



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 60 2004 006 279 T2 2007.12.27**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 658 285 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **60 2004 006 279.0**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US2004/024387**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **04 779 447.4**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2005/019212**

(86) PCT-Anmeldetag: **18.08.2004**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **03.03.2005**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **24.05.2006**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **02.05.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **27.12.2007**

(51) Int Cl.⁸: **C07D 413/04 (2006.01)**
A61K 47/22 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

496537 P 20.08.2003 US

(73) Patentinhaber:

Eli Lilly and Co., Indianapolis, Ind., US

(74) Vertreter:

Spott, Weinmiller & Böhm, 80336 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR

(72) Erfinder:

JUNGHEIM, Louis Nikolaus, Indianapolis, IN 46240, US; MCGILL, John McNeill, Greenwood, IN 46143, US; THRASHER, Kenneth Jeff, Indianapolis, IN 46217, US; HERR, Robert Jason, Voorheesville, NY 12186, US; VALLURI, Muralikrishna, Rensselaer, NY 12144, US

(54) Bezeichnung: **VERBINDUNGEN, VERFAHREN UND FORMULIERUNGEN ZUR ORALEN VERABREICHUNG EINER GLUCAGONARTIGEN PEPTID (GLP)-1-VERBINDUNG ODER EINES MELANOCORTIN-4-REZEPTOR-(MC4-)AGONISTISCHEN PEPTIDS**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Hintergrund der Erfindung

[0001] Herkömmliche Mittel zur Abgabe der Wirkstoffe sind oft stark durch biologische, chemische und physikalische Barrieren beschränkt. Typischerweise werden diese Barrieren durch die Umgebung, in der die Abgabe stattfindet, die Umgebung des Abgabeziels oder dem Ziel an sich geschaffen. Biologisch oder chemisch wirksame Mittel sind gegenüber diesen Barrieren besonders empfindlich. Bei der Abgabe von biologisch aktiven oder chemisch aktiven pharmakologischen und therapeutischen Mitteln an Menschen und Tiere werden physikalische und chemische Barrieren durch den Körper geschaffen. Beispiele von physikalischen Barrieren sind die Haut und verschiedene Organmembranen, die vor der Erreichung des Ziels überwunden werden müssen und Beispiele für chemische Barrieren umfassen unter anderem Variationen in pH, Lipiddoppelschichten und abbauenden Enzymen.

[0002] Diese Barrieren haben eine besondere Bedeutung beim Design von oralen Abgabesystemen. Die orale Abgabe von vielen biologisch oder chemisch wirksamen Mitteln wäre die Verabreichung der Wahl an Menschen und Tiere, falls die biologischen, chemischen und physikalischen Barrieren nicht existieren würden, wie der variierende pH im Gastrointestinaltrakt (GI), starke Verdauungsenzyme und für den Wirkstoff undurchdringliche Gastrointestinalmembranen. Unter den verschiedenen Mitteln, die typischerweise einer oralen Verabreichung nicht zugänglich sind, sind biologisch oder chemisch aktive Peptide, wie Calcitonin und Insulin, Polysaccharide und insbesondere Mucopolysaccharide, einschließlich unter anderem Heparin, Heparinoide, Antibiotika und andere organische Substanzen. Diese Mittel werden schnell durch den Gastrointestinaltrakt durch Säurehydrolyse, Enzyme oder dergleichen inaktiviert oder zerstört.

[0003] Frühere Verfahren zur oralen Verabreichung von empfindlichen pharmakologischen Mitteln beruhen auf der Co-Verabreichung von Hilfsstoffen oder Enhancern (beispielsweise Resorcinole und nichtionische oberflächenaktive Mittel, wie Polyoxyethylenoleylether und n-Hexadecylpolyethylenether), um die Permeabilität der Verdauungswände künstlich zu erhöhen, wie auch die Co-Verabreichung von Enzyminhibitoren (beispielsweise Pankreastrypsininhibitoren, Diisopropylfluorophosphat), um den enzymatischen Abbau zu hemmen.

[0004] Es wurden auch Liposomen als Arzneimittelabgabesysteme für Insulin und Heparin beschrieben. Siehe beispielsweise US 4 239 754 A, Patel et al (1976), FEBS Letters, Band 62, Seite 60 und Hashimoto et al. (1970), Endocrinology Japan, Band 26, Seite 337.

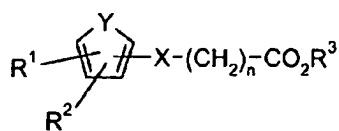
[0005] Jedoch ist eine Breitspektrumsanwendung solcher Arzneimittelabgabesysteme ausgeschlossen, da (1) die Systeme toxische Mengen von Hilfsstoffen, Enhancern oder Inhibitoren erfordern, (2) geeignete niedermolekulare Frachten, das heißt Wirkstoffe, sind nicht verfügbar, (3) sie zeigen eine schlechte Stabilität und eine unpassende Haltbarkeit, (4) die Systeme sind schwierig herzustellen, (5) die Systeme können den Wirkstoff (die Ladung) nicht schützen, (6) die Systeme verändern den Wirkstoff nachteilig oder (7) die Systeme erlauben oder fördern die Absorption des Wirkstoffs nicht.

[0006] Vor kurzem wurden Mikrosphären oder künstliche Polymere aus gemischten Aminosäuren (Proteinoiden) zur Abgabe von Pharmazeutika verwendet. Beispielsweise beschreibt die US 4 925 673 A die Arzneimittel-enthaltende Proteinoidmikrosphärenträger wie auch Verfahren zu deren Herstellung und Verwendung. Diese Proteinoidmikrosphären sind zur Abgabe von mehreren Wirkstoffen brauchbar.

[0007] Moleküle für Abgabemittel wurden auch beschrieben in US 5 541 155 A, US 5 693 338 A, US 5 976 569 A, US 5 643 957 A, US 5 955 503 A, US 6 100 298 A, US 5 650 386 A, US 5 866 536 A, US 5 965 121 A, US 5 989 539 A, US 6 001 347 A, US 6 071 510 A, US 5 820 881 A und US 6 242 495 A, siehe auch WO 02 02 509 A, WO 01 51 454 A, WO 01 44 199 A, WO 01 32 130 A, WO 00 59 863 A, WO 00 50 386 A, WO 00 47 188 A und WO 00 40 203 A.

