



(12) **Oversettelse av
 europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2485723 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.

A61K 31/18 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)

Patentstyret

(45)	Oversettelse publisert:	2014.05.12
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet:	2013.12.11
(86)	Europeisk søknadsnr:	10761018.0
(86)	Europeisk innleveringsdag:	2010.10.06
(87)	Den europeiske søknadens publiseringsdato:	2012.08.15
(30)	Prioritet	2009.10.06, EP, 09172364
(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 RS SE SI SK SM TR
	Utpekte samarbeidende stater	BA ME
(73)	Innehaver:	Dompé S.p.A., Località Campo di Pile snc, 67100 L'Aquila AQ, IT-Italia
(72)	Oppfinner:	PIEMONTE, Lorenzo, Diabetes Research Institute (HSR-DRI) -San Raffaele Scientific InstituteVia Olgettina 60, 20132 Milano, IT-Italia DAFFONCHIO, Luisa, c/o Dompé S.p.A.Località Campo di Pile snc, I-67100 L'Aquila AQ, IT-Italia ALLEGRETTI, Marcello, c/o Dompé S.p.A.Località Campo di Pile snc, I-67100 L'Aquila AQ, IT-Italia
(74)	Fullmektig	Bryn Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO, Norge

(54) Benevnelse: **Inhibitorer av CXCR1/2 som adjuvans ved transplantering av pankreas øyer**

(56) Anførte publikasjoner:

EP-A- 1 790 637
WO-A-01/78708
WO-A-02/062330
WO-A-2008/000407
WO-A-2008/039876
WO-A2-2005/090295
CAVALIERI B ET AL: "Neutrophil recruitment in the reperfused-injured rat liver was effectively attenuated by repertaxin, a novel allosteric noncompetitive inhibitor of CXCL8 receptors: a therapeutic approach for the treatment of post-ischemic hepatic syndromes" INTERNATIONAL JOURNAL OF IMMUNOPATHOLOGY AND PHARMACOLOGY, UNIVERSITA DEGLI STUDI DI CHIETI E PESCARA GABRIELE D'ANNUNZIO, IT, vol. 18, no. 3, 1 January 2005 (2005-01-01), pages 475-486, XP009131154 ISSN: 0394-6320
CUGINI D ET AL: "Inhibition of the chemokine receptor CXCR2 prevents kidney graft function deterioration due to ischemia/reperfusion" KIDNEY INTERNATIONAL, NATURE PUBLISHING GROUP, LONDON, GB, vol. 67, 1 January 2005 (2005-01-01), pages 1753-1761, XP002421838 ISSN: 0085-2538
MOVAHEDI BABAK ET AL: "Pancreatic duct cells in human islet cell preparations are a source of angiogenic cytokines interleukin-8 and vascular endothelial growth factor." DIABETES AUG 2008, vol. 57, no. 8, August 2008 (2008-08), pages 2128-2136, XP002574096 ISSN: 1939-327X
MORICONI, ALESSIO ET AL: "Design of Noncompetitive Interleukin-8 Inhibitors Acting on CXCR1 and CXCR2" 2007, JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, 50(17), 3984-4002 CODEN: JMCMAR; ISSN: 0022-2623, XP002607876 the whole document

Oppfinnelsens område.

Foreliggende oppfinnelse vedrører forbindelser som er nyttige som adjuvanter
5 ved transplantering av pankreas-øyer hos pasienter med diabetes type 1.

Bakgrunn for oppfinnelsen.

Transplantasjon av pankreasvev, i form av hele pankreas eller av isolerte
pankreas-øyer, er blitt et klinisk valg ved behandling av insulinavhengig diabetes
10 mellitus type 1.

Transplantasjon av pankreas-øyer er særlig attraktivt siden det er et mindre
invasivt alternativ sammenlignet med transplantasjon av hele pankreas, og er
forbundet med en mye lavere risiko for alvorlige komplikasjoner. Imidlertid er en slik
prosedyre fremdeles begrenset av dårlig effektivitet.

15 Den tidligste strategien ved transplantasjon av øyer var basert på protokoller
som hadde vist seg å være vellykket ved transplantasjon av hele («solid») organer, og
omfattet administrering av immunosuppressive midler, så som azatioprin, cyklosporin
og kortikosterioider. En slik strategi viste seg å ikke være effektiv i det spesifikke
tilfelle med transplantasjon av pankreas-øyer og ga meget dårlige resultater, der de
20 fleste av transplantatene sviktet innen ett år fra transplantering (Sulaiman og Shapiro,
Diabetes, Obesity and Metabolism, 8, 2006, 15-25).

I de siste årene har utviklingen av Edmonton-protokollen, som har innført nye,
spesifikke, immunosuppressive regimer og teknikker for preparering av øyer,
dramatisk forbedret det kliniske resultatet av øy-transplantasjon.

25 I henhold til Edmonton-protokollen blir pankreas-øyer isolert fra pankreas hos
en avdød donor, renses og deretter transplantert til en mottager ved hjelp av et
kateter plassert gjennom øvre abdomen og inn i portåren i leveren. Raskt etter
infusjon av dem i leveren begynner cellene å frigjøre insulin. For å forhindre
avstøtning, blir det benyttet et nytt immunosuppressivt regime som krever anvendelse
30 av en kombinasjon av immunosuppressive legemidler, nemlig sirolimus og tacrolimus,
og av et monoklonalt CD25-antistoff, Daclizumab (Saphiro et al., N. Engl. J. Med.,
2000, 343(4):230-238).

Uheldigvis er det fremdeles noen mangler ved transplantasjon av øyer som ikke
er blitt løst og som forhindrer denne prosedyren i å bli standard behandling for
35 pasienter med diabetes type 1.

En første ulempe forbundet med transplantasjon av pankreas-øyer er at det
fremdeles, selv om Edmonton-protokollen i betydelig grad har økt suksessraten, er en

høy prosentandel av tidlig svikt av transplantatet, på grunn av en serie av komplekse fenomener, så som IBMIR, rekruttering av inflammatoriske celler og aspesifikk immunitet. Faktisk er intrahepatisk infusjon av øyer til mennesker forbundet med en umiddelbar, blodmediert inflammatorisk reaksjon, trombose og hepatisk vevs-iskemi med forhøyede leverenzymer i blodet (Barshes NR. et al., J. Am. Coll. Surg., 2005, 200(3):353-361; Barshes NR. et al., J. Leukoc. Biol., 2005, 77(5):587-97; Bertuzzi et al., J. Clin. Endocrinol. Metab., 2004, 89(11): 5724-8; Bhargava R. et al., Diabetes, 2004, 53(5): 1311-7; Contreras et al., 2004, 53(11): 2894-14; Johansson et al., Diabetes, 2005, 54(6):1755-62). Tap av så mye som 50-75% av øyene under innpodning i leveren (Contreras et al., se ovenfor) er blitt foreslått å være den viktigste faktoren ansvarlig for det enorme antall øyer som er nødvendig for å oppnå normoglykemi (Barshes et al., se ovenfor).

Videre synes de transplanterte øyene, selv når transplantasjonen innledningsvis er vellykket og fører til insulin-uavhengighet hos mottageren, å tape sin evne til å fungere over tid. Dette begrenser muligheten til å oppnå langvarig insulin-uavhengighet hos de transplanterte pasientene, der kun 14% av pasientene oppviser insulin-uavhengighet to år etter transplanteringen [Meloche RM., World J. Gastroenterol. 2007; 13(47):6347-6355].

En ytterligere ulempe er at Edmonton-protokollen krever anvendelse av en kombinasjon av immunosuppressive legemidler; sirolimus og tacrolimus må tas resten av livet eller så lenge de transplanterte øyene fortsetter å fungere. Imidlertid har disse legemidlene betydelige bivirkninger, som det ville være ønskelig å redusere. Komplikasjoner som stammer fra den immunosuppressive behandlingen er den andre mest vanlige, alvorlige hendelsen rapportert ved denne typen transplantat.

Således er ytterligere utvikling fremdeles nødvendig for å forbedre langtidslevedyktigheten og funksjonen til transplantatet for å opprettholde glukosekontrollen over tid og redusere immunosuppressiv behandling.

