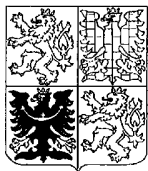


# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **05.06.1998**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **25.06.1997**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1997/050723**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **17.05.2000**  
(Věstník č. 5/2000)

(86) PCT číslo: **PCT/IB98/00874**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO98/58948**

(21) Číslo dokumentu:

**1999 - 4586**

(13) Druh dokumentu: **A3**

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

**C 07 K 5/023**

**A 61 K 38/06**

**C 07 D 401/06**

**C 07 D 471/04**

//(A 61 P 19/10, C 07 D 471/04, C 07 D  
231:00, C 07 D 221:00)

(71) Přihlašovatel:

PFIZER PRODUCTS INC., Groton,  
CT, US;

(72) Původce:

Carpino Philip Albert, Groton, CT, US;  
DaSilva-Jardine Paul Andrew, Providence, RI,  
US;  
Lefker Bruce Allen, Gales Ferry, CT, US;  
Murry Jerry Anthony, East Haddam, CT, US;

(74) Zástupce:

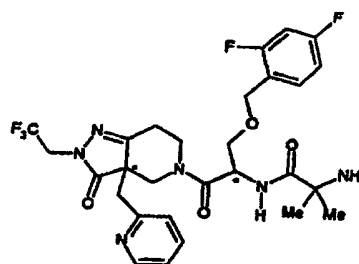
Hořejš Milan Dr. Ing., Národní 32, Praha 1,  
110 00;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Vinanová sůl substituovaného dipeptidu jako  
sekretagog růstového hormonu**

(57) Anotace:

Soli (L)-kyseliny vinné 2-amino-N-[1-(2,4-difluorbenzyloxymethyl)-2-oxo-2-[3-oxo-3a-pyridin-2-ylmethyl-2-(2,2,2-trifluormethyl)-2,3,3a,4,6,7-hexahydropyrazolo[4,3-c]pyridin-5-yl]ethyl]-2-methylpropionamidu, která je sekretagem růstového hormonu a jako taková je vhodná pro zvýšení hladiny endogenního růstového hormonu. Meziprodukty, které jsou vhodné při syntéze této sloučeniny. Sůl (L)-kyseliny vinné sloučeniny je užitečná pro léčení a/nebo prevenci osteoporózy rezistence na inzulín a jiných stavů nebo nemocí spojených s deficitem růstového hormonu. Sůl (L)-kyseliny vinné sloučeniny je také vhodná při léčení osteoporózy, když se použije v kombinaci s: bisfosfonovou sloučeninou, estrogenem, premarinem a případně progesteronem, agonistou nebo antagonistou estrogenu nebo kalcitoninem. Farmaceutické kompozice.



(L)

15.12.99

PV 1999-4586

Vinanová sůl substituovaného dipeptidu jako sekretagog  
růstového hormonu

#### Oblast vynálezu

Vynález se týká soli (L)-(+)-kyseliny vinné a 2-amino-N-{1-(R)-(2,4-difluorbenzyloxymethyl)-2-oxo-2-[3-oxo-3a-(R)-pyridin-2-ylmethyl-2-(2,2,2-trifluorethyl)-2,3,3a,4,6,7-hexahydropyrazolo[4,3-c]pyridin-5-yl]ethyl}-2-methylpropionamidu, která je sekretagogem růstového hormonu.

Růstový hormon (GH), který je sekretován z hypofýzní žlázy, stimuluje růst všech tkání těla, které jsou schopné růst. Navíc růstový hormon je znám, že má následující základní účinky na metabolické procesy těla:

1. zvýšená míra syntézy proteinů v podstatě všech buněk těla,
2. snížená míra využití cukrů v buňkách těla, a
3. zvýšená mobilizace volných mastných kyselin a využití mastných kyselin pro energii.

Nedostatek růstového hormonu vede k různým lékařským poruchám. U dětí vyvolává zakrnělost. U dospělých důsledky získaného nedostatku GH zahrnuje hluboké snížení netučné hmoty těla a průvodní vzrůst celkového tělesného tuku zejména v trupové oblasti. Snížená skeletální hmota a hmota srdečního svalu a svalová síla vedou k význačnému snížení zátěžové kapacity. Hustota kostí se také sníží. Podávání exogenního růstového hormonu se ukázalo, že působí mnoho metabolických změn. Další výhody terapie zahrnují snížení LDL cholesterolu a zvýšenou psychologickou pohodu.

V případech, kde se vyžadují zvýšené hladiny růstového hormonu, se tento problém obecně řešil zajištěním exogenního

růstového hormonu nebo podáváním prostředku, který stimuluje produkci růstového hormonu a/nebo jeho uvolňování. V kterémkoli případě peptidická povaha sloučeniny požadovala, aby byla podávána injekčně. Zpočátku byla zdrojem růstového hormonu extrakce hypofýzních žláz z mrtvol. To mělo za následek drahý produkt a provádělo se to s rizikem, že nemoc spojená se zdrojem hypofýzní žlázy by mohla být přenesena na příjemce růstového hormonu (například Jacob Creutzfeldova nemoc).

V současné době se rekombinantní růstový hormon stal dostupným i když dále nepřináší jakékoli riziko přenosu nemoci, je však stále velmi drahým produktem, který musí být dáván injekčně nebo nasálním sprejem.

Většina GH deficiencí je vyvolána defekty v uvolňování GH, ne primárními defekty při hypofýzní syntéze GH. Tudíž alternativní strategie pro normalizování sérových GH úrovní je ve stimulaci jeho uvolňování ze somatotrofů. Zvýšení GH sekrece se může dosáhnout stimulací nebo inhibicí různých neuropřenašecích systémů v mozku a hypothalamu. Jako výsledek je sledován vývoj syntetických prostředků uvolňujících růstový hormon ke stimulaci hypofýzní GH sekrece a to může mít několik výhod na nákladnou a obtížnou terapii nahrazením GH. Působením fyziologických regulačních cest většina žádoucích prostředků by stimulovala pulsatilní sekreci GH a přílišné hladiny GH, které by byly spojeny s nežádoucími postranními účinky podávání exogenního GH by byly vyloučeny následkem intaktních negativních zpětněvazebných smyček.

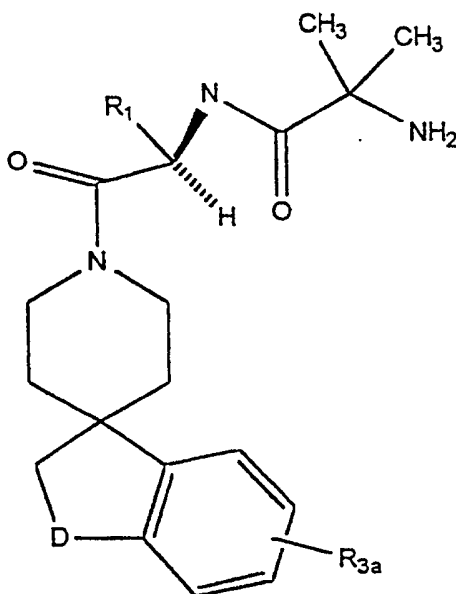
Fyziologické a farmakologické stimulanty sekrece GH zahrnují arginin, L-3,4-dihydroxyfenylalanin (L-DOPA), glukagon, vasopressin a insulin, vyvolaný hypoglykemií stejně jako aktivity jako je spánek a cvičení, které nepřímo vyvolávají uvolňování růstového hormonu z hypofýzy působením určitým způsobem na hypothalamus možná buď na snížení sekrece somatostatinu nebo na zvýšení sekrece známého sekretagogového

uvolňovacího faktoru růstového hormonu (GHRF) nebo neznámý exogenní růstový hormon uvolňující hormon nebo tyto všechny.

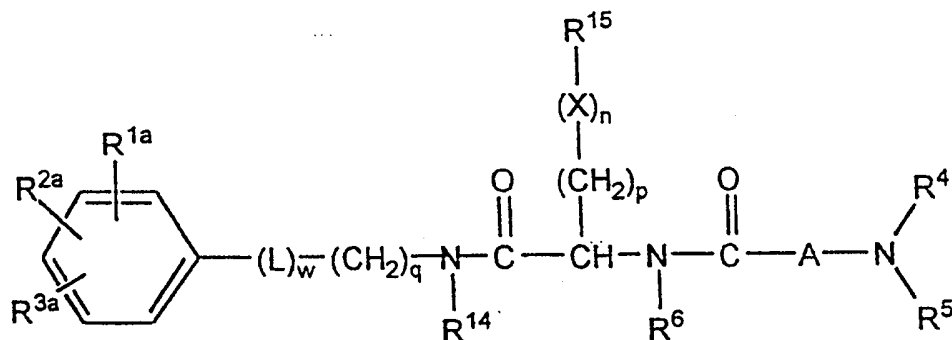
Vynález se také týká způsobu léčení insulinově rezistentních stavů jako je neinzulinově závislý diabetes (NIDD) a snížená glykemická kontrola spojená s obezitou a stárnutím u savců při jeho potřebě, což zahrnuje podávání těmto savcům účinného množství L-(+)-vinanové soli sloučeniny vzorce I jak bude dále ukázáno.

Byly vyvinuty jiné sloučeniny, které stimulují uvolňování endogenního růstového hormonu jako jsou analogické peptidylové sloučeniny vztažené k GRF nebo peptidy US patentu 4 411 890. Tyto peptidy, zatímco jsou značně menší než růstové hormony, jsou ještě citlivé na různé proteasy. U většiny peptidů je jejich potenciál pro <sup>orální</sup> biodostupnost nízký.

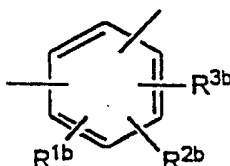
WO 94/13696 se týká určitých spiropiperidinů a homologů, které podněcují uvolňování růstového hormonu. Výhodné sloučeniny mají obecnou strukturu uvedenou níže.



WO 94/11012 se týká určitých dipeptidů, které podněcují uvolňování růstového hormonu. Tyto dipeptidy mají obecnou stukturu



kde L je



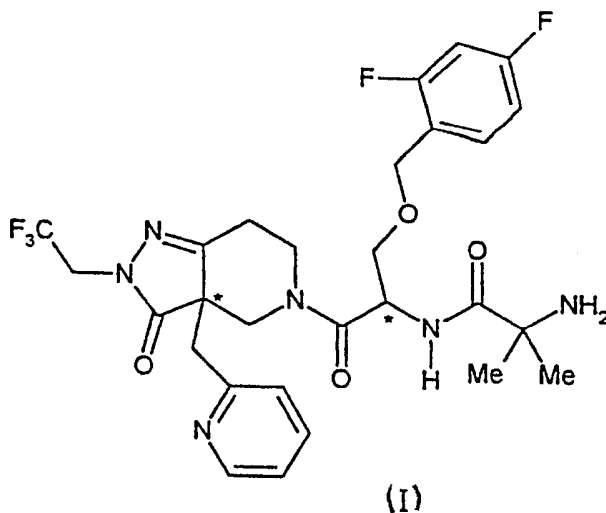
Sloučeniny WO 94/11012 a WO 94/13696 se označují jako užitečné při léčení osteoporózy v kombinaci s parathyroidním hormonem nebo bifosfonatem.

Je uvedeno všeobecné zveřejnění farmaceuticky akceptovatelných solí sloučeniny vzorce I z této přihlášky a volné báze sloučeniny vzorce I tohoto vynálezu a je nárokováno v souběžně projednávané PCT přihlášce PCT/IB 96/01353, která má mezinárodní datum přihlášení 4. prosince 1996, která je postoupena tomuto nabyvateli.

Bylo zjištěno, že sůl L-(+)-kyseliny vinné sloučeniny vzorce I uvedená níže, může být izolována v krystalické formě, která má výhodné vlastnosti jako je snadná příprava a formulace, vysoká rozpustnost, dobrá stabilita a je snadněji vyčištěna než nekrystalická forma.