Kurze Zusammenfassung der Erfindung

[0008] Die vorliegende Erfindung betrifft eine Verbindung der Formel I

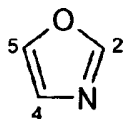


I

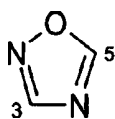
worin

R^1 und R^2 jeweils unabhängig für H, OH, Cyano, C_1 - C_6 Alkyl, C_1 - C_6 Alkoxy, CF_3 , Halogen oder NR^4R^4 stehen, R^3 für H oder C_1 - C_6 Alkyl steht,

X steht für



worin der Pyridin- oder Thiophensubstituent an das Kohlenstoffatom Nummer 4 gebunden ist und der $(CH_2)_nCO_2R^3$ Rest an das Kohlenstoffatom Nummer 2 gebunden ist, oder für



worin der Pyridin- oder Thiophensubstituent an das Kohlenstoffatom Nummer 3 gebunden ist und der $(CH_2)_nCO_2R^3$ Rest an das Kohlenstoffatom Nummer 5 gebunden ist,

Y für S, $CR^5 = N$ oder $N = CR^5$ steht,

n für 2, 3, 4, 5, 6 oder 7 steht,

R^4 für H, COR^6 , SO_2R^7 oder C_1 - C_6 Alkyl steht,

R^4 für H oder C_1 - C_6 Alkyl steht,

R^5 für H steht oder mit X eine Bindung bildet,

R^6 für H oder C_1 - C_6 Alkyl steht, und

R^7 für H oder C_1 - C_6 Alkyl steht,

oder ein pharmazeutisches Salz hiervon.

[0009] Die vorliegende Erfindung betrifft ferner eine Verbindung der Formel I, worin R^3 für H steht. Diese Verbindung wird hierin später als Verbindung der Formel II bezeichnet.

[0010] Die vorliegende Erfindung betrifft auch eine pharmazeutische Zusammensetzung, die eine Verbindung der Formel II oder ein pharmazeutisches Salz hiervon und einen pharmazeutischen Träger enthält.

[0011] Die vorliegende Erfindung betrifft auch eine pharmazeutische Zusammensetzung, die eine Verbindung der Formel II oder ein pharmazeutisches Salz hiervon und eine GLP-1 Verbindung enthält.

[0012] Die vorliegende Erfindung betrifft auch eine pharmazeutische Zusammensetzung, die eine Verbindung der Formel II oder ein pharmazeutisches Salz hiervon und ein MC4 Agonistpeptid enthält.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0013] Die Bezugnahme hierin später auf "eine Verbindung der Formel I" oder "Verbindung der Formel II" umfasst die pharmazeutischen Salze hiervon.

[0014] Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung, wie sie hierin beschrieben und beansprucht sind, werden die folgenden Ausdrücke wie folgt definiert.

[0015] Der Ausdruck "Halogen" bezieht sich auf Fluor, Chlor, Brom und Iod. Der Ausdruck " C_1 - C_6 Alkyl" steht für einen geraden, verzweigten oder cyclischen Kohlenwasserstoffrest mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen, beispielsweise Methyl, Ethyl, n-Propyl, Isopropyl, Cyclopropyl, n-Butyl, Isobutyl, sek-Butyl, t-Butyl, Cyclobutyl, Pentyl, Cyclopentyl, Hexyl, Cyclohexyl und dergleichen. Reste, wie Cyclobutylmethylen werden vom Umfang der C_1 - C_6 Alkylgruppe auch umfasst.

[0016] Der Ausdruck " C_1 - C_4 Alkyl" bezieht sich spezifisch auf Methyl, Ethyl, n-Propyl, Isopropyl, Cyclopropyl,

Cyclopropylmethyl, n-Butyl, Isobutyl, sek-Butyl, t-Butyl und Cyclobutyl. Eine "C₁-C₆ Alkoxygruppe" ist ein C₁-C₆ Alkylrest, der über eine Sauerstoffbindung gebunden ist.

[0017] Der Ausdruck "pharmazeutisch" meint, wenn er hierin als Adjektiv verwendet wird, dass es im wesentlichen für den empfangenden Patienten unschädlich ist.

[0018] Der Ausdruck "Patient" umfasst Menschen und Tiere, wie Haustiere (Hunde, Katzen, Pferde und dergleichen). Der bevorzugte Patient in der Behandlung ist der Mensch.

[0019] Der Ausdruck "GLP-1 Verbindung", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf ein oder mehrere natürlich vorkommende GLP-1 Polypeptide (GLP-1(7-37)OH und GLP-1(7-36)NH₂), GLP-1 Fragmente, GLP-1 Analoga, GLP-1 Derivate von natürlich vorkommenden GLP-1 Polypeptiden, GLP-1 Fragmente oder GLP-1 Analoga und Exendin-3 und Exendin-4, die die Fähigkeit zur Bindung des GLP-1 Rezeptors aufweisen und einen Signaltransduktionsweg initiieren, der zu einer insulinotropen Aktivität führt, wie dies in WO 03 072 195 A (Anmeldenummer PCT/US03/03111) beschrieben ist.

[0020] Der Ausdruck "MC4 Agonistpeptid", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf die pharmazeutisch brauchbaren Peptide, die in PCT/US04/16625 vom 17. Juni 2004 beschrieben sind (Peptide der Formel I, II und III, wie dies hierin beschrieben ist).

[0021] Die Verbindung der Formel II ist zur Erhöhung der oralen Bioverfügbarkeit eines Wirkstoffs, das heißt einer GLP-1 Verbindung oder eines MC4 Agonistpeptids brauchbar, worin die Verbindung mit dem Wirkstoff unter Bildung einer Kombinationszusammensetzung gemischt wird. Diese Kombination ist eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung. Die Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung umfassen eine Verbindung der Formel II, die ein Abgabemittel (eine Verbindung der Formel II) ist und eine GLP-1 Verbindung oder ein MC4 Agonistpeptid.

