pH 7,4)/1% (v/v) n-oktylglykosid ved en hastighet konstant på
0,25 ml/min og samling av 1 ml fraksjoner. Deretter ble proteinene eluert som følger: 10
ml 10 mM natriumfosfatbuffr (pH 7,4)/1% (v/v) n-oksylglykosid etterfulgt av de
35 følgende fosfatgradientene: 15 ml med 10 til 250 mM, 15 ml med 250 til 700 mM og
10 ml med 700 til 1000 mM fosfat. I hver fraksjon ble aktiviteten av aminopeptidase N
og sukrase og radioaktivitet bestemt. For hver fraksjon ble 100 µl fjernet og protein ble

presipitert etterfulgt av SDS-PAGE med konsekvent bestemmelse av distribusjonen av radioaktivt merkede proteiner ved å skjære gelene i 2 mm deler.

Preparativ SDS gelelektroforese

5

Fraksjonene som inneholdt det radioaktivt merkede 145 kDa-proteinet ble samlet og proteinet ble presipitert med kloroform/metanol. Etter oppløsning i SDS-prøvebuffer (62,5 mM Tris/HCl (pH 6,8) 2% SDS/5%/2-merkaptoetanol/10% glyserol/0,001% bromfenolblått ble prøven sentrifugert og den klare supernatanten ble applisert på separasjonsgelen till en preparativ 7,5% SDS-gel (diameter 28 mm; lengde av separasjonsgel: 5 cm). Elektroforese ble utført ved 500 V (40 mA, 6W) og eluatet ble fraksjonert til 1,5 ml fraksjoner. 150 µl-alikvoter av hver fraksjon ble anvendt for analyser av proteinsammensetning ved hjelp av SDS-PAGE.

15 Rensing av det 145 kDa-bindende proteinet for kolesterolabsorpsjonshemmere ved hjelp av streptavidinbiotin affinitetskromatografi: 10 prøver av kaninilealbørstekant-membranvesikler (200 µg protein) ble inkubert med 200 µM biotinmerket kolesterolhemmer C-4 i 10 mM Tris/Hepes-buffer (pH 7,4)/100 mM NaCl/100 mM mannitol i 30 minutter i mørke ved 20°C etterfulgt av stråling ved 254 nm i 30 sekunder i en Rayonet RPR-100 fotokjemisk reaktor utstyrt med 4 RPR 2537 Å-lamper. Etter samling ble vesiklene vasket 3 ganger med 2 ml Tris/Hepes-buffer (pH 7,4)/300 mM mannitol. Sluttpelleten ble suspendert i 2 ml "løsningsbuffer" i 1 time ved 4°C. Etter sentrifugering ble den klare supernatanten blandet med 0,5 ml streptavidin-agarosekuler og holdt under røring i 4°C i 2 timer. Etter sentrifugering ble kulene inkubert med 2 ml 25 10 mM Tris/Hepes-buffer (pH 7,4)/300 mM mannitol/ 1 % n-oktylglukosid/4 mM PMSF/4 mM iodacetamid/4 mM EDTA/i 10 minutter ved 4°C etterfulgt av sentrifugering. Etter å ha repetert denne prosedyre to ganger, ble proteinene eluert fra streptavidin-agarosekulene med 3 deler à 2 ml av den ovenfor nevnte bufferen som inneholdt 5 mM biotin. Fra alle eluatene ble alikvoter fjernet for bestemmelsen av den 30 enzymatiske aktiviteten av aminopeptidase N og sukrase og for analyse ved SDS-PAGE. For endelig rensing ble biotineluatene som inneholdt det kovalent modifiserte 145 kDa bindende proteinet for kolesterolabsorpsjonshemmere oppnådd ved preparativ SDS-elektroforese som beskrevet over.

35 Enzymatisk fragmentering:

Det 145 kDa-proteinet isolert ved begge prosedyrene ble presipitert med klorofor/metanol og gjenløst i 3 µl Tris/HCl-buffer (pH 6,8)/6,2% SDS/0,5% 2-merkaptoetanol/0,0005% bromfenolblått. Enzymatisk fragmentering ble utført ved å tilsette 5 µl av en fersklaget løsning av chymotrypsin (35 ng/ml) i den ovenfor nevnte bufferen og inkubasjon ved 30°C i 1 time. Reaksjonen ble stoppet ved å tilsette en SDS-prøvebuffer som inneholdt 4 mM EDTA/4 mM PMSF/4 mM iodacetamid og oppvarming i 5 minutter til 95°C etterfulgt av SDS-PAGE på Tris/Tricine-geler.