CXCL8 er et kjemokin som kan induseres av inflammatoriske mediatorer som er implisert i tidlige faser av vevsreparasjon, og som er blitt vist å bevirke angiogenese (Li et al., J. Immunol., 2003, 170:3369-3376) gjennom induksjon av kjemotakse, overlevelse og proliferasjon av endotelceller, og å tjene til å tiltrekke nøytrofiler. Det utøver sin virkning ved å binde seg til sine kognate, G-proteinkoblede reseptorer CXCR1 og CXCR2.

Ny litteratur har fremsatt en hypotese om at CXCL8 kan bevirke innpodning gjennom induksjon av revaskularisering av det transplanterte vevet (Movahedi et al., Diabetes, 2008, 57:2128-36).

EP 1 123 276 beskriver N-(2-arylpropionyl)sulfonamider, blant dem R(-)-2-[(4-isobutylfenyl)propionyl]metansulfonamid (I) og deres farmasøytisk akseptable salter, for anvendelse som inhibitorer av nøytrofil kjemotakse og degranulering induisert av CXCL-8, særlig for anvendelse ved behandling av patologi så som psoriasis, revmatoid artritt, ulcerøs kolitt, akutt respiratorisk insuffisiens (ARDS), idiopatisk fibrose og glomerulonefritt.

EP 1 355 641 beskriver anvendelse av R(-)-2-[(4-isobutylfenyl)propionyl]-metansulfonamid og farmasøytisk akseptable salter derav, særlig dets lysinsalter, ved forebygging og behandling av iskemi/reperfusjonsskade av transplanterte organer og av funksjonell skade som er et resultat av avstøtningsreaksjoner etter transplantasjon av et helt organ, særlig nyrer, som det er nødvendig å ta ut av en donor og lagre før transplantasjon. Slike skader anses å være ansvarlig for forsinket transplantat-funksjon, noe som gjør dialyse nødvendig i tilfelle av nyretransplantasjon.

EP 1 579 859 beskriver anvendelse av N-(2-arylpropionyl)sulfonamider, blant dem R(-)-2-[(4-isobutylfenyl)propionyl]metansulfonamid og dets lysinsalt, for fremstilling av medikamenter for behandling av ryggmargsskade.

WO 01 78 708 beskriver anvendelse av CXCR3-antagonister for å inhibere avstøtning av transplanterte transplantater, innbefattende pankreas-øyer.

EP 1 790 637 beskriver anvendelse av kjemokinreseptor-antagonister for behandling av avstøtning av transplantater av pankreas-øyer.

Beskrivelse av figurene.

Figur 1: Panel A representerer ikke-fastende glykemi (i mg/dl) målt fra dag -1 til dag +7 etter isotransplantasjon av 400 pankreas-øyer hos knock out- (blek linje) og villtype- (sort linje) mus. Panel B representerer resultatene av oral glukosetoleransetest (OGTT). Glykemi (i mg/dl) ble målt umiddelbart før administrering av glukose og etter 10, 20, 30, 60 og 90 minutter etter administrering av oral glukose. Grafen for blodglukose er vist for hvert dyr.

Figur 2: Panel A representerer glykemi ved forskjellig tidsforløp etter transplantering i reparixin-behandlede (heltrukken linje) eller kontroll- (punkttert linje) mus. Panel B viser multivariat Cox-regresjonsanalyse.

Figur 3a og 3b rapporterer i form av spredningsplott middelverdien oppnådd i den orale glukosetoleransetesten (OGTT) (figur 3a) og i den intravenøse glukosetoleransetesten (IVGTT) (figur 3b) hos mus transplantert i nærvær eller fravær av reparixin med øyer fra den samme isoleringen. Merkelapper identifiserer nummeret på isoleringen. Firkanter og sirkler representerer mus transplantert med henholdsvis 250 eller 150 IE. Øvre og nedre paneler rapporterer dataene henholdsvis 1 og 3 måneder

etter transplantasjon. Den heltrukne linjen er identitetslinjen: sirkler over identitetslinjen representerer observasjoner med høyere verdier i reparixin-gruppen enn i den vehikkel-behandlede gruppen ($\Delta+$).

Figur 4 representerer de sirkulerende nivåene av alanin-aminotransferase (ALT) 24 t og 48 t etter transplantering hos reparixin- og vehikkel-behandelnde dyr transplantert med 150 (panel A) eller 250 IE (panel B).

Figur 5: Panel A representerer glykemi på forskjellige tidspunkter etter transplantering hos mus behandlet med reparixin, rapamycin, reparixin + rapamycin eller vehikkel. Panel B representerer multivariat Cox-regresjonsanalyse.

Figur 6: Sirkulerende nivåer av alanin-aminotransferase (ALT) 24 t og 48 t etter transplantering hos mus behandlet med vehikkel (A), reparixin (B), rapamycin (C) eller reparixin + rapamycin (D).

Figur 7: Panel A representerer prosentandelen transplantat-overlevelse over tid etter transplantering hos mus behandlet med reparixin, rapamycin, reparixin + rapamycin eller vehikkel. Panel B representerer multivariat Cox-regresjonsanalyse.

Figur 8 viser antall PMN ekstrahert fra leveren over tid (dager) etter transplantering av øyer (uttrykt som celler pr. mg. Levervev) hos kontroll (fet linje) eller reparixin-behandlede mus (blek linje).

Figur 9 viser antall NK-celler ekstrahert fra leveren over tid (dager) etter transplantering av øyer (uttrykt som celler pr. mg levervev) hos kontroll (fet linje) eller reparixin-behandlede mus (blek linje).

Figur 10 viser prosentandelen av CXCR2+-celler i de forskjellige leukocyt-subpopulasjonene ekstrahert fra leveren 5 dager etter allogen transplantering av øyer. På absissen står tallene 1-11 for følgende:

- 1: PMN ($\text{Gr1}^+ \text{CD11b}^+ \text{CD11c}^-$).
- 2: PMN ($\text{Gr1}^+ \text{CD11b}^+ \text{Ly6c}^-$).
- 3: Makrofager ($\text{CD11b}^+ \text{CD11c}^- \text{Gr1}^-$).
- 4: Dendrittceller ($\text{CD11c}^+ \text{CD11b}^+ \text{Gr1}^-$).
- 5: Lymfocytter ($\text{CD3}^+ \text{CD4}^+$).
- 6: Lymfocytter ($\text{CD3}^+ \text{CD8}^+$).
- 7: B-lymfocytter (CD19^+).
- 8: NKT-celler ($\text{NK1.1}^+ \text{CD3}^+$).
- 9: NKT-celler ($\text{NK1.1}^+ \text{CD3}^-$).
- 10: Lymfocytter ($\text{CD4}^+ \text{TCRb}^+$).
- 11: Lymfocytter ($\text{CD8}^+ \text{TCRb}^+$).

Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen.

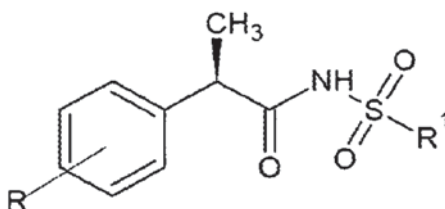
Foreliggende oppfinnere har nå overraskende funnet at agonister til CXCR1 og/eller CXCR2, i motsetning til hva som var forventet ut fra det som læres i tidligere kjent teknikk, er skadelig for overlevelse av øyer etter transplantering av pankreas-øyer. Slik det vil beskrivet i de følgende eksempler, viser pankreas-øyer en forbedret funksjon og overlevelse når de er transplantert til CXCR2-knock out-BALB/C-mus, sammenlignet med villtype-mus, med en vedvarende bedre glukosetoleranse og lavere glukosekonsentrasjon enn kontrollmus.

Videre viser forsøk utført av foreliggende oppfinnere klart at forbindelser som inhiberer CXCR1- og/eller CXCR2-signalisering er i stand til effektivt å forbedre transplantat-overlevelse og funksjon etter transplantering av pankreas-øyer.

Følgelig er det første formål for foreliggende søknad anvendelse av inhibitorer av CXCR1 og/eller CXCR2 som adjuvanter ved transplantering av pankreas-øyer hos pasienter med diabetes type 1.

Med «inhibitorer av CXCR1 og/eller CXCR2» i henhold til foreliggende oppfinnelse, menes forbindelser som er i stand til å forhindre biologisk CXCL8-aktivitet som stammer fra CXCR1- og/eller CXCR2-aktivering. Disse forbindelsene kan være konkurrerende antagonist eller allosteriske inhibitorer av reseptorene.

