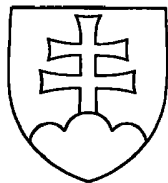


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU

- (22) Dátum podania: 28.06.96
(31) Číslo prioritnej prihlášky: MI95A001513
(32) Dátum priority: 14.07.95
(33) Krajina priority: IT
(40) Dátum zverejnenia: 06.05.98
(86) Číslo PCT: PCT/EP96/02872, 28.06.96

(21) Číslo dokumentu:

41-98

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl.⁶ :

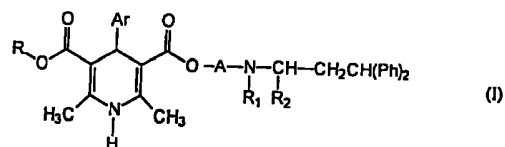
A 61K 31/44

(71) Prihlasovateľ: RECORDATI S.A., CHEMICAL & PHARMACEUTICAL COMPANY, Chiasso, CH;

(72) Pôvodca vynálezu: Sartani Abraham, Arese, IT;
Leonardi Amedeo, Milano, IT;
Testa Rodolfo, Vignate, IT;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Použitie derivátov 1,4-dihydropyridínu v prevencii a liečbe aterosklerotických zmien arteriálnych stien**

(57) Anotácia:
Použitie derivátov 1,4-dihydropyridínu všeobecného vzorca (I), v ktorom význam substituentov R, Ar, Ph, A, R¹ a R² je uvedený v opisnej časti prihlášky vynálezu na výrobu liečiv na prevenciu, zastavenie a zvrátenie aterosklerotických zmien arteriálnych stien u ľudí. Uprednostňované 1,4-dihydropyridíny na tento účel sú lerkanidipín, (S)-lerkanidipín a (R)-lerkanidipín.



POUŽITIE DERIVÁTOV 1,4-DIHYDROPYRIDÍNU V PREVENCII A LIEČBE ATEROSKLEROTICKÝCH ZMIEN ARTERIÁLNYCH STIEN

Oblasť techniky

Vynález sa týka využitia 1,4-dihydropyridínov na inhibíciu viacerých procesov zohrávajúcich významnú úlohu vo vývoji aterosklerotických vaskulárnych lézií ako je napríklad proliferácia a migrácia myocytov, metabolizmus cholesterolu v makrofágoch a oxidácia lipoproteínov s nízkou špecifickou hmotnosťou. Priaznivé ovplyvnenie horeuvedených procesov možno považovať za základ prevencie aterosklerotického poškodenia arteriálnych stien u človeka. Vynález sa takisto týka využitia 1,4-dihydropyridínov na výrobu liekov slúžiacich na prevenciu, zastavenie, prípadne zvrátenie aterosklerotických zmien arteriálnych stien.

Doterajší stav techniky

Arterioskleróza je všeobecné označenie pre zhrubnutie a stvrdnutie arteriálnej steny. Arterioskleróza je zodpovedná za veľký počet úmrtí v Spojených štátoch a iných štátoch s moderným - západným spôsobom života. Jedným z typov arteriosklerózy je aj ateroskleróza, ochorenie veľkých tepien predstavujúce etio-patogenetický podklad väčšiny prípadov ischemickej choroby srdca, aortálnej aneurizmy, ischemickej choroby dolných končatín a takisto zohráva významnú úlohu aj v patogenéze cerebrovaskulárnych ochorení. Ateroskleróza je zďaleka najčastejšou príčinou smrti v Spojených štátoch, a to vo vekovej skupine pod aj nad 65 rokov.

V súčasnosti sa všeobecne uznáva, že ateroskleróza je multifaktoriálny proces, spočívajúci v nadmernej proliferácii imigrovaných hladkých svalových buniek v intime postihnutých artériou. Tvorbu aterosklerotických plátov možno považovať za

- 1/ migrácia a proliferácia hladkých svalových buniek intimy, spolu s kolísajúcim množstvom akumulovaných makrofágov a T-lymfocytov;
- 2/ tvorba veľkého množstva väzivovej matrix bunkami proliferujúcich hladkých svalových buniek, a to vrátane kolagénu, elastických vlákien a proteoglykánov a
- 3/ akumulácia lipidov, najmä vo forme voľného cholesterolu a jeho esterov, v bunkách a okolitom väzivovom tkanive.

Okrem toho, viaceré experimentálne štúdie upozorňujú na kľúčovú úlohu oxidácie lipoproteínov s nízkou špecifickou hmotnosťou (LDL) v skorých štádiách aterosklerózy u ľudí, pričom hypercholesterolémia predstavuje hlavný rizikový faktor pre rozvoj tohto ochorenia. Dostupné údaje ukazujú, že LDL sa oxidujú a že oxidovaný LDL môže viesť k rozvoju aterosklerózy. Uplatňuje sa pritom niekoľko rôznych mechanizmov, ako je napríklad zvýšené ukladanie LDL v tkanivových makrofágov, čo vedie k akumulácii lipidov a chemotaktickej aktivite monocytov, alebo priame cytotoxické pôsobenie na endoteliálne bunky arteriálnej steny.

Podstata vynálezu

V súčasnosti sa prekvapivo zistilo, že niektoré 1,4-dihydropyridíny známe z amerického patentu 4 705 797 pre svoje koronarodilatačné a antihypertenzívne účinky sú schopné inhibovať mnohé z biologických procesov vedúcich k vzniku aterosklerotických lézií a preto môžu byť využité u ľudí na prevenciu a liečbu aterosklerotických zmien arteriálnych stien, hypercholesterolémie ako aj rôznych nimi spôsobených ochorení, napríklad ischemickej choroby srdca - infarktu myokardu či cerebrovaskulárnych ochorení, ako sú mozgový infarkt či intracerebrálne krvácanie.

Zlúčeniny vynálezu možno taktiež použiť pri zabránení vzniku restenózy po perkutánnej transluminálnej koronárnej angioplastike (PTCA) a pri inhibícii progresie vaskulárnej hypertrofie

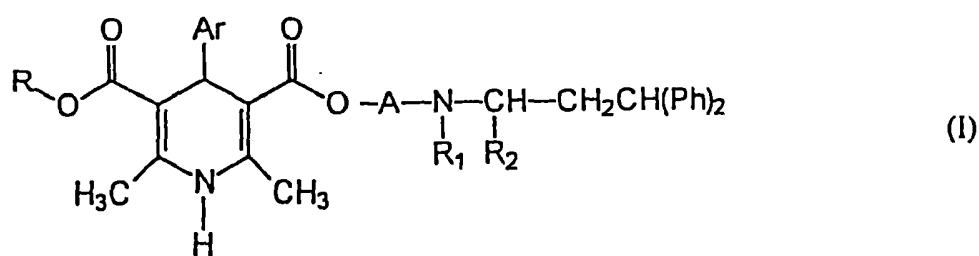
v súvislosti s hypertenziou.

Zvlášť perspektívny spomedzi derivátov 1,4-dihydropyridínu je lerkandipín, jeho enantioméry a ich farmakologicky prijateľné soli. Lerkandipín je metyl-1,1,N-trimetyl-N-(3,3-difenylpropyl-2-aminoetyl 1,4-dihydro-2,6-dimetyl-4-(3-nitrofenyl)-pyridín-3,5-dikarboxylát.

Na jednej strane, (S)-enantiomér aj racemát lerkandipínu majú antihypertenzívny účinok a možno ich využiť u pacientov, u ktorých je indikovaná liečba hypertenzie a zároveň aj aterosklerotickými zmenami podmienených ťažkostí.

Na druhej strane, (R)-lerkandipín nemá prakticky žiadne antihypertenzívne účinky a možno ho využiť pri liečbe stavov, pri ktorých dochádza k migrácii a proliferácii hladkých svalových buniek bez iných kardiovaskulárnych porúch. Tento enantiomér je preto využiteľný najmä u pacientov, u ktorých nie je žiadúce zníženie krvného tlaku.

Vynález sa týka využitia zlúčeniny s nasledovným všeobecným vzorcom I



kde

Ph je fenylová skupina,

Ar je 2-nitrofenylová, 3-nitrofenylová, 2,3-dichlorofenylová alebo benzofurán-4-yllová skupina,

A je rozvetvená alkylová skupina obsahujúca 3 až 6 atómov uhlíka,

R je nerozvetvená alebo rozvetvená alkylová skupina

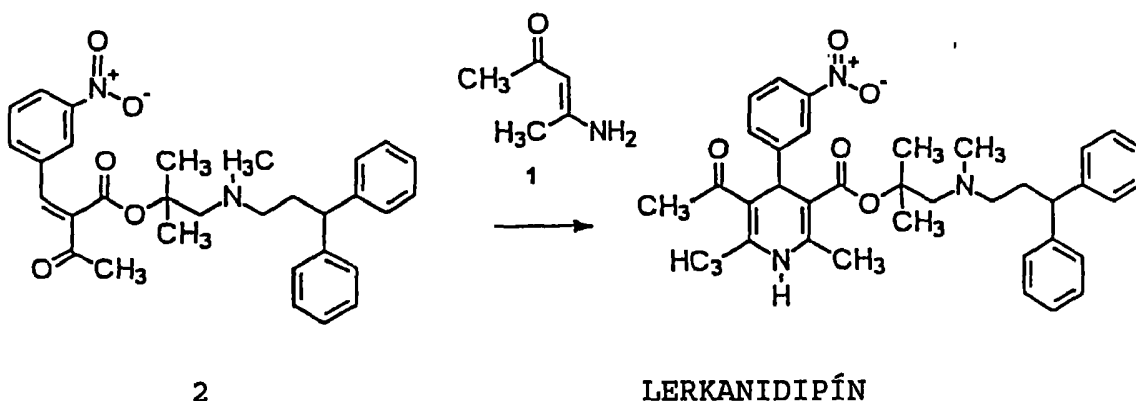
obsahujúca 1 až 6 atómov uhlíka, voliteľne mono-substitovaná alkoxy skupinou obsahujúcou 1 až 6 atómov uhlíka, R_1 je atóm vodíka, hydroxy skupina alebo alkylová skupina obsahujúca 1 až 4 atómy uhlíka a R_2 je atóm vodíka alebo metylová skupina alebo soli, enantioméru, hydrátu alebo solvátu takejto zlúčeniny na prípravu lieku slúžiaceho na prevenciu, zastavenie alebo zvrátenie aterosklerotických zmien v arteriálnej stene pacienta.

Vynález sa ďalej týka metódy prevencie, zastavenia alebo zvrátenia aterosklerotických zmien v arteriálnych stenách pacienta, pričom zahŕňa podávanie terapeuticky účinných dávok zlúčeniny s všeobecným vzorcom I alebo soli, enantioméru, hydrátu alebo solvátu takejto zlúčeniny.

Uprednostňovanými 1,4-dihydropyridínovými derivátmi I na prípravu lieku určeného na podávanie pacientom sú lerkanidipín a jeho (R)- a (S)-enantioméry.

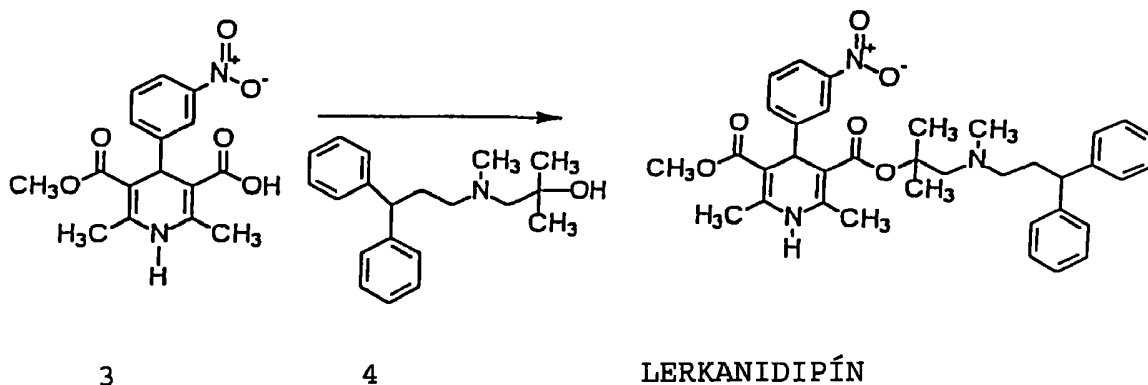
Lerkanidipín možno pripraviť Hantzschovou cyklizáciou metyl 3-aminokrotónanu (1) s 1,1,N-trimetyl-N-(3,3-difenylpropyl)-2-aminoetyl α -acetyl-3-nitrocinamátom (2) metódou znázornenou nižšie v reakčnej schéme 1, ktorá je podrobnejšie opísaná v americkom patente US 4 707 797.

REAKČNÁ SCHÉMA 1



Iným spôsobom prípravy lerkanidipínu je esterifikácia 1,4-dihydro-2,6-dimetyl-5-metoxycarbonyl-4-(3-nitrofenyl)-pyridín-3-karboxylovej kyseliny (3) s 2,N-dimetyl-N-(3,3-difenylpropyl)-1-amino-2-propanolom (4) metódou znázornenou nižšie v reakčnej schéme 2, ktorá je podrobnejšie opísaná v príklade 3.

REAKČNÁ SCHÉMA 2



Enantioméry lerkanidipínu možno pripraviť esterifikačnou metódou uvedenou v reakčnej schéme 2 za využitia vhodných homochirálnych kyselín, ktoré v pomere 1:1 vytvárajú uvedenú kyselinu 3. Tieto homochirálné kyseliny, ďalej v našom texte označované ako kyselina 5 [(R)-enantiomér] a kyselina 6 [(S)-enantiomér], možno jednoducho pripraviť rozpustením racemickej kyseliny 3 metódou publikovanou A. Ashimorim a kol. v Chem. Pharm. Bull. 39, 108 (1991).

Esterifikáciu podľa reakčnej schémy 2 možno uskutočniť v prítomnosti spojiva ako je napr. dicyklohexylkarbodiimid, N,N'-karbonyldiimidazol alebo dietylkyanofosfonát, a voliteľne v prítomnosti promótora, ako je N-hydrosukcínimid alebo 4-dimetylamínopyridín v aprotických alebo chlórovaných rozpúšťadlách, napríklad dimetylformamid alebo chloroform, pri teplotách v rozmedzí -10 až 140 °C pomocou všeobecne známych organických syntéz: Albertson, Org. React 12, 205 (1982); Doherty a kol., J. Med. Chem. 35, 2 (1992); Staab a kol., Newer

Methods Prep. Org. Chem. 5, 81 (1988); Ishihara, Chem. Pharm. Bull. 39, 3238 (1991).

Enantioméry lerkanidipínu možno pripraviť aj tak, že najprv reaguje kyselina 5 (alebo 6) s alkylchloroformátom v prítomnosti terciárneho amínu ako je napr. trietylamín a potom sa pridá medziprodukt (4) pri teplote 0 - 80 °C. Voliteľne možno pred pridaním medziproduktu (4) pridať promótor, napr. 1-hydroxipiperidín, vid' Albertson, Org. React. 12, 157 (1982).

Enantioméry lerkanidipínu možno tiež pripraviť konverziou kyseliny 5 (alebo 6) na zodpovedajúci acylhalid pomocou anorganického halidu kyseliny, ako je napríklad chlorid fosforečný, oxalylchlorid, chlorid fosforitý, oxychlorid fosforitý alebo chlorid tionylu v chlоровanom rozpúšťadle ako napr. chloroform, dichlóretán, dichlórmetyl alebo 1,1,1-trichlóretán voliteľne v prítomnosti promótora ako napr. dimetylformamid pri teplote -10 až 85 °C. Acylhalid môže, ale nemusí byť izolovaný pred pridaním medziproduktu (4).

Enantioméry lerkanidipínu, získané ľubovoľným z uvedených spôsobov, možno čistiť pomocou všeobecne používaných metód, a to či už ako zásady (napr. stĺpcovou chromatografiou) alebo ako soli (napr. zrážaním alebo rekryštalizáciou). Uvedené metódy možno taktiež použiť aj pri všetkých ostatných zlúčeninách všeobecného vzorca I.

Podľa tohto vynálezu môže byť 1,4-dihydropyridínový derivát I podaný pacientovi ako taký, alebo v podobe niektorej farmakologicky prijateľnej soli, hydrátu alebo solvátu. Vhodné sú farmakologicky prijateľné kyslé adičné soli vytvorené s kyselinou chlorovodíkovou, sírovou, maleínovou, jantárovou, citrónovou, metánsulfónovou a toluénsulfónovou; môžu byť pripravené klasickým spôsobom z voľných zásad. Bez ohľadu na formu (zásada, soľ, hydrát, solvát) aktívna zložka sa podáva po primiešaní do farmakologicky vhodného nosiča.

Na perorálne využitie môžu byť 1,4-dihydropyridínové deriváty inkorporované do vhodného nosiča a podávané vo forme tabliet, pastiliek, kapsulí, elixírov, suspenzií, sirupov, oblátok, žuvačiek, a pod. Tieto prípravky musia obsahovať aspoň 0,5 % aktívnych zložiek, pričom množstvo aktívnej zložky môže v závislosti od konkrétnej farmakologickej formy kolísť od 5 do 70 % hmotnosti celej jednotky prípravku. Množstvo aktívnej zložky v takýchto zmesiach má umožniť praktické dávkovanie, hoci žiadúcu dávku možno dosiahnuť podaním viacerých dávkovacích foriem. Zlúčeniny podľa vynálezu možno podávať v perorálnej dávke 0,1 až 400 mg, pričom sa uprednostňuje rozsah 1 až 200 mg. Tabletky, pilule, kapsule, pastilky a pod. môžu obsahovať napr. nasledujúce prísady: spojivo ako napr. mikrokryštalická celulóza, tragant alebo želatína; vehikuluko napr. škrob alebo laktóza; dezintegračné činidlo ako napr. alginová kyselina, škrobový glykolát sodný, kukuričný škrob a pod; lubrikant ako napríklad stearan horečnatý alebo hydrogenovaný ricínový olej; a glidant ako napríklad koloidný oxid kremičitý. Môžu sa pridať aj sladidlá (sacharóza, sacharín) ako aj aromatizujúce prísady (mäta pieporná, salicylan metylnatý alebo pomarančová esencia). Ak je dávkovacou jednotkovou formou kapsula, môže táto okrem uvedených zložiek obsahovať aj tekuté vehikulum ako je napr. mastný olej. Perorálne dávkovacie jednotky môžu obsahovať rôzne ďalšie materiály modifikujúce tvar dávkovacej jednotky, ako napr. povlakové materiály. Tabletky alebo pilulky môžu byť pokryté cukrom, šelakom, alebo inými enterálnymi povlakovými materiálmi. Sirup môže okrem aktívnych zložiek obsahovať sacharózu ako sladidlo, ako aj určité konzervačné prísady, farbivá, pigmenty, aromatické esencie a príchute. Materiál použitý na prípravu rôznych zmesí musí byť farmakologicky čistý a v použitých množstvách netoxický.

Pre parenterálne podávanie možno 1,4-dihydropyridínové deriváty zabudovať do roztoku alebo suspenzie. Tieto prípravky musia obsahovať aspoň 0,1 % aktívnej zložky, pričom množstvo

umožniť praktické dávkovanie. Uprednostňuje sa parenterálna dávkovacia jednotka obsahujúca 0,05 až 100 mg aktívnej zložky. Roztoky alebo suspenzie môžu obsahovať nasledujúce zložky: sterilné riedidlo ako napr. aqua pro injectione, iontové roztoky, netuhnúce oleje, polyetylénglykoly, glycerín, propylénglykol alebo iné syntetické rozpúšťadlá; antibakteriálne prostriedky ako napr. benzylalkohol alebo metylparabény; anti-oxidanty ako napr. kyselinu askorbovú alebo hydrosiričitan sodný; chelátotvorné činidlá ako napr. kyselinu etyléndiamín-tetraoctovú; tlmivý roztok ako napr. acetát, citrát alebo fosfát a prísadu na úpravu toxicity ako napr. chlorid sodný alebo dextróza. Parenterálne viacdávkové ampulky môžu byť zo skla alebo plastu.

Uvedené dávkovacie formy, pomocné príslady a spôsoby podávania zahŕňajú aj tie, ktoré sú uvedené v patentoch US 4 089 969 a US 5 091 182. Obidva dokumenty sú zahrnuté v podobe odkazu v plnom rozsahu.

Prehľad obrázkov na výkresoch

Na priložených výkresoch je znázornené:

Obr. 1 je grafickým znázornením účinku lerkanidipínu a jeho enantiomérov na zabudovanie [³H]-tymidínu do myocét buniek hladkého svalu krysy.

Obr. 2 je grafickým znázornením schopnosti lerkanidipínu a jeho enantiomérov interferovať s migráciou arteriálnych myocét.

Obr. 3 je grafickým znázornením schopnosti lerkanidipínu a jeho enantiomérov inhibovať enzým ACAT a esterifikáciu cholesterolu indukovanú AcLDL v peritoneálnom makrofágu myši.

Obr. 4 je grafickým znázornením vplyvu koncentrácie

lerkanidipínu a jeho enantiomérov na esterifikáciu cholesterolu v makrofágoch naplnených esterom cholesterolu od dávky.

Obr. 5 a 6 je grafickým znázornením účinku lerkandipínu a jeho enantiomérov na bunkami sprostredkovanú oxidáciu LDL.

Obr. 7 je časový priebeh bunkami sprostredkovanej oxidácie a účinkov lerkandipínu po inkubácii.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Nasledujúce príklady ilustrujú prípravu (R, S)-lerkanidipínu a jeho (S)- a (R)-enantiomérov.

PRÍKLAD 1

(S) - (+) -metyl 1,1-N-trimetyl-N-(3,3-difenylpropyl)-2-aminoetyl 1,4-dihydro-2,6-dimetyl-4-(3-nitrofenyl)-pyridín-3,5-dikarboxylát [(S)-lerkanidipín] hydrochlorid hemihydrát.

0,13 ml tionyl chloridu sa pridalo pri -10°C do miešanej suspenzie 0,54 g (R)-1,4-dihydro-2,6-dimetyl-4-(3-nitrofenyl)-5-metoxycarbonyl-pyridín-3-karboxylovej kyseliny v 2,9 ml bezvodého dichlórmétánu a 0,75 ml bezvodého dimetylformamidu v atmosfére dusíka, chránenej pred priamym svetlom. Po 1 hodine inkubácie pri teplote 0°C sa pri teplote -5°C pridal roztok 0,48 g 2,N-dimetyl-N-(3,3-difenyl-propyl)-1-amino-2-propanolu (pripraveného podľa postupu uvedeného v americkom patente US 4 705 797) v 1 ml dichlórmétánu. Po troch hodinách miešania pri teplote 0°C a státi cez noc pri teplote $20 - 25^{\circ}\text{C}$ sa rozpúšťadlo odparilo vo vákuu a zvyšok sa potom rozpustil v 20 ml etylacetátu. Organická fáza sa postupne premyla roztokom soli (4 ml), 10 % vodným roztokom uhličitanu sodného (5 x 4 ml), roztokom soli (4 ml), 1N kyselinou chlorovodíkovou (5 x 5 ml), roztokom soli (4 ml), 10% vodným roztokom

uhličitanu sodného (2 x 5 ml) a nakoniec roztokom soli (4 ml). Organická fáza sa vysušila nad bezvodým síranom sodným a odparila do sucha vo vákuu. Zvyšok sa vyčistil na silikagélovej kolóne vymývaním petrolejovým éterom a acetónom v pomere 85:15. Jednotlivé TLC frakcie (petrolejový éter:acetát v objemovom pomere 7:3 a chloroform:5N metanolický roztok amoniaku v objemovom pomere 99:1,1) sa odparili za vzniku zvyšku, ktorý sa rozpustil v 75 ml dietyléteru obsahujúceho 3 % acetónu. Po filtrácii sa roztok okyslil 3N éterickým roztokom chlorovodíka a vzniknutá zrazenina sa odsala a vysušila pri 78 °C/15 mmHg za vzniku 0,66 g zlúčeniny uvedenej v titule príkladu.

Bod topenia 115-125 °C; $[\alpha]_D^{25} = + 70,56^\circ$ (MeOH; c = 0,981).

Elementárna analýza $C_{36}H_{41}N_3O_6 \cdot HCl \cdot 0.5 H_2O$ v percentách

Namerané: C:65,47; H:6,57; N:6,29; Cl:5,32; H_2O :1,68

Vypočítané C:65,79; H:6,60; N:6,39; Cl:5,39; H_2O :1,37

1H -NMR spektrum základnej zložky 200 MHz ($CDCl_3, \delta$):

8,10	(m, 1H)	nitrofenyl, 2-CH
7,97	(m, 1H)	nitrofenyl, 4-CH
7,62	(m, 1H)	nitrofenyl, 6-CH
7,33	(dd, 1H)	nitrofenyl, 5-CH
7,29-7,10	(m, 10H)	aromatické atómy vodíka $CH(Ph)_2$
5,79	(bs, 1H)	pyridín, NH
5,05	(s, 1H)	pyridín, 4-CH
3,92	(t, 1H)	$\underline{CH}(Ph)_2$
3,63	(s, 3H)	$COOCH_3$
2,57	(m, 2H)	$OC(CH_3)_2\underline{CH}_2N$
2,40-2,23	(m, 2H)	$N(CH_3)CH_2CH_2$
2,33-2,27	(2s, 6H)	pyridín, 2- CH_3 a 6- CH_3
2,19-2,09	(m, 2H)	$N(CH_3)CH_2CH_2$
2,17	(s, 3H)	NCH_3
1,35-1,31	(2s, 6H)	$OC(\underline{CH}_3)_2CH_2N$

PRÍKLAD 2

(R)-(-)-metyl 1,1-N-trimetyl-N-(3,3-difenylpropyl)-2-aminoetyl
1,4-dihydro-2,6-dimetyl-4-(3-nitrofenyl)-pyridín-3,5-
-dikarboxylát [(R)-lerkanidipín] hydrochlorid hemihydrát

Zlúčenina uvedená v titule príkladu bola pripravená postupom opísaným v príklade 1 na prípravu (S)-enantioméru, s tým rozdielom, že bol použitý (S)-enantiomér 1,4-dihydro-2,6-dimetyl-4-(3-nitrofenyl)-5-metoxycarbonyl-pyridín-3-karboxylovej kyseliny namiesto (R)-enantioméru.

Bod topenia 115-120 °C, $[\alpha]_D^{25} = -70,88$ (MeOH, $c = 0,975$).

Elementárna analýza $C_{36}H_{41}N_3O_6 \cdot HCl \cdot H_2O$ v percentách

Namerané: C:64,93; H:6,62; N:6,24; Cl:5,41; H₂O:2,50

Vypočítané C:64,90; H:6,60; N:6,31; Cl:5,32; H₂O:2,70

¹H-NMR spektrum základnej zložky v CDCl₃ bolo úplne identické so spektrom (S)-enantioméru z príkladu 1.

PRÍKLAD 3

Metyl 1,1-N-trimetyl-N-(3,3-difenylpropyl)-2-aminoetyl 1,4-dihydro-2,6-dimetyl-4-(3-nitrofenyl)-pyridín-3,5-dikarboxylát
[lerkanidipín] hydrochlorid

45,8 g (0,385 mol) chloridu tionylu sa nakvapkalo počas 15 minút do miešanej zmesi obsahujúcej 116,2 g (0,35 mol) 2,6-dimetyl-5-metoxycarbonyl-4-(3-nitrofenyl)-1,4-dihydro-pyridín-3-karboxylovej kyseliny (3), pripravenej spôsobom uvedeným v DE 2 847 237, 645 ml bezvodého dichlórmetánu a 160 ml bezvodého dimetylformamidu, udržiavaného v atmosfére dusíka pri teplote -4 °C a +1 °C. Zmes sa miešala pri uvedenej

teplote po dobu 1 hodiny, následne sa po kvapkách počas 15 minút pri teplote -10°C až 0°C pridalo 104,1 g (0,35 mol) 2,N-dimetyl-N-(3,3-difenylpropyl)-1-amino-propanolu (4), pripraveného podľa metódy opísanej v americkom patente US 4 705 797, rozpusteného v 105 ml bezvodého dichlórmetánu. Po 3-hodinovom premiešavaní pri teplote 0°C a odstátí počas noci pri teplote miestnosti sa rozpúšťadlo odparilo vo vákuu a zvyšok sa rozpustil v 3500 ml etylacetátu. Organická fáza sa postupne premývala roztokom soli (700 ml), 10 % vodného roztoku uhličitanu sodného (5 x 700 ml), roztoku soli (700 ml), 1N kyseliny chlorovodíkovej (5 x 700 ml) a nakoniec roztokom soli (700 ml). Organická fáza sa 30 minút sušila nad bezvodým síranom sodným a potom prefiltrovala, pretrepala s 23 g živočíšneho uhlia a znovu prefiltrovala. Objem roztoku sa potom odparovaním vo vákuu zredukoval na približne 1 liter a po 24 hodinovom státí pri teplote 0 až 5°C sa kryštály oddelili vákuovou filtráciou a rekryštalizovali z 99 % etanolu za vzniku 179,5 (78 %) zlúčeniny uvedenej v titule príkladu, s bodom topenia $186 - 188^{\circ}\text{C}$.

FARMAKOLOGICKÉ ÚDAJE

Účinky na migráciu a proliferáciu arteriálnych myocytov

Zvierací model cievnej lézie ukázal, že poškodenie artérie vedie k proliferácii myocytov média, z ktorých mnoho migruje do intimy a ďalej proliferuje za vzniku neointimálnej lézie. Príčiny týchto procesov zatiaľ neboli celkom objasnené. Nedávne objavy ukázali, že myocyty predstavujú 90 - 95 % bunkovej populácie aterosklerotických lézií u mladých dospelých a tvoria priemerne 50 % aterosklerotických plakov v pokročilom štádiu. Okrem toho sa vaskulárne myocyty podieľajú na rozvoji lézie syntézou extracelulárnej matrix. Takisto dokážu akumulovať lipidy, čím sa premenia na tzv. penové bunky.

Objasnenie faktorov ovplyvňujúcich tieto fenomény poskytuje nové možnosti pre selektívne ovplyvnenie a inhibíciu procesov aterogenézy.

Na výzkum migrácie myocytov boli pre potreby tohto vynálezu použité bunky hladkých svalov z krysej aorty v prítomnosti fibrinogénu ako chemotaktického faktora. Pri štúdiach proliferácie boli použité krysie ako aj ľudské bunky. Rast myocytov bol hodnotený stanovením počtu buniek a inkorporácie [³H]-tymidínu. Postup bol nasledovný:

Kultivovali sa myocyty z intimálnej-mediálnej vrstvy aorty samčiekov krýs druhu Sprague-Dawley (200 - 250 g). Bunky sa kultivovali v monovrstvách pri teplote 37 °C vo zvlhčenej atmosfére 5 % CO₂ v Eaglovom minimálnom esenciálnom médiu obohatenom 10 % (v/v) teľacím fetálnym sérom, 100 j./ml penicilínu, 0,1 mg/ml streptomycínu, 20 mM tricínového tlmivého roztoku a 1 % (v/v) roztokom neesenciálnych aminokyselín. Médium sa menilo raz za tri dni. Bunky sa používali medzi štvrtou a desiatou pasážou, pričom sa ich životnosť testovala vylučovaním tripanovej modrej. Boli identifikované vlastnosti rastu myocytov, morfológia a použitie monoklonného ochranného telieska špecifické pre α-aktín, aktín je typická podoba myocytov. Ľudské vaskulárne myocyty (A 617 z ľudskej femorálnej artérie) boli kultivované za rovnakých podmienok. Bunky sa inokulovali s rôznou hustotou pri krysích (2×10^5) a ľudských (5×10^4) myocytoch/Petriho miskú (35 mm) a inkubovali s Eaglovým minimálnym esenciálnym médiom obohateným 10 % teľacím fetálnym sérom. Po 24 hodinách bolo toto médium vymenené za médium obsahujúce 0,4 % fetálne teľacie sérum, čím sa dosiahlo zastavenie rastu buniek a kultúry sa inkubovali 72 hodín. V tomto čase (čas 0) sa médium vymenilo za médium obsahujúce 10 % fetálne teľacie sérum v prítomnosti alebo neprítomnosti známych koncentrácií skúšaných zlúčenín. Kultúry sa nato inkubovali ďalších 72 hodín pri teplote 37 °C. V čase 0 sa tesne pred pridaním testovaných zlúčenín odobrali z každej

Petriho misky vzorky na stanovenie počtu buniek. Proliferácia buniek sa hodnotila stanovením počtu buniek pomocou Coulter Counter model ZM po trypsinizácii monovrstiev. Životnosť buniek sa testovala vylučovaním tripanovej modrej, pričom pri použitých koncentráciách lieku bola vyššia ako 95 %. Výsledky sú uvedené v tabuľke 1.

TABUĽKA 1 - Inhibícia rastu myocytov meraná počtom buniek

Myocyty z	LE IC ₅₀ (μM)	(R) -LE IC ₅₀ (μM)	(S) -LE IC ₅₀ (μM)	NI IC ₅₀ (μM)	LA IC ₅₀ (μM)
krysa SD	31,2	30,7	33,3	38,8	23,6
krysa SHR	14,1	9,2	16,8	n	n
krysa WK	16,4	15,3	20,7	n	n
človeka	25,3	n	n	n	n

LE = lerkanidipín

SD = Sprague Dawley*

NI = nikardipín

SHR = spontánne hypertenzné*

LA = lacidipín

WK = Wistar Kyoto*

IC₅₀ = koncentrácia potrebná na inhibovanie bunkového rastu o 50 %

n = neskúšaný

* = z Charles River, Calco, Taliansko

Lerkanidipín a jeho enantioméry znížili proliferáciu kryších a ľudských myocytov v závislosti od koncentrácie, pozri tabuľku 1, a vykazovali prakticky rovnakú účinnosť ako ostatné skúšané 1,4-dihydropyridíny. Je potrebné poznamenať, že lerkanidipín (a jeho enantioméry) mali účinok na bunky zo všetkých skúšaných druhov, najmä u človeka.

V inej sérii pokusov sa dosiahla synchronizácia myocytov do G₀/G₁ interfázy bunkového cyklu inkubovaním logaritmicky

rastúcich kultúr ($= 3 \times 10^5$ buniek/platňa) po dobu 96 - 120 hodín v médiu obsahujúcom 0,4 % fetálne telacie sérum. Kľudové bunky boli inkubované po dobu 20 hodín v čerstvom médiu s 10 % fetálnym telacím sérom v prítomnosti skúšaných liekov. Proliferácia buniek sa hodnotila pomocou zabudovávania [^3H]-tymidínu do jadier. Bunky boli inkubované s [^3H]-tymidínom (1 $\mu\text{Ci/ml}$ média) po dobu 2 hodín. Rádioaktivita sa merala scintilačným koktejlom Filter-Count.

Výsledky uvedené na obr. 1 potvrdzujú silný inhibičný účinok lerkamidipínu a jeho enantiomérov na rast buniek.

Migrácia kryších myocytov bola skúšaná pomocou 48-jamkovej mikrochemotaktickej komory (Neuro-Probe, USA). Čerstvo trypsinované myocyty boli suspendované v médiu obohatenom o 5 % fetálne telacie sérum (testovacie médium). Dolné jamky s 27 μl skúšobného média obsahujúceho fibrinogén (600 $\mu\text{g/ml}$), ktorý slúžil ako chemotaktické činidlo, boli prikryté bezpolyvinylpyrrolidonovým polykarbonátovým filtrom (veľkosť pórov 8 μM). Do hornej časti komory so skúšanými zlúčeninami sa umiestnilo 50 μl bunkovej suspenzie (1×10^6 buniek/ml). 5-hodinová inkubácia prebehla pri teplote 37 $^{\circ}\text{C}$ v atmosfére 95 % vzduchu a 5 % CO_2 . Po inkubácii sa filter z komory odstránil a z jeho horného povrchu sa zotreli nemigrované bunky a filtre sa trikrát prepláchli fyziologickým roztokom s fosfátovým tlmivým roztokom. Filtre sa potom ofarbili Diff-Quikom (Merz-Dade AG, Švajčiarsko). Pod mikroskopom sa stanovil počet myocytov, pri 100-krát zväčšenom zornom poli, ktoré migrovali na dolný povrch filtrov. V každej vzorke sa vyhodnotilo 6 zorných polí pri veľkom zväčšení a vypočítala sa priemerná hodnota.

Výsledky zobrazené na obrázku 2 demonštrujú schopnosť lerkamidipínu a jeho enantiomérov interferovať s migráciou arteriálnych myocytov. Všetky skúšané zlúčeniny boli v miere závislej od dávky schopné inhibovať migráciu myocytov, pričom najúčinnnejším sa ukázal byť (R)-enantiomér.

Ovplyvnenie metabolizmu cholesterolu v makrofágoch myšacieho peritonea

Aterómy obsahujú hlavne dva typy buniek, makrofágy a bunky hladkých svalov. Makrofágy pochádzajú z cirkulujúcich monocytov a sú hlavnými lipidmi obsahujúcimi bunkami v lézii. Mechanizmus, ktorým akumulujú lipoproteínový cholesterol a samy sa pritom menia na tzv. penové bunky, závisí najmä na procesoch sprostredkovaných receptormi. Zúčastňuje sa nich tzv. scavengerový (zametačový) receptor, ktorý rozoznáva chemicky a biologicky zmenené formy LDL, ako sú napr. acetyl LDL (AcLDL) a oxidovaný LDL. Scavengerový receptor na rozdiel od LDL receptora nie je regulovaný spätnou väzbou, čo má za následok masívnu akumuláciu cholesterolu v bunkách. Cholesterol sa akumuluje v makrofágoch v esterifikovanej forme za účasti enzýmu acyl-koenzým A-cholesterol-acyltransferázy (ACAT), ktorý katalyzuje esterifikáciu cholesterolu v cytoplazme. Z makrofágov možno odstrániť len voľný cholesterol.

Esterifikácia cholesterolu indukovaná AcLDL v myšacích peritoneálnych makrofágoch sa študovala nasledujúcim spôsobom. Myšacie peritoneálne makrofágy sa získali peritoneálnou lavážou u myší (Balb/c Charles River, Calco, Taliansko) tri dni po intraperitoneálnom podaní tioglykolátu. Bunky ($2 - 3 \times 10^6$) sa naniesli do 35 mm jamiek s Dulbeccovým minimálnym esenciálnym médiom obsahujúcim 10 % fetálneho hovädzieho séra. Po 3 hodinách sa z jamiek premytím odstránili nefixované bunky. Jamky sa následne na ďalších 24 hodín pred použitím prekryli Dulbeccovým minimálnym esenciálnym médiom obsahujúcim 10 % fetálneho hovädzieho séra. Po nanesení buniek sa pri teplote 37 °C v bezsérovom Dulbeccovom minimálnom esenciálnom médiu obohatenom o 0,2 % bovínného albumínu obsahujúceho uve-
dené aditíva a neobsahujúceho esenciálne mastné kyseliny. Z plazmy zdravých dobrovoľníkov sa sekvenčnou ultracentrifugáciou (Beckman L5-50, Palo Alto, CA) izoloval ľudský LDL ($d = 1,019 - 1,063$ g/ml). Za účelom acetylácie sa LDL

dialyzoval oproti 0,15 M NaCl, pH 7,4, zriedil rovnakým objemom nasýteného octanu sodného a následne upravil bezvodým octanom. Pre [^{125}I]AcLDL, lipoproteíny sa označovali jódidom [^{125}I] sodným odsoleným gélovou filtráciou na Sephadex G-25 eluovanom fyziologickým roztokom s fosfátovým pufróm. Špecifická aktivita bola 100 - 200 cpm/ng proteínu. Rádioaktivita nevyzrážateľná kyselinou trichlóroctovou bola pod 2 % celkovej hodnoty. Všetky lipoproteíny boli sterilne prefiltrované. Bunky sa inkubovali so skúšanými zlúčeninami 24 hodín. Po výmene média za rovnaké médium sa pokračovalo v inkubácii ďalších 24 hodín. Počas druhej inkubácie sa pridal [^{125}I]AcLDL (50 $\mu\text{g/ml}$). Esterifikácia cholesterolu sa merala po pridaní [1 - ^{14}C] olejovej kyseliny (0,68 mCi vzorka) doplnenej počas posledných 1 až 2 hodín boviným albumínom a po následnom stanovení rádioaktivity viazanej na celulárne estery cholesterolu. Podľa potreby boli bunky pred pridaním liekov a meraním obohatené o cholesterol 24 hodinovou inkubáciou s 50 $\mu\text{g/ml}$ AcLDL.

Bolo dokázané, že lerkandipín a jeho enantioméry sú schopné v závislosti od koncentrácie inhibovať až na 90 % tvorbu esterifikovaného cholesterolu indukovanú v myšacích peritoneálnych makrofágoch (inými slovami esterifikačný účinok enzýmu ACAT). Hodnoty IC_{50} pre lerkandipín a jeho enantioméry sa pohybovali od 8 do 15 μM , ako bolo ukázané na obrázku 3, pričom (R)-enantiomér sa ukázal byť najúčinnnejším z uvedených zlúčenín.

Ďalšia séria pokusov mala za cieľ zhodnotiť účinok lerkandipínu na esterifikáciu cholesterolu v makrofágoch naplnených esterom cholesterolu ešte pred pridaním zlúčeniny, t.j. za podobných podmienok ako v penových bunkách. Bunky sa naplnili esterom cholesterolu 24-hodinovým inkubovaním v médiu obsahujúcom 50 μg acetyl LDL. Výsledky, na obr. 4, ukazujú, že lerkandipín inhiboval esterifikáciu cholesterolu až na 75 % v závislosti od koncentrácie s hodnotou IC_{50} približne

7 μM . (R)-enantiomér lerkanidipínu sa ukázal byť o trochu účinnejší než racemát alebo (S)-lerkanidipín, ktorý bol zo skúšaných zlúčenín najmenej účinný.

Nakoniec bolo dokázané, že lerkanidipín a jeho enantioméry pri 5 μM neinterferovali so schopnosťou makrofágu hydrolyzovať esterifikovaný cholesterol nachádzajúci sa v cytoplazme. Opísané experimenty spočívali v inkubácii buniek naplnených [^3H] cholesterolom v prítomnosti špecifického inhibítora ACAT S-58035. Blokáda intracelulárnej re-esterifikácie cholesterolu umožnila stanovenie schopnosti buniek hydrolyzovať akumulované estery cholesterolu. Pridanie lerkanidipínu alebo jeho enantiomérov neovplyvnilo bunkovú hydrolytickú aktivitu, čo bolo dokumentované hladinou rádioaktivity vo frakcii esterifikovaného cholesterolu.

Všetky nasycovacie média obsahovali [1,2- ^3H] cholesterol v koncentrácii 0,5 $\mu\text{Ci/ml}$. Po 24 hodinovej nasycovacej fáze, počas ktorej sa zabudováva a esterifikuje rádioaktívne označovaný cholesterol, boli bunkové monovrstvy premývané a inkubované po dobu ďalších 24 hodín v médiu obsahujúcom 0,1 % bovínneho albumínu, čo umožnilo vyrovnanie intracelulárnych poolov označovaného cholesterolu na tú istú špecifickú aktivitu. Za účelom kvantifikácie hydrolýzy esteru cholesterolu boli naplnené bunky inkubované po dobu 24 hodín v Dulbecovom minimálnom esenciálnom médiu obsahujúcom lieky, 0,1 % bovínneho albumínu a zlúčeninu S-58035 v úlohe inhibítora acyl-koenzýmu A-cholesterol acyltransferázy. Inhibícia acyl-koenzýmu A-cholesterol acyltransferázy blokuje reesterifikáciu voľného cholesterolu vznikajúceho pri hydrolýze esteru cholesterolu, a tak umožňuje stanovenie aktivity hydrolázy. Hydrolýza esterov cholesterolu sa kvantifikuje stanovením poklesu hladiny rádioaktívne označovaných esterov cholesterolu. [E. H. Harrison a kol., J. Lipid. Res 31, 2187 (1990)]. Po uvedených inkubáciach sa bunky premyli fyziologickým roztokom s fosfátovým pufrom a extrahovali zmesou

hexán:izopropanol v pomere (3:2 v/v). Médiá sa extrahovali zmesou chloroform:metanol (2:1 v/v). Po odstránení rozpúšťadla sa voľný a esterifikovaný cholesterol odseparovali pomocou TLC (izooktán:dietyléter:kyselina octová v objemovom pomere 75:25:2). Množstvo cholesterolu a rádioaktivita škvŕn sa stanovili enzymatickou metódou (Boehringer Mannheim, Nemecko) [F.Bernini a kol., Atherosclerosis 104, 19 (1993)] alebo kvapalinovou scintiláciou (Lipoluma Lumac, Landgraf, Holandsko). Výsledky sú uvedené v tabuľke 2.

TABUĽKA 2 - Vplyv lerkanidipínu a jeho enantiomérov na hydrolýzu esterov cholesterolu v makrofágoch

	% esteru cholesterolu	
AcLDL 50 µg/ml	31	0,8
AcLDL 50 µg/ml + S-58035 1 µg/ml	15	0,5
AcLDL 50 µg/ml + S-58035 1 µg/ml + 5×10^{-6} M LE	12	1,2
AcLDL 50 µg/ml + S-58035 1 µg/ml + 5×10^{-6} M (S)-LE	14	0,4
AcLDL 50 µg/ml + S-58035 1 µg/ml + 5×10^{-6} M (R)-LE	16	2,1

Vplyv na oxidáciu LDL

Výsledky experimentálnych štúdií naznačujú kľúčovú úlohu oxidačných zmien LDL v ranných štádiách rozvoja aterosklerózy u človeka. Dostupné údaje potvrdzujú, že LDL sa in vivo oxidačne mení a že oxidačne zmenené LDL (Ox-LDL) môže celým radom rôznych mechanizmov spôsobovať aterosklerózu a zvýšenie jeho vychytávania v tkanivových makrofágoch (cez dráhy scavengerových receptorov), má za následok akumuláciu lipidov, chemotaktický účinok na monocyty a cytotoxické pôsobenie na bunky endotelu arteriálnej steny.

Antioxidačná kapacita lerkanidipínu sa hodnotila inkubovaním LDL s $20 \mu\text{M Cu}^{++}$ v prítomnosti alebo neprítomnosti rôznych koncentrácií skúšaných zlúčenín ($0,01 \mu\text{M} - 50 \mu\text{M}$). Po oxidácii LDL nasledovalo monitorovanie tvorby konjugovaných diénov pri 234 nm . Podmienky pokusu boli nasledovné: LDL ($d = 1,019 - 1,063$) bolo izolované z poolovanej ľudskej plazmy sekvenčným ultracentrifugovaním pri 4°C a 40000 otáčok/min v 50Ti rotore za použitia ultracentrifúgy L5-50 (Beckman, Palo Alto, CA). LDL sa potom dialyzovalo oproti $0,15 \text{ M NaCl}$ obsahujúcemu $0,01\%$ etyléndiamíntetraoctovej kyseliny pH $7,4$, sterilizovalo filtráciou cez $0,2 \mu\text{M}$ milipórový filter a až do použitia (do 3 týždňov) sa skladovalo pri teplote 4°C v dusíkovej atmosfére a v tme. Pred použitím sa LDL dialyzovalo oproti fyziologickému roztoku s fosfátovým pufrom pH $7,4$ bez etyléndiamíntetraoctovej kyseliny na stĺpcoch Sephadex G-25 (PD-10, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Švédsko). Následne sa LDL prefiltrovalo cez sterilný $0,22 \mu\text{M}$ filter. LDL vo fyziologickom roztoku s fosfátovým tlmivým roztokom ($50 \mu\text{g}$ lipoproteínového proteínu/ml) sa oxidovalo inkubáciou pri 25°C s $20 \mu\text{M CuSO}_4$ po dobu 3 hodín. Roztok lerkianidipínu sa pripravil ako 10^{-2} M zásobný roztok v metanole a pridal sa ako etanolvý roztok (maximum 1% v/v) ešte pred pridaním medi. Vplyv lerkanidipínu na oxidáciu LDL sa stanovil kontinuálnym monitorovaním tvorby konjugovaných diénov pomocou zaznamenávania vzostupu absorbancie pri 234 nm a 5 minútových intervaloch v priebehu 3 hodín. Meraná vzorka sa porovnávala s kontrolnou vzorkou obsahujúcou fyziologický roztok s fosfátovým pufrom. Bol použitý UV spektrofotometer (Beckman DU 640) s plynulým snímaním a s automatickou výmenou 6 kyviet. Časový posun začiatku oxidácie bol vypočítaný ako interval medzi krivkou maximálneho vzostupu propagačnej fázy a bazálnej absorbancie v čase 0. Výsledky sú uvedené v tabuľke 3.

TABUĽKA 3 - Vplyv lerkanidipínu na časový posun začiatku oxidácie LDL

Lerkanidipín μM	časový posun
0	46,5 $\pm$ 4,6
0,5	45,1 $\pm$ 3,7
1,0	49,8 $\pm$ 4,7
2,5	53,6 $\pm$ 3,3 *
5,0	73,2 $\pm$ 4,8 +
10,0	112,7 $\pm$ 5,2 +

* P < 0,05

+ P < 0,01

Ako uvádza tabuľka 3, 10 μM racemát lerkanidipínu predĺžil fázu časového posunu začiatku oxidácie LDL na dvojnásobok. Účinok zlúčeniny bol úmerný jej koncentrácii. Aktivita enantiomérov bola porovnateľná s aktivitou racemátu.

Hodnotili sa takisto antioxidačné účinky lerkanidipínu a jeho enantiomérov na oxidáciu sprostredkovanú bunkami. LDL neobsahujúci etyléndiamíntetraoctovú kyselinu sa za sterilných podmienok inkuboval s 5 μM Cu^{++} (100 ug Apo B/ml) v prítomnosti buď buniek J774 alebo buniek EAhy-926. Po 22 hodinách inkubácie bola oxidácia zablokováná pridaním butylovaného hydroxytoluénu rozpusteného v etanole do média (výsledná koncentrácia 40 μM). Miera peroxidácie lipidov sa merala stanovením percenta inhibície tvorby aldehydových degradačných produktov s použitím skúšky tiobarbiturovou kyselinou [A.N.Hanna a kol., Biochem. Pharmacol. 45, 753 (1993)]. V stručnosti, k 0,250 ml inkubovaných vzoriek bolo pridaných najprv 0,750 ml trichlóroctovej kyseliny (0,20 % w/v), následne 0,750 ml kyseliny tiobarbiturovej kyseliny (0,67 % w/v). Vzorky sa zahrievali 20 min na teplotu 100 C, následne sa ochladili a centrifugovali. Boli vypočítané malóndialdehydové ekvivalenty, pričom ako štandard slúžil 1,1,3,3-tetrametoxypropán.

Výsledky, zobrazené na obrázku 5, získané s bunkami ATTC TIB 67 J774A.1 ukazujú, že lerkandipín a jeho enantioméry efektívne inhibujú oxidáciu LDL. Výsledky zobrazené na obrázku 6, získané s bunkami EAhy 926, ktoré majú mnoho spoločných vlastností s endoteliálnymi bunkami, ukazujú, že lerkandipín inhiboval oxidáciu LDL v rozsahu koncentrácií od 10 do 100 μM .

V opísaných experimentoch bol účinok lerkandipínu na bunkami sprostredkovanú oxidáciu stanovovaný po 22 hodinovej inkubácii. V snahe vysvetliť nižšiu účinnosť lerkandipínu za týchto podmienok, zisťovala sa miera peroxidácie lipidov v prítomnosti 30 μM lerkandipínu v rôznych časoch odobratím vzoriek inkubačného média a stanovením oxidačných zlúčenín vyššie opísaným spôsobom. Výsledky zobrazené na obrázku 7 ukazujú, že 30 μM lerkandipín vykazoval po 10 hodinách inkubácie veľmi vysokú inhibičnú aktivitu na oxidáciu lipidov. Tieto výsledky podporujú názor, že lerkandipín podaný vo vhodnom čase môže mať rovnako výrazný účinok na oxidáciu LDL sprostredkovanú bunkami ako má na oxidáciu sprostredkovanú Cu^{++} .

Bolo dokázané, že lerkandipín je zo všetkých doteraz skúšaných 1,4-dihydropyridínov najúčinnnejší. Lerkandipín je približne o jeden rád účinnnejší ako lacidipín, ktorý bol dosiaľ v daných experimentálnych podmienkach zo známych 1,4-dihydropyridínov najúčinnnejší.

Vplyv na krvný tlak u psov s hypertenziou

Boli skúmané antihypertenzívne účinky perorálne podávaného lerkandipínu a jeho enantiomérov u psov s renálnou hypertenziou.

Pri skúške boli použité psy samci rasy beagle s hmotnosťou

12 - 13 kg, vo veku 1 až 3 rokov (Nossan Allevamenti, Taliansko). Chronická stabilná hypertenzia bola navodená konstrikciou obidvoch renálnych artérií podľa Goldblattovej metódy "hypertenzia dvoch obličiek a dvoch klipov". V celkovej barbiturátovej anestézii (35 mg/kg i.v.) boli v dvoch zákrokoch s odstupom jedného mesiaca zaklipované obidve renálne artérie originálnou striebornou renálnou svorkou, pričom sa ich lúmen zúžil o cca 60 - 70 %. Dva mesiace po poslednom zákroku bola u psov prítomná experimentálna renálna hypertenzia a zvieratá boli pripravené na implantáciu katétra. V celkovej anestézii pentobarbitalom sodným (35 mg/kg i.v.) bola za sterilných podmienok cez arteria carotis comunis lateris dextri katétrom PE 200 Clay Adams zakanylovaná aorta ascendens. Katéter bol podkožne vyvedený v dorzálnej časti krku, naplnený heparinizovaným fyziologickým roztokom a denne preplachovaný, aby sa zabránilo koagulácii. Po uplynutí jedného týždňa na zotavenie boli zvieratá napojené na tlakovú hlavu HP 1290A, ktorá bola pripojená na zosilňovač HP 8805B multikanálového polygrafu Hewlett Packard HP 7700, čím bolo zabezpečené invazívne monitorovanie arteriálneho krvného tlaku. Frekvencia srdca sa odčítavala manuálne z tlakovej krivky.

Všetky zvieratá boli liečené buď placebom alebo lerkanidipínom a jeho (R)- a (S)-enantiomérmi. Lieky sa podávali perorálne rovným aseptickým katétrom s kruhovým prierezom (Pores Serlat - Francúzsko). Lieky boli suspendované vo vodnom 0,5 % Methocele A4C s Antifoam M10 (10 %). Podával sa objem 1 ml/kg. Ako placebo bola použitá suspenzná zmes. Počas experimentu bol arteriálny krvný tlak kontinuálne zaznamenávaný 30 minút pred (bazálne hodnoty) a 8 hodín po podaní lieku.

Lerkanidipín a (S)-lerkanidipín navodili pokles arteriálneho krvného tlaku v závislosti od dávky lieku. Hodnoty ED₂₅ (dávka spôsobujúca 25 % pokles DBP v dobe maximálneho účinku) boli vyhodnotené lineárnou regresnou analýzou a zhrnuté v tabuľke 4.

TABUĽKA 4

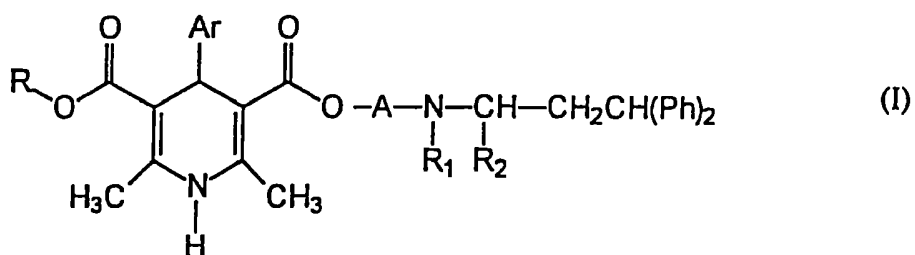
Zlúčenina	ED ₂₅ (mg/kg) 95 % C.L.
Lerkanidipín	0,9 (0,5 ÷ 1,6)
(S)-Lerkanidipín	0,4 (0,3 ÷ 0,7)
(R)-Lerkanidipín	>> 30

C.L. = konfidenčný limit

(S)-lerkanidipín mal najväčší antihypertenzívny účinok, bol približne dvakrát účinnejší než racemát, pričom (R)-enantiomér až do dávky 30 mg/kg krvný tlak neovplyvnil (menej než 10% pokles DBP).

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Použitie zlúčeniny so všeobecným vzorcom I,



kde

Ph je fenylová skupina,

Ar je 2-nitrofenylová, 3-nitrofenylová, 2,3-dichlorofenylová alebo benzofurán-4-ylová skupina,

A je rozvetvená alkylová skupina obsahujúca 3 až 6 atómov uhlíka,

R je nerozvetvená alebo rozvetvená alkylová skupina obsahujúca 1 až 6 atómov uhlíka, voliteľne mono-substituovaná alkoxy skupinou obsahujúcou 1 až 6 atómov uhlíka,

R₁ je atóm vodíka, hydroxy skupina alebo alkylová skupina obsahujúca 1 až 4 atómy uhlíka,

R₂ je atóm vodíka alebo metylová skupina,

alebo soľ, enantiomér, hydrát alebo solvát takejto zlúčeniny na prípravu lieku slúžiaceho na prevenciu, zastavenie alebo zvrátenie aterosklerotických zmien v arteriálnej stene pacienta.

2. Použitie lerkanidipínu, (S)-lerkanidipínu alebo (R)-lerkanidipínu, alebo soli, hydrátu alebo solvátu takejto zlúčeniny na prípravu lieku slúžiaceho na prevenciu, zastavenie alebo zvrátenie aterosklerotických zmien v arteriálnej stene pacienta.

3. Použitie podľa nároku 1 alebo nároku 2 na prípravu lieku, ktorý obsahuje farmakologicky prijateľné vehikulum.

4. Použitie podľa ľubovoľného z predchádzajúcich nárokov na prípravu lieku vhodného na perorálne podávanie.

5. Použitie podľa nároku 4 na prípravu lieku, ktorý obsahuje 5 až 70 % zlúčeniny.

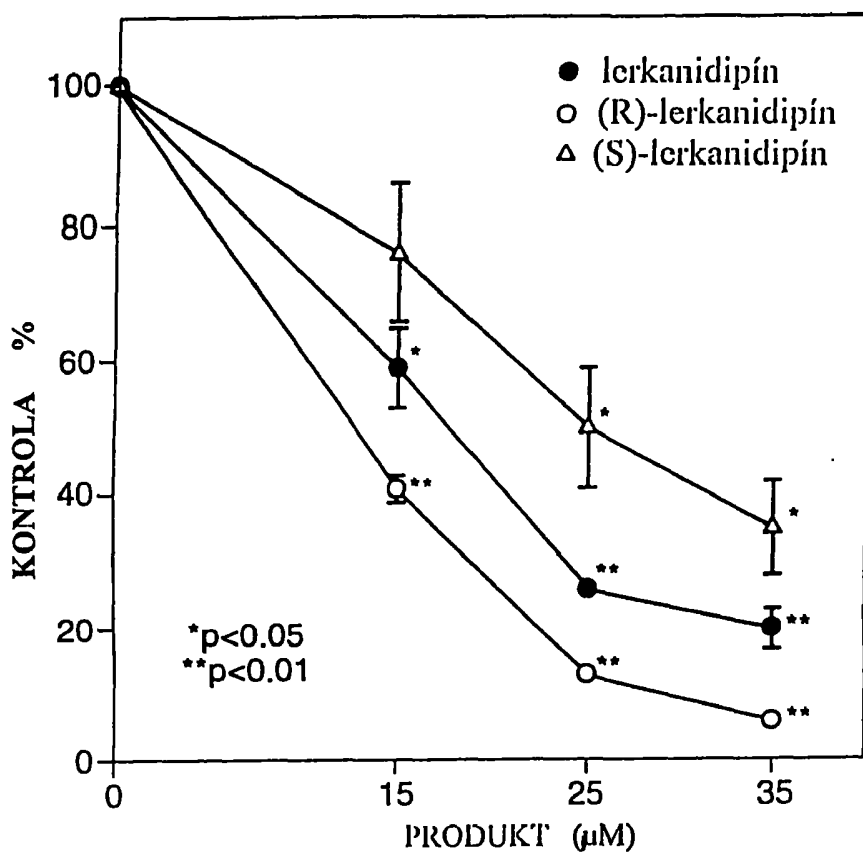
6. Použitie podľa nároku 4 alebo nároku 5 na prípravu lieku, ktorý obsahuje od 0,1 mg do 400 mg zlúčeniny vo forme jednorazovej dávky.

7. Použitie podľa nároku 4 alebo nároku 5 na prípravu lieku, ktorý obsahuje od 1 mg do 200 mg zlúčeniny vo forme jednorazovej dávky.

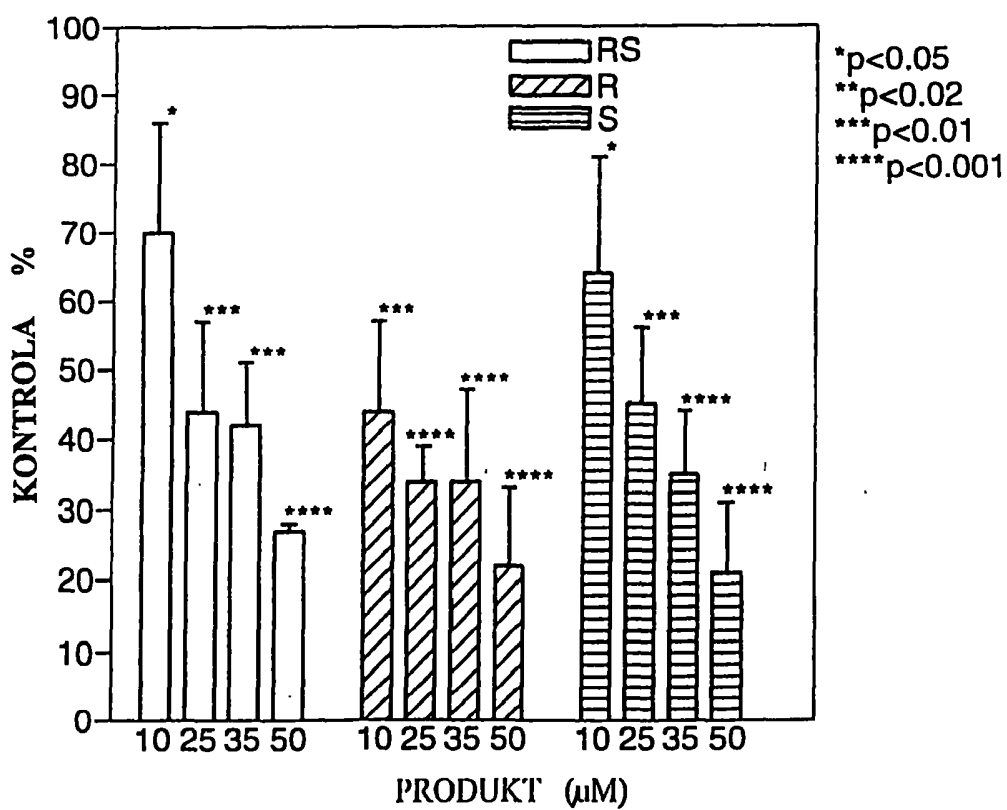
8. Použitie podľa ľubovoľného z nárokov 1 až 3 na prípravu lieku v podobe vhodnej na parenterálne podanie.

9. Použitie podľa nároku 8 na prípravu lieku, ktorý obsahuje 0,5 až 30 % zlúčeniny.

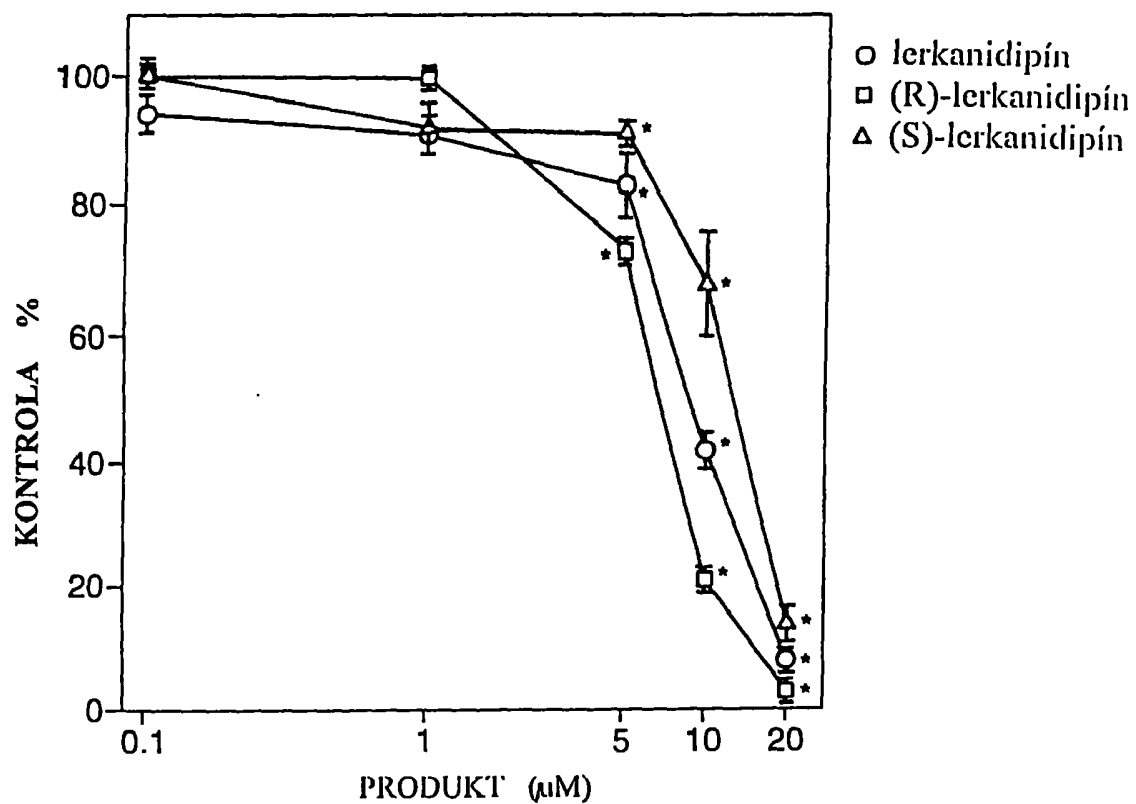
10. Použitie podľa nároku 8 alebo nároku 9 na prípravu lieku, ktorý obsahuje 0,5 mg až 100 mg účinnej zlúčeniny vo forme jednorazovej dávky.



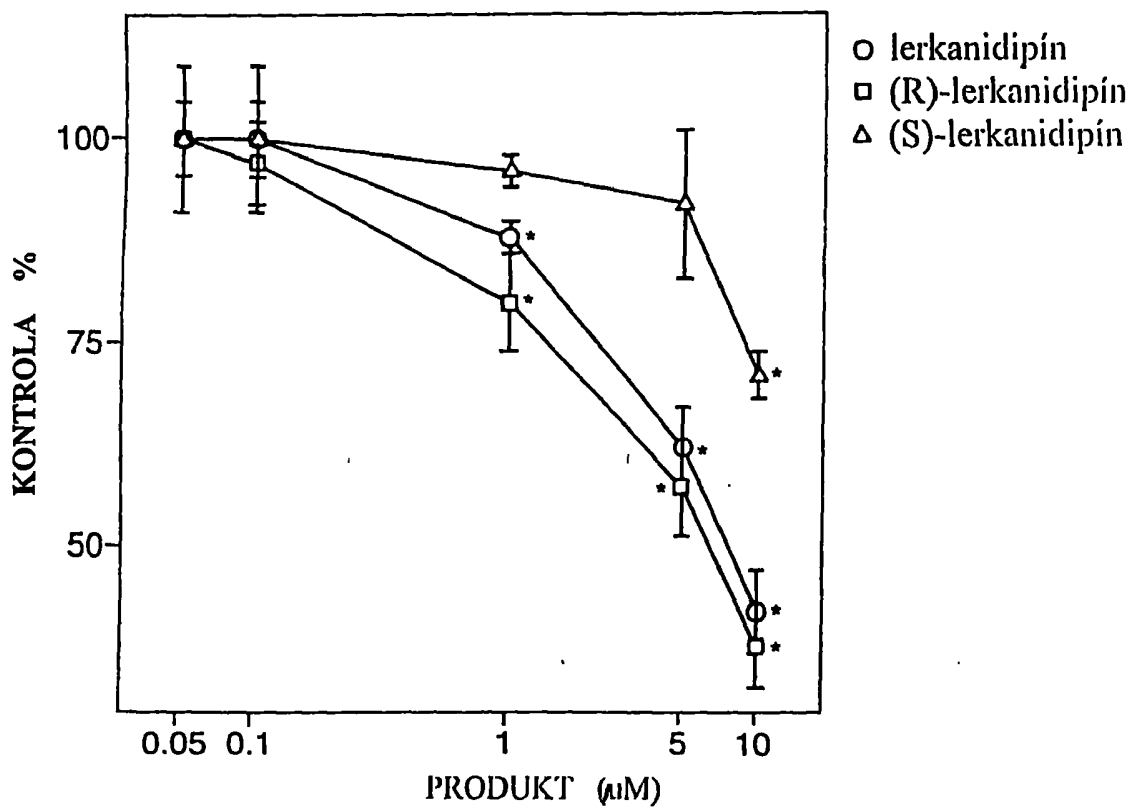
Obr. 1



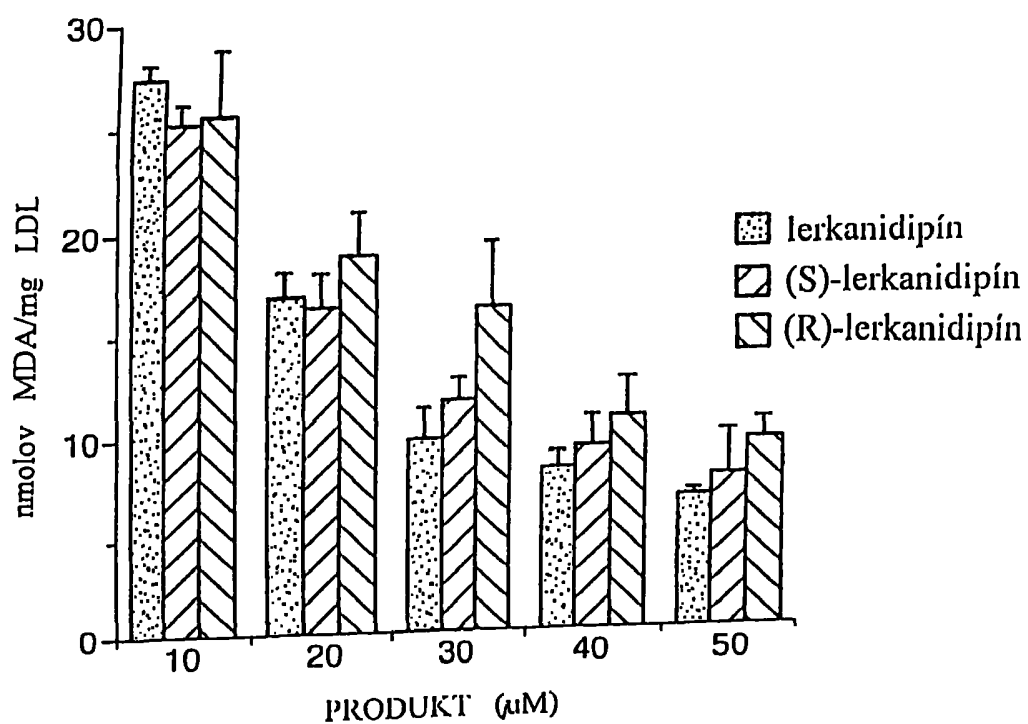
Obr. 2



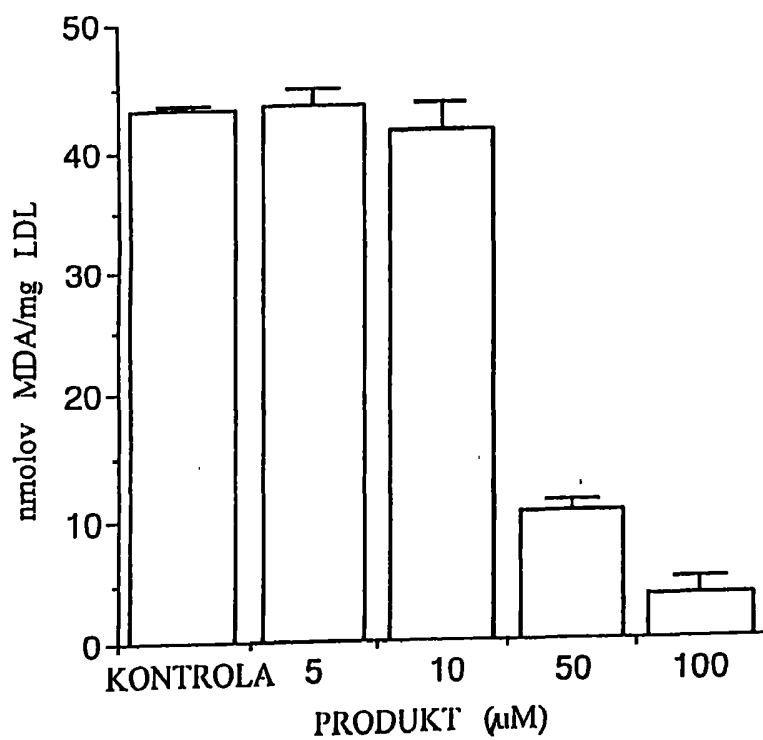
Obr. 3



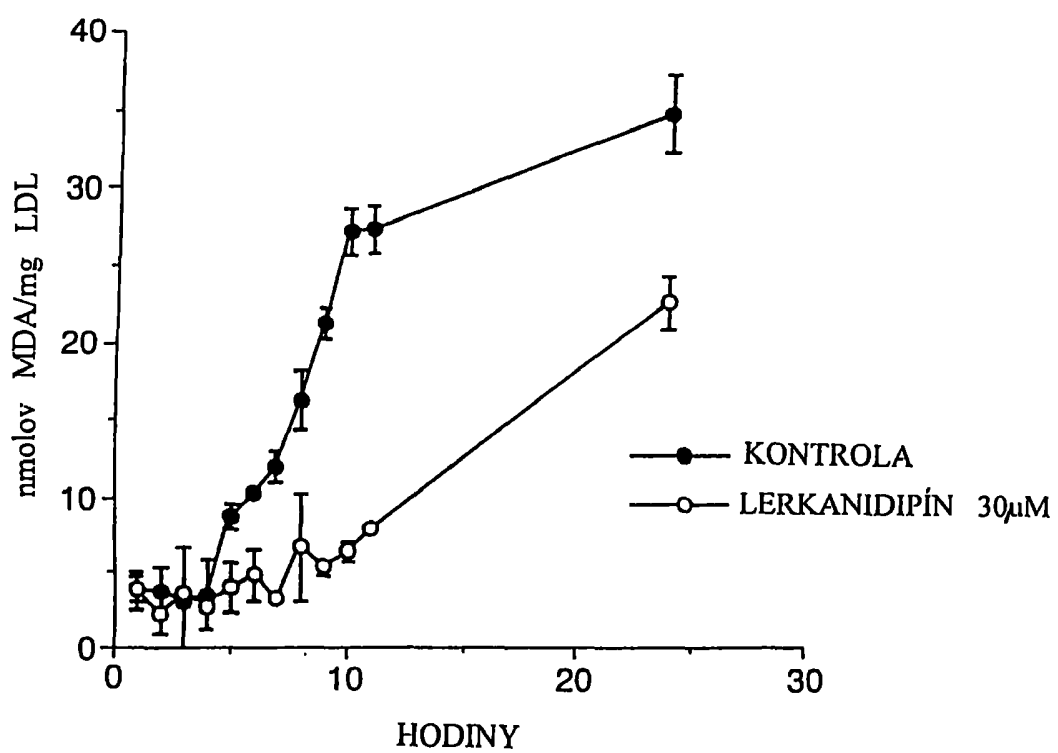
Obr. 4



Obr. 5



Obr. 6



Obr. 7