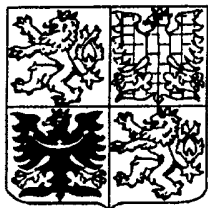


ČESKÁ  
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

# ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(21) 2282-95

(13) A3

6(51)

A 61 K 31/40

(22) 27.08.93

(32) 05.03.93

(31) 93/026892

(33) US

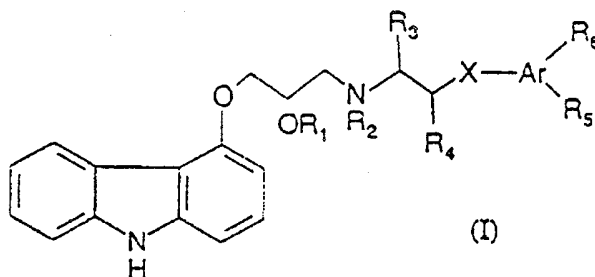
(40) 12.06.96

(71) BOEHRINGER MANNHEIM PHARMACEUTICALS  
CORPORATION, Rockville, MD, US;

(72) Ohlstein Eliot H., Glenmoore, PA, US;

(54) Použití karbazolyl-(4)-oxypropanolaminových  
sloučenin k inhibici proliferace hladkých  
svalových buněk

(57) Použití karbazolyl-(4)-oxypropanolaminových sloučenin ze souboru zahrnujícího sloučeniny obecného vzorce I, kde  $R_1$  znamená vodík, alkanoyl s až 6 atomy uhlíku nebo aroyl vybraný z benzoylu a naftoylu,  $R_2$  znamená vodík, alkyl s až 6 atomy uhlíku nebo aralkyl zvolený z benzylu, fenethylu a fenylpropylu,  $R_3$  znamená vodík nebo alkyl s až 6 atomy uhlíku,  $R_4$  znamená vodík nebo alkyl s až 6 atomy uhlíku, nebo pokud X představuje kyslík,  $R_4$  dohromady s  $R_5$  mohou představovat  $-CH_2-O-$ , X představuje valenční spojku,  $-CH_2$ , kyslík nebo síru, Ar je fenyl, naftyl, indanyl nebo tetrahydronaftyl,  $R_5$  a  $R_6$  jsou vodík, fluor, chlor nebo brom, hydroxyskupina, alkyl s až 6 atomy uhlíku,  $-CONH_2$ , alkoxyskupiny s až 6 atomy uhlíku, benzyloxyskupiny, nižší alkylthioskupiny s až 6 atomy uhlíku, alkylsulfinylu s až 6 atomy uhlíku a alkylsulfonylu s až 6 atomy uhlíku, nebo  $R_5$  a  $R_6$  tvoří dohromady methylenedioxykupinu, nebo její farmaceuticky přijatelné soli, k výrobě léčiva pro inhibici proliferace a migrace hladkých svalových buněk, pro prevenci restenozy po perkutánní transluminální srdeční angioplastice, pro prevenci aterosklerozy a pro potlačení cévní hypertrofie spojené s hypertensí, u savců.



Použití karbazolyl-(4)-oxypropanolaminových sloučenin k inhibici proliferace hladkých svalových buněk.

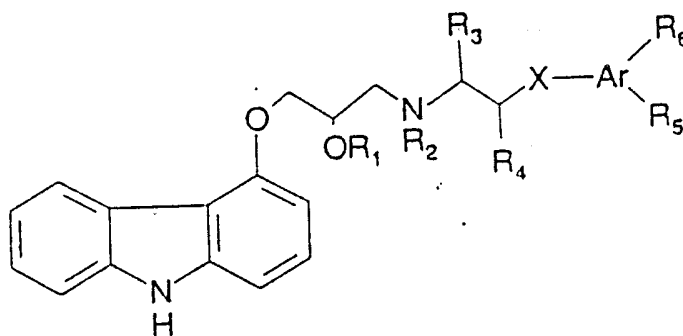
05. IX. 95  
 003110  
 155037  
 621

Oblast techniky

Vynález se týká nového lékařského použití karbazolyl -(4)-oxypropanolaminových sloučenin, zejména karvedilolu.

Dosavadní stav techniky

Karbazolyl-(4)-oxypropanolaminové sloučeniny obecného vzorce I,



(I)

kde R<sub>1</sub> je vodík, nižší alkanoyl s obsahem maximálně 6 atomů uhlíku nebo aroyl ze skupiny tvořené benzylem a naftylem

R<sub>2</sub> je vodík, nižší alkyl s obsahem maximálně 6 atomů uhlíku nebo arylalkyl ze skupiny tvořené benzylem, fenylethylem a fenylpropylem

R<sub>3</sub> je vodík nebo nižší alkyl s obsahem maximálně 6 atomů uhlíku

R<sub>4</sub> je vodík nebo nižší alkyl s maximálně 6 atomy uhlíku, nebo když X je kyslík, R<sub>4</sub> a R<sub>5</sub> tvoří společně skupinu -CH<sub>2</sub>-O-

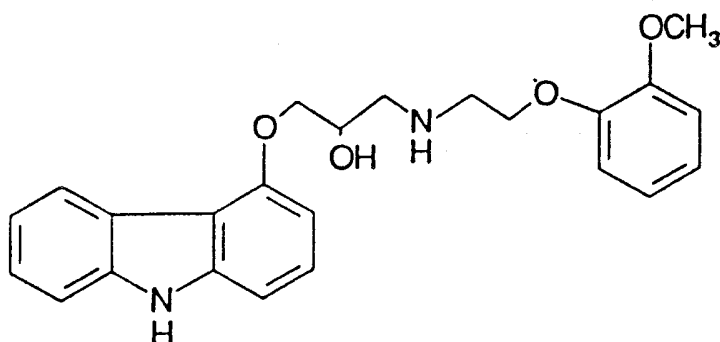
X je valenční spojka, -CH<sub>2</sub>, kyslík nebo síra

Ar je fenyl, naftyl, indanyl a tetrahydronaftyl

R<sub>5</sub> a R<sub>6</sub> jsou vodík, fluor, chlor, brom, hydroxyl, alkyl s maximálně 6 atomy uhlíku, -CONH<sub>2</sub>-skupina, nižší akoxyskupina s maxi-

málně 6 atomy uhlíku, benzyloxyskupina, nižší alkylthioskupina s maximálně 6 atomy uhlíku, nižší alkylsulfinyl s maximálně 6 atomy uhlíku a nižší alkylsulfonyl s maximálně 6 atomy uhlíku nebo