Podstata vynálezu

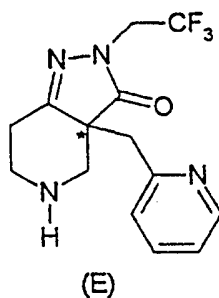
Vynález vytváří sůl L-(+)-kyseliny vinné sloučeniny vzorce I



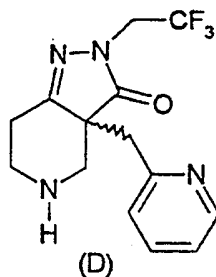
\* indikuje stereochemické centrum.

Výhodné sloučeniny vzorce I jsou stereochemické směsi nebo separované izomery mající konfigurace 3a-(S),1-(R); 3a-(S),1-(S); 3a-(R),1-(S); a/nebo 3a-(R),1-(R) isomery.

Vynález také vytváří způsob přípravy soli (D)-kyseliny vinné nebo (L)-kyseliny vinné sloučeniny vzorce (E)

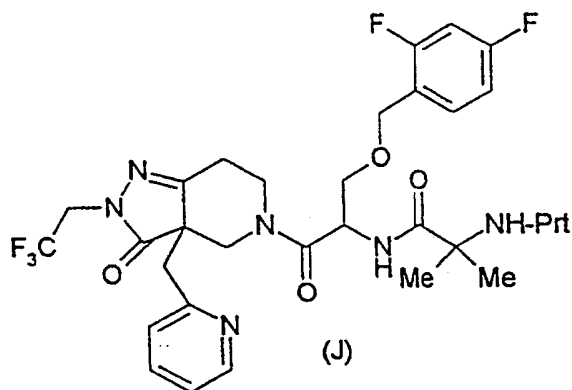


který zahrnuje reakci sloučeniny vzorce (D)

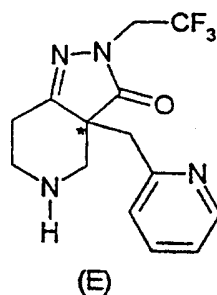


s (D)-kyselinou vinnou nebo (L)-kyselinou vinnou ve směsi acetonu a vody v poměru asi 8:1 až asi 9:1 při teplotě mezi asi 0 °C až teplotou místnosti. Výhodný je předcházející postup, kde (D)-kyselina vinná se nechá reagovat se sloučeninou vzorce D a sloučenina vzorce E má R-konfiguraci;

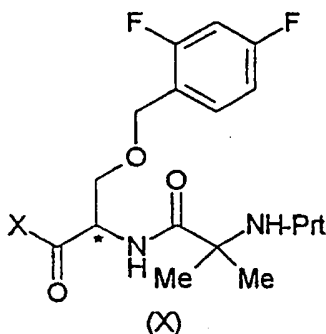
způsob přípravy sloučeniny vzorce J



který zahrnuje reakci sloučeniny vzorce E



se sloučeninou vzorce X



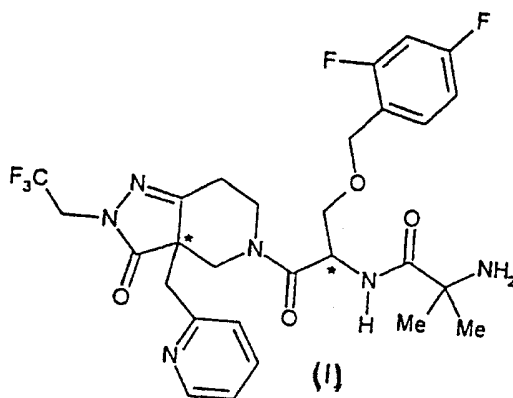
kde Prt je chránicí skupina aminu a

X je OH,  $-O(C_1-C_4)$ alkyl nebo halogen,

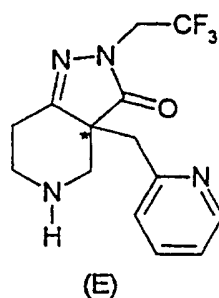
v přítomnosti organické báze a peptidového kondenzačního reagentu při teplotě mezi asi  $-78^\circ\text{C}$  až asi  $-20^\circ\text{C}$ .

Výhodný z bezprostředně předcházejícího postupu je ten, kde peptidový kondenzační reagent je cyklický anhydrid l-propanfosfonové kyseliny a sloučenina vzorce X má R-konfiguraci a sloučenina vzorce E má R-konfiguraci. Ještě výhodnější je, když Prt je terc.butoxykarbonyl v bezprostředně předcházejícím postupu, a

způsob pro přípravu soli (L)-(+)-kyseliny vinné sloučeniny vzorce I

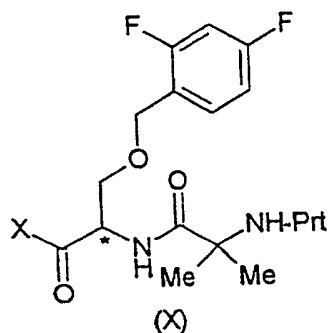


kdterý zahrnuje reakci sloučeniny vzorce E





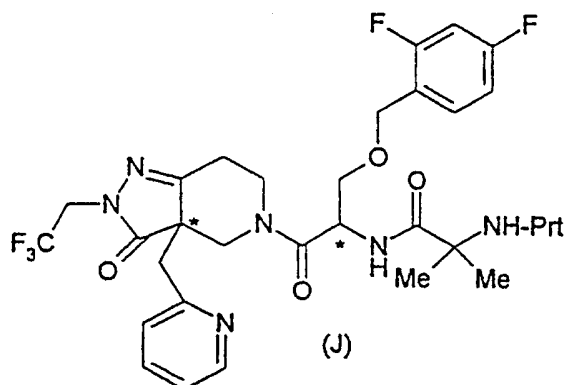
se sloučeninou vzorce X



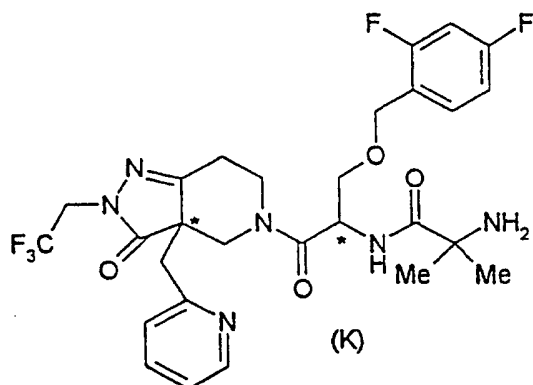
kde Prt je chránicí skupina aminu a

X je OH,  $-O(C_1-C_4)$ alkyl nebo halogen,

v přítomnosti organické báze a peptidového kondenzačního reagentu při teplotě mezi asi  $-78^{\circ}\text{C}$  až asi  $-20^{\circ}\text{C}$ , čímž se získá sloučenina vzorce J



deprotekci sloučeniny vzorce J za vhodných deprotekčních podmínek, čímž se získá sloučenina vzorce K

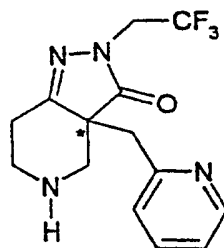


načež se nechá reagovat sloučenina vzorce K s (L)-(+)-kyselinou vinnou v reakčním inertním rozpouštědle, čímž se získá sůl (L)-(+)-kyseliny vinné sloučeniny vzorce I.

Výhodný z bezprostředně předcházejícího postupu je ten, kde Prt je terc.butoxykarbonyl, výhodnější z předcházejícího postupu je ten, kde peptidový kondenzační reagent je cyklický anhydrid l-propanfosfonové kyseliny a sloučenina vzorce I má absolutní a relativní konfiguraci 3a-(R), l-(R).

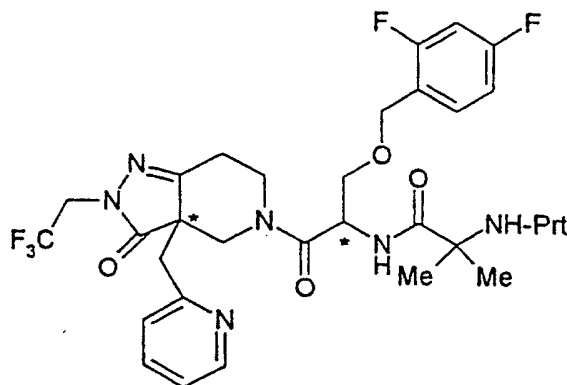
V dalším aspektu vynález vytváří:

R,S-enantiomerní směs, R-enantiomer nebo S-enantiomer sloučeniny vzorce



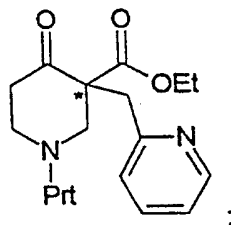
kde se dává přednost soli (D)-kyseliny vinné nebo (L)-kyseliny vinné,

3a-(R,S), l-(R) diastereoisomerní směs, 3a-(R),l-(R) diastereoisomer nebo 3a-(S), l-(R) diastereoisomer sloučeniny vzorce

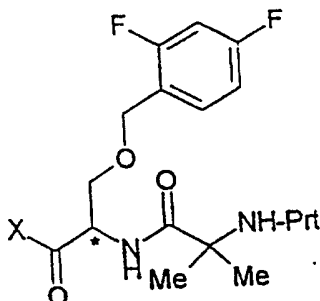


kde Prt je chránicí skupina aminu vybraná ze skupiny zahrnující t-BOC, FMOC a CBZ, a

R, S-enantiomerní směs, R-enantiomer nebo S-enantiomer sloučeniny vzorce



R,S-enantiomerní směs, R-enantiomer nebo S-enantiomer sloučeniny vzorce



kde X je OH,  $-O(C_1-C_4)$ alkyl nebo halogen a

Prt je chránicí skupina aminu a kde

X je OH, Prt je BOC a stereocentrum je v R-konfiguraci, čemuž se dává přednost.

V ještě dalším aspektu tento vynález vytváří (kde sloučenina vzorce I je znázorněna výše):

způsoby pro zvýšení hladin endogenního růstového hormonu u lidí nebo jiných živočichů, který zahrnuje podávání takové-  
muto člověku nebo živočichu účinného množství soli (L)-(+)-  
kyseliny vinné sloučeniny vzorce I,

farmaceutické kompozice, které zahrnují farmaceuticky akceptovatelný nosič a určité množství soli (L)-(+)-vinné kyseliny sloučeniny vzorce I,

farmaceutické směsi užitečné pro zvýšení endogenní produkce nebo uvolňování růstového hormonu u lidí nebo jiných živočichů, které zahrnují farmaceuticky akceptovatelný nosič, účinné množství soli (L)-(+)-kyseliny vinné sloučeniny vzorce I podle nároku 1 a sekretagog růstového hormonu vybraný ze skupiny zahrnující GHRP-6, hexarelin, GHRP-1, uvolňovací faktor růstového hormonu (GRF), IGF-1, IGF-2 a B-HT920 nebo jeho analog,

způsoby léčení nebo prevence osteoporózy, které zahrnují podávání člověku nebo jinému živočichu v případě takového léčení nebo prevence, určitého množství soli (L)-(+)-kyseliny vinné sloučeniny vzorce I, která je účinná při léčení nebo prevenci osteoporózy,

způsoby léčení nebo prevence nebo stavů, které mohou být léčeny nebo předcházeny růstovým hormonem, které zahrnují podávání člověku nebo jinému živočichu v případě takového léčení nebo prevence, určitého množství soli (L)-(+)-kyseliny vinné sloučeniny vzorce I, které je účinné při podněcování uvolňování endogenního růstového hormonu, přičemž výhodný je způsob, kde nemocí nebo stavem je městnavé selhání srdce, obezita nebo slabost spojená se stárnutím, také je výhodný způsob, kde nemoc nebo stav je městnavé selhání srdce, dále je výhodný způsob, kde nemocí nebo stavem je slabost spojená se stárnutím,

způsoby pro urychlenou nápravu kostních zlomenin, zeslabení proteinové katabolické odezvy po větší operaci, redukce kachexie a ztráty proteinů vlivem chronického onemocnění, urychlení hojení ran nebo urychlení uzdravování popálených pacientů nebo pacientů prošlých větším chirurgickým zákrokem, kteréžto metody zahrnují podávání živočichovi v případě potřeby takového léčení, účinného množství soli (L)-(+)-kyseliny vinné sloučeniny vzorce I, které je účinné při podněcování uvolňování endogenního růstového hormonu, výhod-