SDS Gelelektroforese

10

SDS-PAGE ble utført i vertikale plategeler (20 x 17 x 0,15 cm) ved å anvende et elektroforesesystem LE 2/4 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Tyskland) med gelkonsentrasjoner på 7-10,5 % med et forhold på 97,2% akrylamid og 2,8% N,N-metylenbisakrylamid eller for analytiske formål i på forhånd støpte NOVEX-geler (4-12%, 12% eller 15%, Invitrogen (Groningen, Nederland) ved å anvende en elektroforese system Xcelle II fra Novex. Elektroforetisk separasjon av peptidfragmenter ble utført i Tris/Tricin-geler (16,5%) ifølge Schägge & Jagow. Etter elektroforese ble gelene fiksert til 12,5% trikloreddiksyre etterfulgt av farging med Serva Blue R 250. For bestemmelse av distribusjonen av radioaktivitet, ble individuelle gelfelter kuttet til 2 mm deler, protein ble hydrolysert med 250 µl av vevesløser Biolute S og flytende scintillasjonstilling ved å anvende 4 ml scintillator Quickszint 501.

20

Oppløselighet av 1det 145 kDa-bindende proteinet for kolesterol absorpsjonshemmere:

25

En nødvendighet for rensing av det 145 kDa-bindende proteinet for kolesterolabsorpsjonshemmere er en tilfredsstillende løsning av dette integralmembranproteinet i en ikke-denaturert tilstand. Løsningseksperimenter med en rekke detergenter viste at med SDS så kunne rundt 80-90% og med Zwittergent 9-13 så kunne ca. 60% av det fotomerkede proteinet løses mens med CHAPS, NP-40, diitonin og Triton-X-114 så kunne ingen signifikant løsning oppnås. 1%-løsning av ikkeioniske detergenter som Triton-X-100, n-oktylglukosid, decylmaltosid, dodecylmaltosid eller klolesterolhemisuksinat/dodecylmaltosid i 10 mM Tris/Hepes-buffer (pH 7,)/300 mM mannitol førte bare til delvis løsning av det 145 kDa-proteinet og dets rensing ble dermed hemmet. To protokoller ble til slutt funnet å gi 60-80% løsning av det 145 kDa-proteinet som muliggjorde en rensingsprosedyre: a) løsning med 1% SDS med etterfølgende fortykning med 1% n-oktylglukosid til en startkonsentrasjon på 0,1% SDS/1% n-oktylglukosid. b) løsning med 10 mM Tris/Hepes-buffer (pH 7,4)/75 mM

35

KCl/5 mM MgCl₂/1 mM EGTA/1 mM DTT / 1% Triton X-100/1% n-oktylglykosid ("løsningsbuffer"). Løsningsprosedyren tillot en vellykket fraksjonering av børstekant-membranproteiner ved kromatografisk prosedyre.

5 Design av biotinmerket 2-azetidion-fotoaffinitetsprobe:

For en en-trinns rensing av målproteinene for kolesterolabsorpsjonshemmerne så har vi koplet den biotininnholdende fotolabile gruppen N-(biotinyl)-4-azidofenylalanin til et avstandsstykke til paraposisjonen av N-fenyl eller benzylaminoringen til 2-azetidion
 10 kolesterolabsorberende hemmere. Strukturaktivitetslekskap har vist at denne posisjonen tillater betydelig kjemisk modifikasjon som opprettholder in vivo potensialet for å hemme intestinal kolesterolabsorpsjon. Etter bruk av den biotinmerkede fotoaffinitetsmerke C-4 på NMRI-mus så ble intestinal kolesterolabsorpsjon doseavhengig hemmet, noe som indikerer en biologisk effektivitet av den biotinmerkede fotolabile
 15 kolesterolabsorberende hemmer, en nødvendighet for å identifisere proteinene eller proteinene som er involvert i intestinal kolesterolabsorpsjon av denne probe. Fotoaffinitetsmerking av kanin tynntarm BBMV med azidobenzoylderivatet [³H]C-1 i nærværet av økende konsentrasjoner av den biotinmerkede kolesterolhemmeren C-4 resulterte i en konsentrasjonsavhengig nedgang i graden av merking av det 145 kDa-
 20 proteinet noe som indikerer en spesifikk interaksjon mellom C-4 og det 145 kDa-bindende proteinet for kolesterolabsorpsjonens hemmere i børstekant-membranen til tynntarmenterocytter.

