

(19)



(10) **LT 5132 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

- (11) Patent numeris: **5132** (51) Int. Cl. ⁷: **A61K 45/06**
A61K 38/13
A61P 37/06
- (21) Paraiškos numeris: **2003 015**
- (22) Paraiškos padavimo data: **2003 02 17**
- (41) Paraiškos paskelbimo data: **2004 01 26**
- (45) Patent paskelbimo data: **2004 05 25**
- (62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —
- (86) Tarptautinės paraiškos numeris: **PCT/US01/23862**
- (86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: **2001 07 31**
- (85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: **2003 02 17**
- (30) Prioritetas: **60/222.053, 2000 07 31, US**
60/231.282, 2000 09 08, US
09/915.411, 2001 07 25, US
- (72) Išradėjas:
Richard HORUK, US
- (73) Patent savininkas:
SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT, 13342 Berlin, DE
- (74) Patentinis patikėtinis:
Rita LAURINAVIČIŪTĖ, UAB „Metida“, Gedimino pr. 45-6, LT-2600 Vilnius, LT

- (54) Pavadinimas:
Nepeptidiniai CCR1 receptorių antagonistai derinyje su ciklosporinu A širdies transplanto atmetimui gydyti

- (57) Referatas:

Šis išradimas yra skirtas farmacinėms kompozicijoms, tinkančioms žinduolių širdies transplanto atmetimui gydyti, į kurias įeina farmaciškai priimtina pagalbinė medžiaga, betarpiškai efektyvus kiekis nepeptidinio CCR1 receptoriaus antagonisto ir subnephrotoksinis kiekis A ciklosporino.

Išradimo sritis

Šis išradimas yra susijęs su farmacinėmis kompozicijomis, tinkančiomis žinduolių širdies transplantato atmetimui gydyti, į kurias įeina farmaciškai priimtina pagalbinė medžiaga, terapiškai efektyvus kiekis nepeptidinio CCR1 receptoriaus antagonisto ir subnefrotoksinis kiekis A ciklosporino. Šis išradimas taip pat yra susijęs su tokių farmacinių kompozicijų panaudojimu žinduolio širdies transplantato atmetimui gydyti.

Išradimo kilmė

Svarbus uždegiminio proceso komponentas yra atskiros leukocitų populiacijos aktyvacija, migracija iš cirkuliacijos ir jų susikaupimas uždegimo paveiktame audinyje. Nors leukocitų judėjimo mintis nėra nauja, neseniai ji patyrė renesansą atradus ir charakterizavus adhezijos molekulių selektino ir integrino šeimas ir didelę šeimą atrankių chemostatinių citokinių, žinomų kaip chemokinai. Chemokinių receptoriai yra ekspresuojami ant leukocitų ir perduoda signalus po chemokinių prisijungimo ir pagaliau tokie signalai yra perduodami leukocitų aktyvacijai arba migracijai link chemokinių šaltinio. Taigi, reguliuodami leukocitų migraciją ir aktyvaciją iš periferinio kraujo į ekstravaskulines vietas organuose, odoje, sąnariuose arba jungiamuosiuose audiniuose, chemokinai vaidina lemiamą vaidmenį palaikant šeimnininko gynybą bei imuninio atsako atsiradimą.

Iš pradžių chemokinių šeimos molekulės buvo skirstomos į dvi grupes: "C-X-C" pošeimę ir "C-C" pošeimę. Būdinga abiejų šių pošeimių ypatybė yra keturių cisteino liekanų buvimas labai konservatyviose molekulių padėtyse. Chemokinių "C-C" pošeimėje pirmosios dvi liekanos yra greta viena kitos, o "C-X-C" pošeimėje cisteinų liekanas skiria viena aminorūgšties liekana. Pasirodo, kad dabartinis "-C-" atvaizdavimas atstovauja naują chemokinių

šeimą, kurioje "-C-" chemokinas neturi dviejų iš keturių, "C-C" pošeimėje ir "C-X-C" pošeimėje esančių, cisteino liekanų.

Vienas chemokinių "C-C" pošeimės narys yra makrofago uždegiminis proteinas-1 α ("MIP-1 α "). Jį ekspresuoja ląstelės, tokios kaip makrofagai, T ir B limfocitai, neutrofilai ir fibroblastai. Nesenas tyrimas (žr. Karpus, W.J. et al., *J. Immunol.* (1995), Vol.155, pp.5003-5010) pateikia patikimą MIP-1 α *in vivo* koncepcijos įvertinimą išsėtinės sklerozės pelių eksperimentiniame autoimuniniame encefalomyelito ("EAE") modelyje. Išsėtinė sklerozė yra autoimuninė liga, kurioje tarpininkauja T ir B limfocitai ir makrofagai; jos metu atsiranda centrinės nervų sistemos baltosios medžiagos ekstensyvus uždegimas ir demielinimas. Tyrimas parodė, kad antikūnai prieš MIP-1 α apsaugo nuo pradinio ir recidyvinio ligos atsiradimo bei apsaugo nuo vienbranduolinių ląstelių infiltracijos į centrinę nervų sistemą. Gydytas šiais antikūnais taip pat gali palengvinti jau esančią klinikinę ligą. Šie rezultatai leido tyrinėtojams padaryti išvadą, kad MIP-1 α vaidina svarbų vaidmenį išsėtinės sklerozės etiologijoje. Kitas tyrimas (žr. Godiska, R. et al., *J. Neuroimmunol.* (1995), Vol. 58, pp. 167-176) parodė daugelio chemokinių, įskaitant MIP-1 α , irNR teigiamą reguliaciją SJL pelių (pelių kamienas, imlus Th₁ ligoms, tokioms kaip EAE) žaizdose ir nugaros smegenyse ūmios EAE eigoje.

RANTES yra kitas C-C chemokinių pošeimės narys (pavadinimas RANTES yra akronimas, išvestas iš kai kurių baltymo ir jo geno iš pradžių pastebėtų ir numatytų charakteristikų: Regulated upon Activation Normal I cell Expressed presumed Secreted). Buvo rasta, kad daugybė audinių ekspresuoja RANTES panašiu būdu kaip ir MIP-1 α . Daugelio tyrimų duomenys rodo, kad yra nenormalus RANTES gaminimasis vystantis reumatiniam artritui (žr. Rathanasawami, P. et al., *J. Biol. Chem.* (1993), Vol. 268, pp. 5834-5839 ir Snowden, N. et al., *Lancet* (1994), Vol. 343, pp. 547-548). Reumatinis artritas yra chroniška uždegiminė liga, kuriai yra būdinga iš dalies T limfocitų ir monocitų infiltracija, kurioje, kaip manoma, tarpininkauja uždegiminių audinių išskirti chemotaktiniai faktoriai. Kitais tyrimais aiškiai įrodyta, kad RANTES yra susijęs su reumatinio artrito patofiziologija (žr. Barnes, D.A. et al., *J. Clin. Invest.* (1998), Vol.101, pp.2910-2919 ir Plater-

Zyberk, C.A. et al., *Immunol. Lett.* (1997), Vol. 57, pp. 117-120). Pavyzdžiui, žiurkių adjuvantu sukkelto artrito ("AIA") modelyje antikūnai prieš RANTES labai sumažina ligos vystymąsi.

Šie ir kiti tyrimai duoda aiškų įrodymą, kad MIP-1 α kiekiai yra padidinti EAE išsėtinės sklerozės modeliuose ir kad RANTES kiekiai yra padidinti reumatinio artrito atveju (žr. pvz., Glabinski, A.R. et al., *Am. J. Pathol.* (1997), Vol. 150, pp.617-630; Glabinski, A.R. et al., *Methods Enzymol.* (1997), Vol. 288, pp. 182-190; ir Miyagishi, R.S. et al., *J. Neuroimmunol.* (1997), Vol. 77, pp. 17-26). Be to, kaip aprašyta aukščiau, šie chemokinai yra chemoatraktantai T ląstelėms ir monocitams, kurie yra svarbiausi ląstelių tipai, dalyvaujantys šių ligų patofiziologijoje. Taigi, bet kokia molekulė, kuri inhibuoja bet kurio iš šių chemokinų aktyvumą, turėtų būti naudinga gydant šias ligas ir todėl bus tinkama kaip priešuždegiminis agentas.

Taip pat yra aiškių įrodymų, kad RANTES turi ryšį su organų transplantatų atmetimu. Vienbranduolinių ląstelių infiltracija į tarpą tarp organų transplantatų audinių yra ūmaus ląstelių atmetimo požymis. Šis ląstelinis infiltratas pirmiausia susideda iš T ląstelių, makrofagų ir eozinofilų. RANTES ekspresijos ūmaus inkstų alotransplantato atmetimo tyrime buvo rasta RANTES iRNR ekspresija infiltruojamose vienbranduolinėse ląstelėse ir inkstų kanalėlių epitelio ląstelėse, ir buvo rasta, kad pats RANTES yra prijungtas prie mikrogyslelių endotelinio paviršiaus atmetamame alotransplantate (žr. Pattison, J. et al., *Lancet* (1994), Vol. 343, pp. 209-211 ir Wiedermann, C.J. et al., *Curr. Biol.* (1993), Vol.3, pp. 735-739). Nesename darbe (žr. Pattison, J.M. et al., *J. Heart Lung Transplant.* (1996), Vol. 15, pp. 1194-1199) teigiama, kad RANTES gali vaidinti vaidmenį alotransplantato aterosklerozėje. Padidinti RANTES kiekiai – ir iRNR, ir baltymo – buvo rasti vienbranduolinėse ląstelėse, miofibroblastuose ir arterijų, kuriose vyksta padidinta aterosklerozė, lyginant su normaliomis vainikinėmis arterijomis, endotelinėse ląstelėse.

Kadangi RANTES yra chemokinų receptorių CCR1 ir CCR5 ligandas, tai šie receptoriai, esantys ant cirkuliuojančių vienbranduolinių ląstelių, gali būti tinkamais terapiniais taikiniais transplantacijos biologijoje. CCR1 receptoriaus svarba buvo tirta širdies transplantacijos pelių, turinčių tikslinę deleciją CCR1 gene, modeliuose (Gao, W. et al., *J. Clin. Invest.* (2000), Vol.

105, pp. 35-44). Šiame tyrime keturi atskiri alotransplantato išgyvenimo modeliai parodė CCR1(-/-) recipientų žymų gyvenimo trukmės pailgėjimą. Viename modelyje A ciklosporino kiekiai, kurie turėjo ribinį poveikį CCR1(+/+) pelėse, CCR1(-/-) recipientams davė nuolatinį alotransplantato priėmimą.

Neseniai buvo parodyta, kad kai kurios mažos molekulės yra nepeptidiniai CCR1 receptoriaus antagonistai, inhibuojantys RANTES ir MIP-1 α aktyvumą ir todėl yra tinkami kaip prieš uždegiminiai agentai. Žr. PCT publikuotą patentinę paraišką WO 98/56771, JAV patentinę paraišką Ser. Nr. 09/094397, paduotą 1998 m. birželio 9 d., dabar JAV patentas 6207665, paskelbtas 2001 m. kovo 27 d., Hesselgesser, J. et al., *J. Biol. Chem.* (1998), Vol. 273, pp. 15687-15692, Ng, H.P. et al., *J. Med. Chem.* (1999), Vol. 42, pp. 4680-4694, Liang, M. et al., *Eur. J. Pharmacol.* (2000a), Vol. 389, pp. 41-49 ir Liang, M. et al. *J. Biol. Chem.* (2000b), Vol. 275, pp. 19000-19008. Šių patentinių paraiškų ir žurnalų straipsnių aprašymai yra pridedami kaip literatūros šaltiniai.

Ciklosporinai yra neutralių lipofilinių ciklinių oligopeptidų (11-merų) šeima, gaunama iš grybų *Tolypocladium inflatum* Gams, taip pat ir kitų netikrų grybų. Pagrindinis komponentas yra A ciklosporinas – gerai žinomas imunodepresantas, kuris selektyviai inhibuoja adaptacinius imuninius atsakus, blokuodamas T ląstelių aktyvaciją (žr. Kahan, B.D., *New Engl. J. Med.* (1989), Vol. 321, pp. 1725-1738, ir Valantine, H. *Transplant. Proc.* (2000), Vol. 32, pp. 27S-44S). Nors A ciklosporinas yra esminis faktorius sėkmingoje organų transplantacijoje, išlieka didelės ilgalaikio saugumo problemos, tiesiogiai susijusios su A ciklosporinu paremtu imunoslopinimu, įskaitat toksišką poveikį į inkstus, hipertenziją, cukrinį diabetą ir potransplantacinę limfoproliferacinę ligą. Todėl būtų pageidautina vartoti subnefrotoksinę A ciklosporino dozę, tokiu būdu sumažinant jo nepageidautinus šalutinius poveikius ir išlaikant imunosupresinį aktyvumą, būtina chroniškam atmetimui išvengti, kuris širdies transplantacijos atveju yra žinomas kaip chroniška alotransplantato vaskulopatija, pagrindinai pasireiškianti kaip pagreitinta aterosklerozė.

Giminingi šaltiniai

Nesename inkstų transplantavimo tyrime peptidinis chemokinių receptoriaus antagonistas Met-RANTES, duotas su mažomis A ciklosporino dozėmis, žymiai sumažino inkstų pažeidimą, įskaitant tarpaudininį uždegimą, pagrindinai sumažindamas infiltruotų monocitų skaičių (Gröne, H.J. et al., *FASEB J.* (1999), Vol. 13, pp.1371-1383). Šis tyrimas palaiko teoriją, kad RANTES per specifinių chemokinių receptorių ant vienbranduolinių ląstelių aktyvaciją vaidina svarbų vaidmenį alotransplantato atmetime.

Publikuota Europos patentinė paraiška 1000626 (Applied Research Systems) aprašo peptidinio chemokinių receptoriaus antagonistą - Met-RANTES - panaudojimą kartu su ciklosporinu transplantuotų organų, audinių arba ląstelių atmetimo prevencijai arba gydymui.

Išradimo santrauka

Šis išradimas yra skirtas farmacinėmis kompozicijomis, tinkančiomis žinduolių širdies transplantato atmetimui gydyti, į kurias įeina viena arba daugiau farmaciškai priimtinių pagalbinių medžiagų, terapiškai efektyvus kiekis nepeptidinio CCR1 receptoriaus antagonistų ir subnefrotoksinis kiekis A ciklosporino. Ypatingai šis išradimas yra skirtas farmacinėms kompozicijoms, tinkančioms žinduolių širdies transplantato atmetimui gydyti, kur šiose kompozicijose yra viena arba daugiau farmaciškai priimtinių pagalbinių medžiagų, subnefrotoksinis kiekis A ciklosporino ir terapiškai efektyvus kiekis nepeptidinio CCR1 receptoriaus antagonistų, pasirinkto iš JAV patente 6207665 aprašytų junginių.

