



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(51) МПК

A61K31/519 (2006.01)*A61P9/10* (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

Статус: по данным на 27.01.2015 - действует

Пошлина: учтена за 12 год с 19.11.2014 по 18.11.2015

(21), (22) Заявка: 2005119174/14, 18.11.2003

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
18.11.2003(30) Конвенционный приоритет:
18.11.2002 US 10/298,377

(43) Дата публикации заявки: 20.01.2006

(45) Опубликовано: [10.08.2008](#)

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: US 2002/0156081 A1, 24.10.2002. US 6262079
17.07.2001. US 5731343 24.03.1998. СУМАРОКОВ А.В. и др.
Клиническая кардиология. Универсум Паблишинг, 1996, с.37.
НАТТОРИ R. et al. Src tyrosine kinase is the trigger but not
mediator of ischemic preconditioning". Am. J. Physiol. Heart Circ.
Physiol. 2001 Sep; 281(3):H1066-74, реферат. HENKE JH et al.

(72) Автор(ы):
ЧЕРЕШ Дэвид А. (US),
ПОЛ Роберт (DE),
ЭЛИЦЕЙРИ Брайан (US)

(73)
Патентообладатель(и):
ДЗЕ СКРИППС РИСЕРЧ
ИНСТИТЮТ (US)

(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу:
20.06.2005(86) Заявка РСТ:
US 03/37653 (18.11.2003)(87) Публикация РСТ:
WO 2004/045563 (03.06.2004)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр. 3, ООО
"Юридическая фирма Городисский и Партнеры", пат.пов. Г.Б.
Егоровой, рег.№ 513

(54) СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ ИНФАРКТА МИОКАРДА

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, в частности к кардиологии, и касается лечения инфаркта миокарда

у млекопитающих, в том числе у человека. Для этого вводят терапевтически эффективное количество фармацевтической композиции, включающей химический ингибитор тирозинкиназы семейства Src. При этом ингибитор тирозинкиназы выбирают из группы, состоящей из 4-амино-5-(4-метилфенил)-7-(трет-бутил)пиразоло[3,4-d-]пиримидина, 4-амино-5-(4-хлорфенил)-7-(трет-бутил)пиразоло[3,4-d-]пиримидина и их смеси. Использование этих соединений в конкретных эффективных дозах, разработанных в опытах «ин vivo», обеспечивает уменьшение сосудистой проницаемости и сокращения зоны некроза при инфаркте миокарда. 4 н. и 12 з.п. ф-лы, 2 табл., 14 ил.

(56) (продолжение):

CLASS="b560m"Discovery of a novel, potent, and Src famili-selective tyrosine kinase inhibitor. J. Biol. Chem. 1996, vol.271, No2, Jan12:695-701, US 5731343 24.03.1998. OWENS D.W. et al. The catalytic activity of the Src famili kinases is required to disrupt cadheren-dependent cell-cell contacts. Mol. Biol. Cell. 2000, 11:51-64.

Настоящая заявка является заявкой в частичное продолжение заявки на патент США №10/298377, поданной 18 ноября 2002 г., которая является заявкой в частичное продолжение заявки на патент США №09/538248, поданной 29 марта 2000 г., которая является заявкой в частичное продолжение заявки на патент США №09/470881, поданной 22 декабря 1999 г., которая, в свою очередь, является заявкой в частичное продолжение международной заявки на патент № PCT/US99/11780 с указанием США в качестве страны назначения и поданной 29 мая 1998 г., которая заявляет приоритет предварительной заявки на патент США №60/087220, поданной 29 мая 1998 г. Указанные заявки включены в данное описание во всей своей полноте в качестве ссылки.

Заявление по вопросу прав Правительства

Настоящая заявка на патент выполнена при поддержке правительства согласно контрактам №№ CA 50286, CA 45726, CA 75924, CA 78045, HL 54444 и HL 09435 Национального Института Здоровья. Правительство имеет определенные права на настоящее изобретение.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к области медицины, конкретно к способам и композициям для лечения инфаркта миокарда у млекопитающих.

Уровень техники

Проницаемость сосудов в результате повреждения, заболевания или другой травмы кровеносных сосудов вызывает сосудистую утечку и отек, связанные с повреждением ткани. Например, нарушение мозгового кровообращения, связанное с инсультом (CVA), или другое повреждение кровеносных сосудов мозга или тканей позвоночника являются самым распространенным случаем неврологического нарушения и основной причиной нетрудоспособности. Обычно поражение мозга или тканей позвоночника в области CVA включает сосудистую утечку и/или отек. Обычно CVA может включать повреждение, вызванное ишемией мозга, нарушением нормального кровообращения мозга; умственную недостаточность вследствие транзиторных нарушений кровообращения; инфаркт вследствие отека и тромбоза внутричерепных и внечерепных артерий; кровоизлияние; и

артериовенозные мальформации. Ишемический удар и внутримозговое кровоизлияние могут развиваться внезапно, и последствия инцидента обычно отражают пораженную область мозга (См. The Merck Manual, 16-е издание, глава 123, 1992).

Помимо CVA инфекции или заболевание центральной нервной системы (ЦНС) также могут поражать кровеносные сосуды мозга и позвоночника и вызывать воспаление и отек, как, например, при бактериальных менингитах, вирусных энцефалитах и абсцедировании мозга (См. The Merck Manual, 16-е издание, глава 125, 1992). Также могут ослаблять кровеносные сосуды и приводить к сосудистой утечке и отеку состояния при системных заболеваниях, таких как диабет, заболевание почек, атеросклероз, инфаркт миокарда и т.п. Таким образом, сосудистая утечка и отек представляют собой критические патологии, отличные и независимые от рака, которые нуждаются в эффективном специфическом терапевтическом воздействии в соответствии с видом повреждения, травмы или состояний заболевания.

Инфаркт миокарда представляет собой гибель сердечных тканей вследствие перекрытия поступления крови в сердечную мышцу. Инфаркт миокарда является одним из самых распространенных диагнозов у госпитализированных пациентов в западных странах. Сообщалось, что в Соединенных Штатах около 1,1 миллиону людей в год ставят диагноз острого инфаркта миокарда. Смертность от инфаркта миокарда может превышать 53%, а до 66% выживших пациентов не достигают полного восстановления. Снижение смертности только на один процент могло бы спасти до 3400 жизней в год. Инфаркт миокарда и сопровождающий отек обычно происходят при окклюзии коронарной артерии, перекрытии поступления кислорода в сердечную ткань, которая снабжается блокированной артерией. При блокировании поставки крови ткань, в норме снабжаемая кровью блокированной артерией, становится ишемической. В результате сердечная ткань с кислородной недостаточностью начинает отмирать (некроз). Nonkanen и др., патент США №5914242, описывает способ уменьшения зоны инфаркта миокарда, включающий введение пациенту некоторых ингибиторов фермента серин/треонин фосфатазы и родственных полипептидов после приступа ишемии сердца. Такие ферменты и полипептиды являются дорогостоящими и сложными в производстве и при очистке для фармацевтического использования.

Авторы изобретения обнаружили, что ингибирование активности тирозинкиназы семейства Src обеспечивает способ лечения инфаркта миокарда посредством уменьшения отека и образующегося некроза коронарной ткани, который обычно является результатом окклюзии коронарной сосудистой сети, таким образом уменьшая эффекты повреждение ткани при инфаркте миокарда.

Раскрытие изобретения

Настоящее изобретение относится к способу лечения инфаркта миокарда (ИМ) посредством ингибирования активности тирозинкиназы семейства Src. Способ включает лечение коронарной ткани млекопитающего, страдающего окклюзией коронарных сосудов, эффективным количеством ингибитора тирозинкиназы семейства Src. Млекопитающее может быть человеком или млекопитающим, не являющимся человеком. Коронарная ткань, требующая лечения, может представлять собой любую часть сердца, которая страдает от ишемии (т.е. снижения кровообращения) вследствие окклюзии коронарных сосудов. Терапевтическое лечение проводится путем взаимодействия целевой коронарной

ткани с эффективным количеством желаемой фармацевтической композиции, содержащей химический (т.е. небелковый) ингибитор тирозинкиназы семейства Src. Полезно обрабатывать больную коронарную ткань в области, близкой к месту, где происходит или произошла опасная окклюзия сосудов. Способ обеспечивает уменьшение некроза тканей (инфаркта), обычно являющегося результатом окклюзии коронарных сосудов.

Еще одним аспектом настоящего изобретения является изделие, которое содержит упаковочный материал и фармацевтическую композицию, содержащуюся в упаковочном материале, причем фармацевтическая композиция способна уменьшить некроз коронарной ткани, страдающей от снижения кровообращения в результате окклюзии коронарных сосудов. Упаковочный материал содержит маркировку, которая указывает, что фармацевтическая композиция может быть применена для лечения инфаркта миокарда и что фармацевтическая композиция содержит терапевтически эффективное количество ингибитора тирозинкиназы семейства Src в фармацевтически приемлемом носителе.

Подходящие ингибиторы тирозинкиназы семейства Src для целей настоящего изобретения включают ингибиторы тирозинкиназы семейства Src класса пиразолопиримидинов, такие как 4-амино-5-(4-метилфенил)-7-(трет-бутил)пиразоло[3,4-d]пиримидин (AGL 1872), 4-амино-5-(4-хлорфенил)-7-(трет-бутил)пиразоло[3,4-d]пиримидин (AGL 1879) и т.п.; ингибиторы тирозинкиназы семейства Src класса макроциклических диенонов, такие как радицикол R2146 (Radicicol R2146), гелданамицин, гербимидин А и т.п.; ингибиторы тирозинкиназы семейства Src класса пиридо[2,3-d]пиримидинов, такой как PD173955 и т.п.; ингибиторы тирозинкиназы семейства Src класса 4-анилино-3-хинолинкарбонитрила, такой как SKI-606 и т.п.; и их смеси.