Rensing av det 145 kDa-bindende proteinet fotomerket med den tritium-merkede 2-
 25 azetidion kolesterolabsorpsjonhemmer C-1:

Det fotomerkede 145 kDa-bindende proteinet er lokalisert i et molekylvektsområde hvor veldig tilstedeværende membranproteiner i børstekant-membranene som sukrase/siomaltasekomplekset eller aminopeptidases N vandrer på SDS-geler og gjør
 30 derfor en fullstendig separasjon fra disse proteinene obligatorisk for sekvensbestemmelse. Den biokjemiske undersøkelsen identifiserte det 145 kDa-proteinene som et glykosylert integrert membranprotein med et skift på molekylær masse fra 145 kDa til 110 kDa ved deglykosylering med N-glykanase. We undersøkte derfor forskjellige lektiner som potensielle ligander for affinitetskromatografi. Med hvetekim
 35 lektinagarose ble en fullstendig retardasjon av det fotomerkede 145 kDa-proteinene oppnådd mens 70 til 80% av den enzymatiske aktiviteten til sukrase og aminopeptidase N ble eluert. Med N-acetylglykosamin kunne hele mengden av det radiomerkede 145

kDa-proteinet elueres sammen med 30-50% av aminopeptidase N og sukraseaktivitet. Totalt så ble en 4-5 ganger anrikning av det 145 kDa-bindende proteinet for kolesterolabsorpsjonshemmere oppnådd. For en videre rensing ble en rekke forskjellige prosedyrer evaluert. Ioneutbyttekromatografi på Mono Q eller Mono S kolonner førte til fullstendig separasjon fra sukrase/isomaltase men bare delvis fra aminopeptidase N mens ingen klar separasjon kunne oppnås med metallgelaterende kromatografi. Med 5 hydroksylapatitt kromatografi kunne en sterk anrikning av det 145 kDa-proteinet og separasjon fra sukrase og aminopeptidase N oppnås. En optimalisert fosfatgradientprofil førte til en nesten fullstendig separasjon av det 145 kDa-proteinet fra andre 10 membranproteiner; Det 145 kDa-proteinet ble eluert ved høye fosfatkonsentrasjoner og var fri for signifikante enzymatiske aktiviteter fra sukrase eller aminopeptidase N. Sluttrensning ble oppnådd ved preparativ SDS-PAGE av eluatene fra hydroksylapatittkromatografi. Den estimerte mengden av rent 145 kDa-proteinet var 1 – 3% av materialet som ble applisert på hydroksylapatittkolonnen noe som indikerer at en 15 anrikningsfaktor $> 150 < 500$ -ganger med hensyn til børstekant-membranen og 2500-10000 ganger med hensyn til enterocyt totalprotein ble oppnådd.

Rensing av det 145 kDa-bindende proteient for kolesterolabsorpsjonshemmere ved streptavidinbiotin affinitetskromatograf etter fotoaffinitetsmerking med en biotinmerket 20 fotolabil kolesterolabsorpsjonshemmer.

Kanin tynntarm BBMV ble inkubert med 200 μM av C-4 og krysskobling ble oppnådd ved ultrafiolett stråling ved 254 nm. Etter løsning ble de kovalente modifiserte proteinene som inneholdt de biotinmerkede 2-azetidion kolesterolabsorpsjonshemmerne ekstrahert med streptavidinkuler. Etter kraftig vasking ble bunnede proteiner eluert med 10 mM løsning av biotin og analysert ved SDS-PAGE. Hovedsakelig så ble et protein med M_r 145 kDa holdt tilbake av streptavidinkulene mens ingen proteiner ble detektert ved ultrafiolett stråling ble utelatt noe som indikerer at 145 kDa-protein er det primære bindingsproteient for den biotinmerkede fotolabile kolesterolabsorpsjonshemmeren C-4. Biotinekstraktene fra streptavidinkulene inneholdt ikke detekterbare enzymatiske aktiviteter av sukrase/isomaltase eller aminopeptidase N noe som indikerer at det eluerte 145 kDa-proteinet antakelig representerer en enkel proteindel modifisert ved kovalent binding av den biotinmerkede kolesterolabsorpsjonshemmeren. Nærvær av 200 μM av andre kolesterolabsorpsjonshemmere som ezetimib under fotomerkingen med C-4 reduserte mengden av 145 kDa-protein som var mulig å ekstrahere med 35 streptavidinkuler og som indikerer en direkte konkurranse mellom kolesterolabsorpsjonshemmere med C-4 for identiske bindingssteder; i motsetning til dette så

