

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

293 912

(13) Druh dokumentu:

B6

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **1998-3488**
 (22) Přihlášeno: **29.04.1997**
 (30) Právo přednosti: **01.05.1996 US 1996/16675**
 (40) Zveřejněno: **11.08.1999**
 (**Věstník č. 08/1999**)
 (47) Uděleno: **23.06.04**
 (24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **18.08.2004**
 (**Věstník č. 8/2004**)
 (86) PCT číslo: **PCT/US1997/007130**
 (87) PCT číslo zveřejnění: **WO 1997/041102**

(51) Int. Cl. :⁷

C 07 D 211/60
C 07 D 401/06
C 07 D 401/12
A 61 K 31/435

(73) Majitel patentu:

ORTHO-MCNEIL PHARMACEUTICAL, INC.,
Raritan, NJ, US

(72) Původce:

Costanzo Michael J., Ivyland, PA, US
Hoekstra William J., Villanova, PA, US
Maryanoff Bruce E., Forest Grove, PA, US

(74) Zástupce:

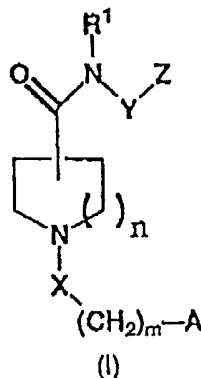
Čermák Karel Dr., Národní 32, Praha 1, 11000

(54) Název vynálezu:

Karboxamidový derivát pyrrolidinu, piperidinu
hexahydroazepinu, jeho použití a farmaceutická
kompozice na jeho bázi

(57) Anotace:

Karboxamidové deriváty pyrrolidinu, piperidinu a hexahydroazepinu obecného vzorce I, jejich použití jako léčiva a pro léčení trombotických poruch zprostředkovaných destičkami, jako je arteriální a venózní trombóza, akutní infarkt myokardu, nestabilní angína, reokluze následující trombolytickou terapií a angioplastikou, zápal a různé vazookluzivní poruchy a farmaceutické kompozice na jejich bázi.



CZ 293912 B6

Karboxamidový derivát pyrrolidinu, piperidinu hexahydroazepinu, jeho použití a farmaceutická kompozice na jeho bázi

5 Oblast techniky

Vynález se týká karboxamidových derivátů pyrrolidinu, piperidinu hexahydroazepinu, jejich použití a farmaceutických kompozic na jejich bázi. Tyto deriváty se hodí pro léčení trombotických poruch zprostředkovaných destičkami.

10

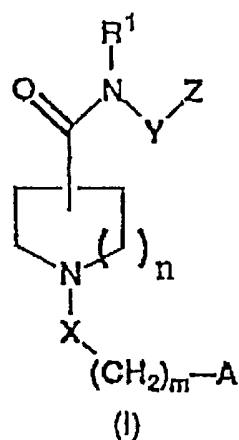
Dosavadní stav techniky

Agregace destiček tvoří počáteční hemostatickou odpověď za účelem snížení krvácení způsobeného vaskulárním poraněním. Patologické prodloužení tohoto normálního hemostatického procesu však může vést k tvorbě trombu. Závěrečnou obvyklou dráhou v agregaci destiček je navázání fibrinogenu k aktivovanému, odhalenému glykoproteinu IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) destiček. Prostředky, které přerušují navázání fibrinogenu ke GPIIb/IIIa, tedy inhibují agregaci destiček. Tyto prostředky jsou proto užitečné při léčení trombotických poruch zprostředkovaných destičkami, jako je arteriální a venózní trombóza, akutní infarkt myokardu, nestabilní angína, reokluze následující trombolytickou terapií a angioplastikou, zápal a různé vazookluzivní poruchy. Fibrinogenový receptor (GPIIb/IIIa) je aktivovaný stimuly, jako je ADP, kolagen a trombin, odhalujícími vázající se domény ke dvěma odlišným peptidovým oblastem fibrinogenu: α -řetězci Arg-Gly-Asp (RGD) γ -řetězci His-His-Leu-Gly-Gly-Ala-Lys-Gln-ala-Gly-Asp-Val (HHLGGAKQAGDV, γ 400-411). Protože tyto peptidové fragmenty samotné způsobovaly inhibici fibrinogenové vazby ke GPIIb/IIIa, mimetismus těchto fragmentů by sloužil také jako antagonist. Ve skutečnosti se před tímto vynálezem objevily silné antagonisty na bázi RGD, které inhibují jako vazbu fibrinogenu ke GPIIb/IIIa, tak agregaci destiček (například Ro-438857 má IC_{50} 0,094 μ M proti agregaci destiček *in vitro* způsobované trombinem). Některé z těchto prostředků projevily *in vivo* účinnost jako antitrombotická činidla a v některých případech se použily ve spojení s fibrinolytickou terapií, například t-Pa nebo streptokináza (J. A. Zablocki, *Current Pharmaceutical Design* 1995, 1, 533). Jak se demonstruje pomocí výsledků farmakologických studií popsaných dále, sloučeniny podle předloženého vynálezu projevují schopnost blokovat navázání fibrinogenu k izolovanému GP IIb/IIIa (0,0002 – 1,39 μ M IC_{50}), inhibovat agregaci destiček *in vitro* za přítomnosti různých stimulů destiček (0,019 – 65,0 μ M vs. trombin) a dále ještě inhibovat *ex vivo* agregaci destiček ve zvířecích modulech. Kromě toho tyto prostředky projevují účinnost ve zvířecích trombotických modelech, jak prokázali jejich původci („Nipecotic Acid Derivates As Intithrombotic Compounds“ – přihláška č. 08/213772, registrovaná 16. března 1994). Sloučeniny podle předloženého vynálezu projevují účinnost jako trombotické prostředky silou své schopnosti zabraňovat agregaci destiček. Kromě toho, protože sloučeniny podle tohoto vynálezu inhibují adhezi buňka-buňka nebo buňka-matrice zprostředkovanou integrinem, mohou být užitečné také proti zápalu, resorpci kostí, metastáze tumorových buněk atd. (D. Cox, *Drug News&Perspectives* 1995, 8, 197).

45

Podstata vynálezu

Předložený vynález se týká sloučenin následujícího obecného vzorce (I):

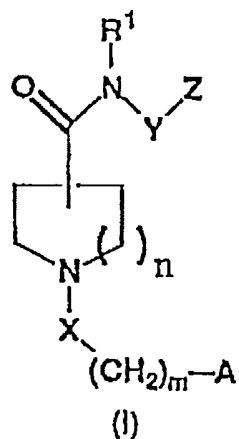


- 5 kde A, X, Y, Z, R¹, m a n jsou definovány dále. Tyto inhibitory agregace destiček jsou užitečné v léčbě trombotických poruch zprostředkovaných destičkami, jako je arteriální a venózní trombóza, akutní infarkt myokardu, nestabilní angína, reokluze následující trombolytickou terapií a angioplastiku, zápal a různé vazookluzivní poruchy. Tyto sloučeniny jsou užitečné také jako
 10 antitrombotická činidla použitá v souvislosti s fibrinolytickou terapií (například t-Pa nebo streptokináza). Farmaceutické kompozice obsahující takové sloučeniny jsou také součástí předloženého vynálezu.

Následuje podrobný popis vynálezu.

15

Vynález se týká zejména sloučenin následujícího vzorce (I):



kde

- 20 A je zvolen ze souboru zahrnujícího 2-piperidyl, 3-piperidyl, 4-piperidyl, 1-piperaziny, 2-pyrrolidinyl, 3-pyrrolidinyl a NHR²;
- R² je zvolen ze souboru zahrnujícího H, alkyl s 1 až 8 atomy uhlíku a acyl se 2 až 6 atomy uhlíku a přednostně znamená vodík;
- 25 m je celé číslo 1, 2 nebo 3 a přednostně znamená 1 nebo 2;

X je zvolen ze souboru zahrnujícího C(O), C(O)O, C(O)NH, CH₂ a SO₂;

n je celé číslo 1, 2 nebo 3;

5

R¹ je zvolen ze souboru zahrnujícího vodík a cykloalkyl s 5 až 8 atomy uhlíku;

Y je zvolen ze souboru zahrnujícího (CH₂)_p, CH(R³)(CH₂)_q, (CH₂)_qCH(R³), (CH(COR⁴)CH₂)_q,
 10 (CH₂)_pCHOH a 3-piperidinkarboxylovou kyselinu; s výhradou, že když Y je (CH₂)_p a p je
 2, x je jiný než C(O), nebo když X je C(O), potom buď R¹ je jiný než H, nebo R² je jiný než
 H, a s další výhradou, že když Y je (CH(CO₂R⁴)CH₂)_q, X je jiný než C(O) nebo CH₂;

p je 2 nebo 3;

15 q je 1, 2 nebo 3 a přednostně 1;

R³ je alkyl s 1 až 8 atomy uhlíku, alkenyl se 2 až 8 atomy uhlíku, alkinyl se 2 až 8 atomy uhlí-
 ku, fenyl, naftyl, fenylalkyl s 1 až 8 atomy uhlíku v alkylové části, naftylalkyl s 1 až 8 atomy
 20 uhlíku v alkylové části nebo heteroaryl, kterým může být pyridyl, thienyl, furyl nebo chino-
 yl;

R⁴ je vodík nebo alkyl s 1 až 8 atomy uhlíku nebo cykloalkyl s 5 až 8 atomy uhlíku a před-
 nostně znamená vodík;

25 Z je CO₂H, CO₂alkyl, SO₃H, PO₃H₂ nebo 5-tetrazol, přednostně CO₂H.

Přednostně je skupina C(O)N(R¹)YZ navázána ke kruhovému uhlíku centrálního azacyklu
 v poloze 3 nebo 4 (v poloze 4, když se jedná o více než pětičlenný kruh), a nejvýhodněji v polo-
 ze 3.

30

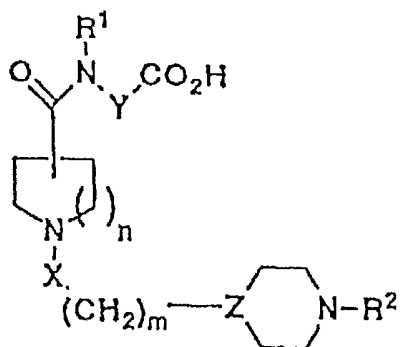
Jak se zde používá, pokud není uvedeno jinak, alkyl a alkoxy skupina, použité samotné nebo jako
 část substituované skupiny, zahrnují přímé nebo rozvětvené řetězce s 1 až 8 atomy uhlíku.
 Alkylové zbytky například zahrnují methyl, ethyl, propyl, izopropyl, n-butyl, izobutyl, sek.butyl,
 35 terc.butyl, n-pentyl, 3-(2-methyl)butyl, 2-pentyl, 2-methylbutyl, neopentyl, n-hexyl, 2-hexyl
 a 2-methylpentyl. Alkoxy skupiny jsou kyslíkaté ethery vytvořené z dříve popsáných alkylových
 skupin s přímým nebo rozvětveným řetězcem. Cykloalkylové skupiny obsahují 5 až 8 atomů
 uhlíku a přednostně 6 až 7 atomů uhlíku.

Sloučeniny podle předloženého vynálezu mohou existovat také ve formě farmaceuticky příja-
 40 telné soli. Farmaceuticky přijatelná sůl má obecně formu, ve které je dusík u 1-piperidonového
 (pyrrolidinového, piperazinového) substituentu protonová anorganickou nebo organickou kyseli-
 nou. Reprezentativní organické a anorganické kyseliny zahrnují kyselinu chlorovodíkovou, bro-
 movodíkovou, jodovodíkovou, chloristou, sírovou, dusičnou, fosforečnou, octovou, propionovou,
 glykolovou, mléčnou, jantarovou, maleinovou, fumarovou, jablečnou, vinnou, citronovou, ben-
 45 zoovou, mandlovou, methansulfonovou, hydroxyethansulfonovou, benzensulfonovou, šťavelo-
 vou, pamoovou, 2-naftalensulfonovou, p-toluensulfonovou, cyklohexansulfamovou, salicylovou,
 cukrovou nebo triflouroctovou.

