

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 20000976 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 20000976

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
A61K 31/4985
A61K 31/395
A61P 15/00

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date 26.04.2000

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 26.04.2000

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 30.10.2000

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 14.06.2019

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

30.04.1999 US 132036P

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Lilly Icos LLC, 1209 Orange Street, Wilmington, DE 19801, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Emmick, Jeffrey, Plainfield, IN 46168, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
2 • Ferguson, Kenneth, Bothell, WA 98021, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
3 • Pullman, William, Carmel, IN 46032, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
4 • Whitaker, John, Woodinville, WA 98072, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Tuotteita

Produkter

Tuotteita

Keksinnön ala

Esillä oleva keksintö koskee voimakkaasti selektiivisiä fosfodiesteri-
raasi (PDE) -entsyymien inhibiittoreita ja niiden käyttöä farmaseutisissa val-
misteissa. Esillä oleva keksintö koskee erityisesti sykliselle guanosini-3',5'-mo-
nofosfaatille spesifisen fosfodiesteri-tyypin 5 (PDE5) voimakkaita inhibiitto-
reita, jotka farmaseuttiseen tuotteeseen sisällytettynä ovat käyttökelpoisia sek-
suaalisen toimintahäiriön hoidossa. Tässä kuvatuille valmisteille on tunnus-
omaista selektiivinen PDE5:n inhibiitio ja siten ne tarjoavat edun hoitoalueilla,
joilla toivotaan PDE5:n inhibitiota minimoiden tai eliminoiden muiden fosfo-
diesteri-entsyymien inhibition aiheuttamat haitalliset sivuvaikutukset.

Keksinnön tausta

Sykliselle guanosini-3',5'-monofosfaatille spesifisen fosfodiesteri-
raasin (cGMP-spesifisen PDE:n) inhibiittoreiden biokemialliset, fysiologiset ja klii-
niset vaikutukset viittaavat niiden käyttökelpoisuuteen erilaisissa sairaustilois-
sa, joissa toivotaan sileän lihaksen, munuaisten, hemostaattisen, inflammato-
risen ja/tai endokriinisen toiminnan modulaatiota. Tyyppiä 5 oleva cGMP-spe-
sifinen fosfodiesteri-tyyppi (PDE5) on tärkein cGMP:a hydrolysoiva entsyymi veri-
suonten sileässä lihaksessa, ja sitä on raportoitu esiintyvän peniksen paisu-
vaisessa [Taher *et al.*, J. Urol. 149 (1993) 285A]. PDE5 on siksi houkutteleva
kohde seksuaalisen toimintahäiriön hoidossa [Murray, DN&P 6(3) (1993) 150 -
156].

Farmaseuttinen tuote, joka tarjoaa käyttöön PDE5-inhibiittorin, on
nykyisin saatavissa ja sitä markkinoidaan tavaramerkillä VIAGRA®. VIAGRAn®
aktiivinen ainesosa on sildenafili. Tätä tuotetta myydään valmisteena, joka si-
sältää 25, 50 ja 100 mg:n sildenafili-tabletteja ja pakkauksessa olevan selos-
teen. Pakkauksessa olevassa selosteessa esitetään, että sildenafili on voi-
makkaampi inhibiittori PDE5:n kuin muiden tunnettujen fosfodiesteri-tyyppien
suhteen (yli 80 kertaa PDE1:n inhibiitio, yli 1 000 kertaa PDE2:n, PDE3:n ja
PDE4:n inhibiitio). Sildenafilin IC₅₀-arvon PDE5:tä vastaan on raportoitu olevan
3 nmol/l [Drugs of the Future 22(2) (1997) 128 - 143] ja 3,9 nmol/l [Boolell *et al.*,
Int. J. of Impotence Res. 8 (1996) 47 - 52]. Sildenafililla on kuvattu olevan
4 000-kertainen selektiivisyys PDE5:n suhteen PDE3:een verrattuna ja vain
10-kertainen selektiivisyys PDE5:n suhteen PDE6:een verrattuna. On esitetty
teoria, että värinäköön liittyvien poikkeavuuksien taustalla on sen PDE6-selek-
tiivisyyden suhteellinen puute.

Vaikka sildenafili on saavuttanut merkittävää kaupallista menestystä, se ei ole vastannut odotuksia merkittävien haitallisten sivuvaikutustensa vuoksi, mukaan luettuna kasvojen punoitus (esiintymistiheys 10 %). Haitalliset sivuvaikutukset rajoittavat sildenafilin käyttöä potilailla, jotka kärsivät näön poikkeavuuksista ja kohonneesta verenpaineesta ja, merkittävimmin, yksilöillä, jotka käyttävät orgaanisia nitraatteja [Welds *et al.*, Amer. J. of Cardiology 83 (5A) (1999) 21(C) - 28(C)].

Sildenafilin käytön orgaanisia nitraatteja nauttivilla potilailla otaksutaan aiheuttavan kliinisesti merkitsevän verenpaineen laskun, joka voisi olla vaarallinen potilaalle. Siten sildenafilipakkauksen etiketissä kielletään tiukasti tuotteen käyttö yhdessä orgaanisten nitraattien (esimerkiksi nitroglyseriinin, isosorbidimononitraatin, erytryylitranitraatin) ja muiden, missä tahansa muodossa olevien tyypidioksidinluovuttajien kanssa joko säännöllisesti tai ajoittain, koska sildenafili vahvistaa nitraattien hypotensiiviä vaikutuksia. Katso C. R. Conti *et al.*, Amer. J. of Cardiology 83 (5A) (1999) 29C - 34C. Niinpä, vaikka sildenafili onkin käytettävissä, on edelleen olemassa tarve löytää parannettuja farmaseuttisia tuotteita, jotka ovat käyttökelpoisia seksuaalisen toimintahäiriön hoidossa.

Esillä oleva keksintö tarjoaa käyttöön valmisteen, joka on tarkoitettu lääkekäyttöön ihmisillä ja käsittää pakkauksessa olevan selosteen, säiliön ja oraalisen annostelumuodon, joka käsittää selektiivistä PDE5-inhibiittoria yksikköannoksina noin 1 - 20 mg/annostelumuoto. Tämän keksinnön suotuisat vaikutukset on havaittu kliinisissä tutkimuksissa ja sen havainnon kautta, että seuraavat kriteerit täyttävä selektiivinen PDE5-inhibiittori mahdollistaa määrrien noin 1 - 20 mg/annostelumuoto tehokkaan oraalisen annon ilman PDE5-inhibiittorituotteidelle yleensä vaadittuja kontraindikaatioita, kuten näön poikkeavuuksia koskevia varoituksia. Esillä olevan keksinnön mukaisella selektiivisellä PDE5-inhibiittorilla on

1) vähintään 100-kertainen ero IC_{50} -arvoissa PDE5:n ja PDE6:n inhibition välillä jonkin määrätyn PDE5-inhibiittorin ollessa kyseessä (ts. PDE5:n vastainen IC_{50} -arvo on vähintään 100 kertaa pienempi kuin PDE6:n vastainen IC_{50} -arvo);

2) vähintään 1 000-kertainen ero IC_{50} -arvoissa PDE5:n ja PDE1c:n inhibition välillä;

3) IC_{50} -arvo alle 10 nmol/l.

Merkittävää on, että kliiniset tutkimukset ovat myös paljastaneet, että voidaan saada aikaan tehokas tuote, jolla on pienennetty taipumus aiheuttaa punastumista siihen herkillä yksilöillä. Mitä odottamattomimmin tuotetta voidaan antaa myös johtaen kliinisesti merkityksettömiin PDE5-inhibiittorin ja orgaanisen nitraatin yhteisvaikutuksiin liittyviin sivuvaikutuksiin. Siten kontraindikaatio, jonka on uskottu olevan välttämätön PDE5-inhibiittoria sisältävän tuotteen kohdalla, on tarpeeton käytettäessä edellä määritellyn kaltaista selektiivistä PDE5-inhibiittoria tässä esitettävällä tavalla. Esillä oleva keksintö tarjoaa siten käyttöön seksuaalisen toimintahäiriön tehokkaan hoidon yksilöillä, joita ei aiemmin ole voitu hoitaa tai jotka ovat kärsineet hyväksyttävää voimakkaamista sivuvaikutuksista, mukaan luettuina yksilöt, joilla on sydän-verisuonisairaus, kuten yksilöt, jotka tarvitsevat nitraattihoitoa, joilla on ollut sydäninfarkti yli kolme kuukautta ennen seksuaalisen toimintahäiriön hoitamisen aloittamista ja joilla on New York Heart Associationin (NYHA) määritelmän mukainen luokan 1 kongestiivinen sydänvika, tai näön poikkeavuuksista kärsivät yksilöt.

Keksinnön yhteenveto

Esillä oleva keksintö tarjoaa käyttöön valmisteeseen, joka on tarkoitettu lääkekäyttöön ihmisillä ja käsittää pakkauksessa olevan selosteen, säiliön ja oraalisen annostelumuodon, joka käsittää noin 1 - 20 mg selektiivistä PDE5-inhibiittoria annostelumuotoa kohden.

Esillä oleva keksintö tarjoaa lisäksi käyttöön menetelmän sellaisten tilojen hoitamiseksi, joiden yhteydessä toivotaan PDE5:n inhibitiota, joka menetelmä käsittää noin 1 - noin 20 mg selektiivistä PDE5-inhibiittoria sisältävän oraalisen annostelumuodon antamisen sen tarpeessa olevalle potilaalle tarvittaessa kokonaisannoksen ollessa korkeintaan 20 mg/vuorokausi. Keksintö tarjoaa lisäksi käyttöön selektiivistä PDE5-inhibiittoria annoksena noin 1 - noin 20 mg käsittävän oraalisen annostelumuodon käytön seksuaalisen toimintahäiriön hoitamiseksi.

Erityisiin tiloihin, joita voidaan hoitaa esillä olevan keksinnön mukaisella menetelmällä ja valmisteella, kuuluvat, mainittuihin kuitenkin rajoittumatta, miehen erektiohäiriö ja naisen seksuaalinen toimintahäiriö, jota kutsutaan myös naisen seksuaalikiinnostumishäiriöksi.

Esillä oleva keksintö tarjoaa tarkemmin määriteltynä käyttöön valmisteeseen, joka on tarkoitettu lääkekäyttöön ihmisillä ja käsittää

(a) oraalisen annostelumuodon, joka käsittää noin 1 - noin 20 mg selektiivistä PDE5-inhibiittoria, jolla on

(i) vähintään 100-kertainen ero IC_{50} -arvoissa PDE5:n ja PDE6:n inhibition välillä,

(ii) vähintään 1 000-kertainen ero IC_{50} -arvoissa PDE5:n ja PDE1c:n inhibition välillä,

5 (iii) IC_{50} -arvo alle 10 nmol/l ja

(iv) riittävä hyötyosuus ollakseen vaikuttava oraalisina yksikköannoksina noin 1 - noin 20 mg;

(b) pakkauksessa olevan selosteen, jossa esitetään, että kyseinen PDE5-inhibiittori on käyttökelpoinen seksuaalisen toimintahäiriön hoitoon sen
10 tarpeessa olevalla potilaalla ja että orgaanisten nitraattien antoon liittyvät kielot eivät koske sitä;

(c) säiliön.

Esillä oleva keksintö tarjoaa lisäksi käyttöön valmisteen, joka on tarkoitettu lääkekäyttöön ihmisillä ja käsittää

15 (a) oraalisen annostelumuodon, joka käsittää noin 1 - noin 20 mg selektiivistä PDE5-inhibiittoria, jolla on

(i) vähintään 100-kertainen ero IC_{50} -arvoissa PDE5:n ja PDE6:n inhibition välillä,

20 (ii) vähintään 1 000-kertainen ero IC_{50} -arvoissa PDE5:n ja PDE1c:n inhibition välillä,

(iii) IC_{50} -arvo alle 10 nmol/l ja

(iv) riittävä hyötyosuus ollakseen vaikuttava oraalisina yksikköannoksina noin 1 - noin 20 mg;

25 (b) pakkauksessa olevan selosteen, jossa esitetään, että kyseinen PDE5-inhibiittori on käyttökelpoinen seksuaalisen toimintahäiriön hoitoon potilaalla, joka on sen tarpeessa ja käyttää orgaanista nitraattia;

(c) säiliön.

