

**ÖZET**

**İLAÇ KOMBİNASYONU**

5 Mevcut buluş solunum hastalıkları ve inflamatuvar hastalıkların tedavisinde şaşırtıcı terapötik etkinliği olan ilaçların yeni bir kombinasyonu ile ilgilidir.

## İSTEMLER

1. Bir kompozisyon olup, özelliği; (a) 9,10-Dimetoksi-2-(2,4,6-trimetilfenilimino)-3-(N-karbamoil-2-aminoetil)-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirimido[6,1-a]izokuinolin-4-on gibi bir  
5 PDE3/PDE4 inhibitörü veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir asit ilaveli bir tuzu ve (b) bir muskarinik reseptör antagonisti içermesidir.
2. İstem 1'e göre bir kompozisyon olup, özelliği; burada PDE3/PDE4 inhibitörünün (a) 9,10-Dimetoksi-2-(2,4,6-trimetilfenilimino)-3-(N-karbamoil-2-aminoetil)-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirimido[6,1-a]izokuinolin-4-on olmasıdır.
- 10 3. İstem 1 ve 2'ye göre bir kompozisyon olup, özelliği; muskarinik reseptör antagonisti (b)'nin atropin, hiosin, glikopirolat, ipratropium, tiotropium, oksitropium, pirenzepin, telenzepin, aklidinyum veya umeclidinyum olmasıdır.
4. İstem 1 ile 3'ün herhangi birine göre bir kompozisyon olup, özelliği; muskarinik reseptör antagonisti (b)'nin atropin, ipratropium bromür veya tiotropium bromür  
15 olmasıdır.
5. İstem 1 ile 4'ten herhangi birine göre bir kompozisyon olup, özelliği; kompozisyonun sabit bir kombinasyon olmasıdır.
6. Farmasötik bir kompozisyon olup, özelliği; İstem 1 ile 5'ten herhangi birinde tanımlanan bir kompozisyon ve farmasötik olarak kabul edilebilir bir veya daha fazla  
20 taşıyıcı, seyreltici veya yardımcı madde içermesidir.
7. İstem 6'ya göre bir farmasötik kompozisyon olup, özelliği; kuru toz inhaler (DPI) veya ölçülü doz inhaler (MDI) ile uygulamaya yönelik olmasıdır.
8. İstem 1 ile 7'den herhangi birine göre bir kompozisyon olup, özelliği; (i) damarların veya bronşun akut veya kronik obstrüksiyonuna veya (ii) akut veya kronik  
25 inflamasyona dayanan bir hastalık veya durumun tedavisinde kullanıma yönelik olmasıdır.
9. İstem 8'e göre kullanıma yönelik bir kompozisyon olup, özelliği; burada hastalık veya durumun astım, alerjik astım, saman nezlesi, alerjik rinit, bronşit, amfizem, bronşektazi, kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH), erişkin solunum  
30 distress sendromu (ARDS), steroid dirençli astım, şiddetli astım, pediyatrik astım, kistik fibrozis, akciğer fibrozu, pulmoner fibroz, interstisyel akciğer hastalığı, cilt

bozuklukları, atopik dermatit, psoriasis, oküler inflamasyon, serebral iskemi veya bir oto-bağışıklık hastalığı olmasıdır.

**10.** İstem 8 veya 9'a göre kullanım için bir kompozisyon olup, özelliği; hastalık veya durumun astım veya kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) olmasıdır.

5 **11.** İstem 1 veya 2'de tanımlanan bir PDE3/PDE4 inhibitörü olup, özelliği; istem 1, 3 veya 4'ün herhangi birinde tanımlanan bir muskarinik reseptör antagonisti ile kombinasyon halinde istem 8 ile 10'dan herhangi birinde tanımlanan bir hastalık veya durumun tedavisinde kullanıma yönelik olmasıdır.

10 **12.** İstem 1, 3 veya 4'ün herhangi birinde tanımlanan bir muskarinik reseptör antagonisti olup, özelliği; istem 1 veya 2'de tanımlanan bir PDE3/PDE4 inhibitörü ile kombinasyon halinde istem 8 ile 10'dan herhangi birinde tanımlanan bir hastalık veya durumun tedavisinde kullanıma yönelik olmasıdır.

15 **13.** Bir ürün olup, özelliği; istem 8 ile 10'un herhangi birinde tanımlanan bir hastalık veya bir durumun tedavisinde eşzamanlı, ayrı veya sıralı olarak kullanım için istem 1 veya 2'de tanımlanan (a) bir PDE3/PDE4 inhibitörü ve (b) istem 1,3 ya da 4'ün herhangi birinde tanımlanan bir muskarinik reseptör antagonistini içermesidir.

## TARİFNAME

### İLAÇ KOMBİNASYONU

#### BULUŞ ALANI

Mevcut buluş solunum hastalıkları ve inflamatuvar hastalıkların tedavisinde şaşırtıcı  
5 terapötik etkinliği olan ilaçların yeni bir kombinasyonu ile ilgilidir.

#### BULUŞUN ARKA PLANI

Çok sayıda farklı yaklaşım bulunmaktadır. Örnek olarak, kortikosteroidler,  $\beta$ 2-  
adrenajik reseptör agonistleri, fosfodiesteraz (PDE) 4 inhibitörleri, PDE 3 inhibitörleri,  
lökotrien reseptör antagonistleri, epidermal büyüme hormon reseptör (egfr) kinaz  
10 inhibitörleri, p38 kinaz inhibitörleri, NK1 agonistleri ve muskarinik reseptör  
antagonistleri solunum yolu hastalıklarının tedavisinde kullanılması için iyi  
bilinmektedir.

RPL554 (9,10-Dimetoksi-2-(2,4,6-trimetilfenilimino)-3-(N-karbamoil-2-aminoetil)-  
3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirimido[6,1-a]izokuinolin-4-on) bir çift PDE3/PDE4 inhibitörüdür  
15 ve WO 00/58308 numaralı patentte açıklanmıştır. Kombine bir PDE3/PDE4 inhibitörü  
olarak, RPL554'ün hem antiinflamatuvar hem de bronkodilatör aktivitesi  
bulunmaktadır ve astım ve kronik obstrüktif pulmoner hastalığı (COPD) gibi solunum  
yolları hastalıklarının tedavisi için yararlıdır.

Solunum yolları hastalıklarının tedavisi için farklı sınıflarda solunum yolu ilaçlarının  
20 kombinasyon halinde kullanıldığı bilinmektedir. Bununla birlikte, bu tarz  
kombinasyonların bileşenleri arasındaki nadiren sinerjik etki gözlenmektedir.

#### BULUŞ ÖZETİ

RPL554'ün muskarinik reseptör antagonistlerinin aktivitesini etkili hale getirme  
yeteneği mevcut buluşun şaşırtıcı bir bulgusudur. RPL554 ve muskarinik reseptör  
25 antagonistleri bu sebeple artmış bir terapötik etki sağlamak için kombinasyonda  
sinerjik olarak etkileşmektedir.

İlaçlar arasındaki gerçek bir sinerjik etki nadirdir. Sinerjik etkinin varlığı, örnek olarak,  
Berenbaum yöntemi, Bliss Independence (BI) kriteri ve/veya Loewe Additivity (LA)  
modeli ile izobol eğrisi yoluyla saptanabilir (bkz. Berenbaum, 1977; Greco ve ark.,

1995; Grabovsky ve Tallarida, 2004; Tallarida, 2006; Goldoni ve Johansson, 2007; Tallarida ve Raffa, 2010).

Berenbaum yöntemine göre, bir kombinasyon için sinerji ilk olarak, her ilacın bir düşük ve bir yüksek dozunu belirlemek için monoterapiler olarak bileşen ilaçlardan her birinin doz cevap eğrisinin saptanması ile tespit edilir. Daha sonra her ilacın düşük dozlarının bir kombinasyonunun etkisi ölçülür. Eğer her bir ilacın düşük dozlarının bir kombinasyonu monoterapi olarak tek başına yüksek dozdan daha fazla bir cevap oluşturuyorsa, iki ilaç arasında gerçek bir sinerji vardır.

Mevcut buluş sahipleri şaşırtıcı bir şekilde, Berenbaum yöntemine göre RPL554 bir muskarinik reseptör antagonisti ile kombine edildiğinde gerçek bir sinerjistik etki ortaya çıktığını bulmuşlardır. Her bileşen ilacın düşük dozlarını kullanırken elde edilen artmış terapötik etki, klinik anlamda oldukça istenen bir durumdur ve örnek olarak bu hastanın deneyimlediği yan etkileri azaltır.

Buna göre, mevcut buluş (a) bir 9,10-Dimetoksi-2-(2,4,6-trimetilfenilimino)-3-(N-karbamoil-2-aminoetil)-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirimido[6,1-a]izokuinolin-4-on olan PDE3/PDE4 inhibitörü veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunu ve (b) bir muskarinik reseptör antagonisti içeren bir kompozisyon sağlar.

Buluş ayrıca, buluşa göre bir kompozisyon içeren bir farmasötik kompozisyon ve bir veya daha fazla farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcılar, seyrelticiler veya yardımcı maddeler sağlar.

Buluş ayrıca, burada tanımlanan hastalıkların veya durumların tedavisinde kullanmak için buluşta yer alan bir kompozisyon sağlar.

Buluş ayrıca burada tanımlanan hastalıkların veya durumların tedavisinde kullanmak için bir muskarinik reseptör antagonisti ile kombine halde burada tanımlandığı gibi bir PDE3/PDE4 inhibitörü sağlar.

Buluş ayrıca burada tanımlanan hastalıkların veya durumların tedavisinde kullanmak için burada tanımlandığı gibi bir PDE3/PDE4 inhibitörü ile kombine halde bir muskarinik reseptör antagonisti sağlar.

Buluş ayrıca burada tanımlanan bir hastalık veya durumun tedavisinde eş zamanlı olarak, ayrı olarak veya ardışık olarak kullanım için (a) burada tanımlanan bir

PDE3/PDE4 inhibitörü ve (b) bir muskarinik reseptör antagonisti içeren bir ürün sağlar.

### ŞEKİLLERİN KISA TANIMI

**Şekil 1:** RPL554 ile 50 dakika inkübasyondan sonra insan izole edilmiş bronşiyal preparatların EFS'ye kontraksiyonun inhibisyonunu temsil eden çizgi grafiği. Gösterilen noktalar, 5 farklı denekten elde edilen örneklerle yapılan deneylerden alınmıştır ve bunlar ortalama  $\pm$  SEM \*\*\*P<0.001'e karşı kontrol olarak temsil edilir.

**Şekil 2:** Asetilkolin ile sub-maksimum kontraksiyon üzerine RPL554 ve atropinin insan bronşiyal gevşemesi. Gösterilen noktalar, 5 farklı denekten elde edilen örneklerle yapılan deneylerden alınmıştır ve bunlar ortalama  $\pm$  SEM \*\*\*P<0.001'e karşı atropin olarak temsil edilir.

**Şekil 3:** Arttırılmış RPL554 dozunun, pasif duyarlılaştırılmış insan izole bronşlarında histaminin kasılma etkisi üzerine etkisi. Gösterilen noktalar, 5 farklı denekten elde edilen örneklerle yapılan deneylerden alınmıştır ve bunlar ortalama  $\pm$  SEM \*\*\*P<0.001'e karşı pasif duyarlılaştırılmış kontrol olarak temsil edilir.

**Şekil 4:** Atropin ve RPL554 arasındaki düşük konsantrasyon etkileşimi (10 nM ve 100 nM). 5 farklı denekten elde edilen örneklerle yapılan deneylerden elde edilen veriler ve bunlar ortalama  $\pm$  SEM \*P<0.05 ve \*P<0.01 olarak temsil edilir.

**Şekil 5:** RPL554 + atropin kombinasyonu için BI ilaç etkileşim modelinin cevap yüzey analizinden elde edilen etkileşim yüzeyleri. Yatay eksen bileşiklerin konsantrasyonunu, dikey eksen  $\Delta E$ 'yi (gevşeme, % ) temsil etmektedir. 0 düzlemi BI etkileşimlerini gösterirken, 0 düzleminin üstündeki hacim, sinerjistik (pozitif  $\Delta E$ ) etkileşimleri gösterir. Etkileşimlerin büyüklüğü doğrudan  $\Delta E$  ile ilişkilidir ve 3D grafiklerdeki farklı tonlar farklı yüzdelik sinerji bantlarını (% 10) temsil eder. Her bir nokta kesişimi, farklı deneklerden alınan örnekler üzerinde yapılan deneylerin ortalamasını temsil etmektedir (n = 5).

**Şekil 6:** Atropine karşı gevşeme cevabını (açık sütun; Atropine, nM), (kapalı sütun; nM) her bir doz kombinasyonunun RPL554 aditif cevabı (noktalı sütun; aditif) ve her bir doz kombinasyonu için gözlenen gevşeme cevabını (koyu noktalı kolon; Kombinasyon 1:1) temsil eden bar grafik. Her agonistin konsantrasyonu X ekseninde gösterilmiştir. Her bar ortalamayı ve dikey çizler ise standart sapmayı (SD) temsil eder (N=5). Aditif cevap durumunda, SD, Tallarida ve Raffa (2010) yöntemleri

kullanılarak saptanmıştır. Bir örnek t-testi kullanılarak \*  $P < 0.05$  (ayarlanmış) cf aditif cevap.

**Şekil 7:** RPL554'ün tek başına (●) veya 2 µg/kg atropin (▲) ile kombinasyon halinde iv uygulamasını takiben hava yolu t obstrüksiyonunda azalma (Bombesin (2 µg/ml; 5 ml/saat) intravenöz (iv.) uygulaması ile indüklenmiştir).

**Şekil 8:** RPL554'ün tek başına (●) veya 2 µg/kg atropin (▲) ile kombinasyon halinde iv uygulamasını takiben ortalama arteriyel kan basıncında azalma.

**Şekil 9:** Atopinin iv uygulanmasından sonra hava yolu obstrüksiyonunda azalma (Bombesin (2 µg/ml; 5 ml/saat) intravenöz (iv.) uygulaması ile indüklenmiştir).

**Şekil 10:** iv. atropin uygulamasından sonra ortalama arter kan basıncında azalma.

**Şekil 11:** Farklı elektriksel alan stimülasyonu (EFS) frekanslarında glikopironyum için bronşial tonun konsantrasyon cevap eğrisi (CRC).

**Şekil 12:** Farklı konsantrasyonlardaki glikopironyumda, glikopironyum için bronşial tonun konsantrasyon cevap eğrisi ve eğri altında kalan alan (AUC).

**Şekil 13:** Farklı elektriksel alan stimülasyonu (EFS) frekanslarında RPL554 için bronşial tonun konsantrasyon cevap eğrisi (CRC).

**Şekil 14:** Farklı konsantrasyonlardaki RPL554 için bronşial tonun frekans cevap eğrisi.

**Şekil 15:** (A) 3Hz, (B) 10Hz, ve (C) 25 Hz EFS'de RPL554, glikopironyum ve kombinasyon halindeki RPL554 ve glikopironyum için insan izole bronşun kontraktıl cevabı ve her frekansta (D) AUC karşılaştırmaları.

**Şekil 16:** RPL554, glikopironyum için gevşeme cevabı, kombinasyon halindeki RPL554 ve glikopironyum için beklenen cevap ve kombinasyon halindeki RPL554 ve glikopironyum için gözlenen cevap.

**Şekil 17:** Karbakol indüklü sub-maksimal kontraksiyonda insan izole bronşiyalleri için halindeki RPL554 ve glikopironyuma karşı konsantrasyon cevap eğrisi (CCh).

**Şekil 18:** Küçük insan bronşları (<1 mm çapında) için kombinasyon halindeki RPL554 ve glikopironyum tarafından indüklenen beklenen ve gözlenen gevşeme cevabı.

**Şekil 19:** Kombinasyon halindeki RPL554 ve glikopironyum tarafından indüklenen beklenen ve gözlenen gevşeme cevabı arasındaki delta etkisi.

## BULUŞUN DETAYLI TANIMI

5 Burada aşağıdaki kısaltmalar kullanılmaktadır:

RPL5 54: 9,10-Dimetoksi-2-(2,4,6-trimetilfenilimino)-3-(N-karbamoil-2-aminoetil)-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirimido[6,1-a]izokuinolin-4-on); ANOVA varyans analizi; Bl Bliss Independence; COX: siklooksijenaz; EC30: % 30'luk bir maksimum etki göstermek için gerekli olan konsantrasyon; EC50: % 50'lik bir maksimum etki  
10 göstermek için gerekli olan konsantrasyon; EC70: % 70'lik bir maksimum etki göstermek için gerekli olan konsantrasyon; EFS: elektrik alan stimülasyonu; Emax: maksimum etki; KH: Krebs-Henseleit tampon çözeltisi; LA: Loewe aditivitesi ve PDE: fosfodiesteraz.

“Farmasötik olarak kabul edilebilir” terimi biyolojik veya başka bir şekilde istenmeyen  
15 olmayan maddeleri ima eder. Örnek olarak “farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcı” terimi bir kompozisyona dahil edilebilen ve istenmeyen biyolojik etkilere veya kompozisyonun diğer bileşenleriyle zararlı bir şekilde etkileşime neden olmaksızın bir deneğe/hastaya uygulanabilen maddeyi belirtir. Bu tarz farmasötik olarak kabul edilebilir maddeler tipik olarak toksikolojik ve üretim testlerinin gerekli standartlarını  
20 karşılamıştır ve Amerika Gıda ve İlaç Dairesi tarafından uygun inaktif maddeler olarak tanımlanmış malzemeleri içerir.

“Farmasötik olarak kabul edilebilir asit ilave tuz” biyolojik veya başka bir şekilde istenmeyen olmayan farmasötik bir asit ilave tuzunu ima eder. Bu tarz farmasötik olarak kabul edilebilir asit ilave tuzları alanında uzman kişilerce iyi bilinmektedir.

25 “Terapötik olarak etkili miktar” terimi tedaviye ihtiyaç duyan bir kişiye uygulandığında tedaviyi etkileyecek yeterli miktarı ima eder. Özellikle, bir “etkili” miktar istenen sonucu elde etmek için ihtiyaç duyulan miktardır ve bir “terapötik olarak etkili” miktar istenen terapötik etkiyi elde etmek için ihtiyaç duyulan miktardır. Örnek olarak, bir muskarinik reseptörü antagonize etmek için, bir “etkili miktar” bir muskarinik reseptör  
30 antagonize edici miktardır. Benzer olarak, kronik obstüriktif pulmoner hastalığını (COPD) tedavi etmek için bir terapötik olarak etkili miktar istenen terapötik sonucu



başaracaktır, bu belki hastalığın önlenmesi, düzeltilmesi, baskılanması veya hafifletilmesi olabilir.

“Tedavi etme” veya “tedavi” terimi burada, bir memeli gibi (özellikle bir insan) bir kişideki bir hastalığın veya tıbbi durumun (COPD gibi) tedavi edilmesi anlamında kullanılmıştır, bu şunları içerir: (a) hastalığın veya tıbbi durumun önlenmesi, yani bir kişinin profilaktik tedavisi (b) hastalığın veya meydana gelen bir tıbbi durumun düzeltilmesi, yani bir kişideki hastalığın veya tıbbi durumun elimine edilmesi veya gerilemesinin sağlanması; (c) hastalığın veya meydana gelen bir tıbbi durumun baskılanması, yani bir kişideki hastalığın veya tıbbi durumun gelişmesinin yavaşlatılması veya durdurulması; veya (d) bir kişideki hastalığın veya tıbbi durumun semptomlarının hafifletilmesi. Örnek olarak, örnek olarak “COPD tedavisi” meydana gelen COPD’nin önlenmesini, COPD’nin düzeltilmesini, COPD’nin baskılanmasını ve COPD semptomlarının hafifletilmesini içerecektir. “Denek” terimi, hastalığın önlenmesi veya belirli bir hastalığın veya tıbbi durumun tedavisi için şu anda tedavi gören, tedaviye veya hastalık önlemeye ihtiyacı olan insanlar gibi tüm hayvanları aynı zamanda buluşta yer alan kompozisyonların bir deneyde değerlendirildiği veya kullanıldığı bir test denekleri (örneğin bir hayvan modeli) dahil etmeyi amaçlamaktadır.

#### PDE3/PDE4 inhibitörü

Mevcut buluşta kullanılan PDE3/PDE4 inhibitörü 9,10-Dimetoksi-2-(2,4,6-trimetilfenilimino)-3-(N-karbamoil-2-aminoetil)-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirimido[6,1-a]izokuinolin-4-on (ayrıca RPL554 olarak da bilinir) veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir asit ilave tuzudur.

Tipik olarak, PDE3/PDE4 inhibitörü 9,10-Dimetoksi-2-(2,4,6-trimetilfenilimino)-3-(N-karbamoil-2-aminoetil)-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirimido[6,1-a]izokuinolin-4-on’dur.

Böylece 9,10-Dimetoksi-2-(2,4,6-trimetilfenilimino)-3-(N-karbamoil-2-aminoetil)-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirimido[6,1-a]izokuinolin-4-on’un serbest bazı tercih edilir.

#### Muskarinik reseptör antagonisti

Bir muskarinik reseptör antagonisti (MRA) muskarinik asetilkolin reseptörlerinin aktivitesini bloke eden bir bileşiktir. Alanında uzman bir kişi verilen bir bileşiğin, bu alanda iyi bilinen analizleri kullanarak muskarinik asetilkolin reseptörlerinin aktivitesini zorlanmaksızın bloke edip etmeyeceğini tespit edebilir.

