



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2461812 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.
A61K 31/557 (2006.01)
A61K 31/5585 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2014.06.02
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2014.01.01
(86)	Europeisk søknadsnr	10739941.2
(86)	Europeisk innleveringsdag	2010.08.05
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2012.06.13
(30)	Prioritet	2009.08.07, EP, 09167491
(84)	Utpekte stater	AL AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL PT RO SE SI SK SM TR
	Utpekte samarbeidende stater	BA ME RS
(73)	Innehaver	SciPharm SàRL, 26-28, rue Edward Steichen, 2540 Luxembourg, LU-Luxembourg
(72)	Oppfinner	FREISSMUTH, Michael, Billrothstr. 68, A-1190 Wien, AT-Østerrike KOENIG, Xaver, Johannessteig 3, A-2340 Moedling, AT-Østerrike GLOECKEL, Christina, Rosaliag. 9/33, A-1120 Wien, AT-Østerrike
(74)	Fullmektig	Murgitroyd & Company, 165-169 Scotland Street, GB-G58PL GLASGOW, Storbritannia

(54)	Benevnelse	SAMMENSETNING FOR BEHANDLINGEN AV CYSTISK FIBROSE
(56)	Anførte publikasjoner	WO-A1-2008/098196 US-A1- 2001 006 979 TISSIERES P ET AL: "Aerosolized iloprost as a bridge to lung transplantation in a patient with cystic fibrosis and pulmonary hypertension" THE ANNALS OF THORACIC SURGERY, ELSEVIER, vol. 78, no. 3, 1 September 2004 (2004-09-01), pages E48-E50, XP004546014 ISSN: 0003-4975

SAMMENSETNING FOR BEHANDLINGEN AV CYSTISK FIBROSE

Den foreliggende oppfinnelse tilveiebringer sammensetninger som omfatter et prostasyklin eller en prostasyklinanalog eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav for anvendelse i

5 forebygging eller behandling av cystisk fibrose.

Cystisk fibrose (CF) er en genetisk sykdom som skyldes mutasjoner i et 230 kb-gen på kromosom 7 som koder for et 1480 aminosyrepolypeptid kjent som CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) som fungerer som en kloridkanal i epitelmembraner.

10 Over 1000 mutante alleler er hittil identifisert. Den mest alminnelige mutasjonen, $\Delta F508$, er delesjonen av en fenylalaninrest ved kodon 508 i CFTR-proteinet (cystic fibrosis transmembrane conductance-protein). Denne mutasjonen fører til en betydelig reduksjon i CFTR-funksjon og fører til den klassiske cystisk fibrose-fenotypen som er karakterisert ved abnormitet i eksokrine kjertel-funksjoner, som økt kloridkonsentrasjon i svette,

15 tilbakevendende luftveisinfeksjon med bronkiektasi, og pankreasinsuffisiens med tidlig debut. Klinisk sett mistenkes det vanligvis CF når ett eller flere typiske CF-fenotypiske trekk er til stede hos en pasient. Dette kan være en kronisk pulmonal sykdom alene eller svært ofte assosiert med gastrointestinale og ernæringsmessige abnormiteter (f.eks. pankreasinsuffisiens og tilbakevendende pankreatitt), salttapssyndromer og urogenitale

20 abnormiteter hos hanner (dvs. obstruktiv azoospermi). I menneskelungen obstruerer tykke, klebrige sekresjoner de distale luftveier og submukøse kjertler, som uttrykker CFTR. Duktulær dilatasjon av disse kjertler (assosiert med blokkering med mukus) og tilklebingen av luftveisflater med tykk, viskøs, nøytrofilt dominert mukopurulent debris er blant sykdommens patologiske kjennetegn. Pulmonal inflammasjon er en annen vesentlig årsak til nedgangen i

25 respiratorisk funksjon hos pasienter med cystisk fibrose, og kan gå forut for inntreden av kronisk infeksjon. Mucinøs impaksjon og tykke konkresjoner i ductus pancreaticus fører til kronisk fibrose, fetterstatning av kjertelen eller begge i en stor undergruppe av pasienter med en tidligere diagnose idiopatisk eller alkoholisk pankreatitt.

