

# PATENTOVÝ SPIS

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLUVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2001-3879**  
(22) Přihlášeno: **26.04.2000**  
(30) Právo přednosti: **30.04.1999 US 1999/132036**  
(40) Zveřejněno: **17.04.2002**  
**(Věstník č. 4/2002)**  
(47) Uděleno: **21.02.2006**  
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **12.04.2006**  
**(Věstník č. 4/2006)**  
(86) PCT číslo: **PCT/US2000/011129**  
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2000/066099**

(11) Číslo dokumentu:

## 296 534

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:  
**A61K 31/4985** (2006.01)  
**A61P 15/10** (2006.01)

(73) Majitel patentu:

LILLY ICOS LLC, Wilmington, DE, US

(72) Původce:

Pullman William Ernest, Carmel, IN, US  
Whitaker John Steven, Woodinville, WA, US

(74) Zástupce:

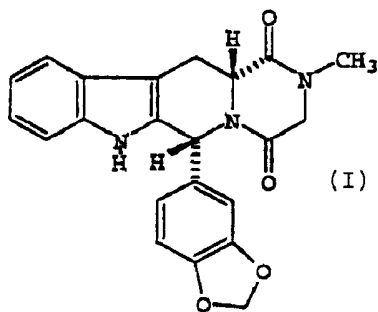
Dr. Karel Čermák, Národní třída 32, Praha 1, 11000

(54) Název vynálezu:

**Farmaceutická jednotková dávková forma a lék  
pro léčbu stavu, při němž je žádoucí inhibice  
fosfodiesterasy PDE5**

(57) Anotace:

Farmaceutická jednotková dávková forma, která obsahuje 1 až 20 mg sloučeniny strukturního vzorce I, kde uvedená dávková forma je vhodná pro perorální podávání. Sloučenina vzorce I je vysoce selektivním inhibitorem fosfodiesterasy typu 5 (PDE5) specifické pro cyklický guanosin-3',5'-monofosfát. Použití jednotkové dávky obsahující 1 až 20 mg sloučeniny strukturního vzorce I pro výrobu léku pro léčbu stavu, při němž je žádoucí inhibice PDE5, jako je sexuální dysfunkce u mužů i žen.



CZ 296534 B6

## Farmaceutická jednotková dávková forma a lék pro léčbu stavu, při němž je žádoucí inhibice fosfodiesterasy PDE5

### 5 Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká farmaceutické jednotkové dávkové formy a léku pro léčbu stavu, při němž je žádoucí inhibice fosfodiesterasy PDE5, jako je léčení sexuální dysfunkce u mužů i žen. Účinnou složkou tohoto léku je vysoce selektivní inhibitor fosfodiesterasy specifické pro cyklický guanosin-3',5'-monofosfát. Zde popsaná forma je výhodná v terapeutických aplikacích, ve kterých je žádoucí inhibice PDE5 s minimalizací nebo eliminací nežádoucích účinků vznikajících v důsledku inhibice jiných fosfodiesteras.

### 15 Dosavadní stav techniky

Biochemické, fyziologické a klinické účinky inhibitorů fosfodiesterasy specifického pro cyklický guanosin-3',5'-monofosfát (cGMP specifické PDE) ukazují na jejich použitelnost u mnoha onemocnění, u kterých je žádoucí modulace funkce hladkého svalstva, ledvin, hemostázy, zánětu a/nebo endokrinního systému. Fosfodiesterasa specifická pro cGMP typu 5 (PDE5) je hlavním enzymem hydrolyzujícím cGMP v hladkém svalstvu cév a byla popsána její exprese v corpus cavernosum penisu (Taher et al., J. Urol. 149, str. 285A (1993)). Proto je PDE5 atraktivním cílem pro léčbu sexuální dysfunkce (Murray, DnandP 6(3), str. 150–56 (1993)).

Farmaceutický prostředek, který poskytuje inhibitor PDE5, je v současnosti prodáván pod obchodním názvem Viagra<sup>(R)</sup>. Aktivní složkou v prostředku Viagra<sup>(R)</sup> je sildenafil. Produkt je prodáván ve formě balení obsahující tablety obsahující 25, 50 a 100 mg sildenafilu a příbalový leták. V příbalovém letáku je uvedeno, že sildenafil je účinnějším inhibitorem PDE5 než jiných známých fosfodiesteras (více než 80-násobně ve srovnání s inhibicí PDE1, více než 1000-násobně ve srovnání s inhibicí PDE2, PDE3 a PDE4). IC<sub>50</sub> pro sildenafil pro PDE5 byla určena jako 3 nM (Drugs and the Future, 22(2), str. 138–143 (1997)) a jako 3,9 nM (Boolel et al., Int. J. of Impotence, 8, str. 47–52 (1996)). Pro sildenafil se uvádí, že má 4000-násobnou selektivitu pro PDE5 versus PDE3, a pouze 10-násobnou selektivitu pro PDE5 versus PDE6. Předpokládá se, že relativní chybění selektivity pro PDE6 je příčinou abnormalit souvisejících s barevným viděním.

Ačkoliv sildenafil dosáhl významného komerčního úspěchu, brzy selhal v důsledku nežádoucích vedlejších účinků, včetně obličejové „flushes“ (incidence 10%). Nežádoucí účinky limitují použití sildenafilu u pacientů s abnormalitami zraku, hypertensí a – což je nejvýznamnější – u jedinců užívajících organické nitráty (Weld et al., Amer. J. of Cardiology, 85 (5A), str. 21(C)–28(C) (1999)).

Použití sildenafilu u pacientů užívajících organické nitráty způsobuje klinicky významný pokles tlaku krevního, který může být pro pacienta nebezpečný. Proto uvádí příbalový leták sildenafilu přísnou kontraindikaci jeho použití současně s organickými nitráty (například nitroglycerinem, isosorbidmononitrátem, isosorbidnitrátem, erythryltetranitrátem) a jinými organickými donory oxidu dusnatého v jakékoliv formě, které jsou užívány pravidelně nebo nárazově, protože sildenafil potencuje hypotenzní účinky nitrátů. Viz C.R. Conti et al., Amer. J. of Cardiology, 83 (5A), str. 29C–34C (1999). Proto zůstává, i přes dostupnost sildenafilu, potřeba nových farmaceutických přípravků vhodných pro léčbu sexuální dysfunkce.

Dauganův patent US 5 859 006 popisuje některé tetracyklické deriváty, které jsou účinnými inhibitory PDE specifické pro cGMP, nebo PDE5. IC<sub>50</sub> sloučenin popsaných v patentu US 5 859 006 je v rozmezí od 1 nM do 10 μM. Orální dávka takových sloučenin je 0,59 mg denně pro průměrného dospělého pacienta (70 kg). Proto jsou popsány dávkové jednotky (tablety nebo kapsle)

obsahující 0,2 až 400 mg aktivní sloučeniny. Významné nežádoucí účinky pro sloučeniny popsané v patentu US 5 859 006 nejsou uvedeny. WO 97/03 675 popisuje použití tetracyklických derivátů podle patentu US 5 859 006 pro léčení impotence.

5

### Podstata vynálezu

Přihlašovatel nyní zjistil, že jeden takový tetracyklický derivát (6R,12aR)-2,3,6,7,12,12a-hexahydro-2-methyl-6-(3,4-methylenedioxyfenyl)-pyrazino[2',1':6,1]pyrido[3,4-b]indol-1,4-diol, alternativně označovaný jako (6R-trans)-6-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2,3,6,7,12,12a-hexahydro-2-methylpyrazino-[1',2':1,6]pyrido[3,4-b]indol-1,4-dion, a zde označovaný jako sloučenina I, může být podáván v dávkové jednotce, která poskytuje účinnou léčbu bez nežádoucích účinků asociovaných s nyní prodáváním inhibitem PDE5, sildenafilem. Před předkládaným vynálezem se předpokládalo, že takové nežádoucí účinky jsou způsobeny inhibicí PDE5.