Esillä oleva keksintö tarjoaa myös käyttöön valmisteen, joka on tarkoitettu lääkekäyttöön ihmisillä ja käsittää

30 (a) oraalisen annostelumuodon, joka käsittää noin 1 - noin 20 mg selektiivistä PDE5-inhibiittoria, jolla on

(i) vähintään 100-kertainen ero IC_{50} -arvoissa PDE5:n ja PDE6:n inhibition välillä,

35 (ii) vähintään 1 000-kertainen ero IC_{50} -arvoissa PDE5:n ja PDE1c:n inhibition välillä,

(iii) IC_{50} -arvo alle 10 nmol/l ja

(iv) riittävä hyötyosuus ollakseen vaikuttava oraalisina yksikköannoksina noin 1 - noin 20 mg;

(b) pakkauksessa olevan selosteen, jossa esitetään, että kyseinen PDE5-inhibiittori on käyttökelpoinen seksuaalisen toimintahäiriön hoitoon potilaalla, joka on sen tarpeessa ja potee tilaa, joka valitaan verkkokalvosairauden, punastumisalttiuden, näön poikkeavuusalttiuden, luokan 1 kongestiivisen sydämvian, vähintään 90 päivää ennen seksuaalisen toimintahäiriön hoidon aloittamista tapahtuneen sydäninfarktin ja niiden yhdistelmien joukosta;

(c) säiliön.

10 Yksityiskohtainen selitys

Tässä esitetyn ja kuvatun esillä olevan keksinnön tarkoituksiin määritellään seuraavat termit ja lyhenteet seuraavasti.

Termi "säiliö" tarkoittaa mitä tahansa astiaa ja sille tarkoitettua sulkemisvälinettä, jotka soveltuvat farmaseuttisen tuotteen varastointiin, kuljettamiseen, jakeluun ja/tai käsittelyyn.

Termillä " IC_{50} " mitataan yhdisteen voimakkuutta jonkin määrätyn PDE-entsyymin (esimerkiksi PDE1c:n, PDE5:n tai PDE6:n) inhiboinnissa. IC_{50} on yhdistepitoisuus, joka johtaa entsyymin 50-prosenttiseen inhibitioon yhdessä annos-vastekokeessa. Yhdisteen IC_{50} -arvon määrittäminen on helppo tehdä tunnetuilla *in vitro* -menetelmillä, joita kuvataan yleisesti julkaisussa Y. Cheng *et al.*, Biochem. Pharmacol. 22 (1973) 3099 - 3108.

Termi "pakkauksessa oleva seloste" tarkoittaa tuotteen mukana olevaa informaatiota, joka tarjoaa kuvauksen siitä, miten tuotetta annetaan, yhdessä turvallisuus- ja tehotietojen kanssa, joita tarvitaan antamaan lääkärille, apteekkihenkilökunnalle ja potilaalle mahdollisuus tietoon perustuvaan tuotteen käyttöä koskevaan päätökseen. Pakkauksessa olevan selosteen katsotaan yleensä olevan "etiketti" farmaseuttisen tuotteen ollessa kyseessä.

Termiä "oraalinen annostelumuoto" käytetään yleisessä mielessä viittaamaan suun kautta annettaviin farmaseuttisiin tuotteisiin. Ammattimiehet tietävät, että oraalisiin annostelumuotoihin kuuluvat sellaiset muodot kuin nesteformulaatiot, tabletit, kapselit ja geelikapselit.

Termi "selektiivinen PDE5-inhibiittori" määritellään PDE5-inhibiittoriksi, jonka

1) IC_{50} -arvo PDE5:n inhibitiolle on vähintään 100 kertaa pienempi kuin IC_{50} -arvo PDE6:n inhibitiolle;

2) IC_{50} -arvo PDE5:n inhibitiolle on vähintään 1 000 kertaa pienempi kuin IC_{50} -arvo PDE1c:n inhibitiolle;

3) IC_{50} -arvo PDE5:n inhibitiolle on pienempi kuin 10 nmol/l.

Selektiivisten PDE5-inhibiittoreiden kemiallinen rakenne vaihtelee merkittävästi, eikä niiden käyttö esillä olevassa keksinnössä riipu kemiallisesta rakenteesta vaan ennemminkin tässä esitetyistä selektiivisyys- ja voimakkuusparametreistä.

Termi "näön poikkeavuudet" tarkoittaa epänormaalia näkemistä, jolle on tunnusomaista näkeminen sinisenä-vihreänä, jonka otaksutaan aiheutuvan PDE6:n inhibitiosta.

Termi "punastuminen" tarkoittaa kasvojen ja kaulan ohimenevää punaisuutta, joka johtuu lääkkeen nauttimisen aiheuttamasta vasodilataatiosta ja johon tavallisesti liittyy lämmön tunne kasvoilla ja kaulalla ja joskus hikoilu.

Termi "vapaa lääke" tarkoittaa kiinteitä lääkehiukkasia, joita ei ole tiiviisti upotettu polymeeriseen keraaostumaan.

Kuten edellä mainittiin, esillä oleva keksintö koskee valmistetta, joka on tarkoitettu lääkekäyttöön ihmisillä ja käsittää pakkauksessa olevan selosteen, säiliön ja annostelumuodon, joka käsittää noin 1 - 20 mg selektiivistä PDE5-inhibiittoria yksikköannostelumuotoa kohden. Esillä olevassa keksinnössä käyttökelpoinen selektiivinen PDE5-inhibiittori on PDE5-inhibiittori, jolla on

1) vähintään 100-kertainen ero IC_{50} -arvoissa PDE5:n ja PDE6:n inhibition välillä,

2) vähintään 1 000-kertainen ero IC_{50} -arvoissa PDE5:n ja PDE1c:n inhibition välillä,

3) IC_{50} -arvo alle 10 nmol/l ja jonka hyötyosuus on riittävä, jotta inhibiittori on vaikuttava yksikköannoksina noin 1 - noin 20 mg.

Ero ilmaistaan IC_{50} -arvojen PDE6/PDE5-suhteena, ts. PDE6:n vastaisen IC_{50} -arvon suhde PDE5:n vastaiseen IC_{50} -arvoon (PDE6/PDE5) on yli 100, edullisemmin yli 300 ja edullisimmin yli 500.

Vastaavasti PDE1c:n vastaisen IC_{50} -arvon suhde PDE5:n vastaiseen IC_{50} -arvoon (PDE1c/PDE5) on yli 1 000. Edullisilla PDE5-inhibiittoreilla ero PDE5:n ja PDE1c:n inhibition välillä on yli 3 000-kertainen, ero PDE5:n ja PDE1C:n vastaisten IC_{50} -arvojen välillä on edullisemmin yli 5 000-kertainen. Inhibiittorin voimakkuus, jota edustaa PDE5:n vastainen IC_{50} -arvo, on alle

10 nmol/l, edullisesti alle 5 nmol/l, edullisemmin alle 2 nmol/l ja edullisimmin alle 1 nmol/l.

Pakkauksessa oleva seloste tarjoaa kuvauksen siitä, miten tuotetta annetaan, yhdessä turvallisuus- ja tehotietojen kanssa, joita tarvitaan antamaan lääkärielle, apteekkihenkilökunnalle ja potilaalle mahdollisuus tietoon perustuvaan tuotteen käyttöä koskevaan päätökseen. Pakkauksessa olevan selosteen katsotaan yleensä olevan farmaseuttisen tuotteen etiketti. Esillä olevaan valmisteeseen sisällytetty pakkauksessa oleva seloste tuo esiin, että kyseinen selektiivinen PDE5-inhibiittori on käyttökelpoinen sellaisten tilojen hoidossa, joiden yhteydessä toivotaan PDE5:n inhibitiota. Pakkauksessa oleva seloste antaa myös ohjeet antaa yksi tai useampi noin 1 - noin 20 mg:n yksikköannostelumuoto tarvittaessa kokonaisannoksen ollessa korkeintaan 20 mg/vuorokausi. Annettava annos on edullisesti noin 5 - noin 20 mg/vuorokausi, edullisemmin noin 5 - noin 15 mg ja edullisimmin noin 5 mg:n tai noin 10 mg:n annostelumuoto tarvittaessa kerran vuorokaudessa.

Edullisiin hoidettaviin tiloihin kuuluvat seksuaalinen toimintahäiriö [mukaan luettuina miehen erektiohäiriö ja naisen seksuaalinen toimintahäiriö, edullisemmin naisen seksuaalikiihottumishäiriö (FAD; female arousal disorder)]. Edullinen hoidettava tila on miehen erektiohäiriö.

Merkittävää on, että pakkauksessa oleva seloste tukee tuotteen käyttöä seksuaalisen toimintahäiriön hoitamiseen potilailla, jotka potevat verkkokalvosairautta, esimerkiksi diabetekseen liittyvää retinopatiaa tai *retinitis pigmentosaa*, tai orgaanisia nitraatteja käyttävillä potilailla. Pakkauksessa oleva seloste ei siten edullisesti sisällä kieltoja, jotka liittyvät näihin tiloihin ja erityisesti annostelumuodon antoon orgaanisen nitraatin ohella. Pakkauksessa oleva seloste ei edullisemmin sisällä myöskään verkkokalvosairauksiin, erityisesti *retinitis pigmentosaan*, eikä näön poikkeavuuksiin alttiisiin yksilöihin liittyviä varoituksia eikä kieltoja. Pakkauksessa olevassa selosteessa ilmoitetaan edullisesti myös, että punastumisen esiintymistiheys on alle 2 %, edullisesti alle 1 % ja edullisimmin alle 0,5 % potilaista, joille on annettu kyseistä annostelumuotoa. Punastumisen esiintymistiheys osoittaa merkittävää parannusta tekniikan tasoa vastaaviin PDE5-inhibiittoria sisältäviin farmaseuttisiin tuotteisiin nähden.

Esillä olevassa valmisteessa käytettävä säiliö on lääkealalla tavanomainen. Säiliö on yleensä kuplapakkaus, foliopaketti, lasi- tai muovipullo ja siihen liittyvä tulppa tai sulkemismuovikork tai muu potilaan tai apteekkihenkilökun-

nan käytettäväksi sopiva mainitunlainen tuote. Säiliö mitoitetaan edullisesti siten, että siihen mahtuu 1 - 1 000 kiinteää annostelumuotoa, edullisesti 1 - 500 kiinteää annostelumuotoa ja edullisimmin 5 - 30 kiinteää annostelumuotoa.

- 5 Ammattimiehet tietävät, että oraalisiin annostelumuotoihin kuuluvat esimerkiksi sellaiset muodot kuin nesteformulaatit, tabletit, kapselit ja geelikapselit. Annostelumuodot ovat edullisesti kiinteitä annostelumuotoja, erityisesti tabletteja, jotka käsittävät noin 1 - noin 20 mg selektiivistä PDE5-inhibiittoria. Mitkä tahansa oraaliseen käyttöön tarkoitetut farmaseuttisesti hyväksyttävät täyteaineet soveltuvat mainitunlaisten annostelumuotojen valmistukseen. Soveltuviin farmaseuttisiin annostelumuotoihin kuuluvat kersaostumamuodot, joita kuvaa esimerkiksi Butler US-patenttijulkaisussa 5 985 326, johon tässä viitataan. Edullisissa suoritusmuodoissa esillä olevan keksinnön mukainen yksikköannostelumuoto on kiinteä tuote, joka ei sisällä PDE5-inhibiittorin
- 10 kersaostumamuotoa vaan kiinteää PDE5-inhibiittoria vapaana lääkkeenä.