Foretrukne forbindelser ifølge oppfinnelsen er forbindelser med formel I, eller farmasøytisk akseptable salter derav:



(I)

hvor R er valgt blant lineær eller forgrenet 4-(C₁-C₆)alkyl, 4-trifluormetansulfonyloksy eller 3-benzoyl og R¹ er lineær eller forgrenet (C₁-C₆)alkyl. Spesielt foretrukne forbindelser i henhold til foreliggende oppfinnelse er R(-)-2-[(4-isobutylfenyl)-propionyl]metansulfonamid (alminnelig kjent som repertaxin eller reparixin, heretter referert til som reparixin) og R(-)-2-[(4'-trifluormetansulfonyloksy)fenyl]propionyl-metansulfonamid (alminnelig kjent og heretter referert til som meraxin).

Foretrukne salter av forbindelsene ifølge oppfinnelsen er lysin- og natrium-saltene. Spesielt foretrukne salter av forbindelsene ifølge oppfinnelsen er lysin-saltet av reparixin og natriumsaltet av meraxin.

Slik det vil bli beskrevet nedenfor, er forbindelsene med formel I, i dyremodeller, i stand til effektivt å forbedre overlevelse og funksjon av transplantat etter transplantasjon av pankreas-øyer.

5 I detalj viser data oppnådd i forsøksmodeller av transplantasjon av øyer en klar effekt av de ovennevnte forbindelser, representert ved R(-)-2-[(4-isobutylfenyl)-propionyl]metansulfonamid, ved beskyttelse mot tap av aktivitet og/eller skade på de transplanterte β -cellene.

I henhold til en foretrukket utførelsesform av oppfinnelsen, er den nevnte forbindelse med formel I reparixin. I henhold til en ytterligere, foretrukket utførelsesform, er nevnte forbindelse med formel I meraxin. Forbindelsene ifølge oppfinnelsen 10 er effektive til å støtte innpodningen av transplanterte pankreas-øyceller ved diabetes type 1.

Faktisk, slik det vil fremgå klarere fra den følgende forsøksdel, resulterte intravenøs administrering av reparixin til dyremodeller fra dag -1 til dag +6 etter 15 syngen eller allogen transplantering av pankreas-øyer i en høyere sannsynlighet og i en redusert midlere tid for å nå normale nivåer av glykemi (et ikke-fastende blodglukosenivå lavere enn 250 mg/ml), sammenlignet med kontrollene.

Således er et ytterligere formål for foreliggende oppfinnelse anvendelse av inhibitorer av CXCR1 og/eller CXCR2, fortrinnsvis av forbindelsene med formel I, mer 20 foretrukket av reparixin eller meraxin, for å forbedre innpodning og tidlig transplantatfunksjon og for å redusere forekomsten av tidlig transplantatsvikt etter transplantering av pankreas-øyer hos pasienter med diabetes type 1.

Nevnte transplantering blir fortrinnsvis utført til leveren eller benmargen til pasienten.

25 Forsøk med allogen transplantering av øyer viste at administrering av CXCR1/CXCR2-inhibitoren reparixin i signifikant grad reduserte forekomsten av avstøtningsreaksjoner hos de musene som oppnår primær funksjon etter transplantering.

Videre viser resultatene at transplantatfunksjon opprettholdes i lengre tid 30 sammenlignet med kontroller, med en økning av den midlere overlevelsestid.

Effekten av reparixin til å forbedre transplantatfunksjon og overlevelse er blitt vist med transplanteringen av pankreas-øyer, både i lever og i benmarg.

Således er et ytterligere formål for foreliggende oppfinnelse anvendelse av inhibitorer av CXCR1 og/eller CXCR2, fortrinnsvis av forbindelsene med formel (I), 35 mer foretrukket reparixin, for å redusere transplantatavstøtningsreaksjoner og for å forbedre langtidsoverlevelse av transplantat. Forbindelsene ifølge oppfinnelsen kan anvendes for dette formål alene eller i en kombinasjonsbehandling med ett eller flere

immunosuppressive midler, fortrinnsvis valgt blant sirolimus (også kjent som rapamycin) og tacrolimus.

Imidlertid antyder de oppnådde data, som er rapportert i forsøksdelen, også at anvendelse av en forbindelse ifølge oppfinnelsen alene kan være tilstrekkelig til å
5 hemme transplantatavstøtning. Faktisk, som vist i forsøksdelen, økte blokkeringen av CXCR1/2-reseptoren med reparixin signifikant avstøtningstiden hos mus som oppnådde primær funksjon etter transplantering, mens det ikke var noen signifikant variasjon med rapamycin. Videre ga administrering av reparixin alene resultater som var sammenlignbare med dem oppnådd med administrering av en kombinasjon av
10 reparixin og rapamycin. Disse dataene antyder klart at administrering av reparixin alene kan være tilstrekkelig til å redusere transplantatavstøtningsreaksjonen, uten behov for, eller med et redusert behov for, en immunosuppressiv behandling, noe som er en betydelig fordel med tanke på toksisitet.

Syntesen av forbindelsene ifølge oppfinnelsen kan utføres i henhold til
15 fremgangsmåter som er velkjente på fagområdet. For eksempel kan reparixin fremstilles som beskrevet i eksempel 1 i EP 1 123 276 og i eksempel 1 i EP 1 355 641, mens lysinsaltet kan fremstilles som beskrevet i henholdsvis eksempel 7 og eksempel 2 i de forannevnte patenter. For eksempel kan meraxin fremstilles i henhold til eksempel 1 i EP 1 776 336.

20 Forbindelsene anvendt i henhold til foreliggende oppfinnelse blir formulert som farmasøytiske preparater egnet for anvendelse ved oral administrering, så som tabletter, kapsler, siruper, fortrinnsvis i form av formuleringer med kontrollert frigjøring, eller ved parenteral administrering, fortrinnsvis i form av sterile løsninger egnet for intravenøs eller intramuskulær administrering. De farmasøytiske formene
25 kan fremstilles i henhold til konvensjonelle metoder, for eksempel som beskrevet i Remington, «The Science and Practice of Pharmacy», 21. utg. (Lippincott, Williams and Wilkins). Fortrinnsvis vil mengden av reparixin eller dets farmasøytisk akseptable salt i hver av de ovennevnte administreringsformer være slik at det gir mellom 2 og 15 mg forbindelse eller salt/kg kroppsvekt, mens mengden av meraxin eller dets
30 farmasøytisk akseptable salt vil være slik at det gir mellom 10 og 20 mg forbindelse eller salg/kg kroppsvekt. I ethvert tilfelle vil regimet og mengden av legemiddel som skal administreres bli bestemt av legen i henhold til pasientens behov.

Oppfinnelsen vil nå bli ytterligere, detaljert illustrert i den følgende forsøksdel.

FORSØKSDEL.

1. Syngen transplantasjon av øyer til knock out-mus.

For å teste rollen som aktivisering av CXCL8-signaliserende bane gjennom CXCR1 og CXCR2 har for overlevelse av øyer, ble funksjonen til øyene etter syngen, intrahepatisk transplantering av øyer vurdert hos Balb/c CXCR2-/--mus og CXCR2+/+-mus. CXCR1 blir ikke uttrykt i mus, og således avskaffer «knock out» av CXCR2 totalt signaliseringen induisert av CXCL8.

Ikke-fastende glykemi i løpet av den første uken etter transplantering og oral glukosetoleranse 4 uker etter transplantering ble oppfattet som indikatorer på funksjonalitet. Som vist på figur 1, viste transplanterte CXCR2 knock out-mus klart en vedvarende bedre glukosetoleranse enn kontrollmus av villtype, som vist ved den signifikante reduksjonen av konsentrasjonen av sirkulerende glukose i løpet av hele vurderingsperioden.

Den orale glukosetoleransetesten ble utført som beskrevet nedenfor, i del 2.

2. Syngen transplantasjon av øyer til mus.

Øyer fra 12 uker gamle C57-mus ble transplantert til leveren hos C57-mus med diabetes (alloxan-indusert diabetes, glykemi >450 mg/dl). To forskjellige, marginale øymassemodeller, 150 IE (øy-ekvivalenter («Islet Equivalents»)) og 250 IE, ble benyttet. Reparixin ble administrert ved hjelp av kontinuerlig subkutan infusjon som startet fra dag -1 til dag 6 eller 13 etter transplantasjon av øyer, i en dose på 8 mg/kg/t. Kontrolldyr fikk subkutan vehikkel kontinuerlig.