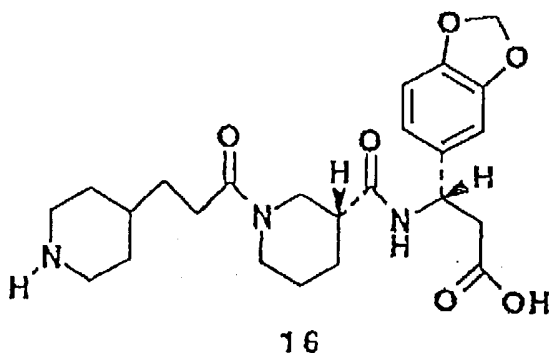
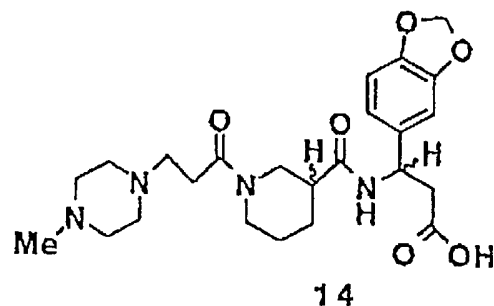
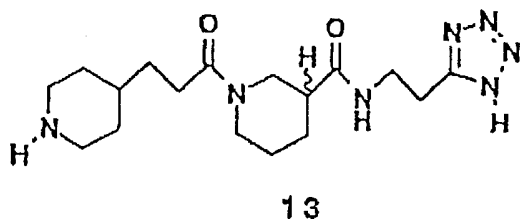
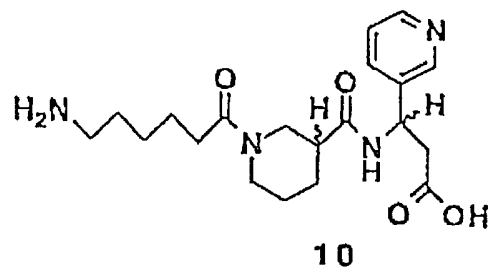
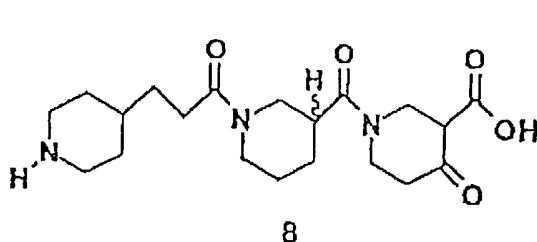
Obzvlášť přednostně sloučeniny podle předloženého vynálezu zahrnují sloučeniny uvedené
 50 v tabulce I, kde „Subst“ označuje polohu navázání skupiny C(O)N(R¹)YCO₂H k centrálnímu
 azacyklu a kde písmeno „R“ po číslici „3“ označuje absolutní konfiguraci (Cahnova-Ingoldova-
 Prelogova pravidla). Tyto číslice nemají žádnou konfiguraci, specifikovány jsou racemické
 směsi.

55

Tabulka 1



#	Subst	m	n	X	R^1	R^2	Y	Z
1	3	2	2	C(O)	H	H	CH(Ph)CH ₂	CH
2	3	1	2	NHCO	H	H	CH ₂ CHMe	CH
3	3	1	2	OC(O)	H	H	(<i>R</i>)-CH(CO ₂ Me)CH ₂	CH
4	3	2	1	C(O)	H	H	CH(4-Me-Ph)CH ₂	CH
5	4	2	2	C(O)	H	H	CH(Me)CH ₂	CH
6	4	2	2	C(O)	H	H	CH(4-CO ₂ H-Ph)CH ₂	CH
7	3	2	2	C(O)	H	Me	CH ₂ CH ₂	CH
8	Viz vzorec							
9	3	2	2	C(O)	H	H	CH(Me ₃ Si-ethinyl)CH ₂	CH
10	Viz vzorec							
11	3R	2	2	CO	H	H	CH ₂ CH(OH)	CH
12	3	2	2	SO ₂	H	H	CH ₂ CH ₂	CH
13	Viz vzorec							
14	3	2	2	CO	H	Me	CH(3,4-OCH ₂ O-Ph)CH ₂	N
15	3	2	2	CO	H	Me	CH(3-chinoly)CH ₂	N
16	3R	2	2	CO	H	H	<i>S</i> -CH(3,4-OCH ₂ O-Ph)CH ₂	CH
17	3	2	3	CO	H	H	CH(3-chinoly)CH ₂	CH
18	3R	2	2	CO	H	H	<i>S</i> -CH(3-chinoly)CH ₂	CH
19	3R	2	2	CO	H	H	<i>S</i> -CH(<i>t</i> -butylethinyl)CH ₂	CH
20	3	2	2	CH ₂	H	H	<i>S</i> -CH(3,4-OCH ₂ O-Ph)CH ₂	CH
21	3R	2	2	CO	H	h	<i>S</i> -CH(3-pyridyl)CH ₂	CH

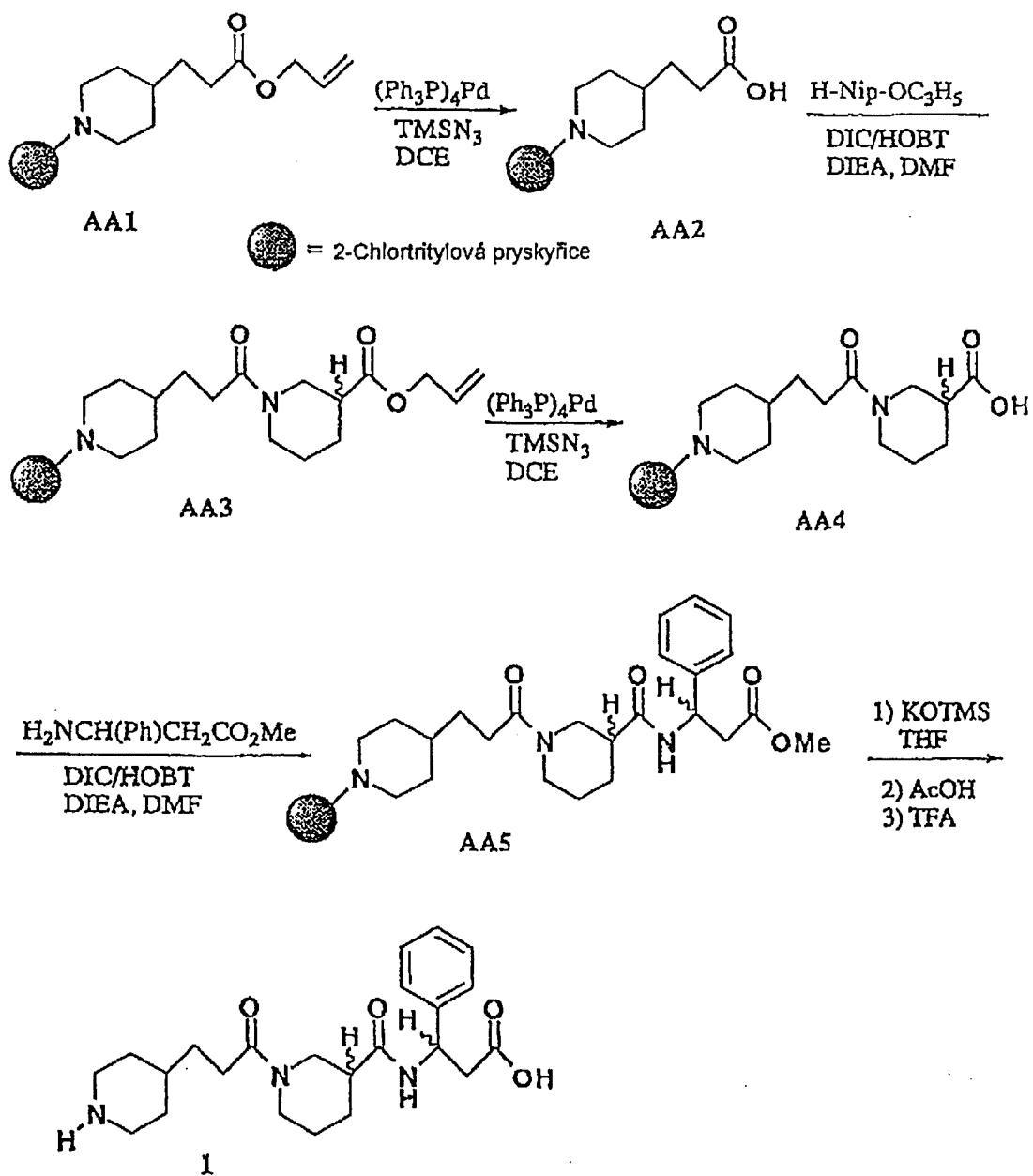


Sloučeniny podle vynálezu se mohou připravovat podle schématu AA. V tomto schématu se může allylesterem nipekotinové kyseliny (buď racemická směs, nebo oddělený enantiomer) působit na 4–piperidinpropionovu kyselinu vázanou k pryskyřici za přítomnosti DIC/HOBT a terciárního aminu. Allylester se potom odstraňuje pomocí katalýzy zprostředkované palladiem a řetězový kopulační proces pokračuje, aby se získal konečný produkt za zmýdelnění trimethylsilanolátem draselným (například sloučenina 1). Analogicky se připravily náhrady na bázi močoviny a urethanu pro terciární amid (sloučeniny 2 a 3) reakcí pevně uloženého aminu (alkoholu) s p–nitrofenylchlorformiátem a potom ethylnipekotinátem (S.M. Hutchins, *Tetrahedron Lett.* 1994, 35, 4055).

Trisubstituované meziprodukty esteru 3-aminopropionové kyseliny se připravily za použití modifikovaného Knoevenagelova postupu (schéma AG; E. Profft, *J. Prakt. Chem.* 1965, 30, 18) následovaným Fischerovou esterifikací produktu karboxylové kyseliny (pokud není komerčně dostupný). Tyto meziprodukty se připravily v enantiomericky obohacené formě pomocí penicilinamidázy štěpením racemických fenylacetamidů, jako je meziprodukt AG3 (V.A. Soloshonok, *Tetrahedron: Asymmetry*, 1965, 6, 1601). Nežádoucí R-enantiomer se hydrolyzuje pomocí amidázy, zatímco žádaný S-enantiomer si udrží fenylacetylovou skupinu. Ethyl-nipekotinát a ethyl-izonipekotinát jsou komerčně dostupnými meziprodukty. Ethyl-pyrrolidin-3-karboxylát se připravil, jak je publikováno (J. Saunders, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* 1988, 1618); ethyl-hexahydroazepin-3-karboxylát se připravit, jak je publikováno (H. Rapoport, *J. Org. Chem.* 1974, 39, 893).

- Piperazinové analogy se připravily, jak příkladně uvádí schéma AB, jak je publikováno (S. G. Gilbreath, *J. Am. Chem. Soc.* 1988, 110, 6172). Tetrazoly (13) se připravily z příslušných nitrilů za použití trimethylsilylazidu/dibutylstaniumoxidu, jak je publikováno (schéma AC; S. J. Wittenberger, *J. Org. Chem.* 1993, 58, 4139). Nitrilový prekurzor AC2 se připravil pomocí standardní kopulace amidovou vazbou s 3-aminopropionitrilem a redukoval v konečném stupni syntézy hydrogenací za použití oxidu platičitého (W. J. Hoekstra, *J. Med. Chem.* 1995, 38, 1582).
- N-Methylpiperidinové analogy se mohou připravit technikami peptidové syntézy v pevné fázi založené na Fmoc, jak znázorňuje schéma AD (P. Sieber, *Tetrahedron Lett.* 1987, 28, 6147). Chránicí skupiny Fmoc se odštěpily pomocí 20% piperidinu/DMF, kopulace se uskutečnily za použití DIC/HOBT/DMF a konečné produkty se odstranily z pryskyřice pomocí 59% TFA.
- Sulfonamid 12 se připravil tak, jak znázorňuje schéma AE. Meziprodukt AE1 se izoloval ve dvou stupních od 4-pyridinethansulfonové kyseliny pomocí hydrogenace/protektce, jak je popsáno (J. il DeGaw, *J. heterocyclic Chem.* 1966, 3, 90) a potom se chloroval thionylchloridem za použití standardních podmínek (P. J. Heasrt, *Org. Syn.* 1950, 30, 58) za získání AE2. Meziprodukt AE2 se potom převedl na konečný produkt standardní syntézou v roztoku (W. J. Hoekstra, *J. Med. Chem.* 199, 38, 1582).
- Piperidinpropyl-nipekotinamid 20 se připravil tak, jak znázorňuje schéma AF. Ster AF1 se bránil pomocí Boc za použití standardních podmínek Boc-ON (D. S., Tarbell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1972, 69, 730) a potom redukoval na svůj příslušný primární alkohol pomocí DIBAL/THF (E. Winterfeldt, *Synthesis* 1975, 617) za získání meziproduktu AF2. Tato sloučenina se přeměnila na svůj příslušný tosylát, AF3 za použití pTsCl (L. F. Awad, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1986, 59, 1587). Ethyl-nipekotinát se potom alkyloval meziproduktem AF3 za použití standardních podmínek (benzen/zahřívání); I. Seki, *Chem. Pharm. Bull. Jpn.* 1970, 18, 1104).
- Enantiomericky obohacený ethylester R-(–)-nipokotinové kyseliny se izoloval pomocí chirálního štěpení racemické látky jako příslušná sůl D-vinné kyseliny (A. m. Akkerman, *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas* 1951, 70, 899).

SCHÉMA AA



SCHEMA AB

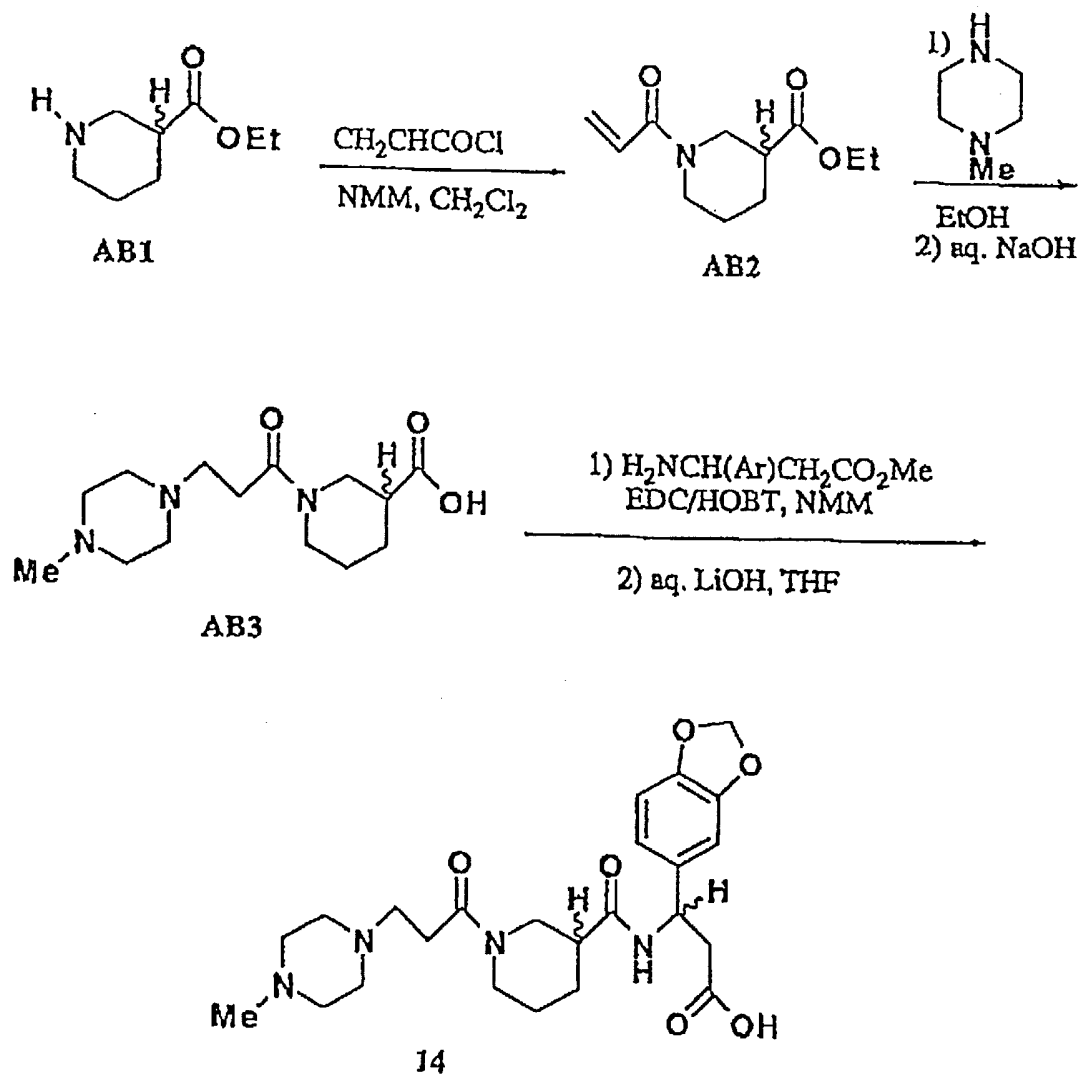


SCHÉMA AC

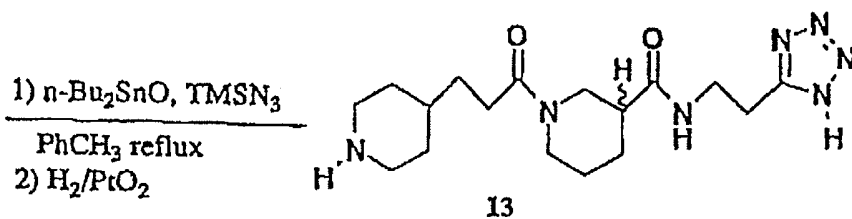
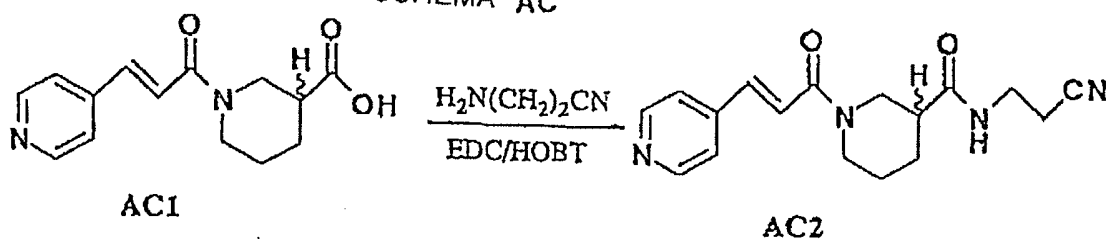
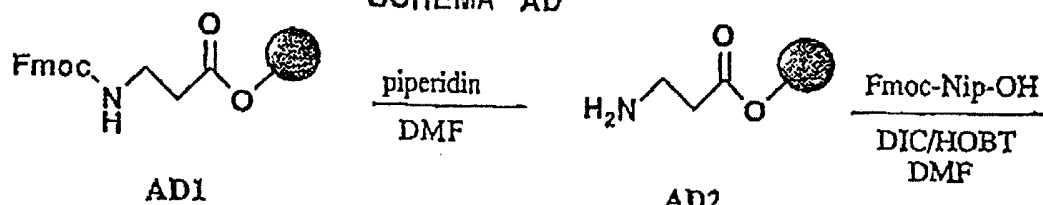
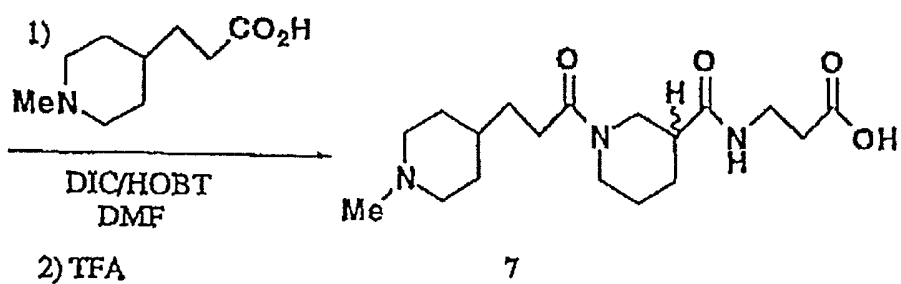
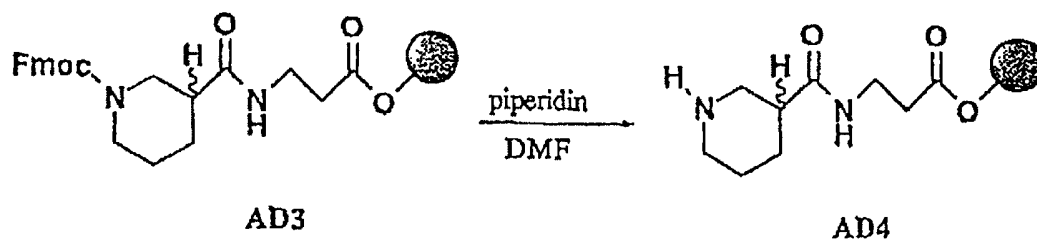


