



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 31/495 (2018.08); A61K 31/519 (2018.08); A61P 11/00 (2018.08)

(21)(22) Заявка: 2015144083, 17.03.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
17.03.2014

Дата регистрации:
11.09.2018

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
15.03.2013 US 61/799,177

(43) Дата публикации заявки: 24.04.2017 Бюл. № 12

(45) Опубликовано: 11.09.2018 Бюл. № 26

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 15.10.2015

(86) Заявка РСТ:
GB 2014/050834 (17.03.2014)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2014/140648 (18.09.2014)

Адрес для переписки:
105064, Москва, а/я 88, "Патентные поверенные
Квашнин, Сапельников и партнеры"

(72) Автор(ы):

УОКЕР Майкл Дж. А. (СА),
КАЦЦОЛА Марио (ИТ),
КАЛЦЕТТА Луиджино (ИТ)

(73) Патентообладатель(и):

ВЕРОНА ФАРМА ПиэлСи (GB)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2006147269 А, 20.07.2008. EP
2111861 А1, 28.10.2009. US 20120302533 А1,
29.11.2012.

(54) КОМБИНАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к области медицины, в частности к композициям для лечения заболевания или состояния, которое связано с острой или хронической закупоркой сосудов или бронхов или острым или хроническим воспалением, а также к способам лечения. Композиция содержит (а) PDE3/PDE4 ингибитор, который представляет собой 9,10-диметокси-2-(2,4,6-триметилфениламино)-3-(N-карбамоил-2-аминоэтил)-3,4,6,7-тетрагидро-2Н-пиримидо[6,1-а]изохинолин-4-он или его фармацевтически приемлемую кислотно-аддитивную соль, и (b)

антагонист мускаринового рецептора. Также раскрыты фармацевтические композиции для лечения заболевания или состояния, которое связано с острой или хронической закупоркой сосудов или бронхов или острым или хроническим воспалением. Также раскрыты способы лечения заболевания или состояния, которые связаны с острой или хронической закупоркой сосудов или бронхов или острым или хроническим воспалением. Группа изобретений обеспечивает синергетический эффект комбинации RPL554 с антагонистами мускариновых рецепторов. 6 н. и

R U 2 6 6 6 6 2 4 C 2

R U 2 6 6 6 6 2 4 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

A61K 31/495 (2006.01)*A61K 31/519* (2006.01)*A61P 11/00* (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

A61K 31/495 (2018.08); A61K 31/519 (2018.08); A61P 11/00 (2018.08)(21)(22) Application: **2015144083, 17.03.2014**(24) Effective date for property rights:
17.03.2014Registration date:
11.09.2018

Priority:

(30) Convention priority:
15.03.2013 US 61/799,177(43) Application published: **24.04.2017** Bull. № 12(45) Date of publication: **11.09.2018** Bull. № 26(85) Commencement of national phase: **15.10.2015**(86) PCT application:
GB 2014/050834 (17.03.2014)(87) PCT publication:
WO 2014/140648 (18.09.2014)Mail address:
**105064, Moskva, a/ya 88, "Patentnye poverennye
Kvashnin, Sapelnikov i partnery"**

(72) Inventor(s):

**UOKER Majkl Dzh. A. (CA),
KATSTSOLA Mario (IT),
KALTSETTA Luidzhino (IT)**

(73) Proprietor(s):

VERONA FARMA PieLSi (GB)**(54) DRUG COMBINATION**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: group of inventions relates to medicine, in particular to compositions for treating a disease or condition associated with acute or chronic obstruction of blood vessels or bronchi, or acute or chronic inflammation, as well as to methods of treatment. Composition comprises (a) a PDE3/PDE4 inhibitor which is 9,10-dimethoxy-2-(2,4,6-trimethylphenylamino)-3-(N-carbamoyl-2-aminoethyl)-3,4,6,7-tetrahydro-2H-pyrimido[6,1-a]isoquinolin-4-one, or a pharmaceutically acceptable acid addition salt thereof, and (b) a muscarinic receptor antagonist. Also

disclosed are pharmaceutical compositions for the treatment of a disease or condition associated with acute or chronic obstruction of blood vessels or bronchi or with acute or chronic inflammation. Also disclosed are methods of treating a disease or condition associated with acute or chronic obstruction of blood vessels or bronchi or acute or chronic inflammation.

EFFECT: group of inventions provides a synergistic effect of the combination of RPL554 with muscarinic receptor antagonists.

15 cl, 19 dwg, 4 tbl, 7 ex

Область изобретения

Приоритет изобретения согласно настоящей заявке заявляется по предварительной заявке США номер 61/799,177, поданной 15 марта 2013, которая включена в настоящую заявку посредством ссылки.

5 Настоящее изобретение относится к новой комбинации лекарственных средств, которая обладает неожиданной терапевтической активностью при лечении респираторных и воспалительных заболеваний.

Уровень техники

10 Существует ряд различных терапевтических подходов лечения респираторных заболеваний, таких как астма и хроническое обструктивное заболевание легких (ХОЗЛ). Например, кортикостероиды, β_2 -адренергических рецепторов агонисты, фосфодиэстеразы (PDE) 4 ингибиторы, PDE 3 ингибиторы, антагонисты лейкотриенового рецептора, рецептора эпидермального фактора роста (egfr) киназные ингибиторы, p38 киназные ингибиторы, NK1 агонисты и антагонисты мускаринового рецептора известны
15 для применения для лечения респираторных заболеваний.

RPL554 (9,10-Диметокси-2-(2,4,6-триметилфениламино)-3-(N-карбамоил-2-аминоэтил)-3,4,6,7-тетрагидро-2H-пиримидо[6,1-a]изохинолин-4-он) представляет собой двойной PDE3/PDE4 ингибитор и описывается в WO 00/58308. В качестве комбинированного PDE3/PDE4 ингибитора, RPL554 имеет как противовоспалительную, так и
20 бронхорасширяющую активность и полезен для лечения респираторных заболеваний, таких как астма и хроническое обструктивное заболевание легких (ХОЗЛ).

Известно, что различные классы респираторных лекарственных средств могут применяться в комбинации для лечения респираторных заболеваний. Однако синергетическое взаимодействие между компонентами таких комбинаций наблюдаются
25 редко.

Сущность изобретения

Авторами настоящего изобретения неожиданно было обнаружено, что RPL554 способен усиливать активность антагонистов мускариновых рецепторов. RPL554 и антагонисты мускариновых рецепторов по этой причине взаимодействуют
30 синергетическим образом в комбинации с обеспечением улучшенного терапевтического эффекта.

На самом деле синергетические взаимодействия между лекарственными средствами встречаются редко. Наличие синергетического эффекта может быть определено, например, посредством метода Беренбаума, критерия независимости по Блисссу (BI) и/или модели аддитивности Loewe (LA) через изогнутые изоболы (смотрите Беренбаума,
35 1977; Greco et al., 1995; Grabovsky and Tallarida, 2004; Tallarida, 2006; Goldoni and Johansson, 2007; Tallarida and Raffa, 2010).

Согласно методу Беренбаума, синергетический эффект комбинации определяется посредством сначала определения кривых зависимости ответа от дозы для каждого из составляющих лекарственных средств в качестве монотерапии для идентификации
40 низкой и высокой дозы для каждого лекарственного средства. Затем измеряется эффект комбинации низких доз каждого лекарственного средства. Если комбинация низких доз каждого лекарственного средства обеспечивает более хороший ответ, чем высокая доза одного лекарственного средства самого по себе в качестве монотерапии, значит,
45 имеет синергетическое взаимодействие между двумя лекарственными средствами.

Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что истинный синергетический эффект согласно методу Беренбаума возникает, когда RPL554 объединяется с антагонистом мускаринового рецептора. Улучшенный терапевтический

эффект, который достигается, при этом с применением низких доз каждого применяемого лекарственного средства, весьма желателен в клинической области, и, например, приводит к снижению побочных эффектов, возникающих у пациентов.

Соответственно, настоящее изобретение обеспечивает композицию, которая содержит
 5 (а) PDE3/PDE4 ингибитор, который представляет собой 9,10-Диметокси-2-(2,4,6-триметилфениламино)-3-(N-карбамоил-2-аминоэтил)-3,4,6,7-тетрагидро-2H-пиримидо[6,1-а]изохинолин-4-он или его фармацевтически приемлемую кислотную аддитивную соль, и (b) антагонист мускаринового рецептора.

Настоящее изобретение также обеспечивает фармацевтическую композицию,
 10 содержащую композицию согласно настоящему изобретению и один или более фармацевтически приемлемые носители, разбавители или эксципиенты.

Настоящее изобретение также обеспечивает способ лечения заболевания или состояния, которое основано на (i) острой или хронической закупорки сосудов бронхов или (ii) остром или хроническом воспалении, у субъекта, нуждающегося в этом,
 15 отличающийся тем, что способ включает введение указанному субъекту (а) PDE3/PDE4 ингибитор, как определено в настоящей заявке, и (b) антагониста мускаринового рецептора.

Настоящее изобретение также обеспечивает продукт, содержащий (а) PDE3/PDE4 ингибитор, как определено в настоящей заявке, и (b) антагонист мускаринового
 20 рецептора для одновременного, раздельного или последовательного применения для лечения заболевания или состояния, как определено в настоящей заявке.

Настоящее изобретение также обеспечивает применение (а) PDE3/PDE4 ингибитора, как определено в настоящей заявке, для получения медикамента для
 25 одновременного, раздельного или последовательного применения при лечении заболевания или состояния, как определено в настоящей заявке, в комбинации с (b) антагонистом мускаринового рецептора.

Настоящее изобретение также обеспечивает применение (b) антагониста мускаринового рецептора для получения медикамента для одновременного, раздельного или последовательного применения при лечении заболевания или состояния, как
 30 определено в настоящей заявке, в комбинации с (а) PDE3/PDE4 ингибитором, как определено в настоящей заявке.

Настоящее изобретение также обеспечивает применение (а) PDE3/PDE4 ингибитора, как определено в настоящей заявке, и (b) антагониста мускаринового рецептора для получения медикамента для применения при лечении заболевания или состояния, как
 35 определено в настоящей заявке.

Настоящее изобретение также обеспечивает композицию согласно настоящему изобретению для применения при лечении заболевания или состояния, как определено в настоящей заявке.

Настоящее изобретение также обеспечивает PDE3/PDE4 ингибитор, как определено
 40 в настоящей заявке, для применения при лечении заболевания или состояния, как определено в настоящей заявке, в комбинации с антагонистом мускаринового рецептора.

Настоящее изобретение также обеспечивает антагонист мускаринового рецептора для применения при лечении заболевания или состояния, как определено в настоящей заявке, в комбинации с PDE3/PDE4 ингибитором, как определено в настоящей заявке.

45 Краткое описание чертежей

Фиг. 1: линейный график, показывающий ингибирование сокращения у человека для выделенных бронхиальных препаратов относительно EFS через 50 минут инкубации с RPL554. Показанные точки получены в ходе экспериментов с образцами n=5 различных

субъектом и приведены как среднее значение $\pm$ SEM; *** $P < 0.001$, по сравнению с контролем.

Фиг. 2: Бронхиальная релаксация у человека для RPL554 и атропина при субмаксимальном сокращении благодаря ацетилхолину. Показанные точки получены в ходе экспериментов с образцами $n=5$ различных субъектом и приведены как среднее значение $\pm$ SEM; *** $P < 0.001$, по сравнению атропином.

Фиг. 3: Влияние увеличения дозы RPL554 на сокращающий эффект гистамина в пассивно-сенситизированных выделенных бронхах человека. Показанные точки получены в ходе экспериментов с образцами $n=5$ различных субъектом и приведены как среднее значение $\pm$ SEM *** $P < 0.001$, по сравнению с пассивно-сенситизированным контролем.

Фиг. 4: Взаимодействие при низких концентрациях (10 нМ и 100 нМ) между атропином и RPL554. Данные получены в ходе экспериментов, осуществленных образцами $n=5$ различных субъектом, и приведены как среднее значение $\pm$ SEM. * $P < 0.05$ и ** $P < 0.01$.

Фиг. 5: Поверхности взаимодействия, полученные в ходе анализа поверхности ответа для В1 модели взаимодействия лекарственных средств для комбинации RPL554 плюс атропин. Горизонтальная ось показывает концентрацию соединений, а вертикальная ось показывает ΔE (релаксация, %). 0-план показывает В1 взаимодействие, объем выше 0-плана показывает синергетические (положительное ΔE) взаимодействия. Магнитуда взаимодействий непосредственно связана с ΔE , и различные тоны для 3D графиков показывают различные процентильные полосы синергетического эффекта (10%). Пересечение в каждой точке показывает среднее по экспериментам, осуществленным для образцов от различных субъектов ($n=5$).

Фиг. 6: Столбчатая диаграмма, показывающая ответ релаксации на атропин (открытая колонка; атропин, нМ), RPL554 (закрытая колонка; нМ), аддитивный ответ на каждую дозированную комбинацию (колонка пунктиром; аддитивный эффект) и наблюдаемый ответ релаксации для каждой дозированной комбинации (колонка темным пунктиром; комбинация 1:1)). Концентрации каждого агониста показаны на оси X. Каждый столбец показывает среднее значение, и вертикальные линии показывают стандартное отклонение ($N=5$). В случае аддитивного ответа, SD оценивали с применением способов Tallarida и Raffa (2010). * $P < 0.05$ (установлено) для аддитивного ответа с применением t-теста для одного образца.

Фиг. 7: Уменьшение непроходимости дыхательных путей (вызванной внутривенным (iv.) введением бомбезина (2 мкг/мл; 5 мл/ч)) после iv. введения RPL554 самого по себе (●) или в комбинации с 2 мкг/кг атропином (▲).

Фиг. 8: Уменьшение среднего артериального давления крови после iv. введения RPL554 самого по себе (●) или в комбинации с 2 мкг/кг атропином (▲).

Фиг. 9: Уменьшение непроходимости дыхательных путей (вызванной внутривенным (iv.) введением бомбезина (2 мкг/мл; 5 мл/ч)) после iv. введения атропина.

Фиг. 10: Уменьшение среднего артериального давления крови после iv. введения атропина.

Фиг. 11: Кривая зависимости ответа от концентрации (CRC) бронхиального тонуса для гликопиррония при различных частотах стимулирования электрическим полем (EFS).

Фиг. 12: Кривая зависимости ответа от частоты бронхиального тонуса для гликопиррония при различных концентрациях гликопиррония, а также графики площади под кривой (AUC).

Фиг. 13: Кривая зависимости ответа от концентрации (CRC) бронхиального тонуса

для RPL554 при различных частотах стимулирования электрическим полем (EFS).

Фиг. 14: Кривая зависимости ответа от частоты бронхиального тонуса для RPL554 при различных концентрациях.

Фиг. 15: Ответ сокращения выделенных бронхов человека на RPL554, гликопирроний и RPL554 и гликопирроний в комбинации при EFS, равной (А) 3 Гц, (В) 10 Гц, и (С) 25 Гц, и AUC сравнения для каждой частоты (D).

Фиг. 16: Ответ релаксации на RPL554, гликопирроний, ожидаемый ответ на RPL554 и гликопирроний в комбинации и наблюдаемый ответ на RPL554 и гликопирроний в комбинации.

Фиг. 17: Кривая зависимости ответа от концентрации для RPL554 и гликопиррония для выделенных бронхов человека при субмаксимальном сокращении, вызванном карбахолом (CCh).

Фиг. 18: Ожидаемый и наблюдаемый ответ релаксации, вызванной RPL554 и гликопирронием в комбинации для маленьких бронхов человека (диаметр <1 мм).

Фиг. 19: Дельта-эффект между наблюдаемым и ожидаемым ответом релаксации, вызванным RPL554 и гликопирронием в комбинации.

Подробное описание настоящего изобретения

В описании настоящего изобретения применяются следующие аббревиатуры:

RPL554: 9,10-Диметокси-2-(2,4,6-триметилфениламино)-3-(N-карбамоил-2-аминоэтил)-3,4,6,7-тетрагидро-2Н-пиримидо[6,1-а]изохинолин-4-он; ANOVA: вариационный анализ; VI: независимость по Блиссу; COX: циклооксигеназа; EC30: концентрация, необходимая чтобы вызвать 30% от максимального эффекта; EC50: концентрация, необходимая чтобы вызвать 50% от максимального эффекта; EC70: концентрация, необходимая чтобы вызвать 70% от максимального эффекта; EFS: стимуляция электрическим полем; Emax: максимальный эффект; КН: буферный раствор Кребса-Хенселейта; LA: аддитивность по Loewe; и PDE: фосфодиэстераза.

Термин "фармацевтически приемлемый" относится к веществу, которое не является биологически или иным образом не желательным. Например, термин "фармацевтически приемлемый носитель" относится к веществу, которое может быть включено в композицию и вводиться субъекту / пациенту, не вызывая не желательных биологических эффектов или не взаимодействуя вредоносным образом с другими компонентами композиции. Такие фармацевтически приемлемые вещества, как правило, удовлетворяют стандартам токсикологических и производительных тестов и включают вещества, определенные в качестве подходящих неактивных ингредиентов управлением США по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов.

Термин "фармацевтически приемлемая кислотно-аддитивная соль" относится к кислотно-аддитивным солям для фармацевтического применения, которые не являются биологически или иным образом не желательными. Такие фармацевтически приемлемые кислотно-аддитивные соли хорошо известны специалистам в данной области техники.

Термин "терапевтически эффективное количество" означает количество, достаточное для эффективного лечения при введении субъекту, нуждающемуся в лечении. В частности, "эффективное" количество это количество, необходимое для получения желаемого результата, и "терапевтически эффективное" количество это количество, необходимое для получения желаемого терапевтического эффекта. Например, для антагонизации мускаринового рецептора, "эффективное количество" представляет собой количество, антагонизирующее мускариновый рецептор. Подобным образом, терапевтически

эффективное количество для лечения хронического обструктивного заболевания

легких (ХОЗЛ) это количество, которое обеспечивает достижение желаемого терапевтического результата, которым может быть профилактика заболевания, улучшение состояния, подавление заболевания или излечение.

Термин "лечить" или "лечение", как применяется в настоящей заявке, означает лечение 5 заболевания или медицинского состояния (такого как ХОЗЛ) у субъекта, такого как млекопитающее (в частности человек), которое включает: (а) профилактику возникновения заболевания или медицинского состояния, т.е., профилактическое лечение субъекта; (b) улучшение заболевания или медицинского состояния, т.е., уменьшение или вызов регрессии заболевания или медицинского состояния у субъекта; (с) подавление 10 заболевания или медицинского состояния, т.е., замедление или прекращение развития заболевания или медицинского состояния у субъекта; или (d) излечение симптомов заболевания или медицинского состояния у субъекта. Например, термин "лечение ХОЗЛ" будет включать профилактику возникновения ХОЗЛ, уменьшение ХОЗЛ, подавление ХОЗЛ и излечение симптомов ХОЗЛ. Термин "субъект", как понимается, 15 включает всех млекопитающих, включая людей, которые нуждаются в лечении или профилактики заболевания, которые в данный момент лечатся для профилактики заболевания или лечения конкретного заболевания или медицинского состояния, а также тестируемых субъектов, на которых композиции согласно настоящему изобретению оцениваются или которые применяются для анализа, например животная 20 модель.