Evnen til å nå et ikke-fastende blodglukosenivå lavere enn 200 mg/dl i to påfølgende målinger etter transplantasjon av øyer ble først vurdert. Som vist på figur 2, var sannsynligheten og den midlere tid for å nå euglykemi (<200 mg/dl): 50% og 7 dager for mus behandlet med reparixin, sammenlignet med 35,1% og 50 dager for mus behandlet med vehikkel (log rank $p < 0,012$).

En multivariat Cox-regresjonsanalyse, hvor reparixin-behandling, varighet av behandling, antall transplanterte øyer og mottagerens glykemi før transplantering var inkludert som kovariater, bekreftet at resultatet ble signifikant forbedret med reparixin (oddsforhold: 2,6; 95% CI: 1,1-6,1; $p < 0,021$). Som forventet resulterte transplantasjon av 250 IE i en forbedret transplantasjon (oddsforhold 1,6; 95% CI: 0,6-4,3; $p < 0,28$), mens glykemi før transplantering påvirket resultatet negativt (oddsforhold: 0,6, 95% CI: 0,3-1,1; $p = 0,12$).

En intravenøs glukosetoleransetest (IVGTT) og en oral glukosetoleransetest (OGTT) ble utført 1 og 3 måneder etter transplantasjon for å vurdere funksjonaliteten til de transplanterte øyene. IVGTT ble initiert etter en 16-timers faste. Musene ble gitt

glukose 0,5 g/kg) ved hjelp av injeksjon i halevenen. Blodprøver ble tatt 0, 1, 5, 15, 20, 30 og 60 minutter etter injeksjon og ble benyttet til å bestemme glukosekonsentrasjon. Fra IVGTT ble glukosetoleranse kvantifisert ut fra glukose-eliminajonskonstanten (KG, uttrykt som prosent eliminajon av glukose pr. minutt), som

5 reduksjonen av sirkulerende glukose mellom 1 og 15 min. (KG_{1-15}) etter intravenøs administrering, etter den logaritmiske transformasjonen av de individuelle plasma-glukoseverdier. En lignende estimering ble utført for den totale 1- til 60-min. glukosebortfalls- («disappearance») raten (KG_{1-60}). Denne parameteren indikerer raten av glukosebortfall under hele testen. OGTT ble initiert etter en 4-timers faste.

10 Musene ble gitt glukose (1 g/kg) med oral sonde. Blodprøver ble tatt 0, 10, 20, 30, 60, 90 og 120 minutter etter administrering av glukose og benyttet til å bestemme glukosekonsentrasjonen. Området under grafen (AUC) for glukose i løpet av OGTT ble beregnet ved anvendelse av den trapezoidale metode (grunnlinje = 0 min.). Virkningene av transplantasjon av øyer på glukosetoleranse etter IVGTT og OGTT er illustrert

15 på figur 3. Dataene er angitt som spredningsplott. Hvert punkt representerer den midlere verdien av den målte parameteren hos mus transplantert i nærvær eller fravær av reparixin med øyer fra den samme isoleringen. Merkelappene identifiserer isoleringens nummer, mens firkantene og sirklene representerer mus transplantert med henholdsvis 250 eller 150 IE. Øvre og nedre paneler angir dataene henholdsvis 1

20 og 3 måneder etter transplantasjon. Den heltrukne linjen er identitetslinjen: sirklene ovenfor identitetslinjen representerer observasjon med høyere verdier i den reparixin-behandlede gruppen enn i den vehikkel-behandlede gruppen ($\Delta+$). OGTT 1 og 3 måneder etter transplantering viste at for mus behandlet med reparixin forblir AUC for glukose mindre enn det til kontrollmusene. I overensstemmelse med disse dataene ble

25 glukose-eliminajonskonstantene mellom 1 og 15 min. (KG_{1-15}) og 1 og 60 min. (KG_{1-60}) signifikant økt hos reparixin-behandlede mus, sammenlignet med kontrollmus.

Akutt leverskade ble kvantifisert på bakgrunn av sirkulerende nivåer av alanin-aminotransferase (ALT) 24 t og 48 t etter transplantasjon. ALT-nivåene ble ikke

30 påvirket av reparixin-behandling verken hos mus transplantert med 150 eller 250 IE (figur 4). Likeledes var det ingen synlig forskjell på sirkulerende nivåer av hvite blodceller, røde blodceller og blodplater (data ikke vist).

3. Allogen transplantasjon av øyer hos mus.

Øyer fra 12 uker gamle Balb/c-mus ble transplantert til leveren hos C57-mus med diabetes (alloxan, glykemi >450 mg/dl). I noen forsøk ble øyer fra 12 uker gamle C57BL/6(B6)-mus transplantert til leveren hos NOD/LtJ- (NOD) mus av hunkjønn med diabetes for å vurdere nærvær av eventuell autoimmun reaksjon. NOD-mus ble benyttet som mottagere av øy-transplantat etter minst tre ikke-fastende blodglukose-avlesninger høyere enn 350 mg/dl. I begge tilfeller ble 400 IE transplantert. Dyrene ble behandlet med reparixin alene (5,28 mg/kg/t kontinuerlig subkutan infusjon som starter fra dag -1 til dag 7 etter transplantering), rapamycin alene (daglige intraperitoneale injeksjoner som starter med en induksjonsdose på 0,3 mg/kg på dag 0, fulgt av en vedlikeholdsdose på 0,15 mg/kg inntil dag 14), reparixin + rapamycin eller vehikkel.

Evnen til å nå primær funksjon, definert som ikke-fastende blodglukosenivåer lavere enn 250 mg/dl i 2 påfølgende målinger etter transplantasjon av øyer og tiden til avstøtning definert som 2 påfølgende, ikke-fastende blodglukoseavlesninger høyere enn 300 mg/dl ble først vurdert.

Etter vurdering av alle musene transplantert i den alloimmune settingen, var sannsynligheten og den midlere tiden for å nå den primære funksjonen (glykemi <250 mg/dl): 72% og 1 dag for mus behandlet med reparixin alene, 73% og 1 dag for mus behandlet med rapamycin alene, 69% og 1 dag for mus behandlet med reparixin + rapamycin, 44% og 2 dager for mus behandlet med vehikkel (figur 5, log rank $p < 0,041$). En multivariat Cox-regresjonsanalyse hvor reparixin-behandling, rapamycin-behandling og mottagers glykemi før transplantering var inkludert som kovariater, bekreftet resultatets forbedring med reparixin-behandling (oddsforhold: 2,5, 95% CI: 0,79-2,99; $p < 0,202$). Behandling med rapamycin (oddsforhold: 1,1, 95% CI: 0,62-2,15; $p < 0,62$) og glykemi før transplantering (oddsforhold: 1,03, 95% CI: 0,68-1,59, $p < 0,88$) var mindre relevant.

Sirkulerende nivåer av ALT målt 24 t og 48 t etter transplantering ble ikke påvirket av reparixin, verken i nærvær eller i fravær av rapamycin (figur 6).

Dessuten økte behandling med reparixin signifikant tiden før avstøtning hos mus som oppnådde primær funksjon etter transplantering (figur 7). Den midlere overlevelsestid var henholdsvis $12 \pm 0,6$ dager ($n=13$) og $8 \pm 0,5$ dager ($n=7$) for reparixin- og vehikkel-behandlede mus i fravær av rapamycin. I nærvær av rapamycin var den midlere overlevelsestid henholdsvis 12 ± 2 dager ($n=11$) og $8 \pm 0,6$ dager ($n=11$) for reparixin og kontrollmus. Dataene ble bekreftet med en multivariat Cox-regresjonsanalyse, innbefattende reparixin-behandling, rapamycin-behandling og mottagers glykemi før transplantering som kovariater. Behandlingen med reparixin ble

bekreftet som en signifikant, uavhengig beskyttelsesfaktor for tap av transplantat-overlevelse (oddsforhold: 0,252, 95% intervallkonfidens: 0,099-0,64, $p=0,004$), mens rapamycin-behandlingen (oddsforhold: 1,173, 95% intervallkonfidens: 0,562-2,45, $p=0,67$) og glykemien før transplantering (oddsforhold: 1,002, 95% intervallkonfidens: 0,604-1,661, $p=0,99$) ikke var signifikant.

