



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **41915** (13) **C2**

(51) **7 A61K31/403, A61P9/00**

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(54) ЗАСІБ ДЛЯ ІНГІБУВАННЯ ПРОЛІФЕРАЦІЇ І МІГРАЦІЇ КЛІТИН ВАСКУЛЯРНИХ ГЛАДЕНЬКИХ М'ЯЗІВ У ССВЦІВ

(21) 95083997

(22) 27 08 1993

(24) 15 10 2001

(31) 08/026,892

(32) 05 03 1993

(33) US

(31) PCT/US 93/02062

(32) 05 03 1993

(33) US

(86) PCT/US93/08019, 27 08 1993

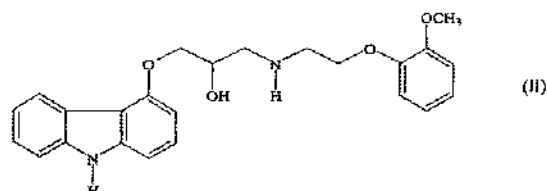
(46) 15 10 2001, Бюл. № 9, 2001 р

(72) Олстайн Ініот X, US

(73) БОЕРІНГЕР МАННХАЙМ ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ
КОРПОРЕЙШН-СМІТКЛАЙН БІЧАМ КОРПО-
РЕЙШН ЛІМІТЕД ПАРТНЕРШІП №1, US

(56) - Yae et al / Carvedilol, a new antipaterntensive,
prevents oxidation of human low density lipoprotein
by macrophages and copper // Chemical Abstracts -
Vol 118, No 11, 15 03 1993, Abstract № 94065e
- Giora et al / Myocardial protection with carvedilol //
Chemical Abstracts, Vol 117, № 3, 20 06 1992 -
abstract № 20266d

(57) 1 Применение соединения карведилола фор-
мулы



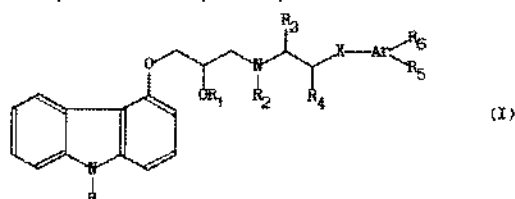
в качестве средства для ингибирования пролифе-
рации и миграции клеток васкулярных гладких
мышц у млекопитающих

2 Применение по п 1, **отличающееся** тем, что
указанное млекопитающее является человеком

3 Применение по п 1, **отличающееся** тем, что
указанное ингибирование обеспечивает предот-
вращение рестеноза после чрескожного внутрисо-
судистого вмешательства при реконструкции ко-
ронарных сосудов у млекопитающих

4 Применение по п 3, **отличающееся** тем, что
указанное млекопитающее является человеком

Настоящее изобретение относится к новой
медицинской области использования производных
карбазолил-(4)-оксипропаноламина формулы I, в
особенности карведилола, для ингибирования
пролиферации клеток гладких мышц. В частности,
настоящее изобретение описывает новый способ
использования карведилола для изготовления
фармацевтических композиций, пригодных для
предотвращения рестеноза после чрескожного
внутрисосудистого вмешательства при реконст-
рукции коронарных сосудов (PTCA), для подавле-
ния развития васкулярной гипертрофии, связан-
ной с артериальной гипертензией, и предотвра-
щения развития атеросклероза



где R₁ является водородом, низшим алканоилом,
содержащим до 6 атомов углерода, или ароилом,
выбранным из бензоила и нафтоила,

R₂ является водородом, низшим алкилом,
содержащим до 6 атомов углерода, или арипалки-
лом, выбранным из бензила, фенилэтила и фе-
нилпропила,

R₃ является водородом или низшим алки-
лом, содержащим до 6 атомов углерода,

R₄ является водородом или низшим алки-
лом, содержащим до 6 атомов углерода, или в том
случае, когда X является кислородом, R₄ и R₅
вместе могут представлять собой -CH₂-O-,

X представляет собой валентную связь,
-CH₂-, кислород или серу,

Ar выбирают из фенила, нафтила, инданила
и тетрагидронафтила,

R₅ и R₆ независимо друг от друга выбирают
из водорода, фтора, хлора, брома, гидроксильной
группы, низшего алкила, содержащего до 6 атомов
углерода, группы -CONH₂, низшей алкоксигруппы,

содержащей до 6 атомов углерода, оксibenзильной группы, низшей алкилтиогруппы, содержащей до 6 атомов углерода, низшей алкилсульфинильной группы, содержащей до 6 атомов углерода, и низшей алкилсульфонильной группы, содержащей до 6 атомов углерода, или

