

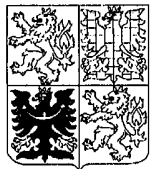
PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 4554

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **26.05.1999**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **19.06.1998**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/099945**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **16.05.2001**
(Věstník č. 5/2001)

(86) PCT číslo: **PCT/FI99/00449**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/66932**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

A 61 K 31/50

A 61 P 9/04

(71) Přihlašovatel:

ORION CORPORATION, Espoo, FI;

(72) Původce:

Haikala Heimo, Espoo, FI;

Pollesello Piero, Grankulla, FI;

Kaivola Juha, Helsinki, FI;

Levijoki Jouko, Helsinki, FI;

(74) Zástupce:

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

(54) Název přihlášky vynálezu:

Nové použití pyridazinového derivátu

(57) Anotace:

Způsob léčby neurohumorální nerovnováhy způsobené poruchami srdeční funkce za účelem zabránění rozvoje srdečního selhání, nebo způsob zvýšení citlivosti kontraktilních bílkovin srdečního svalu vůči kalcium, které zahrnují podání účinného množství (R)-N-[4-(1,4,5,6-tetrahydro-4-methyl-6-oxo-3-pyridazinyl)fenyl]acetamidu savi potřebujícímu takovou léčbu.

Nové použití pyridazinového derivátu

Oblast techniky

Vynález se týká způsobu zvýšení citlivosti kontraktilních bílkovin v srdečním svalu vůči kalciumu a způsobu léčby neurohumorální nerovnováhy způsobené poruchami srdeční funkce za účelem zabránění rozvoje srdečního selhání, kteréžto způsoby zahrnují podání účinného množství (R)-N-[4-(1,4,5,6-tetrahydro-4-methyl-6-oxo-3-pyridazinyl) fenyl]acetamidu.

Dosavadní stav techniky

Racemický N-[4-(1,4,5,6-tetrahydro-4-methyl-6-oxo-3-pyridazinyl)fenyl] acetamid byl dříve popsán jako hypotenzní (US 3746712) a jako kardiotonická látka mající inotropní aktivitu (US 4397854). Bylo zjištěno, že inotropní účinek racemického N-[4-(1,4,5,6-tetrahydro-6-oxo-3-pyridazinyl)fenyl]acetamidu je založen na inhibici enzymu fosfodiesterázy III (PDE III) (Ishimori T. et al., *Arzheim.-Forsch.* (1994), 44(5), 583-8). Sloučenina (I) má asymetrický uhlíkový atom a může proto existovat v stereoizomerních formách. (R)- a (S)- enantiomery sloučeniny (I) byly dříve popsány v japonské patentové přihlášce č. (Heisei) JP 3163050. Údaje týkající se biologické aktivity enantiomerů však nebyly popsány.

V současnosti probíhá celá řada klinických studií na léčbu srdečního selhání s inotropními sloučeninami, např. milrinonem, jejichž mechanismus je založen na inhibici PDE III. Tyto sloučeniny zvyšují kontraktilitu srdečního svalu zvýšením přenosu kalcia do srdečníhovalu, čímž dochází k vazodilataci. Kontrakce srdečního svalu je spouštěna vazbou kalcia na troponin v tenkém filamentu kontraktilních bílkovin. Je však možné, že dlouhodobá aplikace inhibitorů PDE III vede k přetížení srdečního svalu kalciumem, které může vést k rozvoji arytmií. Proto hlavním mechanismem zvyšujícím srdeční kontraktilitu by měl být mechanismus, který nevede k přetížení

kalciem. Zvýšení obratu intracelulárního kalcia uvolněného ze sarkoplazmatického retikula a zvýšení citlivosti kontraktilních bílkovin vůči kalciu jsou ty mechanismy, které nevyvolávají přetížení kalciem.

Pokud má pacient závažné poškození srdeční funkce, může být pořád kontraktilita srdečního svalu udržena prostřednictvím neurohumorální aktivace v těle, což vede ke zvýšenému přísunu kalcia do srdečního svalu. V této situaci může přetížení kalciem vyvolat arytmie a prolongovaná neurohumorální aktivace vede k akceleraci rozvoje srdečního selhání. Neurohumorální nerovnováha může být indikována například změnami koncentrací reninu a noradrenalinu v plazmě pacientů. Inhibitory PDE III nemohou být používány chronicky v léčbě neurohumorální nerovnováhy, protože mohou dále zvyšovat přísun kalcia do srdečního svalu. Avšak použití látek zvyšujících citlivost vůči kalciu může dostatečně zvyšovat kontraktilitu již za normálních a snížených koncentrací kalcia, čímž dochází ke snížení potřeby neurohumorální aktivace a tímto i k zabránění rozvoje srdečního selhání.

Bylo zjištěno, že (R)-enantiomer N-[4-(1,4,5,6-tetrahydro-4-metyl-6-oxo-3-pyridazinyl)fenyl]acetamidu zvyšuje citlivost vůči kalciu na tenkých filamentech kontraktilních bílkovin, a toto je jeho hlavní mechanismus zvýšení srdeční kontrakility. Tento efekt byl neočekávaný, protože bylo popsáno, že mechanismus účinku racemické sloučeniny (I) spočívá v inhibici PDE III. Z tohoto důvodu jako látka zvyšující citlivost vůči kalciu má (R)-enantiomer N-[4-(1,4,5,6-tetrahydro-4-metyl-6-oxo-3-pyridazinyl)fenyl]acetamidu využití v léčbě neurohumorální nerovnováhy způsobené poruchami srdeční funkce za účelem zabránění srdečního selhání.

Popis vynálezu

Předkládaný vynález se týká způsobu léčby neurohumorální nerovnováhy způsobené poruchami srdeční funkce za účelem

zabránění srdečního selhání pomocí podání například perorálně či parenterálně pevné nebo tekuté dávkové formy (R)-enantiomeru sloučeniny (I) v účinném množství pacientovi potřebujícímu tuto léčbu.

Předkládaný vynález se také týká způsobu zvýšení citlivosti kontraktilních bílkovin vůči kalciumu pomocí podání účinného množství (R)-enantiomeru sloučeniny (I) pacientovi potřebujícímu tuto léčbu.

Předkládaný vynález se dále týká použití (R)-enantiomeru sloučeniny (I) ve výrobě léku pro použití v léčbě neurohumorální nerovnováhy způsobené poruchami srdeční funkce za účelem zabránění srdečního selhání.

Předkládaný vynález se dále týká použití (R)-enantiomeru sloučeniny (I) ve výrobě léku pro zvýšení citlivosti kontraktilních bílkovin vůči kalciumu.

Farmaceuticky účinná sloučenina podle tohoto vynálezu je formulována do dávkových forem za použití principů známých v oboru. Tato je podána pacientovi jako taková nebo v kombinaci s vhodnými farmaceutickými excipienty ve formě tablet, dražé, kapslí, čípků, emulzí, suspenzí nebo roztoků. Preparát podle vynálezu obsahuje terapeuticky účinné množství farmaceuticky aktivní sloučeniny, která je předmětem vynálezu. Obsah aktivní sloučeniny je v preparátu okolo 0,5 až 100% váhově.

V nárokovaném způsobu může být sloučenina, která je předmětem vynálezu podána v perorálních dávkách v rozmezí od zhruba 0,1 až do 500 mg, přednostně od 0,5 do 10 mg za den. Volba vhodných složek preparátu je rutinní záležitostí pro osoby běžně znalé oboru. Je zřejmé, že mohou být použity také vhodné nosiče, rozpouštědla, složky vytvářející gel či disperze, antioxidanty, barviva, sladící látky, zvlhčující sloučeniny a další složky normálně používané na tomto technologickém poli.

Příklady provedení vynálezu

Následující příklad bude dále ilustrovat vynález.

Příklad 1.

Příprava (R)-N-[4-(1,4,5,6-tetrahydro-4-metyl-6-oxo-3-pyridaziny] fenyl] acetamidu

(R)-6-[4-aminofenyl]-4,5-dihydro-5-metyl-3-(2H)-pyridazinon (30,0 g) a acetonitril (600 ml) byly smíšeny a směs byla zahřívána pod zpětných chlazením až do rozpuštění výchozího materiálu. Ke směsi byl přidán anhydrid octový (30,0 ml). Po 10 minutách byla směs ochlazena na pokojovou teplotu. Produkt byl zfiltrován, promyt acetonitrilem a vysušen. Výtěžek byl 30,8 g, bod tání 230-232°C, ¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) 1,06 (d, 3H, J = 7,3 Hz), 2,06 (s, 3H), 2,22 (d, 1H, J = 16,6 Hz), 2,67 (dd, 1H, J = 16,6 Hz, 6,8 Hz), 3,35 (m, 1H), 7,63 (d, 2H, J = 8,8 Hz), 7,72 (d, 2H, J = 8,8 Hz), 10,09 (s, 1H), 10,88 (s, 1H). [α]_D²⁰ = -466° (c = 2 mg/ml, DMF).

Použití sloučeniny, která je předmětem vynálezu je demonstrováno následujícími experimenty. Sloučenina A je (R)-N-[4-(1,4,5,6-tetrahydro-4-metyl-6-oxo-3-pyridaziny] fenyl] acetamid.

Účinek zvyšující citlivost obnažených srdečních vláken vůči kalciumu

Levý ventrikulární papilární sval morčete byl odříznut a promyt v ledovém Tyrodově roztoku. Poté byl papilární sval ponořen do roztoku obsahujícím (mM): Octan draselný 74,7, EGTA 10, MgSO₄ 5,4, ATP-Na₂ 4, DTE 1, MOPS 20, pH 7,0 (pomocí 1 M KOH). Následně byl papilární sonikován při 10 Watech po dobu 60 sekund v tomto ledovém roztoku. Vzdálenost mezi ultrazvukovou sondou a papilárním svalem byla 10 mm. Vlákna (méně než 200 μm v průměru) byla odříznuta od povrchu sonikovaných papilárních svalů. Sonikovaná a odříznutá vlákna byla navíc udržována po dobu 30 minut v "obnažovacím" (ledovém) roztoku obsahujícím

spolu s dalšími složkami saponin (250 ug/ml). Během tohoto postupu bylo průběžně prováděno magnetické promíchávání.

Vlákna, která byla dále seříznuta (méně než 100 um v průměru) byla poté horizontálně umístěna spolu s lepidlem (celulóza acetát v acetonu) mezi ocelovou tyčinku snímače izometrické síly (měřicí přístroj napětí AME-801, Horten Electronics, Norsko) a skleněnou tyčinku připojenou k mikromanipulátoru. Snímač síly byl připojen k zesilovači. Vlákna byla udržována v "relaxačním" roztoku obsahujícím (mM): imidazol 30, ATP- Na_2 10, NaN_3 5, EGTA 5, MgCl_2 12,5 a 350 U kreatinkinázy. Teplota roztoku byla 22°C a pH bylo nastaveno na 6,7 pomocí 1M KOH. Iontová síla byla upravena pomocí 1M KCl, aby odpovídala "aktivačnímu" roztoku. Složení "aktivačního" roztoku bylo stejné jako složení "relaxačního" roztoku s výjimkou, že "aktivační" roztok obsahoval také CaCl_2 . Vlákna byly indukována ke kontrakci v požadovaných volných pCa ($-\log[\text{Ca}^{2+}]$), které byly získány vhodným smíšením "relaxačních" a "aktivačních" roztoků. Napětí vytvořené vláknem při pCa 4,8 bylo bráno jako maximální odpověď. Na počátku experimentu bylo vlákno napnuto tak, jak je popsáno výše.

Účinky zvyšující citlivost pro kalcium jsou uvedeny pro Sloučeninu A a milrinon v Tabulce 1.

Tabulka 1. Účinek zvyšující citlivost obnaženého vlákna vůči kalciu při pCa 5,6

		Změna v síle/% kontroly
Sloučenina A	0,3 uM	+ 26 ± 6 (N = 7)
	3 uM	+109 ± 35 (N = 7)
Milrinon		Neúčinný

Pozitivně inotropní účinek na stimulovaném srdečním svalu

Byla použita čtyři týdny stará morčata vážící okolo 350 g. V experimentech byl pravý ventrikulární papilární srdeční sval umístěn pro měření izometrického napětí v orgánové lázni obsahující modifikovaný Tyrodův roztok (37°C) probublávaný 95% O₂, 5% CO₂. Složení modifikovaného Tyrodova roztoku bylo (mM): NaCl 135; MgCl₂ · 6 H₂O 1; KCl 5; CaCl₂ · 2 H₂O 2; NaHCO₃ 15; Na₂HPO₄ · 2H₂O 1; glukóza 10; pH 7,3-7,4. Objem otevřené horizontální komory byl 1 ml a průtok perfúzního roztoku protékajícího komorou byl 5 ml/min. Papilární sval (méně než 1 mm v průměru) byl napnut horizontálně mezi snímač posunu síly (FT 0,3 C) a jehlu fixovanou ke dnu komory. Na sval byla aplikována iniciální natahovací síla 300 mg, která byla elektricky stimulována (Stimulator model SEC 48 F, Grass Instruments) platinovými elektrodami při 1 Hz pomocí pravoúhlých pulsů (trvání 4 ms). Stimulace byla prováděna při napětí dvojnásobném než je napětí prahové, aby bylo dosaženo simultánní aktivace všech myocytů v kapilárním svalu. Snímač posunu síly byl připojen k zesilovači (polygraph D.C. driver, model 7 DA, Grass Instruments) a programovatelnému skeneru (model SI 5010, Tetronix). Amplifikovaný signál byl digitalizován 1 kHz frekvencí programovatelným digitalizačním zařízením (model 390 A, Sony Tetronix).

Inotropní účinky Sloučeniny A a milrinonu jsou uvedeny v Tabulce 2.

Tabulka 2. Pozitivně inotropní účinek na papilární sval morčete

	EC ₅₀ /uM
Sloučenina A	0,1
Milrinon	2

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Použití (R)-N-[4-(1,4,5,6-tetrahydro-4-metyl-6-oxo-3-pyridazinyl) fenyl] acetamidu ve výrobě léku pro použití v léčbě neurohumorální nerovnováhy způsobené poruchami srdeční funkce za účelem zabránění srdečního selhání.
2. Použití (R)-N-[4-(1,4,5,6-tetrahydro-4-metyl-6-oxo-3-pyridazinyl) fenyl] acetamidu ve výrobě léku pro zvýšení citlivosti kontraktilních bílkovin vůči kalciu.
3. Způsob léčby neurohumorální nerovnováhy způsobené poruchami srdeční funkce za účelem zabránění srdečního selhání pomocí podání účinného množství (R)-N-[4-(1,4,5,6-tetrahydro-4-metyl-6-oxo-3-pyridazinyl)fenyl] acetamidu savci potřebujícímu tuto léčbu.
4. Způsob zvýšení citlivosti kontraktilních bílkovin vůči kalciu pomocí podání účinného množství (R)-N-[4-(1,4,5,6-tetrahydro-4-metyl-6-oxo-3-pyridazinyl)fenyl]acetamidu pacientovi potřebujícímu tuto léčbu.