ný je způsob, kde je způsob pro akceleraci uzdravení pacientů prošlých větším chirurgickým zákrokem, také je výhodným způsob, který je pro urychlení nápravy kostních zlomenin,

způsoby pro zvýšení svalové síly, mobility, udržování tloušťky kůže, metabolickou homeostázu nebo renální homeostázu, kterýžto způsob zahrnuje podávání člověku nebo jinému živočichu v případě potřeby takového léčení, určitého množství soli (L)-(+)-kyseliny vinné sloučeniny vzorce I, které je účinné při podněcování uvolňování endogenního růstového hormonu,

způsoby pro léčení nebo prevenci osteoporózy, které zahrnují podávání člověku nebo jinému živočichu s osteoporózou, účinného množství bifosfonatové sloučeniny a soli (L)-(+)-kyseliny vinné sloučeniny vzorce I, výhodná je metoda pro léčení osteoporózy, kde bifosfonatovou sloučeninou je ibandronat, výhodná je metoda pro léčení osteoporózy, kde bifosfonatovou sloučeninou je alendronat,

způsoby pro léčení nebo prevenci osteoporózy, které zahrnují podávání člověku nebo jinému živočichu s osteoporózou, účinného množství estrogenu nebo Premarinu<sup>R</sup> a soli (L)-(+)-kyseliny vinné sloučeniny vzorce I a případně progesteronu,

způsoby pro léčení osteoporózy, které zahrnují podávání člověku nebo jinému živočichu s osteoporózou, účinného množství kalcitoninu a soli (L)-(+)-kyseliny vinné sloučeniny vzorce I,

způsoby zvýšení hladin IGF-1 u lidí nebo jiných živočichů deficientních na IGF-1, které zahrnují podávání člověku nebo jinému živočichu s IGF-1 deficiencí, účinného množství soli (L)-(+)-kyseliny vinné sloučeniny vzorce I,

způsoby pro léčení osteoporózy, které zahrnují odávání člověku nebo jinému živočichu s osteoporózou, účinného množství agonisty estrogenu nebo antagonisty estrogenu a soli

(L)-(+)-kyseliny vinné sloučeniny vzorce I, výhodný je způsob, kde agonist nebo antagonist estrogenu je tamoxifen, droloxifen, raloxifen nebo idoxifen, také je výhodný způsob, kde agonistou nebo antagonistou estrogenu je:

cis-6-(4-fluorfenyl)-5-[4-(2-piperidin-1-ylethoxy)fenyl]-5,6,7,8-tetrahydronaftalen-2-ol,

(-)-cis-6-fenyl-5-[4-(2-pyrrolidin-1-ylethoxy)fenyl]-5,6,7,8-tetrahydronaftalen-2-ol,

cis-6-fenyl-5-[4-(2-pyrrolidin-1-ylethoxy)fenyl]-5,6,7,8-tetrahydronaftalen-2-ol,

cis-1-[6'-pyrrolidinoethoxy-3'-pyridyl]-2-fenyl-6-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydronaftalen,

1-(4'-pyrrolidinoethoxyfenyl)-2-(4"-fluorfenyl)-6-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin,

cis-6-(4-hydroxyfenyl)-5-[4-(2-piperidin-1-ylethoxy)fenyl]-5,6,7,8-tetrahydronaftalen-2-ol, nebo

1-(4'-pyrrolidinoethoxyfenyl)-2-fenyl-6-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin,

způsoby zvýšení svalové hmoty, kteréžto způsoby zahrnují podávání člověku nebo jinému živočichu v případě takového léčení, účinného množství soli (L)-(+)-kyseliny vinné sloučeniny vzorce I,

způsoby pro podporu růstu u dětí s nedostatkem růstového hormonu, které zahrnují podávání růstového hormonu dětem s nedostatkem růstového hormonu, účinného množství soli (L)-(+)-kyseliny vinné nebo sloučeniny vzorce I,

způsoby pro léčení insulinové rezistence u savců, které zahrnují podávání uvedenému savci, účinného množství soli (L)-(+)-kyseliny vinné sloučeniny vzorce I, výhodný je způsob, kde stav spojený s insulinovou rezistencí je diabetes typ I, diabetes typ II, hypreglykemie, snížená tolerance vůči glukose nebo insulinový rezistenční syndrom, také je výhodný způsob, kde stav spojený s insulinovou rezistencí je spojen s obezitou nebo vysokým věkem,

způsoby pro zvýšení hladin endogenního růstového hormonu, které zahrnují podávání člověku nebo jinému zvířeti v případě potřeby, účinného množství funkčního antagonisty somatostatinu a soli (L)-(+)-kyseliny vinné sloučeniny vzorce I, výhodný je způsob, kde funkční antagonist somatostatinu je alfa-2 adrenergický agonist, a

způsoby léčení nebo prevence městnavého selhání srdce, obezity, slabosti spojené se stárnutím, které zahrnují podávání člověku nebo jinému živočichu v případě potřeby, účinného množství funkčního antagonisty somatostatinu a soli (L)-(+)-kyseliny vinné sloučeniny vzorce I.

Předložená sloučenina vzorce I podporuje uvolňování růstového hormonu, je stabilní za různých fyziologických podmínek a může být podávána parenterálně, nasálně nebo orální cestou.

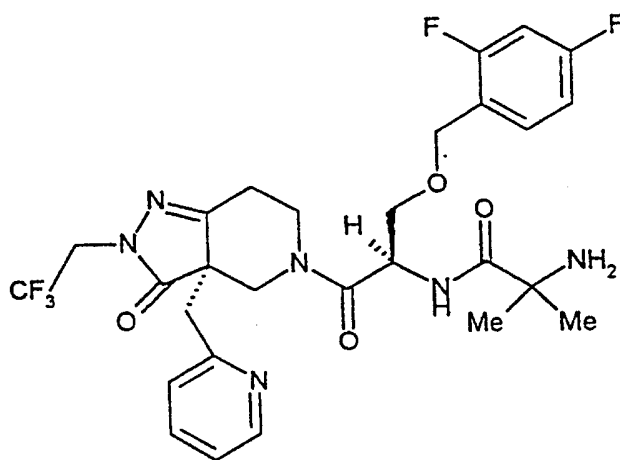
#### Podrobný popis vynálezu

(L)-(+)-vinanová sůl sloučeniny vzorce I může být vyrobena následujícími postupy, které zahrnují postupy známé v chemickém stavu techniky pro přípravu sloučenin.

Určité postupy pro přípravu soli (L)-(+)-kyseliny

vinné sloučeniny vzorce I jsou vytvořeny jako další rysy tohoto vynálezu a jsou znázorněny reakčními schématem uvedeným dále.

Sloučenina předloženého vynálezu má absolutní a relativní konfiguraci jak je uvedeno níže



I

která je označena jako 3a-(R),1-(R) konfigurace. Může být připravena dále popsáním způsobem.

Růstový hormon uvolňující sůl (L)-(+)-kyseliny vinné sloučeniny vzorce I je užitečná in vitro jako unikátní nástroj pro porozumění jak se reguluje sekrece růstového hormonu v hypofýzní hladině. To zahrnuje použití při vyhodnocování mnoha faktorů, myšlených nebo známých, že ovlivňují sekreci růstového hormonu jako je věk, sex, vyživovací faktory, glukosa, aminokyseliny, mastné kyseliny, stejně jako hladové a nehladové stavy. Navíc sůl (L)-(+)-kyseliny vinné



sloučeniny vzorce I může být použita při vyhodnocení toho, jak jiné hormony modifikují uvolňovací aktivitu růstového hormonu. Například bylo již stanoveno, že somastatin inhibuje uvolňování růstového hormonu.

Sůl (L)-(+)-kyseliny vinné sloučeniny vzorce I může být podávána zvířatům včetně člověka k uvolňování růstového hormonu in vivo. Sůl (L)-(+)-kyseliny vinné sloučeniny vzorce I je užitečná pro léčení symptomů vztažených k nedostatku GH, ke stimulaci růstu nebo zvýšení krmivého účinku zvířat chovaných pro produkci masa, k zvýšení kvality masa, k zvýšení produkce mléka u dojnic, pro zvýšení hojení kostí nebo ran a pro zvýšení funkce vitálních orgánů. Sůl (L)-(+)-kyseliny vinné sloučeniny vzorce I indukci sekrece endogenního GH změní stav těla a modifikuje jiné na GH závislé metabolické, imunologické nebo vývojové procesy.

Například sloučeniny předloženého vynálezu mohou být podávány kuřatům, krocanům, dobytku (jako jsou ovce, prasata, koně, hovězí dobytek atd.), společenským zvířatům (například psům), nebo mohou mít využití v akvakultuře k urychlení růstu a zvýšení poměru protein/tuk u ryb. Navíc sůl (L)-(+)-kyseliny vinné sloučeniny vzorce I může být podávána lidem in vivo jako nástroj přímého určení, zda je hypofýza schopna uvolňovat růstový hormon. Například sůl (L)-(+)-kyseliny vinné sloučeniny vzorce I může být podávána in vivo dětem.

Vzorky séra odebrané před a po takovémto podávání mohou být zkoušeny na růstový hormon. Srovnání množství růstového hormonu v každém z těchto vzorků bude prostředkem pro přímé určení schopnosti pacientovy hypofýzy uvolňovat růstový hormon.

V souhlase s tím předložený vynález zahrnuje do svého rozsahu farmaceutické kompozice obsahující jako aktivní složku sůl (L)-(+)-kyseliny vinné sloučeniny vzorce I ve spojení s farmaceuticky akceptovatelným nosičem. Případně farmace-

15.12.99

utické směsi mohou dále obsahovat anabolický prostředek navíc k soli (L)-(+)-kyseliny vinné sloučeniny vzorce I nebo další sloučeniny, která vykazuje rozdílnou aktivitu, například antibiotického růstového uvolňovače nebo prostředku pro léčení osteoporózy nebo s jinými farmaceutickými aktivními látkami, kde kombinace zvyšuje účinnost a minimalizuje postranní účinky.

Růst podporující a anabolické prostředky jsou dobře známy ve stavu techniky a zahrnují, ale nejsou na ně omezeny, TRH, PTH, diethylstilbesterol, estrogeny, beta-agonisty, theofillin, anabolické steroidy, enkefaliny, prostaglandiny, E série, sloučeniny zveřejněné v US patentu č. 3 239 345, na kteráéžto uveřejnění se tímto odkazuje, například zernol, sloučeniny v US patentu č. 4 036 979, na kteréžto zveřejnění se tímto odkazuje, například sulbenox a peptidy zveřejněné v US patentu číslo 4 411 890, na kteréžto zveřejnění se tímto odkazuje.

Sůl (L)-(+)-kyseliny vinné sloučeniny vzorce I v kombinaci s jinými sekretagogy růstového hormonu jako jsou uvolňovací peptidy růstového hormonu GHRP-6 a GHRP-1, jak je popsáno v US patentu číslo 4 411 890, kteréžto zveřejnění je zde začleněno odkazem a publikace WO 89/07110, WO 89/07111 a B-HT920, stejně jako hexarelin a nově objevený GHRP-2 jak je popsáno v WO 93/04081 nebo uvolňovací hormon růstového hormonu (GHRH, také označovaný GRF) a jeho analogy nebo růstový hormon a jeho analogy nebo somatomediny včetně IGF-1 a IGF-2 nebo adrenergické agonisty jako je clonidin, xylazin, detomidin a medetomidin (clonidin, který je zveřejněn v US patentu č. 3 202 660, kteréžto zveřejnění se zde začleňuje odkazem, xylazin, který je zveřejněn v US patentu číslo 3 235 550, kteréžto zveřejnění se zde začleňuje odkazem a medetomidin, který je zveřejněn

v US patentu č. 4 544 664, kteréžto zveřejnění je zde začleněno odkazem), nebo agonisty serotoninu 5HT<sub>1D</sub> jako je sumatriptan nebo prostředky, které inhibují somatostatin nebo jeho uvolňování, jako je fyzostigmin a pyridostigmin, jsou užitečné pro zvýšení endogenních hladin GH u savců.