Способы настоящего изобретения являются пригодными для лечения инфаркта миокарда. Более конкретно способы настоящего изобретения являются пригодными для уменьшения некроза сердечной ткани вследствие закупорки коронарных сосудов в результате заболевания, повреждения или травмы сердца.

Краткое описание чертежей, составляющих часть данного описания:

Фиг.1 представляет собой последовательность кДНК (SEQ ID NO:1) с-Src человека, которая впервые была описана у Braeuninger и др., Proc. Natl. Acad. Sci., США, 88:10411-10415 (1991). Данная последовательность является доступной через GenBank Accession под номером X59932 X71157. Последовательность содержит 2187 нуклеотидов с частью, кодирующей белок, которая начинается и заканчивается позициями нуклеотидов, соответствующими 134 и 1486.

Фиг.2 представляет собой кодированную последовательность аминокислотных остатков с-Src человека, которая кодируется последовательностью, показанной на Фиг.1 (SEQ ID NO:2).

На Фиг.3 изображена последовательность нуклеиновых кислот (SEQ ID NO:3) кДНК, кодирующая с-Yes белок человека. Данная последовательность является доступной через GenBank Accession под номером M15990. Последовательность содержит 4517 нуклеотидов с частью, кодирующей белок, которая начинается и заканчивается позициями нуклеотидов, соответствующими 208 и 1839, и транслируется в аминокислотную последовательность, изображенную на Фиг.4.

На Фиг.4 изображена аминокислотная последовательность с-Yes (SEQ ID NO:4).

На Фиг.5 показаны результаты модифицированных тестов Miles для ПС при VEGF в коже мышей с дефицитом Src, Fyn и Yes. Фиг.5,А представляет собой фотографии обработанных ушей. Фиг.5,В представляет собой графики результатов эксперимента по стимуляции мышей с различными типами дефицита. Фиг.5,С представляет собой диаграмму количества красителя Evan's blue, элюированного из обработанных тканей.

Фиг.6 представляет собой график, изображающий относительный размер церебрального инфаркта у Src+/-, Src-/-, дикого типа (WET) и AGL1872 (т.е. 4-амино-5-(4-метилфенил)-7-(трет-бутил)пиразоло[3,4-d]пиримидин) обработанных мышей дикого типа. Доза составляла 1,5 мг/кг веса тела.

На Фиг.7 изображены последовательные снимки ЯМР-томографии головного мозга контрольных и обработанных AGL1872 мышей, демонстрирующие уменьшение размера мозгового инфаркта у животных, обработанных AGL1872 (справа), по сравнению с контрольными животными (слева).

На Фиг.8 изображены структуры предпочтительных ингибиторов тирозинкиназы семейства Src класса пиразолопиримидинов настоящего изобретения.

На Фиг.9 изображены структуры предпочтительных ингибиторов тирозинкиназы семейства Src макроциклических диенонов настоящего изобретения.

На Фиг.10 изображена структура предпочтительных ингибиторов тирозинкиназы семейства Src класса пиридо[2,3-d]пиримидинов настоящего изобретения.

На Фиг.11 приведены фотомикрографические изображения живой окрашенной сердечной ткани крысы, которая была травмирована для индуцирования инфаркта миокарда; изображение справа, показывающее значительную степень некроза, представляет собой контроль; изображение слева, показывающее резко сниженную степень некроза, представляет собой ткань, обработанную химическим ингибитором тирозинкиназы семейства Src (AGL1872).

На Фиг.12 изображена гистограмма размера инфаркта миокарда как функция концентрации ингибитора (AGL1872).

На Фиг.13 изображена гистограмма размера инфаркта миокарда как функция времени после обработки ингибитором (AGL1872).

На Фиг.14 изображена гистограмма содержания воды в миокарде как функция концентрации ингибитора (AGL1872).

Осуществление изобретения

А. Определения

Термин "аминокислотный остаток", как используется в настоящем описании, относится к аминокислоте, образованной путем химического расщепления (гидролиза) полипептида по его пептидным связям.

Предпочтительно аминокислотные остатки, рассматриваемые в настоящем описании, представляют собой "L" изомерную форму. Однако остатки в "D" изомерной форме могут замещаться любым L-аминокислотным остатком при условии, что у полипептида сохраняется требуемое функциональное свойство. NH₂ относится к свободной аминогруппе, находящейся на аминоконце полипептида. COOH относится к свободной карбоксильной группе, находящейся на карбоксильном конце полипептида, придерживаясь стандартной номенклатуры полипептидов (описанной в J. Biol. Chem., 243:3552-59 (1969) и принятой 37 CFR §1.822(b)(2)).

Следует отметить, что все последовательности аминокислотных остатков представлены в настоящем описании в виде формулы, у которой ориентация слева направо соответствует стандартному направлению от аминоконца (N-конец) к карбоксильному концу (C-конец). Помимо этого, следует отметить, что тире в начале или в конце последовательности аминокислотных остатков указывает на пептидную связь со следующей последовательностью из одной или нескольких остатков аминокислот.

Термин "полипептид", как используется в настоящем описании, относится к линейным последовательностям аминокислотных остатков, соединенных друг с другом пептидными связями между альфа-аминогруппой и карбоксильной группой соседних аминокислотных остатков.

Термин "пептид", как используется в настоящем описании, относится к линейным последовательностям, состоящим не более чем из 50 аминокислотных остатков, соединенных друг с другом как в полипептиде.

Термин "белок", как используется в настоящем описании, относится к линейным последовательностям, состоящим более чем из 50 аминокислотных остатков, соединенных друг с другом как в полипептиде.

V. Общее обсуждение

В общем случае настоящее изобретение относится к (1) установлению того, что VEGF-индуцируемая проницаемость сосудов (ПС) специфически опосредована белками тирозинкиназы, такими как Src и Yes, и что ПС может модулироваться ингибитором активности тирозинкиназы семейства Src; и (2) установлению того, что введение *in vivo* ингибитора тирозинкиназы семейства Src уменьшает поражение тканей в результате увеличения проницаемости сосудов, связанной с болезнью или повреждением.

Это открытие является важным ввиду роли, которую играет проницаемость сосудов в ряде патологических процессов. Настоящее изобретение относится к установлению того, что проницаемость сосудов может специфически модулироваться и уменьшаться путем ингибирования активности тирозинкиназы семейства Src. В частности, настоящее изобретение относится к установлению того, что введение *in vivo* ингибитора тирозинкиназы семейства Src уменьшает поражение тканей в результате увеличения проницаемости сосудов, связанной с болезнью или повреждением, которое не связано с раком или ангиогенезом.

Проницаемость сосудов вовлечена в ряд патологических процессов, в которых поражение ткани вызывается резким увеличением ПС вследствие травмы кровеносного сосуда. Таким образом, возможность специфически модулировать ПС предоставляет новые и эффективные виды лечения для

уменьшения неблагоприятных последствий удара.

Примеры тканей, связанных с заболеванием или повреждением, индуцируемым сосудистой утечкой и/или отеком, на которые может быть оказано благоприятное действие при специфической модуляции посредством ингибитора с использованием ингибитора тирозинкиназы семейства Src, включают ревматоидный артрит, диабетическую ретинопатию, воспалительные заболевания, рестеноз, удар, инфаркт миокарда и т.п.

Сообщалось, что системная нейтрализация белка VEGF с использованием IgG слитого белка с VEGF рецепторами уменьшает размер инфаркта после церебральной ишемии. Такой эффект сопровождался уменьшением VEGF-регулируемой проницаемости сосудов (N. van Bruggen и др., J. Clin. Invest. 104:1613-1620 (1999)). Однако VEGF не является ключевым медиатором увеличения проницаемости сосудов, которым, как обнаружено в настоящее время, является Src. Более того, Src может быть активирован стимулом, отличным от VEGF (См., например, Erpel и др., Cell Biology, 7:176-182 (1995)).

Более конкретно, настоящее изобретение относится к установлению того, что ингибиторы тирозинкиназы семейства Src, конкретно ингибиторы Src, являются пригодными для лечения инфаркта миокарда путем уменьшения поражения коронарной ткани у млекопитающего вследствие окклюзии коронарных сосудов.

C. Белки тирозинкиназы семейства Src

Как используется в настоящем описании и прилагаемой формуле изобретения, термин "белок тирозинкиназы семейства Src" и его грамматические вариации относятся в частности к белку, имеющему аминокислотную последовательность, гомологичную v-Src, N-терминальную миристолящую, сохраненную структуру домена, имеющую N-терминальную переменную область, за которой следует SH3-домен, SH2-домен, каталитический домен тирозинкиназы и C-терминальный регуляторный домен. Термины "белок Src" и "Src" используются для совместного обозначения различных форм белка Src тирозинкиназы, имеющего молекулярный вес 60 КДа, N-терминальную переменную область, включающую в себя 2 сайта фосфорилирования PKC и один сайт фосфорилирования PKA, относительно более высокую общую идентичность аминокислотной последовательности известным белкам Src, чем известным членам других подгрупп семейства Src (например, Yes, Fyn, Lck и Lyn), и которая активируется фосфорилированием тирозина, который соответствует тирозину в позиции 416 в SEQ ID NO:2. Термины "Yes белок" и "Yes" используют для совместного обозначения различных форм Yes белка тирозинкиназы, имеющего молекулярный вес 62 КДа, N-терминальную переменную область, у которой отсутствует какой-либо сайт фосфорилирования, относительно более высокую общую идентичность аминокислотной последовательности известным Yes белкам, чем известным членам других подгрупп семейства Src (например, Yes, Fyn, Lck и Lyn), и которая активируется фосфорилированием тирозина, который соответствует тирозину в позиции 426 в SEQ ID NO:4.