PDE3/PDE4 ингибитор

PDE3/PDE4 ингибитор, применяемый согласно настоящему изобретению, представляет собой 9,10-диметокси-2-(2,4,6-триметилфениламино)-3-(N-карбамоил-2-аминоэтил)- 3,4,6,7-тетрагидро-2Н-пиримидо[6,1-а]изохинолин-4-он (также известный как RPL554) 25 или его фармацевтически приемлемую кислотно-аддитивную соль.

Как правило, PDE3/PDE4 ингибитор представляет собой 9,10-диметокси-2-(2,4,6-триметилфениламино)-3-(N-карбамоил-2-аминоэтил)-3,4,6,7-тетрагидро-2Н-пиримидо [6,1-а]изохинолин-4-он. Таким образом, свободное основание 9,10-диметокси-2-(2,4,6-триметилфениламино)-3-(N-карбамоил-2-аминоэтил)-3,4,6,7-тетрагидро-2Н-пиримидо 30 [6,1-а]изохинолин-4-она является предпочтительным.

Антагонисты мускариновых рецепторов

Антагонист мускаринового рецептора (MRA) представляет собой соединение, которое блокирует активность мускариновых ацетилхолиновых рецепторов. Для специалиста в данной области техники не сложно определить блокирует ли данное соединение 35 активность мускариновых ацетилхолиновых рецепторов, применяя анализы, хорошо известные для специалистов в данной области техники.

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что RPL554 способна усиливать активность двух структурно различных антагонистов мускариновых рецепторов, а именно атропина и гликопиррония. На основе этого обнаружения с двумя структурно 40 различными антагонистами мускариновых рецепторов, следует, что синергетическое взаимодействие, наблюдаемое с RPL554, возникает скорее благодаря активности этих соединений в качестве антагонистов мускариновых рецепторов, чем благодаря специфической структуре этих соединений. Поэтому следует, что синергетическое взаимодействие с RPL554 можно ожидать для всех соединений с активностью 45 антагониста мускаринового рецептора.

Как правило, антагонист мускаринового рецептора представляет собой атропин, метилатропин, гоматропин, гиосциамин, скополамин, ипратропиум, окситропиум, тиотропиум, метантелин, пропантелин, анизотропии, клидиниум, копирролат (Robinul),

изопропамид, мепензолат, тридигексетил, гексоциклиум, циклопентолат, тропикамид, тригексифенидил, пирензепин, телензепин, AF-DX 116 и метоктрамин или тому подобное. Например, антагонист мускаринового рецептора представляет собой атропин, атропин сульфат, атропин оксид, метилатропин нитрат, гоматропин гидробромид, гиосциамин (d, l) гидробромид, скополамин гидробромид, ипратропиум бромид, окситропиум бромид, тиотропиум бромид, метантелин, пропантелин бромид, анизотропии метил бромид, клидиниум бромид, копирролат (Robinul), изопропамид иодид, мепензолат бромид, тридиксетил хлорид (Pathilone), гексоциклиум метилсульфат, циклопентолат гидрохлорид, тропикамид, тригексифенидил гидрохлорид, пирензепин, телензепин, AF-DX 116 и метоктрамин или тому подобное. Другими представительные примеры антагонистов мускариновых рецепторов включают аклидиниум (например, аклидиниум бромид) и умеклидиниум (например умеклидиниум бромид).

Как правило, антагонист мускаринового рецептора представляет собой атропин, гиосцин, гликопирролат (гликопирроний), ипратропиум, тиотропиум, окситропиум, пирензепин, телензепин, аклидиниум или умеклидиниум. Предпочтительно, антагонистом мускаринового рецептора может быть атропин, гиосцин, гликопирролат (гликопирроний), ипратропиум бромид, тиотропиум бромид, окситропиум бромид, пирензепин, телензепин, аклидиниум или умеклидиниум. Альтернативно, антагонистом мускаринового рецептора атропин, гиосцин, гликопирролат, ипратропиум бромид, тиотропиум бромид, окситропиум бромид, пирензепин или телензепин.

Более предпочтительно, антагонист мускаринового рецептора представляет собой атропин, ипратропиум бромид или тиотропиум бромид.

Более предпочтительно, агонист мускаринового рецептора представляет собой атропин или гликопирроний.

Антагонисты мускариновых рецепторов необязательно присутствуют в форме их рацематов, их энантиомеров, их диастереомеров, и их смесей, и необязательно их фармацевтически приемлемых кислотно-аддитивных солей. Типичными примерами подходящих кислот для образования кислотно-аддитивных солей антагонистов мускариновых рецепторов являются соляная кислота, бромистоводородная кислота, серная кислота, фосфорная кислота, метансульфоновая кислота, уксусная кислота, фумаровая кислота, сукциновая

кислота, малеиновая кислота и трифторуксусная кислота. Кроме того, могут применяться смеси вышеупомянутых солей.

Композиции, комбинации, фармацевтические композиции и составы

Композиции согласно настоящему изобретению содержат (a) PDE3/PDE4 ингибитор, который представляет собой 9,10-диметокси-2-(2,4,6-триметил фениламино)-3-(N-карбамоил-2-аминоэтил)-3,4,6,7-тетрагидро-2H-пиримидо[6,1-a]изохинолин-4-он или его фармацевтически приемлемую кислотно-аддитивную соль и (b) антагонист мускаринового рецептора.

Как правило, композиция согласно настоящему изобретению представляет собой фиксированную комбинацию. В фиксированной комбинации, PDE3/PDE4 ингибитор и антагонист мускаринового рецептора присутствуют в одной и той же композиции. Фиксированная комбинация может применяться для одновременного введения PDE3/PDE4 ингибитора и антагониста мускаринового рецептора. Как правило, фиксированная комбинация представляет собой композицию в виде сухого порошка (которая предпочтительно подходит для доставки посредством ингалятора сухого порошка), раствор которой подходит для доставки посредством аэрозольного аппарата, или раствор или суспензия которой подходит для доставки посредством ингалятора

отмеренных доз с распыление сжатым воздухом.

Таким образом, например, фиксированная комбинация предпочтительно представляет собой композицию в виде сухого порошка, содержащую как PDE3/PDE4 ингибитор, так и антагонист мускаринового рецептора. Альтернативно, фиксированная комбинация может представлять собой раствор, как правило водный раствор, содержащий как PDE3/PDE4 ингибитор, так и антагонист мускаринового рецептора, который подходит для доставки посредством ингалятора отмеренных доз с распыление сжатым воздухом. Альтернативно, фиксированная комбинация может представлять собой раствор или суспензию, содержащую как PDE3/PDE4 ингибитор, так и антагонист мускаринового рецептора, которые подходят для доставки посредством ингалятора отмеренных доз с распыление сжатым воздухом.

Два компонента в фиксированной композиции, как правило, смешаны между собой.

Альтернативно, композиция согласно настоящему изобретению может представлять собой свободную комбинацию. В свободной комбинации активные компоненты (а) и (b), как правило, отделены друг от друга и упакованы в одном наборе для одновременного, по существу одновременного, раздельного или последовательного введения.

Как правило, композиция представляет собой фармацевтическую композицию, которая дополнительно содержит один или более фармацевтически приемлемый носителей, разбавителей или эксципиентов в дополнение к PDE3/PDE4 ингибитору и антагонист мускаринового рецептора. Композиции может содержать другие терапевтические и/или вспомогательные для образования композиции агенты, при необходимости. Предпочтительным примером другого терапевтического агента является агонист β_2 -адренергетического рецептора. Примерами агонистов β_2 -адренергических рецепторов являются сальбутамол, альбутерол, битолтерол, феноиерол, формотерол, индакатерол, изоэтарин, левабутерол, метапротеренол, пирбутерол, сальмефамол, сальметерол и тербуталин. Предпочтительными примерами агонистов β_2 -адренергических рецепторов являются сальбутамол, сальметерол, формотерол, альбутерол и пирбутерол.

Композиции согласно настоящему изобретению, как правило, вводятся субъекту в форме фармацевтической композиции. Такие фармацевтические композиции могут вводиться субъекту любым подходящим путем введения, включая, но без ограничения к этому, ингаляционный, пероральный, назальный, местный (включая трансдермальный) и парентеральный пути введения. Введение посредством ингаляции является предпочтительным. Кроме того, композиции согласно настоящему изобретению могут вводиться, например перорально, в виде множества доз в день, в виде одной ежедневной дозы или одной еженедельной дозы. Необходимо понимать, что любая форма активных агентов, применяемых в композиции согласно настоящему изобретению, (т.е. свободное основание, фармацевтически приемлемая соль, сольват и т.д.), которая является подходящей для конкретного способа введения, может применяться в фармацевтических композициях, описанных в настоящей заявке.

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению, как правило, содержат терапевтически эффективное количество активного агента. Специалистам в данной области техники будет понятно, однако, что фармацевтическая композиция может содержать более чем терапевтически эффективное количество, т.е., валовые составы, или менее чем терапевтически эффективное количество, т.е., отдельные однократные дозы, предназначенные для многократного введения для достижения терапевтически эффективного количества. В одном варианте выполнения настоящего

изобретения, композиция будет содержать около 0.01-95 мас. % активного агента, включая около 0.01-30 мас. %, как например, около 0.01-10 мас. %, где точное количество зависит от самой композиции, пути введения, частоты введения доз и т.д. В другом варианте выполнения настоящего изобретения, композиция, подходящая для ингаляции, например, содержит около 0.01-30 мас. % активного агента, или еще в одном варианте выполнения настоящего изобретения композиция содержит около 0.01-10 мас. % активного агента.

Любой обычный носитель или эксципиент может применяться в фармацевтических композициях согласно настоящему изобретению. Выбор конкретного носителя или эксципиента, или комбинаций носителей или эксципиентов, будет зависеть от способа введения, применяемого для лечения конкретного субъекта или вида медицинского состояния или болезненного состояния. В этом отношении, получение подходящей композиции для конкретного способа введения будет находиться в рамках компетенции специалиста в фармацевтической области. Кроме того, носители или эксципиенты, применяемые в таких композициях, являются коммерчески доступными. В качестве дальнейшей иллюстрации, обычные методики получения композиций описываются в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20 Edition, Lippincott Williams & White, Baltimore, Md. (2000); and H.C. Ansel et al., Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7th Edition, Lippincott Williams & White, Baltimore, Md. (1999).

Типичные примеры веществ, которые могут служить в качестве фармацевтически приемлемых носителей включают, но без ограничения к этому, следующие: сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; целлюлозу, такую как микрокристаллическая целлюлоза, и ее производные, такие как натрия карбоксиметилцеллюлоза, этилцеллюлоза и ацетат целлюлозы; порошкообразный трагакант; ржаной солод; желатин; тальк; эксципиенты, такие как какао масло и суппозиторные воски; масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, сафлоровое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло; гликоли, такие как пропиленгликоль; полиолы, такие как глицерин, сорбит, маннит и полиэтиленгликоль; сложные эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат; агар; буферизующие агенты, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; альгиновая кислота; апирогенная вода; изотонический соляной раствор; раствор Рингера; этиловый спирт; фосфатные буферные растворы; сжатые газы-пропелленты, такие как хлорфторуглероды и гидрофторуглероды; и другие нетоксичные совместимые вещества, применяемые в фармацевтических композициях.

Фармацевтические композиции, как правило, получают путем тщательного и непосредственного смешивания или перемешивания активного агента/активного ингредиента с фармацевтически приемлемым носителем и один или более необязательными ингредиентами. Полученная равномерно перемешанная смесь может затем быть формована или загружена в таблетки, капсулы, пилюли, канистры, картриджи, дозаторы и тому подобное с применением обычных методик и оборудования.

Как правило, фармацевтические композиции подходят для ингаляционного введения. Фармацевтическая композиция может вводиться посредством ингалятора сухого порошка (DPI) или ингалятора отмеренных доз (MDI).

Подходящие композиции для ингаляционного введения, как правило, находятся в форме аэрозоля или порошка, например, композиция в виде сухого порошка. Такие композиции, как правило, вводят с применением хорошо известных устройств для введения, таких как, аэрозольный ингалятор, ингалятор сухого порошка или ингалятор отмеренных доз, примеры которых описаны далее.

Альтернативно, композиция, содержащая активный агент(ы) / активный ингредиент (ы), может вводиться путем ингаляции с применением аэрозольного ингалятора. Такие аэрозольные устройства, как правило, производят высокоскоростной поток воздуха, который вызывает распыление композиции в виде тумана, который переносится в дыхательные пути субъекта. Соответственно, когда полученный в виде композиции для применения в аэрозольном ингаляторе, активный агент(ы) / активный ингредиент (ы), как правило, растворяется в подходящем носителе для образования раствора. Альтернативно, активный агент(ы) / активный ингредиент(ы) может быть микронизирован и объединен с подходящим носителем с образованием суспензии микронизированных частиц респираторного размера, где микронизированный, как правило, определяется как имеющий частицы, в которых по меньшей мере 90 процентов частиц имеют средний массовый диаметр менее чем около 10 мкм. Термин "средний массовый диаметр" означает диаметр, такой что половина массы частиц содержится в частицах с большим диаметром, и половина содержится в частицах с меньшим диаметром.

Подходящие аэрозольные устройства включают ингалятор RespiMat^{RTM} Soft MistTM (Boechinger Ingelheim), AERx^{RTM} Pulmonary Delivery System (Aradigm Corp.) и PARI LC Плюс Reusable Nebulizer (Pari GmbH). Примерная композиция для применения в аэрозольном ингаляторе (ингаляторе с распылением) содержит изотонический водный раствор, содержащий от около 0,05 мкг/мл до около 10 мг/мл RPL554. В одном варианте выполнения настоящего изобретения такой раствор имеет pH около 3.5-6.

Альтернативно, композиция, содержащая активный агент(ы) / активный ингредиент (ы), может вводиться путем ингаляции посредством ингалятора сухого порошка (DPI). Такие DPI, как правило, вводят активный агент в виде свободнотекучего порошка, который диспергируется в потоке воздуха субъекта в ходе вдоха. Для достижения состояния свободнотекучего порошка, активный агент(ы) / активный ингредиент(ы), как правило, получают в виде композиции с подходящими эксципиентами, такими как лактоза, крахмал, маннит, декстроза, полимолочная кислота, полилактид-со-гликолид, и их комбинации. Как правило, активный агент(ы) / активный ингредиент(ы) микронизируется и объединяется с эксципиентами с образованием смеси, подходящей для ингаляции. Соответственно, в одном варианте выполнения настоящего изобретения, активный агент(ы) / активный ингредиент(ы) находится в микронизированной форме. Например, композиция согласно настоящему изобретению для применения в DPI содержит сухую лактозу, имеющую размер частиц от около 1 мкм до около 100 мкм (например, сухая измельченная лактоза), и микронизированные частицы активного агента. Такая композиция в виде сухого порошка может быть получена, например, путем объединения лактозы с активным агентом и затем сухого смешивания компонентов. Альтернативно, если желательно, активный агент может быть получен в виде композиции без эксципиента. Композиция затем, как правило, загружается в DPI, или в картриджи или капсулы для ингалятора для применения с DPI. DPI хорошо известны специалистам в данной области техники, и многие такие устройства являются коммерчески доступными, где типичные устройства включают Aerolizer^{RTM} (Novartis), AirmaxTM (IVAX), ClickHaler^{RTM} (Innovata Biomed), Diskhaler^{RTM} (GlaxoSmithKline), Diskus^{RTM} или Accuhaler (GlaxoSmithKline), Easyhaler^{RTM} (Orion Pharma), EclipseTM (Aventis), FlowCaps^{RTM} (Hovione), Handihaler^{RTM} (Boehringer Ingelheim), Pulvinal^{RTM} (Chiesi), Rotahaler^{RTM} (GlaxoSmithKline), SkyeHalerTM или CertihalerTM (SkyePharma), Twisthaler

(Schering-Plough), Turbuhaler^{RTM} (AstraZeneca), Ultrahaler^{RTM} (Aventis), и тому подобное.

Альтернативно, композиция, содержащая активный агент, может вводиться посредством ингаляции с применением ингалятора отмеренных доз (MDI). Такие MDI, как правило, выгружают отмеренное количество активного агента с применением сжатого газа-пропеллента. Композиции в виде отмеренных доз таким образом, как правило, содержат раствор или суспензию активного агента в сжиженном пропелленте, как например хлорофторуглерод, такой как CCl₃F, или гидрофторалкан (HFA), такой как 1,1,1,2-тетрафторэтан (HFA 134a) и 1,1,1,2,3,3,3-гептафтор-н-пропан (HFA 227), хотя HFA в общем являются предпочтительными, так как хлорофторуглероды оказывают воздействие на озоновый слой. Дополнительные необязательные компоненты HFA композиций включают со-растворители, такие как этанол или пентан, и поверхностно-активные вещества, такие как сорбит триолеат, олеиновая кислота, лецитин и глицерин. Смотрите, например, патент США №5,225,183, автором которого являются Purewal et al., EP 0717987 A2 (компания Minnesota Mining and Manufacturing), и WO 92/22286 (компания Minnesota Mining and Manufacturing). Примерная композиция для применения в MDI содержит около 0.01-5 мас. % активного агента; около 0-20 мас. % этанола; и около 0-5 мас. % поверхностно-активного вещества; где оставшуюся часть составляет HFA пропеллент. Такие композиции, как правило, получают путем добавления охлажденного или сжатого гидрофторалкана в подходящий контейнер, содержащий активный агент, этанол (если присутствует) и поверхностно-активное вещество (если присутствует). Для получения суспензии, активный агент микронизируют и затем объединяют с пропеллентом. Композицию затем загружают в аэрозольную канистру, которая образует часть MDI. MDI хорошо известны специалистам в данной области техники, и многие такие устройства являются коммерчески доступными, где типичные устройства включают AeroBid Inhaler System (Forest Pharmaceuticals), Atrovent Inhalation Aerosol (Boehringer Ingelheim), Flovent^{RTM} (GlaxoSmithKline), Maxair Inhaler (3M), Proventil^{RTM} Inhaler (Schering), Serevent^{RTM} Inhalation Aerosol (GlaxoSmithKline) и тому подобное. Альтернативно, композиция в виде суспензии может быть получена путем распыления с сушкой покрытия из поверхностно-активного вещества на микронизированные частицы активного агента. Смотрите, например, WO 99/53901 (Glaxo Group Ltd.) и WO 00/61108 (Glaxo Group Ltd.).