influerte ikke substrater for andre intestinale næringstransportører for gallesyrer, fettsyrer, glukose, oligopeptider eller aminosyrer mengden ekstraherbart 145 kDa-protein. Når disse merkingeksperimentene ble utført med cellemembraner fra forskjellige organer så viste det at bare ved merking av BBMV fra kanin tynntarm –
 5 duodenum, jejunom og ileum -, så kunne et 145 kDa-protein ekstraheres med etter merking av BBMV fra mage, cecum, colon, rectum, nyre, lever eller adipocytter som ble ingen 145 kDa-protein holdt igjen av streptavidinkuler. Derfor kunne det 145 kDa-bindende proteinet bare renses fra de anatomiske stedene hvor intestinal
 10 kolesterolabsorpsjon finner sted. Duodenum, jejunum og ileum. Det 145 kDa-protein som er renses med hvetekil lektin- og hydroksylapatitt kromatografi og ved streptavidin-biotinaffinitetskromatografi kan ikke skilles på SDS-geler. Etter enzymatisk fragmentering med chymotrypsin fikk man et nesten identisk peptidmønster med en rekke peptider i det molekylære masseområde på 4-35 kDa noe som indiker at de 145-proteinene som var renses med begge tilnæringsmåtene er identiske og inneholder
 15 hovedsakelig om ikke bare utelukkende en proteindel.

Fig. 1: Del 1 av reaksjonsskjema for syntese av 5-(2-okso-heksahydro-tieno[3,4-d]imidazol-6-yl)-pentansyre[2-(4-azido-fenyl)-1-(4{4-3-(3-hydroksey-3-fenylpropyl)-2-(4-metoksyfenyl)-4-okso-azetidin-1-yl]-fenylkarbamoyl}-butylkarbamoyl)-etyl]amid
 20 (14).

Fig. 1: Del 2 av reaksjonsskjemaet for syntese av 5-(2-okso-heksahydro-tieno[3,4-d]imidazol-6-yl)-pentansyre[2-(4-azido-fenyl)-1-(4{4-3-(3-hydroksey-3-fenylpropyl)-2-(4-metoksyfenyl)-4-okso-azetidin-1-yl]-fenylkarbamoyl}-butylkarbamoyl)-etyl]amid
 25 (14).

P a t e n t k r a v

1.

Fremgangsmåte for å isolere et glykosylert protein med en størrelse på 145 kDa

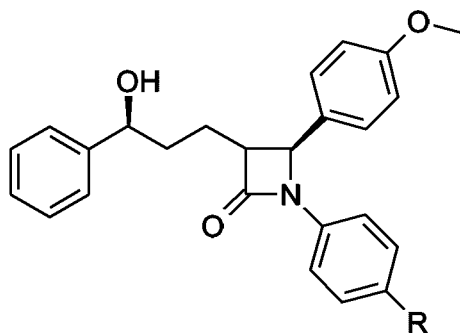
5 +/- 7,55 kDa som bestemt ved SDS polyakrylamid gelelektroforese,

k a r a k t e r i s e r t v e d a t

- a) børstekantvev fra tynntarmen blir tilveiebrakt,
- b) børstekantvevet fra a) blir inkubert med en fotoreaktiv 2-azetidinon forbindelse
10 som er radioaktivt merket,
- c) det biologiske materialet er løselig og celledbris blir fjernet
- d) supernatanten blir tilsatt til en innretning som innehar hvetekimlektinagarose,
- e) eluatet fra hvetekimlektinagarosen fra d) anvendes på en
hydroksylapatittkolonne,
- 15 f) de radioaktivt merkede fraksjonene fra e) settes på en preparativ SDS-PAGE,
- g) de radioaktivt merkede fraksjonene blir samlet og muligens presipitert, hvori den
fotoreaktive 2 azetidinone forbindelsen har den følgende struktur av formel I:

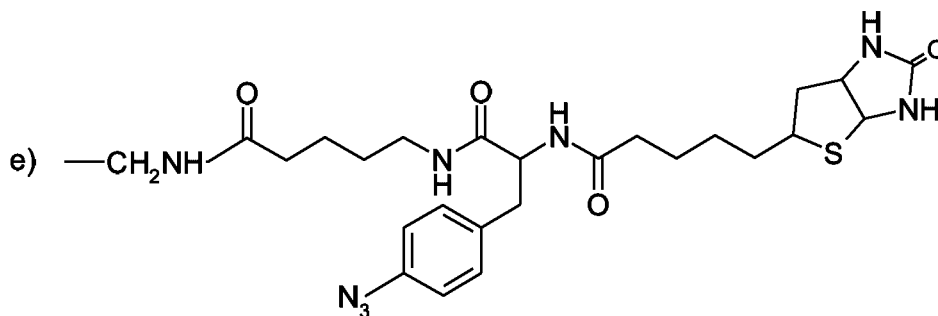
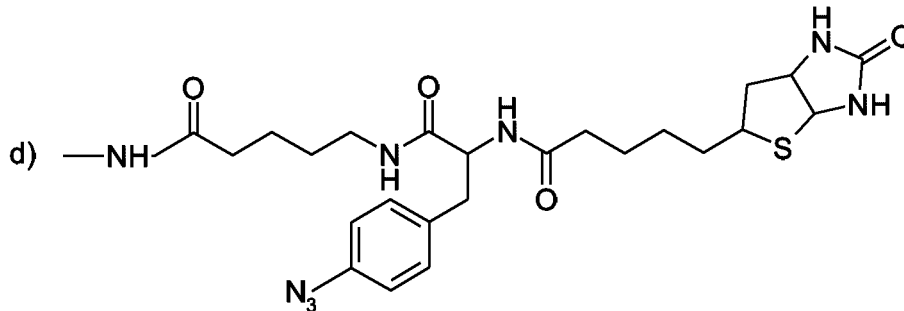
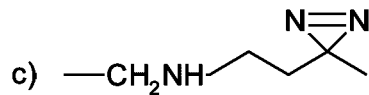
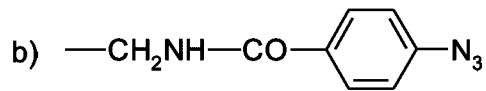
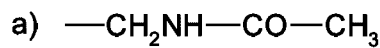
Formel 1

20



hvor R skal velges fra en av de følgende gruppene a) til e):

27



2.

- 5 Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d a t
børstekantvevet stammer fra enten et menneske, en rotte, en mus eller en kanin.

3.

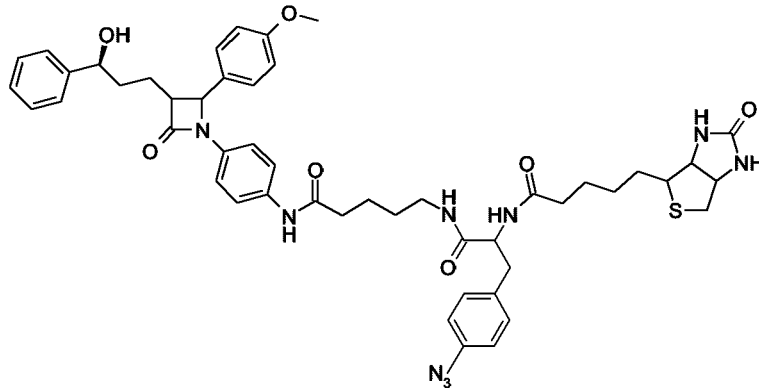
- 10 Fremgangsmåte for å isolere et glykosylert kolesterolbindende protein med en størrelse
på 145 kDa +/- 7,55 kDa som bestemt ved SDS polyakrylamid gelelektroforese,
k a r a k t e r i s e r t v e d a t

- 15 a) børstekantvev fra tynntarmen blir tilveiebrakt,
b) børstekantvevet fra a) blir inkubert med en fotoreaktiv 2-
azetidionforbindelse som er biotinmerket,
c) det biologiske materialet fra b) blir løst og celledbris blir fjernet,
d) supernatanten blir tilsatt på streptavidin-agarose,
e) eluatet blir tilsatt på en SDS-PAGE,

- f) proteinene som kjører i et område fra 145 +/- 7,55 kDa blir skåret ut, eluert og muligens refoldet,

hvor den fotoreaktive 2-azetidion forbindelsen som en biotinmerket har følgende struktur:

5



4.