SCHÉMA AD



= Wangova pryskyfice



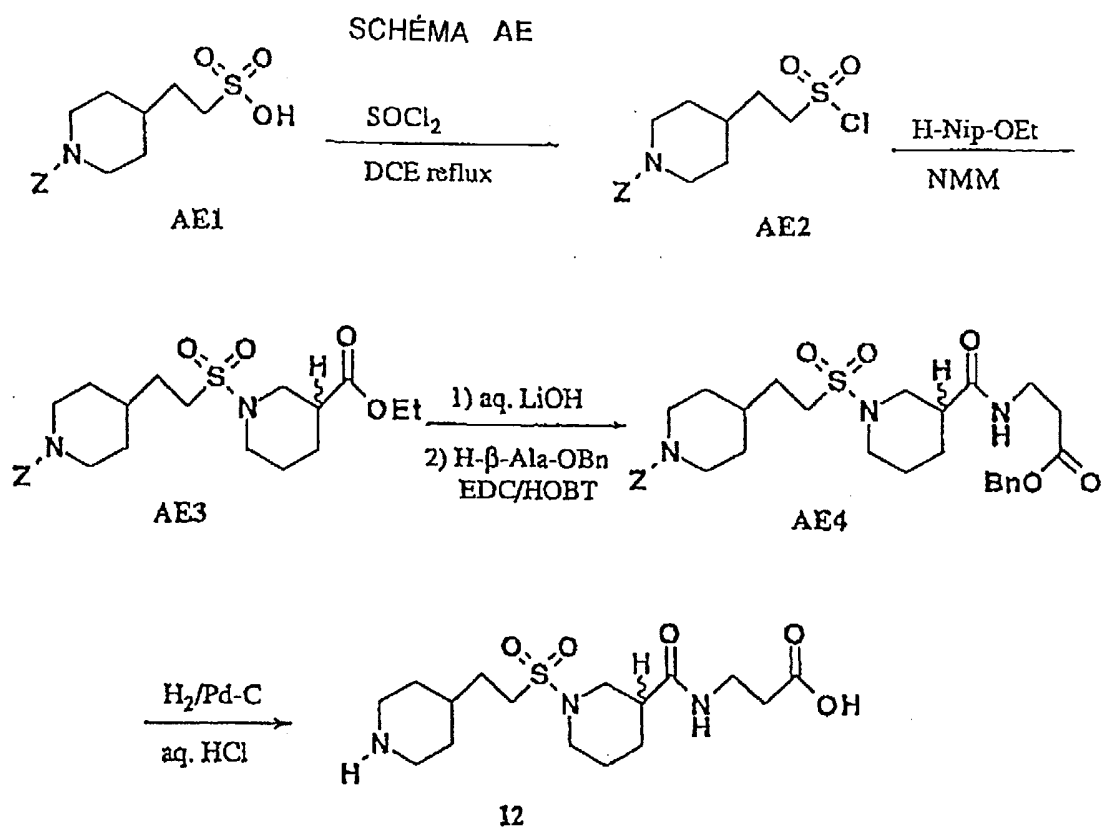
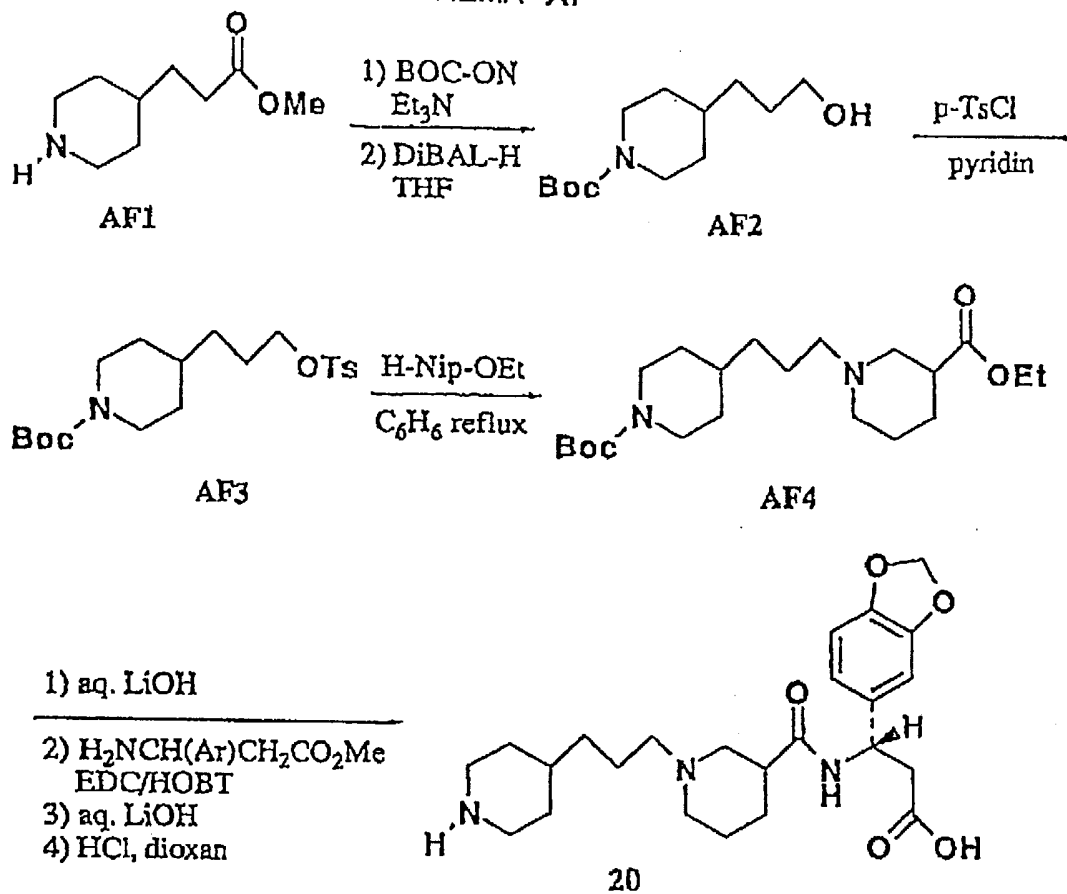
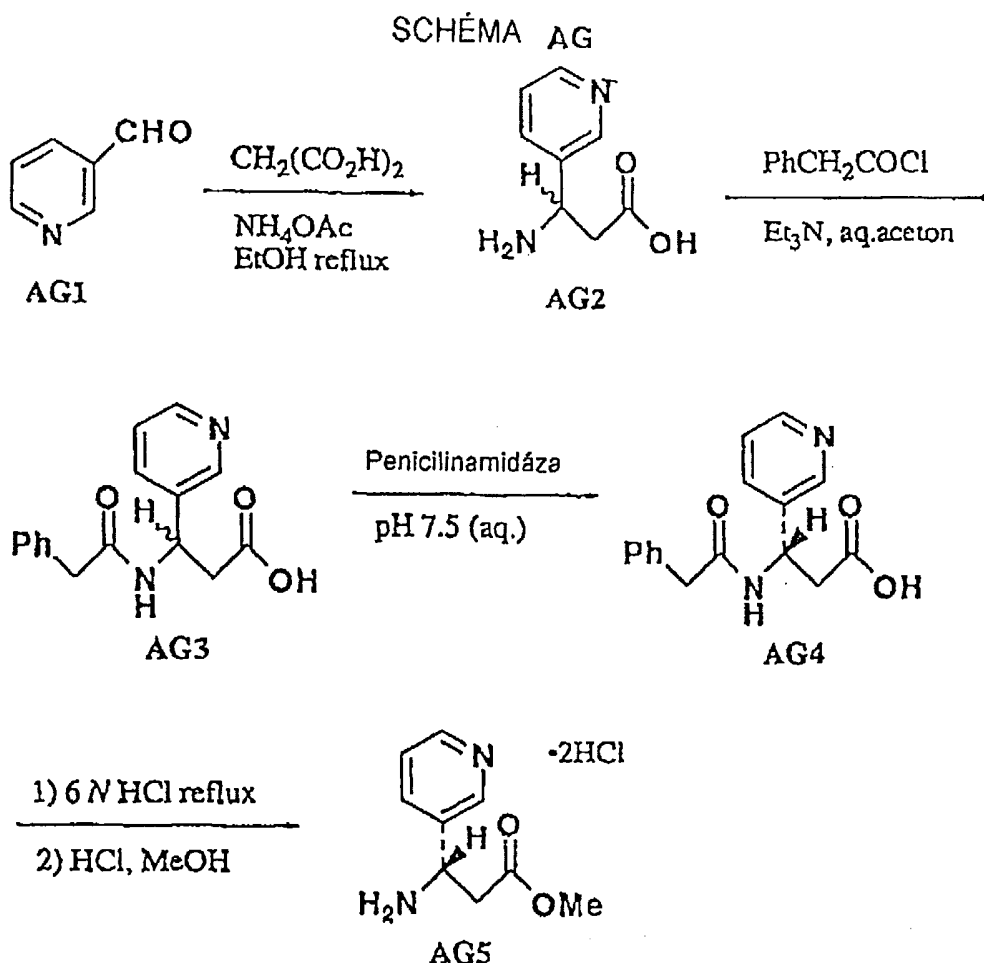


SCHÉMA AF





- Aby se připravily farmaceutické kompozice podle tohoto vynálezu, jedna nebo více sloučenin vzorce (I) podle vynálezu nebo jejich sůl se jako aktivní přísada dokonale promísí s farmaceutickým nosičem podle konvenčních farmaceutických technik míchání, přičemž nosič může mít formu rozličných typů v závislosti od formy přípravku žádoucího k podávání, například orální nebo parenterální, jako například intramuskulární. Při přípravě kompozic v orální dávkovací formě se může použít jakýchkoliv farmaceutických médií. Tedy vhodné nosiče a přísady pro kapalnou orální přípravky, jako například pro suspenze, elixíry a roztoky, zahrnují vodu, glykoly, oleje, alkoholy, aromatizační prostředky, konzervační prostředky, barviva apod.; vhodné nosiče a přísady pro pevné orální přípravky, jako jsou například prášky, kapsle, pilulky, želatinové kapsle a tablety, zahrnují škroby, cukry, ředidla, granulační prostředky, lubrikanty, pojiva, dezintegrační činidla apod. Tablety a kapsle představují pro snadnost jejich podávání pochopitelně nejvýhodnější orální dávkovací jednotkou formu, ve které se pevné farmaceutické nosiče používají. Pokud je to potřebné, tablety se mohou pomoci standardních postupů potáhnout cukrem nebo se mohou potáhnout entericky. Nosiče pro parenterální přípravky budou obvykle zahrnovat sterilní vodu, a mohou zahrnovat i jiné složky, například pro účely napomáhání rozpouštění nebo ke konzervaci. Mohou se připravit také injikovatelné suspenze, v kterých se mohou použít vhodné kapalnou nosiče, suspenzační činidla apod. Farmaceutické kompozice zde budou obsahovat na jednotkovou dávku, například tabletu, kapsli, prášek, injekci, obsah kávové lžičky a pod., množství aktivní složky nezbytné k dodání účinné dávky, jak se popisuje dále. Farmaceutické kompozice zde budou obsahovat na jednotkovou dávkovací jednotku, například tabletu, kapsli, prášek, injekci, čípek, obsah kávové lžičky a pod., od přibližně 0,03 mg do 100 mg/kg (přednostně 0,1 až 30 mg/kg) a mohou se podávat v dávce od přibližně 0,1 do 300 mg/kg/den (přednostně 1 až 50 mg/kg/den). Dávkování se však může měnit v závislosti na požadavku pacienta, závažnosti stavu, který se má léčit, a na použité sloučenině. Může se používat aplikace denního podávání nebo postperiodického dávkování.

Farmakologie

Sloučeniny podle předloženého vynálezu přerušují navázání fibrinogenu ke glykoproteinu I**Ib**/I**IIa** (GP I**Ib**/I**IIa**) destiček, a tím inhibují agregaci destiček. Takové sloučeniny jsou proto užitečné při léčbě trombotických poruch zprostředkovaných destičkami, jako je arteriální a venózní trombóza, akutní infarkt myokardu, reokluze následující trombolytickou terapií a angioplastikou a různé vazookluzivní poruchy. Protože závěrečnou obvyklou dráhou v normální agregaci destiček je navázání fibrinogenu k aktivovanému, odhalenému glykoproteinu GP I**Ib**/I**IIa**, inhibice tohoto navázání představuje přijatelný antitrombotický přístup. Receptor je aktivován stimuly, jako je ADP, kolagen a trombin, odhalujícími vázající se domény ke dvěma odlišným peptidovým oblastem fibrinogenu: α -řetězci Arg-Gly-Asp (RGD) a γ -řetězci 400–411. Jak se demonstruje pomocí výsledků farmakologických studií popsaných dále, sloučeniny podle předloženého vynálezu projevují schopnost blokovat navázání fibrinogenu k izolovanému GP I**Ib**/I**IIa** (IC_{50} 0,0002 – 1,39 μ M), inhibovat agregaci destiček *in vitro* za přítomnosti různých stimulů destiček (0,019 – 65,0 μ M vs. trombin) a dále ještě inhibovat *ex vivo* agregaci destiček ve zvířecích modelech.