Предпочтительный способ измерения коронарной ишемии включает индуцирование ишемии у крыс путем наложения лигатуры на коронарную артерию и определения размера инфаркта миокарда при помощи ЯМР-томографии, эхокардиографии и аналогичных способов в течение всего времени, как более подробно изложено в настоящем описании ниже.

D. Способы лечения и предупреждения инфаркта миокарда

Способы настоящего изобретения включают взаимодействие ишемической коронарной ткани с фармацевтической композицией, которая включает, по меньшей мере, один химический ингибитор тирозинкиназы семейства Src.

Подходящие ингибиторы тирозинкиназы семейства Src для целей настоящего изобретения включают химические ингибиторы Src, такие как ингибиторы тирозинкиназы семейства Src класса пиразолопиримидинов, ингибиторы тирозинкиназы семейства Src класса макроциклических диенонов, ингибиторы тирозинкиназы семейства Src класса пиридо[2,3-d]пиримидинов и ингибиторы тирозинкиназы семейства Src класса 4-анилино-3-хинолинкарбонитрила. Также могут быть использованы смеси ингибиторов.

Предпочтительные ингибиторы тирозинкиназы семейства Src класса пиразолопиримидинов включают 4-амино-5-(4-метилфенил)-7-(трет-бутил)пиразоло[3,4-d]пиримидин (также иногда называемый PP1 или AGL1872), 4-амино-5-(4-хлорфенил)-7-(трет-бутил)пиразоло[3,4-d]пиримидин (также иногда называемый PP2 или AGL1879) и т.п., получение которых более подробно описано у Waltenberger и др., *Circ. Res.*, 85:12-22 (1999), релевантное раскрытие которой включено в данное описание во всей своей полноте в качестве ссылки. Химические структуры AGL1872 и AGL1879 проиллюстрированы на Фиг.8. AGL1872 (PP1) является доступным от Biomol по лицензии от Pfizer, Inc. AGL1879 (PP2) является доступным от Calbiochem по лицензии от Pfizer, Inc. (см. также Hanke и др., *J.Biol. Chem.* 271(2):695-701 (1996)).

Предпочтительные ингибиторы тирозинкиназы семейства Src класса макроциклических диенонов включают, например, радицикол R2146, гелданамицин, гербимицин А и т.п. Структуры радицикола R2146, гелданамицина, гербимицина А проиллюстрированы на Фиг.9. Гелданамицин доступен от Life Technologies. Гербимицин А доступен от Sigma. Радицикол, который коммерчески доступен от различных компаний (например, Calbiochem, RBI, Sigma), является антибактериальным антибиотиком с макроциклическим лактонным кольцом, который также действует как неспецифический белковый ингибитор тирозинкиназы и проявляет ингибирование активности Src киназы. Ингибиторы макроциклических диенонов содержат макроциклическое лактонное кольцо с 12-20 атомами углерода или структуру лактонного кольца, содержащего группу $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ -бис-ненасыщенного кетона (т.е. диенона) и группу оксигенированного арила как часть макроциклического кольца.

Предпочтительные ингибиторы класса пиридо[2,3-d]пиримидинов включают, например, PD173955 и т.п. Структура PD173955, ингибитора, разработанного Parke Davis, раскрыта у Moasser и др., *Cancer Res.*, 59:6145-6152 (1999), релевантное раскрытие которой включено в данное описание во всей своей полноте в качестве ссылки. Химическая структура PD173955 проиллюстрирована на Фиг.10.

Предпочтительные ингибиторы класса 4-анилино-3-хинолинкарбонитрила включают, например, SKI-606, доступный от Wyeth. Примеры ингибиторов Src 4-анилино-3-хинолинкарбонитрила раскрыты в публикациях патентов США № 2001/0051520 и № 2002/00260052, релевантное раскрытие которых включено в данное описание во всей своей полноте в качестве ссылки.

Другие специфические ингибиторы Src киназы, используемые в способах и композициях настоящего изобретения, включают PD162531 (Owens и др., Mol. Biol. Cell 11:51-64 (2000)), который разработан Parke Davis, но структура которого не доступна из литературных источников.

Предпочтительно химический ингибитор представляет собой ингибитор пиразолопиримидинов, более предпочтительно AGL1872 и AGL1879, наиболее предпочтительно химический ингибитор представляет собой AGL1872. Другой предпочтительный ингибитор Src представляет собой 4-анилино-3-хинолинкарбонитрил, известный как SKI-606.

Дополнительные подходящие ингибиторы тирозинкиназы семейства Src могут быть идентифицированы и охарактеризованы с использованием стандартных видов анализа, известных в данной области техники. Например, скрининг химических соединений для сильнодействующих и селективных ингибиторов Src или других тирозинкиназ может быть выполнен и может быть получен в результате идентификации химических групп, используемых в белковых ингибиторах тирозинкиназы семейства Src.

Например, катехолы были идентифицированы как важные связывающие элементы для некоторых ингибиторов тирозинкиназы, полученных из природных продуктов, и были обнаружены в соединениях, выбранных при помощи комбинаторного отбора управляемого мишенью для селективных ингибиторов c-Src (См. Maly et al., "Combinatorial target-guided ligand assembly: Identification of protein subtype-selective c-Src inhibitors" PNAS (США) 97(6):2419-2424 (2000)). Комбинаторная химия, основанная на скрининге соединений-кандидатов ингибитора, используя группы, которые известны как значимые для ингибирования Src, в качестве стартовой точки является действенным и эффективным средством для выделения и получения характеристик других химических ингибиторов тирозинкиназы семейства Src.

Однако даже тщательный отбор потенциальных связывающих элементов, основанный на возможности имитации широкого ряда функциональных групп, присутствующих на полипептидах и нуклеиновых кислотах, может быть использован для выполнения комбинаторного скрининга активных ингибиторов. Например, для такой задачи в частности подходят библиотеки О-метилоксима с учетом того, что библиотеку легко создать путем конденсации О-метилгидроксиламина с любым из большого количества коммерчески доступных альдегидов. Образование О-алкилоксима совместимо с широким рядом функциональных групп, которые являются стабильными при физиологическом pH (См. выше Maly и др.).

Млекопитающее, которое может быть подвергнуто лечению способом согласно настоящему изобретению, желательно, является человеком, хотя понятно, что принципы настоящего изобретения указывают на то, что способы настоящего изобретения являются эффективными также и в отношении млекопитающих, не являющихся людьми. В этом контексте понятно, что млекопитающее включает любые виды млекопитающих, виды сельскохозяйственных и домашних млекопитающих, а также людей, которым требуется лечение сосудистой утечки или отека, связанного с поражением ткани.

Предпочтительный способ лечения содержит введение млекопитающему, страдающему от инфаркта миокарда, терапевтически эффективного количества физиологически совместимой композиции, содержащей химический ингибитор тирозинкиназы семейства Src, более точно химический (т.е. небелковый) ингибитор Src.

Предпочтительный способ предупреждения инфаркта миокарда включает введение млекопитающему с

повышенным риском инфаркта миокарда профилактического количества физиологически совместимой композиции, содержащей химический ингибитор тирозинкиназы семейства Src, более точно химический (т.е. небелковый) ингибитор Src.

Пределы дозирования для введения химического ингибитора тирозинкиназы семейства Src, такого как AGL1872 или SKI-606, могут находиться в диапазоне от примерно 0,1 мг/кг веса тела до примерно 100 мг/кг веса тела или ограничиваются растворимостью активного агента в фармацевтическом носителе. Предпочтительная доза составляет примерно 1,5 мг/кг веса тела. Фармацевтические композиции, реализующие настоящее изобретение, также могут быть введены орально. Иллюстративные дозированные формы для введения орально включают капсулы, таблетки с энтеросолюбильным покрытием или без него и т.п.

В случае острого повреждения или травмы самое лучшее начать лечение настолько быстро после того, как произошел инцидент, насколько это возможно. Однако в случаях острого инцидента время для эффективного введения ингибиторов тирозинкиназы семейства Src может находиться в пределах 48 часов после возникновения повреждения или травмы. Предпочтительным является введение в течение примерно 24 часов, лучше - введение в течение 6 часов. Наиболее предпочтительно введение пациенту ингибитора тирозинкиназы семейства Src в течение примерно 45 минут после повреждения. Введение после 48 часов после первичного повреждения может быть подходящим для уменьшения дополнительного поражения ткани вследствие последующей сосудистой утечки или отека; однако в таких случаях положительное воздействие на первичное поражение ткани может быть уменьшенным.

Если профилактическое введение произведено для предупреждения инфаркта миокарда, связанного с хирургической процедурой, или произведено ввиду предрасполагающих диагностических показателей, введение может происходить до любой острой окклюзии коронарных сосудов, или во время события, вызывающего такую окклюзию, например, подкожные **сердечно-сосудистые** вмешательства, такие как коронарная ангиопластика. Для лечения хронических состояний, которые приводят к окклюзии коронарных сосудов, введение химических ингибиторов тирозинкиназы семейства Src может быть произведено в режиме непрерывного дозирования.

Обычно доза может меняться в зависимости от возраста, состояния, пола и степени повреждения, от которого страдает пациент, и может определяться специалистом в данной области техники. В случае какого-либо осложнения доза также может подбираться конкретным врачом.