Дополнительные примеры способов получения респираторных частиц и композиций и устройств, подходящих для дозированной ингаляции, описаны в патентах США №5,874,063, авторами которого являются Briggner et al.; №5,983,956, авторами которого являются Trofast; №6,221,398, авторами которого являются Jakupovic et al.; №6,268,533, авторами которого являются Gao et al.; №6,475,524, авторами которого являются Bisrat et al.; и №6,613,307, автором которого является Cooper.

Альтернативно, фармацевтические композиции могут быть подходящими для перорального введения. Подходящие фармацевтические композиции для перорального введения могут быть в виде капсул, таблеток, пилюль, пастилок, саше, драже, порошков, гранул, или в виде раствора, или суспензии в водной или неводной жидкости; или в виде жидкой эмульсии масло-в-воде или вода-в-масле; или в виде эликсира или сиропа и тому подобного; где каждая из форм содержит определенное количество активного агента.

В случае предназначения для перорального введения в виде твердой лекарственной формы (т.е. в виде капсул, таблеток, пилюль и тому подобного), композиция, как правило, будет содержать активный агент и один или более фармацевтически

приемлемых носителей, таких как цитрат натрия или фосфат дикальция. Твердые лекарственные формы могут также содержать: наполнители или добавки, такие как крахмалы, микрокристаллическая целлюлоза, лактоза, сахароза, глюкоза, маннит и/или кремниевая кислота; связующие вещества, такие как карбоксиметилцеллюлоза, альгинаты, желатин, поливинил пирролидон, сахароза и/или камедь; гигроскопические вещества, такие как глицерин; распадающиеся вещества, такие как агар-агар, карбонат кальция, картофельный крахмал или маниоковый крахмал, альгиновая кислота, определенные силикаты, и/или карбонат натрия; добавки для замедления растворения, такие как парафин; ускорители абсорбции, такие как соединения четвертичного аммония; смазывающие агенты, такие как цетиловый спирт и/или глицерин моностеарат; абсорбенты, такие как каолин и/или бентонитовая глина; смазывающие вещества, такие как тальк, стеарат кальция, стеарат магния, твердые полиэтиленгликоли, лаурилсульфат натрия и/или их смеси; окрашивающие агенты; и буферизующие агенты.

Агенты высвобождения, смазывающие агенты, покрывающие агенты, подсластители, ароматизаторы и ароматизирующие добавки, консерванты и антиоксиданты могут также присутствовать в фармацевтических композициях. Примерные покрывающие агенты для таблеток, капсул, пилюль и тому подобного, включают применяемые для энтеральных покрытий, такие как целлюлозы ацетат фталат, поливинил ацетат фталат, гидроксипропилеметилцеллюлозы фталат, сополимеры метакриловой кислоты и сложного эфира метакриловой кислоты, целлюлозы ацетат тримеллитат, карбоксиметил этил целлюлоза, гидроксипропилметилцеллюлозы ацетат сукцинат, и тому подобное. Примеры фармацевтически приемлемых антиоксидантов включают: растворимые в воде антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, цистеина гидрохлорид, бисульфат натрия, натрия метабисульфат, натрия сульфит и тому подобное; растворимые в масле антиоксиданты, такие как аскорбил пальмитат, бутилированный гидроксианизол, бутилированный гидрокситолуол, лецитин, пропилгаллат, альфа-токоферол и тому подобное; и металл-хелатирующие агенты, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота, сорбит, винная кислота, фосфорная кислота и тому подобное.

Композиции могут также быть составлены для обеспечения медленного или контролируемого высвобождения активного агента с применением, в качестве примера, гидроксипропилметилцеллюлозы в различных пропорциях, или других полимерных матриц, липосом и/или микросфер. Кроме того, фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению могут содержать опалесцирующие агенты и могут быть получены таким образом, что они высвобождают активный агент только, или предпочтительно, в определенной части желудочно-кишечного тракта, при необходимости, замедленным образом. Примеры вставляемых композиций, которые могут применяться, включают полимерные вещества и воски. Активный агент может также быть получен в микро-инкапсулированной форме, при необходимости, с одним или более вышеописанных эксципиентов.

Подходящие жидкие лекарственные формы для перорального введения, в качестве иллюстрации, фармацевтически приемлемые эмульсии, микроэмульсии, растворы, суспензии, сиропы и эликсиры. Жидкие лекарственные формы, как правило, содержат активный агент и инертный разбавитель, такой как, например, вода или другие растворители, солюбилизующие агенты и эмульгаторы, такие как этиловый спирт, изопропиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат бензиловый спирт бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, масла (например, хлопковое, арахисовое, кукурузное, зародышевое, оливковое, касторовое и кунжутное масла), глицерин,

тетрагидрофуриловый спирт, полиэтиленгликоли и сложные эфиры жирных кислот и сорбитана и их смеси. Суспензии могут содержать суспендирующие агенты, такие как например, этоксилированные изостеариловые спирты, полиоксиэтиленовые сложные эфиры сорбита и сорбитана, микрокристаллическую целлюлозу, метагидроксид

5 алюминия, бентонит, агар-агар и трагакантовую камедь и их смеси.

В случае если они предназначены для перорального введения, фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению могут быть упакованы в виде единичной дозированной формы. Термин «единичная дозированная форма» означает физически дискретную единицу, подходящую для дозирования субъекту, т.е. каждая единица

10 содержит предварительно определенное количество активных агентов, рассчитанное для оказания желательного терапевтического действия или по отдельности или в сочетании с одной или несколькими дополнительными единицами. Например, такая единичная дозированная форма может представлять собой капсулы, таблетки, пилюли и тому подобное.

15 Композиции согласно настоящему изобретению можно также вводить парентерально (например, подкожной, внутривенной, внутримышечной или внутрибрюшинной инъекцией). Для такого введения активный агент представляют в стерильном растворе, суспензии или эмульсии. Репрезентативные растворители для получения таких составов включают воду, солевой раствор, спирты с низкой молекулярной массой, такие как

20 пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, масла, желатин, эфиры жирных кислот, такие как этилолеат и тому подобное. Типичным парентеральным составом является стерильный водный раствор активного агента с pH 4-7. Парентеральные составы могут содержать также один или несколько солюбилизаторов, стабилизаторов, консервантов, смачивающих агентов, эмульгаторов и диспергирующих агентов. Этим составам может

25 быть придана стерильность посредством применения стерильной инъекционной среды, стерилизующего агента, фильтрации, облучения или нагревания.

Композиции согласно настоящему изобретению также могут вводиться трансдермально с применением известных систем и эксципиентов для трансдермальной доставки. Например, активные агенты могут быть смешаны с усилителями

30 проницаемости, такими как пропиленгликоль, монолаурат полиэтиленгликоля, азациклоалкан-2-оны и тому подобные, и введены в пластырь или аналогичную систему доставки. Дополнительные эксципиенты, включая гелеобразующие агенты, эмульгаторы и буферы, могут применяться в таких трансдермальных композициях при желании.

Посредством комбинации RPL554 со вторым агентом может быть достигнута двойная

35 терапия, т.е. PDE3/PDE4 ингибирующая активность и активность, связанная со вторым агентом (антагонист мускаринового рецептора), в некоторых случаях посредством введения двух композиций, и в некоторых случаях посредством введения одной композиции, содержащей активный агент и второй агент. В комбинированной терапии, количество RPL554, которое вводится, а также количество вторых агентов, может быть

40 меньше, чем количество, как правило, вводимое при монотерапии.

RPL554 может быть либо физически смешан со вторым активным агентом (антагонист мускаринового рецептора) с образованием композиции, содержащей оба агента; либо каждый агент может присутствовать в отдельных и раздельных композициях, которые вводятся субъекту одновременно или последовательно. Например, RPL554 может

45 объединяться со вторым активным агентом с применением обычных методик и оборудования с образованием комбинации активных агентов, содержащей RPL554 и второй активный агент. Дополнительно, активные агенты могут быть объединены с фармацевтически приемлемым носителем с образованием фармацевтической композиции,

содержащей RPL554, второй активный агент и фармацевтически приемлемый носитель. В этом варианте выполнения настоящего изобретения, компоненты композиции, как правило, смешиваются или перемешиваются с получением физической смеси. Физическая смесь затем вводится в терапевтически эффективном количестве с применением любого из описанных в настоящей заявке путей введения.

Альтернативно, активные агенты могут оставаться отдельно и раздельно перед введением субъекту. В этом варианте выполнения настоящего изобретения, агенты физически не смешаны вместе перед введением, но вводятся одновременно или в раздельные моменты времени в виде отдельных композиций. Такие композиции могут быть упакованы раздельно или могут быть упакованы вместе в виде набора. При введении в раздельные моменты времени, второй агент будет, как правило, вводиться менее чем через 24 часа после введения RPL554. В других вариантах выполнения настоящего изобретения это взаимодействие во времени составляет менее 12 часов, менее 8 часов, менее 6 часов, менее 4 часов, менее 3 часов, менее 1 часа, менее тридцати минут, менее десяти минут, менее одной минуты или непосредственно сразу после введения RPL554. Это также относится к последовательному введению. Таким образом, RPL554 может вводиться путем ингаляции одновременно или последовательно с другим активным агентом с применением устройства для ингаляции, которое имеет разделенные части (например, блистерные упаковки) для каждого активного агента, где последовательно введение может означать введение непосредственно сразу после введения RPL554 или позже через некоторый определенный период времени (например, через один час или через три часа). Альтернативно, комбинация может вводиться с применением различных устройств для доставки, т.е. одно устройство для доставки для каждого агента. Дополнительно, агенты могут доставляться путем различных путей введения, т.е. один путем ингаляции, а другой путем перорального введения.

Как правило, набор содержит первую лекарственную форму, содержащую RPL554 и по меньшей мере одну дополнительную лекарственную форму, содержащую один или более вторых агентов, приведенных в настоящей заявке, в количествах, достаточных для осуществления способов согласно настоящему изобретению. Первая лекарственная форма и вторая (или третья и т.д.) лекарственная форма вместе содержат терапевтически эффективное количество активных агентов для лечения или профилактики заболевания или медицинского состояния у субъекта.

Второй агент(ы), когда включены, присутствуют в терапевтически эффективном количестве, т.е., как правило, вводятся в количестве, которое вызывает терапевтически благоприятный эффект при совместном введении с RPL554. Второй агент может быть в форме фармацевтически приемлемой кислотной-аддитивной соли, сольвата, оптически чистого стереоизомера и т.д. Таким образом, вторые агенты, перечисленные далее, как подразумевается, включают все такие формы и являются коммерчески доступными или могут быть получены с применением обычных методик и реагентов. Подходящие дозы для второго реагента находятся, как правило, в интервале от около 0.05 мкг/день до около 500 мг/день.

Заболевания и состояния

Комбинация (a) PDE3/PDE4 ингибитора, как определено в настоящей заявке, и (b) антагониста мускаринового рецептора, как определено в настоящей заявке, полезна для лечения заболевания или состояния, которое связано с (i) острой или хронической закупоркой сосудов или бронхов, или (ii) острым или хроническим воспалением, у субъекта, нуждающегося в этом.

Как правило, заболевание или состояние выбирается из:

1. дыхательные пути: обструктивные заболевания дыхательных путей, включая астму, в том числе бронхиальную, аллергическую, эндогенную, экзогенную, вызванную физической нагрузкой, вызванную лекарствами (включая аспирин и

5 нестероидные противовоспалительные средства (NSAID)) и вызванную пылью астму, как перемежающуюся, так и постоянную и всех степеней тяжести, и другие причины гиперреактивности дыхательных путей; хроническое обструктивное заболевание легких (ХОЗЛ); бронхит, включая инфекционный и эозинофильный бронхит; эмфизема; бронхоэктаз; кистозный фиброз; саркоидоз; легкого "фермера" и родственные заболевания; гиперчувствительный пневмонит; фиброз легкого, включая эндогенный
10 фиброзный альвеолит, идиопатические интерстициальные пневмонии, фиброз, осложняющий противоопухолевую терапию и хроническую инфекцию, в том числе туберкулез и аспергиллез и другие грибковые инфекции; осложнения после трансплантации легкого; васкулитные и тромботические расстройства сосудистой сети легкого и легочная гипертензия; противокашлевая активность, включая лечение
15 хронического кашля, ассоциированного с воспалительными и секреторными состояниями дыхательных путей, и ятрогенного кашля; острый и хронический ринит, включая медикаментозный ринит и вазомоторный ринит; круглогодичный и сезонный аллергический ринит, включая нервный ринит (сенная лихорадка); назальный полипоз; острая вирусная инфекция, включая простуду, и инфекция, вызванная респираторно-
20 синцитиальным вирусом, вирусом гриппа, коронавирусом (в том числе SARS (вирус атипичной пневмонии)) и аденовирусом;

2. кости и суставы: кожные высыпания, ревматического или подагрического происхождения, связанные с остеоартритом/остеоартрозом или включающие остеоартрит/остеоартроз, как первичные, так и вторичные по отношению к, например,
25 врожденной дисплазии бедра; шейный и поясничный спондилит, и боль в спине, и боль в шее; ревматоидный артрит и болезнь Стилла; серонегативные спондилоартропатии, включая анкилозирующий спондилоартрит, псориатический артрит, реактивный артрит и недифференцированную спондилоартропатию; септический артрит и другие
30 инфекционные артропатии и костные расстройства, такие как туберкулез, включая болезнь Потта и синдром Понке; острый и хронический синовит, вызванный кристаллами, включая уратную подагру, болезнь, связанную с отложениями пирофосфата кальция, и воспаление сухожилия, сумки и синовиального воспаления, связанное с отложениями кальциевого апатита; болезнь Бехчета; первичный и вторичный синдром Шегрена; системный склероз и ограниченная склеродерма; системная красная
35 волчанка, смешанное заболевание соединительной ткани, и недифференцированное заболевание соединительной ткани; воспалительные миопатии, включая дерматомиозит и полимиозит; ревматическая полимиалгия; ювенильный артрит, включая идиопатические кожные высыпания ревматического или подагрического происхождения любой зоны иннервации сустава и ассоциированные синдромы, и ревматизм и его
40 системные осложнения; васкулитиды, включая гигантоклеточный артериит, синдром Такаясу, гранулематозный аллергический ангиит, нодозный полиартериит, микроскопический полиартериит, и васкулитиды, ассоциированные с вирусной инфекцией, реакциями гиперчувствительности, криоглобулинами и парапротеинами; поясничная боль; семейная средиземноморская лихорадка, синдром Макла-Уэльса и
45 семейная ирландская лихорадка, болезнь Кикучи; вызванные лекарствами артралгии, тендониты и миопатии;

3. боль и ремоделирование соединительной ткани при скелетно-мышечных расстройствах вследствие травмы [например, спортивной травмы] или заболевания:

кожные высыпания ревматического или подагрического происхождения (например, ревматоидный артрит, остеоартрит, подагра или кристаллическая артропатия), другие заболевания суставов (такие как дегенерация межпозвоночного диска или дегенерация височно-нижнечелюстного сустава), ремоделирование кости (например, остеопороз, болезнь Педжета или остеонекроз), полихондрит, склеродерма, смешанное расстройство соединительной ткани, спондилоартропатии или периодонтальное заболевание (например, периодонтит);

4. кожа: псориаз, атопический дерматит, контактный дерматит или другие экзематозные дерматозы, и реакции гиперчувствительности отложенного типа; фито- и фотодерматит; себорейный дерматит, герпетиформный дерматит, плоский лишай, склерозирующий и атрофический лишай, гангренозная пиодерма, кожный саркоид, дискоидная красная волчанка, пемфигус, пемфигоид, врожденный буллезный эпидермолиз, крапивница, отек Квинке, васкулиты, токсические эритемы, кожная эозинофилия, гнездная алопеция, мужская алопеция, синдром Свита, синдром Вебера-Кристиана, полиморфная эритема; инфекционный и неинфекционный целлюлит; панникулит; кожные лимфомы, немеланомный рак кожи и другие диспластические поражения; вызванные лекарствами расстройства, включая локальные лекарственные сыпи;

5. глаза: блефарит; конъюнктивит, включая хронический и весенний аллергический конъюнктивит; ирит; ранний и поздний увеит; хориоидит; аутоиммунное заболевание; дегенеративные или воспалительные расстройства, поражающие сетчатку; офтальмит, включая симпатический офтальмит; саркоидоз; инфекции, в том числе вирусные, грибковые и бактериальные инфекции;

6. желудочно-кишечный тракт: глоссит, гингивит, периодонтит; эзофагит, включая рефлюкс; эозинофильный гастроэнтерит, мастоцитоз, болезнь Крона, колит, в том числе неспецифический язвенный колит, проктит, анальный зуд; заболевание брюшной полости, синдром раздраженной толстой кишки и пищевые аллергии, которые могут оказывать воздействие далеко от кишки (например, мигрень, ринит или экзема);

7. абдоминальные: гепатит, включая аутоиммунный, алкогольный и вирусный гепатит; фиброз и цирроз печени; холецистит; острый и хронический панкреатит;

8. мочеполовые: нефрит, включая интерстициальный и гломерулонефрит; нефротический синдром; цистит, включая острый и хронический (интерстициальный) цистит и язву Ханнера; острый и хронический уретрит, простатит, эпидидимит, оофорит и сальпингит; вульвовагинит; болезнь Пейрони; эректильная дисфункция (как у мужчин, так и у женщин);

9. отторжение трансплантата: острое и хроническое после трансплантации, например почки, сердца, печени, легкого, костного мозга, кожи или роговицы либо после переливания крови; или хроническое заболевание "трансплантат против хозяина";

10. ЦНС: болезнь Альцгеймера и другие, приводящие к слабоумию расстройства, включая болезнь Кройцфельда Якоба (CJD) и новый вариант болезни Кройцфельда Якоба (nvCJD); амилоидоз; рассеянный склероз и другие демиелинизирующие синдромы; церебральный атеросклероз и васкулит; височный артериит; астенический бульбарный паралич; острая и хроническая боль (острая, перемежающаяся или постоянная, центрального или периферического происхождения), в том числе висцеральная боль, головная боль, мигрень, тригеминальная невралгия, атипичная лицевая боль, боль в суставах и костях, боль, возникающая из-за рака и инвазии опухоли, невропатические болевые синдромы, в том числе диабетические, постгерпетические и ВИЧ-ассоциированные невропатии; нейросаркоидоз; осложнений злокачественных,

инфекционных или аутоиммунных процессов на центральную и периферическую нервную систему;

11. другие аутоиммунные и аллергические расстройства, включая тиреоидит Хашимото, диффузный токсический зоб, болезнь Аддисона, сахарный диабет, идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура, эозинофильный фасциит, гипер-IgE синдром, антифосфолипидный синдром;

12. другие расстройства с воспалительным или иммунологическим компонентом, в том числе синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД), лепра, синдром Сезари и паранеопластические синдромы;

13. сердечно-сосудистая система: атеросклероз, поражающий коронарное и периферическое кровообращение; перикардит; миокардит, воспалительные и аутоиммунные кардиомиопатии, в том числе миокардиальный саркоидоз; ишемические реперфузионные повреждения; эндокардит, вальвулит и аортит, в том числе инфекционный (например, сифилитический) аортит; васкулиты; расстройства проксимальных и периферических вен, включая флебит и тромбоз, в том числе тромбоз глубоких вен и осложнения варикозного расширения вен;

14. онкология: лечение распространенных видов рака, в том числе опухолей предстательной железы, молочной железы, легкого, яичника, поджелудочной железы, кишечника и ободочной кишки, желудка, кожи и головного мозга и злокачественностей, поражающих костный мозг (включая лейкомии) и лимфопролиферативные системы, такие как ходжкинская и неходжкинская лимфомы, включающее предупреждение и лечение метастазирования и рецидивов опухолей, и паранеопластических синдромов; или

15. желудочно-кишечный тракт: заболевание брюшной полости, проктит, эозинофильный гастроэнтерит, мастоцитоз, болезнь Крона, неспецифический язвенный колит, микроскопический колит, перемежающийся колит, расстройство раздраженной кишки, синдрома раздраженной кишки, невоспалительная диарея, пищевые аллергии, которые оказывают воздействие далеко от кишки, например мигрень, ринит и экзема.