4. CXCR1/2-blokkering med reparixin modulerer inflammatorisk status i leveren etter allogen transplantasjon av øyer.

Den intrahepatiske leukocyttpopulasjonen ble analysert i nærvær eller fravær av reparixin-behandling etter allogen intrahepatisk transplantasjon av øyer til mus. Øyer (400 IE) fra 12 uker gamle Balb/c-mus ble transplantert til leveren hos C57 mus med diabetes (alloxan-indusert, >450 mg/dl) i nærvær av subkutan, kontinuerlig infusjon av reparixin i 7 dager, som starter fra dag -1 med en dose på 8 mg/t/kg, eller av vehikkel. Musene ble drept på dag 0, +1, +3, +5, +7, +10, +14 etter transplantasjon av øyer og leveren ble veiet på tidspunktet for autopsi. Suspensjoner av enkeltceller ble fremstilt fra to leverlapper med kjent vekt og analyse av den intrahepatiske leukocytt- (IHL) populasjonen ble utført ved hjelp av flytcytometri. Cellene ble overflatefarget med fluorescein-isotiocyanat (FITC)-, phycoerytrin (PE)- eller allophycocyanin (APC)-merket anti-CD4, anti-CD8, anti-CD3, anti-CD19, anti-TCR, anti-NK1,1, anti-CD11, anti-Gr-1, anti-CD11b og anti-CD11c Abs (PharMingen, San Diego, CA) for påvisning av Gr-1⁺/CD11b⁺/CD11c⁻-celler (for det meste PMN'er), CD4⁺/TCR⁺ (for det meste T-hjelperceller), CD8⁺/TCR⁺-celler (for det meste CTL'er), NK1.1⁺/CD3⁻-celler (NK-celler), NK1.1⁺/CD3⁺-celler (NKT-celler) og Gr-1⁻/CD11b⁺/CD11c⁻ (for det meste makrofager), CD115⁺/CD11b⁺/Cd11c⁻ (for det meste monocytt), CD11c⁺/CD11b⁺/Gr1⁻ (for det meste dendrittceller), CD19 (for det meste B-lymfocytter). Prøver ble innhentet med et FACSCalibur-flytcytometer og dataene ble analysert ved anvendelse av CELLQuest-programvare (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA).

I et andre sett av forsøk ble CXCR2- og CXCR1-ekspresjon på IHL-populasjon vurdert på det tidspunktet da leukocyttinfiltrasjon oppnådde den høyeste grad av infiltrasjon.

De oppnådde resultatene bekrefter at behandlingen med reparixin reduserer rekruttering av leukocytene og infiltrasjon i leveren etter allogen transplantasjon. Særlig blir PMN'er (figur 8) og NKT-celler (figur 9), som er den leukocytt-subpopulasjonen som uttrykker CXCR2, signifikant påvirket, slik det også kan sees på figur 10.

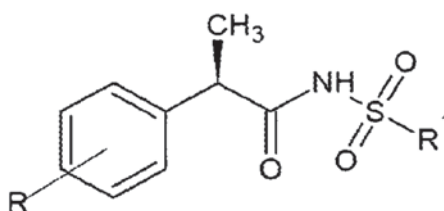
5. CXCR2/1-blokkering med reparixin påvirker resultatet av alloge transplantasjon av øyer etter transplantasjon av øyer til benmarg.

Øyer (400 IE) fra 12 uker gamle Balb/c-mus ble transplantert til benmargen hos C57-mus med diabetes (alloxan-indusert, >450 mg/dl) i nærvær av subkutan, 5
kontinuerlig infusjon av reparixin i 7 dager, som starter fra dag -1 med en dose på 8 mg/t/kg. En kontrollgruppe av mus ble behandlet med vehikkel. De primære sluttpunktene for forsøket var evnen til å nå primær funksjon, definert som ikke-
fastende blodglukosenivåer lavere enn 250 mg/dl i to påfølgende målinger etter
10 transplantasjon av øyer og tiden til avstøtning definert som to påfølgende, ikke-
fastende blodglukose-avlesninger høyere enn 350 mg/dl.

De oppnådde resultatene bekreftet at resultatet ble forbedret med behandling med reparixin.

P a t e n t k r a v

1. Inhibitor av CXCR1 og/eller CXCR2 for anvendelse som adjuvans-medikament for transplantering av pankreas-øyer til pasienter med diabetes type 1.
2. Inhibitor ifølge krav 1, for anvendelse som i krav 1, hvor nevnte inhibitor er en forbindelse med formel I, eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav:

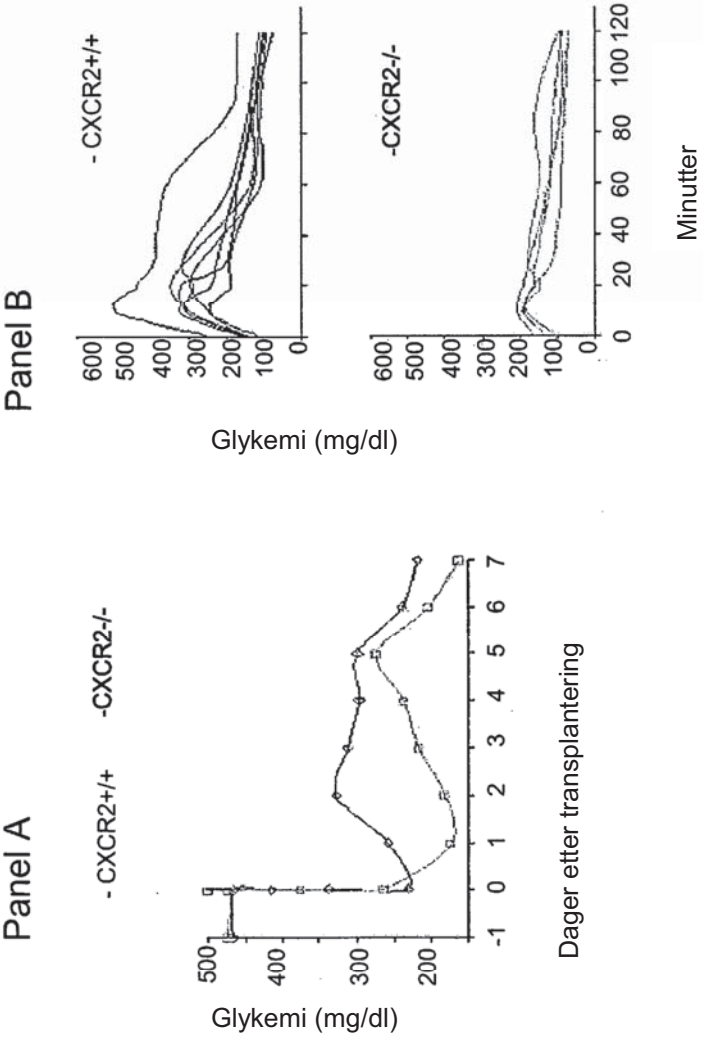


(I)

hvor R er valgt blant lineære eller forgrenet 4-(C₁-C₆)alkyl, 4-trifluormetan-sulfonyloksy eller 3-benzoyl og R¹ er lineær eller forgrenet (C₁-C₆)alkyl.

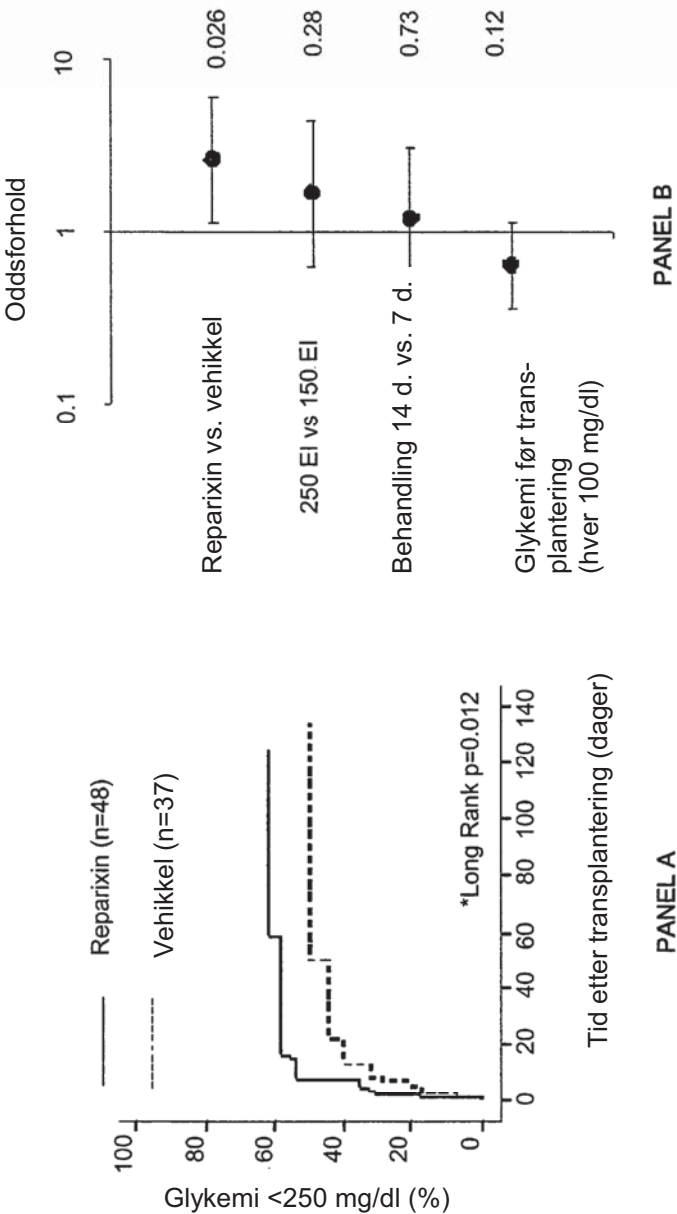
3. Inhibitor ifølge krav 2, for anvendelse som i krav 1, hvor det farmasøytisk akseptable salt er valgt blant lysin- og natriumsalt.
4. Inhibitor ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 3, for anvendelse som i krav 1, hvor nevnte medikament forbedrer innpodning av pankreas-øyceller og tidlig funksjon av transplantat.
5. Inhibitor ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 4, for anvendelse som i krav 1, hvor nevnte medikament reduserer forekomsten av svikt av transplanterte pankreas-øyer.
6. Inhibitor ifølge krav 5, for anvendelse som i krav 1, hvor nevnte medikament reduserer tiden og forekomsten av transplantat-avstøtning av pankreas-øyceller.
7. Inhibitor ifølge krav 6, for anvendelse som i krav 1, hvor nevnte medikament forbedrer langtids overlevelse av transplantat.

8. Inhibitor ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 7, for anvendelse som i krav 1, valgt blant R(-)-N-2-[(4s-isobutylfenyl)propionyl]metansulfonamid og R(-)-2-[(4'-trifluormetansulfonyloksy)fenyl]propionyl-metansulfonamid.



