

# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **10.11.2000**  
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **10.11.1999 23.11.1999**  
(31) Číslo prioritní přihlášky: **1999/01618 1999/167101**  
(33) Země priority: **DK US**  
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **11.09.2002**  
**(Věstník č. 9/2002)**  
(86) PCT číslo: **PCT/DK00/00624**  
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO01/34593**

(21) Číslo dokumentu:

**2002 - 1587**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>:

**C 07 D 401/06**

**A 61 K 31/454**

**A 61 P 5/00**

(71) Přihlašovatel:

**NOVO NORDISK A/S, Bagsvaerd, DK;**

(72) Původce:

**Ankersen Michael, Ganlose, DK;**

(74) Zástupce:

**PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1, Praha 4,  
14000;**

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Sloučeniny ovlivňující růstový hormon**

(57) Anotace:

Nová diastereomerní sloučenina, její farmaceuticky přijatelná sůl, prostředek, ve kterém je obsažena a její použití pro léčení zdravotních poruch, které jsou důsledkem nedostatku růstového hormonu.

**CZ 2002 - 1587 A3**

## Sloučenina uvolňující růstový hormon

### Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká nové sloučeniny, jejích farmaceuticky přijatelných solí, prostředků, ve kterých je obsažena, a jejich použití pro léčení zdravotních poruch vznikajících z nedostatku růstového hormonu.

### Dosavadní stav techniky

Růstový hormon je hormon, který stimuluje růst všech tkání, které mohou růst. Navíc je o růstovém hormonu známo, že má různé účinky na metabolismus, např. stimulace syntézy proteinu a mobilizace volných mastných kyselin a způsobuje přepínání energetického metabolismu z cukerného metabolismu na metabolismus mastných kyselin. Nedostatek růstového hormonu případně vede k mnoha vážným zdravotním poruchám, např. trpasličí vzrůst.

Růstový hormon se uvolňuje z hypofýzy. Uvolňování buď přímo nebo nepřímo kontroluje mnoho hormonů a neurotransmiterů. Uvolňování růstového hormonu lze stimulovat hormonem uvolňujícím růstový hormon a inhibovat somatostatinem. V obou případech se hormony uvolňují z hypotalamu, ale jejich působení je zprostředkováno přes specifické receptory umístěné na hypofýze. Byly popsány i další sloučeniny stimulující uvolňování růstového hormonu z hypofýzy. Například arginin, L-3,4-dihydroxyfenylalanin (L-Dopa), glukagon, vasopressin, PACAP (peptid aktivující hypofýzovou adenylcyklasu), agonisté muskarinních receptorů a syntetický hexapeptid, peptid uvolňující růstový hormon, který uvolňuje endogenní růstový hormon buď přímým ovlivněním hypofýzy nebo ovlivněním uvolňování hormonu uvolňujícího růstový hormon a/nebo somatostatinu z hypotalamu.

Při poruchách nebo stavech, při kterých je požadováno zvýšené množství růstového hormonu, vede proteinová povaha růstového hormonu k tomu, že jiné než parenterální podávání není vhodné. Navíc další přímo působící činidla stimulující produkci enzymů, např. hormon uvolňující růstový hormon a PACAP, jsou delší polypeptidy, pro které je preferováno parenterální podávání.

Použití určitých sloučenin pro zvýšení množství růstového hormonu u savců bylo již dříve popsáno v např. EP 18 073, EP 83 864, WO 8 302 272, WO 8 907 110, WO 8 901 711, WO 8 910 933, WO 8 809 780, WO 9 118 016, WO 9 201 711, WO 9 304 081, WO 9 413 696, WO 9 517 423, WO 9 514 666, WO 9 615 148, WO 9 622 997, WO 9 635 713, WO 9 700 894, WO 9 722 620, WO 9 723 508, WO 9 740 023 a WO 9 810 653.

Prostředek obsahující sloučeniny uvolňující růstový hormon je důležitý z důvodů účinnosti při uvolňování růstového hormonu stejně jako z důvodů biodostupnosti. Proto je předmětem předkládaného vynálezu poskytnout novou sloučeninu uvolňující růstový hormon. Navíc je předmětem předkládaného vynálezu poskytnout novou sloučeninu uvolňující růstový hormon (činidlo stimulující produkci růstového hormonu), která je specifická a/nebo selektivní a nemá žádné podstatné vedlejší účinky, jako je např. uvolňování LH, FSH, TSH, ACTH, vasopressinu, oxytocinu, kortisolu a/nebo prolaktinu. Předmětem předkládaného vynálezu je také poskytnutí sloučeniny, která má dobrou orální biodostupnost.

### Podstata vynálezu

#### Shrnutí předkládaného vynálezu

Předkládaný vynález poskytuje novou sloučeninu, která působí přímo na buňky hypofýzy za normálních experimentálních podmínek *in vitro* tak, že se z nich uvolňuje růstový hormon.

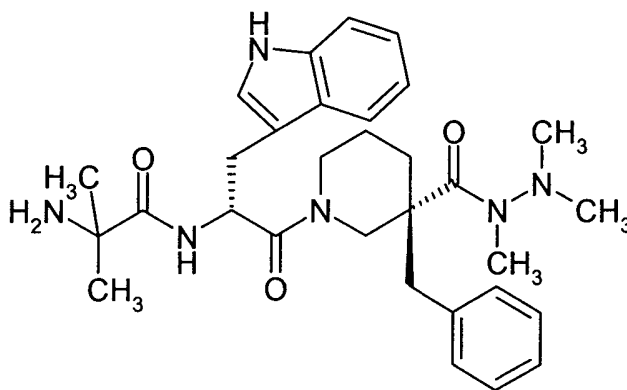
Sloučeninu uvolňující růstový hormon lze použít *in vitro* jako unikátní výzkumný nástroj pro porozumění, kromě jiného, jak je vylučování růstového hormonu regulováno na úrovni hypofýzy.

Navíc lze sloučeninu uvolňující růstový hormon podle předkládaného vynálezu také podávat *in vivo* tak, aby se zvýšilo uvolňování endogenního růstového hormonu.

#### Popis předkládaného vynálezu

Předkládaný vynález se týká sloučeniny, kterou lze získat postupem popsaným v příkladu 1, nebo její farmaceuticky přijatelné soli.

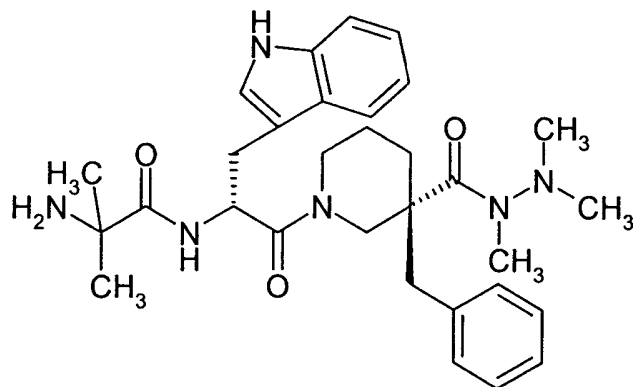
Dále se předkládaný vynález týká sloučeniny, kterou lze získat postupem popsaným v příkladu 1, kdy se jedná o sloučeninu 2-amino-*N*-[(1*R*)-2-[(3*R*)-3-benzyl-3-(*N,N',N'*-trimethylhydrazinokarbonyl)piperidin-1-yl]-1-(1*H*-indol-3-ylmethyl)-2-oxoethyl]-2-methylpropionamid, sloučenina strukturního vzorce I:



(I)

nebo její farmaceuticky přijatelné soli.

Dále se předkládaný vynález týká sloučeniny 2-amino-*N*-[(1*R*)-2-[(3*R*)-3-benzyl-3-(*N,N',N'*-trimethylhydrazinokarbonyl)piperidin-1-yl]-1-(1*H*-indol-3-ylmethyl)-2-oxoethyl]-2-methylpropionamidu, sloučeniny strukturního vzorce I:



(I)

nebo její farmaceuticky přijatelné soli.

Strukturu sloučeniny, kterou lze získat postupem popsáním v příkladu 1, lze ověřit rentgenovou difrakční analýzou (např. jak je popsáno v Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19. vydání (1995), zejména na stranách 160 a 561 až 562).

Jakékoliv možné kombinace dvou nebo více provedení popsáných v předkládaném vynálezu spadají do rámce předkládaného vynálezu.

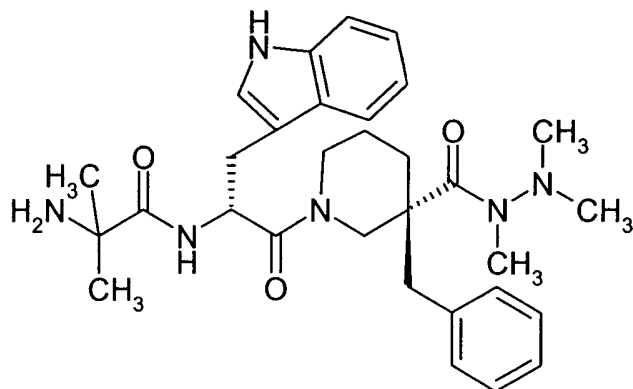
#### Obecné způsoby

Postup použitý v této patentové přihlášce je založen na spojování peptidů, které je v dané problematice dobře známé, a nelze je žádným způsobem pokládat za omezení předkládaného vynálezu.

V tomto postupu se před spojováním aminokyselin nebo peptidových zbytků odstraní vhodně chránicí skupiny jako je *tert*-butoxykarbonyl (Boc) postupy, které jsou odborníkům dobře známé. Také je možné, že tyto chránicí skupiny nejsou vůbec použity. Příslušné aminokyseliny lze chránit a odchránit způsoby známými v dané problematice a popsány např. T.W. Green (Protective Groups in Organic Synthesis, 2. vydání, John Wiley and Sons, New York 1991).

Celý postup je podrobně popsán v příkladu 1.

Rozštěpením racemické směsi *terc*-butylesteru 3-benzylpiperidin-1,3-dikarboxylové kyseliny se získají enantiomery a konečná sloučenina získaná na závěr celého postupu pak místo směsi dvou diastereomerů je diastereomer 2-amino-*N*-[(1*R*)-2-[(3*R*)-3-benzyl-3-(*N,N,N*'-trimethylhydrazinokarbonyl)piperidin-1-yl]-1-(1*H*-indol-3-ylmethyl)-2-oxoethyl]-2-methylpropionamid, sloučenina strukturního vzorce I:



(I)

Sloučenina podle předkládaného vynálezu vykazuje zvýšenou odolnost proti proteolytickému odbourávání enzymy, protože není přírodní, zejména protože přírodní amidové vazby jsou nahrazeny nepřirodními vazbami napodobujícími přírodní. Předpokládá se, že zvýšená odolnost sloučeniny podle předkládaného vynálezu proti proteolytickému odbourávání v porovnání se známými peptidy uvolňujícími růstový hormon, zlepší její biodostupnost v porovnání s biodostupností peptidů popsaných v dosavadním stavu techniky.