$R_5$  a  $R_6$  společně tvoří metylendioxyskupinu nebo jejich soli přijatelné z farmaceutického hlediska, jsou uvedeny v U.S. Pat. No. 4,503,067. V tomto patentu je rovněž uvedena látka obecného vzorce I, lépe známá jako karvediol (1-(carbazol-4-yloxy-3-[[2-(o-methoxyphenoxy) ethyllaminol]-2-propanol]), mající strukturní vzorec II:



(II)

Sloučeniny, jejichž příkladem je karvedilol jsou nové léky s mnohostrannými účinky používané v léčbě mírné až střední hypertenze, jsou užitečné i při angině pectoris a městnavém srdečním selhání (CHF). Karvedilol je znám nejen jako kompetitivní antagonist  $\beta$ -adrenoreceptoru a vasodilatator, ale také jako antagonist kalciových kanálů ve vyšších koncentracích. Vasodilatační účinky karvedilolu vyplývají primárně z blokády  $\alpha_1$ -adrenoreceptoru, kdežto  $\beta$ -adrenoreceptor, blokující účinek léku zabraňuje reflexní tachykardii při léčbě hypertenze. Tyto mnohostranné účinky karvedilolu odpovídají antihypertensivnímu účinku látky na zvířata a zejména na lidi, a stejně jsou prospěšné v léčbě anginy pectoris a CHF. Vilette, R.N., Sauermelch, C.F. & Ruffolo, R.R., Jr. (1990) Eur. J. Pharmacol., 176, 237-240; Nichol, A.J., Gellai, M. & Ruffolo, R.R., Jr. (1991) Fundam. Clin. Pharmacol., 5, 25-38; Ruffolo, R.R., Jr., Gellai, M., Hieble, J.P., Vilette, R.N. & Nichols, A.J. (1990) Eur. J. Clin. Pharmacol., 38, S82-S88; Ruffolo,

R.R., Jr., Boyle, D.A., Venuti, R.P. & Lukas, M.A. (1991) *Drugs of Today*, 27, 465-492; a Yue, T.L., Cheng, H., Lysko, P.G., McKenna, P.J., Feuerstein, R., Gu, J., Lysko, K.A., Davis, L.L. & Feuerstein, G. (1992) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 263, 92-98.

Antihypertenzivní účinek karvedilolu je zprostředkován primárně snížením periferní cévní resistance bez průvodní reflexní změny srdečního rytmu, která provází ostatní antihypertenzivní léky. Willette, R.N. a kol., Nichols, A.J. a kol., Ruffolo, R.R. Jr., Gellai, M., Hieble, J.P., Willette, R.N. & Nichols, A.J. (1990) *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 38, 82-88. Karvedilol také značně snižuje rozsah infarktů u modelů akutního infarktu myokardu u krys, psů a vepřů, (Ruffolo, R.R. Jr., a kol., *Drugs of Today*), zřejmě vlivem jeho antioxidačního účinku a snížení volných kyslíkových radikálů, způsobujících peroxidaci tuků (Yue, T.L. a kol.).

Abnormální proliferace - bujení buněk hladkého svalu cév je spojena s kardiovaskulárními poruchami jako je aterosklerosa, hypertenze a též s většinou endovaskulárních výkonů. Abnormální bujení hladkého svalu cévy je obvyklou komplikací po perkutánní transluminální srdeční angioplastice (percutaneous transluminal coronary angioplasty PTCA).

Výskyt chronických restenos způsobených následným bujením hladkého svalu cév po PTCA, byl pozorován ve více než 40 až 45 % případů během 3 až 6 měsíců, jak je popsáno: Capron, L., Heudes, D., Chajara, A. & Bruneval, P. (1991) *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 18, 207-211; Bourassa, M. (1992) *J. Am. Coll. Cardiol.*, 19, 1410-1411. Neurohumorální faktory, například angiotensin II, norepinephrin, stejně jako růstové faktory, včetně z destiček uvolňovaného růstového faktoru (platelet-derived growth factor PDGF) a fibroplastového růstového faktoru (FGF), hrají roli při vzniku cévní restenosis in vivo. Bourassa, M., te al. supra; Powell, J.S., Clozel, J.P., Müller, R.K.M., Kuhn, H., Hefti, F., Hosang, M. & Baumgartner, H.R. (1989) *Science*, 245, 186-198; Clozel, J.P., Hess, P., Michael, C., Schietiger, K. & Baumgartner, H.R. (1991) *Hypertension*, 18, (Suppl. II), 1155-1159; Fingerle, J., Sanders, K.K., & Fotev Z. (1991) *Basic. Res. Cardio.*, 86, 75-81.; Forney- Prescott, M., Webb, R.L. & Reidi, M.A. (1991) *Am. J. Pathol.*, 139, 1291-1296.;

Kauffman, R.F., Bean, J.S., Zimmerman, K.M., Brown, R.F. & Steinberg, M.I. (1991) *Life Sci.*, 49, 223-228; Azuma, H.Y. & Hamasaki, H. (1992) *Br. J. Pharmacol.*, 106, 665-671.; Ferns, G.A.A., Raines, E.W., Sprugel, K.H., Motani, A.S., Reidi, M.A. & Ross, R. (1991) *Science*, 253, 1129-1132; a Lindner, V. & Reidi, M.A. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 88, 3739-3743.

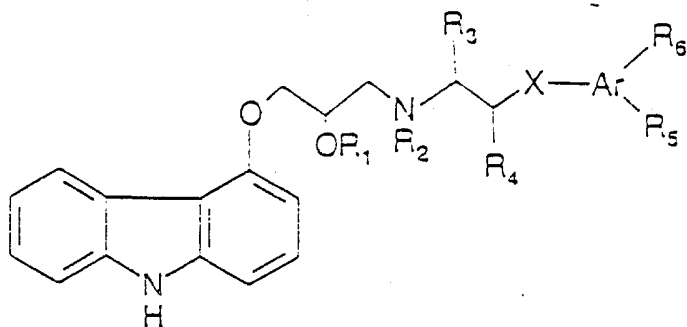
Vysoký výskyt cévní reokluse spojené s PTCA vedl k vytvoření animálních modelů vzniku restenos in vivo na zvířatech a k hledání účinné látky pro jejich prevenci. Antagonisté receptoru pro angiotensin II, inhibitory angiotensin konvertujícího enzymu, antagonisté  $\alpha$ - adrenoreceptoru a protilátky růstového faktoru vedly u takových animálních modelů pouze k mírné redukci výskytu restenosy u zvířat (pouze z 10 až 50 %). Powell, J.S., a kol., supra; Fingerle, J. a kol., supra; Forney-Prescott, M. a kol., supra; a Kauffman, R.F., a kol., supra. Klinické studie s inhibitory angiotensin konvertujícího enzymu (ACE), ukázaly pouze slabý protektivní vliv proti rozvoji restenosy u pokusných zvířat. U lidí se nepodařilo významný protektivní vliv prokázat. Popma, J.J., Califf, R.M. & Topol, E.J. (1991) *Circulation*, 84, 1426-1436. Omezená a nevýznamná ochrana proti vzniku restenosy, kterou jsou schopny poskytnout látky se specifickým mechanismem účinku zřejmě nereflektují komplexně povahu změn při vzniku restenos. Předpokládá se, že mnoho různorodých patofysiologických mitogenních faktorů hraje roli v odpovědi cévní stěny na její mechanické poškození a je nepravděpodobné, že ovlivnění pouze jednoho z těchto faktorů může být prospěšné.