- Tabletit käsittävät edullisesti yleisesti turvallisina pidettyjä farmaseuttisia täyteaineita, kuten laktoosia, mikrokiteistä selluloosaa, tärkkelystä, kalsiumkarbonaattia, magnesiumstearaattia, steariinihappoa, talkkia ja kolloidista piidioksidia, ja niitä valmistetaan tavanomaisin lääkkeidenvalmistusmenetelmin, jollaisia kuvataan teoksessa Remington's Pharmaceutical Sciences, 18. p., Mack Publishing Co., Easton, PA 1990. Mainitunlaisiin menetelmiin kuuluvat esimerkiksi märkärakeistus, jota seuraa kuivaus, jauhatus ja puristaminen kalvopäällysteisiksi tai päällystämättömiksi tableteiksi; kuivarakeistus, jota seuraa jauhatus ja puristaminen kalvopäällysteisiksi tai päällystämättömiksi tableteiksi; kuivasekoitus, jota seuraa puristaminen kalvopäällysteisiksi tai päällystämättömiksi tableteiksi; muottivaletut tabletit; märkärakeistus, kuivaus ja pakkaaminen gelatiinikapseleihin; gelatiinikapseleihin pakattu kuiva seos tai gelatiinikapseleihin pakattu suspensio ja liuos. Kiinteissä annostelumuodoissa on yleensä tunnistusmerkkejä, jotka on kohokuvioitu tai painettu
- 20
- 25
- 30

- Esillä oleva keksintö perustuu yksityiskohtaisiin kokeisiin ja kliinisiin tutkimuksiin ja niihin odottamattomiin havaintoihin, että sivuvaikutuksia, joiden aiemmin on uskottu olevan osoitus PDE5:n inhibitiosta, voidaan vähentää kliinisesti merkityksettömälle tasolle valitsemalla selektiivinen PDE5-inhibiittori, jolla on tässä esitettävät erityisominaisuudet, nimittäin
- 35

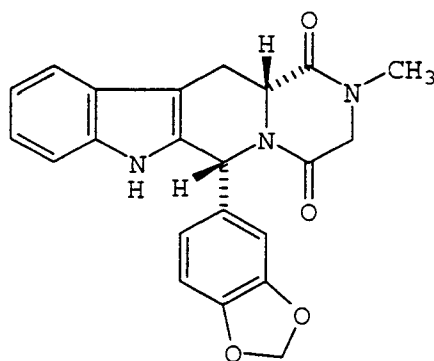
1) vähintään 100-kertainen ero IC_{50} -arvoissa PDE5:n ja PDE6:n inhibition välillä;

2) vähintään 1 000-kertainen ero IC_{50} -arvoissa PDE5:n ja PDE1c:n inhibition välillä;

5 3) IC_{50} -arvo alle 10 nmol/l PDE5:n inhibition ollessa kyseessä.

Tämä odottamaton havainto antoi mahdollisuuden kehittää valmisteita, jotka sisältävät selektiivistä PDE5-inhibiittoria noin 1 - noin 20 mg:n annostelumuo-
doissa, jotka oraalisesti annettuina minimoivat epätoivottavat sivuvaikutukset, joiden on aiemmin uskottu olevan väistämättömiä. Näihin sivuvaikutuksiin kuu-
10 luvat kasvojen punoitus, näön poikkeavuudet ja merkittävä verenpaineen lasku annettaessa PDE5-inhibiittoria yksinään tai yhdessä orgaanisen nitraatin kans-
sa. Esillä olevan, noin 1 - noin 20 mg:n annostelumuotoina annetun PDE5-
inhibiittorin hyvin vähäinen vaikutus PDE6:een mahdollistaa selektiivisen PDE5-
inhibiittorin antamisen myös potilaille, jotka potevat verkkokalvosairautta, kuten
15 diabetekseen liittyvää retinopatiaa tai *retinitis pigmentosaa*.

Yksi mainitunlainen selektiivinen PDE5-inhibiittori, ts. (6R-trans)-6-(1,3-
bentsodioksol-5-yyli)-2,3,6,7,12,12a-heksahydro-2-metyylipyratsino[1',2':1,6]-
pyrido[3,4-b]indoli-1,4-dioni, jonka vaihtoehtoinen nimi on (6R,12aR)-2,3,6,7,-
12,12a-heksahydro-2-metyyli-6-(3,4-metyleenidioksifenyyli)pyratsino[2',1':6,1]-
20 pyrido[3,4-b]indoli-1,4-dioni, esitetään Dauganin US-patenttijulkaisussa 5 859 006,
ja sitä edustaa rakennekaava I:



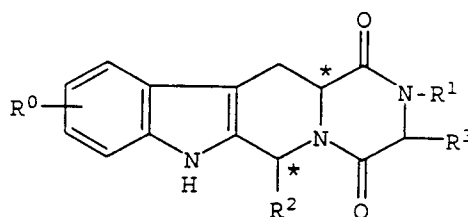
(I)

Ihmisillä tehdyissä kliinisissä tutkimuksissa on osoitettu, että kaavan I mukai-
sella yhdisteellä on hyvin pieni vaikutus systoliseen verenpaineeseen annettu-
35 na orgaanisten nitraattien yhteydessä. Sen sijaan sildenafililla, yhdessä nit-
raattien kanssa annettuna, esiintyy jopa neljä kertaa suurempi systolisen ve-

renpaineen lasku kuin plasebolla, mikä johtaa VIAGRAN[®] pakkauksessa olevassa selosteessa oleviin kontraindikaatioihin ja varoituksiin tietyille potilaille.

Selektiivisten PDE5-inhibiittoreiden kemiallinen rakenne vaihtelee merkittävästi, eikä esillä olevan keksinnön yhteydessä määritellyn selektiivisen PDE5-inhibiittorin käyttö riipu mistään määrätystä kemiallisesta rakenteesta vaan tässä esitetyistä kriittisistä parametreista. Edullisia yhdisteitä, joilla on vaadittu voimakkuus ja selektiivisyys, voidaan kuitenkin helposti identifioida tässä kuvatuin testein yhdisteiden joukosta, joita kuvataan US-patenttijulkaisussa 5 859 006 (Daugan), US-patenttijulkaisussa 5 981 527 (Daugan *et al.*) ja US-patenttijulkaisussa 6 001 847 (Daugan *et al.*), joista kuhunkin viitataan tässä.

US-patenttijulkaisun 5 859 006 (Daugan) ja US-patenttijulkaisun 5 981 527 (Daugan *et al.*) mukaisia edullisia yhdisteitä edustavat rakennekaava II:

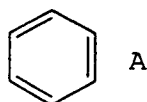


jossa

R^0 valitaan vedyn, halogeenin ja C_{1-6} -alkyylin joukosta;

R^1 valitaan seuraavien joukosta: vety, C_{1-6} -alkyyli, C_{2-6} -alkenylyli, C_{2-6} -alkynylyli, halogeeni- C_{1-6} -alkyyli, C_{3-8} -sykloalkyyli, C_{3-8} -sykloalkyyli- C_{1-3} -alkyyli, aryyli- C_{1-3} -alkyyli, jossa aryyli on fenyyli tai fenyyli, joka on substituoitu 1 - 3 substituentilla, jotka on valittu halogeenin, C_{1-6} -alkyylin, C_{1-6} -alkoksyylin, metyleenidioksin ja niiden seosten joukosta, ja heteroaryyli- C_{1-3} -alkyyli, jossa heteroaryyli on tienyyli, furyyli tai pyridyyli, joista kukin on mahdollisesti substituoitu 1 - 3 substituentilla, jotka on valittu halogeenin, C_{1-6} -alkyylin, C_{1-6} -alkoksyylin ja niiden seosten joukosta;

R^2 edustaa mahdollisesti substituoitua monosyklistä aromaattista rengasta, joka on valittu bentseenin, tiofeenin, furaanin ja pyridiinin joukosta, tai mahdollisesti substituoitua bisyklistä rengasta,

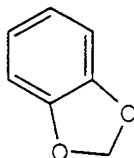


joka on liittynyt loppuosaan molekyyliä bentseenirenkaan yhden hiiliatomin kautta ja jossa fuusioitunut rengas A on 5- tai 6-jäseninen rengas, joka on tyydyttynyt tai osittain tai täysin tyydyttymätön ja käsittää hiiliatomeja ja mahdollisesti 1 tai 2 heteroatomia, jotka on valittu hapen, rikin ja typen joukosta;

- 5 R^3 edustaa vetyä tai C_{1-3} -alkyyliä tai R^1 ja R^3 edustavat yhdessä 3- tai 4-jäsenistä alkyyli- tai alkenyyliketjua; ja näiden yhdisteiden suolat ja solvaatit.

Muita edullisia yhdisteitä ovat ne, joilla on kaava II, jossa

- 10 R^0 on vety, halogeeni tai C_{1-6} -alkyyli;
 R^1 on vety tai C_{1-6} -alkyyli;
 R^2 on bisyklinen rengas,



joka voi olla mahdollisesti substituoitu yhdellä tai useammalla ryhmällä, jotka on valittu halogeenin ja C_{1-3} -alkyylin joukosta; ja

R^3 on vety tai C_{1-3} -alkyyli.

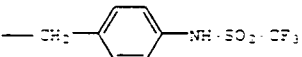
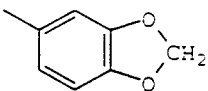
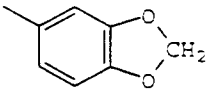
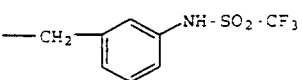
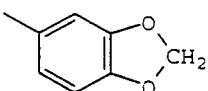
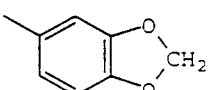
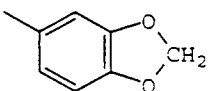
- 20 Seuraava taulukko 1 valaisee US-patenttijulkaisussa 5 859 006 esitettyjen selektiivisten PDE5-inhibiittoreiden edustajien IC_{50} -arvoja PDE5:n ja PDE6:n suhteen määritettyinä tässä kuvatuin menettelyin.

Taulukko 1

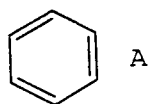
Yhdiste	PDE5 IC_{50} (nmol/l)	PDE6 IC_{50} (nmol/l)	PDE6/ PDE5
1	5	663	133
2	2	937	469
3	2	420	210
4	5	729	146
5	2,5	3 400	1 360

- 25 Taulukon 1 yhdisteellä 5 on rakennekaava I, ja lisäksi sen IC_{50} -arvo PDE1c:n suhteen on 10 000 ja suhde PDE1c/PDE5 4 000.

Taulukon 1 yhdisteiden 1 - 5 rakenteet vastaavat rakennekaavaa II, jossa R^0 , R^1 , R^2 ja R^3 ovat seuraavat:

Yhdiste	R ⁰	R ¹	R ²	R ³
1	H			H
2	H	CH ₃		H
3	H			H
4	H	H		CH ₃
5	H	CH ₃		H

Taulukossa 1 esitetyt tiedot osoittavat, että yhdiste, jolla on rakennekaava I, jossa R¹ on vety tai C₁₋₆-alkyyli, R² on



ja R³ on vety, on erityisen edullinen. A on edullisesti



Edullisia yhdisteitä ovat seuraavat:

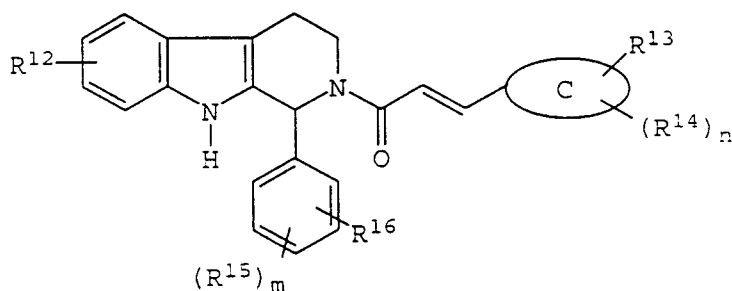
(6R,12aR)-2,3,6,7,12,12a-heksahydro-2-metyyli-6-(3,4-metyleenidioksifenyyli)-pyratsino[2',1':6,1]pyrido[3,4-b]indoli-1,4-dioni; ja

(3S, 6R,12aR)-2,3,6,7,12,12a-heksahydro-2,3-dimetyyli-6-(3,4-metyleenidioksi-fenyyli)pyratsino[2',1':6,1]pyrido[3,4-b]indoli-1,4-dioni;

ja niiden fysiologisesti hyväksyttävät suolat ja solvaatit (esimerkiksi hydraatit).

