

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

295 283

(13) Druh dokumentu:

B6

(51) Int. Cl. : ⁷

A 61 K 31/50

A 61 P 9/04

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2000-4554**
(22) Přihlášeno: **26.05.1999**
(30) Právo přednosti: **19.06.1998 US 1998/99945**
(40) Zveřejněno: **16.05.2001**
(Věstník č. 05/2001)
(47) Uděleno: **28.04.05**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **15.06.2005**
(Věstník č. 6/2005)
(86) PCT číslo: **PCT/FI1999/000449**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 1999/066932**

(73) Majitel patentu:

ORION CORPORATION, Espoo, FI

(72) Původce:

Haikala Heimo, Espoo, FI
Pollesello Piero, Grankulla, FI
Kaivola Juha, Helsinki, FI
Levijoki Jouko, Helsinki, FI

(74) Zástupce:

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

(54) Název vynálezu:

**Derivát pyridazinonu pro léčení
neurohumorální nerovnováhy**

(57) Anotace:

Použití (R)-N-[4-(1,4,5,6-tetrahydro-4-methyl-6-oxo-3-pyridazinyl)fenyl]acetamidu pro výrobu léčiva pro léčení neurohumorální nerovnováhy způsobené změnami srdeční funkce za účelem zabránění vývoji srdečního selhání a/nebo zvýšení citlivosti kontraktilních bílkovin srdečního svalu vůči vápníku.

CZ 295283 B6

Derivát pyridazinonu pro léčení neurohumorální nerovnováhy

Oblast techniky

Vynález se týká použití určitého derivátu pyridazinu pro výrobu léčiva pro léčení neurohumorální nerovnováhy způsobené změnami srdeční funkce za účelem zabránění vývoji srdečního selhání a/nebo zvýšení citlivosti kontraktilních bílkovin srdečního svalu vůči vápníku.

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 3 746 712) a jeho kardiotonická látka mající inotropní aktivitu (US 4 397 854). 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 (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 srdečního svalu, 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 kalcem, které může vést k rozvoji arytmie. Proto hlavním mechanismem zvyšujícím srdeční kontraktilitu by měl být mechanismus, který nevede k přetížení kalcem. Zvýšení obratu intracelulárního kalcia uvolněného ze sarkoplazmatického retikula a zvýšení citlivosti kontraktilních bílkovin vůči kalcium jsou ty mechanismy, které nevyvolávají přetížení kalcem.

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 kalcem vyvolat arytmiu 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 kalcium 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-methyl-6-oxo-3-pyridazinyl)fenyl]acetamidu zvyšuje citlivost vůči kalcium 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 kalcium má (R)-enantiomer N-[4-(1,4,5,6-tetrahydro-4-methyl-6-oxo-3-pyridazinyl)fenyl]acetamidu využití v léčbě neurohumorální nerovnováhy způsobené poruchami srdeční funkce za účelem zabránění srdečního selhání.

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu je použití (R)-N-[4-(1,4,5,6-tetrahydro-4-methyl-6-oxo-3-pyridazinyl)-fenyl]acetamidu pro výrobu léčiva pro léčení neurohumorální nerovnováhy způsobené změnami
5 srdeční funkce za účelem zabránění vývoji srdečního selhání.

Předmětem vynálezu je dále také použití (R)-N-[4-(1,4,5,6-tetrahydro-4-methyl-6-oxo-3-pyridazinyl)fenyl]acetamidu pro výrobu léčiva pro zvýšení citlivosti kontraktálních bílkovin
10 srdečního svalu vůči vápníku.

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
15 aktivní sloučeniny, která je předmětem vynálezu. Obsah aktivní sloučeniny je v preparátu okolo 0,5 až 100% hmotnostně.

V nárokováném 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
20 mohou být použity také vhodné nosiče, rozpouštědla, složky vytvářející gel či disperze, antioxi-danty, barviva, sladící látky, zvlhčující sloučeniny a další složky normálně používané na tomto technologickém poli.

25 Příklady provedení vynálezu

Následující příklad bude dále ilustrovat vynález.

30 Příklad 1

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

(R)-6-[4-aminofenyl]-4,5-dihydro-5-methyl-3-(2H)-pyridazinon (30,0 g) a acetonitril (600 ml) byly smíseny a směs byla zahřívána pod zpětným chlazením až do rozpuštění výchozího materiálu. Ke směsi byl přidán acetanhydrid (30,0 ml). Po 10 minutách byla směs ochlazená na pokojovou teplotu. Produkt byl zfiltrován, promyt acetonitrilem a vysušen. Výtěžek byl 30,8 g, teplota tání 230 až 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).
40

Použití sloučeniny, která je předmětem vynálezu, je demonstrováno následujícími experimenty. Sloučenina A je (R)-N-[4-(1,4,5,6-tetrahydro-4-methyl-6-oxo-3-pyridazinyl)fenyl]acetamid.
45

Účinek zvyšující citlivost obnažených srdečních vláken vůči kalcii

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 sval sonikován při 10 Watech po dobu 60 sekund v tomto ledovém roztoku. Vzdálenost mezi ultrazvukovou sondou a papilárním svalem byla 10 mm. Vlákná (méně než 200 μm v průměru) byla odříznuta od povrchu sonikovaných papilárních svalů. Sonikovaná a odříznutá vlákna byla
50

navíc udržována po dobu 30 minut v "obnažovacím" (ledovém) roztoku obsahujícím spolu s dalšími složkami saponin (250 µg/ml). Během tohoto postupu bylo průběžně prováděno magnetické promíchávání.

- 5 Vlákná, která byla dále seříznuta (méně než 100 µm 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. Vlákná byla udržována v "relaxačním" roztoku obsahujícím (mM): imidazol 30, ATP-Na₂ 10, NaN₃ 5, EGTA 5, MgCl₂ 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 CaCl₂. Vlákná byla indukována ke kontrakci v požadovaných volných pCa (-log[Ca²⁺]), 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.

20

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

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

Pozitivně inotropní účinek na stimulovaném srdečním svalu

25

- 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 pulzů (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).

40

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

45 Tabulka 2. Pozitivně inotropní účinek na papilární sval morčete

	EC ₅₀ /µM
Sloučenina A	0,1
Milrinon	2

PATENTOVÉ NÁROKY

- 5 1. Použití (R)-N-[4-(1,4,5,6-tetrahydro-4-methyl-6-oxo-3-pyridazinyl)fenyl]acetamidu pro výrobu léčiva pro léčení neurohumorální nerovnováhy způsobené změnami srdeční funkce za účelem zabránění vývoje srdečního selhání.
- 10 2. Použití (R)-N-[4-(1,4,5,6-tetrahydro-4-methyl-6-oxo-3-pyridazinyl)fenyl]acetamidu pro výrobu léčiva pro zvýšení citlivosti kontraktilních bílkovin srdečního svalu vůči vápníku.

15

Konec dokumentu