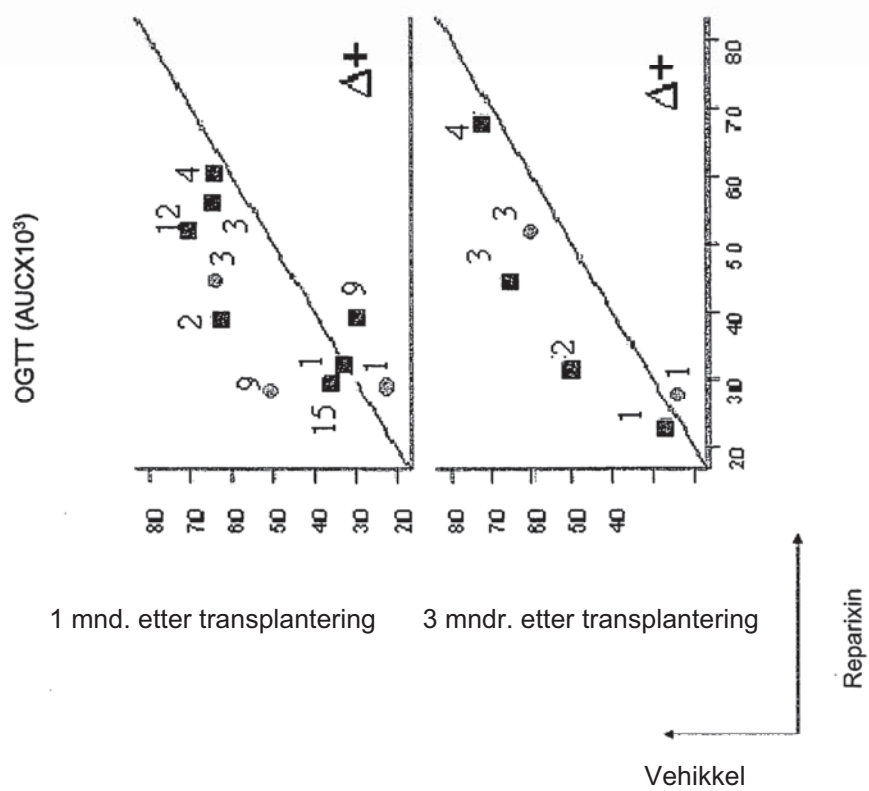
Figur 1

2/11



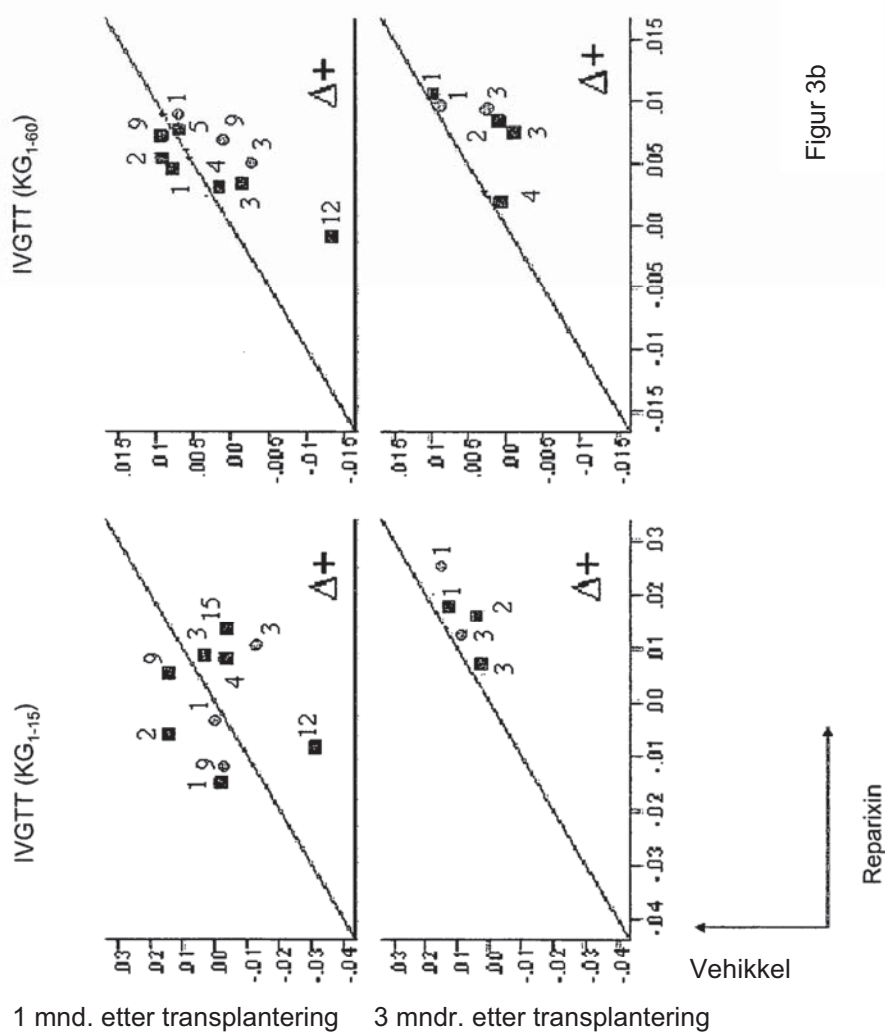
Figur 2

3/11



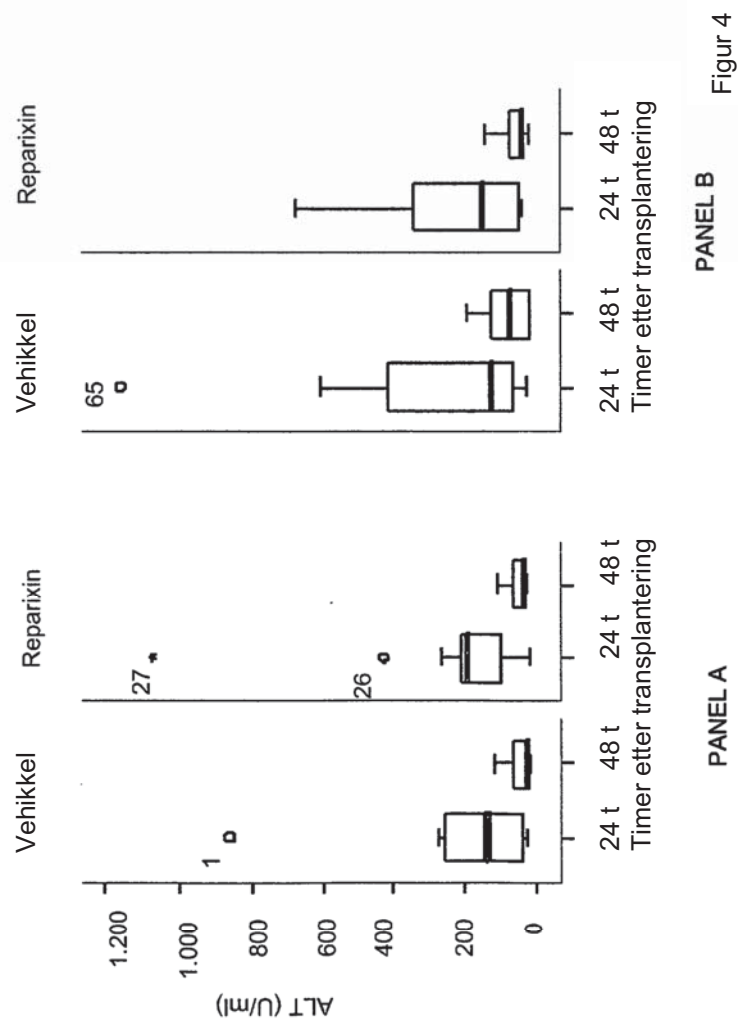
Figur 3a

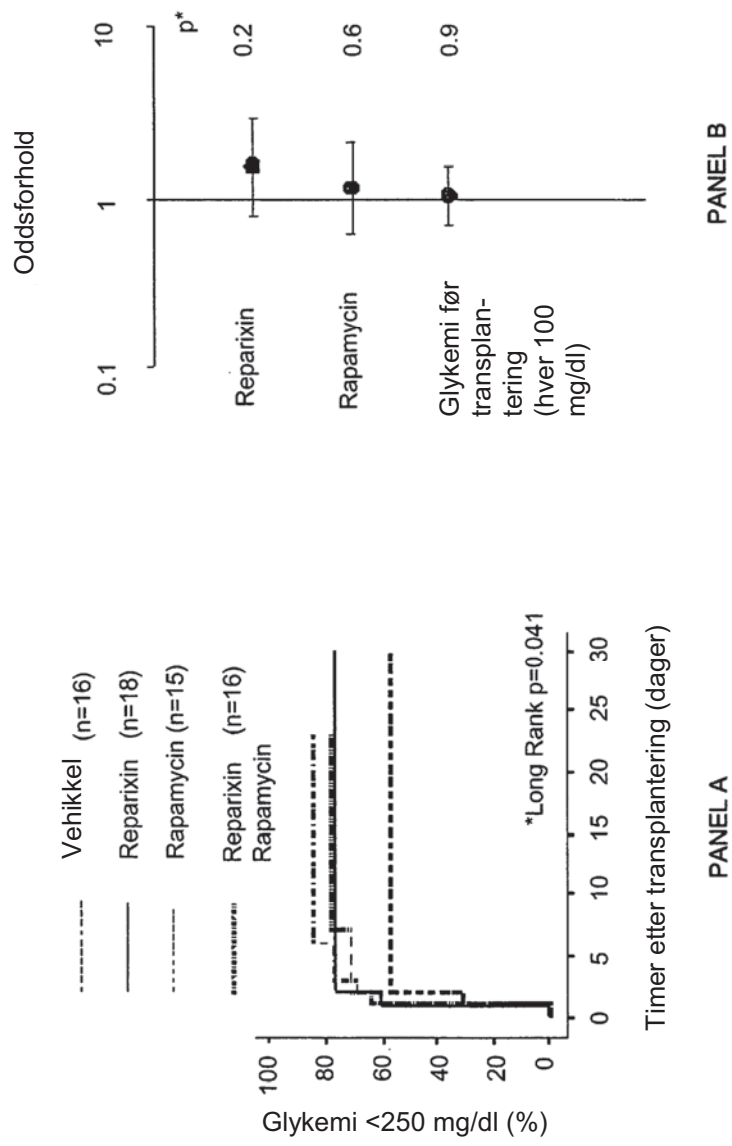
4/11



Figur 3b

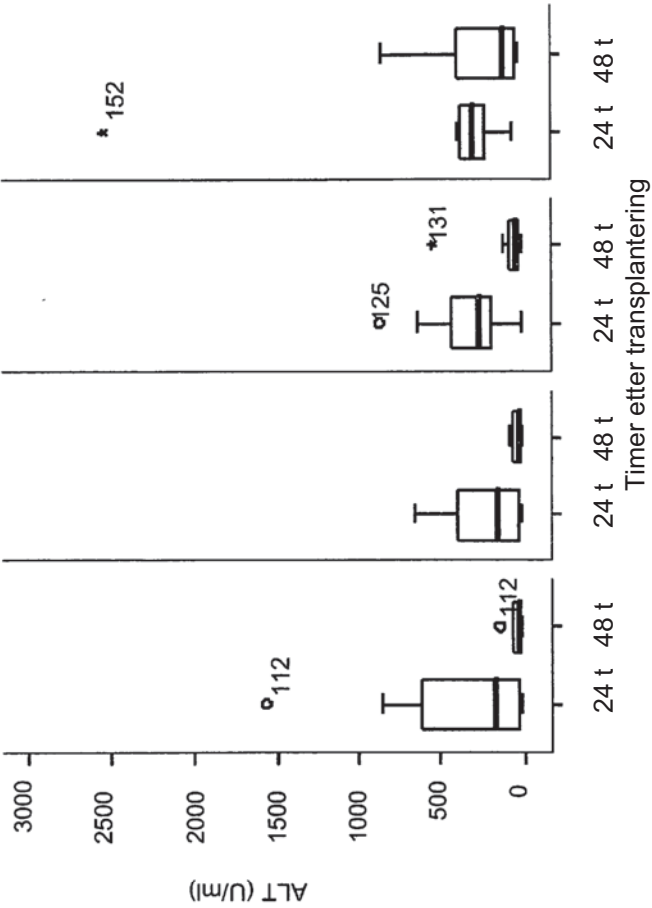
5/11