Zkouška *in vitro* navázání purifikovaného glykoproteinu I**Ib**/I**IIa** v pevné fázi

Mikrotitrační plotna Immulon-2 o 96 jamkách (Dynatech-Immulon) se potáhne 50 μ l/jamka purifikovaného GP I**Ib**/I**IIa** s afinitou k RGD (účinný rozsah 0,5 až 10 μ g/ml) v 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM $MgCl_2$ při pH 7,4. Plotna se zakryje a inkubuje přes noc při 4 °C. Roztok GP I**Ib**/I**IIa** se odstraní a přidá se 150 μ l 5% BSA a inkubuje při teplotě místnosti 1 až 3 hodiny. Plotna se rozsáhle promyje modifikovaným tyrodeho pufrem. Přidá se biotinylovaný fibrinogen (25 μ l/jamka) s 2 x konečnou koncentrací do jamek, které obsahují testovanou sloučeninu (25 μ l/jamka). Plotna se přikryje a inkubuje 2 až 4 hodiny při teplotě místnosti. Dvacet minut před ukončením inkubace se za míchání přidá jedna kapka činidla A (kit křenové peroxidázy, Vecta Stain ABC, Vector Laboratories, Inc.) a jedna kapka činidla B k 5 ml modifikované směsi Tyrodeho pufru a nechá se stát. Roztok ligandu se odstraní a plotna se promyje modifikovaným Tyrodeho pufrem (5 x 200 μ l/jamka). Přidá se HRP-biotin-avidinové činidlo Vecta Stain (50 μ l/jamka, připraveno jak výše) a inkubuje při teplotě místnosti 15 minut. Roztok Vecta Stain se odstraní a jamky se promyjí modifikovaným Tyrodeho pufrem (5 x 200 μ l/jamka). Přidá se vyvíjecí pufr (10 ml 50mM citrátového/fosfátového pufru @ pH 5,3, 6 mg o-fenylendiaminu, 6 μ l 30% H_2O_2 ; 50 μ l/jamka) a inkubuje při teplotě místnosti 3 až 5 minut a potom se přidá 2N H_2SO_4 (50 μ l/jamka). Absorbance se odečte při 490 nm. Výsledky jsou uvedeny v tabulce II.

Zkouška *in vitro* inhibice agregace, vyvolané trombinem, přes gel filtrovaných destiček

Procenta agregace destiček se vypočítají jako zvýšení průchodu světla koncentráту destiček zpracované sloučeninou proti koncentráту destiček zpracované kontrolou. Lidská krev se získá od normálních dárců, kteří nepoužívají léky, do zkumavek obsahujících 0,13 M citrátu sodného. Plazma bohatá na destičky (PRP) se shromáždí centrifugací čisté krve při 200 x g v průběhu 10 minut při 25 °C. PRP (5 ml) se podrobí gelové filtraci přes Sepharose 2B (objem vrstvy 50 ml) a počet destiček se nastaví na 2×10^7 destiček na vzorek. Do křemíkové kyvety se přidají následující složky: koncentrovaný filtrát destiček a Tyrodeho pufr (0,14 M NaCl, 0,0027 M KCl, 0,012M $NaHCO_3$, 0,76 mM Na_2HPO_4 , 0,0055 M glukózy, 2 mg/ml BSA a 5,0 mM HEPES @ pH 7,4) v množství rovnajícím se 350 μ l, 50 μ l 20 mM kalcia a 50 μ l zkoušené sloučeniny. Agregace se monitoruje v agregometru BIODATA 3 minuty po adici agonisty (50 μ l trombinu, 1 jednotka/ml). Výsledky jsou uvedeny v tabulce II.

Tabulka II

Výsledky *in vitro*

Sloučenina #	Navázání fibrinogenu		Agregace destiček*	
	% Inh. (50 μ M)	IC ₅₀ (μ M)	% Inh. (50 μ M)	IC ₅₀ (μ M)
1	95,0 %	0,003	83,0 %	3,6
2	93,0 %	0,027	95,7 %	54,0
3	81,0 %	–	26,2 %	> 100
4	89,9 %	0,121	81,0 %	26,0
5	89,0 %	0,012	100 %	10,0
6	90,7	0,197	71,2 %	73,0
7	100 %	0,006	75,6 %	2,4
8	93,0 %	0,332	94,8 %	65,0
9	99,0 %	0,002	90,9 %	0,37
10	91,3	0,019	85,0 %	1,6
11	79,6 %	0,004	99,2 %	1,55
12	97,0 %	0,025	88,0 %	15,5
13	95,0 %	1,39	67,0 %	25,5
14	99,0 %	0,004	91,0 %	0,91
15	100 %	0,0091	92,2 %	1,9
16	100 %	0,0005	94,0 %	0,028
17	96,0 %	0,005	89,6 %	0,45
18	100 %	0,0002	100 %	0,019
19	99,0 %	0,021	92,1 %	0,079
20	99,0 %	0,0007	89,7 %	37,0
21	100 %	0,0005	100 %	0,060

5

* Trombinem vyvolaná agregace destiček filtrovaných přes gel

Ex vivo studie na psech

- 10 Dospělí psi smíšené rasy (8 až 13 kg) se anestetizovali pentabarbitalem sodným (35 mg/kg, i.v.) a uměle respirovali. Arteriální krevní tlak a srdeční frekvence se měřily za použití Millarova tlakového transduktoru na špičce katétru vloženého ve femorální arterii. Druhý Millarův transduktor se krkavicí umístil v levé komoře (LV) za účelem měření diastolického tlaku na konci LV a indexů kontraktility myokardu. Elektrokardiogram svodu II byl zaznamenávám z končetinových elektrod. Katétry se umístily do femorální arterie a vény za účelem odebrání vzorků krve
- 15 a podání léků, a to jednotlivě. Odpovědi se kontinuálně monitorovaly za použití systému pro sběr dat Modular Instruments.

- 20 Vzorky arteriální krve (5 až 9 ml) se odebraly do zkumavek obsahujících 3,8% citrát sodný za účelem přípravy plazmy bohaté na destičky (PRP) a stanovení účinků parametrů koagulace: doba protrombinu (PT) a doba aktivovaného částečného tromboplastinu (APTT). Oddělené krevní vzorky (1,5 ml) se zavedly do EDTA za účelem stanovení hematokritu a počtu buněk (destičky, RBC a bílé krvinky). Vzorové doby krvácení se získaly z bukálního povrchu za použití symplaťového incizního zařízení a Whatmanova filtračního papíru.

25

Agregace PRP se prováděla za použití agregometru BioData. Při agregaci čisté krve se používal impedační agregometr Chronolog. PT a APTT se stanovily pomocí BioData, nebo pomocí koagulačního analyzátoru ACL 3000+. Buňky se počítaly pomocí Sysmex K-1000.

- 30 Sloučeniny se rozpustily v malém objemu dimethylformamidu (DMF) a zředily fyziologickým roztokem na výslednou koncentraci 10 % DFM. Sloučeniny se podávaly intravenózně pomocí infuzní pumpy Harvard. Dávky se podávaly v 15-minutovém intervalu konstantní rychlostí

0,33 ml/min. Data se získávala po každé dávce a v 30-minutových intervalech po ukončení podání léku. Orální dávky se podávaly jako vhodné roztoky injekční stříkačkou.

5 Sloučeniny způsobovaly výraznou inhibici *ex vivo* odpovědí agregace destiček. Tedy v čisté krvi sloučeniny inhibovaly agregaci stimulovanou kolagenem (nebo ADP) v dávkách 0,1 až 10 mg/kg s výraznou inhibicí kolagenem stimulovaného uvolnění ATP destičkami. V PRP tedy sloučeniny inhibovaly kolagenem stimulovanou agregaci destiček s výraznou aktivitou při 0,1 až 10 mg/kg. Sloučeniny neměly měřitelný hemodynamický účinek v dávkách od 1 mg/kg i.v. Léky způsobovaly zvýšení vzorové doby krvácení při 0,1 až 1 mg/kg s rychlým vyléčením po léčbě. V průběhu 10 léčení se nepozorovaly žádné účinky na koagulaci (PT nebo APTT) a počty destiček, bílých krvinek a RBC se nezměnily při jakékoliv dávce sloučenin.

Výsledky ukazují, že sloučeniny jsou všeobecně účinnými inhibitory agregace destiček *ex vivo* (antagonizující jak dráhu kolagenu, tak dráhu ADP) po i.v. podání dávek v rozmezí od 0,1 až 15 1 mg/kg nebo 1 až 10 mg/kg orálně (tabulka III). Antiagregační účinky jsou doprovázeny zvýšením doby krvácení při vysokých dávkách. Žádné jiné hemodynamické nebo hematologické účinky se nepozorovaly.

20 Tabulka III

Výsledky *ex vivo* studie na psech

Sloučenina #	Intravenózní dávkování		Orální dávkování	
	Dávka	Trvání*	Dávka	Trvání*
15	1 mg/kg	30 min	10 mg/kg	120 min
16	0,1 mg/kg	60 min	1 mg/kg	60 min
16			3 mg/kg	> 180 min
18	0,1 mg/kg	30 min	1 mg/kg	150 min
19	1 mg/kg	30 min	10 mg/kg	90 min
21	0,3 mg/kg	150 min	1 mg/kg	180 min

25 * Indikuje trvání > 50% inhibice agregace destiček vyvolané kolagenem nebo ADP *ex vivo*

Sloučeniny 16 a 18 projevily účinnost v spím arteriovenózním modelu trombózy s umělou cévkou v způsobu závislém na dávce (metoda v „Nipectic Acid Derivates As Antithrombotic Compounds“, přihláška č. 08/213772, registrovaná 16. března 1994). Například sloučenina 16 inhibuje tvorbu trombu při 10, 30 a 100 µg/kg/min kumulovaných dávek i.v. infuzí (75 %, 37 %, 12 % 30 hmotnosti trombu vs. kontrolní vehikulum). Sloučenina 18 inhibuje tvorbu trombu při 3, 10 a 30 µg/kg/min kumulovaných dávek i.v. infuzí (82 %, 41 %, 12 % hmotnosti trombu vs. kontrolní vehikulum).

35 Příklady provedení vynálezu

Chráněné aminokyseliny se zakoupily od Aldrich Chemical nebo Bachem Bioscience Inc. 2-Chlortritylová pryskyřice a Wangova pryskyřice se získaly od Novabiochem Corp. Enantiomericky obohacené ethylestery cykloalkyliden-3-karboxylových kyselin se izolovaly pomocí 40 chirálního štěpení racemického materiálu, jak se publikuje (A. M. Akkerman, *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas* 1951, 70, 899). Všechny ostatní chemikálie se zakoupily od Aldrich Chemical Company, Inc. Vlastní ¹H NMR spektra se zaznamenávala pomocí spektrometru Bruker AC-360 při 360 MHz a vazební konstanty se udávaly v Hz. Teploty tání se určily pomocí zařízení pro stanovení teploty tání Mel-Temp II a nejsou korigovány. Mikroanalýzy se prováděly v Robertson 45 Microlit Laboratories, Inc., Madison, New Jersey. V příkladech a v celé této přihlášce mají následující zkratky dále uvedené významy.

	Bn nebo Bzl	= benzyl
	Boc	= <i>tert.</i> butoxykarbonyl
	BOP.Cl	= bis (2-oxo-3-oxazolidinyl)fosfinchlorid
5	SL	= sloučenina
	DCE	= 1,2-dichlorethan
	DCM	= dichlormethan
	DIC	= diizopropylkarbodiimid
	DIEA	= diizopropylethylamin
10	DMF	= N,N-dimethylformamid
	EDC	= ethyl-dimethylaminopropylkarbodiimid
	EDTA	= ethylendiamintetraoctová kyselina
	Et ₂ O	= diethylether
	HOBT	= hydroxybenzotriazol
15	i-Pr	= izopropyl
	NMM	= N-methylmorpholin
	Nip	= nipekotinoyl (hexahydronikotinoyl), (pokud není uvedeno jinak, racemický v poloze 3)
	PTSA	= <i>p</i> -toluensulfonová kyselina
20	TFA	= trifluoroctová kyselina
	Z	= benzyloxykarbonyl

Allyl-3-(4-piperidin)propionát.HCl (prekurzor AA1)

25 Ke směsi 3-(4-pyridin)akrylové kyseliny (10,0 g, 0,066 mol) a vodného roztoku HCl (2,0 N, 50 ml) pod atmosférou dusíku se přidal oxid platičitý (0,54 g). Tato směs se hydrogenovala při 344,74 kPa a teplotě místnosti 21 hodin, přefiltrovala přes celit a odpařila za účelem získání 3-(4-piperidyl)propionátu. HCl jako bílého prášku (12,9 g, 99 %). Tento prášek se nechal reagovat s allylalkoholem (50 ml) a zahříval při 50 °C 2 hodiny. Roztok se ochladil na teplotu místnosti, odpařil na objem přibližně 10 ml a zředil diethyletherem (250 ml). Výsledná sraženina se shromáždila a promyla diethyletherem za poskytnutí bílého prášku (14,5 g, 94 %):

35 ¹H NMR (DMSO-d₆) δ 8,7–9,1 (m, 2H), 5,9 (m, 1H), 5,25 (dd, J = 7, 15, 2 H), 4,53 (d, J = 4,2 H), 3,21 (d, J = 8,2 H), 2,74 (t, J = 7,2 H), 2,35 (t, J = 4, 2 H), 1,72 (d, J = 8, 2 H), 1,5 (m, 3 H), 1,3 (m, 2 H), MS m/e 198 (MH⁺).

Methyl-(S)-3-amino-3-(3-pyridyl)propionát.2HCl (AG5)

40 Fenylacetamidový meziprodukt AG3 se připravil za použití standardních způsobů, jak se znázorňuje ve schématu AG (E. Profft, *J. Prakt. Chem.* 1965, 30, 18). Roztok sloučeniny AG3 (0,225 mol) ve vodě (600 ml) se při teplotě místnosti zastavil na pH 7,5 za použití KOH (3,0 N) a nechal reagovat s penicilinamidázou (91520 jednotek, Sigma). Tato směs se míchala 47 hodin, okyselila na pH 1 pomocí HCl (konc.) a výsledná sraženina se přefiltrovala přes celatom FW-14. Filtrát se extrahoval Et₂O (3 x 300 ml), zkoncentroval ve vakuu a nechal zreagovat s MeOH/konc. NH₄OH (9:1). Roztok obsahující produkt se přečistil chromatografií na silikagelu (eluent DCM/MeOH/NH₄OH, 78:18:4) za vzniku amonné soli (S)-3-fenylacetamido-3-(3-pyridyl)propionové kyseliny (19,5 g, 58 %). Tento produkt se nechal reagovat s HCl (6,0 N, 292 ml), zahříval při refluxu 5 hodin, ochladil na teplotu místnosti a extrahoval Et₂O (3 x 200 ml). Vodná vrstva se upravila na pH 12, zkoncentrovala ve vakuu a výsledná pevná látka se triturovala s MeOH (2 x 300 ml). Roztok se odpařil za vzniku asi 14 g sodné soli. Tato látka se nechala reagovat s MeOH (500 ml), 2,2-dimethoxypropanem (44 ml) a HCl (4 N v dioxanu, 84 ml) a míchala 90 hodin při teplotě místnosti. Směs se přefiltrovala a filtrát se zkoncentroval ve vakuu. Výsledná šedobílá pevná látka se triturovala s Et₂O (2 x 150 ml) a vysušila za vzniku sloučeniny AG5 (16,7 g, 96 %, přesně) jako bílé amorfnní pevné látky.

55

Příklad 1

N-3-(4-Piperidinpropionyl)nipekotinoyl-(3-amino-3-fenyl)-propionová kyselina.TFA
(SL # 1)

Sintrovaná skleněná nádoba o objemu 25 ml se pod dusíkem naplnila 2-chlortrityllovou pryskyřicí (0,24 g, 0,36 mmol, Novabiochem) a DMF (5 ml). Pryskyřice se třepala s dusíkem 5 minut, aby nabobtnala a odstranil se DMF. Pryskyřice se postupně nechala zreagovat s DMF (5 ml), DIEA (0,31 ml, 5 ekv.) a allyl-3-(4-piperidin)propionát.HCl (0,20 g, 2,4 ekv.) a 8 hodin třepala. Výsledný tmavozelený roztok se odstranil a pryskyřice se promyla DMF (3 x 5 ml), vodný roztok DMF (25%, 3 x 5 ml), THF (3 x 5 ml), DCM (3 x 5 ml) a Et₂O (5 ml). Pryskyřice nabobtnala s DCE (5 ml) a nechala reagovat se směsí tetrabutylamoniumfluoridhydrátu (0,28 g, 3 ekv.), trimethylsilylazidu (0,38 ml 10 ekv.), tetrakis(trifenylfosfin)palladia (0,084 g, 0,20 mol %) a DCE (5 ml). Pryskyřice se 15 hodin třepala a odstranil se oranžový roztok. Pryskyřice se promyla DCM (3 x 5 ml), DMF (3 x 5 ml), THF (3 x 5 ml) a Et₂O (5 ml). Pryskyřice nabobtnala pomocí DMF (5 ml) a nechala zreagovat s DIEA (0,18 ml, 3 ekv.), allylnipekotinátem.HCl (0,17 g, 3 ekv.), DIC (0,17 ml, 3 ekv.) a HOBt (1 mg). Pryskyřice se třepala 15 hodin a potom se odstranil reakční roztok. Pryskyřice se promyla DMF (3 x 5 ml), vodným roztokem DMF (25%, 3 x 5 ml), THF (3 x 5 ml), DCM (3 x 5 ml) a Et₂O (5 ml). Pryskyřice nabobtnala pomocí DCE (5 ml) a nechala reagovat se směsí tetrabutylamoniumfluoridhydrátu (0,28 g, 3 ekv.), trimethylsilylazidu (0,38 ml, 10 ekv.), tetrakis(trifenylfosfin)palladia (0,084 g, 0,20 mol %) a DCE (5 ml). Pryskyřice se 15 hodin třepala a odstranil se oranžový roztok. Pryskyřice se promyla DCM (3 x 5 ml), DMF (3 x 5 ml), THF (3 x 5 ml) a Et₂O (5 ml). Pryskyřice nabobtnala pomocí DMF (5 ml) a nechala zreagovat s DIEA (0,18 ml, 3 ekv.), methyl-D,L-3-amino-3-fenylpropionát.HCl (0,23 g, 3 ekv.), DIC (0,17 ml, 3 ekv.) a HOBt (1 mg). Pryskyřice se třepala 17 hodin a potom se odstranil reakční roztok. Pryskyřice se promyla DMF (3 x 5 ml), vodným roztokem DMF (25%, 3 x 5 ml), THF (3 x 5 ml), DCM (3 x 5 ml) a Et₂O (5 ml). Pryskyřice nabobtnala pomocí THF (5 ml) a nechala zreagovat s roztokem trimethylsilanolátu draselného (0,23 g, 10 ekv.) a THF (2 ml). Pryskyřice se třepala 18 hodin a potom se odstranil reakční roztok. Pryskyřice se promyla DMF (3 x 5 ml), kyselinou octovou/THF (1:1, dvakrát), vodným roztokem DMF (25%, 3 x 5 ml), THF (3 x 5 ml), DCM (3 x 5 ml) a Et₂O (5 ml). Pryskyřice se nechala reagovat s TFA/DCM (1:1, 10 ml), třepala 15 minut a shromáždil se výsledný červený roztok. Tento roztok se odpařil a výsledný olej se trituroval s Et₂O (3 x 5 ml) a vysušil za poskytnutí sloučeniny 1 jako čirého skla (0,11 g):

¹H NMR (DMSO-d₆) δ 8,6 (m, 1H), 8,42 (d, J = 7, 1 H), 8,2 (m, 1H), 7,3 (m, 3 H), 7,2 (m, 2 H), 5,18 (d, J = 6, 1 H), 4,3 (m, 1H), 3,7 (m, 1 H), 3,2 (m, 3 H), 2,8 (m, 2 H), 2,6 (m, 2 H), 2,3 (m, 5 H), 1,1-1,9 (m, 11 H); MS m/e 416 (MH⁺).

Za použití stejného všeobecného postupu syntézy pevné fáze jako v příkladu 1, se připravily sloučeniny z příkladů 2 až 21 podle reakčního schématu uvedeného v jednotlivých příkladech.

Příklad 2

N-3-(4-Piperidinmethylaminokarbonyl)nipekotinoyl-(3-amino-2-methyl)propionová kyselina.TFA (SL # 2)

Sloučenina 2, připravená podle schématu AA, se izolovala jako čiré sklo:

¹H NMR (CD₃OD) δ 3,9 (m, 2H), 3,2 (m, 4H), 4,10 (d, J = 7, 2 H), 2,9 (m, 3H), 2,6 (m, 2 H), 2,3 (m, 1 H), 1,9 (m, 4 H), 1,7-1,9 (m, 5 H), 1,3-1,5 (m, 5 H), 1,11 (d, J = 7,3 H); MS m/e 355 (MH⁺).

Příklad 3

5 α -methylester N-3-(4-piperidinmethyloxykarbonyl)nipekotinoyl-D-asparagové kyseliny.TFA (SL # 3)

Sloučenina 3, připravená podle schématu AA, se izolovala jako žluté sklo:

10 $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD) δ 4,8 (m, 2 H), 3,9 (m, 3 H), 3,70 (d, $J = 9,4$ H), 3,39 (s, 3 H), 3,3 (m, 2 H), 2,9 (m, 4 H), 2,8 (m, 2H), 1,9 (m, 4 H), 1,7 (m, 2 H), 1,4 (m, 4 H); MS m/e 400 (MH $^+$).

Příklad 4

15 N-3-(4-Piperidinpropionyl)pyrolidin-3-karbonyl-[3-amino-3-(4-tolyl)]propionová kyselina.TFA (SL # 4)

Sloučenina 4, připravená podle schématu AA, se izolovala jako čiré sklo:

20 $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD) δ 7,19 (d, $J = 5,2$ H), 7,10 (d, $J = 5, 2$ H), 5,31 (dd, $J = 3, 10; 1$ H), 3,6 (m, 4 H), 3,3 (m, 2 H), 2,9 (m, 4 H), 2,7 (m, 2 H), 2,3 (m, 2 H), 2,1 (m, 3 H), 1,9 (m, 4 H), 1,6 (m, 4 H), 1,3 (m, 4 H); MS m/e 416 (MH $^+$).

25 Příklad 5

N-3-(4-Piperidinpropionyl)isonipekotinoyl-(3-amino-3-methyl)propionová kyselina.TFA (SL #5)

30 Sloučenina 5, připravená podle schématu AA, se izolovala jako světlehnědé sklo:

35 $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD) δ 4,5 (m, 1H), 4,2 (m, 1H), 3,9 (m, 1H), 3,3 (m, 2H), 3,3 (m, 3 H), 3,1 (m, 1H), 2,9 (m, 3 H), 2,7 (m, 2H), 2,4 (m, 2H), 2,0 (m, 2 H), 1,7 (m, 2H), 1,5 (m, 6 H), 1,3 (m, 2 H), 1,15 (d, $J = 9, 3$ H); MS m/e 354 (MH $^+$).

Příklad 6

40 N-3-(4-Piperidinpropionyl)isonipekotinoyl-[3-amino-3-(4-karboxyfenyl)]propionová kyselina.TFA (SL #6)

Sloučenina 6, připravená podle schématu AA, se izolovala jako světlehnědé sklo:

45 $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD) δ 7,9 (m, 3H), 7,43 (d, $J = 5,2$ H), 5,4 (m, 1H), 4,5 (m, 1 H), 4,0 (m, 1H), 3,3 (m, 4 H), 3,1 (m, 1 H), 2,9 (m, 2 H), 2,7 (m, 2 H), 2,7 (m, 1 H), 2,5 (m, 4 H), 2,0 (m, 2 H), 1,2-1,9 (m, 10 H); MS m/e 460 (MH $^+$).

Příklad 7

50 N-3-(4-N-Methyl-piperidinpropionyl)nipekotinoyl-3-aminopropionová kyselina.Li (SL #7)

Sloučenina 7, připravená podle schématu AD, se izolovala jako bílý prášek:

t.t.: 172–177 °C; ^1H NMR (CDCl_3) δ 4,4 (m, 1H), 3,7 (m, 1H), 3,4 (m, 1 H), 3,2 (m, 1H), 3,1 (m, 1H), 2,7 (m, 2H), 2,3 (m, 6 H), 2,21 (s, 3 H), 1,9 (m, 4 H), 1,3–1,8 (m, 10 H); MS m/e 354 (MH⁺).

5

Příklad 8

N-3-(4-Piperidinpropionyl)nipekotinoyl-4-oxonipekotinová kyselina.TFA (SL #8)

10 Sloučenina 8, připravená podle schématu AA, se izolovala jako čiré sklo:

^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ 8,5 (m, 1H), 8,2 (m, 1H), 6,5 (m, 1H), 4,3 (m, 1H), 3,4–3,8 (m, 4 H), 3,2 (m, 2 H), 3,0 (m, 1 H), 2,8 (m, 2 H), 2,2–2,6 (m, 6 H), 1,8 (m, 2 H), 1,1–1,7 (m, 11 H); MS m/e 394 (MH⁺).

15

Příklad 9

20 N-3-(4-Piperidinpropionyl)nipekotinoyl-[3-amino-3-(2-trimethylsilylethynyl)]propionová kyselina.TFA (SL #9)

Sloučenina 9, připravená podle schématu AA, se izolovala jako žluté sklo:

25 ^1H NMR (CD_3OD) δ 3,8 (m, 1H), 3,2–3,4 (m, 4H), 2,9 (m, 3 H), 2,7 (m, 2 H), 2,3–2,5 (m, 2 H), 1,9 (m, 4H), 1,1–1,9 (m, 13 H), 0,0 (s, 9 H); MS m/e 436 (MH⁺).

Příklad 10

30 N-3-(6-Aminokaproyl)nipekotinoyl-3-amino-3-(3-pyridyl)propionová kyselina.3TFA (SL #10)

Sloučenina 10, připravená podle schématu AA, se izolovala jako čiré sklo:

35 ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ 8,6 (m, 2 H), 8,1 (s, 1 H), 7,0–7,7 (m, 5 H), 5,15 (t, J = 3, 1 H), 4,4 (m, 1H), 4,1 (m, 1 H), 3,7 (m, 2 H), 3,1 (m, 1 H), 2,7 (m, 4 H), 2,5 (m, 1 H), 2,3 (m, 2 H), 1,2–1,9 (m, 11 H); MS m/e 391 (MH⁺).

40 Analýza pro $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_4 \cdot 3\text{TFA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (768,60):
vypočteno: C 40,63; H 4,85; N 7,21; F 22,25;
nalezeno: C 40,81; H 4,70; N 6,12; F 23,83.

Příklad 11

45

N-3-(4-Piperidinpropionyl)-R-(-)-nipekotinoyl-(3-amino-2-hydroxy)propionová kyselina.TFA (SL #11)

Sloučenina 11, připravená podle schématu AA, se izolovala jako růžové sklo:

50

^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ 8,5 (m, 1H), 8,2 (m, 1H), 7,6 (m, 1H), 4,0–4,4 (m, 2H), 3,7 (m, 1H), 3,2 (m, 3H), 2,8 (m, 3 H), 2,6 (m, 1 H), 2,1–2,3 (m, 3H), 1,8 (m, 4 H), 1,0–1,4 (m, 10 H); MS m/e 356 (MH⁺).

Příklad 12

N-3-(4-Piperidinethansulfonyl)nipekotinoyl-3-aminopropionová kyselina.HCl (SL #12)

5

Sloučenina 12 se připravila podle schématu AE. Meziprodukt AE1 se syntetizoval následujícím postupem. 2-(4-Pyridin)ethansulfonylová kyselina (3,0 g, 0,016 mol) se rozpustila ve vodném roztoku HCl (2, 0N, 12 ml) a na tento roztok se působilo oxidem platičitým (0,13 g) a hydrogenoval se při 344,74 kPa a teplotě místnosti 18 hodin. Tato směs se přefiltrovala přes celit a odpařila za získání 2-(4-piperidin)ethansulfonylové kyseliny.HCl (3,5 g, bílý prášek). Tento prášek se rozpustil ve vodném roztoku THF (1:1, 70 ml) při teplotě místnosti a nechal reagovat s NMM (3,7 ml, 2,2 ekv.) a benzylchlorformiátem (2,2 ml, 1 ekv.). Směs se míchala 15 hodin, okyselila vodným roztokem kyseliny citronové a extrahovala CHCl_3 (2 x 100 ml). Organická vrstva se vysušila síranem sodným a odpařila za získání 2-(4-N-benzyloxykarbonylpiperidin)-ethansulfonylové kyseliny (2,75 g, zlatový olej). Tento olej se přeměnil na konečný produkt 12 v pěti stupních syntézy (schéma AE, W.J. Hoekstra, *J. Med. Chem.* 1995, 38, 1582) a izoloval jako čiré sklo:

^1H NMR (DMSO-d_6) δ 8,9 (m, 1 H), 8,6 (m, 1 H), 3,5 (m, 2 H), 3,1-3,3 (m, 4 H), 3,0 (m, 2 H), 2,6-2,8 (m, 4 H), 2,3 (m, 3 H), 1,65-1,9 (m, 5 H), 1,6 (m, 3 H), 1,2-1,4 (m, 5 H); MS m/e 376 (MH⁺).

Příklad 13

25

N-3-(4-Piperidinpropionyl)nipekotinoyl-5H-(2H-aminoethyl)tetrazol.HCl (SL #13);

Sloučenina 13, připravená podle schématu AC, se izolovala jako žlutá pěna:

^1H NMR (DMSO-d_6) δ 8,9 (m, 1H), 8,6 (m, 1 H), 8,13 (d, J = 28, 1 H), 4,2 (m, 2 H), 3,2 (m, 3 H), 3,0 (m, 4 H), 2,7 (m, 4 H), 2,31 (q, J = 8, 2 H), 1,7-1,9 (m, 3 H), 1,4-1,6 (m, 5 H), 1,1-1,3 (m 4 H); MS m/e 364 (MH⁺).

Příklad 14

35

N-3-(4-N-Methyl-piperazinpropionyl)nipekotinoyl-[3-amino-(3,4-methylenedioxyfenyl)]-propionová kyselina.Na (SL # 14);

Sloučenina 14, připravená podle schématu AB, se izolovala jako bílá amorfnní pevná látka:

^1H NMR (D_2O) δ 6,8 (m, 3H), 5,91 (s, 2H), 5,0 (m, 1H), 4,0 (m, 1H), 3,7 (m, 1H), 2,8-3,4 (m, 11 H), 2,69 (s, 3H), 2,4-2,6 (m, 7 H), 1,9 (m, 1 H), 1,7 (m, 2 H), 1,5 (m, 1 H); MS m/e 475 (MH⁺). Anal. vypoč. pro $\text{C}_{24}\text{H}_{33}\text{N}_4\text{O}_6 \cdot \text{Na} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (514,56): C, 56,02; H, 6,86; N, 10,89. Nalez.: C, 55,72; H, 6,78; N, 10,52.

Příklad 15

N-3-(4-N-Methyl-piperazinpropionyl)nipekotinoyl-[3-amino-3-(3-chinoly)]propionová kyselina.3TFA (SL #15);

Sloučenina 15, připravená podle schématu AB, se izolovala jako žlutý prášek:

^1H NMR (DMSO- d_6) δ 8,94 (s, 1H), 8,12 (s, 1 H), 7,9 (m, 2 H), 7,6 (m, 2 H), 7,07 (d, $J = 4$, 1 H), 5,2 (m, 1 H), 4,1 (m, 1 H), 3,7 (m, 1 H), 3,1–3,3 (m, 2 H), 2,9 (m, 2 H), 2,6 (m, 2 H), 2,43 (s, 3 H), 1,9–2,4 (m, 12 H), 1,2–1,5 (m, 4 H); MS m/e 482 (MH $^+$).

5

Příklad 16

N-3-(4-Piperidinpropionyl)-R-(–)-nipekotinoyl-[(S)-3-amino-3-(3,4-methylenedioxyfenyl)]-propionová kyselina.HCl (SL #16)

10

Sloučenina 16, připravená podle schématu AA a AC, se izolovala jako bílý prášek: t.t. 190 až 200 °C;

^1H NMR (DMSO- d_6) δ 8,9 (m, 1H), 8,6 (m, 1H), 8,4 (m, 1H), 6,83 (d, $J=5$, 1 H), 6,79 (d, $J = 5$, 1 H), 6,7 (m, 1 H), 5,95 (s, 2 H), 5,08 (dd, $J = 5$, 11, 1 H), 4,1–4,3 (n, 1 H), 3,7 (m, 1 H), 3,15 (d, $J = 10$, 2 H), 3,0 (m, 1 H), 2,7 (m, 2 H), 2,6 (m, 3 H), 2,31 (d, $J = 7$, 2 H), 1,81 (d, $J=10$, 2 H), 1,2–1,7 (m, 11 H); MS m/e 460 (MH $^+$); $[\alpha]^{24}_D -0,478^\circ$ (c 1,00, MeOH).

15

20 Příklad 17

N-3-(4-Piperidinpropionyl)hexahydroazepin-3-karbonyl-[3-amino-3-(3-chinolyl)]propionová kyselina.2TFA (SL #17)

25 Sloučenina 17, připravená podle schématu AA, se izolovala jako sklo:

^1H NMR (D_2O) δ 9,06 (s, 1 H), 8,9 (m, 1 H), 8,2 (m, 1 H), 8,04 (s, 1 H), 8,0 (t, $J=4$, 2 H), 7,8 (t, $J = 4$, 2 H), 5,5 (m, 1 H), 3,8 (m, 1 H), 3,3 (m, 4 H), 3,0 (m, 2 H), 2,7 (m, 4 H), 2,0–2,4 (m, 6 H), 1,7–1,9 (m, 4 H), 1,1–1,6 (m, 8 H); MS m/e 481 (MH $^+$).

30

Příklad 18

N-3-(4-Piperidinpropionyl)-R-(–)-nipekotinoyl-[(S)-3-(3-amino-(3-chinolyl)]propionová kyselina.2HCl (SL #18)

35

Sloučenina 18, připravená podle schématu AA a AG, se izolovala jako bílé vločky: t.t. 142 až 144 °C°;

40 MS m/e 467 (MH $^+$); $[\alpha]^{24}_D -173^\circ$ (c 0,1, MeOH).

Analýza pro $\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_4 \cdot 2,25 \text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (566,64):

vypočteno: C 55,11; H 6,80; N 9,89; Cl 14,08;

nalezeno: C 54,85; H 6,62; N 10,04; Cl 13,68.

45

Příklad 19

N-3-(4-Piperidinpropionyl)-R-(–)-nipekotinoyl-[(S)-3-amino-3-(2-terc.butylethynyl)]-propionová kyselina.HCl (SL # 19)

50

Sloučenina 19, připravená podle schématu AA, se izolovala jako bílý prášek: MS m/e 420 (MH $^+$).

