



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2229172 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.
A61K 31/519 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2014.12.22
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2014.09.10
(86)	Europeisk søknadsnr	08857354.8
(86)	Europeisk innleveringsdag	2008.12.02
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2010.09.22
(30)	Prioritet	2007.12.03, EP, 07301616
(84)	Utpekte stater	AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MT NL NO PL PT RO SE SI SK TR
	Utpekte samarbeidende stater	AL BA MK RS
(73)	Innehaver	AstraZeneca AB, , 151 85 Södertälje, SE-Sverige
(72)	Oppfinner	MICHEL, Jean-Baptiste, INSERM Unit 698CHU BichatClaude Bernard46 Rue Henri Huchard, F-75018 Paris, FR-Frankrike
(74)	Fullmektig	Tandbergs Patentkontor AS, Postboks 1570 Vika, 0118 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	Tikagrelor for behandling av abdominale aortaaneurismer
(56)	Anførte publikasjoner	EP-A1- 1 493 745, WO-A1-00/34283, WO-A1-01/92262, WO-A1-97/03084 WO-A1-99/05143, WO-A1-02/096428, WO-A2-2009/007675, US-A1- 2007 265 282 R.T. OWEN ET AL: "AZD6140", DRUGS OF THE FUTURE, vol. 32, no. 10, 1 January 2007 (2007-01-01), page 845, XP055024216, ISSN: 0377-8282, DOI: 10.1358/dof.2007.032.10.1133832 DATABASE MEDLINE [Online] US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US; June 1992 (1992-06), ETANI H ET AL: "[Platelet accumulation in abdominal aortic aneurysms and the effect of antiplatelet drugs: assessment by indium platelet scintigraphy].", XP002687010, Database accession no. NLM1640649 & KAKU IGAKU. THE JAPANESE JOURNAL OF NUCLEAR MEDICINE JUN 1992, vol. 29, no. 6, June 1992 (1992-06), pages 651-657, ISSN: 0022-7854 LLOYD G M ET AL: "Patients with abdominal aortic aneurysm: Are we missing the opportunity for cardiovascular risk reduction?", JOURNAL OF VASCULAR SURGERY, C.V. MOSBY CO., ST. LOUIS, MO, US, vol. 40, no. 4, 1 October 2004 (2004-10-01), pages 691-697, XP004584815, ISSN: 0741-5214, DOI: 10.1016/J.JVS.2004.06.039 DIEHM N ET AL: "Current evidence and prospects for medical treatment of abdominal aortic aneurysms", VASA, vol. 34, no. 4, November 2005 (2005-11), pages 217-223, XP9164626, ISSN: 0301-1526

Beskrivelse

Oppfinnelsens område

[0001] Den foreliggende oppfinnelsen er rettet mot anvendelsen av en P2Y₁₂-reseptor (også kjent som P_{2T}, P2Y_{ADP} eller P2T_{AC}) antagonist i behandlingen av abdominale aortaaneurismer.

Oppfinnelsens bakgrunn

[0002] Abdominalt aortaaneurisme (AAA) er en hyppig form for aterotrombotisk sykdom som er svært alders- og kjønnsrelatert (Bengtsson H et al. (1996), Ann N Y Acad Sci 800:1-24). AAA patofysiologi involverer ekstracellulær matriseproteolyse (Michel JB (2001), Arterioscler Thromb Vasc Biol 21:1389-1392), forsvinning av myke muskelceller (SMC) (Michel JB (2003), Arterioscler Thromb Vasc Biol 23:2146-2154), inflammatorisk celleinfiltrasjon og et fravær av cellekolonisering og heling (Fontaine V et al. (2004), Am J Pathol 164:2077-2087). Det ble nylig vist at den dynamiske biologien for den murale tromben, inkludert luminal fibrinogenese (Touat Z et al. (2006), Am J Pathol 168:1022-1030) og abluminal fibrinolyse (Carrell TW et al. (2006), Vascular 14:9-16; Fontaine V et al. (2002), Am J Pathol 161:1701-1710), spiller en betydelig rolle i utviklingen av AAA. I denne konteksten spiller interaksjonen mellom aktiverte plateaggregater og polymorfonukleær leukocyt (PMN) rekruttering (Sarda-Mantel L et al. (2006), Arterioscler Thromb Vasc Biol 26:2153-2159; Touat et al., 2006) en hovedrolle i fraværet av celleheling (Fontaine V et al. (2004), Am J Pathol 164:2077-2087).

[0003] Studier som viser at plater akkumulerer i AAA og støtter effekten av antiplatelegemidler i behandlingen av denne tilstanden er kjent (Etani H et al., The Japanese Journal of Nuclear medicine (1992) 29(4): 651-657). Anvendelsen av antiplatemidler hos pasienter med AAA er rapportert i Lloyd GM et al. (2004), Journal of Vascular surgery 40(1): 691-697. Vanlige terapier av AAA er gjennomgått f.eks. i Diehm N et al. (2005), Vasa-Journal of Vascular Diseases 34(4): 217-223.

[0004] Man har funnet at adenosin 5'-difosfat (ADP) virker som en nøkkelmediator for trombose. ADP-indusert plateaggregasjon er mediert ved P2Y₁₂-reseptorsubtypen plassert på platemembranen. P2Y₁₂-reseptoren (også kjent som P_{2T}, P2Y_{ADP} eller P2T_{AC})) er en G-proteinkoblet reseptor primært involvert i å mediere plateaktivering/-aggregasjon. De farmakologiske karakteristikkene av denne reseptoren har blitt beskrevet, f.eks. i referansene av Humphries et al. (1994), Br. J. Pharmacology, 113, 1057-1063, og Fagura et al. (1998), Br. J. Pharmacology, 124, 157-164. Det har blitt vist at antagonist på denne reseptoren gir betydelige forbedringer fremfor andre antitrombosemidler (se J. Med. Chem. (1999) 42, 213).

[0005] Internasjonal patentsøknad WO 99/05143 omtaler generelt en rekke triazol[4,5-*d*]pyrimidin-forbindelser med aktivitet som P_{2T} (også kjent som P2Y₁₂, P2Y_{ADP} eller P2T_{AC})-antagonister. Nylig har en ny klasse av direkte (ikke-prodroge) P_{2T}-reseptorantagonister blitt beskrevet som gir betydelige forbedringer fremfor andre antitrombosemidler. Internasjonal patentsøknad WO 00/34283 omtaler nye "direkte" P_{2T} reseptorantagonister, inkludert forbindelser med formel (I). Krystallinske og amorfe former av en triazol(4,5-*d*)pyrimidin-forbindelse er omtalt i WO01/92262.