#### Farmaceutický prostředek

Sloučenina podle předkládaného vynálezu je případně ve formě farmaceuticky přijatelné soli tak, že se jedná o soli vzniklé přidáním kyseliny ke sloučeninám podle předkládaného vynálezu, což zahrnuje ty, které se připraví tak, že se nechá reagovat sloučenina strukturního vzorce I s anorganickou nebo organickou kyselinou, jako je kyselina chlorovodíková, bromovodíková, sírová, octová, fosforečná, mléčná, maleinová,

mandlová, ftalová, citrónová, glutarová, glukonová, methansulfonová, salicylová, jantarová, vinná, toluensulfonová, trifluoroctová, sulfamová nebo fumarová a/nebo voda.

Sloučeninu podle předkládaného vynálezu lze podávat ve formě farmaceuticky přijatelné soli vzniklé přidavkem kyseliny nebo, pokud je to vhodné, jako sůl alkalického kovu nebo kovu alkalických zemin nebo nižší alkylamonnou sůl. Předpokládá se, že formy soli vykazují přibližně stejnou účinnost jako formy volné báze.

V dalším aspektu se předkládaný vynález týká farmaceutického prostředku obsahujícího jako aktivní složku, sloučeninu podle předkládaného vynálezu nebo její farmaceuticky přijatelnou sůl spolu s farmaceuticky přijatelným nosičem nebo ředidlem.

Farmaceutické prostředky obsahující sloučeninu podle předkládaného vynálezu lze připravit běžnými postupy, které jsou popsány např. v Remington's Pharmaceutical Sciences, 1985, nebo v Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19. vydání (1995). Prostředky jsou v běžné formě, například kapsulí, tablet, aerosolů, roztoků, suspenzí nebo povrchových přípravků.

Použitý farmaceutický nosič nebo ředidlo je běžný pevný nebo tekutý nosič. Příklady pevných nosičů jsou laktosa, terra alba, sacharosa, cyklodextrin, talek, želatina, agar, pektin, akácie, stearát hořečnatý, kyselina stearová nebo nižší alkylethery celulosy. Příklady tekutých nosičů jsou sirup, arašídový olej, olivový olej, fosfolipidy, mastné kyseliny, amidy mastných kyselin, polyoxyethylen nebo voda.

Podobně nosič nebo ředidlo případně obsahuje jakýkoliv materiál s řízeným uvolňováním známý v dané problematice, jako je glycerylmonostearát nebo glyceryldistearát samostatně nebo ve směsi s voskem.

Pokud je pevný nosič použit pro orální podávání, přípravek lze tabletovat, umístit do tvrdých želatinových kapsulí ve formě prášku nebo pelet, nebo je ve formě pastilek nebo bonbonu. Množství pevného nosiče se mění v širokém rozmezí, ale obvykle je 25 mg až 1 g. Pokud je použit tekutý nosič, přípravek je ve formě sirupu, emulze, měkkých želatinových kapslí nebo sterilní injikovatelné tekutiny, jako jsou vodné nebo nevodné tekuté suspenze nebo roztoku.

Typická tableta, kterou lze připravit běžnými postupy tabletování obsahuje:

Jádro:

Aktivní sloučenina (volná forma nebo její sůl)	10 mg
Koloidní oxid křemičitý (Aerosil)	1,5 mg
Celulosa, mikrokrytalická (Avicel)	70 mg
Upravená celulosová pryskyřice (Ac-Di-Sol)	7,5 mg
Stearát hořečnatý	

Potah:

HPMC	9 mg
*Mywacett 9-40 T	0,9 mg

\*Acylovaný monoglycerid použitý jako plastifikátor pro potah.

Pro nasální podávání obsahuje přípravek sloučeninu podle předkládaného vynálezu rozpuštěnou nebo suspendovanou v tekutém nosiči, zejména ve vodném nosiči, pro aerosolovou aplikaci. Nosič případně obsahuje aditiva, jako jsou solubilizační činidla, např. propylenglykol, tenzidy, sloučeniny zvyšující absorpci, jako je lecithin (fosfatidylcholin) nebo cyklodextrin, nebo ochranné látky jako jsou parabeny.

Obecně jsou sloučeniny podle předkládaného vynálezu podávány v jednotkové dávkovací formě obsahující 50 mg až

200 mg aktivní složky spolu s farmaceuticky přijatelným nosičem na jednotku dávky.

Vhodná dávka sloučenin podle předkládaného vynálezu je 0,01 mg až 500 mg denně, např. 5 mg až 50 mg, jako je 10 mg na dávku, při podávání pacientům, např. lidem, jako lék.

V dalším aspektu se předkládaný vynález týká farmaceutického prostředku v jednotkové dávkovací formě, který obsahuje jako aktivní složku 10 mg až 200 mg sloučeniny strukturního vzorce I nebo její farmaceuticky přijatelné soli.

Bylo prokázáno, že sloučenina podle předkládaného vynálezu má schopnost uvolňovat *in vivo* endogenní růstový hormon. Tuto sloučeninu lze proto použít pro léčení stavů, které vyžadují zvýšená množství růstového hormonů v plasmě, jako jsou lidé s nedostatkem růstového hormonu nebo starší pacienti nebo hospodářská zvířata.

Tak se v hlavním aspektu předkládaný vynález týká farmaceutického prostředku pro stimulaci uvolňování růstového hormonu z hypofýzy, kdy tento prostředek obsahuje jako aktivní složku sloučeninu podle předkládaného vynálezu nebo její farmaceuticky přijatelnou sůl spolu s farmaceuticky přijatelným nosičem nebo ředidlem.

V dalším aspektu se předkládaný vynález týká způsobu stimulování uvolňování růstového hormonu z hypofýzy, způsobu podávání účinného množství sloučeniny podle předkládaného vynálezu nebo její farmaceuticky přijatelné soli subjektu, který to potřebuje.

V dalším aspektu se předkládaný vynález týká použití sloučeniny podle předkládaného vynálezu nebo její farmaceuticky přijatelné soli pro přípravu léku stimulujícího uvolňování růstového hormonu z hypofýzy.

Odborníkům v dané problematice je dobře známo, že současná a případná použití růstového hormonu u lidí jsou různá. Sloučeninu podle předkládaného vynálezu podávat za účelem stimulování uvolňování růstového hormonu z hypofýzy a proto má

podobné účinky při použití jako samotný růstový hormon. Sloučeniny podle předkládaného vynálezu jsou použitelné pro: stimulaci uvolňování růstového hormonu u starších pacientů, prevenci katabolických vedlejších účinků glukokortikoidů, prevenci a léčení osteoporózy, léčení chronického únavového syndromu, léčení akutního únavového syndromu a ztráty svalstva po elektivní operaci, stimulaci imunitního systému, urychlení léčení zranění, urychlení srůstání zlomeniny kostí, urychlení léčení komplikovaných zlomenin, např. distrakční osteogeneze, léčení únavových zlomenin, léčení zpomaleného růstu, léčení zpomaleného růstu v důsledku selhání nebo nedostatečné funkce ledvin, léčení kardiomyopatie, léčení chřadnutí v důsledku chronického onemocnění jater, léčení trombocytopenie, léčení zpomalení růstu v důsledku Crohnovy nemoci, léčení syndromu krátkého střeva, léčení chřadnutí v důsledku chronické obstruktivní plicní poruchy, léčení komplikací souvisejících s transplantací, léčení fyziologicky malého vzrůstu včetně dětí s nedostatkem růstového hormonu a malého vzrůstu v důsledku chronického onemocnění, léčení obezity a zpomalení růstu v důsledku obezity, léčení anorexie, léčení zpomalení růstu v důsledku syndromu Prader-Willi a Turnerova syndromu, zvýšení rychlosti růstu pacientů, kteří mají syndrom částečné necitlivosti na růstový hormon, urychlení uzdravení a zkrácení hospitalizace pacientů s popáleninami, léčení intrauterinního zpomalení růstu, skeletální dysplasii, hyperkortisolismus a Cushingův syndrom, vyvolání pulzatilního uvolňování růstového hormonu, nahrazení růstového hormonu u namáhaných pacientů, léčení osteochondrodysplasie, léčení Noonanova syndromu, léčení schizofrenie, léčení depresí, léčení Alzheimerovy nemoci, léčení při prodlouženém léčení zranění a psychosociální deprivaci, léčení katabolismu v důsledku pulmonární dysfunkce a ventilační závislosti, léčení srdečního selhání nebo související vaskulární dysfunkce, léčení narušené funkce srdce, léčení nebo prevence infarktu myokardu, snížení

tlaku krve, ochranu proti ventrikulární dysfunkci nebo prevenci reperfuse, léčení dospělých při chronické dialýze, zesílení proteinové katabolické reakce po velké operaci, snížení kachexie a ztráty proteinů v důsledku chronického onemocnění jako je rakovina nebo AIDS, léčení hyperinsulinemie včetně nesidioblastosy, léčení pro vyvolání ovulace, stimulaci vývoje brzlíku a prevenci narušení funkce brzlíku v důsledku věku, léčení pacientů s imunopresí, léčení sarkopenie, léčení chřadnutí v důsledku AIDS, zlepšení mobility a síly svalů, udržení tloušťky pokožky, zlepšení metabolické homeostáze a ledvinové homeostáze u slabých starších osob, stimulaci imunitního systému domácích živočichů a léčení poruch při stárnutí domácích živočichů, podporování růstu hospodářských zvířat a stimulaci růstu vlny u ovcí, zvýšení produkce mléka u hospodářských zvířat, léčení metabolického syndromu (syndrom X), léčení odolnosti k inzulinu, včetně NIDDM u savců, např. lidí, léčení odolnosti k inzulinu v souvislosti se srdcem, zlepšení kvality spánku a korekce relativního hyposomatotropismu ve stáří díky zvýšení spánku ve stádiu rychlých pohybů očí a snížení čekací doby na stádium rychlých pohybů očí, léčení hypothermie, léčení slabosti v důsledku stárnutí, léčení městnavého srdečního selhání, léčení fraktur krčku, léčení imunitní nedostatečnosti u jedinců se sníženým poměrem buněk T4/T8, léčení svalové atrofie, léčení muskuloskeletárních opruch u starších osob, zvýšení aktivity proteinové kinasy B (PKB), zlepšení celkové funkce plic, léčení poruch spánku, léčení zpomalení růstu v důsledku astmatu, léčení zpomalení růstu v důsledku juvenilní revmatické artritidy a léčení zpomalení růstu v důsledku cystické fibrosy.