R₅ и R₆ вместе представляют собой диоксиметильную группу

Уровень техники

Аномальная пролиферация васкулярных гладких мышц связана с сердечнососудистыми расстройствами, такими как атеросклероз, артериальная гипертензия и большинство эндоваскулярных процедур. Аномальная пролиферация васкулярных гладких мышц является обычным осложнением после чрескожного внутрисосудистого вмешательства при реконструкции коронарных сосудов (PTCA). Сообщалось, что частота заболевания хроническим рестенозом, вызванным пролиферацией васкулярных гладких мышц после PTCA достигает 40-45 % в течение 3-6 месяцев (Capron L, Heudes D, Chajara A, Bruneval P, 1991, *J Cardiovasc Pharmacol*, v18, p 207-211, Bourassa M, 1992, *J Am Coll Cardiol*, v19, p 1410-1411). Несколько нейрогуморальных факторов, включая ангиотензин II и норадреналин, а также факторы роста, включая фактор роста, полученный из тромбоцитов (PDGF) и основной фактор роста фибробластов (FGF), участвуют в развитии васкулярного рестеноза *in vivo* (см. Bourassa M, указана выше, Powell J S, Clozel J-P, Muller R K M, Kuhn H, Hefti F, Hosang M, Baumgartner H R (1989), *Science*, v 245, p 186-198, Clozel H-P, Hess P, Michael C, Schietinger K, Baumgartner H R, 1991, *Hypertension*, v 18 (Suppl II), p II55-II59, Fingerle J, Sanders K H, Fotev Z, 1991, *Basic Res Cardiol*, v 86, p 75-81, Forney-Prescott M, Webb R L, Reidy M A, 1991, *Am J Pathol*, v139, p 1291-1296, Kaufmann R F, Beans J S, Zimmermann K M, Brown R F, Steinberg M I, 1991, *Life Sci*, v 49, p 223-228, Azuma H Y, Hamasaki H, 1992, *Br J Pharmacol*, v 106, p 665-671, Ferns G A A, Raines E W, Sprugel K H, Motani A S, Reidy M A, Ross R, 1991, *Science*, v 253, p 1129-1132, Lindner V, Reidy M A, 1991, *Proc Natl Acad Sci (USA)*, v 88, p 3739-3743).

Высокая частота повторных васкулярных окклюзий, связанных с PTCA, привело к разработке животных моделей рестеноза *in vivo* и к поиску агентов для предотвращения рестеноза. Антагонисты рецепторов ангиотензина II, ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента (ACE), антагонисты α -адренорецепторов и факторы роста антител обычно приводят лишь к умеренному (10-50%) снижению частоты васкулярного рестеноза у таких животных моделей (см. Pernell J S, указана выше, Fingerle J, указана выше, Forney-Prescott M, указана выше, Kaufmann R F, указана выше). Клинические исследования ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента (ACE) (которые показали наличие лишь незначительного защитного действия от рестеноза на животных моделях) не выявили сколько-нибудь значительной эффективности при предотвращении ангиографически определяемого рестеноза у людей (Porta J J, Califf R M, Topol E J, 1991, *Circulation*, v 84, p 1426-1436). Такое ограниченное или незначительное

защитное действие против васкулярного рестеноза, обеспечиваемое агентами со специфическим механизмом действия, наиболее вероятно отражает сложный характер патофизиологической картины васкулярного рестеноза, считается, что в реакции на повреждение стенок сосудов участвует множество хемотактических и митогенных факторов, и поэтому маловероятно, чтобы препятствие действию только одного из этих факторов оказалось благотворным.

Таким образом, было бы очень желательно получить терапевтические антимитотические агенты, которые бы уменьшали или предотвращали аномальную пролиферацию клеток гладких мышц, связанную с сердечно-сосудистыми расстройствами, такими как атеросклероз и васкулярная гипертрофия, связанная с артериальной гипертензией, или вызванную осложнениями после PTCA, и приводящую к хроническому рестенозу.

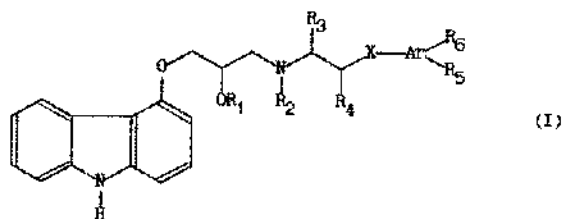
Сущность изобретения

По первому аспекту настоящее изобретение описывает новую медицинскую область использования производных карбазолил-(4)-оксипропаноламина формулы I в качестве антимитотических агентов для ингибирования роста клеток гладких мышц. В частности, предпочтительный вариант осуществления настоящего изобретения предусматривает использование соединения формулы I, в котором R₁ представляет собой -H, R₂ представляет собой H, R₃ представляет собой H, R₄ представляет собой H, X представляет собой атом O, Ar представляет собой фенильную группу, R₅ представляет собой орто-ОСН₃ и R₆ представляет собой H, а указанное соединение более известно под названием карведилол (1-{карбазол-4-илокси-3-[(2-орто-метоксифенокси)-этил]-амино}-2-пропанол) или его фармацевтически переносимой соли, причем указанное соединение используется для изготовления фармацевтических композиций, пригодных для предотвращения рестеноза после PTCA, для подавления развития васкулярной гипертрофии, связанной с артериальной гипертензией, и для предотвращения развития атеросклероза.

