

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

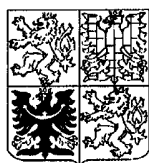
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

3744-97

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **30. 05. 96**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **01.06.95**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **95/457700**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **17. 06. 98**
(**Věstník č. 6/98**)

(86) PCT číslo: **PCT/US96/08037**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 96/38145**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

A 61 K 31/445
A 61 K 31/38

(71) Přihlášovatel:

ELI LILLY AND COMPANY, Indianapolis, IL,
US;

(72) Původce:

Singh Jai Pal, Carmel, IN, US;
Wiernicki Todd Robert, Indianapolis, IN, US;

(74) Zástupce:

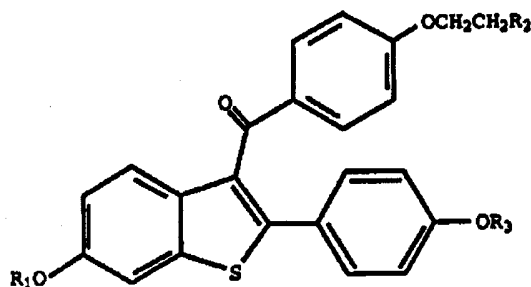
Švorčík Otakar JUDr., Hájkova 2, Praha 2,
12000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Způsob inhibice migrace buněk
vaskulárního hladkého svalstva**

(57) Anotace:

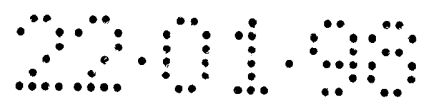
Předmětem vynálezu je použití sloučeniny obecného vzorce I, ve kterém R_1 a R_3 znamenají nezávisle na sobě atom vodíku, methyl nebo skupinu vzorce a/ nebo b/, kde Ar znamená popřípadě substituovaný fenyl, R_2 je vybrán ze souboru sestávajícího z pyrrolidinokupiny, hexamethyleniminoskupiny a piperidinokupiny, nebo její farmaceuticky přijatelné soli nebo solvátu, k přípravě farmaceutického přípravku pro inhibici migrace buněk vaskulárního hladkého svalstva.



O
"
-C-(C₁-C₆alkyl)

O
"
-C-Ar

CZ 3744-97 A3



Způsob inhibice migrace buněk vaskulárního hladkého svalstva

Oblast techniky

Vynález se týká způsobu inhibice migrace buněk vaskulárního hladkého svalstva.

Dosavadní stav techniky

Migrace buněk hraje důležitou roli při hojení ran, zánětu, syndromu respiračních potíží dospělých a zhoubném bujení [Savani a kol., J. Clin. Invest., 95, 1158 - 1168 (1995), Kullmann a kol., Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol., 8, 83 - 88 (1993), Brooks a kol., Cell, 79, 1157 - 1164 (1994)]. Migrace buněk vaskulárního hladkého svalstva z media do intimy hraje kritickou roli při tvorbě neointimy vedoucí k patogenezi vaskulárních chorob, jako je ateroskleróza, restenóza následující po PTCA a žilní bypasová ateroskleróza [Jackson a kol., Arteriosclerosis and Thrombosis, 13, 1218 - 1226 (1993), Brown a kol., Cardiovascular Res., 28, 1815 - 1820 (1995), Bell a Madri, Am. J. Pathol., 137, 7 - 12 (1990)]. Bylo zjištěno, že použití protilátek růstových faktorů stimulujících migraci buněk hladkého svalstva nebo peptidů, které blokují migraci buněk zprostředkovanou integrinem, inhibuje tvorbu neointimy u zvířecích modelů vaskulárního zranění [Ferns a kol., Science, 253, 1129 - 1132 (1991), Choi a kol., J. Vasc. Surg., 19, 125 - 135 (1994)].

Bylo dokázáno, že vaskulární restenóza po perkutánní

transluminální koronární angioplastice (PTCA) je odpovědí tkáně charakterizovanou počáteční a pozdní fází. Trombóza a/nebo vasospasmy mohou přispívat k počáteční fázi, která nastává hodiny až dny po PTCA. Zdá se, že pozdní fáze je ovládána migrací SMC, proliferací a vaskulárním přetvořením. U těchto chorob přispívá zvýšená akumulace SMC migrací z media do intimy výrazně k patogenezi choroby. Přílišná proliferace a migrace buněk vaskulárního hladkého svalstva může být primární mechanismus k reokluzi koronárních arterií následující po PTCA, atheroktomii, laserové angioplastice a chirurgickém arteriálním bypasu štěpu, viz "Intimal Proliferation of Smooth Muscle Cells as an Explanation for Recurrent Coronary Artery Stenosis after Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty," Austin a kol., Journal of the American College of Cardiology, 8, 369 - 375 (srpen 1985).

Vaskulární restenóza zůstává hlavní dlouhodobou komplikací následující po chirurgické intervenci blokových arterií perkutánní transluminální koronární angioplastikou (PTCA), atheroktomií, laserovou angioplastikou a arteriálním chirurgickým bypasem štěpu. U asi 35 % pacientů, kteří prodělali PTCA, se objevuje reokluze od tří do šesti měsíců po proceduře. Aktuální strategie ošetření vaskulární restenózy zahrnuje mechanickou intervenci pomocí zařízení, jako je stent, nebo farmakologickou terapii zahrnující heparin, nízkomolekulární heparin, kumarin, aspirin, rybí olej, antagonistu vápníku, steroidy a prostacyklin. Tyto strategie nedokázaly omezit rychlost reokluze a byly neúčinné pro ošetření a prevenci vaskulární restenózy, viz "Prevention of Restenosis after Percutaneous Transluminal Coronary

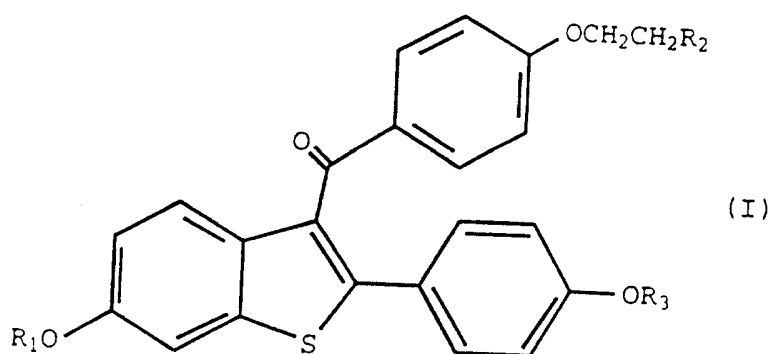
Angioplasty: The Search for a "Magic Bullet", Hermans a kol., American Heart Journal, 122, 171 - 187 (červenec 1991).

Při patogenezi restenózy dochází k nadměrné buněčné proliferaci a migraci, jakožto důsledku růstových faktorů produkovaných buněčnými složkami v krvi a porušené stěny tepny, které zprostředkovávají proliferaci buněk hladkého svalstva při vaskulární restenóze.

Prostředky, které inhibují migraci buněk hladkého svalstva, jsou vhodné pro ošetření a prevenci restenózy. Tento vynález se týká použití sloučenin jako inhibitorů migrace buněk hladkého svalstva.

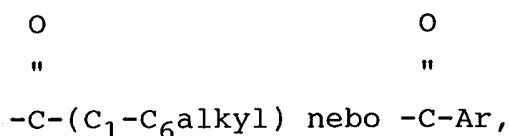
Podstata vynálezu

Vynález poskytuje použití sloučeniny obecného vzorce I



ve kterém

R_1 a R_3 znamenají nezávisle na sobě atom vodíku, methyl nebo skupinu vzorce



kde Ar znamená popřípadě substituovaný fenyl,

R₂ je vybrán ze souboru sestávajícího z pyrrolidinoskupiny, hexamethyleniminoskupiny a piperidinoskupiny,

nebo její farmaceuticky přijatelné soli a solvátu,

k přípravě farmaceutického přípravku pro inhibici migrace buněk vaskulárního hladkého svalstva.

Nyní se uvádí podrobný popis tohoto vynálezu.

Vynález je založen na zjištění, že vybrané skupiny sloučenin obecného vzorce I jsou vhodné pro inhibici migrace buněk vaskulárního hladkého svalstva. Způsoby ošetření jsou prakticky prováděny podáváním dávky sloučeniny obecného vzorce I nebo II nebo její farmaceuticky přijatelné soli nebo solvátu, které jsou účinné pro inhibici migrace buněk vaskulárního hladkého svalstva, člověku nebo jinému savci, který to potřebuje.

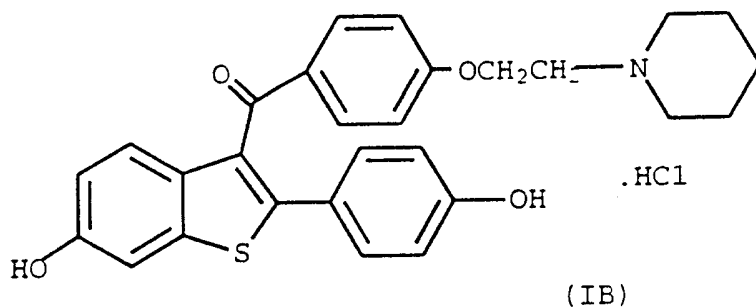
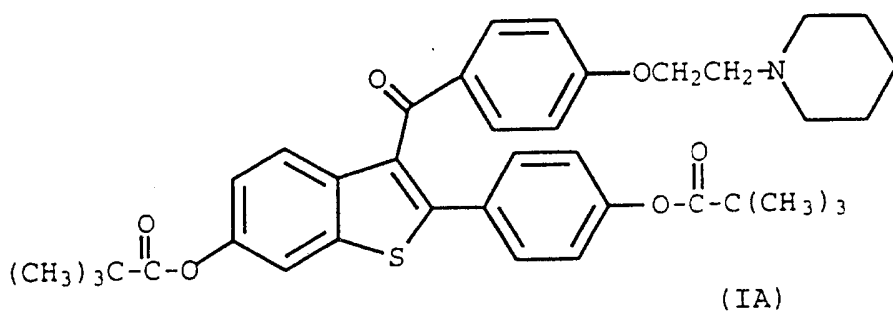
Pojem "inhibuje" je zvolen tak, aby obsahoval obecně přijímaný význam, který zahrnuje profylaktické ošetření lidského subjektu k zamezení migrace buněk hladkého svalstva a udržení pod kontrolou a/nebo ošetření existující migrace buněk hladkého svalstva. Používaný způsob zahrnuje jak terapeutické, tak profylaktické ošetření, podle toho, které je vhodné.



Obecně je sloučenina kombinována s běžnými excipienty, rozpouštědly nebo nosiči a lisována do tablet nebo formulována jako elixíry nebo roztoky vhodné pro orální podávání nebo podávání intramuskulární nebo intravenózní cestou. Sloučenina může být podávána transdermálně a může být formulována jako dávková forma postupně se uvolňující a tak podobně.

Sloučeniny obecného vzorce I mohou být vyrobeny podle zavedených způsobů, jako jsou detailně popsány v US patentových spisech č. 4 133 814, 4 418 068 a 4 380 635, na které se tímto odkazuje. Obecně způsob vychází z benzo[b]-thiofenu, který obsahuje 6-hydroxylovou skupinu a 2-(4-hydroxyfenylovou) skupinu. Výchozí sloučenina je chráněna, alkylována a zbavena chránicí skupiny za vzniku sloučenin obecného vzorce I. Příklady přípravy těchto sloučenin jsou uvedeny ve výše uvedených US patentech.

Součástí vynálezu je použití sloučenin vzorce IA a IB



Substituovaný fenyl zahrnuje fenyl substituovaný jednou nebo dvakrát alkylem obsahujícím 1 až 6 atomů uhlíku, alkoxy skupinou obsahující 1 až 4 atomy uhlíku, hydroxy skupinou, nitro skupinou, chlorem, fluorem nebo trichlormethylem nebo trifluormethylem.

Sloučeniny tvoří farmaceuticky přijatelné adiční soli s kyselinou nebo bází se širokou skupinou organických a anorganických kyselin a bází a zahrnují fyziologicky přijatelné soli, které jsou často používány ve farmaceutické chemii. Takové soli také nacházejí použití jako součást tohoto vynálezu. Typické anorganické kyseliny používané k tvorbě takovýchto solí zahrnují kyselinu chlorovodíkovou, bromovodíkovou, jodovodíkovou, dusičnou, sírovou, fosforeč-

nou, fosforičitou a podobně. Mohou být také použity soli odvozené od organických kyselin, jako jsou alifatické mono- a dikarboxylové kyseliny, alkanové kyseliny substituované fenylem, hydroxyalkanové a hydroxyalkandiové kyseliny, aromatické kyseliny, alifatické a aromatické sulfonové kyseliny. Takovéto farmaceuticky přijatelné soli pak zahrnují acetát, fenylacetát, trifluoracetát, akrylát, askorbát, benzoát, chlorbenzoát, dinitrobenzoát, hydroxybenzoát, methoxybenzoát, methylbenzoát, o-acetoxybenzoát, naftalen-2-benzoát, bromid, isobutyrylát, fenylbutyrylát, β -hydroxybutyrylát, butin-1,4-dioát, hexin-1,4-dioát, kaprát, kaprylát, chlorid, cinnamát, citrát, formiát, fumarát, glykolát, heptanoát, hippurát, laktát, malát, maleát, hydroxymaleát, malonát, mandelát, mesylát, nikotinát, isonikotinát, nitrát, oxalát, ftalát, tereftalát, fosfát, monohydrogenfosfát, dihydrogenfosfát, metafosfát, pyrofosfát, propiolát, propionát, fenylpropionát, salicylát, sebakát, sukcinát, suberát, sulfát, hydrogensulfát, pyrosulfát, sulfit, hydrogensulfit, sulfonát, benzensulfonát, p-bromfenylsulfonát, chlorbenzensulfonát, ethansulfonát, 2-hydroxyethansulfonát, methansulfonát, naftalen-1-sulfonát, naftalen-2-sulfonát, p-toluensulfonát, xylensulfonát, tartrát a podobně. Výhodnou solí je sůl kyseliny chlorovodíkové.

Farmaceuticky přijatelné adiční soli s kyselinou se obvykle tvoří reakcí sloučeniny obecného vzorce I s ekvimolárním množstvím nebo s přebytkem kyseliny. Reaktanty se obecně uvádí do styku v rozpouštědlech, ve kterých jsou oba rozpustné, jako je diethylether nebo benzen. K vysrážení solí za normálních okolností dochází asi po 1 hodině až 10 dnech a soli mohou být izolovány filtrací nebo rozpouštědlo může

být oddestilováno obvyklým způsobem.

Báze, které jsou obvykle používány pro tvorbu solí, zahrnují hydroxid amonný a hydroxidy alkalických kovů a kovů alkalických zemin, uhličitany a hydrogenuhličitany, stejně jako alifatické a aromatické aminy, alifatické diaminy a hydroxyalkylaminy. Zvláště vhodné báze pro přípravu adičních solí zahrnují hydroxid amonný, uhličitan draselný, hydrogenuhličitan sodný, hydroxid vápenatý, methyamin, diethylamin, ethylendiamin, cyklohexylamin a ethanolamin.

Farmaceuticky přijatelné soli mají obecně zvýšenou charakteristiku rozpustnosti ve srovnání se sloučeninou, od které jsou odvozeny, a tak jsou často lépe upravitelné do kompozice ve formě kapaliny nebo emulze.

Farmaceutické kompozice mohou být připraveny způsoby, které jsou známé ze stavu techniky. Tak například mohou být sloučeniny doplněné běžnými excipienty, rozpouštědly nebo nosiči a formovány do tablet, kapslí, suspenzí, prášků a podobně. Příklady excipientů, rozpouštědel a nosičů, které jsou vhodné do takových kompozic, zahrnují dále uvedené látky: plnidla a nastavovadla, jako jsou škrob, cukry, mannitol a křemičité deriváty pojiva, jako jsou karboxymethylcelulóza a jiné deriváty celulózy, algináty, želatina a polyvinylpyrrolidon, zvlhčovadla, jako je glycerol, dezintegrační činidla, jako jsou agaragar, uhličitan vápenatý a hydrogenuhličitan sodný, činidla pro zpomalení rozpouštění, jako je parafin, urychlovače resorpce, jako jsou kvartérní amoniové sloučeniny, povrchově aktivní činidla, jako jsou cetylalkohol, glycerolmonostearát, adsorpční nosiče, jako

jsou kaolin a bentonit a lubrikanty, jako jsou mastek, stearát vápenatý a hořečnatý a pevné polyethylglykoly.

Sloučeniny mohou být také formulovány jako elixíry nebo roztoky vhodné pro orální podávání nebo jako roztoky vhodné pro parenterální podávání, například intramuskulární, subkutánní nebo intravenózní cestou. Sloučeniny se navíc hodí k formulaci do postupně se uvolňujících dávkových forem a podobně. Kompozice mohou být sestaveny tak, že uvolňování aktivních složek probíhá pouze nebo výhodně v určité části zažívacího traktu, eventuálně po určité časovou periodu. Povlaky, potahy nebo ochranné matrice mohou být vyrobeny například z polymerních látek nebo vosků.

Konkrétní dávka sloučeniny obecného vzorce I, požadovaná pro inhibici migrace buněk hladkého svalstva podle tohoto vynálezu, bude závislá na závažnosti stavu, cestě podávání a podobných faktorech, které budou záviset na rozhodnutí ošetřujícího lékaře. Obecně budou přijatelné a účinné denní dávky od 0,1 do asi 1000 mg/den a obvykle od asi 50 do asi 200 mg/den. Takovéto dávky budou podávány subjektu, který potřebuje léčení, jedenkrát až asi třikrát každý den nebo častěji podle potřeby, aby inhibovaly účinně migraci buněk hladkého svalstva.

Lokální dodávání inhibičních množství aktivní sloučeniny pro ošetření migrace buněk vaskulárního hladkého svalstva nebo restenózy může být provedeno pomocí různých technik, které dostávají sloučeninu do nebo poblíž postiženého místa. Příklady technik lokálního podávání nejsou limitovány, ale pouze ilustrovány dostupnými technickými

metodami. Příklady zahrnují lokální katetry pro dodávání, specifické nosiče k dodání do určeného místa, implantáty, přímé injekce nebo přímé aplikace.

Lokální dodávání pomocí katetru dovoluje podávání farmaceutického prostředku přímo na místo postižení. Příklady lokálního podávání za použití balónového katetru jsou popsány v evropském patentovém spisu č. 383 492 A2 a US patentovém spisu č. 4 636 195 (Wolinsky, 13. ledna 1987).

Lokální podávání pomocí implantátu představuje chirurgické zavedení základní hmoty, která obsahuje farmaceutický prostředek, do postiženého místa. Implantovaná základní hmota uvolňuje farmaceutický prostředek pomocí difuze, chemické reakce nebo rozpouštědlových aktivátorů [Lange, Science, 249, 1527 - 1533 (září 1990)].

Příkladem lokálního podávání pomocí implantátu je použití stentu. Stenty jsou určeny pro mechanickou prevenci zhroucení a reokluze koronárních tepen. Začlenění farmaceutického prostředku do stentu dodává léčivou látku přímo na postižené místo. Lokální dodávání touto technikou popsal Kohn v Pharmaceutical Technology (říjen 1990).

Jiným příkladem je dodávací systém, ve kterém je polymer, který obsahuje farmaceutický prostředek, injektován do místa postižení v kapalně formě. Polymer se potom vytvrdí do formy implantátu *in situ*. Tato technika je popsána v PCT WO 90/03768 (Donn, 19. dubna 1990).

Jiným příkladem je dodávání farmaceutického prostředku

pomocí polymerního endoluminálního podávání. Tato technika používá katetr k aplikaci polymerního implantátu na vnitřní povrch lumenu. Farmaceutický prostředek začleněný do biologicky odbouratelného polymerního implantátu je poté uvolňován na operovaném místě. Tato technika je popsána v PCT WO 90/01969 (Schindler, 23. srpna 1989).

Posledním příkladem lokálního dodávání pomocí implantátu je přímá injekce váčků nebo mikročástic do postiženého místa. Tyto mikročástice mohou být složeny z látek, jako jsou proteiny, lipidy, cukry nebo syntetické polymery. Tyto mikročástice mají farmaceutický prostředek zabudovaný v mikročástici nebo na mikročástici jako povlak. Dodávací systémy zahrnující mikročástice popsal Lange v *Science*, 249, 1527 - 1533 (září 1990) a Mathiowitz a kol. v *J. App. Poly. Sci.*, 26, 809 (1981).

Lokální podávání pomocí specifických nosičů je popsáno jako připojení farmaceutického prostředku na nosič, který přivede léčivou látku do místa postižení. Příklady takovýchto technik dodávání zahrnují použití nosičů, jako jsou proteino-
vé ligandy nebo monoklonální protilátky [Lange, *Science*, 249, 1527 - 1533 (září 1990)].

Lokální dodávání přímou aplikací zahrnuje použití topických aplikací. Příkladem lokálního podávání přímou aplikací je aplikace farmaceutického prostředku přímo do arteriálního bypasového štěpu během chirurgického zákroku.

Obvykle je výhodné podávat sloučeninu obecného vzorce I ve formě adiční soli s kyselinou, jak je běžné při podávání

farmaceutických prostředků nesoucích bázecké skupiny, jako je piperidinový kruh. Je také výhodné podávat takovou sloučeninu orální cestou starším lidem (například ženám po menopauze). Pro tyto účely jsou dostupné následující orální dávkové formy.

Příklady provedení vynálezu

Prostředky

V dále popsaných prostředcích výraz "aktivní složka" znamená sloučeninu obecného vzorce I.

Prostředek 1: Želatinové kapsle

Tvrdé želatinové kapsle se připravují za použití těchto složek:

Složka	Množství (mg/kapsle)
aktivní složka	0,1 - 1000
škrob, NF	0 - 650
škrob, prášek schopný tečení	0 - 650
kapalný silikon, $3,50 \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$	0 - 15

Složky se smíchají, protlučou sítem s rozměrem částice 0,314 mm (No. 45 mesh U.S. sieve) a plní do tvrdých želatinových kapslí.

Dále se uvádějí příklady zvláštních prostředků ve

formě kapsle se sloučeninou obecného vzorce I, kde takovou sloučeninou je raloxifen.

Prostředek 2: Raloxifenová kapsle

Složka	Množství (mg/kapsle)
raloxifen	1
škrob, NF	112
škrob, prášek schopný tečení	225,3
kapalný silikon, $3,50 \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$	1,7

Prostředek 3: Raloxifenová kapsle

Složka	Množství (mg/kapsle)
raloxifen	5
škrob, NF	108
škrob, prášek schopný tečení	225,3
kapalný silikon, $3,50 \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$	1,7

Prostředek 4: Raloxifenová kapsle

Složka	Množství (mg/kapsle)
raloxifen	10
škrob, NF	103
škrob, prášek schopný tečení	225,3
kapalný silikon, $3,50 \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$	1,7

Prostředek 5: Raloxifenová kapsle

Složka	Množství (mg/kapsle)
raloxifen	50
škrob, NF	150
škrob, prášek schopný tečení	397
kapalný silikon, $3,50 \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$	3,0

Zvláštní prostředky popsané výše se mohou změnit a poskytnou dostatečné odchylky ve shodě s tímto vynálezem.

Prostředky ve formě tablet se mohou připravit za použití složek uvedených dále.

Prostředek 6: Tablety

Složka	Množství (mg/tableta)
aktivní složka	0,1 - 1000
celulóza, mikrokrytalická	0 - 650
oxid křemičitý, sublimovaný	0 - 650
kyselina stearová	0 - 15

Složky se smíchají a slisují do formy tablet.

Dále uvedeným postupem se podle jiného provedení mohou připravit tablety, z nichž každá obsahuje 0,1 až 1000 mg aktivní složky.

Prostředek 7: Tablety

Složka	Množství (mg/tableta)
aktivní složka	0,1 - 1000
škrob	45
celulóza, mikrokrytalická	35
polyvinylpyrrolidon (jako 10% roztok ve vodě)	4
natriumkarboxymethylcelulóza	4,5
stearát hořečnatý	0,5
mastek	1

Aktivní složka, škrob a celulóza se protlučou sítem s rozměrem částice 0,314 mm (No. 45 mesh U.S. sieve) a důkladně promíchají. S výsledným práškem se smíchá roztok

polyvinylpyrrolidonu a vzniklá hmota se potom protluče sítem s rozměrem částice 1,168 mm (No. 14 mesh U.S. sieve). Granule takto připravené se vysuší za teploty 50 až 60 °C a protlučou sítem s rozměrem částice 0,912 mm (No. 18 mesh U.S. sieve). Ke granulím se potom přidá natriumkarboxymethylcelulóza, stearát hořečnatý a mastek, které se protloukly sítem s rozměrem částice 0,246 mm (No. 60 mesh U.S. sieve), a po vzájemném smíchání se hmota lisuje na tabletovacím stroji za vzniku tablet.

Suspenze, které vždy obsahují 0,1 až 1000 mg léčiva na dávku objemu 5 ml, se připraví takto:

Prostředek 8: Suspenze

Složka	Množství (mg/5 ml)
aktivní složka	0,1 - 1000 mg
natriumkarboxymethylcelulóza	50 mg
sirup	1,25 mg
roztok kyseliny benzoové	0,10 ml
ochucovadlo	podle potřeby
barvivo	podle potřeby
vyčištěná voda	do 5 ml

Aktivní složka se protluče sítem se rozměrem částice 0,314 mm (No. 45 mesh U.S. sieve) a smíchá s natriumkarboxymethylcelulózou a sirupem za vzniku hladké pasty. Roztok kyseliny benzoové, ochucovadla a barviva se zředí určitým množstvím vody a potom přidá k pastě za míchání. Ke směsi se

poté přidá dostatečný objem vody, aby se dosáhlo požadovaného objemu.

Testy

Sloučeniny podle vynálezu mají schopnost inhibovat migraci buněk vaskulárního hladkého svalstva, jak je dokázáno dále.

Buňky hladkého svalstva prasečí aorty

Prasečí aorty byly získány z čerstvě poražených kastrovaných samců vepře na místních jatkách. Buňky hladkého svalstva byly získány stejným způsobem, jaký byl dříve popsán (Bonin a kol., 1989). Uvedeno v krátkosti, aorta byla podélně rozříznuta a endothelium bylo odstraněno jemným oškrabáním povrchu lumenu holicí čepelkou. Aorta byla poté několikrát promyta sterilním růstovým mediem, které obsahovalo Dubeccoem modifikované Eaglesovo medium (DMEM), 10% zárodečné hovězí sérum, L-glutamin (2 mM), penicilin (100 jednotek/ml) a streptomycin (100 µg/ml). Proužky mediálních buněk hladkého svalstva byly sloupnuty z vnější vrstvy cévní stěny a nakrájeny na 1 až 2mm kousky. Explantáty byly umístěny do 24 jamkové kultivační nádoby obsahující výše uvedené kultivační medium. Do 5 až 7 dnů byl pozorován růst buněk z explantátů. Po 10 až 14 dnech byly explantáty odstraněny, buňky byly podrobeny trypsinaci a přeočkovány do T75 baněk obsahujících 15 ml růstového media.

Lidské buňky hladkého svalstva

Lidské buňky koronárního a aortického hladkého svalstva byly získány od Clonetics Corporation (San Diego, CA, USA). Oba typy buněk byly kultivovány v růstovém mediu, které zde bylo popsáno u prasečích buněk hladkého svalstva.

Zkoušky migrace buněk hladkého svalstva

Řízená migrace buněk hladkého svalstva získaných z prasečích a lidských arterií v gradientu růstových faktorů odvozených od krevních destiček byla provedena za použití modifikované Boydenovy komory využívající 96 transjamkových systémů a polykarbonátových filtrů s 8 μm póry (Neuro Probe, Inc., Cabin John, NJ, USA). Buňky hladkého svalstva kultivované v T75 baňkách byly převedeny do Dubeccoem modifikovaného Eagles/F12 media prostého fenolové červeně (DMEM/F-12), obsahujícího 2% zárodečné hovězí sérum, L-glutamin (2 mM), penicilin (100 jednotek/ml) a streptomycin (100 g/ml). Po 24 hodinách byly buňky podrobeny trypsinaci za použití trypsin/EDTA prosté fenolové červeně ("phenol red free trypsin/EDTA") (Gibco, BRL). Buňky ($2,5 \times 10^{-6}$ buněk/ml) byly suspendovány v DMEM/F12 prostém fenolové červeně obsahujícím 1 % plasmy chudé na krevní destičky a různé koncentrace sloučeniny obecného vzorce I. 100 μl suspenze buněk bylo přidáno do vrchních jamek modifikované Boydenovy komory. Jamky spodní komory byly naplněny 43 μl DMEM/F-12 s obsahem 1 % plasmy chudé na krevní destičky, 5 ng/ml PDGF a různé koncentrace sloučenin. Komory byly inkubovány při teplotě 37 °C v 5% oxidu uhličitém po dobu 5 hodin. Migrační membrána byla odstraněna z komory a buňky z vrchní strany membrány byly odstraněny bavlněným tampónem. Buňky, které migrovaly na spodní stranu membrány, byly fixovány v methanolu a vybarveny

pomocí detekčního roztoku Diff-Quick (Baxter). Migrace buněk byla kvantitativně vyhodnocena buď spektrofotometricky, za použití mikrotitračního odečítače (ThermoMax, Molecular Dynamics, Inc.), nebo spočítáním buněk v 40x zvětšeném poli (HPF) za použití invertního mikroskopu (Nikon, Inc.).

Pro experimenty zahrnující předinkubaci buněk se sloučeninou bylo léčivo umístěno do media pro předběžné zpracování v určitých koncentracích, v oddělených baňkách, a inkubováno 18 hodin. Podmínky kultivace buněk při těchto zkouškách používajících předinkubaci byly přesně stejné jako podmínky použité při experimentech popsanych pro akutní účinky léčiva.

Tabulka I

Stimulace migrace buněk prasečího aortického hladkého svalstva (Porcine Aortic Smooth Muscle Cell - SMC - Migration) růstovým faktorem odvozeným od krevních destiček (Platelet-Derived Growth Factor - PDGF)

PDGF (ng/ml)	Migrace SMC (650 nm) (O.D. 650 nm)
0,04	0,016 ± 0,008
0,80	0,009 ± 0,003
1,50	0,013 ± 0,007
3,00	0,028 ± 0,008
6,00	0,058 ± 0,010
12,0	0,052 ± 0,007
25,0	0,047 ± 0,009

Tabulka II

Inhibice PDGF indukované prasečí aortické SMC migrace
sloučeninou A* a β -estradiolem

Migrace SMC (O. D. 650 nm)

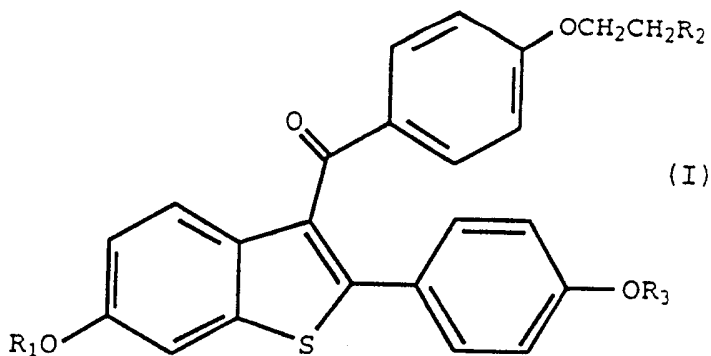
Koncentrace (nM)	Sloučenina A	β -Estradiol
0,0	0,053 ± 0,015	0,053 ± 0,015
0,1	0,035 ± 0,005	0,032 ± 0,003
1,0	0,030 ± 0,005	0,023 ± 0,003
10	0,032 ± 0,007	0,034 ± 0,006

* Sloučenina A má obecný vzorec I, kde R_1 a R_3 je vodík
a R_2 je pyrrolidinová skupina.

Výše uvedená aktivita naznačuje, že sloučeniny podle vynálezu jsou schopny inhibovat migraci buněk vaskulárního hladkého svalstva a její účinky.

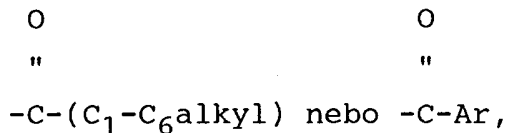
P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Použití sloučeniny obecného vzorce I



ve kterém

R₁ a R₃ znamenají nezávisle na sobě atom vodíku, methyl nebo skupinu vzorce



kde Ar znamená popřípadě substituovaný fenyl,

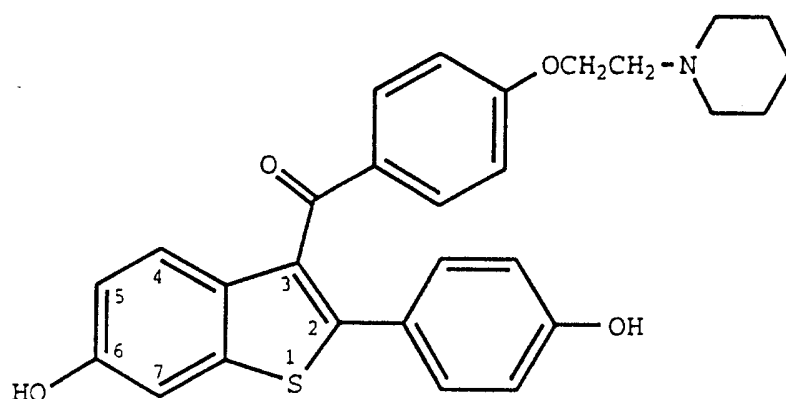
R₂ je vybrán ze souboru sestávajícího z pyrrolidinoskupiny, hexamethyleniminoskupiny a piperidinoskupiny,

nebo její farmaceuticky přijatelné soli a solvátu,

k přípravě farmaceutického přípravku pro inhibici migrace buněk vaskulárního hladkého svalstva.

2. Použití podle nároku 1, kde sloučenina obecného vzorce I je ve formě své hydrochloridové soli, k přípravě farmaceutického přípravku pro inhibici migrace buněk vaskulárního hladkého svalstva.

3. Použití podle nároku 1, kde sloučeninou obecného vzorce I je sloučenina vzorce



nebo její hydrochloridová sůl, k přípravě farmaceutického přípravku pro inhibici migrace buněk vaskulárního hladkého svalstva.

4. Použití podle nároku 1, k přípravě farmaceutického přípravku pro inhibici aterosklerózy, restenózy, zánětu nebo zhoubného napadení.