RPL554'ün, iki yapısal olarak farklı muskarinik reseptör antagonistinin, yani atropin ve glikopirronyumun aktivitesini güçlendirme yeteneğine sahip olması bu buluşun bir bulgusudur. İki yapısal olarak farklı muskarinik reseptör antagonisti ile bu bulguya dayanarak, RPL554 ile gözlemlenen sinerjik etkileşimin, bu bileşiklerin spesifik yapısından ziyade muskarinik reseptör antagonistleri olarak bu bileşiklerin aktivitesinden dolayı ortaya çıktığı izlenmiştir. Dolayısıyla muskarinik reseptör antagonisti aktivitesi olan tüm bileşikler ile RPL554 ile sinerjik bir etkileşimin beklenmesi mümkündür.

Tipik olarak, muskarinik reseptör antagonistleri atropin, metilatropin, homatropin, hiyosiyamin, skopolamin, ipratropium, oksitropium, tiotropium, metantelin, propantelin, anizotropin, klidinium, kopirolat (Robinul), izopropamid, mepenzolat, tridiheksetil, heksosiklium, siklopentolat, tropikamid, triheksifenidil, pirenzepin, telenzepin, AF-DX 116 ve metaktramin ve benzerleridir. Örnek olarak, muskarinik reseptör antagonistleri atropin, atropin sülfat, atropin oksit, metilatropin nitrat, homatropin hidrobromür, hiyosiyamin (d, 1) hidrobromür, skopolamin hidrobromür, ipratropium bromür, oksitropium bromür, tiotropium bromür, metantelin, propantelin bromür, anizotropin metil bromür, klidinyum bromür, kopirolat (Robinul) , izopropamid iyodür, mepenzolat bromür, tridiheksiletil klorür (Pathilone), heksosiklium metilsülfat, siklopentolat hidroklorür, tropikamid, triheksifenidil hidroklorür, pirenzepin, telenzepin, AF-DX 116 ve metaktramin veya benzerleridir. Muskarinik reseptör antagonistlerinin diğer karakteristik örneklerine aklidinyum (özellikle aklidinyum bromür) ve umeklidinyum (özellikle umeklidinyum bromür) dahildir.

Tipik olarak, muskarinik reseptör antagonistleri atropin, hiosin, glikopirolat (glikopironyum), ipratropyum, tiotropium, oksitropium, pirenzepin, telenzepin, aklidinyum veya umeclidinyum'dur. Tercih edilen şekliyle muskarinik reseptör antagonistleri atropin, hiosin, glikopirolat (glikopironyum), ipratropyum bromür, tiotropium bromür, oksitropium bromür, pirenzepin, telenzepin, aklidinyum veya umeclidinyum'dur. Alternatif olarak, muskarinik reseptör antagonistleri atropin, hiosin, glikopirolat, ipratropyum bromür, tiotropium bromür, oksitropium bromür, pirenzepin veya telenzepin'dir.

Daha tercih edileceği şekliyle, muskarinik reseptör antagonistleri atropin, ipratropyum bromür veya tiotropium bromür'dür.

En çok tercih edilebilir haliyle, muskarinik reseptör antagonistleri atropin veya glikopironyum'dur.

Muskarinik reseptör antagonistleri opsiyonel olarak rasematları, enantiyomerleri, diastereoizomerleri veya bunların karışımları ve opsiyonel olarak farmasötik olarak kabul edilebilir asit ilave tuzları formundadır. Muskarinik reseptör antagonistlerin ilave tuzlarının oluşumu için uygun asitlere tipik örnekler hidroklorik asit, hidrobromik asit, sülfürik asit, fosforik asit, metanosülfonik asit, asetik asit, fumarik asit, süksinik asit, maleik asit ve trifluoroasetik asittir. Dahası, bahsi geçen tuzların karışımları kullanılabilir.

10 Kompozisyonlar, kombinasyonlar, farmasötik kompozisyonlar ve formülasyonlar

Buluşun kompozisyonu (a) 9,10-Dimetoksi-2-(2,4,6-trimetilfenilimino)-3-(N-karbamoil-2-aminoetil)-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirimido[6,1-a]izokuinolin-4-on olan PDE3/PDE4 inhibitörü veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir asit ilave tuzunu ve (b) bir muskarinik reseptör antagonistini içerir.

15 Tipik olarak, buluşta yer alan kompozisyon bir sabit kombinasyondur. Bir sabit kombinasyonda, PDE3/PDE4 inhibitörü ve muskarinik reseptör antagonisti aynı kompozisyonun içinde yer alır. Sabit kombinasyon PDE3/PDE4 inhibitörü ve muskarinik reseptör antagonistinin eş zamanlı uygulanması için kullanılabilir. Tipik olarak sabit kombinasyon, bir kuru toz kompozisyonu (tercih edilen şekliyle bir kuru toz inhalerden veriliş için uygun), bir nebulizerden veriliş için uygun bir çözelti veya 20 bir basınçlı ölçülü doz inhalerden veriliş için uygun bir çözelti veya bir süspansiyondur.

Böylece, örnek olarak, sabit kombinasyon tercih edilen şekliyle PDE3/PDE4 inhibitörü ve muskarinik reseptör antagonistinin her ikisini birden içerir. Alternatif olarak, sabit kombinasyon PDE3/PDE4 inhibitörü ve muskarinik reseptör antagonistinin her ikisini birden içeren ve bir nebulizerden veriliş için uygun bir çözelti, tipik olarak ise bir sulu çözelti olabilir. Alternatif olarak, sabit kombinasyon PDE3/PDE4 inhibitörü ve muskarinik reseptör antagonistinin her ikisini birden içeren ve bir basınçlı ölçülü doz inhalerden veriliş için uygun bir çözelti veya bir süspansiyon 25 olabilir. 30

Bir sabit kombinasyondaki iki bileşen tipik olarak birlikte karıştırılmıştır.

Alternatif olarak, buluşta yer alan kompozisyon bir serbest kombinasyon olabilir. Bir serbest kombinasyonda, aktif bileşenler (a) ve (b) tipik olarak birbirlerinden ayrılırlar ve eş zamanlı, büyük ölçüde eş zamanlı, ayrı veya ardışık uygulama için bir ambalaj içinde ambalajlanabilirler.

- 5 Dahası tipik olarak, kompozisyon PDE3/PDE4 inhibitörü ve muskarinik reseptör antagonistine ilave olarak bir veya daha fazla farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcılar, seyrelticiler veya yardımcı maddeler içeren bir farmasötik kompozisyonudur. Eğer istenirse kompozisyonlar diğer terapötik ajanları ve/veya formülasyon ajanlarını içerebilirler. Diğer terapötik ajanın tercih edilen bir örneği  $\beta 2$
- 10 adrenerjik reseptör agonistidir.  $\beta 2$  adrenerjik reseptör agonistlerine örnek olarak salbutamol, albuterol, bitolterol, fenoterol, formoterol, indakaterol, isoetarin, levalbuterol, metaproterenol, pirbuterol, salmefamol, salmeterol ve terbutalin verilebilir.  $\beta 2$  adrenerjik reseptör agonistlerin tercih edilen örnekleri salbutamol, salmeterol, formoterol, albuterol ve pirbuterol'dür.
- 15 Mevcut buluşta yer alan kompozisyon bir hastaya tipik olarak bir farmasötik kompozisyon şeklinde uygulanır. Bu tarz farmasötik kompozisyonlar hastaya inhale, oral, nazal, topikal (transdermal dahil) ve parenteral uygulama yollarını içeren, fakat sadece bunlarla sınırlandırılmaz, herhangi bir kabul edilebilir uygulama yolu ile uygulanabilir. İnhalasyon yolu ile uygulama tercih edilir. Dahası, buluşta yer alan
- 20 kompozisyonlar örnek olarak oral olarak günde çoklu doz halinde, tek bir günlük doz halinde veya haftalık tek bir doz halinde uygulanabilir. Burada tartışılan farmasötik kompozisyonlarda, özel bir uygulama yolu için uygun buluşta yer alan kompozisyonda kullanılan aktif ajanların herhangi bir formunun (yani serbest baz, farmasötik olarak kabul edilebilir tuz, solvat, vb.) kullanılabileceği anlaşılabacaktır.
- 25 Buluşta yer alan farmasötik kompozisyonlar tipik olarak bir aktif ajanın terapötik olarak etkili bir miktarını içerir. Bununla birlikte alanında uzman bir kişiler bir farmasötik kompozisyonun terapötik olarak etkili miktarından daha fazlasını yani bulk kompozisyonlar içerebileceğini veya terapötik olarak etkili miktara ulaşmak üzere çoklu uygulama için terapötik olarak etkili miktarından daha az içerebileceğini yani
- 30 tek tek birim dozları içerebileceğini bilmektedirler. Bir yapılanmada, kompozisyon, formülasyonun kendisine, uygulama yoluna, dozlama sıklığına vb. bağlı olarak gerçek miktarlar ile yaklaşık ağırlıkça % 0.01-10 gibi, ağırlıkça yaklaşık % 0.01-30 aktif ajan dahil olmak üzere ağırlıkça yaklaşık % 0.01-95 aktif ajan içerecektir. Diğer

bir yapılanmada, inhalasyon için uygun olan bir kompozisyon, örnek olarak, ağırlıkça yaklaşık % 0.01-30 aktif ajan içerirken diğer bir yapılanmada ağırlıkça yaklaşık % 0.01-10 aktif ajan içerir.

Herhangi bir konvensiyonel taşıyıcı veya yardımcı madde buluşta yer alan kompozisyonlarda kullanılabilir. Özel bir taşıyıcı veya yardımcı madde veya taşıyıcı veya yardımcı maddelerin kombinasyonların seçimi belirli bir hastayı veya tıbbi durumu veya hastalık durumunu tedavi etmek için kullanılan uygulama yoluna bağlı olacaktır. Bu bağlamda, belirli bir uygulama yolu için uygun bir kompozisyonun hazırlanması farmasötik alanda uzman kişilerin alanı içindedir.

Ek olarak, bu tarz kompozisyonlarda kullanılan taşıyıcılar veya yardımcı maddeler ticari olarak erişilebilirdir. İlerleyen bölümlerdeki çizimler yoluyla, konvensiyonel formülasyon teknikleri Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition, Lippincott Williams & White, Baltimore, Md. (2000); ve H. C. Ansel et al., Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 10th Edition, Lippincott Williams & White, Baltimore, Md. (1999) kaynaklarında tanımlanmıştır.

Farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcılar olarak hizmet eden maddeleri temsilen şunlar verilebilir, fakat sadece bunlarla sınırlı değildir: laktoz, glukoz ve sükroz gibi şekerler; bir mısır nişastası ve patates nişastası gibi nişastalar; mikrokristal selüloz ve onun türevleri olan karboksimetil selüloz, etil selüloz ve selüloz asetat gibi selülozlar; toz kitre zıncısı; malt; jelatin; talk; kakao yağı veya supozituar mumları gibi yardımcı maddeler; fıstık yağı, pamuk tohumu yağı, aspir yağı, susam yağı, zeytin yağı, mısır yağı ve soya yağı gibi yağlar; propilen glikol gibi glikoller; gliserin, sorbitol, mannitol ve polietilen glikol gibi polioller; etil oleat ve etillaurat gibi esterler; agar; magnezyum hidroksit ve alüminyum hidroksit gibi tampon ajanları; aljinik asit; pirojen içermeyen su; izotonik tuzlu su; Ringer çözeltisi; etil alkol; fosfat tamponu çözeltileri; kloroforokarbonlar ve hidroflorokarbonlar gibi sıkıştırılmış itici gazlar; ve farmasötik kompozisyonlarda kullanıldıklarında toksik olmayan geçimli diğer maddelerdir. Farmasötik kompozisyonlar tipik olarak aktif ajan/aktif maddenin bir farmasötik olarak kabul edilebilir bir taşıyıcı veya ve bir veya daha fazla opsiyonel madde ile tamamen veya çok iyi karıştırılması veya harmanlanması ile hazırlanır. Elde edilen tekdüze bir şekilde harmanlanmış karışım daha sonra konvensiyonel prosedürler ve ekipmanlar kullanılarak tabletler, kapsüller, haplar, kutular, kartuşlar, dağıtıcılar vb. olarak şekillendirilebilir veya yüklenebilirler. Tipik olarak, farmasötik kompozisyonlar inhale

uygulama için uygundur. Farmasötik kompozisyon kuru toz inhaler (DPI) veya ölçülü doz inhaler (MDI) ile uygulanabilir.

Inhale uygulama için uygun kompozisyonlar tipik olarak bir aerosol veya bir toz, özellikle bir kuru toz kompozisyon formunda olacaktır. Bu tarz kompozisyonlar genel olarak bir nebulizer inhaler, bir kuru toz inhaler veya bir ölçülü doz inhaler gibi iyi bilinen cihazlar kullanılarak uygulanır, bunların örnekleri aşağıda tanımlanmıştır.

Alternatif olarak, aktif ajan(lar)/aktif madde(ler) içeren bir kompozisyon, bir nebulizer inhaler kullanılan inhalasyon ile uygulanabilir. Bu tarz nebulizer cihazlar tipik olarak kompozisyonun bir kişinin solunum yoluna taşınan bir gaz bulutu olarak spreylemesine neden olan yüksek hızlı bir hava akımı üretir. Buna göre, bir nebulizer inhaler içinde kullanılmak için formüle edildiğinde aktif ajan(lar)/aktif madde(ler), bir çözelti oluşturmak için tipik olarak uygun bir taşıyıcı içinde çözülür. Alternatif olarak, aktif ajan(lar)/aktif madde(ler) mikronize edilebilir ve solunum için uygun boyutta mikronize partiküllerin bir süspansiyonu oluşturmak için uygun bir taşıyıcı ile kombine edilebilir, burada mikronize tipik olarak partiküllerin en az yaklaşık % 90'ının 10 µm daha küçük çapta ortalama bir kütle çapına sahip olduğu partiküller olarak tanımlanmaktadır. "Kütle ortalama çapı" terimi partikül kütlelerinin yarısı daha büyük çaptaki partikülleri içerdiği ve yarısının ise daha küçük çaptaki partikülleri içerdiği çap anlamındadır.

Uygun nebulizer cihazlar RespimatRTM Soft Mist™ Inhaler (Boehringer Ingelheim), AERxRTM Pulmonary Delivery System (Aradigm Corp.), ve PARI LC Plus Reusable Nebulizer (Pari GmbH)'i kapsamaktadır. Bir nebulizer inhalerde kullanım için örnek olacak bir kompozisyon yaklaşık 0.05 µg/ml ile yaklaşık 10 mg/ml bir RPL554 içeren bir izotonik sulu çözelti içerir. Bir yapılanmada bu tarz bir çözelti yaklaşık 3.5-6 değerinde bir pH'ya sahiptir.

Alternatif olarak, aktif ajan(lar)/aktif madde(ler) içeren bir kompozisyon bir kuru toz inhaler (DPI) kullanılarak inhalasyon yolu ile uygulanabilir. Bu tarz DPI'lar tipik olarak aktif ajan nefes alma esnasında bir hastanın hava akımı içinde disperse olan serbest akan bir toz olarak uygulanır. Serbest akan bir toz elde etmek için aktif ajan(lar)/aktif madde(ler) tipik olarak laktoz, mannitol, dekstroz, polilaktik asit, polilaktit-ko-glikolid ve bunların kombinasyonları gibi uygun bir yardımcı madde ile formüle edilir. Tipik olarak, aktif ajan(lar)/aktif madde(ler) mikronize edilir ve inhalasyon için uygun bir

karışım elde etmek için bir yardımcı madde ile kombine edilir. Buna göre, buluşta yer alan bir yapılanmada aktif ajan(lar)/aktif madde(ler) mikronize formdadır. Örnek olarak, bir DPI'da kullanmak için örnek bir kompozisyon yaklaşık 1 µm ile yaklaşık 100 µm arasında bir partikül boyutuna sahip kuru laktoz (örneğin kuru öğütülmüş laktoz) ve mikronize partiküllere sahip aktif ajan içerir. Bu tarz bir kuru toz formülasyon örnek olarak laktoz ile aktif ajanın kombine edilmesi ve daha sonra bileşenleri kuru karıştırma ile yapılabilir. Alternatif olarak, eğer istenirse, aktif ajan bir yardımcı madde olmadan formüle edilir. Daha sonra kompozisyon tipik olarak bir DPI içine veya bir inhalasyon kartuşu veya bir DPI ile kullanmak için kapsüllere yüklenir.

DPI'lar alanında uzman kişilerce iyi bilinir ve bu tarz cihazların çoğunluğu ticari olarak temin edilebilir, örnek cihazlar şu şekildedir; Aerolizer<sup>RTM</sup> (Novartis), Airmax<sup>TM</sup> (IV AX), ClickHaler<sup>RTM</sup> (Innovata Biomed), Diskhaler<sup>RTM</sup> (GlaxoSmithKline), Diskus<sup>RTM</sup> veya Accuhaler (GlaxoSmithKline), Easyhaler<sup>RTM</sup> (Orion Pharma), Eclipse<sup>TM</sup> (Aventis), FlowCaps<sup>RTM</sup> (Hovione), Handihaler<sup>RTM</sup> (Boehringer Ingelheim), Pulvinal<sup>RTM</sup> (Chiesi), Rotahaler<sup>RTM</sup> (GlaxoSmithKline), SkyeHaler<sup>TM</sup> veya Certihaler<sup>TM</sup> (SkyePharma), Twisthaler (Schering-Plough), Turbuhale<sup>RTM</sup> (AstraZeneca), Ultrahale<sup>RTM</sup> (Aventis) ve benzerleri.

Alternatif olarak, aktif ajan içeren kompozisyon ölçülü doz inhaler (MDI) kullanılan inhalasyon ile uygulanabilir. Bu tarz MDI'lar tipik olarak basınçlı itici gaz kullanarak ölçülü bir miktarda aktif ajanı boşaltır. Böylece ölçülü doz formülasyonu tipik olarak kloroflorokarbon gibi, CChF gibi veya bir hidrofloroalkan (HFA) gibi 1,1,1,2-tetrafloroetan (HFA 134a) ve 1,1,1,2,3,3,3-heptafloro-n-propan (HF A 227) gibi bir sıvılaştırılabilir itici içinde aktif ajanın bir çözeltisi veya süspansiyonunu içerir, bununla birlikte kloroflorokarbonların ozon tabakasını etkiledikleri hakkındaki endişeler sebebiyle genellikle HFA'lar tercih edilir. HFA formülasyonlarının ilave opsiyonel bileşenleri etanol veya pentan gibi ko-solventleri ve sorbiton trioleati oleik asit, lesitin ve gliserin gibi sürfaktanları içerir. Bakınız, örnek olarak, U.S. Pat. No. 5,225,183 , Purewal et al., EP 0717987 A2 (Minnesota Mining and Manufacturing Company), ve WO 92/22286 (Minnesota Mining and Manufacturing Company). MDI içinde kullanılmak üzere örnek bir kompozisyon yaklaşık ağırlıkça % 0.01-5 aktif ajan; yaklaşık ağırlıkça % 0-20 etanol ve yaklaşık ağırlıkça 0-5 sürfaktan içerir, geri kalan kısmı bir HFA itici gaz olacaktır. Bu tarz kompozisyonlar tipik olarak aktif ajan, etanol (eğer varsa) ve sürfaktan (eğer varsa) içeren uygun bir taşıyıcı kaba soğutulmuş

veya basınçlandırılmış bir hidrofloroalkanın ilave edilmesi ile hazırlanır. Bir süspansiyon hazırlamak için, aktif ajan mikronize edilmeli ve daha sonra itici gaz ile kombine edilmelidir. Daha sonra formülasyon MDI'nın bir kısmından oluşan bir aerosol kutusuna yüklenir. MDI'lar alanında uzman kişiler tarafından iyi bilinirler ve bu tarz cihazların çoğu ticari olarak temin edilebilir, örnek cihazlar şu şekildedir; AeroBid Inhaler System (Forest Pharmaceuticals), Atrovent Inhalation Aerosol (Boehringer Ingelheim), Flovent<sup>RTM</sup> (GlaxoSmithKline), Maxair Inhaler (3M), Proventil<sup>RTM</sup> Inhaler (Schering), Serevent<sup>RTM</sup> Inhalation Aerosol (GlaxoSmithKline) ve benzerleri. Alternatif olarak, bir süspansiyon formülasyonu aktif ajan mikronize partikülleri üzerine bir sürfaktan kaplamasının püskürtülere kurutulması ile hazırlanabilir. Bakınız, örnek olarak, WO 99/53901 (Glaxo Group Ltd.) ve WO 00/61108 (Glaxo Group Ltd.).

Solunum için uygun partiküllerin hazırlama proseslerine ilave örnekler ve inhalasyon dozlama için uygun formülasyonlar ve cihazlar U.S. Pat. Nos. 5,874,063 , Briggner et al.; 5,983,956 , Trofast; 6,221,398 , Jakupovic et al.; 6,268,533 , Gao et al.; 6,475,524 , Bisrat et al.; ve 6,613,307 , Cooper patentlerinde tanımlanmıştır.

Alternatif olarak farmasötik kompozisyon oral uygulama için uygun olabilir. Oral uygulama için uygun formülasyonlar kapsüller, tabletler, pilüller, pastiller, kaşeler, drajeler, tozlar, granüller; solüsyonlar veya bir sulu veya sulu olmayan bir sıvı içindeki süspansiyonlar; su içinde yağ veya yağ içinde su sıvı emülsiyonlar; eliksirler veya şuruplar ve benzerleridir, her biri önceden belirlenmiş bir miktarda aktif ajan içerirler.