Pro uvedené indikace se dávkování mění v závislosti na způsobu podávání a požadované terapii. Nicméně obecně se podává dávka 0,0001 až 100 mg/kg tělesné hmotnosti denně pacientům a živočichům, aby se vyvolalo účinné uvolňování

endogenního růstového hormonu. Navíc sloučenina podle předkládaného vynálezu nemá při podávání v uvedeném množství žádné podstatné vedlejší účinky, jako je například uvolňování LH, FSH, TSH, ACTH, vasopressinu, oxytocinu, kortisolu a/nebo prolaktinu. Obvykle dávkovací formy vhodné pro orální, nasální, pulmonální nebo transdermální podávání obsahují 0,0001 mg až 100 mg, s výhodou 0,001 mg až 50 mg sloučeniny podle předkládaného vynálezu smíchané s farmaceuticky přijatelným nosičem nebo ředidlem.

Případně obsahuje farmaceutický prostředek podle předkládaného vynálezu sloučeninu podle předkládaného vynálezu v kombinaci s jednou nebo více sloučeninami vykazujícími jinou aktivitu, např. antibiotikum nebo jiný farmakologicky aktivní materiál.

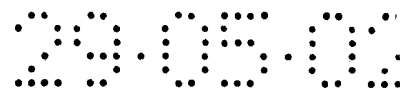
Způsob podávání je jakýkoliv způsob, který účinně dopraví aktivní sloučeninu do požadovaného místa působení, jako je orální, nasální, pulmonární, transdermální nebo parenterální, přičemž orální způsob je preferován.

Odhlédnuto od farmaceutického použití sloučeniny podle předkládaného vynálezu ji lze také použít jako *in vitro* nástroj pro zkoumání regulace uvolňování růstového hormonu.

Sloučenina podle předkládaného vynálezu je také použitelná jako *in vivo* nástroj pro vyhodnocení schopnosti hypofýzy uvolňovat růstový hormon. Například lze vzorky séra odebrané před a po podání sloučeniny lidem testovat na růstový hormon. Porovnáním množství růstového hormonu v každém vzorku séra lze přímo stanovit schopnost pacientovy hypofýzy uvolňovat růstový hormon.

Sloučeninu podle předkládaného vynálezu lze podávat komerčně zajímavým živočichům tak, aby se zvýšila rychlost a rozsah jejich růstu a zvýšila produkce mléka.

Další použití sloučeniny podle předkládaného vynálezu je v kombinaci s dalšími činidly stimulujícími produkci enzymů, jako je peptid uvolňující růstový hormon (2 nebo 6), hormon



uvolňující růstový hormon a jeho analogy nebo somatomediny včetně IGF-1 a IGF-2.

#### Farmakologické způsoby

Sloučeninu podle předkládaného vynálezu lze hodnotit *in vitro* z hlediska účinnosti uvolňování růstového hormonu v primární kultuře krysí hypofýzy a toto hodnocení lze provést následujícím způsobem.

Izolace buněk krysí hypofýzy je úpravou postupu popsáno v O. Sartor a kol., *Endocrinology*, **116**, 652 až 957 (1985). Samci bílých krys Sprague-Dawley (250 g +/- 25 g) byly koupeny od firmy Møllegaard, Lille Skensved, Dánsko. Krysy byly umístěny ve skupinových klecích (čtyři zvířata v jedné kleci) a umístěny v místnostech s dvanáctihodinovým světelným cyklem. Teplota v místnosti byla 19 °C až 24 °C a vlhkost byla 30 % až 60 %.

Krysy byly dekapitovány a hypofýzy byly rozřezány. Neurointermediární laloky byly vyjmuty a zbylá tkáň byla ihned umístěna do ledem vychlazeného izolačního pufru (médiu Gey (Gibco 041-04030) doplněné o 0,25 % hmotnostních D-glukosy, 2 % hmotnostní neesenciálních aminokyselin (Gibco 043-01140) a 1 % hmotnostní sérumalbuminu (BSA) (Sigma A-4503)). Tkáň byla nakrájena na malé kousky a přenesena do izolačního pufru doplněného o 3,8 mg/ml trypsinu (Worthington č. 3707 TRL-3) a 330 mg/ml DNasy (Sigma D-4527). Tato směs byla inkubována při 70 otáčkách za minutu při 37 °C v atmosféře 95 % objemových kyslíku a 5 % objemových oxidu uhličitého. Tkáň pak byla třikrát promyta výše uvedeným pufrem. Pomocí standardní pasteuovy pipety byla tkáň nasáta, aby se rozdělila na jednotlivé buňky. Pak byly buňky přefiltrovány přes nylonový filtr (16 mm), aby se odstranila nedigerovaná tkáň. Suspenze buněk byla třikrát promyta izolačním pufrem doplněným o trypsinový inhibitor (0,75 mg/ml, Worthington č. 2829) a nakonec resuspendována v kultivačním médiu; DMEM

(Gibco 041-01965) doplněné o 25 mM HEPES (Sigma H-3375), 4 mM glutamin (Gibco 043-05030H), 0,075 % hmotnostních hydrogenuhličitanu sodného (Sigma S-8875), 0,1 % hmotnostních neesenciálních aminokyselin, 2,5 % hmotnostních fetálního telecího séra (FCS, Gibco 011-06290), 3 % hmotnostních koňského séra (Gibco 034-06050), 10 % hmotnostních čerstvého krysího séra, 1 nM T<sub>3</sub> (Sigma T-2752) a 40 mg/ml dexamethasonu (Sigma D-4902) o pH 7,3, na hustotu 2 x 10<sup>5</sup> buněk na mililitr. Buňky byly naočkovány na mikrotitrační destičky (Nunc, Dánsko), 200 ml/jamka, a kultivovány po dobu 3 dnů při teplotě 37 °C a v atmosféře obsahující 8 % objemových CO<sub>2</sub>.

#### Testování sloučeniny

Po kultivaci byly buňky dvakrát promyty stimulačním pufrem (Hanks Balanced Salt Solution (Gibco 041-04020) doplněný 1 % hmotnostním BSA (Sigma A-4503), 0,25 % hmotnostních D-glukosy (Sigma G-5250) a 25 mM HEPES (Sigma H-3375) a pH 7,3) a předkultivovány po dobu 1 h při teplotě 37 °C. Pufř byl vyměněn za 90 ml stimulačního pufru (37 °C). Pak bylo přidáno 10 ml roztoku testované sloučeniny a destičky byly inkubovány po dobu 15 minut při teplotě 37 °C v atmosféře 5 % objemových CO<sub>2</sub>. Médium bylo slito a analyzováno na obsah růstového hormonu testovacím systémem rGH SPA.

Sloučenina byla testována v dávkách 10 pM až 100 nM. Vztah závislosti na dávce byl vyjádřen pomocí Hillovy rovnice (Obr. P, Biosoft). Účinnost (maximální množství uvolněného růstového hormonu, E<sub>max</sub>) byla vyjádřena v % E<sub>max</sub> proteinu uvolňujícího růstový hormon GHRP-6. Působivost (EC<sub>50</sub>) byla stanovena jako koncentrace, která vyvolá poloviční maximální stimulaci uvolňování růstového hormonu.

Sloučeniny podle předkládaného vynálezu lze hodnotit z hlediska metabolické stability následujícím postupem:

Sloučenina byla rozpuštěna na koncentraci 1 mg/ml ve vodě. 25 ml tohoto roztoku bylo přidáno do 175 ml konkrétního

enzymového roztoku (čímž se dosáhne poměru enzym : substrát 1 : 5, hmotnostně). Roztok byl ponechán při teplotě 37 °C přes noc. 10 ml různých degradačních roztoků bylo analyzováno proti odpovídajícímu referenčnímu vzorku za použití elektrosprej hmotové spektrometrie (ESMS) s monitorováním molekulového iontu. Pokud je signál nižší o více než 20 % v porovnání s referenčním vzorkem, je zbylý roztok analyzován pomocí HPLC a hmotové spektrometrie, aby se zjistil rozsah a přesná místa odbourání.

V testech stability byly použity standardní peptidy (ACTH 4-10, Angiotensin 1-14 a Glukagon), aby se ověřila schopnost různých roztoků odbourávat peptidy.

Standardní peptidy (angiotensin 1-14, ACTH 4-10 a glukagon) byly koupeny od firmy Sigma, MO, USA.

Enzymy (trypsin, chymotrypsin, elastasa aminopeptidasa M a karboxypeptidasa Y a B) byly všechny koupeny od firmy Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Německo).

Směs pankreatických enzymů: trypsin, chymotrypsin a elastasa ve 100 mM hydrogenuhličitanu amonném při pH 8,0 (všechny koncentrace 0,025 mg/ml).

Karboxypeptidasová směs: karboxypeptidasa Y a B v 50 mM octanu amonném o pH 4,5 (všechny koncentrace 0,025 mg/ml).

Roztok aminopeptidasy M: aminopeptidasa M (0,025 mg/ml) ve 100 mM hydrogenuhličitanu amonném o pH 8,0.

Hmotová spektrometrie byla provedena za použití dvou různých hmotových spektrometrů. Sciex API III LC-MS s trojitým kvadrupólem (Sciex Instruments, Thornhill, Ontario) vybavený iontovým zdrojem elektrosprej a Bio-Ion 20 time-of-flight Plasma Desorption (Bio-Ion Nordic AB, Uppsala, Sweden).

Kvantifikace sloučeniny (před a po odbourání) byla provedena na API III za použití sledování jediného iontu molekulového iontu při průtokovém nástřiku analytu. Průtok tekutiny (methanol : voda, 1 : 1, objemově) 100 ml/min byl kontrolován ABI 140B HPLC jednotkou (Perkin-Elmer Applied

Biosystems Divisions, Foster City, CA). Parametry zařízení byly nastaveny na standardní pracovní podmínky a monitorování jediného molekulového iontu bylo provedeno za použití nejintenzivnějšího molekulového iontu (ve většině případů odpovídá dvakrát nabitému molekulovému iontu).

Identifikace produktů odbourávání se dále provádí za použití plasmové desorpční hmotové spektrometrie (PDMS) s aplikací vzorku na nitrocelulosou pokryté cíle a při standardním nastavení zařízení. Přesnost stanovených hmotností je obecně vyšší než 0,1 %.