30 Cystisk fibrose er den mest alminnelige nedarvede livstruende sykdom i den kaukasiske populasjon, idet den rammer omkring 4 av 10 000 barn. I USA har medianalderen ved død økt fra 8,4 år i 1969 til 14,3 år i 1998. Den midlere alder ved død har økt fra 14 år i 1969 til 32,4 år i 2003 (Cystic Fibrosis Foundation). For barn født på 1990-tallet er median overlevelse predikert til å være over 40 år. En viktig bidragsyter til den signifikante økning i

35 forventet levealder er forbedret behandling av kroniske luftveisinfeksjoner og fjerning av mukus hos CF-pasienter så vel som bedre ernæring og tidligere diagnose.

Tap av CFTR-(cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)-anionkonduktans fra

luftveisepitelets apikale membraner forstyrrer regulering av luftveisoverflatens væskelag. Dette fører til hemmet mukociliær rensning, luftveisinfeksjon og inflammasjon karakteristisk for cystisk fibrose (CF). CFTR's alminnelige $\Delta F508$ -mutasjon er til stede på i det minste én allel hos >90% av CF-pasienter, og >50% av pasienter er homozygote overfor $\Delta F508$, idet

5 resten er «compound»-heterozygote. Et sentralt spørsmål i CF-sykdom er denne vanlige CFTR-variants manglende evne til å oppnå den native, foldede tilstand som vil komme ut fra det endoplastiske retikulum (ER) og trafikkerer til epitelcellens apikale membran.

Dersom akvisisjon av den native konformasjon forsinkes, antas det at CFTR opprettholder eksessive eller prolongerte interaksjoner med molekylære chaperoner, som deretter målretter

10 proteinet for degradering ved hjelp av mekanismer som kontrollerer ER-et for feilfoldede eller ufullstendig komplekserte proteiner. ER-assosiert degradering (ERAD) involverer ubiquitinerings av aberrante proteiner og deres levering til proteasomet for fordøyelse. Hvis ERAD sakker akterut i forhold til hastigheten på proteinsyntese, eller under behandling med proteasominhibitorer, akkumuleres aggregater av det mutante protein. CFTR var det første

15 integrale membranprotein hos pattedyr som ble identifisert som et substrat for ubiquitin-proteasom-mediert degradering, og dette har tjent som en modell for den voksende liste av proteinkonformasjonsykdommer, som utgjør en mangfoldig samling av patologiske etiologier.

I all vesentlighet alt $\Delta F508$ CFTR-et som dannes av cellen, ødelegges av ERAD. Dessuten

20 kan 60-70% av villtype-protein (wt-protein) likeledes degraderes på grunn av dets kompliserte foldemønster, selv om dette kan variere fra celletype til celletype. De proteolytiske kløyvingsmønstrene til de umodne former av wt og $\Delta F508$ CFTR er like, hvorimot fordøyelsesmønsteret til modent wt CFTR er forskjellig. Dette funnet støtter forestillingen om at i det minste en del av det ER-tilbakeholdte mutante CFTR er til stede i en mellomliggende

25 konfigurasjon som dannes langs den normale CFTR-foldingveien, i motsetning til dannelsen av en variantproteinstruktur. For $\Delta F508$ CFTR kan denne mellomliggende konformasjon ikke fortsette forbi et kritisk trinn i foldeprosessen, men dette innebærer at $\Delta F508$ CFTR kunne reddes dersom det var mulig å fasilitere dette trinn.

Et mangfold av forsøksbetingelser, slik som redusert temperatur, inkubasjon med kjemiske

30 chaperoner, eller farmakologiske korrektorer, kan fremme unnslipningen av $\Delta F508$ CFTR fra ER-et, idet det gir en funksjonell anionkanal ved celleoverflaten. I tillegg har utprøvere rapportert gjenopprettelse av $\Delta F508$ CFTR-funksjon ved koekspresjon av en rekke partielle CFTR-konstruksjoner eller underområder fra wt CFTR. En konsensus med hensyn til hvorvidt CFTR-underområder er effektive i mutant protein-redning, er imidlertid ikke tydelig, og denne

35 effektens mekanisme forblir uklar. I tillegg har CFTR fragment-indusert redning blitt observert primært i celler som eksogent overuttrykker både CFTR-fragmentet og fullengde- $\Delta F508$ CFTR-et.

Prostaglandin I₂ (prostasyklin; epoprostenol, PGI₂) er en oksygenert metabolitt av arakidonsyre dannet enzymatisk ved de sekvensielle aktiviteter av syklooksxygenase og PGI-syntaseenzymer. Det dannes konstitutivt av vaskulære endotel- og glatte muskelceller og induseres under inflammatoriske betingelser i vaskulære celler og makrofager.

- 5 PGI₂ er en potent vasodilator og antitrombosemiddel hvis virkninger skyldes binding til en unik heptahelikale G-protein-koblet reseptor benevnt I-prostanoid (IP)₄-reseptoren. Denne reseptor kobles til G_s- og aktiviserer adenylatsyklase, hvilket resulterer i et akutt utbrudd av intracellulært cAMP. Siden ekspresjon av CFTR og mutert CFTR er avhengig av cAMP-avhengig, er stoffer som forsterker intracellulære nivåer av cAMP, av interesse i utvikling av legemidler for behandling av CF. De fleste av disse stoffer, slik som forskolin, inducerer imidlertid en temmelig uspesifikk stigning av cAMP, hvilket også kan ha svært skadelige virkninger, slik som inflammasjon. Det er således et udekket behov for spesifikke forsterkere av cAMP i lungeepitelceller.

- 15 Treprostinil er en potent IP-reseptoragonist, selv om dens spesifisitet for denne reseptor er ukjent. Sprague R.S. et al., 2008, viste at prostasyklinanaloger (UT-15, Remodulin) stimulerer reseptormediert cAMP-syntese og ATP-frigjøring fra erytrocytter hos kanin og menneske.

- I WO 08/098196 beskrives behandlingen av pulmonal fibrose under anvendelse av treprostinil. Pulmonal fibrose er imidlertid en interstitiell lungesykdom som forårsakes av 20 akkumulering av kollagenfibre i lungene; dette innskrenker lungens kapasitet til å inhalere luft: lungene mister sin compliance, og luftveismotstanden øker (compliance = 1/motstand). I det sykdommen utvikler seg, er det også en økning i vaskulær motstand. Treprostinols virkested i pulmonal fibrose er vaskulaturen og det interstitielle rom i alveolene.

- 25 Tissieres et al. beskriver studier som anvender iloprost til behandlingen av en pasient med cystisk fibrose og sekundær pulmonal hypertensjon. Det beskrives at aerosolisert iloprost var virkningsfullt i å senke pulmonalt arteriestrykk (The annals of thoracic surgery, vol, 78, nr.3, E48-E50).

- 30 I US2001/006979 A1 beskrives anvendelsen av prostasyklinderivater som iloprost eller cicaprost i behandlingen av fibrotiske sykdommer.

- 35 Cystisk fibrose er ikke relatert til pulmonal fibrose fordi det er en sykdom som oppstår i det bronkiale epitel. På grunn av fraværet av CFTR er det for lite vann i det mukos som dekker det bronkiale epitel; følgelig kan cilierne ikke flytte den tykke mukos, og mukociliær rensning bryter sammen (mukociliær rensning fungerer som et transportbånd der cilierne slår rytmisk på en konsentrert måte for å flytte mukusen tilbake til trakea og farynx, hvorfra det kan renses ved svelging eller hosting osv.). Dersom mukociliær bryter sammen, kan bakteriene ikke

fjernes fra bronkiene, bronkiene koloniseres av bakterier, og gjentatte anfall av lungeinfeksjoner som ødelegger lungene finner sted. Situasjonen kan avhjelpes ved å gjenopprette Cl-fluxer til det bronkiale epitel. Ved cystisk fibrose er virkestedet således bronkiens luftveiseepitel. Virkestedet er anatomisk distinkt (lungeinterstitium vs. bronkial
 5 luftvei), involverer et forskjellig celledsett (fibroblaster, vaskulære glatte muskelceller, endotel versus absorberende og sekreterende bronkiale epitelceller) og involverer trolig også forskjellige reseptorer (prostasyklinreseptor vs. muligvis EP2-reseptor).

For øyeblikket finnes det ingen behandlinger av cystisk fibrose tilgjengelig som signifikant
 10 forbedrer pasienters livskvalitet over en lengre periode. Det er derfor et formål ved oppfinnelsen å tilveiebringe sammensetninger for behandling som kan øke ekspresjonen av $\Delta F508$ CFTR og/eller kloridkanalfunksjon i lungens epitelceller.