Bir katı dozaj formunda (yani, kapsüller, tabletler, pilüller ve benzerleri olarak) oral uygulama için tasarlandığında, kompozisyon tipik olarak aktif ajan ve sodyum sitrat veya dikalsiyum fosfat gibi bir veya daha fazla farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcılar içerecektir. Katı dozaj formlar ayrıca nişastalar, mikrokristal selüloz, laktoz, sükroz, glukoz, mannitol ve/veya silisik asit gibi dolgu maddeleri ve hacim arttırıcılar; karboksimetilselüloz, aljinatlar, jelatin, polivinilprolidon, sükroz ve/veya akasya gibi bağlayıcılar; gliserol gibi nem vericiler; agar-agar, kalsiyum karbonat, patates ve tapyoka nişastası, aljinik asit, bilinen silikatlar, ve/veya sodyum karbonat gibi dağıtıcı ajanlar; parafin gibi çözünme geciktirici ajanlar; kuaterner amonyum bileşikler gibi absorpsiyon arttırıcılar; setil alkol ve/veya gliserol monostearat gibi ıslatma ajanları; kaolin ve/veya bentonit kili gibi absorbantlar; talk, kalsiyum stearat, magnezyum stearat, katı polietilen glikoller, sodyum lauril sülfat ve/veya bunların karışımları gibi lubrikantlar; renklendirici ajanlar ve tampon ajanları içerir.



Farmasötik kompozisyonlarda ayrıca salım ajanları, ıslatıcı ajanlar, kaplama ajanları, tatlandırıcılar, lezzet verici ve koku verici ajanlar, koruyucular ve antioksidanlar da yer alabilir. Tabletler, kapsüller, pilüller ve benzerleri için örnek kaplama ajanları arasında selüloz asetat fitalat, polivinil asetat fitalat, hidroksipropil metilselüloz fitalat, metakrilik asit-metakrilik asit ester kopolimerler, selüloz asetat trimellitat, karboksimetil etil selüloz, hidroksipropil metil selüloz asetat süksinat ve benzerleri gibi enterik kaplama için kullanılanlar yer alır. farmasötik olarak kabul edilebilir antioksidan örnekleri arasında askorbik asit, sistein hidroklorür, sodyum bisülfat, sodyum metabisülfat sodyum sülfat ve benzerleri gibi suda çözünebilir antioksidanlar; askorbil palmitat, bütlat hidroksianizol, bütlat hidroksitoluen, lesitin, propil gallat, alfatokoferol ve benzerleri gibi yağda çözünen antioksidanlar ve sitrik asit, etilendiamin tetraasetik asit, sorbitol, tartarik asit, fosforik asit ve benzerleri gibi metal şelasyon ajanları yer alır.

Kompozisyonlar ayrıca, örnek olarak çeşitli oranlarda hidroksipropil metil selüloz veya diğer polimer matriksleri, lipozomlar ve/veya mikroküreler kullanılarak aktif ajanın yavaş veya kontrollü salınımının sağlanması için de formüle edilebilir. Ek olarak, buluşta yer alan farmasötik kompozisyonlar opaklaştırıcı ajan içerebilir ve bunlar aktif ajanı, sadece veya tercih edilen şekliyle, gastrointestinal kanalın belirli bir bölümünde, opsiyonel olarak geciktirilmiş bir şekilde salabilirler. Kullanılabilecek içine katma kompozisyonlarının örnekleri arasında polimerik maddeler ve mumlar da bulunmaktadır. Bu aktif ajanlar ayrıca, eğer uygun olursa, yukarıda tanımlanan bir veya daha fazla yardımcı madde ile mikroenkapsüle formda da bulunabilirler. Oral uygulama için uygun sıvı dozaj formları, örnek olarak, farmasötik olarak kabul edilebilir emülsiyonları, mikroemülsiyonları, çözeltileri, süspansiyonları, şurupları ve eliksirleri de içerebilirler. Likit oral dozaj formları tipik olarak aktif ajan ve örnek olarak su ve diğer solventler gibi inter seyrelticileri, etil alkol, izopropil alkol, etil karbonat, etil asetat, benzil alkol, benzil benzoat, propilen glikol, 1, 3-bütlen glikol, yağlar (pamuk tohumu yağı, yer fıstığı, mısır, tohum, zeytin, hint ve susam yağı), gliserol, tetrahidrofuril alkol, polietilen glikoller ve sorbitan doymuş yağ esterleri ve bunların karışımları gibi çözücü ajanları ve emülsifierleri içerir. Süspansiyonlar, örnek olarak, etoksillenmiş izostearil alkoller, polioksietilen sorbitol ve sorbitan esterleri, mikrokristal selüloz, alüminyum metahidroksit, bentonit, agar agar ve kitre gibi süspanse edici ajanları ve bunların karışımlarını içerir.

Oral uygulama amaçlandığında, buluşta yer alan farmasötik kompozisyonlar tekli bir dozaj formu içinde ambalajlanabilirler. "Tekli dozaj formu" terimi, yani her birim, tek başına veya bir veya daha fazla ilave birim ile kombinasyon halinde istenen terapötik etkiyi sağlamak için önceden belirlenmiş miktarda bir aktif ajan içeren, bir hastaya 5 doz uygulanması için uygun, fiziksel olarak ayrı bir birimi ifade eder.

Buluştta yer alan kompozisyon parenteral olarak da (örneğin subkütan, intravenöz, intramüsküler veya intraperitoneal enjeksiyon) uygulanabilir. Bu tarz bir uygulama için, aktif ajan bir steril çözelti, süspansiyon veya emülsiyon içinde sağlanır. Bu tarz formülasyonları hazırlamak için kullanılan solventlere örnek olarak su, salin, propilen 10 glikol, polietilen glikol gibi düşük molekül ağırlıklı alkoller, yağlar, jelatin, etil oleat gibi doymuş yağ esterleri ve benzerleri verilebilir. Tipik bir parenteral formülasyon bir steril pH 4-7 aktif ajanın sulu çözeltisidir. Parenteral formülasyonlar ayrıca bir veya daha fazla çözücüler, stabilizerler, koruyucular, ıslatma ajanları, emülsifierler ve dağıtıcı ajanları da içerebilir. Bu formülasyonlar steril enjektabl bir ortam, sterilize 15 edici bir ajan, filtrasyon, ışın veya ısı kullanılarak steril hale getirilebilir.

Buluştta yer alan kompozisyonlar bilinen transdermal veriliş sistemleri ve yardımcı maddeleri kullanılarak transdermal olarak da uygulanabilirler. Örnek olarak, aktif ajan propilen glikol, polietilen glikol monolaurat, azasikloalkan-2-on ve benzerleri gibi permeasyon artırıcı ajanlar ile karıştırılarak ve bir patch (yama) veya benzer veriliş 20 sistemleri içine dahil (inkopore) edilebilir. Eğer istenirse, bu tarz transdermal kompozisyonlarda jelleşme ajanları, emülsifierler ve tamponların dahil olduğu ilave yardımcı maddeler kullanılabilir.

RPL554 ile ikinci bir ajanın kombine edilmesi ile çift terapi, yani, bazı durumlarda iki kompozisyonun uygulanması ile ve bazı durumlarda aktif ajan ve sekonder ajan 25 içeren bir tekli kompozisyonun uygulanması ile PDE3/PDE4 inhibisyon aktivitesi ve sekonder ajan (muskarinik reseptör aktivitesi) ile ilgili aktivite başarılabılır. Kombinasyon tedavisinde, uygulanan RPL554 miktarı, aynı zamanda sekonder ajanların miktarı, tipik olarak monoterapide uygulanan miktardan daha az olabilir.

Buluştta yer alan kompozisyonlar bilinen transdermal veriliş sistemleri ve yardımcı 30 maddeleri kullanılarak transdermal olarak da uygulanabilirler. Örnek olarak, aktif ajan propilen glikol, polietilen glikol monolaurat, azasikloalkan-2-on ve benzerleri gibi permeasyon artırıcı ajanlar ile karıştırılarak ve bir patch (yama) veya benzer veriliş

sistemleri içine dahil (inkopore) edilebilir. Eğer istenirse, bu tarz transdermal kompozisyonlarda jelleşme ajanları ve tamponların dahil olduğu ilave yardımcı maddeler kullanılabilir.

RPL554 ile ikinci bir ajanın kombine edilmesi ile çift terapi, yani, bazı durumlarda iki kompozisyonun uygulanması ile ve bazı durumlarda aktif ajan ve sekonder ajan içeren bir tekli kompozisyonun uygulanması ile PDE3/PDE4 inhibisyon aktivitesi ve sekonder ajan (muskarinik reseptör aktivitesi) ile ilgili aktivite başarılabılır. Kombinasyon tedavisinde, uygulanan RPL554 miktarı, aynı zamanda sekonder ajanların miktarı, tipik olarak monoterapide uygulanan miktardan daha az olabilir.

RPL554, ya her iki ajanı da içeren bir kompozisyon oluşturmak için ikinci bir aktif ajan (muskarinik reseptör antagonisti) ile fiziksel olarak karıştırılabilir ya da her ajan, hastaya eş zamanlı veya sırayla uygulanan ayrı ve farklı kompozisyonlarda yer alabilir. Örnek olarak, RPL554, RPL554 ve ikinci bir aktif ajan içeren aktif ajanların bir kombinasyonunu oluşturmak için konvensiyonel prosedürler ve ekipmanlar kullanarak ikinci bir aktif ajan ile kombine edilebilir. Ek olarak, aktif ajanlar RPL554, ikinci bir aktif ajan ve farmasötik olarak kabul edilebilir bir taşıyıcı içeren bir farmasötik kompozisyon oluşturmak için farmasötik olarak uygun bir taşıyıcı ile kombine edilebilir. Bu yapılanmada, kompozisyonun bileşenleri bir fiziksel karışım oluşturmak için tipik olarak karıştırılabilir veya harmanlanabilir. Daha sonra fiziksel karışım, burada tanımlanan yolların herhangi biri kullanılarak terapötik olarak etkili bir miktarda uygulanır.

Alternatif olarak, aktif ajanlar hastaya uygulanmadan önce ayrı ve farklı kalabilirler. Bu yapılanmada, aktif ajanlar uygulamadan önce fiziksel olarak birlikte karıştırılmazlar, fakat farklı kombinasyonlar halinde aynı anda veya farklı zamanlarda uygulanabilirler. Bu tarz kombinasyonlar ayrı olarak ambalajlanabilir veya bir kit içinde birlikte ambalajlanabilir. Ayrı bir zamanda uygulandığında ikinci ajan tipik olarak RPL554'ün uygulanmasından sonra 24 saatten daha az bir süre sonra uygulanacaktır. Diğer yapılanmalarda bu zamanlı ilişki 12 saatten az, 8 saatten az, 6 saatten az, 4 saatten az, 3 saatten az, 1 saatten az, otuz dakikadan az, on dakikadan az, bir dakikadan az bir süre sonra veya RPL554 uygulamasından hemen sonra şeklindedir. Bu ayrıca ardışık uygulama olarak da adlandırılır. Dolayısıyla, RPL554 inhalasyon yolu ile ayrı bölmeleri (örneğin blister ambalaj) kullanan bir inhalasyon veriliş cihazı kullanılarak diğer bir aktif ajan ile eş zamanlı olarak veya ardışık olarak

uygulanabilir, burada ardışık terimi, RPL554 uygulamasından hemen sonra veya önceden belirlenmiş bir zaman sonra (örneğin bir saat sonra veya 3 saat sonra) uygulanması anlamına gelebilir. Alternatif olarak, kombinasyon ayrı verilmiş cihazları yani her ajan için bir cihaz kullanılarak verilebilir. Ek olarak ajanlar farklı uygulama yolları ile yani bir tanesi inhalasyon yolu ile verilirken diğeri oral uygulama ile verilebilir.

Tipik olarak kit, RPL554 içeren bir ilk dozaj formu ve burada ortaya konulduğu gibi buluşta yer alan yöntemlerin gerçekleştirilmesi için yeterli miktarlarda bir veya daha fazla ikincil ajan içeren en az bir ilave dozaj formu içerir. İlk dozaj formu ve ikinci (veya üçüncü, vs.) dozaj formu birlikte bir hastadaki bir hastalığı veya tıbbi durumu tedavi etmek veya önlemek için terapötik olarak etkili miktarlarda bir aktif ajan içerirler. İkincil ajanlar, dahil oldukları zaman, terapötik olarak etkili miktarlarda yani tipik olarak RPL554 ile aynı anda uygulandıklarında terapötik olarak bir yarar sağlayan bir miktarda uygulanırlar. İkinci ajanlar farmasötik olarak kabul edilebilir bir ilave asit, solvat, optik olarak saf stereoizomer ve benzeri bir formda olabilirler. Bu nedenle, aşağıda listelenen ikincil ajanların, bu gibi formların tümünü içerdiği düşünülmektedir ve ticari olarak temin edilebilir veya konvensiyonel prosedürler ve reaktifler kullanılarak hazırlanabilirler. İkincil bir ajan için uygun dozlar tipik olarak yaklaşık 0.05 µg/gün ila yaklaşık 500 mg/gün aralığındadır.

## Hastalıklar veya durumlar

Burada tanımlandığı gibi (a) bir PDE3/PDE4 inhibitörü ve (b) bir muskarinik reseptör antagonisti kombinasyonu ihtiyaç durumunda bir hastadaki (i) damarların veya bronşların akut veya kronik obstrüksiyonu veya (ii) akut veya kronik inflamasyon bazlı bir hastalığın veya durumun tedavisi için uygundur.

## Tipik olarak hastalık veya durumun şunlardan seçilir:

1. Respiratuvar kanal: hava yollarının obstrüktif hastalıkları: bronşiyal, alerjik, intrinsik, ekstrinsik, egzersiz indüklü, ilaç indüklü (aspirin ve NSAİİ indüklü olanlar dahil) ve toz indüklü astımı içeren astım, tüm şiddetlerdeki hem aralıklı hem kalıcı ve tüm şiddetlerde, ve hava yolu aşırı duyarlılığın diğer sebepleri; kronik obstrüktif pulmoner hastalığı (COPD); enfeksiyöz ve eosinofilik bronşitin dahil olduğu bronşit; amfizem; bronşektazi; kistik fibrozis; sarkoidozis; çiftçi akciğer ve ilgili hastalıklar; hipersensitivite pnömonisi; kriptojenik fibroz alveolit, idiyopatik intersitisyel pnömoni,

antineoplastik tedaviyi komplike hale getiren fibrozis ve tüberküloz aspergillozis ve diğer akciğer enfeksiyonlarını içeren akciğer fibrozisi; akciğer transplantasyonunun komplikasyonları; akciğer vaskülatürünün vaskülitik ve trombotik hastalıkları ve pulmoner hipertansiyon; hava yolunun inflamatuvar ve sekretuvar durumları ile ilgili kronik öksürük, ve iyatrojenik öksürük; rinit medikamentosa dahil akut ve kronik rinit ve vazomotor rinit; rinit nervosayı (bahar nezlesi) içeren pereniyal ve sezonsal alerjik rinit; nazal polipler; genel soğuk algınlığını içeren akut viral enfeksiyon ve respiratuvar sinsitiyal virüs, influenza, koronavirüs (SARS dahil) ve adenovirüs sebebiyle oluşan enfeksiyon;

2. Kemik ve eklemler: örnek olarak konjenital kalça displazisine, hem birincil hem de ikincil osteoartrit/osteoartroz ile ilgili veya bunları içeren artritler; servikal ve lomber spondilit ve bel ve boyun ağrısı; romatoid artrit ve Still hastalığı; ankilozan spondilit, psoriatik artrit, reaktif artrit ve belirgin olmayan spondartropati dahil seronegatif spondiloartropatiler; septik artrit ve diğer enfeksiyon ile ilgili artropatiler ve Potts hastalığı ve Poncet sendromunu içeren tüberküloz gibi kemik bozuklukları; ürat gut, kalsiyum pirofosfat depozisyonu hastalığı ve kalsiyum apatit ile ilgili tendon, bursal ve sinovyal enflamasyonu içeren akut ve kronik kristal indüklü sinovit; Behçet hastalığı; primer ve sekonder Sjogren sendromu; sistemik skleroz ve sınırlı skleroderma; sistemik lupus eritematosus, karışık bağ dokusu hastalığı ve farklılaşmamış bağ dokusu hastalığı; dermatomiyozitler ve polimiyozit dahil olmak üzere iltihaplı miyopatiler; polimarjik romatika; eklem dağılımı ve ilişkili sendromlar ne olursa olsun idiyopatik inflamatuvar artritleri, romatizmal ateş ve sistemik komplikasyonları da içeren juvenil artrit; dev hücreli arterit, Takayasu arteriti, Churg-Strauss sendromu, poliarteritis nodoza, mikroskopik poliarterit ve viral enfeksiyona bağlı vaskülitidler, hipersensitivite reaksiyonları, kriyoglobülinler ve paraproteinler de dahil olmak üzere vaskülitler; bel ağrısı; Ailevi Akdeniz ateşi, Muckle-Wells sendromu ve Ailevi Hibernian Ateşi, Kikuchi hastalığı; ilaç indüklü artanjiler, tendonitiditler ve miyopatiler;

3. Yaralanma (örnek olarak spor yaralanmaları) veya hastalık sebebiyle meydana gelen kas iskelet hastalıklarının ağrı ve bağ dokusunun yeniden oluşumu: artritler (örnek olarak romatoid artrit, osteoartrit, gut veya kristal artropati), diğer eklem hastalıkları (intervertebral disk dejenerasyonu veya temporomandibular eklem dejenerasyonu gibi), kemik yenileme hastalığı (osteoporoz, Paget hastalığı veya

osteonekroz gibi), polikondritler, skleroderma, karışık bağ dokusu bozukluğu, spondiloartropati veya periodontal hastalık (periodontit gibi);

4. Deri: psoriasis, atopik dermatit, kontakt dermatit veya diğer egzamatöz dermatozlar ve gecikmiş tip hipersensitivite reaksiyonları; fito ve fotodermatit; 5 seboreik dermatit, dermatit herpetiformis, liken planus, liken sklerozus et atropika, pioderma gangrenozum, cilt sarkoidleri, diskoit lupus eritematozus, pemfigus, pemfigoid, epidermoliz bullosa, ürtiker, anjiyoödem, vaskülitler, toksik eritemler, kutanöz, eozinofiller, alopesi areata, erkek tipi kellik, Sweet sendromu, Weber-Christian sendromu, eritema multiforme; hem enfektif hem de enfektif olmayan 10 selülit; panikülit; kutanöz lenfomalar, melanom olmayan cilt kanseri ve diğer displastik lezyonlar; sabit ilaç erüpsiyonu da dahil olmak üzere ilaç indüklü bozukluklar;

5. Gözler: blefarit; konjenitalit, kalıcı ve vernal alerjik konjunktivit; iritis; anterior ve posterior üveit; koroidit; otoimmün; retinayı etkileyen dejeneratif veya inflamatuvar bozukluklar; sempatik oftalmik dahil oftalmidler; sarkoidoz; viral, fungal ve bakteriyel 15 olanlar dahil enfeksiyonlar;

6. Gastrointestinal kanal: glossit, gingivit (diş eti iltihabı), periodontitis; reflü de dahil olmak üzere özofajit; eozinofilik gastroenterit, mastositoz, Crohn hastalığı, ülseratif kolit de dahil olmak üzere kolit, proktit, pruritis ani; çölyak hastalığı, irritabl bağırsak sendromu ve bağırsaktan uzak etkilere sahip olabilen besin alerjileri 20 (örneğin migren, rinit veya egzama);

7. Abdominal: otoimmün, alkolik ve viral dahil hepatit; karaciğer fibrozu ve sirozu; kolesistit; hem akut hem de kronik pankreatit;

8. Genitoüriner: interstisyel ve glomerülonefrit dahil nefrit; nefrotik sendrom; Akut ve kronik (interstisyel) sistit ve Runner ülseri dahil sistit; akut ve kronik üretrit, 25 prostatit, epididimit, ooforit ve salpinjit; vulvo-vajinit; Peyronie hastalığı; erektil disfonksiyon (hem erkek hem de kadın);

9. Allograft ret: akut ve kronik, örneğin böbrek, kalp, karaciğer, akciğer, kemik iliği, deri veya kornea nakli veya kan nakli sonrasında; veya konakçı hastalığına karşı kronik graft;

30 10. Santral sinir sistemi: Alzheimer hastalığı ve CJD ve nvCJD dahil olmak üzere diğer demans bozuklukları; amiloidoz; multipl skleroz ve diğer demiyelinizan sendromlar; serebral ateroskleroz ve vaskülit; temporal arterit; miyastenia gravis;

viseral ağrı, baş ağrısı, migren, trigeminal nevralji, atipik yüz ağrısı, eklem ve kemik ağrısı, kanser ve tümör invazyonundan kaynaklanan ağrı, diyabetik, post-herpetik ve HIV ile bağlantılı nöropatiler dahil nöropatik ağrı dahil olmak üzere akut ve kronik ağrı (akut, aralıklı veya kalıcı, santral veya periferik orijinli); nörosarkoidoz; malignant, enfeksiyöz veya otoimmün süreçlerin santral ve periferik sinir sistemi komplikasyonları;

11. Hashimoto tiroiditi, Graves hastalığı, Addison hastalığı, diabetes mellitus, idiyopatik trombositopenik purpura, eozinofilik fasiit, hiper IgE sendromu, antifosfolipid sendromu dahil olmak üzere diğer oto-immün ve alerjik bozukluklar;

12. Edinilmiş immün yetmezlik sendromu (AIDS), leprosi, Sezary sendromu ve paraneoplastik sendromlar dahil olmak üzere enflamatuvar veya immünolojik bir bileşen ile diğer bozukluklar;

13. Kardiyovasküler: koroner ve periferik dolaşımı etkileyen ateroskleroz; perikardit; miyokardit, miyokardiyal sarkoid dahil inflamatuvar ve oto-immün kardiyomiyopatiler; iskemik reperfüzyon yaralanmaları; endokardit, valvülit ve enfektif (örneğin sifilitik) dahil aortit; vaskülit; derin ven trombozu ve varikoz damarlarının komplikasyonlarını içeren flebit ve tromboz da dahil olmak üzere proksimal ve periferik damar bozuklukları;

14. Onkoloji: prostat, meme, akciğer, yumurtalık, pankreas, bağırsak ve kolon, mide, deri ve beyin tümörleri ile kemik iliği (lösemiler dahil) etkileyen maligniteler ve Hodgkin ve non-Hodgkin lenfoma gibi lenfoproliferatif sistemler dahil olmak üzere yaygın kanserlerin tedavisi; metastatik hastalığın ve tümör rekürrenslerinin önlenmesi ve tedavisi ve paraneoplastik sendromlar; ve,

15. Gastrointestinal kanal: Çölyak hastalığı, proktit, eozinofilik gastroenterit, mastositoz, Crohn hastalığı, ülseratif kolit, mikroskopik kolit, nedeni belli olmayan kolit, irritabl bağırsak hastalığı, irritabl bağırsak sendromu, inflamatuvar olmayan diyare, bağırsaktan uzak etkilere sahip besin alerjileri, migren, rinit ve egzama.

Tercih edilen şekliyle hastalık veya durum astım, alerjik astım, saman nezlesi, alerjik rinit, bronşit, amfizem, bronşiektazi, kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH), erişkin solunum sıkıntısı sendromu (ARDS), steroid dirençli astım, şiddetli astım, pediatrik astım, akciğer fibrozu, pulmoner fibrozis, interstisyel akciğer hastalığı, cilt

bozuklukları, atopik dermatit, psoriasis, oküler inflamasyon, serebral iskemi veya otoimmün hastalıklardır.

Daha tercih edilen şekliyle edilen şekliyle, hastalık veya durum, astım veya kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) 'dir.

- 5 Tedavi edilen hasta tipik olarak bir insandır.

Tipik olarak bileşenler (a) ve (b) birlikte uygulanır. Tercih edilen şekliyle aktif bileşen (a) ve (b) tek bir dozaj formu içindedir.

Alternatif olarak, aktif bileşenler (a) ve (b) ayrı olarak uygulanabilir. Burada aktif her bir aktif bileşen (a) ve (b) uygulanması arasında bir zaman gecikmesi olabilir.

- 10 Aktif bileşenler (a) ve (b) inhalasyon yoluyla uygulanabilir. Aktif bileşenler (a) ve (b) aerosol ile uygulanabilirler.

Doz başına uygulanan aktif ajan miktarı veya günlük uygulanan toplam miktar önceden belirlenebilir veya hastanın durumunun doğası ve ciddiyeti, tedavi edilen durum, hastanın yaşı, ağırlığı ve genel sağlığı, hastanın aktif ajana toleransı,

- 15 uygulama yolu, aktivite, etkinlik, farmakokinetik ve toksikolojik profiller gibi aktif ajanın ve uygulanan herhangi bir ikincil maddenin farmakolojik değerlendirmeleri , ve benzeri durumları içeren bir çok faktör göz önüne alınarak bireysel hasta bazında belirlenebilir. Bir hastalıktan veya tıbbi durumdan (KOAH gibi) muzdarip bir hastanın

- 20 tedavisine önceden belirlenmiş bir doz ile veya tedavi eden doktor tarafından belirlenen bir doz ile başlanabilir ve hastalığın veya tıbbi durumun semptomlarını önlemek, iyileştirmek, bastırmak veya hafifletmek için gerekli olan bir zaman süresince devam edilecektir. Böyle bir tedavi uygulanan hastalar tipik olarak

- tedavinin etkinliğinin saptanması için rutin olarak izlenir. Örnek olarak, KOAH tedavisinde, zorlanmış ekspiratuvar hacimde (bir saniyede ölçülmüş) belirgin

- 25 düzelme, tedavinin etkililiğini belirlemek için kullanılabilir. Burada tarif edilen diğer hastalıklar ve durumlar için benzer indikatörler, alanında uzman kişilerce iyi bilinir ve tedaviyi yürüten doktor tarafından kolayca elde edilebilir. Doktor tarafından sürekli

- olarak izlenmesi, optimal süre aktif maddenin optimum miktarının herhangi bir zamanda verileceğini ve ayrıca tedavi süresinin belirlenmesini kolaylaştırmayı

- 30 sağlayacaktır. İkincil ajanlar da uygulandığında, bunların seçimini, dozajı ve terapi süresinin ayarlanmasını gerektirebileceği için bu özellikle önemlidir. Bu şekilde, tedavi rejimi ve doz çizelgesi, tedavi boyunca ayarlanabilir; böylece, istenen etkinliği



sergileyen en düşük aktif ajan miktarının uygulanır ve ayrıca, uygulamanın hastalık veya tıbbi durumun başarıyla tedavi edilmesi için gerekli olduğu sürece devam etmesi sağlanır. Buna göre, bir yapılanmada buluşta yer alan kompozisyonlar, insanlar ve onlarla birlikte yaşayan hayvanlar da (örneğin, köpekler, kediler, vb.) dahil olmak üzere memelilerde düz kas bozukluklarının tedavisinde faydalıdır. Bazı düz kas hastalıkları, örnek olarak, aktif mesane, kronik obstrüktif pulmoner hastalığı ve irritabl bağırsak sendromunu içerir. Tipik olarak, düz kası bozukluklarının veya muskarinik reseptörlerin aracılık ettiği diğer bozuklukların tedavisi için uygun dozlar, yaklaşık 0.15 µg/kg/gün ila 5 mg/kg/gün dahil yaklaşık 0.14 µg/kg/gün ila 7 mg/kg/gün aktif ajan aralığında değişecektir. Ortalama 70 kg'lık bir insan için, bu miktar yaklaşık 10 µg/gün ila 500 mg/gün aktif ajan olacaktır.

Tipik olarak, buluşta yer alan kompozisyonlar, insanların da dahil olduğu memelilerde, hastaya kompozisyonun terapötik olarak etkili bir miktarda uygulanması ile KOAH veya astım gibi pulmoner veya respiratuvar hastalıkları tedavi etmek için uygundur. Genel olarak bir pulmoner hastalığı tedavi etmek için doz yaklaşık 10-1500 µg/gün aralığında değişecektir. "KOAH" terimi alanında uzman kişiler tarafından kronik obstrüktif bronşit ve amfizemin de dahil olduğu çeşitli respiratuvar durumları içeren hastalıklar olarak anlaşılır, Barnes (2000) N. Engl. J. Med. 343:269-78'de ve burada yer alan referanslarda örnekler verilmiştir.

İnhalasyon ile uygulandığında, buluşta yer alan kompozisyonlar tipik olarak bronkodilatasyon oluşturma etkisine sahiptirler. Buna göre, yöntemin bir diğer bakış açısı itibarıyla buluş, bir hastaya bronkodilatasyon üreten bir miktarda buluşta yer alan bir kompozisyonun uygulanmasını içeren bir hastada bronkodilatasyon üretmeye yönelik bir yöntemdir. Genel olarak, bronkodilatasyon üretmek için terapötik olarak etkin doz yaklaşık 10-1500 µg/gün arasında değişecektir.

Alternatif olarak buluşta yer alan kompozisyon aktif mesane sendromunu tedavi etmek için kullanılabilir. Aktif mesane sendromunu tedavi etmek için kullanıldığında zaman, tipik bir doz yaklaşık 1.0-500 mg/gün aralığında değişecektir. Alternatif olarak, buluşta yer alan kompozisyon irritabl bağırsak sendromunu tedavi etmek için kullanılabilir. İrritabl bağırsak sendromunu tedavi etmek için kullanıldığında buluşta yer alan kompozisyon tipik olarak oral olarak veya rektal olarak uygulanacaktır ve tipik bir doz yaklaşık 1.0-500 mg/gün aralığında değişecektir.

Güvenilirlik çalışmalarını takiben buluşun bir bulgusu, RPL554'ün kan basıncına veya kalp atış hızına göre muskarinik reseptör antagonistleri (atropin gibi) ile advers olarak etkileşime girmemektedir. Benzer şekilde, muskarinik reseptör antagonistlerinin (atropin gibi) kardiyovasküler etkileri RPL554'den etkilenmez.

- 5 Aşağıdaki örnekler buluşu açıklamaktadır.

## ÖRNEKLER

### Örnek 1

#### Materyaller ve Metotlar

##### Dokuların hazırlanması

- 10 Makroskopik olarak normal akciğerlerin bölgeleri, akciğer kanseri için lobektomi cerrahisi uygulanan fakat kronik hava yolu hastalığı öyküsü olmayan 24 hastadan (11 erkek 13 kadın,  $60.1 \pm 1.6$  yaş) kesip çıkarılan temiz alanlardan alındı.

- Hava yolları hemen siklooksijenaz (COX) inhibitörü indometazin ( $5.0 \mu\text{m}$ ) içeren oksijene Krebs-Henseleit tampon çözeltisi (KH) içine yerleştirildi (mM: NaC 119.0, KCl 5.4,  $\text{CaCl}_2$  2.5,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.2,  $\text{MgSO}_4$  1.2,  $\text{NaHCO}_3$  25.0, glukoz 11.7; pH 7.4) ve 4°C'de "Regina Elena National Cancer Institute"den veya "Sant' Andrea Hospital"dan "Tor Vergata University" Cerrahi ve Tıp Fakültesi, Roma, İtalya'daki Solunum Araştırmaları Laboratuvarı'na ulaştırılmıştır. Hastaların hiçbirisi teofilin,  $\beta_2$ -agonistler veya glukokortikosteroidlerle kronik olarak tedavi edilmemiştir. Ameliyat 15 gününde saptanan serum IgE düzeyleri normal aralıkta bulunmuştur. Preoperatif akciğer fonksiyon parametreleri genellikle normal bulunmuş ve solunum yolu enfeksiyonu bulgusuna rastlanmamıştır.

- Laboratuvarda, bağ ve alveolar dokulardan havayolları ayrıldı. Daha sonra segmental bronşlar izole edilmiş ve soğutma sıcaklığında KH tampon solüsyonunda gece 25 boyunca saklandı. Ertesi sabah, bronşlar halkalar halinde ( $n = 120$ ; kalınlık: 1-2 mm; çap: 5-7 mm) kesildi ve KH tamponu ( $37^\circ\text{C}$ ) içeren 44 00 dört bölmeli 10 ml İzole Organ Banyoları'na (Ugo Basile, VA-İtalya) aktarıldı ve sürekli olarak % 95:5  $\text{O}_2/\text{CO}_2$  karışımı ile havalandırıldı.

##### İlaçların hazırlanması

- 30 Aşağıdaki ilaçlar kullanılmıştır: asetilkolin, histamin, atropin, papaverin ve indometasin. Tüm maddeler Sigma-Aldrich'den (St. Louis, ABD) elde edilmiştir.

İlaçlar, etanolde çözülmüş olan indometasin ve kinin hariç, distile suda çözülmüş ve daha sonra bir KH tamponu içinde seyreltilmiştir. Maksimum etanol miktarı (% 0.02) izole edilen doku cevaplarını etkilememiştir (Freas ve ark., 1989; Hatake ve Wakabayashi, 2000). RPL554 Verona Pharma PLC, Londra, İngiltere tarafından

5 sağlanmıştır. Bileşikler, kullanımlarına kadar -80°C'de küçük alikuatlar halinde saklanmıştır.

#### Gerilim ölçümleri

İnsan bronşları indometasin (5.0  $\mu$ M) ile ilaçlanan KH tampon solüsyonu (37°C) içeren, % 95 O<sub>2</sub>/% 5 CO<sub>2</sub> ile kabarcıklandırılmış ve pasif gerilim (0.5-1.0 g) altında

10 süspanse edilmiş organ banyolarına yerleştirilmiştir. Bronş halkaları, bir kancanın sabit bir çubuğa iplikle bağlandığı organ banyolarındaki kancalara monte edilmiş ve diğer kanca, izometrik kuvvet yer değiştirme dönüştürücüsüne iplikle bağlanmıştır. Havayolları, ilaçlı KH tampon çözeltisinin her 10 dakikada bir tekrarlanması ile 90 dakika boyunca dengelenmeye bırakılmıştır. İzometrik gerilimin değişimleri

15 dönüştürücü (Fort 10 WPI, Basile, Instruments, İtalya) ile ölçülmüş ve doku yanıt hızı asetilkolin (100  $\mu$ M) ile değerlendirilmiştir; tepki bir platoya ulaştığında, halkalar üç kez yıkanmış ve 45 dakika boyunca dengelenmeye bırakılmıştır.

#### Çalışma tasarımı

##### RPL554'ün elektriksel alan stimülasyonu üzerine etkisi

20 Her bir organ banyosu, elektriksel alan stimülasyonu (EFS) için dokuya (10 mm aralıkla) yerleştirilen iki platin plak elektrotu (1 cm<sup>2</sup>) ile donatılmıştır. Deneyler, 10 Hz EFS zincir (iki fazlı sinyal, sabit akım 10V, 0.5ms, 10 saniye), ilk saat 5 için her 5 dakikada bir tek darbe ve sonraki 5 saat boyunca 30 dakika aralıklarla 3165 çoklu sinyal güçlendiricisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Ugo Basile, VA- İtalya) (Binks et

25 al., 2001). EFS zincirlerinin başlangıcından sonra, dokular RPL554 (10 veya 100  $\mu$ M) ile elektrik alan stimülasyonuna (EFS) kasılma cevabının maksimum inhibisyonu elde edilinceye kadar inkübe edilmiştir. İlaç ile inkübasyon daha sonra sonlandırılmış ve dokular, 30 dakika süreyle tekrar tekrar yıkanmış ve daha sonra ilaç uygulamasından sonra 5 saate kadar her 30 dakikada bir yıkanmıştır.

##### 30 RPL554'ün pasif duyarlılaştırılmış bronş üzerindeki rahatlatıcı etkisi

İnsan izole bronş halkaları, başka yerde tarif edildiği gibi (Watson et al., 1997; Rabe, 1998), % 10 vol<sup>-1</sup> hassaslaştırıcı serum (hassaslaştırılmış halkalar) varlığında veya

yokluğunda (hassaslaşmamış kontrol halkaları) KH tampon çözeltisi içeren tüplerde oda sıcaklığında gece boyunca döndürülmüştür. Şiddetlenme sırasında atopik astımı (genel aeroalerjenlere karşı spesifik toplam IgE > 250 U ml<sup>-1</sup>) olan kişiler, serum bağıışı için imzalı onay vermişlerdir. Serum, tam kanın santrifüjüyle hazırlanmış ve  
 5 serum örnekleri, gerektiği kadar -80°C'de 200 ml'lik alikuatlar halinde dondurulmuştur.

Ertesi sabah, yapışan alveolar ve bağ dokularının çıkarılmasından sonra, bronş halkaları KH tamponu (37°C) içeren bir organ banyosuna aktarılmış ve sürekli olarak % 95 O<sub>2</sub>/ % 5 CO<sub>2</sub> ile gazlı hale getirilmiştir. Dokular, RPL554 (1, 10 ve 100 µM) ile 30  
 10 dakika önceden inkübe edildi ve sonra RPL554 varlığında histamin (10 nM - 1 mM) konsantrasyon yanıt eğrisi oluşturulmasıyla (yıkamadan) izlenmiştir.

RPL554 ve muskarinik reseptör antagonistinin sinerjik etkisi

Bir muskarinik reseptör antagonisti ile kombinasyon halindeki RPL554 tarafından indüklenen olası sinerjik relaksasyonu test etmek için, bronş halkaları % 70'lik bir  
 15 maksimum etkiye (EC70) neden olmak için gereken konsantrasyondaki asetilkolin ile kontrakte edilmiş ve 15 dakikalık stabilizasyon periyodu sağlanmıştır. Daha sonra tekli bileşik RPL554'ü ve muskarinik reseptör antagonistini tek başına test etmek için hem de başka yerlerde tarif edildiği gibi (Greco et al., 1995; Tallarida, 2001; Goldoni and Johansson, 2007; Boik et al., 2008; Lee, 2010) izobolar grafikler üretmek üzere  
 20 bir muskarinik reseptör antagonisti ile kombinasyon halinde uygulanan RPL554'ü test etmek için konsantrasyon cevap eğrileri oluşturulmuştur.

Bir sonraki konsantrasyonun uygulanmasından önce stabil bir relaksasyon seviyesine erişmek için ardışık konsantrasyonlar arasında 20 dakikalık aralıklar kullanılmıştır. Deneyin tamamlanmasından sonra, dokuları tamamen rahatlatmak ve her bir  
 25 dokunun gevşemesinin karşılaştırılabileceği bir standart sağlamak için papaverin (500 µM) eklenmiştir.

### Analiz sonuçları

#### EFS çalışmaları analizleri

EFS ile indüklenen bronş kontraktıl gerilimi kontrol bronşlarının bir yüzdesi olarak  
 30 ölçüldü ve başka yerde tarif edildiği gibi (Motulsky and Christopoulos, 2004) nonlinear regresyon kullanılarak biyolojik verilerin modellerine uyularak polinom eğrileri oluşturuldu. Maksimum etki (E<sub>max</sub>), EFS stimülasyonu ile indüklenen en

düşük kontraktıl güç olarak tanımlandı ve ofset ( $t_{1/2}$ , dak), maksimum relaksasyonun yarısını uyandırmak için gerekli olan zamanı belirtir. İzole edilmiş organ banyosu sistemine monte edilen her üç bronş halkası için, bunlardan biri başka yerde (Mercier et al., 2002) tarif edildiği gibi bir zaman kontrolü olarak kullanılmıştır.

##### 5 Konsantrasyon yanıt çalışmalarının analizi

Sigmoidal bir modele uygun, uygun eğri, etki (E),  $E_{max}$  ve % 50'lik maksimum etkiyi ( $EC_{50}$ ) sağlamak için gereken konsantrasyonu hesaplamak için kullanılmıştır. Kullanılan eşitlik cevaba karşı  $\log[agonist]$ , değişken eğim,  $Y=Bottom + (Top-Bottom)/(1+10^{[(\log EC_{50}-X)*HillSlope]})$  olarak tanımlanmıştır (Motulsky and Christopoulos, 2004; Goodman et al., 2008).  $E/E_{max}$ , kontraktıl ajanlar tarafından çıkarılan  $E_{max}$  yüzdesi olarak ifade edilmiştir; istatistiksel analiz için  $EC_{50}$  değerleri  $pD_2$ 'ye dönüştürülmüş (Goodman ve ark., 2008) ve gevşetici cevapları, papaverin (500  $\mu M$ ) ile indüklenen relaksasyon yüzdesi olarak ifade edilmiştir.

##### Sinerjizm çalışmalarının analizi

15 RPL554 ile muskarinik reseptör antagonisti arasındaki potansiyel sinerjizmin analizi, Berenbaum metodu, Bliss Bağımsızlık (BI) kriteri ve Loewe Aditivite (LA) modeli eğimli izoballer ile uygulanarak ölçülmüştür (Berenbaum, 1977; Greco et al., 1995; Grabovsky and Tallarida, 2004; Tallarida, 2006; Goldoni and Johansson, 2007; Tallarida and Raffa, 2010).

20 Berenbaum yöntemini uygulamak için,  $EC_{50}$  değerleri için Etkileşim İndeksi değerlendirildi ve bu nedenle, Etkileşim İndeksi  $<1$  ise, etki sinerjik olarak kabul edildi; Eğer Etkileşim İndeksi  $> 1$  ise, etki antagonistik olarak değerlendirildi ve Etkileşim İndeksi = 0 ise, etki aditif olarak değerlendirildi (Goldoni and Johansson, 2007; Lee, 2010).

25 İki ajan için BI teorisi aşağıdaki denklemle ifade edilir:  $E(x,y)= E_x+E_y(E_x*E_y)$ , burada E fraksiyonel etkidir ve x ve y, bir kombinasyon deneyinde iki bileşiğin konsantrasyonudur. Eğer kombinasyon etkisi yukarıdaki denklemden beklenen değerden yüksekse, etkileşim sinerjik olarak kabul edilir; bu etki daha düşük ise, etkileşim antagonistiktir. Aksi takdirde, etki aditiftir ve hiçbir etkileşim yoktur (Greco et al., 1995; Meletiadis et al., 2003; Boucher and Tam, 2006; Goldoni and Johansson, 2007; Boik et al., 2008; Lee, 2010). Bu çalışmada BI eşitliği  $X = RPL554$  ve  $Y =$   
30 muskarinik reseptör antagonisti ile karakterize edilmiştir.