Šis išradimas taip pat yra skirtas farmacinės kompozicijos, tinkančios žinduolių širdies transplantato atmetimui gydyti, į kurias įeina viena arba daugiau farmaciškai priimtinių pagalbinių medžiagų, terapiškai efektyvus kiekis nepeptidinio CCR1 receptoriaus antagonistų ir subnefrotoksinis kiekis A ciklosporino, įvedimo būdams tokio gydymo reikalingam žinduoliui. Ypatingai šis išradimas yra skirtas farmacinės kompozicijos, tinkančios žinduolių širdies transplantato atmetimui gydyti, kur šioje kompozicijoje yra viena arba daugiau farmaciškai priimtinių pagalbinių medžiagų, subnefrotoksinis kiekis A

ciklosporino ir terapiškai efektyvus kiekis nepeptidinio CCR1 receptoriaus antagonisto, pasirinkto iš JAV patente 6207665 aprašytų junginių, įvedimo būdams tokio gydymo reikalingam žinduoliui.

Šis išradimas taip pat yra skirtas žinduolių širdies transplantato atmetimo gydymo būdams, kuriame tokio gydymo reikalingam žinduoliui yra skiriama farmacinė kompozicija, į kurią įeina viena arba daugiau farmaciškai priimtinių pagalbinių medžiagų, terapiškai efektyvus kiekis nepeptidinio CCR1 receptoriaus antagonisto ir subnefrotoksinis kiekis A ciklosporino. Ypatingai šis išradimas yra skirtas žinduolių širdies transplantato atmetimo gydymo būdams, kuriame tokio gydymo reikalingam žinduoliui yra skiriama farmacinė kompozicija, į kurią įeina viena arba daugiau farmaciškai priimtinių pagalbinių medžiagų, subnefrotoksinis kiekis A ciklosporino ir terapiškai efektyvus kiekis nepeptidinio CCR1 receptoriaus antagonisto, pasirinkto iš JAV patente 6207665 aprašytų junginių.

Trumpas brėžinių aprašymas

Fig.1. rodo šio išradimo nepeptidinio CCR1 receptoriaus antagonisto poveikį į radiožymėto MIP-1 α susirišimą su žiurkės CCR1 ekspresuojančiomis ląstelėmis.

Fig.2 rodo šio išradimo nepeptidinio CCR1 receptoriaus antagonisto poveikį į MIP-1 α indukuotą viduląstelinio Ca²⁺ kiekio padidėjimą žiurkių CCR1 ekspresuojančiose ląstelėse.

Fig.3 rodo šio išradimo nepeptidinio CCR1 receptoriaus antagonisto koncentraciją plazmoje po nuolatinio poodinio dozės įvedimo žiurkėms.

Fig.4 rodo šio išradimo nepeptidinio CCR1 receptoriaus antagonisto ir A ciklosporino derinio poveikį į alogeninių širdies transplantų išgyvenimą žiurkėse.

Fig.5 rodo šio išradimo nepeptidinio CCR1 receptoriaus antagonisto ir A ciklosporino derinio poveikį į atmetimo balus žiurkėms, praėjus 3 dienoms po alogeninio širdies transplantatų implantavimo.

Fig.6 rodo šio išradimo nepeptidinio CCR1 receptoriaus antagonisto poveikį į A ciklosporino kiekius žiurkių plazmoje.

Fig.7 rodo šio išradimo nepeptidinio CCR1 receptoriaus antagonisto poveikį į monocitų prilipimą prie aktyvuotų endotelio ląstelių.

Smulkus išradimo aprašymas

A. APIBRĖŽIMAI

Aprašyme ir pridedamoje apibrėžtyje, jeigu nenurodyta kitaip, toliau duodami terminai turi tokias reikšmes:

“Aminokarbonilas” reiškia $-C(O)NH_2$ radikalą.

“Fenilas” reiškia benzeno radikalą, kuriame gali būti vienas arba daugiau pakaitų, pasirinktų iš grupės, susidedančios iš hidroksilo, halogeno, alkilo, halogenalkilo, alkoksigrupės, alkenilo, nitrogrupės, cianogrupės, aminogrupės, monoalkilaminogrupės, dialkilaminogrupės, alkilkarbonilo, karboksigrupės, alkoksikarbonilo ir aminokarbonilo.

“Farmaciškai priimtina druska” reiškia adityvines druskas ir su rūgštimis, ir su bazėmis.

“Farmaciškai priimtina adityvinė druska su rūgštimi” reiškia tokias druskas, kurios išlaiko laisvų bazių biologinį veiksmingumą ir savybes, kurios nėra biologiškai arba kaip nors kitaip nepageidautinos ir kurios yra sudarytos su neorganinėmis rūgštimis, tokiomis kaip hidrochlorido rūgštis, hidrobromido rūgštis, sulfato rūgštis, nitrato rūgštis, fosfato rūgštis ir panašios, ir organinėmis rūgštimis, tokiomis kaip acto rūgštis, propiono rūgštis, piruvo rūgštis, maleino rūgštis, malono rūgštis, gintaro rūgštis, fumaro rūgštis, vyno rūgštis, citrinų rūgštis, benzenkarboksirūgštis, migdolų rūgštis, metansulfonrūgštis, etansulfonrūgštis, p-toluensulfonrūgštis, salicilo rūgštis ir panašios.

“Farmaciškai priimtina adityvinė druska su baze” reiškia tokias druskas, kurios išlaiko laisvų rūgščių biologinį veiksmingumą ir savybes, kurios nėra biologiškai arba kaip nors kitaip nepageidautinos. Tokios druskos yra pagaminamos prijungiant neorganinę bazę arba organinę bazę prie laisvos rūgšties. Druskos su neorganinėmis bazėmis yra, bet jomis neapsiribojama, natrio, kalio, ličio, amonio, kalcio, magnio, cinko, aliuminio druskos ir panašios. Tinkamiausios neorganinės druskos yra amonio, natrio,

kalio, kalcio ir magnio druskos. Druskos su organinėmis bazėmis yra, bet jomis neapsiribojama, pirminių, antrinių ir tretinių aminų druskos, pakaitus turinčių aminų, įskaitant gamtinių pakaitus turinčių aminų, druskos, ciklinių aminų ir bazinių jonitinių dervų, tokių kaip izopropilaminas, trimetilaminas, dietilaminas, trietilaminas, tripropilaminas, etanolaminas, 2-dimetilaminoetanolis, 2-dietilaminoetanolis, trimetaminas, dicikloheksilaminas, lizinas, argininas, histidinas, kofeinas, prokainas, hidrabaminas, cholinai, betainas, etilendiaminas, gliukozaminas, metilglukaminas, teobrominas, purinai, piperazinas, piperidinas, N-etilpiperidinas, poliamininės dervos ir panašūs. Ypatingai tinkamos organinės bazės yra izopropilaminas, dietilaminas, etanolaminas, trimetilaminas, dicikloheksilaminas, cholinai ir kofeinas.

“Karbamido-“ reiškia radiklą, kurio formulė $-N(H)-C(O)-NH_2$.

Iš aukščiau duotų apibrėžimų ir pavyzdžių turi būti suprantama, kad radikaluose, turinčiuose alkilo grupes su pakaitais, pakaitas gali būti prie bet kurio alkilo grupės anglies atomo.

“Širdies transplantato atmetimas” reiškia tokias ligos būkles, šio išradimo tikslams, kurioms yra būdingas ūmus arba chroniškas pooperacinis širdies transplantato atmetimas ir apima: ankstyvąjį transplantato pakenkimą, ankstyvąjį ūmų atmetimą, ankstyvąjį sisteminį atmetimą ir vėlyvąją chronišką alotransplantato vaskulopatiją (ankstyvasis ir vėlyvasis yra žymimi kaip atitinkamai mažiau ir daugiau nei 6 mėn.-vieneri metai po transplantacijos).

“Žinduolis” reiškia žmones ir naminius gyvūnus, tokius kaip katės, šunys, kiaulės, galvijai, avys, ožkos, arkliai, triušiai ir panašūs.

“Subnefrotoksinis kiekis” reiškia A ciklosporino kiekį, kuris yra terapiškai efektyvus kiekis žmogaus širdies transplantato atmetimui gydyti, bet jis nėra susijęs su nepageidautinu šalutiniu nefrotoksinio poveikiu, kuriam yra būdingas padidintas kreatinino kiekis serume, padidinta proteinurija, padidintas skysčių sulaikymas, sumažintas glomerulinis filtravimo greitis ir sumažintas natrio ir kalio šalinamasis išskyrimas.

“Vienu metu” reiškia naudojimą farmacinės kompozicijos, kurioje yra du veiklieji ingredientai: terapiškai efektyvus kiekis šio išradimo nepeptidinio CCR1 receptoriaus antagonistų ir subnefrotoksinis kiekis A ciklosporino, esant

vienai arba keletui farmaciškai priimtinių pagalbinių medžiagų, vienoje kompozicijoje.

“Viena paskui kitą” reiškia naudojimą šio išradimo farmacinės kompozicijos dviejose skirtingose kompozicijose, kur kiekviena iš jų turi vieną iš dviejų veiklių ingredientų: terapiškai efektyvų kiekį šio išradimo nepeptidinio CCR1 receptoriaus antagonisto arba subnefrotoksinį kiekį A ciklosporino, kartu su viena arba keletu farmaciškai priimtinių pagalbinių medžiagų. Šios dvi kompozicijos yra įvedamos to reikalingam žinduoliui skirtingu laiku.

Šio išradimo nepeptidiniai CCR1 receptoriaus antagonistai savo struktūroje gali turėti asimetrinių anglies atomų. Todėl nepeptidiniai CCR1 receptoriaus antagonistai gali egzistuoti kaip atskiri stereoizomerai, racematai ir kaip enantiomerų ir diastereomerų mišiniai. Visi tokie atskiri stereoizomerai, racematai ir jų mišiniai yra laikomi patenkančiais į šį išradimą. Jeigu yra žinoma nepeptidinio CCR1 receptoriaus antagonisto tam tikrų anglies atomų absoliuti konfigūracija, ji yra nurodoma atitinkamu absoliučios konfigūracijos deskriptoriumi *R* arba *S*. Deskriptorius “*trans*” yra naudojamas parodyti, kad R^{1a} pakaitai yra priešingose piperazino plokštumos pusėse. Deskriptorius “*cis*” yra naudojamas parodyti, kad R^{1a} pakaitai yra toje pačioje piperazino plokštumos pusėje.

Čia naudojama šio išradimo CCR1 receptoriaus nepeptidinių antagonistų nomenklatūra yra I.U.P.A.C. sistemos modifikuota forma, kurioje į šio išradimo apimtį patenkantys CCR1 receptoriaus antagonistai yra pavadinti kaip piperazino dariniai, kaip aprašyta JAV patente 6207665.

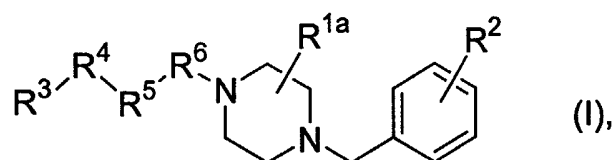
“Terapiškai efektyvus kiekis” reiškia tokį nepeptidinio CCR1 receptoriaus antagonistą, geriau žemiau aprašyto (I) formulės nepeptidinio CCR1 receptoriaus antagonistą, kiekį, kuris įvestas jo reikalingam žinduoliui, geriau žmogui, yra pakankamas žemiau aprašytam širdies transplantato atmetimo gydymui. Šio išradimo nepeptidinio CCR1 receptoriaus antagonistų kiekis, kuris sudaro “terapiškai efektyvų kiekį” kitiems priklausomai nuo naudojamo nepeptidinio CCR1 receptoriaus antagonistų, atmetimo sunkumo ir nuo gydomo žmogaus amžiaus, bet jį paprastu būdu gali nustatyti paprastas specialistas pagal savo žinias ir pagal šį aprašymą.

Čia naudojami terminai "gydant" arba "gydymas" apima žinduolio širdies transplantato, geriau žmogaus, atmetimo gydymą ir į jį įeina:

- (i) apsisaugojimas nuo atmetimo atsiradimo žinduolio, geriau žmogaus, organizme, ypatingai prieš arba po širdies transplantacijos tokiam žinduoliui;
- (ii) būklės inhibavimas, t.y. atmetimo išsivystymo sustabdymas; arba
- (iii) būklės palengvinimas, t.y. atmetimo regresijos sukėlimas.

B. TINKAMIAUSI ĮGYVENDINIMO VARIANTAI

Iš aukščiau duotoje išradimo santraukoje aprašytų farmacinių kompozicijų, tinkamiausia farmacinių kompozicijų grupė apima tokias kompozicijas, kuriose nepeptidinis CCR1 receptoriaus antagonistas yra junginys, pasirinktas iš (I) formulės junginių:



kuriuose:

- R^{1a} yra vienas arba daugiau pakaitų, nepriklausomai pasirinktų iš grupės, susidedančios iš alkilo arba hidroksialkilo;
- R² yra fluoras 4-je padėtyje;
- R³ yra fenilas, 4-je padėtyje turintis pakaitu chlorą, o 2-je padėtyje aminokarbonilą, ureidogrupę, arba glicinamidogrupę;
- R⁴ yra -O-;
- R⁵ yra metilenas; o
- R⁶ yra -C(O)-;

kaip atskiras stereoizomeras arba jų mišinys; arba jo farmaciškai priimtina druska.

Iš šios farmacinių kompozicijų grupės tinkamiausia farmacinių kompozicijų pogrupė apima tokius junginius, kuriuose nepeptidinis CCR1 receptoriaus antagonistas yra pasirinktas iš grupės, susidedančios iš:

(2R,5S)-1-((4-chlor-2-(aminokarbonil)fenoksi)metil)karbonil-2,5-dimetil-4-(4-fluorbenzil)piperazino;

(trans)-1-((4-chlor-2-(glicinamido)fenoksi)metil)karbonil-2,5-dimetil-4-(4-fluorbenzil)piperazino;

(2R)-1-((4-chlor-2-(ureido)fenoksi)metil)karbonil-2-metil-4-(4-fluorbenzil)piperazino;

(trans)-1-((4-chlor-2-(ureido)fenoksi)metil)karbonil-2,5-dimetil-4-(4-fluorbenzil)piperazino;

(2R,5S)-1-((4-chlor-2-(ureido)fenoksi)metil)karbonil-2,5-dimetil-4-(4-fluorbenzil)piperazino; ir

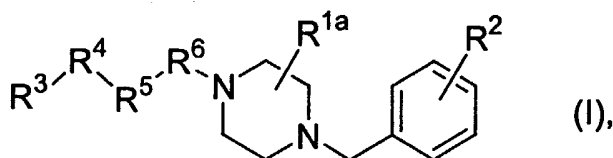
(2R,5S)-1-((4-chlor-2-(glicinamido)fenoksi)metil)karbonil-2,5-dimetil-4-(4-fluorbenzil)piperazino.