Фармацевтические композиции настоящего изобретения предпочтительно вводят парентерально путем инъекции или при помощи постепенной инфузии в течение некоторого времени. Хотя обычно ткань, требующая лечение, может быть доступна в теле посредством системного введения и, следовательно, наиболее часто ее лечат при помощи внутривенного введения терапевтических композиций, другие ткани и средства подачи рассматриваются в том случае, если существует вероятность того, что целевая ткань содержит целевую молекулу. Таким образом, композиции настоящего изобретения могут быть введены внутривенно, внутрибрюшинно, внутримышечно, подкожно, внутриполостно, чрескожно, орально и также могут подаваться при помощи перистальтических средств.

Внутривенное введение осуществляется, например, путем инъекции единичной дозы. Термин

"единичная доза", при использовании в отношении к терапевтической композиции настоящего изобретения, относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве однократной дозы для субъекта, причем каждая единица содержит заданное количество активного вещества, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта в соответствии с требуемым разбавителем, т.е. носителем или наполнителем.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления активный агент вводят внутривенно одной дозой. Локализованное введение может быть выполнено путем прямой инъекции или путем использования анатомически изолированных областей, изоляции микроциркуляции целевых систем органов, реперфузии в системе циркуляции или временной окклюзии целевых областей сосудистой системы, связанных с больными тканями с использованием катетера.

Фармацевтические композиции вводят способом, совместимым с лекарственной дозированной формой и в терапевтически эффективном количестве. Термины "терапевтически эффективное количество" и "профилактическое количество", как используются в настоящем описании и в прилагаемой формуле изобретения, относятся к фармацевтическим композициям, обозначают количество фармацевтической композиции, вызывающее у субъекта биологический или медицинский ответ, который необходим врачу-клиницисту (например, уменьшение поражения тканей или предупреждение инфаркта миокарда).

Количество, предназначенное для введения, и временные параметры зависят от субъекта, нуждающегося в лечении, способности организма субъекта усваивать активный ингредиент и степени желаемого терапевтического эффекта. Точное количество активного ингредиента, предназначенное для введения, зависит от заключения практикующего врача и является специфическим для каждого индивида. Однако подходящие пределы дозирования для системного введения изложены в настоящем описании и зависят от типа введения. Подходящие режимы введения также являются изменяемыми, но в типичном случае представляют собой начальное введение с последующими повторными дозами с интервалами от одного до нескольких часов путем инъекции или другим способом введения, например введения орально. В качестве альтернативы предлагается длительная внутривенная инфузия, достаточная для поддержания концентраций в крови в пределах, установленных для терапии *in vivo*.

Способы настоящего изобретения уменьшают поражение тканей в результате окклюзии коронарных сосудов, связанное с различными формами коронарной болезни, либо в результате повреждения, либо травмы сердца, уменьшают симптомы заболевания, и в зависимости от заболевания могут способствовать лечению данного заболевания. Степень некроза ткани и, следовательно, степень ингибирования, достижимая способами настоящего изобретения, может быть оценена различными способами. В частности, способы настоящего изобретения чрезвычайно хорошо подходят для лечения инфаркта миокарда.

Уменьшение поражения тканей в результате окклюзии коронарных сосудов может происходить за короткий промежуток времени после введения терапевтической композиции. Большинство из терапевтических эффектов может быть визуализировано через 24 часа после введения в случае острого поражения или травмы. Однако в случае длительного применения эффекты не будут заметны так быстро.

Факторы временного ограничения включают скорость абсорбции ткани, усвоение на клеточном уровне, транслокацию белка или трансляцию нуклеиновых кислот (в зависимости от лекарства) и нацеливание белка. Таким образом, эффекты, регулирующие повреждение ткани, могут происходить в течение часа с момента введения ингибитора. Сердечная ткань также может быть подвержена дополнительному или пролонгированному воздействию ингибиторов тирозинкиназы семейства Src, применяя надлежащие условия. Таким образом, может быть разработано множество желаемых терапевтических временных рамок путем модификации параметров.

Е. Терапевтические композиции

Ингибиторы тирозинкиназы семейства Src, как изложено в настоящем описании, могут быть использованы для изготовления лекарственных веществ для лечения инфаркта миокарда. Ингибиторы могут быть включены в фармацевтические композиции, пригодные для осуществления терапевтических и профилактических способов, изложенных в настоящем описании. Фармацевтические композиции настоящего изобретения содержат физиологически совместимый носитель вместе с химическим ингибитором тирозинкиназы семейства Src, как изложено в настоящем описании, растворенным или диспергированным в нем в качестве активного ингредиента. В предпочтительном варианте осуществления фармацевтическая композиция не является иммуногенной при введении с терапевтической целью пациенту, относящемуся к млекопитающему, такому как человек.

Как используется в настоящем описании, термины "фармацевтически приемлемый" и "физиологически совместимый" и их грамматические вариации, если они относятся к композициям, носителям, разбавителям и реагентам, используются взаимозаменяемо и означают, что млекопитающему можно принимать вещества внутрь или наружно без получения нежелательных физиологических эффектов, таких как тошнота, вертиго, расстройство желудка и т.п.

Изготовление фармакологической композиции, которая содержит активные ингредиенты, растворенные или диспергированные в ней, хорошо известны в данной области техники и не ограничены лекарственной формой. Обычно такие композиции изготавливают в виде инъекций, либо в виде жидких растворов, либо в виде суспензий. Также могут быть изготовлены твердые формы, пригодные для растворения или суспендирования в жидкости перед использованием. Лекарственные препараты также могут быть эмульгированными или могут быть представлены в виде липосомной композиции.

Активный ингредиент может быть смешан с наполнителем, который является фармацевтически приемлемым и совместимым с активным ингредиентом, и находится в количестве, подходящем для применения в терапевтических способах, изложенных в настоящем описании. Подходящими наполнителями являются, например, вода, физиологический раствор, декстроза, глицерин, этанол и т.п. и их комбинации. Дополнительно, при необходимости, композиции могут содержать некоторые количества вспомогательных веществ, таких как увлажняющие или эмульгирующие агенты, агенты рН буферизации и т.п., которые усиливают эффективность активного ингредиента.

Терапевтическая композиция настоящего изобретения может включать в себя фармацевтически приемлемые соли активных компонентов. Фармацевтически приемлемые соли включают соли присоединения кислоты (образованные со свободными аминогруппами полипептидов), которые

образованы неорганическими кислотами, такими как, например, хлористоводородная или фосфорная кислоты, или органическими кислотами, такими как уксусная, винная, миндальная и т.п. Соли, образованные свободными карбоксильными группами, также могут быть получены из неорганических оснований, таких как, например, гидроксиды натрия, калия, аммония, кальция или железа, и органических оснований, таких как изопропиламин, триметиламин, 2-этиламиноэтанол, гистидин, прокаин и т.п.

Физиологически совместимые носители хорошо известны в данной области техники. Примерами жидких носителей являются стерильные водные растворы, которые не содержат вещества помимо активных ингредиентов и воды, или содержат буфер, такой как натрий-фосфатный с физиологическим pH, физиологический раствор, или оба эти компонента, такой как забуференный фосфатом физиологический раствор. Дополнительно к этому, водные носители могут содержать более чем одну буферную соль, а также соли, такие как хлориды натрия и калия, декстрозу, полиэтиленгликоль и другие растворы.

Жидкие композиции также могут содержать жидкие фазы дополнительно к воде или вместо нее. Примерами таких дополнительных жидких фаз являются глицерин, растительные масла, такие как хлопковое масло, и водно-масляные эмульсии.

Химические терапевтические композиции настоящего изобретения содержат физиологически совместимые носители совместно с ингибитором тирозинкиназы семейства Src, растворенным или диспергированным в них в качестве активного ингредиента.

Подходящие ингибиторы тирозинкиназы семейства Src ингибируют биологическую тирозинкиназную активность тирозинкиназы семейства Src. Более подходящие тирозинкиназы семейства Src имеют первичную специфичность для ингибирования активности белка Src и дополнительно ингибируют наиболее близкородственные тирозинкиназы семейства Src.

F. Изделия

Настоящее изобретение также предлагает изделие, которое представляет собой емкость с маркировкой для предоставления терапевтически эффективного количества ингибитора тирозинкиназы семейства Src. Ингибитор может представлять собой отдельно упакованный химический ингибитор тирозинкиназы семейства Src или сочетание из одного или нескольких ингибиторов. Изделие содержит упаковочный материал и фармацевтический агент, содержащийся внутри упаковочного материала. Изделие также может содержать две или более суб-терапевтически эффективные дозы фармацевтической композиции, которые совместно действуют синергидно, приводя в результате к уменьшению поражения тканей в результате окклюзии коронарных сосудов.

Как используется в настоящем описании, термин упаковочный материал относится к материалу, такому как стекло, пластик, бумага, фольга и т.п., способному содержать внутри фиксированного средства фармацевтический агент. Таким образом, например, упаковочный материал может представлять собой пластмассовые или стеклянные ампулы, ламинированные оболочки и подобные емкости, используемые для содержания фармацевтической композиции, включающей в себя фармацевтический агент.

В предпочтительных вариантах осуществления упаковочный материал содержит маркировку, которая представляет собой описание содержимого изделия и применение фармацевтического агента, содержащегося в нем.