Fremgangsmåte ifølge krav 3, k a r a k t e r i s e r t v e d a t børstekantvevet er fra enten et menneske, en rotte, en mus eller kanin.

10

5.

Sammensetning som omfatter et glykosylert protein med evnen til spesifikt å binde kolesterolabsorpsjonshemmere, k a r a k t e r i s e r t v e d a t proteinet er blitt isolert ved en fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 4.

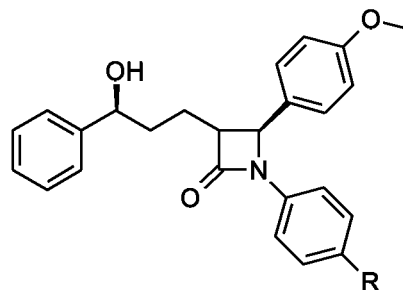
15

6.

Sammensetningen i følge krav 5, k a r a k t e r i s e r t v e d a t proteinet danner kompleks til en forbindelse med formelen I:

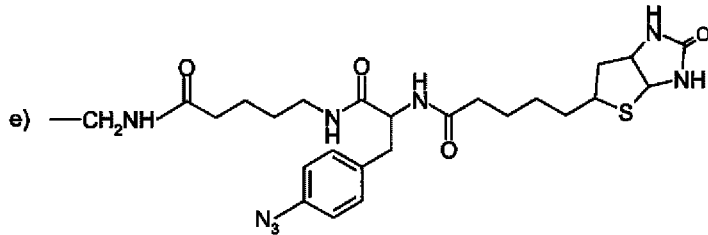
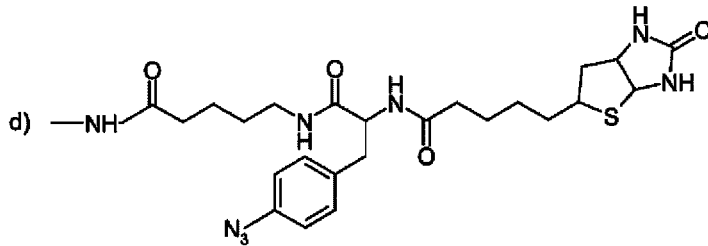
20

Formel I



hvor R skal velges fra en av de følgende gruppene d) og e):

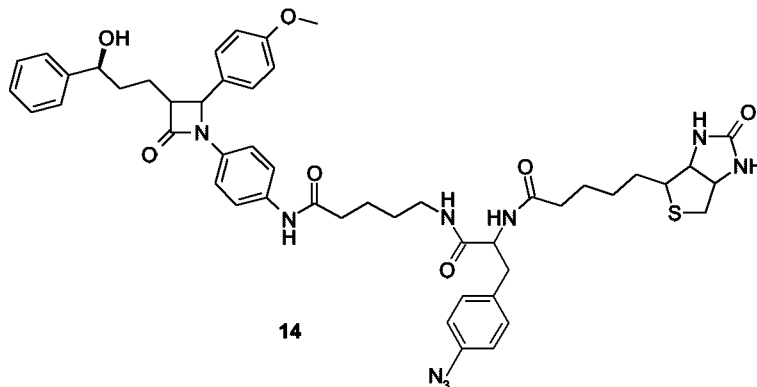
29



7.

Sammensetningen i følge krav 5, k a r a k t e r i s e r t v e d at proteinet danner kompleks til en forbindelse som har strukturen:

5



8.

Anvendelse av sammensetningen i følge krav 5 for å identifisere en forbindelse som hemmer kolesterolgjenopptak hvor

10

a) biologisk materiale blir tilveiebrakt som inneholder proteinet som definert i krav 5,

b) en forbindelse blir tilveiebrakt,

c) det biologiske materiale fra a) og forbindelsen fra b) blir brakt i kontakt med hverandre,

15

d) mengde av kolesterol tatt opp ved det biologiske materialet fra c) blir bestemt,

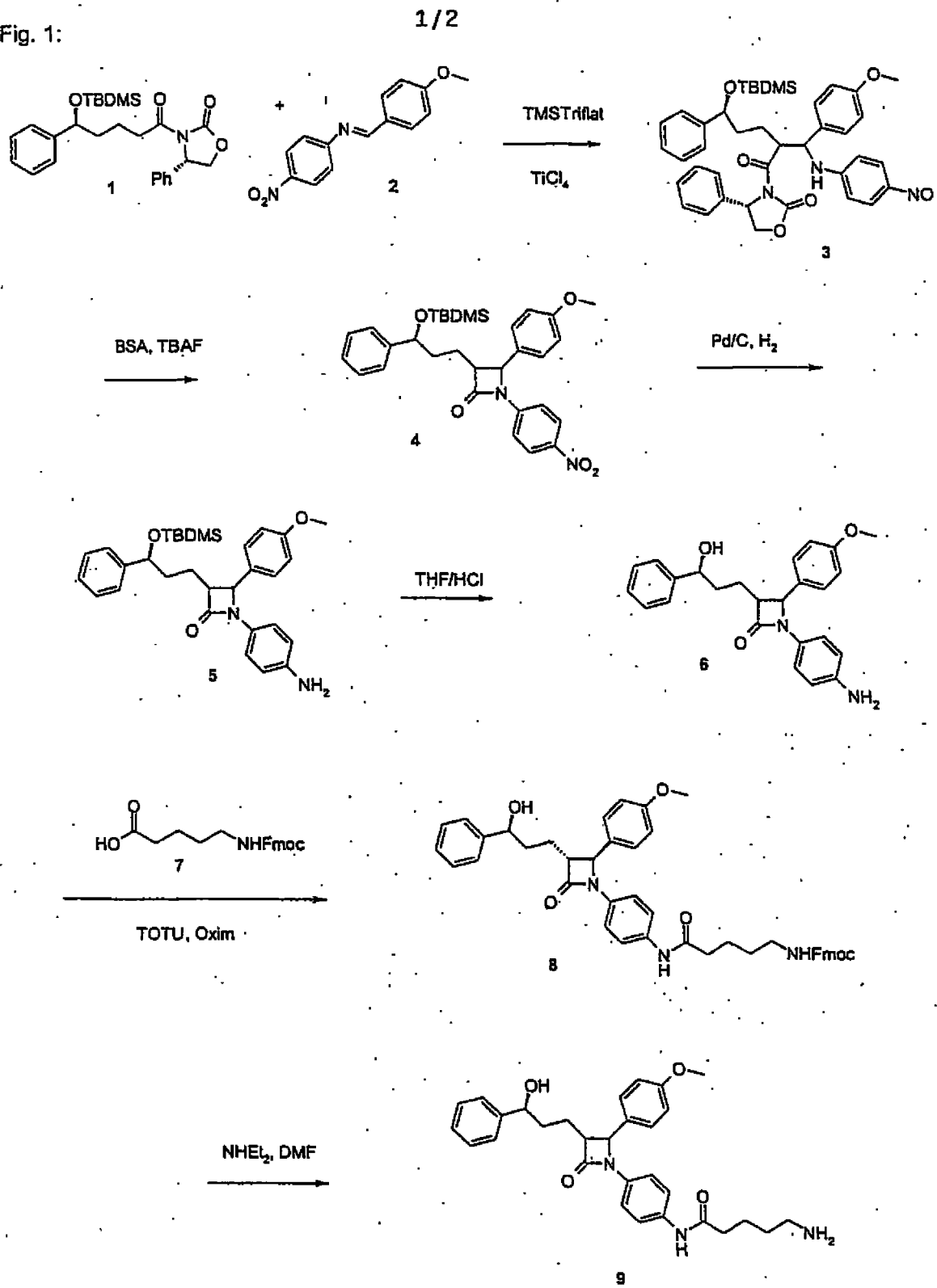
e) resultatet fra d) blir sammenliknet med resultater fra et kontroll eksperiment

hvor i kolesterolopptaket blir bestemt fra biologisk materiale som har det samme

arts og/eller vevsspesifisiteten som det biologiske materialet fra a) men som ikke blir brakt i kontakt med en forbindelse i b),

- f) resultatene fra e) indikerer en forbindelse som hemmer kolesterolgjenopptak når nedsatt kolesterolopptak fra cellene som er blitt brakt i kontakt med en
- 5 forbindelse fra b) blir bestemt.

Fig. 1:



2/2

Fig. 2:

