

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580041690.4

[51] Int. Cl.

A61K 31/421 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 11 月 14 日

[11] 公开号 CN 101072557A

[22] 申请日 2005.12.6

[21] 申请号 200580041690.4

[30] 优先权

[32] 2004.12.17 [33] EP [31] 04029946.3

[86] 国际申请 PCT/EP2005/013046 2005.12.6

[87] 国际公布 WO2006/063715 英 2006.6.22

[85] 进入国家阶段日期 2007.6.5

[71] 申请人 塞诺菲-安万特德国有限公司

地址 德国法兰克福

[72] 发明人 W·林茨 S·沙费尔 E·法尔克
H-L·舍费尔

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 黄革生 林柏楠

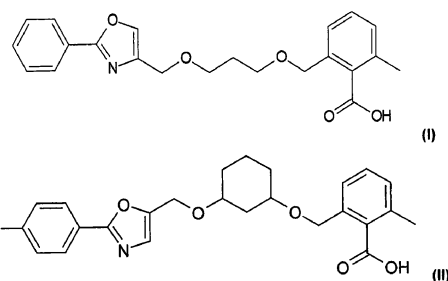
权利要求书 1 页 说明书 11 页

[54] 发明名称

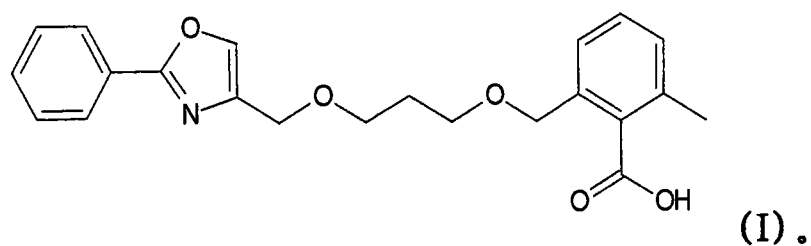
PPAR 激动剂用于治疗充血性心力衰竭的用途

[57] 摘要

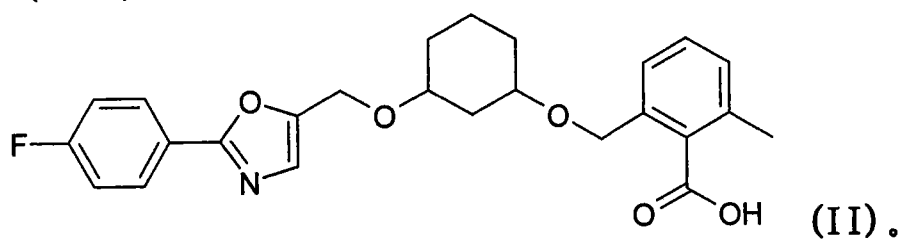
本发明描述了式(I)或(II)的PPAR激动剂用于治疗充血性心力衰竭(CHF)的用途。



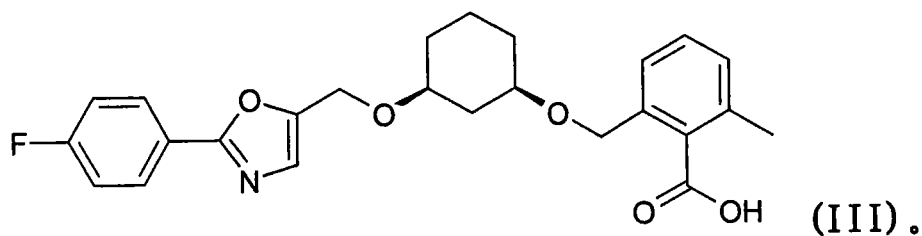
1. 式(I)化合物或其可药用盐或其生理功能衍生物用于制备治疗充血性心力衰竭(CHF)的药物的用途



2. 式(II)化合物或其可药用盐或其生理功能衍生物用于制备治疗充血性心力衰竭(CHF)的药物的用途



3. 根据权利要求 2 的用途, 其特征在于化合物(II)是式(III)的化合物



PPAR 激动剂用于治疗充血性心力衰竭的用途

充血性心力衰竭是一种破坏性的疾病，其中心脏不能充分泵血导致血流在肺的蓄积。典型的症状包括呼吸短促，平躺时呼吸困难和腿和踝的肿胀。所述的体能渐进性损伤可最终导致死亡。心力衰竭有许多的原因，但最常见的是心肌梗塞(约所有病例的 60%)、慢性高血压(约 25%)、遗传倾向(10%)和心肌病，或这些因素的组合。