[0006] Anvendelsen av {1*S*-[1 α ,2 α ,3 β (1*S**,2*R**),5 β]}-3-(7-{[2-(3,4-difluorfenyl)syklopropyl]amin}-5-(propyltio)-3*H*-1,2,3-triazol[4,5-*d*]pyrimidin-3-yl)-5-(2-hydroksyetoksy)syklopentan-1,2-diol som antiplate terapeutisk middel, dets virkning som P2Y₁₂(P_{2T})-antagonist og prekliniske og kliniske studier er evaluert i Owen RT et al. (2007), *Drugs of the Future* 32(10): 845-853. EP 1 493 745 A1 omtaler anvendelsen av denne forbindelsen som antiplatemiddel for anvendelse i behandlingen av arteriell trombotisk komplikasjon.

Kort beskrivelse av figurene

[0007]

Fig. 1. Hindring av aneurismekspansjon ved behandling med forbindelse (A). Måling av den eksterne aneurismediameteren etter aneurismeinduksjon på dag 10 (a) og dag 42 (b). Den eksterne diameteren var lik i kontrollen (åpent kvadrat) og forbindelse (A)-behandlede (fylt kvadrat) rotter etter 10 dager (a), men var betydelig lavere i forbindelse (A)-gruppen etter 42 dagers behandling (b). (c) Økningen i aneurismediameter var lik for de to gruppene på dag 10 men var betydelig redusert i rottene behandlet med forbindelse (A) (fylte søyler) på dag 42. Ingen økning i aneurismediameter ble observert mellom dag 10 og 42 for rotter behandlet med forbindelse (A). **, $P < 0,001$.

Fig. 2. Hemming av utvikling av mural trombe ved behandling med forbindelse (A). (a) Farging med Picro sirius-rød av representative aneurismer fra kontroll (venstre) og forbindelse (A)-behandlede rotter (høyre) på dag 42. Aorta-diameteren og trombe (T)-område var større i aneurismer fra kontroll sammenlignet med rotter behandlet med forbindelse (A). Merk at avsetningen av kollagen (rød farging) inne i tromben kun er observert i forbindelse (A)-gruppen. (b) Tromboseområdet/veggområdet økte mellom dag 10 og 42 i begge rottegruppene, men var betydelig redusert ved behandling med forbindelse (A) (fylte søyler) både ved dag 10 og 42. (c) Analyse innen gruppen viste at den større aneurismediameteren på dag 42 ble forbundet med et større trombose-område ($R^2 = 0,13$ og $R^2 = 0,40$ for henholdsvis kontroll (åpne sirkler) og

forbindelse (A)-behandlede rotter (fylte sirkler), $P < 0,05$). (d) Immunfarging av CD41 (integrin α_{IIb} , en platemarkør) inne i den murale tromben til aneurismer fra kontroll (venstre) og forbindelse (A)-behandlede rotter (høyre) på dag 42. L: aortahulrom. Fargekvantifisering viser at behandling i 42 dager med forbindelse (A) reduserer den relative størrelsen på det CD41-positive området inne i den murale tromben betydelig sammenlignet med det sett i kontrollgruppen. Opprinnelig forstørrelse, x200. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$.

Fig. 3. Hemming av inflammatorisk infiltrasjon ved behandling med forbindelse (A). (a) Immunfarging av PMN-er inne i den murale tromben til aneurismer fra kontroll (venstre) og forbindelse (A)-behandlede rotter (høyre) på dag 42. Kvantifisering av PMN-infiltrasjon inne i den murale tromben og veggen på dag 10 (midterste panel) og 42 (nedre panel). Etter 10 og 42 dager ble PMN-er for det meste funnet inne i den murale tromben til kontrollaneurismene (åpne søyler). Forbindelse (A)-behandling (fylte søyler) hemmet infiltrasjonen av PMN-er i tromben på begge tidspunkter. (b) Immunfarging av makrofager inne i den murale tromben til aneurismer fra kontroll (venstre) og forbindelse (A)-behandlede rotter (høyre) på dag 42. Kvantifisering av makrofaginfiltrasjon i den murale tromben og veggen på dag 10 (midterste panel) og 42 (nedre panel). Makrofager ble funnet inne i den murale tromben samt i veggen til kontrollaneurismer (åpne søyler). Etter 42 dager var flere makrofager til stede inne i veggen enn i tromben. Forbindelse (A)-behandlede (fylte søyler) hemmet infiltrasjonen av makrofager inne i tromben på begge tidspunkter. Reduksjonen i makrofaginnhold inne i veggen etter 10 eller 42 dager med behandling med forbindelse (A) nådde ikke statistisk signifikans. L: aortahulrom. Opprinnelig forstørrelse, x200. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$.

Fig. 4. Redusert MMP-9 uttrykk med forbindelse (A)-behandling. (a) MMP-9 immunfarging inne i den murale tromben til aneurismene fra kontroll (venstre) og forbindelse (A)-behandlede rotter (høyre) på dag 42. Kvantifisering av MMP-9-farging på dag 42 viste at området okkupert av MMP-9-farging i forhold til veggområdet var større inne i tromben enn inne i veggen i kontrollaneurismene (åpne søyler). Behandling med forbindelse (A) reduserte størrelsen på det MMP-9-positive området sterkt, både inne i tromben og veggen (fylte søyler). L: aortahulrom. Opprinnelig forstørrelse, x200. **, $P < 0,001$; ***, $P < 0,0001$. (b) Det var en positiv korrelasjon mellom størrelsen på det MMP-9-positive området inne i tromben og det totale trombeområdet på dag 42 når alle rottene ble vurdert (kontroller, åpne sirkler; forbindelse (A)-behandlet, fylte sirkler), $R^2 = 0,79$, $P < 0,0001$.

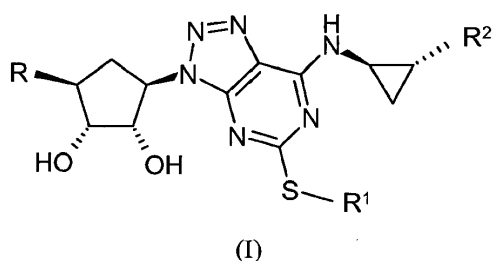
Fig. 5. SMC-kolonisering av den murale tromben og bevaring av elastiske lameller inne i aneurismeveggen med behandling med forbindelse (A). (a) Orcein-farging av aneurismer fra kontroll (venstre) og forbindelse (A)-behandlede rotter (høyre) på dag 42. Piler indikerer de elastiske lamellene. Kvantifisering av området for elastiske lameller viste den nyttige effekten av behandling med forbindelse (A) (fylte søyler) både på dag 10 og 42. (b) Immunfarging av SMC-er inne i den murale tromben til aneurismer fra kontroll (venstre) og forbindelse (A)-behandlede rotter (høyre) på dag 42. Pilene indikerer SMC-er inne i tromben. Tetthet av SMC-er inne i den murale tromben og veggen på dag 10 (midterste panel) og 42 (nedre panel) økte mellom dag 10 og 42 i begge grupper. Behandling med forbindelse (A) (fylte søyler) forbedret trombekoloniseringen av SMC-er etter 42 dager sammenlignet med kontroller (åpne søyler), mens ingen effekt av forbindelse (A) kunne bli observert inne i veggen. **L:** hulrom; **M:** media; **A:** adventitia. Opprinnelig forstørrelse, x100. **, $P < 0,001$.