Kombinace soli (L)-(+)-kyseliny vinné sloučeniny vzorce I s GRF vede k synergickým vzrůstům endogenního růstového hormonu.

Je dobře známo odborníkům v oboru, že známá a potenciální použití růstového hormonu jsou rozličná a početná (viz "Human Growth Hormone", Strobil a Thomas, Pharmacological Reviews, 46, str. 1-34 (1994), T.Rosen a j., Horm.Res., 1995, 43:str.93-99, M.Degerblad a j., European Journal of Endocrinology, 1995, 133:str.180-188, J.O.Jorgensen, European Journal of Endocrinology, 1994, 130:str.224-228, K.C.Copeland a j., Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, sv. 78, č. 5, str. 1040-1047, J.A.Aloi a j., Journal of Clinical Endocrinology Metabolism, sv. 79, č. 4, str.943-949, F.Cordido a j., Metab.Clin.Exp., (1995), 44(6), str. 745-748, K.M.Fairhall a j., J.Endocrinol., (1995), 145(3), str. 417-426, RM.Frieboes a j., Neuroendocrinology, (1995), 61(5), str. 584-589 a M.Llovera a j., Int.J.Cancer., (1995), 61(1), str. 138-141).

Tak podávání soli (L)-(+)-kyseliny vinné sloučeniny vzorce I pro účely stimulace uvolňování endogenního růstového hormonu může mít stejné účinky nebo použití jako růstový hormon sám. Tato různá použití růstového hormonu mohou být shrnuta následovně:

stimulace uvolňování růstového hormonu u starých lidí,  
léčení nedostatku růstového hormonu dospělých,  
prevence katabolických postranních účinků glukokortikoidů,

léčení osteoporózy,  
stimulace imunitního systému,  
akcelerace hojení ran,  
urychlení nápravy kostních zlomenin,  
léčení retardace růstu,  
léčení městnavého selhání srdce, jak je zveřejněno v PCT publikacích WO 95/28173 a WO 95/28174 (příklad způsobu zkoušení sekreatagogů růstového hormonu pro účinnost při léčení městnavého selhání srdce je zveřejněn v R.Yang a j., Circulation, sv. 92, č.2, str.262, 1995),  
léčení akutního nebo chronického selhání ledvin nebo jejich nedostatečnosti,  
léčení fyziologické nízké postavy včetně nedostatku růstového hormonu u dětí,  
léčení nízké postavy spojené s chronickou nemocí,  
léčení obezity,  
léčení růstové retardace spojené s Prader-Willi syndromem a Turnerovým syndromem,  
akcelerace uzdravování a snížení hospitalizace popálených pacientů nebo po větším chirurgickém zákroku jako je gastrointerstinální chirurgický zákrok,  
léčení retardace nitroděložního růstu, kosterní dysplasie, hyperkortisonismus a Cushingův syndrom,  
náhrada růstového hormonu u stresovaných pacientů,  
léčení osteochondrodysplasie, Noonanova syndromu, poruch spánku, Alzheimerovy nemoci, zpožděného hojení ran a psychosociální deprivace,  
léčení pulmonální dysfunkce a ventilační závislosti,  
zeslabení proteinové katabolické odezvy po větší operaci,  
léčení malabsorpčních syndromů, snížení kachexie a proteinových ztrát vlivem chronické nemoci jako je rakovina nebo AIDS, urychlení získávání hmotnosti a přírůstku proteinů u pacientů na TPN (úplná parenterální výživa),

léčení hyperinsulinemie včetně nesidioblastosy, pomocného léčení pro vyvolání ovulace a pro prevenci a léčení žaludečních a duodenálních vředů,  
stimulace vývoje brzlíku a prevence k věku vztaženého poklesu funkce brzlíku,  
adjunktivní terapie pro pacienty a chronické hemodialýze, léčení imunosupresovaných pacientů a zvýšení odezvy proti látek po vakcinaci,  
zvýšení síly svalů, zvýšení hmoty svalů, mobility, udržování tloušťky kůže, metabolické homeostasy, renální homeostasy a slabosti starých lidí,  
stimulace osteoblastů, remodelace kostí a růstu chrupavek, léčení neurologických nemocí jako je periferní a drogami vyvolaná neuropatie, Guillian-Barreův syndrom, amyotrofni laterální sklerosa, roztroušená sklerosa, cerebrovaskulární příhody a dimyelinační nemoci,  
stimulace imunitního systému u společenských zvířat a léčení poruch stárnutí u společenských zvířat,  
růstový podněcovatel u dobytka a stimulace růstu vlny u ovcí.

Odborníkům v oboru je zřejmé, že existují početné sloučeniny, které se nyní užívají v úsilí léčit nemoci nebo terapeutické indikace vyčíslené výše. Kombinace těchto terapeutických prostředků, z nichž některé byly zmíněny výše s podněcovatelem růstu, vykazují anabolické a požadované vlastnosti těchto různých terapeutických prostředků.

V těchto kombinacích terapeutické prostředky a soli (L)-(+)-kyseliny vinné sloučeniny vzorce I mohou být nezávisle a postupně podávány nebo spolupodávány v dávkovacích mezích od jedné setiny do jednonásobků dávkovacích úrovní, které jsou účinné, když jsou tyto sloučeniny a sekretagogy používány jednotlivě. Kombinovaná terapie k inhibici resorpce kostí, prevenci osteoporózy, redukci kosterních zlo-

menin, zlepšení hojení zlomenin kostí, stimulaci tvorby kostí a zvýšení minerální hustoty kostí může být dosaženo kombinací bisfosfonátů a soli (L)-(+)-kyseliny vinné sloučeniny vzorce I. Viz PCT publikaci WO95/11029 pro diskusi kombináční terapie používající bisfosfonátů a sekretagogů GH.

Použití bisfosfonátů pro tato využití je přehledně zpracováno například v Hamdy, N.A.T., role bisfosfonátů při metabolických kostních nemocích, Trends in Endocrinol.Metab., 1993, 4, str. 19-25. Bisfosfonáty s těmito využitími zahrnují, ale nejsou tím omezeny, aledronat, tiludronat, dimethyl-APD, risedronat, etidronat, YM-175, klodronat, pamidronat a BM-210995 (ibadronat).

Podle jejich potence orální denní dávkovací úrovně bisfosfonátu mezi 0,1 mg a 5 g a denní dávkovací úrovně soli (L)-(+)-kyseliny vinné sloučeniny vzorce I mezi 0,01 mg/kg až 20 mg/kg tělesné hmotnosti jsou podávány pacientům k získání účinného léčení osteoporózy.

Sůl (L)-(+)-kyseliny vinné sloučeniny vzorce I může být kombinována s savčím agonistou/antagonistou estrogenu. Jakýkoli agonist/antagonist estrogenu může být použit jako druhá sloučenina tohoto aspektu tohoto vynálezu. Výraz agonist/antagonist estrogenu se týká sloučenin, které se vážou s receptorem estrogenu, inhibují přeměnu kostí a předcházejí ztrátám kostí. Zejména agonisty estrogenu jsou zde definovány jako chemické sloučeniny schopné vazby na receptorová místa estrogenu v savčí tkáni a napodobují působení estrogenu v jedné nebo více tkáních. Antagonisty estrogenu jsou zde definovány jako chemické sloučeniny schopné se vázat k receptorovým místům estrogenu v savčí tkáni a blokovat působení estrogenu v jedné nebo více tkáních.

Takovéto aktivity se snadno určí odborníky v oboru pomocí standardních zkoušek zahrnujících vázací zkoušky receptoru estrogenu, standardní kostní histomorfometrické a denzitometrické metody (viz Eriksen E.F. a j., Kostní histomorfometrie, Raven Press, New York, 1994, str. 1-74, Grier S.J. a j., Použití duální energie X-paprskové absorbometrie u zvířat, Inv.Radiol., 1996, 31(1):50-62, Wahner H.W. a Fogelman I., Vyhodnocení osteoporózy: Duální energie X-paprskové absorbometrie v klinické praxi, Martin Dunitz Ltd., London, 1994, str. 1-296).

Množství těchto sloučenin je popsáno a referováno dále, avšak jiné agonisty/antagonisty estrogenu budou známy odborníkům v oboru. Výhodný agonist/antagonist estrogenu je droloxifen: (fenol, 3-[1-[4-[2-(dimethylamino)ethoxy]-fenyl]-2-fenyl-1-butenyl]-, (E)-) a sdružené sloučeniny, které jsou zveřejněny v US patentu 5 047 43, jehož obsah se tímto začleňuje formou odkazu.

Další agonist/antagonist estrogenu, který je výhodný, je tamoxifen: (ethanamin, 2-[4-(1,2-difenyl-1-butenyl)fenoxy]-N,N-dimethyl, (Z)-2-, 2-hydroxy-1,2,3-propantrikarboxylat (1:1)) a přidružené sloučeniny, které jsou zveřejněny v US patentu 4 536 516, kteréžto zveřejnění je tímto začleněno formou odkazu.

Další příbuznou sloučeninou je 4-hydroxytamoxifen, který je zveřejněn v US patentu 4 623 650, kteréžto zveřejnění se tímto začleňuje formou odkazu.

Další výhodný agonist/antagonist estrogenu je raloxifen: (methanon, [6-hydroxy-2-(4-hydroxyfenyl)benzo[b]thien-3-yl][4-[2-(1-piperidiny)ethoxy]fenyl]hydrochlorid) a sdružené sloučeniny, které jsou uvedené v US patentu číslo 4 418 068, kteréžto zveřejnění se zde začleňuje formou odkazu.

Další výhodný agonist/antagonist estrogenu je idoxifen: pyrrolidin, 1-[4-[1-(4-jodfenyl)-2-fenyl-1-butenyl]fenoxy]-ethyl] a sdružené sloučeniny, které jsou zveřejněny v US patentu číslo 4 839 155, kteréžto zveřejnění se zde začleňuje formou odkazu.

Další výhodný agonist/antagonist estrogenu zahrnuje sloučeniny jak jsou popsány v běžně postoupeném US patentu č. 5 552 412, kteréžto zveřejnění se zde začleňuje formou odkazu. Zvláště výhodné sloučeniny, které jsou tam popsány, jsou:

cis-6-(4-fluorfenyl)-5-[4-(2-piperidin-1-ylethoxy)fenyl]-5,6,7,8-tetrahydronaftalen-2-ol,

(-)-cis-6-fenyl-5-[4-(2-pyrrolidin-1-ylethoxy)fenyl]-5,6,7,8-tetrahydronaftalen-2-ol,

cis-6-fenyl-5-[4-(2-pyrrolidin-1-ylethoxy)fenyl]-5,6,7,8-tetrahydronaftalen-2-ol,

cis-1-[6'-pyrrolidinoethoxy-3'-pyridyl]-2-fenyl-6-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydronaftalen,

1-(4'-pyrrolidinoethoxyfenyl)-2-(4"-fluorfenyl)-6-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin,

cis-6-(4-hydroxyfenyl)-5-[4-(2-piperidin-1-ylethoxy)fenyl]-5,6,7,8-tetrahydronaftalen-2-ol, a

1-(4'-pyrrolidinoethoxyfenyl)-2-fenyl-6-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin.

Jiné agonisty/antagonisty estrogenu jsou posány v US patentu 4 133 814 (jehož zveřejnění se zde začleňuje odkazem.



US patent 4 133 814 zveřejňuje deriváty 2-fenyl-3-aroylebenzothiofenu a 2-fenyl-3-aroylebenzoylthiofen-1-oxidu.

Následující odstavce vytvářejí výhodná dávkovací rozmezí pro různé antiresorpční prostředky.

Množství antiresorpčního prostředku, které se má použít, je určeno jeho aktivitou jako inhibičního prostředku kostní ztráty. Tato aktivita se určí pomocí individuální sloučeninové farmakokinetiky a její minimálně a maximálně účinná dávka při inhibici kostní ztráty se určí za pomoci postupu jako je postup referovaný výše.