Фармацевтический агент в изделии представляет собой любую композицию настоящего изобретения, пригодную для предоставления ингибитора тирозинкиназы семейства Src, составленную в фармацевтически приемлемой форме, как изложено в настоящем описании, в соответствии с изложенными указаниями. Подходящие ингибиторы тирозинкиназы семейства Src для целей настоящего изобретения включают химические ингибиторы Src, включающие ингибиторы тирозинкиназы семейства Src класса пиразолопиримидинов, такие как 4-амино-5-(4-метилфенил)-7-(трет-бутил)пиразоло[3,4-d]пиримидин, 4-амино-5-(4-хлорфенил)-7-(трет-бутил)пиразоло[3,4-d]пиримидин и т.п.; ингибиторы тирозинкиназы семейства Src класса макроциклических диенонов, такие как радицикол R2146, гелданамицин, гербимицин А и т.п.; ингибиторы тирозинкиназы семейства Src класса пиридо[2,3-d]пиримидинов, такой как PD173955 и т.п.; ингибиторы тирозинкиназы семейства Src класса 4-анилино-3-хинолинкарбонитрила, такой как SKI-606 и т.п.; и их смеси. Изделие содержит количество фармацевтического агента, достаточное для применения при лечении состояния, указанного в настоящем описании, либо в единичной дозе, либо в виде множества доз.

Упаковочный материал содержит маркировку, которая указывает на применение фармацевтического агента, содержащегося в нем, например, для лечения состояний, облегчаемых посредством ингибирования увеличения проницаемости сосудов, и состояний, подобных рассмотренным в настоящем описании. Дополнительно маркировка может включать в себя инструкции по применению и соответствующую информацию, которая требуется при продаже. Упаковочный материал может включать в себя емкость(емкости) для хранения фармацевтического агента.

ПРИМЕРЫ

Нижеследующие примеры, относящиеся к данному изобретению, являются иллюстративными и, конечно, не должны быть истолкованы как ограничивающие настоящее изобретение. Более того, такие изменения настоящего изобретения, известные в настоящее время, и которые будут разработаны в дальнейшем, которые могут находиться в сфере компетенции специалистов в данной области техники, следует рассматривать как входящие в объем нижеприведенной формулы настоящего изобретения.

Пример 1. VEGF-опосредованная активность ПС зависит от Src и Yes, но не Fyn

Специфичность потребности Src для ПС изучали при помощи оценки индуцируемой VEGF активности ПС, связанной с SFK, такими как Fyn или Yes, которые подобно Src известны как экспрессируемые эндотелиальными клетками (Bull и др., FEBS Letters, 361:41-44 (1994); Kiefer и др., Curr. Biol. 4:100-109 (1994)). Было подтверждено, что эти три SFK одинаково экспрессировались в аорте мышей дикого типа. Подобно src^{-/-} мышам, животные с дефицитом Yes также имели нарушения ПС, индуцируемой VEGF. Интересно отметить, что мыши с недостатком Fyn поддерживали высокую ПС в ответ на VEGF, которая незначительно отличалась от контрольных мышей. VEGF-индуцируемое нарушение ПС у src^{-/-} и yes^{-/-} мышей, демонстрирует, что киназная активность специфичных SFK является существенной для VEGF-опосредованных сигнальных событий, ведущих к активности ПС, но не к ангиогенезу.

Свойства проницаемости сосудов при VEGF в коже *src*^{+/+} (Фиг.5,А, левый фотоснимок) или *src*^{-/-} (Фиг.5,А, правый фотоснимок) мышей определяли путем введения внутрикожной инъекции физиологического раствора или VEGF (400 нг) мышам, которым внутривенно инъецировали краситель Evan's blue. После 15 мин кусочки кожи сфотографировали (масштаб 1 мм). Звездочки указывают на участки инъекции. Области, окружающие участки инъекции VEGF, bFGF или физиологического раствора, отделяли и производили количественное определение ПС элюированием красителя Evan's blue в формамид при 58°C в течение 24 часов, и измерения абсорбции при 500 нм (Фиг.5,В, левый график). Способность медиатора воспаления (аллилизотиоцианата), известного как индуцирующего воспаление, связанное с ПС, тестировали у *src*^{+/+} или *src*^{-/-} мышей (Фиг.5,В, справа).

Способность VEGF индуцировать ПС сравнивали у *src*^{-/-}, *fn1*^{-/-} или *yes*^{-/-} мышей в Miles тесте (Фиг.5,С). Данные для каждого Miles теста выражали в виде среднего значения \pm SD для трех животных. Нарушения ПС у *src*^{-/-} и *yes*^{-/-} по сравнению с контрольными животными были статистически значимыми (* $p < 0,05$, парный t-критерий), причем нарушения ПС ни у *fn1*^{-/-} мышей, обработанных VEGF, ни у *src*^{+/+} мышей, обработанных аллилизотиоцианатом, не были статистически значимыми (** $p < 0,05$).

Пример 2. Мыши, обработанные ингибитором тирозинкиназы семейства Src, и *Src*^{-/-} мыши показали уменьшенное поражение ткани, связанное с травмой или повреждением кровеносных сосудов по сравнению с необработанным диким типом мышей

Ингибиторы киназ семейства Src снижают патологическую сосудистую утечку и проницаемость после повреждения или заболевания сосудов, такого как инсульт. Сосудистый эндотелий представляет собой тип активных клеток, который реагирует на многие раздражители в регуляторных процессах, таких как рост новых кровеносных сосудов во время ангиогенеза опухоли, в регуляции проницаемости стенки сосуда во время отека, индуцированного инсультом, и повреждения ткани.

Уменьшение проницаемости сосудов в двух мышинных моделях инсульта посредством лекарственного ингибирования пути метаболизма Src, является достаточным для ингибирования поражения головного мозга путем уменьшения сосудистой утечки, индуцированной ишемией. Более того, обычно при недостатке у мышей Src, который уменьшает сосудистую утечку/проницаемость, объем инфаркта также является уменьшенным. Объединение данных для синтетического ингибитора Src с подтверждающим генетическим признаком уменьшения сосудистой утечки при инсульте и другие родственные модели демонстрируют физиологическую значимость такого подхода в уменьшении повреждения мозга после инсультов. Ингибирование таких путей метаболизма некоторыми доступными ингибиторами киназ семейства Src для таких последовательностей передачи сигналов имеет терапевтическую пользу, заключающуюся в уменьшении поражения мозга вследствие поражения ткани, связанного с проницаемостью сосудов.

Использовали два различных способа индуцирования фокальной церебральной ишемии. Обе модели животных фокальной церебральной ишемии хорошо изучены и широко используются при изучении инсульта. Обе модели ранее использовались для изучения патофизиологии церебральной ишемии, а также для проверки новых противоинсультных лекарственных препаратов.

(а) Мышей анестезировали 2,2,2-трибромэтанолом (AVERTIN™) и поддерживали температуру тела

путем содержания животного на горячей грелке. Между правым ухом и правым глазом произвели рассечение. Ретракцией височной мышцы обнажили череп и в области выше средней мозговой артерии (СМА) просверлили небольшое трепанационное отверстие. Удалили мягкие мозговые оболочки и закупорили правую СМА путем коагуляции с использованием нити накала. Животным предоставили возможность восстановиться и вернули в свои клетки. После 24 часов провели перфузию мозга, который удалили и разрезали на 1-мм поперечные срезы. Срезы погрузили в 2% раствор хлорида 2,3,5-трифенилтетразолия (ТТС), и области мозга, охваченные инфарктом, идентифицировали как неокрашенную (белую) ткань, окруженную жизнеспособной (красной) тканью. Величину инфаркта определяли как сумму неокрашенных площадей срезов, умноженную на их толщину.

Для изучения роли Src в церебральной ишемии использовались мыши с дефицитом Src (Src^{-/-}). Src^{+/-} мыши служили в качестве контроля. Авторы обнаружили, что у Src^{-/-} мышей объем инфаркта уменьшился с 26±10 до 16±4 мм³ в контрольных группах через 24 часа после инсульта. Эффект был выражен даже в большей степени в случае, когда мыши C57B16 дикого типа были инъецированы внутрибрюшинно (i.p.) 1,5 мг/кг AGL1872 через 30 мин после окклюзии сосудов. Размер инфаркта уменьшился с 31±12 мм³ у необработанной группы до 8±2 мм³ у группы, обработанной AGL1872.

(b) Во второй модели фокальной церебральной ишемии СМА закупорили посредством помещения эмбола в начало СМА. Одиночный интактный 24-х часовой зрелый тромб, богатый фибрином, поместили в начало СМА с использованием модифицированного катетера PE-50. Индуцирование церебральной ишемии подтверждали снижением церебрального потока крови в ипсилатеральном полушарии по сравнению с контрлатеральным полушарием. Через 24 часа мозг удаляли, готовили серийные срезы и окрашивали гематоксилин-эозином (ГЭ). Определяли величину инфаркта путем сложения площадей инфаркта в серийных ГЭ срезах, умноженных на расстояние между сечениями.

Дозу AGL1872, использованную в этом исследовании (1,5 мг/кг i.p.), выбирали эмпирически. Известно, что VEGF впервые проявляется примерно через 3 часа после церебральной ишемии мозга с достижением максимума после 12-24 часов. В этом исследовании AGL1872 был введен через 30 мин после приступа инфаркта, чтобы полностью заблокировать увеличение VEGF-индуцируемой проницаемости сосудов. В соответствии с динамикой типичной экспрессии VEGF потенциальное терапевтическое окно для введения ингибиторов Src может достигать 12 часов после инсульта. При заболеваниях, связанных с устойчивым увеличением проницаемости сосудов, подходящим является длительное применение лекарственного препарата, подавляющего Src.

Фиг.6 представляет собой график, который изображает результаты сравнения среднего объема инфаркта (мм³) мозга у мышей после повреждения, в котором мыши представляют собой Src гетерогенных (Src^{+/-}), доминантных негативных Src мутантов (Src^{-/-}), мышей дикого типа (WET) или мышей дикого типа, обработанных 1,5 мг/кг AGL1872.