Oversikt over oppfinnelsen

[0008] Den foreliggende oppfinnelsen er rettet mot anvendelsen av forbindelsen {1S-[1 α ,2 α ,3 β (1S*,2R*),5 β]}-3-(7-{[2-(3,4-difluorfenyl) syklopropyl]amin}-5-(propyltio)-3H-1,2,3-triazol[4,5-d]pyrimidin-3-yl)-5-(2-hydroksyetoksy)syklopentan-1,2-diol for fremstillingen av et legemiddel for behandlingen av abdominale aortaaneurismer.

[0009] Den foreliggende oppfinnelsen er rettet mot forbindelsen {1S-[1 α ,2 α ,3 β (1S*,2R*),5 β]}-3-(7-{[2-(3,4-difluorfenyl) syklopropyl]amin}-5-(propyltio)-3H-1,2,3-triazol[4,5-d]pyrimidin-3-yl)-5-(2-hydroksyetoksy)syklopentan-1,2-diol for anvendelse i behandlingen av abdominale aortaaneurismer.

[0010] Anvendelsen av en forbindelse med formel (I):



hvor:

R er CH₂OH eller O(CH₂)₂OH;

R¹ er C₃₋₄ alkyl eventuelt substituert av tre halogenatomer;

R² er fenyl eller 3,4-difluorfenyl;

eller et farmasøytisk akseptabelt derivat derav,

for behandlingen eller hindringen av abdominale aortaaneurismer som beskrevet heri.

[0011] Farmasøytisk akseptable derivater av en forbindelse med formel (I) inkluderer salter (f.eks. farmasøytisk akseptable ikke-toksiske organiske eller uorganiske syreaddisjonssalter, slik som et salt av salt-, hydrobrom-, salpeter-, svovel- eller eddiksyre), solvater og solvater av salter.

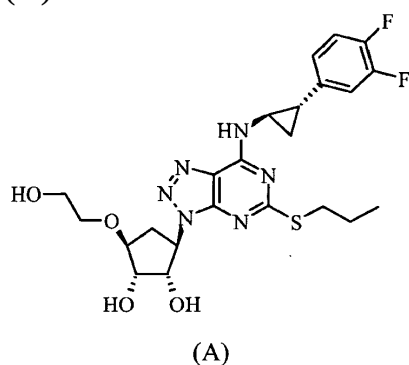
[0012] En forbindelse med formel (I) for behandlingen eller hindringen av abdominale aortaaneurismer er beskrevet heri.

[0013] Anvendelsen av en forbindelse med formel (I) for fremstillingen av et legemiddel for behandlingen eller hindringen av abdominale aortaaneurismer er beskrevet heri.

[0014] Anvendelsen av en forbindelse med formel (I) i en fremgangsmåte for behandlingen eller hindringen av abdominale aortaaneurismer, hvori en farmasøytisk og farmakologisk effektiv mengde av forbindelsen med formel (I) blir administrert til en person med behov for slik behandling eller hindring er beskrevet heri.

[0015] Anvendelsen av en forbindelse med formel (I) i en fremgangsmåte for behandlingen eller hindringen av abdominale aortaaneurismer, hvori forbindelsen med formel (I) blir administrert til en person med behov for slik behandling eller hindring er beskrevet heri.

[0016] R^1 kan være n-propyl, 3,3,3-trifluorpropyl eller n-butyl. I en utførelsesform kan R^2 være 3,4-difluorfenyl. I én utførelsesform er forbindelsen med formel (I) forbindelse (A):



[0017] Forbindelsen (A) ovenfor blir konvensjonelt kalt {1S-[1 α ,2 α ,3 β (1S*,2R*),5 β]}-3-(7-{[2-(3,4-difluorfenyl) syklopropyl]amin}-5-(propyltio)-3H-1,2,3-triazol[4,5-d]pyrimidin-3-yl)-5-(2-hydroksyetoksy)syklopentan-1,2-diol.

[0018] Egnede formuleringer for å administrere en forbindelse med formel (I) er kjent i teknikken og inkluderer de kjent fra WO00/34283, WO2008/024044 og WO2008/024045. En farmasøytisk formulering av forbindelse (I) kan, og virkelig vanligvis vil, inneholde forskjellige andre ingredienser kjent i teknikken, f.eks. bevaringsmidler, stabiliserende midler, viskositetsregulerende midler, emulgerende midler eller bufrende midler. Dermed vil den farmasøytiske formuleringen av

forbindelse (I) normalt omfatte en total mengde av forbindelsen med formel (I) i området fra 0,05 til 99 vektprosent, slik som i området fra 0,10 til 70 vektprosent eller i området fra 0,10 til 50 vektprosent, alle vektprosent er basert på total formulering.

[0019] Egnede doser av forbindelsen med formel (I) kan bli bestemt av den

medisinske utøveren eller annen fagperson, og vil avhenge av alvorligheten av tilstanden og på personen som skal behandles samt forbindelsen(e) som blir anvendt.

Egnede doser av aktiv forbindelse i terapeutisk og/eller profylaktisk behandling av pattedyr, særlig menneske, inkluderer disse som gir en gjennomsnittelig plasma-konsentrasjon på opp til 10 $\mu\text{mol/l}$, f.eks. i området 0,001 til 10 $\mu\text{mol/l}$ over

behandlingsperioden for den relevante tilstanden. I alle tilfeller vil legen eller en fagperson kunne bestemme den aktuelle dosen som vil være mest egnet for en enkelt person som trolig varierer med tilstanden som skal behandles, samt vekt, kjønn og respons fra den enkelte personen som skal behandles. Doseringene nevnt ovenfor er eksempler på gjennomsnittstilfeller. Naturligvis kan det være individuelle tilfeller der høyere eller lavere doseringsområder er foretrukket og slik er innen denne oppfinnelsens område.

[0020] For å unngå tvil inkluderer begrepet "behandling" terapeutisk og/eller profylaktisk behandling.

Biologisk evaluering

Plateaggregering

[0021] Friske Lewis rotter av hankjønn (Iffa Credo, Lyon, Frankrike) fikk en enkel oral dose av forbindelse (A) (10 mg/kg kroppsvekt). Friskt venøst blod fra to rotter ble tatt før og ved 2, 10 og 24 t etter administrering av forbindelse (A) og sentrifugert ved 250 g i 3 min ved romtemperatur. Platerikt plasma ble klargjort som tidligere beskrevet (Eckly et al., 2001). 450 μl platesuspensjon ble omrørt ved 1100 opm og aktivert ved tilsetningen av 5 μM ADP (Sigma, Saint Quentin-Fallavier, Frankrike) i et sluttvolum på 500 μl . Aggregering ble målt ved romtemperatur med en turbidimetrisk fremgangsmåte i et dobbeltkanal aggregometer (Chrono-Log, West Havertown, PA, USA). Omfanget av aggregering ble anslått ved å måle den maksimale kurvehøyden over grunnlinjen.