Atrofin ve RPL554 için her bir akciğere ait bronştan gelen kontrol konsantrasyon cevap eğrileri, Emax, eğim (nH) ve potens (EC50) parametre tahminlerini hesaplamak için 4 parametrelili bir lojistik denkleme oturtulmuştur. Atropin (sırasıyla  $66 \pm 14$ ,  $0.912 \pm 0.488$ ,  $1.181$  ( $0.134-10.4$ )  $\mu\text{M}$ ,  $n = 5$ ) ve RPL554 (sırasıyla  $100 \pm 0$ ,  $2.271 \pm 0.713$ ,  $21.2$  ( $11.5- 39.1$ )  $\mu\text{M}$ ,  $n = 5$ ,) için aşağıdaki parametre tahminleri Emax ve nH (ortalama  $\pm$  SD) ve EC50 (geometrik ortalama % 95 CI) sinerjizmi değerlendirmek için her bir ilaç çifti kombinasyonunun katkı tepkisini hesaplamak için kullanılmıştır (Tallarida and Raffa 2010)(Grabovsky and Tallarida 2004). Doz eşdeğerliği kavramını kullanarak,  $a/A + b/B = 1$  ilişkisi  $b + \text{beq}(a) = B$  olarak yeniden formüle edilmiş, burada beq a'nın doz eşdeğerliğidir ve iki ayrı konsantrasyon cevap eğrisinin  $E_A = (fA)$  and  $E_B = (fB)$  eşitlenmesiyle  $b + \text{beq}(a)$  için çözülür. Daha sonra B'ye göre her bir doz kombinasyonu için aditif cevap ( $E_{ab}$ ) B'nin  $E_B = (fB)$  içine eklenmesiyle hesaplanmıştır. Kombinasyon dozlara karşı gözlemlenen relaksiyon cevabı ile aditif cevap arasındaki fark, bir tek örnek t-testi kullanılarak çoklu karşılaştırmalar için hesaplanmış ve olasılık, çoklu karşılaştırmalar için Bonferroni düzeltmesi kullanılarak ayarlanmıştır. Örnek amaçlı olarak, 1:1 doz kombinasyonları sinerji için analiz edilmiştir.

#### İstatistiksel analiz

Bütün değerler her tedavi grubu için ortalama  $\pm$  SEM olarak gösterilmiştir. İstatistiksel anlamlılık Student's t testi veya varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilmiş ve istatistiksel anlamlılık seviyesi  $P < 0.05$  olarak tanımlanmıştır (Motulsky, 1995). Tüm veriler bilgisayar yazılımları kullanılarak gerçekleştirilmiştir (GraphPad Prism, San Diego California USA; Microsoft Excel, Redmond Washington USA).

Atropin (bir muskarinik reseptör antagonisti) ile birlikte uygulanan RPL554'ün sinerjik etkisi

Atropin ile kombinasyon halinde uygulanan RPL554 ile indüklenen sinerjik relaksiyonu test etmek için, bronş halkaları% 70'lik bir maksimum etkiyi (EC70) sağlamak için gereken konsantrasyonda asetilkolin ile kontrakte edilmiş ve 15 dakika stabilizasyon periyoduna bırakılmıştır. Daha sonra, tekli bileşik RPL554 veya tek başına atropin veya başka yerlerde tarif edildiği şekilde (Greco et al., 1995; Tallarida, 2001; Goldoni and Johansson, 2007; Boik et al., 2008; Lee, 2010) izoboler grafikler (atropin:RPL554 ve 10:1 ila 1:100 arasında değişen) meydana getirmek için atropin

ile kombinasyon halinde uygulanan RPL554 testi için konsantrasyon cevap eğrileri oluşturulmuştur.

Bir sonraki konsantrasyonun uygulanmasından önce stabil bir relaksasyon seviyesine erişmek için ardışık konsantrasyonlar arasında 20 dakikalık aralıklar kullanılmıştır.

- 5 Deneyin tamamlanmasından sonra, dokuları tamamen rahatlamak ve her dokunun relaksasyonunun karşılaştırılabileceği bir standart sağlamak için papaverin (500 µM) ilave edilmiştir.

### Sonuçlar

#### Bronş halkalarının temel karakteristikleri

- 10 Çalışmada kullanılan ıslak ağırlık ( $220.5 \pm 16.5$ mg), asetilkolin ( $100 \mu\text{M}$ ) ( $440 \pm 95$  mg) tarafından indüklenen kasılma ve ilaçlarla ( $445 \pm 98$  mg) tedaviden önce EFS (10Hz) ile indüklenen kasılma ile ilgili insan izole bronş halkalarının temel karakteristikleri arasında anlamlı bir farklılık ( $P>0.05$ ) yoktur.

- 15 On deneylerde, sonraki çalışmalar için bir alt maksimal cevap (yaklaşık % 70 maksimum cevap;  $1250 \pm 190$  mg;  $n=5$ ) oluşturmak için bir asetilkolin konsantrasyon cevap eğrisi (1 nM'den 1 mM'ye) oluşturulmuştur.

#### RPL554'ün izole edilmiş insan hava yollarının bronşiyal ton üzerindeki etkileri

- 20 RPL554, bu ilaca maruz kaldıktan sonra en az 5 saat süreyle muhafaza edilen insan bronşiyal dokularının EFS'si tarafından indüklenen kontraktıl cevabı inhibe etmiştir (Şekil 1). RPL554, bu kontraktıl cevapları maksimum  $100 \mu\text{M}$  konsantrasyonda kaldırmıştır ( $E_{\text{max}} \% 91.33 \pm 3.37$ ;  $T_{1/2} 23.7 \pm 12.3$ min).

- 25 RPL554, asetilkolon ile önceden kontraksiyona uğramış insan izole bronşiyal dokuların konsantrasyona bağlı bir relaksasyonuna neden olmuştur. RPL554 bronşiyal relaksiyonda atropinden daha az potentsi ( $P < 0.05$ ), ancak atropinin aksine, RPL554 dokuları tamamen gevşetmiştir ( $P < 0.001$ ). Atropin ve RPL554 için her bir akciğere ait bronştan gelen kontrol konsantrasyon cevap eğrileri,  $E_{\text{max}}$ , eğim (nH) ve potens ( $EC_{50}$ ) parametre tahminlerini hesaplamak için 4 parametrelili bir lojistik denkleme oturtulmuştur. Aşağıdaki parametre, atropin ( $66 \pm 14$ ,  $0.912 \pm 0.488$ ,  $1.181$  ( $0.134 - 10.4$ )  $\mu\text{M}$ ,  $n = 5$ , sırasıyla) ve RPL554 ( $100 \pm 0$ ,  $2.271 \pm 0.713$ ,  $21.2$  ( $11.5 - 39.1$ )  $\mu\text{M}$ ,  $n = 5$ , sırasıyla) için  $E_{\text{max}}$  ve nH (ortalama  $\pm$  SD) ve  $EC_{50}$  (geometrik ortalama, % 95 CI) hesaplar (Şekil 2).
- 30

Bronşun pasif duyarlılığı, duyarlı olmayan dokularla karşılaştırıldığında histaminin kontraktıl etkisini arttırmıştır. Pasif olarak duyarlılaştırılmış bronşlarda, 1 ve 10 µM'de RPL554, konsantrasyon cevap eğrisini, işlenmemiş dokulara kıyasla, histamine doğru sola kaydırmış ve RPL554 100 µM'de histamin ile indüklenen kontraksiyonu tamamen kaldırmıştır (Şekil 3, Tablo 1).

**Tablo 1.** Pasif olarak duyarlılaştırılmış bronşlarda histamin ile indüklenen kontraksiyon üzerine RPL554 etkisi. Gösterilen veriler, n=5 farklı denekten alınan örneklerle yapılan deneylerden elde edilmiştir ve bunlar, ortalama ± SEM \*\*\*P<0.001 ile pasif olarak duyarlılaştırılmış kontrol olarak gösterilmektedir.

|       |                      | Pasif olarak duyarlılaştırılmış |                 |                |               |
|-------|----------------------|---------------------------------|-----------------|----------------|---------------|
|       | Duyarlılaştırılmamış | Kontrol                         | RPL554 1 µM     | RPL554 10 µM   | RPL554 100 µM |
| Emaks | 100.7 ± 1.7          | 101.8 ± 1.4                     | 70.3 ± 2.7 ***  | 58.1 ± 2.2 *** | nd            |
| pD2   | 4.82 ± 0.03***       | 5.29 ± 0.03                     | 4.97 ± 0.07 *** | 4.98 ± 0.07*** | nd            |

RPL554 ve atropinin insan bronşiyal ton üzerindeki sinerjik gevşetici etkisi

RPL554 ve atropinin etkileşimi, 1nM ila 10µM konsantrasyon aralığı üzerinde (1 nM: P<0.05; 10 nM ve 1 µM: P<0.01; 100 nM ve 10 µM: P<0.001) RPL554'ün önemli bir sinerjik etkisini üretmiştir ve maksimum sinerjizm, RPL554 1 µM ve atropin 10 nM'nin çapraz konsantrasyonları için tespit edilmiştir (BI delta etkisi: 0.54 ± 0.09). Daha düşük konsantrasyonlarda RPL554 ve atropin (10 nM, P<0.05 ve 100 nM, P<0.01), her bir ilaç tek başına verildiğindeki etkilerin toplamına kıyasla bronşiyal halkaların relaksiyonunu ~4.85 kat arttırarak sinerjik olarak etkileşime girmiştir (Şekil 4).

RPL554 ve atropinin (1:1), asetilkolin ile önceden kontrakte edilmiş insan bronş tonu üzerindeki izomolar ilişkisinin sonuçları, gevşetici potensin arttırılmasına dayanan istatistiksel olarak anlamlı bir BI etkileşimi (P<0.01) göstermiştir (Tablo 2).

|  |                  |
|--|------------------|
|  | RPL554 + atropin |
|--|------------------|



|                                         | Gözlenen      | Beklenen     |
|-----------------------------------------|---------------|--------------|
| <b>Emaks</b>                            | 97.87 ± 1.50  | 98.68 ± 7.91 |
| <b>pD2</b>                              | 7.54 ± 0.31   | 5.55 ± 0.33  |
| <b>Delta potens (gözlenen-beklenen)</b> | 1.99 ± 0.10** |              |

**Tablo 2:** RPL554 artı atropinin (izomolar, 1:1) asetilkolin tarafından indüklenen submaksimal kontraksiyon üzerinde gevşetici sinerjik etkisi. Gösterilen veriler, n=5 farklı denekten alınan örnekler ile gerçekleştirilen deneylerden elde edilmiştir ve ortalama ± SEM olarak temsil edilmektedir. \*\*Sıfır etkileşim hipotezi delta etkisi için (gözlemlenen değerlere karşı beklenen değerler) P<0.01.

Ayrıca, Berenbaum analizi, RPL554 artı atropin'in, 1 nM ila 10 µM konsantrasyon aralığı boyunca RPL554 için sinerjik etkileşimi ortaya çıkardığını (Etkileşim indeksi: 0.09 ± 0.07) ve RPL554'in, 2.91 ± 0.44 logaritmalık atropine doğru gevşetici konsantrasyon cevap eğrilerinin sola kaymasına önemli ölçüde neden olduğunu göstermiştir (P<0.05). Sinerji kanıtı olan atropin ve RPL554'ün 1:1 doz kombinasyonları için gözlemlenen ve aditif relaksasyon tepkisi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur (Şekil 6).

Son olarak, BI yöntemini kullanarak 3D yüzey analizi, atropinin, RPL554 ile birlikte uygulandığında, tüm konsantrasyonları kapsayan önemli derecede yüksek ve geniş sinerjik etkileşimi indüklediğini göstermiştir (Şekil 5).

PDE3/PDE4'ün RPL554 tarafından selektif olarak inhibe edilmesinin, insan izole solunum yollarında, daha önce gine domuzundan izole edilmiş trakeada bildirilen gözlemleri genişleten ve destekleyen, bronşiyal tonun relaksiyonunu sağladığı gösterilmiştir (Boswell-Smith et al., 2006b).

Bu inhibitör etki, ilaç maruziyetinin sona ermesinden sonra 5 saate kadar devam ettirilmiş ve bu da bu bileşiğin insan solunum yollarında uzun süre etki gösterdiğini doğrulamıştır. Ayrıca, RPL554, histamin veya asetilkolin ile kontrendike olan hava yollarını rahatlatmak üzere rol oynamıştır. Dahası, dokuların RPL554 ile önceden inkübasyonu, dokuların, pasif olarak duyarlılaştırılmış bronşlarda eksojen olarak

uygulanan histaminin kontraktile etkisine karşı önemli bir koruma ile sonuçlanmıştır. Buna ek olarak, bir muskarinik reseptör antagonisti (atropin) ile bağlantılı PDE3/4 inhibisyonu, ASM'nin relaksasyonu üzerinde sinerjik bir etki göstermiştir. Bu sonuçlar, RPL554'ün insan bronş dokularındaki kontraktile ajanlara karşı iyi bir fonksiyonel antagonist olduğunu ve bir muskarinik reseptör antagonisti ile kombine edildiğinde daha da sinerjik bronkodilatasyon yapma kabiliyetine sahip olduğunu göstermektedir.

RPL554, diğer PDE4 inhibitörlerine kıyasla EFS ile indüklenen kontraktile yanıtlara karşı önemli derecede daha uzun etki süresine sahip olan EFS'nin ortaya çıkardığı, kontraksiyon yanıtlarının konsantrasyon ve zaman bağımlı inhibisyonuna neden olmuştur (Spina et al., 1998; Boswell-Smith et al., 2006b).

RPL554, histamin ile kontrakte edilmiş pasif olarak duyarlılaştırılmış insan bronşlarında kontraktile cevabın inhibe edilmesinde özellikle etkili olmuştur ve duyarlı gine domuzlarındaki antijen tarafından indüklenen akut bronkospazmı önemli derecede hafifleten çeşitli selektif PDE3 ve PDE4 inhibitörleri bildirilmiştir (Boswell-Smith et al., 2006a).

RPL554 ayrıca, pasif olarak duyarlılaştırılmış bronşlardaki histamine olan maksimum cevapta belirgin bir düşüşe yol açmıştır.

#### Mevcut buluştaki kombinasyonun güvenilirlik çalışmaları

Bu çalışma, RPL554'ün bir muskarinik antagonist (atropin) ile kardiyovasküler etkileşimlere sahip olup olmadığını belirlemek için yapılmıştır. Tamamlayıcı olması için  $\beta_2$  agonist (salbutamol) dahil edilmiştir. RPL554, olası anti-inflamatuar etkilere sahip bir inhale bronkodilatör olarak kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) ve astımın tedavisi için geliştirilen bir çift PDE3/PDE4 inhibitörüdür. İntravenöz bolus enjeksiyonu olarak verilen RPL554'e, salbutamole ve atropine verilen kardiyovasküler cevaplar, kan basıncında ve kalp hızında enjeksiyon sonrası pik değişiklikleri olarak ölçülen kardiyovasküler değişiklikler olarak değerlendirilmiştir. Çalışma dizaynı, kör ve beş dakika aralıklarla değiştirilen çiftler şeklinde verilen ilaçlarla, örn. RPL554 ardından salbutamol ve bunun tersi, rastgeledir. Çalışma için seçilen dozlar kardiyovasküler etkileri ve muhtemelen plazma konsantrasyonlarını, inhalasyon için kullanılanlardan çok daha yüksek üretmiştir. Bunun yerine, yukarıda belirtilen terapötik koşullar altında muhtemel etkileşimleri test etmek için seçilmiştir.

#### **Ozet**

Bu çalışmada randomize bir tasarıma göre, tek başına ve kombinasyon halinde intravenöz olarak uygulanan RPL554, salbutamol ve atropinin anestezi uygulanmış sıçanlardaki kan basıncı ve kalp hızı üzerindeki etkileri incelenmiştir. RPL554 ve salbutamol için başlangıç dozu-yanıt çalışmasından, ortalama kan basıncında (MBP) 15-30 mmHg artış ve kalp atış hızında (HR) dakikada 30-60 atım artış sağlayan dozlar seçilmiştir. Kan basıncında veya kalp atış hızı üzerinde daha az etkiler meydana getiren atropin için, uygulanan maksimum doz sonraki çalışmalar için seçilmiştir. Bundan sonra, seçilen dozlar 5 dakika süreyle uygulanan çiftler halinde incelenmiştir. Çalışmadan elde edilen veriler, anestezi uygulanmış sıçanlarda MBP veya HR üzerindeki etkileri bakımından, kardiyovasküler anlamda RPL554 ile salbutamol arasında veya RPL554 ile atropin arasında herhangi bir etkileşim olmadığını göstermektedir. Olası etkileşimleri titizlikle test etmek için, çalışma için seçilen dozlar ve uygulama yolu, moröal terapötik dozlarda görülmeyen kardiyovasküler etkiler üretmiştir. Buna ek olarak, bolus intravenöz yol muhtemelen, inhalasyon ile verilen düşük terapötik dozlarda görülmeyenlerden daha yüksek plazma konsantrasyonları ile sonuçlanmıştır. Çalışmanın amacı, supra terapötik koşullar altında muhtemel etkileşimlerin üstesinden gelmek için supra normal koşulları kullanmaktır.

#### Protokol

Çalışmalar, Charles River'dan 200-250 gram ağırlığında Sprague-Dawley cinsi sıçanlar üzerinde gerçekleştirilmiştir. Sıçanlar deney laboratuvarına teslim edildikten sonra, 1-3 saat boyunca yiyecek ve su verilmemiştir. Deney amaçları doğrultusunda hayvanlar, i.p. yol ile 100 mg/kg'lık bir dozda tiyobütarbital ile anestezi edilmişlerdir. Ek anestezi için bir gereklilik oluşmamıştır ve deney süresinin sonunda her bir sıçan öldürülmüştür. Çalışma iki bölümden oluşmuştur: (I) başlangıç dozu-değişkenlik çalışması ve (II) etkileşim çalışması. İncelenen ilaçlar: RPL554 (R), salbutamol (S), atropin (A), hepsi tuzlu suda çözölmüştür.

#### (I) Başlangıç dozu-değişkenlik çalışması

Bir başlangıç dozu değişkenlik çalışması şu şekilde gerçekleştirilmiştir: üç ilacın intravenöz bolus dozları için kümülatif doz-cevap eğrileri, tam çalışma için üç ilacın her birinin uygun dozlarını belirlemek için gerçekleştirilmiştir. Başlangıç dozu-cevap çalışmasından, ortalama kan basıncında (MBP) 15-30 mmHg artış ve kalp atış

hızında (KH) dakikada 30-60 atım artış meydana getiren RPL554 veya salbutamol dozları seçilmiştir. Atropin sınırlı kardiyovasküler etkiler yaratmıştır ve bu nedenle yüksek doz, muskarinik reseptör blokajının derin olduğu konusundaki literatür kanıtları olduğu için seçilmiştir. Bu doz değişkenlik çalışması, doz katlama bazında verilen her üç ilacın kümülatif dozlarında, dört sıçanı kapsamaktadır. Her ilaç dozları, farklı ilaçlar arasında 1 saat olacak şekilde her 5 dakikada i.v. bolus enjeksiyon olarak verilmiştir. Enjeksiyonların sırası şu şekildedir: hayvan 1 için - S, R, A; hayvan 2 için R, A, S; hayvan 3 için - A, S, R ve hayvan 4 – için R, A, S. Yukarıda belirtildiği gibi enjeksiyon dozları ve yolları süpernormal olarak seçilir ve yukarıdaki dozlar inhalasyonla verildiğinde etkiler meydana getirir.

Bu çalışmadan sonra gelen etkileşim çalışması için aşağıdaki dozlar seçilmiştir:

R = 8 µg/kg - % 0.9 salin (tuzlu su) içinde 8 µg/mL

S = 2 µg/kg - % 0.9 salin (tuzlu su) içinde 2 µg/mL

A = 32 µg/kg - % 0.9 salin (tuzlu su) içinde 32 µg/mL

## (II) Etkileşim çalışması

Bu çalışmada tüm ilaçlar i. v. bolus enjeksiyon ile tek doz olarak, bir juguler ven kanülü vasıtasıyla ve 1 mL/kg'lık bir hacimde uygulanmıştır. Çalışma tasarımı, toplam 12 hayvan için her biri dört hayvan içeren 3 grupta kör ve rastgele bir tasarımıdır. İlaç çiftleri her bir hayvana randomize kör bir şekilde her bir grubun dört fare içerdiği bir dizi tasarımı kullanılarak enjeksiyon ile şu şekilde verilmiştir: R1S2, S1R2, R1A2 ve A1R2 (rastgele sırayla, burada 1, verilen birinci ilacı gösterir ve 2 birinci ilaçtan 5 dakika sonra verilen ikinci ilacı gösterir). Toplam 3 grup çalışılmış, böylece toplam 12 sıçan kullanılmıştır ve hayvanlardan hiçbirinin değiştirilmesi gerekmemiştir. Çalışma, daha ileri araştırmanın gerekip gerekmediğini ve eğer öyleyse daha fazla sayıda grup ve/veya doz ayarlaması yapılması için bir provizyonel analiz amacıyla 12 hayvandan sonra durdurulmuştur (uyarlanabilir bir tasarım).

Kan basıncı, bir çıktısının AD Instruments PowerLab 26T tarafından işlendiği bir dönüştürücü kullanılarak bir karotis arterden ölçülmüştür. Kalp atış hızı, EKG ve kan basıncı izlerinden bir atımdan atıma bazda hesaplanmıştır. Analiz, LabChart 6'ya göre yapılmıştır. Ölçümler, LabChart 6'daki fonksiyonlar kullanılarak yapılmıştır.