На Фиг.7 показаны последовательные снимки ЯМР-томографии образцов изолированного перфузированного мозга мыши после обработки для индуцирования повреждения ЦНС, где изменение изображений у животных (справа), обработанных AGL1872, ясно демонстрирует уменьшение церебрального инфаркта по сравнению с изменением изображений у контрольных необработанных животных (слева).

Пример 3. Крысы, обработанные ингибитором тирозинкиназы семейства Src и Src-/- мыши показывают уменьшение поражения тканей, связанного с травмой или повреждением коронарных кровеносных сосудов, по сравнению с необработанными мышами дикого типа.

Ишемию миокарда индуцировали посредством наложения лигатуры на левую переднюю нисходящую коронарную артерию у Sprague-Dawley крыс. Пораженные ткани приводили в контакт с химическим ингибитором тирозинкиназы семейства Src посредством инъекций внутривенно (i.p.) ингибитора тирозинкиназы семейства Src класса пиразолопиримидинов AGL1872 или SKI-606 после индуцирования ишемии. Магнитная резонансная томография (ЯМР-томография) с высоким разрешением, измерение сухого веса, размер инфаркта, объем сердца и область повышенного риска определяли через 24 часа после операции. Определяли степень выживания и выполнили эхокардиографию через 4 недели после операции у крыс, получивших i.p. инъекции ингибитора при дозе примерно 1,5 мг/кг после инфаркта миокарда (ИМ).

На Фиг.11 показаны фотомикрографические снимки сердечной ткани крыс, обработанных (слева) и контрольных (справа), окрашенной эозинным красителем (витальный краситель). Контрольная ткань (верхний правый снимок) показывает большую площадь некроза на периферии этой ткани. Напротив, обработанная ткань (верхний левый снимок) показывает очень небольшое количество некротической ткани.

На Фиг.12 показана гистограмма размера инфаркта через 24 часа после обработки (в мг ткани) как функция концентрации ингибитора (AGL1872). Оптимальный уровень ингибирования был достигнут при дозе примерно 1,5 мг/кг. Доза примерно 3 мг/кг не привела в результате к какому-либо значимому уменьшению размера инфаркта.

Обработка ингибитором тирозинкиназы семейства Src дает в результате уменьшение размера инфаркта и области повышенного риска в зависимости от дозы в течение 24 часов после операции. Максимальное ингибирование, примерно 68% ($p < 0,05$) размера инфаркта достигалось при дозе ингибитора примерно 1,5 мг/кг, введенного примерно через 45 мин после индуцирования ишемии (Фиг.13). Ингибитор также был эффективным, когда вводился примерно через 6 часов после индуцирования ишемии, приводя в результате к уменьшению размера инфаркта примерно на 42% ($p < 0,05$). Как определили при помощи иммуногистохимического анализа, ингибирование Src не препятствует экспрессии VEGF в ишемических тканях. Уменьшенный размер инфаркта сопровождался снижением содержания воды в миокарде (примерно $5\% \pm 1,3\%$; $p < 0,05$) и сокращением объема отека тканей, как определили при помощи ЯМР-томографии, что указывает на то, что положительный эффект ингибирования Src связан с предупреждением VEGF-опосредованной ПС (Фиг.14). Фракция укорочения, как оценили при помощи эхокардиографии, примерно через 4 недели после операции, составила примерно 29% у контрольных и примерно 34% у обработанных крыс ($p < 0,05$). Существенно то, что четырехнедельная доля выживших была неожиданно высокой (100%) для обработанных крыс относительно примерно 63% для контрольных крыс.

Для точной регистрации отека *in vivo* авторы использовали магнитно-резонансную томографию (ЯМР-томографию) с высоким разрешением для оценки сердечной ткани у крыс, которые были обработаны ингибитором Src AGL1872 или SKI-606 или без него, после необратимой окклюзии левой передней

нисходящей (LAD) артерии. Ожидается, что области отека, из-за увеличенного содержания воды в них, имеют большую T_2 релаксацию, чем области без отека. Для количественной оценки отека были установлены размеры области с $T_2 > 49$ мсек (более чем на два стандартных отклонения, превышающих среднее значение нормально перфузируемого миокарда). Через час после приступа ишемии ингибирование Src, индицируемое T_2 -взвешенным сигналом, не повлияло на исходный цитотоксический отек. Однако через 24 часа рассчитанные T_2 карты показали уменьшение отека миокарда, связанного с инфарктом, на 47% посредством AGL1872 по сравнению с носителем ($n=2$ AGL1872 группа, $n=1$ группа носителя). Такой результат коррелирует с содержанием воды в миокарде, вычисленным ex-vivo с использованием влажного/сухого веса миокарда без ишемии. В зависимости от предоставляемой дозы AGL1872 уменьшает отек и размер инфаркта, с максимальным уменьшением при 1,5 мг/кг ($n>5$ в каждой группе, $P<0,001$). SKI-606 также значительно уменьшает размер инфаркта, если вводится мышам или крысам после необратимой окклюзии. Для оценки динамики такого ответа AGL1872 вводили в различные моменты времени после окклюзии. Несмотря на то что максимальный эффект (уменьшение размера инфаркта на 50%) был достигнут при введении через 45 минут после окклюзии, обработка после 6 часов все еще дает 25% защиту ($n=5$ в каждой группе, $P<0,05$).

Ингибирование Src, показанное эхокардиографией, подтверждает значимое сохранение Фракции укорочения и диастолического диаметра левого желудочка (ЛЖ) через 4 недели по сравнению с необработанными крысами, указывающее на то, что в восстановленной ткани сохранялась сократительная функция в течение долгого времени. Ингибирование Src также обеспечивало благоприятное влияние на систолический диаметр ЛЖ и региональное движение стенок (таблица 1). Обработка ингибитором Src SKI-606 также благоприятно повлияла на Фракцию укорочения и показатель регионального движения стенок ($n=7$ в каждой группе, $P<0,01$). Для оценки выживания после ИМ авторы использовали 2-годичных C57 черных мышей в качестве модели, характеризующейся значительной смертностью ($>40\%$) после утечки LAD. Введение AGL1872 (1,5 мг/кг) через 45 минут после ИМ увеличило выживание по сравнению с контролем в течение первых 4 недель (91,7% по сравнению с 58,3%, соответственно, $n=12$ в каждой группе), демонстрирующее длительный терапевтический эффект ингибирования Src.

Таблица 1				
Функциональное восстановление после ИМ: Эхокардиография				
	Контроль	AGL1872	Улучшение в %	P-значение
Диаметр ЛЖ, диастола (мм)	0,93±0,02	0,82±0,02	11	0,01
Диаметр ЛЖ, систола (мм)	0,71±0,03	0,59±0,04	16	0,03
Фракция укорочения (%)	23,8±1,7	32,8±3,2	38	0,03
Показатель региональное движение стенок	26,9±0,8	24,0±0,5	9	0,01
# крыс на группу	8	8		

Хронический фиброз миокарда происходит после инфаркта и является непосредственным отражением степени некроза тканей после ИМ. Для оценки влияния ингибирования Src на фиброз через 4 недели после ИМ у крыс проводили гистопатологический анализ фиброзной ткани, используя гибкое

трихромное окрашивание. Ингибирование Src способствовало уменьшению на 52% в фиброзной ткани ЛЖ по сравнению с контролем ($19,1 \pm 2,2\%$ по сравнению с $40,0 \pm 3,0\%$, $n=4$ в каждой группе, $P < 0,01$). Устойчиво лучшее сохранение волокон миокарда и структуры ЛЖ наблюдали среди образцов, которые получили ингибитор Src, что указывает на то, что ингибирование Src способствует длительному защитному эффекту миокарда после ИМ.

Для оценки эффективности ингибирования Src после перенесенной ишемии крыс подвергли окклюзии с последующей реперфузией и затем через 24 часа оценивали функцию желудочка и размер инфаркта. Ингибирование Src при помощи AGL1872 сохранило Фракцию укорочения левого желудочка (ЛЖ) и уменьшило размер инфаркта по сравнению с контрольными группами ($n=4$ в каждой группе, $P < 0,05$). 18% уменьшение размера инфаркта после ишемии-реперфузии сравнимо с уменьшением на 50% после необратимой окклюзии, в которых поддерживалась экспрессия VEGF, являющаяся следствием влияния гипоксии. Дополнительно, SKI-606 (5 мг/кг) обеспечило уменьшение размера инфаркта на 43% в модели ишемии-реперфузии ($n=5$ в каждой группе, $P < 0,01$). Совместно, эти данные демонстрируют положительный эффект ингибирования Src после перенесенной ишемии.

Пример 4. Влияние ИМ на целостность сосудов и жизнеспособность миоцитов в периинфарктной зоне

Поскольку экспрессия VEGF увеличивается главным образом в периинфарктной зоне, в этой области через 3-24 часа после ИМ исследовали ультраструктурные эффекты ингибирования Src в небольших кровеносных сосудах. В таблице 2 приведены суммарные наблюдения для 250 кровеносных сосудов, исследованных в каждой группе с использованием трансмиссионной электронной микроскопии. Напротив, для многочисленных образцов нормальной ткани миокарда многочисленные примеры нарушений в периинфарктной зоне наблюдали в тканях, подвергшихся инфаркту. В интерстициальной жидкости присутствовали экстравазированные клетки крови (эритроциты, тромбоциты и нейтрофилы), очевидно просочившиеся через ближайшие кровеносные сосуды. Некоторые эндотелиальные клетки (ЭК), которые часто выглядели электронно-прозрачными и содержали большое количество ямок, набухли и закупорили часть просвета кровеносных сосудов. В эндотелии присутствовали большие круглые вакуоли, которые часто были в несколько раз больше, чем толщина ЭК. Со временем после ИМ повреждение миоцитов увеличивалось и изменялось между смежными клетками, идентифицируемое как разрыв митохондриальной мембраны, дезорганизация митохондриальных крист, внутриклеточный отек и дезинтеграция миофиламентов. Наиболее сильно пострадавшие миоциты часто были смежными с поврежденными кровеносными сосудами или свободными клетками крови. Часто через 24 часа после ИМ авторы наблюдали нейтрофилы, которые участвовали в сильном ответе на повреждение и могли вносить вклад в продуцирование VEGF.

Таблица 2				
Ультраструктурные наблюдения в сердечной ткани мышей после ИМ или инъекции VEGF				
	Дисфункция барьера ЭК	Активация тромбоцитов и адгезия	Повреждение ЭК	Поражение сердца
3 ч ИМ	18	36	31	22
3 ч ИМ +AGL1872	2	11	14	2

24 ч ИМ	5	7	34	45
24 ч ИМ +AGL1872	0	1	15	9
Контроль	0	0	1	0
VEGF, pp60Src+/-	24	18	33	16
VEGF, pp60Src+/-	0	0	0	0

Для каждой группы исследовали ткань левого желудочка в течение 4 часов (приблизительно 250 микрососудов) при помощи трансмиссионной электронной микроскопии, и наблюдения были посчитаны и сгруппированы в соответствии с:

- (а) дисфункцией барьера ЭК: щели, фенестрация, экстравазированные клетки крови;
- (б) активацией/адгезией тромбоцитов: тромбоциты, дегранулированные тромбоциты, кластеры тромбоцитов, адгезия тромбоцитов в ЕСМ (внеклеточный матрикс);
- (в) повреждением ЭК: электронно-прозрачные ЭК, набухшие ЭК, большие ЭК вакуоли, закупоренный просвет сосудов;
- (г) поражением сердца: набухание митохондрий, дезорганизация крист, дезинтеграция миофиламентов.

Через три часа после ИМ часто наблюдали щели между соседними EG, которые могли объяснить экстравазацией клеток крови в окружающее интерстициальное пространство. Интересно отметить, что многие щели были закупорены тромбоцитами. Некоторые тромбоциты находились в контакте с базальной пластинкой, расположенной между ЭК тогда, как в других случаях базальная пластинка также выглядела разрушенной. Некоторые тромбоциты были дегранулированы и могли потенцировать дальнейшую активацию, адгезию и агрегацию циркулирующих тромбоцитов. Поскольку такие закупоривающие массы тромбоцитов могут предотвращать дальнейшую сосудистую утечку, они могут непреднамеренно способствовать уменьшению перфузии в небольших кровеносных сосудах путем образования микротромбов, которые могут в дальнейшем привести к заболеванию тканей, связанному с ишемией.

Пример 5. ИМ и системная инъекция VEGF продуцируют аналогичную ответную реакцию кровеносных сосудов.

Для определения вклада VEGF в сложную патологию или ИМ внутривенно инъецировали VEGF нормальной мыши и через 30 мин оценили сердечную ткань на ультраструктурном уровне. Интересно отметить, что степень дисфункции эндотелиального барьера, индуцированного VEGF, и степень повреждения кровеносных сосудов были сравнимы со степенью, наблюдаемой в периинфарктной зоне после ИМ (таблица 2). Наблюдали значительную адгезию тромбоцитов к базальной мембране ЭК, а также поражение миоцитов. Аналогичные признаки поражения мозга обнаружили после системной инъекции VEGF, подтверждая, что такие эффекты могут быть системными. Эти результаты указывают, что VEGF-опосредованная ПС соответствует многим ответным реакциям кровеносных сосудов после

ИМ.

Для определения, является ли VEGF эффективным как посредник длительной патологии, связанной с ИМ, мышей инъецировали VEGF четыре раза в течение 2 часов. Такая обработка создавала поражение, аналогичное поражению, наблюдаемому через 24 часа после ИМ. Были обнаружены адгезия тромбоцитов, нейтрофилов и значительное поражение миоцитов, а также многочисленные электронно-прозрачные ЭК, многие из которых были набухшими, закупоривая просвет кровеносных сосудов. Суммарно 30-минутное воздействие VEGF было достаточным для возникновения ультраструктуры, аналогичной таковой, наблюдаемой через 3 часа после ИМ, после чего в перинфарктной зоне значительно увеличивается экспрессия VEGF. Более длительное воздействие VEGF вызывало реструктурирование, аналогичное реструктурированию, наблюдаемому в тканях через 24 часа после ИМ.

Тот факт, что мыши с дефицитом Src были защищены после ИМ и не имели ПС в коже и мозге после местной инъекции, указывает на то, что в сердце у мышей с дефицитом Src отсутствовала VEGF-индуцируемая ПС. В соответствии с результатами ингибирования Src у pp60Src^{-/-} мышей (таблица 2) после инъекции VEGF не наблюдали признаки ответной реакции кровеносных сосудов, такие как щели, активность тромбоцитов, пораженные ЭК и экстравазированные клетки крови у мышей дикого типа. Полное блокирование любой ответной реакции указывает на то, что VEGF-опосредованная активность Src во время ишемической болезни инициирует каскады, ведущие к повреждению, индуцированному ПС.

Обсуждение

У мышей системное введение антител VE-кадгерина вызывает ПС в сердце и легких, интерстициальный отек и фокальные точки, выраженные на базальной мембране, которые выглядят аналогично на ультраструктурном уровне с поражением, наблюдаемым после введения VEGF. В эмбрионах мышей кровеносные сосуды с нулевым β -катенином содержат плоские фенестрированные эндотелиальные клетки, связанные с частой геморрагией. Предшествующее изучение *in vitro* подразумевало VEGF в регуляции функции VE-кадгерина. В ЭК в состоянии потока VE-кадгерин образует комплекс с Flk. Для оценки комплекса VE-кадгерин-VEGF *in vivo* были приготовлены лизаты тканей сердца мышей, инъецированных VEGF или без него. Эти лизаты были подвергнуты иминопреципитации с анти-Flk с последующим иммуноблоттингом для VE-кадгерина и β -катенина. В контрольной группе мышей предшествующий комплекс Flk, β -катенина и VE-кадгерина наблюдали в кровеносных сосудах. Такой комплекс быстро разрушался в течение 2-5 минут после VEGF стимуляции, и снова собирался через 15 мин в кровеносных сосудах *in vivo*. Временная шкала диссоциации комплекса полностью соответствовала таковой для фосфорилирования Flk, β -катенина и VE-кадгерина и диссоциации β -катенина и VE-кадгерина. Эти VEGF-опосредованные события являются Src-зависимыми, поскольку сигнальный комплекс Flk-кадгерин-катенин сохранялся без повреждений, и у мышей, стимулированных VEGF, заранее обработанных ингибиторами Src, не происходило фосфорилирования β -катенина и VE-кадгерина. Такие события не наблюдались после инъекции

фактора роста базальных фибробластов (bFGF), аналогичного ангиогенному фактору роста, который не вызывает проницаемости сосудов.

Хотя единичная инъекция VEGF продуцировала обратимый, быстрый и транзиторный сигнальный ответ, который возвращался в исходное состояние через 15 минут, четыре инъекции VEGF (через каждые 30 минут) продуцировали длительный ответ передачи сигнала. Например, после длительного воздействия VEGF сохраняются диссоциация F1k-катенин и Erk фосфорилирование. Такая модель может быть применимой к физиологической ситуации после ИМ, в которой экспрессия VEGF увеличивается в результате гипоксии и сохраняется в течение нескольких дней.

Src играет физиологическую и молекулярную роль в ПС после острого ИМ или системного введения VEGF. Неблагоприятный исход после ИМ, очевидно отчасти, является следствием гиперпроницаемости перфузированных микрососудов сердца вокруг зоны инфаркта. Такие сосуды испытывают неблагоприятное воздействие VEGF и подвержены Src зависимому увеличению ПС, что приводит к окклюзии сосудов или коллапсу, и в конечном счете к поражению окружающих миоцитов. Это согласуется с продолжительностью слабой перфузии тканей и высокой смертностью, которая была задокументирована после ИМ, несмотря на открытие сосудов во время реперфузии. Ингибирование Src по истечении 6 часов после ИМ все еще обеспечивает значимую защиту от VEGF-индуцированной ПС, указывая на важность такого подхода в клинической практике. По-видимому, введение ингибиторов Src после ИМ ограничивает ПС, предотвращая диссоциацию комплексов F1k-кадгерин-катенин, которые поддерживают функцию эндотелиального барьера.

Ультраструктурные данные подтверждают, что начальные эффекты VEGF после ИМ включают открытие эндотелиальных соединений, обнажающее базальную мембрану эндотелия. Тромбоциты, многие из которых были дегранулированы и активированы, склеивались с такими участками. Это представляет интерес, поскольку тромбоциты содержат VEGF, который при локальном освобождении при активации тромбоцитов может увеличивать ПС-ответ. Фактически является возможным, что некоторые из таких благоприятных воздействий ингибирования Src являются следствием его воздействий на активирование тромбоцитов. Из представленных данных очевидно, что ранние события после ИМ инициируют каскад, который приводит в результате к увеличению отека, поражению тканей, что затем приводит к фиброзу и реструктурированию сердечной ткани. Важно отметить, что фиброзная реструктурированная сердечная ткань функционально является неполноценной по сравнению с нормальной сердечной тканью. Таким образом, при ограничении воздействия повреждения на раннем этапе можно ожидать долговременных положительных последствий, поскольку требуется меньший объем реструктурирования сердечной ткани. Поскольку блокирование одного коронарного сосуда вызывает острое повреждение, которое ведет к росту зоны инфаркта, фиброзу и в некоторых случаях к смерти, эффективное вмешательство в этот процесс на раннем этапе может обеспечить длительную защиту и благоприятное воздействие.

Представленные данные показывают, что ингибитор Src может хорошо выполнять такую роль. Ингибирование Src поддерживает комплекс F1k-кадгерин-катенин и приводит эндотелиальные соединения в состояние резистентности к воздействиям VEGF, вызывающим проницаемость.

Интересно отметить, что системная инъекция VEGF продуцирует многие из ультраструктурных

эффектов в кровеносных сосудах сердца, наблюдаемых после ИМ. Для индуцирования дисфункции эндотелиального барьера и поражения кровеносных сосудов *in vivo* было достаточно только VEGF. Подобным образом, способы настоящего изобретения, включающие в себя блокирование ингибитором Src тирозинкиназы семейства Src, подтвердило такие события не только после ИМ, но даже после системной инъекции VEGF. Ингибирование Src стабилизирует комплекс Fk-кадгерин-катенин несмотря на стимуляцию VEGF. Другие участники VEGF-индуцированной ПС могут включать в себя ямки или визикуло-вакуолярные органеллы (VVO) и фенестрации. Такие виды проницаемости также могут быть Src-зависимыми, поскольку *pp60Src*^{-/-} мыши не проявляют признаков проницаемости после инъекции VEGF. В качестве альтернативы эндотелиальные щели, экстравазированные клетки крови и незащищенная базальная мембрана могут индуцировать фенестрации и VVO.

VEGF экспрессируется *in vivo* в ответ на множество факторов (цитокины, онкогены, гипоксия) и влияет на индуцирование проницаемости и ангиогенез, а также пролиферацию эндотелиальных клеток, миграцию и защиту от апоптоза. Опухоли продуцируют большое количество VEGF, которое может быть обнаружено в кровотоке. Фактически после инъекции VEGF кровеносные сосуды внутри или около опухоли имеют многие общие характеристики, описанные в настоящем исследовании, такие как фенестрированный эндотелий, открытые межэндотелиальные соединения и кластеризованные слитые ямки. Уровень VEGF в сыворотке пациентов с разными типами рака может находиться в пределах 100-3000 пг/мл, в то время как уровень VEGF в местной ткани или клетках может быть в 10-100 раз выше. У пациентов после ИМ отмечали уровень VEGF в сыворотке между 100-400 пг/мл и выше - у пациентов с острым ИМ по сравнению с устойчивой стенокардией. Что касается некоторых первичных и метастатических опухолей, локальные уровни VEGF в периинфарктной области могут сильно превышать уровни в сыворотке. Представленные данные могут объяснить тот факт, что некоторые раковые пациенты имели повышенное заболевание тромбоцитов, поскольку увеличенное накопление VEGF в кровотоке может провоцировать ПС-ответ, который привлекает тромбоциты и приводит к снижению потока крови. Дополнительно, недавно опубликованное исследование может объяснить плевральный выпот и общий отек, связанный с раком поздней стадии. Таким образом, блокирование Src может иметь глубокое воздействие на отечное заболевание, связанное с раком.

AGL1872, несмотря на ингибирование тирозинкиназы семейства Src, также разрушает ряд других киназ, принимая во внимание, что SKI-606is по имеющимся сведениям более селективен для Src и Yes. Оба этих ингибитора показали аналогичный паттерн биологической активности, который отражал эффекты, наблюдаемые у мышей с дефицитом Src. Тот факт, что фармакологические ингибиторы Src, введенные животным дикого типа, оказывали такое же воздействие на поврежденные ткани, биохимию и ультраструктуру сердечных сосудов, как и наблюдаемое у "knockout" мышей (мыши с удаленным геном), подтверждает, что результат является главным образом следствием утечки, опосредованной ЭК, и не связан с генетической предрасположенностью у этих животных. Src и Yes, но не Fyn, являются существенными для ответа VEGF-опосредованной ПС и роста ткани, пораженной инфарктом, после ишемического повреждения мозга. Суммарно, эти данные подтверждают то, что положительные эффекты введения ингибитора тирозинкиназы семейства Src после ИМ действительно являются функцией ингибирования Src киназы, и, наиболее вероятно, вовлекают *pp60Src* и *pp62Yes* в качестве Src киназ.

По существу идентичные ультраструктурные изменения наблюдались после ИМ или сразу после

инъекции VEGF. Тот факт, что VEGF действует главным образом на эндотелий, а не на другие типы клеток, указывает на то, что блокирование Src в ЭК объясняет ультраструктурные наблюдения. Более того, большинство наблюдаемых изменений непосредственно связаны с изменениями в ЭК контактах клетка-клетка и целостностью кровеносных сосудов, ни одно из которых не наблюдалось ни у животных после Src инсульта, ни у животных дикого типа, обработанных ингибитором Src. Необходимо отметить, что роль Src в ПС может быть отнесена к ее способности к фосфорилированию VE-кадгерина и β -катенина и способности вызывать диссоциацию комплекса таких белков, соединенных с рецептором VEGF, Flk.

Способы настоящего изобретения хорошо подходят для специфического уменьшения поражения тканей, индуцированного ПС, в частности которое является результатом инфаркта миокарда, поскольку целевое ингибирование действия тирозинкиназы семейства Src фокусирует ингибирование на ПС без длительного воздействия на другие VEGF-индуцированные ответы, которые могут быть благоприятными для восстановления от повреждения.

По-видимому, Src контролирует поражение тканей путем влияния на проницаемость сосудов и, таким образом, представляет собой новую терапевтическую цель в патологии ишемии миокарда. Степень поражения миокарда после окклюзии коронарной артерии может быть значительно уменьшена при помощи сильного фармакологического ингибирования тирозинкиназы семейства Src.

В общем случае применение синтетических относительно низкомолекулярных химических ингибиторов является безопасным и более контролируемым, чем применение относительно более больших белков. Таким образом, первые являются предпочтительными в качестве терапевтически активных агентов.

Вышеуказанная спецификация позволяет специалистам в данной области техники применять на практике настоящее изобретение. Более того, различные модификации настоящего изобретения дополнительно к таковым, показанным и изложенным в настоящем описании, будут очевидными специалистам в данной области техники из вышеуказанного описания и входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

Формула изобретения

1. Способ лечения млекопитающего, страдающего от инфаркта миокарда, включающий введение млекопитающему терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, включающей химический ингибитор тирозинкиназы семейства Src, причем ингибитор тирозинкиназы выбирают из группы, состоящей из 4-амино-5-(4-метилфенил)-7-(трет-бутил)пиразоло[3,4-d-]пиримидина, 4-амино-5-(4-хлорфенил)-7-(трет-бутил)пиразоло[3,4-d-]пиримидина и их смеси.
2. Способ по п.1, в котором млекопитающее является человеком.
3. Способ по п.1, в котором млекопитающее не является человеком.
4. Способ по п.1, в котором ингибитор тирозинкиназы семейства Src представляет собой ингибитор

белка Src.

5. Способ по п.1, в котором фармацевтическую композицию вводят млекопитающему посредством внутрибрюшинной инъекции.

6. Способ по п.1, в котором фармацевтическую композицию вводят млекопитающему посредством внутривенной инъекции.

7. Способ по п.1, в котором фармацевтическую композицию вводят млекопитающему в течение примерно 6 ч после инфаркта миокарда.

8. Способ по п.1, в котором фармацевтическую композицию вводят млекопитающему в течение примерно 24 ч после инфаркта миокарда.

9. Изделие, содержащее упаковочный материал и фармацевтическую композицию, содержащуюся в упаковочном материале, в котором фармацевтическая композиция находится в количестве, способном уменьшить некроз в коронарной ткани, страдающей от затрудненной подачи крови, причем упаковочный материал содержит наклейку, которая указывает, что указанная фармацевтическая композиция может быть применена для лечения инфаркта миокарда, и при этом фармацевтическая композиция содержит химический ингибитор тирозинкиназы семейства Src и фармацевтически приемлемый носитель, в котором ингибитор тирозинкиназы семейства Src выбирают из группы, состоящей из 4-амино-5-(4-метилфенил)-7-(трет-бутил)пиразоло[3,4-d]пиримидина, 4-амино-5-(4-хлорфенил)-7-(третбутил)пиразоло[3,4-d]пиримидина и их смеси.

10. Изделие по п.9, в котором ингибитор тирозинкиназы семейства Src представляет собой ингибитор белка Src.

11. Способ профилактического лечения млекопитающего с риском инфаркта миокарда, включающий введение млекопитающему профилактического количества фармацевтической композиции, содержащей химический ингибитор тирозинкиназы семейства Src, причем ингибитор тирозинкиназы выбирают из группы, состоящей из 4-амино-5-(4-метилфенил)-7-(трет-бутил)пиразоло[3,4-d]пиримидина, 4-амино-5-(4-хлорфенил)-7-(трет-бутил)пиразоло[3,4-d]пиримидина и их смеси.

12. Способ по п.11, в котором млекопитающее не является человеком.

13. Способ по п.11, в котором млекопитающее является человеком.

14. Способ по п.11, в котором фармацевтическую композицию вводят млекопитающему орально.

15. Способ по п.11, в котором фармацевтическую композицию вводят млекопитающему парентерально.

16. Применение химического ингибитора тирозинкиназы семейства Src, выбранного из группы, состоящей из 4-амино-5-(4-метилфенил)-7-(трет-бутил)пиразоло[3,4-d] пиримидина, 4-амино-5-(4-хлорфенил)-7-(трет-бутил)пиразоло[3,4-d]пиримидина и их смеси для производства лекарственного средства для лечения инфаркта миокарда.