Dělení a izolace produktů odbourávání bylo provedeno za použití HPLC kolony s reversní fází HY-TACH C-18 4,6 x 105 mm (Hewlett-Packard Company, Palo Alto, CA) se standardním dělicím gradientem acetonitril : kyselina trifluoroctová. Použitý HPLC systém byl HP1090M (Hewlett-Packard Company, Palo Alto, CA).

Peptidový derivát	Ion MW/SIM (amu)	Karboxy-peptidasová směs	Směs pankreatických enzymů
Standardy			
ACTH 4-10	1124,5/562,8	+	-
Glukagon	3483/871,8	-	-
Inzulín (B23-29)	859,1/430,6		
Angiotensin 1-14	1760,1/881,0	-	-
GHRP-2	817,4/409,6	-	-
GHRP-6	872,6/437,4	-	-

+: Stabilní (méně než 20% snížení SIM (jediného molekulového iontu) signálu po 24 h v odbourávacím roztoku)

-: Nestabilní (více než 20% snížení SIM (jediného molekulového iontu) signálu po 24 h v odbourávacím roztoku)

### Farmakokinetické způsoby

Sloučeninu podle předkládaného vynálezu lze hodnotit z hlediska orální biodostupnosti a takové hodnocení se provádí následujícím způsobem.

Farmakokinetické vlastnosti sloučeniny lze hodnotit u vyhladovělých psů plemene Beagle.

Intravenózní a orální podání testované sloučeniny v 5% roztoku glukosy, vyjádřeno v procentech hmotnostních, bylo odděleno jedním týdnem vylučování.

Vzorky krve byly odebrány těsně před podáním léku (čas nula) a pak 0,08, 0,25, 0,50, 0,75, 1,0, 1,5, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0 a 6,0 hodin po podání.

Vzorky plasmy byly skladovány zmrzlé (< -18 °C) až do analýzy.

Pro stanovení sloučeniny v plasmě byl použit postup HPLC s extrakcí pevné fáze a UV detekce.

Sloučenina podle předkládaného vynálezu má orální biodostupnost 50 %.

Farmakokinetické parametry sloučenin byly vypočteny za použití farmakokinetického software WinNonlin, verze 1.1 (Scientific Consulting Inc., Apex, NC, USA).

Jakýkoliv nový rys nebo kombinace rysů popsaných v předkládaném vynálezu je pokládána za nezbytnou pro předkládaný vynález.

### Příklady provedení vynálezu

Způsoby přípravy sloučeniny podle předkládaného vynálezu a přípravků obsahujících tuto sloučeninu jsou dále ilustrovány v následujících příkladech, které nicméně nelze žádným způsobem pokládat za omezující.

Struktury sloučenin byly potvrzeny pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC), nukleární magnetické rezonance (NMR, Bruker 400 MHz) nebo kombinace kapalinové

chromatografie s hmotovou spektrometrií (LC-MS). Posuny v NMR jsou uvedeny v ppm a vypsány jsou pouze vybrané signály. Teplota tání je uvedena ve °C. Kolonová chromatografie byla provedena postupem popsaným ve W.C. Still a kol., J. Org. Chem., **43**, 2923 až 2925 (1978) na silikagelu Merck 60 (Art. 9385). Sloučeniny použité jako výchozí látky jsou buď známé sloučeniny nebo sloučeniny, které lze snadno připravit způsoby, které jsou v dané problematice známy. Roztok amoniaku v methanolu byl 10% roztok amoniaku v methanolu, vyjádřeno v procentech hmotnostních.

#### HPLC analýza:

##### Způsob A1

Analýza byla provedena za použití UV detekcí při 214, 254, 276 a 301 nm na 218TP54 4,6 mm x 250 mm 5m C-18 silikagelové koloně (The Separations Group, Hesperia), která byla promývána průtokem 1 ml/min při teplotě 42 °C. Kolona byla předem promyta 5% acetonitrilem (vyjádřeno v procentech objemových) v pufru obsahujícím 0,1 M síran amonný jehož pH bylo pomocí 4 M kyseliny sírové upraveno na hodnotu 2,5. Po nástřiku vzorku byla kolona promývána gradientem 5% acetonitril až 60% acetonitril (vyjádřeno v procentech objemových) v uvedeném pufru během 50 minut.

##### Způsob B1

Analýza byla provedena za použití UV detekcí při 214, 254, 276 a 301 nm na 218TP54 4,6 mm x 250 mm 5m C-18 silikagelové koloně (The Separations Group, Hesperia), která byla promývána průtokem 1 ml/min při teplotě 42 °C. Kolona byla předem promyta 5% acetonitrilem s 0,1 % objemových kyseliny trifluoroctové (vyjádřeno v procentech objemových) v roztoku kyseliny trifluoroctové ve vodě (0,1 % objemových). Po nástřiku vzorku byla kolona promývána gradientem 5% acetonitril až 60% acetonitril s 0,1 % objemových kyseliny

trifluoroctové (vyjádřeno v procentech objemových) v uvedeném pufriu během 50 minut.

#### Způsob h8

Analýza byla provedena za použití UV detekcí při 214 a 254 nm na 218TP54 4,6 mm x 250 mm C-18 silikagelové koloně, která byla promývána průtokem 1 ml/min při teplotě 42 °C. Kolona byla předem promyta směsí 5 % objemových acetonitrilu, 85 % objemových vody a 10 % objemových roztoku vody s 0,5 % objemových kyseliny trifluoroctové a po nástřiku vzorku vymývána lineárním gradientem směsi 5 % objemových acetonitrilu, 85 % objemových vody a 10 % objemových roztoku vody s 0,5 % objemových kyseliny trifluoroctové až na směs 90 % objemových acetonitrilu a 10 % objemových roztoku vody s 0,5 % objemových kyseliny trifluoroctové během 15 minut.

#### Chirální HPLC:

Chirální HPLC bylo provedeno za použití UV detekcí při 225 a 254 nm na 4,6 mm x 250 mm Chiracel OJ koloně opatřené předkolonkou 4,6 mm x 80 mm Chiracel OJ (obě od firmy Daicel Chemical Industries, Ltd.) promýváním průtokem 0,7 ml/min za laboratorní teploty. Vzorek byl vymýván isokratickým eluentem heptan (92 % objemových) : isopropanol (8 % objemových) : kyselina trifluoroctová (0,1 % objemových).

#### Analýza kapalinová chromatografie - hmotová spektrometrie:

Tyto analýzy byly provedeny na systému PE Sciex API 100 LC/MS za použití Waters® 3 mm x 150 mm 3,5 m C-18 Symmetry kolony a pozitivního iontového nástřiku a průtokem 20 ml/min. Kolona byla promývána lineárním gradientem 5 % objemových až 90 % objemových acetonitrilu, 85 % objemových až 0 % objemových vody a 10 % objemových roztoku kyseliny trifluoroctové (0,1 % objemových) ve vodě během 15 min při průtoku 1 ml/min.

## Zkratky:

TLC:	tenkovrstvá chromatografie
DMSO:	dimethylsulfoxid
min:	minuty
h:	hodiny
Boc:	terc-butoxykarbonyl
DMF:	dimethylformamid
THF:	tetrahydrofuran
EDAC:	hydrochlorid <i>N</i> -ethyl- <i>N'</i> -dimethylaminopropylkarbodiimidu
HOAt:	1-hydroxy-7-azabenzotriazol
DIEA:	diisopropylethylamin
TFA:	kyselina trifluoroctová

## Stavební bloky:

*N*-methylované aminokyseliny použité v následujících příkladech byly připraveny postupem popsáním v Can. J. Chem., 55, 906, 1977.

*N,N'*-dimethylhydrazid kyseliny mravenčí

Směs 50 ml methylformiátu a 50 ml 1,1-dimethylhydrazinu byla míchána tři dny za laboratorní teploty. Odpařením za sníženého tlaku byly získány krystaly, které byly rozmíchány ve směsi ethanolu a heptanu (5 : 95, objemově), chlazeny v lednici přes noc a odfiltrovány:

50,7 g (575 mmolů) (výtěžek: 88 % molárních)

Dihydrochlorid *N,N,N'*-trimethylhydrazinu

Trojhrdlá kulatá baňka o objemu 2 l opatřená magnetickým míchadlem a přikapávací nálevkou byla po přidání 20,4 g  $\text{LiAlH}_4$  evakuována a naplněna dusíkem. Přikapávací nálevka byla opatřena probublávačkou na dusík a pak bylo pomalu přidáno 250 ml suchého tetrahydrofuranu (exothermní). Šedivá suspenze byla intenzivně míchána a během 1 hodiny byl po kapkách přidán

roztok *N,N*'-dimethylhydrazidu kyseliny mravenčí ve 250 ml suchého tetrahydrofuranu. Výsledná reakční směs byla míchána přes noc za laboratorní teploty. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (mobilní fáze CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100) : CH<sub>3</sub>OH (10) : NH<sub>3</sub> (1)).

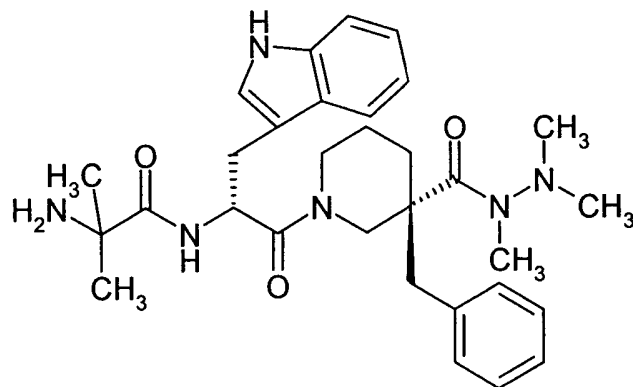
Jiná trojhrdlá kulatá baňka o objemu 2 l opatřená chladičem chlazeným suchým ledem byla po přidání 350 ml 4,8 M HCl v CH<sub>3</sub>OH umístěna do chladicí lázně ze suchého ledu (-70 °C). Pak byla přes Vigreuxův chladič připojena k baňce s reakční směsí, která pak byla umístěna do olejové lázně. K reakční směsi pak bylo opatrně přidáno 200 ml tetrahydrofuranu a 200 ml methanolu. Pomalým zahříváním na teplotu 130 °C se dosáhlo destilace produktu a rozpouštědel, což vedlo k vylučování krystalické dihydrochloridové soli trimethylhydrazinu (při teplotě -70 °C). Chladicí lázeň ze suchého ledu byla odstraněna a teplota byla ponechána vzrůst na laboratorní teplotu. Odpařením za sníženého tlaku byl získán hustý bezbarvý olej, který byl sušen přes noc za sníženého tlaku: 45,2 g (309 mmolů) (výtěžek: 68 % molárních).