Tüm ilaçların etkileri, ilacın her enjeksiyonuna gelen pik cevap zamanında ölçülmüştür. Salbutamol ile pik cevap süresi, kan basıncı için yaklaşık 20 saniye ve kalp hızı için yaklaşık 60 saniye olarak ölçülmüştür. RPL554 için ilgili süreler kan basıncı için 60-80 saniye ve kalp atış hızı için 2-4.5 dakika olarak ölçülmüştür.

- 5 Atropin için, hem kan basıncı hem de kalp hızı için 4 dakika olarak ölçülmüştür.

- Veriler, sistolik, diyastolik ve hesaplanan ortalama kan basıncı olarak mmHg olarak kaydedilirken, kalp hızı atım/dakika olarak kaydedilmiştir. Kaydedilen değerler, iki kontrol değerinden elde edilen kan basıncında ve kalp hızında ilaç indüklü değişiklikler sağlamak üzere işlenmiştir. Bunlardan biri ilk enjeksiyondan önce ve 10 ikincisi ise ikinci enjeksiyon öncedir. Hesaplanan değişiklikler de bu iki kontrol değeri için normalize edilmiş ve kontrol değerlerinden düşüş için negatif bir değer veya kontrol değerlerinden bir artış için pozitif olarak ifade edilmiştir.

### Sonuçlar

#### Primer farmakodinamikler

- 15 Tablo 3: Anestezi uygulanmış sıçanlarda (ortalama değer başına n = 3) kontrol ( $\Delta$ ) ortalama arteriyel kan basıncı ve ortalama kalp atım hızındaki değişiklikler üzerine tek başına ve başka bir ilaçtan sonra RPL554, salbutamol ve atropin'in etkileri

| <b>RPL554"ün salbutamol veya atropin ile eşleştirildiğindeki etkisi</b> |                           |      |                         |
|-------------------------------------------------------------------------|---------------------------|------|-------------------------|
|                                                                         | $\Delta$ MBP (mmHg ve %)  |      | $\Delta$ HR (bpm ve %)  |
| Salbutamolden* önce RPL554                                              | -15                       | -15% | 36 10%                  |
| Salbutamolden** sonra RPL554                                            | -17                       | -16% | 29 7%                   |
| Atropinden* önce RPL554                                                 | -17                       | -16% | 30 8%                   |
| Atropinden** sonra RPL554                                               | -19                       | -20% | 33 10%                  |
| <b>Salbutamolün RPL554 ile eşleştirildiğindeki etkisi</b>               |                           |      |                         |
|                                                                         | $\Delta$ MBP (mmHg ve % ) |      | $\Delta$ HR (bpm ve % ) |
| RPL554*’den önce salbutamol                                             | -32                       | -30% | 58 18%                  |

|                                                        |                           |      |                         |     |
|--------------------------------------------------------|---------------------------|------|-------------------------|-----|
| RPL554***den sonra salbutamol                          | -23                       | -24% | 43                      | 11% |
| <b>Atropinin RPL554 ile eşleştirildiğindeki etkisi</b> |                           |      |                         |     |
|                                                        | $\Delta$ MBP (mmHg ve % ) |      | $\Delta$ HR (bpm ve % ) |     |
| RPL554*den önce atropin                                | -5.0                      | -5%  | 6.3                     | 1%  |
| RPL554****den sonra atropin                            | -2.7                      | -3%  | 21                      | 5%  |

İlaçlar i.v. bolus enjeksiyonlar olarak 5 dakika aralıklarla çiftler halinde verilmiştir.  $\Delta$  değerleri, ilaç öncesi değerlerden elde edilen pik etkilerdeki farktır ve ön ilaç değerlerine göre değişim veya yüzde değişim olarak ifade edilmiştir.

5 \*= önceki ilaç tedavisi olmaksızın ilaca olan kontrol cevabı

Ölçülen primer farmakodinamik değişkenler, hesaplanan ortalama kan basıncına sahip sistolik ve diyastolik kan basıncı ve kalp atış hızıdır. Görülen değişikliklerin özeti yukarıda Tablo 3'te gösterilmektedir.

10 Tüm durumlarda görüldüğü gibi, çalışılan dozda RPL554, sistolik, diyastolik veya ortalama basınçların gerçek değişiklikler olarak ifade edilip edilmediğine veya ilaç öncesi değerler için normalize edilmesine bakılmaksızın kan basıncında düşüş meydana getirmiştir. RPL554 enjeksiyonu için kan basıncındaki değişiklikler, salbutamol veya atropinin önceki uygulanmasından önce veya sonra ölçüldüğünde, Tablo 3'te görüldüğü gibi, değişikliklerin ilaçtan önceki değişiklikler olarak ifade edilip  
15 edilmediği veya yüzde olarak normalize edilip edilmediği açısından farklı değildi.

Kalp atım hızı cevapları diğer ilaçların önceki uygulanmasından da etkilenmemiştir, ancak ikinci ilacın ilkinden 5 dakika sonra verilmesi, ilaç öncesi değerleri dikkate alınan ilaca bağlı olacak şekilde değiştirmiştir.

Sekonder farmakodinamikler ve güvenilirlik farmakolojisi

20 Sekonder farmakodinamik değişkenler: EKG, solunum sayısı ve aritmilerdir. EKG'de veya solunum hızında önemli bir değişiklik görülmemiştir ve aritmiler gözlenmemiştir.

Farmakodinamik ilaç etkileşimleri

Çalışmanın temel amacı üç ilaç arasındaki olası kardiyovasküler etkileşimlerdir. İlaçlar arasında, Tablo 3'te sunulduğu gibi veya gerçek deney kayıtlarının incelenmesiyle görüldüğü gibi önemli etkileşimler gözlenmemiştir.

### **Örnek 2**

- 5 RPL554'ün atropine (bir muskarinik reseptör antagonisti) ile kombinasyon halinde uygulandığındaki in vivo sinerjik etkisi

Bu Örnek, RPL554'ün atropin ile kombinasyon halinde uygulanması durumunda, bombesin tarafından indüklenen bronkokonstriksiyonu ve potansiyel sinerjistik etkileri tersine çevirme yeteneğini araştırmaktadır.

- 10 Gine domuzlarına anestezi uygulanmış ve ventile edilmiştir. Hava yolu obstrüksiyonu, bombesin (2µg/ml; 5 ml/saat) intravenöz uygulanması ile indüklenmiştir. Bronkodilatasyon tek başına çeşitli dozlarda RPL554'ün i.v. uygulanması veya alt maksimal atropin dozları (2 µg/kg) ile kombinasyon halinde uygulanması ile indüklenmiştir. Dozlar, atropin için bir doz seçmek amacıyla bir hava yolu
- 15 obstrüksiyonunda yaklaşık % 20 azalma oluşturan bir doz-cevap eğrisi üreten aşağıdaki çalışmalardan seçilmiştir. Toplam akciğer direnci (RL) ve ortalama arteriyel kan basıncı ölçülmüştür. Veriler hava yolu obstrüksiyonunda veya kan basıncında % azalma olarak belirtilmiştir.

- RPL554 10-80 µg/kg dozda gine domuzunun hava yollarının doz bağımlı
- 20 relaksasyonuna neden olmuştur. 2µg/kg atropine (hava yolları obstrüksiyonunda % 22.3 + 4.9 azalmaya neden olan bir doz) ile kombinasyon halinde, RPL554'ün bir submaksimal dozu (20µg/kg), RPL554'ün tek başına uygulandığı dozdan hava yollarının daha yüksek bir relaksasyonuna neden olmuştur (Tablo 4). 20 µg/kg RPL554'ün i.v. uygulaması (ya da birlikte uygulandığında potansiyel bulunmayan)
- 25 ortalama arteriyel kan basıncında bir azalmaya sebep olmuştur (kontrol: % 37.3 + 6.7, + 2 µg/kg atropine: % 35.3 + 4.3). Sonuçlar Şekil 7 ila 10'da gösterilmiştir.

| Tablo 4  | Hava yolu obstrüksiyonunda % azalma |                            |
|----------|-------------------------------------|----------------------------|
|          | RPL554 kontrol                      | RPL554 + atropin (2 µg/kg) |
| 10 µg/kg | 7.4 + 1.9                           | 41.7 + 1.2                 |

|          |            |            |
|----------|------------|------------|
| 20 µg/kg | 24.6 + 4.3 | 76.5 + 8.8 |
| 40 µg/kg | 55.2 + 6.2 | 84,3 +9.1  |
| 80 µg/kg | 65.1 + 5.3 | 81.9+4.7   |

Sonuçlar, RPL554'ün muskarinik reseptör antagonisti atropin ile kombine edildiğinde, bronkodilatör olarak sinerjik aktivitelere sahip olan, ancak kan basıncını etkileyen ilaç sınıflarıyla etkileşime girmeyen etkili bir bronkodilatatör olduğuna dair başka kanıtlar ortaya koymaktadır.

### **Örnek 3**

İnsan izole bronşu üzerinde glikopironyum bromür (bir muskarinik reseptör antagonisti) ile birlikte uygulanan RPL554'ün sinerjistik etkisi

İnsan izole bronşundaki RPL554 ile glikopironyum bromür arasındaki uzun süreli etkileşimler araştırılmıştır.

#### **Yöntemler**

6 hastadan alınan bronş halkaları O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (% 95/5) ile havalandırılmış 0.5-1.0 g gerilim altında Krebs-Henseleit solüsyonunda (3TC) inkübe edilmiştir. Tek başına ve kombinasyon halindeki RPL554 ile glikopironyum bromürün etki süresi (% 30 maksimum relaksasyon, EC<sub>30</sub>) 3, 10 veya 25Hz elektrik alan stimülasyonu (EFS) ile kontrakte edilmiş dokularda çalışılmıştır. Bronş tonu papaverine maksimum cevabın yüzdesi (E<sub>max</sub>) olarak ifade edilmiş ve kontraktıl cevap eğrisi altındaki alan (AUC) değerlendirilmiştir. İlaç karışımının etkileri Bliss Bağımsızlık Teorisi ile analiz edilmiştir. Değerler (n=3) ortalama ± SEM şeklindedir.

### **Sonuçlar**

Tek başına uygulanan RPL554 ve glikopironyum, sırasıyla 160 ± 20 dakika ve 50 ± 10 dakika maksimum relaksasyon sağlamış ve etki 4 saat için saptanabilmiştir.

Maksimum sinerjik gevşeme etkileşimi, yıkama süresi boyunca yaklaşık 2 saate eşittir (% 71.4 ± 5.1) ve ilaçların kombinasyonu, EFS aracılı kontraktıl cevaptaki düşüş halen % 41.2 ± 8.5 olduğu zaman, gevşetici etkiyi 6 saate uzatmıştır. Gözlenen AUC (% 44.9 ± 3.1), çalışmanın 6 saati boyunca (P <0.001) 3Hz'deki EFS



için temel etkinliğe sahip ( $\% -35.8 \pm 2.5$ ,  $P<0.001$ ) beklenen düzeyden ( $\% 65.8 \pm 3.3$ ) anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Sonuçlar Şekil 10 ila 16'da gösterilmiştir.

### Sonuç

Düşük konsantrasyonlardaki RPL554 ve glikopironyum, insan izole bronşunda EFS tarafından indüklenen kontraktıl tonu sinerjik olarak inhibe etmiş ve 6 saat boyunca gevşetici etkisini uzatmıştır.

### Örnek 4

Küçük, insan havayolları üzerinde glikopironyum bromür (bir muskarinik reseptör antagonisti) ile kombinasyon halinde uygulanan RPL554'ün sinerjik etkisi

İnsan izole bronşiyallerindeki RPL554 ile glikopironyum arasındaki etkileşim araştırılmıştır.

### Yöntemler

6 hastadan alınan hassas bir şekilde kesilmiş akciğer dilimleri (PCLS'ler),  $O_2/CO_2$  ( $\% 95: 5$ ) ile havalandırılmış olan Krebs-Henseleit solüsyonunda ( $37^\circ C$ ) inkübe edilmiştir. Tek başına ve izoeftif konsantrasyonlarda kombinasyon halinde uygulanan RPL554 ve glikopironyuma karşı konsantrasyon cevabı, karbakol (CCh) tarafından indüklenen alt maksimum kontraksiyonda (maksimum  $\% 70$ , EC70) değerlendirilmiştir. Küçük bronşlarda ( $<1mm$  çapında) relaksyon, papaverin ( $E_{max}$ ) ve potensi  $IC_{50}$ 'nin negatif logaritması ( $pD_2$ ) ile indüklenen maksimum cevabın yüzdesi (lumen alanının artırılması) olarak ifade edilmiştir. İlaç karıımı etkileri Bliss Bağımsızlık Teorisi ile analiz edilmiştir. Değerler ( $n=3$ ) ortalama  $\pm$  SEM şeklindedir.

### Sonuçlar

Glikopironyum, RPL554'e kıyasla ( $pD_2$ : glikopironyum  $9.2 \pm 0.4$ , RPL554  $6.0 \pm 0.1$ ,  $P<0.001$ ) bronşiyollerin daha güçlü konsantrasyona bağlı relaksyonunu sağlamıştır ve her ikisi de CCh ile indüklenen kasılmayı ortadan kaldırmıştır. Düşük ila orta konsantrasyonlarda glikopironyum ve RPL554 (glikopironyum  $0.05nM-0.14nM$ , RPL554  $0.32\mu M-0.54\mu M$ ), beklenen cevap ile karşılaştırıldığında ( $P<0.05$ ) küçük havayollarında relaksyonu  $\% +21.1 \pm 4.0$  arttırarak sinerjik bir gevsemeye yaratmıştır. Glikopironyum artı RPL554'ün düşük konsantrasyonlarında (EC30), beklenen cevapla ( $\% 510 \pm 5.4$ ) karşılaştırıldığında,  $\% 69.1 \pm 2.4$ 'lük anlamlı ( $P<0.05$ ) lumen alanı artışını indüklemiştir. Sonuçlar Şekil 17 ila 19'da gösterilmiştir.

## Sonuç

RPL554 ve glikopironyumun, özellikle düşük ila orta konsantrasyonlarda bronşioollerin lümen alanının arttırılması üzerinde sinerjik bir etkileşime sahip olduğu bulunmuştur.

### **Örnek 5**

- 5 Tiotropium bromür (bir muskarinik reseptör antagonisti) ile kombinasyon halinde verilen RPL554'ün sinerjistik etkisi

RPL554 ve atropinin kombinasyonunun sinerjistik etkisini değerlendirilmesi için kullanılan Örnek 1'deki yöntem muskarinik reseptör antagonisti tiotropium bromür için tekrarlanır. Konsantrasyon cevap eğrileri, tek başına RPL554, tek başına tiotropium bromür ve tiotropium bromür ile kombinasyon halinde uygulanan RPL554'ü test edecek şekilde oluşturulmuştur. Tiotropium bromür ve RPL554 arasındaki sinerjik etkinin değerlendirilmesi için Berenbaum Yöntemi ve Bliss Bağımsızlık kriteri kullanılır. RPL554 ve tiotropium bromür kombinasyonu için bir sinerjik etki gözlenir.

### **Örnek 6**

- 15 Oksitropium bromür (bir muskarinik reseptör antagonisti) ile kombinasyon halinde uygulanan RPL554'ün sinerjik etkisi

RPL554 ve atropinin kombinasyonunun sinerjistik etkisini değerlendirilmesi için kullanılan Örnek 1'deki yöntem muskarinik reseptör antagonisti oksitropium bromür için tekrarlanır. Konsantrasyon cevap eğrileri, tek başına RPL554, tek başına oksitropium bromür ve oksitropium bromür ile kombinasyon halinde uygulanan RPL554'ü test edecek şekilde oluşturulmuştur. Oksitropium bromür ve RPL554 arasındaki sinerjik etkinin değerlendirilmesi için Berenbaum Yöntemi ve Bliss Bağımsızlık kriteri kullanılır. RPL554 ve oksitropium bromür kombinasyonu için bir sinerjik etki gözlenir.

### **Örnek 7**

Aklidinyum (bir muskarinik reseptör antagonisti) ile kombinasyon halinde verilen RPL554'ün sinerjistik etkisi

RPL554 ve atropinin kombinasyonunun sinerjistik etkisini değerlendirilmesi için kullanılan Örnek 1'deki yöntem muskarinik reseptör antagonisti aklidinyum için tekrarlanır. Konsantrasyon cevap eğrileri, tek başına RPL554, tek başına aklidinyum ve aklidinyum ile kombinasyon halinde uygulanan RPL554'ü test edecek şekilde

oluşturulmuştur. Aklidinyum ve RPL554 arasındaki sinerjik etkinin değerlendirilmesi için Berenbaum Yöntemi ve Bliss Bağımsızlık kriteri kullanılır. RPL554 ve aklidinyum kombinasyonu için bir sinerjik etki gözlenir.

### **Formülasyon Örnek 1 – bir DPI ile uygulama**

- 5 RPL554 kombinasyonu (0.2 mg) mikronize edilir ve daha sonra laktoz (25 mg) ile karıştırılır. Bu harmanlanmış karışım daha sonra bir jelatin inhalasyon kartuşuna yüklenir. Kartuş içeriği, örneğin bir DPI kullanılarak uygulanır.

Bir mikronize RPL554 kombinasyonu (100 mg), öğütülmüş laktoz (25 g) ile karıştırılır (örneğin laktoz, partiküllerin yaklaşık % 85'inden daha azı yaklaşık 60 µm ile yaklaşık 90 µm'lik bir MMD'ye sahip ve partiküllerin % 15'den daha fazlası 15 µm'den daha düşük bir MMD'ye sahip). Harmanlanmış karışım, daha sonra, doz başına yaklaşık 10-500 µg RPL554 sağlayacak şekilde yeterli bir miktarda soyulabilir bir blister ambalajın her bir blisterine yüklenir. Blister içeriği bir DPI kullanılarak uygulanır.

Alternatif olarak, mikronize bir RPL554 kombinasyonu (1 g) ve öğütülmüş laktoz 15 ağırlık oranı 1: 200 olan bir bulk kompozisyon oluşturmak üzere öğütülmüş laktoz (200 g) ile karıştırılır. Harmanlanmış kompozisyon, doz başına yaklaşık 10-500 µg RPL554 sağlayabilen bir DPI içinde ambalajlanır.

Alternatif olarak, mikronize RPL554 (100 mg) ve mikronize muskarinik reseptör antagonisti (500 mg), öğütülmüş laktoz (30 g) ile karıştırılır. Harmanlanmış karışım 20 daha sonra, doz başına yaklaşık 10 µg ile yaklaşık 500 µg RPL554 sağlayacak şekilde yeterli bir miktarda soyulabilir bir blister ambalajın ayrı blisterlerine yüklenir. Blister içeriği bir DPI kullanılarak uygulanır.

### **Formülasyon Örnek 2 – bir MDI içinde kullanmak için kompozisyonlar**

Mikronize RPL554 kombinasyonu (10 g), lesitin (0.2 g) demineralize suda (200 mL) 25 çözülmesi ile hazırlanan bir çözelti içinde disperse edilir. Meydana gelen süspansiyon püskürtülerek kurutulur ve daha sonra ortalama çapı yaklaşık 1.5 µm'den küçük olan partikülleri içeren bir mikronize kompozisyon oluşturmak üzere mikronize edilir. Mikronize edilmiş kompozisyon daha sonra MDI ile uygulandığında doz başına yaklaşık 10 µg ile yaklaşık 500 µg RPL554 sağlamak üzere yeterli bir miktarda 30 basınçlı 1,1,1,2-tetrafloroetan içeren MDI kartuşlarına yüklenir.

- Alternatif olarak, ağırlıkça % 5 RPL554 kombinasyonu, ağırlıkça % 0.5 lesitin ve ağırlıkça % 0.5 trihaloz içeren bir süspansiyon, ortalama boyutu 10 µm'den küçük mikronize partiküller halindeki 5 g RPL554 kombinasyonunun 0.5 g trihaloz ve 0.5 g lesitin 100 mL demineralize su içerisinde çözülmesi ile oluşan koloidal bir solüsyonun içinde dağıtılarak hazırlanır. Süspansiyon püskürtülerek kurutulur ve elde edilen materyal, ortalama çapı 1.5 µm'den küçük olan partiküller elde etmek için mikronize edilir. Partiküller basınçlı 1,1,1,2-tetrafluroetan ile metal kutulara yüklenir.

### **Formülasyon Örnek 3 – bir nebulizer inhallerde kullanmak için kompozisyon**

- RPL554 kombinasyonu (25 mg) sitrat tamponlu (pH 5) izotonik salin (125 mL) içinde çözülür. Karışım karıştırılır ve bileşik çözülene kadar sonike edilir. Çözeltinin pH'si kontrol edilir ve gerekirse yavaşça sulu 1N sodyum hidroksit ilave edilerek pH 5'e ayarlanır. Çözelti, doz başına yaklaşık 10 µg ila yaklaşık 500 µg RPL554 kombinasyonu sağlayan bir nebulizör cihazı kullanılarak uygulanır.

### **Formülasyon Örnek 4 – oral uygulama için sert jelatin kapsüller**

- RPL554 kombinasyonu (50 g), püskürtülerek kurutulmuş laktoz (440 g) ve magnezyum stearat (10 g) iyice karıştırılır. Elde edilen kompozisyon daha sonra sert jelatin kapsüllere (kapsül başına 500 mg kompozisyon) yüklenir.