[0022] Die vorliegende Erfindung ist besonders zur Abgabe einer GLP-1 Verbindung oder eines MC4 Agonistpeptids (Wirkstoffs) vorteilhaft, der sonst durch die Bedingungen, auf die er trifft, zerstört oder weniger wirksam gemacht werden würde, bevor der Wirkstoff seinen Zielbereich (das heißt den Bereich, worin der Wirkstoff der Abgabezusammensetzung freigesetzt wird) innerhalb des Körpers des Organismus erreicht, in den er abgegeben wird. Die Zusammensetzungen, die eine oder mehrere Verbindungen der Formel II (vorzugsweise und am typischsten eine) und einen Wirkstoff umfassen, haben eine Brauchbarkeit bei der Abgabe dieses Wirkstoffs an ausgewählte biologische Systeme und eine erhöhte oder verbesserte Bioverfügbarkeit des Wirkstoffs im Vergleich zur Verabreichung des Wirkstoffs ohne dem Abgabemittel. Die Abgabe kann durch die Abgabe von mehr Wirkstoff über einen Zeitraum oder durch die Abgabe des Wirkstoffs in einem bestimmten Zeitraum (zur Bewirkung einer schnelleren oder verzögerten Abgabe) oder über einen Zeitraum (wie eine anhaltende Abgabe) verbessert werden.

Bevorzugte Verbindungen (Ausführungsformen) der Erfindung

[0023] Bestimmte erfindungsgemäße Verbindungen sind besonders interessant und bevorzugt. Die folgende Liste nennt mehrere Gruppen an bevorzugten Verbindungen. Es ist verständlich, dass jede der Angaben mit anderen Angaben unter Bildung von zusätzlichen Gruppen an bevorzugten Verbindungen kombiniert werden kann.

n steht für 2, 3, 4 oder 5,

R¹ und R² stehen jeweils unabhängig für H, OH, OCH₃CH₃, CF₃, Cl oder Br,

R¹ und R² stehen jeweils unabhängig für H, OH, OCH₃CH₃ oder CF₃,

R¹ und R² stehen jeweils unabhängig für H, OH, OCH₃ oder NH₂,

R¹ steht für H und R² steht für OH,

R¹ und R² stehen beide für H,

R³ steht für H,

R⁴ steht für H,

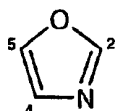
R⁴ steht für COR⁶ und R⁶ steht für CH₃,

R⁴ steht für SO₂R⁷ und R⁷ steht für CH₃,

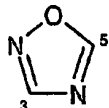
R⁴ steht für H,

R⁷ steht für C₁-C₆ Alkyl,

X steht für



und der Arylsubstituent (Pyridin oder Thiophen) ist an das Kohlenstoffatom Nummer 4 gebunden und die Alkansäure ist an das Kohlenstoffatom Nummer 2 gebunden,
X steht für



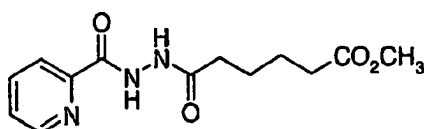
und der Arylsubstituent ist an das Kohlenstoffatom Nummer 3 gebunden und die Alkansäure ist an das Kohlenstoffatom Nummer 5 gebunden.

Präparationen und Beispiele

[0024] Alle nicht-wässrigen Reaktionen werden unter einer trockenen Stickstoffatmosphäre ausgeführt, falls nichts anderes angegeben ist. Im Handel erhältliche Reagenzien und wasserfreie Lösemittel werden so verwendet, wie sie von den Lieferanten erhalten werden und es werden keine Versuche unternommen, diese Komponenten weiter zu reinigen oder zu trocknen. Die Entfernung der Lösemittel unter verringertem Druck wird mit einem Büchi Rotationsverdampfer bei etwa 28 mm Hg Druck mittels einer mit Teflon ausgekleideten KNF Vakuumpumpe erreicht. Es wird eine Dünnschichtchromatographie mittels 1" × 3" Analtech Nr. 02521, Whatman Nr. MK6F oder EM Science (Merck) Nr. 5719-2 Silicagelplatten mit Fluoreszenzindikator ausgeführt. Die Visualisierung der TLC Platten erfolgt durch Beobachtung mit entweder kurzweiligem UV Licht, 10% Phosphormolybdänsäure in Ethanol oder in Ioddampf. Es wird eine Blitzsäulenchromatographie mittels Kieselgel Silicagel 60 ausgeführt. Es werden Protonen NMR Spektren auf einem Bruker AC 300 MHz Kernmagnetresonanzspektrometer erhalten und in ppm δ Werten mittels Tetramethylsilan als interne Referenz angegeben. Die Schmelzpunkte werden mittels eines elektrothermischen Schmelzpunktgeräts erhalten und sind nicht korrigiert. Die CI Massenspektrometrieanalysen werden auf einem Shimadzu QP-5000 GC/Massenspektrometer (Methan) durch direkte Injektion ausgeführt. Die API Massenspektrometrieanalysen werden auf einem Finnegan LCQ Duo Ion Trap oder einem PESCiex API 150EX Massenspektrometer mittels Elektronensprayionisation (ESI) oder einer chemischen Ionisation bei atmosphärischem Druck (APCI) ausgeführt. Die HPLC Analysen werden mittels einer Waters Symmetry C18, 5 μ m, WAT046980, 3,9 × 150 mm Säule ausgeführt. Das Elutionssystem besteht aus 90:10 (0,1% TFA in H₂O)/(0,1% TFA in CH₃CN) Gradientenelution bis 10:90 (0,1% TFA in H₂O)/(0,1% TFA in CH₃CN) über 20 Minuten, gefolgt von einer isokratischen 10:90 (0,1% TFA in H₂O)/(0,1% TFA in CH₃CN) Elution für 10 Minuten, gefolgt von einer isokratischen 90:10 (0,1% TFA in H₂O)/(0,1% TFA in CH₃CN) Elution für 10 Minuten. Die Flussrate beträgt 1 ml/min. Die UV Detektion wird sowohl bei 214 nm als auch 254 nm ausgeführt.

Präparation 1

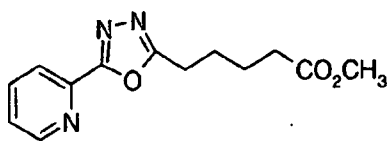
6-Oxo-6-[N'-(pyridin-2-carbonyl)hydrazino]hexansäuremethylester



[0025] Eine Lösung aus 2-Picolinylhydrazid (8,05 g, 58,8 mmol) und Adipinsäuremonomethylchlorid (10,5 g, 58,8 mmol) in DMF (117 ml) bei Raumtemperatur unter Stickstoff wird für 12 Stunden gerührt. Das Lösemittel wird unter verringertem Druck entfernt. Der Rückstand wird mit Diethylether (300 ml) behandelt, die Feststoffe werden durch Filtration gesammelt, in Wasser (200 ml) gelöst und mit Ethylacetat (200 ml) gewaschen. Der pH wird mit einer gesättigten NaHCO₃ Lösung auf 8 eingestellt und es wird mit Ethylacetat (2 × 200 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel wird unter verringertem Druck unter Bildung von 6-Oxo-6-[N'-(pyridin-2-carbonyl)hydrazino]hexansäuremethylester entfernt (3,85 g, 59%).

Beispiel 1

5-(5-Pyridin-2-yl[1,3,4]oxadiazol-2-yl)pentansäuremethylester



[0026] Triethylamin (14,4 ml, 104 mmol) wird zu einem Gemisch aus 6-Oxo-6-[N'-(pyridin-2-carbonyl)hydrazino]hexanoctansäuremethylester (9,63 g, 34 mmol), Tetrachlorkohlenstoff (26,6 g, 172 mmol) und Triphenylphosphin (20,3 g, 78 mmol) in Acetonitril (35 ml) bei Raumtemperatur unter Stickstoff gegeben und für 30 Minuten gerührt. Die Feststoffe werden durch Filtration entfernt und dann wird das Filtratlösemittel unter verringertem Druck entfernt. Der Rückstand wird mit Wasser (500 ml) verdünnt und mit Ethylacetat (3 × 500 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden mit Kochsalzlösung (200 ml) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel wird unter verringertem Druck entfernt. Der Rückstand wird mit Ethylacetat behandelt und die Feststoffe werden unter Bildung von 5-(5-Pyridin-2-yl[1,3,4]oxadiazol-2-yl)pentansäuremethylester (8,15 g, 91%) gewonnen.

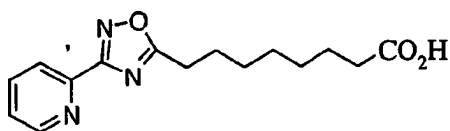
Beispiel 2

5-(5-Pyridin-2-yl[1,3,4]oxadiazol-2-yl)pentansäure

[0027] 2 N Natriumhydroxid (20 ml) wird zu einer Lösung aus 5-(5-Pyridin-2-yl[1,3,4]oxadiazol-2-yl)pentansäuremethylester (8,16 g, 31 mmol) in THF (60 ml) und Methanol (20 ml) bei Raumtemperatur unter Stickstoff gegeben und das Gemisch wird für 12 Stunden bei Rückfluss erhitzt. Das Lösemittel wird unter verringertem Druck entfernt, der Rückstand wird mit Wasser (500 ml) verdünnt und mit Ethylacetat (200 ml) gewaschen. Man stellt den pH der wässrigen Phase auf pH 3 mit konzentrierter HCl ein und extrahiert mit Ethylacetat (3 × 200 ml). Die organischen Extrakte werden mit Kochsalzlösung (200 ml) vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel wird unter verringertem Druck unter Bildung von 5-(5-Pyridin-2-yl[1,3,4]oxadiazol-2-yl)pentansäure (2,05 g, 27%) entfernt. APCI Massenspektrum m/z 246 $[C_{12}H_{13}N_3O_3 + H]^+$.

Beispiel 3

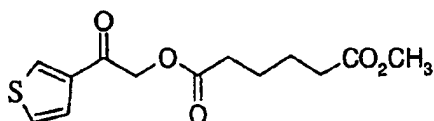
8-(3-Pyridin-2-yl[1,2,4]oxadiazol-5-yl)octansäure



[0028] 2 N Natriumhydroxid (20 ml) wird zu einer Lösung aus 8-(3-Pyridin-2-yl[1,2,4]oxadiazol-5-yl)-octanoat in Methanol (100 ml) bei Raumtemperatur unter Stickstoff gegeben und das Gemisch wird für 3 Stunden gerührt. Das Lösemittel wird unter verringertem Druck entfernt, der Rückstand wird mit Wasser verdünnt und mit Diethylether gewaschen. Die wässrige Phase wird mit 2 N HCl auf pH 1 eingestellt und die Feststoffe werden durch Vakuumfiltration unter Bildung der Titelverbindung gewonnen. APCI Massenspektrum m/z 288 $[C_{15}H_{19}N_3O_3-H]^-$.

Präparation 2

Methyl-2-oxo-2-thiophen-3-ylhexandioat

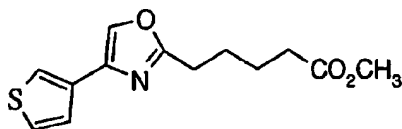


[0029] Eine Lösung aus Natriumbicarbonat in Wasser wird zu einer Lösung aus Suberinsäuremonomethylester in Methanol (50 ml) bei Raumtemperatur gegeben und das Gemisch wird für 30 Minuten gerührt. Das Lösemittel wird unter verringertem Druck entfernt und der Rückstand wird zu einer Lösung aus 2-Brom-1-thio-

phen-3-ylethanon in Aceton bei Raumtemperatur unter Stickstoff gegeben. Das Gemisch wird für 10 Stunden am Rückfluss erhitzt und dann wird das Lösemittel unter verringertem Druck entfernt. Der Rückstand wird mit Diethylether verdünnt, für 20 Minuten gerührt, durch eine kurze Silicagelsäule filtriert und zweimal mit Diethylether gewaschen. Das Lösemittel wird unter verringertem Druck unter Bildung der Titelverbindung entfernt.

Beispiel 4

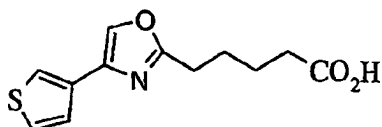
Methyl-5-(4-thiophen-3-yloxazol-2-yl)pentanoat



[0030] Ein Gemisch aus Methyl-2-oxo-2-thiophen-3-ylhexandioat, Acetamid und Bortrifluoriddiethyletherat wird bei 135–140°C unter Stickstoff für 4 Stunden erhitzt. Das Gemisch wird gekühlt, mit gesättigter NaHCO₃ Lösung verdünnt und mit Ethylacetat extrahiert. Der organische Extrakt wird mit gesättigtem wässrigem Natriumchlorid (Kochsalzlösung) gewaschen und unter Natriumsulfat getrocknet. Das Lösemittel wird unter verringertem Druck entfernt und der Rückstand wird durch Blitzsäulenchromatographie auf Silicagel gereinigt, wobei mit Hexan/Ethylacetat unter Bildung der Titelverbindung eluiert wird. APCI Massenspektrum m/z 266 [C₁₃H₁₅NO₃S + H]⁺.

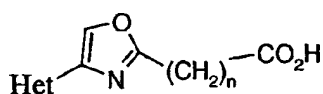
Beispiel 5

5-(4-Thiophen-3-yloxazol-2-yl)pentansäure



[0031] Eine Lösung aus Natriumhydroxid in Wasser wird zu einer Lösung aus Methyl-5-(4-thiophen-3-yloxazol-2-yl)pentanoat in Methanol bei Raumtemperatur gegeben und das Gemisch wird für 2 Stunden bei 40°C erhitzt. Der pH des Gemisches wird mit 1 N HCl auf 2 eingestellt und es wird mit Ethylacetat extrahiert. Der organische Extrakt wird dreimal mit Wasser extrahiert, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel wird unter verringertem Druck entfernt. Der Rückstand wird mit Hexan/Ethylacetat behandelt und die Feststoffe werden durch Filtration unter Bildung der Titelverbindung gewonnen: APCI Massenspektrum m/z 252 [C₁₂H₁₃NO₃S + H]⁺.

[0032] Die Beispiele 6 bis 11, nämlich die Verbindungen der Formel II(a), die unten in Tabelle 1 aufgeführt sind, werden durch dasselbe Verfahren hergestellt, wie dies für die Herstellung der Verbindung von



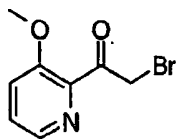
II(a)

Tabelle 1: Verbindungen der Formel II(a)

Beispiel	Het	n	Massenspektrum m/z
6	Thien-2-yl	4	252 [C ₁₂ H ₁₃ NO ₃ S + H] ⁺
7	Pyrid-2-yl	4	247 [C ₁₃ H ₁₄ N ₂ O ₃ + H] ⁺
8	3-Hydroxythien-2-yl	4	268 [C ₁₂ H ₁₃ NO ₄ S + H] ⁺
9	Pyrid-3-yl	4	247 [C ₁₃ H ₁₄ N ₂ O ₃ + H] ⁺
10	Pyrid-4-yl	4	247 [C ₁₃ H ₁₄ N ₂ O ₃ + H] ⁺
11	3-Hydroxythien-2-yl	2	238 [C ₁₀ H ₉ NO ₄ S - H] ⁻

Präparation 3

2-Brom-1-(3-methoxy-pyridin-2-yl)ethanon



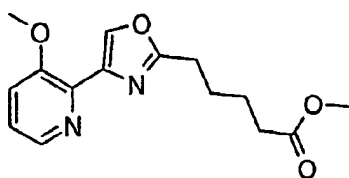
[0033] Natriumhydrid (5,91 g, 147,8 mmol) wird zu einer schnell gerührten Lösung aus 2-Brom-3-pyridinol in DMF (wasserfrei, 200 ml) gegeben. Nach 30 Minuten wird Iodmethan (9,2 ml, 147,8 mmol) zugegeben und unter N_2 für 2,5 Stunden gerührt. Es wird mit Wasser gestoppt und konzentriert. Es erfolgt eine Aufteilung zwischen Et_2O und Wasser und die Phasen werden getrennt. Es wird mit Et_2O aus der wässrigen Phase extrahiert (2x), die vereinigten Phasen werden über $MgSO_4$ getrocknet und konzentriert. Der Rückstand wird durch Blitzchromatographie auf Silicagel gereinigt, wobei mit 0 bis 25% $EtOAc/Hexan$ unter Bildung von 2-Brom-3-methoxy-pyridin gereinigt wird (21,0 g, 83%).

[0034] Es wird Kupfer(I)-iodid (38 mg, 0,2 mmol) zu einem Gemisch aus 2-Brom-3-methoxy-pyridin (188 mg, 1,0 mmol), Tributyl(1-ethoxyvinyl)zinn (0,68 ml, 2,0 mmol) und DMF (wasserfrei, 4 ml) in einem verschlossenen Röhrchen gegeben. Es wird mit N_2 gespült und für 3 Stunden auf $80^\circ C$ erhitzt. Das Gemisch wird durch Blitzchromatographie auf Silicagel gereinigt, wobei mit 0 bis 30% $EtOAc/Hexan$ unter Bildung von 2-(1-Ethoxyvinyl)-3-methoxy-pyridin (151 mg, 84%) eluiert wird.

[0035] Es wird N-Bromsuccinimid (306 mg, 1,7 mmol) zu einer gerührten Lösung aus 2-(1-Ethoxyvinyl)-3-methoxy-pyridin (305 mg, 1,7 mmol) in THF (30 ml) und Wasser (2 ml) gegeben. Es wird für 15 Minuten bei RT unter N_2 gerührt. Es wird auf SiO_2 absorbiert und durch Blitzchromatographie auf Silicagel gereinigt, wobei mit 0 bis 40% $EtOAc/Hexan$ unter Bildung der Titelverbindung (211 mg, 54%) gereinigt wird.

Beispiel 12

5-[4-(3-Methoxy-pyridin-2-yl)oxazol-2-yl]pentansäuremethylester



[0036] Es wird Bortrifluoretherat (0,30 ml, 1,00 mmol) zu einem verschlossenen Röhrchen gegeben, worin 2-Brom-1-(3-methoxy-pyridin-2-yl)ethanon (231 mg, 1,00 mmol), 5-Carbamoylpentansäuremethylester (222 mg, 1,39 mmol) und THF (wasserfrei, 3 ml) enthalten sind. Es wird mit N_2 gespült, verschlossen und über Nacht bei $80^\circ C$ erhitzt. Es erfolgt eine Aufteilung zwischen gesättigter, wässriger $NaHCO_3$ Lösung und 20% $i-PrOH/CHCl_3$ und die Phasen werden getrennt. Es wird mit $i-PrOH/CHCl_3$ (3x) aus der wässrigen Phase extrahiert, die vereinigten Phasen werden mit $MgSO_4$ getrocknet und konzentriert. Es wird auf SiO_2 absorbiert und durch Blitzchromatographie auf Silicagel gereinigt, wobei mit 1 bis 3% $Methanol/CHCl_3$ unter Bildung der Titelverbindung (97 mg, 33%) eluiert wird. MS (IS) 291 ($M + 1$)⁺.

Beispiel 13

5-[4-(3-Hydroxypyridin-2-yl)oxazol-2-yl]pentansäure

[0037] 5-[4-(3-Methoxy-pyridin-2-yl)oxazol-2-yl]pentansäuremethylester wird mit Bortribromid behandelt, wonach eine Standardhydrolyse unter Bildung der Titelverbindung erfolgt.

Formulierung

[0038] Da die Verbindung der Formel II einen basischen und/oder sauren Rest enthalten kann (das heißt Amino- und/oder Carbonsäure) kann die Verbindung als pharmazeutisches Salz formuliert werden, beispielsweise als Natrium- oder Hydrochloridsalz oder als Salz, wie dies in "Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use", Weinheim, New York: VHCA, Wiley-VCH, 2002 beschrieben ist. Die Verbindung der For-

mel II wird vorzugsweise in einer Dosierungsform formuliert, das heißt in einem individuellen Abgabeträger, beispielsweise einer Tablette oder einer Kapsel, bevor sie an den empfangenden Patienten verabreicht wird. Daher ist eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung eine pharmazeutische Zusammensetzung, die eine Verbindung der Formel II oder ein pharmazeutisches Salz hiervon, einen Wirkstoff und einen pharmazeutischen Träger enthält.

[0039] Die vorliegenden pharmazeutischen Zusammensetzungen werden durch bekannte Verfahren gut bekannter und leicht verfügbarer Inhaltsstoffe hergestellt. Bei der Herstellung der erfindungsgemäßen Formulierungen wird das Abgabemittel (Verbindung der Formel II) mit einem Wirkstoff gemischt und wird gewöhnlich mit einem Träger gemischt oder durch einen Träger verdünnt oder in einen Träger eingeschlossen, der in Form einer Kapsel, eines Sachets, eines Papiers oder eines anderen Behälters vorliegen kann. Wenn der Träger als Verdünnungsmittel dient kann es ein festes, halbfestes oder flüssiges Material sein, das als Träger, Hilfsstoff oder Medium für den Wirkstoff dient.

Biologische Tests

Entwicklung der Formulierung des Abgabemittels

[0040] Für eine orale Dosierung einer GLP-1 Verbindung wird typischerweise für jede Formulierung ein pH Bereich von 7,4 bis 8,4 verwendet, während für ein MC4 Agonistpeptid für die Formulierung typischerweise ein pH Bereich von 6,8–7,2 (am typischsten 7,0) verwendet wird. Eine Zielabgabemittelkonzentration von 150 mg/ml ist auch in beiden Fällen typisch. Es werden anfängliche Machbarkeitsstudien ausgeführt, um die schließlichen Trägerformulierungen zu bestimmen.

[0041] Kurz gesagt werden 200 mg des Abgabemittels in ein Typ I Glasröhrchen gewogen, wozu 1 ml Milli Q Wasser zugegeben wird. Jedes Gemisch wird visuell auf Löslichkeit untersucht, wonach die Zugabe von NaOH, um die Löslichkeit zu erhöhen oder von HCl, um den pH zu senken, zur oralen Dosierung erfolgt. Die Formulierungen werden dann mit Milli Q Wasser auf 150 mg/ml verdünnt. Unter Verwendung dieses Ansatzes fallen die Formulierungen im allgemeinen in 3 Kategorien: Wässrig löslich, fast vollständig löslich (beispielsweise wenige verbleibende ungelöste Partikel, sehr feine wässrige Suspensionen oder trübe Lösungen) und wässrig, unlöslich (beispielsweise schwere Suspensionen). Abgabemittel, die eine wässrige Unlöslichkeit zeigen, werden erforderlichenfalls in 4% G/V (wässriger) Hydroxypropylcellulose (Klucel® LF, Hercules, Wilmington, DE) formuliert. In diesen Fällen werden zwischen 50 und 100 mg des Mittels in Klucel® LF in einem Typ I Glasröhrchen unter Bildung einer Konzentration von 200 mg/ml suspendiert. Für schwere wässrige und Klucel® LF Suspensionen werden die Präparationen für 3 Minuten auf Eis gekühlt, wonach eine Sondenultrabeschallung auf Eis für 30 Minuten mittels eines Misonix Sonicator® Ultrasonic Processor XL (3/16th Inch Mikrospitze) zur Verringerung der Partikelgröße erfolgt. Nach einer pH Einstellung mit NaOH oder HCl werden die Formulierungen dann auf 150 mg/ml mit Milli Q Wasser oder Klucel® LF verdünnt.

Formulierung von Stammlösungen des Wirkstoffs

[0042] Die GLP-1 Verbindungen (beispielsweise Val⁸-Glu²²-GLP-1(7-37)OH und Val⁸-Glu²²-I³³-GLP-1(7-37)OH und MC4 Agonistpeptide (beispielsweise Ac-Arg-cyclo[Cys-Glu-His-D-Phe-Arg-Trp-Cys]-NH₂, Ac-cyclo[hCys-His-D-Phe-Arg-Trp-Cys]-NH₂, Ac-cyclo[hCys-His-D-Phe-Arg-Trp-Penicillamin]-NH₂ und N-Cyclohexancarboxylcyclo[hCys-His-D-Phe-Arg-Trp-Penicillamin]-NH₂) wie sie hierin verwendet werden, sind in WO 03 072 195 A und der Patentanmeldung PCT/US04/16625 vom 17. Juni beschrieben.

[0043] Eine Stammlösung der GLP-1 Wirkstoffverbindung wird folgendermaßen hergestellt. Kurz gesagt wird eine bekannte Menge an lyophilisiertem Wirkstoff in ein Typ 1 Glasröhrchen eingewogen. Dann wird MilliQ Wasser unter Bildung einer Anfangskonzentration von etwa 7–10 mg/ml zugegeben. Die vollständige Löslichkeit des Peptids wird durch langsame Erhöhung des pH des Mediums auf 10,5 mit 1 N NaOH und 5 N NaOH, gefolgt von einer Inkubation bei Raumtemperatur für 30 Minuten erreicht. Ein Volumen an 1 M Tris Puffer pH 8,0 wird unter Bildung einer Pufferkonzentration von 20 mM Tris zugegeben und der pH wird mit 1 N HCl und 5 N NaOH auf pH 7,8 eingestellt. Die Lösung wird dann durch ein 0,2 µm Spritzenfilter mit geringer Proteinbindung (Millex GV, Millipore) filtriert. Die Konzentration des Peptidfiltrats wird durch UV Spektroskopie (λ_{max} = 280 nm) bestimmt. Die Lösung wird dann in eine Stammkonzentration von etwa 5,0 mg/ml mittels 20 mM Tris Puffer pH 7,8 verdünnt. Die Wirkstofflösung wird in 1,0 ml Aliquots bei –70°C bis zur Verwendung gelagert.

[0044] Eine Stammlösung des MC4R Agonistpeptids wird folgendermaßen hergestellt. Kurz gesagt wird eine

bekannte Menge an lyophilisiertem MC4R Agonistpeptid in ein Typ I Glasröhrchen eingewogen. Milli Q Wasser wird dann unter Bildung einer Anfangskonzentration von etwa 19–21 mg/ml zugegeben. Der pH wird mit 1 N NaOH und 5 N NaOH auf 6,0 angehoben, wonach eine Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur erfolgt. Die Konzentration der Peptidlösung wird durch UV Spektroskopie (max = 280 nm, Lichtbrechungskorrektur wird zwischen 250 nm und 410 nm angewendet) bestimmt. Die Lösung wird dann als Stammlösung mit einer Konzentration von etwa 20,0 mg/ml gelagert. Die Peptidlösung wird gelagert und bis zur Verwendung bei 4–8°C gekühlt.

Orales Rattenabgabeverfahren

[0045] Männliche Sprague-Dawley Ratten (kanülierte Femoralarterie, Charles River, Wilmington, MA), die 250–300 g wiegen, werden in diesen Studien verwendet. Die Tiere werden in Einzeledelstahlkäfigen gehalten und gemäß den Eli Lilly and Company Animal Care and Use Policies & Procedures versorgt. Die Tiere lässt man für mindestens 12 Stunden fasten (mit freiem Zugang zu Wasser), bevor die Dosis verabreicht wird. Jedes Experiment (Abgabemittel + Wirkstoff) wird in einer Gruppe an 4 Ratten ausgeführt. Die Endformulierungen für jedes Abgabemittel werden etwa 5 bis 10 Minuten vor der in vivo Dosierung frisch hergestellt.

[0046] Genauer gesagt wird die Abgabemittelformulierung (165 mg/ml Stammlösung) und die GLP-1 Wirkstoffverbindung (–5,0 mg/ml Stammlösung) unter Bildung eines Gemisches aus Abgabemittel + Wirkstoff zusammengegeben. Die Endkonzentrationen in jeder Formulierung sind jeweils 150 mg/ml und 0,5 mg/ml. Die Formulierungen werden durch eine orale Verabreichung (p.o.) für eine schließliche Dosis von 300 mg/kg Abgabemittel und 1,0 mg/kg Wirkstoff dosiert. 1 ml Blutproben werden in EDTA Röhrchen aus der systemischen Kanüle (Femoralarterie) von jedem Tier nach 5, 10 und 20 Minuten (eine Probe/Zeitpunkt) gewonnen. Die Röhrchen werden auf Eis unmittelbar nach der Gewinnung gekühlt und bei etwa 5°C/3000 Upm/15 Minuten zentrifugiert. Das Plasma wird entfernt, in 12 × 75 mm Polypropylenprobenröhrchen mit Schnappdeckeln gegeben und sofort bei –70°C gelagert, bis sie durch einen Radioimmuntest analysiert werden.

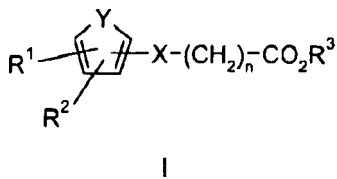
[0047] Im Fall eines MC4 Agonistpeptidwirkstoffs werden die Abgabemittelformulierung (±165 mg/ml Stammlösung) und die Peptidlösung (–20,0 mg/ml Stammlösung) unter Bildung eines Gemisches aus Abgabemittel und Wirkstoff zusammengegeben. Die Endkonzentrationen in jeder Formulierung betragen jeweils 150 mg/ml und 5,0 mg/ml. Die Formulierungen werden durch eine orale Gabe (p.o.) für eine schließliche Dosis von 300 mg/kg Abgabemittel und 10,0 mg/kg Wirkstoff dosiert. 0,40 ml Blutprobe werden in Heparinröhrchen aus der systemischen Kanüle (Femoralarterie) von jedem Tier nach 5, 15, 30, 60, 90 und 120 Minuten (eine Probe/Zeitpunkt) entnommen. Die Röhrchen werden auf Eis unmittelbar nach der Gewinnung gekühlt und bei etwa 5°C/3000 Upm/15 Minuten zentrifugiert. Das Plasma wird entfernt, in Platten mit 96 Vertiefungen überführt und unmittelbar bei –70°C gelagert, bis es durch eine LC/MS/MS analysiert wird.

Radioimmuntest und Pharmakokinetikanalyse

[0048] Die Konzentrationen an immunreaktivem Mittel in Rattenplasma werden durch einen Radioimmuntest getestet, der unspezifisch natives Peptid und metabolische Produkte detektiert. Diese Konzentrationen werden anschließend verwendet, um die angegebenen pharmakokinetischen Parameter zu bestimmen. Die Plasma-proben werden mit radioaktiv markiertem Mittel und polyklonalem Kaninchenantiserum gemischt und dann über Nacht bei –4°C inkubiert. Gebundene und freie Formen an immunreaktivem Mittel werden durch Fällen der gebundenen Fraktion durch Polyethylenglycol-gestützte, Fällung durch sekundären Antikörper getrennt. Nach dem Sammeln der gebundenen Fraktion durch Zentrifugation wird die Radioaktivität durch einen gamma Zähler gemessen. Die Daten werden durch einen gewichteten logistischen Algorithmus mit 4/5 Parameter analysiert. Für GLP-1 Verbindungen reicht die Standardkurve von 9,8 pg/ml bis 10 000 pg/ml und die oberen und unteren Quantifizierungsgrenzen betragen jeweils 150 pg/ml und 4000 pg/ml. Für die MC4 Agonistpeptide reicht die Standardkurve von 5,0 ng/ml bis 5000 ng/ml und die oberen und unteren Quantifizierungsgrenzen betragen jeweils 10 ng/ml und 5000 ng/ml. Die pharmakokinetische Analyse wird mittels WinNonlin® Version 3.0 (Pharsight Corporation, Mountain View, CA) ausgeführt. Die Plasmakonzentrationszeitdaten werden als Mittel ± Standardabweichung (SD) angegeben. Die Effizienz des Abgabemittels wird als Fläche unter der Plasmakonzentrations-Zeitkurve definiert, die von 0 bis 20 Minuten (AUC) des Wirkstoffs jeweils in Gegenwart des Abgabemittels gemessen wird. Repräsentative Verbindungen der Formel II (Abgabemittel) werden mit einem Wirkstoff im oralen Rattenabgabetest gemessen und die AUC des Wirkstoffs in Gegenwart des Abgabemittels ist größer als die AUC des Wirkstoffs in Abwesenheit des Abgabemittels.

Patentansprüche

1. Verbindung der Formel I

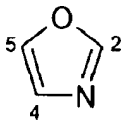


worin

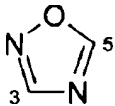
R¹ und R² jeweils unabhängig für H, OH, Cyano, C₁-C₆ Alkyl, C₁-C₆ Alkoxy, CF₃, Halogen oder NR⁴R⁴ stehen,

R³ für H oder C₁-C₆ Alkyl steht,

X steht für



worin der Pyridin- oder Thiophensubstituent an das Kohlenstoffatom Nummer 4 gebunden ist und der (CH₂)_nCO₂R³ Rest an das Kohlenstoffatom Nummer 2 gebunden ist, oder für



worin der Pyridin- oder Thiophensubstituent an das Kohlenstoffatom Nummer 3 gebunden ist und der (CH₂)_nCO₂R³ Rest an das Kohlenstoffatom Nummer 5 gebunden ist,

Y für S, CR⁵ = N oder N = CR⁵ steht,

n für 2, 3, 4, 5, 6 oder 7 steht,

R⁴ für H, COR⁶, SO₂R⁷ oder C₁-C₆ Alkyl steht,

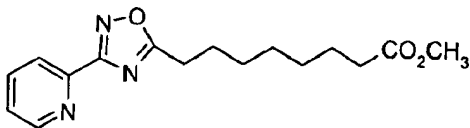
R⁴ für H oder C₁-C₆ Alkyl steht,

R⁵ für H steht oder mit X eine Bindung bildet,

R⁶ für H oder C₁-C₆ Alkyl steht, und

R⁷ für H oder C₁-C₆ Alkyl steht,

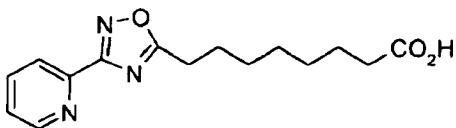
oder ein pharmazeutisches Salz hiervon, worin die Verbindung der Formel I nicht steht für



2. Verbindung nach Anspruch 1, worin R² jeweils unabhängig für H, OH, C₁-C₆ Alkyl, C₁-C₆ Alkoxy, CF₃, Halogen oder NR⁴R⁴ steht.

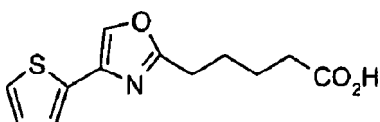
3. Verbindung nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, worin R³ für H steht.

4. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, die folgende ist



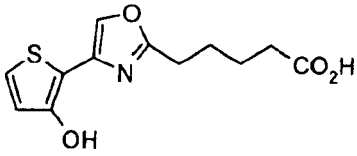
oder ein pharmazeutisches Salz hiervon.

5. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, die folgende ist



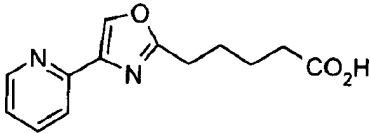
oder ein pharmazeutisches Salz hiervon.

6. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, die folgende ist



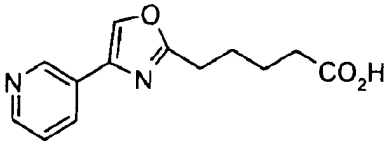
oder ein pharmazeutisches Salz hiervon.

7. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, die folgende ist



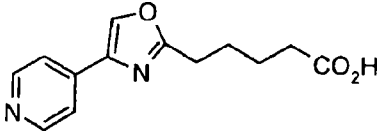
oder ein pharmazeutisches Salz hiervon.

8. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, die folgende ist



oder ein pharmazeutisches Salz hiervon.

9. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, die folgende ist



oder ein pharmazeutisches Salz hiervon.

10. Pharmazeutische Zusammensetzung, die umfasst:

- a) eine Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 9 oder ein pharmazeutisches Salz hiervon, und
- b) eine GLP-1 Verbindung

11. Zusammensetzung nach Anspruch 10, worin die GLP-1 Verbindung Val⁸-Glu²²-GLP-1(7-37)OH ist.

12. Pharmazeutische Zusammensetzung, die umfasst

- a) eine Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 9 oder ein pharmazeutisches Salz hiervon, und
- b) ein MC4 Agonistpeptid.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen