УКРАЇНА

(19) UA **(11) 131006** **(13) C2**

(51) МПК
A61K 31/4468 (2006.01)
A61P 9/04 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ "УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: **a 2023 06278**

(22) Дата подання заявки: **02.06.2022**

(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: **09.07.2026**

(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **21177292.6**

(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **02.06.2021**

(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **EP**

(41) Публікація відомостей про заявку: **28.02.2024, Бюл.№ 9**

(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: **08.07.2026, Бюл.№ 27**

(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору PCT: **PCT/EP2022/065013, 02.06.2022**

(72) Винахідник(и):
Лунд Ларс (SE),
Бернареджі Альберто (IT),
Ловаті Емануела (CH),
Джуліано Клаудіо (IT),
П'єтра Клаудіо (IT)

(73) Володілець (володільці):
ХЕЛСІНН ХЕЛСКЕА СА,
Via Pian Scairolo 9, 6912 Lugano/Pazzallo, Switzerland (CH),
АНАКАРДІО АБ,
Nanna Svartz Väg 4, 171 65 Solna, Sweden (SE)

(74) Представник:
Петров Андрій Володимирович, реєстр. №139

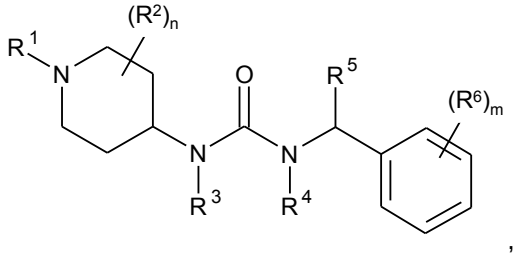
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
WO 2012/116176 A2, 30.08.2012
WO 2015/134839 A1, 11.09.2015
Effects of GH secretagogues on contractility and Ca<2+> homeostasis of isolated adult rat ventricular myocytes / QIANG SUN et al. // ENDOCRINOLOGY. 2010. Vol. 151. No. 9. Pages 4446-4454

UA 131006 C2

(54) ЗАСТОСУВАННЯ ПОХІДНИХ ПІПЕРИДИНСЕЧОВИНИ ЯК ІНОТРОПНИХ АГЕНТІВ

(57) Реферат:

Даний винахід стосується застосування сполук, представлених формулою (I)

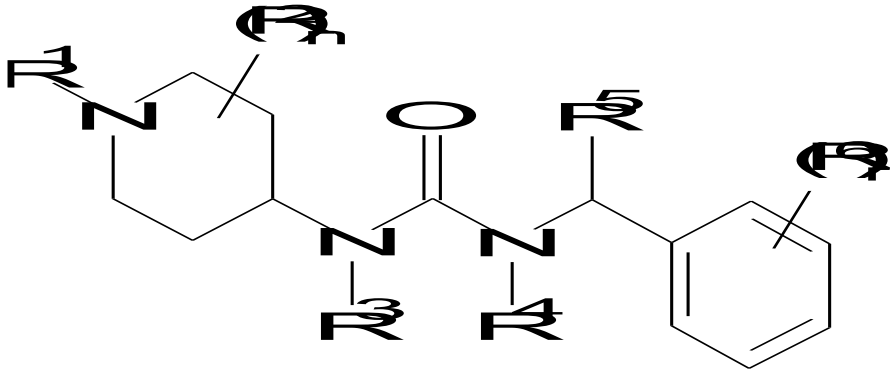


, (I)

як інотропних агентів. Сполуки формули (I), які включають переважно 1-[(1S)-1-(2,3-дихлор-4-метоксифеніл)етил]-3-метил-3-[(4R)-1-метил-3,3-диметил-4-піперидил]-сечовину та її гідрохлоридну сіль, описані в даній патентній заявці, мають значну інотропну активність щодо кардіоміоцитів, як нормальних, так і спричинених інфарктом міокарда моделей серцевої

недостатності на тваринах, що робить їх корисними для лікування пацієнтів, які потребують цього, із серцево-судинними захворюваннями. На відміну від відомих інотропних агентів, сполуки даної патентної заявки ефективні щодо скорочувальної здатності кардіоміоцитів, не впливаючи при цьому на мобілізацію кальцію. Відповідно, вони переважно вільні від побічних ефектів, викликаних підвищеними концентраціями кальцію, таких як підвищена потреба в кисні, тахікардія, аритмія, ішемія і аналогічні їм.

Таким чином, став доступний новий, безпечний та ефективний інотропний метод лікування.



Рівень техніки

Серцева недостатність (СН) (HF), також відома як застійна серцева недостатність, є поширеним серйозним патологічним станом, що характеризується недостатньою насосною здатністю серця, яке не може підтримувати швидкість кровотоку, необхідну для метаболізму в організмі, або може підтримувати це лише вторинно по відношенню до нейрогормональних факторів активації, що призводить, серед іншого, до затримки рідини та появи ознак та симптомів серцевої недостатності. СН є основною причиною госпіталізації серед людей похилого віку. У 2015 році від неї постраждало близько 40 мільйонів людей по всьому світу. В цілому, близько 2 % дорослого населення страждає на серцеву недостатність, а у людей старше 65 років ця цифра зростає до 6–10 %. СН може мати фатальні наслідки, при цьому ризик смерті становить близько 35 % в перший рік після встановлення діагнозу.

Ознаки та симптоми серцевої недостатності зазвичай включають задишку, надмірну втому та набряки ніг. Задишка зазвичай посилюється при фізичному навантаженні чи у положенні лежачи, і може бути причиною нічних пробуджень людини. Поширені причини серцевої недостатності включають ішемічну хворобу серця, зокрема перенесений раніше інфаркт міокарда (серцевий напад), високий кров'яний тиск, фібриляцію передсердь, вади клапанів серця, надмірне вживання алкоголю, інфекції та кардіоміопатію невідомої етіології. Ці фактори викликають серцеву недостатність, змінюючи структуру та/або функцію серця. СН може бути пов'язана зі зниженою фракцією викиду (СНзнФВ) (HFrEF) або зі збереженою фракцією викиду (СНзбФВ) (HFpEF), залежно від того, втрачено або збережено фізіологічну здатність лівого шлуночка скорочуватися або розслаблятися.

Лікування СН залежить від тяжкості та причини захворювання. У людей із хронічною стабільною серцевою недостатністю, незалежно від фракції викиду, лікування зазвичай складається зі змін способу життя, таких як відмова від куріння, фізичні вправи та зміни дієти; лікування основних факторів ризику, таких як гіпертонія, та полегшення симптомів за допомогою діуретиків. Клас препаратів, що використовуються при лікуванні СН, за своєю суттю дуже різноманітний і включає молекули з різними ефектами та механізмами дії, такі як: судинорозширювальні засоби, спрямовані на розширення кровоносних судин, полегшення кровотоку та зниження артеріального тиску; діуретики та антагоністи альдостерону, покликані допомогти при затримці рідини; інгібітори АПФ (ACE), препарати БРА (ARB) або АРНі (ARNi), спрямовані на покращення функції серця та збільшення тривалості життя; глікозиди наперстянки, спрямовані на посилення серцевих скорочень; антикоагулянти або антиагреганти для запобігання утворенню тромбів; бета-блокатори для покращення роботи серця; інгібітори (НЗПГ2) SGLT2, що мають комплексну корисну дію, транквілізатори для зниження тривожності. Наприклад, у пацієнтів з серцевою недостатністю, спричиненою зниженням фракції викиду, рекомендуються інгібітори ангіотензинперетворюючого ферменту, блокатори рецепторів ангіотензину або сакубітрил/валсартан (АРНІ) разом з бета-блокаторами, антагоністи мінералокортикоїдних рецепторів та інгібітори натрій-глюкозного котранспортера 2 (інгібітори (НЗПГ2)).

Вищезазначені підходи, спрямовані на блокування та потенційно на звернення назад несприятливих структурних та/або функціональних змін серця при СНзнФВ, також знижують ризик госпіталізації з приводу серцевої недостатності та смерті. Однак вони не усувають основної патології СН: зниження скоротливості серця. Також доступні препарати, що підвищують скоротливість (умовно звані інотропами): вони включають інгібітори фосфодіестерази-3 (ФДЕ3) (PDE3) (наприклад, мілринон (milrinone)) і адренергічні агоністи (наприклад, добутамін (dobutamine)). Як правило, ці агенти діють за рахунок збільшення концентрації кальцію, що спричиняє ряд побічних ефектів, включаючи збільшення потреби міокарда в кисні, ішемію, аритмію, а також викликають надмірну гіпотензію за допомогою різних механізмів. У деяких країнах доступний левосимендан (levosimendan), він діє частково за рахунок підвищення чутливості до кальцію, але він також діє за допомогою інгібування ФДЕ3, збільшуючи концентрацію кальцію та викликаючи аритмію, а також діє на судини, викликаючи гіпотонію.

Новий клас інотропів, активаторів міозину, знаходиться в стадії розробки, але є побоювання, що вони можуть викликати ішемію і викликати підвищення рівня тропоніну, а результати фази 3 не передбачають позитивного впливу на смертність від серцево-судинних причин (New England Journal of Medicine 2021 Jan 14;384(2):105-116). Повідомлялося про підвищення рівня тропоніну при сепсисі, захворюваннях нирок, тромбоемболії легеневої артерії, серцевої інфекції та серцевої недостатності, що мало важливе прогностичне значення.

Грелін - це гормон, що виробляється клітинами шлунково-кишкового тракту, який стимулює вивільнення гормону росту, збільшує перистальтику/секрецію шлунка, а також стимулює апетит

та споживання їжі. Грелін також бере участь у регуляції когнітивного навчання та пам'яті, пов'язаних з винагородою, циклу сну-неспання, смакових відчуттів, поведінки, пов'язаної з винагородою, та метаболізму глюкози. Також повідомляється про серцево-судинні ефекти греліну: у здорових суб'єктів він розширює артерії, знижує артеріальний тиск, зменшує серцеве постнавантаження та збільшує серцевий викид. (Hypertension, 2014, 64, 450-454). Щодо інотропних ефектів греліну в літературі наводяться суперечливі повідомлення. В Endocrinology 2010, 15(1), 4446-4454 повідомлялося про те, що перфузія греліну в серці після ішемії має інотропний ефект на кардіоміоцити. Однак у Peptides, 2006, 27(7), 1616-1623 повідомлялося про те, що грелін має негативний інотропний ефект, частково опосередкований K_{Ca}-каналами.

У публікації International Journal of Cardiology, 2009, 137(3), 267-275 повідомляється про відсутність впливу людського греліну на серцеву функцію у щурячій моделі серцевої недостатності; аналогічно, не було виявлено інотропних ефектів греліну в ізольованих передсердях з електростимуляцією. (Cardiovascular Research, 2006, 69, 227-235).

Стимулятори секреції гормону росту представляють синтетичні пептиди, які аналогічно греліну стимулюють секрецію гормону росту. Деякі з них можуть виявляти серцево-судинні ефекти, такі як підвищення коронарного опору, прискорення серцевого ритму та кардіотропні ефекти, причому останній досягається за рахунок мобілізації кальцію. (Endocrinology, 2003, 144(11), 5050-5057).

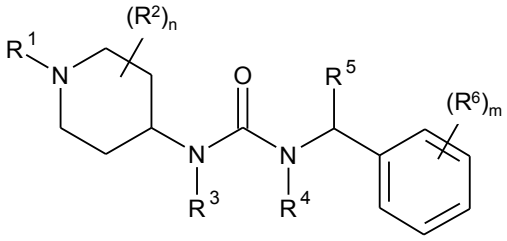
Сімейство асиметричних похідних сечовини з активністю, що модулюють грелін, описані у WO2012/116176 і у WO2015/134839 для застосування при лікуванні захворювань опосередкованих греліном; у цих документах не представлено жодних експериментальних доказів будь-яких серцевих ефектів, будь-якої з описаних сполук. У наступній патентній заявці WO 2019/179878 описана гідрохлоридна сіль 3-(1-(2,3-дихлор-4-метоксифеніл)етил)-1-метил-(1,3,3-триметилпіперидин-4-іл)сечовини, що володіє покращеними властивостями проникнення в мозок і використовується для лікування низки неврологічних розладів; також повідомляється, що ця сполука має центрально-опосередкований брадикардичний ефект; брадикардія описується в літературі як можливий фактор, який, якщо він важкий, може сприяти розвитку явної серцевої недостатності, але у легкій формі може бути захисним засобом при серцевій недостатності (European Heart Journal, 1999, 20,252-255).

У публікації Endocrinology, 2010, 151(9), стор. 4446-4454 повідомляється про опосередковані кальцієм позитивні інотропні ефекти греліну (поліпептиду, що складається з 28 амінокислот) - природнього стимулятора секреції гормону росту та його аналога гексареліна; у статті також визнається існування суперечливих повідомлень про ефекти загального класу засобів, що стимулюють секрецію гормону росту, включаючи повідомлення про випадки негативних інотропних ефектів.