Muita esimerkkejä esillä olevan keksinnön yhteydessä käyttökelpoi-
5 sista yhdisteistä ovat ne, joita esitetään US-patenttijulkaisussa 6 001 847 (Daugan *et al.*) ja julkaisussa WO 97/43 287, joihin viitataan tässä.

Muita esimerkkejä yhdisteistä käytettäviksi esillä olevan keksinnön yhteydessä esitetään PCT-hakemuksessa PCT/EP98/06 050, jossa Yhdysval-
lat on nimetty ja jonka otsikko on "Chemical Compunds", keksijät A. Bombrun
10 ja F. Gellibert, jossa esitettyihin tietoihin viitataan tässä erityisesti. Tällä yhdis-
teryhmällä on rakennekaava III,



(III)

20 ja sen suolat ja solvaatit (esimerkiksi hydraatit), joissa

C edustaa 5- tai 6-jäsenistä heteroaryyliryhmää, joka sisältää vä-
hintään yhden heteroatomin, joka on valittu hapen, typen ja rikin joukosta;

R¹² edustaa vetyä tai halogeenia;

25 R¹³ valitaan seuraavien joukosta:

vety,

nitro (NO₂),

trifluorimetyyli,

trifluorimetoksyli,

30 halogeeni,

syaani (CN),

5- tai 6-jäseninen heterosyklinen ryhmä, joka sisältää vähintään yh-
den heteroatomin, joka on valittu hapen, typen ja rikin joukosta, ja on mahdol-
lisesti substituoitu C(=O)OR^a- tai C₁₋₄-alkyyli-ryhmällä,

35 C₁₋₆-alkyyli, joka on mahdollisesti substituoitu OR^b-ryhmällä,

C₁₋₃-alkoksyli,

- $C(=O)R^h$,
 $OC(=O)OR^h$,
 $C(=O)OR^h$,
 C_{1-4} -alkyleeni-Het,
5 C_{1-4} -alkyleeni- $C(=O)OR^h$,
 OC_{1-4} -alkyleeni- $C(=O)OR^h$,
 C_{1-4} -alkyleeni- OC_{1-4} -alkyleeni- $C(=O)OR^h$,
 $C(=O)NR^iSO_2R^i$,
 $C(=O)C_{1-4}$ -alkyleeni-Het,
10 C_{1-4} -alkyleeni- NR^hR^i ,
 C_{2-6} -alkenyleeni- NR^hR^i ,
 $C(=O)NR^hR^i$,
 $C(=O)NR^hR^i$,
 $C(=O)NR^hC_{1-4}$ -alkyleeni- OR^i ,
15 $C(=O)NR^hC_{1-4}$ -alkyleeni-Het,
 OR^i ,
 OC_{2-4} -alkyleeni- NR^hR^i ,
 OC_{1-4} -alkyleeni- $CH(OR^h)CH_2NR^hR^i$,
20 OC_{1-4} -alkyleeni-Het,
 OC_{2-4} -alkyleeni- OR^h ,
 OC_{2-4} -alkyleeni- $NR^hC(=O)OR^h$,
 NR^hR^i ,
 NR^hC_{1-4} -alkyleeni- NR^hR^i ,
25 $NR^hC(=O)R^i$,
 $NR^hC(=O)NR^hR^i$,
 $N(SO_2C_{1-4}\text{-alkyyli})_2$,
 $NR^h(SO_2C_{1-4}\text{-alkyyli})$,
 $SO_2NR^hR^i$ ja
30 OSO_2 -trifluorimetyyli;
 R^{14} valitaan seuraavien joukosta: vety, halogeeni, OR^h , C_{1-6} -alkyyli,
 NO_2 ja NR^hR^i ;
tai R^{13} ja R^{14} muodostavat yhdessä 5- tai 6-jäsenisen, mahdollisesti
vähintään yhden heteroatomin sisältävän renkaan 3- tai 4-jäsenisen alkyleeni-
tai alkenyleeniketjuko­ponentin;
35 R^{15} valitaan seuraavien joukosta: vety, halogeeni, NO_2 , trifluorime-
toksyyli, C_{1-6} -alkyyli, OC_{1-6} -alkyyli ja $C(=O)R^h$;

R^{16} on vety;

tai R^{15} ja R^{16} muodostavat yhdessä 5- tai 6-jäsenisen, mahdollisesti vähintään yhden heteroatomin sisältävän renkaan 3- tai 4-jäsenisen alkyleeni- tai alkenyleeniketjukomponentin;

- 5 Het edustaa 5- tai 6-jäsenistä heterosyklistä ryhmää, joka sisältää vähintään yhden heteroatomin, joka on valittu hapen, typen ja rikin joukosta, ja on mahdollisesti substituoitu C_{1-4} -alkyyllillä;

R^h ja R^i voivat olla samanlaisia tai erilaisia ja valitaan riippumattomasti vedyn C_{1-6} -alkyylin joukosta;

- 10 R^j edustaa fenyyliä tai C_{4-6} -sykloalkyyliä, jolloin fenyyli tai C_{4-6} -sykloalkyyli voi mahdollisesti olla substituoitu yhdellä tai useammalla halogeeniatomilla, yhdellä tai useammalla $C(=O)R^h$ -ryhmällä tai yhdellä tai useammalla OR^h -ryhmällä;

n on kokonaisluku 1, 2 tai 3;

- 15 m on kokonaisluku 1 tai 2.

Valmisteet

Humaani-PDE5-valmiste

- Humaani-PDE5:n rekombinanttivalmistus toteutettiin olennaisesti tavalla, jota kuvataan US-patenttijulkaisun 5 702 936 esimerkissä 7, johon tässä
20 viitataan, paitsi että käytetty hiivatransformaatiovektori, joka on johdettu V. Pricen *et al.* [Methods in Enzymology 1985 (1990) 308 - 315] kuvaamasta ADH2-perusplasmidista, sisälsi hiivan ADH2-promoottori- ja -terminaattorisekvenssit ADH1-promoottori- ja -terminaattorisekvenssien sijasta ja *Saccharomyces cerevisiae* -isäntä oli proteaasivajauksellinen kanta BJ2-54, joka on tallennettu 31. elokuuta 1998 the American Type Culture Collectioniin, Manassas, Virginia, saantinumeroilla ATCC 74465. Transformoituja isäntäsoluja kasvatettiin 2X SC-leu -alustassa, pH 6,2, joka sisälsi hivenmetalleja ja vitamiineja. 24 tunnin kuluttua lisättiin glyserolia sisältävää YEP-alustaa loppupitoisuudeksi 2x YEP / 3 % glyserolia. Solut otettiin talteen noin 24 tunnin kuluttua, pestiin ja
30 varastoitettiin lämpötilassa -70 °C.

- Solupelletit (29 g) sulatettiin jäiden päällä yhtä suuren tilavuuden kanssa lyysipuskuria (25 mmol/l Tris-Cl:a, pH 8, 5 mmol/l $MgCl_2$:a, 0,25 mmol/l ditiotreitolia, 1 mmol/l bentsamidiinia ja 10 μ mol/l $ZnSO_4$:a). Solut hajotettiin N_2 :ä sisältävässä mikrofluidisaattorissa paineessa 137,9 MPa (20 000 psi). Ly-
35 saatti sentrifugoitiin ja suodatettiin 0,45 μ m:n kertakäyttösuodattimien läpi.

Suodos syötettiin 150 ml:n Q Sepharose Fast Flow -kolonniin (Pharmacia). Kolonni pestiin 1,5-kertaisella tilavuudella puskuria A (20 mmol/l Bis-Tris Propaneaa, pH 6,8, 1 mmol/l MgCl_2 :a, 0,25 mmol/l ditiotreitolia ja 10 $\mu\text{mol/l}$ ZnSO_4 :a) ja eluoiitiin portaittaisella gradientilla 125 mmol/l NaCl:a puskurissa A, jota seurasi lineaarinen gradientti 125 - 1 000 mmol/l NaCl:a puskurissa A.

Lineaarisesta gradientista saadut aktiiviset fraktiot syötettiin 180 ml:n hydroksiapatiittikolonniin puskurissa B (20 mmol/l Bis-Tris Propaneaa, pH 6,8, 1 mmol/l MgCl_2 :a, 0,25 mmol/l ditiotreitolia, 10 $\mu\text{mol/l}$ ZnSO_4 :a ja 250 mmol/l KCl:a). Lataamisen jälkeen kolonni huuhdottiin 2-kertaisella tilavuudella puskuria B ja eluoiitiin lineaarisella gradientilla 0 - 125 mmol/l kaliumfosfaattia puskurissa B. Aktiiviset fraktiot yhdistettiin, saostettiin 60-prosenttisella ammoniumsulfaatilla ja suspendoitiin uudelleen puskuriin C (20 mmol/l Bis-Tris Propaneaa, pH 6,8, 125 mmol/l NaCl:a, 0,5 mmol/l ditiotreitolia ja 10 $\mu\text{mol/l}$ ZnSO_4 :a). Tämä yhdistelmä syötettiin 140 ml:n Sephacryl S-300 HR -kolonniin ja eluoiitiin puskurilla C. Aktiiviset fraktiot laimennettiin glyserolipitoisuuteen 50 % ja varastoitettiin lämpötilassa -20 °C. Tuloksena olevien valmisteiden puhtausaste oli noin 85 % SDS-PAGE:n mukaan.

PDE-aktiivisuusmääritys

PDE5:n aktiivisuus voidaan mitata tavanomaisilla määrittelyillä. Min-
 20 kä tahansa PDE:n ominaisaktiivisuus voidaan esimerkiksi määrittää seuraavasti. PDE-määrittelyt, joissa hyödynnettiin hiilierotustekniikkaa, toteutettiin olennaisesti tavalla, jota kuvaavat Loughney *et al.*, The Journal of Biological Chemistry 271 (1996) 796 - 806. Tässä määrittelyssä PDE5-aktiivisuus muuttaa [^{32}P]cGMP:tä [^{32}P]5'GMP:ksi suhteessa läsnä olevaan PDE5-aktiivisuus-
 25 määrään. [^{32}P]5'GMP muutetaan sitten kvantitatiivisesti vapaaksi [^{32}P]-fosfaatiksi ja leimaamattomaksi adenosiiniksi käärmeenmyrkyn 5'-nukleosidaasin vaikutuksesta. Vapautunut [^{32}P]-fosfaattimäärä on siten verrannollinen entsyymiaktiivisuuteen. Määritys tehdään lämpötilassa 30 °C 100 μl :ssa reaktioseosta, joka sisältää (loppupitoisuuksina) 40 mmol/l Tris-Cl:a (pH 8,0), 1 $\mu\text{mol/l}$ ZnSO_4 :a, 5 mmol/l MgCl_2 :a ja 0,1 mg/ml naudan seerumialbumiinia. PDE5:tä
 30 on läsnä määriä, jotka antavat tulokseksi substraatin < 30-prosenttisen kokonaishydrolyysin (lineaariset määrittelysolosuhteet). Määritys käynnistetään lisäämällä substraatti (1 mmol/l [^{32}P]cGMP:tä) ja seosta inkuboidaan 12 minuuttia. Sitten lisätään 75 μg *Crotalus atrox* -myrkkyä ja inkubointia jatketaan vielä 5 mi-
 35 nuuttia (yhteensä 15 minuuttia). Reaktio keskeytetään lisäämällä 200 ml aktiivihiielisuspensiota (25 mg/ml 0,1 mol/l NaH_2PO_4 :a sisältävässä liuoksessa, pH

4). Kun on sentrifugoitu (750 x g, 3 minuuttia) hiilen laskeuttamiseksi, otetaan supernatanttinäyte tuikelaskurissa tehtävää radioaktiivisuusmittausta varten ja lasketaan PDE5-aktiivisuus. Valmisteiden ominaisaktiivisuus oli noin 3 μ mol hydrolysoitua cGMP:tä minuutissa milligrammaa kohden proteiinia.