在患者中，CHF 的严重程度是根据临床症状来进行分类的，该临床症状基于纽约心脏协会(NYHA)建立的分级方法。患者的体能可确定为 NYHA I级(无症状)、NYHA II级(中等体力耗费时出现症状)、NYHA III级(轻微体力耗费时出现症状)或 NYHA IV级(休息时出现症状)。

当前延缓 CHF 进展的 CHF 治疗大大延长了患者的存活时间。然而，任何给定的 NYHA 阶段，整体死亡率仍然保持很高，最近在主要是 NYHA II级和III级患者中进行的大规模试验中平均每年的死亡率为 15%。所有目前批准的已证明对死亡率有益的 CHF 药物(例如，利尿剂、ACE 抑制剂、 β -阻滞剂)的常见缺点是它们的降压效应。联合治疗通常是不可能的因为许多患者血压降低得太多。因此，迫切需要可供选择的针对新的作用机制的治疗策略，以进一步改进 CHF 的药物治疗。

过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferators activated receptors, PPARs)表示一种核激素受体，其中有两种(PPAR α 和 PPAR γ)在许多组织中被表达，包括心肌和血管。PPAR 的激活可导致大量基因的表达和随之的蛋白质的生产。PPAR γ 活化剂(例如，罗格列酮)基于其提高对胰岛素的敏感性以及延迟胰岛素耐受性发展为显形糖尿病的有效性，已被批准用于治疗II型糖尿病(Malinowski 和 Bolesta, Clin. Therapeutics, (2000), 22, 1151-1168; Leff 和 Reed, Curr. Med. Chem. Immunology,

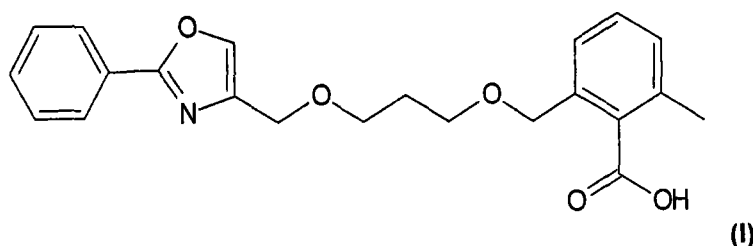
Endocrine & Metabolic Agents (2002), 2, 33-47)。除了一些 PPAR α 活化剂以外, 贝特类因为其能够降低血液胆固醇水平而在临床中使用 (Sacks-FM, Am. J. Cardiol. (2001), 88(12A), 14N-18N)。新的 PPAR α 活化剂, 在结构上与贝特类不同且更为强效, 在临床上开发用于脂紊乱和糖尿病(Inoue 和 Katayama, 当前药物靶标: Cardiovascular & Haematological Disorders (2004), 4, 35-52)。

对于衰竭的心肌, 代谢紊乱伴随着从脂肪酸的氧化转变为葡萄糖的氧化。这种效应导致心肌产能效率的降低, 这又会造成CHF的收缩功能的损失。在衰老大鼠模型中, CHF通过体格训练得到改善, 同时伴随着PPAR α 在心肌中表达的正常化。

除了它们的代谢作用, 有关PPAR活化剂对心脏的直接作用所知很少。在体外的离体新生心肌细胞中, PPAR α 激动剂非诺贝特和WY14,643和PPAR γ 活化剂罗格列酮能够防止内皮素-1诱发心肌肥大。相似地, PPAR γ 活化剂降低了离体心肌细胞的由于机械张力诱导的心肌肥大。在动脉高血压模型中, PPAR α 和PPAR γ 激活均能够降低心脏的纤维化。在小鼠急性心肌缺血和再灌注模型中, PPAR α 和PPAR γ 激活已显示能够降低心肌梗塞的大小。在心肌梗塞后的慢性期, PPAR γ 活化剂已显示改善了心肌重构和心衰症状(Liang等人, Endocrinology 2003, 144: 4187-4194)。另一方面, 有证据显示在II型糖尿病患者中PPAR γ 激动剂可能使心衰恶化。