Kort beskrivelse av oppfinnelsen:
 15

Formålet med oppfinnelsen oppnås ved å tilveiebringe en sammensetning som omfatter et prostasyklin eller en analog, et derivat eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav for anvendelse i forebygging eller behandling av cystisk fibrose.

20 Ifølge en bestemt utførelsesform ifølge oppfinnelsen er prostasyklinanalogen valgt fra gruppen av treprostinil, iloprost, cisaprost eller beraprost eller farmasøytisk akseptable salter derav.

Treprostinilderivatet kan nærmere bestemt velges fra gruppen av syrederivater, prodruger,
 25 sustained release-former, inhalerte former, orale former, polymorfer eller isomerer av treprostinil.

Sammensetningen ifølge oppfinnelsen kan administreres ved intravenøs administrasjon, inhalasjon, eller den kan være i en oralt tilgjengelig form valgt fra gruppen av tabletter og
 30 kapsler.

Nærmere bestemt omfatter sammensetningen en effektiv mengde av treprostinil eller dets derivat, eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav som er i det minste 1,0 ng/kg kroppsvekt/min.
 35

Videre tilveiebringes ifølge den foreliggende oppfinnelse også anvendelsen av et kit for behandling eller forebygging av en tilstand assosiert med cystisk fibrose hos en pasient, hvilket kit omfatter (i) en effektiv mengde av et prostasyklin eller en prostasyklinanalog eller

derivat eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, nærmere bestemt et farmasøytisk akseptabelt salt av treprostinil, (ii) én eller flere farmasøytisk akseptabelt bærere og/eller tilsetningsstoffer, og (iii) instruksjoner for anvendelse i behandling eller forebygging av cystisk fibrose.

5

Figurer:

Fig. 1: Akkumulering av cAMP i IB3-1-celler etter inkubasjon med treprostinil

Fig. 2: Aktivisering av en Cl-strøm ved treprostinil i den humane bronkialt epitel IB3-1-cellelinje som transient uttrykker CFTR-wt.

10

Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen

Oppfinnerne har overraskende funnet at prostasyklin eller analoger eller derivater eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav kan anvendes til å behandle cystisk fibrose. Syntetiske prostasyklinanaloger kan for eksempel være, men er ikke begrenset til, treprostinil, iloprost, cisaprost eller beraprost.

15

Egnede prostasyklinderivater innbefatter, men er ikke begrenset til, syrederivater, prodruger, sustained release-former, inhalerte former og orale former av treprostinil, iloprost, cisaprost eller beraprost.

20

Et farmasøytisk akseptabelt salt av et prostasyklin eller en prostasyklinanalog ifølge den foreliggende oppfinnelse kan dannes mellom en syre og en basisk gruppe av forbindelsen, slik som en amino-funksjonell gruppe, eller en base og en sur gruppe av forbindelsen, slik som en karboksyl-funksjonell gruppe. Ifølge en annen utførelsesform er forbindelsen et farmasøytisk akseptabelt syreaddisjonssalt.

25

Nærmere bestemt er treprostinil eller dets derivat nyttig ifølge oppfinnelsen. Treprostinil kan på vellykket måte forbedre ekspresjonen av $\Delta F508$ CFTR og/eller kloridkanalfunksjonen i epitelceller i lungen hos cystisk fibrose-pasienter.

30

Nærmere bestemt innbefatter fysiologisk akseptable salter av treprostinil salter avledet av baser. Basesalter innbefatter ammoniumsalter (slik som kvaternære ammoniumsalter), alkalimetallsalter, slik som de av natrium og kalium, jordalkalimetallsalter, slik som de av kalsium og magnesium, salter med organiske baser, slik som disykloheksylamin og N-metyl-D-glukamin, og salter med aminosyrer slik som arginin og lysin.

35

Det har overraskende vist seg at et prostasyklin eller analog eller derivat derav fører til

stimulering av dannelsen av cAMP i bronko-epitelceller. Denne virkemåten kan finne sted via induisert aktivisering av IP-reseptoren. Det er interessevekkende at fosfodiesteraseinhibitoren (PDE3-inhibitor), anagrelid, ikke har vist seg å inducere noen akkumulering-cAMP i forsøk.