5 Nauta-PDE6-valmiste

Nauta-PDE6:n toimitti tri N. Virmaux, INSERM U338, Strasbourg. Naudan verkkokalvot preparoitiin tavalla, jota kuvaavat Virmaux *et al.*, FEBS Letters 12(6) (1971) 325 - 328, katso myös A. Sitaramayya *et al.*, Ewyp. Eye Res. 25 (1977) 163 - 169. Ellei toisin mainita, lyhyesti esitettynä kaikki toimen-

10 piteet tehtiin kylmässä ja himmeässä punaisessa valossa. Silmiä pidettiin kylmässä ja pimeässä korkeintaan neljä tuntia teurastuksen jälkeen.

Naudan verkkokalvon ulomman osan (ROS; retinal outer segment) preparoinnissa noudatettiin olennaisesti menettelyjä, joita kuvaavat Schichi *et al.*, J. Biol. Chem. 224 (1969) 529. Tyypillisessä kokeessa jauhettiin 35 nau-

15 dan verkkokalvoa huumareessa yhdessä 35 ml:n kanssa fosfaattipuskuria (0,066 mol/l, pH 7,0), johon oli lisätty sakkaroosia pitoisuudeksi 40 %, mitä seurasi homogenointi Potter-homogenaattorissa (20 ylös ja alas iskua). Suspensiota sentrifugoitiin 20 minuuttia kiihtyvyydellä 25 000 x g. Pelletti homoge-

20 noitiin 7,5 ml:ssa fosfaattipuskuria (0,066 mol/l, 40 % sakkaroosia) ja asetettiin varovasti kerrokseksi 7,5 ml:n fosfaattipuskurikerroksen (ei sisältänyt sakkaroosia) alle. Sentrifugoitiin 20 min kiihtyvyydellä 45 000 x g käyttämällä ulos heilahtavaa roottoria, ja tämä antoi tulokseksi pelletin, joka on musta pohjasta, ja myös punaisen vyöhykkeen rajapinnalla 0,066 mol/l fosfaattia - 40 % sakkaroosia / 0,066 mol/l fosfaattia (epäpuhdas ROS). Rajapinnalla oleva punainen

25 materiaali poistettiin, laimennettiin fosfaattipuskurilla, sentrifugoitiin pelletiksi ja jakautettiin uudelleen edellä kuvattuun puskuroituun 40-prosenttiseen sakkaroosiliuokseen. Tämä menettely toistettiin 2 tai 3 kertaa, kunnes ei enää muodostunut pellettiä. Puhdistettu ROS pestiin fosfaattipuskurissa ja sentrifugoitiin lopuksi pelletiksi, 20 min kiihtyvyydellä 25 000 x g. Kaikki materiaalit pidettiin

30 pakastettuina käyttöön asti.

Hypotonisia uutteita valmistettiin suspendoimalla eristetty ROS liuokseen, joka sisälsi 10 mmol/l Tris-Cl:a, pH 7,5, 1 mmol/l EDTA ja 1 mmol/l ditioerytritolia, minkä jälkeen sentrifugoitiin 30 min kiihtyvyydellä 100 000 x g.

Valmisteen ominaisaktiivisuuden ilmoitettiin olevan noin 35 nmol hyd-

35 rolysoitua cGMP:tä minuutissa milligrammaa kohden proteiinia.

***Spodoptera fugiperda* -soluista (Sf9) saatu PDE1c-valmiste**

Solupelletit (5 g) sulatettiin jäiden päällä 20 ml:n kanssa lyysipuskuria (50 mmol/l MOPS:ää, pH 7,4, 10 μ mol/l ZnSO_4 :a, 0,1 mmol/l CaCl_2 :a, 1 mmol/l DTT:a, 2 mmol/l bentsamidiini-HCl:a, 5 g/ml pepstatiinia, leupeptiiniä ja aproteniiniä kutakin). Solut hajotettiin johtamalla ne French-painekennon (SLM-Aminco) läpi pitäen lämpötila 10 °C:n alapuolella. Tuloksena olevaa soluhomogenaattia sentrifugoitiin 45 minuuttia kierrostaajuudella 36 000 min^{-1} lämpötilassa 4 °C Beckman-ultrasentrifugissa käyttämällä roottoria Type TI45. Supernatantti heitettiin pois ja tuloksena oleva pelletti suspendoitiin uudelleen 40 ml:aan solubilisaatiopuskuria [lyysipuskuri, joka sisälsi 1 mol/l NaCl:a, 0,1 mol/l MgCl_2 :a, 1 mmol/l CaCl_2 :a, 20 μ g/ml kalmoduliinia ja 1 % Sulfobetaïne SB12:ta (Z3-12)] käsittelemällä 3 x 30 sekuntia ultraäänellä käyttämällä mikrokärjellä varustettua VibraCell-säädintä. Tämä tehtiin jäämurska-suolaseoksessa jäähdtyksen aikaansaamiseksi. Ultraäänikäsittelyn jälkeen seosta sekoitettiin hitaasti 30 minuuttia lämpötilassa 4 °C membraaniin sitoutuneiden proteiinien liukenemisen saattamiseksi loppuun. Tätä seosta sentrifugoitiin 45 minuuttia kierrostaajuudella 36 000 min^{-1} Beckman-ultrasentrifugissa käyttämällä roottoria Type TI45. Supernatantti laimennettiin lyysipuskurilla, joka sisälsi 10 μ g/ml kalpaiini-inhibiittoria I ja II. Saostunutta proteiinia sentrifugoitiin 20 minuuttia kierrostaajuudella 9 000 min^{-1} käyttämällä Beckman JA-10 -roottoria. Talteen otetulle supernatantille tehtiin sitten Mimetic Blue AP Agarose -kromatografia.

Ajon tekemiseksi Mimetic Blue AP Agarose -kolonnissa hartsi suojattiin aluksi syöttämällä 10 kerroksen tilavuutta 1-prosenttista polyvinyylipyrrolidonia (MW 40 000) epäspesifisten sitoutumiskohtien salpaamiseksi. Löyhästi sitoutunut PVP-40 poistettiin pesemällä 10 kerroksen tilavuudella liuosta, joka sisälsi 2 mol/l NaCl:a ja 10 mmol/l natriumsitraattia, pH 3,4. Juuri ennen liukenevaksi tehdyn PDE1c-näytteen lisäämistä kolonni tasapainotettiin 2 kerroksen tilavuudella kolonnipuskuria A (50 mmol/l MOPS:ää, pH 7,4, 10 μ mol/l ZnSO_4 :a, 5 mmol/l MgCl_2 :a, 0,1 mmol/l CaCl_2 :a, 1 mmol/l DTT:a ja 2 mmol/l bentsamidiini-HCl:a).

Liukenevaksi tehty näyte syötettiin kolonniin virtausnopeudella 2 ml/min kierrättäen siten, että koko näyte syötettiin 4 - 5 kertaa 12 tunnin aikana. Kun lataus oli saatettu loppuun, kolonni pestiin 10-kertaisella tilavuudellaan kolonnipuskuria A, sen jälkeen 5-kertaisella tilavuudellaan kolonnipuskuria B (kolonnipuskuri A, joka sisälsi 20 mmol/l 5'-AMP:tä) ja sen jälkeen 5-kertaisella

tilavuudellaan kolonnipuskuria C (50 mmol/l MOPS:ää, pH 7,4, 10 μ mol/l ZnSO₄:a, 0,1 mmol/l CaCl₂:a, 1 mmol/l ditiotreitolia ja 2 mmol/l bentsamidiini-HCl:a). Entsyymi eluoitiin kolmeksi peräkkäiseksi yhdistelmäksi. Ensimmäinen yhdistelmä koostui entsyymistä, joka oli peräisin 5 kerroksen tilavuudella tehdystä huuhtomisesta kolonnipuskurilla C, joka sisälsi 1 mmol/l cAMP:tä. Toinen yhdistelmä koostui entsyymistä, joka oli peräisin 5 kerroksen tilavuudella tehdystä huuhtomisesta kolonnipuskurilla C, joka sisälsi 1 mol/l NaCl:a. Viimeinen entsyymiyhdistelmä koostui 5 kerroksen tilavuudella tehdystä huuhtomisesta kolonnipuskurilla C, joka sisälsi 1 mol/l NaCl:a ja 20 mmol/l cAMP:tä.

10 Aktiiviset entsyymiyhdistelmät otettiin talteen ja syklinen nukleotidi poistettiin tavanomaisella geelisuodatuskromatografialla tai hydroksiapatiittihartseilla tehdyllä kromatografialla. Syklisten nukleotidien poistamisen jälkeen entsyymiyhdistelmät dialysoitiin dialyysipuskuria vastaan, joka sisälsi 25 mmol/l MOPS:ää, pH 7,4, 10 μ mol/l ZnSO₄:a, 500 mmol/l NaCl:a, 1 mmol/l CaCl₂:a, 15 1 mmol/l ditiotreitolia ja 2 mmol/l bentsamidiini-HCl:a, mitä seurasi dialyysi dialyysipuskuria vastaan, joka sisälsi 50 % glyserolia. Entsyymi jäädytettiin nopeasti hiilihappojään avulla ja säilytettiin lämpötilassa -70 °C.

Tuloksena olevien valmisteiden puhtausaste oli noin > 90 % SDS-PAGE:n mukaan. Näiden valmisteiden ominaisaktiivisuus oli noin 0,1 - 1,0 μ mol hydrolysoitua cAMP:tä minuutissa milligrammaa kohden proteiinia.

IC₅₀-arvomääritykset

Kiinnostuksen kohteena oleva parametri arvioitaessa PDE5:n ja/tai PDE1c:n ja PDE6:n kompetitiivisen entsyymi-inhibiittorin voimakkuutta on inhibitiokerto, ts. K_i. Tämän parametrin approksimaatio voidaan saada määrittämällä IC₅₀, joka on se inhibiittorikonsentraatio, joka johtaa 50-prosenttiseen entsyymi-inhibitiioon yhdessä annos-vastekokeessa seuraavissa olosuhteissa.

Inhibiittorikonsentraatio on aina paljon suurempi kuin entsyymikonsentraatio, niin että vapaan inhibiittorin konsentraatio (joka on tuntematon) approksimoidaan kokonaisinhibiittorikonsentraation (joka tunnetaan) kautta.

30 Valitaan sopiva inhibiittorikonsentraatioalue (ts. kokeessa on läsnä inhibiittorikonsentraatioita, jotka ovat vähintään muutaman kerran suurempia ja muutaman kerran pienempiä kuin K_i). Inhibiittorikonsentraatiot olivat tyypillisesti alueella 10 nmol/l - 10 μ mol/l.

Entsyymi- ja substraattikonsentraatiot valitaan siten, että alle 20 % substraatista kuluu inhibiittorin poissa ollessa (substraatin maksimihydrolyysik-

si saadaan esimerkiksi 10 - 15 %), niin että entsyymiaktiivisuus on suunnilleen vakio koko määrittelyn ajan.

Substraattipitoisuus on alle kymmenesosa Michaelisin vakioista (K_m). Tämä johtuu Cheng-Prisoffin yhtälöstä, joka suhteuttaa nämä kaksi parametria: $IC_{50} = K_i(1+S/K_m)$, jossa $(1+S/K_m)$ on noin 1 suhteen S/K_m arvojen ollessa pieniä.

IC_{50} -arvo arvioidaan tietopisteistä sovittamalla tiedot sopivaan entsyymi-inhibiittorivuorovaikutusmalliin. Kun tiedetään, että tässä vuorovaikutuksessa tapahtuu inhibiittorin yksinkertainen kilpailu substraatin kanssa, voidaan käyttää seuraavaa kahden parametrin mallia:

$$Y = A/(1+x/B)$$

jossa Y on inhibiittorikonsentraatiolla x mitattu entsyymiaktiivisuus, A on aktiivisuus inhibiittorin poissa ollessa ja B on IC_{50} . Katso Y. Cheng *et al.*, *Biochem. Pharmacol.* 22 (1973) 3099 - 3108.

Esillä olevan keksinnön mukaisten inhibiittoreiden vaikutukset edellä kuvatun kaltaisten PDE5- ja PDE6-valmisteiden entsyymiaktiivisuuteen määritettiin jommallakummalla kahdesta määrittelyksestä, jotka erosivat toisistaan pääasiassa mittakaavan suhteen ja antoivat olennaisesti samoja IC_{50} -arvotuloksia. Kummassakin määrittelyksessä käytettiin Wellsin *et al.* menettelyn [Biochim. Biophys. Acta 384 (1975) 430] muunnosta. Ensimmäinen määrittelyksistä tehtiin kokonaistilavuudessa 200 µl liuosta, joka sisälsi 50 mmol/l Trisiä, pH 7,5, 3 mmol/l Mg-asetaattia, 1 mmol/l EDTAa, 50 µg/ml käärmeeenmyrkky-nukleotidaasia ja 50 nmol/l [3H]-cGMP:tä (Amersham). Keksinnön mukaiset yhdisteet liuotettiin DMSO:iin, jota oli määrittelyksessä läsnä loppupitoisuutena 2 %. Määritysseoksia inkuboitettiin 30 minuuttia lämpötilassa 30 °C ja reaktio keskeytettiin lisäämällä 800 µl liuosta, joka sisälsi 50 mmol/l Trisiä, pH 7,5, 10 mmol/l EDTAa, 10 mmol/l teofylliiniä, 0,1 mmol/l adenosiniä ja 0,1 mmol/l guanosiniä. Seokset ladattiin 0,5 ml:n QAE Sephadex -kolonneille ja eluoitiin 2 ml:lla 0,1 M formaattiliuosta (pH 7,4). Eluoitunut radioaktiivisuus mitattiin tui-
kelaskennalla Optiphase Hisafe 3:ssa.

Toinen mikromaljalla tehtävä PDE-määritys kehitettiin käyttämällä Multiscreen-maljoja ja alipainejako-osaa. Määritysseos (100 µl) sisälsi 50 mmol/l Trisiä, pH 7,5, 5 mmol/l Mg-asetaattia, 1 mmol/l EDTAa ja 250 µg/ml käärmeeenmyrkky-nukleotidaasia. Reaktioseoksen muut komponentit olivat edellä

kuvatun kaltaiset. Inkuboinnin lopussa koko määritystilavuus ladattiin QAE Sephadex -mikrokolonnimaljalle suodattamalla. Vapaa radioaktiivisuus eluoitiin 200 µl:lla vettä, josta analysoitiin 50 µl:n annoksia tuikelaskennalla edellä kuvatulla tavalla.

- 5 Seuraavat esimerkit annetaan patenttivaatimusten kohteena olevan keksinnön mukaisen valmisteen valaisemiseksi tarkemmin. Esillä olevan keksinnön suoja-alaa ei pidä ymmärtää koostuvaksi yksinomaan seuraavista esimerkeistä.

Esimerkki 1

- 10 Yhdiste, jonka rakennekaava on I, valmistettiin US-patenttijulkaisussa 5 859 006 kuvatulla tavalla ja formuloitiin tableteiksi käyttämällä märkärakeistusta. Povidoni liuotettiin veteen 10-prosenttiseksi liuokseksi. Aktiivinen yhdiste, mikrokiteinen selluloosa, kroskarmelloosinatrium ja natriumlauryylisulfaatti lisättiin voimakkaasti leikkaavaan sekoittimeen ja sekoitettiin 2 minuuttia.
- 15 Jauheet märkärakeistettiin käyttämällä povidoniliuos ja ylimääräistä vettä tarpeen mukaan rakeistuksen saattamiseksi loppuun. Tuloksena olevaa seosta kuivattiin leijukerroskuivurissa sisääntuloilman lämpötilan ollessa $70\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$, kunnes kuivaushäviö oli alle 2,5 %. Rakeet johdettiin sopivalla seulalla (tai siivilällä) varustetun Comil-laitteen läpi ja laitettiin sopivaan sekoittimeen. Rakeiden ulkopuolinen kroskarmelloosinatrium ja natriumlauryylisulfaatti ja kolloidinen vedetön piidioksidi johdettiin sopivan siivilän (esimerkiksi $500\text{ }\mu\text{m}$) läpi, lisättiin sekoittimeen ja sekoitettiin 2 minuuttia. Lisättiin magnesiumstearaatti ja sekoitettiin 2 minuuttia. Seos puristettiin tavoitepuristusarvoon painoa 250 mg kohden käyttämällä normaalia 9 mm:n koveraa välineistöä.
- 25 Ydintabletteja päällystettiin vesipitoisella Opadry OY-S-7322 -suspensiolla käyttämällä Accelacota-päällystysastiaa (tai vastaavaa) ja tuloilman lämpötilaa $50 - 70\text{ °C}$, kunnes tabletin paino oli kasvanut noin 8 mg. Opadry OY-S-7322 sisältää metyylihydroksipropyyliseluloosaa Ph.Eur., titaanidioksidia Ph.Eur. ja triasetiinia USP. Opadry nostaa kunkin tabletin painon noin
- 30 258 mg:aan. Tablettia kohden levitettävän kalvopäällysteen määrä voi olla mainittua pienempi prosessin tehosta riippuen.

Tabletit pakataan kuplapakkauksiin ja niihin liitetään pakkauksessa oleva seloste, jossa kuvataan tuotteen turvallisuutta ja tehoa.

Ainesosa	Formulaatit (mg/tabletti)	
Selektiivinen PDE5-inhibiittori ¹⁾	1	5
Hydroksipropyylimetyyliselluloosaftalaatti	1	5
Mikrokiteinen selluloosa	221,87	213,87
Kroskarmelloosinatrium	5,00	5,00
Natriumlauryylisulfaatti	2,50	2,50
Natriumpovidoni K30	9,38	9,38
Puhdistettu vesi, USP (kostutusvesi)	q.s.	q.s.
Kroskarmelloosinatrium	5,00	5,00
Natriumlauryylisulfaatti	2,50	2,50
Kolloidinen vedetön piidioksidi	0,50	0,50
Magnesiumstearaatti	1,25	1,25
Koko ydin, osasumma	250,00	250,00
(Kalvopäälyste Opadry OY-S-7322)	noin 8 mg	noin 8 mg

¹⁾Rakennekaavan (I) mukainen yhdiste

Esimerkki 2

Seuraavaa formulaatiota käytetään valmiin, 10 mg rakennekaavan I mukaista yhdistettä sisältävän annostelumuodon valmistuksessa.

5

Ainesosa	Määrä (mg)
Rakeet	
Selektiivinen PDE5-inhibiittori ¹⁾	10,00
Laktoosimonohydraatti	153,80
Laktoosimonohydraatti (suihkukuivattu)	25,00
Hydroksipropyyliselluloosa	4,00
Kroskarmelloosinatrium	9,00
Hydroksipropyyliselluloosa (EF)	1,75
Natriumlauryylisulfaatti	0,70
	35,00
Ulkopuolella olevat jauheet	
Mikrokiteinen selluloosa (rakeinen-102)	37,50
Kroskarmelloosinatrium	7,00
Magnesiumstearaatti (kasvispohjainen)	1,25
	Yhteensä 250 mg
Kalvopäälyste (noin 11,25)	

Tablettien valmistuksessa käytetään puhdistettua vettä, USP. Vesi poistetaan käsittelyn aikana, ja sitä jää valmiiseen tuotteen hyvin pieniä määriä.

Tabletit valmistetaan käyttämällä märkärakeistusprosessia. Prosessin kuvaus vaihe vaiheelta on seuraava. Rakeistettaville lääkeaineille ja täyteaineille tehdään varmistusseulonta. Selektiiviinen PDE5-inhibiittori kuivasekoitetaan laktoosimonohydraatin (suihkukuivattu), hydroksipropyyliselluloosan, kroskarmelloosinatriumin ja laktoosimonohydraatin kanssa. Tuloksena oleva jauheseos rakeistetaan vesipitoisen hydroksipropyyliselluloosa- ja natriumlauriylisulfaattiliuoksen kera käyttämällä Powrex-rakeistinta tai muuta sopivaa voimakkaasti leikkaavaa rakeistinta. Vettä voidaan lisätä enemmän toivotun päätepisteen saavuttamiseksi. Märkien rakeiden paakkujen hajottamiseksi ja kuivauksen helpottamiseksi voidaan käyttää myllyä. Märät rakeet kuivataan käyttämällä joko leijukerroskuivuria tai kuivausuunia. Kun materiaali on kuivunut, sille voidaan tehdä kokoluokittelu mahdollisten suurten agglomeraattien poistamiseksi. Mikrokiteiselle selluloosalle, kroskarmelloosinatriumille ja magnesiumstearaatille tehdään varmistusseulonta ja ne lisätään kuiviin kokoluokiteltuihin rakeisiin. Näitä täyteaineita ja kuivia rakeita sekoitetaan, kunnes seos on yhtenäinen, käyttämällä rumpusekoitinta, nauhasekoitinta tai muita sopivia sekoituslaitteita. Sekoitusprosessi voidaan jakaa kahdeksi vaiheeksi. Mikrokiteinen selluloosa, kroskarmelloosinatrium ja kuivat rakeet lisätään sekoittimeen ja tehdään ensimmäisen vaiheen sekoitus, mitä seuraa magnesiumstearaatin lisääminen näihin rakeisiin ja toinen sekoitusvaihe.

Sekoitetut rakeet puristetaan sitten tableteiksi käyttämällä pyörivää puristuskonetta. Ydintableteille tehdään kalvopäällystys käyttämällä sopivan väriseoksen vesipitoista suspensiota päällystysastiassa (esimerkiksi Accela Cota). Päällystetyt tabletit voidaan pölyttää kevyesti talkilla tablettien käsittelyominaisuuksien parantamiseksi.

Tabletit pakataan muovisäiliöihin (30 tablettia/säiliö) ja mukaan liitetään pakkauksessa oleva seloste, jossa kuvataan tuotteen turvallisuutta ja tehoa.

Esimerkki 3

Seuraavaa formulaatiota käytetään valmiin, 5 mg rakennekaavan I mukaista yhdistettä sisältävän annostelumuodon valmistuksessa.

Ainesosa	Määrä (mg)
Rakeet	
Selektiivinen PDE5-inhibiittori ¹⁾	2,50
Laktoosimonohydraatti	79,395
Laktoosimonohydraatti (suihkukuivattu)	12,50
Hydroksipropyyliselluloosa	2,00
Kroskarmelloosinatrium	4,50
Hydroksipropyyliselluloosa (EF)	0,875
Natriumlauryylisulfaatti	0,35
Ulkopuolella olevat jauheet	
Mikrokiteinen selluloosa (rakeinen-102)	18,75
Kroskarmelloosinatrium	3,50
Magnesiumstearaatti (kasvispohjainen)	0,63
	Yhteensä 125 mg
Kalvopäällyste (noin) 6,875	

Esimerkin 3 mukainen annostelumuoto valmistettiin samalla tavalla kuin esimerkin 2 mukainen annostelumuoto.

Esimerkki 4

Liuoskapseli		
Ainesosa	mg/kapseli	Prosenttia (%)
Selektiivinen PDE5-inhibiittori ¹⁾	10	2
PEG400 NF	490	98
Täyttömäärä	500	100

5

Gelatiinikapselit täytetään tarkasti pumpaamalla täsmällinen tilavuus ennalta liuotettua lääkeformulaatiota kapselin osaksi suljettuun onteloon. Kapseli suljetaan täysin lämmön avulla heti, kun se on täytetty injektioimalla lääkeaineliuosformulaatio.

10

Kapselit pakataan muovisäiliöihin ja mukaan liitetään pakkauksessa oleva seloste.

Esimerkki 5

Tämä tutkimus oli satunnaistettu, plasebovertailunäytteen sisältävä, kaksisuuntaisella ristikkäismallilla toteutettu kliininen farmakologinen kaksois-

5 na lääkeaineena olevan selektiivisen PDE5-inhibiittorin (ts. rakennekaavan I mukaisen yhdisteen) ja lyhytvaikutteisten nitraattien samanaikaisen annon hemodynaamisia vaikutuksia terveisiin vapaaehtoiisiin miehiin. Tässä tutkimuksessa kohteet saivat joko tutkittavaa lääkeainetta annoksena 10 mg tai plasebo-

10 boa päivittäin seitsemän päivän ajan. Kuudentena tai seitsemäntenä päivänä kohteet saivat kielen alle nitroglyseriiniä (0,4 mg) ollessaan selällään kallistetavalla pöydällä. Nitroglyseriini annettiin 3 tunnin kuluttua tutkittavan lääkeai-

neen annostelusta, ja kaikki kohteet pitivät nitroglyseriinitabletin kielensä alla, kunnes se oli kokonaan liuennut. Kohteet kallistettiin 70°:n kulmaan pää ylöspäin 5 minuutin väliajoin yhteensä 30 minuutin ajan mitaten verenpaine ja sy-

15 ke. Tähän tutkimukseen tulleiden 22 terveen miehen (iältään 19 - 60 vuotta) joukossa ei ollut yhtään keskeyttänyttä.

Tämän tutkimuksen alustavassa analyysissä tutkittava lääkeaine oli hyvin siedetty, eikä vakavia negatiivisia tapahtumia esiintynyt. Tutkittavaan lää-

20 keaineeseen liittyviä muutoksia ei esiintynyt turvallisuutta mittaavissa laboratoriomäärityksissä eikä EKG:issä, joissa käytettiin 12 johtoa. Yleisimmät negatiiviset tapahtumat olivat päänsärky, ruuansulatushäiriöt ja selkäkipu.

Esimerkki 6

Kahdessa satunnaistetussa, plasebovertailunäytteen sisältävässä kaksoissokkotutkimuksessa annettiin hoidon tarpeessa oleville potilaille raken-

25 nekaavan I mukaista yhdistettä erilaisina annoksina sekä päivittäin että tarpeen mukaan seksuaalikumppanin kanssa ja kotiympäristössä tapahtuvaa yhdyntää varten. Annokset 5 - 20 mg rakennekaavan I mukaista yhdistettä olivat tehokkaita, eikä punoitusta eikä raportoituja näön poikkeavuuksia esiintynyt. Havaittiin, että 10 mg:n annos rakennekaavan I mukaista yhdistettä oli täysin

30 tehokas ja sivuvaikutukset olivat hyvin vähäisiä (ei punoitusta eikä raportoitua sinisenä näkemistä).

Erektiotoimintoa arvioitiin käyttämällä kansainvälistä erektiotoimintoindeksiä (IIEF; the International Index of Erectile Function) [Rosen *et al.*, Urology 49 (1997) 822 - 830], seksuaalisista yrityksistä pidettyjä päiväkirjoja ja

35 yleistä tyytyväisyyskyselyä. Rakennekaavan I mukainen yhdiste paransi mer-

kitsevästi erektiotoimintoa arvioituna kaikkien tulosten mukaan. Molemmissa hoito-ohjelmissa, sekä "tarvittaessa" että päivittäin annosteltuna, rakennekaavan I mukainen yhdiste paransi merkitsevästi erektiotoimintoa annoksina 1 - 20 mg.

5 Esimerkki 7

Kolmas kliininen tutkimus oli satunnaistettu, plasebovertailunäytteen sisältävä kaksoissokkotutkimus, jossa käytettiin rakennekaavan I mukaista yhdistettä (tutkittavaa lääkeainetta) annettuna "tarvittaessa" miespotilaille, joilla oli erektiohäiriö. Tutkittavaa lääkeainetta annettiin kahdeksan viikon aikana hoidettaessa miehen erektiohäiriötä (ED; erectile dysfunction). Erektiohäiriö (ED) määritellään pysyväksi kyvyttömyydeksi saada ja/tai ylläpitää riittävä erektio tyydyttävän seksuaalisen suorituskyvyn mahdollistamiseksi. Annostelu "tarvittaessa" määritellään tutkittavan lääkeaineen ajoittaiseksi annoksi ennen odotettua seksuaalista aktiviteettia.

Tutkimuspopulaatio koostui 212 miehestä, jotka olivat vähintään 18-vuotiaita ja joilla oli lievä - vakava erektiohäiriö. Tutkittavaa lääkeainetta annettiin oraalisesti keraaostumatabletteina, jotka oli valmistettu Butlerin US-patenttijulkaisun 5 985 326 mukaisesti. Tutkittavaa lääkeainetta annettiin annoksina 2 mg, 5 mg, 10 mg ja 25 mg "tarvittaessa" ja korkeintaan kerran vuorokaudessa. Hoitoa millään nitraateilla, atsolisienilääkkeillä (esimerkiksi ketokonatsolilla tai itrakonatsolilla), varfariinilla, erytromysiinillä tai antiandrogeeneillä ei sallittu missään vaiheessa tutkimuksen aikana. Muita ED:n hoitoon käytettyjä hyviksi todettuja tai kokeellisia lääkityksiä, hoitoja tai välineitä ei sallittu. 41 kohteelle annettiin plaseboa.

Kaksi ensisijaista tehomuuttujaa olivat kohteen kyky työntää siitin partnerin vaginaan ja kyky ylläpitää erektio yhdynnän aikana kansainvälisellä erektiotoimintoindeksillä (IIEF) mitattuna. IIEF-kysely sisältää 15 kysymystä ja mittaa erektiotoimintoa lyhytsanaisesti ja luotettavasti. Katso R. C. Rosen *et al.*, *Urology* 49 (1997) 822 - 830.

Toissijaisia tehomuuttujia olivat IIEF-tasopisteet erektiotoiminnolle, orgasmitoiminnolle, seksuaaliselle halulle, yhdynnän antamalle tyydytykselle ja yleiselle tyytyväisyydelle; potilaan kyky saavuttaa erektio, kyky työntää penis partnerin vaginaan, yhdynnän saattaminen loppuun ejakulaatiolla, tyytyväisyys erektion kovuuteen ja kokonaistyytyväisyys, kaikki mitattuina "seksuaalikoh-
taamispäiväkirjan" (the Sexual Encounter Profile (SEP) diary) mukaan; ja hoi-

tojakson lopussa tehty yleisarviointikysymys. SEP on potilaspäiväkirjaväline, joka dokumentoi kunkin seksuaalisen kohtaamisen tutkimuksen aikana.

Tutkimuksen turvallisuusanalyysi sisälsi kaikki mukana olleet koh-
teet ja tehtiin arvioimalla kaikki raportoidut negatiiviset tapahtumat, muutokset
5 kliinisissä laboratorioarvoissa, elämän kannalta olennaiset merkit, fyysisen tut-
kimuksen tulokset ja elektrokardiogrammitulokset.

Lopussa potilaita, jotka arvostelivat kykynsä tunkeutua vaginaan
(IIEF-kysymys 3) luokkaan "lähes aina tai aina", oli seuraavasti: 17,5 % plase-
boryhmässä, 38,1 % ryhmässä 2 mg, 48,8 % ryhmässä 5 mg, 51,2 % ryhmäs-
10 sä 10 mg ja 83,7 % ryhmässä 25 mg. Vertailut paljastivat tilastollisesti merkit-
seviä eroja tunkeutumiskyvyn muutoksessa plasebon ja tutkittavan lääkeai-
neen kaikkien annostasojen välillä.

Lopussa potilaita, jotka arvostelivat kykynsä pitää yllä erektio (IIEF-
kysymys 4) luokkaan "lähes aina tai aina", oli seuraavasti: 10,0 % plasebo-
15 ryhmässä, 19,5 % ryhmässä 2 mg, 32,6 % ryhmässä 5 mg, 39,0 % ryhmässä
10 mg ja 69,0 % ryhmässä 25 mg. Vertailut paljastivat tilastollisesti merkitseviä
eroja tunkeutumiskyvyn muutoksessa plasebon ja tutkittavan lääkeaineen kol-
men korkeimman annostason välillä.

Tämä tutkimus osoitti kaiken kaikkiaan, että kaikki kolme tutkittavan
20 lääkeaineen annosta, nimittäin 2 mg, 5 mg, 10 mg ja 25 mg, otettuina "tarvit-
taessa" saivat aikaan merkitsevän parannuksen suhteessa plaseboon erektio-
häiriötä potevien miesten seksuaalisessa suorituskävyssä, kun arvioinnin poh-
jana IIEF, potilaspäiväkirjat, joissa arvioidaan onnistuneiden yhdyntöjen tiheys
ja yhdynnän antama tyydytys, ja yleinen arvio. Tämä parannus osoitettiin suu-
25 ressä tutkimuspopulaatiossa, joka sisälsi potilaita, joilla esiintyi erektiohäiriön
kaikkia vakavuusasteita. Useimmat negatiiviset tapahtumat olivat vakavuu-
deltaan lieviä tai kohtuullisia. Merkittävää on, ettei yksikään potilas ilmoittanut
väärinään häiriöihin liittyviä negatiivisia tapahtumia.

Kliinisistä tutkimuksista saadut yhdistetyt tulokset osoittivat, että ra-
30 kennekaavan I mukaisen yhdisteen anto hoitaa tehokkaasti miehen erektiohäi-
riötä, kuten seuraava taulukko valaisee.

IIEF-erektiotoimintotaso (muutos perusviivasta)			
Yksikköannos	n	Keskiarvo $\pm$ SD	p
Plasebo	131	0,8 $\pm$ 5,3	
2 mg	75	3,9 $\pm$ 6,1	< 0,001
5 mg	79	6,6 $\pm$ 7,1	< 0,001
10 mg	135	7,9 $\pm$ 6,7	< 0,001
25 mg	132	9,4 $\pm$ 7,0	< 0,001
50 mg	52	9,8 $\pm$ 5,5	< 0,001
100 mg	49	8,4 $\pm$ 5,1	< 0,001

n on kohteiden lukumäärä, SD standardipoikkeama

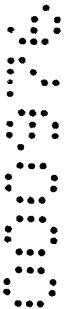
- Yhdistetyistä kliinisistä tutkimuksista havaittiin kuitenkin myös, että hoidon myötä ilmaantuneiden negatiivisten tapahtumien prosentuaalinen osuus kasvoi kaavan I mukaisen yhdisteen yksikköannoksen kasvaessa, kuten seuraava taulukko valaisee.

Hoidon myötä ilmaantuneet negatiiviset tapahtumat (%)							
Yksikköannos (mg)							
Tapahtuma	Plasebo	2	5	10	25	50	100
Päänsärky	6	12	10	23	29	34	46
Ruuansulatushäiriö	6	3	14	13	19	20	25
Selkäkipu	5	3	3	15	18	24	22
Lihassärky	3	0	3	9	16	20	29
Nuha	3	7	3	4	4	0	2
Konjunktiviitti	1	0	1	1	0	2	5
Silmäluomien turvotus	0	0	0	1	1	2	3
Punoitus	0	0	0	< 1	0	3	7
Näön poikkeavuudet	0	0	0	0	0	0	0

- Edellä oleva taulukko osoittaa negatiivisten tapahtumien lisääntymisen yksikköannoksilla 25 mg - 100 mg. Niinpä, vaikka havaittiin erektiohäiriöhoidon tehokkuus annoksilla 25 mg - 100 mg, täytyy annoksilla 25 mg - 100 mg havaitut negatiiviset tapahtumat ottaa huomioon.

Esillä olevan keksinnön mukaisesti yksikköannos noin 1 - noin 20 mg, edullisesti noin 2 - noin 20 mg, edullisemmin noin 5 - noin 20 mg ja

- edullisimmin noin 5 - noin 15 mg annettuna siten, että maksimiannos on 20 mg vuorokaudessa, sekä hoitaa erektiohäiriötä tehokkaasti että minimoi tai eliminoi haitallisten sivuvaikutusten esiintymisen. Tärkeää oli, ettei näön poikkeavuuksia ilmoitettu ja punastuminen tuli suurin piirtein eliminoiduksi. Sen lisäksi,
- 5 että hoidetaan yksilöiden erektiohäiriötä yksikköannoksella noin 1 - noin 20 mg rakennekaavan I mukaista yhdistettä mahdollisimman vähäisin haitallisin sivuvaikutuksin, voidaan esillä olevan keksinnön mukaisella menetelmällä ja koostumuksella yllättävästi hoitaa myös nitraattihoidossa olevien yksilöiden erektiohäiriötä.
- 10 Edellä olevassa selityksessä on kuvattu esillä olevan keksinnön periaatteita, edullisia suoritusmuotoja ja toimintatapoja. Tässä suojattavaksi tarkoitettua keksintöä ei kuitenkaan tule ymmärtää nimenomaisesti esitettyihin muotoihin rajoittuvaksi, koska niitä on pidettävä valaisevina eikä rajoittavina. Ammattimiehet voivat tehdä variaatioita ja muutoksia poikkeamatta keksinnön
- 15 hengestä.



Patenttivaatimukset

1. Valmiste, joka on tarkoitettu lääkekäyttöön ihmisillä, t u n n e t t u siitä, että se käsittää

(a) oraalisen annostelumuodon, joka käsittää noin 1 - noin 20 mg selektiivistä PDE5-inhibiittoria, jolla on

(i) vähintään 100-kertainen ero IC_{50} -arvoissa PDE5:n ja PDE6:n inhibition välillä,

(ii) vähintään 1 000-kertainen ero IC_{50} -arvoissa PDE5:n ja PDE1c:n inhibition välillä,

(iii) IC_{50} -arvo PDE5:n inhibition ollessa kyseessä alle 10 nmol/l ja

(iv) riittävä hyötyosuus ollakseen vaikuttava oraalisina yksikköannoksina noin 1 - noin 20 mg;

(b) pakkauksessa olevan selosteen, jossa esitetään, että kyseinen PDE5-inhibiittori on käyttökelpoinen seksuaalisen toimintahäiriön hoitoon potilaalla,

joka on sen tarpeessa ja ettei sillä ole kontraindikaatioita koskien PDE5 inhibiittorin antoa potilaalle, joka potee verkkokalvosairautta; ja

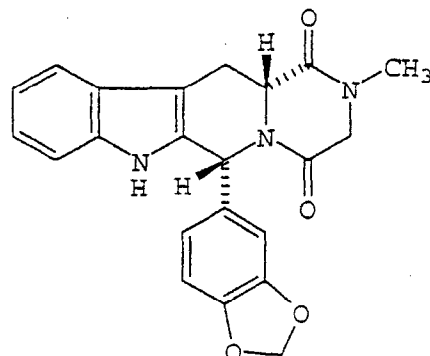
(c) säiliön.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen valmiste, t u n n e t t u siitä, että verkkokalvosairaus on diabetekseen liittyvä retinopatia.

3. Patenttivaatimusten 1 ja 2 mukainen valmiste, t u n n e t t u siitä, että oraalinen annostelumuoto käsittää noin 5 mg, noin 10 mg tai noin 20 mg selektiivistä PDE5-inhibiittoria.

4. Patenttivaatimusten 1, 2 ja 3 mukainen valmiste, t u n n e t t u siitä, että pakkauksessa oleva seloste antaa selektiivisen PDE5-inhibiittorin maksimiannostukseksi noin 20 mg vuorokaudessa.

5. Patenttivaatimusten 1, 2, 3, ja 4 mukainen valmiste, t u n n e t t u siitä, että selektiivisellä PDE5-inhibiittorilla on rakenne



6. Valmiste, t u n n e t t u siitä, että se on olennaisesti edellä selityksessä kuvatun kaltainen.

7. Menetelmä seksuaalisen toimintahäiriön hoitamiseksi, t u n n e t t u siitä, että käytetään patenttivaatimusten 1, 2, 3, 4 ja 5 mukaista valmistetta.

8. Patenttivaatimuksen 1 mukainen valmiste, t u n n e t t u siitä, että verkkokalvosairaus on *retinis pigmentosa*.

9. Valmiste, joka on tarkoitettu lääkekäyttöön ihmisillä, t u n n e t t u siitä, että se käsittää

10 (a) oraalisen annostelumuodon, joka käsittää noin 1 - noin 20 mg selektiivistä PDE5-inhibiittoria, jolla on

(i) vähintään 100-kertainen ero IC_{50} -arvoissa PDE5:n ja PDE6:n inhibition välillä,

15 (ii) vähintään 1 000-kertainen ero IC_{50} -arvoissa PDE5:n ja PDE1c:n inhibition välillä,

(iii) IC_{50} -arvo PDE5:n inhibition ollessa kyseessä alle 10 nmol/l ja

(iv) riittävä hyötyosuus ollakseen vaikuttava oraalisina yksikköannoksina noin 1 - noin 20 mg;

20 (b) pakkauksessa olevan selosteen, jossa esitetään, että kyseinen PDE5-inhibiittori on käyttökelpoinen seksuaalisen toimintahäiriön hoitoon potilaalla, joka on sen tarpeessa ja että hoidon PDE5-inhibiittorilla jälkeen punastumisesta ilmoittavien potilaiden prosenttiosuus on alle 10 prosentin tasolla; ja
(c) säiliön.

25 10. Valmiste, joka on tarkoitettu lääkekäyttöön ihmisillä, t u n n e t t u siitä, että se käsittää

(a) oraalisen annostelumuodon, joka käsittää noin 1 - noin 20 mg selektiivistä PDE5-inhibiittoria, jolla on

(i) vähintään 100-kertainen ero IC_{50} -arvoissa PDE5:n ja PDE6:n inhibition välillä,

30 (ii) vähintään 1 000-kertainen ero IC_{50} -arvoissa PDE5:n ja PDE1c:n inhibition välillä,

(iii) IC_{50} -arvo PDE5:n inhibition ollessa kyseessä alle 10 nmol/l ja

(iv) riittävä hyötyosuus ollakseen vaikuttava oraalisina yksikköannoksina noin 1 - noin 20 mg;

35 (b) pakkauksessa olevan selosteen, jossa esitetään, että kyseinen PDE5-inhibiittori on käyttökelpoinen seksuaalisen toimintahäiriön hoitoon potilaalla,

joka on sen tarpeessa ja että hoidon PDE5-inhibiittorilla jälkeen punastumisesta ilmoittavien potilaiden prosenttiosuus on alempaa tasoa kuin niiden potilaiden prosenttiosuus, jotka ilmoittavat punastumisesta sildenafilin tavaraselosteessa; ja

5 (c) säiliön.

11. Valmiste, joka on tarkoitettu lääkekäyttöön ihmisillä, t u n n e t t u siitä, että se käsittää

(a) oraalisen annostelumuodon, joka käsittää noin 1 - noin 20 mg selektiivistä PDE5-inhibiittoria, jolla on

10 (i) vähintään 100-kertainen ero IC_{50} -arvoissa PDE5:n ja PDE6:n inhibition välillä,

(ii) vähintään 1 000-kertainen ero IC_{50} -arvoissa PDE5:n ja PDE1c:n inhibition välillä,

(iii) IC_{50} -arvo PDE5:n inhibition ollessa kyseessä alle 10 nmol/l ja

15 (iv) riittävä hyötyosuus ollakseen vaikuttava oraalisisinä yksikköannoksina noin 1 - noin 20 mg;

(b) pakkauksessa olevan selosteen, jossa esitetään, että kyseinen PDE5-inhibiittori on käyttökelpoinen seksuaalisen toimintahäiriön hoitoon potilaalla, joka on sen tarpeessa ja että hoidon PDE5-inhibiittorilla jälkeen poikkeavasta

20 näöstä ilmoittavien potilaiden prosenttiosuus on alempaa tasoa kuin niiden potilaiden prosenttiosuus, jotka ilmoittavat poikkeavasta näöstä sildenafilin tavaraselosteessa; ja

(c) säiliön.

12. Patenttivaatimuksen 11 mukainen valmiste, t u n n e t t u siitä, että pakkauksessa oleva seloste kertoo, että hoidon PDE5-inhibiittorilla jälkeen poikkeavasta näöstä ilmoittavien potilaiden prosenttiosuus on noin nolla.

13. Selektiivisen PDE5-inhibiittorin käyttö lääkkeen valmistamiseksi, joka sisältää pakkauksessa olevan selosteen, jossa kerrotaan, että kyseinen PDE5-inhibiittori on käyttökelpoinen seksuaalisen toimintahäiriön hoitoon potilaalla, joka on sen tarpeessa ja ettei sillä ole kontraindikaatioita koskien PDE5-inhibiittorin antoa potilaalle, joka potee verkkokalvosairautta.

30

14. Selektiivisen PDE5-inhibiittorin käyttö lääkkeen valmistamiseksi, joka sisältää pakkauksessa olevan selosteen, jossa esitetään, että kyseinen PDE5-inhibiittori on käyttökelpoinen seksuaalisen toimintahäiriön hoitoon potilaalla, joka on sen tarpeessa ja että hoidon PDE5-inhibiittorilla jälkeen pu-

35

nastumisesta ilmoittavien potilaiden prosenttiosuus on alle 10 prosentin tasolla.

15. Selektiivisen PDE5-inhibiittorin käyttö lääkkeen valmistamiseksi, joka sisältää pakkauksessa olevan selosteen, jossa kerrotaan, että kyseinen
5 PDE5-inhibiittori on käyttökelpoinen seksuaalisen toimintahäiriön hoitoon potilaalla, joka on sen tarpeessa ja että hoidon PDE5-inhibiittorilla jälkeen punastumisesta ilmoittavien potilaiden prosenttiosuus on alempaa tasoa kuin niiden potilaiden prosenttiosuus, jotka ilmoittavat punastumisesta sildenafilin tavaraselosteessa.

10 16. Selektiivisen PDE5 inhibiittorin käyttö lääkkeen valmistamiseksi, joka sisältää pakkauksessa olevan selosteen, jossa esitetään, että kyseinen PDE5-inhibiittori on käyttökelpoinen seksuaalisen toimintahäiriön hoitoon potilaalla, joka on sen tarpeessa ja että hoidon PDE5-inhibiittorilla jälkeen poikkeavasta näöstä ilmoittavien potilaiden prosenttiosuus on alempaa tasoa kuin
15 niiden potilaiden prosenttiosuus, jotka ilmoittavat epänormaalista näöstä sildenafiliin tavaraselosteessa.

17. Selektiivisen PDE5-inhibiittorin käyttö lääkkeen valmistamiseksi, joka valmiste sisältää pakkauksessa olevan selosteen, jossa esitetään, että kyseinen PDE5-inhibiittori on käyttökelpoinen seksuaalisen toimintahäiriön
20 hoitoon potilaalla, joka on sen tarpeessa ja ettei sillä ole kontraindikaatioita koskien PDE5-inhibiittorin antoa potilaalle, joka potee tilaa, joka valitaan ryhmästä, joka käsittää verkkokalvosairauden, punastumisalttiuden, näön poikkeavuusalttiuden, luokan 1 kongestiivisen sydänvian, vähintään 90 päivää ennen seksuaalisen toimintahäiriön hoidon aloittamista tapahtuneen sydäninfarktin ja niiden yhdistelmät.
25

18. Valmiste, joka on tarkoitettu lääkekäyttöön ihmisillä, t u n n e t t u siitä, että se käsittää

(a) oraalisen annostelumuodon, joka käsittää noin 1 - noin 20 mg selektiivistä PDE5-inhibiittoria, jolla on

30 (i) vähintään 100-kertainen ero IC_{50} -arvoissa PDE5:n ja PDE6:n inhibition välillä,

(ii) vähintään 1 000-kertainen ero IC_{50} -arvoissa PDE5:n ja PDE1c:n inhibition välillä,

(iii) IC_{50} -arvo PDE5:n inhibition ollessa kyseessä alle 10 nmol/l ja

35 (iv) riittävä hyötyosuus ollakseen vaikuttava oraalisina yksikköannoksina noin 1 - noin 20 mg;

- (b) pakkauksessa olevan selosteen, jossa esitetään, että kyseinen PDE5-inhibiittori on käyttökelpoinen seksuaalisen toimintahäiriön hoitoon potilaalla, joka on sen tarpeessa, ja ettei sillä ole kontraindikaatioita koskien PDE5-inhibiittorin antoa potilaalle, joka potee tilaa, joka valitaan ryhmästä, joka kä-
- 5 sittää luokan 1 kongestiivisen sydänvian, vähintään 90 päivää ennen seksuaalisen toimintahäiriön hoidon aloittamista tapahtuneen sydäninfarktin ja niiden yhdistelmät; ja
- (c) säiliön.