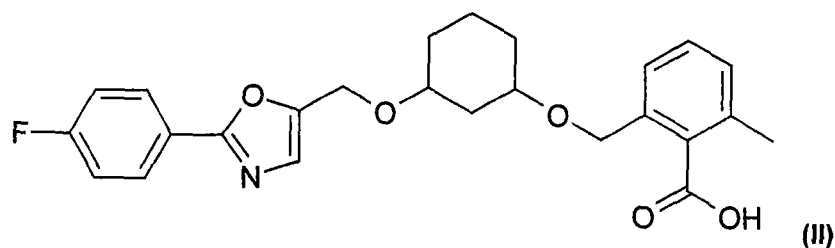
因此, PPAR γ 激活对CHF的益处是有争议的, 关于选择性激活PPAR α 在CHF中的作用方面尚无数据。

本发明的一个实施方案是式(I)化合物或其可药用盐或其生理功能衍生物用于制备治疗充血性心力衰竭(CHF)的药物的用途。

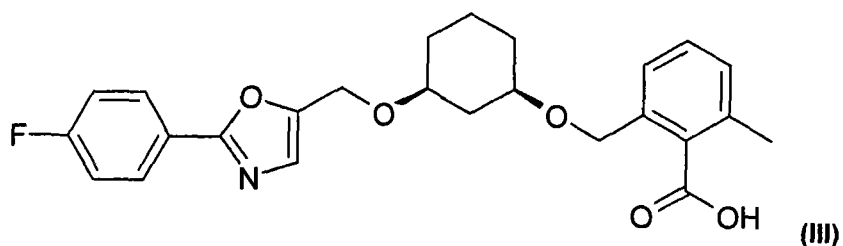


另一个实施方案是式(II)化合物或其可药用盐或其生理功能衍生物用

于制备治疗充血性心力衰竭(CHF)的药物的用途。



优选的式(II)化合物是式(III)的化合物。



式(I)的化合物根据国际专利申请 WO 2004/085377 的实施例 5 制备，化合物(II)和(III)根据国际专利申请 WO 03/020269 的实施例 I 和 II 制备。

因为其在水中的溶解度比原始或基本的化合物更高，所以可药用的盐特别适用于医学应用。这些盐必须具有可药用的阴离子或阳离子。本发明化合物适宜的可药用酸加成盐是无机酸如盐酸、氢溴酸、磷酸、偏磷酸、硝酸和硫酸的盐以及有机酸如例如乙酸、苯磺酸、苯甲酸、柠檬酸、乙磺酸、富马酸、葡萄糖酸、乙醇酸、羟乙基磺酸、乳酸、乳糖酸、马来酸、苹果酸、甲磺酸、琥珀酸、对-甲苯磺酸和酒石酸的盐。适宜的可药用碱盐有铵盐、碱金属盐(如钠和钾盐)、碱土金属盐(如镁和钙盐)。

这里所用的术语“生理功能衍生物”指的是本发明式(I)化合物任何生理学可耐受的衍生物，例如酯，其在施用于哺乳动物如，例如人时能形成(直接或间接)式(I)、(II)或(III)的化合物或其活性代谢物。具有生理学功能的衍生物还包括本发明化合物的前体药物，如，例如在 H. Okada 等人, Chem. Pharm. Bull. 1994, 42, 57-61 中所述的物质。该类前体药物在体内可以代谢成本发明的化合物。这些前体药物本身可以是有活性或无活性的。