Proto jsou vysoce žádoucí anti-mitotická činidla, která snižují nebo chrání před abnormální proliferací buněk hladkého svalu při kardiovaskulárních chrobách například atherosklerose, cévní hypertrofii spojené s hypertensí nebo při komplikacích PTCA vedoucích k chronickým restenosám.

#### Podstata vynálezu

Podstata vynálezu spočívá v novém lékařském použití karbazolyl-(4)-oxypropanolaminových sloučenin obecného vzorce I,

18. III 96  
1620265  
DOKUM  
UNIVERSITÄT  
MASARYK  
PRAHA  
18. III 96



(I)

ve kterém

R<sub>1</sub> znamená atom vodíku, nižší alkanoylovou skupinu s až 6 atomy uhlíku nebo aroylovou skupinu vybranou z benzoylu a naftoylou,

R<sub>2</sub> znamená atom vodíku, nižší alkylovou skupinu s až 6 atomy uhlíku nebo aralkylovou skupinu zvolenou z benzylu, fenethylu a fenylpropylu,

R<sub>3</sub> znamená atom vodíku nebo alkylovou skupinu s až 6 atomy uhlíku,

R<sub>4</sub> znamená atom vodíku nebo nižší alkylovou skupinu s až 6 atomy uhlíku, nebo pokud X představuje atom kyslíku, R<sub>4</sub> dohromady s R<sub>5</sub> mohou představovat skupinu vzorce -CH<sub>2</sub>-O-

X představuje valenční spojku, skupinu vzorce -CH<sub>2</sub>, atom kyslíku nebo atom síry,

Ar je zvolen z fenylu, naftylu, indanylu nebo tetrahydronaftylu,

R<sub>5</sub> a R<sub>6</sub> jsou jednotlivě zvoleny z atomu vodíku, fluoru, chloru nebo bromu, hydroxyskupiny, nižší alkylové skupiny s až 6 atomy uhlíku, skupiny vzorce -CONH<sub>2</sub>-, nižší alkoxy skupiny s až 6 atomy uhlíku, benzyloxyskupiny, nižší alkylthioskupiny s až 6 atomy uhlíku, nižší alkylsulfinylové skupiny s až 6 atomy uhlíku a nižší alkylsulfonylové skupiny

s až 6 atomy uhlíku, nebo

$R_5$  a  $R_6$  tvoří dohromady methylen-dioxykupinu,

nebo její farmaceuticky přijatelné soli, k výrobě léčiva pro inhibici proliferace a migrace hladkých svalových buněk savců, s výhodou k výrobě léčiva pro prevenci restenozy po perkutánní transluminální srdeční angioplastice u savců, pro prevenci aterosklerózy savců a pro potlačení cévní hypertrofie (zbytnění) spojené s hypertenzí u savců. Účelné je sloučeninou obecného vzorce I v těchto léčivech karvedilol.

Podstata vynálezu spočívá zaprvé v novém medicínském použití karbazolyl-(4)-oxypropanolaminových sloučenin obecného vzorce I jako anti-mitotických prostředků pro inhibici růstu buněk hladkého svalstva. Vynález umožňuje zejména nové použití sloučeniny obecného vzorce I, ve kterém  $R_1$  až  $R_4$  a  $R_6$  je vodík, X je kyslík, Ar je fenyl,  $R_5$  je methoxyskupina v poloze ortho (tak zvaného karvedilolu, 1-(karbazol-4-yloxy-3-[[2-(o-methoxyfenoxy)ethyl]amino]-2-propanolu) nebo z farmaceutického hlediska přijatelných soli, k výrobě léčiva k prevenci restenoz následujících po PTCA, k potlačení postupu cévní hypertrofie spojené s hypertenzí a k prevenci vzniku aterosklerózy.

Léčebná metoda pro prevenci restenozy, ke které dochází po PTCA, v potlačení cévní hypertrofie spojené s hypertenzí a k prevenci vzniku aterosklerózy u savců spočívá v tom, že se savců, a to zejména lidem, vnitřně podávají v nezbytném a účinném množství léčiva obsahující sloučeniny výše uvedeného obecného vzorce I, zvláště sloučeniny obecného vzorce I, ve kterém  $R_1$  až  $R_4$  a  $R_6$  je vodík, X je kyslík, Ar je fenyl,  $R_5$  je methoxyskupina

v poloze ortho (tak zvaný karvedilol) nebo jejich farmaceuticky přijatelné soli.

Bylo zjištěno, že sloučeniny obecného vzorce I, zejména kardilol, jsou schopné zastavit mitogeny stimulovanou proliferaci kultivovaných buněk hladkého svalu z krysí aorty in vitro. Nejzajímavější je, že sloučeniny obecného vzorce I, zejména karvedilol, jsou schopné blokovat proliferativní účinek několika farmakologicky nepříbuzných mitogenů jako trombinu, PDGF, epidermálního růstového faktoru (EGF), angiotensinu II a endothelinu-1 s hodnotou  $IC_{50}$  přibližně 1  $\mu M$ , v případě karvedilolu. To je účinek, který není sdílen s žádným jiným antagonistou  $\beta$ -adrenoreceptoru, jako je labetalol, celiprolol nebo sotalol. Protože sloučeniny obecného vzorce I, zejména karvedilol, zabráňují proliferacním účinkům různých stimulačních mitogenů, je možné uvést, že jsou vhodné k prevenci nežádoucího následku této proliferace, a mají jasnou výhodu před antagonisty jednotlivých specifických růstových faktorů.

Dále bylo zjištěno, že sloučeniny obecného vzorce I, zvláště karvedilol, vykazují vyšší ochranné účinky proti proliferaci cévních buněk hladkého svalu v krevních cévách. Zvláště sloučeniny obecného vzorce I včetně karvedilolu silně inhibují bujení buněk v hladkého svalu cév, migraci a neointimální proliferaci v tepnách vystavených akutním zraněním způsobeným balonkovou angioplastikou.

Konečně tento vynález umožňuje použití sloučenin obecného vzorce I, zejména karvedilolu, nebo jejich farmaceuticky přijatelných soli, k výrobě léčiva pro inhibici proliferace a migrace hladkých svalových buněk savců, zejména člověka, zvláště k prevenci restenosis po angioplastice,

podmíněné neointimální proliferaci u pacientů, kteří prodělali PTCA, k inhibici vzniku atherosklerosy nebo k potlačení postupu cévní hypertrofie spojené s hypertensí. Při léčebné metodě těchto chorobných stavů se pacientovi vnitřně podává účinná dávka farmaceutického prostředku, který obsahuje sloučeninu obecného vzorce I, zejména karvedilol, nebo její farmaceuticky přijatelnou sůl.

Jak je ilustrováno příklady, karvedilol poskytuje významnou ochranu (v 84 % snižuje sílu vnitřní vrstvy cévní stěny v příčném průřezu) před balonkovou angioplastikou vyvolanou neointimální proliferací, migrací a cévní stenózou v modelu na krční tepně krys. Kromě toho karvedilol významně inhibuje migraci buněk hladkého svalu cév *in vitro* a inhibuje mitogenesi lidského hladkého svalu cév způsobenou řadou různých mitogenů, aniž je jeho působení omezeno jakýmkoli mechanistickým vysvětlením nebo teorií či činností, počítaje v to vyjádřenou ochranu proti restenóze po balonkové angioplastice *in vivo*.

Protiproliferativní ochranný mechanismus karvedilolu podle vynálezu není výsledkem blokády kalciových kanálů nebo receptoru pro angiotensin II, které oba mohou zapříčinit restenosu po balonkové angioplastice, protože hemodynamické experimenty prokázaly, že použitý režim dávkování karvedilolu nemá významný vliv na kalciové kanály či receptory angiotensinu II. Navíc u podobného zvířecího modelu, užitého u tohoto vynálezu, blokátor kalciového kanálu nifedipin způsobil nižší než 40 % ochranu ve stehenní arterii králíka po předcházející angioplastice (Jackson, C.L., Bush, R.C. & Bowyer, D.E. (1988) *Artheroscler*, 69, 115-122).

I když nemohla být vyloučena blokáda  $\beta$ -adrenoreceptoru jako mechanismus, kterým karvedilol chrání hladké svalstvo cév proti postižení po angioplastice, není žádná evidence k předpokladu, že tyto receptory jsou schopné zprostředkovat mitogenesi hladkých svalů. Naproti tomu je známo, že aktivace  $\alpha_1$ -adrenoreceptoru cirkulujícím norepinefrinem může být účastna do rozvoje luminální stenosis následující po angioplastice. Nicméně antagonist  $\alpha_1$ -adrenoreceptoru prazosin (1mg/kg, p.o.) způsobí pouze 16 % inhibici proliferace hladkého svalu cév pozorovaného u krys po angioplastice krční cévy (Fingerle, J., a kol.). Navíc není pravděpodobné, že hypotensivní účinky karvedilolu přispívají k pozorovaným k antiproliferačním účinkům, protože ostatní antihypertensivní látky nevykazují efekt na cévní restenosu, která byla zaznamenána u karvedilolu. Konečně kontinuální aplikace antagonisty receptoru angiotensinu II losartanu po stejnou časovou periodu jako byl podáván karvedilol u krys způsobila stejnou redukci systémového krevního tlaku, jaká byla pozorována po karvedilolu, ale byla u něj zaznamenána pouze 48 % redukce proliferace vnitřní vrstvy stěny cévy. Kauffmann, R.F. a kol.

Podobně stejné hypotensivní dávky několika dalších antihypertensivních látek, jako je minoxidil nebo hydralazin nedokázaly vytvořit signifikantní ochranu proti cévním restenózám. Powell, J.S., Müller, R.K.M. & Baumgartner, H.R. (1991) *J. Am. Coll. Cardiol.*, 17, 137B-142B.

Chemotektická migrace buňky hladkého svalu medie do intimy je prvním důležitým krokem v patogenezi neointimální proliferace

po balonkové angioplastice. PDGF je zřejmě klíčová substance způsobující proliferaci a migraci buněk hladkých svalů. Ferns, G. a.a., a kol.; Ross, R. (1986) N. Engl. J. Med. 314, 488-500.

Carvedilol inhibuje podle vynálezu migraci buněk hladkého svalu vyvolanou PDGF s hodnotou  $IC_{50}$  srovnatelnou s potencií pozorovanou při inhibici proliferace hladkého svalu a antioxidační aktivity.

Aniž se omezíme jakýmkoli mechanistickým vysvětlením nebo teorií působení, karvedilol má schopnost inhibovat znovuvytvoření vnitřní vrstvy cévní stěny *in vivo*, která může být ve vztahu k přímé inhibici migrace hladkého svalu cév ze střední do vnitřní vrstvy cévní stěny a také částí antioxidační aktivity karvedilolu, která může ztlumit aktivitu makrofágů a monocytů v místě zranění. Protože oxidovaný lipoprotein nízké hustoty (low density lipoprotein LDL) je také chemotaktický v hladkém svalu cévy, a karvedilol inhibuje oxidaci LDL. Toto může dodatečně přispět k mechanismu zmíněné inhibice neointimální formace cévy *in vivo*.

Přesnou molekulární strukturu vedoucí k antiproliferativnímu a antimigračnímu účinku karvedilolu je třeba ještě objasnit. Nové lékařské použití karvedilolu a metoda léčení používající karvedilol podle vynálezu poskytuje dobrou ochranu proti neointimální formaci cévní stěny a restenose po angioplastice u animálního modelu. Stupeň ochrany vytvořený karvedilolem je srovnatelný pouze s nedávno uveřejněným pokusem c-myc antisense oligonukleotidu. Simons, M., Edelman, E.R., Dekeyser, J.L., Langer, R. & Rosenberg, R.D. (1992) Nature, 359, 67-70. Toho bylo dosaženo pouze cestou přímé deposice vykonstruované anti-sense na poraněný povrch cévy v protikladu ke zmíněnému užití a způsobu léčení, ve kterém je antistenotický efekt s výhodou dosažen systémovým podáváním, které je přístupnější v konvenční lékařské praxi. Míra ochrany proti restenose indukované karvedilolem (až 84%) při použití denní dávky 2 mg/kg daleko převyšuje známé účinky ostatních sloučenin zkoušených na zvířecích modelech.

Sloučeniny obecného vzorce I mohou být připraveny podle US Pat. No 4,503,067. Karvedilol je komerčně dostupný u Smith Kline Beecham Corp. (Kredex) a Boehringer Mannheim GmbH (Německo).

Farmaceutické přípravky sloučenin obecného vzorce I obsahující karvediol mohou být pacientům podle vynálezu podávány jakýmkoliv lékařsky přijatelným způsobem, nejlépe parenterálně. Pro parenterální podání bude farmaceutická směs ve formě sterilní injekční tekutiny skladované například v ampuli nebo ve formě vodné nebo nevodné suspenze. Povaha a složení farmaceutického nosiče, rozpouštědla nebo vehikula bude ovšem záviset na způsobu podání, například zda bude injekce intravenosní nebo do svalu.

Farmaceutické přípravky sloučenin obecného vzorce I pro použití podle vynálezu mohou být aplikovány ve formě roztoků nebo lyofilizovaných prášků pro parenterální použití. Prášky mohou být připraveny k použití přidáním vhodného rozpouštědla nebo jiného farmaceuticky vhodného nosiče. Kapalná forma je obvykle pufrovaný izotonický vodný roztok. Příklady vhodných rozpouštědel jsou normální izotonický solný roztok, standardní 5 % roztok glukosy ve vodě nebo v ústojném roztoku octanu sodného nebo amonného. Taková forma je zvláště vhodná pro parenterální podávání, ale může být podávána i orálně nebo může být součástí odměřovaných dávek inhalátorem nebo rozprašovačem nebo insulací. Může být vhodné přidat vehikulum jako etanol, polyvinylpyrrolidon, želatinu, hydroxycelulosu, arabskou gumu, polyetylglykol, manitol, chlorid nebo citrát sodný.

Alternativně mohou být tyto sloučeniny obecného vzorce I podávány orálně v kapslích, tabletách, emulzích nebo sirupech. Farmaceuticky vhodné tuhé nebo kapalné nosiče mohou být přidány pro zvýšení stability nebo snazší výrobu přípravku. Tekuté nosiče zahrnují sirupy, arašidový nebo olivový olej, glycerin, sůl, etanol a vodu, tuhé nosiče škrob, lakotosu, dihydrát síranu vápenatého, bílou hlinku, magnesium stearat nebo stearin, talek, pektin, arabskou gumu, agar nebo želatinu. Nosičem může být také glycerylmonostearat nebo glyceryldistaerat samotný nebo s voskem. Množství tuhé nosiče je různé, s výhodou mezi 20 mg až 1 g na jednotku dávky. Farmaceutické přípravky mohou být vyrobeny konvenčními technologiemi mletím, mícháním, granulací nebo lisováním do tabletových forem nebo mícháním a plněním do želatinových kapslí. Při použití tekutých nosičů se připravují sirupy, elixíry,

emulze, vodné či nevodné suspence. Také tekuté formy mohou být podávány přímo perorálně nebo plněny do želatinových kapslí.

Denní dávky lidem při léčení podle vynálezu nepřekročí 100 mg sloučenin obecného vzorce I, včetně karvediolu. Pro prevenci reokluse po PTCA doporučený dávkovací režim je podávání od 12,5 mg/den do 100 mg/den sloučenin obecného vzorce I, zejména karvedilolu v jedné nebo více dávkách až 3 x denně před, během a až do 6 měsíců po angioplastice. Nejvýhodnější je dávkování 25 mg/den ve 3 dávkách. Skutečně preferované dávky sloučenin používané ve farmaceutických přípravcích podle tohoto vynálezu budou kolísat podle konkrétního složení přípravku, způsobu podání, konkrétního místa podání, léčeného pacienta a konkrétní léčené nemoci.

Při použití sloučenin obecného vzorce I včetně sloučeniny vzorce II podle vynálezu není třeba očekávat nevhodné toxikologické vlivy.

V následujících příkladech jsou všechny teploty ve °C, ledaže byly indikovány jiným způsobem. Všechny výchozí materiály byly získány z obchodních zdrojů. I bez dalšího podrobného rozpracování se lze domnívat, že člověk zkušený v dané technice využije předcházející popis vynálezu v co největší míře. Pokud se týče nároků, který si vynálezce vyhrazuje, jsou příslušné odkazy uvedeny níže.

### Příklady provedení

#### Materiály

Lidský epidermální růstový faktor a destičky uvolňovaného růstového faktoru A/B byly koupeny od Boehringer Mannheim Corp. (Indianapolis, IN); [<sup>3</sup>H]thimidin (spec.aktivita = 110 Ci/mmol; New England Nuclear, Boston, MA) a lidský thrombin byl koupen od Sigma (St. Louis, MO). Karvedilol byl získán od Boehringer Mannheim (Německo). Roztoky karvedilolu byly bezprostředně před jejich podáním připraveny pro injekce rozpuštěním 5 mg sloučeniny v nosiči, který sestával z 0,3 ml kyselého ethanolu (stejně objemy 100 % ethanolu a 1M HCl) v 4,7 ml sterilní destilované vody. Všechny ostatní použité chemikálie byly z komerčních zdrojů a byly použi-

ty bez dalšího čištění.

### Statistika

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  S.E.M. a n znamená počet zvířat nebo počet jednotlivých pokusů v konkrétní skupině. Statistické srovnání bylo provedeno použitím one-way analysis variance s p hodnotou menší než 0,05 považovanou za signifikantní.

### Kultura buněk hladkého svalu cév

Původní kultury hladkého svalu srdečnicové cévy pro použití k migračním studiím byly připraveny explantační technikou popsanou v Ohlstein, E.H., Arleth, A., Bryan, H., Elliott, J.D. & Sung, C.P. (1992) Eur. J. Pharmacol., 225, 347-350. Původní kultura lidských buněk hladkého svalu plicní arterie konzervovaná hlubokým zmrazením pro použití ke studiu DNA syntesy byla získána z Clonetics Corp. (San Diego, CA). Buňky rostly v modifikované MCDB 131 obsahující 5 % zárodečného bovinního sera, 10 ng/ml epidermálního růstového faktoru, 2 ng/ml basic-fibroplastového růstového faktoru, 1  $\mu$ M dexametazonu, 10  $\mu$ g/ml sulfátu gentamycinu a 10 ng/ml amphotericinu B (Clonetics Corp.).

### DNA - syntesy

Lidské buňky hladkého svalu cévy byly vloženy do 24 well plates (Corning, NY) ( $2 \cdot 10^4$  buněk/cm<sup>2</sup>, pasáž 6) a byly kultivovány 3 dny. Buňky byly potom inaktivovány sérem, obsahujícím Eagleovo medium (DMEM; Gibco Labor., Grand Island, NY), modifikovaným Dulbeccem, které obsahovalo insulin (5  $\mu$ g/ml), transferrin (5  $\mu$ g/ml) a seleničitan sodný (5 ng/ml) po dobu 48 hodin. Buňky byly doplňovány čerstvým médiem jednou mezi a po 48 hodinách inaktivační periody. Karvedilol byl přidán 15 minut před přidávkou mitogenu a následující 24 hodinovou inkubací. DNA-syntesa byla sledována měřením radioaktivity inkorporace [<sup>3</sup>H] thymidinu (4 hodiny) do TCA nerozpustné frakce.

### Příklad 1

Migrace hladkého svalu cévy

Postup sledování migrace buněk hladkého svalu cévy byl popsán dříve v Hidaka, Y., Eda, T., Yonemoto, M. & Kamei, T. (1992) *Atheroscler.* 95, 87-94. Buňky hladkého svalu srdeční cévy (pasáž 3) byly suspendovány ( $1 \cdot 10^6$  buněk/ml) v séru bez DMEM doplněném 0,2 % (w/v) bovinního séra albuminu (Sigma). Zkoušky migrace byly provedeny v přizpůsobených Boydenových komůrkách, které použil Transwell (Costar, Cambridge, MA) - komůrky pro kultivaci buněk s polykarbonátovou membránou o velikosti pórů 8  $\mu\text{m}$ . PDGF byl rozpuštěn v DMEM a umístěn v nižším oddělení v přítomnosti nebo bez karvedilolu. Buňky hladkého svalu cévy ( $5 \cdot 10^5$  buněk) byly potom zatíženy vrchním oddělením a inkubovány 24 hodin při 37 °C ve vlhké atmosféře obsahující 5 % CO<sub>2</sub>. Nepohyblivé buňky byly s povrchu jemně seškrábnuty a promyty 3 krát PBS. Filtry byly ustáleny v methanolu a upraveny Giemsa. Počet buněk hladkého svalu cévy, které skrze 100 x high power field (HPF) migrovaly k nižšímu povrchu filtrů byl určen mikroskopicky. Na filtr byly počítány 4 HPF. Zkoušky byly prováděny 2 až 3 krát.

Se zvyšující se koncentrací PDGF roste migrace buněk hladkého svalu krys. Maximální vliv byl zaznamenán při koncentraci 1 nM. Když byl karvediol umístěn v nižší komůrce s PDGF, odezva migrace byla významně inhibována do určité koncentrace závislé na hodnotě IC<sub>50</sub> pro 3  $\mu\text{M}$  karvedilolu.

## Příklad 2

### Balonková angioplastika krční arterie křesy

Zvířata použitá ke studiu byla rozdělena do dvou skupin. Na zvířata použitá pro hemodynamické studie (a) a na zvířata použitá pro histopatologické zkoušky stupně intimální proliferace po angioplastice krční arterie (b). Tyto dvě větší skupiny byly dále rozděleny na zvířata, která byla léčena karvedilolem (1 mg/kg, i.p., 2 krát denně, přibližně 5  $\mu\text{M}$ /kg/den) a na zvířata, která sloužila jako kontrola, která dostávala stejný objem vehikula. Všechna zvířata byla léčena karvedilolem nebo jenom vehikulem 3 dny před začínající hemodynamickou studií nebo angioplastikou

krční arterie (později tato skupina dostávala po 14 dnů následující po chirurgickém zákroku karvedilol nebo vehikulum a poté byla tato zvířata obětována k histologickému vyšetření krční arterie). Druhá skupina po balonkové angioplastice krční arterie byla za aseptických podmínek anesteziována (pentobarbitalem sodným 65 mg/kg, i.p.), samčí krysy Sprague-Dawley (380-420 g) byly léčeny po 3 dny buď karvedilolem nebo vehikulem, poté byla nalezena levá vnější krční arterie (středovým řezem) a vyčištěna od ulpělé tkáně až do místa vidlicového rozdělení krční arterie. Zvláštní péče byla věnována tomu, aby nedošlo ke zranění bludného nervu nebo připojeného cervikálního ganglionu a sympatiku během čištění distální části krční arterie. 2-F Fogartyho arteriální embolektomický katetr (Baxter Healthcare Corp., Santa Ana, CA) byl vložen do levé vnější krční arterie a zaveden na fixní vzdálenost 5 cm do dolní vnější krkavice a spojené krční arterie tak, aby konec katetru byl proximálně k oblouku aorty. Zafixovaný balonek byl nafouknut tekutinou tak, aby došlo k vytvoření jemného odporu ve stěně cévy a pak byl katetr vyjmut. S nafouknutým balonkem byl katetr vyjímán v konstantních intervalech (přibližně 2 cm/s) zpět do bodu blízkého místu vsunutí do vnější krční arterie. Tento postup byl proveden celkem 3 krát, pak byl katetr odstraněn a rána byla zavřena. Zvířata byly uložena v plexisklové schránce v páru, světlo a tma se střídaly po 12 hodinách, zvířata měla přístup ke standardní laboratorní stravě a pití vody ad libitum.

14 dní po provedení balonkové angioplastiky byly spojené krční tepny odstraněny z krys a použity k histopathologické studii. Do určité míry bylo znovuvytvoření vnitřní vrstvy cévní stěny histologicky kvantifikováno. Cévy byly fixovány bezprostředním promýváním vysokou dávkou pentobarbitalu sodného při konstantním tlaku 95-100 mmHg) in situ. Celková délka běžné krční tepny, sahající od oblouku aorty k vidlicovému rozvětvení krční arterie (přibližně 5 cm dlouhá) byla vyjmuta pro histologické pozorování. Arteriální příčné řezy (8  $\mu$ m) byly řezány z parafinových bloků obsahujících střední třetinu arterie a byly barveny hematoxylinem a eosinem. Vrstvy příčných řezů krevních cév (vnitřní, střední a vnější) byly hodnoceny za použití buněčného zobrazovacího sys-

tému Bioscan Optimus (Edmonds, VA).

Všechny pokusy byly provedeny speciálně podle norem Animal Care a Use Commmttee, SmithKline Beecham Pharmaceuticals a AALAC.

Karvedilolová léčba neměla vliv na zvýšení tělesné hmotnosti během 17 denní léčebné periody (380 +/- 6 g, n = 9 a 377 +/- 6 g, n = 10 v karvedilolem a vehikulem léčených skupinách 3 dny před chirurgickým zákrokem 425 +/- 9 g a 416 +/- 7 g 14 dnů po balonkové angioplastice). Krysy léčené karvedilolem (1 mg/kg i.p.), 2 krát denně po 3 dny měly výrazně nižší klidový střední arteriální krevní tlak a srdeční frekvenci (102 +/- 5 mmHg a 305 +/- 9 bpm, n = 6) než ty, které byly léčeny vehikulem (125 +/- 3 mmHg a 360 +/- 21 bpm, n = 7).

Balonková angioplastika levé společné krční arterie způsobila značné zesílení vnitřní vrstvy cévní stěny u krys léčených vehikulem, způsobující vysoce významné - 20 násobné zvýšení poměru intima:media. Kontralaterální pravá společná krční céva, která nebyla podrobena angioplastice, byla normální u obou skupin krys, léčených jak karvedilolem, tak vehikulem. Nebyly u nich pozorovány žádné rozdíly mezi vzorky oblastí vnitřní, střední a vnější vrstvy cévy a tyto cévy měly stejný poměr intima:media. Zvětšení neointimální proliferace po angioplastice bylo výrazně potlačeno karvedilolovou léčbou, při níž v 84 % případů došlo ke snížení vnitřní vrstvy cévy v příčném řezu a srovnatelně v 81 % poklesl poměr intima:media. Karvedilolová léčba nezměnila ani střední, ani vnější vrstvu cévy v příčném řezu. Karvedilolová léčba poskytla vysoce významnou ochranu proti myointimální proliferaci a migraci, které jsou důsledkem poranění cévní stěny po balonkové angioplastice.

### Příklad 3

Inhibice mitogenese hladkého svalu cévy u lidí

Karvedilol podmiňuje na jeho koncentraci závislou inhibici mitogenese, která je stimulovaná PDGF(1 nM), EGF (1 nM), thrombin (0,1 U/ml) a zárodečným bovinním sérem (1 %) u kultivovaných buněk hladkého svalu lidské plicní arterie. Hodnota IC<sub>50</sub> pro karve-

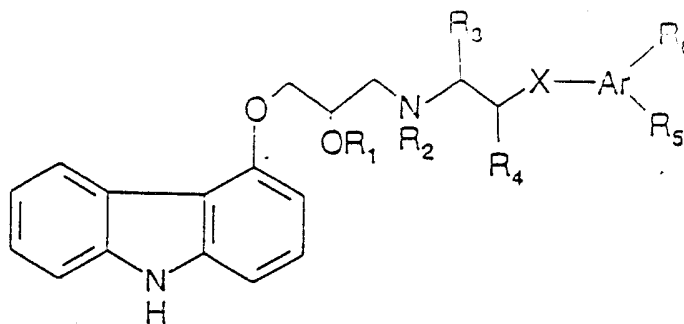
dilol proti mitogenesi stimulované růstovými faktory a séry byla mezi 0,3 a 2  $\mu\text{M}$ . Tento vliv byl plně reverzibilní, když buňky znovu získaly úplnou citlivost k růstovým stimulatorům během 24 hodinové inkubace, jestliže byl karvedilol z prostředí vymyt.

#### Využitelnost

vynález lze využít v lékařské praxi. Popsané případy objasňují jak lze vynálezy využít, nijak však neomezují dále uvedené patentové nároky.

P A T E N T O V É   N Á R O K Y

1. Použití karbazolyl-(4)-oxypropanolaminových sloučenin ze souboru zahrnujícího sloučeniny obecného vzorce I



96 III 81  
01200  
0 4 1 0 5 0  
(1)  
02

ve kterém

R<sub>1</sub> znamená atom vodíku, nižší alkanoylovou skupinu s až 6 atomy uhlíku nebo aroylovou skupinu vybranou z benzoylu a naftoylou,

R<sub>2</sub> znamená atom vodíku, nižší alkylovou skupinu s až 6 atomy uhlíku nebo aralkylovou skupinu zvolenou z benzylu, fenethylu a fenylpropylu,

R<sub>3</sub> znamená atom vodíku nebo alkylovou skupinu s až 6 atomy uhlíku,

R<sub>4</sub> znamená atom vodíku nebo nižší alkylovou skupinu s až 6 atomy uhlíku, nebo pokud X představuje atom kyslíku, R<sub>4</sub> dohromady s R<sub>5</sub> mohou představovat skupinu vzorce -CH<sub>2</sub>-O-,

X představuje valenční spojku, skupinu vzorce -CH<sub>2</sub>, atom kyslíku nebo atom síry,

Ar je zvolen z fenylu, naftylu, indanylu nebo tetrahydronaftylu,

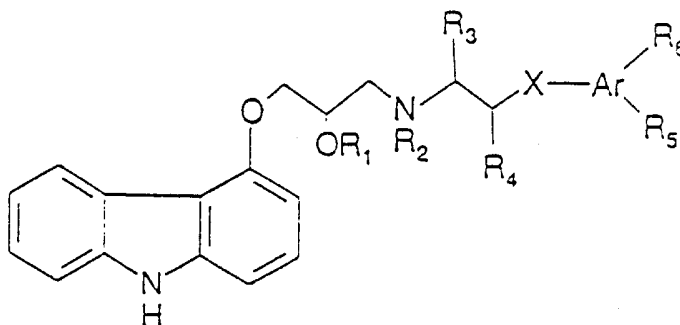
R<sub>5</sub> a R<sub>6</sub> jsou jednotlivě zvoleny z atomu vodíku,

fluoru, chloru nebo bromu, hydroxyskupiny, nižší alkylové skupiny s až 6 atomy uhlíku, skupiny vzorce  $-\text{CONH}_2-$ , nižší alkoxy skupiny s až 6 atomy uhlíku, benzyloxyskupiny, nižší alkylthioskupiny s až 6 atomy uhlíku, nižší alkylsulfinylové skupiny s až 6 atomy uhlíku a nižší alkylsulfonylové skupiny s až 6 atomy uhlíku, nebo

$R_5$  a  $R_6$  tvoří dohromady methylenedioxy skupinu,

nebo její farmaceuticky přijatelné soli, k výrobě léčiva pro inhibici proliferace a migrace hladkých svalových buněk savců.

2. Použití karbazolyl-(4)-oxypropanolaminových sloučenin ze souboru zahrnujícího sloučeniny obecného vzorce I



(I)

ve kterém

$R_1$  znamená atom vodíku, nižší alkanoylovou skupinu s až 6 atomy uhlíku nebo aroylovou skupinu vybranou z benzoylu a naftoylu,

$R_2$  znamená atom vodíku, nižší alkylovou skupinu s až 6 atomy uhlíku nebo aralkylovou skupinu zvolenou z benzylu, fenethylu a fenylpropylu,

$R_3$  znamená atom vodíku nebo alkylovou skupinu s až 6

atomy uhlíku,

$R_4$  znamená atom vodíku nebo nižší alkylovou skupinu s až 6 atomy uhlíku, nebo pokud  $X$  představuje atom kyslíku,  $R_4$  dohromady s  $R_5$  mohou představovat skupinu vzorce  $-\text{CH}_2-\text{O}-$ ,

$X$  představuje valenční spojku, skupinu vzorce  $-\text{CH}_2$ , atom kyslíku nebo atom síry,

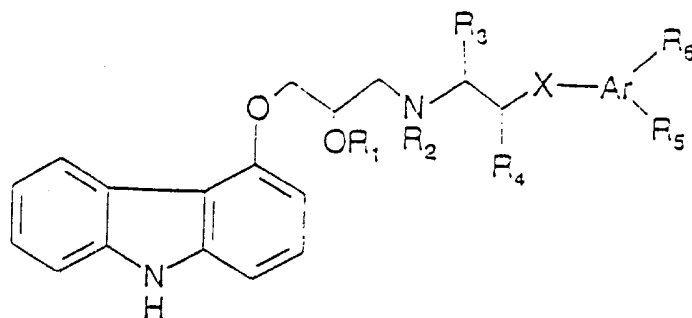
$Ar$  je zvolen z fenylu, naftylu, indanylu nebo tetrahydronaftylu,

$R_5$  a  $R_6$  jsou jednotlivě zvoleny z atomu vodíku, fluoru, chloru nebo bromu, hydroxyskupiny, nižší alkylové skupiny s až 6 atomy uhlíku, skupiny vzorce  $-\text{CONH}_2-$ , nižší alkoxykupiny s až 6 atomy uhlíku, benzyloxyskupiny, nižší alkylthioskupiny s až 6 atomy uhlíku, nižší alkylsulfinylové skupiny s až 6 atomy uhlíku a nižší alkylsulfonylové skupiny s až 6 atomy uhlíku, nebo

$R_5$  a  $R_6$  tvoří dohromady methylenedioxykupinu,

nebo její farmaceuticky přijatelné soli, k výrobě léčiva pro prevenci restenozy po perkutánní transluminální srdeční angioplastice u savců.

3. Použití karbazolyl-(4)-oxypropanolaminových sloučenin ze souboru zahrnujícího sloučeniny obecného vzorce I.



(I)

ve kterém

R<sub>1</sub> znamená atom vodíku, nižší alkanoylovou skupinu s až 6 atomy uhlíku nebo aroylovou skupinu vybranou z benzoylu a naftoylou,

R<sub>2</sub> znamená atom vodíku, nižší alkylovou skupinu s až 6 atomy uhlíku nebo aralkylovou skupinu zvolenou z benzylu, fenethylu a fenylpropylu,

R<sub>3</sub> znamená atom vodíku nebo alkylovou skupinu s až 6 atomy uhlíku,

R<sub>4</sub> znamená atom vodíku nebo nižší alkylovou skupinu s až 6 atomy uhlíku, nebo pokud X představuje atom kyslíku, R<sub>4</sub> dohromady s R<sub>5</sub> mohou představovat skupinu vzorce -CH<sub>2</sub>-O-,

X představuje valenční spojku, skupinu vzorce -CH<sub>2</sub>, atom kyslíku nebo atom síry,

Ar je zvolen z fenylu, naftylu, indanylu nebo tetrahydronaftylu,

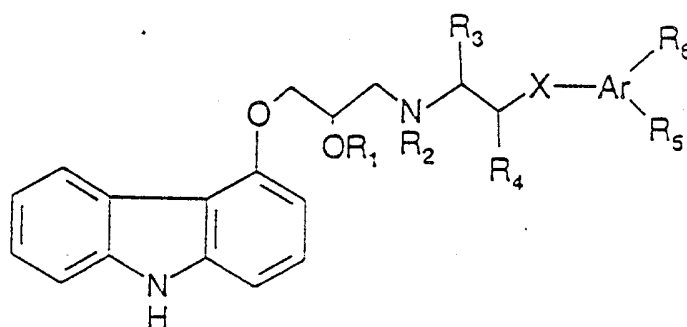
R<sub>5</sub> a R<sub>6</sub> jsou jednotlivě zvoleny z atomu vodíku, fluoru, chloru nebo bromu, hydroxyskupiny, nižší alkylové skupiny s až 6 atomy uhlíku, skupiny vzorce -CONH<sub>2</sub>-, nižší alkoxyskupiny s až 6 atomy uhlíku, benzyloxyskupiny, nižší alkylthioskupiny s až 6 atomy uhlíku, nižší alkylsulfinylové skupiny s až 6 atomy uhlíku a nižší alkylsulfonylové skupiny

s až 6 atomy uhlíku, nebo

$R_5$  a  $R_6$  tvoří dohromady methylenedioxykupinu,

nebo její farmaceuticky přijatelné soli, k výrobě léčiva pro prevenci atherosklerosy u savců.

4. Použití karbazolyl-(4)-oxypropanolaminových sloučenin ze souboru zahrnujícího sloučeniny obecného vzorce I



ve kterém

$R_1$  znamená atom vodíku, nižší alkanoylovou skupinu s až 6 atomy uhlíku nebo aroylovou skupinu vybranou z benzoylu a naftoylu,

$R_2$  znamená atom vodíku, nižší alkylovou skupinu s až 6 atomy uhlíku nebo aralkylovou skupinu zvolenou z benzylu, fenethylu a fenylpropylu,

$R_3$  znamená atom vodíku nebo alkylovou skupinu s až 6 atomy uhlíku,

$R_4$  znamená atom vodíku nebo nižší alkylovou skupinu s až 6 atomy uhlíku, nebo pokud X představuje atom kyslíku,  $R_4$  dohromady s  $R_5$  mohou představovat skupinu vzorce  $-\text{CH}_2-\text{O}-$ ,

X představuje valenční spojku, skupinu vzorce  $-\text{CH}_2-$ , atom kyslíku nebo atom síry,

Ar je zvolen z fenylu, naftylu, indanylu nebo tetrahydronaftylu,

R<sub>5</sub> a R<sub>6</sub> jsou jednotlivě zvoleny z atomu vodíku, fluoru, chloru nebo bromu, hydroxyskupiny, nižší alkylové skupiny s až 6 atomy uhlíku, skupiny vzorce -CONH<sub>2</sub>-, nižší alkoxyskupiny s až 6 atomy uhlíku, benzyloxyskupiny, nižší alkylthioskupiny s až 6 atomy uhlíku, nižší alkylsulfinylové skupiny s až 6 atomy uhlíku a nižší alkylsulfonylové skupiny s až 6 atomy uhlíku, nebo

R<sub>5</sub> a R<sub>6</sub> tvoří dohromady methylen-dioxyskupinu,

nebo její farmaceuticky přijatelné soli, k výrobě léčiva pro potlačení cévní hypertrofie spojené s hypertensí u savců.

5. Použití podle nároků 1 až 4, kde karbazolyl-(4)-oxypropanolaminovou sloučeninou je karvedilol.