Предпочтительно, заболеванием или состоянием является астма, аллергическая астма, поллиноз, аллергический ринит, бронхит, эмфизема, бронхоэктаз, хроническое обструктивное заболевание легких (ХОЗЛ), синдром расстройства дыхания у взрослых (ARDS), резистентная к стероидам астма, тяжелая астма, детская астма, кистозный фиброз, фиброз легких, легочный фиброз, интерстициальное заболевание легких, кожные заболевания, атопический дерматит, псориаз, воспаление глаз, церебральная ишемия, или аутоиммунные заболевания.

Более предпочтительно, заболеванием или состоянием является астма или хроническое обструктивное заболевание легких (ХОЗЛ).

Субъектом, подлежащим лечению, является, как правило, человек.

Как правило, активные компоненты (a) и (b) вводятся совместно. Предпочтительно активные компоненты (a) и (b) содержатся в виде одной лекарственной формы.

Альтернативно, активные компоненты (a) и (b) могут вводиться раздельно. Может присутствовать промежуток во времени между введением активных компонентов (a) и (b).

Активные компоненты (a) и (b) могут вводиться путем ингаляции. Активные компоненты (a) и (b) могут вводиться в виде аэрозоля.

Количество активного агента, введенного как доза, или общее количество, введенное в день, можно определить предварительно или можно определить на основе отдельного пациента с учетом различных факторов, включающих природу и тяжесть состояния

пациента, подвергаемое лечению состояние, возраст, массу и общее состояние здоровья пациента, толерантность пациента к активному агенту, путь введения, фармакологические соображения, такие как активность, эффективность, фармакокинетики и профили токсикологичности вводимого активного агента и любых вторых агентов и тому подобное. Лечение пациента, страдающего заболеванием или патологическим состоянием (таким как ХОЗЛ), можно начать с применения предварительно определенной дозы или дозы, определенной лечащим врачом, и можно продолжать в течение периода времени, необходимого для профилактики, уменьшения интенсивности симптомов, подавления или ослабления симптомов заболевания или патологического состояния. Пациенты, подвергаемые такому лечению, обычно находятся под наблюдением на общепринятой основе для определения эффективности терапии. Например, при лечении ХОЗЛ значительное улучшение в объеме форсированного выдоха (измеренного за одну секунду) можно применять для определения эффективности лечения. Аналогичные показатели для других заболеваний и состояний, описанных здесь, являются хорошо известными для специалистов в данной области и легкодоступными для лечащего врача. Непрерывный мониторинг, проводимый врачом, может гарантировать, что оптимальное количество активного агента будет введено в любое данное время, а также облегчит определение продолжительности лечения. Это особенно важно, когда вводят также вторые агенты, поскольку их выбор, доза и продолжительность лечения могут также требовать корректировки. В этом смысле лечебную схему и схему применения лекарственного средства можно регулировать в течение курса лечения, так чтобы вводить наименьшее количество активного агента, которое проявляет требуемую эффективность, и, кроме того, чтобы введение продолжать только так долго, как необходимо для удачного лечения заболевания или патологического состояния.

Соответственно, в одном варианте выполнения настоящего изобретения, композиции согласно настоящему изобретению являются применимыми для лечения нарушений действий гладких мышц у млекопитающих, включая людей и их животных-компаньонов (например, собак, кошек и т.д.). Такие нарушения действий гладких мышц включают в качестве иллюстрации повышенную активность мочевого пузыря, хроническое обструктивное заболевание легких и синдром раздраженной толстой кишки. Подходящие дозы для лечения нарушений действий гладких мышц или других заболеваний, опосредуемых мускариновыми рецепторами, обычно находятся в диапазоне от около 0,14 мкг/кг/день до около 7 мг/кг/день активного агента, включая дозы от около 0,15 мкг/кг/день до около 5 мг/кг/день. Для человека со средней массой 70 кг она может составлять от около 10 мкг на день до около 500 мг на день активного агента.

Как правило, композиции согласно настоящему изобретению являются применимыми для лечения легочных и респираторных заболеваний, таких как ХОЗЛ или астма, у млекопитающих, включая людей, путем введения пациенту терапевтически эффективное количества композиция. В общем, доза для лечения легочного заболевания будет в диапазоне приблизительно 10-1500 мкг/день. Специалисту в данной области техники понятно, что термин "ХОЗЛ" включает различные респираторные состояния, включающие хронический обструктивный бронхит и эмфизему, приводимые в качестве примеров в публикации Barnes (2000) N. Engl. J. Med. 343:269-78, и источниках, процитированных в ней.

При введении ингаляцией композиции согласно настоящему изобретению, как правило, обладают эффектом, вызывающим расширение бронхов. Соответственно другим объектом настоящего изобретения является способ индуцирования расширения

бронхов у пациента, включающий введение пациенту индуцирующего расширение бронхов количества композиции согласно настоящему изобретению. Терапевтически эффективная доза для индуцирования расширения бронхов обычно составляет около 10-1500 мкг/день.

5 Альтернативно, композиции согласно настоящему изобретению могут применяться для лечения повышенной активности мочевого пузыря. При применении для лечения повышенной активности мочевого пузыря типичная доза будет в диапазоне около 1,0-500 мг/день. Альтернативно, композиции согласно настоящему изобретению могут применяться для лечения синдрома раздраженной толстой кишки. При применении
10 для лечения синдрома раздраженной толстой кишки композиции согласно настоящему изобретению, как правило, вводят перорально или ректально, и типичная доза находится в диапазоне около 1,0-500 мг/день.

Согласно настоящему изобретению было обнаружено, после исследования безопасности, что RPL554 не взаимодействует отрицательным образом с антагонистами
15 мускариновых рецепторов (как например, атропин) с точки зрения кровяного давления и сердечного ритма. Подобным образом, RPL554 не оказывает влияние на сердечно-сосудистое действие антагонистов мускариновых рецепторов (как например, атропин).

Следующие примеры иллюстрируют настоящее изобретение.

Примеры

20 Пример 1

Материалы и способы

Подготовка тканей

Области макроскопически нормальных легких отобрали из незатронутых областей, взятых у 24 субъектов (11 мужчин и 13 женщин в возрасте 60.1 ± 1.6), подвергнутых
25 удалению органа по причине рака легких, но без истории хронического заболевания дыхательных путей.

Дыхательные пути немедленно поместили в оксигенированный буферный раствор Кребса-Хенселейта (КН) (мМ: NaCl 119.0, KCl 5.4, CaCl₂ 2.5, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 1.2, NaHCO₃ 25.0, глюкоза 11.7; pH 7.4), содержащий ингибитор циклооксигеназы (COX)
30 (5.0 мкМ), и транспортировали при 4°C из "Regina Elena National Cancer Institute" или "Sant'Andrea Hospital" в лабораторию "Respiratory Research Laboratory" при факультете "Surgery and Medicine" университета "Tor Vergata University", Рим, Италия. Ни один из субъектов не лечился хронически с помощью теофиллина, β_2 -агонистов или
35 глюкокортикостероидов. Уровни IgE в сыворотке, определенные на день хирургического вмешательства, были в нормальном диапазоне. Параметры функции легких до операции были в общем в норме и не подавали признаков дыхательных инфекций.

В лаборатории дыхательные пути отсекали от соединительных и альвеолярных тканей. Затем сегментальные бронхи отделяли и хранили всю ночь в буферном растворе
40 КН при температуре охлаждения. На следующее утро бронхи порезали на круги (n=120; толщина: 1-2 мм; диаметр: 5-7 мм) и перенесли в 4400 четырехкамерную с объемом 10 мл инкубаторы изолированных органов (Ugo Basile, VA - Italy), содержащие КН буфер (37°C) и непрерывно вентилируемые смесь 95:5% O₂/CO₂.

Получение лекарственных средств

45 Применялись следующие лекарственные средства: ацетилхолин, гистамин, атропин, папаверин и индометацин. Все вещества приобретали у компании Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Лекарственные средства растворяли в дистиллированной воде, за исключением индометацина и хинина, которые растворяли в этаноле, и затем разбавляли

КН буфером. Максимальное количество этанола (0.02%) не влияло на ответы выделенных тканей (Freas et al., 1989; Hatake and Wakabayashi, 2000). RPL554 был любезно предоставлен компанией Verona Pharma PLC, London, UK. Соединения хранили в небольших аликвотах при -80°C до их применения.

5 Измерение натяжения

Человеческие бронхи поместили в инкубаторы органов, содержащие КН буферный раствор (37°C), содержащие индометацин (5.0 мкм), барботируемые 95% O₂/5% CO₂, и суспендировали при пассивном натяжении (0.5-1.0 г). Круги бронхов, поддерживаемые на крюках в инкубаторах органов, присоединили посредством связывания ниткой, к 10 стационарному стержню и другому крюку, связанному ниткой с преобразователем перемещений изометрической силы. Дыхательным путям дали уравновеситься в течение 90 минут при постоянной замене обработанного лекарственным средством КН буферного раствора каждые 10 минут. Изменения изометрического натяжения измеряли с помощью измерительного датчика (Fort 10 WPI, Basile, Instruments, Italy), и способность 15 тканей к реакции оценивали с помощью ацетилхолина (100 мкм); когда ответ достиг плато, кольца промыли три раза и дали им уравновеситься в течение 45 минут.

Модель исследования

Влияние RPL554 на стимуляцию электрическим полем

В каждый инкубатор органов поместили два платиновых плоских электрода (1 см²), 20 расположенных вдоль ткани (на расстоянии 10 мм) для стимуляции электрическим полем (EFS). Эксперименты осуществляли с применением последовательности импульсов по 10 Гц EFS (двухфазный импульс с постоянным током 10 В, 0.5 мс, 10 с), один импульс каждые 5 минут в течение первого часа и затем с интервалами по 30 минут в течение 25 следующих 5 часов с помощью 3165 multiplexing pulse booster (Ugo Basile, VA - Italy) (Binks et al., 2001). После старта EFS последовательности импульсов, ткани инкубировали вместе с RPL554 (10 или 100 мкм) до достижения максимального ингибирования реакции сокращения на стимуляцию электрическим полем (EFS). Инкубацию с лекарственным средством затем прекратили, и ткани повторно промывали в течение периода времени, 30 равного 30 минут, и затем еще 30 минут до достижения 5 часов после введения лекарственного средства.

Релаксирующее действие RPL554 на пассивно-сенситизированные бронхи

Выделенные бронхиальные круги человека вращали всю ночь при комнатной температуре в трубках, содержащих КН буферный раствор в отсутствии 35 (несенситизированные контрольные кольца) или присутствии 10% об.⁻¹ сенситизирующей сыворотки (сенситизированные кольца) как описано, среди прочего, в (Watson et al., 1997; Rabe, 1998). Субъекты, страдающие атопической астмой (общий IgE>250 U мл⁻¹, специфичный против общих аэроаллергенов) в ходе обострения давали письменное согласие на донорство сыворотки. Сыворотку получали путем 40 центрифугирования цельной крови, и образцы сыворотки замораживали при -80°C в аликвотах, объемом 200 мл, до востребования.

На следующее утро, после удаления приросших альвеолярных и соединительных тканей, бронхиальные круги переносили в инкубатор органов, содержащий КН буфер (37°C), и непрерывно газировали с помощью 95% O₂/5% CO₂. Ткани предварительно 45 инкубировали в течение 30 минут с RPL554 (1, 10 и 100 мкм), и затем (без промывания) строили кривые зависимости ответа от концентрации для гистамина (10 нМ - 1 мМ) в присутствии RPL554.

Синергетический эффект RPL554 плюс антагониста мускаринового рецептора

Чтобы протестировать возможную синергетическую релаксацию, вызванную RPL554 в комбинации с антагонистом мускаринового рецептора, бронхиальные круги заставляли сокращаться с помощью ацетилхолина при концентрации, необходимой чтобы вызвать 70% от максимального эффекта (EC70), и обеспечивали период стабилизации в течение 15 минут. Затем строили кривые зависимости ответа от концентрации для тестирования индивидуального соединения RPL554 и антагониста мускаринового рецептора самого по себе; а также RPL554, вводимого в комбинации с антагонистом мускаринового рецептора, чтобы получить графики изобол, как описано, среди прочего, в (Greco et al., 1995; Tallarida, 2001; Goldoni and Johansson, 2007; Boik et al., 2008; Lee, 2010).

Интервалы по 20 минут между последовательными концентрациями применялись для достижения стабильного уровня релаксации перед введением следующей концентрации. По завершению эксперимента, папаверин (500 мкм) добавляли для полной релаксации тканей и получения стандарта, с которым необходимо сравнивать релаксацию каждой ткани.

Анализ результатов

Анализ EFS исследований

Бронхиальное сокращательное натяжение, вызванное EFS, измеряли в виде процента от контрольных бронхов, и строили кривые, описываемые полиномом, путем подгонки моделей биологических данных с применением нелинейной регрессии, как описано, среди прочего, в (Motulsky and Christopoulos, 2004). Максимальный эффект (E_{max}) определяли как самую низкую сокращающую силу, вызванную EFS стимуляцией, и изгиб (t_{1/2}, минуты) показывает время индуцирования половины от максимальной релаксации. Для каждого трех бронхиальных кругов, поддерживаемых в системах инкубации выделенных органов, один применялся в качестве временного контроля, как описано, среди прочего, в (Mercier et al., 2002).

Анализ исследований реакции на концентрацию

Подходящий подбор кривой по точкам для сигмоидальной модели применялся для вычисления эффекта (E), E_{max} и концентрации, необходимой для достижения 50% от максимального эффекта (EC₅₀). Применялось следующее уравнение $\log[\text{агонист}]$ относительно ответа, переменная крутизна, выраженное как $Y = \text{низ} + (\text{верх} - \text{низ}) / \{1 + 10^{[(\log EC_{50} - X) * \text{склон}]}\}$ (Motulsky and Christopoulos, 2004; Goodman et al., 2008). E/E_{max} выражалось как процент от E_{max}, обеспечиваемой сокращающими агентами; Значения EC₅₀ переводили в pD₂ для статистического анализа (Goodman et al., 2008), и реакции (ответы) релаксации выражались в виде процента от релаксации, вызванной папаверином (500 мкм).

Анализ исследований синергизма

Анализ потенциального синергетического эффекта между RPL554 и антагонистом мускаринового рецептора проводили? измеряя посредством метода Беренбаума, критерия независимости по Блисссу (BI) и модели аддитивности Loewe (LA) с помощью искривленных изобол (Berenbaum, 1977; Greco et al., 1995; Grabovsky and Tallarida, 2004; Tallarida, 2006; Goldoni and Johansson, 2007; Tallarida and Raffa, 2010).

Для того чтобы применить метод Беренбаума, оценивали показатель взаимодействия для значений EC₅₀, и, поэтому, если показатель взаимодействия был <1, эффект рассматривали как синергетический; если показатель взаимодействия был >1, эффект рассматривали как антагонистический, и если показатель взаимодействия был =0, эффект рассматривали как аддитивный (Goldoni and Johansson, 2007; Lee, 2010).

Теория BI для двух агентов выражается следующим уравнением: $E(x,y) = E_x + E_y -$

($E_x \cdot E_y$), где E представляет собой фракционный эффект, и x и y представляют собой концентрации двух соединений в эксперименте для комбинации. Если эффект комбинации выше чем ожидаемое значение по вышеуказанному уравнению, взаимодействие рассматривается как синергетическое, тогда как, если эффект ниже, взаимодействие является антагонистическим. Другими словами, эффект является аддитивным и взаимодействие не происходит (Greco et al., 1995; Meletiadis et al., 2003; Boucher and Tarn, 2006; Goldoni and Johansson, 2007; Boik et al., 2008; Lee, 2010). В этом исследовании уравнение BI характеризуется тем, что $X = \text{RPL554}$ и $Y = \text{антагонист мускаринового рецептора}$.

Контрольную кривую зависимости ответа от концентрации для атропина и RPL554 в бронхах из каждого легкого подгоняли по четырем параметрам логистического уравнения для вычисления оценок значения параметра $E_{\max}$, уклона (nH) и потенциала (EC_{50}). Следующие оценки значения параметра $E_{\max}$ и nH (среднее значение $\pm SD$) и EC_{50} (geomean, 95% CI) для атропина (66 ± 14 , 0.912 ± 0.488 , 1.181 (0.134 - 10.4) мкМ, $n=5$, соответственно) и RPL554 (100 ± 0 , 2.271 ± 0.713 , 21.2 (11.5 - 39.1) мкМ, $n=5$, соответственно) затем применялись для вычисления аддитивного ответа на каждую комбинацию пары лекарственных средств для оценки синергетического эффекта (Tallarida and Raffa 2010) (Grabovsky and Tallarida 2004). Применяя концепцию эквивалентности дозы, уравнение $a/A + b/B = 1$ переформулировали как $b + beq(a) = B$, где beq представляет собой эквивалентную дозу a , и решали для $beq(a)$ путем приведения двух отдельных кривых зависимости ответа от концентрации $E_A = f(A)$ и $E_B = f(B)$. Аддитивный ответ (E_{ab}) для каждой дозированной комбинации в отношении B затем вычисляли путем вставки B в $E_B = f(B)$. Разность между наблюдаемой реакцией релаксации на дозы комбинации и аддитивным ответом вычисляли и анализировали, применяя t -тест одного образца и для множества сравнений, вероятность устанавливали для множества сравнений, применяя проверку по методу Бонферрони. В целях иллюстрации, 1:1 дозированные комбинации применяли для анализа синергетического эффекта.