本发明的化合物还可以以各种多晶形式，例如无定形和结晶多晶形式存在。本发明化合物所有的多晶形式都在本发明的范围内并且是本

发明的另一方面。

获得所需生物学作用所必需的式(I)、(II)或(III)化合物的量取决于许多因素,例如所选择的特定化合物、所需的应用、施用方式以及患者的临床情况。其日剂量一般为每天每公斤体重 0.3mg 至 100mg (一般为 3mg 至 50mg),例如 3-10mg/kg/天。静脉内剂量可以为例如 0.3mg 至 1.0mg/kg,其可以适宜地以每公斤每分钟 10ng 至 100ng 输液的形式进行施用。用于这些目的的适宜输注溶液的浓度可以为例如约每毫升 0.1ng 至 10mg,一般为约 1ng 至 10mg。单剂量可包含例如约 1mg 至 10g 活性成分。因此,注射用的安瓿剂可包含例如,1mg 至 100mg,并且可以被口服施用的单剂量制剂例如胶囊或片剂可包含 1.0 至 1000mg,一般为 10 至 600mg。为了治疗上述的病症,式(I)、(II)或(III)的化合物可以以该化合物本身的形式进行应用,但是其优选地是具有可药用载体的药物组合物形式。当然,该载体必须是可接受的,即其能与该组合物的其它成分相容并且对患者的健康无害。该载体可以是固体和/或液体,并且优选地与所说化合物一起被配制为单剂量形式,例如片剂,其可包含 0.05% 至 95% 重量的活性成分。同样可以存在其它药学活性物质,包括其它式 I 的化合物。本发明的药物组合物可以用已知药学方法中的一种来进行制备,所说的方法基本是由将该成分与药理学可接受的载体和/或赋形剂混合到一起所组成的。

本发明的药物组合物包括适于口服、直肠、局部、经口(例如舌下)和胃肠外(例如皮下、肌内、真皮内或静脉内)施用的药物组合物,但是最适宜的施用方式在各个体中取决于被治疗病症的性质和严重程度以及在各病例中所用式(I)、(II)或(III)化合物的性质。包衣的制剂和包衣的缓释制剂也在本发明的范围内。优选耐酸和耐胃液的制剂。耐受胃液的适宜包衣包括乙酸邻苯二甲酸纤维素、聚邻苯二甲酸乙酸乙烯酯、邻苯二甲酸羟丙基甲基纤维素以及甲基丙烯酸和甲基丙烯酸甲酯的阴离子聚合物。

用于口服施用的适宜药物化合物可以为独立单位如,例如胶囊、糯米纸囊剂或片剂的形式,其各自包含确定数量式(I)、(II)或(III)的化合物;可以为粉末或颗粒的形式、为位于水性或非水性液体中的溶液或混悬液形式;

或者可以为水包油或油包水乳剂的形式。如已经提及的那样,这些组合物可以用任何适宜的药用方法来进行制备,所说的方法包括一种其中将活性化合物和载体(其可以由一种或多种另外的成分组成)相接触的步骤。该组合物通常是通过将活性化合物与液体和/或分割得很细的固体载体均匀混合到一起,其后如果需要的话将该产品成形来进行制备的。因此,例如,片剂可以通过将化合物的粉末或颗粒(在适宜的情况中还包含一种或多种另外的成分)压制或模制来进行制备。压制片可以通过将自由流动形式,如,例如粉末或颗粒形式的化合物(在适宜的情况中其可混有粘合剂、助流剂、惰性稀释剂和/或一种(多种)表面活性剂/分散剂)在适宜的机器中进行压片来进行制备。模制片可以通过将粉末形式并用惰性液体稀释剂润湿的化合物在适宜的机器中进行模制来进行制备。

适于经口(舌下)施用的药物组合物包括包含式(I)、(II)或(III)的化合物和矫味剂(通常为蔗糖)以及阿拉伯胶或黄蓍胶的片剂以及在惰性基质如明胶和甘油或蔗糖和阿拉伯胶中包含所说化合物的软锭剂。

适于胃肠外施用的适宜药物组合物可包括式(I)、(II)或(III)的化合物无菌的水性制剂,其可与所用的领受者的血液等渗。这些制剂可被静脉内施用,但是也可以通过皮下、肌肉或真皮内注射来进行施用。这些制剂可通过将所说的化合物与水进行混合并使所得溶液无菌和与血液等渗来进行制备的。本发明可注射的组合物通常包含 0.1 至 5% 重量的活性化合物。

适于直肠施用的药物组合物可为单剂量栓剂的形式。这些制剂可通过将式(I)的化合物与一种或多种常规固体载体,例如可可豆脂进行混合并将所得的混合物成形来进行制备。

适于局部应用于皮肤上的药物组合物可为软膏、乳膏、洗剂、糊剂、喷雾、气雾剂或油状物的形式。适宜的载体例如矿脂、羊毛脂、聚乙二醇、醇类以及两种或多种这些物质的组合。该活性化合物的存在浓度通常为所说组合物的约 0.1 至 15% 重量,例如约 0.5 至 2%。

还可以进行经皮施用。适于经皮应用的药物组合物可以为适于长期与患者的表皮接触的单硬膏剂形式。该类硬膏剂适宜地包含被溶解和/或分散

于胶粘剂中或被分散于聚合物中的位于适当地被缓冲的水溶液中的活性成分。适宜的活性成分浓度为约 1% 至 35% 重量, 或约 3% 至 15%。活性化合物可以, 如例如, *Pharmaceutical Research*, 2(6): 318(1986)中所述的那样通过电转运或离子电渗疗法进行释放。

为了试验 PPAR γ (罗格列酮)或 PPAR α (式(I)、(II)和(III)的化合物)的特异性激活对 CHF 改善的作用, 使用了慢性冠状动脉结扎的大鼠模型, 因为心肌梗塞是工业化国家引起 CHF 的最为常见的原因。

本文显示 PPAR α 的激活对充血性心力衰竭是有益的。关于心肌功能, 收缩期与舒张期的 LV 功能——以及因此影响的心输出量在接受式(I)、(II)或(III)化合物而非 PPAR γ 活化剂治疗后得到改善。

PPAR α 的激活亦改善了肺部充血, 可由右室和肺重量(较低的肺重量可作为较好心脏功能的指标, 较高的肺重量表明肺充血, 其经常由降低的心脏功能(即充血)引起)正常化得到证明。

在前面的研究中已报道了 PPAR γ 和 PPAR α 的激活在体外降低了心肌肥大, 减少了在盐皮质激素依赖性高血压中的纤维化, 并限制了急性缺血再灌注模型的心肌梗塞面积(参看上文)。因此无法预期这两种 PPAR 亚型的活化在心肌梗塞后心衰中起相反作用。这种不同的发现其原因之一可能是两种 PPAR 亚型的组织特异性的差异表达。

缩写和首字母缩略词:

CHF = 充血性心力衰竭

LV = 左心室/心室

MI = 心肌梗塞

PPAR = 过氧化物酶体增殖物激活受体

SEM = 均值标准误

实施例 1: 使用式(I)化合物治疗充血性心力衰竭概念研究的证据

雄性 Wistar 大鼠每笼 3 只地进行饲养, 每只笼子均在温度、湿度和光照的标准化条件下。大鼠可自由取食标准化饲料(钠含量 0.2%, Altromin, Lage, 德国)和饮用水。慢性心衰的诱导是通过左冠状动脉距主动脉起端约

2mm 远端的永久性闭塞导致游离左心室壁大面积梗塞实现的。慢性治疗在心肌梗塞产生后的当天开始并持续 8 周。

在治疗期结束时, 心脏功能用离体工作心脏标本(改装的 Langendorff 仪, 参照 Linz 等人, J. Ren. Angiotensin Aldosterone Syst., 2003)进行测定: 照 Langendorff 法进行心脏灌注, 用充氧的(95% O₂, 5% CO₂)以下组成的非循环 Krebs-Henseleit 液(mmol/L): NaCl, 118; KCl, 4.7; CaCl₂, 2.5; MgSO₄, 1.6; NaHCO₃, 24.9; KH₂PO₄, 1.2; 葡萄糖, 5.5; 丙酮酸钠, 2.0。左心房由左心耳的切口插管。在 60mmHg 固定灌流压的 15min 平衡期后, 心脏在 11mmHg 固定的充盈压时切换到工作模式。之后, 后负荷压以两分钟的间隔逐步从 40mm Hg 升至 140mmHg。表中数据是代表性的, 并约定恒定后负荷压为 80mm Hg。流量和压力信号在 500Hz 下进行采样, 平均每 2 秒钟一次。心输出量测定心脏泵至全身的血液的全部容量。LV dP/dtmax 是心肌收缩力的指标, 即, 心脏产生力的能力; LV dP/dtmin 是心脏松弛能力的指标。另外, 肺重量是测量肺充血的指标, 肺充血是 CHF 的间接指征。

在心肌梗塞后的当天开始用式(I)化合物进行治疗(压在饲料中, 剂量为 20 mg/kg/d)。单纯的 PPAR γ 激动剂罗格列酮在另一组中用作对照(3 mg/kg/天, 加入饲料中)。

用式(I)的 PPAR α 活化剂的慢性治疗改善了心力衰竭的不同方面, 而 PPAR γ (使用罗格列酮)的活化则不能。所有这些数据提供了式(I)化合物在治疗充血性心力衰竭中具有有益作用的强有力原理。

表 1:

试验条件	肺重量	心输出量	LV dP/dtmax	LV dP/dtmin
	克	mL/min	mmHg/s	mmHg/s
Sham (无 MI,未治疗)	1.88 ± 0.10*	37.3 ± 3.5*	5780 ± 191*	3527 ± 217*
MI 安慰剂	2.96 ± 0.40	18.9 ± 2.9	3748 ± 176	2119 ± 75
MI 罗格列酮 3 mg/kg/d	3.67 ± 0.38*	10.2 ± 3.8*	3491 ± 147	2081 ± 65
MI 化合物 (I) 20 mg/kg/d	1.62 ± 0.06*	25.8 ± 4.3*	4614 ± 253*	2502 ± 77*

数据用均值 ± 均值标准误表示。 每组 N=6-12。 *, p<0.05 与安慰剂比较。心输出量, LV dP/dtmax 和 LV dP/dtmin 是在 80 mmHg (工作心脏) 的后负荷下测量的。

实施例 2: 慢性心肌梗塞的剂量响应

雄性 Sprague Dawley 大鼠用左冠状动脉慢性结扎进行预处理, 以便造成心肌缺血(MI)以及后续的心衰的发生。用式(I)化合物(压在饲料中, 产生不同的日剂量)在心肌缺血后的当天开始治疗。治疗 8 周后, 将动物处死, 称肺的重量, 以工作心脏的模式以实施例 1 中所述的相同方式(参见上文)分析离体心脏的功能。该方法可评价心肌功能的不同方面。为了与在当前试验系列中已建立的治疗原则的作用进行对比, 另外一组使用了已知的在 CHF 的治疗中有活性的 ACE/NEP 双重抑制剂或血管肽酶抑制剂 (7-(2-乙酰硫基-3-甲基-丁酰氨基)-6-氧代-1,2,3,4,6,7,8,12b-八氢-苯并[c]吡啶并[1,2-a]氮杂革-4-甲酸, 国际专利申请号 WO 02/083671)。

用式(I)化合物慢性治疗改善了心衰的不同方面。同时, 这些数据证实了式(I)化合物在充血性心衰中的有益作用。

表 2:

试验条件	肺重量 g/100g BW	心输出量 mL/min	LV dP/dtmax Mm Hg/s	LV dP/dtmin mm Hg/s
Sham (无 MI, 未治疗)	0.39 ± 0.01*	36.0 ± 2.7*	5807 ± 192*	2985 ± 109*
MI 安慰剂	0.71 ± 0.07	7.3 ± 1.8	3170 ± 247	2056 ± 138
MI 化合物 (I) 1 mg/kg/d	0.80 ± 0.08	12.5 ± 3.3	3280 ± 250	1886 ± 137
MI 化合物(I) 3 mg/kg/d	0.54 ± 0.08 *	21.5 ± 5.4*	3665 ± 166*	2353 ± 77*
MI 化合物(I) 10 mg/kg/d	0.54 ± 0.09*	21.0 ± 4.0*	4043 ± 256*	2339 ± 111*
MI VPI 30 mg/kg/d	0.56 ± 0.07*	27.2 ± 3.5*	3868 ± 172*	2379 ± 120*

数据用均值 ± 均值标准误表示。每组 N=6-12。*, p<0.05 与安慰剂比较。心输出量, LV dP/dtmax 和 LV dP/dtmin 是在 80 mmHg (工作心脏)的后负荷下测量的。

例 3: 式(I)化合物的激动剂有效性

式(I)化合物的激动剂活性按照 WO 03/020269 以如下方法进行测定: 为了分析与人体 PPAR α 结合并以激动剂的方式激活它的物质的有效性, 使用被称为“PPAR α 报道细胞系”的稳定转染的 HEK 细胞系(HEK=人胚胎肾)。

在如下所述的为期 3 天的试验中确定了 PPAR α 激动剂的活性:

第 1 天: 将 PPAR α 报道细胞系在混有下列添加物的 DMEM 培养基 (Life Technology) 中培养至 80 % 的融合率: 10 % cs-FCS (胎牛血清, Hyclone)、抗生素(0.5mg/ml zeocin [Invitrogen]、0.5mg/ml G418 (Life Technology)、1 % 青霉素-链霉素溶液[Life Technology])和 2 mM L-谷酰胺 (Life Technology)。所说的培养是在标准细胞培养瓶(Becton Dickinson)中

在细胞培养恒温箱中在 37℃ 下、在存在 5 % CO₂ 的情况下进行的。将该 80 % 融合的细胞用 30 ml PBS (Life Technology) 洗涤一次, 用 2ml 胰蛋白酶溶液(Life Technology)在 37℃ 下处理 2 分钟, 吸收于 5 ml 上述的培养基中并在细胞计数器中对其进行计数。在稀释至 500000 个细胞/ml 后, 在每种情况下将 100000 个细胞接种到具有透明塑料底的 96 孔微量滴定板 (Corning Costar) 的各孔中。将这些板在细胞培养恒温箱中在 37℃ 和 5 % CO₂ 的条件下培养 24 小时。

第 2 天: 将进行试验的 PPAR α 激动剂以 10mM 的浓度溶解于 DMSO 中。将这种储备液用混有 5 % cs-FCS (Hyclone)、2mM L-谷酰胺(Life Technology)和之前所述的抗生素(zeocin、G418、青霉素和链霉素)的不含酚红的 DMEM 培养基 (Life Technology) 稀释。在 11 种不同浓度(10 μ M; 3.3 μ M; 1 μ M; 0.33 μ M; 0.1 μ M; 0.033 μ M; 0.01 μ M; 0.0033 μ M; 0.001 μ M; 0.00033 μ M 和 0.0001 μ M) 下对试验物质进行试验。在 1 μ M 至 10pM 或 100nM 至 1pM 的浓度范围内对效力较强的化合物进行试验。通过吸取完全除去在第 1 天接种的 PPAR α 报道细胞系中的培养基, 并立即向这些细胞中加入用培养基稀释的试验物质。试验物质的稀释和加入都是用自动装置(robot)(Beckman Biomek 2000)进行的。用培养基稀释的试验物质的终体积为 96 孔微量滴定板的每个孔 100 μ l。在所说试验中, DMSO 的浓度低于 0.1 % v/v 以避免该溶剂的细胞毒性作用。向各板中加入标准 PPAR α 激动剂(其同样被稀释成 11 种不同的浓度)以证明各板中所说的试验是有效的。将这些试验板在恒温箱中在 37℃ 和 5 % CO₂ 的条件下培养 24 小时。

第 3 天: 将用试验物质处理的 PPAR α 受体细胞从恒温箱中取出, -20℃ 冷冻 1h 以促进细胞溶解。在平板解冻后(在室温解冻至少 30min), 移取 50 μ l 的缓冲液 1 (Luc-Screen kit #LS1000, PE Biosystems Tropic) 至每个孔中, 将板转移至测量荧光的配置有移液单位(Luminoscan Ascent, LabSystems)的装置中。移取 50 μ l 的缓冲液 2(Luc-Screen kit #LS1000, PE Biosystems Tropic)至 96 孔板的每个孔启动在测量仪器中进行的萤光素酶反应。缓冲液加至每个孔是按照生产商(LabSystems)的说明书在确定、相

等的时间间隔下进行的。所有样品在加入缓冲液 2 后精确的 16min 后测量。每个样品测定时间为 10 秒。

化合物(II)和(III)的 PPAR α 激动剂活性和化合物(I)、(II)和(III)的 PPAR γ 激动剂活性以相似的方式测定。