По второму аспекту настоящее изобретение предусматривает метод лечения, предназначенный для предотвращения рестеноза после PTCA, для подавления развития васкулярной гипертрофии, связанной с артериальной гипертензией, и для предотвращения развития атеросклероза у млекопитающих, включающий внутреннее введение нуждающемуся в этом млекопитающему, предпочтительно человеку, эффективного количества соединения, выбранного из группы, состоящей по существу из соединений формулы I, предпочтительно соединения формулы I, в котором R₁ представляет собой -H, R₂ представляет собой H, R₃ представляет собой H, R₄ представляет собой H, X представляет собой атом O, Ar представляет собой фенильную группу, R₅ представляет собой группу -ОСН₃ в орто-положении, а R₆ представляет собой H, то есть карведилола, или его фармацевтически переносимой соли.

Подробное описание изобретения

В патенте США № 4503087 описаны производные карбазолил-(4)-оксипропаноламина формулы I.



где R_1 является водородом, низшим алканоилом, содержащим до 6 атомов углерода, или ароилом, выбранным из группы, включающей бензоил и нафтоил,

R_2 является водородом, низшим алкилом, содержащим до 6 атомов углерода, или арилалкилом, выбранным из группы, включающей бензил, фенилэтил и фенилпропил,

R_3 является водородом или низшим алканоилом, содержащим до 6 атомов углерода,

R_4 является водородом или низшим алканоилом, содержащим до 6 атомов углерода, или в том случае, когда X является кислородом, R_4 и R_5 вместе могут представлять собой $-\text{CH}_2-\text{O}-$,

X представляет собой валентную связь, $-\text{CH}_2-$, кислород или серу,

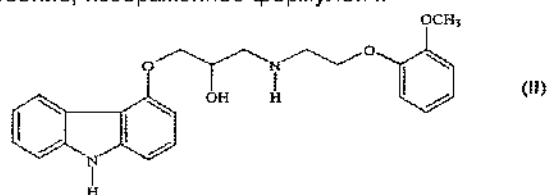
Ar выбирают из группы, включающей фенил, нафтил, инданил и тетрагидронафтил,

R_5 и R_6 независимо друг от друга выбирают из группы, включающей водород, фтор, хлор, бром, гидроксильную группу, низший алкил, содержащий до 6 атомов углерода, группу $-\text{CONH}_2$, низшую алкоксигруппу, содержащую до 6 атомов углерода, оксibenзильную группу, низшую алкилтиогруппу, содержащую до 6 атомов углерода, низшую алкилсульфинильную группу, содержащую до 6 атомов углерода, и низшую алкилсульфонильную группу, содержащую до 6 атомов углерода, или

R_5 и R_6 вместе представляют собой диоксиметильную группу,

и их фармацевтически переносимые соли

Данный патент также описывает соединение формулы I, более известное под названием карведилола (1-(карбазол-4-илокси-3-[(2-(орто-метоксифеноксифенил)-этил)-амино]-2-пропанол)), имеющего строение, изображенное формулой II



Имеющие такое строение соединения, примером которых является карведилол, являются новыми лекарственными средствами, пригодными для лечения слабой или умеренной формы гипертонии, и находящими применение при стенокардии и застойной сердечной недостаточности (CHF). Карведилол известен как антиметаболит β -адреноцептора и как сосудорасширяющий фактор, а при более высоких концентрациях является также антагонистом кальциевых каналов. Сосудорасширяющее действие карведилола вызвано в первую очередь блокадой α_1 -адреноцептора, в то время как блокирующее действие препарата по отношению к β -адреноцептору при его использовании

для лечения гипертонии предотвращает рефлекторную тахикардию. Такое множественное действие карведилола обуславливает антигипертензивную эффективность лекарственного средства у животных, в частности, у человека, а также его пригодность для лечения стенокардии и застойной сердечной недостаточности (CHF) (см. Willette R N, Sauemelch C F, Ruffolo R R Jr, 1990, Eur J Pharmacol, v 176, p 237-240; Nichols A J, Gellai M, Ruffolo R R, Jr, 1991, Fundam Clin Pharmacol, v 5, p 25-38; Ruffolo R R, Jr, Gellai M, Hieble J P, Willette R N, Nichols A J, 1990, Eur J Clin Pharmacol, v 38, p S82-S88; Ruffolo R R Jr, Boyle D A, Venuti R P, Lukas M A, 1991, Drugs of today, v 27, p 465-492; Yue T-L, Cheng H, Lysko P O, McKenna P J, Feuerstein R, Gu J, Lysko K A, Davis L L, Feuerstein G, 1992, J Pharmacol Exp Ther, v 263, p 92-98).

Антигипертензивное действие карведилола осуществляется в первую очередь по механизму снижения общего периферического сосудистого сопротивления без вызывания сопутствующих рефлекторных изменений частоты сердечных сокращений, обычно возникающих при использовании других антигипертензивных средств (см. Willette R N и др., указана выше; Nichols A J и др., указана выше; Ruffolo R R, Jr, Gellai M, Hieble J P, Willette R N, Nichols A J, 1990, Eur J Clin Pharmacol, v 38, p S82-S88). Карведилол также существенно уменьшает размер зоны поражения при моделировании у крыс, собак и свиней острого инфаркта миокарда (Ruffolo R R, Jr и др., Drugs of today, указана выше), возможно, вследствие своего антиокислительного действия при смячении окисления липидов кислородом по свободно-радикальному механизму (см. Yue T-L и др., указана выше).