Статистический анализ

Все значения выражали в виде среднего значения $\pm SEM$ для каждой обрабатываемой группы. Статистическую значимость определяли с помощью теста Стьюдента t или вариационного анализа (ANOVA), при необходимости, и уровень статистической значимости определяли как $P < 0.05$ (Motulsky, 1995). Анализ всех данных осуществляли с применением компьютерного программного обеспечения (GraphPad Prism, San Diego California USA; Microsoft Excel, Redmond Washington USA).

Синергетический эффект RPL554, вводимого в комбинации с атропином (антагонист мускаринового рецептора)

Чтобы протестировать синергетическую релаксацию, вызванную RPL554 в комбинации с атропином, бронхиальные круги заставляли сокращаться с помощью ацетилхолина при концентрации, необходимой чтобы вызвать 70% от максимального эффекта (EC_{70}), и обеспечивали период стабилизации в течение 15 минут. Затем строили кривые зависимости ответа от концентрации для тестирования индивидуального соединения RPL554 и атропина самого по себе; а также RPL554, вводимого в комбинации с атропином, чтобы получить графики изобол, как описано, среди прочего, в (Greco et al., 1995; Tallarida, 2001; Goldoni and Johansson, 2007; Boik et al., 2008; Lee, 2010).

Интервалы по 20 минут между последовательными концентрациями применялись для достижения стабильного уровня релаксации перед введением следующей концентрации. По завершению эксперимента, папаверин (500 мкМ) добавляли для

полной релаксации тканей и получения стандарта, с которым необходимо сравнивать релаксацию каждой ткани.

Результаты

Базовые характеристики бронхиальных кругов

5 Не наблюдалось значительной разницы ($P>0.05$) между базовыми характеристиками выделенных бронхиальных кругов человека, применяемых при исследовании, касающемся влажной массы (220.5 ± 16.5 мг), сокращения, вызванного ацетилхолином (100 мкМ) (440 ± 95 мг), и сокращения, вызванного EFS (10 Гц), до обработки лекарственными средствами (445 ± 98 мг).

10 В предварительных экспериментах, кривая зависимости ответа от концентрации для ацетилхолина (от 1 нМ до 1 мМ) строилась для оценки субмаксимального ответа (около 70% от максимального ответа; 1250 ± 190 мг; $n=5$) для последующих исследований.

Влияние RPL554 на бронхиальный тонус выделенных дыхательных путей человека

RPL554 ингибировал реакцию сокращения, вызванную воздействием EFS на
15 бронхиальные ткани человека, причем этот эффект поддерживался в течение по меньшей мере 5 часов после воздействия этим лекарственным средством (Фиг. 1).

RPL554 исключил эти реакции сокращения при максимальной концентрации 100 мкМ ($E_{\max} 91.33\pm 3.37\%$; $T_{1/2} 23.7\pm 12.3$ мин).

RPL554 вызывал зависимую от концентрации релаксацию выделенных бронхиальных
20 тканей человека, предварительно сокращенных ацетилхолином. RPL554 был менее эффективен ($P<0.05$) чем атропин при бронхиальной релаксации, но, в отличие от атропина, RPL554 обеспечивал полную релаксацию тканей ($P<0.001$) Контрольную кривая зависимости ответа от концентрации для атропина и RPL554 в бронхах из
25 каждого легкого подгоняли по четырем параметрам логистического уравнения для вычисления оценок значения параметра $E_{\max}$, уклона (nH) и потенциала (EC_{50}).

Следующие оценки значения параметра $E_{\max}$ и nH (среднее значение $\pm SD$) и EC_{50} (geomean, 95% CI) для атропина (66 ± 14 , 0.912 ± 0.488 , 1.181 (0.134-10.4) мкМ, $n=5$, соответственно) и RPL554 (100 ± 0 , 2.271 ± 0.713 , 21.2 (11.5-39.1) мкМ, $n=5$, соответственно) (Фиг. 2).

30 Пассивная сенсibilизация бронхов увеличила эффект сокращения от гистамина по сравнению с несенсибилизированными тканями. В пассивно-сенсibilизированных бронхах, RPL554 при 1 и 10 мкМ значительно ($P<0.001$) сдвигал влево кривую зависимости ответа от концентрации для гистамина по сравнению с необработанными
35 тканями, и RPL554 при 100 мкМ полностью прекращал сокращение, вызванное гистамином (Фиг. 3, Таблица 1).

40

45

Таблица 1: Воздействие RPL554 на сокращение, вызванное гистамином в пассивно-сенситизированных бронхах. Приведены данные из экспериментов, осуществляемых с образцами n=5 различных субъектов, и они выражены как среднее значение $\pm$ SEM ***P<0.001 по сравнению с пассивно-сенситизированным контролем.

	Несенситизированный	Пассивно-сенситизированный			
		Контроль	RPL554 1мкМ	RPL554 10мкМ	RPL554 100мкМ
E_{max}	100.7 $\pm$ 1.7	101.8 $\pm$ 1.4	70.3 $\pm$ 2.7 ***	58.1 $\pm$ 2.2 ***	н.о.
pD2	4.82 $\pm$ 0.03 ***	5.29 $\pm$ 0.03	4.97 $\pm$ 0.07 ***	4.98 $\pm$ 0.07 ***	н.о.

Синергетическое релаксирующее действие RPL554 плюс атропина на тонус бронхов. Взаимодействие RPL554 и атропинов вызвало значительный синергетический эффект RPL554 в диапазоне концентраций от 1 нМ до 10 мкМ (1 нМ: P<0.05; 10 нМ и 1 мкМ: P<0.01; 100 нМ и 10 мкМ: P<0.001), и максимальный синергетический эффект был обнаружен для перекрестных концентраций RPL554 1 мкМ и атропина 10 нМ (ВІ дельта эффект: 0.54 $\pm$ 0.09). Более низкие концентрации RPL554 и атропина взаимодействовали синергетическим образом (10 нМ, P<0.05 и 100 нМ, P<0.01) путем увеличения релаксация бронхиальных колец в $\approx$ 4.85 раз, по сравнению с суммой эффектов, вызываемых каждым лекарственным средством, применяемым отдельно (Фиг. 4).

Результаты воздействия изомолярной комбинации (1:1) RPL554 плюс атропина на тонус бронхов человека, предварительно сокращенных ацетилхолином, показал статистически значимое ВІ взаимодействие (P<0.01), на основе увеличения эффективности релаксации (Таблица 2).

	RPL554 + атропин	
	Наблюдаемый	Ожидаемый
E_{max}	97.87 $\pm$ 1.50	98.68 $\pm$ 7.91
pD2	7.54 $\pm$ 0.31	5.55 $\pm$ 0.33
Дельта-потенциал (наблюдаемый- ожидаемый)	1.99 $\pm$ 0.10**	

Таблица 2: Релаксирующий синергетический эффект RPL554 плюс атропин (изомолярная, 1:1) на субмаксимальное сокращение, вызванное ацетилхолином. Приведены данные из экспериментов, осуществляемых с образцами n=5 различных субъектов, и они выражены как среднее значение $\pm$ SEM ***P<0.01 для дельта-эффекта теории нулевого взаимодействия (наблюдения по сравнению с ожидаемыми значениями).

Кроме того, анализ Беренбаума продемонстрировал, что RPL554 плюс атропин вызывает синергетическое взаимодействие для RPL554 в диапазоне концентраций от 1 нМ до 10 мкМ (показатель взаимодействия: 0.09 ± 0.07), и что RPL554 вызывает значительный сдвиг влево кривых зависимости реакции релаксации от концентрации для атропина, равный логарифму 2.91 ± 0.44 ($P < 0.05$). Имеется статистически значимая разница между наблюдаемой и аддитивной реакцией релаксации для 1:1 дозированных комбинаций атропина и RPL554, показывающая очевидность синергетического эффекта (Фиг. 6).

Наконец, 3D поверхностный анализ с применением ВІ метода продемонстрировал, что атропин вызвал значительно высокое и широкое синергетическое взаимодействие, распространяющееся на все концентрации, при введении совместно с RPL554 (Фиг. 5).

Это показало, что селективное ингибирование PDE3/PDE4 посредством RPL554 вызвало релаксацию бронхиального тонуса в выделенных дыхательных путях человека, что расширило и подтвердило наблюдения, ранее сделанные для выделенной трахеи морской свинки (Boswell-Smith et al., 2006b). Это ингибирующее действие поддерживалось вплоть до 5 часов после прекращения воздействия лекарственным средством, подтверждая длительную продолжительность действия этого соединения в дыхательных путях человека. Кроме того, RPL554 действовал, вызывая релаксацию дыхательных путей, сокращенных либо гистамином, либо ацетилхолином. Более того, предварительная инкубация тканей с RPL554 позволяет достичь значительной защиты тканей от сокращающего действия экзогенно вводимого гистамина в пассивно-сенситизированных бронхах. Кроме того, ингибирование PDE3/4, связанного с антагонистом мускаринового рецептора (атропин), показало синергетическое действие в отношении релаксации ASM. Эти результаты показывают, что RPL554 представляет собой хороший функциональный антагонист против сокращающих агентов в бронхиальных тканях человека и при объединении с антагонистом мускаринового рецептора может быть способен обеспечивать синергетическое расширение бронхов.

RPL554 вызывает зависимое от концентрации и времени ингибирование реакций сокращения, вызванных EFS, которое имеет значительно большую продолжительность действия против EFS-индуцированных реакций сокращения, чем другие PDE4 ингибиторы (Spina et al., 1998; Boswell-Smith et al., 2006b).

RPL554 особенно эффективен при ингибировании реакции сокращения в пассивно-сенситизированных бронхах человека, сокращенных по действием гистамина, и множество селективных PDE3 и PDE4 ингибиторов было предложено для значительного облегчения острого бронхоспазма, вызванного антигеном у сенситизированных морских свинок (Boswell-Smith et al., 2006a).

RPL554 также вызывал заметное уменьшение максимального ответа на гистамин в пассивно-сенситизированных бронхах.

Исследование безопасности комбинации согласно настоящему изобретению

Это исследование проводилось для определения имеет ли RPL554 сердечно-сосудистое взаимодействие с мускариновым антагонистом (атропин). β_2 агонист (сальбутамол) был включен для полноты исследования. RPL554 представляет собой двойной PDE3/PDE4 ингибитор, разработанный для лечения хронического обструктивного заболевания легких (ХОЗЛ) и астмы в виде ингалируемого расширителя бронхов с возможными противовосполительными действиями. Сердечно-сосудистые реакции на RPL554, сальбутамол и атропин, вводимые в виде внутривенных болюсных инъекций, оценивали в виде сердечно-сосудистых изменений, измеряемых в виде пиковых изменений после инъекции в кровяном давлении и сердцебиении. Модель исследования была слепая и

случайная с лекарственными средствами, вводимыми по парам с разницей в 5 минут, чередующимся образом, например, RPL554 после сальбутамола и наоборот. Дозы, выбранные для исследования, вызывали сердечно-сосудистые эффекты, и вероятные концентрации в плазме, намного более высокие, чем применяемые для ингаляции.

5 Между тем их выбрали для тестирования возможных взаимодействий при супратерапевтических условиях.

В общем

В этом исследовании эффекты внутривенного введения RPL554, сальбутамола и атропина, самих по себе и в комбинациях, изучали согласно рандомизированной модели, на кровяное давление и сердцебиение у крыс с анестезией. Дозы, вызывающие 15-30 ммHg увеличение среднего кровяного давления (МВР) и увеличение сердцебиения на 30-60 ударов в минуту (HR), выбирали на основе первоначального изучения зависимости ответа от дозы для RPL554 и сальбутамола. Для атропина, который оказывал меньшее влияние на кровяное давление и сердцебиение, максимальную вводимую дозу выбирали для дальнейшего исследования. После этого, выбранные дозы исследовали для пар, вводимых с разницей в 5 минут. Данные, полученные в ходе исследования, позволили предположить, что нет никакого взаимодействия в сердечно-сосудистом контексте между RPL554 и сальбутамолом, или между RPL554 и атропином с точки зрения влияния на МВР или HR у крыс с анестезией. Для того, чтобы точно протестировать возможные взаимодействия, дозы и пути введения, выбранные для исследования, вызывали сердечно-сосудистые эффекты, не наблюдаемые для стандартных терапевтических доз. Кроме того, болюсный внутривенный путь введения точно приводил к намного более высоким концентрациям в плазме, которые не наблюдались при более низких терапевтических дозах, вводимых путем ингаляции. Идеей исследования было применение супранормальных условий, для того чтобы протестировать возможные взаимодействия при супратерапевтических условиях.

Протокол

Исследования осуществляли на самцах крыс линии Sprague-Dawley, полученных у компании Charles River, массой 200-250 г. Сразу после того, как крыс доставили в экспериментальную лабораторию, у них не было доступа к еде и воде в течение 1-3 часов. В целях эксперимента животным вводили анестезию на основе тиобутабарбитала при дозе 100 мг/кг и i.p. пути введения. Не было необходимости в добавке анестезии, и в конце эксперимента каждая крыса умерщвлялась. Исследование имело две части: (I) первоначальное исследование диапазона доз и (II) исследование взаимодействия. Исследуемыми лекарственными средствами были: RPL554 (R), сальбутамол (S), атропин (A), все растворенные в соляном растворе.

(I) Первоначальное исследование диапазона доз

Первоначальное исследование диапазона доз осуществляли следующим образом: кумулятивные кривые зависимости ответа от дозы для внутривенных болюсных доз для трех лекарственных средств строили для определения подходящих доз для каждого из трех лекарственных средств для полного исследования. Дозы RPL554 или сальбутамола, вызывающие 15-30 ммHg увеличение среднего кровяного давления (МВР) и увеличение сердцебиения на 30-60 ударов в минуту (HR), выбирали на основании этого первоначального исследования зависимости ответа от дозы. Атропин вызывал ограниченные сердечно-сосудистые действия, и поэтому высокая доза была выбрана как та, для которой в литературе раскрывается очевидность абсолютной блокады мускаринового рецептора. В этом исследовании зависимости ответа от дозы участвовало четыре крысы, которым вводились кумулятивные дозы каждого из трех лекарственных

средств, на основе удваивания дозы. Дозы каждого из лекарственных средств вводились в виде внутривенных болюсных инъекций, каждые 5 минут, с разницей в 1 час между различными лекарственными средствами. Порядок инъекций был следующим: для животного 1 - S, R, A; для животного 2 - R, A, S; для животного 3 - A, S, R и для животного 4 - R, A, S. Как показано выше, дозы и пути введения выбирали в качестве супернормальных и выше доз, вызывающих эффекты при введении путем ингаляции.

На основании этого исследования были выбраны следующие дозы для дальнейшего изучения взаимодействия:

R=8 мкг/кг - 8 мкг/мл в 0.9% соляном растворе

S=2 мкг/кг - 2 мкг/мл в 0.9% соляном растворе

A=32 мкг/кг - 32 мкг/мл в 0.9% соляном растворе

(II) Исследование взаимодействия

В этом исследовании все лекарственные средства вводились в виде единичной дозы путем внутривенной болюсной инъекции через катетер яремной вены, при объеме 1 мл/кг. Модель исследования была слепой и случайной с тремя линиями, где каждая включает 4 животных, в общем 12 животных.

Пары лекарственных средств вводились животным на рандомизированной слепой основе, с применением полинейной модели, где каждая линия включала 4 крысы со следующими инъекциями: R1S2, S1R2, R1A2 and A1R2 (в случайном порядке, где 1 обозначает введение первого лекарственного средства, и 2 означает введение второго лекарственного средства через 5 минут после введения первого лекарственного средства). В общем, таким образом было исследовано 3 линии, в общем 12 крыс применялось, и ни одно из животных не было заменено. Исследование остановили после 12 животных, в целях предварительного анализа для определения, является ли оправданным дальнейшее исследование, и, если так, требовалось больше линий и/или регулировок доз (адаптивная модель).

Кровяное давление измеряли по сонной артерии, применяя датчик, выход которого был оборудован AD Instruments PowerLab 26T. Сердцебиение вычисляли от удара к удару с помощью ECG и признаков кровяного давления. Анализ проводили с помощью LabChart 6. Измерения осуществили с применением операций в LabChart 6.

Все эффекты лекарственных средств измеряли в момент пикового ответа на каждую инъекцию лекарственного средства. Момент пикового ответа на сальбутамол составлял около 20 секунд для кровяного давления и 60 секунд для сердцебиения. Для RPL554 соответствующие моменты составляли 60-80 секунд для кровяного давления и 2-4.5 минуты для сердцебиения. Для атропина, это составляло 4 минуты для кровяного давления и сердцебиения.

Данные получали как выражалось ли систолическое, диастолическое или среднее давление кровяное давление в ммHg, тогда как сердцебиение получали в виде ударов в минуту. Полученные значения обрабатывали с получением изменений, вызванных лекарственным средством, в кровяном давлении и сердцебиении от контрольных значений. Одно из которых представляло собой значение до введения первого лекарственного средства, и второе - до введения второго лекарственного средства. Также проводили нормализацию вычисленных изменений к этим двум контрольным значениям, и их выражали либо в виде отрицательного значения в случае падения относительно контрольных значений, либо в виде положительного значения в случае увеличения относительно контрольных значений.

Результаты

Первичная фармакодинамика

Таблица 3. Эффекты RPL554, сальбутамола и атропина, самих по себе и после другого лекарственного средства, на изменения от контрольного (Δ) среднего артериального кровяного давления и среднего сердцебиения у крыс с анестезией (n=3 на каждое среднее значение)

Эффект RPL554 при парном введении с сальбутамолом или атропином				
	Δ MBP (ммHg и %)		Δ HR (bpm и %)	
RPL554 до сальбутамола*	-15	-15%	36	10%
RPL554 после сальбутамола**	-17	-16%	29	7%
RPL554 до атропина*	-17	-16%	30	8%
RPL554 после атропина**	-19	-20%	33	10%

Эффект сальбутамола при парном введении с RPL554				
	Δ MBP (ммHg и %)		Δ HR (bpm и %)	
Сальбутамол до RPL554*	-32	-30%	58	18%
Сальбутамол после RPL554***	-23	-24%	43	11%
Эффект атропина при парном введении с RPL554				
	Δ MBP (ммHg и %)		Δ HR (bpm и %)	
Атропин до RPL554*	-5.0	-5%	6.3	1%
Атропин после RPL554****	-2.7	-3%	21	5%

Лекарственные средства вводились в виде внутривенных болюсных инъекций в парах с разницей в 5 минут. Δ значения представляют собой отличие пиковых эффектов от значений до введения лекарственного средства, выраженное как изменение или процент изменения относительно значений до введения лекарственного средства

* = контрольный ответ на лекарственное средство без предварительной обработки лекарственным средством

Измеряемыми первичными фармакодинамическими переменными были систолическое и диастолическое артериальное кровяное давление с вычисленным средним кровяным давлением и сердцебиением. Изменения суммированы в приведенной выше Таблице 3.