Velmi hygroskopický produkt byl uchováván pod dusíkovou atmosférou.

Další výchozí látky byly nakoupeny od firmy Aldrich.

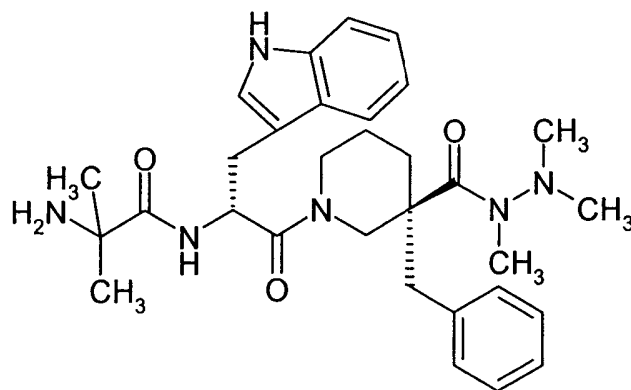
#### Příklad 1

Způsob přípravy sloučeniny, kterou je buď 2-amino-*N*-[(1*R*)-2-[(3*R*)-3-benzyl-3-(*N,N,N*'-trimethylhydrazinokarbonyl)piperidin-1-yl]-1-(1*H*-indol-3-ylmethyl)-2-oxoethyl]-2-methylpropionamid, sloučenina strukturního vzorce I:



(I)

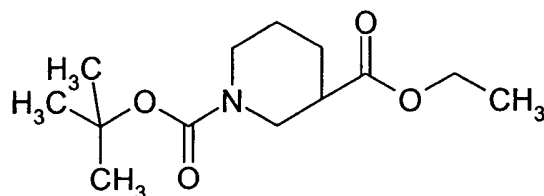
nebo 2-amino-*N*- [(1*R*)-2-[(3*S*)-3-benzyl-3-(*N,N',N'*-tri-methylhydrazinokarbonyl)piperidin-1-yl]-1-(1*H*-indol-3-yl-methyl)-2-oxo-ethyl]-2-methylpropionamid, sloučenina strukturního vzorce II:



(II)

Krok a

1-*tert*-butyl-3-ethyl-piperidin-1,3-dikarboxylát  
(sloučenina strukturního vzorce III)



(III)

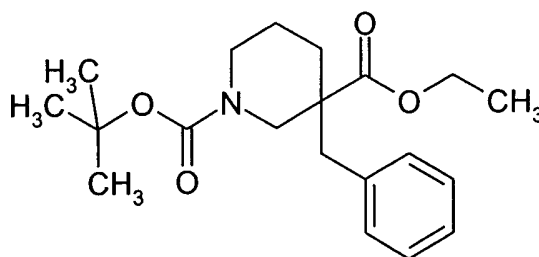
Do jednohrdlé kulaté baňky o objemu 1 l opatřené magnetickým míchadlem a přikapávací nálevkou byl nasypán pevný NaOH (15,6 g) a pak tetrahydrofuran (400 ml) a ethylnipekotát (50 ml, 324 mmolů). K míchanému roztoku byl za laboratorní

teploty přikapán  $\text{Boc}_2\text{O}$  (84,9 g, 389 mmolů) rozpuštěný v tetrahydrofuranu (150 ml) (během 1 hodiny, sráží se bílá pevná látka, NaOH se rozpouští, exothermní). Výsledná reakční směs byla míchána přes noc za laboratorní teploty. Pak byla směs nalita do ethylacetátu (500 ml) a vody (2000 ml), vodná vrstva byla opět extrahována ethylacetátem (2 x 500 ml) a spojené organické vrstvy byly promyty nasyceným roztokem chloridu sodného (100 ml), vysušeny síranem hořečnatým, přefiltrovány a odpařeny za sníženého tlaku, čímž byl získán 1-terc-butyl-3-ethyl-piperidin-1,3-dikarboxylát (sloučenina strukturního vzorce III) (82,5 g) ve formě hustého žlutého oleje.

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1,25 (t, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,45 (s, 6H, 3 x  $\text{CH}_3$ ), 2,05 (m, 1H), 2,45 (m, 1H), 2,85 (m, 1H), 3,95 (široký d, 1 H), 4,15 (q, 2H,  $\text{CH}_2$ )

#### Krok b

1-terc-butyl-3-ethyl-3-benzylpiperidin-1,3-dikarboxylát  
(sloučenina strukturního vzorce IV) (racemická směs)



(IV)

Trojhrdlá kulatá baňka o objemu 2 l opatřená magnetickým míchadlem, teploměrem, probublávačkou na dusík a přikapávací nálevkou byla evakuována, naplněna dusíkem, byl do ní přidán bezvodý tetrahydrofuran (500 ml) a byl ochlazen na teplotu  $-70\text{ }^\circ\text{C}$ . Pak byl přidán diisopropylamid lithný (164 ml 2,0 M roztoku v tetrahydrofuranu, 327 mmolů). Do míchaného roztoku byl při teplotě  $-70\text{ }^\circ\text{C}$  po kapkách během 45 minut přidán roztok 1-terc-butyl-3-ethyl-piperidin-1,3-dikarboxylátu (sloučenina strukturního vzorce III) (80 g, 311 mmolů) v bezvodém

tetrahydrofuranu (50 ml) (při teplotě  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$  až  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  vznikl čirý červený roztok). Výsledná směs byla míchána po dobu 20 minut a pak byl během 40 minut po kapkách přidán roztok benzylbromidu (37 ml, 311 mmolů) v bezvodém tetrahydrofuranu (250 ml) (při teplotě  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  až  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Výsledná směs byla míchána po dobu 1 hodiny při teplotě  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  a pak ponechána přes noc za laboratorní teploty (světle oranžový roztok). Reakční směs pak byla odpařena za sníženého tlaku na objem 300 ml, převedena do dělicí nálevky, zředěna dichlormethanem (900 ml) a promyta vodou (900 ml). Protože se vodná vrstva špatně oddělovala, byla reextrahována dichlormethanem 200 ml, spojené organické vrstvy byly promyty vodným roztokem hydrogensíranu sodného (200 ml, 10% roztok, vyjádřeno v procentech objemových), vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného (200 ml, nasycený roztok), vodou (200 ml), nasyceným roztokem chloridu sodného (100 ml), vysušeny síranem hořečnatým, odfiltrovány a odpařeny za sníženého tlaku, čímž byl získán olej, který byl rozpuštěn ve směsi ethylacetátu s heptanem (1 : 10, objemově) a ponechán stát přes noc. Vzniklá pevná látka byla odfiltrována, promyta heptanem a vysušena za sníženého tlaku, čímž byla získána racemická směs 1-terc-butyl-3-ethyl-3-benzylpiperidin-1,3-dikarboxylátu (sloučenina strukturního vzorce IV) (81,4 g).

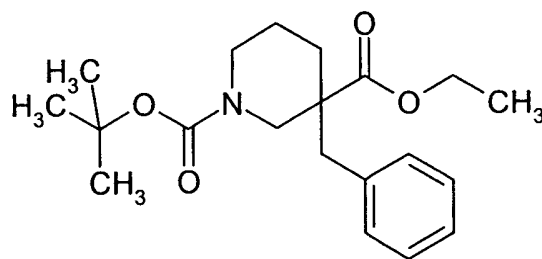
HPLC (h8):  $R_t = 15,79\text{ min}$

LC-MS:  $R_t = 7,67\text{ min}$ ;  $(m+1) = 348,0$

Krok c

terc-butyl-hydrogen-3-benzylpiperidin-1,3-dikarboxylát

(sloučenina strukturního vzorce V) (racemická směs)



(V)

1-*terc*-butyl-3-ethyl-3-benzylpiperidin-1,3-dikarboxylát (sloučenina strukturního vzorce IV) (81 g, 233 mmolů) byl rozpuštěn v ethanolu (400 ml) a hydroxidu sodném (400 ml, 16% roztoku ve vodě, vyjádřeno v procentech hmotnostních) v jednohrdlé kulaté baňce o objemu 1 l opatřené zpětným chladičem a magnetickým míchadlem. Výsledná směs byla zahřívána k varu pod zpětným chladičem po dobu 10 h pod dusíkovou atmosférou, ochlazena na laboratorní teplotu, odpařena za sníženého tlaku na objem 600 ml (začala se srážet pevná látka), zředěna vodou (400 ml), ochlazena ledovou lázní a za intenzivního míchání okyselena 4 M kyselinou sírovou na pH 3 (výsledná teplota 28 °C). Výsledná směs byla extrahována ethylacetátem (2 x 700 ml) a spojené organické vrstvy byly promyty nasyceným roztokem chloridu sodného ve vodě (200 ml, vysušeny síranem hořečnatým, přefiltrovány a odpařeny za sníženého tlaku, čímž byl získán olej, který byl rozpuštěn ve směsi ethylacetátu s heptanem (10 : 1 objemově) a ponechán stát přes noc. Vzniklé krystaly byly odfiltrovány, promyty heptanem a vysušeny za sníženého tlaku, čímž byla získána racemická směs *terc*-butyl-hydrogen-3-benzylpiperidin-1,3-dikarboxylátu (sloučenina strukturního vzorce V) (66,0 g).

HPLC (h8): Rt = 12,85 min.