Приймаючи до уваги зазначене вище в рівні техніки, залишається висока потреба у лікарських засобах, здатних вирішити основну проблему та основну причину СН, тобто, знижену скоротливість серця, які є безпечними та не мають побічних ефектів, зокрема тих побічних ефектів, що спричинені мобілізацією кальцію.

Короткий опис

Автори даного винаходу несподівано виявили, що сполуки, представлені формулою (I)



(I)

чиї радикали R^1-R^6 і індекси m, n, визначені в докладному описі, мають виражену інотропну активність щодо кардіоміоцитів, що робить їх корисними для лікування пацієнтів із серцево-судинними захворюваннями.

Дані сполуки, які включають переважно 1-[(1S)-1-(2,3-дихлор-4-метоксифеніл)етил]-3-метил-3-[(4R)-1-метил-3,3-диметил-4-піперидил]сечовину та її гідрохлоридну сіль, таким чином, ефективні при лікуванні патологічних станів, що характеризуються або пов'язані зі зниженою та/або неефективною скорочувальною здатністю серця.

Прикладами таких станів є серцева недостатність, серцевий напад, кардіогенний шок, септичний шок, інфаркт міокарда, кардіоміопатія, гіпертензія легеневої артерії (ЛАГ) (PAH)

тощо.

Переважним показанням є серцева недостатність, яка може бути будь-якого типу (тобто, гострою або хронічною, та зі зниженою або збереженою фракцією викиду), ступені тяжкості (легка, середня або важка) та стадії (тобто початкова або розвинена).

Переважним показанням є прогресуюча серцева недостатність, гостра або хронічна.

Найбільш доцільним показанням є прогресуюча серцева недостатність, гостра або хронічна, зі зниженою фракцією викиду (СНзнФВ). Переважним прикладом кардіоміопатії є дилатаційна кардіоміопатія (ДКМП) (DCM), зокрема ДКМП, обумовлена генетичними варіантами (також відома як сімейна ДКМП). Переважним прикладом ЛАГ є ЛАГ із систолічною функцією правого шлуночка.

Сполуки формули (I), включаючи сполуку 1-[(1S)-1-(2,3-дихлор-4-метоксифеніл)етил]-3-метил-3-[(4R)-1-метил-3,3-диметил-4-піперидил]сечовини та її гідрохлоридну сіль, також корисні тим, що вони проявляють інотропну активність, не впливаючи на мобілізацію кальцію: фактично, замість того, щоб підвищувати концентрацію кальцію в цитозолі кардіоміоцитів, вони діють шляхом підвищення чутливості саркомера кардіоміоцитів до існуючого рівня кальцію.

Отже, сполуки за даною патентною заявкою забезпечують значну інотропну відповідь у пацієнтів, які потребують їх, уникаючи при цьому поширених побічних ефектів відомих інотропних засобів, що викликають підвищення концентрації кальцію в цитозолі кардіоміоцитів, які коротко називають тут "підвищеними концентраціями кальцію", таких як підвищена потреба в кисні, тахікардія, аритмія, ішемія тощо. В цілому, таким чином стає доступним нове, безпечне та ефективне інотропне лікування.

Опис фігур

Фігура 1 (зверху): дозозалежне збільшення скорочувальної здатності кардіоміоцитів миші (верхня панель), індуковане AC01/HM01; скорочувальний ефект AC01/HM01 вимірювався на кардіоміоцитах (пустушка (SHAM), тобто, кардіоміоцитах, що зазнали процедури-пустушки без індукції інфаркту міокарда) у різних концентраціях (0,2, 0,5 і 1 мкМ), використовуючи як показники зміни довжини фракції скорочення (ФС (FS)%). AC01/HM01 в концентрації 1 мкМ продемонстрував найбільший скорочувальний ефект у порівнянні з носієм (* $p<0,05$, ** $p<0,01$). Гістограма показує середнє значення фракції скорочення клітин N, проаналізованих, як зазначено.

Фігура 1 (знизу): збільшення скорочувальної здатності, індуковане AC01/HM01, яке інгібувалося D-Lys3 (специфічним антагоністом греліну), на кардіоміоцитах, виділених із сердець як мишей-пустушок, так і мишей із серцевою недостатністю (СН) (мишам була проведена перев'язка лівої передньої низхідної артерії, що викликала інфаркт міокарда; через кілька тижнів у мишей розвинулася серцева недостатність): скорочувальна здатність кардіоміоцитів підвищувалася при застосуванні агоніста рецептора греліну AC01/HM01 (1 мкМ), в той час як попередня обробка антагоністом рецептора греліну D-Lys3-GHRP-6 (3 мкМ) блокувала скорочувальний ефект.

Кардіоміоцити, виділені як з пустушок (ліворуч), так і з груп ІМ (інфаркт міокарда) (MI) (праворуч), позитивно реагували на AC01/HM01, збільшуючи свою скорочувальну здатність. (* $p<0,05$, ** $p< 0,01$).

Гістограма показує середнє значення фракції скорочення клітин N, проаналізованих, як зазначено.

Фігура 2 (зліва та вгорі праворуч): Репрезентативне зображення лінійного сканування (ліворуч) та криві перехідного процесу Ca^{2+} (мобілізації) (вгорі праворуч) у кардіоміоцитах, ізольованих із сердець-пустушок, які отримували носій або різні концентрації AC01/HM01.

Обробка AC01/HM01 не викликала зміни амплітуд перехідних процесів Ca^{2+} ні при яких концентраціях, що вказує на те, що підвищена скорочувальна здатність на Фігурі 1 обумовлена підвищеною чутливістю до Ca^{2+}, а не перехідними процесами Ca^{2+}.

Фігура 2 (праворуч внизу): Гістограми показують середнє значення перехідних процесів Ca^{2+} у N клітинах, проаналізованих, як зазначено (p = незначно для всіх порівнянь).

Фігура 3: Репрезентативне лінійне сканування та криві перехідних процесів Ca^{2+} у кардіоміоцитах, ізольованих з сердець мишей-пустушок. Репрезентативне лінійне сканування перехідних процесів Ca^{2+} (зліва), репрезентативні криві зміни амплітуди (праворуч) та середні значення амплітуд перехідних процесів Ca^{2+} у кардіоміоцитах, ізольованих з сердець мишей-пустушок (внизу).

Обробка AC01/HM01 (1 мкМ) з D-Lys 3 GHRP-6 чи без нього не змінювала амплітуду перехідного процесу Ca^{2+}. Гістограми показують середнє значення N клітин, проаналізованих, як зазначено.

Фігура 4: Рівні Фосфо (Ser 22-23) cTnI, оцінені методом вестерн-блот.

(Зверху): Репрезентативний блот фосфорильованих форм cTnI та загальних cTnI. Обробка кардіоміоцитів-пустушок AC01/HM01 (1 мкМ; середній стовпчик) знизила рівні фосфорилювання серцевого тропоніну I за залишками серину 22-23. Попередня обробка антагоністом рецептора греліну D-Lys3-GHRP-6 (3 мкМ, стовпчик праворуч) блокувала передачу сигналів, активованих AC01/HM01 у кардіоміоцитах, та відновила рівні фосфорилювання з TnI до фізіологічних рівнів, що спостерігаються в кардіоміоцитах, в які ввели носій (лівий стовпчик).

(знизу): Гістограма, що показує рівні експресії фосфо-TnI, виражені у вигляді кратних змін у кардіоміоцитах, оброблених носієм. Партії кардіоміоцитів (~10^5 клітин) збирали в пробірки та обробляли, як зазначено. Гістограма показує середнє значення N проаналізованих партій, як зазначено (* p<0,05, ** p< 0,01, *** p<0,001),

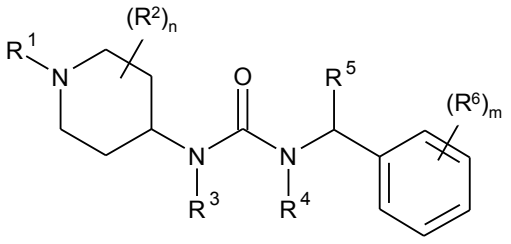
Фігура 5. Активність протеїнкінази A (ПКА) в ізольованих кардіоміоцитах. Кардіоміоцити, в які ввели AC01/HM01 (1 мкМ), демонстрували зниження активності ПКА (PKA) (сіра смужка). D-Lys 3-GHRP-6 блокував внутрішньоклітинну передачу сигналів AC01/HM01 і відновлював активність ПКА до фізіологічних рівнів (червона смужка), аналогічно кардіоміоцитів, обробленим носієм (біла смужка).

Партії кардіоміоцитів (~10^5 клітин) збирали в пробірки та обробляли, як зазначено. Гістограма показує середнє значення для N партій.

Фігура 6. Молекулярна передача сигналів, що запускається взаємодією AC01/HM01 і рецептора греліну: AC01/HM01 активує передачу сигналів Gαi, яка пов'язана зі зниженою активністю ПКА і зниженим фосфорилюванням cTnI по серину 22-23. Цей механізм відповідальний за підвищену чутливість до Ca^{2+} у кардіоміоцитах та покращену скорочувальну здатність після стимуляції AC01/HM01.

Докладний опис

Першим основним завданням даного винаходу є одержання сполуки формули (I) або фармацевтично прийнятної солі сполуки формули (I) для використання як інотропний засіб



(I)

В даній формулі (I):

R^2, R^3, R^5- незалежно один від одного являють собою C_1-C_6 алкіл,

R^1, R^4- незалежно один від одного являють собою водень або C_1-C_6 алкіл,

R^6 являє собою C_1-C_6 алкіл, гало, C_1-C_6 алкоксі або C_1-C_6 галоалкіл,

n являє собою 2-3,

m являє собою1-3.

Загалом у цій формулі (I): використовуваний термін "алкіл" включає обидва, лінійний та розгалужений алкіл; використовувані терміни "C_1-$C_{n''}$ розкривають кожен із одиничних гомологів діапазону 1-n, наприклад, використовуваний термін C_1-C_6 еквівалентний C_1, C_2, C_3, C_4, C_5, C_6.

В одному варіанті здійснення цього винаходу, R^4 являє собою водень.

У кращому варіанті здійснення даного винаходу R^4 являє собою водень, та n являє собою 2.

В ще більш кращому варіанті здійснення даного винаходу R^4 являє собою водень, n являє собою 2, та R^2 являє собою метил.

В іншому більш кращому варіанті здійснення даного винаходу R^4 являє собою водень, n являє собою 2, R^2 являє собою метил, та дві R^2 групи приєднані до одного і того ж атома вуглецю піперидинового кільця, зокрема, до атома вуглецю, який безпосередньо не зв'язаний з атомом азоту піперидину, тобто, вони приєднані до 3-іл положення піперидинового кільця (що еквівалентно 5-іл положенню).

У переважних варіантах здійснення даного винаходу всі наведені вище варіанти його здійснення можуть бути додатково охарактеризовані одним або більш, переважно всіма, з наступних умов:

- обидва і R^3, і R^5 являють собою C_1-C_3 алкіл, переважно метил,
- m являє собою 3,
- R^6 являє собою гало і/або алкоксі, переважно принаймні один R^6 являє собою алкоксі.

Сполуки формули (I), в яких R^1 являє собою C_1-C_6 алкіл, являють собою загально

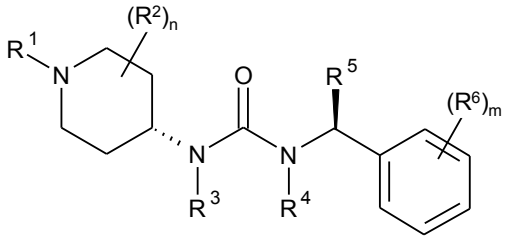
застосовуваний варіант; альтернативно, сполуки формули (I), в яких R^1 являє собою водень, являють собою інший загально застосовуваний варіант.

Використовуваний термін "гало" означає тут хлор, фтор, бром чи йод; як правило, використовуваний термін "гало" вказує на хлор; як правило, використовуваний термін "алкоксі" вказує на метоксі или этоксі.

Використовуваний термін "фармацевтично прийнятна сіль" означає тут будь-яку сіль, яка зазвичай вважається нетоксичною у фармацевтичній практиці;

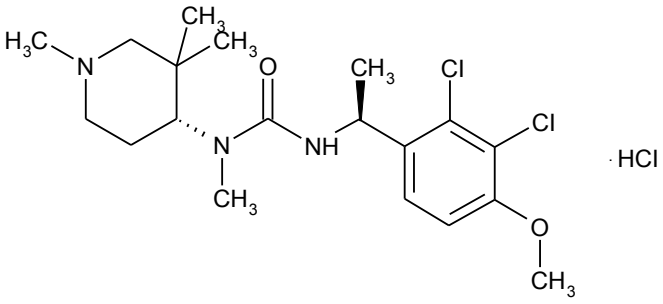
зокрема, оскільки сполуки формули (I) є солеутворюючими амінами, будь-яка відповідна солеутворююча кислота може бути використана у фармацевтичній практиці для утворення фармацевтично прийнятної солі з вільної основи формули (I): типова фармацевтично прийнятна сіль є сіль соляної кислоти (гідрохлорид), зокрема моногідрохлорид.

Сполуки формули (I) містять два асиметричні атоми вуглецю і можуть існувати в різних стереоізомерних формах та їх сумішах, всі вони представлені даною формулою (I); серед них кращою є форма 1(S), 4(R), яка відповідає структурі:



(I)

де R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, m і n мають значення, визначені вище. В особливо бажаному варіанті здійснення даного винаходу сполука формули (I) являє собою 1-[(1S)-1-(2,3-дихлор-4-метоксифеніл)етил]-3-метил-3-[(4R)-1-метил-3,3-диметил-4-піперидил]-сечовину або її фармацевтично прийнятну сіль, зокрема моногідрохлоридну сіль, що має наступну структуру (Ia):



(Ia).

Сполука зі структурою (Ia) відома сама по собі, наприклад, з Frontiers in Pharmacology, 2018, Том 9, стаття 869, стор. 1-16, і тут скорочено згадується як AC01 або HM01, взаємозамінно.

Використовуваний в описі термін "інотропний агент", поряд з використовуваними термінами "інотропна активність" або "інотропний ефект" при згадуванні активності сполук даної формули (I) вказують, що сполука, що розглядається, здатна стимулювати, тобто, посилювати скорочувальну здатність і силу серця пацієнта.

Використовуваний термін інотропний означає тут "позитивну" інотропну активність, тобто, вплив на м'яз є стимулюючим і не поширюється на протилежний негативний інотропний ефект.

Інотропна активність сполук за даною патентною заявкою ефективна щодо клітин серцевого м'яза, тобто клітин міокарда, що призводить до посиленої скорочувальної здатності відповідного м'язового органу, тобто серця. Підвищена скорочувальна здатність покращує функціональність серця, зокрема силу його скорочень, що призводить до підвищення насосної здатності з подальшим покращенням доставки крові та насичення киснем різних ділянок тіла.

На відміну від доступних інотропних агентів, інотропний ефект сполук за цією патентною заявкою формули (I) не опосередкований збільшенням концентрацій кальцію; цей ефект експериментально підтверджується відсутністю збільшення концентрацій кальцію в цитозолі кардіоміоцитів, тобто відсутністю вивільнення та потоку кальцію з позаклітинного простору та саркоплазматичного ретикулуму. Таким чином, несподівано було виявлено, що ці сполуки мають скорочувальну ефективність без збільшення базальних концентрацій кальцію в м'язовій

клітині, тобто, вони швидше підвищують чутливість клітин до існуючих рівнів кальцію. Отже, термін "інотропний агент", що використовується, може бути більш точно визначений, як "заснований на сенсибілізації до кальцію" інотропний агент або, як альтернатива, як "нейтральний за рівнем кальцію" інотропний агент. Отже, відповідна інотропна активність, типова сполука за даною патентною заявкою формули (I), вигідно відрізняється від такої у доступних інотропних препаратів тим, що вона не включає побічні ефекти, зумовлені підвищеною концентрацією кальцію в клітинах, такі як підвищена потреба міокарда в кисні, ішемія, аритмія та надмірна артеріальна гіпотензія тощо. Таким чином, медичне застосування, що розглядається, додатково характеризується, як таке, що не має вищевказаних побічних ефектів, пов'язаних з підвищеною концентрацією кальцію в клітинах.

Сполуки за даною патентною заявкою формули (I) ефективні для застосування при лікуванні будь-яких патологічних станів пацієнта людини або тварини, що характеризуються або пов'язані зі зниженою та/або неефективною скорочувальною здатністю серця. Прикладами цих станів є серцева недостатність (також відома як застійна серцева недостатність), серцевий напад, кардіогенний шок, септичний шок, інфаркт міокарда, кардіоміопатія, гіпертензія легеневої артерії (ЛАГ) та аналогічне їм.

Переважним показанням є серцева недостатність, вона може бути будь-якого типу (тобто, гострою або хронічною, зі зниженою або збереженою фракцією викиду), ступенів тяжкості (легкою, середньотяжкою або тяжкою) та стадії (тобто початковою або прогресуючою). Станом серцевої недостатності, при якому дане лікування особливо необхідне/ефективне, є серцева недостатність зі зниженою фракцією викиду (СНзнФВ), зокрема прогресуюча СНзнФВ, зазначена серцева недостатність є або гострою, або хронічною. Особливим показанням для лікування є хронічна СНзнФВ, як на початковій, так і на пізній стадії. Переважним прикладом кардіоміопатії є дилатаційна кардіоміопатія (ДКМП), зокрема ДКМП, обумовлена генетичними варіантами (також відома як сімейна ДКМП). Переважним прикладом ЛАГ є ЛАГ із систолічною функцією правого шлуночка.

Застосування за даною патентною заявкою по суті є ефективним при станах, які вимагають тривалого лікування інотропними агентами, таких як хронічні форми серцевої недостатності, у всіх цих випадках запобігання супутньому розвитку побічних ефектів, пов'язаних з кальцієм, особливо корисно для пацієнта, оскільки воно запобігає тривалому впливу кальцію, небезпечним наслідкам, які можуть призвести до летального результату в довгостроковій перспективі, що робить доступнішою більш безпечну інотропну терапію з виживанням у більш довгостроковій перспективі.

Отже, у кращому варіанті виконання даної патентної заявки медичне застосування переважно спрямоване на субпопуляцію пацієнтів, для яких особливо слід уникати побічних ефектів, пов'язаних із підвищеною концентрацією кальцію в кардіоміоцитах, тобто, пацієнтів, які мали, мають або перебувають у групі ризику розвитку ішемії, аритмії та/або гіпотензії, що відповідає підгрупі більш ослаблених пацієнтів із серцево-судинними захворюваннями, для яких виникнення вищезазначених побічних ефектів може бути дуже небезпечним і, можливо, смертельним.

Серцева недостатність, що розглядається тут, може бути викликана будь-якими захворюваннями, які послаблюють серцевий м'яз, або захворюваннями, що викликають ригідність серцевих м'язів, або захворюваннями, які збільшують потребу тканин організму в кисні понад здатність серця доставляти його.

Багато захворювань можуть порушувати насосну функцію шлуночків серця. Наприклад, м'язи шлуночків можуть бути ослаблені перенесеними раніше серцевими нападами або запаленням (міокардитом), що з часом призводить до прогресуючої серцевої недостатності. Зниження насосної здатності шлуночків через м'язове ослаблення називається систолічною дисфункцією. Після кожного скорочення шлуночків (систоли) м'язи шлуночків повинні розслабитись, щоб кров із передсердь могла заповнити шлуночки. Таке розслаблення шлуночків називається діастола. Такі захворювання, як гемохроматоз або амілоїдоз можуть викликати ущільнення серцевого м'яза і погіршувати здатність шлуночків розслаблятися і наповнюватися; це називається діастолічною дисфункцією. Найбільш поширеною причиною є тривалий високий кров'яний тиск, що призводить до потовщення (гіпертрофії) серця. Крім того, хоча в деяких пацієнтів, насосна функція і наповнююча здатність серця можуть бути нормальними, аномально висока потреба тканин організму в кисні (наприклад, при гіпертиреозі) може утруднити забезпечення адекватного кровотоку серцем (так звана серцева недостатність з високим викидом). У деяких пацієнтів може бути присутній один або декілька з цих факторів, що викликають застійну серцеву недостатність. Застійна серцева недостатність може вражати багато органів тіла. Наприклад, ослаблений серцевий м'яз може бути не в змозі постачати

ниркам достатньою кількістю крові, які потім починають втрачати нормальну здатність виводити сіль (натрій) і воду. Це зниження функції нирок може призвести до того, що організм затримає більше рідини. Легені можуть переповнитися рідиною (набряк легень), і здатність людини виконувати фізичні вправи знижується. Рідина також може накопичуватися в печінці, тим самим погіршує її здатність очищати організм від токсинів і виробляти незамінні білки. Ефективність абсорбції кишечником поживних речовин та ліків може знизитися. З часом, за відсутності лікування або навіть при оптимальному лікуванні існуючими методами лікування, погіршення застійної серцевої недостатності торкнеться практично кожного органу в організмі. Це відбувається незалежно від першопричини, що призвела до подальшого розвитку серцевої недостатності. Таким чином, лікування за даною патентною заявкою додатково спрямоване на лікування всіх вищевказаних симптомів та наслідків серцевої недостатності.

Дана патентна заявка додатково стосується застосування сполуки формули (I) або її фармацевтично прийнятної солі, як зазначено вище, при виробництві інотропного лікарського засобу для лікування будь-якого з вищевказаних патологічних станів. Додатково дана патентна заявка відноситься до способу лікування будь-якого з вищевказаних патологічних станів, що включає введення сполуки формули (I) або її фармацевтично прийнятної солі суб'єкту, який цього потребує.

Відповідні суб'єкти, яким призначено лікування за даною патентною заявкою, включають ссавців. До ссавців відносяться люди будь-якої статі і на будь-якій стадії розвитку, ссавці додатково включають, крім іншого, собак, кішок, велику рогату худобу, кіз, коней, овець, свиней, гризунів, зайцеподібних, приматів тощо, і включають ссавців у період внутрішньоутробного розвитку.

Використовувані діапазони доз можуть становити переважно від 0,1 до 10 мг/день, наприклад від 0,2 до 10 мг/день; добова доза може бути поділена на більш ніж одне щоденних введення, включаючи два щоденні введення, наприклад, від 0,1 до 5 мг двічі на день (двічі на добу).

Сполуки за даним винаходом формули (I) можуть бути виготовлені у фармацевтично прийнятних лікарських формах, які підходять для введення зазначених вище добових доз. Наприклад, вони можуть містити сполуку формули (I) у кількостях, що варіюються від 0,1 до 10 мг, або частину цієї кількості, якщо призначені для багаторазового щоденного введення.

Фахівець у галузі техніки, до якої належить даний винахід, може без зайвих експериментів, і покладаючись на особисті знання та опис даної патентної заявки, оптимізувати ці діапазони щодо конкретної фармацевтичної форми, яка буде вироблятися.

Тверда дозована форма для перорального введення може бути, наприклад, представлена у вигляді окремих одиниць, таких як тверді або м'які капсули, пілюлі, пакетики, пастилки, саше, пігулки або міні-пігулки, кожна з яких містить задану кількість принаймні однієї зі сполук даного винаходу. У деяких формах пероральне введення може здійснюватися у вигляді порошку або гранул. У деяких формах форма пероральної дози є сублінгвальною, такою як, наприклад, пастилка або оральна плівка для внутрішнього прийому. У таких твердих дозованих формах сполуки формули I зазвичай комбінують з одним або декількома допоміжними речовинами. Такі капсули або пігулки можуть представляти препарати з контрольованим вивільненням. У випадку капсул, пігулок або міні-пігулок та пігулок лікарської форми також можуть містити буферні агенти або можуть бути приготовані з кишковорозчинним покриттям.

Рідкі дозовані форми для перорального введення включають, наприклад, фармацевтично прийнятні емульсії, розчини, суспензії, сиропи та еліксири, що містять інертні розріджувачі, які зазвичай використовуються в галузі техніки, до якої відноситься дана патентна заявка (наприклад, воду). Такі композиції також можуть містити допоміжні речовини, такі як змочувальні, емульгуючі агенти, агенти що суспендують, ароматизатори (наприклад, підсолоджувачі) та/або віддушки.

У деяких формах композиції за даною патентною заявкою можуть включати форму парентеральної дози. "Парентеральне введення" включає, наприклад, підшкірні ін'єкції, внутрішньовенні ін'єкції, внутрішньочеревні, внутрішньом'язові ін'єкції, внутрішньошлункові ін'єкції та інфузію. Препарати для ін'єкцій (наприклад, стерильні водні або олійні суспензії для ін'єкцій) можуть бути приготовані відповідно до відомого рівня техніки з використанням відповідних диспергуючих, змочувальних агентів та/або агентів, що суспендують.

Як правило, у складі використовується відповідна кількість фармацевтично прийнятного носія для надання складу ізотонічного стану.

Приклади фармацевтично прийнятного носія включають без обмеження, фізіологічний розчин, розчин Рінгера та розчин декстрози. Інші прийнятні допоміжні речовини включають без обмеження, загусники, розріджувачі, буфери, консерванти, поверхнево-активні речовини та

аналогічне їм.

Зазначені сполуки можуть вводитися будь-яким відповідним способом, переважно у формі фармацевтичної композиції, адаптованої до такого способу, та в дозі, ефективній для передбачуваного лікування або профілактики. Активні сполуки та композиції, наприклад, можна вводити такими шляхами та способами введення: перорально, ректально, парентерально, через очі, інгаляційно або місцево.

Зокрема, введення може бути: підшкірним, інгаляційним, за допомогою клізми, кон'юнктивальним, за допомогою очних крапель, за допомогою вушних крапель, альвеолярним, назальним, інтраназальним, вагінальним, інтравагінальним, трансвагінальним, через очі, внутрішньоочним способом, черезшкірним, ентеральним, пероральним, внутрішньоротовим, трансоральним, кишковим, ректальним, інтраректальним, трансректально-ректальним, ін'єкційним, інфузійним, внутрішньовенним, внутрішньоартеріальним, внутрішньом'язовим, внутрішньомозковим, внутрішньошлуночковим, внутрішньомозково-шлуночковим, внутрішньосерцевим, підшкірним, внутрішньокістковим, внутрішньо шкірним, інтратекальним, внутрішньочеревним, внутрішньоміхуровим, інтракавернозним, інтрамедулярним, внутрішньоочним, внутрішньочерепним, черезшкірним, трансмукозальним, трансназальним, інгаляційним, інтрацистернальним, епідуральним, перидуральним, інтравітреальним та аналогічним їм. Переважним способом введення є пероральний або внутрішньовенний.

Сполуки за даною патентною заявкою формули (I), як правило, вводять у терапевтично ефективних кількостях. Терапевтично ефективна кількість може широко змінюватись в залежності від тяжкості захворювання, віку та відносного стану здоров'я суб'єкта, активності використовуваної сполуки та інших факторів.

Терапевтично ефективні кількості сполук формули (I) можуть змінюватись від близько 0,001 мг/кг маси тіла до близько 0,1 мг/кг маси тіла, переважно від близько 0,001 мг/кг маси тіла до близько 0,01 мг/кг маси тіла.

Фахівець у галузі техніки, до якої належить даний винахід, може без зайвих експериментів, і покладаючись на особисті знання та опис даної патентної заявки, оптимізувати ці діапазони щодо кожного з різних патологічних станів, зазначених вище.

З усього цього опису наводяться посилання на різні публікації. Зміст цих публікацій у всій їх повноті включено як посилання в даний опис, щоб повніше описати рівень техніки, до якого це відноситься. Наведені посилання також індивідуально і спеціально включені в даний документ за допомогою посилання на матеріал, що міститься в них, який обговорюється в реченні, в якій використовується посилання.

Форми однини, що використовуються в описі та доданій формулі даної патентної заявки, включають посилання на множину, якщо з контексту явно не випливає інше. Так, наприклад, посилання на лікування "патологічного стану" включає лікування двох або більше таких станів, навіть якщо вони виникають одночасно в одного й того самого суб'єкта.

Слово "або" чи подібні терміни, які використовуються в описі даної патентної заявки, означають будь-якого одного члена відповідного переліку, а також включають будь-яку комбінацію членів цього переліку.

"Необов'язковий" або "необов'язково" означає, що згодом описана подія чи обставина може статися, а може і не відбутися, і що опис включає випадки, коли вказана подія чи обставина відбувається, та випадки, коли вона не відбувається.

Використовуваний термін "близько" при використанні його для зміни значення будь-якого параметра та його діапазонів відноситься до експериментальних змін числової величини, які можуть виникати, наприклад, в результаті типових процедур вимірювання та поводження, що використовуються для приготування сполук, композицій та аналогічне їм; через ненавмисну помилку в цих процедурах; через відмінності у виробництві, джерелі або чистоті вихідних матеріалів або інгредієнтів, що використовуються для здійснення методів; та аналогічні фактори.

Використовуваний термін "близько" також включає в обсяг поняття кількості, які відрізняються через зміни з часом композиції або рецептури з конкретною початковою концентрацією або сумішшю, і кількості, які відрізняються через змішування або обробку композиції або рецептури з конкретною початковою концентрацією або сумішшю.

Всі ці експериментальні відхилення зазвичай знаходяться в межах ±5 % заданого значення. Незалежно від того, чи змінена використовуваним терміном "близько" додана до цього документа формула винаходу, вона включає еквіваленти цих величин.

Використовуваний термін "містить" і варіанти цього слова, такі як "що містить" і "містить", означають "включаючи, крім іншого", і не призначені для виключення, наприклад, інших добавок, компонентів, цілих чисел або стадій.

Термін "проведення лікування" або "лікування", що використовується в описі, означає медичне спостереження за пацієнтом з наміром вилікувати, покращити стан, стабілізувати або запобігти захворюванню, патологічному стану або розладу. Ці терміни включають активне лікування, тобто лікування, спрямоване конкретно на покращення стану після захворювання, патологічного стану або розладу, а також включає етіотропне лікування, тобто лікування, спрямоване на усунення причин супутнього захворювання, патологічного стану або розладу з відновленням вихідних параметрів організму пацієнта до захворювання, включаючи збільшення будь-якого параметра, який був знижений патологічно, такого як скоротлива здатність серця. Ці терміни можуть означати, що симптоми основного захворювання зменшуються та/або що одна або декілька основних клітинних, фізіологічних або біохімічних причин або механізмів, що викликають симптоми, зменшуються. Зрозуміло, що "зменшений", що використовується в даному контексті, означає те, що він відноситься до стану захворювання, включаючи молекулярний стан захворювання, а не тільки фізіологічний стан захворювання. Крім того, ці терміни включають паліативне лікування, тобто лікування, спрямоване на полегшення симптомів, а не на вилікування захворювання, патологічного стану або розладу; профілактичне лікування, тобто лікування, спрямоване на мінімізацію або часткове або повне інгібування розвитку пов'язаного захворювання, патологічного стану або розладу; і підтримуюче лікування, тобто лікування, яке застосовується на додаток до іншої специфічної терапії, спрямованої на поліпшення супутнього захворювання, патологічного стану або розладу. Ці терміни означають як лікування, що має лікувальну або полегшуючу мету, так і лікування, що має профілактичну мету. Може проводитися лікування як гострих, так і хронічних станів. Зрозуміло, що лікування може означати зменшення одного або більше симптомів або характеристик принаймні на 5 % 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 %, 99,9 %, 99,99 %, 100 % по відношенню до контролю. У контексті цих термінів профілактика відноситься до здатності сполуки або композиції (такої як сполуки та композиції за даною патентною заявкою) запобігати захворюванню, визначеному в даному документі, у пацієнтів, у яких діагностовано захворювання, або які мають ризик розвитку такого захворювання. У цьому контексті профілактика включає відстрочення початку захворювання порівняно з контролем. Ці терміни не вимагають, щоб лікування справді було ефективним для отримання будь-яких із передбачуваних результатів. Достатньо, щоб результати були передбачуваними.

В описі можуть бути використані скорочення, які добре відомі фахівцю в галузі техніки, до якої відноситься даний винахід, (наприклад, "г" для позначення години або годин, "г" або "гм" для грама (ів), "мл" для мл і "кт" для кімнатної температури, "нм" для нанометрів, "М" для молей і тому подібні скорочення).

Наступні приклади наведені для того, щоб надати фахівцям у галузі техніки, до якої відноситься даний винахід, повне розкриття та опис того, як виробляються та оцінюються сполуки, композиції, вироби, пристрої та/або способи, заявлені в даному документі, та є необмежуючими прикладами.

Було зроблено зусилля для забезпечення точності щодо цифр (наприклад, кількості, температури та аналогічне їм), але слід враховувати деякі похибки та відхилення. Якщо не вказано інше, частини вказані за масою, температура вказана в°С і якщо не вказано інше, температура є кімнатною, а тиск дорівнює атмосферному тиску або близького до нього.

Експериментальна частина

Приклад 1

Вплив HM01 на кардіоміоцити мишачої моделі серцевої недостатності, спричиненої інфарктом міокарда та контрольних мишей

Методи

Етичне схвалення досліджень на тваринах

Дослідження проводились у Каролінському інституті (Karolinska Institutet), Стокгольм, Швеція. Дослідження було схвалено Північним етичним комітетом Стокгольму з експериментів на тваринах (Stockholm North Ethical Committee on Animal Experiments). Експерименти на тваринах проводилися відповідно до шведського закону про захист тварин (Swedish Animal Welfare Act), шведської постанови про соціальне забезпечення (Swedish Welfare ordinance), а також рекомендацій та застосованих нормативних актів шведської влади (етичний дозвіл 2155-2020 та N273-15) (Ethical permit 2155-2020 and N273-15). Експерименти на тваринах відповідали основним положенням Директиви 2010/63/ЄС Європейського парламенту про захист тварин, які використовуються в наукових цілях (Directive 2010/63/EU of the European Parliament on the protection of animals used for scientific purposes). Мишей утримували при 12-годинному циклі світло/темрява та забезпечували їжею та водою без обмеження.

Мишача модель серцевої недостатності, спричиненої інфарктом міокарда

Мишей C57BL/6 у віці 12-16 тижнів анестезували газовою сумішшю кисню та ізофлурану. Інфаркт міокарда (ІМ) був спричинений постійною перев'язкою лівої коронарної артерії, як зазначено вище. Тварини-пустушки були прооперовані аналогічно, але без перев'язки коронарної артерії. Тварин умертвляли через 4 тижні після процедури, коли у групі ІМ були очевидні ознаки серцевої недостатності (СН): ехокардіографія показала зменшене фракційне скорочення лівого шлуночка (ФУ) та неконтрактильну інфарктовану передню стінку (%ФУ ІМ=29,3±1,1, пустушка =61,4±2,1). Після введення седативних препаратів мишей піддавали евтаназії шляхом зміщення шийних хребців, а серця збирали та обробляли для ізолювання кардіоміоцитів.

Відношення маси серця до маси тіла використовувалося як параметр для оцінки гіпертрофії серця (маса серця/маса тіла ІМ =9,5±1,3, пустушка =6,0±0,4). Більше того, в серці мишей з ІМ виявлена ділянка некротичного інфаркту на передній стінці ЛШ, нижча від коронарної оклюзії, що покриває близько 1/3 лівого шлуночка. Загалом для дослідження використовували 5 мишей-пустушок і 3 мишей з ІМ.

Ізоляція кардіоміоцитів

Кардіоміоцити були свіжо ізольовані із шлуночків серця окремо у мишей-пустушок та мишей СН відповідно до протоколу, розробленого Альянсом з клітинної сигналізації (Alliance for Cellular Signalling) (ідентифікатор протоколу процедури AfCS PP00000125). З кожного з 5 сердець пустушок і 3 сердець СН була виготовлена клітинна суспензія, і розділена на 10 аліквот кожна, загалом 50 аліквот із сердець-пустушок та 30 аліквот із сердець СН. Ці аліквоти обробляли носієм AC01/HM01 чи D-Lys3-GHRP-6+AC01/HM01, як зазначено, і використовували для подальших фізіологічних та біохімічних експериментів.

Реагенти

AC01/HM01 суспендували у фізіологічному розчині фосфатного буфера (PBS: у мм: NaCl 137, KCl 7, Na_2HPO_4 10, KH_2PO_4 1,8 М) і розбавляли до одержання 3 різних концентрацій: 0,2, 0,5 або 1 мкМ у розчині Тірода. Було використано діапазон концентрацій у межах 0,2-1 мкМ, щоб переконатися, що рецептор активовано. D-Lys 3 GHRP-6 (антагоніст рецептора греліну; Sigma Aldrich, Stockholm, Sweden; IC_{50} для антагоністичної активності = 0,9 мкМ) суспендували у PBS та використовували при 3 мкМ у якості кінцевої концентрації у розчині Тіроду (у мМ: NaCl 121, KCl 5,0, $CaCl_2$ 1,8, $MgCl_2$ 0,5, NaH_2PO_4 0,4, $NaHCO_3$ 24, ЕДТА 0,1, глюкоза 5,5). Перед вимірюванням скорочувальної здатності та передачі сигналів Ca^{2+} та біохімічними аналізами суспензії кардіоміоцитів із сердець-пустушок та сердець із СН рандомізували за 3 типами обробки: носій, AC01/HM01 чи D-Lys3-GHPR-6+AC01/HM01.

Обробку різними агентами проводили протягом 15 хвилин за кімнатної температури. Деякі аліквоти клітинної суспензії піддавали миттєвому заморожуванню рідким N_2 і зберігали при температурі -80 °С для подальшого біохімічного аналізу. Усі експерименти з обробки кардіоміоцитів проводилися наосліп.

Конфокальна візуалізація

Свіжо ізольовані кардіоміоцити розділили на аліквоти в пробірці об'ємом 1,5 мл і інкубували з проникною для клітин формою флуоресцентного індикатора Ca^{2+}Fluo-3 AM з наступним промиванням протягом >5 хв. Перед стимуляцією різними реагентами клітини поміщали у чашки зі скляним дном, покриті ламініном (Mattek, Ashland, MA, USA), які представляють собою спеціально виготовлену камеру для перфузії/стимуляції, та безперервно перфузували O_2/CO_2 (95/5 %) барботованим розчином Тіроду з наступною композицією (в мМ: NaCl 121, KCl 5,0, $CaCl_2$ 1,8, $MgCl_2$ 0,5, NaH_2PO_4 0,4, $NaHCO_3$ 24, EDTA 0,1, глюкоза 5,5), який є розчином носія. 15 партій із пустушок та 9 партій із СН кардіоміоцитів рандомізували для різних обробок: носій, AC01/HM01 (0,2, 0,5 або 1 мкМ) чи попередня обробка D-Lys3-GHPR-6 (3 мкМ) з подальшою обробкою AC01/HM01 (1 мкМ). Кардіоміоцити для скорочення стимулювали при надпороговій напрузі з частотою 1 Гц при використанні електричного поля між двома платиновими електродами, прикріпленими до камери перфузії/стимуляції. Флуоресцентні зображення лінійного сканування були отримані при використанні конфокального мікроскопа (Biorad; 40-кратні олійні імерсійні лінзи) тільки на кардіоміоцитах, які скорочувалися при електричній стимуляції і мали нормальну морфологію (наприклад, поперечносмугасті, у формі "цеглини"). Клітини, які демонстрували спонтанні скорочення, не аналізувалися. Для кількісної оцінки змін флуоресценції (перехідні процеси Ca^{2+}) і скоротливої здатності окремих кардіоміоцитів використовували програмне забезпечення ImageJ (програмне забезпечення з відкритим вихідним кодом, розроблене NIH, Bethesda, USA).

Вимірювання скорочувальної здатності кардіоміоцитів

Свіжо ізольовані кардіоміоцити розділили на аліквоти у пробірки об'ємом 1,5 мл і інкубували з проникною для клітин формою флуоресцентного індикатора Ca^{2+}Fluo-3 AM протягом близько

20 хвилин з наступним промиванням протягом >5 хвилин.

Клітини поміщали у чашки зі скляним дном, покритим ламініном. (35 мм, Mattek, Ashland, MA, USA), а потім встановлювали у спеціально виготовлену камеру для перфузії/стимуляції. Клітини безперервно перфузували O_2/CO_2 (95/5 %) барботованим розчином Тіроду з наступною композицією (у мм): NaCl 121, KCl 5,0, $CaCl_2$ 1,8, $MgCl_2$ 0,5, NaH_2PO_4 0,4, $NaHCO_3$ 24, EDTA 0,1, глюкоза 5,5, який є розчином-носієм.

15 аліквот суспензії кардіоміоцитарних пустушок і 9 аліквот СН рандомізували для різних обробок: носій, AC01/HM01 (0,2, 0,5 або 1 мкМ) чи попередня обробка D-Lys3-GHPR-6 (3 мкМ) з подальшою обробкою AC01/HM01 (1 мкМ). Кардіоміоцити для скорочення піддавалися електричній стимуляції при надпороговій напрузі з частотою 1 Гц з використанням двох платинових електродів, приєднаних до камери перфузії/стимуляції. Флуоресцентні зображення лінійного сканування були отримані під час використання конфокального мікроскопа (Biorad; 40-кратні олійні імерсійні лінзи). Фіксували зображення лише від кардіоміоцитів, які скорочувалися при електричній стимуляції та мали нормальну морфологію (наприклад, поперечносмугасті, у формі "цеглини"). Клітини, які демонстрували спонтанні скорочення, не аналізувалися. Для кількісної оцінки змін флуоресценції (перехідні процеси Ca^{2+}) та скорочувальної здатності окремих кардіоміоцитів використовували програмне забезпечення ImageJ (програмне забезпечення з відкритим вихідним кодом, розроблене NIH, Bethesda, USA).

Вимірювання внутріклітинного Ca^{2+}

Перехідні процеси Ca^{2+} вимірювали під час використання конфокального мікроскопа (Biorad) у режимі лінійного сканування. Для збудження використовували довжину хвилі 491 нм, а випромінюване світло збирали при довжині хвилі >515 нм. Лінійне сканування було спрямоване вздовж довгої осі кардіоміоциту. Флуоресцентний сигнал (F/Fo) розраховували як відношення між флуоресценцією спокою перед початком перехідного процесу Ca^{2+} (F0) і піковою флуоресценцією (F) перехідного процесу Ca^{2+}.

Вимірювання скорочувальної здатності кардіоміоцитів

Скорочувальну здатність кардіоміоцитів вимірювали як відсоток укорочення довжини (фракційне вкорочення; %FS). Виділені кардіоміоцити піддавали впливу в перфузійній камері вищевказаними реагентами: носій або AC0/HM01 (0,2, 0,5 чи 1 мкМ у розчині Тірода), з антагоністом рецептора греліну D-Lys3-GHPR-6 та без нього (3 мкМ у розчині Тірода).

Імуноблотинг білків

Аліквоти заморожених суспензій кардіоміоцитів лізували під час використання буфера NP40 (Thermo Fisher FNN0021, Stockholm, Sweden), доповненого інгібіторами фосфатази (Sigma-Aldrich P2850-1 мл, P5726-1 мл, Stockholm, Sweden). Білкові лізати розділяли електрофорезом та переносили на мембрани. Мембрани інкубували з первинними антитілами: кролячим антитілом проти фосфо (Ser 22-23) серцевого тропоніна I (cTnI, Cell Signalling, Leiden, The Netherlands #4004S) та кролячими антитілами до cTnI (Cell Signalling #4002S, Leiden, The Netherlands). Після цього використовували вторинні антитіла, мічені інфрачервоним випромінюванням (IRDye 680 і IRDye 800, 1:5000, Licor). Імунореактивні смуги аналізували під час використання інфрачервоної системи візуалізації Odyssey (Li-Cor, Bad Homburg, Germany). Щільність смуг визначали кількісно під час використання ImageJ (NIH, Bethesda, USA), нормалізували за загальним cTnI і остаточні дані виражали у вигляді кратного збільшення порівняно зі смугами, що представляють білок, виділений із клітин, оброблених носієм.

Аналіз активності ПКА у кардіоміоцитах

Для визначення активності ПКА у кардіоміоцитах використовували набір для аналізу активності кінази ПКА на основі (ab139435, Abcam, Cambridge, UK). Аліквоти заморожених кардіоміоцитів розморожували та змішували з буфером для лізису, що містить (мМ) наступне: 20 MOPS, 50 β ‑ гліцеролфосфату, 5 ЕГТК, 2 ЕДТА, 1 бензамідіну, 1 ортованадату натрію, 1 % NP40, 1 ДТТ, повний коктейль інгібіторів протеази (Roche Diagnostics, West Sussex, UK) та коктейль з інгібіторів фосфатази № 3 (Sigma, Gillingham, UK). Близько 2 мкг білку з кожного зразка аналізували відповідно до інструкцій виробника 27.

Статистика

Статистичне порівняння між 2 групами проводили з використанням t-критерію Стьюдента (непарного). Для порівняння між >2 групами використовували аналіз ANOVA. Статистичною значимістю вважали значення $p < 0,05$. Середні дані були представлені у вигляді середнього ± стандартної похибки середнього (SEM). На фігурах значення P вказані, як наступне: * P <0,05, ** P <0,01, *** P <0,001.

Результати

AC01/HM01 підвищує скорочувальну здатність кардіоміоцитів (Фіг. 1)

Скорочувальну здатність вимірювали на ізольованих кардіоміоцитах у відповідь на

AC01/HM01 у різних концентраціях (0,2, 0,5 і 1 мкМ) по відношенню до носія. На Фігурі 1 зверху показано, що скорочувальна здатність кардіоміоцитів пустушок, виміряна, як відсоток фракційного укорочення довжини (ФУ %), була збільшена дозозалежним чином зі значною та статистично значущою відповіддю при 0,5 і 1 мкМ AC01/HM01. На Фігурі 1 знизу показано, що кардіоміоцити, оброблені AC01/HM01 (1 мкМ) продемонстрували значне збільшення скорочувальної здатності, виражене у відсотках від фракційного укорочення (ФУ %) по відношенню до носія, як у пустушок, так і в СН, і що попередня обробка антагоністом рецептора греліну, D-Lys 3 GHRP-6 (3 мкМ), блокувала скорочувальний ефект AC01/HM01, припускаючи, що молекулярний механізм специфічний для передачі сигналів рецепторами греліну.

Використовувалися кардіоміоцити, виділені як у контрольних мишей (пустушок), так і у мишей із серцевою недостатністю (СН), викликаної інфарктом міокарда, для вимірювання скорочувальної здатності. Не пов'язана з лікуванням AC01/HM01 скорочувальна здатність кардіоміоцитів, певно, була вищою в кардіоміоцитах СН в порівнянні з пустушками. Життєздатні кардіоміоцити з СН, викликаної ІМ, одержані з неішемізованої частини серця, компенсують інфаркт/некротичний міокард, покращуючи їх скорочувальну здатність за рахунок посилення циркуляції Ca^{2+} та чутливості міофіламентів. Проте збільшення скорочувальної здатності, індуковане AC01/HM01 в порівнянні з кардіоміоцитами, обробленими носієм, спостерігалося як у пустушок, так і у СН, що дозволяє припустити, що ця молекула може додатково покращувати скорочувальну здатність незалежно від стану кардіоміоцитів.

AC01/HM01 підвищує скорочувальну здатність кардіоміоцитів без збільшення амплітуди перехідних процесів Ca^{2+} (Фігура 2; Фігура 3)

Усі клінічно доступні інотропи підвищують скорочувальну здатність за рахунок збільшення внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+}, який несе відповідальність за їх несприятливий профіль безпеки, тому було несподівано спостерігати, що підвищена скорочувальна здатність, що спостерігається на Фігурі 1, була досягнута без зміни перехідних процесів Ca^{2+}: на Фігурі 2 показано, що жодної істотної зміни амплітуди перехідних процесів Ca^{2+} не спостерігалося ні за яких концентрацій AC01/HM01, що тестувалися. Тим не менш, як видно на Фігурі 1, AC01/HM01 збільшували фракційне скорочення (скоротливу здатність). Це дозволяє припустити, що скорочувальний ефект пов'язаний із підвищеною чутливістю до Ca^{2+}, а не зі збільшенням вивільнення Ca^{2+}. На Фігурі 3 показано, що AC01/HM01 не збільшує перехідні процеси Ca^{2+} у кардіоміоцитах пустушок. У кардіоміоцитах мишей-пустушок C01/HM01 з попередньою обробкою D-Lys3 чи без неї не впливає на амплітуди перехідних процесів Ca^{2+} в порівнянні з клітинами, обробленими носієм (Фігура 3). Це ще раз підтверджує, що скорочувальний ефект AC01/HM01 обумовлений посиленим механізмом сенсибілізації до Ca^{2+}, як вказано на Фігурі 2.

AC01/HM01 знижують фосфорилювання cTnI, що пов'язано з підвищеною чутливістю до Ca^{2+} (Фігура 4).

Раніше було показано, що зміни у фосфорилювання серинових залишків 22-23 білка серцевого саркомера cTnI впливають на чутливість міофіламенту до Ca^{2+} у міоцитах шкіри мишей та щурів через механізм, що залежить від цАМФ-ПКА (cAMP-PKA). Щоб дослідити молекулярний механізм, що лежить в основі підвищеної чутливості до Ca^{2+} та скоротливої здатності в експериментальній моделі по даному винаходу, суспензію кардіоміоцитів мишей-пустушок обробляли носієм або AC01/HM01 з D-Lys 3 або без нього, і потім обробляли для біохімічного аналізу. На Фігурі 4 показано, що в аналізах вестерн-блоту білкових екстрактів кардіоміоцити, що були оброблені AC01/HM01, демонстрували знижені рівні фосфорилювання (середній стовпчик; сіра полоса) cTnI (серін 22-23) по відношенню до кардіоміоцитів, що були оброблені носієм (лівий стовпчик, біла полоса), у той час як попередня обробка D-Lys3 блокувала цей ефект (стовпчик праворуч, червона полоса).

Ці дані узгоджуються з моделлю, згідно з якою AC01/HM01 активує рецептор греліну та підвищує чутливість до Ca^{2+} за рахунок зниження фосфорилювання cTnI.

AC01/HM01 знижає активність ПКА кардіоміоцитів та фосфорилювання cTnI (Фігура 5).

Фосфорилювання cTnI (Ser 22-23) опосередковується ПКА. Відповідно, були проведені дослідження впливу AC01/HM01 на ферментативну активність ПКА. На Фігурі 5 показано, що активність ПКА знизилась в кардіоміоцитах, оброблених AC01/HM01 по відношенню до носія, і що цей ефект був заблокований попередньою обробкою D-Lys 3 перед стимуляцією AC01/HM01. Це несподівано дозволяє припустити, що антагоніст рецептора греліну. AC01/HM01 може активувати передачу сигналів, що інгібують Gα (Gαi), яка інгібує активність аденілатциклази, призводячи до зниження активності ПКА.

Коментарі

Дані показали, що AC01/HM01, але не носій, збільшує скорочувальну здатність кардіоміоцитів дозозалежним чином. Несподівано, на відміну від існуючих інотропів, AC01/HM01

збільшує скорочувальну здатність без збільшення перехідних амплітуд Ca^{2+} у кардіоміоцитах, що дозволяє припустити, що збільшення скорочувальної здатності відбувалося за рахунок підвищення чутливості міофіламентів до Ca^{2+}.

Специфічний антагоніст греліну, D-Lys 3 GHRP-6, блокував вплив AC01/HM01 на скоротність кардіоміоцитів, що додатково підтверджує, що скорочувальний ефект контролюється передачею сигналів рецептора греліну. Індуковане AC01/HM01 збільшення чутливості міофіламентів до Ca^{2+}, певно, пов'язано з інгібуючою передачею сигналів рецептора греліну G-α (G-αi), що призводить до зниження активності ПКА та зниження фосфорилювання cTnI Ser 22-23. Це передбачає новий фармакологічний спосіб впливу на функцію міофіламентів з метою підвищення скорочувальної здатності.

Ці результати підкреслюють потенційне використання цієї нової першої у своєму класі молекули та нового механізму дії для лікування серцевої недостатності, збільшення скоротливості та серцевого викиду без механізмів традиційних інотропів, які збільшують концентрацію Ca^{2+} і викликають підвищену потребу в кисні, тахікардію, аритмію, ішемію та підвищену смертність.

Центральне місце в регуляції гемодинаміки займає вегетативна нервова система, яка контролює вивільнення катехоламінів (адреналіну та норадреналіну) із симпатичних нервових закінчень та надниркових залоз. Важливою функцією цього є регуляція інотропного стану серця. Активація β- адренергічних рецепторів у серці призводить до стимуляції передачі сигналів цАМФ-ПКА, що призводить до збільшення серцевого викиду за рахунок збільшення частоти серцевих скорочень (хронотропія), збільшення сили скорочення (інотропія) та збільшення швидкості розслаблення (лузітропія). Збільшення сили скорочення серця за рахунок активації цАМФ-ПКА залежить від посилення передачі сигналів Ca^{2+} в міоцитах. Альтернативним механізмом підвищення скорочувальної здатності, який не вимагає токсичного посилення вивільнення Ca^{2+}, є сенсибілізація міофіламентів до Ca^{2+}. Дійсно, існує фізіологічний механізм регуляції чутливості до Ca^{2+} через ПКА-залежне фосфорилювання cTnI за залишками серину 22 і 23 (Ser22/23 в миші та Ser23/24 у людини) на N-кінці, який регулює афінність cTnC до зв'язування Ca^{2+}. Коли cTnI фосфорилюється, чутливість міофіламенту до Ca^{2+} знижується, та крива залежності сили-Ca^{2+} зміщується праворуч (менше зусилля при даній концентрації Ca^{2+}). Докази зворотної кореляції між фосфорилюванням cTnI (Ser 22-23) і чутливістю міофіламентів до Ca^{2+} виявлені у серцях з термінальною стадією недостатності, які демонстрували знижене фосфорилювання cTnI і підвищену чутливість до Ca^{2+} порівняно з донорськими серцями, в той час як лікування ПКА усувало будь-яку різницю у чутливості до Ca^{2+} між пошкодженими та неушкодженими міозитами.

Це передбачає, що при серцевій недостатності активуються компенсаторні механізми для покращення скорочувальної здатності за рахунок підвищення чутливості до Ca^{2+}. Несподівано, AC01/HM01, певно, посилює ці механізми чутливості до Ca^{2+}.

Таким чином, дані щодо даної патентної заявки демонструють, що нова молекула AC01/HM01 є першим у своєму класі новим типом міотропу, який специфічно впливає на рецептор греліну та збільшує скорочувальну здатність кардіоміоцитів. На противагу звичайним інотропам, які діють шляхом шкідливого збільшення перехідних процесів Ca^{2+}, AC01/HM01 натомість знижує активність ПКА і зменшує фосфорилювання cTnI, можливо, за допомогою передачі сигналів рецепторами, опосередкованими Gαi, і, таким чином, підвищує чутливість до Ca^{2+} (Фігура 6). Це перше повідомлення, що показує підвищену скорочувальну здатність AC01/HM01 в кардіоміоцитах. Це дослідження підтримує використання AC01/HM01 як засобу для лікування зниженої скорочувальної здатності серця при СН.

Приклад 2

У людини, одноразова зростаюча доза, фаза 1, рандомізоване, подвійне сліпе, плацебо-контрольоване дослідження для оцінки безпеки та фармакокінетики перорального застосування HM01 у здорових добровольців чоловічої статі.

Первинні цілі

- Встановити максимальну переносиму дозу (МПД) (MTD) шляхом оцінки безпеки та переносимості досліджуваних одноразових доз HM01 для прийому внутрішньо по зростаючій, аж до максимальної дози 10 мг.

- Оцінити фармакокінетику (ФК) (PK) HM01 та його метаболітів (M2, M6 і M9) після одноразового прийому внутрішньо.

Вторинні цілі

- Для оцінки біомаркерів фармакодінаміки (ФД) (PD).

- Для оцінки функціональних параметрів, пов'язаних з механізмом дії HM01.

План дослідження

Одноцентрове, рандомізоване, подвійне сліпе, плацебо-контрольоване дослідження одноразових наростаючих доз (SAD) (ОНД).

Скринінгові обстеження проводилися протягом 28 днів до прийому препарату. Відповідні суб'єкти поверталися до дослідницького центру вранці 1-го дня і залишалися у стаціонарі до виписки через 72 години після прийому препарату (вранці 4-го дня), якщо не виникало проблем із безпекою. Пероральну дозу вводили вранці 1-го дня. Пацієнти поверталися до клініки через 7 днів після лікування вранці 8-го дня (±1 день) для оцінки безпеки.

Після завершення всіх 72-годинних оцінок когорти було проаналізовано на сліпі дані про безпеку та псевдонімізовані дані ФК, та комітет з підвищення дози (DEC) (dose escalation committee (DEC)) ухвалив рішення про наступне збільшення дози.

Залежно від характеру, частоти та тяжкості профілю безпеки, DEC, включаючи, за потреби, експертів у відповідній галузі, приймав рішення про те, чи необхідо: • Продовжувати підвищення дози відповідно до запланованої схеми; • Припинити підвищення дози (тобто відмовитися від подальшого прийому досліджуваного препарату); • Продовжувати прийом з подальшим підвищенням дози до запланованих доз, тобто доз >5 мг (але <10 мг).

Суб'єкти, що беруть участь

Здорові некурящі суб'єкти чоловічої статі віком від 18 до 50 років включно, з індексом маси тіла (ІМТ) від 18,5 до 29,9 кг/м^2 включно. Було заплановано когорти по 8 осіб на кожний етап дозування. Когорта 1 (10 мг або плацебо) була припинена після прийому препарату 4 суб'єктами. Когорти 2-4 складалися з 8 суб'єктів у кожній, тобто загалом 28 суб'єктів, які були рандомізовані та завершили дослідження. Випадків відміни препарату не було.

Продукт, що тестується, доза та спосіб застосування

Порошок HM01 HCl у желатинових капсулах. Були доступні капсули з концентрацією 0,1 мг, 1,0 мг і 10 мг для когорти 1.

Когорта 1: 10 мг HM01

Когорта 2: 0,1 мг HM01, когорта 3: 0,3 мг HM01, когорта 4: 1,0 мг HM01

Перша когорта складалася з 4 суб'єктів (3 активних, 1 плацебо).

Когорти з 2-ої по 4-у складалися з 8 суб'єктів, 6 суб'єктів отримували дозу HM01 і 2 суб'єкта отримували плацебо. З міркувань безпеки кожна когорта була поділена на 2 підгрупи перша підгрупа з 2 суб'єктів (1 HM01, 1 плацебо) і друга підгрупа з 6 суб'єктів (5 HM01, 1 плацебо). Друга підгрупа була розпочата лише за відсутності будь-яких серйозних проблем із безпекою за оцінкою дослідника після закінчення принаймні 24 годин.

Суб'єктам вводили дозу на порожній шлунок (без прийому їжі протягом принаймні 8 годин). Доступ до їжі був обмежений до 4 годин після введення дози. Капсули вводили перорально разом з 240 мл води.

Змінні безпеки

Небажані явища (НЯ) (АЄ), показники життєдіяльності (артеріальний тиск, частота пульсу та температура тіла), ЕКГ у 12 відведеннях, холтерівська ЕКГ, медичний огляд (МО) (РЄ) і лабораторні аналізи (гематологія, клінічна хімія та аналіз сечі) оцінювалися під час скринінгу та декілька разів протягом усього дослідження.

Фармакокінетичні змінні

Зразки крові для аналітичного аналізу на HM01 і 3 основних метаболіти (M2, M6 і M9) відбирали перед введенням дози (протягом 60 хвилин до введення препарату) і у 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 16, 24, через 30, 36, 48, 60 і 72 години після введення дози (18 зразків). Сечу збирали протягом 24 годин після введення дози. Зразки крові та сечі аналізували на вміст HM01 і його метаболітів з використанням валідованих методів ЖХ-МС/МС (рідинна хроматографія з тандемною мас-спектрометрією (LC-MS/MS methods).

Оцінювані параметри ФК включали C_{max} (максимальна концентрація, що спостерігається), C_{max}/D (C_{max} на одиницю дози), t_{max} (час піку), C_{last} (остання вимірювана концентрація вища нижньої межі кількісної оцінки), t_{last} (час C_{last}), AUC $_{(0-24)}$ та AUC_{last} (площа під кривою залежності концентрації від часу в плазмі від нуля до 24 годин і до останньої вимірюваної концентрації, t_{last}, відповідно), AUC_{last}/D (AUC_{last} на одиницю дози), AUC_∞ (площа під кривою залежності концентрації від часу в плазмі від нуля до нескінченності), AUC_∞ (/D (AUC_∞ на одиницю дози), $t_{1/2}$ (явний кінцевий період напіврозпаду), CL/F (системний кліренс після позасудинного введення, тільки для вихідного лікарського засобу), Vz/F (явний обсяг розподілу після позасудинного введення, тільки для вихідного лікарського засобу), MPT (середній час знаходження).

Додаткові параметри були отримані із сечі, тобто, $Ae_{(0-24)}$, кількість вихідного лікарського засобу та метаболітів, виділених за 24 год., і CL_R, нирковий кліренс.

Фармакодинамічні змінні

Зразки крові для визначення гормону росту (ГР) (GH), інсуліноподібного фактора росту -1

(ІФР-1) (IGF-1), адренокортикотропного гормону (АКТГ) (ACTH), пролактину, кортизолу та альдостерону у сироватці крові до введення дози і 0.5, 1, 2, 3, 4, 6 та через 24 години після введення дози були взяті шляхом венозної пункції. Усі біомаркери були визначені з використанням імуноферментного аналізу (ELISA). Спрощений опитувальник харчового апетиту, що ґрунтується на оцінці апетиту на 1-й день після вечері та на 1-й день перед прийомом дози, через 1, 2, 4, 8 і 24 години після прийому. Щоденник випорожнення, починаючи з 1-го дня і закінчуючи випискою на 4-й день.

Результати

Фармакокінетика

Для НМ01 і М6 спостерігалося пропорційне дозі збільшення AUC∞ і C_{max}. Для AUC_{last} для НМ01 і М6 спостерігалося дещо більше, аніж пропорційне дозі збільшення AUC_{last} для НМ01 і М6 з нахилами функції 1,29 і 1,26, відповідно, і 90 % довірчими інтервалами вище 1. Середній арифметичний час напіввиведення (від 9 до 11 годин), медіанна t_{max} (від 3 до 4 годин), середній геометричний кліренс (від 55,9 до 65,8 л/год.) та обсяг розподілу (від 801 до 911 л) НМ01 були однаковими для всіх доз. Після введення від 0,1 мг до 10 мг НМ01 середній арифметичний період напіввиведення М6 становив від 23 до 37 годин, а медіанна t_{max} - від 3,0 до 5,0 годин. Співвідношення AUC∞ М6 до НМ01 було подібним після введення 0,3 і 1,0 мг НМ01 (2,330, 2,336) та трохи нижче для дози 10 мг (1,761). Близько 10 % від дози у 10 мг виводилося з сечею у вигляді вихідної сполуки НМ01 і 16 % у вигляді М6.

Таблиця

Короткий опис основних параметрів ФК НМ01 (данні ФК)

	0,1 мг НМ01 N=6	0,3 мг НМ01 N=6	1 мг НМ01 N=6	10 мг НМ01 N=3
$AUC_{(0-24)}$ (г*нг/мл)	-	3,747 (14,4)	13,42 (40,4)	148,8 (32,3)
AUC_{last} (г*нг/мл)	0,4899 (98,7)	2,819 (39,8)	14,71 (53,4)	176,1 (37,7)
AUC_{last}/D (г*нг/мл)мг	4,899 (98,7)	9,396 (39,8)	14,71 (53,4)	17,61 (37,7)
AUC∞ (г*нг/мл)	-	4,558 (24,6)[a]	16,94 (48,6)	178,8 (37,1)
AUC∞ (г*нг/мл)мг	-	15,19 (24,6)[a]	16,94 (48,6)	17,88 (37,1)
C_{max} (нг/мл)	0,1357 (20,9)	0,2866 (26,7)	1,280 (34,7)	15,28 (47,1)
C_{max}/D (нг/мл)мг	1,357 (20,9)	0,9554 (26,7)	1,280 (34,7)	1,528 (47,1)
t_{max} (г)	3,00 (2,0-3,0)	4,00 (3,0-6,0)	4,00 (3,0-6,0)	3,00 (2,0-3,0)
t_{last} (г)	8,00 (4,0-8,0)	16,00(12,0-24,0)	36,00(16,0 36,0)	72,00(48,0-72,0)
λ_z ($г^{-1}$)	-	0,0821 (33,2)[a]	0,0648 (27,7)	0,0646 (19,8)
$t_{1/2}$ (г)	-	8,830 (36,4)[a]	11,00 (23,7)	10,86 (18,6)
CL/F (л/г)	-	65,8 (24,6)[a]	59,0 (48,6)	55,9 (37,1)
V_z/F (л)	-	801,2 (12,5)[a]	911,3 (28,1)	865,6 (16,5)
МРТ (г)	-	14,45 (24,3)[a]	15,33 (21,2)	14,19 (11,4)

Представлені середнє геометричне та геометричний CV (%), за винятком $t_{1/2}$, де вказані арифметичне та арифметичний CV (%), і для t_{max}, де вказані медіани та діапазони;

a^n=5 (через ненадійне визначення кінцевої фази в одного випробуваного)

Фармакодинаміка

Концентрації ГР збільшувалися в порівнянні з вихідним рівнем після введення НМ01 з піковими концентраціями через 2-3 години після прийому дози. Збільшення ГР було значнішим після введення 1,0 і 10 мг НМ01, тоді як більш низькі збільшення спостерігалися після 0,3 і 0,1 мг НМ01. Середні криві ГР були однаковими після прийому 1,0 і 10 мг НМ01. Після досягнення піку концентрація ГР швидко знижувалася. Значних відмінностей у рівнях ІФР-1 у сироватці крові між групами, що приймали дози, і плацебо не спостерігалось. Концентрації АКТГ, пролактину, кортизолу і альдостерону швидко підвищувалися в порівнянні з вихідними

значеннями після введення більш високих доз 1,0 і 10 мг НМ01. Пікові концентрації, як правило, спостерігались через 2-3 години після прийому. Після цього концентрації швидко знижувались. Збільшення було схожим після 1,0 і 10 мг НМ01, за винятком пролактину, де збільшення було вище після 10 мг порівняно з 1,0 мг, і АКТГ, рівні якого визначалися лише після дози 1,0 мг НМ01. Опитувальник апетиту не виявив суттєвих чи послідовних відмінностей між групами, які приймали дози, та плацебо. Між групами, що отримували дозу, не було відмінностей у кількості дефекацій на день та кількості піддослідних з дефекацією, що залежали від дози.

Безпека

Кількість суб'єктів, які повідомили про побічні ефекти, що виникають під час лікування (НЯВЛ) (TEAE), та кількість НЯВЛ збільшувалося залежно від дози: після прийому 0,1 мг НМ01 про НЯВЛ не повідомлялось, 2 суб'єкта (33,3 %) повідомили про 5 НЯВЛ після прийому 0,3 мг, 3 суб'єкта (50,0 %) повідомили про 7 НЯВЛ після прийому 1,0 мг, і 3 суб'єкта (100 %) повідомили про 19 НЯВЛ після прийому 10 мг НМ01 в порівнянні з 5 суб'єктами (71,4 %), що повідомили про 5 НЯВЛ після прийому плацебо.

Найчастіше повідомлялося про НЯВЛ з боку нервової системи (головним чином, головний біль) та серцевої діяльності (головним чином, синусова брадикардія), які починалися в основному невдовзі після прийому препарату та були короткочасними. Більшість НЯВЛ були легкої інтенсивності, про НЯВЛ помірної інтенсивності повідомлялося в 1 суб'єкта після введення 1,0 мг (приливи) і 10 мг АС01 (синусова брадикардія) і плацебо (головний біль). Клінічно значущих відмінностей між групами дозування за будь-якими лабораторними показниками не було виявлено. Середній систолічний та діастолічний артеріальний тиск, і температура тіла не показали клінічно значущих змін після прийому препарату, чи відмінностей між групами лікування.

Приклад 3

Рандомізоване, подвійне сліпе, зі багаторазовим збільшенням дози, плацебо-контрольоване, багатоцентрове дослідження безпеки, переносимості, ефективності, фармакокінетики (ФКК) та фармакодинаміки (ФД) фази1b/2a з пероральним агоністом греліну АС01 у пацієнтів із серцевою недостатністю із зниженою фракцією викиду(СНзнФВ).

Дослідження зосереджено на пацієнтах з СНзнФВ, що мають знижену скорочувальну здатність серця, низький серцевий викид та неадаптивну нейрогормональну активацію для підтримки серцевого викиду, тяжкі симптоми та високі показники госпіталізації з приводу загострення серцевої недостатності та смерті, а також згадані вище доклінічні дані, що свідчать про те, що АС01 збільшує скорочувальну здатність кардіоміоцитів за рахунок сенсибілізації до кальцію, а не збільшення концентрації кальцію і, таким чином може покращити скорочувальну здатність серця, серцевий викид та клінічні наслідки без побічних ефектів звичайних інотропів.

План дослідження

Багатоцентрове, рандомізоване, подвійне сліпе, плацебо-контрольоване дослідження, проведене у 2 частинах: послідовна фаза збільшення дози в когорті (частина А) та наступна паралельна фаза розширення когорти (частина Б). Пацієнтів рандомізували у співвідношенні 3:1 для отримання міні-пігулок АС01 чи міні-пігулок плацебо на порожній шлунок протягом 7 днів двічі на добу (фаза збільшення дози, частина А) або 28 днів (фаза розширення когорти, частина Б).

Фаза збільшення дози (Частина А)

До 40-56 пацієнтів порівну поділили на 7 когорт. 6 Активних і 2 плацебо пацієнта на когорту. Вісім пацієнтів у кожній з 5 початкових когорт із послідовним введенням дози отримують лікування декількома зростаючими дозами АС01 (підвищуючи з 0,1 мг двічі на добу до 5 мг послідовних рівнів дози) або плацебо двічі на добу протягом 7 днів. При необхідності можуть бути додані до 2 додаткових когорт. Збільшення дози не перевищить 3,3 рази від рівня дози в попередній когорті і буде не менш ніж на 25 % вище за рівень дози в попередній когорті. Збільшення дози припиняється при досягненні загальної добової дози 5 мг двічі на добу. Пацієнти матимуть ІКД (ICD) (для захисту від шлуночкової аритмії та тяжкої брадикардії). Вибирають дві рівні дози, по 1 з кожної групи на наступному етапі розширення когорти (Частина Б). Проте, ґрунтуючись на результатах фази збільшення дози (Частина А), можуть бути визначені додаткові рівні дози для фази розширення когорти (Частина Б). Період оцінки дози складатиме від першого введення АС01 до 12-го дня (5 днів після останнього введення досліджуваного лікарського препарат [ІЛП (IMP (investigational medicinal product))] у кожній когорті). Поміж 12-м днем після останнього введення ІЛП в 1 когорті і першій дозі в наступній когорті пройде мінімум 10 днів, щоб забезпечити достатній час для розгляду даних Комітетом перевірки безпеки (Safety Review Committee) (SRC).

Фаза розширення когорти (Частина Б)

Після закінчення Частини А від 40 до 60 пацієнтів, різних індивідуумів, що брали участь у Частині А, включають до Частини Б (розширення когорти). Ці пацієнти будуть розділені на 2 когорти за дозами та отримуватимуть лікування двічі на день протягом 28 днів з рівнями доз, вказаними у Частині А. Якщо для розширення когорти вибрано більше 2 рівнів доз, загальна кількість пацієнтів на когорту та/або загальна кількість когорт буде переглянута, щоб охопити всі можливі рівні доз.

Досліджуваний препарат

АС01 виготовляється у вигляді міні-пігулок по 0,05 мг і 1 мг. Плацебо також знаходиться у вигляді міні-пігулок, що мають такий же зовнішній вигляд, форму, запах і смак, що і пігулки АС01.

Мета

Фаза збільшення дози (Частина А)

Первинна мета: встановити безпеку і толерантність багаторазових зростаючих доз перорального АС01 у амбулаторних пацієнтів зі стабільною СНзнФВ, що отримують лікування два рази на день протягом 7 днів, і оцінити рекомендовані дози (РД) (RD) для фази розширення когорти (Частина Б).

Вторинна мета: визначити ФК АС01; визначити ФД АС01 і співвідношення ФК/ФД.

Мета дослідження: визначити вплив АС01 на клінічні змінні (прямі ефекти, наприклад, циркулюючий ГР; ударний об'єм [SV] (УО) і СВ (серцевий викид (CO-cardiac output)), які пов'язані з його механізмом дії і цільовою взаємодією, і які мають відношення до клінічних результатів у пацієнтів зі стабільною СНзнФВ.

Фаза розширення когорти (частина Б)

Первинна мета: Розширити оцінку безпеки толерантності і провести попередню оцінку ефективності у пацієнтів зі стабільною СНзнФВ, що отримували лікування двічі на день протягом 28 днів при двох рівнях дози АС01, починаючи з фази збільшення дози (частина А). Пошукові показники ефективності АС01 включають без обмеження первинні прямі (циркулюючий ГР), а також вторинні прямі, та непрямі ефекти, що модифікують гемодинаміку, та захворювання (наприклад, УО, СВ і інші функціональні параметри, такі як ехокардіографічні показники та ((NT-проМНП) (NT-proBNP)).

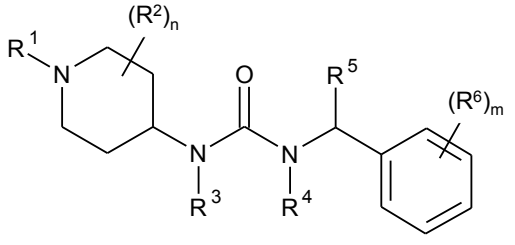
Вторинна мета: сформувати додаткові дані щодо ФК АС01; сформувати додаткові дані щодо ФД АС01 і співвідношеннях ФК/ФД.

Оцінюються наступні результати безпеки (Частини А та Б): Первинні результати: частота серцевих скорочень, систолічний артеріальний тиск, середній артеріальний тиск, медичний огляд (обстеження легень, обстеження серця, огляд кінцівок (набряк)), обстеження на аритмію (холтерівська електрокардіограма [ЕКГ], ЕКГ у 12 відведеннях, звіти про імплантований кардіовертердефібрилятор [ІКД], безперервна телеметрія), браді- або тахікардія (холтерівська ЕКГ, ЕКГ у 12 відведеннях, звіти ІКД, безперервна телеметрія [тільки Частина А]), ішемія (симптоми, зміни ЕКГ та/або високочутливий тест на серцевий тропонін (hs-Troponin T/I), інтервали ЕКГ, тобто, частота серцевих скорочень, PR, QRS і QTcF, NT-проМНП в плазмі, рСКФ (eGFR) (калій; натрій), гематологія (гемоглобін, лейкоцити з диференціюванням, тромбоцити), ферменти печінки, небажані явища (НЯ), вага, глюкоза у плазмі.

Вторинні результати: показники ФК: для кожної когорти оцінюють ФК-параметри АС01 і потенційно активного метаболіту М6 для оцінки швидкості і ступеню абсорбції, розподілу та виведення, а також для обґрунтування інтерпретації результатів безпеки та ефективності. Показники ФД: ФД оцінюється за допомогою вимірювань безпеки, зазначених вище, та вимірювань пошукових показників ефективності з використанням біомаркерів, неінвазивного СВ, ехокардіографії у певні моменти часу, зазначені у Розкладі заходів.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Сполука формули (I)



(I)

або її фармацевтично прийнятна сіль для застосування як інотропного агента,
де:
R^2, R^3, R^5, незалежно один від одного, являють собою C_1-C_6-алкіл,
R^1, R^4, незалежно один від одного, являють собою водень чи C_1-C_6-алкіл,
R^6 являє собою C_1-C_6-алкіл, гало, C_1-C_6-алкокси чи C_1-C_6-галоалкіл,
n являє собою 2-3,
m являє собою 1-3.

2. Сполука для застосування за п. 1, де вказаний інотропний агент вільний від побічних ефектів, спричинених підвищеною концентрацією кальцію.

3. Сполука для застосування за будь-яким з пп. 1-2, де R^4 являє собою водень.

4. Сполука для застосування за п. 3, де n являє собою 2.

5. Сполука для застосування за п. 4, де R^2 являє собою метил.

6. Сполука для застосування за п. 5, де дві групи R^2 приєднані до одного і того ж вуглецевого кільця - піперидинового кільця - формули (I), переважно в 3-іл-положенні.

7. Сполука для застосування за будь-яким з пп. 1-6, де дотримано однієї або декількох з таких умов:
обидва, і R^3, і R^5, являють собою C_1-C_3-алкіл, переважно метил,
m являє собою 3,
R^6 являє собою гало і/або алкокси, переважно принаймні один R^6 являє собою алкокси.

8. Сполука для застосування за будь-яким з пп. 1-7, яка являє собою 1-[(1S)-1-(2,3-дихлор-4-метоксифеніл)етил]-3-метил-3-[(4R)-1-метил-3,3-диметил-4-пиперидил]-сечовину.

9. Сполука для застосування за будь-яким з пп. 1-8, де зазначена фармацевтично прийнятна сіль являє собою моногідрохлоридну сіль.

10. Сполука для застосування за будь-яким з пп. 1-9, для лікування станів, пов'язаних зі зниженою та/або неефективною скорочувальною здатністю серця у пацієнтів, що потребують цього.

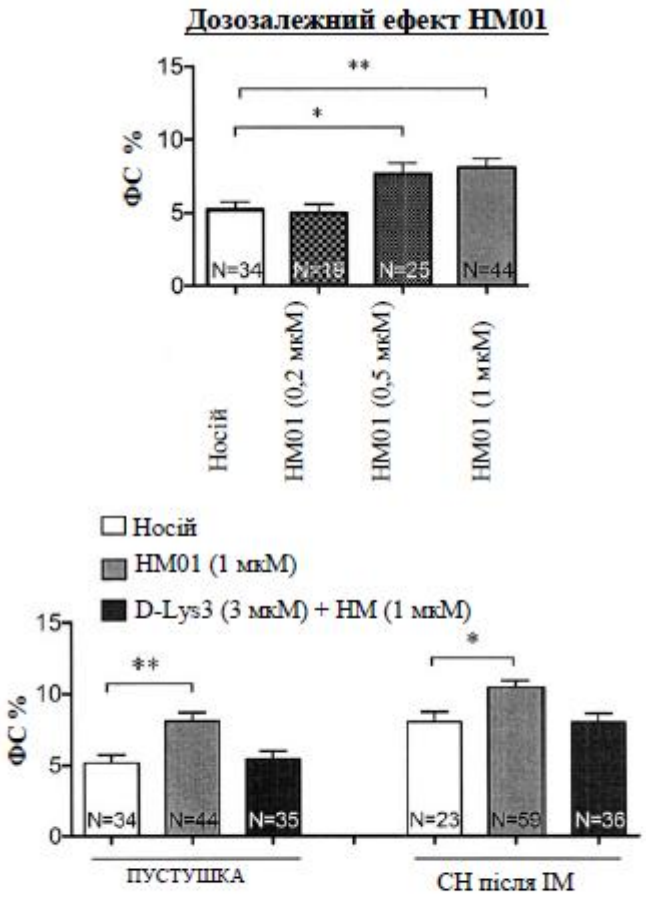
11. Сполука для застосування за будь-яким з пп. 1-10, для лікування станів, вибраних із серцевої недостатності, серцевого нападу, кардіогенного шоку, септичного шоку, інфаркту міокарда, кардіоміопатії, легеневої артеріальної гіпертензії (ЛАГ).

12. Сполука для застосування за будь-яким з пп. 1-11, де зазначена кардіоміопатія є дилатаційною кардіоміопатією (ДКМП), зокрема сімейна ДКМП.

13. Сполука для застосування за будь-яким з пп. 1-11, для лікування тяжкої, прогресуючої, хронічної або гострої серцевої недостатності.

14. Сполука для застосування за будь-яким з пп. 1-11, для лікування тяжкої, прогресуючої, хронічної або гострої серцевої недостатності зі зниженою фракцією серцевого викиду.

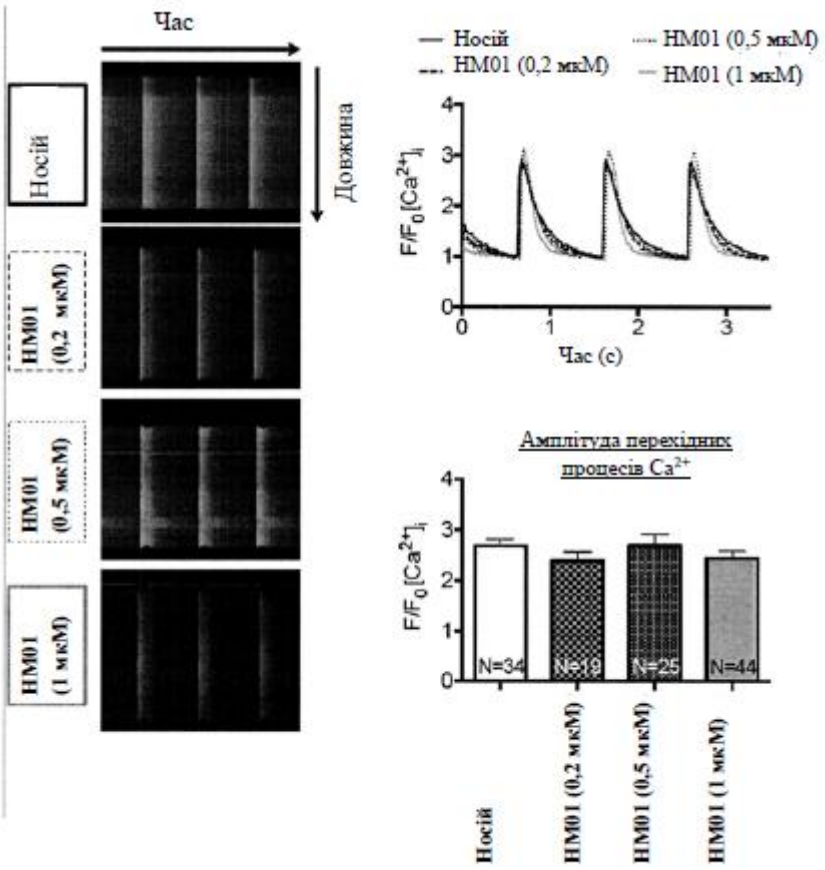
15. Сполука для застосування за будь-яким з пп. 1-14, де зазначені побічні ефекти, зумовлені підвищеними концентраціями кальцію, вибрані з: підвищеної потреби міокарда в кисні, ішемії, аритмії та гіпотензії.



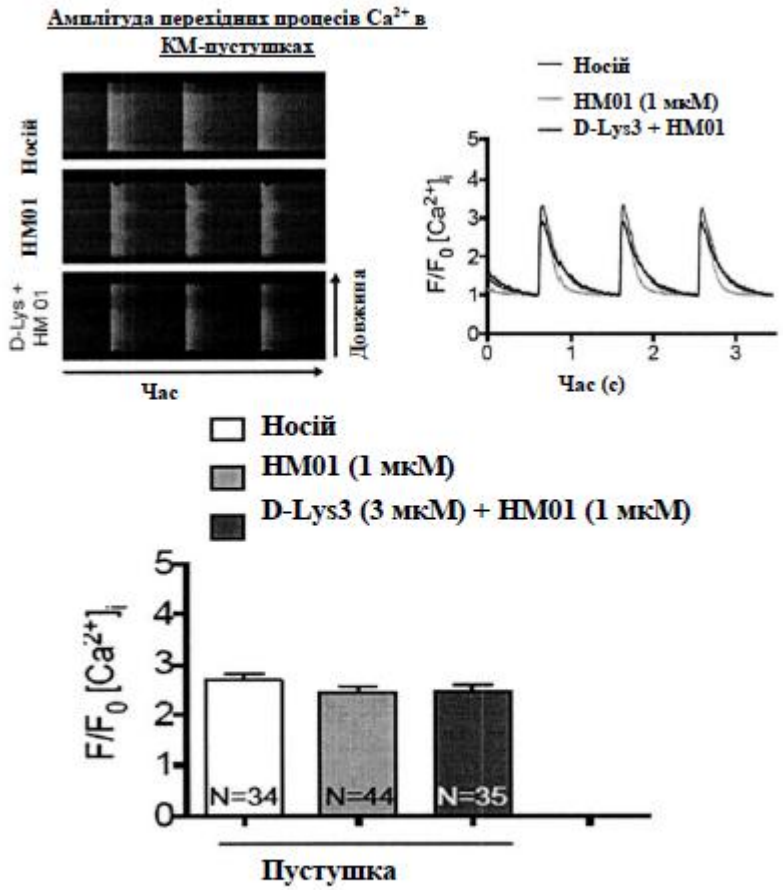
СН- серцева недостатність

ІМ- інфаркт міокарда

Фіг. 1

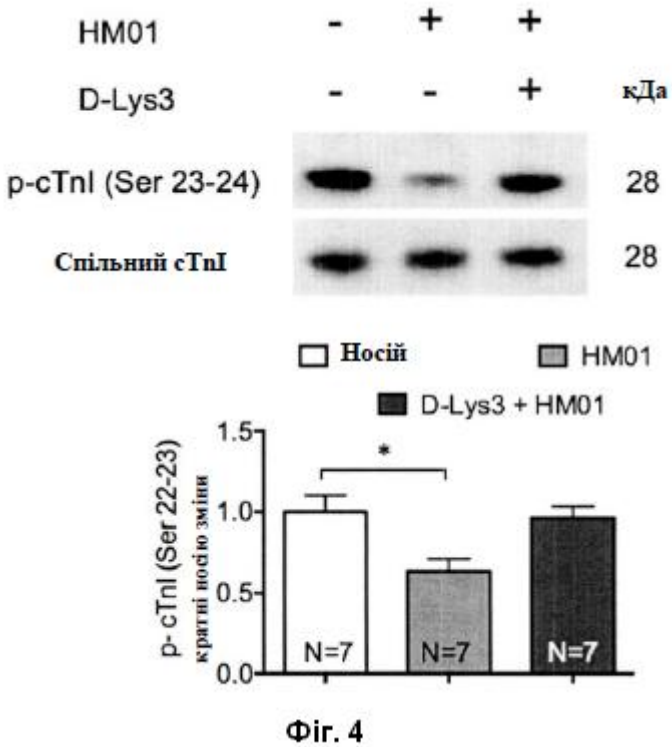

Час
Довжина
Носій
HM01 (0,2 мкМ)
HM01 (0,5 мкМ)
HM01 (1 мкМ)
Носій
HM01 (0,5 мкМ)
HM01 (0,2 мкМ)
HM01 (1 мкМ)
F/F0[Ca2+]i
Час (с)
Амплітуда перехідних процесів Ca2+
N=34
N=19
N=25
N=44
Носій
HM01 (0,2 мкМ)
HM01 (0,5 мкМ)
HM01 (1 мкМ)

Фіг. 2

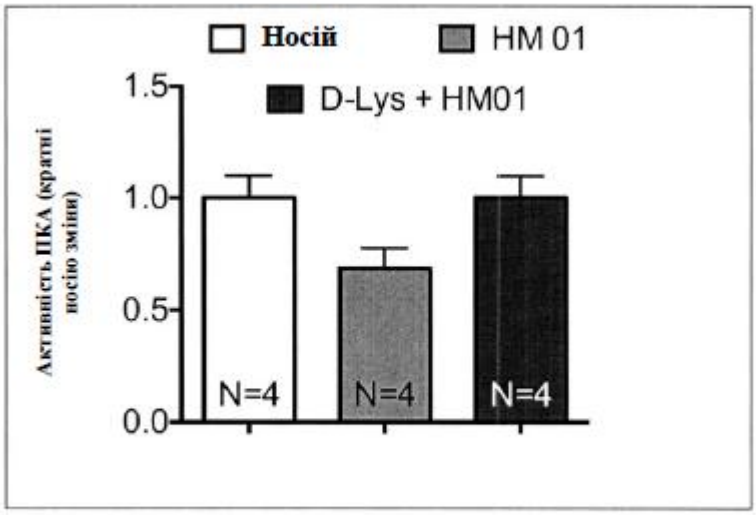


КМ- кардіоміоцити

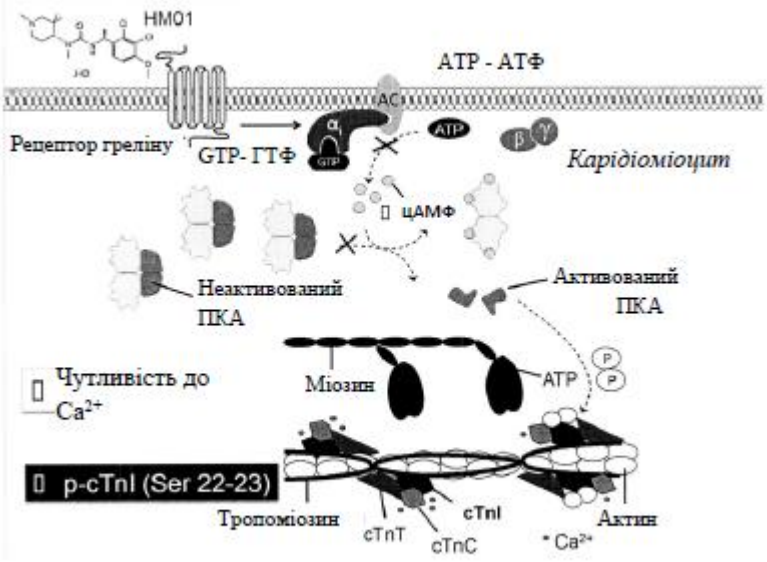
Фіг. 3



Фіг. 4



Фіг. 5



Фіг. 6

Комп'ютерна верстка О. Рябко

ДО "Український національний офіс інтелектуальної власності та інновацій", вул. Дмитра Годзенка, 1, м. Київ – 42, 01601