



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104906572 A

(43) 申请公布日 2015. 09. 16

(21) 申请号 201510089937. 5

A61P 37/06(2006. 01)

(22) 申请日 2010. 10. 06

(30) 优先权数据

09172364. 3 2009. 10. 06 EP

(62) 分案原申请数据

201080045208. 5 2010. 10. 06

(71) 申请人 多姆皮制药公司

地址 意大利米兰

(72) 发明人 洛伦佐·皮耶蒙蒂

路易莎·达丰希奥

马尔塞洛·阿莱格雷蒂

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 郑斌 韩宏星

(51) Int. Cl.

A61K 39/39(2006. 01)

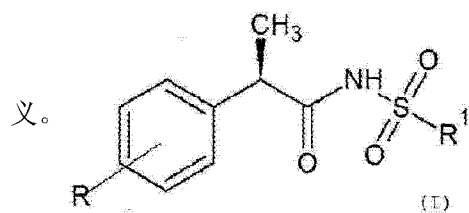
权利要求书1页 说明书8页 附图11页

(54) 发明名称

在胰岛移植中作为佐剂的 CXCR1/2 抑制剂

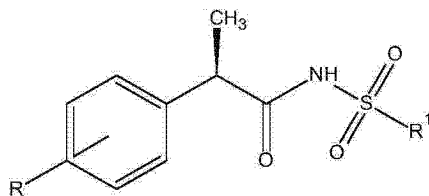
(57) 摘要

本发明涉及 CXCR1 和 / 或 CXCR2 抑制剂,其用于制备在 1 型糖尿病患者胰岛移植中作为佐剂使用的药物。具体地,可根据本发明使用的化合物具有下述式 (I), 其中的 R 和 R¹如本说明书中所定



1. CXCR1 和 / 或 CXCR2 的抑制剂在制备用于 1 型糖尿病患者中胰岛移植的佐剂药物中的用途。

2. 根据权利要求 1 所述的用途, 其中所述抑制剂是式 I 化合物或其可药用盐:



(I)

其中, R 选自直链或支链的 4-(C₁-C₆) 烷基、4- 三氟甲磺酰氧基和 3- 苯甲酰基, 并且 R¹ 是直链或支链的 (C₁-C₆) 烷基。

3. 根据权利要求 2 所述的用途, 其中所述可药用盐选自赖氨酸盐和钠盐。

4. 根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的用途, 其中所述药物改善胰岛细胞植入和早期植入物功能。

5. 根据权利要求 1 至 4 中任一项所述的用途, 其中所述药物减少移植胰岛失败的发生。

6. 根据权利要求 5 所述的用途, 其中所述药物减少胰岛细胞植入排斥的时间和发生。

7. 根据权利要求 6 所述的用途, 其中所述药物改善长期植入物存活。

8. 根据权利要求 1 至 7 中任一项所述的用途, 其中所述式 I 化合物选自 R(-)-N-2-[(4- 异丁基苯基) 丙酰基]- 甲磺酰胺和 R(-)-2-[(4'- 三氟甲磺酰氧基) 苯基] 丙酰基- 甲磺酰胺。

在胰岛移植中作为佐剂的 CXCR1/2 抑制剂

[0001] 本申请是申请号为 201080045208.5、发明名称为“在胰岛移植中作为佐剂的 CXCR1/2 抑制剂”的申请的分案申请,该母案申请是 2010 年 10 月 6 日提交的 PCT 申请 PCT/EP2010/064921 进入中国国家阶段的申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及可用于在 1 型糖尿病患者胰岛移植中作为佐剂的化合物。

背景技术

[0003] 以整个胰腺或分离之胰岛形式进行的胰腺组织移植已经成为治疗 1 型胰岛素依赖性糖尿病的临床选择。

[0004] 胰岛移植特别具有吸引力,这是因为与移植整个胰腺相比,胰岛移植具有更小的创伤并且与较低的严重并发症的风险;但是,这种方法仍然受限于低效率。

[0005] 胰岛移植的早期策略基于已在实质器官移植中得到成功证明的方案(包括施用免疫抑制剂(如硫唑嘌呤、环孢菌素和糖皮质激素)。结果证明这种策略在胰岛移植的具体情形中不是有效的并且结果非常差,大多数的植入在移植起一年内都失败(Sulaiman 和 Shapiro, Diabetes, Obesity and Metabolism, 8, 2006, 15-25)。

[0006] 近年来,引入了新的特异性免疫抑制方案和胰岛制备技术的埃德蒙顿方案(Edmonton Protocol)的开发已显著地改善了胰岛移植的临床结果。

[0007] 根据埃德蒙顿方案,将胰岛从已故供者的胰腺中分离、纯化接着通过经上腹部并进入肝门静脉放置的导管移植到受者中;当胰岛细胞输入肝脏后不久,该细胞开始释放胰岛素。为了防止发生排斥,使用新的免疫抑制方案,该方案需要使用免疫抑制药物(即西罗莫司(Sirolimus)和他克莫司(Tacrolimus))与 CD25 单克隆抗体达利珠单抗(Daclizumab)的组合(Saphiro 等, N Engl. J Med, 2000, 343(4):230-238)。

[0008] 遗憾的是,仍然有许多胰岛移植的缺陷没有解决,并且这些缺陷阻碍该方法成为针对患有 1 型糖尿病患者的标准治疗方法。

[0009] 有关胰岛移植的第一个缺点是,即使埃德蒙顿方案显著地提高了成功率,由于一系列复杂的现象(如血液介导的即刻炎症反应(IBMIR)、炎性细胞的动员和非特异性免疫)所致,仍有高百分率的早期移植失败。事实上,在人体中肝内输入胰岛与血液介导的即刻炎症反应、血栓以及伴随有血液肝酶升高的肝组织缺血有关(Barshes NR 等, J Am Coll Surg, 2005, 200(3):353-361; Barshes NR 等, J Leukoc Biol, 2005, 77(5):587-97; Bertuzzi 等, J Clin Endocrinol Metab, 2004, 89(11):5724-8; Bhargava R 等 Diabetes, 2004, 53(5):1311-7; Contreras 等, 2004, 53(11):2894-14; Johansson 等, Diabetes, 2005, 54(6):1755-62)。在肝脏中植入过程中有多达 50% 至 75% 的胰岛损失(Contreras 等, 同上),这被认为是造成为实现血糖量正常而需要巨大数目胰岛的主要原因(Barshes 等, 同上)。

[0010] 另外,甚至当移植获得最初成功并且产生不依赖于受者的胰岛素时,该移植的胰

岛似乎也随时间失去其功能。这一事件限制了在移植患者中实现长期不依赖于胰岛素的的可能,从移植起两年后只有 14% 的患者表现出不依赖于胰岛素 [Meloche RM World J Gastroenterol 2007 ;13(47) :6347-6355]。

[0011] 另一个缺点是埃德蒙顿方案需要使用免疫抑制药物组合;西罗莫司和他克莫司必须终生服用或者只要移植的胰岛继续起作用就要服用。但是这些药物具有明显的副作用,减少这些副作用是所期望的。来自免疫抑制治疗法的并发症是在该移植类型中报道的第二常见的严重事件。

[0012] 因此,仍然有必要进一步的开发,以改善植入物的长期存活和功能,从而使对葡萄糖随时间的控制并减少免疫抑制治疗。

[0013] CXCL8 是一种由炎性介质诱导的趋化因子,其参与早期组织修复并且已被证实通过诱导趋化、内皮细胞的存活和增殖来促进血管生成 (Li 等, J Immunol, 2003, 170 : 3369-3376), 以及作为中性粒细胞引诱剂起作用。CXCL8 通过与其同源的 G 蛋白偶联受体 CXCR1 和 CXCR2 结合来发挥其作用。

[0014] 近来的文献假定 CXCL8 可以通过诱导植入组织的血管重建来促进植入 (Movahedi 等, Diabetes, 2008, 57 :2128-36)。

[0015] EP1123276 公开了 N-(2-芳基-丙酰基)-磺酰胺类及其可药用盐 (其中包括 R(-)-2-[(4-异丁基苯基)丙酰基]-甲磺酰胺 (I)), 其作为 CXCL-8 诱导的中性粒细胞趋化和脱颗粒的抑制剂使用,特别是用于治疗诸如牛皮癣、类风湿性关节炎、溃疡性结肠炎、急性呼吸功能不全 (ARDS)、先天性纤维化和肾小球肾炎等疾病。

[0016] EP1355641 公开了 R(-)-2-[(4-异丁基苯基)丙酰基]-甲磺酰胺及其可药用盐 (特别是其赖氨酸盐) 在预防和治疗移植器官的缺血/再灌注损伤以及在实质器官 (特别是需要从供者取得并在移植前储存的肾) 移植后由于排斥反应而导致的功能性损伤。所述损伤被认为是造成植入物功能延迟的原因,这使得有必要在肾移植后进行透析。