LC-MS: Rt = 5,97 min; (m+1) = 320,0

Chirální HPLC (Chiracel OJ, mobilní fáze

heptan : isopropanol : kyselina trifluoroctová, 92 : 8 : 0,1):

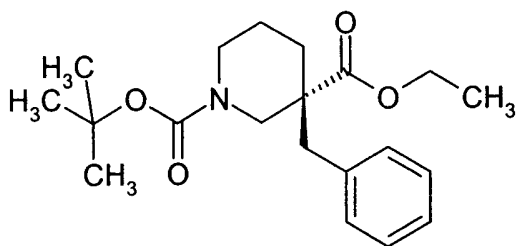
Rt = 8,29 min; 46,5 %

Rt = 13,69 min; 53,5 %

Krok d

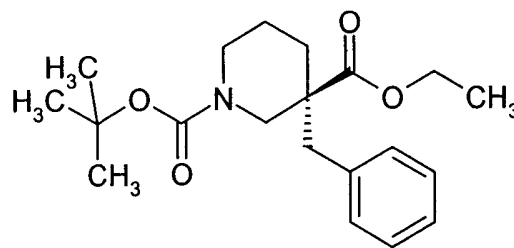
(3*R*)-*tert*-butyl-hydrogen-3-benzylpiperidin-1,3-dikarboxylát (sloučenina strukturního vzorce VI) nebo (3*S*)-*tert*-butyl-hydrogen-3-benzylpiperidin-1,3-dikarboxylát (sloučenina strukturního vzorce VII)

(Štěpení *tert*-butyl-hydrogen-3-benzylpiperidin-1,3-dikarboxylátu (sloučenina strukturního vzorce V))



(VI)

nebo



(VII)

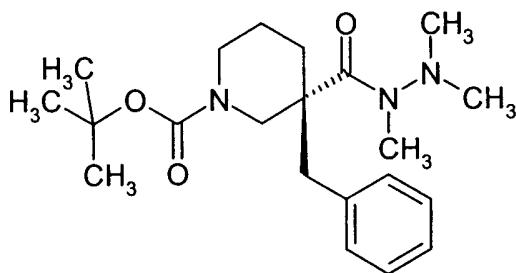
*Tert*-butyl-hydrogen-3-benzylpiperidin-1,3-dikarboxylát (sloučenina strukturního vzorce V) (76 g, 238 mmolů) byl rozpuštěn v ethylacetátu (3,0 l) v jednohrdlé baňce o objemu 5 l opatřené magnetickým míchadlem. Pak byla přidána voda (30 ml), (*R*)-1-fenethylamin (18,2 ml, 143 mmolů) a triethylamin (13,2 ml, 95 mmolů) a výsledná směs byla míchána přes noc za laboratorní teploty, čímž se vyloučily bílé krystaly (41,9 g), které byly odfiltrovány, promyty ethylacetátem a vysušeny za sníženého tlaku. Pak byly rozpuštěny ve směsi vodného roztoku hydrogensíranu sodného (300 ml, 10% roztok, vyjádřeno v procentech hmotnostních) a ethylacetátu (600 ml), vrstvy byly odděleny a vodná vrstva byla reextrahována ethylacetátem (100 ml). Spojené organické vrstvy byly promyty nasyceným roztokem chloridu sodného (100 ml), vysušeny síranem sodným a přefiltrovány. Rozpouštědlo bylo odpařeno za sníženého tlaku, čímž byl získán bezbarvý olej, který byl rozpuštěn ve směsi ethylacetátu s heptanem (10 : 1 objemově) a ponechán stát přes noc. Vzniklé krystaly byly odfiltrovány, promyty heptanem a vysušeny za sníženého tlaku, čímž byla získána sloučenina, kterou je buď (*3R*)-*tert*-butyl-hydrogen-3-benzylpiperidin-1,3-dikarboxylát

(sloučenina strukturního vzorce VI) nebo (3*S*)-*tert*-butyl-  
-hydrogen-3-benzylpiperidin-1,3-dikarboxylát (sloučenina  
strukturního vzorce VII) (27,8 g).

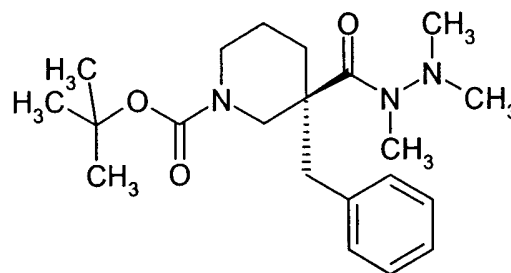
Chirální HPLC (Chiracel OJ, mobilní fáze  
heptan : isopropanol : kyselina trifluoroctová, 92 : 8 : 0,1):  
Rt = 7,96 min; 95,8 % e.e.

#### Krok e

(3*R*)-*tert*-butyl-3-benzyl-3-(*N,N,N'*-trimethylhydrazino-  
karbonyl)piperidin-1-karboxylát (sloučenina strukturního  
vzorce VIII) nebo (3*S*)-*tert*-butyl-3-benzyl-3-(*N,N,N'*-tri-  
methylhydrazinokarbonyl)piperidin-1-karboxylát (sloučenina  
strukturního vzorce IX)



(VIII) nebo



(IX)

Dihydrochlorid trimethylhydrazinu (15,3 g, 104 mmolů) byl  
suspendován v tetrahydrofuranu (250 ml) v jednohrdlé kulaté  
baňce o objemu jeden litr opatřené velkým magnetickým  
míchadlem a přikapávací nálevkou spojenou s probublávačkou na  
dusík. Baňka pak byla umístěna do vodní lázně (teplota 10 °C  
až 20 °C), byl do ní přidán brom-tris-pyrrolidinofosfonium-  
hexafluorofosfát (40,4 g, 86,7 mmolů) a za intenzivního  
míchání byl po kapkách přidán diisopropylethylamin (59 ml,  
347 mmolů). Výsledná směs (obsahující hustou sraženinu) byla  
míchána po dobu 5 minut a pak byl pomalu během 1,5 hodiny  
přidán roztok produktu z kroku d, což je buď (3*R*)-*tert*-butyl-  
-hydrogen-3-benzylpiperidin-1,3-dikarboxylát (sloučenina  
strukturního vzorce VI) nebo (3*S*)-*tert*-butyl-hydrogen-3-  
-benzylpiperidin-1,3-dikarboxylát (sloučenina strukturního  
vzorce VII), (27,7 g, 86,7 mmolů) v tetrahydrofuranu (250 ml).

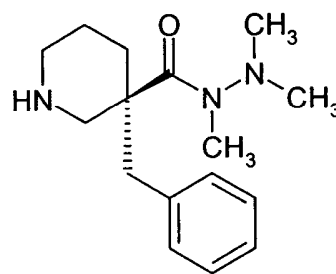
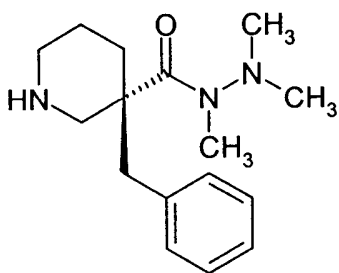
Výsledná reakční směs byla míchána přes noc za laboratorní teploty. Pak byla reakční směs zředěna ethylacetátem (1000 ml), promyta vodou (500 ml), roztokem hydrogensíranu sodného ve vodě (200 ml, 10% roztok, vyjádřeno v procentech objemových), vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného (200 ml, nasycený roztok), nasyceným roztokem chloridu sodného (200 ml), vysušena síranem hořečnatým, odfiltrována a odpařena za sníženého tlaku, čímž byl získán hustý oranžový olej. Výsledná směs byla rozpuštěna v ethylacetátu (300 ml), přidána ke 150 g silikagelu a odpařena za sníženého tlaku do formy suchého prášku, který byl nanesen na filtr se silikagelem (150 g). Po promytí heptanem (1 l) byla požadovaná sloučenina uvolněna ethylacetátem (2,5 l). Po odpaření za sníženého tlaku byl produkt, což je buď (3*R*)-*tert*-butyl-3-benzyl-3-(*N,N,N'*-trimethylhydrazinokarbonyl)piperidin-1-karboxylát (sloučenina strukturního vzorce VIII) nebo (3*S*)-*tert*-butyl-3-benzyl-3-(*N,N,N'*-trimethylhydrazinokarbonyl)piperidin-1-karboxylát (sloučenina strukturního vzorce IX), získán ve formě oranžového oleje (49 g).

HPLC (h8):

Rt = 14,33 min.

Krok f

(3*R*)-(N,N',N'-trimethylhydrazid)-3-benzyl-piperidin-3-karboxylové kyseliny (sloučenina strukturního vzorce X) nebo (3*S*)-(N,N',N'-trimethylhydrazid)-3-benzyl-piperidin-3-karboxylové kyseliny (sloučenina strukturního vzorce XI)



(X) nebo

(XI)

Produkt z kroku e, což je buď (3*R*)-*tert*-butyl-3-benzyl-3-(*N,N,N'*-trimethylhydrazinokarbonyl)piperidin-1-karboxylát

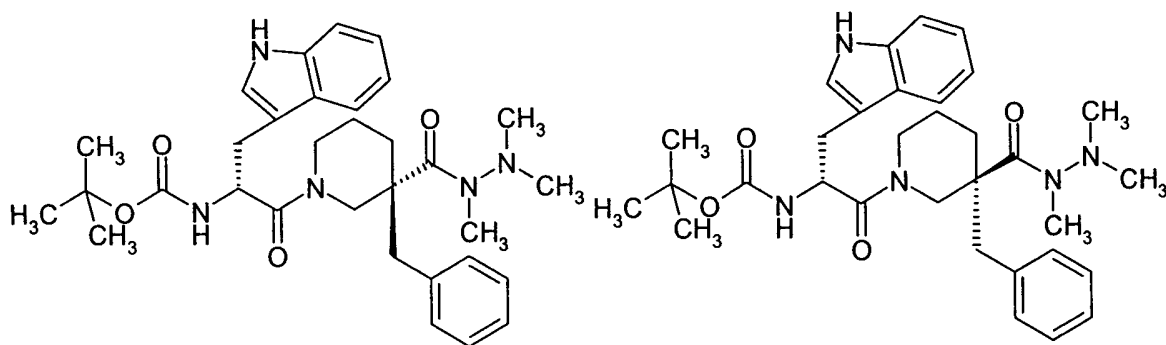
(sloučenina strukturního vzorce VIII) nebo (3*S*)-*terc*-butyl-3-benzyl-3-(*N,N',N'*-trimethylhydrazinokarbonyl)piperidin-1-karboxylát (sloučenina strukturního vzorce IX), (56,7 g, 100,9 mmolu) byl rozpuštěn v ethylacetátu (500 ml) (na čirý bezbarvý roztok) v jednohrdlé kulaté baňce (2 l) opatřené magnetickým míchadlem. Baňka pak byla umístěna do vodní lázně (teplota 10 °C až 20 °C) a skrz roztok byl po dobu 5 minut probubláván plynný chlorovodík (vzniká práškovitá sraženina). Po 1 h míchání (došlo k vysrážení velkého množství bílých krystalů) byl roztok probublán dusíkem, aby se odstranil přebytek chlorovodíku. Sraženina byla odfiltrována, promyta ethylacetátem (2 x 100 ml) a sušena přes noc za sníženého tlaku při teplotě 40 °C, čímž byl získán produkt, což je buď (3*R*)-(N,N',N'-trimethylhydrazid)-3-benzyl-piperidin-3-karboxylové kyseliny (sloučenina strukturního vzorce X) nebo (3*S*)-(N,N',N'-trimethylhydrazid)-3-benzyl-piperidin-3-karboxylové kyseliny (sloučenina strukturního vzorce XI), (37,0 g).

HPLC (h8):

Rt = 7,84 min.