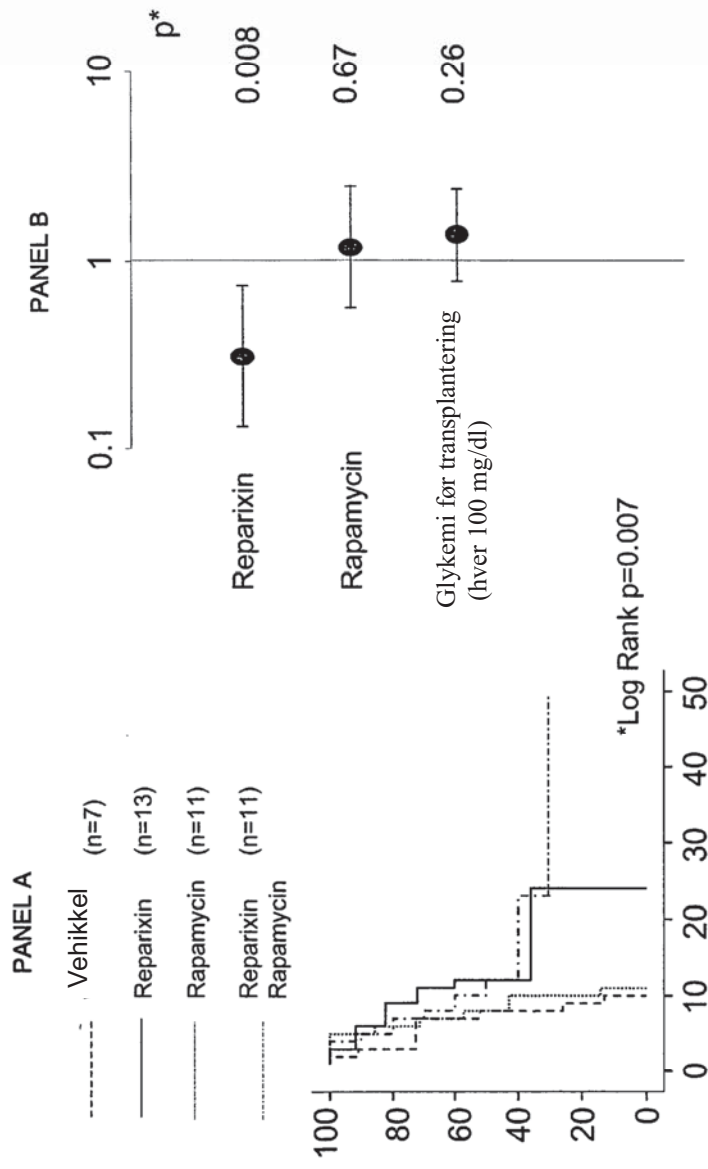


Figur 5

7/11



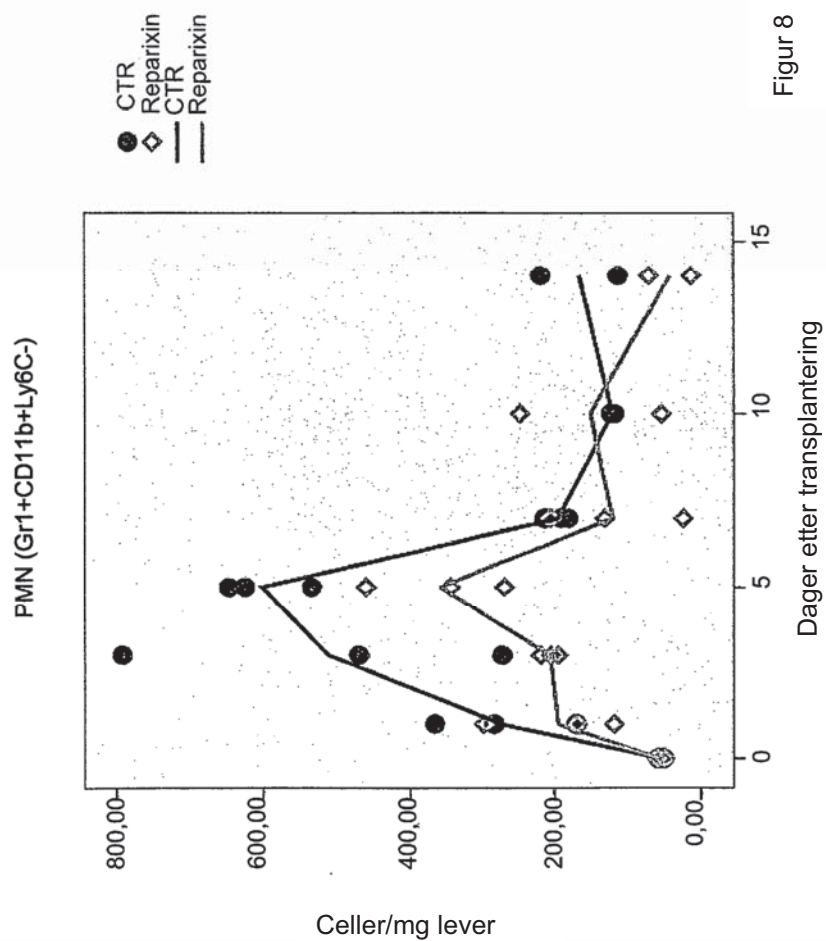
Figur 6

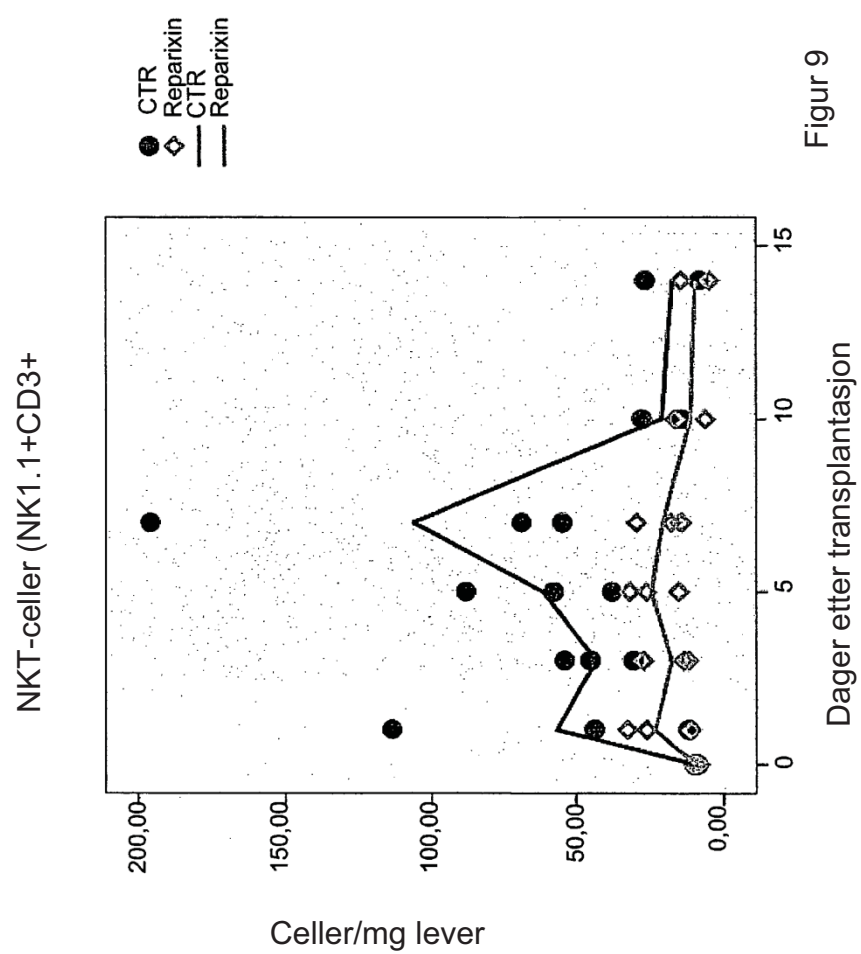


Tid etter transplantering (dager)

Figur 7

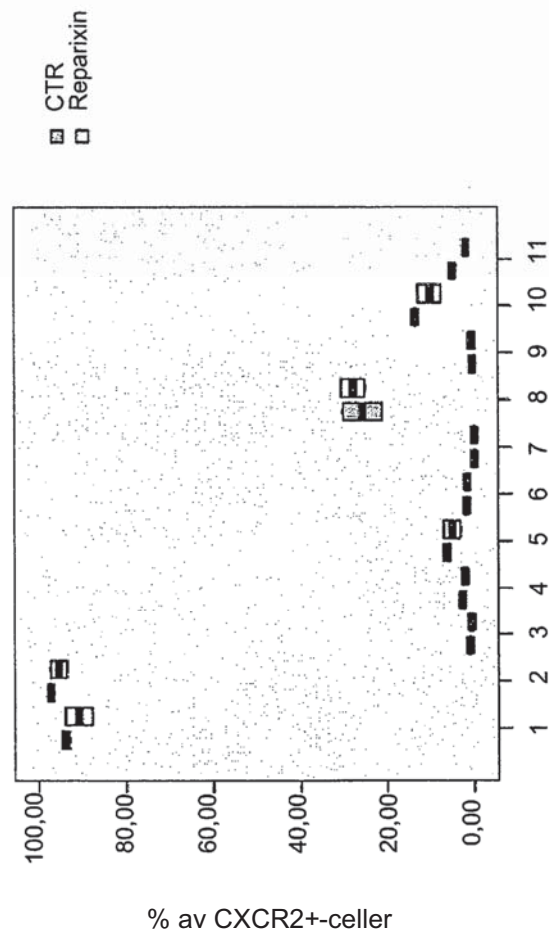
9/11





Figur 9

11/11



Figur 10