Obecně účinné dávkování pro aktivity tohoto vynálezu například pro léčení osteoporózy, pro agonisty/antagonisty estrogenu (když se použijí v kombinaci se solí (L)-(+)-kyseliny vinné sloučeniny I tohoto vynálezu) je v rozmezí 0,01 až 200 mg/kg/den, výhodně 0,5 až 100 mg/kg/den.

Zvláště účinné dávkování pro droloxifen je v rozmezí 0,1 až 40 mg/kg/den, výhodně 0,1 až 5 mg/kg/den.

Zejména účinné dávkování pro raloxifen je v rozmezí 0,1 až 100 mg/kg/den, výhodně 0,1 až 10 mg/kg/den.

Zejména účinné dávkování pro tamoxifen je v rozmezí 0,1 až 100 mg/kg/den, výhodně 0,1 až 5 mg/kg/den.

Zvláště účinné dávkování pro  
cis-6-(4-fluorfenyl)-5-[4-(2-piperidin-1-ylethoxy)fenyl]-  
5,6,7,8-tetrahydronaftalen-2-ol,

(-)-cis-6-fenyl-5-[4-(2-pyrrolidin-1-ylethoxy)fenyl]-5,6,7,8-tetrahydronaftalen-2-ol,

cis-6-fenyl-5-[4-(2-pyrrolidin-1-ylethoxy)fenyl]-5,6,7,8-tetrahydronaftalen-2-ol,

cis-1-[6'-pyrrolidinoethoxy-3'-pyridyl]-2-fenyl-6-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydronaftalen,

1-(4'-pyrrolidinoethoxyfenyl)-2-(4"-fluorfenyl)-6-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin,

cis-6-(4-hydroxyfenyl)-5-[4-(2-piperidin-1-ylethoxy)fenyl]-5,6,7,8-tetrahydronaftalen-2-ol, nebo

1-(4'-pyrrolidinoethoxyfenyl)-2-fenyl-6-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin,

je v rozmezí 0,0001 až 100 mg/kg/den, výhodně 0,001 až 10 mg/kg/den.

Zvlášť účinné dávkování pro 4-hydroxytamoxifen je v rozmezí 0,0001 až 100 mg/kg/den, výhodně 0,001 až 10 mg/kg/den.

Zkouška na stimulaci uvolňování GH z krysích pituicytů

Sloučeniny, které mají schopnost stimulovat sekreci GH z kultivovaných krysích hypofýzních buněk se identifikují za použití následujícího postupu. Tento test je také užitečný pro srovnání se standardy k určení dávkovacích hladin. Buňky se izolují z hypofýz 6 týdnů starých samčích Wistar krys. Po dekapitaci se přední hypofýzní laloky odstraní do chladného sterilního Hangsova rovnovážného solného roztoku bez vápníku nebo hořčíku (HBSS). Tkáně se jemně rozmělní, pak se podrobí dvěma cyklům mechanicky asistované enzymatické

disperze za použití 10 j/ml bakteriální proteasy  
(EC 3.4.24.4., <sup>Sigma</sup> P-6141, St.Louis, Missouri) v HBSS.

Tkáňově enzymová směs se míchá v otáčivé baňce při 30 otáčkách v 5%ní CO<sub>2</sub> atmosféře při asi 37 °C po dobu asi 30 minut s manuální triturací po asi 15 minutách a asi 30 minutách za použití 10ml pipety. Tato směs se odstředí při 200.g po dobu asi 5 minut. Přidá se koňské sérum (35%ní konečná koncentrace) do supernatantu k neutralizaci přebytečné proteasy. Peleta se resuspenduje v čerstvé protease (10 j/ml), míchá se po dobu dalších asi 30 minut za dříve popsanych podmínek a manuálně se trituruje, důkladně 23-odměrnou jehlou.

Znovu se přidá koňské sérum (35%ní konečná koncentrace), pak se buňky z obou výluhů sloučí, pelatují (200.g po dobu asi 15 minut), resuspendují v kultivačním mediu (Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM) doplněném 4,5 g/l glukosy, 10%ním koňským sérem, 2,5%ním fetálním hovězím sérem, 10 % koňského séra, 2,5 % fetálního bovinního séra, 1 % neesenciálních aminokyselin, 100 j/ml nystatinu a 50 mg/ml genamycin-sulfatu, Gibco Grand Island, New York) a vyhodnotí. Buňky se naočkují v množství 6,0 až 6,5.10<sup>4</sup> buněk na cm<sup>2</sup> v 48 důlkových Costar<sup>TM</sup> (Cambridge, Massachusetts) plotnách a kultivují po dobu 3 až 4 dnů v kultivačním mediu.

Právě před GH sekreční zkouškou se kultivační důlky vymyjí 2x uvolňovacím mediem, pak se ekvilibrují po dobu asi 30 minut v uvolňovacím mediu (D-MEM pufrované 25 mM HEPES, pH 7,4 a obsahující 0,5 % bovinního sérového albuminu při 37 °C). Testované sloučeniny se rozpustí v DMSO, pak se zředí do předeřátého uvolňovacího media. Zkoušky se provádějí čtyřnásobně.

Zkouška se iniciuje přidavkem 0,5 ml uvolňovacího media (s vehikulem nebo testovanou sloučeninou) do každého kultivačního důlku.

Inkubace se provádí při asi 37 °C po dobu asi 15 minut, pak se terminuje odstraněním uvolňovacího media, které se odstředí při 2000.g po dobu asi 15 minut k odstranění buněčného materiálu. Koncentrace krysího růstového hormonu v supernatantech se určí standardní radioimuno zkouškou dále popsáním postupem.

#### Měření krysího růstového hormonu

Koncentrace krysího růstového hormonu byly určeny dvojitou protilátkovou radioimuno zkouškou za použití referenčního přípravku krysího růstového hormonu (NIDDK-rGH-RP-2) a antiséra krysího růstového hormonu vypěstovaného v opici (NIDDK-anti-rGH-S-5) získaného od dr. A. Parlowa (Harbor-Ucla Medical Center, Torrence, CA). Další krysí růstový hormon (1,5 j/mg č. G2414, Scripps Labs, St.Diego, CA) se जोड़े na specifickou aktivitu přibližně 30 mikroCi/mikrogram chloramin T metodou pro použití jako značkovací látky.

Imunní komplexy se získají přidavkem kozího antiséra do opičího IgG (ICN/Cappel, Aurora, OH) + polyethylenglykol, mol hm 10 000 až 20 000 na konečnou koncentraci 4,3 %, získání se provádí odstředěním. Tato zkouška má pracovní rozmezí 0,08 až 2,5 mikrogramu krysího růstového hormonu na zkumavku nad bazálními úrovněmi.

Zkouška uvolňování exogenně stimulovaného růstového hormonu u krys po intravenózním podávání testovaných sloučenin

Dvacet jedna dní staré samičí Sprague-Dawley krysy (Charles River Laboratory, Wilmington, MA) se nechají aklimatizovat na lokální vivarijní podmínky (24 °C, 12 hodin světla,

12 hodin tmy, cyklus) po dobu přibližně 1 týdne před testováním sloučeniny. Všechny krysy mají dovolen přístup k vodě a peletované komerční dietě (Agway Country Food Syracuse, N.Y) ad libitum. Experimenty se provádějí podle NIH návodu pro péči a použití laboratorních zvířat.

V den experimentu se testované sloučeniny rozpustí ve vehikulu obsahujícím 1 % ethanolu, 1 mM kyseliny octové a 0,1 % bovinního sérového albuminu solném roztoku. Každý test se provádí u třech krys.

Krysy se zváží a anestetizují pomocí intraperitoneální injekce pentobarbitalu sodného (Nembutol<sup>®</sup>, 50 mg/kg tělesné hmotnosti). 14 minut po podání anestetika se odebere vzorek krve naříznutím konce ocasu a krev se nechá kapat do mikrodstředivkové zkumavky (základní krevní vzorek, přibližně 100 mikrolitrů). 15 minut po podání anestetika se testovaná sloučenina zavede intravenózní injekcí do ocasní žíly s celkovým injekčním objemem 1 ml/kg tělesné hmotnosti. Další krevní vzorky se odeberou z ocasu 5, 10 a 15 minut po podání sloučeniny. Krevní vzorky se udržují na ledu až do sérové separace odstředěním (1 430.g po dobu 10 minut při 10 °C).

Sérum se uskladní při -80 °C až do určení sérového růstového hormonu radioimuno zkouškou, jak je popsáno výše.

Stanovení exogenně stimulovaného uvolňování růstového hormonu u psů po orálním podávání

V den dávkování se testovaná sloučenina odváží pro příslušnou dávku a rozpustí ve vodě. Dávky se zavedou v objemu 0,5 až 3 ml/kg dávkováním dvěma až čtyřem psům pro každý dávkovací režim. Vzorky krve (5 ml) se odeberou z hrdelní žíly přímým propíchnutím žíly před dávkou a v 0,17, 0,33,

0,5, 0,75, 1, 2, 4, 6, 8 a 24 hodin po dávce za použití 5ml vakutejnrů obsahujících lithiumheparin. Připravené plasma se uskladní při  $-20^{\circ}\text{C}$  až do analýzy.

#### Měření psího růstového hormonu

Koncentrace psího růstového hormonu se určí standardním radioimunoassayovým postupem za použití psího růstového hormonu (antigen pro jodaci a referenční přípravek AFP-1983B) a antiséra psího růstového hormonu vypěstovaného v opici (AFP-21452578) získaného od dr. A.Parlowa (Harbor-Ucla Medical Center, Torrence, CA). Značkovač se vytvoří chloramin-T jodací psího růstového hormonu na specifickou aktivitu 20 až 40 mikroCi/mikrogram. Imunní komplexy se získají přidávkou koziho antiséra do opičího IgG (ICN/Cappel, Aurora, OH) plus polyethylenglykolu, mol hm 10 000 až 20 000 do finální koncentrace 4,3 %, načež získání se provede odstředěním. Tato zkouška má pracovní rozmezí 0,08 až 2,5 mikrogramu psího GH/zkoumavka.

Stanovení psího růstového hormonu a úrovně insulinově podobného růstového faktoru-1 u psů po chronickém orálním podávání

Psi obdrží testovanou sloučeninu denně po dobu 7 nebo 14 dnů. Každý den dávkování se testovaná sloučenina odváží pro příslušnou dávku a rozpustí ve vodě. Dávky se dodávají v objemu 0,5 až 3 ml/kg dávkováním pěti psům pro každý dávkovací režim. Krevní vzorky se odebírají ve dnech 0, 3, 7, 10 a 14. Krevní vzorky (5 ml) se získají přímým napíchnutím hrdelní žíly před dávkou, 0,17, 0,33, 0,5, 0,754, 1, 2, 3, 6, 8, 12 a 24 hodin po podávání ve dnech 0, 7 a 14 za použití

5ml vakutejnrů obsahujících lithiumheparin. Navíc krev se odebírá před dávkou a v 8 hodinách ve dnech 3 a 10. Připravené plasma se uskládá při  $-20^{\circ}\text{C}$  až do analýzy.

#### Studie samičích krys

Tato studie vyhodnocuje účinek chronického léčení pomocí mimetického GHRP na hmotnost, stav těla a nehladovějící plasmové koncentrace glukosy, insulinu, laktatu a lipidů u estrogenově deficitních a estrogenově naplněných samičích krys. Akutní odezva hladin sérového GH na intravenózní podávání uvolňovacího prostředku GH byla stanovena v poslední den dávkování. Telesná hmotnost byla monitorována týdně během léčebné periody, navíc tělesný stav a plasmové úrovně glukosy, insulinu, laktatu, cholesterolu a triglyceridů byly stanoveny na konec ošetření.

Panenské Sprague-Dawley krysy byly získány od Charles River Laboratories (Wilmington, MA) a podrobeny bilaterální ovariektomii (Ovx) nebo klamné chirurgii (Sham) přibližně ve 12 týdenním věku. Pro sham chirurgický zákrok byly vaječníky exteriorizovány a uloženy do břišní dutiny.

Po chirurgickém zákroku byly krysy umístěny individuálně ve 20 cm.32 cm.20 cm klecích za standardních viariálních podmínek (asi  $24^{\circ}\text{C}$  s asi 12hodinovým světlem/12hodinový cyklus tmy). Všem krysám byl ponechán volný přístup k vodě a peletované komerční dietě (Agway ProLab 3000, Agway Country Food, Inc., Syracuse, N.Y). Experiment byl proveden podle NIH návodů pro péči a použití laboratorních zvířat.