Недавно мной было обнаружено, что соединения формулы I, в частности, карведилол, способны блокировать стимулируемую митогенами пролиферацию культуры клеток гладких мышц аорты крысы *in vitro*. Наиболее существенным результатом этих исследований является то, что указанные соединения, особенно карведилол, способны блокировать пролиферативное действие нескольких фармакологически неродственных митогенов, включая тромбин, фактор роста, полученный из тромбоцитов (PDGF), фактор роста эпидермиса (EGF), ангиотензин II и эндотелин-1, причем величина ингибирующей концентрации IC_{50} в случае карведилола составляет примерно 1 мкМ. Таким действием не обладают другие антагонисты β -адреноцептора, такие как лабеталол, целипролол или соталол. Поскольку указанные соединения, особенно карведилол, ингибируют пролиферативное действие множественных митогенных стимулов, то использование указанных соединений, особенно карведилола, для ингибирования пролиферации клеток гладких мышц и, таким образом, для предотвращения терапевтически нежелательных последствий такой пролиферации дает ощутимые преимущества по сравнению с использованием специфических антагонистов факторов роста.

Я также обнаружил, что соединения формулы I, особенно карведилол, обладают повышенным защитным действием от пролиферации вас-

кулярных гладких мышц в кровеносных сосудах. Более конкретно, соединения формулы I, включая карведилол, оказывают сильное ингибирующее действие на пролиферацию, миграцию и неоинтимальную пролиферацию клеток васкулярных гладких мышц в артериях, получивших острые травмы вследствие реконструкции сосудов с использованием надувного баллона.

Для достижения данной цели настоящее изобретение предусматривает использование соединения, выбранного из группы, состоящей по существу из соединений формулы I, предпочтительно карведилола, или их фармацевтически переносимых солей, причем указанное использование предназначено для ингибирования пролиферации и миграции клеток гладких мышц у млекопитающих, предпочтительно человека, особенно для предотвращения рестеноза, возникающего вследствие неоинтимальной пролиферации, вызванной реконструкцией кровеносных сосудов пациентов, подвергшихся РТСА, для ингибирования развития атеросклероза, или для подавления развития васкулярной гипертрофии, связанной с артериальной гипертензией.

Настоящее изобретение описывает также метод лечения, предназначенный для ингибирования пролиферации и миграции клеток гладких мышц у млекопитающих, предпочтительно человека, особенно метод лечения, предназначенного для предотвращения рестеноза, возникающего вследствие неоинтимальной пролиферации, вызванной реконструкцией кровеносных сосудов пациентов, подвергшихся РТСА, для ингибирования развития атеросклероза, или для подавления развития васкулярной гипертрофии, связанной с артериальной гипертензией, причем указанный метод включает внутреннее введение нуждающемуся в таком лечении пациенту эффективной дозы фармацевтической композиции, включающей соединения по п 1 Формулы изобретения, предпочтительно карведилола, или его фармацевтически переносимой соли.

Как будет далее показано в Примерах, карведилол обеспечивает глубокую защиту (например, уменьшение площади поперечного сечения интимы на 84%) от неоинтимальной пролиферации клеток гладких мышц в сосудах, получивших острые травмы вследствие реконструкции с использованием надувного баллона, миграции и васкулярного стеноза при моделировании на общей сонной артерии крыс. Кроме того, карведилол в значительной степени ингибирует миграцию клеток васкулярных гладких мышц *in vitro*, а также ингибирует митогенез клеток васкулярных гладких мышц человека под влиянием различных митогенов, что обуславливает выраженное защитное действие от васкулярного рестеноза после реконструкции сосудов с использованием надувных баллонов *in vivo*, не ограниченное какими-либо механистическими объяснениями или теоретическими представлениями о механизме его действия.

В соответствии с настоящим изобретением механизм антипролиферативного защитного действия карведилола не является результатом блокады кальциевых каналов или рецепторов ангиотензина II, которые принимают участие в возникновении стеноза вследствие реконструкции со-

судов с использованием надувного баллона, поскольку гемодинамические эксперименты показали, что карведилол в дозировке, используемой по настоящему изобретению, не оказывает значительного влияния на кальциевые каналы или рецепторы ангиотензина II. Кроме того, в модельных экспериментах на животных, аналогичных проведенным по настоящему изобретению, блокатор кальциевых каналов нифедипин проявлял защитное действие меньше чем на 40% после реконструкции бедренной артерии кролика (см Jackson C L, Bush R C, Bowyer D E, 1988, *Artheroscler*, v 69, p 115-122).