AAA-modell

[0022] Forsøksaortaaneurismer ble indusert ved å implantere et segment av natriumdodekylsulfat-decellularisert aorta fra marsvin (xenogenisk matrise) i rotteaortaer (Allaire E. et al. (1994), J Vasc Surg 19:446-456). Denne AAA-modellen er karakterisert av immuninflammatorisk skade av den xenogeneiske ekstracellulære

matrisen (Allaire E et al. (1997), Surgery 122:73-81; Allaire E et al. (1996), Transplantation 62:794-803). I korthet ble 46 Lewis-rotter av hankjønn (250 g) og 46 marsvin (280 g) (Iffa Credo, Lyon, Frankrike) huset ifølge prinsippene til Laboratory Animal Care formulert av den Europeiske unionen. Dyr ble anestetisert ved intra-

5 peritoneal injeksjon av pentobarbital (5 mg/100 g kroppsvekt). Infrarenale aortaer fra marsvin (1,5 cm) ble tatt og decellularisert med natriumdodekylsulfat-behandling for å oppnå rør av intakt ekstracellulær matrise som ble ortotopisk transplantert i aorta til Lewis-rotter med 10/0 nylonavbrutte suturer (xenograft) (Allaire et al., 1997; Allaire et al., 1996). Den opprinnelige diameteren på graftene ble målt *in situ*, umiddelbart etter

10 uttak under et binokulært mikroskop. Etter 24 t, ble rottene tilfeldig fordelt i to like grupper, behandlet med forbindelse (A) (10 mg/kg kroppsvekt to ganger i døgnet ved oral administrering) eller med fortynningsvæsken fra forbindelse (A) (1 % karboksymetylcellulose/0,1 % Tween-80 i vann) i 10 dager (D 10, $n = 9$ for hver gruppe) eller 6 uker (D42, $n = 14$ for hver gruppe). Ved avliving ble rottene dypt anestetisert,

15 graftdiameteren ble målt på nytt og aorta ble dissekert ut og fiksert i 4 % paraformaldehyd. Aortaprøver ble støpt inn i parafin og kuttet ved 5 μm .

Histologisk og immunhistokjemisk analyse

[0023] Deler ble farget med picro Sirius-rød for å gjøre kollagen og fibrin synlig og med orcein for å gjøre elastin synlig. Immunhistokjemi ble utført med antihumant α -

20 actin (fortynning 1:500, Dako, Trappes, Frankrike), anti-CD68 (makrofager, fortynning 1:1000, Serotec, Cergy Saint-Christophe, Frankrike), anti-rotte polymorfonukleære leukocytter (fortynning 1:3000, Cedarlane, Ontario, Canada), anti-CD41 (integrin α_{IIb} , plater, fortynning 1:50, Santa Cruz Biotechnologies) og anti-MMP-9 (fortynning 1:50, Calbiochem, Darmstadt, Tyskland) som primære antistoffer og et peroksidase Vector

25 ABC-sett for påvisning (Vector Labs, Burlingame, CA, USA). Celler ble talt med et gitter i mikroskopets okular og gjennomsnittsberegnet i 4 symmetriske felt på det samme objektglasset. Størrelsen på områdene representert av trombe, elastisk fiber, AAA-vegg og MMP-9- og CD41-positiv farging ble målt ved morfometrisk analyse med Histolab-programvare (Microvision Instruments, Evly, Frankrike). Trombe-

30 områder ble bestemt på Sirius-rød objektglass. Området okkupert av positiv farging ble kvantifisert av den fargepåvisende modus i dataprogrammet i den indre tromben og ytre veggen.

Statistiske analyser

[0024] Resultat er uttrykt som gjennomsnitt $\pm$ S.D. Den prosentvise diameterøkningen

35 ble kalkulert som følger: (diameter ved høsting - diameter ved grafting) $\times$ 100/diameter ved grafting. Sammenligning mellom de to gruppene ble utført med ikkeparametrisk

Mann-Whitney U-test (Statview, versjon 4.5). Hyppigheten av aneurismer med stor diameter i de 2 forskjellige gruppene ble analysert ved X^2 test. Enkel regresjonsanalyse ble anvendt for å teste for korrelasjons mellom forskjellige parametere. $P < 0,05$ ble ansett betydelig.

5 **Resultater**

Aneurysmediameter

[0025] Decellulærisert ekstracellulær matrisexenografter utviklet i aneurismer, som vist ved økningen i den eksterne aneurysmediameteren observert i ubehandlede kontrollrotter 10 dager ($204,6 \pm 71,2 \%$, $n = 9$) og 42 dager ($359,1 \pm 113,3 \%$, $n = 14$) etter grafting (fig. 1). Behandling med forbindelse (A) i 10 dager endret ikke økningen i ekstern aneurysmediameter ($197,3 \pm 52,8 \%$, $n = 9$), sammenlignet med ubehandlede rotter; den gjennomsnittlige eksterne aneurysmediameteren var lik mellom de to gruppene ($2,22 \pm 0,56$ mm vs. $2,22 \pm 0,70$ mm, i henholdsvis forbindelse (A)-behandlede og kontrollrotter) (fig. 1a,c). Etter 42 dagers behandling ble imidlertid den gjennomsnittlige eksterne aneurysmediameteren betydelig lavere i gruppen behandlet med forbindelse (A) ($3,61 \pm 1,46$ mm, $n = 14$ vs. $5,21 \pm 1,22$ mm, $n = 14$, hos henholdsvis forbindelse (A)-behandlede og kontrollrotter), og prosentøkningen i ekstern diameter var betydelig redusert (fig. 1b,c). Behandling med forbindelse (A) hindret dermed aneurismeeekspansjon, som vist ved forskjellen i prosentøkningen i aortadiameter observert i kontrollrotter mellom dag 10 og 42, som ble redusert i forbindelse (A)-gruppen (fig. 1c). I tillegg dominerte forekomsten av større aneurismer på dag 42 (diameter > 4 mm) i kontrollgruppen, sammenlignet med gruppen behandlet med forbindelse (A) ($X^2=11,6, P<0,001$).

Dannelse av mural trombe

[0026] Forsøksaneurismer som utvikler fra decellulærisert ekstracellulære matrisexenografter er karakterisert av nærværet av en mural trombe, som tidligere beskrevet (Touat et al., 2006) (fig. 2a). I kontrollgruppen representerte forholdene for trombeområde/veggområde $0,22 \pm 0,14$ på dag 10 og økte til $0,78 \pm 0,89$ på dag 42 (fig. 2b). Behandling med forbindelse (A) reduserte betydelig trombe/veggområdet, både på dag 10 og 42 (henholdsvis $0,07 \pm 0,05$ og $0,35 \pm 0,44$) (fig. 2b). Denne relative reduksjonen i trombeområdet ble forbundet ned en betydelig reduksjon i det CD41-positive området (integrin α_{IIb} , en platemarkør) innen tromben på 42 dager ($0,13 \pm 0,16$ og $0,68 \pm 1,36$ for henholdsvis forbindelse (A)-behandlet og kontrolgrupperotter, $P = 0,005$) (fig. 2c). Til sist var det en betydelig korrelasjon mellom trombeområdet og aneurysmediameteren på dag 42 når alle rottene ble vurdert ($R^2 = 0,25$, $P = 0,0003$).

Analyse innen gruppen viste at forbindelse (A)-behandling reduserte retningskoeffisienten(e) for korrelasjonen betydelig sammenlignet med kontrollgruppen (forbindelse (A): $s = 0,17$, $R^2 = 0,40$; kontroll: $s = 0,30$, $R^2 = 0,13$) (fig. 2c), og tilveiebringer bevis for at hemmingen av plateaktivering av forbindelse (A) vil begrense eksperimentell AAA-progresjon.

Inflammatorisk infiltrasjon

[0027] Aneurismeutvikling blir forbundet med en inflammatorisk prosess som involverer polymorfonucleære leukocytter (PMN) og makrofager. Begge inflammatoriske celler var tilstede inne i den murale tromben og aneurismeveggen (fig. 3). PMN-er ble imidlertid mest funnet inne i den murale tromben der de representerte den viktigste inflammatoriske celletypen. Motsatt dominerte makrofager inne i veggen. Mens PMN-tetthet ble redusert mellom dag 10 og 42, økte makrofagtettheten (fig. 3). Behandling med forbindelse (A) hemmet betydelig infiltrasjonen av PMN-er og makrofager i den murale tromben på dag 10 og 42 (fig. 3). Det var ingen endring i makrofaginfiltrasjon i aneurismeveggen.

MMP-9-uttrykk i aneurisme og bevarte elastiske fibre i mediene

[0028] Uttrykket for MMP-9, vist ved immunfarging ble påvist i kontrollrotter både i tromben og i aneurismeveggen (fig. 4a). Det MMP-9-positive området var større inne i trombosen enn i veggen på dag 42. Behandling med forbindelse (A) reduserte markant det MMP-9-positive området, både i tromben og veggen (fig. 4a). I tillegg var det en betydelig positiv korrelasjon mellom trombeområdet og MMP-9-uttrykket inne i tromben på dag 42 når alle rottene ble vurdert ($R^2 = 0,79$, $P = 0,0001$) (fig. 4b). Ved å reflektere det reduserte MMP-9-uttrykket, ble betydelig bevaring av de elastiske fibre for media observert med behandling med forbindelse (A) på begge tidspunkter (fig. 5a). Selv om det relative området okkupert av de elastiske fibre forblir konstant i kontrollrottene mellom dag 10 og dag 42, økte området for elastiske fibre sterkt i rotter behandlet med forbindelse (A) (fig. 5a).

VSMC-kolonisering av den murale tromben

[0029] SMC-er koloniserte det decellulæriserte graftet og delen av den murale tromben som utviklet nær veggen, som vist ved den α -aktinpositive fargingen inne i veggen og tromben (fig. 5b). Videre økte tettheten av SMC-er fra dag 10 til dag 42, både i veggen og tromben, og tilveiebringer bevis for tendensen for modellen for å initiere en spontan helingsprosess over tid. Mens behandling med forbindelse (A) i 10 dager ikke endret tettheten av SMC-er inne i tromben sammenlignet med kontroller,

forbedret behandling i 42 dager betydelig SMC-koloniseringen av tromben (fig. 5b). Dette ble forbundet med en avsetning av kollagen, som vist ved Sirius-rød-farging (fig. 2a). Motsatt påvirket ikke behandling med forbindelse (A) SMC-kolonisering av veggen etter hverken 10 eller 42 dager (fig. 5b).

5 **Konklusjon**

[0030] Hindring av AAA mural trombedannelse via hemming av plateaktivering med forbindelse (A) begrenset eksperimentell AAA progresjon. Ved å blokkere plateaktivering og redusere dannelsen av mural trombe, reduserte forbindelse (A) rekrutteringen av leukocytter i tromben og den følgende beriking med proteaser, som fører til bevaringen av veggintegritet og til begynnelsen av heling som vist ved forbedringen av mesenkymatøs cellekolonisering.

Patentkrav

1. Anvendelsen av forbindelsen {1*S*-[1*α*,2*α*,3*β*(1*S**,2*R**),5*β*]}-3-(7-{[2-(3,4-difluorfenyl) syklopropyl]amin}-5-(propyltio)-3*H*-1,2,3-triazol[4,5-*d*]pyrimidin-3-yl)-5-(2-hydroksyetoksy)syklopentan-1,2-diol for fremstillingen av et legemiddel for
5 behandlingen av abdominale aortaaneurismer.

2. Forbindelsen {1*S*-[1*α*,2*α*,3*β*(1*S**,2*R**),5*β*]}-3-(7-{[2-(3,4-difluorfenyl) syklopropyl]amin}-5-(propyltio)-3*H*-1,2,3-triazol[4,5-*d*]pyrimidin-3-yl)-5-(2-hydroksyetoksy)syklopentan-1,2-diol for anvendelse i behandlingen av abdominale
10 aortaaneurismer.

Tegning

Fig. 1A

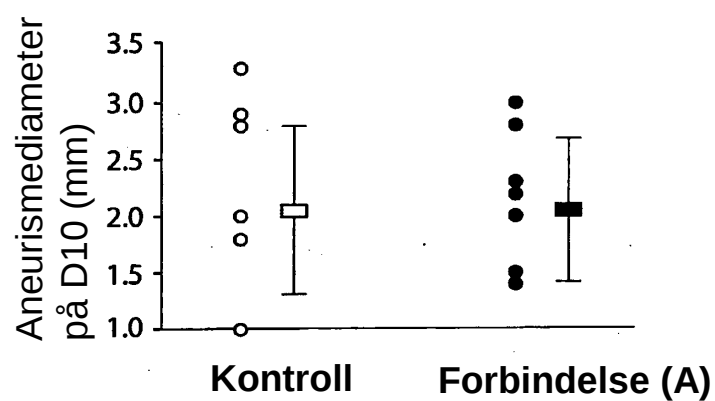


Fig. 1B

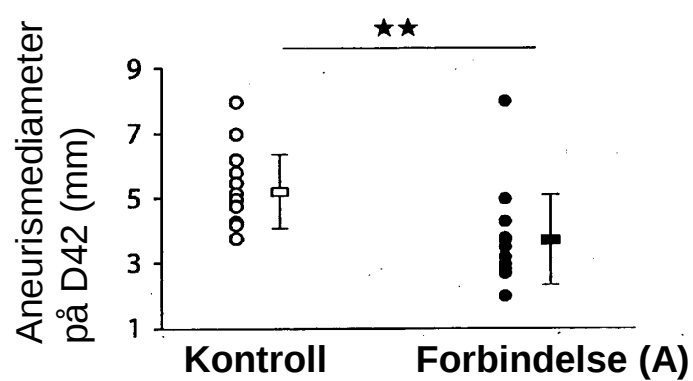


Fig. 1C

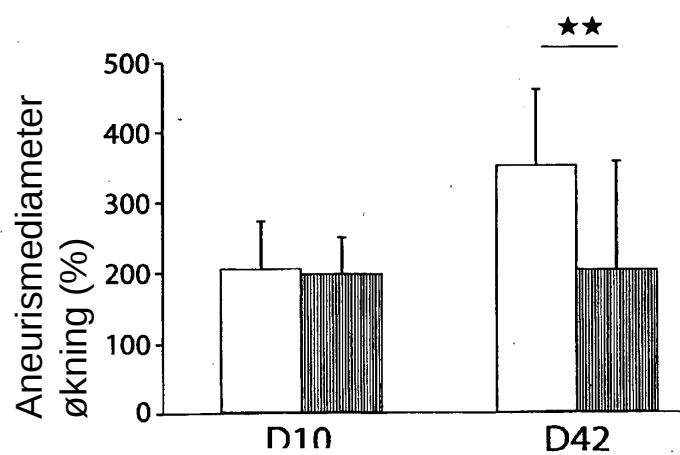


Fig. 2A

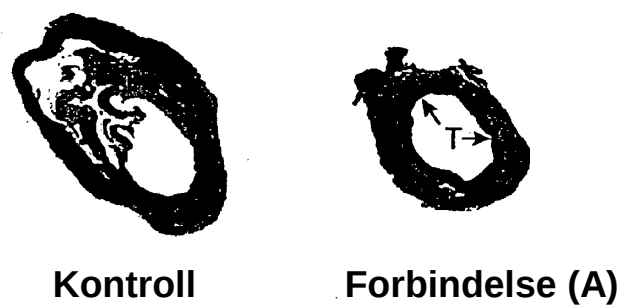


Fig. 2B

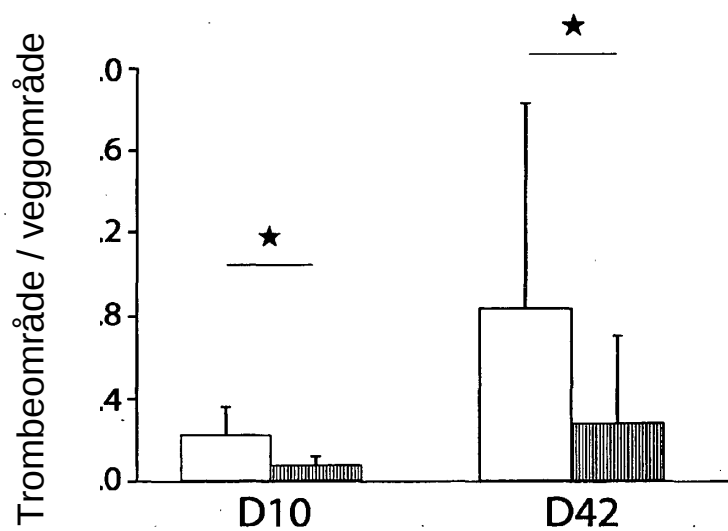


Fig. 2C

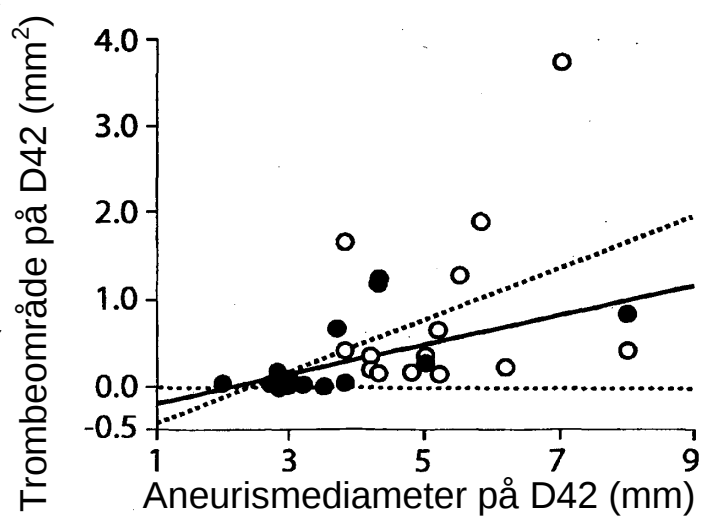


Fig. 2D

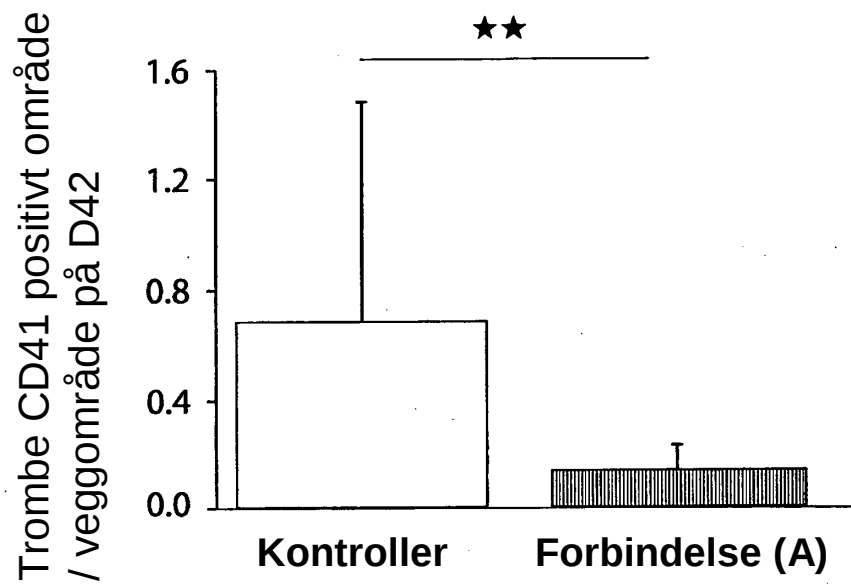
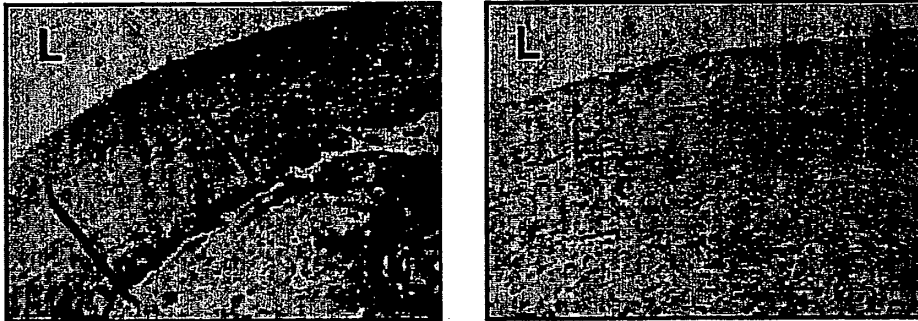


Fig. 3A

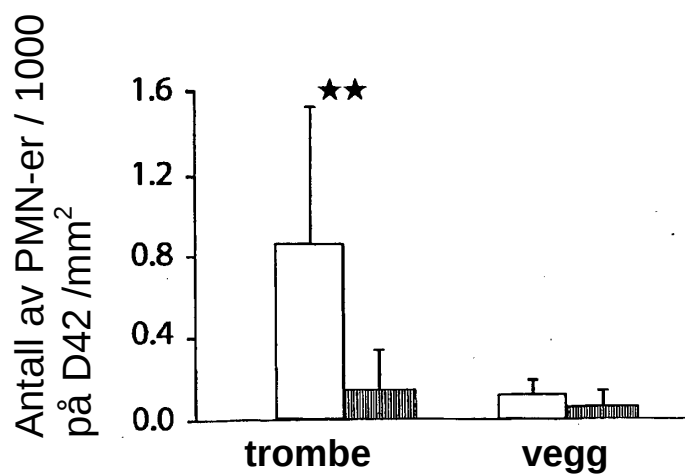
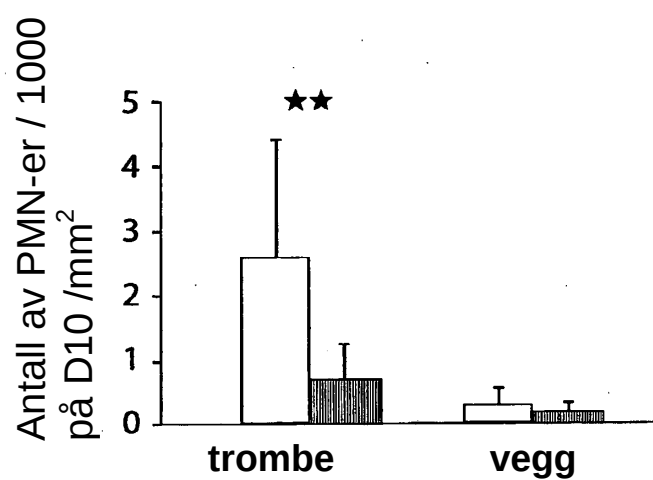
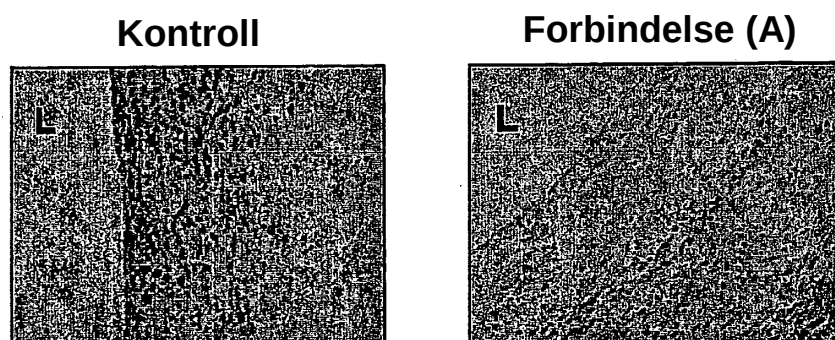