Přibližně 7 měsíců po chirurgickém zákroku Sham a Ovx krysy byly zváženy a náhorně rozděleny do skupin. Krysy byly dákovány denně orálním dákováním 1 ml buď vehikula

(1 % ethanolu v destilované-deionizované vodě), 0,5 mg/kg nebo 5 mg/kg uvolňovacího prostředku růstového hormonu po dobu 90 dnů. Krysy byly váženy v týdenních intervalech během studie.

24 hodiny po poslední orální dávce byla vyhodnocena akutní odezva sérového růstového hormonu (GH) na testovaný prostředek následujícím postupem. Krysy byly anestetizovány pentobarbitalem sodným 50 mg/kg. Anestetizované krysy byly zváženy a základní krevní vzorek (asi 100 mikrolitrů) byl odebrán z ocasní žíly. Testovací prostředek (uvolňovací prostředek růstového hormonu nebo vehikulum) byl pak podáván intravenózně ocasní žílou v 1 ml. Přibližně 10 minut po injekci byl odebrán z ocasu druhý 100 mikrol krevní vzorek. Krev byla ponechána srazit při asi 4 °C, pak odstředěna při 2000.g po dobu asi 10 minut. Sérum bylo uskladněno při asi -70 °C. Koncentrace sérového růstového hormonu byly určeny radioimuno zkouškou jak bylo dříve popsáno. Po této proceduře byla každá anestetizovaná krysa podrobena celkovému tělesnému skenování duálně energetickou x-paprskovou absorbometrií (DEXA, Hologic QDR 1000/W, Waltham, MA). Konečný krevní vzorek byl odebrán nápichem srdce do heparinizovaných zkumavek. Plasma byla oddělena odstředěním a uskladněna zmrzlá, jak bylo výše popsáno.

Plasmový insulin se určuje radioimuno zkouškou za použití soupravy od Binax Corp. (Portland, Maine). Vnitrozkuškový koeficient variace je menší nebo rovný 10 %. Plasmové triglyceridy, celkový cholesterol, glukosa a úrovně laktátu se měří použitím Abbott VP<sup>TM</sup> a VP Super System<sup>®</sup> Autoanalyser (Abbott Laboratories, Irving, Texas), za použití A-Gent<sup>TM</sup> triglyceridů, cholesterolu a glukosových testovacích reagenčních systémů a laktátové soupravy od Sigmy.



Plasmový insulin, triglyceridy, celkový cholesterol a laktát snižující aktivitu uvolňovacího peptidu růstového hormonu (GHRP) nebo mimetického GHRP jako je sloučenina vzorce I, jsou určeny statistickou analýzou (nepárový t-test) s vehikulem upravenou kontrolní skupinou.

Sůl (L)-(+)-kyseliny vinné sloučeniny vzorce I může být podávána orálně, parenterálně (například intramuskulárně, intraperitoneálně, intravenózně nebo subkutánní injekcí nebo implantátem), nasálně, vaginálně, rektálně, sublingválně nebo topickými cestami podání a může být formulována s farmaceuticky akceptovatelnými nosiči k vytvoření dávkovacích forem vhodných pro každou cestu podávání.

Tuhé dávkovací formy pro orální podávání zahrnují tobolky, tablety, pilulky, prášky a granule. V takovýchto tuhých dávkovacích formách je sůl (L)-(+)-kyseliny vinné sloučeniny vzorce I smíšena s alespoň jedním inertním farmaceuticky akceptovatelným nosičem jako je sacharosa, laktosa nebo škrob. Takovéto dávkovací formy mohou také obsahovat, jak je normální praxe, další látky jiné, než takováto inertní ředidla, například lubrikační prostředky jako je stearan hořečnatý. V případě tobolek, tablet a pilulek mohou dávkovací formy také obsahovat pufrovací prostředky. Tablety a pilulky mohou být navíc připraveny s enterickými povlaky.

Kapalné dávkovací formy pro orální podávání zahrnují farmaceuticky akceptovatelné emulze, roztoky, suspenze, sirupy, elixíry obsahující inertní ředidla běžně používaná ve stavu techniky jako je voda. Kromě těchto inertních ředidel kompozice mohou také zahrnovat adjuvanty, jako jsou smáčecí prostředky, emulgační a suspendační prostředky a sladidla, ochucovací a parfémovací prostředky.

Přípravky podle tohoto vynálezu pro parenterální podávání

zahrnují sterilní vodné nebo nevodné roztoky, suspenze nebo emulze. Příklady nevodných rozpouštědel nebo vehikulů jsou propylenglykol, polyethylenglykol, rostlinné oleje jako je olivový olej a kukuřičný olej, želatina a injektovatelné organické estery jako je ethyloleat. Takovéto dávkovací formy mohou také obsahovat adjuvanty jako jsou konzervační, smáčecí, emulgační a disperzní prostředky. Mohou být sterilizovány například filtrací, filtrem, který zadržuje bakterie, začleněním sterilizačních prostředků do kompozic, ozáření kompozic nebo zahřátím těchto kompozic. Mohou být také vyráběny ve formě sterilních tuhých kompozic, které mohou být rozpuštěny ve sterilní vodě nebo jiném sterilním injektovatelném mediu bezprostředně před použitím.

Kompozice pro rektální nebo vaginální podávání jsou výhodně čípky, které mohou obsahovat navíc k aktivní látce excipienty jako je kakaové máslo nebo čípkový vosk.

Kompozice pro nasální nebo sublingvální podávání se také připravují se standardními excipienty dobře známými ve stavu techniky.

Dávkování soli (L)-(+)-kyseliny vinné sloučeniny vzorce I v kompozicích tohoto vynálezu může být různé. Avšak je nutné, aby její množství bylo takové, že se získá vhodná dávkovací forma. Vybrané dávkování závisí na požadovaném terapeutickém účinku, na cestě podávání a na trvání léčení. Obecně jsou dávkovací úrovně mezi 0,0001 do 100 mg/kg tělesné hmotnosti denně podávány lidem a jiným živočichům, například savcům, k získání účinného uvolňování růstového hormonu.

Výhodné dávkovací rozmezí je 0,01 až 5,0 mg/kg tělesné hmotnosti denně, které může být podáváno jako 1 dávka nebo rozděleno do více dávek.

16. 12. 99

- 34 -

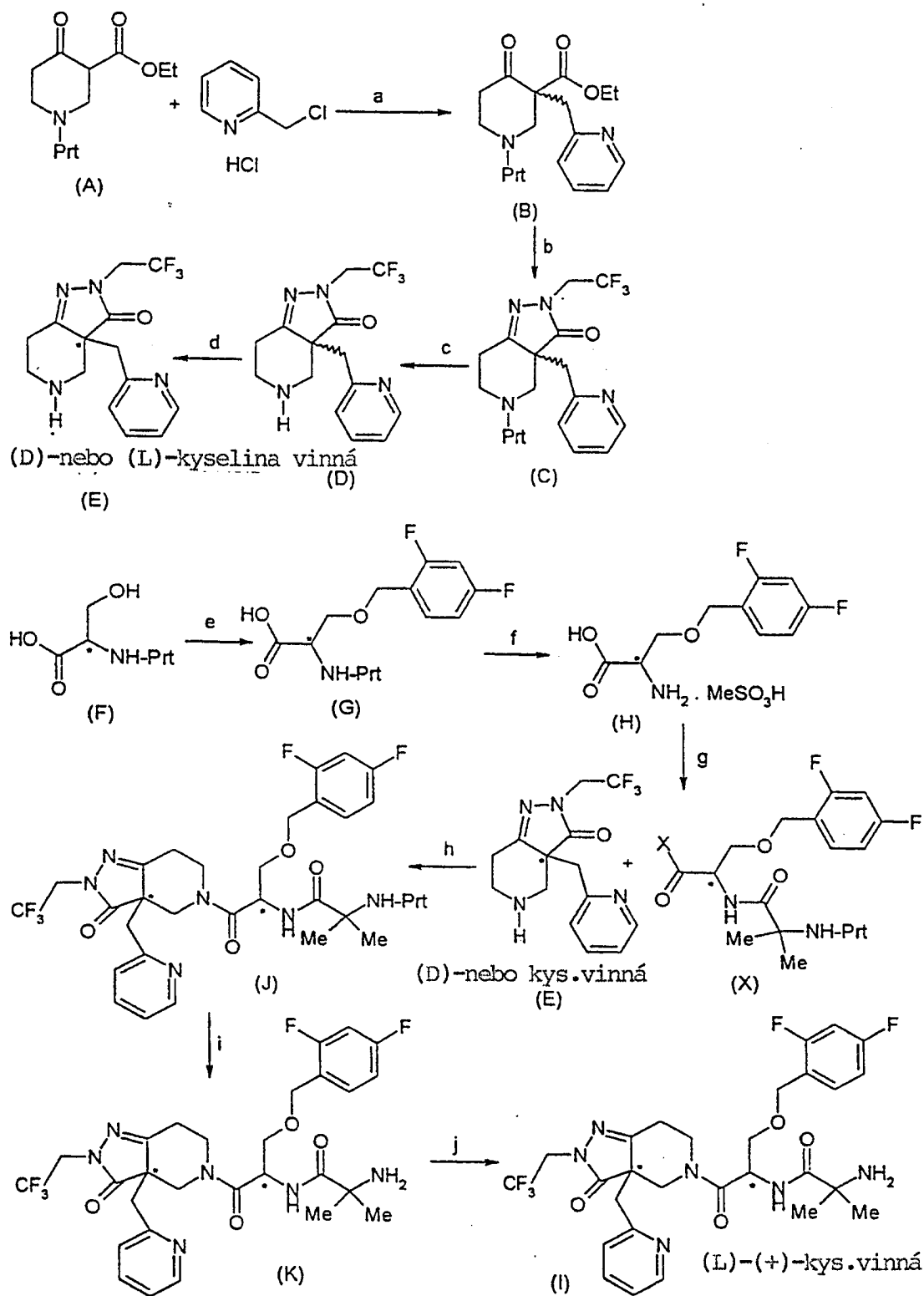
Následující schema ilustruje syntézu soli (L)-(+)-  
kyseliny vinné sloučeniny vzorce I.

Symbol \* indikuje stereochemické centrum.

"Prt" je použit k indikaci jakékoli vhodné chránicí skupiny  
aminu, která je známa odborníkům v oboru.

16.12.99

- 35 -



Dále se popisují stupně reakcí znázorněných v předcházejícím schématu. V následujícím popisu je chránicí skupina Prt aminu znázorněna s výhodnou chránicí skupinou aminu BOC.

#### Stupeň a

Do roztoku sloučeniny A v reakčním inertním polárním aprotickém rozpouštědle jako je aceton, methylethylketon nebo výhodně DMF (dimethylformamid) při asi 0 °C až teplotě místnosti, výhodně 0 °C, se přidá pikolylchloridhydrochlorid, uhličitán jako je  $\text{Li}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{CS}_2\text{CO}_3$  nebo výhodně uhličitán draselný a jodid draselný nebo tetrabutylamoniumjodid. Po míchání při asi -20 °C až asi 70 °C, výhodně 0 °C po dobu asi 2 až 16 hodin, výhodně po dobu asi 2 hodin se ledová lázeň odstraní a přidá se DABCO (1,4-diazobicyklo[2,2,2]oktan).

Reakční směs se míchá po dobu asi 15 až 30 minut a naleje se do směsi vody a nepolárního organického rozpouštědla jako je toluen, diethylether nebo výhodně IPE (isopropylether). Organická vrstva se separuje a zpracuje za použití standardních metod známých ve stavu techniky k získání sloučeniny B.