Как можно увидеть во всех случаях, при изученных дозах, RPL554 приводил к спаду

кровенного давления, независимо от того, выражалось ли систолическое, диастолическое или среднее давление в виде точных значений, или оно было нормализовано для значений до введения лекарственного средства. При измерении до или после предварительного введения сальбутамола или атропина, изменения кровяного давления для инъекции RPL554 не различались, как можно увидеть в Таблице 3, где изменения выражались как изменения от момента до введения лекарственного средства или были нормализованы в виде процента.

На реакции с точки зрения сердцебиения подобным образом не оказывалось влияние предварительным введением лекарственных средств, хотя введение второго лекарственного средства через 5 минут после первого изменяло значения до введения лекарственного средства таким образом, который зависел от рассматриваемого лекарственного средства.

Вторичная фармакодинамика и фармакология безопасности

Вторичными фармакодинамическими переменными были: ECG, скорость дыхания и аритмия. Никаких значительных изменений не наблюдалось в ECG или скорости дыхания, и аритмия не наблюдалась.

Фармакодинамические взаимодействия лекарственных средств

Возможные сердечно-сосудистые взаимодействия между тремя лекарственными средствами были первичной целью исследования. Никаких основных взаимодействий между лекарственными средствами не было обнаружено, как показано в Таблице 3, а также при анализе точных экспериментальных значений.

Пример 2

In vivo синергетический эффект RPL554, вводимого в комбинации с атропином (антагонистом мускаринового рецептора)

В этом Примере исследуется способность RPL554 обращать сокращение бронхов, вызванное бомбезином, и потенциальные синергетические эффекты при введении RPL554 в комбинации с атропином.

Морским свинкам ввели анестезию и искусственную вентиляцию легких.

Непроходимость дыхательных путей вызвали путем внутривенного введения бомбезина (2 мкг/мл; 5 мл/ч). Расширение бронхов вызывали путем внутривенного введения RPL554 самого по себе при различных дозах, или в комбинации с субмаксимальными дозами атропина (2 мкг/кг). Дозы выбирали после исследований с получением кривой зависимости ответа от дозы для атропина для выбора дозы, приводящей к около 20% уменьшению непроходимости дыхательных путей. Измеряли общее легочное сопротивление (R_L) и среднее артериальное кровяное давление. Данные выражали в виде % уменьшения непроходимости дыхательных путей или кровяного давления.

RPL554 вызвал зависимую от дозы релаксацию дыхательных путей морских свинок при 10-80 мкг/кг. В комбинации с 2 мкг/кг атропина (доза, которая вызывает 22.3+4.9% уменьшение непроходимости дыхательных путей), субмаксимальная доза RPL554 (20 мкг/кг) вызвала более сильную релаксацию дыхательных путей, чем эта доза RPL554, вводимого самого по себе (Таблица 4). Внутривенное введение (которое не было эффективным при совместном введении с другими препаратами) 20 мкг/кг RPL554 вызвало уменьшение среднего артериального кровяного давления (контроль: 37.3+6.7%, +2 мкг/кг атропин: 35.3+4.3%). Результаты показаны на Фиг. 7-10.

Таблица 4	% Уменьшения непроходимости дыхательных путей	
	RPL554 контроль	RPL554 + атропин (2мкг/кг)
10 мкг/кг	7.4 +1.9	41.7 + 1.2
20 мкг/кг	24.6 + 4.3	76.5 + 8.8
40 мкг/кг	55.2 + 6.2	84,3 +9.1
80 мкг/кг	65.1 + 5.3	81.9 + 4.7

Приведенные результаты очевидным образом показывают, что RPL554 представляет собой эффективный расширитель бронхов, который, при комбинировании с антагонистом мускаринового рецептора атропином, обладает синергетической активностью в качестве расширителя бронхов, но не взаимодействует с классами лекарственных средств, влияющими на кровяное давление.

Пример 3

Синергетический эффект RPL554, вводимого в комбинации с гликопиррония бромидом (антагонист мускаринового рецептора) на выделенные бронхи человека

Исследовали взаимодействия длительного действия между RPL554 и гликопирронием в выделенных бронхах человека.

Способы

Бронхиальные круги, взятые у 6 пациентов, инкубировали в растворе Кребса-Хенселейта (37°C), аэрированном с помощью O₂/CO₂ (95/5%) при натяжении 0.5-1.0 г. Продолжительность действия (30% от максимальной релаксации, EC₃₀) RPL554 и гликопиррония, самих по себе или в комбинации, исследовали в ткани, сокращенной под действием 3, 10 или 25 Гц стимуляции электрическим полем (EFS). Бронхиальный тонус выражали как % от максимальной реакции на папаверин (E_{max}), и оценивали область под кривой (AUC) для реакции сокращения. Эффекты смеси лекарственных средств анализировали с помощью теории независимости по Блисссу. Значения (n=3) представляют собой среднее значение ±SEM.

Результаты

RPL554 и гликопирроний, вводимые сами по себе, вызывали максимальную релаксацию в момент времени 160±20 минут и 50±10 минут, соответственно, и эффект обнаруживался в течение 4 часов. Максимальное синергетическое взаимодействие с достижением релаксации происходило в момент времени ≈2 часа (71.4±5.1%), в ходе периода вымывания, и эффект релаксации от комбинации лекарственных средств продолжался до момента времени 6 часов, когда уменьшение EFS-связанной реакции сокращения составляло еще 41.2±8.5%. Наблюдаемая AUC (44.9±3.1%) была значительно ниже, чем ожидаемая (65.8±3.3%) в ходе 6 часов исследования (P<0.001), с основной эффективностью для EFS при 3 Гц (-35.8±2.5%, P<0.001). Результаты показаны на Фиг. 11-16.

Заключения

RPL554 и гликопирроний при низких концентрациях синергетическим образом ингибируют сокращение, вызванное EFS в выделенных бронхах человека, и эффект релаксации продолжается в течение 6 часов.

Пример 4

Синергетический эффект RPL554, вводимого в комбинации с гликопиррония бромидом (антагонист мускаринового рецептора) на маленькие дыхательные пути человека

Исследовали взаимодействие между RPL554 и гликопирронием в выделенных бронхах человека.

Способы

Обработанные режущим инструментом с особо высокой точностью доли легких (PCLS), взятые у 6 пациентов, инкубировали в растворе Кребса-Хенселейта (37°C), аэрированном с помощью O₂/CO₂ (95:5%). Зависимость ответа от концентрации на RPL554 и гликопирроний, вводимые сами по себе и в комбинации при изоэффективных концентрациях, оценили при субмаксимальном сокращении (70% от максимума, EC₇₀), вызванным карбахолом (CCh).

Релаксацию небольшой бронхи (диаметр <1 мм) выражали как % от максимального ответа (увеличение области просветом), вызываемого папаверином (E_{max}), а эффективность в виде отрицательного логарифма от IC₅₀ (pD₂). Эффекты смеси лекарственных средств проанализировали с помощью теории независимости по Блисссу. Значения (n=3) представляют собой среднее значение ±SEM.

Результаты

Гликопирроний вызывает более сильную зависимость от концентрации релаксацию бронхиол по сравнению с RPL554 (pD₂: гликопирроний 9.2±0.4, RPL554 6.0±0.1, P<0.001), и оба прекращают CCh-индуцированное сокращение. Гликопирроний и RPL554 при концентрациях ниже средних (гликопирроний 0.05 нМ - 0.14 нМ, RPL554 0.32 мкм - 0.54 мкм) вызывают синергетическую реакцию релаксации в небольших дыхательных путях, усиливая релаксацию на +21.1±4.0%, по сравнению с ожидаемым ответом (P<0.05). Низкие концентрации (EC₃₀) гликопиррония плюс RPL554 вызвали значительное (P<0.05) увеличения области просвета, равное 69.1±2.4%, по сравнению с ожидаемым ответом (51.0±5.4%). Результаты показаны на Фиг. 17-19.

Заключение

RPL554 и гликопирроний имеют синергетическое взаимодействие при расширении области просвета бронхиолы, в основном, при концентрациях ниже средних.

Пример 5

Синергетический эффект RPL554, вводимого в комбинации с тиотропиум бромидом (антагонист мускаринового рецептора)

Способ согласно примеру 1 для оценки синергетического эффекта комбинации RPL554 и атропина повторяли для антагониста мускаринового рецептора тиотропиум бромида. Кривые зависимости ответа от концентрации построили для тестирования RPL554 самого по себе, тиотропиум бромида самого по себе и RPL554, вводимого в комбинации с тиотропиум бромидом. Метод Беренбаума и критерий независимости по Блисссу применяли для оценки синергетического действия между тиотропиум бромидом и RPL554. Синергетический эффект наблюдался для комбинации RPL554 и тиотропиум бромида.

Пример 6

Синергетический эффект RPL554, вводимого в комбинации с окситропиум бромидом (антагонист мускаринового рецептора)

Способ согласно примеру 1 для оценки синергетического эффекта комбинации RPL554 и атропина повторяли для антагониста мускаринового рецептора окситропиум бромида. Кривые зависимости ответа от концентрации построили для тестирования RPL554

самого по себе, окситропиум бромида самого по себе и RPL554, вводимого в комбинации с окситропиум бромидом. Метод Беренбаума и критерий независимости по Блисссу применяли для оценки синергетического действия между окситропиум бромидом и RPL554. Синергетический эффект наблюдался для комбинации RPL554 и окситропиум бромида.

Пример 7

Синергетический эффект RPL554, вводимого в комбинации с аклидиниумом (антагонист мускаринового рецептора)

Способ согласно примеру 1 для оценки синергетического эффекта комбинации RPL554 и атропина повторяли для антагониста мускаринового рецептора аклидиниума. Кривые зависимости ответа от концентрации построили для тестирования RPL554 самого по себе, аклидиниума самого по себе и RPL554, вводимого в комбинации с аклидиниумом. Метод Беренбаума и критерий независимости по Блисссу применяли для оценки синергетического действия между аклидиниумом и RPL554. Синергетический эффект наблюдался для комбинации RPL554 и аклидиниумом.

Пример композиции 1 - введение посредством DPI

RPL554 комбинацию (0.2 мг) микронизировали и затем смешали с лактозой (25 мг). Эту перемешанную смесь затем загрузили в желатиновый картридж для ингаляции. Содержимое картриджа вводили с применением DPI, например.

Микронизированную RPL554 комбинацию (100 мг) смешивали с измельченной лактозой (25 г) (например, лактоза, в которой не более около 85% частиц имеют MMD от около 60 мкм до около 90 мкм, и не менее 15% частиц имеют MMD менее 15 мкм). Перемешанную смесь затем загрузили в отдельные блистеры отслаивающейся блистерной упаковки в количестве, достаточном для обеспечения около 10-500 мкг RPL554 на дозу. Содержимое блистеров вводили с применением DPI.

Альтернативно, микронизированную RPL554 комбинацию (1 г) смешали с измельченной лактозой (200 г) с образованием валового состава, имеющего массовое отношение соединения к измельченной лактозе, равное 1:200. Смешанную композицию упаковали в DPI, способный доставлять около 10-500 мкг RPL554 на дозу.

Альтернативно, микронизированный RPL554 (100 мг) и микронизированный антагонист мускаринового рецептора (500 мг) смешали с измельченной лактозой (30 г). Перемешанную смесь затем загрузили в отдельные блистеры отслаивающейся блистерной упаковки в количестве, достаточном для обеспечения от около 10 мкг до около 500 мкг RPL554 на дозу. Содержимое блистеров вводили с применением DPI.

Пример композиции 2 - композиции для применения в MDI

Микронизированную RPL554 комбинацию (10 г) диспергировали в растворе, полученном путем растворения лецитина (0.2 г) в деминерализованной воде (200 мл). Полученную суспензию высушили распылением и затем микронизировали с образованием микронизированной композиции, содержащей частицы, имеющие средний диаметр менее около 1.5 мкм. Микронизированную композицию затем загрузили в MDI картриджи, содержащие по давлением 1,1,1,2-тетрафторэтан в количестве, достаточном для обеспечения от около 10 мкг до около 500 мкг RPL554 на дозу при введении посредством MDI.

Альтернативно, суспензию, содержащую 5 мас. % RPL554 комбинации, 0.5 мас. % лецитина и 0.5 мас. % трегалозы, получили путем диспергирования 5 г RPL554 комбинации в виде микронизированных частиц со средним размером менее 10 мкм в коллоидном растворе, образованном из 0.5 г трегалозы и 0.5 г лецитина, растворенных в 100 мл деминерализованной воды. Суспензию высушили распылением, и полученное

вещество микронизировали до частиц, имеющих средний диаметр менее 1.5 мкм. Частицы загрузили в канистры, содержащие под давлением 1,1,1,2-тетрафторэтан.

Пример композиции 3 - композиция для применения в аэрозольном ингаляторе

RPL554 комбинацию (25 мг) растворили в цитратном буферизованном (pH 5) изотоническом соляном растворе (125 мл). Смесь перемешали и обработали ультразвуком до растворения соединения. pH раствора проверили и при необходимости довели до pH 5 путем медленного добавления водного 1N раствора гидроксида натрия. Раствор вводили с применением аэрозольного устройства, которое обеспечивает от около 10 мкг до около 500 мкг RPL554 комбинации на дозу.

Пример композиции 4 - твердая желатиновая капсула для перорального введения RPL554 комбинацию (50 г), высушенную распылением лактозу (440 г) и стеарат магния (10 г) тщательно смешали. Полученную композицию затем загрузили в твердые желатиновые капсулы (500 мг композиции на капсулу).

Пример композиции 5 - суспензия для перорального введения

Следующие ингредиенты смешали с получением суспензии, содержащей 100 мг соединения на 10 мл суспензии:

Ингредиенты	Количество
RPL554 комбинация	1.0 г
Фумаровая кислота	0.5 г
Хлорид натрия	2.0 г
Метилпарабен	0.15 г
Пропилпарабен	0.05 г
Гранулированный сахар	25.5 г
Сорбит (70% раствор)	12.85 г
Veegum ^{RTM} К магния алюминия силикат)	1.0 г
Ароматизатор	0.035 мл
Красители	0.5 мг
Дистиллированная вода, при необходимости	до 100 мл

Пример композиции 5 - инъеклируемая композиция для введения путем инъекции RPL554 комбинацию (0.2 г) смешали с 0.4 М натрий ацетатным буферным раствором (2.0 мл). Значение pH полученной смеси довели до pH 4 с применением 0.5 N водной соляной кислоты или 0.5 N водного гидроксида натрия, при необходимости, и затем добавили достаточное для инъекции количество воды с достижением общего объема, равного 20 мл. Смесь затем отфильтровали через стерильный фильтр (0.22 микрон) с получением стерильного раствора, подходящего для введения путем инъекции.

Ссылочные источники

Berenbaum MC (1977) Synergy, additivism and antagonism in immunosuppression. A critical review. Clin Exp Immunol 28:1-18.

Binks AP, Paydarfar D, Schachter SC, Guz A and Banzett RB (2001) High strength stimulation of the vagus nerve in awake humans: a lack of cardiorespiratory effects. Respir Physiol 127:125-133.

Boik JC, Newman RA and Boik RJ (2008) Quantifying synergism/antagonism using nonlinear mixed-effects modeling: a simulation study. Stat Med 27:1040-1061.

Boswell-Smith V, Cazzola M and Page CP (2006a) Are phosphodiesterase 4 inhibitors just more theophylline? J Allergy Clin Immunol 117:1237-1243.

Boswell-Smith V, Spina D, Oxford AW, Comer MB, Seeds EA and Page CP (2006b) The pharmacology of two novel long-acting phosphodiesterase 3/4 inhibitors, RPL554 [9,10-dimethoxy-2(2,4,6-trimethylphenylimino)-3-(n-carbamoyl-2-aminoethyl)-3,4,6,7-tetrahydro-2H-pyrimido [6,1-a]isoquinolin-4-one] and RPL565 [6,7-dihydro-2-(2,6-diisopropylphenoxy)-9,10-dimethoxy-

4H-pyrimido[6,1-a]isoquinolin-4-one]. *J Pharmacol Exp Ther* 318:840-848.

Boucher AN and Tarn VH (2006) Mathematical formulation of additivity for antimicrobial agents. *Diagn Microbiol Infect Dis* 55:319-325.

Freas W, Hart JL, Golightly D, McClure H and Muldoon SM (1989) Contractile properties of isolated vascular smooth muscle after photoradiation. *Am J Physiol* 256:H655-664.

Goldoni M and Johansson C (2007) A mathematical approach to study combined effects of toxicants in vitro: evaluation of the Bliss independence criterion and the Loewe additivity model. *Toxicol In Vitro* 21:759-769.

Goodman LS, Gilman A and Brunton LL (2008) Goodman & Gilman's manual of pharmacology and therapeutics. McGraw-Hill Medical, New York.

Grabovsky Y and Tallarida RJ (2004) Isobolographic analysis for combinations of a full and partial agonist: curved isoboles. *J Pharmacol Exp Ther* 310:981-986.

Greco WR, Bravo G and Parsons JC (1995) The search for synergy: a critical review from a response surface perspective. *Pharmacol Rev* 47:331-385.

Hatake K and Wakabayashi I (2000) Ethanol suppresses L-arginine-induced relaxation response of rat aorta stimulated with bacterial lipopolysaccharide. *Nihon Arukoru Yakubutsu Igakkai Zasshi* 35:61-68.

Meletiadis J, Mouton JW, Meis JF and Verweij PE (2003) In vitro drug interaction modeling of combinations of azoles with terbinafine against clinical *Scedosporium prolificans* isolates.

Antimicrob Agents Chemother 47:106-117.

Mercier FJ, Naline E, Bardou M, Georges O, Denjean A, Benhamou D and Advenier C (2002) Relaxation of proximal and distal isolated human bronchi by halothane, isoflurane and desflurane. *Eur Respir J* 20:286-292.

Motulsky H (1995) Intuitive biostatistics. Oxford University Press, New York; Oxford.

Motulsky H and Christopoulos A (2004) Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression: a practical guide to curve fitting. Oxford University Press, Oxford.

Rabe KF (1998) Mechanisms of immune sensitization of human bronchus. *Am J Respir Crit Care Med* 158:S161-170.

Spina D, Ferlenga P, Biasini I, Moriggi E, Marchini F, Semeraro C and Page CP (1998) The effect duration of selective phosphodiesterase inhibitors in the guinea pig. *Life Sci* 62:953-965.

Tallarida RJ (2001) Drug synergism: its detection and applications. *J Pharmacol Exp Ther* 298:865-872.

Tallarida RJ (2006) An overview of drug combination analysis with isobolograms. *J Pharmacol Exp Ther* 319:1-7.

Tallarida RJ and Raffa RB (2010) The application of drug dose equivalence in the quantitative analysis of receptor occupation and drug combinations. *Pharmacol Ther* 127:165-174.

Watson N, Bodtke K, Coleman RA, Dent G, Morton BE, Ruhlmann E, Magnussen H and Rabe KF (1997) Role of IgE in hyperresponsiveness induced by passive sensitization of human airways. *Am J Respir Crit Care Med* 155:839-844.

(57) Формула изобретения

1. Композиция для лечения заболевания или состояния, которое связано с острой или хронической закупоркой сосудов или бронхов, которая содержит (а) PDE3/PDE4 ингибитор, который представляет собой 9,10-диметокси-2-(2,4,6-триметилфениламино)-3-(N-карбамоил-2-аминоэтил)-3,4,6,7-тетрагидро-2H-пиримидо[6,1-a]изохинолин-4-он или его фармацевтически приемлемую кислотно-аддитивную соль, и (б) антагонист мускаринового рецептора.

2. Композиция по п. 1, отличающаяся тем, что PDE3/PDE4 ингибитор (а) представляет

собой 9,10-диметокси-2-(2,4,6-триметилфениламино)-3-(N-карбамоил-2-аминоэтил)-3,4,6,7-тетрагидро-2H-пиримидо[6,1-a]изохинолин-4-он.

3. Композиция по п. 1, отличающаяся тем, что антагонист мускаринового рецептора (b) представляет собой атропин, гиосцин, гликопирролат, ипратропиум, тиотропиум, окситропиум, пирензепин, телензепин, аклидиниум или умеклидиниум.

4. Композиция по п. 1, отличающаяся тем, что антагонист мускаринового рецептора (b) представляет собой атропин, ипратропиум бромид или тиотропиум бромид.

5. Фармацевтическая композиция для лечения заболевания или состояния, которое связано с острой или хронической закупоркой сосудов или бронхов, содержащая композицию по любому одному из пп. 1-4 и один или более фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или эксципиентов.

6. Фармацевтическая композиция по п. 5, отличающаяся тем, что она предназначена для введения посредством ингалятора сухого порошка (DPI) или ингалятора отмеренных доз (MDI).

7. Способ лечения заболевания или состояния, которое связано с острой или хронической закупоркой сосудов или бронхов, у субъекта, нуждающегося в этом, отличающийся тем, что он содержит введение указанному субъекту (a) PDE3/PDE4 ингибитора, как определено в п. 1 или 2, и (b) антагониста мускаринового рецептора, как определено в любом одном из пп. 1, 3 или 4.

8. Способ по п. 7, отличающийся тем, что он содержит введение указанному субъекту терапевтически эффективного нетоксичного количества композиция по любому одному из пп. 1-6.

9. Способ по п. 8, отличающийся тем, что заболеванием или состоянием является астма, аллергическая астма, поллиноз, аллергический ринит, бронхит, эмфизема, бронхоэктаз, хроническое обструктивное заболевание легких (ХОЗЛ), синдром расстройства дыхания у взрослых (ARDS), резистентная к стероидам астма, тяжелая астма, детская астма, кистозный фиброз, фиброз легких, легочный фиброз или интерстициальное заболевание легких.

10. Способ по п. 9, отличающийся тем, что заболеванием или состоянием является астма или хроническое обструктивное заболевание легких (ХОЗЛ).

11. Способ по любому одному из пп. 7-10, отличающийся тем, что указанным субъектом является человек.

12. Композиция для лечения заболевания или состояния, которое связано с острым или хроническим воспалением, которая содержит (a) PDE3/PDE4 ингибитор, который представляет собой 9,10-диметокси-2-(2,4,6-триметилфениламино)-3-(N-карбамоил-2-аминоэтил)-3,4,6,7-тетрагидро-2H-пиримидо[6,1-a]изохинолин-4-он или его фармацевтически приемлемую кислотно-аддитивную соль, и (b) антагонист мускаринового рецептора.

13. Фармацевтическая композиция для лечения заболевания или состояния, которое связано с острым или хроническим воспалением, содержащая композицию по п. 12 и один или более фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или эксципиентов.

14. Способ лечения заболевания или состояния, которое связано с острым или хроническим воспалением, у субъекта, нуждающегося в этом, отличающийся тем, что он содержит введение указанному субъекту (a) PDE3/PDE4 ингибитора, как определено в п. 1 или 2, и (b) антагониста мускаринового рецептора, как определено в любом одном из пп. 1, 3 или 4.

15. Способ по п. 14, отличающийся тем, что заболеванием или состоянием являются кожные заболевания, атопический дерматит, псориаз, воспаление глаз, церебральная

ишемия или аутоиммунные заболевания.

5

10

15

20

25

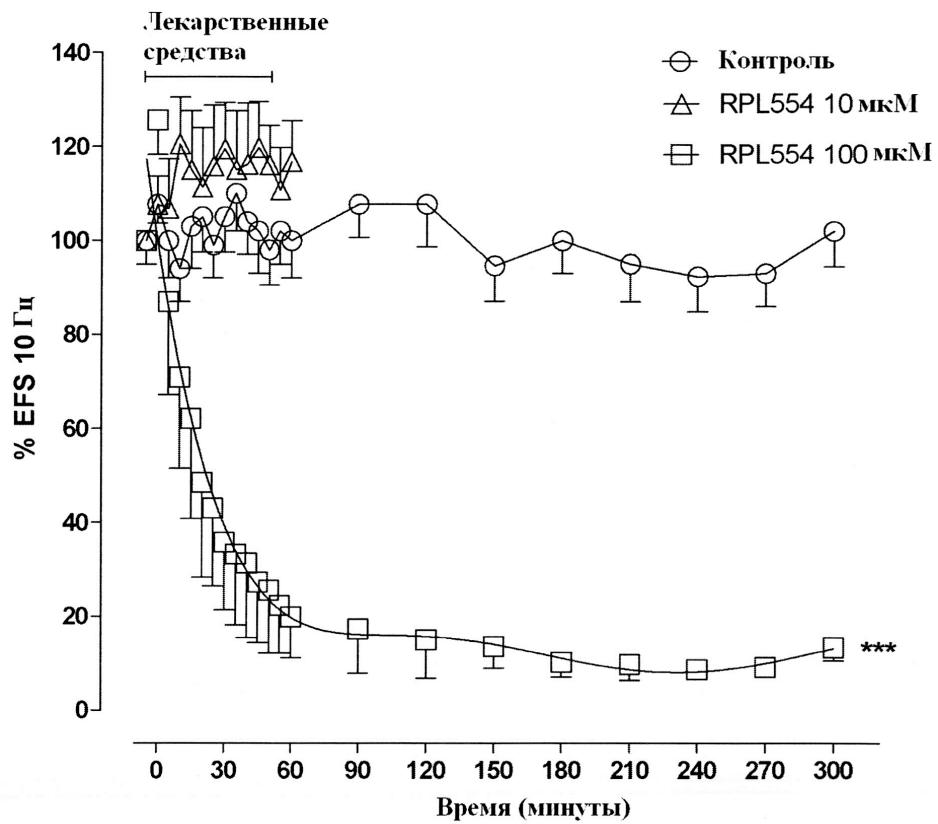
30

35

40

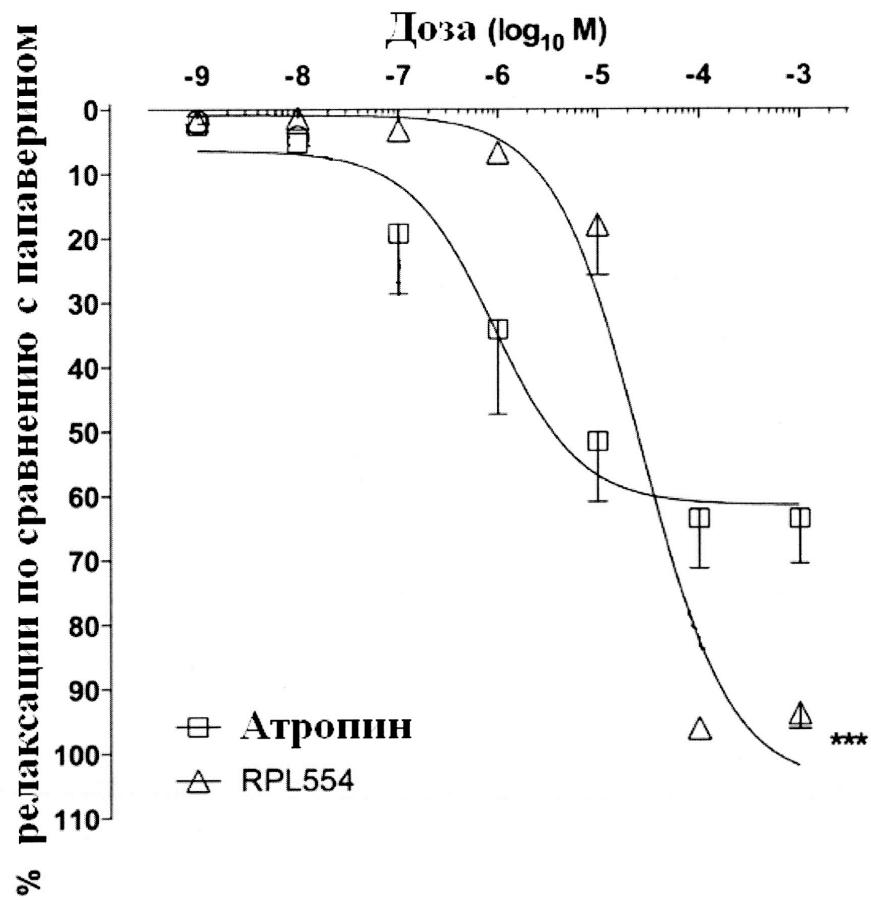
45

1/11



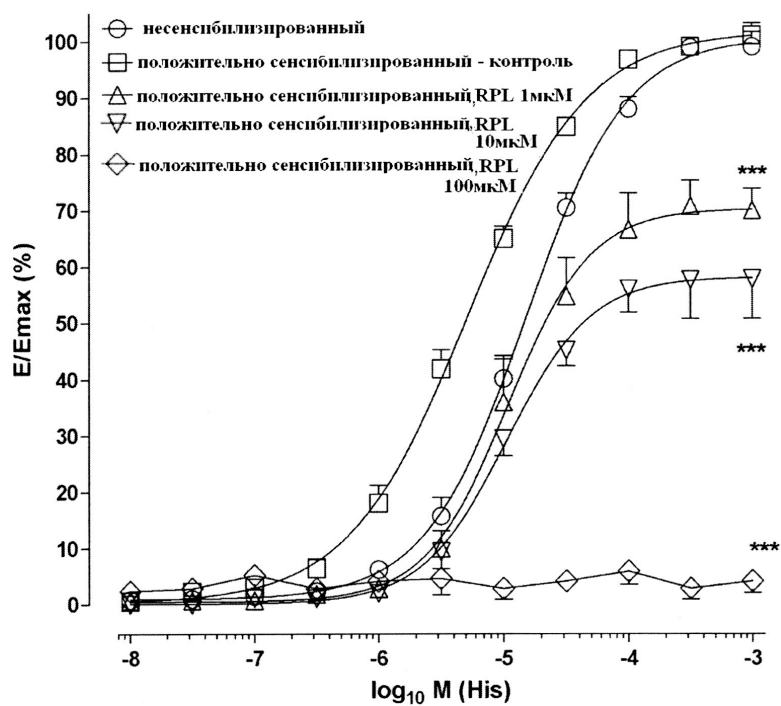
Фиг. 1

2/11

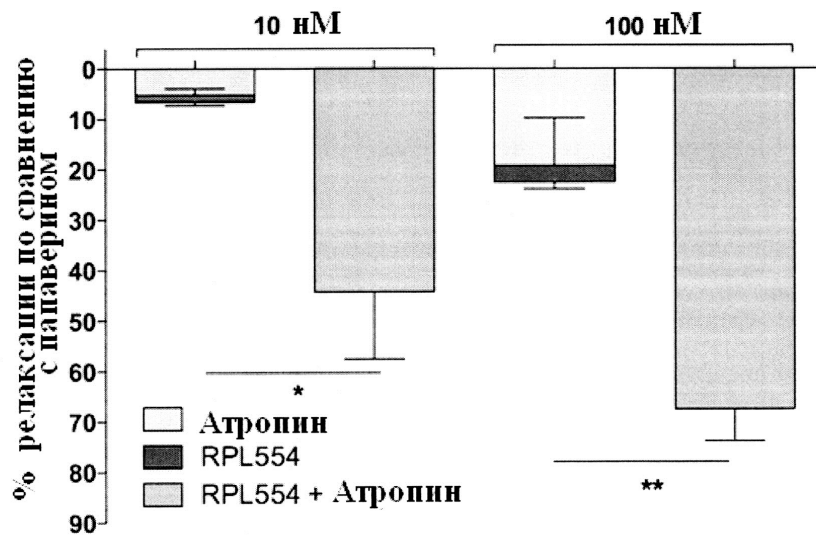


Фиг. 2

3/11

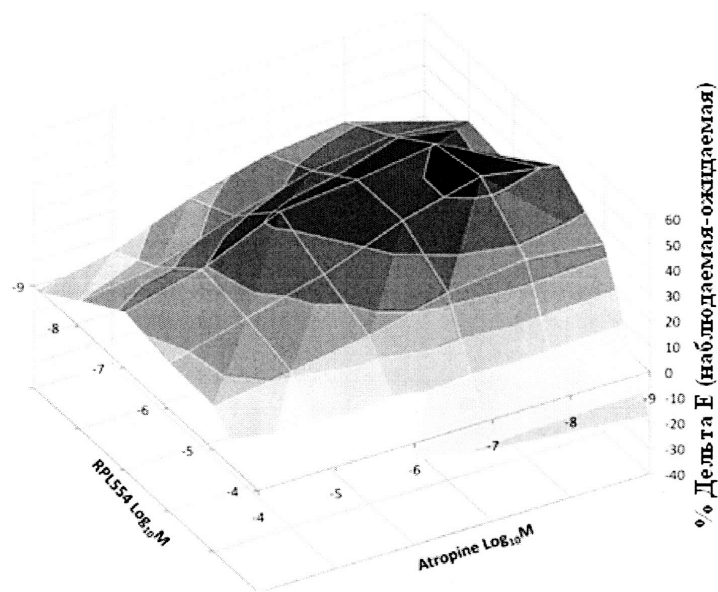


Фиг. 3

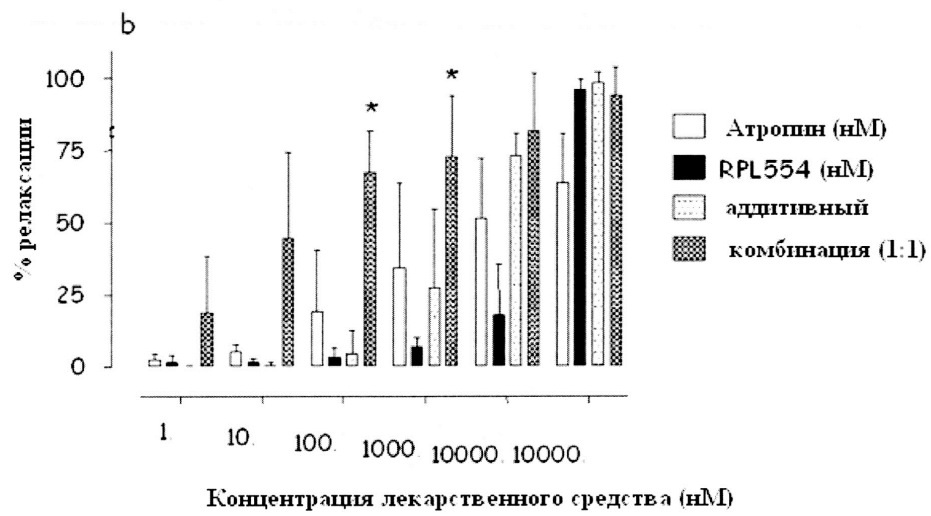


Фиг. 4

4/11

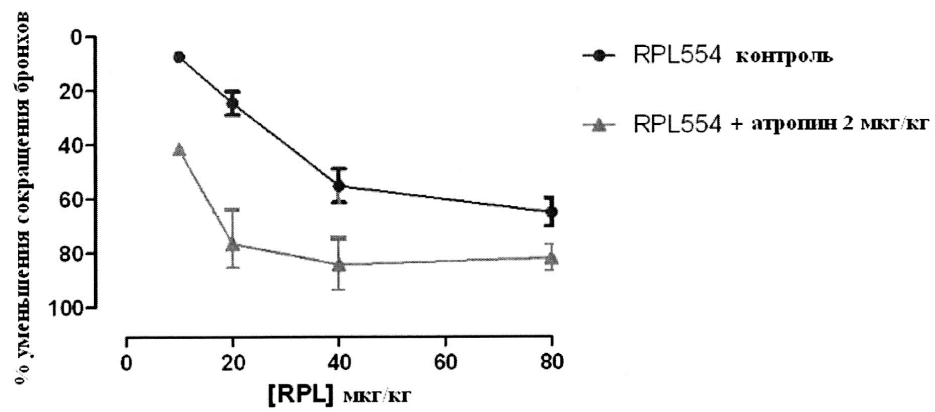


Фиг. 5

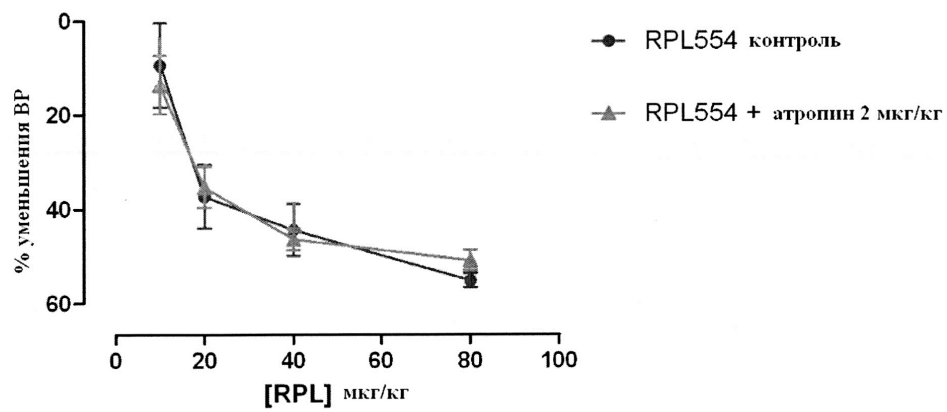


Фиг. 6

5/11

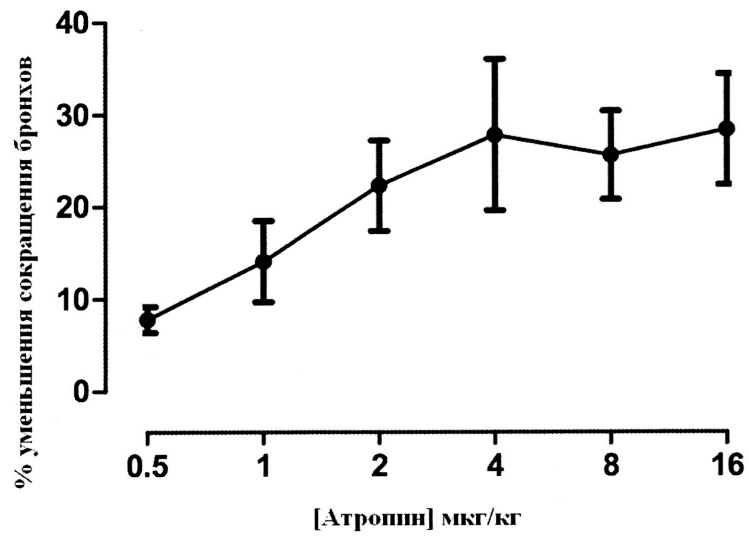


Фиг. 7

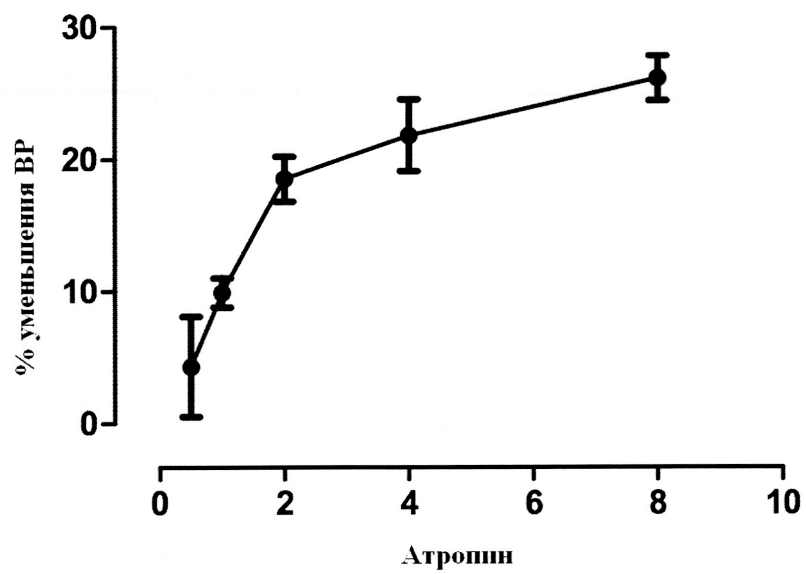


Фиг. 8

6/11

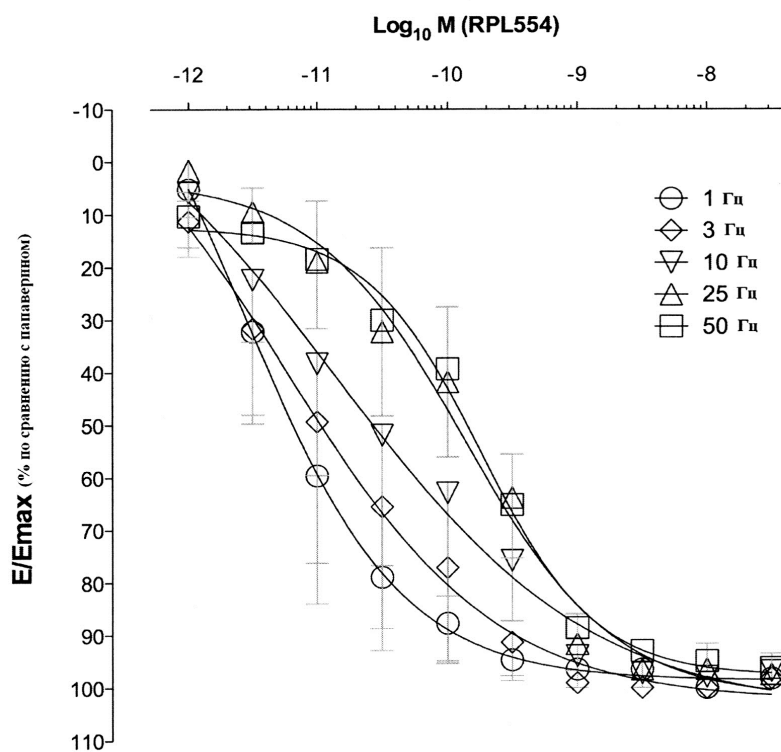


Фиг. 9

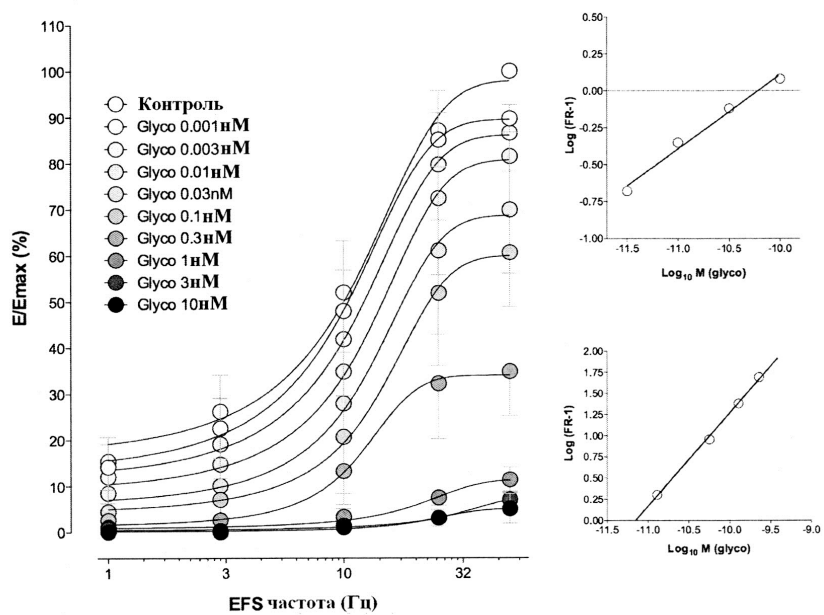


Фиг. 10

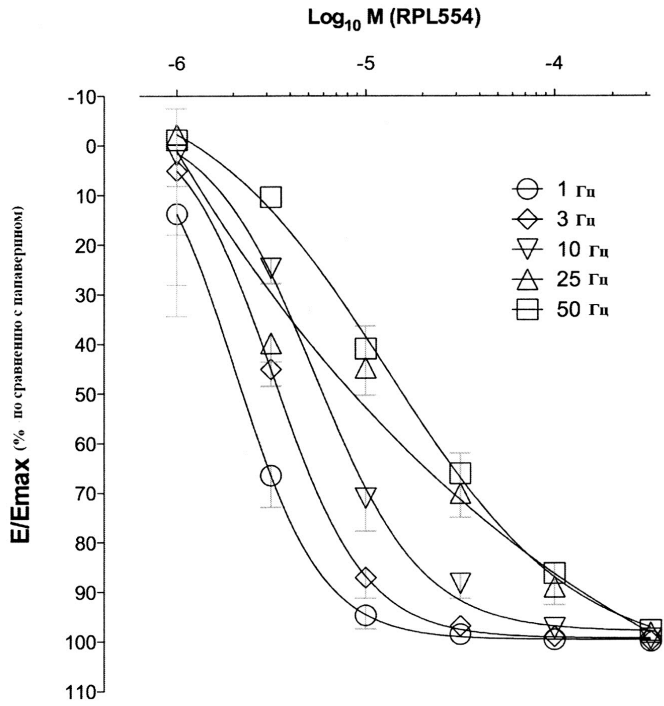
7/11



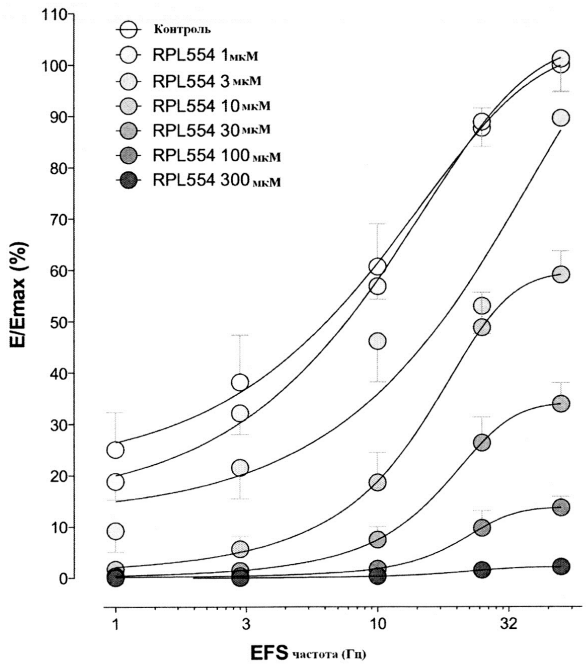
Фиг. 11



Фиг.12



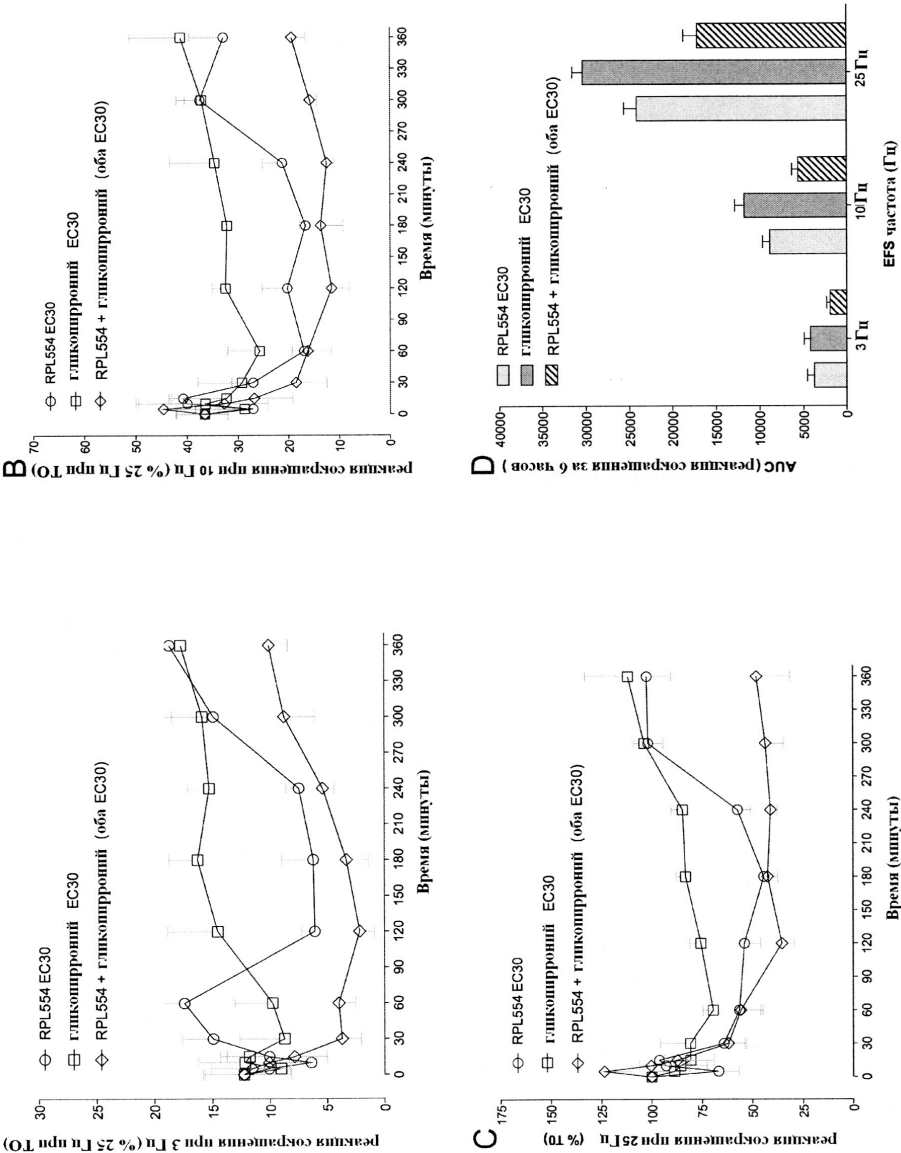
Фиг. 13



Фиг. 14

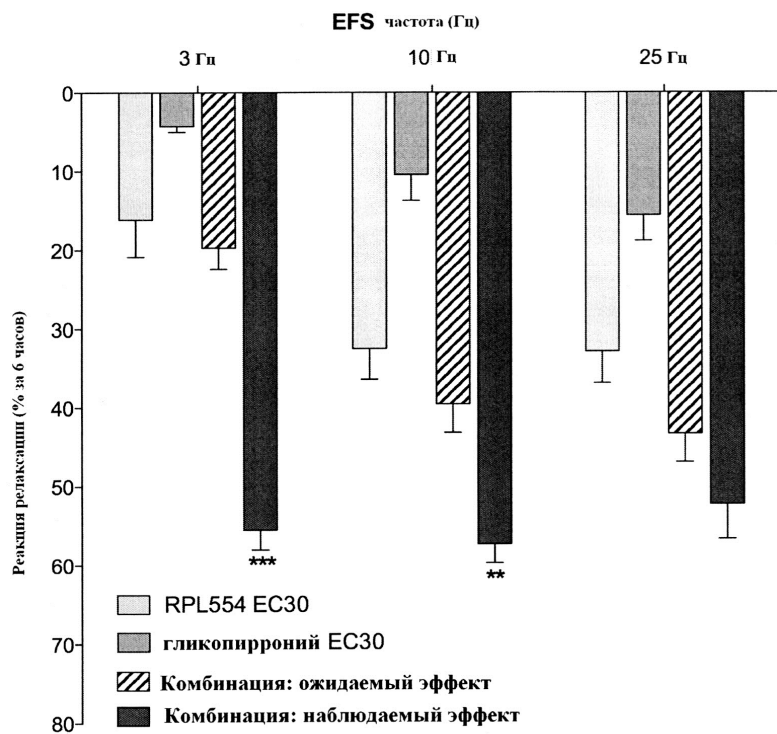
9/11

9/11

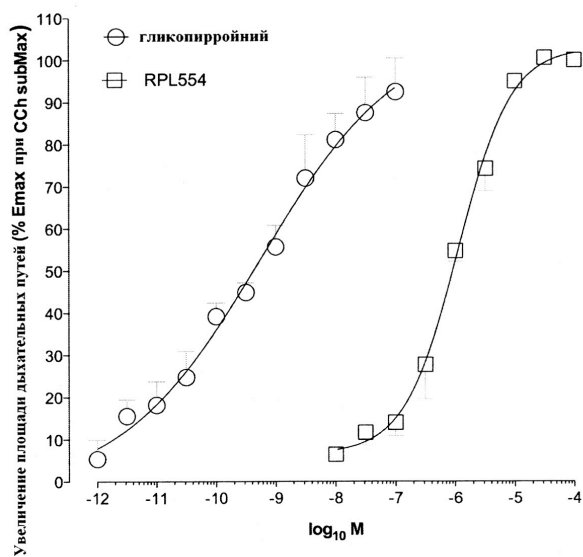


Фиг. 15

10/11

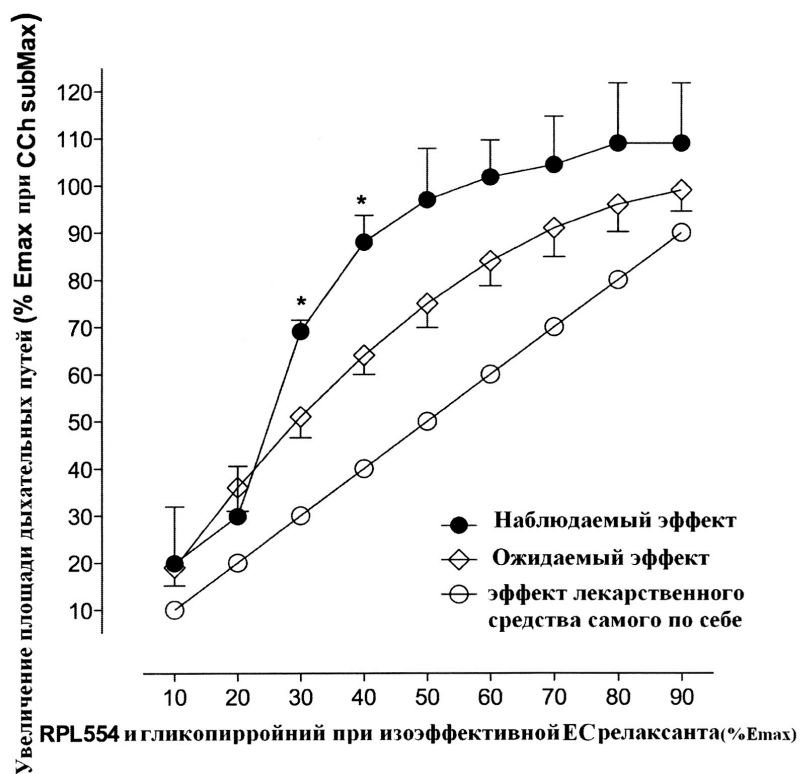


Фиг. 16

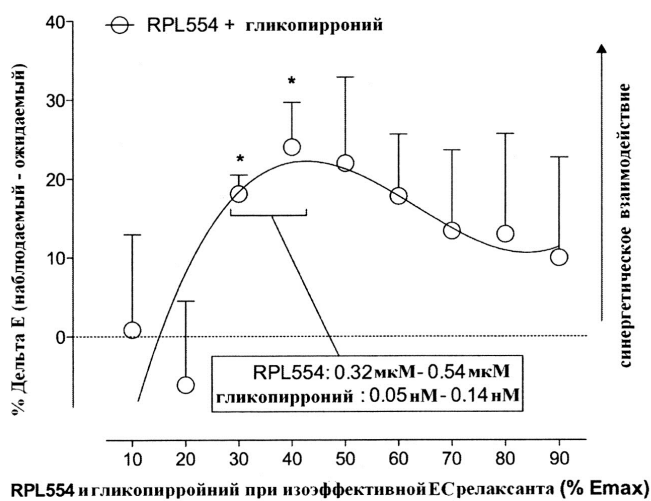


Фиг. 17

11/11



Фиг. 18



Фиг. 19