- 5 Gitt denne evnen til å stimulere cAMP-dannelse gjennom IP-reseptoren, og den begrensede tilstedeværelse av IP-reseptorer til et lite antall celletyper (slik som epiteliale lungeceller), kan et prostasyklin eller analog derav, for eksempel treprostinil eller et derivat eller salt derav, inducere ekspresjon og gating av CFTR og mutCFTR på en bestemt måte som kan anvendes til behandling av CF.

10

Den foreliggende oppfinnelse angår derfor en sammensetning som omfatter et prostasyklin eller prostasyklinanalog, nærmere bestemt treprostinil eller dets derivat, eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav for anvendelse i behandling av cystisk fibrose så vel som behandlingsforløp av cystisk fibrose under anvendelse av et prostasyklin eller

- 15 prostasyklinanalog, nærmere bestemt treprostinil eller dets derivat eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav.

Treprostinil er en syntetisk analog av prostasyklin. Treprostinil markedsføres som Remodulin™. Treprostinil er et (1*R*,2*R*,3*a*S,9*a*S)-[[2,3,3*a*,4,9,9*a*-heksahydro-2-hydroksy-1-[(3*S*)-3-hydroksyoktyl]-1*H*-benz[*f*]inden-5-yl] oksy]eddiksyremononatriumsalt.

20

Ifølge oppfinnelsen kan derivatene av treprostinil være for eksempel syrederivater av treprostinil, prodruger av treprostinil, sustained release-former av treprostinil, inhalerte former av treprostinil, orale former av treprostinil, polymorfer av treprostinil eller isomerer av

25

Sammensetningen ifølge oppfinnelsen kan være til stede i en hvilken som helst form som kan anvendes for administrasjon.

- 30 Sammensetningen ifølge oppfinnelsen kan administreres som en væske eller et pulver. Den kan administreres topisk, intravenøst, subkutant, ved inhalasjon eller under anvendelse av en nebulisator, eller i oralt tilgjengelig form som tabletter eller kapsler. På grunn av den høye metabolske stabilitet til visse prostasyklinanaloger som treprostinil, eller dersom tilveiebrakt som lipidbaserte eller pegylerte former av prostasyklinene eller prostasyklinanalogene, kan
- 35 stoffene også administreres som depotmedikamenter.

Aerosolisert avgivelse av prostasyklinanalogen kan føre til en mer homogen fordeling av middelet i en lunge, slik at avgivelse dypt i lungene oppnås. Anvendelsesdoseringen kan

derved reduseres til den vedvarende tilstedeværelse av middelet på virkestedet i lungene.

Sammensetningen kan administreres med hvilke som helst farmasøytisk akseptable stoffer eller bærere eller eksipienser i overensstemmelse med det som er kjent innenfor teknikken.

- 5 Disse kan for eksempel være, men er ikke begrenset til, vann, nøytraliseringsmidler som NaOH, KOH, stabilisatorer, DMSO, saltløsning, betain, taurin osv.

Uttrykket «farmasøytisk akseptabelt» betyr godkjent av en kontrollmyndighet av den føderale eller en statlig regjering eller listeført i USA.

10

Uttrykket «bærer» viser til et fortynningsmiddel, en adjuvans, eksipiens eller vehikkel med hvilken den farmasøytiske sammensetning administreres. Saltløsninger og vandig dekstrose og glyserolløsninger kan også benyttes som væskebærere, især for injiserbare løsninger. Egnede eksipienser innbefatter stivelse, glukose, laktose, sukrose, gelatin, malt, ris, mel, kalk, silikagel, natriumstearat, glyserolmonostearat, talkum, natriumklorid, tørket skummetmelk, glyserol, propylen, glykol, vann, etanol og lignende. Eksempler på passende farmasøytiske bærere er beskrevet i «Remington's Pharmaceutical Sciences» av E.W. Martin. Formuleringen skal velges i overensstemmelse med administrasjonsmåten.

- 20 Treprostinil er av høy metabolsk stabilitet som spesifikt muliggjør administrasjon via en rekke veier.