#### Stupeň b

70%ní vodný roztok  $\text{CF}_3\text{CH}_2\text{NHNH}_2$  se použije jako vodný roztok v ethanolu, vodě nebo toluenu, výhodně 70%ní vodný roztok  $\text{CF}_3\text{CH}_2\text{NHNH}_2$  se extrahuje toluenem. Do roztoku sloučeniny B v organickém rozpouštědle jako je ethanol nebo výhodně toluen, se nejdříve přidají toluenové extrakty obsahující bezvodý 2,2,2-trifluorethylhydrazin, načež následuje přidávek kyseliny octové. Reakční směs se zahřívá při asi 60 °C až 110 °C, výhodně 70 °C, po dobu asi 30 minut až 12 hodin, výhodně 2 hodin. Reakční směs se ochladí na teplotu místnosti a neutralizuje vodnou zásadou jako je  $\text{NaHCO}_3$ .

Organická vrstva se oddělí a zpracuje pomocí standardních metod známých ve stavu techniky k získání sloučeniny C.

## Stupeň c

Kyselina jako je HCl v IPE nebo ethanolu, trifluorová kyselina nebo alkylsulfonová kyselina jako je methansulfonová kyselina se přidá do roztoku sloučeniny C v reakčním inertním organickém rozpouštědle jako EtOH, IPE nebo výhodně  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Směs se míchá po dobu asi 1 až 2 hodin, pak se ochladí na asi  $0^\circ\text{C}$  až teplotu místnosti, výhodně  $0^\circ\text{C}$  a pak se přidá aminová báze jako je triethylamin nebo  $\text{NH}_4\text{OH}$  do směsi.

Směs se nechá ohřát na teplotu místnosti, zředí se dalším organickým rozpouštědlem a zpracuje za použití standardních metod známých ve stavu techniky pro získání sloučeniny D.

## Stupeň d

(D)- nebo (L)-kyselina vinná, výhodně (D)-kyselina vinná se přidá ke sloučenině D ve směsi aceton/voda (asi 8:1 až asi 9:1) při asi teplotě místnosti. Směs se míchá při teplotě místnosti po dobu asi 15 minut až přes noc, výhodně přes noc, tuhá látka se odfiltruje, shromáždí a promyje studeným acetonem, čímž se získá sloučenina vzorce E, výhodně je sloučenina E (D)-vinan jediného enantiomeru.

## Stupeň e

Do roztoku N-BOC-serinu, výhodně N-BOC-(D)-serinu (sloučenina F) v THF/DMF (asi 1:1 do asi 2:1) při asi  $0^\circ\text{C}$  se přidá n-BuLi nebo roztok terc.butoxidu draselného. Reakční směs se míchá při asi  $0^\circ\text{C}$  po dobu asi 10 až 30 minut, výhodně 20 minut, pak se přidá 2,4-difluorbenzylbromid. Po zahřátí na teplotu místnosti a míchání po dobu 6 až 24 hodin se reakční směs koncentruje ve vakuu k odstranění THF a přidá se vodná kyselina jako je 1N HCl k nastavení směsi na hodnotu pH asi 3.

Reakční směs se pak rozdělí mezi vodu a organické rozpouštědlo jako je  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  nebo IPE. Organický roztok se zpracuje pomocí standardních metod známých ve stavu techniky k získání sloučeniny G, výhodně mající R-konfiguraci ve stereocentru, také známé jako (D)-enantiomer.

#### Stupeň f

Do roztoku sloučeniny G v organickém rozpouštědle jako je THF,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , IPE nebo jejich směs, výhodně  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /IPE (asi 1:1) se přidá alkylsulfonová kyselina jako je methansulfonová kyselina. Tuhá látka se odfiltruje a promyje směsí  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /IPE (1:1), čímž se získá sloučenina H výhodně mající R-konfiguraci ve stereocentru, také známá jako (D)-enantiomer.

#### Stupeň G

Do roztoku sloučeniny H v THF/voda (asi 4:1) se přidá 2,5-dioxypyrrolidin-1-ylester 2-terc.butoxykarbonylamino-2-methylpropionové kyseliny a alkylamin jako je triethylamin. Reakční směs se míchá při teplotě místnosti po dobu 1 až 24 hodin a ochladí se vodnou kyselinou jako je 10%ní roztok vodné kyseliny citronové. Směs se rozdělí organickým rozpouštědlem jako je ethylacetat a organická vrstva se zpracuje pomocí standardních metod známých ve stavu techniky, čímž se získá sloučenina X, výhodně mající R-konfiguraci ve stereocentru, také známa jako (D)-enantiomer. Sloučenina X také může být kyselina, alkylester nebo halogenid kyseliny (X je OH,  $-\text{O}(\text{C}_1\text{C}_4)\text{alkyl}$  nebo halogen), přičemž kyselině se dává přednost.

#### Stupeň h

(a) Sloučenina E výhodně (D)-vinan nebo jediný enantiomer se přidá při asi  $-35^\circ\text{C}$  až  $0^\circ\text{C}$ , výhodně při asi  $-6^\circ\text{C}$  do ethylacetatu.

Roztok se ochladí na asi  $-30$  až  $-50$   $^{\circ}\text{C}$ , pak se přidá alkylamin jako je triethylamin. Reakční směs se míchá po dobu asi 30 až 90 minut při teplotě mezi asi  $-78$   $^{\circ}\text{C}$  až asi  $-20$   $^{\circ}\text{C}$  a zfiltruje se, čímž se získá roztok volné báze sloučeniny E.

(b) Když X ve sloučenině X je OH, sloučenina X, výhodně mající R-konfiguraci ve stereocentru, se přidá při asi  $-78$   $^{\circ}\text{C}$  až  $-20$   $^{\circ}\text{C}$ , výhodně  $35$   $^{\circ}\text{C}$ , do reakčního inertního organického rozpouštědla jako je roztok ethylacetatu obsahující volnou bázi sloučeniny E ze stupně h(a), alkylamin jako je triethylamin a PPAA (cyklický anhydrid 1-propanfosfonové kyseliny) (53% v ethylacetatu). Reakční směs se míchá po dobu asi 1 až 24 hodin a zpracuje se pomocí standardních metod známých ve stavu techniky pro získání sloučeniny J, výhodně mající absolutní a relativní 3a-(R), 1-(R)konfiguraci.

Když X ve sloučenině X je Cl, sloučenina X se přidá při asi  $-78$   $^{\circ}\text{C}$  do reakčního inertního rozpouštědla jako je roztok dichlormethanu obsahující volnou bázi sloučeniny E a alkylamin jako je triethylamin. Reakční směs se míchá po dobu asi 1 až 24 hodin při asi  $0$  až  $30$   $^{\circ}\text{C}$  a pak se zpracuje pomocí standardních metod známých ve stavu techniky k získání sloučeniny J, výhodně mající absolutní a relativní 3a-(R), 1-(R)konfiguraci.

Když X ve sloučenině X je  $-\text{O}(\text{C}_1-\text{C}_4)\text{alkyl}$ , kde se dává přednost methyлу, sloučenina X se přidá do roztoku volné nebo konjugované báze E (konjugovaná báze sloučeniny E  $(-\text{NM})$ , kde  $\text{M}=\text{Li}, \text{Na}, \text{K}, \text{Mg}$  nebo  $\text{Al}$ , výhodně hliník) se připraví reakcí volné aminové báze s příslušným reagentem (to je  $\text{M}=\text{Li}$ , butyllithium nebo LDA,  $\text{M}=\text{Na}$ ,  $\text{NaH}$  nebo  $\text{NaN}(\text{SiMe}_3)_2$  nebo  $\text{M}=\text{K}$ ,  $\text{KH}$  nebo  $\text{KN}(\text{SiMe}_3)_2$ , nebo  $\text{M}=\text{Mg}$ , jakékoli Grignardovo činidlo, výhodně diethylmagnesiumbromid, nebo  $\text{M}=\text{Al}$ , jakýkoli trialkylaluminiový reagent, výhodně trimethylaluminium))



výhodně hliník, v reakčním inertním rozpouštědle jako je dichlormethan a výsledná reakční směs se míchá po dobu asi 1 až 24 hodin při asi  $-20$  až  $110^{\circ}\text{C}$  a zpracuje za použití standardních metod známých ve stavu techniky k získání sloučeniny J, výhodně mající absolutní a relativní 3a-(R), 1-(R) konfiguraci.

#### Stupeň i

Kyselina jako je HCl v EtOH, methansulfonová kyselina, nebo trifluorová kyselina v  $\text{CHCl}_3$  se přidá při asi  $0^{\circ}\text{C}$  až teplota místnosti do sloučeniny J v dichlormethanu, IPE nebo THF. Směs se míchá po dobu asi 40 minut až asi 4 hodin při teplotě místnosti, pak se přidá nasycená vodná zásada jako je  $\text{NaHCO}_3$  až má roztok neutrální pH. Organická vrstva se oddělí a zpracuje pomocí standardních metod známých ve stavu techniky k získání sloučeniny K, výhodně mající absolutní a relativní 3a-(R), 1-(R) konfiguraci.

#### Stupeň j

Do roztoku sloučeniny K v alkoholu, výhodně methanolu, se přidá (L)-(+)-kyselina vinná. Reakční směs se míchá po dobu asi 1 až 12 hodin, zfiltruje a koncentruje. Surový zbytek se zředí organickým rozpouštědlem jako je ethylacetat, zahřeje se a pomalu ponechá chladnout na teplotu místnosti. Tuhá látka se odfiltruje a vysuší, čímž se získá sůl (L)-(+)-kyseliny vinné sloučeniny vzorce I jako bílé krystaly, výhodně mající absolutní a relativní 3a-(R), 1-(R) konfiguraci.

Příklad provedení vynálezu

Následující příklad provedení je vytvořen jen pro účel dalšího osvětlení vynálezu a není určen k omezení uvedeného vynálezu.

Silikagel byl použit pro sloupcovou chromatografii. Teploty tání byly měřeny na Buchi 510 zařízení a jsou nekorigované. Protonová NMR spektra byla zaznamenána na Varian XL-300, Bruker AC-300, Varian Unity 400 nebo Bruker AC-250 při 25 °C. Chemické posuny jsou vyjádřeny v ppm ve směru klesajícího pole od trimethylsilanu.

## Příklad 1

L-(+)-tartarat

2-Amino-N-{1-(2,4-difluorbenzyloxymethyl)-2-oxo-2-[3-oxo-3a-pyridin-2-ylmethyl-2-(2,2,2-trifluorethyl)-2,3,3a,4,6,7-hexahydropyrazolo[4,3-c]pyridin-5-yl]-ethyl}-2-methylpropionamidu

A. 1-terc.butylester-3-ethylester 4-oxo-3-pyridin-2-ylmethylpiperidin-1,3-dikarboxylové kyseliny

Do roztoku 1-terc.butylester-3-ethylesteru 4-oxopiperidin-1,3-dikarboxylové kyseliny (10,34 g, 38,2 mmol) v DMF (40 ml) při asi 0 °C byl přidán pikolylchloridhydrochlorid (5,7 g, 34,7 mmol), uhličitan draselný (14,4 g, 104,1 mmol) a jodid ddraselný (5,76 g, 34,7 mmol). Po míchání při asi 0 °C po dobu asi 2 hodin byla ledová lázeň odstraněna a byl přidán DABCO (973 mg, 8,68 mmol). Reakční směs byla míchána po dobu asi 30 minut a nalita do směsi vody a IPE. Organická vrstva byla oddělena a promyta nasyceným vodným roztokem NaHCO<sub>3</sub> a nasyceným vodným roztokem NaCl, vysušena síranem sodným a koncentrována za vakua.

Surový zbytek byl vykrystalizován z hexanů, čímž se získala bílá tuhá látka (8,19 g, výtěžek 65%ní).

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1,17(t,3H), 1,48(s,9H), 1,55(s,2H), 2,61(m,1H), 2,71(m,1H), 3,31-3,50(m,3H), 4,11(d,2H), 4,49(d,1H), 7,06(brs,1H), 7,17(d,1H), 7,54(m,1H), 8,40(s,1H).