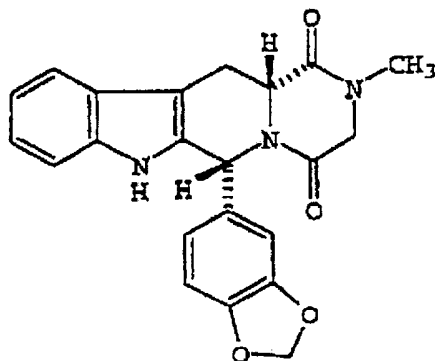
15

Studie provedené přihlašovatelem také ukázaly, že může být připraven účinný prostředek mají sníženou incidenci „flushu“ u vnímavých jedinců. Neočekávaně může být prostředek také podáván bez klinicky významných nežádoucích účinků spojených s kombinovanými účinky inhibitoru PDE5 a organických nitrátů. Proto nejsou kontraindikace, u kterých se předpokládalo, že jsou nutné u prostředku obsahujícího inhibitor PDE5, přítomny, když je sloučenina vzorce I podávána v dávkové jednotce obsahující přibližně 1 až přibližně 20 mg, jak je zde popsáno. Tak poskytuje předkládaný vynález účinnou terapii sexuální dysfunkce u jedinců, kteří byli dříve neléčitelní nebo u kterých byly přítomny významné nežádoucí účinky, včetně jedinců s kardiovaskulárním onemocněním, jako jsou jedinci léčení nitráty, jedinci po infarktu myokardu více než tři měsíce před nasazením terapie sexuální dysfunkce a jedinci s městnavým srdečním selháním 1 stupně, nebo jedinci s abnormalitami zraku.

25

Předmětem vynálezu je farmaceutická jednotka dávková forma, jejíž podstata spočívá v tom že obsahuje 1 až 20 mg (6R,12aR)-2,3,6,7,12,12a-hexahydro-2-methyl-6-(3,4-methylenedioxyfenyl)-pyrazino[2',1':6,1]pyrido[3,4-b]indol-1,4-dionu strukturního vzorce I

30



(I),

kde uvedená dávková forma je vhodná pro perorální podávání.

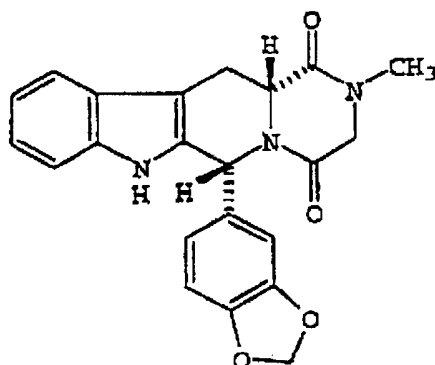
Při léčení onemocnění, při kterých je žádoucí inhibice PDE5, je pacientovi, který potřebuje takovou léčbu, podána orální dávková forma obsahující přibližně 1 až přibližně 20 mg selektivního inhibitoru PDE5, do celkové dávky 20 mg na den. Vhodná dávka pro léčbu sexuální dysfunkce je s výhodou od 1 mg do přibližně 20 mg.

35

Mezi onemocnění, která mohou být léčena způsobem podle předkládaného vynálezu, patří například erektilní dysfunkce u mužů a sexuální dysfunkce u žen, zejména porucha vzrušivosti u žen, též známý jako porucha sexuální vzrušivosti u žen.

40

Předmětem vynálezu je dále také použití jednotkové dávky obsahující 1 až 20 mg sloučeniny strukturního vzorce I



(I),

5 pro výrobu léku pro léčbu stavu, při němž je žádoucí inhibice fosfodiesterázy PDE5, jako je léčba sexuální dysfunkce

V popisu předkládaného vynálezu jsou použity následující termíny a zkratky.

10 Termín „zásobník“ označuje jakoukoliv nádobu a víko vhodnou pro skladování, transport, odebrání a/nebo manipulaci s farmaceutickým prostředkem.

Hodnota „IC<sub>50</sub>“ je hodnota měřící účinnost sloučeniny v inhibici konkrétního PDE enzymu (například PDE1, PDE5 nebo PDE6). IC<sub>50</sub> je koncentrace sloučeniny, která vede k 50% inhibici enzymu v pokusu podání jedné dávky – reakce. Určení hodnoty IC<sub>50</sub> pro sloučeninu je snadno  
15 provedeno způsobem in vitro, který je obecně popsán v Y. Cheng et al., Biochem. Pharmacol. 22, str. 3099–3108 (1973).

Termín „příbalový leták“ označuje informaci přiloženou k výrobku, která popisuje způsob podání výrobku a data týkající se bezpečnosti a účinnosti nutná pro informované rozhodování lékaře, farmaceuta a pacienta o výrobku.  
20

Termín „orální dávková forma“ označuje obecně farmaceutické prostředky podávané orálně. Mezi orální dávkové formy patří kapalné prostředky, tablety, kapsle a gelové kapsle.

25 Termín „abnormality zraku“ označuje abnormality vidění, charakterizované modro-zeleným viděním, o kterém se soudí, že je způsobeno inhibicí PDE6.

Termín „flush“ označuje epizodické zarudnutí obličeje a krku způsobené vazodilatací způsobenou lékem, obvykle v kombinaci s pocitem tepla v obličeji a krku a někdy doprovázené pocením.  
30

Termín „volný lék“ označuje pevné částice léku nezanořené v polymerní ko-sraženině.

Dávková forma podle předkládaného vynálezu je výhodně balena jako prostředek pro farmaceutické použití u člověka, který obsahuje příbalový leták, zásobník a dávkovací formu obsahující  
35 přibližně 1 až přibližně 20 mg sloučeniny I.

Příbalový leták popisuje způsob podání výrobku a data týkající se bezpečnosti a účinnosti nutná pro informované rozhodování lékaře, farmaceuta a pacienta o výrobku. Příbalový leták je obvykle považován za návod k farmaceutickému prostředku. Příbalový leták přiložený k výrobku  
40 uvádí, že sloučenina je použitelná pro léčbu onemocnění, při kterých je žádoucí inhibice PDE5. Příbalový leták také uvádí návod pro podání jedné nebo více přibližně 1 až přibližně 20 mg dávkových jednotek, podle potřeby, do maximální celkové denní dávky 20 mg. Výhodně je podanou dávkou přibližně 5 mg až přibližně 20 mg/den, lépe přibližně 5 mg až přibližně 15 mg/den. Nejlépe je 10 mg dávková forma podána jednou za den.

Výhodným onemocněním, které je léčeno způsobem podle předkládaného vynálezu, je sexuální dysfunkce (včetně erektilní dysfunkce u mužů a sexuální dysfunkce (včetně erektilní dysfunkce u mužů a sexuální dysfunkce u žen, zejména poruchy vzrušivosti u žen (FAD)). Nejvhodnějším

5

Významné je, že příbalový leták doporučuje použití prostředku pro léčbu sexuální dysfunkce u pacientů trpících onemocněním sítnice nebo retinitis pigmentosa, nebo u pacientů užívajících organické nitráty. Příbalový leták tedy neuvádí kontraindikace spojené s těmito stavy, zejména

10

nekontraindikuje podávání dávkové formy s organickými nitráty. Příbalový leták také neuvádí varování kontraindikující užívání léku u pacientů s onemocněním sítnice, zejména retinitis pigmentosa, a u jedinců s abnormalitami zraku. Příbalový leták také popisuje incidenci flushe u pacientů užívajících tuto dávkovací formu nižší než 2%, výhodně nižší než 1 % a nejlépe nižší než 0,5 %. Incidence flushe ukazuje na značené zlepšení ve srovnání se známými farmaceutickými

15

zásobník použitý pro výrobek je běžný zásobník. Obvykle se jedná o blistrové balení, foliové balení, skleněnou nebo plastovou lékovku s uzávěrem, nebo o jiný vhodný zásobník pro použití pacientem nebo lékařem. Výhodně má zásobník velikost vhodnou pro 1 až 1000 pevných dávkových jednotek, lépe pro 1 až 500 pevných dávkových jednotek a nejlépe pro 5 až 30 pevných dávkových jednotek.