- 25 Mengden av sammensetningen ifølge oppfinnelsen kan velges av en hvilken som helst fagmann, idet det foretrekkes at mengden av prostasyklinene eller prostasyklinanalogene eller farmasøytisk akseptable salter derav, nærmere bestemt av treprostinili, er på i det minste 1,0 ng/kg kroppsvekt/min.

De heri beskrevne eksempler er kun ment å være av illustrerende karakter og skal ikke oppfattes som værende begrensende for den foreliggende oppfinnelses omfang.

30

Eksempler

Eksempel 1:

- 35 IB3-1-celler ble platet ut på 6-brønnersplater (0,2*10⁶ celler/brønn) i komplett vekstmedium (LHC-8 + 5% FCS). Den påfølgende dag ble adeninnukleotid-poolen metabolsk merket ved inkubasjon med [3H]adenin (1μCi/brønn) i Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) inneholdende adenosindeaminase (1 enhet/ml) i 4h. Syklisk AMP-dannelse ble stimulert ved hjelp av 20μM forskolin eller PGI₂-analogen treprostinil (Remodulin®). Assayet ble utført i tre

eksemplarer.

Dannelsen av [^3H]cAMP ble fastslått ved hjelp av sekvensiell kromatografi på Dowex 50WX-4 og nøytrale aluminasøyler etterfulgt av væskescintillasjontelling av eluatet.

- 5 Treprostinil bevirket en konsentrasjonsavhengig akkumulering av cAMP i IB3-1-celler (fig. 1). Halvmaksimal stimulering ble observert i området på 0,3 til 1 μM .

Eksempel 2:

IB3-1-celler uttrykker endogent kun mutert CFTR- ΔF508 , som tilbakeholdes inne i cellene.

- 10 Under anvendelse av approprierte manipulasjoner (f.eks. farmakochaperoner på lavtemperatursinkubasjoner) er det mulig å translokere det mutante CFTR- ΔF508 fra det endoplastiske retikulum til ER-et; når innført på celleoverflaten, kan en Cl-konduktans stimuleres ved å forhøye cAMP. Den resulterende Cl-konduktans er imidlertid liten. For utvetydig å bevise at cAMP-akkumuleringen induisert ved hjelp av treprostinil translaterte til en
- 15 aktivering av CFTR, uttrykte vi transient en GFP-tagget versjon av villtype-CFTR (GFP-taggen muliggjorde identifikasjonen av celler som uttrykte proteinet ved celleoverflaten). Som det kan ses i fig. 2 bevirket treprostinil en kraftig aktivering av strømmen induisert ved en depolarisering fra -40 mV holdepotensial til + 60 mV. Maksimumeffekten var forsinket, dvs. den ble først observert flere s etter innvasking av forbindelsen. Likeledes var det også en
- 20 hysteresis i turn-off-reaksjonen; strømmen avtok til basal kun ~ 100 s etter utvasking. Disse forsinkede responser reflekterer den (i) intervenserende signalerende kaskade (dvs. den reseptoravhengige aktivering av G_s , G_{α_s} -avhengig aktivering av cAMP-dannelse og den påfølgende proteinkinase A-avhengige fosforylering av CFTR) og (ii) den forsinkede deaktivering av økt cAMP ved fosfodiesteraser. Lignende forsinkelser ble også sett dersom
- 25 celler ble stimulert med forskolin, en direkte aktivator en adenylylsyklase, som ble anvendt som en positiv kontroll. Disse observasjoner beviser at treprostinil kan aktivere CFTR i bronkiale epitelceller.

Fremgangsmåter:

30

Elektrofysiologi

- Whole cell patch clamp*-teknikken ble anvendt for strømregistreringer utført ved $22 \pm 1,5^\circ\text{C}$ under anvendelse av en Axoclamp 200B patch-clamp-forsterker (Axon Instruments). Pipetter hadde motstander på mellom 1 og 2 M Ω når fylt med den registrerende pipettløsningen
- 35 (sammensetning: 110 mM CsCl, 5 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, 1 mM K₂.ATP, 10 mM Hepes, pH justert til 7,2 med CsOH). Spenningsklemme-protokoller og datainnsamling ble utført med pclamp 6.0-programvare (Axon Instruments). Data ble lavpass-filtret ved 2 kHz (-3 dB) og digitalisert ved 10-20 kHz. Celler ble kontinuerlig overhelt («superfused») med ekstern løsning

(sammensetning: 145 mM NaCl, 4,5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5 mM glukose, 10 mM Hepes, pH justert til 7,4 med NaOH). Når indikert, den eksterne løsning inneholdt treprostinil (10 µM) eller forskolin (5 µM), idet veksling mellom løsninger ble oppnådd ved hjelp av elektronisk styrte trykkventiler.

5

Cellekultur:

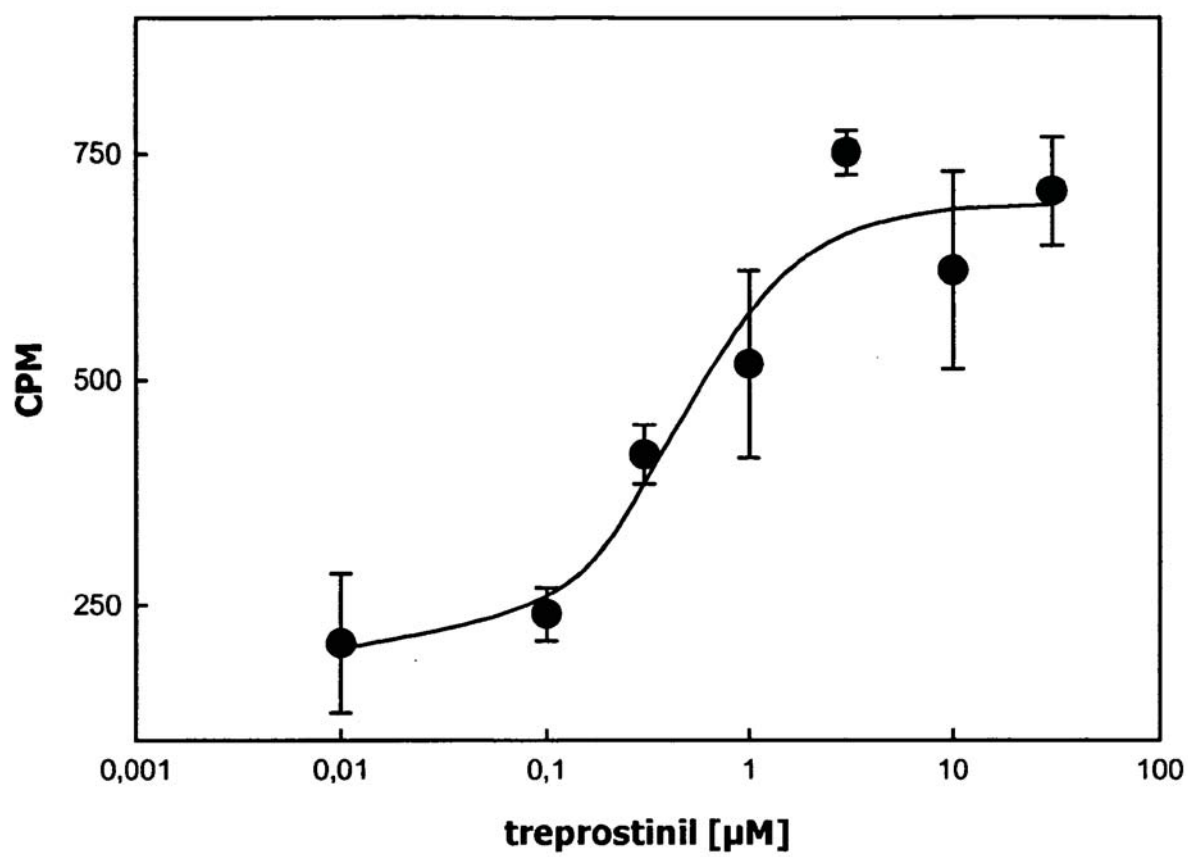
IB3-1-celler ble dyrket på skåler (Nunc, 3,5 cm diameter) dekket med fibronectin (10 µg/mL) rottekollagen I (30 µg/mL) og BSA 10 µg/mL i LHC-8 medium (Gibco) inneholdende 5% føtalt kalveserum (FCS). Celler ble transient transfektert med et plasmid som driver uttrykket av
10 humant GFP-tagget villtype-CFTR under anvendelse av Lipofectamine plus® (Invitrogen) ifølge produsentens instruksjoner.