Krok g

*Terc*-butyl-{(1*R*)-2-[(3*R*)-3-benzyl-3-(N,N',N'-trimethylhydrazinokarbonyl)piperidin-1-yl]-1-[(1*H*-indol-3-yl)methyl]-2-oxoethyl}karbamát (sloučenina strukturního vzorce XII) nebo *terc*-butyl-{(1*R*)-2-[(3*R*)-3-benzyl-3-(N,N',N'-trimethylhydrazinokarbonyl)piperidin-1-yl]-1-[(1*H*-indol-3-yl)methyl]-2-oxoethyl}karbamát (sloučenina strukturního vzorce XIII)



(XII)

nebo

(XIII)

Boc-D-Trp-OH (32,3 g, 106 mmolů) byl rozpuštěn v dimethylacetamidu (250 ml) v jednohrdlé kulaté baňce (500 ml) opatřené magnetickým míchadlem a probublávačkou na dusík. Roztok byl ochlazen na teplotu 0 °C až 5 °C a pak byl přidán 1-hydroxy-7-azabenzotriazol (14,4 g, 106 mmolů), hydrochlorid 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimidu (20,3 g, 106 mmolů) a *N*-methylmorfolin (11,6 ml, 106 mmolů). Po 20 minutách míchání při teplotě 0 °C až 5 °C, byl přidán produkt z kroku f, což je buď (3*R*)-(N,N',N'-trimethylhydrazid)-3-benzyl-piperidin-3-karboxylové kyseliny (sloučenina strukturního vzorce X) nebo (3*S*)-(N,N',N'-trimethylhydrazid)-3-benzyl-piperidin-3-karboxylové kyseliny (sloučenina strukturního vzorce XI), (37,0 g, 106 mmolů) a *N*-methylmorfolin (24,4 ml, 223 mmolů). Reakční směs pak byla míchána přes noc za laboratorní teploty. Pak byl přidán ethylacetát (750 ml) a výsledná směs byla promyta vodným roztokem hydrogensíranu sodného (300 ml, 10% roztok, vyjádřeno v procentech objemových). Vrstvy byly odděleny a vodná vrstva byla reextrahována ethylacetátem (500 ml). Spojené organické vrstvy byly promyty vodou (100 ml), vodným roztokem hydrogenuhlitanu sodného (300 ml, nasycený roztok), vodou (100 ml), nasyceným roztokem chloridu sodného (300 ml), vysušeny síranem hořečnatým, odfiltrovány a odpařeny za sníženého tlaku, čímž byl získán produkt, což je buď terc-butyl-[(1*R*)-2-[(3*R*)-3-benzyl-3-(N,N',N'-trimethylhydrazinokarbonyl)piperidin-1-yl]-1-[(1*H*-indol-3-yl)methyl]-2-

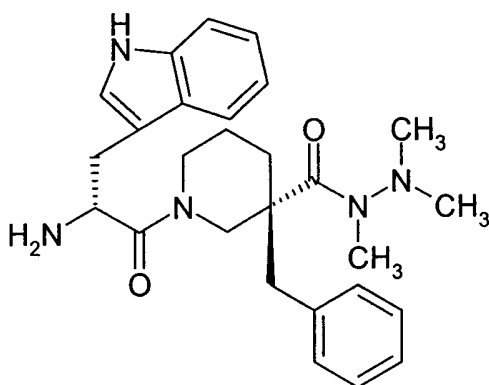
-oxoethyl}karbamát (sloučenina strukturního vzorce XII) nebo *tert*-butyl-{(1*R*)-2-[(3*R*)-3-benzyl-3-(*N,N,N'*-trimethylhydrazinokarbonyl)piperidin-1-yl]-1-[(1*H*-indol-3-yl)methyl]-2-oxoethyl}karbamát (sloučenina strukturního vzorce XIII), (56,7 g) ve formě oranžového oleje.

HPLC (h8): Rt = 14,61 min

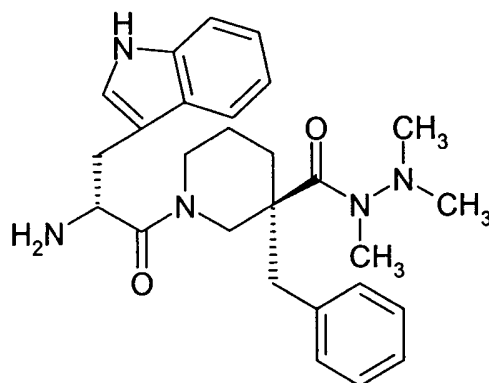
LC-MS: Rt = 7,35 min (m+1) = 562,6

#### Krok h

*N,N,N'*-trimethylhydrazid-1-[(2*R*)-2-amino-3-(1*H*-indol-3-yl)propionyl]- (3*R*)-3-benzylpiperidin-3-karboxylové kyseliny (sloučenina strukturního vzorce XIV) nebo *N,N,N'*-trimethylhydrazid-1-[(2*R*)-2-amino-3-(1*H*-indol-3-yl)propionyl]- (3*S*)-3-benzylpiperidin-3-karboxylové kyseliny (sloučenina strukturního vzorce XV)



(XIV)



(XV)

Produkt z kroku g, což je buď *tert*-butyl-{(1*R*)-2-[(3*R*)-3-benzyl-3-(*N,N,N'*-trimethylhydrazinokarbonyl)piperidin-1-yl]-1-[(1*H*-indol-3-yl)methyl]-2-oxoethyl}karbamát (sloučenina strukturního vzorce XII) nebo *tert*-butyl-{(1*R*)-2-[(3*R*)-3-benzyl-3-(*N,N,N'*-trimethylhydrazinokarbonyl)piperidin-1-yl]-1-[(1*H*-indol-3-yl)methyl]-2-oxoethyl}karbamát (sloučenina strukturního vzorce XIII), (56,7 g, 100,9 mmolu) byl rozpuštěn v ethylacetátu (500 ml) (na čirý bezbarvý roztok) v jednohrdlé kulaté baňce (2 l) opatřené magnetickým míchadlem. Baňka pak byla umístěna do vodní lázně (teplota 10 °C až 20 °C) a skrz

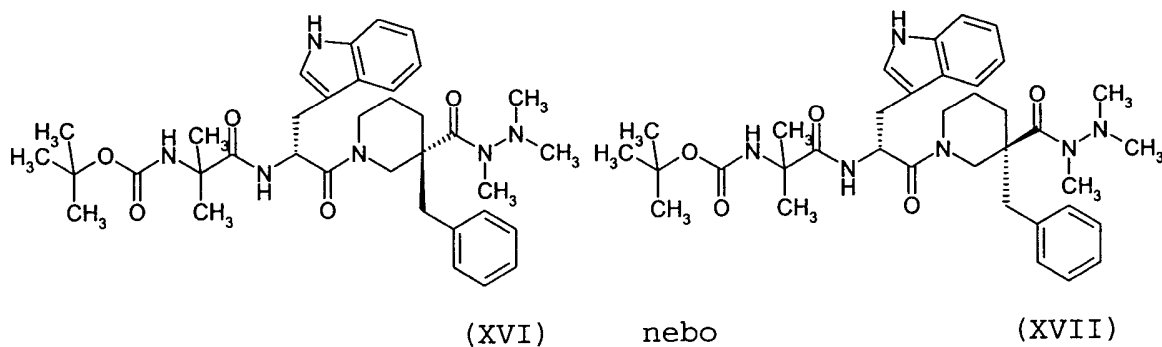
roztok byl po dobu 10 minut probubláván plynný chlorovodík (vzniká olej). Roztok byl probublán dusíkem, aby se odstranil přebytek chlorovodíku a pak byl oddělen olej od ethylacetátové vrstvy. Ethylacetátová vrstva byla vylita. Olej byl rozpuštěn ve vodě (500 ml) a dichlormethanu (1000 ml) a byl k němu přidáván pevný uhličitan sodný dokud se nedosáhlo pH vyššího než 7. Vrstvy byly odděleny a organická vrstva byla promyta vodou (100 ml), nasyceným roztokem chloridu sodného (100 ml), vysušena síranem hořečnatým, odfiltrována a odpařena za sníženého tlaku, čímž byl získán produkt, což je buď *N,N',N'*-trimethylhydrazid-1-[(2*R*)-2-amino-3-(1*H*-indol-3-yl)propionyl]-(3*R*)-3-benzylpiperidin-3-karboxylové kyseliny (sloučenina strukturního vzorce XIV) nebo *N,N',N'*-trimethylhydrazid-1-[(2*R*)-2-amino-3-(1*H*-indol-3-yl)propionyl]-(3*S*)-3-benzylpiperidin-3-karboxylové kyseliny (sloučenina strukturního vzorce XV), (27 g) ve formě oranžové pěny.

HPLC (h8):

Rt = 10,03 min.

Krok i

*Terc*-butyl-(1-{(1*R*)-2-[(3*R*)-3-benzyl-3-(*N,N',N'*-trimethylhydrazinokarbonyl)piperidin-1-yl]-1-(1*H*-indol-3-ylmethyl)-2-oxoethylkarbamoyl}-1-methylethyl)karbamát (sloučenina strukturního vzorce XVI) nebo *terc*-butyl-(1-{(1*R*)-2-[(3*S*)-3-benzyl-3-(*N,N',N'*-trimethylhydrazinokarbonyl)piperidin-1-yl]-1-(1*H*-indol-3-ylmethyl)-2-oxoethylkarbamoyl}-1-methylethyl)karbamát (sloučenina strukturního vzorce XVII)