20

Mezi orální dávkové formy patří kapalné prostředky, tablety, kapsle a gelové kapsle. Výhodně jsou dávkovými formami pevné dávkové formy, konkrétně tablety obsahující přibližně 1 až přibližně 20 mg sloučeniny I. Jakékoliv farmaceuticky přijatelné přísady pro orální aplikaci jsou vhodné pro přípravu takových dávkových forem. Vhodné farmaceutické dávkové formy zahrnují ko-precipitované formy popsané v, například, Butlerově patentu US 5 985 326, který je zde uveden jako odkaz. Ve výhodných provedeních je dávkovou jednotkou podle předkládaného vynálezu současně vysražená forma sloučeniny I neobsahující volnou pevnou sloučeninu, ale lépe obsahuje dávková jednotka podle předkládaného vynálezu pevnou sloučeninu jako volný lék.

25

30

Výhodně obsahují tablety farmaceutické přísady obecně považované za bezpečné, jako je laktosa, mikrokrytická celulóza, škrob, uhličitán vápenatý, magnesium-stearát, kyselina stearová, talek a koloidní oxid křemičitý, a tyto tablety jsou připraveny standardními farmaceutickými způsoby, jak jsou popsány v Remington's Pharmaceutical Sciences, 18. vydání, Mack Publishing Co., Easton, PA (1990). Mezi takové techniky patří, například, granulování za vlhka, po kterém následuje sušení, mletí a lisování do tablet s nebo bez potahování filmem; granulování za sucha, po kterém následuje mletí a lisování do tablet s nebo bez potahování filmem; mísení za sucha, po kterém následuje lisování do tablet, s nebo bez potahování filmem; odlívání tablet; granulování za vlhka, sušení a plnění do želatinových kapslí; mísení za sucha a plnění do želatinových kapslí; nebo příprava suspenzí a roztoků a plnění do želatinových kapslí. Obvykle obsahují pevné dávkové formy identifikační značky, které jsou vylisovány nebo vytlačeny na povrchu

35

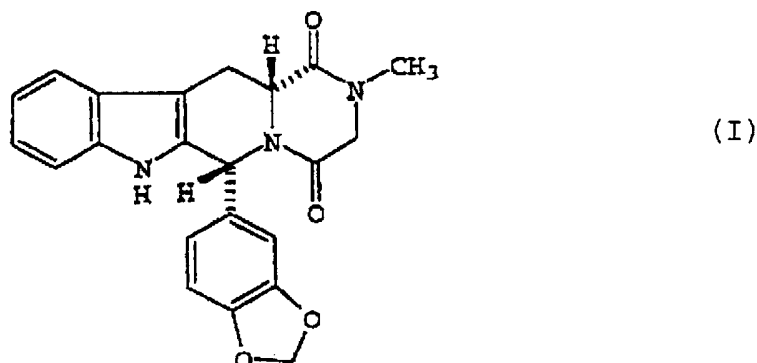
40

Předkládaný vynález je založen na podrobných pokusech a klinických studiích, ve kterých bylo neočekávaně zjištěno, že vedlejší účinky, o kterých se dříve předpokládalo, že jsou způsobeny inhibicí PDE5, mohou být redukovány na klinicky nevýznamnou úroveň pomocí výběru sloučeniny a dávkové jednotky. Toto neočekávané zjištění umožnilo vývoj dávkové jednotky obsahující sloučeninu I v dávce přibližně 1 až přibližně 20 mg, která po orálním podání minimalizuje nežádoucí vedlejší účinky, o kterých se dříve soudilo, že jsou nevyhnutelné. Mezi takové vedlejší účinky patří obličejový „flush“, abnormality zraku a významné snížení krevního tlaku, ke kterým dochází tehdy, když je sloučenina vzorce I podána samostatně nebo v kombinaci s organickými nitráty. Minimální efekt sloučeniny I, podané v dávce dávkové jednotce obsahující přibližně 1 až přibližně 20 mg, na PDE6, také umožňuje podání selektivního inhibitoru PDE5 pacientům s onemocněním sítnice, jako je diabetická retinopatie nebo retinitis pigmentosa.

50

55

Sloučenina I má následující strukturální vzorec:



V klinických studiích na člověku bylo prokázáno, že sloučenina strukturálního vzorce I má minimální vliv na systolický krevní tlak, když je podávána současně s organickými nitráty. Naopak, sildenafil vykazuje 4–násobně vyšší snížení systolického krevního tlaku ve srovnání s placebem, což vede ke kontraindikacím Viagry<sup>(R)</sup> a k opatrnosti u některých pacientů.

Následující tabulka ilustruje IC<sub>50</sub> hodnoty pro PDE5 a PDE6 pro sloučeninu strukturálního vzorce I, které byly určeny zde popsaným způsobem.

| Sloučenina | IC <sub>50</sub> PDE5 (nM) | IC <sub>50</sub> PDE6 (nM) | PDE6/PDE5 |
|------------|----------------------------|----------------------------|-----------|
| I          | 2,5                        | 3400                       | 1360      |

Sloučenina strukturálního vzorce I dále vykazuje IC<sub>50</sub> pro PDE1c 10000 a poměr PDE1c/PDE5 4000.

#### Příklady provedení vynálezu

Následující příklady ilustrují předkládaný vynález, jeho rozsah není uvedenými příklady nijak omezen.

#### Přípravy

##### Příprava lidské PDE5

Rekombinantní produkce lidské PDE5 byla provedena způsobem popsaným v příkladu 7 patentu US 5 702 936, který je zde uveden jako odkaz, s výjimkou použitého kvasinkového transformačního vektoru, který byl odvozen od základního ADH2 plasmidu popsaného v V. Price et al., Methods in Enzymology, 1985, strany 308–318 (1990), který obsahoval kvasinkový ADH2 promotor a terminátor místo ADH1 promotoru a terminátoru, a s tím rozdílem, že použitý kmen *Saccharomyces cerevisiae* byl proteasa-deficientní kmen BJ2–54 uložený 31.8. 1998 v American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, pod přírůstkovým číslem ATCC 74465. Transformované hostitelské buňky byly kultivovány ve 2x SC–leu médiu, pH 6,2, se stopovými prvky a vitamíny. Po 24 hodinách se přidalo YEP médium obsahující glycerol v konečné koncentraci 2x YEP/3% glycerol. O přibližně 24 hodin později se buňky odebraly, promyly a uskladnily se při teplotě –70 °C.

Buněčné pelety (29 g) se rozpustily na ledu stejným způsobem lyzačního pufru (25 mM Tris–Cl, pH 8, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,25 mM dithiothreitol, 1 mM benzamid a 10 μM ZnSO<sub>4</sub>). Buňky se lyzují v mikrofluidizačním zařízení pomocí N<sub>2</sub> při 20000 psi. Lyzát se odstředí a přefiltruje se přes 0,45 μm vyjmutelné filtry. Filtrát se vnese do 150 ml kolony Q Sepharose Fast Flow (Pharmacia). Kolona se promyje 1,5 objemem pufru A (20 mM Bis–Tris propan, pH 6,8, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,25 mM dithiothreitolu, 10 μM ZnSO<sub>4</sub>) a eluuje se krokovým gradientem 125 mM NaCl v pufru A a potom lineárním gradientem 125 až 1000 mM NaCl v pufru A.

Aktivní frakce z lineárního gradientu se aplikují do 180 ml keramické hydroxyapatitové kolony v pufru B (20 mM Bis-Tris propan, pH 6,8, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,25 mM dithiothreitolu, 10  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$  a 250 mM KCl). Po naplnění se kolona promyje 2 objemy pufru B a eluuje se lineárním gradientem 0 až 125 mM fosforečnanu draselného v pufru B. Aktivní frakce se odeberou, vysráží se 60% síranem amonným a resuspendují se v pufru C ((20 mM Bis-Tris propan, pH 6,8, 125 mM NaCl, 0,5 mM dithiothreitolu, 10  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ ). Odebraný materiál se vnese do 140 ml kolony Sephacryl S-300 HR a tato se eluuje pufrem C. Aktivní frakce se naředí na 50% glycerolem a uskladní se při teplotě  $-20^\circ\text{C}$ . Získané přípravky měly přibližně 85% čistotu podle SDS-PAGE.

#### Test na PDE aktivitu

Aktivita PDE5 může být měřena standardními používanými testy. Například může být specifická aktivita PDE určena následujícím způsobem PDE testy využívající techniky separace na aktivním uhlí se provedou v podstatě způsobem popsáným v Loughney et al., (1996), The Journal of Biological Chemistry, 271: 796–806. V tomto testu aktivita PDE5 konvertuje  $[\text{}^{32}\text{P}]\text{cGMP}$  na  $[\text{}^{32}\text{P}]\text{5'GMP}$  úměrně množství přítomné aktivity PDE5.  $[\text{}^{32}\text{P}]\text{5'GMP}$  se potom kvantitativně přemění na volný  $[\text{}^{32}\text{P}]$  fosfát a neznačený adenosin působením 5'-nukleotidasy hadího jedu. Proto je množství  $[\text{}^{32}\text{P}]$  fosfatové aktivity úměrné aktivitě enzymu. Test se provádí při  $30^\circ\text{C}$  ve 100  $\mu\text{l}$  reakční směsi obsahující (konečné koncentrace) 40 mM Tris-Cl (pH 8,0), 1  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ , 5 mM  $\text{MgCl}_2$  a 0,1 mg/ml hovězího sérového albuminu. PDE5 je přítomna v množství, které vede k <30% celkové hydrolýze substrátu (lineární testovací podmínky). Test se zahájí přidáním substrátu (1 mM  $[\text{}^{32}\text{P}]\text{cGMP}$ ) a směs se inkubuje po dobu 12 minut. Potom se přidá 75  $\mu\text{g}$  jedu *Crotalus atrox* a inkubace pokračuje po dobu 3 dalších minut (celkem 15 minut). Reakce se ukončí přidáním 200 ml aktivního uhlí (suspenze 25 mg/ml v 0,1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 4). Po odstředění (750 x g, 3 minuty) za účelem sedimentování aktivního uhlí se odebere vzorek supernatantu pro stanovení radioaktivity ve scintilačním počítací a vypočte se aktivita PDE5. Přípravky měly specifické aktivity okolo 3  $\mu\text{mol}$  cGMP hydrolyzovaných za minutu na mg proteinu.

#### Příprava hovězí PDE6

Hovězí PDE6 byla získána od Dr. N. Virmaux, INSERM U338, Strاسبourg. Hovězí sítnice byly připraveny způsobem popsáným v Virmaux et al., FEBS Letters, 12(6), str. 325–328 (1971) a též v A. Sitaramayya et al., Exp. Eye Res, 25, str. 163-169 (1977). Stručně, všechny úkony byly provedeny v chladu a v tmavě červeném světle. Oči byly uchovávány v chladu a temnu do čtyř hodin po porážce.

Příprava zevního segmentu hovězí sítnice (ROS) byla provedena v podstatě způsobem popsáným ve Schichi et al., J. Biol. Chem. 224: 529 (1969). V typickém experimentu se 35 hovězích sítnic rozdrtilo ve třetí misce s 35 ml 0,066 M fosfátového pufru, pH 7,0, obsahujícího 40 % sacharosy, a potom se provedla homogenizace v Potterově homogenizačním zařízení (20 pohybů nahoru a dolů). Suspenze se odstředí při 25000 x g během 20 minut. Peleta se homogenizuje v 7,5 ml 0,006 M fosfátového pufru (40 % v sacharose) a opatrně se převrství 7,5 ml fosfátového pufru (neobsahujícího sacharosu). Odstředění se provede na vyklápěcí odstředivce při 45000 x g během 20 minut a získá se peleta, která je naspodu černá, a také červený proužek na rozhraní 0,066 M fosfátu – 40 % sacharosy/0,066 M fosfátu (surový ROS). Červený materiál na rozhraní se odstraní, naředí se fosfátovým pufrem, odstředí se na peletu a redistribuuje se v pufrované 40% sacharose způsobem popsáným výše. Tento proces se opakuje 2– až 3–krát, dokud se netvoří žádná peleta. Přechištěný ROS se promyje ve fosfátovém pufru a nakonec se odstředí při 25000 x g během 20 minut za zisku pelety. Všechny materiál se uchovává zmražený do použití.

Hypotetické extrakty se připraví suspendováním izolovaného ROS v 10 mM Tris-Cl, pH 7,5, 1 mM EDTA a 1 mM dithiothreitolu a potom odstředěním při 100000 x g po dobu 30 minut.

Přípravky měly specifické aktivity okolo 35 nmol cGMP hydrolyzovaných za minutu na mg proteinu.

#### Příprava PDE1c z buněk *Spodoptera frugiperda* (Sf9)

- 5 Buněčné pelety (5 g) se rozpustily na ledu 20 ml lyzačního pufru (50 mM MOPS, pH 7,4, 10  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub>, 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 2 mM benzamidin-HCl, 5  $\mu$ g/ml pepstaninu, 5  $\mu$ g/ml leupeptinu a 5  $\mu$ g/ml aprotininu). Buňky se lyzovaly protlačením přes Frenchův buněčný lis (SLC-Aminco) za udržování teploty pod 10 °C. Získaný homogenizát buněk se odstředil při 36000 rpm při 4 °C během 45 minut v Beckmannově ultraodstředivce za použití rotoru typu
- 10 TI45. Supernatant se odstranil a získaná peleta se resuspendovala v 40 ml solubilizačního pufru (lyzační pufr obsahující 1M NaCl, 0,1 M MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 20  $\mu$ g/ml kalmmodulinu a 1% sulfofobetaín SB12 (Z3-12) sonikací za použití VibraCell přístroje s mikrohrotem po dobu 3 x 30 sekund. Toto se provedlo ve směsi drcený led/sůl pro chlazení. Po sonikaci se směs pomalu mísila po dobu 30 minut při 4 °C pro dokončení solubilizace proteinů navázaných na
- 15 membránu. Tato směs se odstředila na Beckman ultraodstředivce za použití rotoru typu TI45 při 36000 rpm během 45 minut. Supernatant se naředil lyzačním pufrem obsahujícím 10  $\mu$ g/ml kalpainového inhibitoru I a II. Vysrážený protein se odstředil během 20 minut při 9000 rpm na Beckman JA-10 odstředivce. Získaný supernatant se potom zpracoval Mimetic Brue AP agarosovou chromatografií.

- 20 Pro zpracování na Mimetic Blue AP agarosové koloně se pryskyřice nejprve chránila aplikací 10 objemů kolony 1% polyvinylpyrrolidinu (tj. molekulová hmotnost 40000) pro blokování nespecifických vazebných míst. Slabě navázaný PVP-40 se odstranil promytím 10 objemy kolony 2M NaCl a 10 mM natrium-citrátu, pH 3,4. Těsně před přidáním vzorku solubilizované
- 25 PDE1c3 se kolona uvedla do rovnováhy 5 objemy kolony kolonového pufru A (50 mM MOPS, pH 7,4, 10  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub>, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 2 mM benzamidin-HCl).

- Solubilizovaný vzorek se aplikoval do kolony při průtoku 2 ml za minutu s recyklací, takže byl vzorek aplikován celkem 4 až 5-krát během 12 hodin. Po ukončení plnění se kolona promyla
- 30 10 objemy kolony kolonového pufru A a potom 5 objemy kolony kolonového pufru B (kolonový pufr A obsahující 20 mM 5'-AMP) a potom 5 objemy kolony kolonového pufru C (50 mM MOPS, pH 7,4, 10  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub>, 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM dithiothreitol a 2 mM benzamidin-HCl). Enzym se eluoval do tří postupných frakcí. První frakce se skládala z enzymu z promytí 5 objemy kolony kolonového pufru C obsahujícího 1 mM cAMP. Druhá frakce se skládala
- 35 z enzymu z promytí 10 objemy kolony kolonového pufru C obsahujícího 1 mM NaCl. Třetí frakce se skládala z enzymu z promytí 5 objemy kolony kolonového pufru C obsahujícího 1 M NaCl a 1 mM cAMP.

- Aktivní enzymové frakce se odebraly a cyklický nukleotid se odstranil pomocí běžné gelové filtrační chromatografie nebo chromatografie na hydroxyapatitové pryskyřici. Po odstranění cyklický
- 40 nukleotidů se enzymové frakce dialyzovaly proti dialyzačnímu pufru obsahujícímu 25 mM MOPA, pH 7,4, 10  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM dithiothreitolu a 1 mM benzamidin-HCl, a potom se provedla dialýza proti dialyzačnímu pufru obsahujícímu 50 % glycerilu. Enzym se rychle zmrazila pomocí suchého ledu a uskladnil se při teplotě -70 °C.

- 45 Získané přípravky měly přibližně > 90% čistotu podle SDS-PAGE. Tyto přípravky měly specifické aktivity přibližně 0,1 až 1,0  $\mu$ mol cAMP hydrolyzovaného za minutu na mg proteinu.

#### Určení IC<sub>50</sub>

- 50 Důležitým parametrem při hodnocení účinnosti kompetitivního inhibitoru enzymu PDE5 a/nebo PDE1c a PDE6 je inhibiční konstanta, tj. K<sub>i</sub>. Tento parametr může být přibližně určen stanovením IC<sub>50</sub>, což je inhibiční koncentrace, která vede k 50% inhibici aktivity enzymu, v pokusu jedna dávka-reakce provedeném za následujících podmínek.

Koncentrace inhibitoru je mnohem vyšší než koncentrace enzymu, takže koncentrace volného inhibitoru (která je neznámá) je přibližně stejná jako celková koncentrace inhibitoru (která je známá).

5

Je vybrán vhodný rozsah koncentrací inhibitoru (tj. v pokusu jsou použity koncentrace alespoň několikrát vyšší a několikrát nižší než  $K_i$ ). Obvykle jsou koncentrace inhibitoru v rozmezí od 10 mM do 10  $\mu$ M.

- 10 Koncentrace enzymu a substrátu jsou vybrány tak, aby byly méně než 20 % substrátu spotřebovaného za nepřítomnosti inhibitoru (při – například – maximální hydrolýze substrátu od 10 do 15 %), takže aktivita enzymu je během testu přibližně konstantní.

- 15 Koncentrace substrátu je menší než 1/10 Michaelisovi konstanty ( $K_m$ ). Za těchto podmínek se bude  $IC_{50}$  velmi blížit  $K_i$ . Toto vyplývá z Cheng–Presuffovi rovnice týkající se těchto dvou parametrů:  $IC_{50} = K_i (1 + S/K_m)$ , kde  $(1 + S/K_m)$  je přibližně 1 při nízkých hodnotách výrazu  $S/K_m$ .

- 20 Hodnota  $IC_{50}$  je vyhodnocena z dat pomocí vhodného modelu interakce enzym–inhibitor. Pokud je známo, že tato interakce zahrnuje prostou kompetici inhibitoru se substrátem, může být použit dvouparametrový model:

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

- kde Y je aktivita enzym měřena při koncentraci x inhibitoru, A je aktivita za nepřítomnosti inhibitoru a B je  $IC_{50}$ . Viz Y. Chentg et al., Biochem. Pharmacol. 22: 3099–3108 (1973).

25

- Vlivy inhibitorů podle předkládaného vynálezu na enzymatickou aktivitu PDE5 a PDE6 v přípravcích popsaných výše byly hodnoceny ve dvou testech, které se od sebe lišily v rozsahu a které vedly k v podstatě stejným výsledkům ve smyslu hodnot  $IC_{50}$ . Oba testy byly modifikacemi postupu podle Well set al., Biochim. Biophys. Acta, 384: 430 (1975). První test byl proveden v celkovém objemu 200  $\mu$ l obsahujícím 50 mM Tris, pH 7,5, 3 mM Mg acetátu, 1 mM EDTA, 50  $\mu$ g/ml nukleotidasy z hadího jedu a 50 nM [ $^3$ H]–cGMP (Amarsham). Sloučeniny podle předkládaného vynálezu se rozpustily v DMSO a v testu byly použity v konečné koncentraci 2 %. Testy se inkubovaly po dobu 30 minut při 30 °C a ukončily se přidáním 800  $\mu$ l 10 mM Tris, pH 7,5, 10 mM EDTA, 10 mM theofyllinu, 0,1 mM adenosinu a 0,1 mM guanosinu. Směsi se vnesly do 0,5 ml QAE Sephadex kolon, které se eluovaly 2 ml 0,1 M formiátu (pH 7,4). Eluovaná radioaktivita se měřila scintilačním počítacem v Optiphase Hisafe 3.

- 40 Druhý PDE test provedený na mikroplošně se provedl za použití Multiscreen ploten a vakuového rozdělovače. Testovací směs (100  $\mu$ l) obsahovala 50 mM Tris, pH 7,5, 5 mM Mg acetátu, 1 mM EDTA a 250  $\mu$ g/ml nukleotidasy z hadího jedu. Další složky reakční směsi byly stejné jako výše. Na konci inkubace se celý objem směsi vnesl filtrací do QAE Sephadex mikrokolony. Volná radioaktivita se eluovala 200  $\mu$ l vody, za kterých se 50  $\mu$ l podíly analyzovaly na scintilačním počítací na způsobem popsaným výše.

- 45 Příklad 1

- 50 Sloučenina I se připravila způsobem popsaným v patentu US 5 859 006 a připravila se ve formě tablet za použití granulování za vlhka. Povidon se rozpustil ve vodě za zisku 10% roztoku. Aktivní sloučenina, mikrokrytalická celulóza, kroskarmelosa sodná a laurylsíran sodný se přidávají do mísicího zařízení s vysokým střihem a mísí se po dobu 2 minut. Prášek se granuluje za vlhka s roztokem povidonu a voda se přidává podle potřeby pro dokončení granulace. Získaná směs se suší v sušičce s fluidním ložem při teplotě vstupního vzduchu 70 °C  $\pm$  5 °C dokud nejsou ztráty při sušení menší než 2,5 %. Granule se prosejí přes Comil s vhodným sítem a přidávají se do vhodného mísicího zařízení. Extragranulární kroskarmelosa sodná a laurylsíran sodný, a koloidní

bezvodý oxid křemičitý se prosejí přes vhodné síto (například 500 mikronové) a přidají se do mísičného zařízení a směs se mísí po dobu 5 minut. Přidá se magnesium–stearát a směs se mísí po dobu 2 minut. Směs se lisuje na požadovanou kompresi/hmotnost 250 mg za použití 9 mm kulatého normálního konkávního razidla.