Хотя блокада β -адренорецепторов не может быть исключена из возможных механизмов защитного действия карведилола от реакции васкулярных гладких мышц на реконструкцию сосудов, нет данных, свидетельствующих о том, что эти рецепторы способны быть промежуточным звеном в митогенезе гладких мышц. Наоборот, имеются данные, свидетельствующие о том, что активация α_1 -адренорецепторов норэпинефрином, циркулирующим в токе крови, может участвовать в стенозе попости сосудов после реконструкции. Однако, антагонист α_1 -адренорецепторов празосин (при концентрации 1 мг/кг) обеспечивает ингибирование пролиферации васкулярных гладких мышц всего на 16% у крыс после реконструкции общей сонной артерии (см Fingerle J и др, указана выше). Кроме того, маловероятно, чтобы гипотензивное действие карведилола оказывало влияние на наблюдаемое антипролиферативное действие, поскольку другие антигипертензивные средства не оказывают заметным действием на васкулярный рестеноз, которое наблюдается при использовании карведилола. Кроме того, моделирование на крысах показало, что непрерывное введение антагониста рецепторов ангиотензина II лозартана в течение аналогичного периода времени оказывает аналогичное полученное при использовании в соответствии с настоящим изобретением карведилола действие по снижению общего кровяного давления, но величина снижения неоинтимальной пролиферации составляет всего 46% (см Kauffmann R F и др, указана выше). Аналогично, при использовании нескольких других антигипертензивных средств, таких как миноксидил или гидралазин, в дозах, обеспечивающих равное гипотензивное действие, не достигалось существенное защитное действие от васкулярного рестеноза (Powell J S, Muller R K M, Baumgartner H R, 1991, *J Am Coll Cardiol*, v 17, p 137B-142B).

Хемотактическая миграция медиальных клеток гладких мышц в интиму является важной первой стадией патогенеза образования неоинтимы после реконструкции сосудов с использованием надувного баллона. Считается, что фактор роста, полученный из тромбоцитов (PDGF), является ключевым соединением в промотировании миграции и пролиферации клеток гладких мышц (Ferns G A A и др, указана выше, Ross R, 1986, *N Engl J Med*, v 314, p 488-500). В соответствии с настоящим изобретением, карведилол ингибирует вызванную PDGF миграцию клеток гладких мышц, причем величина средней ингибирующей концентрации IC_{50} сравнима с его активностью по инги-

бированию пролиферации клеток гладких мышц и антиокислительной активностью. Не ограничиваясь каким-либо механистическим объяснением или теоретическими представлениями о механизме действия, можно считать, что способность карведилола ингибировать миоинтимальные образования *in vivo* частично может быть связана с непосредственным ингибированием физической миграции клеток васкулярных гладких мышц из средней оболочки во внутреннюю оболочку кровеносных сосудов, а также, частично, антиокислительной активностью карведилола, который может ингибировать скопление макрофагов и моноцитов у поврежденного участка. Поскольку окисленный липопротеин низкой плотности (LDL) является также хемотаксическим фактором в васкулярных гладких мышцах, а карведилол ингибирует окисление LDL, это может быть дополнительным механизмом, участвующим в значительной степени ингибирования неоинтимальных образований *in vivo*.

Хотя точный молекулярный механизм процессов, приводящих к антипролиферативному и антимигранторному действию карведилола, нуждается в дальнейшем выяснении, новая медицинская область использования карведилола и метод лечения по настоящему изобретению с использованием карведилола позволяют достичь на животных моделях значительной степени защиты от неоинтимальных образований и стеноза после реконструкции сосудов. Степень защиты, достигаемая при использовании карведилола, сравнима только с недавним сообщением об экспериментах с *c-myc* десенсибилизирующим олигонуклеотидом (Simons M., Edelman E.R., Dekeyser J.-L., Langer R., Rosenberg R.D., 1992, *Nature*, V 359, p. 67-70). Такой результат был достигнут только при прямом нанесении десенсибилизирующего соединения на поврежденный участок поверхности сосуда, в отличие от описанного в настоящем изобретении способа использования и метода лечения, по которому антистенотическое действие достигается при систематическом введении препарата, что более соответствует сложившейся медицинской практике. Степень индуцируемой карведилолом защиты от рестеноза (до 84%) при суммарной суточной дозе, равной 2 мг/кг, значительно превосходит результаты, описанные для других соединений на нескольких животных моделях.

Соединения формулы I могут быть легко получены по способу, описанному в патенте США №4503067. Карведилол промышленно выпускается фирмами SmithKline Beecham Corporation (под торговой маркой KREDEX®) и Boehringer Mannheim GmbH (Германия).

В соответствии с настоящим изобретением, фармацевтические композиции соединений формулы I, включая карведилол, могут вводиться пациентам любым медицински приемлемым способом, предпочтительно парентерально. Фармацевтическая композиция для парентерального введения может быть в форме стерильной жидкости для инъекций, хранящейся в пригодном для этой цели сосуде, таком как ампула, или в форме водной или неводной жидкой суспензии. Природа и состав фармацевтического носителя, разбавителя или наполнителя будет, конечно, зависеть от предполагаемого способа введения препарата,

например, путем внутривенной или внутримышечной инъекции.

Фармацевтические композиции соединений формулы I, предназначенные для использования в соответствии с настоящим изобретением, могут быть приготовлены в виде растворов или лиофилизированных порошков для парентерального введения. Порошки могут быть переведены в раствор путем прибавления перед использованием пригодного разбавителя или другого фармацевтически переносимого носителя. Жидкие препараты обычно являются изотоническими водными растворами, содержащими буфер. Примерами пригодных разбавителей являются нормальный изотонический солевой раствор, стандартный 5 %-ный водный раствор декстрозы или буферный ацетатный раствор солей натрия или аммония. Такие препараты особенно пригодны для парентерального введения, но могут быть также использованы для перорального приема или в дозирующих ингаляторах или аэрозольных ингаляторах для инсуффляции. Может оказаться желательным добавление наполнителей, таких как этанол, поливинилпирролидон, желатин, гидроксипропилцеллюлоза, аравийская камедь, полиэтиленгликоль, маннитол, хлорид натрия или лимоннокислый натрий.

По другому варианту исполнения, указанные соединения могут быть включены в желатиновую капсулу, таблетированы или приготовлены в форме эмульсии или сиропа для перорального приема. Для активации или стабилизации композиции, или для облегчения приготовления композиции к ней могут быть добавлены фармацевтически переносимые твердые или жидкие наполнители. Жидкие наполнители включают сироп, арахисовое масло, оливковое масло, глицерин, физиологический раствор, этанол и воду. Твердые наполнители включают крахмал, лактозу, двуводный сульфат кальция, молотый гипс, стеарат магния или стеариновую кислоту, тальк, пектин, аравийскую камедь, агар или желатин. Наполнитель может также включать материал, обеспечивающий пролонгированное выделение активного компонента, такой как глицерилмоностеарат или глицерилдистеарат, один или в смеси с воском. Количество твердого наполнителя может меняться, но предпочтительно составляет от примерно 20 мг до примерно 1 г на единичную дозу. Фармацевтические препараты изготавливают по обычно используемым в фармации методикам, включающим измельчение, смешение, гранулирование и, в случае необходимости, прессование для получения таблеток, или измельчение, смешение и фасовка для получения твердых желатиновых капсул. Если используется жидкий наполнитель, препарат может быть приготовлен в форме сиропа, эликсира, эмульсии или водной или неводной суспензии. Такой жидкий препарат может вводиться непосредственно перорально или может быть расфасован в мягкие желатиновые капсулы.

Дозировка препарата для лечения болезней людей в соответствии с настоящим изобретением не должна превышать 100 мг/день соединений формулы I, включая карведилол. Для предотвращения повторной окклюзии сосуда после РТСА предпочтительный интервал дозирования составляет от примерно 12,5 мг/день до примерно 100

мг/день соединения формулы I, предпочтительно карведилола, в виде однократной дозы или кратными дозами для приема до трех раз в сутки до, во время и в течение до шести месяцев после проведения реконструкции сосудов, наиболее предпочтительно величина дозы составляет примерно 25 мг/день тремя кратными дозами. Следует понимать, что в каждом конкретном случае величина предпочтительной дозы соединений, используемых в композициях по настоящему изобретению, будет изменяться в зависимости от состава данной конкретной композиции, способа введения, места введения, пациента и вида заболевания, лечение которого проводится.

При использовании соединений формулы I, включая соединение формулы II, в соответствии с настоящим изобретением, не ожидаются какие-либо неприемлемые токсикологические последствия.

В нижеследующих Примерах все температуры указаны в градусах Цельсия (°C). Если не указано иначе, то все исходные материалы закупались. Специалист в данной области может на основании вышеизложенного использовать настоящее изобретение в полной мере без более подробного описания. Приведенные Примеры даны для иллюстрации изобретения, и не ограничивают его объем.

Примеры

Материалы

Человеческий фактор роста эпидермиса и фактор роста A/B, полученный из тромбоцитов, были закуплены у фирмы Boehringer Mannheim Corporation (США), [³H]-тимидин (удельная активность 110 кюри/ммоль, New England Nuclear) и человеческий тромбин были закуплены у фирмы Sigma (США). Карведилол был получен от Boehringer Mannheim (Германия). Растворы карведилола для инъекций готовились непосредственно перед каждым введением путем растворения 5 мг соединения в носителе, который состоял из 0,3 мл кислотнo-спиртовой смеси (равные объемы 100%-ного этанола и 1 М раствора HCl) и 4,7 мл стерильной дистиллированной воды. Все остальные использованные реагенты закупались с маркировкой ч д а и использовались без дальнейшей очистки.

Статистическая обработка результатов

Цифровые величины приводятся как среднееарифметическое значение \pm среднеквадратичная ошибка измерений, а n обозначает число животных или отдельных экспериментов, проведенных в данной конкретной группе. Для сравнения статистических результатов использовался метод однофакторного дисперсионного анализа при принятом значении значимой величины $p < 0,05$.

Культура клеток васкулярных гладких мышц

Первичные культуры васкулярных гладких мышц аорты крысы, предназначенных для использования в исследованиях миграции, были приготовлены методом эксплантации, как было описано ранее в работе Ohlstein E H, Arleth A, Bryan H, Elliott J D, Sung C-P, 1992, Eur J Pharmacol, V 225, p 347-350. Сохраненные в замороженном виде первичные культуры клеток гладких мышц человеческой легочной артерии (пассаж 3), предназначенные для использования в исследованиях

по синтезу ДНК, были получены от фирмы Clonetics Corp (США). Клетки выращивались в модифицированной питательной среде MCDB 131, включающей 5% сыворотки плода коровы, 10 нг/мл фактора роста эпидермиса, 2 нг/мл фактора роста основного фибробласта, 1 мкмоль дексаметазона, 10 мкг/мл гентамицина сульфата и 10 нг/мл амфотерицина В (Clonetics Corp).

Синтез ДНК

Человеческие клетки васкулярных гладких мышц высевались на 24-луночные пластины (Corning, США) и выращивались до слияния колоний (3 суток). После этого рост клеток останавливали (G₀), заменяя среду, содержащую сыворотку, на среду Игла, модифицированную Дульбекко (DMEM, Gibco Laboratories, США), содержащую инсулин (5 мкг/мл), трансферрин (5 мкг/мл) и селенистокислый натрий (5 нг/мл) на 48 часов. Один раз в течение 48-часового периода остановленного роста и после окончания этого периода клетки подпитывались свежей средой. Карведилол прибавляли за 15 минут до прибавления митогена и дополнительной инкубации в течение 24 часов. Результаты синтеза ДНК оценивались путем измерения радиоактивности инкорпорированного (после 4 часов) [³H]-тимидина во фракцию, нерастворимую в трихлоруксусной кислоте.

Пример 1

Миграция клеток васкулярных гладких мышц

Методика оценки миграции клеток васкулярных гладких мышц была описана ранее Hidaka Y, Eda T, Yonemoto M, Kamei T, 1992, Atherosclerosis, V 95, p 87-94. Вкратце, клетки васкулярных гладких мышц аорты крысы (пассаж 3) суспендировали (1×10^6 клеток/мл) в бессывороточной среде DMEM, содержащей дополнительно 0,2 % масс/об бычьего сывороточного альбумина (Sigma). Определения миграции клеток проводили в модифицированных камерах Бойдена с использованием камер для клеточных культур Transwell (Costar, США) с поликарбонатной мембраной с размером пор 8 мкм. Фактор роста, полученный из тромбоцитов, растворяли в питательной среде DMEM и помещали в нижнее отделение в присутствии карведилола или без него. После этого клетки васкулярных гладких мышц (5×10^5 клеток) помещали в верхнее отделение и инкубировали в течение 24 часов при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% углекислого газа. Немигрировавшие клетки на верхней поверхности осторожно соскребали и промывали три раза фосфатным буферным раствором. Фильтры фиксировали в метаноле и окрашивали при помощи Giemsa. Число клеток васкулярных гладких мышц, мигрировавших к нижней поверхности фильтров при силовом поле 100х (HPF), определяли микроскопически. Для каждого фильтра подсчитывали четыре HPF. Параллельно ставили два или три эксперимента.

Фактор роста, полученный из тромбоцитов, вызывал функционально зависящее от концентрации увеличение степени миграции клеток васкулярных гладких мышц крысы, причем максимальный эффект наблюдался при концентрации, равной 1 нмоль. В тех случаях, когда в нижнее отделение вместе с фактором роста, полученным из тромбоцитов, помещали карведилол, величина

миграции в значительной степени ингибировалась в функциональной зависимости от его концентрации, причем средняя ингибирующая концентрация IC₅₀ для карведилола составляла 3 мкмоль

Пример 2

Реконструкция общей сонной артерии крысы с помощью надувного баллончика

Использованные для данных исследований животные разделялись на две группы (а) животные, использованные для гемодинамических исследований, и (б) животные, использованные для гистопатологических исследований неоинтимальной пролиферации после реконструкции общей сонной артерии с помощью надувного баллончика. Эти две основные группы далее подразделялись на животных, получавших курс лечения карведилолом (1 мг/кг, внутривнутрибрюшинно, два раза в день, примерно 5 мкмоль/кг/день) и контрольных животных (которые получали равный объем растворителя, используемого для карведилола). Все животные получали предварительный курс с использованием карведилола или растворителя в течение трех дней до начала гемодинамических исследований или перед реконструкцией общей сонной артерии (последняя группа получала карведилол или растворитель в течение 14 суток после операции, после чего животных умерщвляли для проведения гистологических исследований общих сонных артерий).