Boc-D-Aib-OH (11,9 g, 58,4 mmolů) byl rozpuštěn v dimethylacetamidu (125 ml) v jednohrdlé kulaté baňce (500 ml) opatřené magnetickým míchadlem a probublávačkou na dusík. Do roztoku byl za laboratorní teploty za míchání přidán 1-hydroxy-7-azabenzotriazol (7,95 g, 58,4 mmolů), hydrochlorid 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimidu (11,2 g, 58,4 mmolů) a diisopropylethylamin (13,0 ml, 75,8 mmolů). Po 20 minutách (vznikla žlutá sraženina) byl přidán roztok produktu z kroku h, což je buď *N,N',N'*-trimethylhydrazid-1-[(2*R*)-2-amino-3-(1*H*-indol-3-yl)propionyl]-(3*R*)-3-benzyl-piperidin-3-karboxylové kyseliny (sloučenina strukturního vzorce XIV) nebo *N,N',N'*-trimethylhydrazid-1-[(2*R*)-2-amino-3-(1*H*-indol-3-yl)propionyl]-(3*S*)-3-benzyl-piperidin-3-karboxylové kyseliny (sloučenina strukturního vzorce XV), (27,0 g, 58,4 mmolů) v dimethylacetamidu (125 ml). Reakční směs pak byla míchána po dobu 3 hodin za laboratorní teploty. Pak byl přidán ethylacetát (750 ml) a výsledná směs byla promyta vodným roztokem hydrogensíranu sodného (300 ml, 10% roztok, vyjádřeno v procentech objemových). Vrstvy byly odděleny a vodná vrstva byla reextrahována ethylacetátem (500 ml). Spojené organické vrstvy byly promyty vodou (100 ml), vodným roztokem hydrogenuhlíčitanu sodného (300 ml, nasycený roztok), vodou (100 ml), nasyceným roztokem chloridu sodného (300 ml), vysušeny síranem hořečnatým, odfiltrovány a odpařeny za sníženého tlaku na objem 500 ml. Pak byl přidán silikagel (150 g) a zbylý ethylacetát byl odpařen za sníženého tlaku do formy suchého prášku, který byl nanesen na filtr se silikagelem (150 g). Po promytí heptanem (1 l) byla požadovaná sloučenina uvolněna ethylacetátem (2,5 l). Po odpaření za sníženého tlaku byl produkt, což je buď *tert*-butyl-(1-{(1*R*)-2-[(3*R*)-3-benzyl-3-(*N,N',N'*-trimethylhydrazinokarbonyl)-piperidin-1-yl]-1-(1*H*-indol-3-ylmethyl)-2-oxoethylkarbamoyl}-1-methylethyl)karbamát (sloučenina strukturního vzorce XVI) nebo *tert*-butyl-(1-{(1*R*)-2-[(3*S*)-3-benzyl-3-(*N,N',N'*-tri-

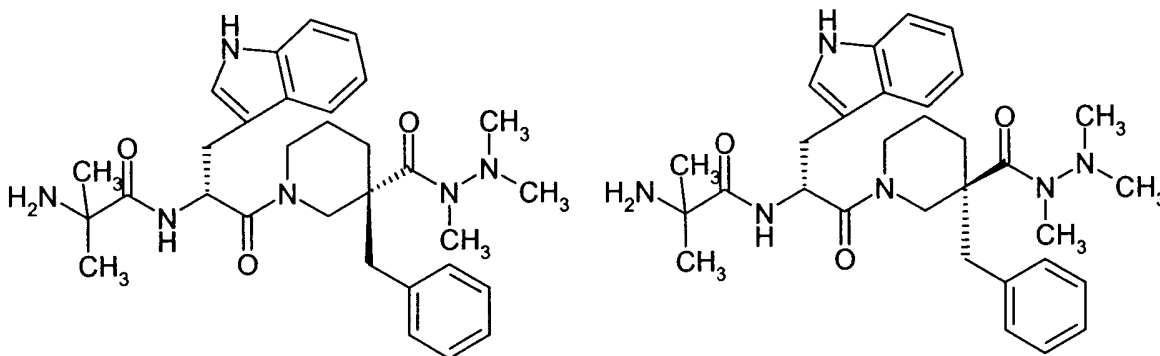
methylhydrazinokarbonyl)piperidin-1-yl]-1-(1*H*-indol-3-yl-methyl)-2-oxoethylkarbamoyl}-1-methylethyl)karbamát (sloučenina strukturního vzorce XVII).

HPLC (h8):

Rt = 14,05 min

Krok j

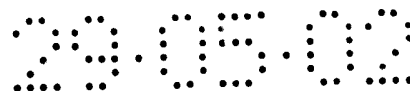
Fumarát 2-amino-*N*-[(1*R*)-2-[(3*R*)-3-benzyl-3-(*N,N',N'*-trimethylhydrazinokarbonyl)piperidin-1-yl]-1-(1*H*-indol-3-yl-methyl)-2-oxoethyl]-2-methylpropionamidu (sloučeniny strukturního vzorce I) nebo fumarát 2-amino-*N*-[(1*R*)-2-[(3*S*)-3-benzyl-3-(*N,N',N'*-trimethylhydrazinokarbonyl)piperidin-1-yl]-1-(1*H*-indol-3-ylmethyl)-2-oxoethyl]-2-methylpropionamidu (sloučeniny strukturního vzorce II)



(I) nebo

(II)

Produkt z kroku i, což je buď *tert*-butyl-(1-{(1*R*)-2-[(3*R*)-3-benzyl-3-(*N,N',N'*-trimethylhydrazinokarbonyl)-piperidin-1-yl]-1-(1*H*-indol-3-ylmethyl)-2-oxoethylkarbamoyl}-1-methylethyl)karbamát (sloučenina strukturního vzorce XVI) nebo *tert*-butyl-(1-{(1*R*)-2-[(3*S*)-3-benzyl-3-(*N,N',N'*-trimethylhydrazinokarbonyl)piperidin-1-yl]-1-(1*H*-indol-3-yl-methyl)-2-oxoethylkarbamoyl}-1-methylethyl)karbamát (sloučenina strukturního vzorce XVII), (23,8 g, 36,8 mmolu) byl rozpuštěn v ethylacetátu (800 ml) (na čirý žlutý roztok) v jednohrdlé kulaté baňce (1 l) opatřené magnetickým míchadlem. Baňka byla pak umístěna do vodní lázně (teplota 10 °C až 20 °C) a skrz roztok byl po dobu 5 minut probubláván plynný chlorovodík (vzniká práškovitá sraženina). Po 1 h



míchání (došlo k vysrážení velkého množství žlutého prášku) byl roztok probublán dusíkem, aby se odstranil přebytek chlorovodíku. Sraženina byla odfiltrována a sušena přes noc za sníženého tlaku při teplotě 40 °C.

Nekrystalická pevná látka byla rozpuštěna ve vodě (500 ml) a promyta ethylacetátem (100 ml). Pak byl přidán dichlormethan (1000 ml) a postupně byl přidáván pevný uhličitan sodný, dokud nebylo dosaženo pH vyššího než 7. Vrstvy byly odděleny a vodná vrstva byla reextrahována dichlormethanem (200 ml). Spojené organické vrstvy byly promyty nasyceným roztokem chloridu sodného (100 ml), vysušeny síranem hořečnatým a odfiltrovány. Rozpouštědlo bylo odpařeno za sníženého tlaku a odparek byl rozpuštěn v ethylacetátu (500 ml) v jednohrdlé kulaté baňce (1 l) opatřené magnetickým míchadlem. Pak byla pomalu během 5 minut přidána suspenze kyseliny fumarové (3,67 g) v isopropanolu (20 ml) a ethylacetát (50 ml), což vedlo ke sražení bílé krystalické soli. Po 1 hodině byla sraženina odfiltrována a vysušena za sníženého tlaku přes noc při teplotě 40 °C, čímž byla získána fumarátová sůl sloučeniny, která je buď 2-amino-*N*-[(1*R*)-2-[(3*R*)-3-benzyl-3-(*N,N',N'*-trimethylhydrazinokarbonyl)piperidin-1-yl]-1-(1*H*-indol-3-ylmethyl)-2-oxoethyl]-2-methylpropionamid (sloučenina strukturního vzorce I) nebo 2-amino-*N*-[(1*R*)-2-[(3*S*)-3-benzyl-3-(*N,N',N'*-trimethylhydrazinokarbonyl)piperidin-1-yl]-1-(1*H*-indol-3-ylmethyl)-2-oxoethyl]-2-methylpropionamid (sloučenina strukturního vzorce II), (13,9 g) ve formě bílého prášku.

HPLC (A1): Rt = 33,61 min

HPLC (B1): Rt = 34,62 min

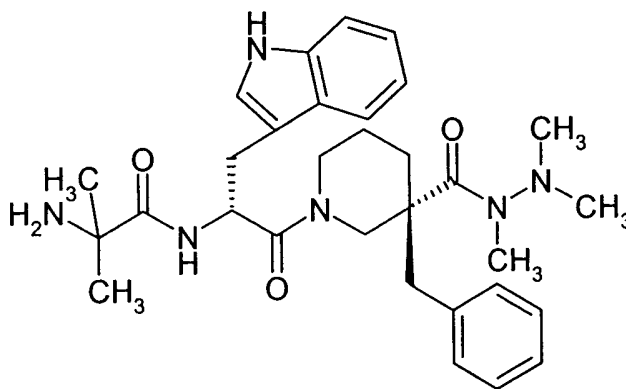
LC-MS: Rt = 5,09 min (m+1) = 547,4.

Průmyslová využitelnost

Sloučeniny podle předkládaného vynálezu jsou průmyslově využitelné pro výrobu léků.

1. Sloučenina, kterou lze získat postupem popsaným v příkladu 1, nebo její farmaceuticky přijatelná sůl.

2. Sloučenina, kterou lze získat postupem popsaným v příkladu 1, kdy se jedná o 2-amino-N-[(1R)-2-[(3R)-3-benzyl-3-(N,N',N'-trimethylhydrazinokarbonyl)piperidin-1-yl]-1-(1H-indol-3-yl-methyl)-2-oxoethyl]-2-methylpropionamid, sloučeninu strukturního vzorce I:



(I)

nebo její farmaceuticky přijatelnou sůl.

3. Farmaceutický prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje jako aktivní složku sloučeninu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 2 nebo její farmaceuticky přijatelnou sůl spolu s farmaceuticky přijatelným nosičem nebo ředidlem.

4. Farmaceutický prostředek podle nároku 3, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je určen pro stimulaci uvolňování růstového hormonu z hypofýzy.

5. Farmaceutický prostředek podle nároku 3 nebo nároku 4, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je určen pro podávání

zvířatům, aby se zvýšila rychlost a rozsah jejich přírůstků, zvýšila produkce mléka a vlny nebo pro léčení nemocí.

6. Způsob stimulace uvolňování růstového hormonu z hypofýzy savce, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje podávání účinného množství sloučeniny podle kteréhokoliv z nároků 1 nebo 2 nebo její farmaceuticky přijatelné soli nebo prostředku podle kteréhokoliv z nároků 3 až 5 tomuto savci.

7. Způsob zvýšení rychlosti a rozsahu přírůstků, zvýšení produkce mléka a vlny nebo léčení nemocí, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje podávání účinného množství sloučeniny podle kteréhokoliv z nároků 1 až 2 nebo její farmaceuticky přijatelné soli nebo prostředku podle kteréhokoliv z nároků 3 až 5 subjektu, který to potřebuje.

8. Použití sloučeniny podle kteréhokoliv z nároků 1 až 2 nebo její farmaceuticky přijatelné soli pro výrobu léku.

9. Použití podle nároku 8, kdy se jedná o lék pro stimulaci uvolňování růstového hormonu z hypofýzy savce.