5

Tabletová jádra se potahují vodnou suspenzí Opadry OY–S–7322 za použití Accelacota (nebo podobné potahovací pícky) za použití teploty vstupního vzduchu 50 °C až 70 °C, dokud se hmotnost tablety nezvýší o přibližně 8 mg. Opadry OY–S–7322 obsahuje methylhydroxypropylcelulosu podle Evropského lékopisu, oxid titaničitý podle Evropského lékopisu, Triacetin USP. Opadry zvyšuje hmotnost každé tablety na 258 mg. Množství potahovacího filmu aplikované na tabletu může být nižší než uvedené množství, podle účinnosti procesu.

10

Tablety se vloží do blistrových balení a přiloží se k nim příbalový leták popisující bezpečnost a účinnost sloučeniny.

15

| Složka                                   | Prostředky (mg na tabletu) |                |
|------------------------------------------|----------------------------|----------------|
| Selektivní inhibitor PDE 5 <sup>1</sup>  | 1                          | 5              |
| Hydroxypropylmethylcelulosafталát        | 1                          | 5              |
| Mikrokrystalická celulósa                | 221,87                     | 213,87         |
| Kroskarmelosa sodná                      | 5,00                       | 5,00           |
| Laurylsíran sodný                        | 2,50                       | 2,50           |
| Povidon K30                              | 3,38                       | 9,38           |
| Přečištěná voda, USP (voda pro irrigaci) | q.s.                       | q.s.           |
| Kroskarmelosa sodná                      | 5,00                       | 5,00           |
| Laurylsíran sodný                        | 2,50                       | 2,50           |
| Koloidní bezvodý oxid křemičitý          | 0,50                       | 0,50           |
| Magnesium–stearát                        | 1,25                       | 1,25           |
| Jádro tablety celkem                     | 250,0                      | 250,0          |
| (Potahovací film Opadry OY–S–7322)       | přibližně 8 mg             | přibližně 8 mg |

<sup>1</sup> Sloučenina (I)

## Příklad 2

20 Následující složky se použijí pro přípravu dávkové formy obsahující 10 mg sloučeniny I.

| Složka                                     | Množství (mg)   |
|--------------------------------------------|-----------------|
| Granulace                                  |                 |
| Selektivní inhibitor PDE5 <sup>1</sup>     | 10,00           |
| Monohydrát laktosy                         | 153,80          |
| Monohydrát laktosy (sušený postříkem)      | 25,00           |
| Hydroxypropylcelulósa                      | 4,00            |
| Kroskarmelosa sodná                        | 9,00            |
| Hydroxypropylcelulósa (EF)                 | 1,75            |
| Laurylsíran sodný                          | 0,70            |
| Extragranulární prášky                     |                 |
| Mikrokrystalická celulósa (granulární–102) | 37,50           |
| Kroskarmelosa sodná                        | 7,00            |
| Magnesium–stearát (rostlinný)              | 1,25            |
| Celkem                                     | 250 mg          |
| Potahovací film                            | přibližně 11,25 |

Při výrobě tablet se použije přečištěná voda, USP. Voda se odstraňuje během zpracování a v konečném produktu zůstává minimální koncentrace.

Tablety se připraví procesem granulování za vlhka, který se provede následujícím způsobem. Lék a granulované přísady se prosejí. Selektivní inhibitor PDE5 se smísí za sucha s monohydrátem laktosy (sušeným postříkem), hydroxypropylcelulosou, kroskamelosou sodnou a monohydrátem laktosy. Získaná prášková směs se granuluje s vodným roztokem hydroxypropylcelulosy a laurylsíranu sodného za použití Powrex nebo jiného vhodného granulačního zařízení s vysokým stříhem, další voda může být přidávána pro dosažení konečného výsledku. Mlýnek může být použit pro zrozdrcení hrudek vlhkého granulátu a pro usnadnění sušení. Materiál získaný vlhkou granulací se suší za použití buď sušičky s fluidním ložem, nebo sušicí pícky. Po usušení může být materiál proset pro eliminaci větších aglomerátů. Mikrokrystalická celulóza, kroskarmelosa sodná a magnesium–stearát se prosejí a přidají se k suchým prosetým granulím. Tyto přísady a suché granule se mísí do zisku uniformní směsi za použití mísicího bubnu, lopatkové míchačky nebo jiného vhodného mísicího zařízení. Mísení může být rozděleno do dvou fází. Mikrokrystalická celulóza, kroskarmelosa sodná a suché granule se přidají do míchacího zařízení a mísí se v první fázi, a potom se přidá k této směsi magnesium–stearát a proveden se mísení ve druhé fázi.

Promísená směs se potom lisuje do tablet za použití rotačního lisovacího přístroje. Tabletová jádra se potáhnou filmem za použití vodné suspenze vhodné barvy v potahovací píce (např. Accela Cota). Potahované tablety mohou být lehce poprášeny talkem pro zlepšení manipulace s tabletami.

Tablety se plní do plastových zásobníků (30 tablet/zásobník) a přiloží se k nim příbalový leták popisující bezpečnost a účinnost sloučeniny.

#### 25 Příklad 3

Následující složky se použijí pro přípravu dávkové formy obsahující 5 mg sloučeniny I.

| Složka                                     | Množství (mg)   |
|--------------------------------------------|-----------------|
| Granulace                                  |                 |
| Selektivní inhibitor PDE5 <sup>1</sup>     | 2,50            |
| Monohydrát laktosy                         | 79,395          |
| Monohydrát laktosy (sušený postříkem)      | 12,50           |
| Hydroxypropylcelulóza                      | 2,00            |
| Kroskarmelosa sodná                        | 4,50            |
| Hydroxypropylcelulóza (EF)                 | 0,875           |
| Laurylsíran sodný                          | 0,35            |
| Extragranulární prášky                     |                 |
| Mikrokrystalická celulóza (granulární-102) | 18,75           |
| Kroskarmelosa sodná                        | 3,50            |
| Magnesium–stearát (rostlinný)              | 0,63            |
| Celkem                                     | 125 mg          |
| Potahovací film                            | přibližně 6,875 |

Dávková forma z příkladu 3 se připraví stejným způsobem jako dávková forma z příkladu 2.

#### 30 Příklad 4

| Kapsle obsahující roztok               |           |              |
|----------------------------------------|-----------|--------------|
| Složka                                 | mg/kapsli | Procento (%) |
| Selektivní inhibitor PDE5 <sup>1</sup> | 10        | 2            |
| PEG40 NF                               | 490       | 98           |
| Hmotnost náplně                        | 500       | 100          |

Dutina želatinové kapsle se naplní přesným objemem náplně tvořené rozpuštěným přípravkem léku. Ihned po injikování roztoku léku do kapsle se kapsle uzavře teplem.

Kapsle se plní do plastového zásobníku a přiloží se k nim příbalový leták.

5

#### Příklad 5

Tato studie byla nahodilá, dvojitě slepá, placebem kontrolovaná, dvojitě překřížená klinická farmakologická studie interakcí léku, která hodnotila hemodynamické účinky současného podávání selektivního inhibitoru PDE5 (tj. sloučeniny I a krátkodobě působících nitrátů na zdravé dobrovolníky mužského pohlaví. V této studii byla jedincům denně po dobu 7 dnů podávána buď sloučenina I v dávce 10 mg, nebo placebo. V den 6 nebo 7 byl jedincům podán sublinguálně nitroglycerin (0,4 mg), když leželi na zádech na sklopném stole. Nitroglycerin byl podán 3 hodiny po aplikaci sloučeniny I všichni jedinci se podrželi nitroglycerinovou tabletu po jazykem, dokud se nerozpustila. Jedinci se nakláněli do sklonku 70° hlavou nahoru každých 5 minut po dobu 30 minut za měření krevního tlaku a pulsu. U 22 jedinců (ve věku 19 až 60 let) nedošlo k vyřazení ze studie.