Analýza pro $C_{23}H_{37}N_3O_4 \cdot 1,07 HCl \cdot 0,43 H_2O$ (468,97):

vypočteno: C 59,21; H 8,42; N 8,96; Cl 8,09;

nalezeno: C 58,92; H 8,58; N 8,76; Cl 7,82.

5

Příklad 20

N-3-(4-Piperidinpropionyl)nipekotinoyl-[(S)-3-amino-3-[3,4-methylenedioxyfenyl]]-
propionová kyselina.2TFA (SL # 20)

10

Sloučenina 20, připravená podle schématu AF a AG, se izolovala jako bílý prášek:

15

1H NMR (CD_3OD) δ 8,6–8,8 (m, 3 H), 6,7–6,9 (m, 3 H), 5,91 (s, 2 H), 5,1–5,2 (m, 1 H), 3,3–3,5 (m, 4 H), 2,8–3,1 (m, 6 H), 2,6–2,7 (m, 3 H), 1,5–2,0 (m, 11 H), 1,2–1,4 (m, 4 H); MS m/e 446 (MH⁺).

Příklad 21

20

N-3-(4-Piperidinpropionyl)-R-(-)-nipekotinoyl-[(S)-3-amino-3-(3-pyridyl)]propionová
kyselina.2TFA (SL # 21)

Sloučenina 21, připravená podle schématu AA a AG, se izolovala jako bílá amorfnní tuhá látka:
t.t. 74 až 81 °C; MS m/e 417 (MH⁺).

25

Analýza pro $C_{22}H_{32}N_4O_4 \cdot 2,1 C_2HF_3O_2 \cdot 0,7 H_2O$ (668,58):

vypočteno: C 47,07; H 5,35; N 8,38; F 17,90; KF 1,89;

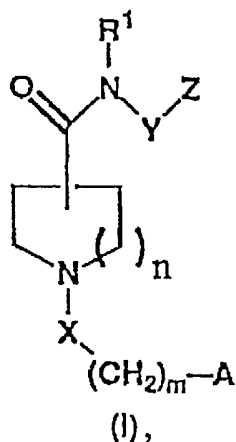
nalezeno: C 47,08; H 5,31; N 8,41; F 17,68; KF 2,00.

30

PATENTOVÉ NÁROKY

35

1. Karboxamidový derivát pyrrolidinu, piperidinu a hexahydroazepinu obecného vzorce I:



kde

- A je zvolen ze souboru zahrnujícího 2-piperidyl, 3-piperidyl, 4-piperidyl, 1-piperazinyl, 2-pyrrolidinyl, 3-pyrrolidinyl a NHR^2 ;
- 5 R^2 je zvolen ze souboru zahrnujícího H, alkyl s 1 až 8 atomy uhlíku a acyl se 2 až 6 atomy uhlíku a přednostně znamená vodík;
- m je celé číslo 1, 2 nebo 3 a přednostně znamená 1 nebo 2;
- X je zvolen ze souboru zahrnujícího C(O) , C(O)O , C(O)NH , CH_2 a SO_2 ;
- 10 n je celé číslo 1, 2 nebo 3;
- R^1 je zvolen ze souboru zahrnujícího vodík a cykloalkyl s 5 až 8 atomy uhlíku;
- 15 Y je zvolen ze souboru zahrnujícího $(\text{CH}_2)_p$, $\text{CH(R}^3)(\text{CH}_2)_q$, $(\text{CH}_2)_q\text{CH(R}^3)$, $(\text{CH(COR}^4)\text{CH}_2)_q$, $(\text{CH}_2)_p\text{CHOH}$ a 3-piperidinkarboxylovou kyselinu; s výhradou, že když Y je $(\text{CH}_2)_p$ a p je 2, x je jiný než C(O) , nebo když X je C(O) , potom buď R^1 je jiný než H, nebo R^2 je jiný než H, a s další výhradou, že když Y je $(\text{CH(CO}_2\text{R}^4)\text{CH}_2)_q$, X je jiný než C(O) nebo CH_2 ;
- 20 p je 2 nebo 3;
- q je 1, 2 nebo 3 a přednostně 1;
- 25 R^3 je alkyl s 1 až 8 atomy uhlíku, alkenyl se 2 až 8 atomy uhlíku, alkinyl se 2 až 8 atomy uhlíku, fenyl, naftyl, fenylalkyl s 1 až 8 atomy uhlíku v alkylové části, naftylalkyl s 1 až 8 atomy uhlíku v alkylové části nebo heteroaryl, kterým je pyridyl, thienyl, furyl nebo chinolyl;
- R^4 je vodík nebo alkyl s 1 až 8 atomy uhlíku nebo cykloalkyl s 5 až 8 atomy uhlíku a přednostně znamená vodík;
- 30 Z je CO_2H , CO_2alkyl , SO_3H , PO_3H_2 nebo 5-tetrazol;
- nebo jeho enantiomer nebo farmaceuticky přijatelná sůl některé z těchto sloučenin.
- 35 2. Karboxamidový derivát podle nároku 1, obecného vzorce I, kde A je 4-piperidyl.
3. Karboxamidový derivát podle nároku 1, obecného vzorce I, kde R^2 je vodík.
4. Karboxamidový derivát podle nároku 1, obecného vzorce I, kde m je 1 nebo 2.
- 40 5. Karboxamidový derivát podle nároku 1, obecného vzorce I, kde X je C(O) .
6. Karboxamidový derivát podle nároku 1, obecného vzorce I, kde R^1 je vodík.
- 45 7. Karboxamidový derivát podle nároku 1, obecného vzorce I, kde Y je 4-oxonipekotinová kyselina.
8. Karboxamidový derivát podle nároku 1, obecného vzorce I, kde q je 1.
- 50 9. Karboxamidový derivát podle nároku 1, obecného vzorce I, kde R^3 je aryl.
10. Karboxamidový derivát podle nároku 1, obecného vzorce I, kde R^4 je vodík.
11. Karboxamidový derivát podle nároku 1, obecného vzorce I, kde Z je CO_2H .
- 55

12. Karboxamidový derivát podle nároku 1, zvolený ze souboru, který tvoří:

- trifluoracetátová sůl N-3-(4-piperidinpropionyl)nipekotinoyl-(3-amino-3-fenyl)propionové kyseliny (SLOUČENINA ČÍSLO 1);
- 5 trifluoracetátová sůl N-(4-piperidinmethylaminokarbonyl)nipekotinoyl-(3-amino-2-methyl)propionové kyseliny (SLOUČENINA ČÍSLO 2);
- 10 trifluoracetátová sůl α -methylesteru N-(4-piperidinmethyloxykarbonyl)nipekotinoyl-D-asparagové kyseliny (SLOUČENINA ČÍSLO 3);
- trifluoracetátová sůl N-3-(4-piperidinpropionyl)pyrrolidin-3-karboxy-[3-amino-3-(4-tolyl)]propionové kyseliny (SLOUČENINA ČÍSLO 4);
- 15 trifluoracetátová sůl N-3-(4-piperidinpropionyl)izonipekotinoyl-(3-amino-3-methyl)propionové kyseliny (SLOUČENINA ČÍSLO 5);
- trifluoracetátová sůl N-3-(4-piperidinpropionyl)-izonipekotinoyl-[3-amino-3-(4-karboxy-fenyl)]propionové kyseliny (SLOUČENINA ČÍSLO 6);
- 20 lithná sůl N-3-(4-(N-methyl-piperidinpropionyl)nipekotinoyl-3-aminopropionové kyseliny (SLOUČENINA ČÍSLO 7);
- 25 trifluoracetátová sůl N-3-(4-piperidinpropionyl)nipekotinoyl-4-oxonipekotinové kyseliny (SLOUČENINA ČÍSLO 8);
- trifluoracetátová sůl N-3-(4-piperidinpropionyl)nipekotinoyl[3-amino-3-(2-trimethylsilyl-ethinyl)]propionové kyseliny (SLOUČENINA ČÍSLO 9);
- 30 tris(trifluoracetátová sůl N-(6-aminokaproyl)nipekotinoyl-3-amino-3-(3-pyridyl)propionové kyseliny (SLOUČENINA ČÍSLO 10);
- trifluoracetátová sůl N-3-(4-piperidinpropionyl)-R(-)-nipekotinoyl-(3-amino-2-hydroxy)-propionové kyseliny (SLOUČENINA ČÍSLO 11);
- 35 hydrochloridová sůl N-3-(4-piperidinetansulfonyl)nipekotinoyl-3-aminopropionové kyselin (SLOUČENINA ČÍSLO 12);
- 40 hydrochloridová sůl N-3-(4-piperidinpropionyl)nipekotinoyl-5H-(2-aminoethyl)tetrazolu (SLOUČENINA ČÍSLO 13);
- sodná sůl N-3-(4-N-methyl-piperazinpropionyl)nipekotinoyl-[3-amino-3-(3,4-methylen-dioxyfenyl)]propionové kyseliny (SLOUČENINA ČÍSLO 14);
- 45 tris(trifluoracetátová) sůl N-3-(4-N-methyl-piperazinpropionyl)nipekotinoyl-[3-amino-3-(3-chinolyl)]propionové kyseliny (SLOUČENINA ČÍSLO 15);
- hydrochloridová sůl N-3-(4-piperidinpropionyl)-R(-)-nipekotinoyl-[(S)-3-amino-3-(3,4-methylenedioxyfenyl)]propionové kyseliny (SLOUČENINA ČÍSLO 16);
- 50 bis(trifluoracetátová) sůl N-3-(4-piperidinpropionyl)hexahydroazepin-3-karboxy-[3-amino-3-(3-chinolyl)]propionové kyseliny (SLOUČENINA ČÍSLO 17);

- bis(hydrochloridová) sůl N-3-(4-piperidinpropionyl)-R-(-)-nipekotinoyl-[(S)-3-amino-3-(3-chinoly)]propionové kyseliny (SLOUČENINA ČÍSLO 18);
- 5 hydrochloridová sůl N-3-(4-piperidinpropionyl)-R-(-)-nipekotinoyl-[(S)-3-amin-3-(2-terc.-butylethynyl)]propionové kyseliny (SLOUČENINA ČÍSLO 19);
- bis(trifluoracetátová) sůl N-3-(4-piperidinpropionyl)nipekotinoyl-[(S)-3-amino-3-(3,4-methylenedioxyfenyl)]propionové kyseliny (SLOUČENINA ČÍSLO 20);
- 10 bis(trifluoracetátová) sůl N-3-(4-piperidinpropionyl)-R-(-)-nipekotinoyl-[(S)-3-amino-3-(3-pyridyl)]propionové kyseliny (SLOUČENINA ČÍSLO 21).
13. Karboxamidový derivát podle nároku 12, zvolený ze souboru přednostních sloučenin číslo 15, 16, 18, 19 a 21.
- 15 14. Farmaceutická kompozice pro léčení trombotických poruch zprostředkovaných destičkami, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje karboxamidový derivát podle nároku 1 v účinném množství pro léčení takových poruch v kombinaci s farmaceuticky přijatelným nosičem.
- 20 15. Karboxamidový derivát podle nároku 1 pro použití jako léčivo.
16. Karboxamidový derivát definovaný v nároku 1 pro použití v účinném množství pro léčení trombotických poruch zprostředkovaných destičkami, jako je arteriální a venózní trombóza, akutní infarkt myokardu, nestabilní angína, reokluze následující trombolytickou terapií a angio-
25 plastiku, zápal a různé vazookluzivní poruchy.
17. Karboxamidový derivát definovaný v nároku 1 pro použití podle nároku 16, kde účinné množství je 0,1 až 300 mg/kg/den.

30

Konec dokumentu

35