[0017] EP1579859 公开了 N-(2-芳基-丙酰基)-磺酰胺类 (其中包括 R(-)-2-[(4-异丁基苯基)丙酰基]-甲磺酰胺及其赖氨酸盐) 在制备用于治疗脊髓损伤的药物中的用途。

发明内容

[0018] 本发明人出乎意料地发现,与从现有技术教导中所期望的相反, CXCR1 和 / 或 CXCR2 的激动剂对胰岛移植后的胰岛存活是有害的。如在之后的实施例中将描述的,与野生型小鼠相比,当将胰岛移植到 CXCR2 敲除的 BALB/C 小鼠中时,胰岛表现出增强的功能和存活,并且与对照小鼠相比具有持续更好的葡萄糖耐量和更低的葡萄糖浓度。

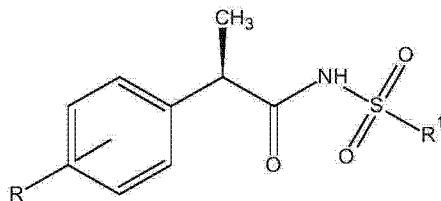
[0019] 另外,本发明人实施的实验清楚地证明了抑制 CXCR1 和 / 或 CXCR2 信号转导的化合物能够有效地改善胰岛移植后植入物的存活和功能。

[0020] 因此,本申请的第一个目的是 CXCR1 和 / 或 CXCR2 的抑制剂作为佐剂在 1 型糖尿病患者胰岛移植中的用途。

[0021] 对于根据本发明的“CXCR1 和 / 或 CXCR2 的抑制剂”而言,其意指能够阻遏 CXCL8 之源自 CXCR1 和 / 或 CXCR2 活化的生物学活性的化合物。这些化合物可以是所述受体的竞争性拮抗剂或变构抑制剂。

[0022] 本发明优选的化合物是式 I 化合物或其可药用盐:

[0023]



(I)

[0024] 其中, R 选自直链或支链的 4-(C₁-C₆) 烷基、4- 三氟甲磺酰氧基或 3- 苯甲酰基, 并且 R¹ 是直链或支链的 (C₁-C₆) 烷基。具体地, 根据本发明优选的化合物是 R(-)-2-[(4- 异丁基苯基) 丙酰基]- 甲磺酰胺 (通常称为瑞帕他辛 (Repertaxin) 或瑞帕利辛, 在下文中称为瑞帕利辛) 和 R(-)-2-[(4'- 三氟甲磺酰氧基) 苯基]- 丙酰基- 甲磺酰胺 (通常并且在下文中称为莫瑞辛 (Meraxin))。

[0025] 本发明化合物的优选的盐是赖氨酸盐和钠盐。本发明化合物的特别优选的盐是瑞帕利辛的赖氨酸盐和莫瑞辛的钠盐。

附图说明

[0026] 图 1 : 图 A 表示在敲除小鼠 (淡色线) 和野生型小鼠 (黑线) 中从同系移植 400 胰岛的 -1 天至移植后 +7 天测量的非禁食性血糖 (单位为 mg/dl)。图 B 表示口服葡萄糖耐量试验 (OGTT) 的结果。在施用葡萄糖之前以及口服葡萄糖后 10 分钟、20 分钟、30 分钟、60 分钟和 90 分钟后立即测定血糖 (单位为 mg/dl)。示出每只动物的血液葡萄糖曲线。

[0027] 图 2 : 图 A 表示移植后在瑞帕利辛 (Reparixin) 处理的小鼠 (实线) 或对照小鼠 (虚线) 中在不同时间时的血糖。图 B 表示 Cox 回归多变量分析。

[0028] 图 3a 和 3b 用散点示出在瑞帕利辛存在或不存在时移植有来自同一分离物之胰岛的小鼠在口服葡萄糖耐量试验 (OGTT) (图 3a) 和静脉葡萄糖耐量试验 (IVGTT) (图 3b) 中获得的平均值。标记指明该分离物的数目。方形和圆形分别表示移植有 250 胰岛当量 (IE) 或 150 胰岛当量的小鼠。上图和下图分别示出移植后 1 个月和 3 个月的数据。实线是鉴别线 : 在鉴别线上方的圆形表示在瑞帕利辛组中比在载体处理组 (Δ+) 中具有更高的观测值。

[0029] 图 4 表示在移植有 150 胰岛当量 (图 A) 或 250 胰岛当量 (图 B) 的瑞帕利辛处理的动物和载体处理的动物移植后 24 小时和 48 小时时的丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 的循环水平。

[0030] 图 5 : 图 A 表示在用瑞帕利辛、雷帕霉素、瑞帕利辛 + 雷帕霉素或载体处理的小鼠中移植后不同时间时的血糖。图 B 表示 Cox 多变量回归分析。

[0031] 图 6 : 在用载体 (A)、瑞帕利辛 (B)、雷帕霉素 (C) 或瑞帕利辛 + 雷帕霉素 (D) 处理的小鼠中移植后 24 小时和 48 小时时的丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 的循环水平。

[0032] 图 7 : 图 A 表示在用瑞帕利辛、雷帕霉素、瑞帕利辛 + 雷帕霉素或载体处理的小鼠中移植后随时间的移植物存活百分率。图 B 表示 Cox 多变量回归分析。

[0033] 图 8 示出在对照小鼠 (粗线) 或瑞帕利辛处理的小鼠 (淡色线) 中胰岛移植后随

时间（天）从肝脏中提取的 PMN 的数目（表示为每毫克肝组织的细胞）。

[0034] 图 9 示出在对照小鼠（粗线）或瑞帕利辛处理的小鼠（淡色线）中胰岛移植后随时间（天）从肝脏中提取的 NK 的数目（表示为每毫克肝组织的细胞）。

[0035] 图 10 示出在同种异体胰岛移植后 5 天从肝脏中提取的不同白细胞亚群中 CXCR2⁺ 细胞的百分数。在横坐标中, 数字 1 至 11 代表如下含义：

[0036] 1 : PMN (Gr1⁺CD11b⁺CD11c⁻)

[0037] 2 : PMN (Gr1⁺CD11b⁺Ly6c⁻)

[0038] 3 : 巨噬细胞 (CD11b⁺CD11c⁻Gr1⁻)

[0039] 4 : 树突状细胞 (CD11c⁺CD11b⁺Gr1⁻)

[0040] 5 : 淋巴细胞 (CD3⁺CD4⁺)

[0041] 6 : 淋巴细胞 (CD3⁺CD8⁺)

[0042] 7 : B 淋巴细胞 (CD19⁺)

[0043] 8 : NKT 细胞 (NK1.1⁺CD3⁺)

[0044] 9 : NKT 细胞 (NK1.1⁺CD3⁻)

[0045] 10 : 淋巴细胞 (CD4⁺TCRb⁺)

[0046] 11 : 淋巴细胞 (CD8⁺TCRb⁺)

具体实施方式

[0047] 如下文将描述地, 在动物模型中, 所述式 I 化合物能有效地改善胰岛移植后植入物的存活和功能。

[0048] 详细地, 在胰岛移植的实验模型中得到的数据证明了上述化合物（以 R(-)-2-[(4-异丁基苯基)丙酰基]-甲磺酰胺为代表）在保护所移植的 β -细胞免于失去活性和 / 或退化中的明显作用。

[0049] 根据本发明一个优选的实施方案, 所述式 I 化合物是瑞帕利辛。根据另一个优选的实施方案, 所述式 I 化合物是莫瑞辛。

[0050] 本发明化合物有效地支持在 1 型糖尿病中植入移植的胰岛细胞。

[0051] 事实上, 从下述实验部分中将会更加清楚的是, 与对照相比, 在同基因或同种异体胰岛移植的 -1 天到 +6 天在动物模型中静脉施用瑞帕利辛引起达到正常血糖水平（非禁食血液葡萄糖水平低于 250mg/ml）更高的概率和减少的时间中值。

[0052] 因此, 本发明的另一个目的是 CXCR1 和 / 或 CXCR2 抑制剂（优选式 I 化合物, 更优选瑞帕利辛或莫瑞辛）用于在 1 型糖尿病患者中胰岛移植后改善植入和早期植入物功能并用于降低早期植入失败发生率的用途。

[0053] 所述移植优选在患者的肝脏中或骨髓中进行。

[0054] 同种异体胰岛移植的实验证明了所述 CXCR1/CXCR2 抑制剂瑞帕利辛的施用显著地降低了在移植后达到初始功能的小鼠中排斥反应的发生。

[0055] 另外, 所述结果证明, 与对照相比, 植入物的功能保持更长的时间, 并伴随存活时间中值的增加。

[0056] 在肝脏和骨髓中的所述胰岛移植均表明了瑞帕利辛在改善植入物的功能和存活方面的功效。

[0057] 因此,本发明的另一个目的是 CXCR1 和 / 或 CXCR2 抑制剂 (优选式 I 化合物,更优选瑞帕利辛) 用于降低植入物的排斥反应以及改善植入物长期存活的用途。

[0058] 为此目的,本发明的所述化合物可以单独使用或者在与一种或更多种免疫抑制剂进行组合治疗 (优选选自西罗莫司 (也称为雷帕霉素) 和他克莫司) 。

[0059] 但是,在实验部分中报道的所获得的数据还表明本发明化合物单独使用即可足以抑制植入物排斥。事实上,如在实验部分中所示地,瑞帕利辛对 CXCR1/2 受体的阻断显著延长了小鼠在移植后达到原来功能的排斥时间,然而,这没有被雷帕霉素显著地改变。另外,单独施用瑞帕利辛提供的结果与组合施用瑞帕利辛和雷帕霉素的结果是相当的。这些数据强烈地表明,在不需要在毒性方面有明显优势的免疫抑制疗法的情况下或者所述需要降低的情况下,单独施用瑞帕利辛即足以降低植入物排斥反应。

[0060] 本发明的所述化合物的合成可以根据本领域熟知的方法进行。例如,瑞帕利辛可以如 EP1123276 的实施例 1 和 EP1355641 的实施例 1 中所公开的方法制备,而所述赖氨酸盐则可以分别如前述专利的实施例 7 和实施例 2 中所公开的方法制备。例如,莫瑞辛可以根据 EP1776336 的实施例 1 制备。

[0061] 根据本发明使用的化合物配制成适于口服施用的药物组合物 (如片剂、胶囊、糖浆剂,优选为控制释放制剂的形式), 或者适于胃肠外施用的药物组合物 (优选为适于静脉内或肌肉内给药的无菌溶液的形式)。药物的形式可以根据常规的方法制备,例如在 Remington, "The Science and Practice of Pharmacy", 第 21 版 (Lippincott Williams 和 Wilkins) 中所公开的方法。优选地,在上述每一种施用形式中瑞帕利辛或其可药用盐的量将例如提供每千克体重 2mg 至 15mg 的化合物或盐,而莫瑞辛或其可药用盐的量将例如提供每千克体重 10mg 至 20mg 的化合物或盐。在任何情况下,待施用药剂的方案和量将由医师根据患者的需要确定。

[0062] 现将在下述实验部分中对本发明更多的细节做进一步的举例说明。

[0063] 实验部分

[0064] 1. 在敲除小鼠中的同基因胰岛移植

[0065] 为了测试 CXCL8 信号转导通路通过 CXCR1 和 CXCR2 的活化对胰岛存活的作用,在 Balb/c CXCR2^{-/-} 小鼠和 CXCR2^{+/+} 小鼠中在同基因胰岛肝内移植后对胰岛功能进行了评估。CXCR1 在小鼠中不表达,因而 CXCR2 的敲除完全消除了由 CXCL8 引起的信号转导。

[0066] 取移植后第一周非禁食血糖和移植后 4 周口服葡萄糖耐量作为功能性指标。如图 1 所示的,如在整个评估阶段中循环葡萄糖浓度显著降低所证明地,经移植的 CXCR2 敲除小鼠明显地表现出比对照野生型小鼠持续更好的葡萄糖耐受。

[0067] 如下面第 2 部分中所描述地进行了口服葡萄糖耐量试验。

[0068] 2. 在小鼠中的同基因胰岛移植

[0069] 将取自 12 周龄 C57 小鼠的胰岛移植到糖尿病性 C57 小鼠 (四氧嘧啶诱导的糖尿病,血糖高于 450mg/dl) 的肝脏中。使用两种不同的边际胰岛量模型 (marginal islet mass model), 即 150IE (胰岛当量) 和 250 胰岛当量。瑞帕利辛从胰岛移植 -1 天开始到胰岛移植后 6 天或 13 天以 8mg/kg/ 小时的剂量通过皮下 (s. c.) 连续注入。对照动物接受连续的皮下施用载体。

[0070] 首先评估了两个连续的检测在胰岛移植后达到小于 200mg/dl 的非禁食血液葡萄

糖水平的能力。如图 2 所示,与用载剂处理的小鼠的 35.1% 和 50 天相比,用瑞帕利辛处理的小鼠达到正常血糖 (euglycaemia) (小于 200mg/dl) 的概率和时间中值是 :50% 和 7 天 (时序检验 (Log Rank), $p < 0.012$)。

[0071] 以瑞帕利辛处理、处理时间、移植胰岛的数目和受者移植前血糖作为协变量,多变量 Cox 回归分析证实了瑞帕利辛显著地改善了结果 (比数比 (Odds ratio) :2.6 ;95% 置信区间 (CI) :1.1-6.1 ; $p < 0.021$)。正如预期的,250 胰岛当量的移植引起了改善的植入 (比数比 :1.6 ;95% 置信区间 :0.6-4.3 ; $p < 0.28$),而移植前血糖对该结果有负面影响 (比数比 :0.6 ;95% 置信区间 :0.3-1.1 ; $p = 0.12$)。

[0072] 在移植后 1 个月和 3 个月进行了静脉内葡萄糖耐量试验 (IVGTT) 和口服葡萄糖耐量试验 (OGTT) 以评价植入胰岛的功能性。IVGTT 在禁食 16 小时后开始 ;小鼠通过尾静脉注射给予葡萄糖 (0.5g/kg)。在注射后 0 分钟、1 分钟、5 分钟、15 分钟、20 分钟、30 分钟和 60 分钟时获取血液样本并用于测定葡萄糖浓度。从 IVGTT 中,在各血浆葡萄糖值对数变换后,通过静脉施用后循环葡萄糖在 1 分钟和 15 分钟之间的减少 (KG_{1-15}) 作为葡萄糖消除常数 (KG ;表示为每分钟葡萄糖消除的百分数) 来将葡萄糖耐量量化。对全部 1 分钟至 60 分钟的葡萄糖消失速率 (KG_{1-60}) 进行类似的评估。该参数表示在整个试验中葡萄糖消失的速率。OGTT 在 4 小时禁食后开始 ;通过口腔管饲法给予小鼠葡萄糖 (1g/kg)。在施用葡萄糖 0 分钟、10 分钟、20 分钟、30 分钟、60 分钟、90 分钟和 120 分钟后获取血液样本并用于测定葡萄糖浓度。OGTT 期间葡萄糖曲线下面积 (AUC) 用梯形法计算 (基线 = 0 分钟)。在图 3 中示意了在 IVGTT 和 OGTT 后胰岛移植对葡萄糖耐量的影响。数据表示为离散的点。每一个点表示在瑞帕利辛存在或不存在时移植来自相同分离物之胰岛的小鼠中测量的参数的平均值 ;标记表明该分离物的数目,而方形和圆形分别表示移植有 250 胰岛当量或 150 胰岛当量的小鼠。上图和下图分别表示移植后 1 个月和 3 个月的数据。该实线为鉴别线 :鉴别线上方的圆形代表在瑞帕利辛处理组中比在载剂处理组 ($\Delta +$) 中具有更高的观测值。移植后 1 个月和 3 个月的 OGTT 表明,在用瑞帕利辛处理的小鼠中葡萄糖的 AUC 仍然低于对照小鼠的 AUC。与这些数据一致的是,与对照小鼠相比,在瑞帕利辛处理的小鼠中在 1 分钟至 15 分钟 (KG_{1-15}) 和 1 分钟至 60 分钟 (KG_{1-60}) 的葡萄糖消除常数显著地增加了。

[0073] 通过移植后 24 小时和 48 小时时的丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 的循环水平进行了对急性肝损伤的量化。在移植有 150 胰岛当量或 250 胰岛当量的小鼠中瑞帕利辛的处理均没有影响 ALT 水平 (图 4)。类似地,在白细胞、红细胞和血小板的循环水平上没有明显差别 (数据未给出)。

[0074] 3. 在小鼠中的同种异体胰岛移植

[0075] 将来自 12 周龄 Balb/c 小鼠的胰岛移植到糖尿病性 C57 小鼠 (四氧嘧啶,血糖高于 450mg/dl) 的肝脏中。在一些实验中,为了评价任何自身免疫反应的存在,将来自 12 周龄 C57BL/6 (B6) 小鼠的胰岛移植到糖尿病雌性 NOD/LtJ (NOD) 小鼠的肝脏中。在至少三次非禁食血液葡萄糖读数高于 350mg/dl 后,将 NOD 小鼠作为胰岛移植受者使用。在这两种情形下均移植了 400 胰岛当量。将这些动物单独用瑞帕利辛处理 (从移植 -1 天开始至移植后 7 天以 5.28mg/kg/ 小时连续皮下注入)、单独用雷帕霉素 (每日腹膜内 (i. p.) 注射,从第 0 天的 0.3mg/kg 的诱导剂量开始,之后维持 0.15mg/kg 的剂量直到第 14 天)、用瑞帕利辛 + 雷帕霉素或载剂处理。

[0076] 首先评价了达到初始功能的能力(定义为在胰岛移植后在2次连续测定中非禁食血液葡萄糖水平低于250mg/dl)和排斥时间(定义为2次连续的非禁食血液葡萄糖读数高于300mg/dl)。

[0077] 考虑到在同种免疫情况下所有移植的小鼠,达到初始功能(血糖低于250mg/dl)的概率和时间中值是:对于单独用瑞帕利辛处理的小鼠为72%和1天,对于单独用雷帕霉素处理的小鼠为73%和1天,对于用瑞帕利辛+雷帕霉素处理的小鼠为69%和1天,对于用载剂处理的小鼠为44%和2天,(图5,时序检验 $p < 0.041$)。以瑞帕利辛处理、雷帕霉素处理以及受者移植前血糖作为协变量,多变量Cox回归分析证实瑞帕利辛处理改善了该结果(比数比:2.5;95%置信区间:0.79至2.99; $p < 0.202$)。用雷帕霉素处理(比数比:1.1;95%置信区间:0.62至2.15; $p < 0.62$)与移植前血糖(比数比:1.03;95%置信区间:0.68至1.59; $p < 0.88$)相关性较低。

[0078] 移植后24小时和48小时测定的ALT循环水平在雷帕霉素存在或缺乏时都没有受到瑞帕利辛的影响(图6)。

[0079] 此外,用瑞帕利辛处理显著地增加了小鼠在移植后实现初始功能的达排斥时间(the time to rejection)(图7)。在缺乏雷帕霉素时,对于用瑞帕利辛和载剂处理的小鼠而言,存活时间中值分别为(12 $\pm$ 0.6)天($n = 13$)和(8 $\pm$ 0.5)天($n = 7$)。在雷帕霉素存在时,对于瑞帕利辛小鼠和对照小鼠而言,存活时间中值分别为(12 $\pm$ 2)天($n = 11$)和(8 $\pm$ 0.6)天($n = 11$)。以瑞帕利辛处理、雷帕霉素处理和受者移植前血糖作为协变量的多变量Cox回归分析证实了该数据。对于植入物存活损失而言,证实了用瑞帕利辛处理是显著独立的保护因素(比数比:0.252;95%置信区间:0.099至0.64; $p = 0.004$),而雷帕霉素处理(比数比:1.173;95%置信区间:0.562至2.45; $p = 0.67$)和移植前血糖(比数比:1.002;95%置信区间:0.604至1.661; $p = 0.99$)则不显著。

[0080] 4. 同种异体胰岛移植后通过瑞帕利辛的CXCR1/2阻断调节肝脏炎症状况

[0081] 在小鼠中同种异体肝内胰岛移植后在瑞帕利辛处理存在或不存在的条件下分析了肝内白细胞种群。在瑞帕利辛存在的情况下从移植-1天开始以8mg/小时/kg的剂量皮下连续输注瑞帕利辛7天或者在载剂存在时,将来自12周龄的Balb/c小鼠的胰岛(400胰岛当量)移植到糖尿病性C57小鼠(四氧嘧啶诱导, $> 450\text{mg/dl}$)的肝脏中。小鼠在胰岛移植后0天、+1天、+3天、+5天、+7天、+10天、+14天处死并且在解剖时将肝脏称重。从已知重量的两个肝叶制备单细胞悬液并且通过流式细胞术进行肝内白细胞(IHL)种群分析。将这些细胞用异硫氰酸荧光素(FITC)、藻红蛋白(PE)或别藻红蛋白(APC)标记的抗CD4、抗CD8、抗CD3、抗CD19、抗TCR、抗NK1.1、抗CD11、抗Gr-1、抗CD11b和抗CD11c特异性抗体(PharMingen, San Diego, CA)进行表面染色,以检测Gr-1⁺/CD11b⁺/CD11c⁻细胞(多为PMN)、CD4⁺/TCR⁺(多为T辅助细胞)、CD8⁺/TCR⁺细胞(多为细胞毒T淋巴细胞)、NK1.1⁺/CD3⁻细胞(NK细胞)、NK1.1⁺/CD3⁺细胞(NKT细胞)和Gr-1⁻/CD11b⁺/CD11c⁻(多为巨噬细胞)、CD115⁺/CD11b⁺/CD11c⁻(多为单核细胞)、CD11c⁺/CD11b⁺/Gr1⁻(多为树突状细胞)、CD19(多为B淋巴细胞)。样品利用FACSCalibur流式细胞仪获得,数据利用CELLQuest软件(Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA)分析。

[0082] 在实验的第二种情形下,在白细胞渗透达到最大渗透度时的时间点评估肝内白细胞种群上CXCR2和CXCR1的表达。

[0083] 获得的结果证实了用瑞帕利辛处理降低了同种异体移植后白细胞在肝脏中的动员和渗透。特别是表达 CXCR2 的白细胞亚群的中性粒细胞（图 8）和自然杀伤 T 细胞（图 9）受到了明显的影响，也可以由图 10 中所示。

[0084] 5. 通过瑞帕利辛的 CXCR2/1 阻断影响在骨髓中胰岛移植后同种异体胰岛移植的结果

[0085] 在瑞帕利辛存在时从移植 -1 天开始以 8mg/ 小、时 /kg 的剂量皮下连续注入瑞帕利辛 7 天，将来自 12 周龄的 Balb/c 小鼠的胰岛（400 胰岛当量）移植到糖尿病性 C57 小鼠（四氧嘧啶诱导，> 450mg/dl）的骨髓中。对照组小鼠用载剂处理。该实验主要的终点是达到初始功能的能力（定义为在胰岛移植后 2 次连续测定中非禁食血液葡萄糖水平低于 250mg/dl）和排斥时间（定义为 2 次连续的非禁食血液葡萄糖的读数高于 350mg/dl）。

[0086] 获得的结果证实了通过用瑞帕利辛的处理改善了结果。

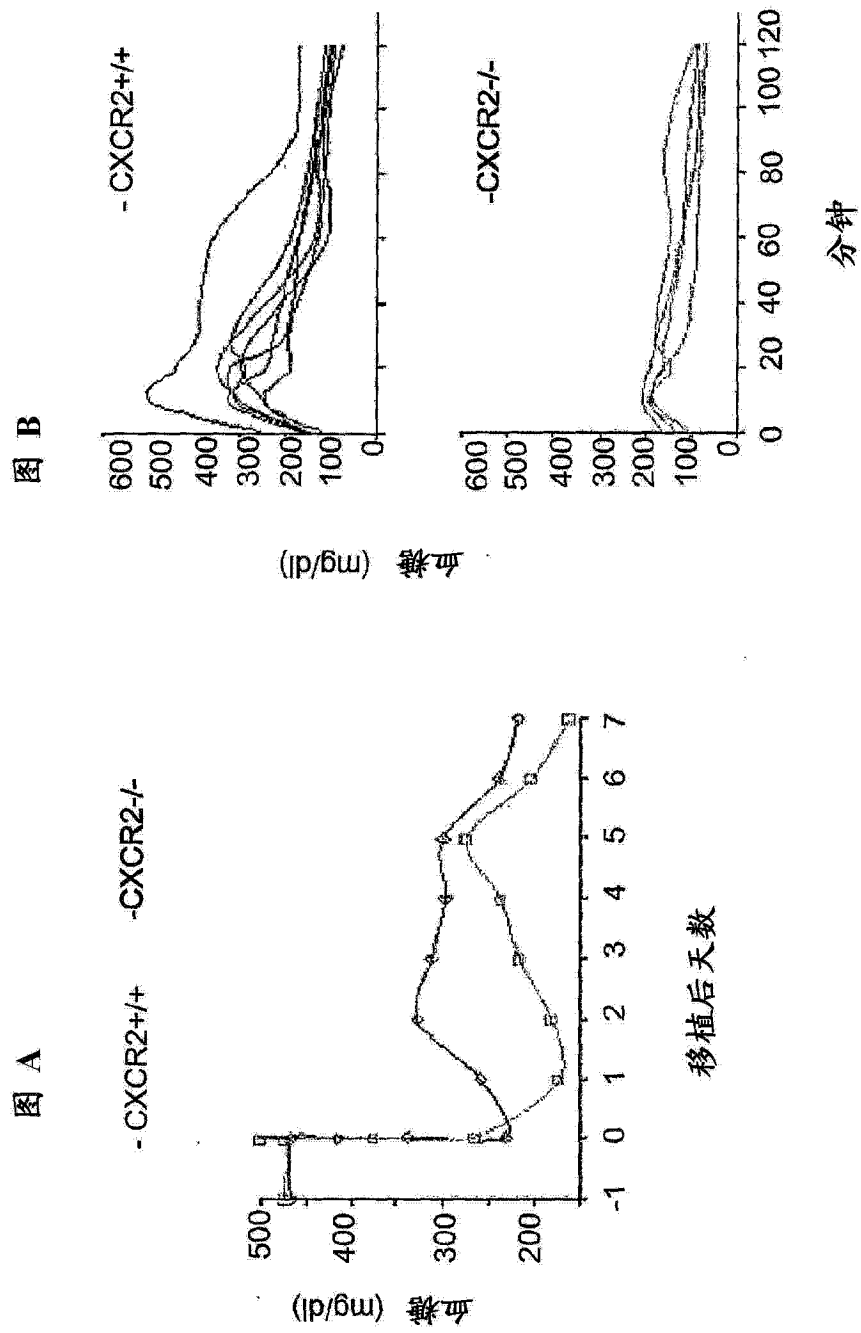


图 1

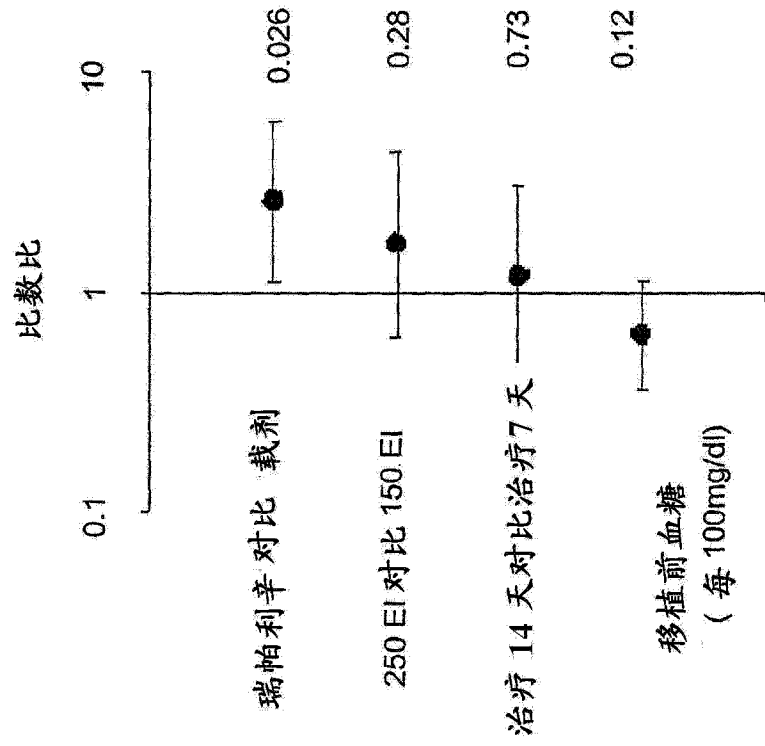


图 B

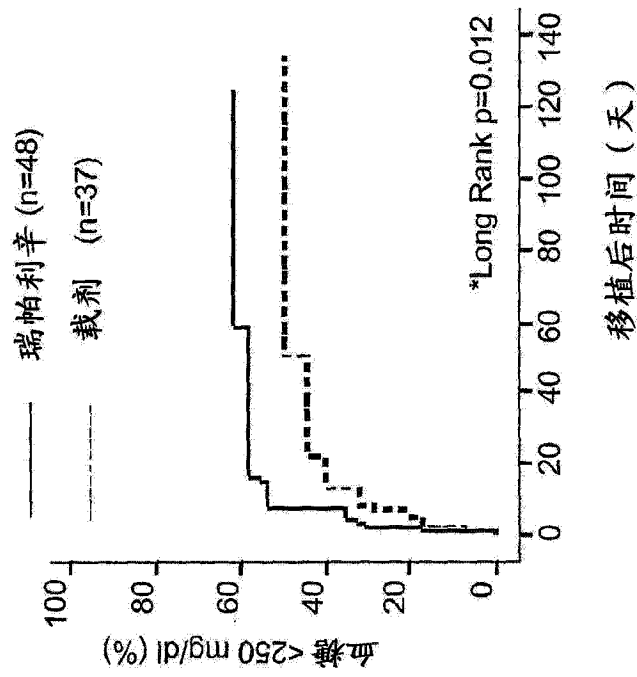


图 A

图 2

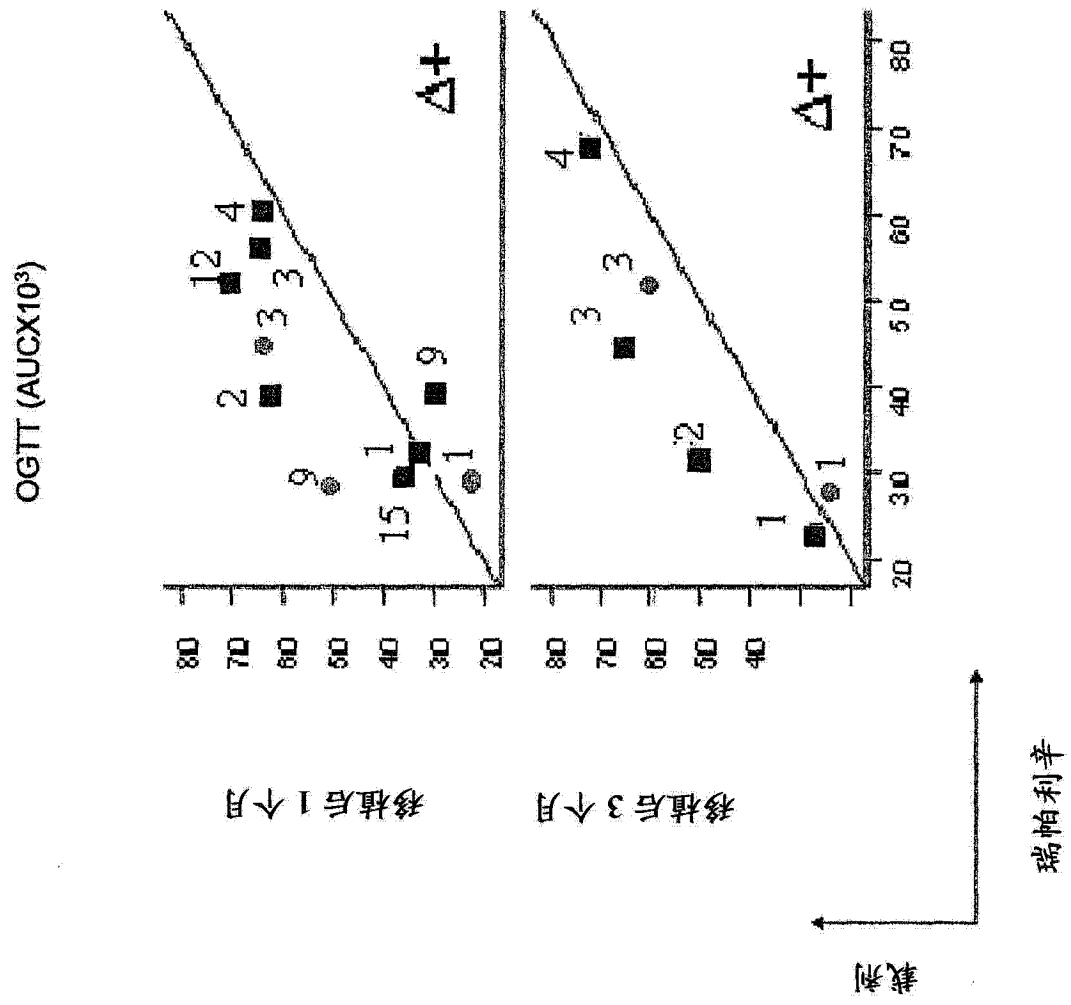


图 3a

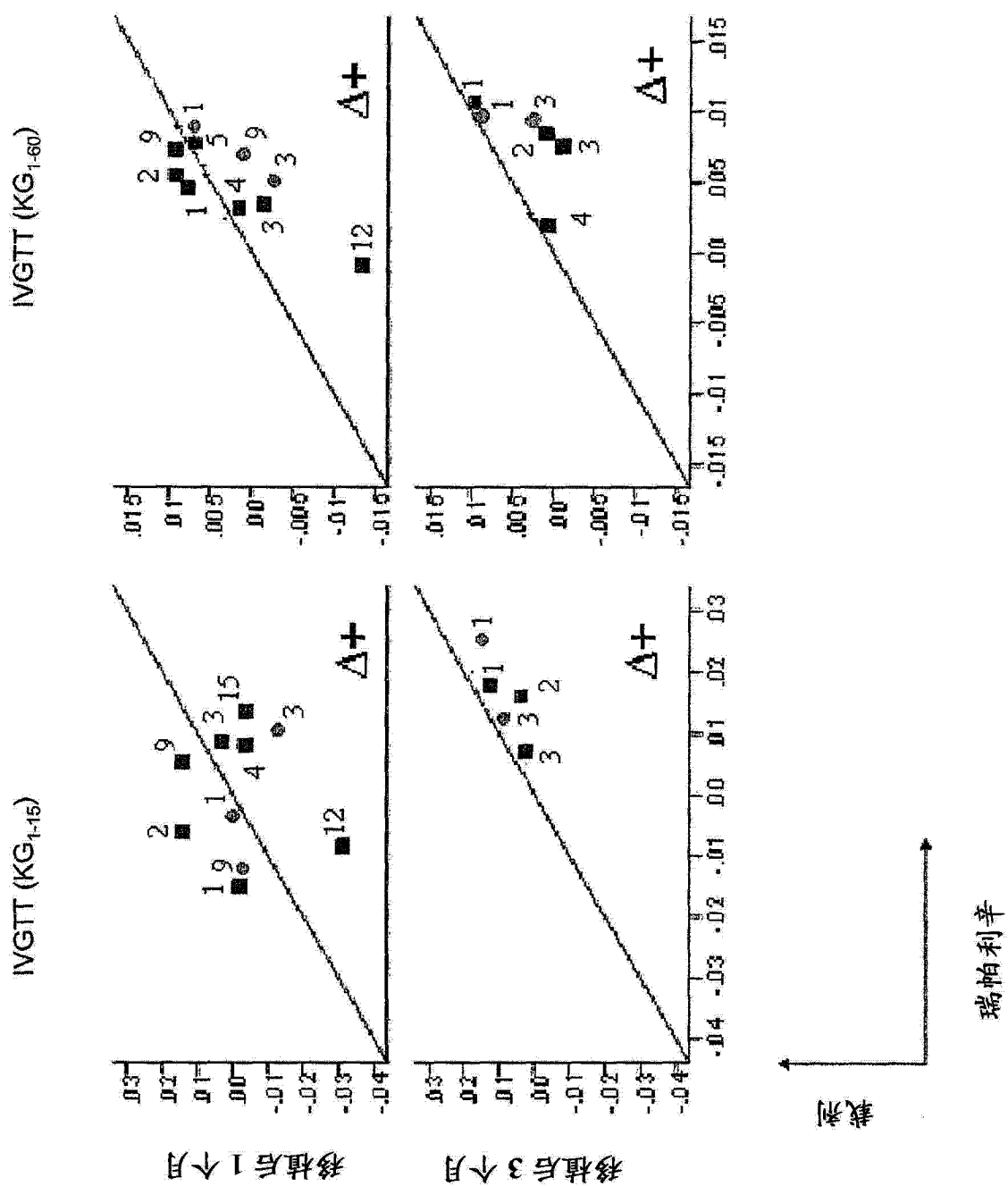


图 3b

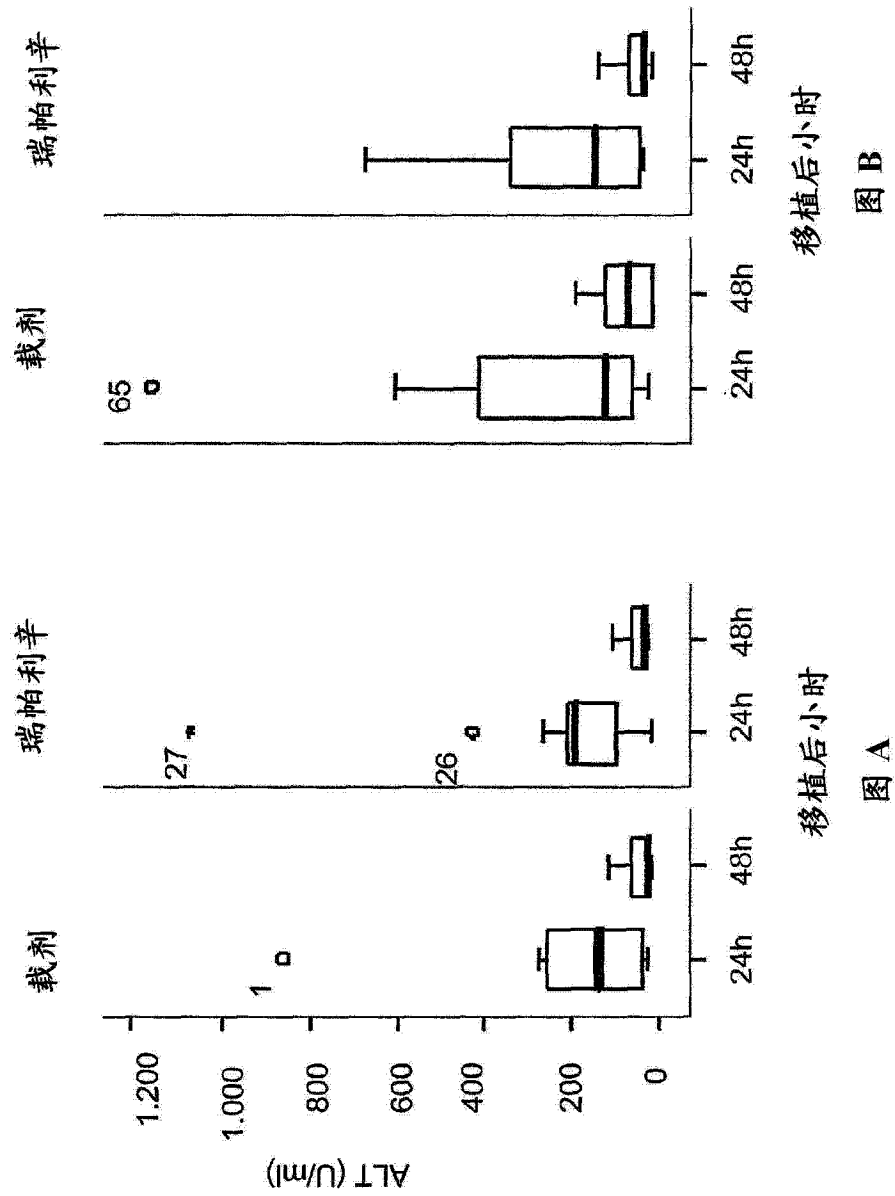


图 4

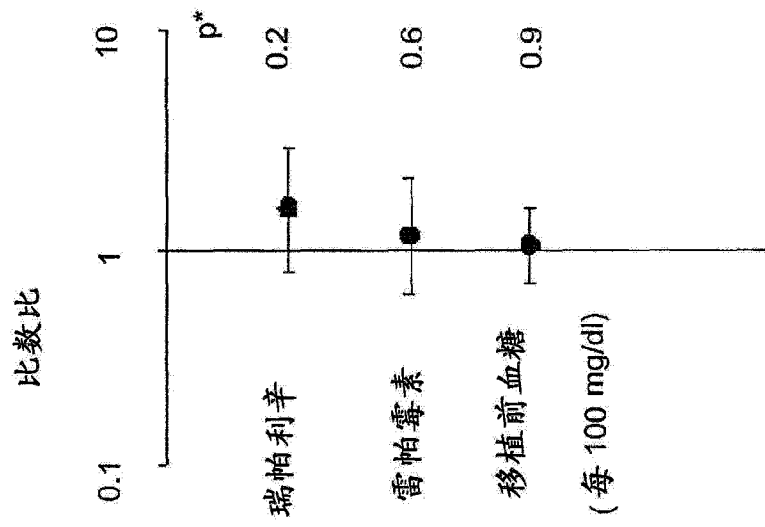


图 B

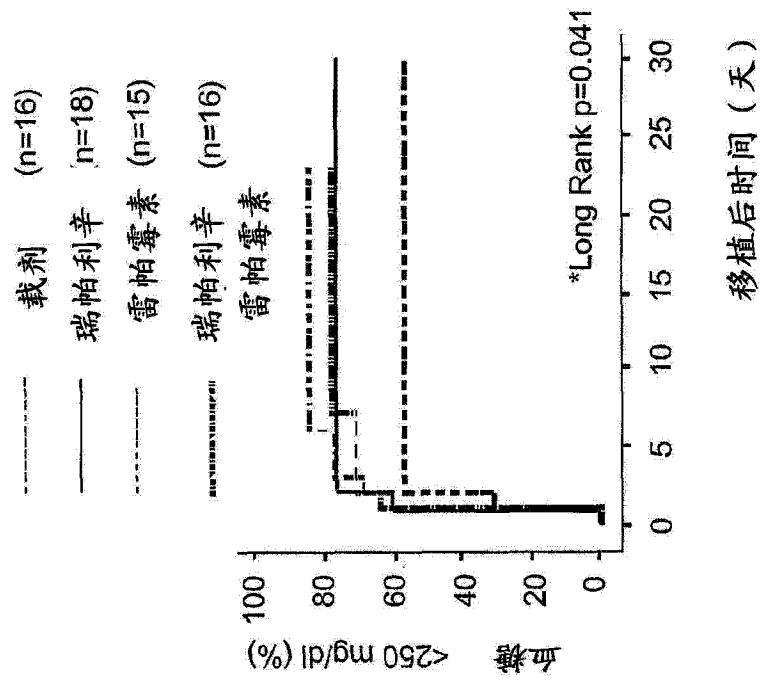


图 A

图 5

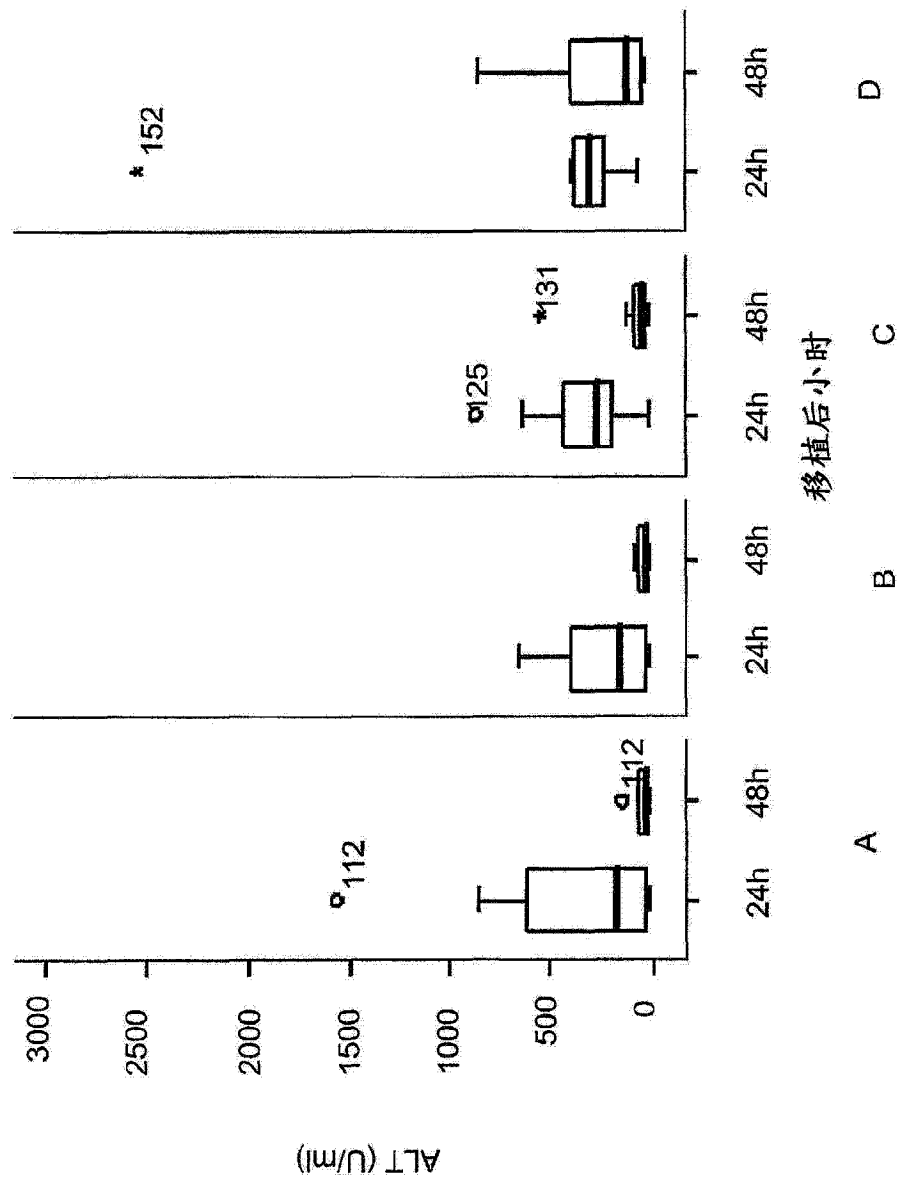


图 6

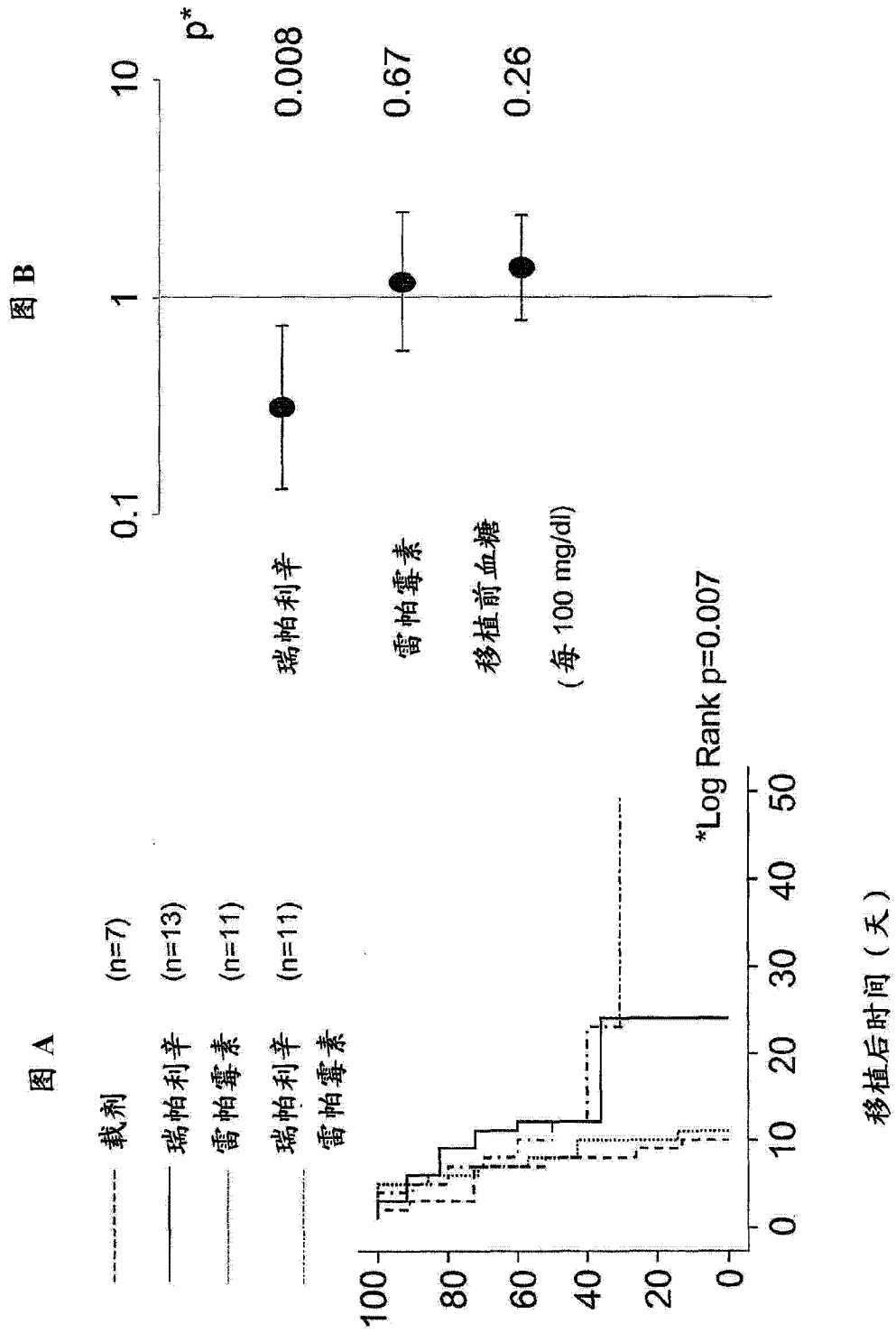


图 7

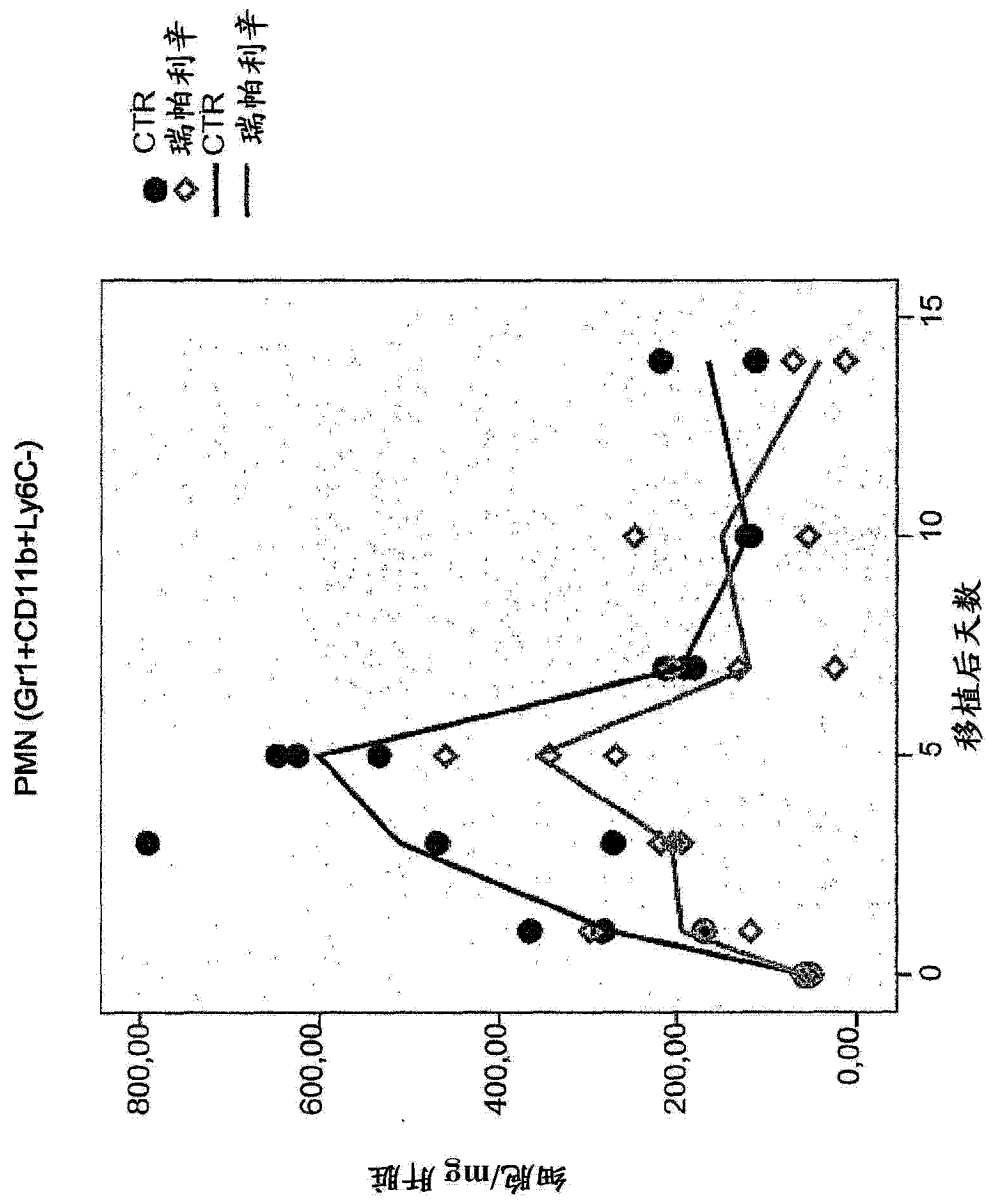


图 8

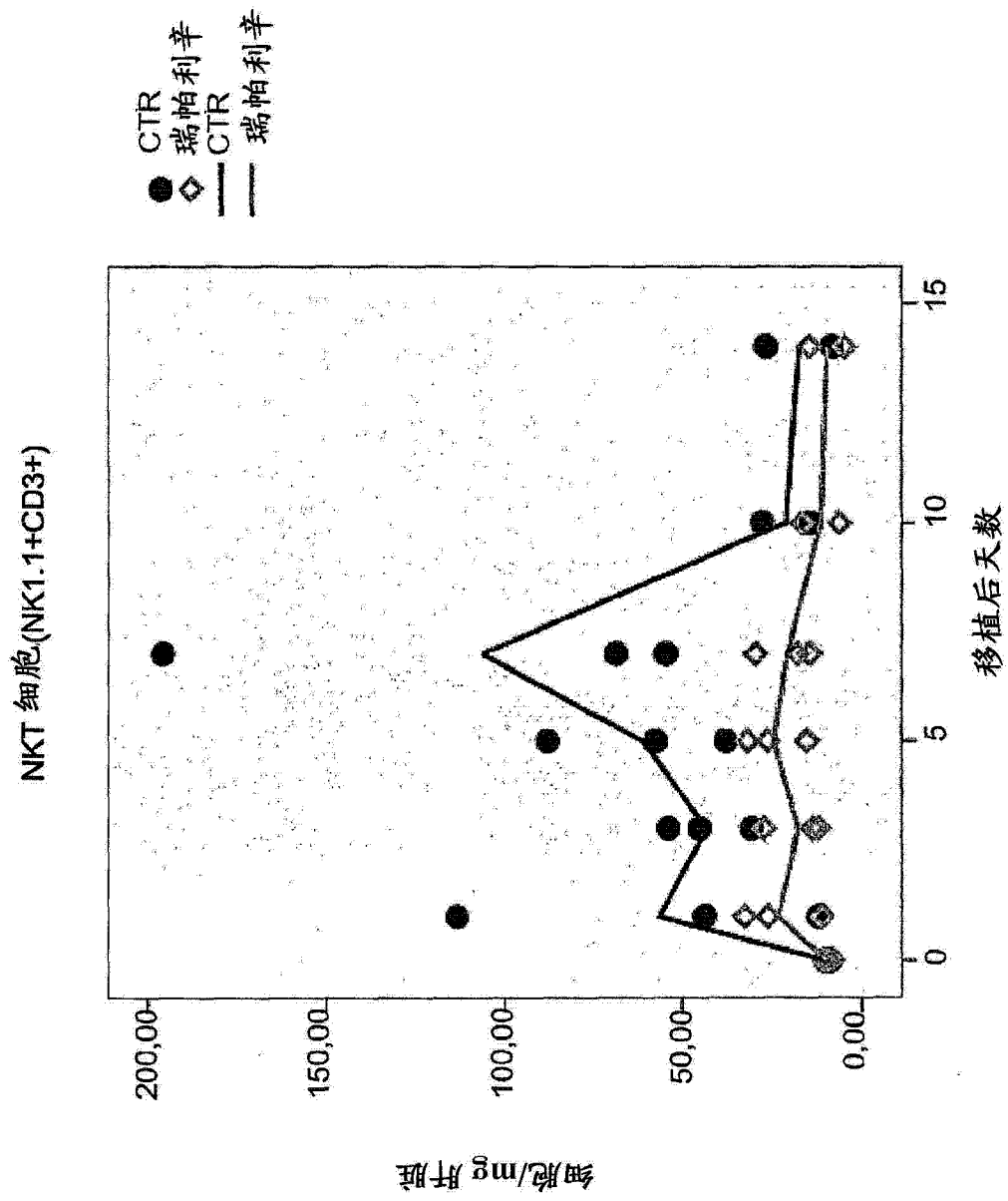


图 9

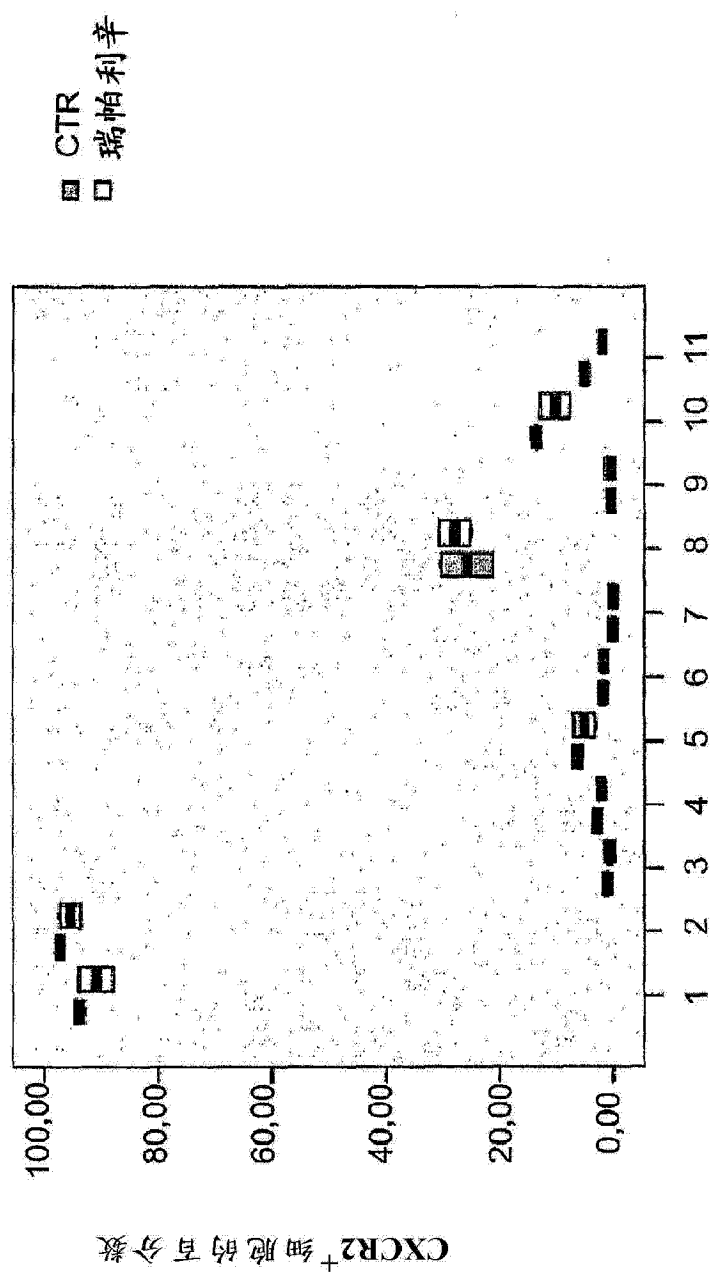


图 10

Abstract

The invention relates to CXCR1 and/or CXCR2 inhibitors for the preparation of a medicament for use as an adjuvant in the transplant of pancreatic islets in Type 1 diabetes patients. In particular, the compounds that can be used according to the invention have the following formula (I) in which R and R' are as defined in the description.