Podle předběžné analýzy této studie byly sloučenina I dobře tolerována a nebyly pozorovány závažně nežádoucí účinky. Nebyly pozorovány změny způsobené sloučeninou I v laboratorním vyšetření ani ve 12-svodovém EKG. Nejčastějšími nežádoucími účinky byly bolest hlavy, dyspepsie a bolesti v zádech. Sloučenina I vykazovala minimální, pokud nějaký, vliv na průměrný systolický tlak a průměrné maximální nitroglycerinem indukované snížení systolického krevního tlaku.

#### Příklad 6

Ve dvou nahodilých, dvojitě zaslepených, placebech kontrolovaných studiích byla sloučenina I podávána pacientům potřebujícím takovou léčbu v různých dávkách, jak v denní terapii, tak podle potřeby pro sexuální styk mimo nemocnici. Dávky od 5 do 20 mg sloučeniny I byly účinné a měly incidenci méně než 1% flushe a nebyly popsány abnormality vidění. Bylo zjištěno, že dávka 10 mg sloučeniny I je plně účinná a má minimální nežádoucí účinky.

Zlepšení erektilní funkce bylo zjištěno podle Mezinárodního indexu erektilní funkce (IIEF) (Rosen et al., Urology 49, str. 822–830 (1997)), diáře sexuálních pokusů a dotazníků celkového uspokojení. Sloučenina I významně zlepšovala procento úspěšných sexuálních styků včetně schopnosti dosáhnout a udržet erekci jak při „příležitostném“, tak při pravidelném denním podávání.

#### Příklad 7

Třetí klinická studie byla nahodilá, dvojitě zaslepená, placebem kontrolovaná studie, při které byla sloučenina I podávána příležitostně mužům s erektilní dysfunkcí. Sloučenina I byla podávána při léčbě mužské erektilní dysfunkce (ED) po dobu 8 týdnů. Erektilní dysfunkce (ED) je definována jako přetrvávající neschopnost dosáhnout a/nebo udržet erekci dostatečně pro uspokojivou sexuální výkonnost. „Příležitostně“ podávání je definováno jako občasné podávání sloučeniny I před očekávanou sexuální aktivitou.

Studovaná populace se skládala z 212 mužů ve věku alespoň 18 let, se střední až těžkou erektilní dysfunkcí. Sloučenina I se podávala orálně ve formě tablet ko-sraženiny vyrobených podle Butlerova patentu US 5 983 326. Sloučenina I se podávala v dávkách 2 mg, 5 mg, 10 mg a 25 mg, „příležitostně“ a ne častěji než 1–krát za 24 hodin. Během studie nebylo povoleno užívání nitrátů, azolových antimykotik (například ketokenazolu nebo itakonazolu), warfarinu, erythromycinu nebo antiandrogenů. Nebylo povoleno užívání žádné jiné schválené medikace, léčby nebo prostředků. 41 jedincům bylo podáváno placebo.

Dvěma primárními sledovanými hodnotami účinnosti byly schopnost jedince sexuálně se stýkat s partnerem a schopnost jedince udržet erekci během sexuálního styku, jak je měřena Mezinárodním indexem erektilní funkce (IIEF). IIEF dotazník obsahuje 15 otázek a jedná se o stručné a spolehlivé měření erektilní funkce. Viz Rosen et al., Urology 49, str. 822–830 (1997).

5

Sekundárními parametry byly IIEF skóre pro erektilní funkci, orgasmus, sexuální žádostivost, uspokojení ze sexuálního styku a celková spokojenost; schopnost pacienta dosáhnout erekce, schopnost zasunout penis do vagíny partnera, dokončení sexuálního styku s ejakulací, spokojenost s tvrdostí erekce a celková spokojenost, stejně jako hodnocení pomocí diáře Profilu sexuálního života (SEP); a pomocí celkového pohovoru na konci léčby. SEP je diář dokumentující každý sexuální styk během studie.

10

Bezpečnostní aspekty studie zahrnovaly všechny jedince zahrnuté do studie a byly hodnoceny pomocí hodnocení všech zaznamenaných nežádoucích účinků, vitálních příznaků, výsledků fyzikálního vyšetření a výsledků elektrokardiografu.

15

Na konci studie bylo procento pacientů hodnotících svou schopnost penetrace do vagíny (IIEF otázka 3) jako „téměř vždy nebo vždy“ následující: 17,5 % v placebo skupině, 38,1 % ve skupině 2 mg, 48,8 % ve skupině 5 mg, 51,2 % ve skupině 10 mg a 83,7 % ve skupině 25 mg. Srovnání ukázalo statisticky významný rozdíl ve schopnosti penetrace mezi placebem a všemi dávkami sloučeniny I.

20

Na konci studie bylo procento pacientů hodnotících svou schopnost udržet erekci (IIEF otázka 4) jako „téměř vždy nebo vždy“ následující: 10,0 % v placebo skupině, 19,5 % ve skupině 2 mg, 32,6 % ve skupině 5 mg, 39,0 % ve skupině 10 mg a 69,0 % ve skupině 25 mg. Srovnání ukázalo statisticky významný rozdíl ve schopnosti udržení erekce mezi placebem a všemi dávkami sloučeniny I.

25

Tato studie také obsahovala hodnocení bezpečnosti. Nežádoucí účinek vyvolaný léčbou je definován jako stav nepřítomný za normálního stavu a přítomný po základním stavu, nebo jako stav přítomný ze základního stavu, který se zhorší po základním stavu. Nejčastěji popisovanými nežádoucími účinky byly bolesti hlavy, dyspepsie a bolesti zad. Zdálo se, že incidence nežádoucích účinků souvisejících s léčbou souvisela s dávkou.

30

Celkově tato studie prokázala, že všechny čtyři dávky sloučeniny I, konkrétně 2 mg, 5 mg, 10 mg a 25 mg, podávané „příležitostně“, vedle k dosažení významného zlepšení, ve srovnání s placebem, sexuální výkonnosti u mužů s erektilní dysfunkcí, jak je hodnocena IIEF, podle diáře pacientů hodnotících frekvenci a úspěšných sexuálních styků a uspokojení ze sexuálního styku, a podle celkového hodnocení.

35

40

Dohromady výsledky z klinických studií ukazují, že podávání sloučeniny I účinně léčí mužskou erektilní dysfunkci, jak je uvedeno v následující tabulce.

| IIEF hodnocení erektilní dysfunkce (změna od základní hodnoty) |     |             |         |
|----------------------------------------------------------------|-----|-------------|---------|
| Dávková jednotka sloučeniny I                                  | n   | Průměr ± SD | p       |
| placebo                                                        | 131 | 0,8 ± 5,3   |         |
| 2 mg                                                           | 75  | 3,9 ± 6,1   | < 0,001 |
| 5 mg                                                           | 79  | 6,6 ± 7,1   | < 0,001 |
| 10 mg                                                          | 135 | 7,9 ± 6,7   | < 0,001 |
| 25 mg                                                          | 132 | 9,4 ± 7,0   | < 0,001 |
| 50 mg                                                          | 52  | 9,8 ± 5,5   | < 0,001 |
| 100 mg                                                         | 49  | 8,4 ± 6,1   | < 0,001 |

n je počet jedinců, SD je standardní odchylka

45

Nicméně, z klinických studií bylo také zřejmé, že procento nežádoucích účinků souvisejících s léčbou se zvyšuje se stoupající dávkou sloučeniny I, jak je patrné z následující tabulky.

| Nežádoucí účinky související s léčbou (%) |                                      |    |    |    |    |    |     |
|-------------------------------------------|--------------------------------------|----|----|----|----|----|-----|
| Nežádoucí účinek                          | Dávková jednotka sloučeniny (I) (mg) |    |    |    |    |    |     |
|                                           | Placebo                              | 2  | 5  | 10 | 25 | 50 | 100 |
| Bolest hlavy                              | 10                                   | 12 | 10 | 23 | 29 | 34 | 46  |
| Dyspepsie                                 | 6                                    | 3  | 14 | 13 | 19 | 20 | 25  |
| Bolesti zad                               | 5                                    | 3  | 3  | 15 | 18 | 24 | 22  |
| Myalgie                                   | 3                                    | 0  | 3  | 9  | 16 | 20 | 29  |
| Rhinitis                                  | 3                                    | 7  | 3  | 4  | 4  | 0  | 2   |
| Conjunctivitis                            | 1                                    | 0  | 1  | 1  | 0  | 2  | 5   |
| Otok očních víček                         | 0                                    | 0  | 0  | 1  | 1  | 2  | 3   |
| Flush                                     | 0                                    | 0  | 0  | <1 | 0  | 3  | 7   |
| Abnormality zraku                         | 0                                    | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0   |

- 5 Výše uvedená tabulka ukazuje zvyšování nežádoucích účinků při dávkách 25 mg až 100 mg. Proto, ačkoliv byla léčba ED účinná při použití dávek 25 mg až 100 mg, musí být brány v úvahu nežádoucí účinky pozorované při dávkách 25 mg až 100 mg.

- 10 Podle předkládaného vynálezu je dávková jednotka obsahující přibližně 1 mg až přibližně 20 mg, výhodně přibližně 2 mg až přibližně 20 mg, lépe přibližně 5 mg až přibližně 15 mg, sloučeniny I, podávaná v maximální dávce 20 mg za 24 hodin, účinná v léčbě ED a minimalizuje nebo eliminuje výskyt nežádoucích vedlejších účinků. Významné je to, že nebyly pospány abnormality zraku a flush. Překvapivě mohou být dávkami přibližně 1 mg až přibližně 20 mg sloučeniny I

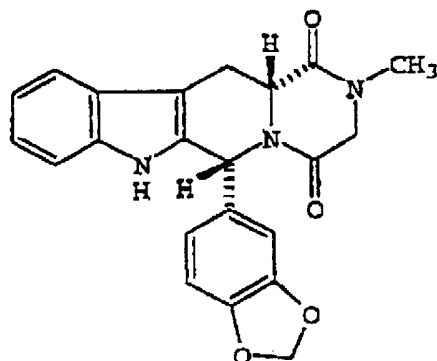
- 15 Principy, výhodná provedení a způsoby provedení vynálezu byly popsány v uvedené přihlášce. Vynález však není omezen popsanými konkrétními provedeními, které jsou pouze ilustrativní. Existují různé variace a modifikace, které spadají do rozsahu vynálezu.

20

## PATENTOVÉ NÁROKY

25

1. Farmaceutická jednotková dávková forma, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje 1 až 20 mg sloučeniny strukturního vzorce I



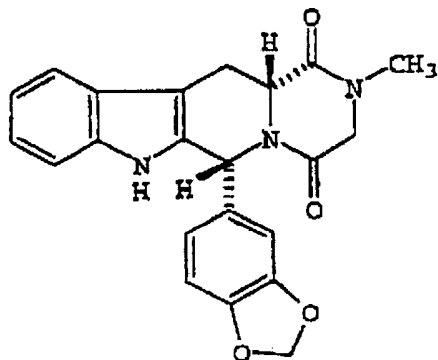
(I),

kde uvedená dávková forma je vhodná pro perorální podávání.

30

2. Dávková forma podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje 2 až 20 mg sloučeniny strukturního vzorce I.

3. Dávková forma podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje 5 až 20 mg sloučeniny strukturního vzorce I.
- 5 4. Dávková forma podle nároku 2, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje 2,5 mg sloučeniny strukturního vzorce I.
- 5 5. Dávková forma podle nároku 3, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje 5 mg sloučeniny strukturní vzorce I.
- 10 6. Dávková forma podle nároku 3, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje 10 mg sloučeniny strukturního vzorce I.
- 15 7. Dávková forma podle nároku 3, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje 20 mg sloučeniny strukturního vzorce I.
8. Dávková forma podle kteréhokoliv z nároků 1 až 7 vybraná ze skupiny sestávající z kapaliny, tablety, kapsle a gelové kapsle.
- 20 9. Dávková forma podle kteréhokoliv z nároků 1 až 7 ve formě tablety.
10. Dávková forma podle kteréhokoliv z nároků 1 až 7 pro použití pro léčbu stavu, při kterém je žádoucí inhibice PDE5.
- 25 11. Dávková forma pro použití podle nároku 10, kde stavem je sexuální dysfunkce.
12. Dávková forma pro použití podle nároku 11, kde sexuální dysfunkcí je mužská erektilní dysfunkce.
- 30 13. Dávková forma pro použití podle nároku 11, kde sexuální dysfunkcí je porucha vzrušivosti u žen.
14. Použití jednotkové dávky obsahující 1 až 20 mg sloučeniny strukturního vzorce I



(I) ,

- 35 pro výrobu léku pro léčbu stavu, při němž je žádoucí inhibice fosfodiesterázy PDE5.
15. Použití podle nároku 14, kde léčivo je pro podání až do maximální celkové dávky 20 mg sloučeniny strukturního vzorce I za den.
- 40 16. Použití podle nároku 14, kde léčivo je pro podávání ve formě jedné nebo více jednotkových dávek obsahujících 1 až 20 mg sloučeniny strukturního vzorce I až do maximální celkové dávky 20 mg sloučeniny strukturního vzorce I za den.

17. Použití podle některého z nároků 14 až 16, kde jednotková dávka obsahuje 2 až 20 mg sloučeniny strukturního vzorce I.
- 5 18. Použití podle některého z nároků 14 až 16, kde jednotková dávka obsahuje 5 až 20 mg sloučeniny strukturního vzorce I.
19. Použití podle některého z nároků 14 až 16, kde jednotková dávka obsahuje 2,5 mg sloučeniny strukturního vzorce I.
- 10 20. Použití podle některého z nároků 14 až 16, kde jednotková dávka obsahuje 5 mg sloučeniny strukturního vzorce I.
21. Použití podle některého z nároků 14 až 16, kde jednotková dávka obsahuje 10 mg sloučeniny strukturního vzorce I.
- 15 22. Použití podle některého z nároků 14 až 16, kde jednotková dávka obsahuje 20 mg sloučeniny strukturního vzorce I.
23. Použití podle nároku 14 nebo 15, kde jednotková dávka obsahuje 10 mg sloučeniny strukturního vzorce I a je pro podání jednou za den.
- 20 24. Použití podle některého z nároků 14 až 23, kde jednotková dávka je ve formě zvolené ze souboru sestávajícího z kapaliny, tablety, kapsle a gelové kapsle.
- 25 25. Použití podle některého z nároků 14 až 23, kde jednotková dávka je ve formě tablety.
26. Použití podle některého z nároků 14 až 25, kde stavem je sexuální dysfunkce.
27. Použití podle nároku 26, kde sexuální dysfunkcí je erektilní dysfunkce u mužů.
- 30 28. Použití podle nároku 26, kde sexuální dysfunkcí je porucha vzrušivosti u žen.

35

---

Konec dokumentu

---