Fig. 3B

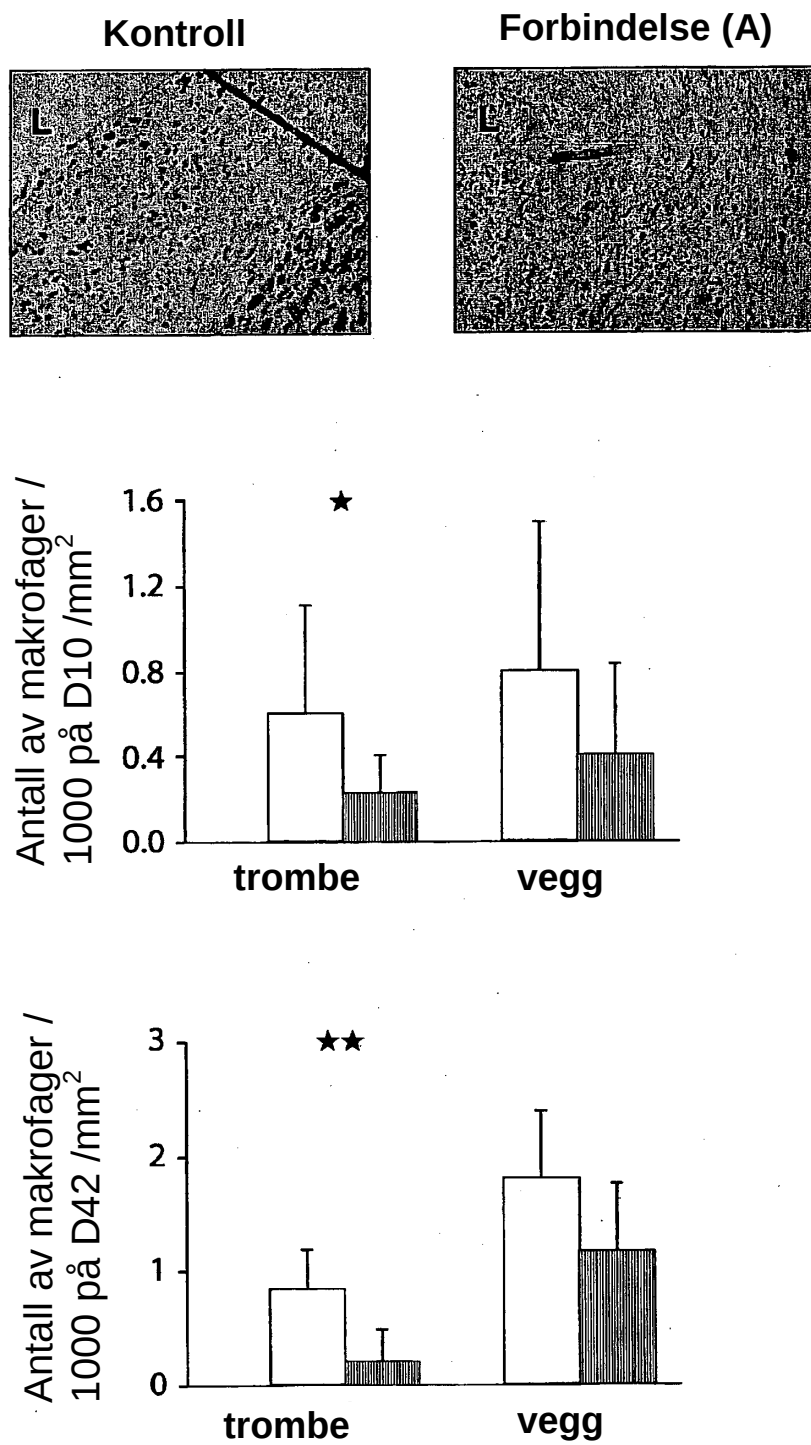


Fig. 4A

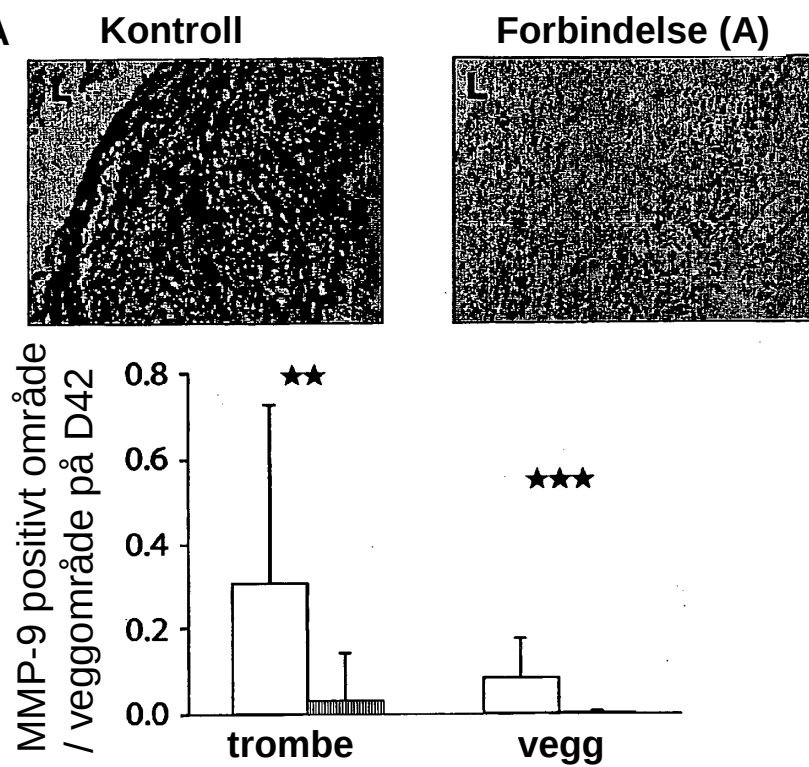


Fig. 4B

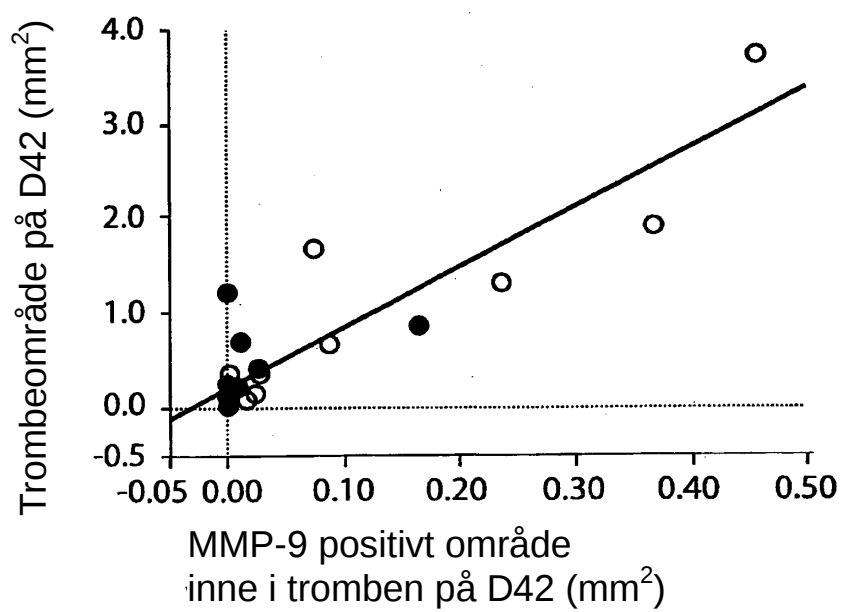


Fig. 5A

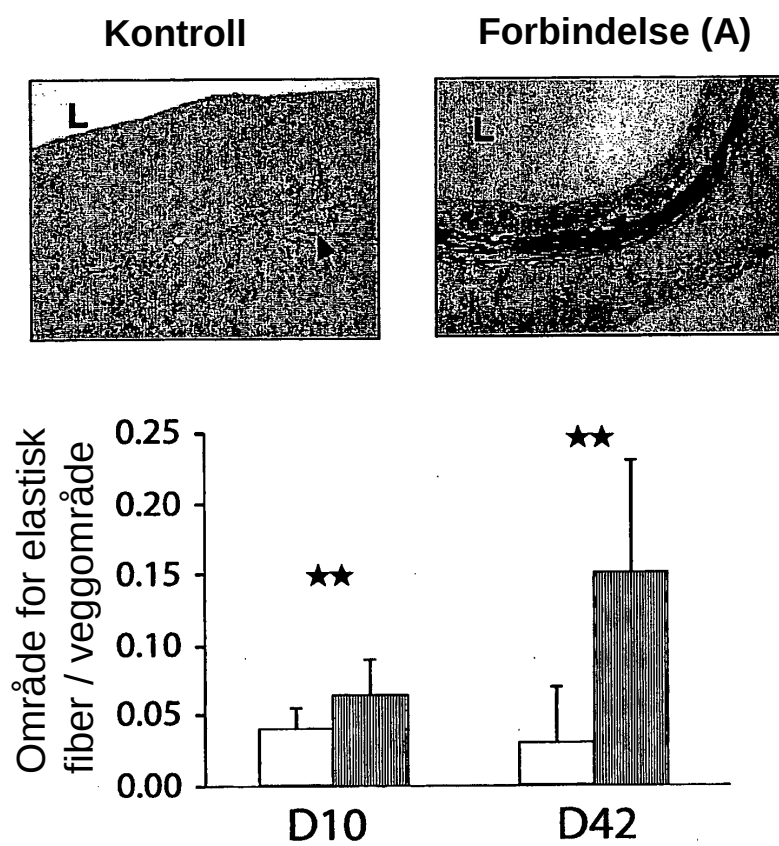


Fig. 5B

Kontroll

Forbindelse (A)