### **Formülasyon Örnek 5 – oral uygulama için süspansiyon**

- Aşağıdaki maddeler süspansiyonun her 101 mL'sinde 100 mg bileşik içeren bir süspansiyon oluşturmak için karıştırılır:

| Madde               | Miktar |
|---------------------|--------|
| RPL554 kombinasyonu | 1.0 g  |
| Fumarik asit        | 0.5 g  |
| Sodyum klorür       | 2.0 g  |
| Metil paraben       | 0.15 g |
| Propil paraben      | 0.05 g |
| Granüle şeker       | 25.5 g |

|                                           |           |
|-------------------------------------------|-----------|
| Sorbitol (% 70 çözelti)                   | 12.85 g   |
| VeegumRTM K (magnezyum alüminyum silikat) | 1.0 g     |
| Koku verici                               | 0.035 g   |
| Renk verici                               | 0.5 g     |
| Distile su q.s.                           | 100 mL'ye |

### **Formülasyon Örnek 5 – enjeksiyon ile uygulamak için enjektabl formülasyon**

RPL554 kombinasyonu (0.2 g), 0.4 M sodyum asetat tampon çözeltisi (2.0 mL) ile karıştırılır. Elde edilen solüsyonun pH değeri, gerekirse 0.5 N sulu hidroklorik asit veya 0.5 N sulu sodyum hidroksit kullanılarak pH 4'e ayarlanır ve daha sonra enjeksiyon için yeterli su ilave edilerek toplam 20 mL hacim elde edilir. Karışım daha sonra enjeksiyon ile uygulama için uygun steril bir solüsyon sağlamak üzere steril bir filtre (0.22 mikron) ile filtrelendir.

### **REFERANSLAR**

- 10 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.
- 15 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)
- 20 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,l-a]isoquinolin-4-one] and RPL565 [6,7-dihydro-2-

(2,6-diisopropylphenoxy)-9,10-dimethoxy-4H-pyrimido[6,l-a]isoquinolin-4-one], *J Pharmacol Exp Ther* 318:840-848.

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

- 5 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  
10 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.

- 15 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.

- 20 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,  
25 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.

5 *Life Sci* 62:953- 965.

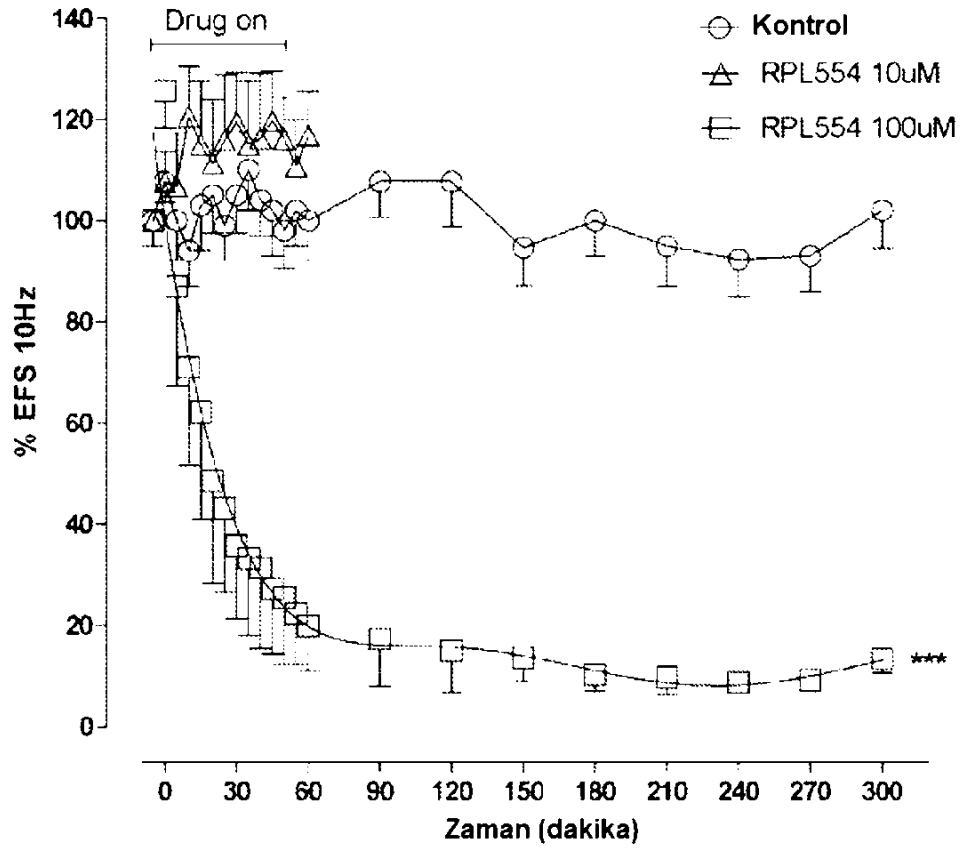
Tallarida RJ (2001) Drug synergism: its detection and applications. *J Pharmacol Exp Ther* 298:865-872.

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

10 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.

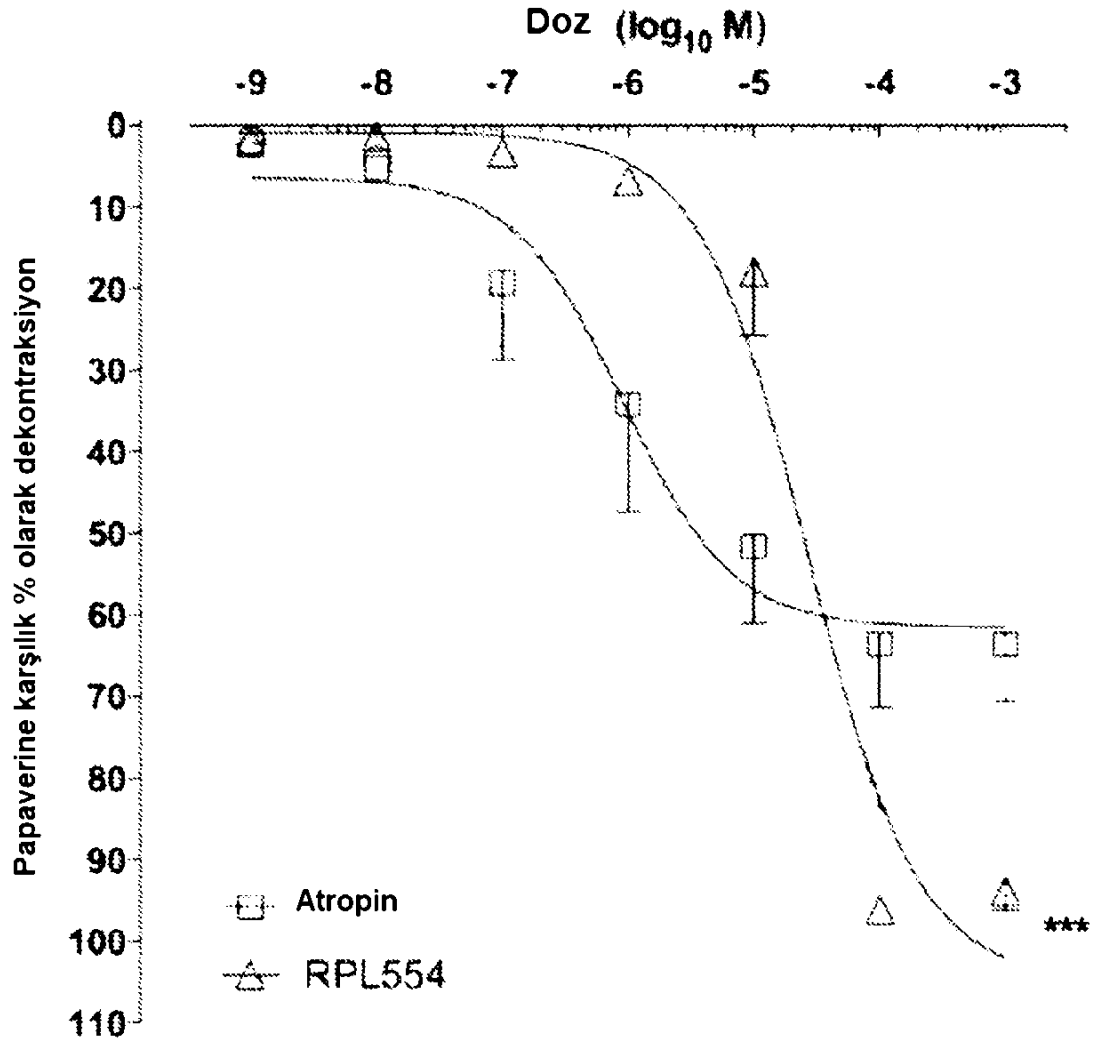
Watson N, Bodtke K, Coleman RA, Dent G, Morton BE, Ruhlmann E, Magnussen H and Rabe KF (1997) Role of IgE in hyperresponsiveness induced by passive

15 sensitization of human airways. *Am J Respir Crit Care Med* 155:839-844.

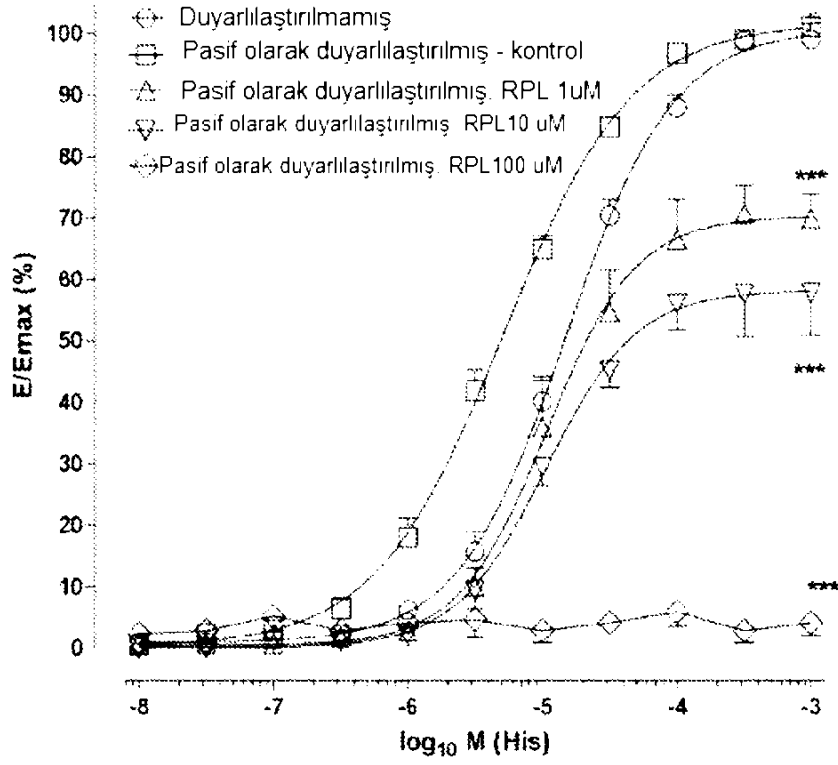


Şekil 1

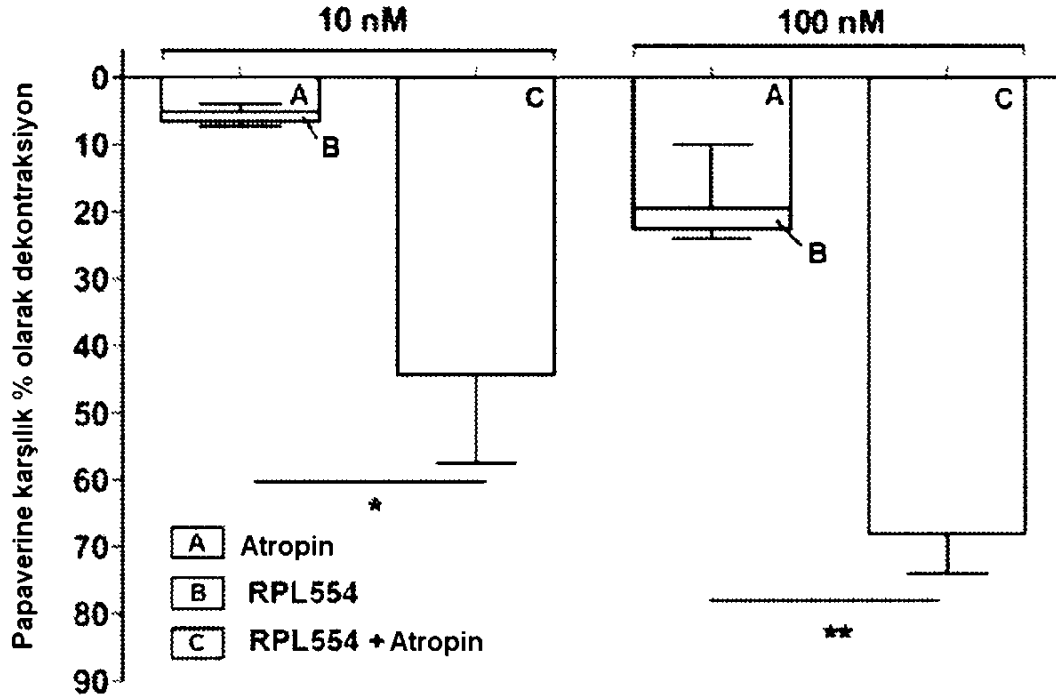




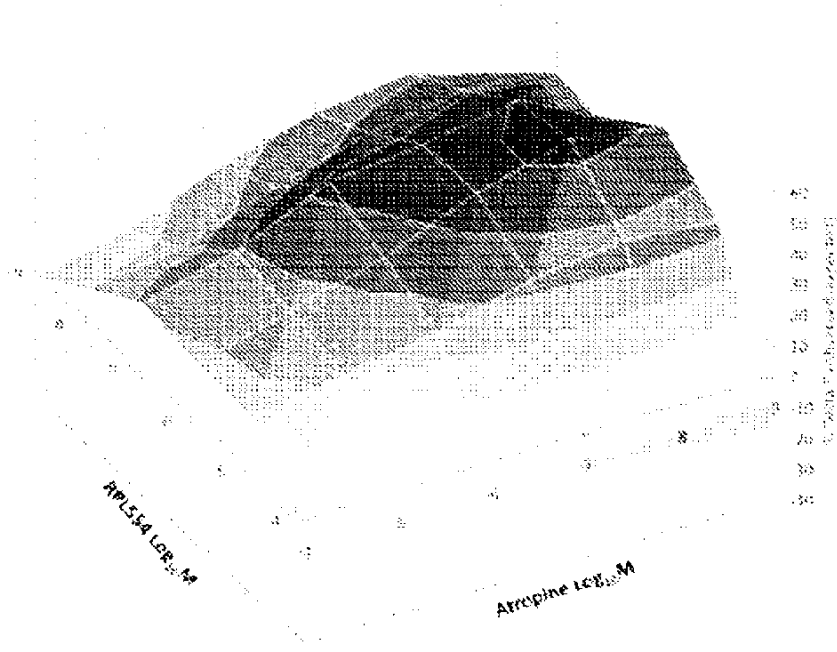
Şekil 2



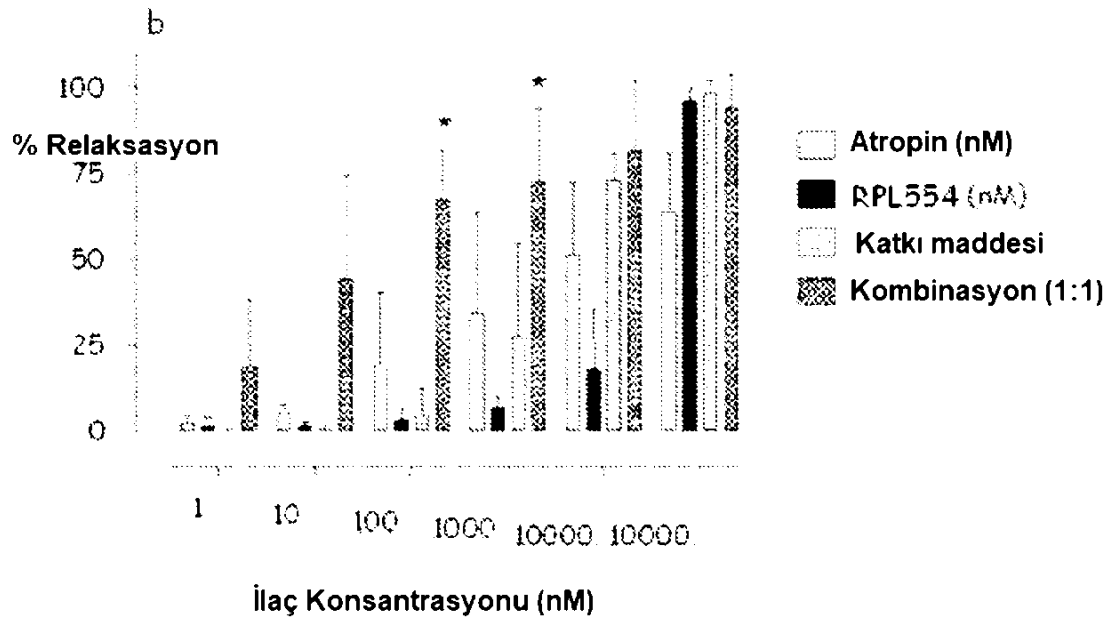
Şekil 3



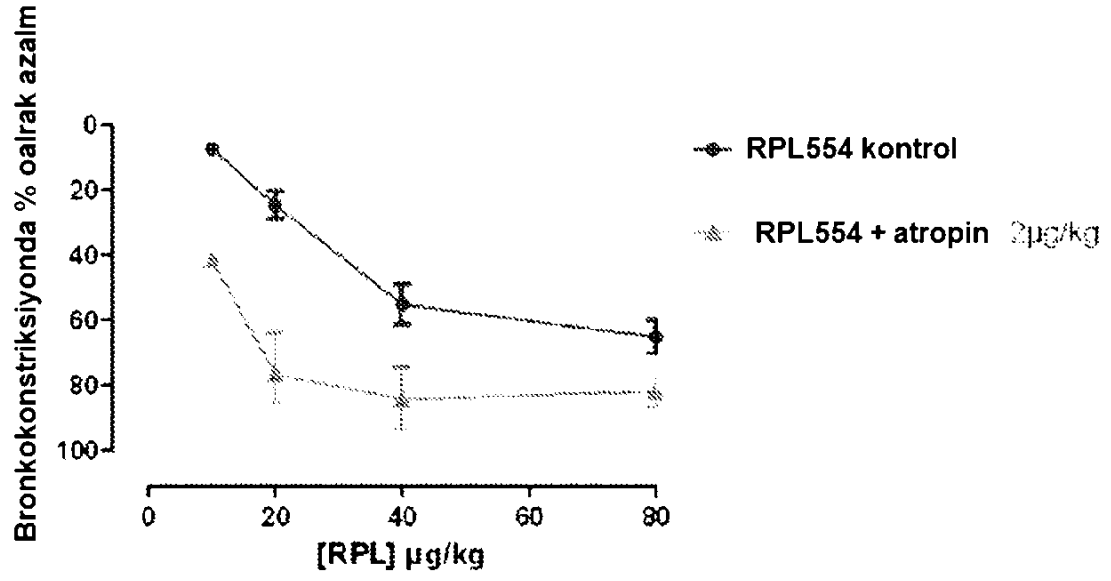
Şekil 4



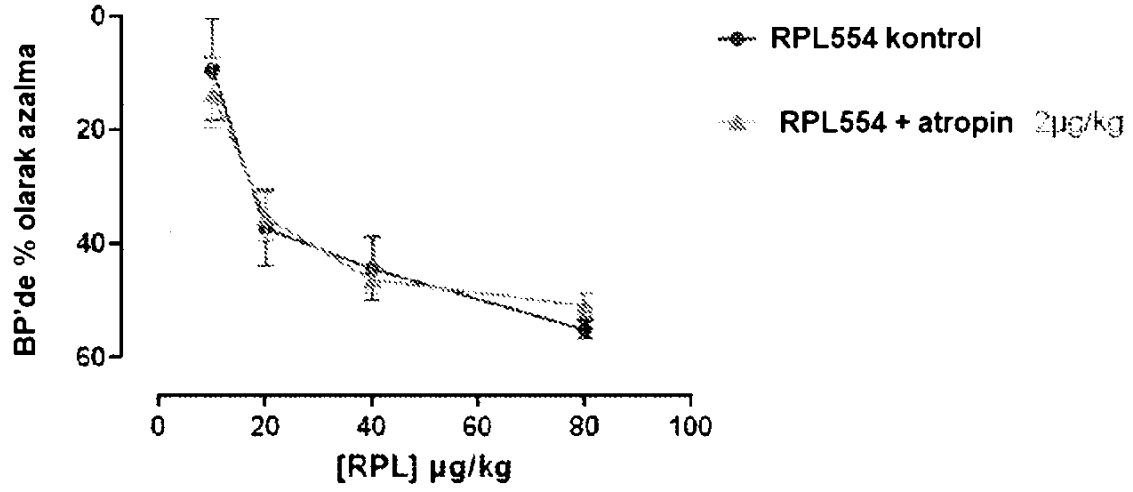
Şekil 5



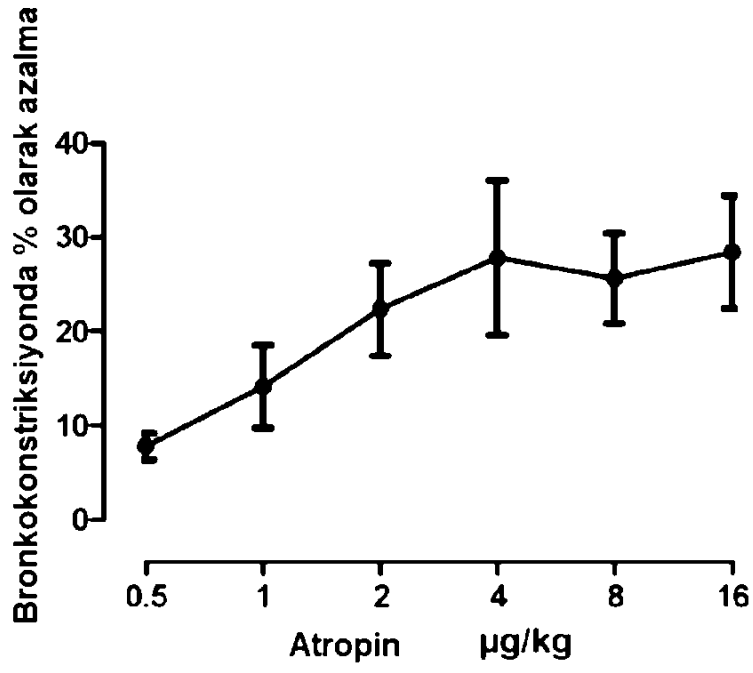
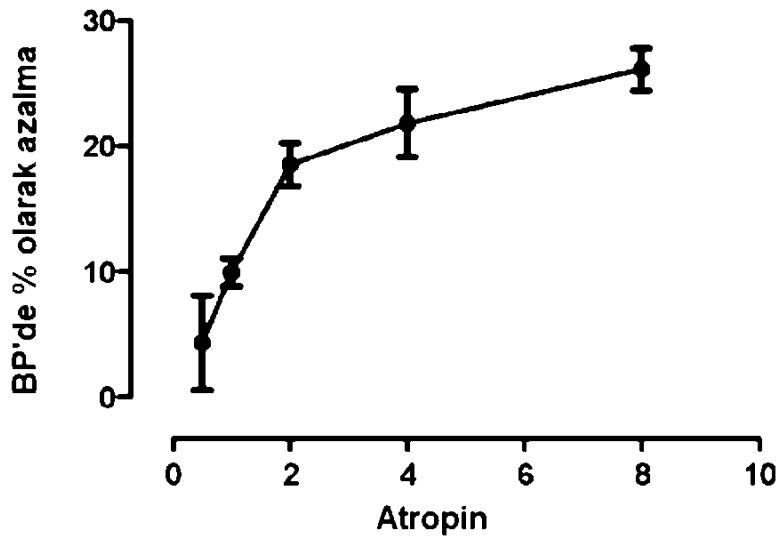
Şekil 6