Реконструкцию левой общей сонной артерии при помощи надувного баллончика проводили в асептических условиях на подвергнутых анестезии (пентобарбитал натрия, 65 мг/кг, внутривнутрибрюшинно) самцах крыс Sprague-Dawley (380-420 г), которые получали предварительный курс в течение трех дней с использованием карведилола или растворителя. После рассечения передней срединной линии определяли положение левой сонной артерии и освобождали ее от прилегающих тканей до точки разветвления общей сонной артерии. Особые меры предосторожности принимали для того, чтобы не допустить при расчистке дистального участка сонной артерии разможнения блуждающего нерва или связанного с ним верхнего цервикального ганглия и симпатического ствола. Катетер-баллон Фогарти 2-F для артериальной эмболизации (Baxter Healthcare Corporation, США) вставляли в полость левой наружной сонной артерии и вводили на фиксированное расстояние (5 см) вглубь наружной и общей сонных артерий, так чтобы кончик катетера приблизился вплотную к дуге аорты. После достижения этого положения баллон накачивали жидкостью настолько, чтобы создать легкое сопротивление стенкам сосуда при удалении катетера. Катетер с надутым баллоном извлекали с постоянной скоростью (примерно 2 см/сек) до точки, проксимальной к месту его введения в наружную сонную артерию. Эту процедуру выполняли три раза, после чего катетер удаляли и рану закрывали. Животных помещали попарно в плексигласовые клетки и содержали при 12-часовом цикле "свет-темнота" с доступом к питьевой воде и стандартному лабораторному корму ad libitum.

Через 14 дней после проведения реконструкции при помощи катетера-баллона общие сонные артерии крыс извлекали для использования в

гистопатологических исследованиях. Степень неоинтимальных образований, проявившихся к 14-му дню, измеряли гистологически. Сосуды фиксировали методом перфузии при постоянном давлении (95-100 мм ртутного столба) in situ немедленно после чрезмерной дозы пентобарбитала натрия. Для гистологических исследований извлекали весь участок общей сонной артерии от дуги аорты до разветвления сонной артерии (длиной примерно 5 см). Поперечные срезы артерии (8 мкм) вырезались из парафиновых блоков, содержащих средние участки этих артерий и использовались для анализов на окрашивание гематоксилином и эозином. Площади поперечных сечений оболочек кровеносных сосудов (интимальной, медиальной и адвентициальной) количественно определяли при помощи системы Bioscan Optimus (США) для визуализации клеток.

Все эксперименты проводились в строгом соответствии с требованиями Комитета по заботе о животных и их использованию, SmithKline Beecham Pharmaceuticals и AALAC.

Курс лечения карведилолом не влиял на увеличение веса тела в течение 17-дневного периода лечения (380±6 г, n = 9 и 377±6 г, n = 10 в группах, получавших карведилол и растворитель за 3 дня до оперативного вмешательства и 425±9 г и 416±7 г через 14 дней после реконструкции сосудов с помощью баллона, соответственно). Крысы, получавшие карведилол (1 мг/кг, внутривнутрибрюшинно, два раза в день в течение трех дней) имели значительно более низкие величины среднего диастолического артериального кровяного давления в состоянии покоя и частоты биения сердца (102±5 мм ртутного столба и 305±9 биений/минуту, соответственно, n = 6), чем крысы из группы, получавшей растворитель (125±3 мм ртутного столба и 360±21 биений/минуту, соответственно, n = 7).

Реконструкция левой общей сонной артерии с помощью баллона вызывала значительное утолщение интимы у крыс, получавших растворитель, что приводило к очень сильному, 20-кратному увеличению соотношения толщин интимальной и медиальной оболочек. Контралатеральные правые общие сонные артерии, которые не были подвергнуты процедуре реконструкции, были нормальными у крыс, получавших как карведилол, так и растворитель, т.е. в них не наблюдалось различий между интимальным, медиальным и адвентициальными участками, и эти сосуды имели постоянные значения соотношения толщин интимальной и медиальной оболочек. Лечение карведилолом в значительной степени снижало степень неоинтимальных образований в подвергнутых реконструкции сонных артериях и приводило к уменьшению на 84% площади поперечного сечения интимальной оболочки и к сопоставимому с этой величиной уменьшению на 81% величины соотношения толщин интимальной и медиальной оболочек. Лечение карведилолом не вызывало изменения площади поперечного сечения медиальной и адвентициальной оболочек. Таким образом, лечение карведилолом оказывает существенное, и очень значительное, защитное действие от миоинтимальной пролиферации и миграции, вызванной

повреждением стенок сосудов при их реконструкции с помощью баллончика

Пример 3

Ингибирование митогенеза васкулярных гладких мышц человека

Карведилол (0,1-10 мкмоль) вызывал функционально зависящее от концентрации ингибирование митогенеза, стимулированного фактором роста, полученным из тромбоцитов (1 нмоль), фактором роста эпидермиса (1 нмоль), тромбином (0,1 ед /мл) и сывороткой плода коровы (1%) в культуре клеток гладких мышц легочной артерии человека. Средние значения ингибирующих концентраций карведилола IC_{50} против митогенеза,

стимулированного факторами роста и сывороткой, составляли от 0,3 до 2 мкмоль. Данный эффект был полностью обратимым, поскольку клетки полностью восстанавливали восприимчивость к стимуляции роста, если карведилол вымывали из среды после инкубации в течение 24 часов.

Приведенное выше описание полностью раскрывает способ использования настоящего изобретения. Однако настоящее изобретение не ограничено приведенным выше вариантом конкретного исполнения изобретения, но включает все его модификации в объеме приведенной ниже формулы изобретения.

Тираж 50 экз

Відкрите акціонерне товариство «Патент»

Україна, 88000, м. Ужгород, вул. Гагаріна, 101

(03122) 3 – 72 – 89 (03122) 2 – 57 – 03