Iš šios farmacinių kompozicijų grupės kita tinkamiausia farmacinių kompozicijų pogrupė apima tokius junginius, kuriuose nepeptidinis CCR1 receptoriaus antagonistas yra (2R)-1-((4-chlor-2-(ureido)fenoksi)metil)karbonil-2-metil-4-(4-fluorbenzil)piperazinas.

Iš šios farmacinių kompozicijų pogrupės tinkamiausia farmacinių kompozicijų klasė yra kompozicijos, kuriose jos reikalingas žinduolis yra žmogus.

Iš aukščiau duotoje išradimo santraukoje aprašytų vartojimo būdų, tinkamiausia vartojimo būdų grupė apima tokius būdus, kuriuose nepeptidinis CCR1 receptoriaus antagonistas ir A ciklosporinas yra įvedami jų reikalingam žinduoliui vienu metu arba vienas po kito.

Iš šios būdų grupės tinkamiausia būdų pogrupė apima tokius būdus, kuriuose nepeptidinis CCR1 receptoriaus antagonistas yra junginys, pasirinktas iš (I) formulės junginių:



kuriuose:

R^{1a} yra vienas arba daugiau pakaitų, nepriklausomai pasirinktų iš grupės, susidedančios iš alkilo arba hidroksialkilo;

R² yra fluoras 4-je padėtyje;

R³ yra fenilas, 4-je padėtyje turintis chlorą, o 2-je padėtyje aminokarbonilą, ureidogrupę, arba glicinamidogrupę;

R⁴ yra -O-;

R⁵ yra metilenas; o

R⁶ yra -C(O)-;

kaip atskiras stereoizomeras arba jų mišinys; arba jo farmaciškai priimtina druska.

Iš šios būdų pogrupės tinkamiausia būdų klasė apima tokius, kuriuose nepeptidinis CCR1 receptoriaus antagonistas yra pasirinktas iš grupės, susidedančios iš:

(2R,5S)-1-((4-chlor-2-(aminokarbonil)fenoksi)metil)karbonil-2,5-dimetil-4-(4-fluorbenzil)piperazino;

(trans)-1-((4-chlor-2-(glicinamido)fenoksi)metil)karbonil-2,5-dimetil-4-(4-fluorbenzil)piperazino;

(2R)-1-((4-chlor-2-(ureido)fenoksi)metil)karbonil-2-metil-4-(4-fluorbenzil)piperazino;

(trans)-1-((4-chlor-2-(ureido)fenoksi)metil)karbonil-2,5-dimetil-4-(4-fluorbenzil)piperazino;

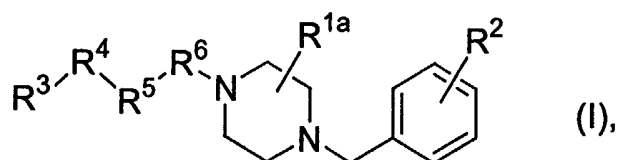
(2R,5S)-1-((4-chlor-2-(ureido)fenoksi)metil)karbonil-2,5-dimetil-4-(4-fluorbenzil)piperazino; ir

(2R,5S)-1-((4-chlor-2-(glicinamido)fenoksi)metil)karbonil-2,5-dimetil-4-(4-fluorbenzil)piperazino.

Iš šios būdų pogrupės kita tinkamiausia būdų klasė apima tokius būdus, kuriuose nepeptidinis CCR1 receptoriaus antagonistas yra (2R)-1-((4-chlor-2-(ureido)fenoksi)metil)karbonil-2-metil-4-(4-fluorbenzil)piperazinas.

Iš šios būdų klasės tinkamiausia būdų poklasė apima tokius būdus, kuriuose jo reikalingas žinduolis yra žmogus.

Iš aukščiau duotoje išradimo santraukoje aprašytų gydymo būdų, tinkamiausia būdų grupė apima tokius būdus, kuriuose nepeptidinis CCR1 receptoriaus antagonistas yra junginys, pasirinktas iš (I) formulės junginių:



kuriuose:

- R^{1a} yra vienas arba daugiau pakaitų, nepriklausomai pasirinktų iš grupės, susidedančios iš alkilo arba hidroksialkilo;
- R^2 yra fluoras 4-je padėtyje;
- R^3 yra fenilas, 4-je padėtyje turintis chlorą, o 2-je padėtyje aminokarbonilą, ureidogrupę, arba glicinamidogrupę;
- R^4 yra -O-;
- R^5 yra metilenas; o
- R^6 yra -C(O)-;

kaip atskiras stereoizomeras arba jų mišinys; arba jo farmaciškai priimtina druska.

Iš šios būdų grupės tinkamiausia būdų pogrupė apima tokius būdus, kuriuose nepeptidinis CCR1 receptoriaus antagonistas yra pasirinktas iš grupės, susidedančios iš:

(2R,5S)-1-((4-chlor-2-(aminokarbonil)fenoksi)metil)karbonil-2,5-dimetil-4-(4-fluorbenzil)piperazino;

(trans)-1-((4-chlor-2-(glicinamido)fenoksi)metil)karbonil-2,5-dimetil-4-(4-fluorbenzil)piperazino;

(2R)-1-((4-chlor-2-(ureido)fenoksi)metil)karbonil-2-metil-4-(4-fluorbenzil)piperazino;

(trans)-1-((4-chlor-2-(ureido)fenoksi)metil)karbonil-2,5-dimetil-4-(4-fluorbenzil)piperazino;

(2R,5S)-1-((4-chlor-2-(ureido)fenoksi)metil)karbonil-2,5-dimetil-4-(4-fluorbenzil)piperazino; ir

(2R,5S)-1-((4-chlor-2-(glicinamido)fenoksi)metil)karbonil-2,5-dimetil-4-(4-fluorbenzil)piperazino.

Iš šios būdų grupės kita tinkamiausia būdų pogrupė apima tokius būdus, kuriuose nepeptidinis CCR1 receptoriaus antagonistas yra (2R)-1-((4-chlor-2-(ureido)fenoksi)metil)karbonil-2-metil-4-(4-fluorbenzil)piperazinas.

Iš šios būdų pogrupės tinkamiausia būdų klasė apima tokius būdus, kuriuose jo reikalingas žinduolis yra žmogus.

Iš šios būdų pogrupės, kita tinkamiausia būdų klasė apima tokius būdus, kuriuose nepeptidinis CCR1 receptoriaus antagonistas ir A ciklosporinas yra įvedami jų reikalingam žinduoliui vienu metu arba vienas po kito.

C. ŠIO IŠRADIMO KOMPOZICIJŲ PANAUDOJIMO GALIMYBĖS

Čia aprašytos farmacinės kompozicijos yra tinkamos žinduolio, geriau žmogaus, širdies transplantato atmetimui gydyti.

Buvo parodyta, kad A ciklosporinas yra labai veiksmingas valdant transplantato pakenkimą, ūmų atmetimą ir sisteminį atmetimą pirmaisiais metais po širdies transplantacijos. Tačiau ilgalaikis palaikomasis A ciklosporino naudojimas, nors ir efektingas valdant chronišką alotransplantato vaskulopatiją, yra tiesiogiai susijęs su šalutiniais poveikiais, įskaitant nefrotoksiškumą, hipertenziją, cukrinį diabetą ir potransplantacinę limfoproliferacinę ligą.

Buvo parodyta, kad tam tikrų chemokinių arba jų receptorių inhibavimas gali būti veiksmingas gyvūnų organų transplantacijos modeliuose. Kaip aukščiau aprašyta, nesename inkstų transplantacijos tyrime bandyme su žiurkėmis chemokinių receptoriaus antagonistas Met-RANTES, duodant jį su mažomis A ciklosporino dozėmis, žymiai sumažino inkstų pažeidimą, įskaitant tarpaudininį uždegimą, pagrindinai sumažindamas infiltruojamų monocitų skaičių (Gröne, H.J. et al., (1999), supra). Kitame tyrime CCR1 receptoriaus svarba buvo ištirta širdies transplantacijos pelių, turinčių tikslią CCR1 deleciją, modeliuose (Gao, W. et al., (2000), supra). Šiame tyrime keturi skirtingi alotransplantato išgyvenimo modeliai parodė žymų CCR1(-/-) recipientų išgyvenimo pailgėjimą. Viename modelyje A ciklosporino kiekiai, kurie turėjo ribinius poveikius CCR1(+/+) pelėse, davė pastovų alotransplantato priėmimą CCR1(-/-) recipientams.

Remiantis šiais tyrimais, yra aiškiai palaikoma teorija, kad chemokinas RANTES, veikiantis per CCR1 receptorių, vaidina svarbų vaidmenį organo transplantato atmetime. Buvo parodyta, kad nepeptidiniai šio išradimo CCR1

receptoriaus antagonistai inhibuoja RANTES aktyvumą. Taigi, šio išradimo nepeptidiniai CCR1 receptoriaus antagonistai yra tinkami organo transplantato, ypač širdies transplantato, atmetimui gydyti.

Kaip smulkiau aptariama toliau, šio išradimo nepeptidiniai CCR1 receptoriaus antagonistai derinyje su A ciklosporinu parodė netikėtus rezultatus gydant žinduolių širdies transplantato atmetimą. Konkrečiau, nepeptidinio CCR1 receptoriaus antagonisto terapiškai efektyvus kiekis ir subnefrotoksiškas A ciklosporino kiekis turi sugebėjimą gydyti širdies transplantato atmetimą be nepageidaujamo A ciklosporino nefrotoksinio poveikio.

D. ŠIO IŠRADIMO JUNGINIŲ TYRIMAS

Norint parodyti, kad šio išradimo nepeptidiniai CCR1 receptoriaus antagonistai inhibuoja MIP-1 α arba RANTES chemokinių aktyvumą, veikiantį per CCR1 receptorių, gali būti naudojama keletas anksčiau aprašytų *in vitro* testų. Žr., pvz., JAV patentas 6207665 ir Hesselgesser, J. et al., (1998), *supra*, Ng, H.P. et al., (1999), *supra*, Liang, M. et al., (2000a), *supra* ir Liang, M. et al., (2000b), *supra*.

Buvo tirtas JAV patente 6207665 aprašyto nepeptidinio CCR1 antagonisto, t.y. (2R)-1-((4-chlor-2-(ureido)fenoksi)metil)karbonil-2-metil-4-(4-fluorbenzil)piperazino, susirišimas su žiurkės CCR1 receptoriumi pagal 1 pavyzdyje aprašytą *in vitro* surišimo testą ir jo rezultatai yra parodyti fig.1. Išstumiamojo surišimo tyrimų Scatchard'o analizė parodė, kad nepeptidinio CCR1 receptoriaus antagonisto afiniškumas yra 121 ± 60 nM (žr. fig.1), t.y. maždaug 100 kartų mažiau veiksmingas žiurkės CCR1 receptoriui nei žmogaus CCR1 receptoriui ($K_i = 1$ nM). Be to, šis nepeptidinis receptoriaus antagonistas galėjo konkurentiškai išstumti radiožymėtą RANTES iš žiurkės CCR1 receptoriaus su panašia K_i . Buvo parodyta, kad tas pats nepeptidinis CCR1 receptoriaus antagonistas yra funkcinis žiurkių CCR1 receptoriaus antagonistas atliekant toliau 2 pavyzdyje ir fig.2 aprašytus kalcio išskyrimo testus. Trumpalaikis viduląstelinio Ca^{2+} koncentracijos padidėjimas, kurį sukėlė 50 nM MIP-1 α , buvo inhibuotas prieš tai inkubuojant žiurkių CCR1

receptorių ekspresuojančias ląsteles su 100 nM nepeptidinio CCR1 receptoriaus antagonistu ("Junginys" fig.2). Šie duomenys parodė, kad nors šis nepeptidinis CCR1 receptoriaus antagonistas nėra taip veiksmingas kaip žiurkių CCR1 receptoriaus inhibitorius lyginant su žmogaus CCR1 receptoriumi, šis nepeptidinis CCR1 receptoriaus antagonistas gali efektyviai konkuruoti dėl susirišimo su žiurkių CCR1 receptoriumi *in vitro* ir yra stiprus jo funkcinis antagonistas.

Buvo atlikti farmakokinetiniai tyrimai su šio išradimo nepeptidiniu CCR1 receptoriaus antagonistu bandyme su žiurkėmis, kaip aprašyta 3 pavyzdyje ir fig.3. Maksimalūs kiekiai plazmoje, praėjus 1, 4 ir 7 dienoms po nepeptidinio CCR1 receptoriaus antagonistu poodinio įvedimo, buvo tarp 12 ir 27 μM (žr. fig.3). Absorbcija buvo palyginus greitai: praėjus 15 min. po vaisto įvedimo, plazmoje buvo rasti gana dideli jo kiekiai. Praėjus 8 val. po vaisto įvedimo vaisto kiekiai plazmoje buvo apie 1-2 μM . Vaisto puslaikis plazmoje buvo apie 2-3 valandos. Nors nepeptidinio CCR1 receptoriaus antagonistu padidinto išskyrimo arba susikaupimo nepastebėta pakartotinai įvedant vaistą, visomis matavimo dienomis buvo stebėtas gana didelis kiekių nepastovumas. Šie tyrimai parodė, kad šio išradimo nepeptidinio CCR1 receptoriaus antagonistu poodinis įvedimas, leidžiant 50 mg/kg dozę tris kartus per dieną, užtikrina tinkamus vaisto kiekius 24 valandų laikotarpyje.

In vivo testas, kuris gali būti naudojamas šio išradimo farmacinės kompozicijos tinkamumo žinduolio širdies transplantato atmetimui gydyti parodymui, yra žiurkių heterotropinio širdies transplantato atmetimo modelis (žr. pvz., Nisco, S. et al., *J. Immunol.* (1994), Vol.152, pp.3786-3792 ir Ono, K. et al., *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* (1969), Vol. 57, pp. 225-229). Šio išradimo farmacinės kompozicijos buvo tiriamos toliau duotame 4 pavyzdyje aprašytame *in vivo* teste, kurio rezultatai yra pailiustruoti fig.4. Šiame teste alotransplantato išgyvenimo laiko pailgėjimas atitinka širdies transplantato atmetimo sumažėjimą recipiente, kuris buvo Liuiso žiurkės, gavusios ACI žiurkių, kaip donorų, transplantatus. Gyvūnų, gavusių tik nepeptidinio CCR1 receptoriaus antagonistu, t.y. (2R)-1-((4-chlor-2-(ureido)fenoksi)metil)karbonil-2-metil-1-(4-fluorbenzil)piperazino ("jung." fig.4) tirpiklyje, vidutinis alotransplantato išgyvenimo laikas buvo $8,8 \pm 1,2$ dienos, lyginant su $6,8 \pm 0,8$

dienos tirpiklį gavusių gyvūnų atveju ("kontrolė" fig.4). Gyvūnų, gavusių šio išradimo nepeptidinio CCR1 receptoriaus antagonistu, vidutinis alotransplantato išgyvenimo laikas buvo statistiškai reikšmingas 0,05 lygiu, lyginant su kontrolinių grupių išgyvenimo laiku, o išgyvenimo testo log laipsninė analizė davė $p = 0,0048$ gyvūnams, gavusiems nepeptidinio CCR1 receptoriaus antagonistu, lyginat su kontrole.

Buvo atlikti tyrimai, kuriuose gyvūnai gavo terapiškai efektyvų kiekį šio išradimo nepeptidinio CCR1 antagonistu, t.y. (2R)-1-((4-chlor-2-(ureido)fenoksi)metil)karbonil-2-metil-1-(4-fluorbenzil)piperazino, ir subnefrotoksinį kiekį (2,5 mg/kg) A ciklosporino. Gyvūnų, gavusių tik 2,5 mg/kg A ciklosporino ("Cs 2,5" fig. 4), vidutinis alotransplantato išgyvenimo laikas buvo $7,3 \pm 0,5$ dienos, lyginant su $17,5 \pm 5,9$ dienos gyvūnams, paveiktiems pagal tą pačią metodiką dar ir nepeptidiniu CCR1 receptoriaus antagonistu ("Cs 2,5 + jung" fig.4). Vidutinis alotransplantato išgyvenimo laikas gyvūnams, gavusiems terapinę A ciklosporino dozę (10 mg/kg) ("Cs10" fig.4) buvo $12,9 \pm 0,7$ dienos, lyginant su $18,4 \pm 5,4$ dienos gyvūnams, paveiktiems pagal tą pačią metodiką dar ir nepeptidiniu CCR1 receptoriaus antagonistu ("Cs 10 + jung" fig.4). Gyvūnų, paveiktų arba 2,5, arba 10 mg/kg A ciklosporino plus nepeptidiniu CCR1 receptoriaus antagonistu, vidutiniai išgyvenimo laikų skirtumai, lyginant su gyvūnų, paveiktų tik arba 2,5, arba 10 mg/kg A ciklosporino, išgyvenimo laikais, buvo statistiškai reikšmingi, gaunant atitinkamai $p = 0,0006$ ir $p = 0,0148$ reikšmes.

Infiltruotų monocitų šviesos mikroskopijos ir imunohistologijos tyrimai, kaip aprašyta toliau 5 pavyzdyje ir fig.5, patvirtino šiuos išgyvenimo duomenis. Praėjus 3 dienoms po transplantacijos atmetimo, balai buvo žymiai sumažinti panaudojus kombinuotą gydymą aukščiau aprašytu šio išradimo nepeptidiniu CCR1 receptoriaus antagonistu ir A ciklosporinu ("junginys-A ciklosporinas" fig.5). Imuniškai neslopintuose transplantatuose buvo stebima tanki vienbranduolinė infiltracija. Daug kardiomiocitų buvo pavirtę vakuolėmis arba buvo nekroziniai. Buvo ryškiai išreikšta tarpaudininė edema. A ciklosporinu gydytose žiurkėse uždegiminių ląstelių infiltratas buvo sumažintas, tačiau dar aiškiai matomas, ypač apie venules su židinine kardiomiocitų destrukcija. Žiurkėse, gydytose tik nepeptidiniu CCR1 receptoriaus antagonistu, buvo matomi židininiai vienbranduolinių ląstelių infiltratai, kurie išsiskyrė panašia į

imuniškai neslopintų transplantatų morfologija. Gyvūnai, gydyti ir nepeptidiniu CCR1 receptoriaus antagonistu, ir A ciklosporinu, turėjo gerai išlaikytą širdies morfologiją su nedideliais vienbranduolinių ląstelių infiltratais. Imuniškai neslopintuose transplantatuose dauguma tankaus vienbranduolinių ląstelių infiltrato ląstelių susidėjo iš monocitų/makrofagų, kurie buvo prisigretinę prie kardiomiocitų. A ciklosporinu paveiktose žiurkėse uždegiminių ląstelių infiltratas buvo židininis ir pirmiausia susidėjo iš ED-1 teigiamų ląstelių. Nepeptidiniu CCR1 receptoriaus antagonistu paveiktuose gyvūnuose vienbranduolinių ląstelių infiltratas buvo labai skirtingas: buvo matomi plotai su vidutinio tankumo monocitų infiltratu apie venules. Paveikimas nepeptidinio CCR1 receptoriaus antagonistu ir A ciklosporino deriniu davė drastišką monocitų/makrofagų infiltracijos sumažinimą alogeninių žiurkių širdyse. Remiantis šių tyrimų duomenimis, šio išradimo nepeptidinis CCR1 receptoriaus antagonistas, vartojamas derinyje su A ciklosporinu, duoda aiškų sinerginį efektyvumo padidinimą širdies transplantacijoje, lyginant su vienu nepeptidiniu CCR1 receptoriaus antagonistu arba vienu A ciklosporinu.

Nors nepeptidinio CCR1 receptoriaus antagonistu ir A ciklosporino derinys davė aiškų sinerginį širdies transplantato išgyvenimo pailginimą, išlieka galimybė, kad stebimas efektas yra dėl vaisto/vaisto sąveikų, kurios stabilizuoja A ciklosporino kiekį kraujyje, o ne dėl tikros vaistų derinio sinergijos. Buvo atlikti farmakokinetiniai tyrimai, matuojant A ciklosporino kiekius kraujyje esant ir nesant šio išradimo nepeptidinio CCR1 receptoriaus antagonistu, t.y. (2R)-1-((4-chlor-2-(ureido)fenoksi)metil)karbonil-2-metil-4-(4-fluorbenzil)piperazino, kaip aprašyta toliau 6 pavyzdyje ir fig.6. Vizualinis laiko-koncentracijos kreivių apžiūrėjimas leidžia pastebėti nedidelį A ciklosporino kiekio puslaikio kraujyje pailgėjimą žiurkėse, paveiktose nepeptidiniu CCR1 receptoriaus antagonistu ("jung." fig.6). Tačiau porinių grupių statistikinė analizė parodė, kad nėra reikšmingo skirtumo tarp abiejų apskaičiuotų parametrų (P-reikšmė AUC = 0,224, o $T_{1/2}$ % 0,317). Taigi vaisto/vaisto sąveikos, kaip aiškaus sinerginio širdies transplantato išgyvenimo pailgėjimo žiurkėse, gydytose šio išradimo nepeptidinio CCR1 receptoriaus antagonistu ir A ciklosporino deriniu, gali būti atmestos.

In vitro adhezijos ir ridenimo testai buvo atlikti norint nustatyti ar drastiška monocitų/makrofagų infiltracija į alogeninių žiurkių širdis gali būti,

bent jau dalinai, dėl chemokinių inhibavimo, veikiančio per CCR1 receptorių. Ankstesnis darbas parodė, kad monocitų ląstelės rodo padidintą prisijungimą prie IL-1β-aktyvuotų endotelinių ląstelių, kurios suriša RANTES po preliminarinio 30 min. trukmės inkubavimo su egzogeniniu RANTES (Gröne, H.J. et al., (1999), *supra*). Išskirti žmogaus kraujo monocitai buvo veikiami didėjančiais kiekiais šio išradimo nepeptidinio CCR1 receptoriaus antagonisto, t.y. (2R)-1-((4-chlor-2-(ureido)fenoksi)metil)karbonil-2-metil-4-(4-fluorbenzil)piperazino, ir buvo prijungiami prie mikrovaskulinio endotelio ląstelių kaip aprašyta žemiau 7 pavyzdyje ir fig.7. Buvo parodyta, kad RANTES tarpininkaujama ir šlyčiai atsparų monocitų sukibimą su IL-1β-aktyvuotomis mikrovaskulinio endotelio ląstelėmis nuo dozės priklausomu būdu inhibuoja nepeptidinis CCR1 receptoriaus antagonistas ("jung." fig.7A). Monocitų, patiriančių ridenimą arba išlaikančių ridenimo sąveikas, procentus, kurie tarnauja kaip atvirkštinis monocitų sulaikymo matas, taip pat nuo dozės priklausomu būdu inhibuoja nepeptidinis CCR1 receptoriaus antagonistas ("jung." fig.7B). Šie duomenys aiškiai palaiko šio išradimo nepeptidinio CCR1 receptoriaus antagonisto ir A ciklosporino tikros sinergijos, gydant gyvūnų širdies transplantato atmetimą, koncepciją.

E. ŠIO IŠRADIMO JUNGINIŲ VARTOJIMAS

Šio išradimo farmacinės kompozicijos gali būti vartojamos įvairiais priimtais vartojimo būdais arba su panašiam tikslui tarnaujančiais agentais. Taigi, pavyzdžiui, vartojimas gali būti peroralinis, nosinis, parenterinis, vietinis, transderminis arba rektalinis, vartojama kietoje formoje, pusiau kietoje formoje, liofilizuotų miltelių arba skystose dozuotose formose, tokiose kaip, pavyzdžiui, tabletės, žvakutės, piliulės, minkštos elastingos arba kietos želatinos kapsulės, milteliai, tirpalai, suspensijos, aerozoliai arba panašios formos, geriausia vienetinėse dozuotose formose, tinkančiose paprastam tikslų dozių įvedimui. Į kompozicijas įeis įprastas farmacinis nešiklis arba pagalbinė medžiaga ir šio išradimo junginys taip veiklusis ingredientas ir taip pat gali įeiti kiti medicininiai agentai, vaistiniai agentai, nešikliai, pagalbinės medžiagos ir t.t.

Bendru atveju, priklausomai nuo numatomo vartojimo būdo farmacinėse kompozicijose bus nuo maždaug 1 % iki maždaug 99 % pagal masę kompozicijų veikliųjų ingredientų, t.y. nepeptidinio CCR1 receptoriaus antagonistų arba jo farmaciškai priimtinos druskos ir A ciklosporino, ir nuo 99 % iki 1 % pagal masę tinkamos farmacinės pagalbinės medžiagos. Geriau, kad kompozicijoje būtų nuo maždaug 5 % iki 75 % pagal masę veikliųjų ingredientų, o likusi dalis būtų tinkamos farmacinės pagalbinės medžiagos.

Tinkamiausias vartojimo būdas yra peroralinis, naudojant įprastą dienos dozių režimą, kuris gali būti pritaikytas pagal širdies transplantato atmetimo stiprumo laipsnį. Tokiam peroraliniam vartojimui šio išradimo farmacinės kompozicijos yra sudaromos įterpiant vieną arba daugiau paprastai naudojamų farmacinių pagalbinių medžiagų, tokių kaip, pavyzdžiui, farmacinės grynumo klasės manitolis, laktozė, krakmolas, paželatinintas krakmolas, magnio stearatas, natrio sacharinas, talkas, celiuliozės eteriniai dariniai, gliukozė, želatina, sacharozė, citratas, propilgalatas ir panašios. Tokioms kompozicijoms suteikiama tirpalų, suspensijų, tablečių, piliulių, kapsulių, miltelių, uždelsto išskyrimo kompozicijų ir panašios vaisto formos.

Pageidautina, kad tokioms kompozicijoms būtų suteikiama kapsulių, kaplečių arba tablečių forma ir todėl jose taip pat bus skiediklio, tokio kaip laktozė, sacharozė, dikalcio fosfatas ir panašūs; dezintegranto, tokio kaip natrio kroskarmeliozė arba jos dariniai; tepalo, tokio kaip magnio stearatas ir panašūs; ir rišiklio, tokio kaip krakmolas, gumiarabikas, polivinilpirolidonas, želatina, celiuliozės eteriniai dariniai ir panašūs.

Šio išradimo farmacinės kompozicijos taip pat gali būti suteikta žvakučių forma, imant, pavyzdžiui, nuo 0,5 % iki maždaug 50 % veikliųjų ingredientų, įterptų į nešiklį, kuris lėtai tirpsta kūne, pvz. polioksietilenglikolius ir polietilenglikolius (PEG), pvz. PEG 1000 (96 %) ir PEG 4000 (4 %).

Skystos vaisto vartojimo kompozicijos, pavyzdžiui, gali būti pagamintos ištirpinant, disperguojant ir t.t. šio išradimo farmacinės kompozicijas (nuo maždaug 0,5 % iki maždaug 20 %) ir galimas farmacinės pagalbinės medžiagas nešiklyje, tokiaime kaip, pavyzdžiui, vanduo, fiziologinis tirpalas, vandeninė dekstrozė, glicerolis, etanolis ir panašūs, tokiu būdu gaunant tirpalą arba suspensiją.

Jeigu pageidaujama, šio išradimo farmacinėse kompozicijose taip pat gali būti nedideli kiekiai pagalbinių medžiagų, tokių kaip drėkikliai ir emulsikliai, pH buferuojantys agentai, antioksidantai ir panašios, tokios kaip, pavyzdžiui, citrinų rūgštis, sorbitano monolauratas, trietanolamino oleatas, butilintas hidroksitoluenas ir t.t.

Konkretūs metodai, tinkantys aukščiau minėtoms kompozicijoms pagaminti, yra žinomi specialistams; žr., pavyzdžiui, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Ed., (Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 1990). Širdies transplantato atmetimui gydyti skirtos farmacinės kompozicijos bet kuriuo atveju turės vieną arba daugiau farmaciškai priimtinių pagalbinių medžiagų, terapiškai efektyvų kiekį šio išradimo nepeptidinio CCR1 receptoriaus antagonisto ir subnefrotoksinį kiekį A ciklosporino.

Nepeptidinio CCR1 receptoriaus antagonisto, geriau (I) formulės nepeptidinio CCR1 receptoriaus antagonisto, terapiškai efektyvus kiekis kirs priklausomai nuo daugelio faktorių, įskaitant konkretaus naudojamo junginio aktyvumą, paciento amžių, kūno masę, bendrą sveikatos stovį, lytį ir maistą; vartojimo būdą ir laiką; šalinimo dažnį; atmetimo proceso sunkumą; ir gydomą šeiminką. Paprastai (I) formulės nepeptidinio CCR1 receptoriaus antagonisto terapiškai efektyvi dienos dozė yra nuo maždaug 0,14 mg iki maždaug 14,3 mg/kg kūno masės per dieną, geriau nuo maždaug 0,7 mg iki maždaug 10 mg/kg kūno masės per dieną, o dar geriau nuo maždaug 1,4 mg iki maždaug 7,2 mg/kg kūno masės per dieną. Pavyzdžiui, skiriant iki 70 kg asmeniui, nepeptidinio CCR1 receptoriaus antagonistų dozių intervalas bus nuo maždaug 10 mg iki maždaug 1,0 g per dieną, geriau nuo maždaug 50 mg iki maždaug 700 mg per dieną, o dar geriau nuo maždaug 100 mg iki 500 mg per dieną.

E. ŠIO IŠRADIMO KOMPOZICIJŲ PAGAMINIMAS

Nepeptidiniai šio išradimo CCR1 receptoriaus antagonistai yra pagaminami JAV patente 6207665 aprašytais būdais.

Šio išradimo ciklosporinai yra neutralūs lipofiliniai cikliniai peptidai (11-merai), gaunami iš grybo *Tolypocladium inflatum* Gams, o taip pat iš kitų netikrų grybų. Jie yra gaunami tyrimo tikslams. Du A ciklosporino preparatai –

Sandimmune® ir Neoral® (Novartis) – dabar yra naudojami žmonių organų transplantacijoje atmetimui gydyti.

* * * * *

Toliau duodami pavyzdžiai yra kaip vadovas padėti išradimo praktikoje ir nėra laikomi apribojančiais šio išradimo sferą.

1 pavyzdys

In Vitro testas

CCR1 receptoriaus antagonistų in vitro surišimo testas

Šis testas parodo šio išradimo nepeptidinių CCR1 receptoriaus antagonistų, geriau (I) formulės nepeptidinio CCR1 receptoriaus antagonistų, susirišimo su žiurkės CCR1 receptoriu afiniškumą.

Reagentai ir tirpalai:

- Chemokinai:** MIP-1 α ir RANTES (Preprotech Inc.).
- Ląstelės:** Žiurkės periferinio kraujo vienbranduolinės ląstelės (PBMC) buvo išskirtos iš pilnos sudėties Liuiso žiurkių kraujo panaudojant Accu-paque™ (Accurate Chemical & Scientific Corp.) tankio centrifugavimą.
- Ligandas:** ¹²⁵I-MIP-1 α ir ¹²⁵I-RANTES iš New England Nuclear (specifinis aktyvumas yra 2200 Ci/mmol, 25 μ Ci/ampulei) buvo praskiestas 1 ml H₂O.
- Testavimo buferis:** 130 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MnCl₂, 50 mM Tris, 30 μ g/ml; bacitracino, 0,1 % BSA, pH 7,4.
- Plovimo buferis:** Fosfatinio buferio tirpalas (PBS)
- Išradimo junginiai:** Junginių pradiniai tirpalai buvo 1 mM 100 % DMSO. Didžiausia koncentracija teste buvo 10 μ M ir galėjo būti keičiama priklausomai nuo junginių veiklumo. Buvo padaryti serijiniai 1:3 praskiedimai testavimo buferiu. Paprastai buvo atrinktos 6 kiekvieno junginio

koncentracijos priklausomybės nuo dozės kreivei gauti, iš kurios buvo nustatyta K_i reikšmė.

Testo metodika:

Testai buvo atliekami 96 duobučių v pavidalo dugną turinčiose mikrotitro plokštelėse, esant 100 μ l bendram tūriui.

Žiurkės PBMC buvo plaunamos vieną kartą PBS ir resuspenduotos testavimo buferyje iki maždaug nuo 0,2 iki $1,0 \times 10^6$ ląstelių/ml. Ląstelės buvo inkubuojamos su 125 I-MIP-1 α arba 125 I-RANTES, esant arba nesant keičiamų koncentracijų nežymėto MIP-1 α , RANTES arba junginio, 4 °C temperatūroje 30 minučių.

Reakcijos buvo nutrauktos, paimant alikvotas iš ląstelių suspensijos ir atskiriant ląsteles nuo buferio, ir centrifuguojant per silicio/parafino alyvos mišinį, kaip aprašyta Hesselgesser et al., (1998), supra.

Nespecifinis surišimas buvo nustatytas, esant 100 nM arba 1 μ M nežymėto MIP-1 α arba RANTES. Junginių koncentracijos testavimo buferyje 1:3 praskiedimuose paprastai buvo nuo 10 μ M iki 30 nM, o veiksmingesniems junginiams priklausomai nuo veiksmingumo buvo mažesnės.

Apskaičiavimas:

Buvo gautos kiekvieno junginio priklausomybės nuo koncentracijos kreivės su 6 koncentracijų taškais, ir surišimo duomenys buvo aproksimuoti kreive panaudojant kompiuterinę programą IGOR (Wavemetrics) afiniškumui ir surišimo vietų skaičiui nustatyti.

Šio išradimo nepeptidiniai CCR1 receptoriaus antagonistai, ištyrus juos šiame bandyme, rodė afiniškumą susiršti su žiurkės CCR1 receptoriumi.

2 pavyzdys

In vitro testas: Kalcio išskyrimas

Nepeptidinių CCR1 receptoriaus antagonistų funkcinis in vitro testas

Kadangi CCR1 receptorius reaguoja į susirišimą su jo ligandais (MIP-1 α ir RANTES) paleisdamas į laisvę viduląstelinį kalcį, biologinį aktyvumą galima matuoti pagal kalcio išskyrimo testus, naudojant fluorescencinį dažą

Fura-2. Šiame teste buvo matuojama šio išradimo nepeptidinių CCR1 receptoriaus antagonistų geba blokuoti šį biologinį atsaką.

Eksperimento eiga:

- 1) Žiurkių PBMC buvo išskirtos kaip aprašyta 1 pavyzdyje, suspaustos centrifuguojant ir vėl suspenduotos Hanks Ca^{2+} (50 ml Hanks, 1,0 ml HEPES, 1,6 ml 500 mM CaCl_2 , pH 7,4). Ląstelės buvo plautos du kartus šioje terpėje.
- 2) Ląstelės buvo vėl suspenduotos terpėje gaunant 1×10^6 ląstelių/ml tankį, esant 1,25 μM Fura-2 AM (Molecular Probes) (pradinis tirpalas buvo pagamintas ištirpinant 50 μg Fura-2 50 μl DMSO).
- 3) Ląstelės buvo inkubuojamos 37 °C temperatūroje 30 minučių esant arba nesant įvairioms šio išradimo nepeptidinio CCR1 receptoriaus antagonistų koncentracijoms. Ląstelės buvo plaunamos centrifuguojant kaip aprašyta aukščiau laisvam Fura-2 pašalinti. Ląstelės vėl buvo suspenduotos pagaminant 1×10^6 ląstelių/ml tankį. Tada ląstelių alikvotos (2,0 ml) buvo supiltos į kiuvetę ir sudėtos į PTI Deltascan Model 4000 spektrofluorimetą. Ląstelės buvo stimuliuojamos 50 nM MIP-1 α (Peptotech Inc.) ir spektrofluorimetru matuojamas Ca^{2+} išsiskyrimo priklausomybė nuo laiko.
- 4) Duomenys buvo koreguoti nM Ca^{2+} išskyrimui, pridedant 100 μl 0,1 % Triton X-100 (maksimalioms reikšmėms), po to 100 μl 500 mM EGTA, pH 8,5 (minimalioms reikšmėms).

Šio išradimo nepeptidiniai CCR1 receptoriaus antagonistai, tiriant šiuo testu, parodė sugebėjimą inhibuoti Ca^{2+} išlaisvinimą, atsakant į MIP-1 α susirišimą su žiurkės CCR1 receptoriu.

3 pavyzdys

In vivo testas

Farmakokinetiniai tyrimai bandyme su Liuiso žiurkėmis

Šiuose tyrimuose buvo naudojami specifinių patogenų neturintys (RT1) žiurkių suaugę patinėliai (Charles River, Boston), sveriantys 200-250 g.

Įdedant ciklodekstrino (400 g, Aldich) į 1 l sterilų plastikinį butelį, buvo pagamintas 40 % ciklodekstrino tirpalas. Buvo pridėta nebuferuoto fiziologinio tirpalo, turinčio tik natrio ir kalio chloridų, ir mišinys buvo purtomas ir maišomas per naktį, kad ištirptų. Pridedama fiziologinio tirpalo iki 1 litro bendro tūrio. Šis tirpalas nufiltruojamas per 0,45 µm filtrą į sterilų butelį, užklijuojama etiketė ir laikomas 4 °C temperatūroje. 25 mg/ml koncentracijos junginio tirpalas ciklodekstrine buvo pagaminamas ištirpinant junginį 40 % ciklodekstrino tirpale fiziologiniame tirpale. Mišinys purtomas ir po to pridedama 230 µl konc. HCl. Mišinys maišomas, kad medžiagos ištirptų. Kai visiškai ištirpsta (1 val.) išmatuojamas tirpalo pH ir pridedama 1M KOH, kad pH padidėtų iki 4,5. Tirpalas nufiltruojamas per 0,45 µm filtrą ir laikomas 4 °C temperatūroje.

Šio išradimo nepeptidinių CCR1 receptoriaus antagonistų tirpalai buvo paruošti 40 % ciklodekstrino/fiziologinio tirpalo skiediklyje ir pelėms buvo leidžiami po oda (s.c.) (50mg/kg tris kartus per dieną) septynias dienas. Panaudojant širdies punkciją, įvairiu laiku buvo paimti kraujo mėginiai į EDTA turinčius mėgintuvėlius, nucentrifuguoti ir plazma buvo laikoma sušaldyta iki vaisto kiekių nustatymo.

Plazmos mėginiai buvo analizuoti arba HPLC, naudojant UV detekcijos metodus, arba HPLC-MS (apspinduliavimo elektronais variantas, veikiantis teigiamų jonų variante). Šio išradimo nepeptidinių CCR1 receptoriaus antagonistų koncentracijos buvo nustatytos iš kalibracijos kreivės, gautos panaudojant plazmą ir analizuojant vienodomis sąlygomis. Šiose analizėse vidiniais standartais buvo naudojami giminingi junginiai.

HPLC-UV metodas:

- 1) Plazmos mėginių 100 µl alikvotos buv įdedamos į 200 µl ledu atšaldyto parūgštinto metanolio (1 % acto rūgšties), turinčio fiksuotą kiekį vidinio standarto ir gerai sumaišoma.
- 2) Gautos baltymo nuosėdos pašalintos centrifuguojant esant 5000xg ir surinkti nuopilai.
- 3) Lygiagrečiai į kontrolinės plazmos pavyzdžius buvo pridėta įvairūs kiekiai nepeptidinių šio išradimo CCR1 receptoriaus antagonistų,

paprastai 0,3-25 μ M koncentracijų ribose, ir apdorojama aukščiau aprašytu būdu.

- 4) Nuopilai buvo sausai nugarinti vakuuminiame garintuve, praskiesti 1:2 metanolio:vandens tirpalu (turinčiu 0,1 % TFA), papurtyti 30 sek. ir nucentrifuguoti nuosėdoms pašalinti.
- 5) Gauti nuopilai buvo suleisti į YMC AQ ODS atvirkštinių fazių kolonėlę ir analizuojami gradientinės HPLC sąlygomis, esant 1 ml/min. srauto greičiui. UV detektoriaus bangos ilgis buvo 230 nm.
- 6) Gradiento sąlygos buvo: pradžioje – A tirpiklio 22 %/B tirpiklio 78 %; 2 min. - A tirpiklio 22 %/B tirpiklio 78 %; 33 min. - A tirpiklio 45 %/B tirpiklio 55 %; 37 min. - A tirpiklio 80 %/B tirpiklio 20 %; 47 min. - A tirpiklio 80 % B tirpiklio 20 %; 49 min.- atgal į pradines sąlygas.
- 7) Smalių plotų santykiai tarp vidinio standarto smailės ir junginio smailės buvo apskaičiuoti standartinės kreivės koncentracijų ribose ir šis santykis buvo naudojamas kalibracinei kreivei gauti. Dominančio junginio koncentracija buvo išvesta iš šios kreivės, skaičiuojant junginio ir vidinio standarto smalių plotų santykį.

HPLC MS metodas:

- 1) Naudojama metodika buvo panaši į aukščiau aprašytą, išskyrus tai, kad mėginio paruošimas buvo sustabdytas nusodinimo metanolio stadijoje ir vietoj gradientino metodo buvo naudojamas trumpas izokratinis metodas.
- 2) Buvo naudojamas FISIONS VG Platform vienkvadrupolinis prietaisas su elektronų srauto įleidimu, veikiantis esant 3,57 kV. Buvo naudojama YMC AQ ODS atvirkštinių fazių kolonėlė, esant 1 ml/min. greičiui, ir visas srautasėjo į UV detektorius, kuriame bangos ilgis buvo 214 nm.
- 3) Srautas buvo suskaldytas taip, kad 50 μ l/min. įeity į masių spektrometrą. Chromatogramos buvo registruojamos iš viso 7,5 min mėginiui, įleidus 50 μ l į kolonėlę. Jonai buvo renkami vieno jono teigiamos jonizacijos mode.
- 4) Kiekybinis įvertinimas buvo gaunamas integruojant jonų srovių plotą (šio išradimo kontrolinio nepeptidinio CCR1 receptoriaus antagonistų ir vidinių standartų) ir gaunant kalibracinę kreivę, kaip aprašyta aukščiau.

Šio išradimo nepeptidiniai CCR1 receptoriaus antagonistai, ištirti šiame bandyme, rodė adekvačius vaisto kiekius žiurkės plazmoje per 24 val. laikotarpį.

4 pavyzdys

In vivo testas

Heterotopinio širdies transplantato atmetimas (Liuiso arba ACI žiurkės)

Šiuose tyrimuose buvo naudojami suaugę specifinių bepatogeninių ACI (RT1a) ir Liuiso (RT1) žiurkių patinėliai (Charles river, Boston, MA), sveriantys 200-250 g, atitinkamai kaip donorai ir recipientai. Vaskuliarizuoti širdies alotransplantatai buvo heterotopiškai transplantuoti į žiurkių-recipienčių pilvo ertmę, naudojant Ono ir Lindsay (Ono, K. et al., (1969), *supra*) metodikos modifikaciją (Nisco, s. et al., (1994), *supra*). Iš donorinės širdies aukšty n kylančios aortos į recipiento abdominalinę aortą ir iš donoro plautinės arterijos į recipiento žemesniąją tuščiąją veną buvo padaryti galo-šono tipo sujungimai, po to buvo perrištos tuščioji vena ir donorinės širdies plautinės venos. Abdominaliniai alotransplantatai buvo kasdien palpuojami, norint įvertinti transplantato funkcionavimą, ir atmetimas buvo laikomas visišku tada, kai nutrūkdavo apčiuopiami širdies skilvelio susitraukimai.

Širdies alotransplantatai iš ACI žiurkių buvo heterotopiškai persodinti į Liuiso žiurkių-recipienčių pilvo ertmę ir šiems gyvūnams buvo duodama: arba 40 % ciklodekstrino s.c. tris kartus per dieną; arba 50 mg/kg šio išradimo nepeptidinio CCR1 receptoriaus antagonisto 40 %-niame ciklodekstrine s.c. tris kartus per dieną; arba 10 mg/kg A ciklosporino alyvų aliejuje per skrandžio zondą vieną kartą per dieną 4 dienas; arba 2,5 mg/kg A ciklosporino alyvų aliejuje per skrandžio zondą vieną kartą per dieną per visą tyrimo laikotarpį; arba 10 mg/kg A ciklosporino alyvų aliejuje per skrandžio zondą vieną kartą per dieną 4 dienas plus 50 mg/kg nepeptidinio CCR1 receptoriaus antagonisto 40 %-niame ciklodekstrine s.c. tris kartus per dieną; arba 2,5 mg/kg A ciklosporino alyvų aliejuje per skrandžio zondą vieną kartą per dieną per visą tyrimo laikotarpį plus 50 mg/kg nepeptidinio CCR1 receptoriaus antagonisto 40 %-niame ciklodekstrine s.c. tris kartus per dieną.

Transplantuotos širdys buvo apžiūrinėjamos kadien, ar tyrimo eigoje yra atmetimo ženklų.

Šio išradimo nepeptidiniai CCR1 receptoriaus antagonistai, ištirti šiame bandyme, rodė sugebėjimą žymiai pailginti širdies transplantato išgyvenimo laiką, kai jie yra duodami kartu su A ciklosporinu.

5 pavyzdys

In vivo testas

Histologija, imunohistochemija ir morfometrija

Transplantuotos širdys buvo išimtos gilios anestezijos sąlygomis, greitai nuspaustas kraujas, pasvertos ir po to apdorotos taip, kaip reikia histologijai ir imunohistochemijai. Organai buvo supjaustyti 1 mm riekelėmis ir kiekviena iš jų fiksuota įmerkiant į 4 % formaldehidą fosfato-druskos buferyje (PBS), pH 7,5 (PBS: 99 mM NaH_2PO_4 , 108 mM NaH_2PO_4 ir 248 mM NaCl) 24 valandoms arba fiksuoti metakame 8 valandoms ir įtvirtinti parafine. Šviesos mikroskopija buvo daroma su 3 μm atpjovomis, nudažytomis panaudojant periodinį rūgštinį Schiff arba Goldner-Elastica. Šviesos mikroskopija buvo daroma su alogeniniais širdies transplantatais praėjus 3 dienoms po transplantacijos.

ED1 monokloninis antikūnas (Serotec/Camon) buvo naudotas tirti metakamu fiksuotam įtvirtintam parafine audiniui (3 μm), norint nudažyti žiurkės monocitus/makrofagų ląsteles. Vizualizacijai buvo naudojama šarminės fosfatazės anti-šarminės fosfatazės detekcijos sistema (Dako). Neigiamam nudažymui buvo atliekamos kontrolės, kurios nereaguoja į pirmąjį arba antrąjį antikūno, kiekvienai atpjovai. ED1-teigiamų monocitų/makrofagų imunohistologinis dažymas alogeniniuose širdies transplantatuose buvo atliekamas praėjus 3 dienoms po transplantacijos.

Alogeninės žiurkės širdies histopatologinis atmetimas buvo laipsniuojamas pagal Billingham (Billingham, M.E. In: *Cardiac transplantation*, pp. 133-152, Butterworths, Boston, 1990). Silpnas ūmus atmetimas (balų skaičius: 1) buvo apibūdinamas padriku tarpudininiu vienbranduoliniu infiltratu, dažnai sustiprėjusiu perivaskulinėse vietose. Vidutinis ūmus

atmetimas (balų skaičius: 2) buvo vidutinio tankio perimocitinis vienbranduolinis infiltratas su kai kurių miocitų nekroze. Sunkus ūmus atmetimas (balų skaičius: 3) atrodė kaip tankus monocitinis infiltratas su židinine hemoragija ir miocitų pakeitimu ir su atsitiktiniais intramuralinių arterijų endotelialitais. Atmetimo balai buvo apskaičiuoti kiekvienam audinių blokui ir iš įvairių blokų buvo apskaičiuotas vidutinis balų skaičius kiekvienai transplantuotai širdžiai, nes atmetimo procesas linko į židininį.

Šio išradimo nepeptidiniai CCR1 receptoriaus antagonistai, ištirti šiame bandyme, žymiai sumažino atmetimo balų skaičių ir transplantato infiltracijos monocitais apimtį, kai jie buvo duoti derinyje su A ciklosporinu.

6 pavyzdys

In vivo testas

A ciklosporino kiekiai žiurkių kraujyje

Liuiso žiurkėms su įtaisytomis kaniulėmis (6 gyvūnai grupėje) buvo duota arba vienkartinė 2,5 mg/kg A ciklosporino dozė (Neoral Oral tirpalas, Sandoz, East Hanover, NJ), praskiesta alyvų aliejumi, arba vienkartinė to paties A ciklosporino dozė po 50 mg/kg šio išradimo nepeptidinio CCR1 receptoriaus antagonisto 40 %-niame ciklodekstrine s.c. injekcijos tris kartus per dieną. Antikoaguliantu naudojant EDTA įvairiu laiku po dozės įvedimo buvo imamas pilnas kraujas. A ciklosporino kiekiai kraujyje buvo matuojami naudojant Cyclo-Trac SP-Whole Blood Radioimmunoassay for Cyclosporin rinkinį (DiaSorin, Stillwater, MN) pagrindinai pagal gamintojo nurodymus. Prieš testą standartai, kontrolės ir mėginiai buvo ekstrahuojami metanolio. Šie metanoliniai ekstraktai buvo sumaišomi su ^{125}I -žymėtu ciklosporinu. Buvo pridėta pelės monokloninio antikūno prieš A ciklosporiną ir asilo anti-pelės antikūno mišinio, kaip vieno reagento. Po 1 valandos inkubavimo, mėgintuvėliai buvo nucentrifuguoti, nupilti ir išmatuotas radioaktyvumas. Radioaktyvumo kiekis nuosėdose buvo atvirkščiai proporcingas A ciklosporino koncentracijai mėginyje. Naudojant 4 parametrų logistinę kreivės pritaikymo programą, buvo gauta kalibracijos kreivė, nubraižant surišimo dydį nuo koncentracijos log. Iš standartinės kreivės buvo interpoliuotos A ciklosporino koncentracijos.

Šio išradimo nepeptidiniai CCR1 receptoriaus antagonistai, ištirti šiame bandyme, nežymiai veikė ciklosporino pasišalinimo puslaikį žiurkių kraujyje.

7 pavyzdys

In vitro testas: monocitų sulipimas ir ridenimas

Nepeptidinių CCR1 receptoriaus antagonistų funkcinis in vitro testas

Monocitų sąveika su endotelium buvo tirta laminarinio tekėjimo testuose pagal duotą aprašymą (Gröne, H.J. et al. (1999), supra, ir Weber, K.S. et al., *Eur. J. Immunol.* (1999), vol.29, pp.700-712). Žmogaus odos mikrovaskulinio endotelio ląstelės buvo auginamos iki susilieimo Petri lėkštelėse ir stimuliuotos 10 ng/ml IL-1 β 12 valandų arba paliktos neapdorotos. Prieš tyrimą ląstelės buvo inkubuotos su 10 ng/ml RANTES 30 minučių. Plokštelės buvo surinktos kaip apatinė sienelė lygiagrečių sienelių srovės kameroje ir sumontuotos ant Olympus IMT-2 perverso mikroskopo platformos su 20x ir 40x fazių kontrasto objektyvais. Žmogaus kraujo monocitai buvo išskirti panaudojant Nycodenz hiperosmolinį gradientinį centrifugavimą ir vėl suspenduoti gaunant 5×10^6 ląstelių/ml testavimo buferyje (10 mM HEPES, 0,5 % HSA, pH 7,4). Prieš pat bandymą Mg^{2+} ir Ca^{2+} koncentracijos sureguliuojamos iki 1 mM. Tyrimo metu ląstelių suspensijos buvo laikomos šildymo bloke 37 °C temperatūroje ir perfunduojamos į srovės kamerą 1,5 dinų/cm² ($1,5 \times 10^{-5}$ N/cm²) greičiu 5 minutes. Inhibavimo eksperimentuose monocitai buvo prieš tai inkubuojami 10 minučių 37 °C temperatūroje su įvairiomis šio išradimo CCR1 receptoriaus nepeptidinių antagonistų koncentracijomis arba DMSO kontrole. Tvirtai prikibusių ląstelių skaičius buvo matuojamas mažiausiai penkiuose laukeliuose, analizuojant atvaizdus, užregistruotus ilgo integravimo JVC 3CCD vaizdo kamera ir JVC SR 900 E vaizdo registratoriumi. Rezultatai išreikšti ląstelėmis/mm². Kaip atvirkštinis prilipimo matas, buvo nustatomas skaičius monocitų, riedančių esant mažai šlyčiai, maždaug kas 30 sekundžių 5 minučių laikotarpyje ir išreiškiamas kaip bendrų sąveikų analizuojamuose laukeliuose procentai.

Šio išradimo nepeptidiniai CCR1 receptoriaus antagonistai, ištyrus šiame teste, inhibavo monocitų sulipimą su aktyvuotomis endotelio ląstelėmis ir padidino monocitų, kurie patiria arba palaiko riedėjimą, procentus.

8 pavyzdys

Šis pavyzdys iliustruoja šio išradimo pavyzdinių farmacinių kompozicijų peroraliniam vartojimui pagaminimą:

A.	<u>Ingredientai</u>	<u>masės/masės %</u>
	Veiklieji ingredientai	20,0 %
	Laktozė	79,5 %
	Magnio stearatas	0,5 %

Aukščiau nurodyti ingredientai sumaišomi ir supilstomi į kieto apvalkalo želatinines kapsules po 100 mg (viena kapsulė turėtų būti maždaug visa dienos dozė).

B.	<u>Ingredientai</u>	<u>masės/masės %</u>
	Veiklieji ingredientai	20,0 %
	Magnio stearatas	0,9 %
	Kraskmolas	8,6 %
	Laktozė	69,6 %
	PVP (polivinilpirolidonas)	0,9 %

Aukščiau nurodyti ingredientai, išskyrus magnio stearatą, sumaišomi ir granuliuojami, granuliavimo skysčiu naudojant vandenį. Tada ši kompozicija išdžiovinama, sumaišoma su magnio stearatu ir atitinkama tabletavimo mašina suformuojamos tabletės.

C.	<u>Ingredientai</u>	
	Veiklieji ingredientai	0,1 g
	Propilenglikolis	20,0 g
	Polietilenglikolis 400	20,0 g
	Polisorbatas 80	1,0 g
	Vanduo	q.s. 100 ml

Veiklieji ingredientai ištirpinami propilenglikolyje, polietilenglikolyje 400 ir polisorbate 80. Po to maišant pridedamas pakankamas kiekis vandens, kad būtų gaunama 100 ml tirpalo, kuris nufiltruojamas ir supilstomas į buteliukus.

D.	<u>Ingredientai</u>	<u>masės/masės %</u>
	Veiklieji ingredientai	20,0 %
	Žemės riešutų aliejus	78,0 %
	Spanas 60	2,0 %

Aukščiau nurodyti ingredientai išlydomi, sumaišomi ir supilstomi į minkštas elastines kapsules.

E.	<u>Ingredientai</u>	<u>masės/masės %</u>
	Veiklieji ingredientai	1,0 %
	Metil- arba karboksimetilceliuliozė	2,0 %
	0,9 % fiziologinis tirpalas	q.s. 100 ml

Veiklieji ingredientai ištirpinami celiuliozės/fiziologiniame tirpale, tirpalas nufiltruojamas ir supilstomas į buteliukus naudojimui.

9 pavyzdys

Šis pavyzdys iliustruoja išradimo pavyzdinės farmacinės kompozicijos parenteriniam vartojimui pagaminimą:

<u>Ingredientai</u>	
Veiklieji ingredientai	0,02 g
Propilenglikolis	20,0 g
Polietilenglikolis 400	20,0 g
Polisorbatas 80	1,0 g
0,9 % fiziologinis tirpalas	q.s. 100 ml

Veiklieji ingredientai ištirpinami propilenglikolyje, polietilenglikolyje 400 ir polisorbate 80. Po to maišant pridedama 0,9 % fiziologinio tirpalo, kad susidarytų 100 ml i.v. tirpalo, kuris nufiltruojamas per 0,2 µm membraninį filtrą ir išfasuojamas steriliomis sąlygomis.

10 pavyzdys

Šis pavyzdys iliustruoja šio išradimo žvakučių formos pavyzdinės farmacinės kompozicijos pagaminimą:

<u>Ingredientai</u>	<u>masės/masės %</u>
Veiklieji ingredientai	1,0 %
Polietilenglikolis 1000	74,5 %
Polietilenglikolis 4000	24,5 %

Šie ingredientai sulydomi kartu, sumaišomi ant garų vonios ir supilami į formas po 2,5 g bendros masės.

11 pavyzdys

Šis pavyzdys iliustruoja šio išradimo pavyzdinės farmacinės kompozicijos, skirtos įpūtimui, pagaminimą:

<u>Ingredientai</u>	<u>masės/masės %</u>
Labai susmulkinti veiklieji ingredientai	1,0 %
Labai susmulkinta laktozė	99,0 %

Šie ingredientai sumalami, sumaišomi ir sudedami į įpūtiklį, turintį dozavimo pompą.

12 pavyzdys

Šis pavyzdys iliustruoja šio išradimo pavyzdinės farmacinės kompozicijos sroviniame purkštuve pagaminimą:

<u>Ingredientai</u>	<u>masės/masės %</u>
Veiklieji ingredientai	0,005 %
Vanduo	89,995 %
Etanolis	10,000 %

Veiklieji ingredientai ištirpinami etanolyje ir sumaišomi su vandeniu. Po to kompozicija fasuojama į srovinį purkštuvą, turintį dozavimo pompą.

13 pavyzdys

Šis pavyzdys iliustruoja šio išradimo aerozolio formos pavyzdinės farmacinės kompozicijos pagaminimą:

<u>Ingredientai</u>	<u>masės/masės %</u>
Veiklieji ingredientai	0,10 %

Propelantas 11/12	98,90 %
Oleino rūgštis	1,00 %

Veiklieji ingredientai disperguojami oleino rūgštyje ir propelantuose. Po to gautas mišinys supilamas į aerosolinį konteinerį, turintį dozavimo vožtuvą.

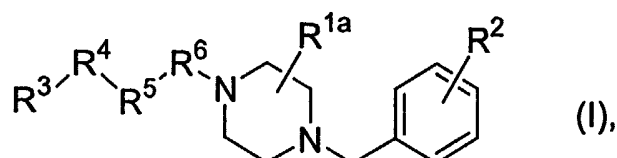
* * * * *

Nors šis išradimas buvo aprašytas duodant nuorodas į konkrečius jo įgyvendinimo variantus, šios srities specialistams turėtų būti suprantama, kad gali būti padaryti įvairūs pakeitimai ir ekvivalentai, nenukrypstant nuo tikros šio išradimo prasmės ir esmės. Be to, gali būti padaryta daug modifikacijų pritaikymui prie konkrečios situacijos, medžiagos, kompozicijos, proceso, proceso stadijos arba stadijų, prie tikslo, esmės arba šio išradimo sferos. Laikoma, kad visas tokias modifikacijas apima toliau duota apibrėžtis.

Išradimo apibrėžtis

1. Farmacinė kompozicija, tinkanti žinduolių širdies transplantato atmetimui gydyti, besiskirianti tuo, kad į ją įeina viena arba daugiau farmaciškai priimtinių pagalbinių medžiagų, terapiškai efektyvus kiekis nepeptidinio CCR1 receptoriaus antagonisto ir subnefrotoksinis kiekis A ciklosporino.

2. Farmacinė kompozicija pagal 1 punktą, besiskirianti tuo, kad nepeptidinis CCR1 receptoriaus antagonistas yra junginys, pasirinktas iš (I) formulės junginių:



kuriuose:

R^{1a} yra vienas arba daugiau pakaitų, nepriklausomai pasirinktų iš grupės, susidedančios iš alkilo arba hidroksialkilo;

R^2 yra fluoras 4-je padėtyje;

R^3 yra fenilas, 4-je padėtyje pakaitu turintis chlorą, o 2-je padėtyje aminokarbonilą, ureidogrupę, arba glicinamidogrupę;

R^4 yra -O-;

R^5 yra metilenas; o

R^6 yra -C(O)-;

kaip atskiras stereoizomeras arba jų mišinys; arba jo farmaciškai priimtina druska.

3. Farmacinė kompozicija pagal 2 punktą, besiskirianti tuo, kad nepeptidinis CCR1 receptoriaus antagonistas yra pasirinktas iš grupės, susidedančios iš:

(2R,5S)-1-((4-chlor-2-(aminokarbonil)fenoksi)metil)karbonil-2,5-dimetil-4-(4-fluorbenzil)piperazino;

(trans)-1-((4-chlor-2-(glicinamido)fenoksi)metil)karbonil-2,5-dimetil-4-(4-fluorbenzil)piperazino;

(2R)-1-((4-chlor-2-(ureido)fenoksi)metil)karbonil-2-metil-4-(4-fluorbenzil)piperazino;

(trans)-1-((4-chlor-2-(ureido)fenoksi)metil)karbonil-2,5-dimetil-4-(4-fluorbenzil)piperazino;

(2R,5S)-1-((4-chlor-2-(ureido)fenoksi)metil)karbonil-2,5-dimetil-4-(4-fluorbenzil)piperazino; ir

(2R,5S)-1-((4-chlor-2-(glicinamido)fenoksi)metil)karbonil-2,5-dimetil-4-(4-fluorbenzil)piperazino.

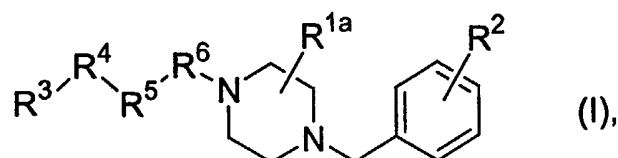
4. Farmacinė kompozicija pagal 2 punktą, besiskirianti tuo, kad nepeptidinis CCR1 receptoriaus antagonistas yra (2R)-1-((4-chlor-2-(ureido)fenoksi)metil)karbonil-2-metil-4-(4-fluorbenzil)piperazinas.

5. Farmacinė kompozicija pagal 4 punktą, besiskirianti tuo, kad jos reikalingas žinduolis yra žmogus.

6. Farmacinė kompozicija, turinti vieną arba daugiau farmaciškai priimtinių pagalbinių medžiagų, terapiškai efektyvų kiekį nepeptidinio CCR1 receptoriaus antagonisto ir subnephrotoksinį kiekį A ciklosporino, skirta vartoti žinduolių širdies transplantato atmetimo gydymui.

7. Farmacinė kompozicija pagal 6 punktą, besiskirianti tuo, kad nepeptidinis CCR1 receptoriaus antagonistas ir A ciklosporinas yra skirti įvedimui jų reikalingam žinduoliui vienu metu arba vienas po kito.

8. Farmacinė kompozicija pagal 7 punktą, besiskirianti tuo, kad nepeptidinis CCR1 receptoriaus antagonistas yra junginys, pasirinktas iš (I) formulės junginių:



kuriuose:

R^{1a} yra vienas arba daugiau pakaitų, nepriklausomai pasirinktų iš grupės, susidedančios iš alkilo arba hidroksialkilo;

R² yra fluoras 4-je padėtyje;

R³ yra fenilas, 4-je padėtyje pakaitu turintis chlorą, o 2-je padėtyje aminokarbonilą, ureidogrupę, arba glicinamidogrupę;

R⁴ yra -O-;

R⁵ yra metilenas; o

R⁶ yra -C(O)-;

kaip atskiras stereoizomeras arba jų mišinys; arba jo farmaciškai priimtina druska.

9. Farmacinė kompozicija pagal 8 punktą, besiskirianti tuo, kad nepeptidinis CCR1 receptoriaus antagonistas yra pasirinktas iš grupės, susidedančios iš:

(2R,5S)-1-((4-chlor-2-(aminokarbonil)fenoksi)metil)karbonil-2,5-dimetil-4-(4-fluorbenzil)piperazino;

(trans)-1-((4-chlor-2-(glicinamido)fenoksi)metil)karbonil-2,5-dimetil-4-(4-fluorbenzil)piperazino;

(2R)-1-((4-chlor-2-(ureido)fenoksi)metil)karbonil-2-metil-4-(4-fluorbenzil)piperazino;

(trans)-1-((4-chlor-2-(ureido)fenoksi)metil)karbonil-2,5-dimetil-4-(4-fluorbenzil)piperazino;

(2R,5S)-1-((4-chlor-2-(ureido)fenoksi)metil)karbonil-2,5-dimetil-4-(4-fluorbenzil)piperazino; ir

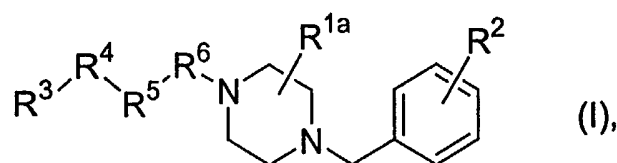
(2R,5S)-1-((4-chlor-2-(glicinamido)fenoksi)metil)karbonil-2,5-dimetil-4-(4-fluorbenzil)piperazino.

10. Farmacinė kompozicija pagal 8 punktą, besiskirianti tuo, kad nepeptidinis CCR1 receptoriaus antagonistas yra (2R)-1-((4-chlor-2-(ureido)fenoksi)metil)karbonil-2-metil-4-(4-fluorbenzil)piperazinas.

11. Farmacinė kompozicija pagal 8 punktą, besiskirianti tuo, kad jos reikalingas žinduolis yra žmogus.

12. Farmacinė kompozicija, į kurią įeina viena arba daugiau farmaciškai priimtinių pagalbinių medžiagų, terapiškai efektyvus kiekis nepeptidinio CCR1 receptoriaus antagonisto ir subnefrotoksinis kiekis A ciklosporino, skirta panaudoti žinduolių širdies transplantato atmetimo gydymui, ją skirant tokio gydymo reikalingam žinduoliui.

13. Farmacinė kompozicija pagal 12 punktą, besiskirianti tuo, kad nepeptidinis CCR1 receptoriaus antagonistas yra junginys, pasirinktas iš (I) formulės junginių:



kuriuose:

R^{1a} yra vienas arba daugiau pakaitų, nepriklausomai pasirinktų iš grupės, susidedančios iš alkilo arba hidroksialkilo;

R^2 yra fluoras 4-je padėtyje;

R^3 yra fenilas, 4-je padėtyje pakaitu turintis chlorą, o 2-je padėtyje aminokarbonilą, ureidogrupę, arba glicinamidogrupę;

R^4 yra -O-;

R^5 yra metilenas; o

R^6 yra -C(O)-;

kaip atskiras stereoizomeras arba jų mišinys; arba jo farmaciškai priimtina druska.

14. Farmacinė kompozicija pagal 13 punktą, besiskirianti tuo, kad nepeptidinis CCR1 receptoriaus antagonistas yra pasirinktas iš grupės, susidedančios iš:

(2R,5S)-1-((4-chlor-2-(aminokarbonil)fenoksi)metil)karbonil-2,5-dimetil-4-(4-fluorbenzil)piperazino;

(trans)-1-((4-chlor-2-(glicinamido)fenoksi)metil)karbonil-2,5-dimetil-4-(4-fluorbenzil)piperazino;

(2R)-1-((4-chlor-2-(ureido)fenoksi)metil)karbonil-2-metil-4-(4-fluorbenzil)piperazino;

(trans)-1-((4-chlor-2-(ureido)fenoksi)metil)karbonil-2,5-dimetil-4-(4-fluorbenzil)piperazino;

(2R,5S)-1-((4-chlor-2-(ureido)fenoksi)metil)karbonil-2,5-dimetil-4-(4-fluorbenzil)piperazino; ir

(2R,5S)-1-((4-chlor-2-(glicinamido)fenoksi)metil)karbonil-2,5-dimetil-4-(4-fluorbenzil)piperazino.

15. Farmacinė kompozicija pagal 13 punktą, besiskirianti tuo, kad nepeptidinis CCR1 receptoriaus antagonistas yra (2R)-1-((4-chlor-2-(ureido)fenoksi)metil)karbonil-2-metil-4-(4-fluorbenzil)piperazinas.

16. Farmacinė kompozicija pagal 15 punktą, besiskirianti tuo, kad jo reikalingas žinduolis yra žmogus.

17. Farmacinė kompozicija pagal 15 punktą, besiskirianti tuo, kad nepeptidinis CCR1 receptoriaus antagonistas ir A ciklosporinas yra skirti įvedimui jų reikalingam žinduoliui vienu metu arba vienas po kito.

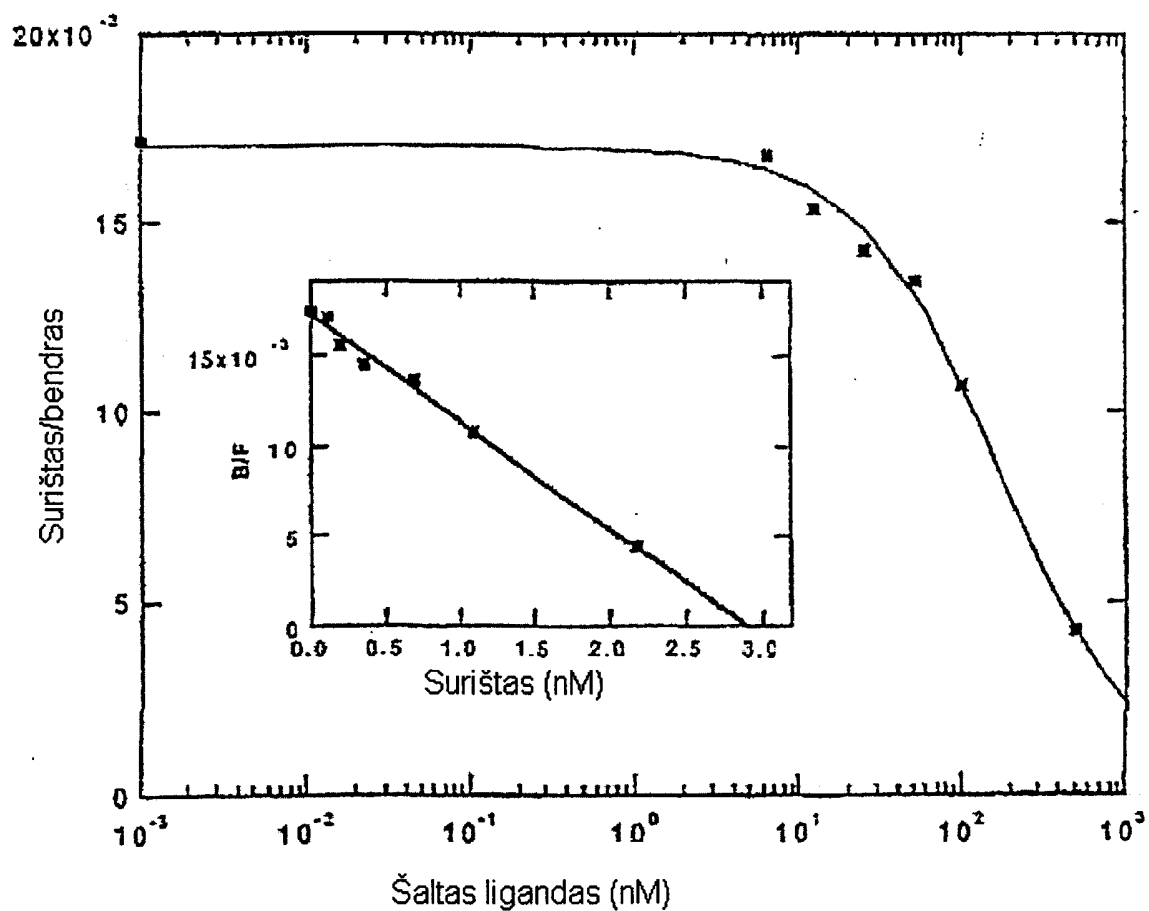


Fig. 1

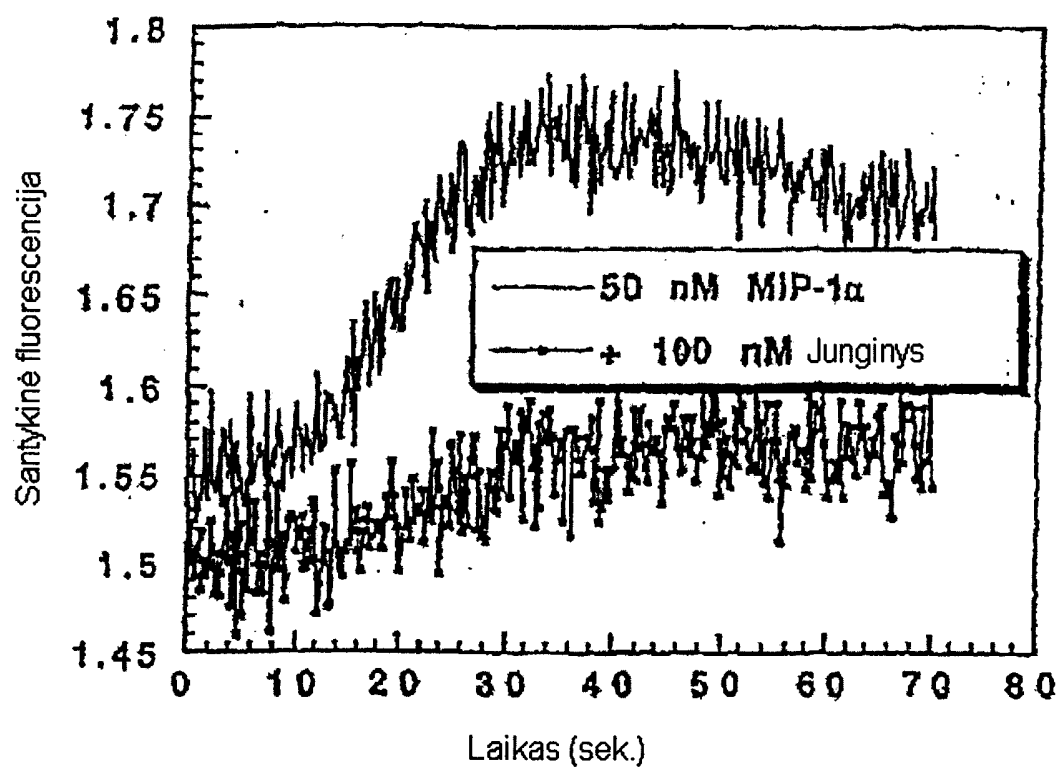


Fig.2

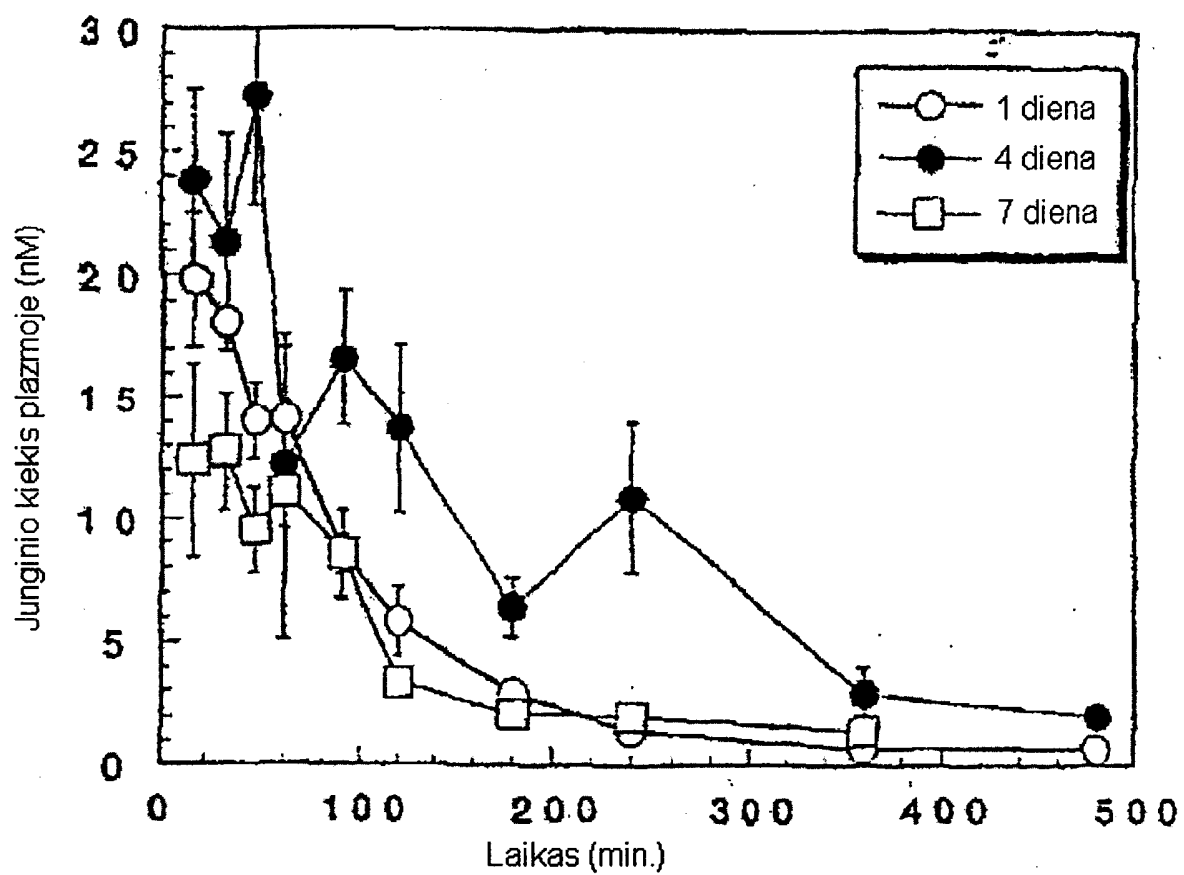


Fig.3

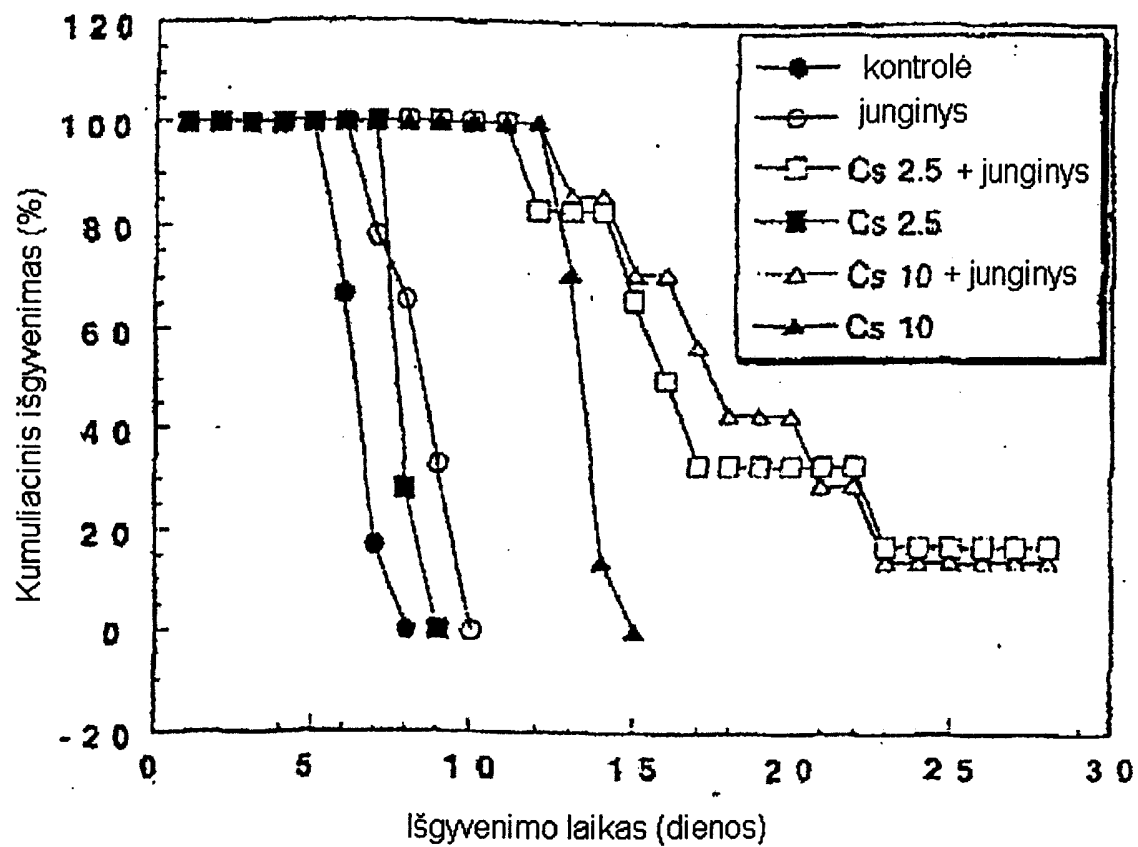


Fig.4

<u>Grupė</u>	<u>N</u>	<u>n</u>	<u>Atmetimo laipsnis</u>
Kontrolė – alyva	2	9	1,72±0,24
Kontrolė – A ciklosporinas	3	15	1,45±0,25
Junginys – alyva	2	9	1,44 ±0,29
Junginys – A ciklosporinas	3	12	0,65±0,14

Ciklosporino A buvo paskirta 2,5 mg/kg. Išradimo CCR1 antagonistu buvo paskirta 50 mg/kg. N = gyvūnų skaičius, n = audinio blokų, ištirtų grupėje, skaičius. Vidurkis ± SEM.

Fig.5

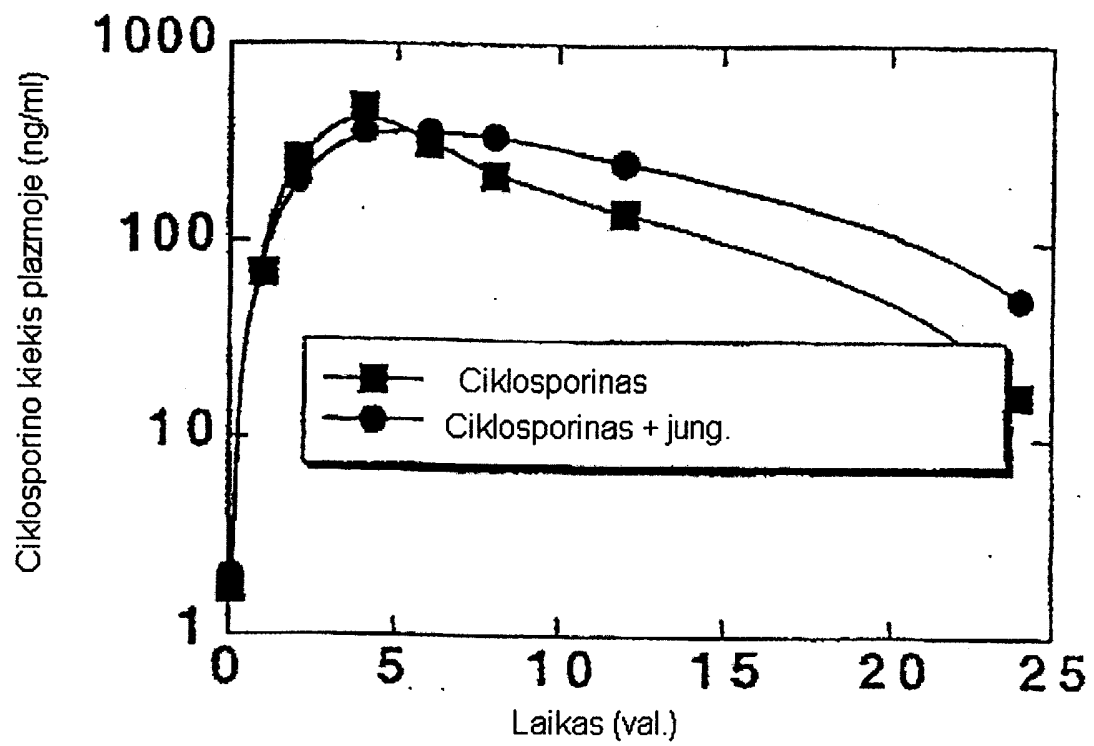


Fig.6

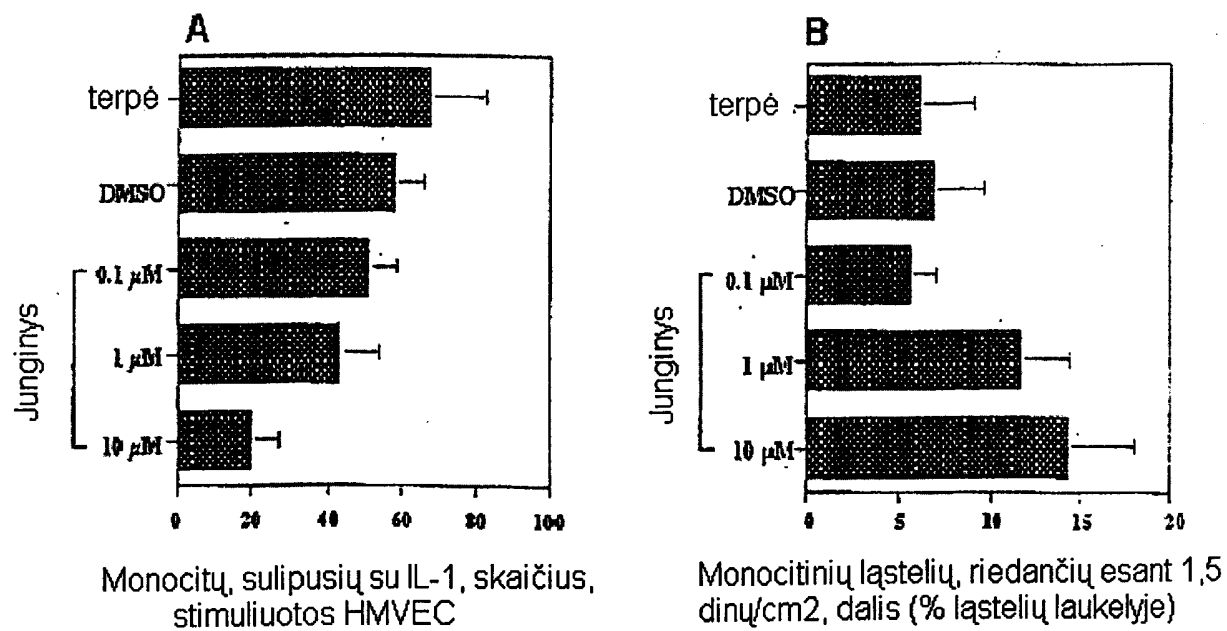


Fig.7