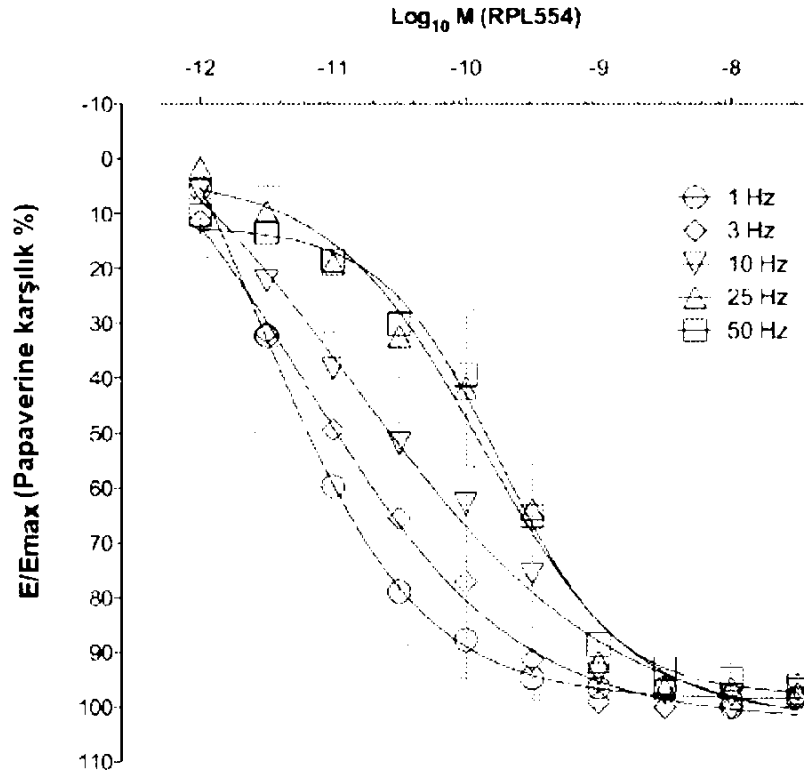


Şekil 7

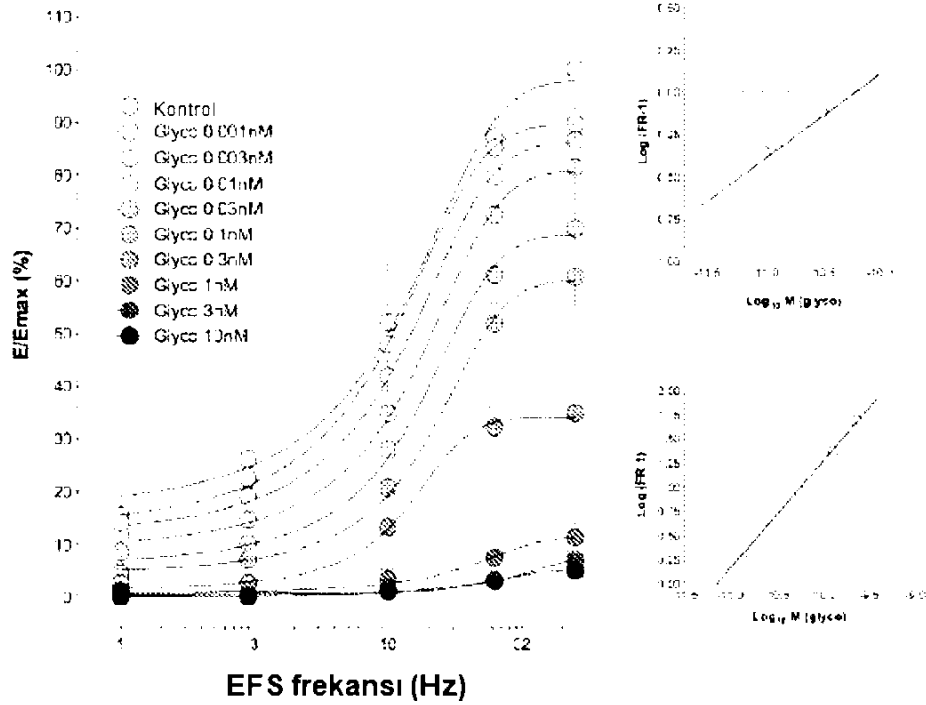


Şekil 8

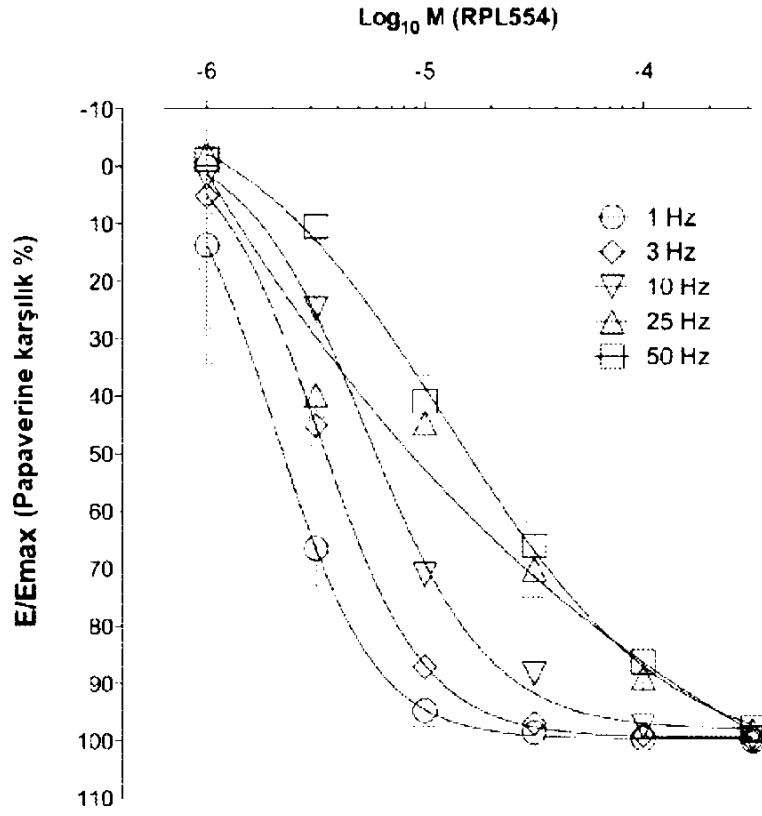
**Şekil 9****Şekil 10**



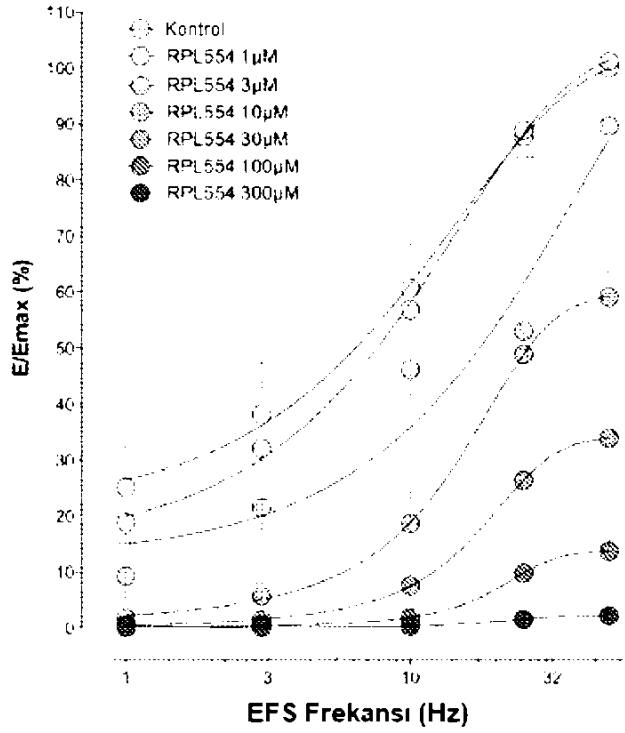
Şekil 11



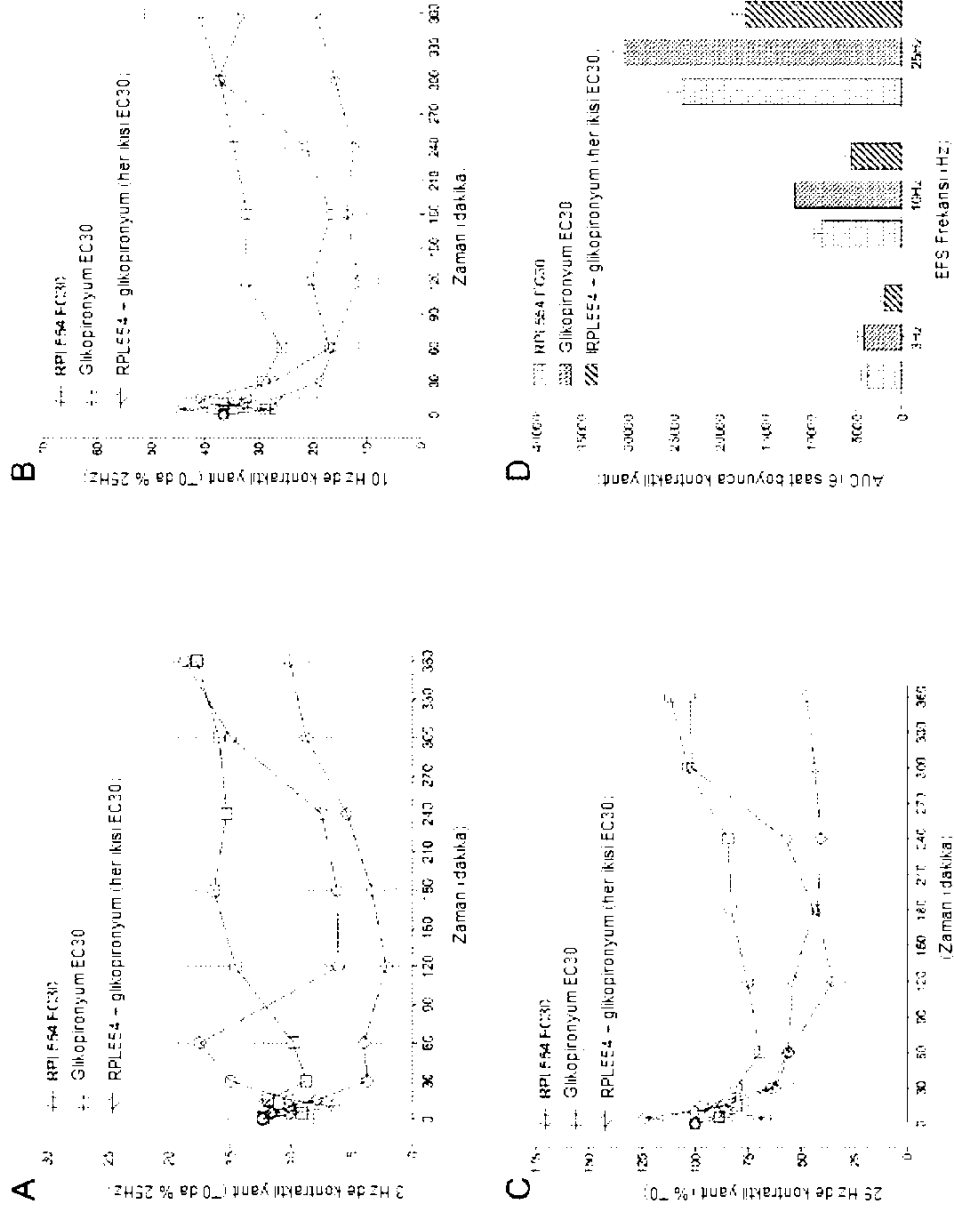
Şekil 12



Şekil 13

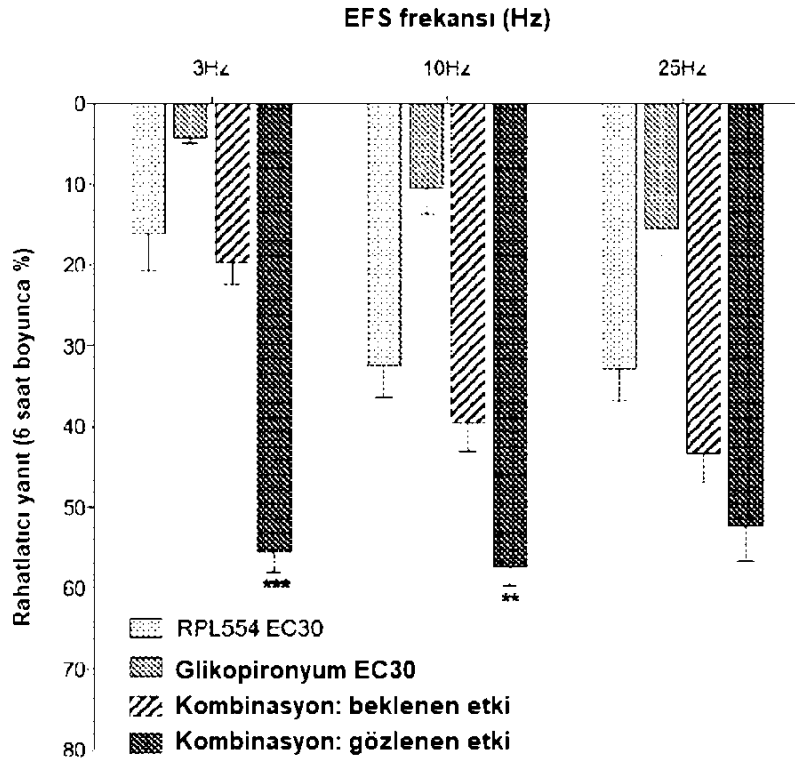


Şekil 14

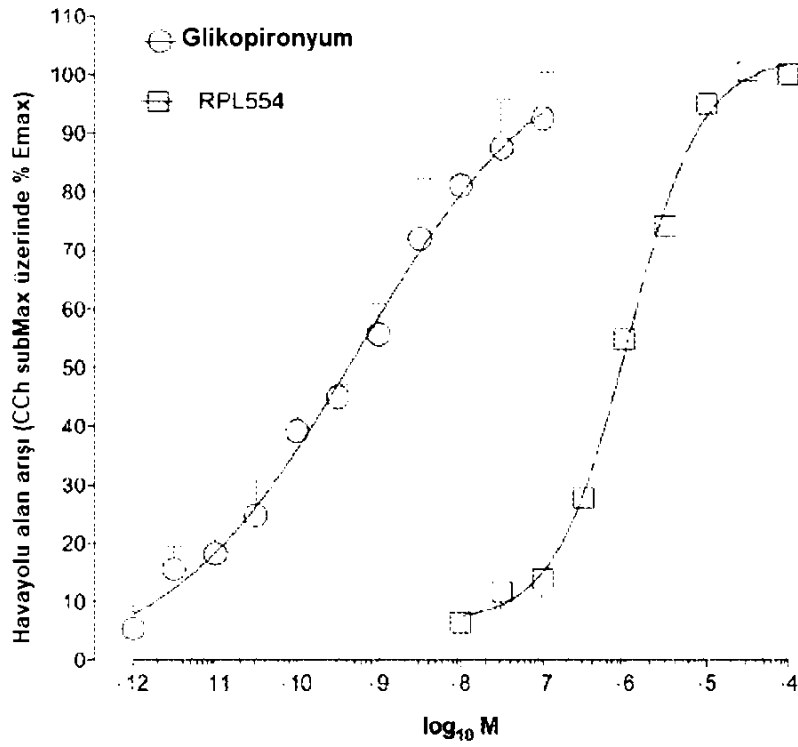


Şekil 15

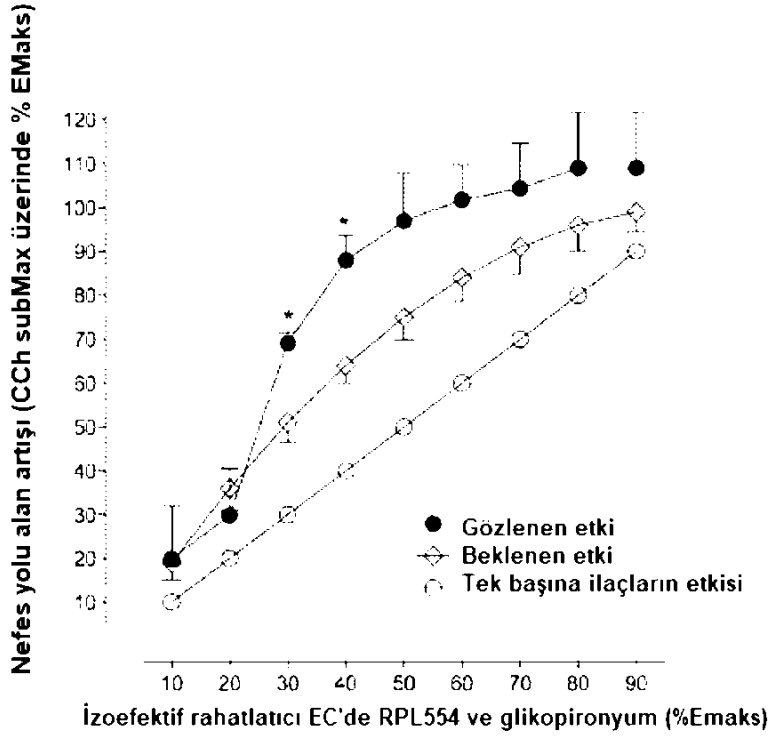




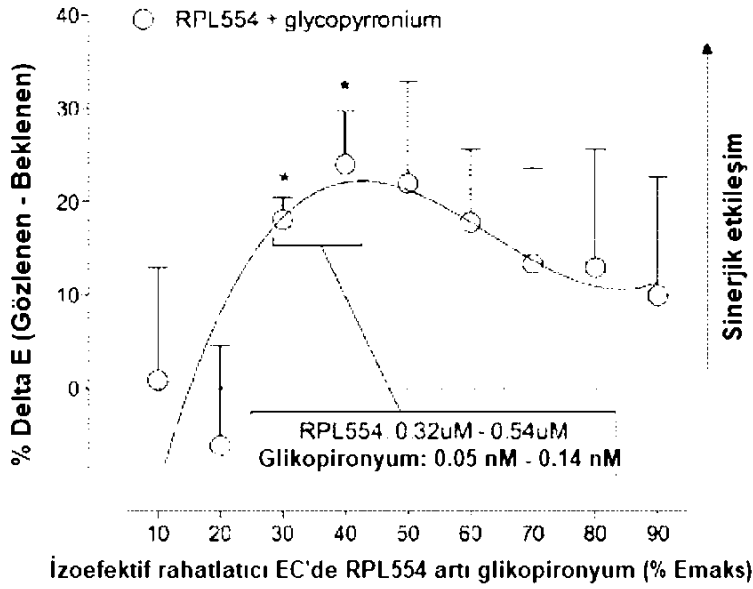
Şekil 16



Şekil 17



Şekil 18



Şekil 19