Representative strøamplituder registrert i whole cell patch clamp-konfigurasjonen ved + 60 mV. En transient transfektert IB3-1-celle uttrykkende GFP-tagget villtype-CFTR ble selektert
15 under fluorescerende lys og klemt til et holdepotensial ved -40 mV. Depolarisering ble induisert ved et spenningstrinn til + 60 mV i 50 ms, og strøamplituden ble registrert. Innvasking av treprostinil (10 µM sluttkonsentrasjon, TP) ble påbegynt ved tidspunktet 50 s og terminert ved 125 s. Forskolin ble vasket inn ved 275 s og ble fjernet ved 375 s. Resultater er vist i figur 2.

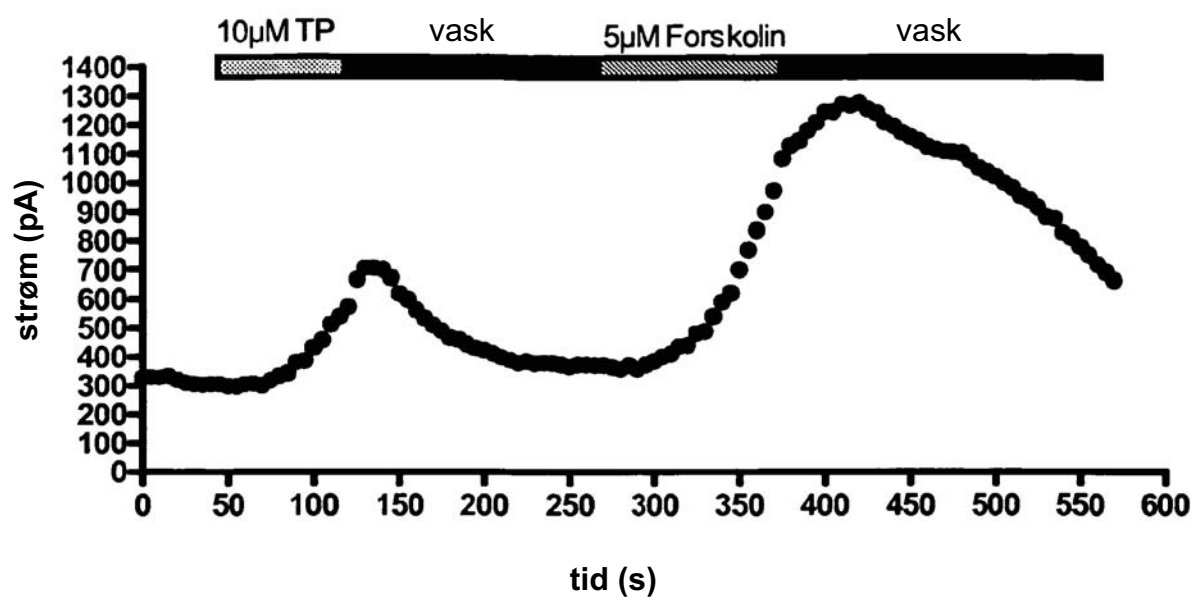
Patentkrav

1. Sammensetning som omfatter prostasyklin eller en analog eller et derivat eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav for anvendelse i forebygging eller behandling av cystisk fibrose, hvor den nevnte prostasyklinanalogen er valgt fra gruppen av treprostinil, iloprost, cisaprost eller beraprost eller derivater eller farmasøytisk akseptable salter derav.
2. Sammensetning for anvendelse ifølge krav 1, hvor det nevnte derivat er valgt fra gruppen av syrederivater av treprostinil, prodruger av treprostinil, sustained release-former av treprostinil, inhalerte former av treprostinil, orale former av treprostinil, polymorfer av treprostinil eller isomerer av treprostinil.
3. Sammensetning for anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 2 for intravenøs administrasjon.
4. Sammensetning for anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 2 for inhalasjon.
5. Sammensetning for anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 2, hvor den nevnte sammensetning er i en oralt tilgjengelig form valgt fra gruppen av tabletter og kapsler.
6. Sammensetning for anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 2, hvor den effektive mengde av treprostinil eller dets derivat eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav er i det minste 1,0 ng/kg kroppsvekt/min.

1/2

*Fig. 1*

2/2

*Fig. 2*