B. terc. Butylester 3-oxo-3a-pyridin-2-ylmethyl-2-(2,2,2-trifluorethyl)-2,3,3a,4,6,7-hexahydropyrazolo[4,3-c]pyridin-5-karboxylové kyseliny

70%ní vodný roztok  $\text{CF}_3\text{CH}_2\text{NHNH}_2$  (325 ml, 1,986 mol) (získaný od Aldricha) byl extrahován toluenem (3x 120 ml). Do roztoku produktu vyrobeného podle stupně A (600 g, 1,655 mol) v toluenu (9 ml) byly nejdříve přidány sloučené toluenové extrakty obsahující bezvodý 2,2,2-trifluorethylhydrazin, načež následoval přídavek kyseliny octové (121,4 g, 1,986 mol). Reakční směs byla zahřívána na asi 79 °C po dobu asi 2 hodin, pak byla přidána další toluenová extrakce 70%ního vodného 2,2,2-trifluorethylhydrazinu (50 g). Reakční směs byla zahřívána na asi 80 °C po dobu asi 3,5 hodiny, ochlazená na teplotu místnosti a zředěna nasyceným vodným roztokem  $\text{NaHCO}_3$  (2 l). Toluenová vrstva byla oddělena a promyta nasyceným vodným roztokem chloridu sodného, vysušena síranem sodným a koncentrována za vakua, čímž se získal olej (754,8g). Krystalizace ze směsi methanol/voda poskytla požadovaný produkt jako bílou tuhou látku (609,5 g).

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1,50(s,9H), 2,53(d,1H), 2,70(br s,2H), 2,88(br s,1H), 3,31(m,2H), 3,97(m,1H), 4,19(m,1H), 4,46(br s,1H), 4,63(br s,1H), 7,06(m,2H), 7,51(m,1H), 8,34(m,1H).

C. 3a-Pyridin-2-ylmethyl-2-(2,2,2-trifluorethyl)-2,3a,4,5,6,7-hexahydropyrazolo[4,3-c]pyridin-3-on

Methansulfonová kyselina (11,6 g, 121 mmol) byla přidána po kapkách do roztoku produktu ze stupně B (10 g, 24,2 mmol) v dichlormethanu (100 ml) během 30 minut. Reakční směs byla míchána po dobu asi 1 hodiny, pak ochlazena na asi 0 °C a pak byl přidán triethylamin (18,6 ml, 133 mmol) přidávkou nálevkou. Směs byla ponechána ohřát na teplotu místnosti během asi 1 hodiny, zředěna dalším dichlormethanem a promyta nasyceným vodným roztokem NaCl, vysušena síranem sodným, zfiltrována a koncentrována za vakua, čímž se získal produkt jako bílá tuhá látka (7,2 g).

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 2,51-2,72(m,4H), 3,35(m,2H), 3,49(m,2H), 4,03(m,1H), 4,25(m,1H), 7,08(d,2H), 7,51(t,1H), 8,37(d,1H).

D. 3a-Pyridin-2-ylmethyl-2-(2,2,2-trifluorethyl)-2,3a,4,5,6,7-hexahydropyrazolo[4,3-c]pyridin-3-on-(D)-tartarat

V suché a dusíkem vyčištěné 5litrové baňce s kulatým dnem, vybavené mechanickým míchadlem, byla přidána D-(-)-kyselina vinná (129 g, 0,86 mol) ke sloučenině vyrobené podle stupně C (243 g, 0,78 mol) ve směsi aceton/voda (9:1, 2 430 ml) při asi 17 °C. Směs byla míchána při teplotě místnosti přes noc, zfiltrována, tuhá látka byla shromážděna a promyta studeným acetonem a vysušena za vakua. Produkt byl získán jako žlutá tuhá látka (284 g, výtěžek 78,8 %).

E. 2-terc.Butoxykarbonylamino-3-(2,4-difluorbenzyloxy)-propionová kyselina

Do roztoku N-Boc-(D)-serinu (452 g, 2,2026 mol) ve směsi THF (7 l) a DMF (3l) při asi 0 °C byl přidán terc.-

butoxidový roztok (515,8 g, 4,5963 mol). Reakční směs byla míchána při asi 0 °C po dobu asi 30 minut, pak byl přidán 2,4-difluorbenzylbromid, (456,5 g, 2,2051 mol). Po zahřátí na teplotu místnosti byla reakční směs koncentrována za vakua k odstranění THF. Reakční směs byla rozdělena mezi 4,5 litru H<sub>2</sub>O a 4,5 l IPE. Vrstvy byly odděleny a pH vodné vrstvy bylo nastaveno 1N HCl na hodnotu asi 3. Vodná vrstva byla extrahována dvakrát 4 l pokaždé IPE. Organický roztok byl vysušen nad síranem sodným a koncentrován za vakua, čímž se získala žlutá vosková tuhá látka (518,0 g, 70,9%ní výtěžek).

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 1,44(s,9H), 3,73(m,1H), 3,93(d,1H), 4,44(br s,1H), 4,54(s,2H), 5,34(m,1H), 6,78(m,1H), 6,84(m,1H), 7,30(m,1H).

F. Sůl methansulfonové kyseliny 2-amino-3-(2,4-difluorbenzyloxy)propionové kyseliny

Do roztoku produktu ze stupně E (1,19 g, 3,59 mmol) v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/IPE (1:1, 12 ml) byla přidána methansulfonová kyselina (1,72 g, 17,95 mmol) pomocí injekční stříkačky během asi 10 minut. Tuhá látka se vysrážela ihned z roztoku. Po asi 1 hodině byla tuhá látka zfiltrována a promyta směsí CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/IPE (1:1), čímž se získalo 939 mg produktu (výtěžek 80%ní).

G. 2-(2-terc.Butoxykarbonylamino-2-methylpropionylamino)-3-(2,4-difluorbenzyloxy)propionová kyselina

Do roztoku produktu ze stupně F (520 mg, 1,46 mmol) v THF/voda (4:1, 10 ml) byl přidán 2,5-dioxopyrrolidin-1-ylester 2-terc.butoxykarbonylamino-2-methylpropionové kyseliny (438 mg, 1,46 mmol) a triethylamin (369 mg, 3,65 mmol).

Reakční směs byla míchána při teplotě místnosti po dobu asi 1 hodiny a ochlazena 10%ním vodným roztokem kyseliny citrónové (10 ml). Po asi 15 minutách byl přidán ethylacetat (50 ml) a organická vrstva byla oddělena a promyta nasyceným vodným roztokem NaCl, vysušena nad síranem sodným a koncentrována za vakua, čímž se získala pěna (534,1 mg, 88%ní výtěžek).

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  : 1,38(br s, 15H), 3,77(d, 1H), 3,92(d, 1H), 4,52(m, 3H), 6,92(m, 1H), 7,41(m, 1H), 7,58(d, 1H).

H. terc. Butylester(1-{1-(2,4-difluorbenzyloxymethyl)-2-oxo-2-[3-oxo-3a-pyridin-2-ylmethyl-2-(2,2,2-trifluorethyl)-2,3-3a,4,6,7-hexahydropyrazolo[4,3-c]pyridin-5-yl]ethylkarbamoyl}-1-methylethyl)karbamové kyseliny

(a) Do sloučeniny vyrobené ve stupni D (517 g, 1,12 mol) byl přidán při asi  $-6^\circ\text{C}$  ethylacetat (5 170 ml) v suché a dusíkem vyčištěné 12litrové varné baňce vybavené mechanickým míchadlem. Roztok byl ochlazen na asi  $-40^\circ\text{C}$ , pak byl přidán triethylamin (398 ml, 2,86 mol) během asi 45 minut. Reakční směs byla míchána po dobu asi 90 minut při teplotě mezi asi  $-50^\circ\text{C}$  až asi  $-40^\circ\text{C}$ , zfiltrována do 22litrové varné baňky vyčištěné dusíkem, promyta ethylacetatem (2 068 ml, předchlazena na asi  $-50^\circ\text{C}$ ), čímž se získala volná báze jako bílá tuhá látka.

(b) Sloučenina vyrobená ve stupni G (425 g, 1,02 mol) byla přidána při asi  $-30^\circ\text{C}$  do ethylacetatového roztoku obsahujícího produkt ze stupně H (a) triethylamin (654 ml, 4,69 mol) a PPAA (cyklický anhydrid 1-propanfosfonové kyseliny) (50%ní v ethylacetatu, 916 ml, 1,53 mol).

15. 12. 99

- 46 -

Reakční směs byla míchána po dobu asi 1 hodiny, promyta vodou a nasyceným vodným roztokem  $\text{NHCl}$ , vysušena nad síranem sodným a koncentrována za vakua, čímž se získal produkt jako olej (636 g, 87,8%ní výtěžek).

I. 2-Amino-N-{1-(2,4-difluorbenzyloxymethyl)-2-oxo-2-[3-oxo-3a-pyridin-2-ylmethyl-2-(2,2,2-trifluorethyl)-2,3,3a,4,6,7-hexahydropyrazolo[4,3-c]pyridin-5-yl]ethyl}-2-methyl-propionamid

Methansulfonová kyselina (258,3 ml, 3,98 mol) byla přidána po kapkách při asi 15 °C během asi 55 minut do produktu ze stupně H (566 g, 0,796 mol) v dichlormethanu (11 320 ml) v suché a dusíkem vyčištěné 22litrové varné baňce vybavené mechanickým míchadlem. Směs byla míchána po dobu asi 40 minut při asi 20 °C, pak byl přidán nasycený vodný roztok  $\text{NaHCO}_3$  (8 490 ml), až bylo pH asi 7,8. Organická vrstva byla oddělena, promyta vodou a nasyceným vodným roztokem  $\text{NaCl}$ , vysušena nad síranem sodným a koncentrována za vakua, čímž se získal olejový produkt (388,8 g, 80%ní výtěžek).

J. L-(+)-tartarat 2-amino-N-{1-(2,4-difluorbenzyloxymethyl)-2-oxo-2-[3-oxo-3a-pyridin-2-ylmethyl-2-(2,2,2-trifluorethyl)-2,3,3a,4,6,7-hexahydropyrazolo[4,3-c]pyridin-5-yl]ethyl}-2-methyl-propionamidu

Do roztoku produktu ze stupně I (370 g, 0,6 mol) v methanolu (4 070 ml) ve 12litrové varné baňce vybavené mechanickým míchadlem byla přidána L-(+)-kyselina vinná (90 g, 0,6 mol). Reakční směs byla míchána po dobu asi 90 minut při 22 °C, zfiltrována a koncentrována. Surový zbytek byl zředěn ethylacetatem (4 560 ml), zahříván při asi 70 °C a pomalu ponechán ochladit na teplotu místnosti během asi 17 hodin.

15.12.99

- 47 -

Tuhá látka byla zfiltrována a vysušena, čímž se získaly bílé krystaly, t.t. 188-189 °C (348,46 g, výtěžek 76%ní).

<sup>1</sup>H-NMR (MeOH, d4)  $\delta$ : 8,28(d,1H), 7,59(t,1H), 7,41-7,39(m,1H), 7,18-7,13(m,1H), 6,92(t,1H), 5,2(t,1H), 4,56(bs,3H), 4,36(s,2H), 4,31-4,25(m,1H), 4,13-4,06(m,1H), 3,78(d,2H), 3,21(t,1H), 3,18-2,96(m,2H), 2,65-2,55(m,2H), 1,57(d,6H).

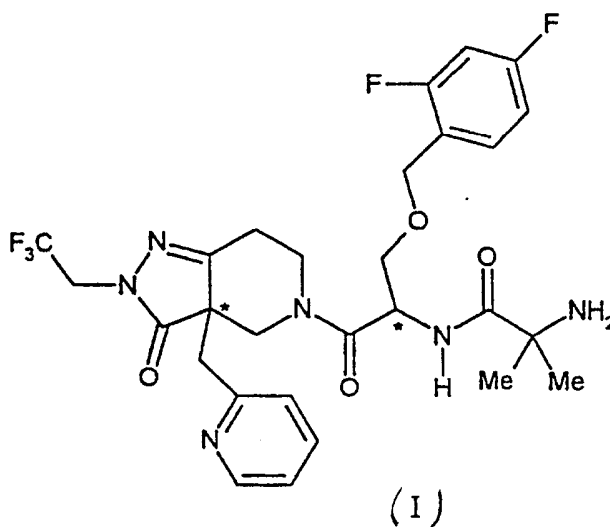
MS: MH<sup>+</sup> 611.

$[\alpha]^{589} + 22,03$  (c=11,9, MeOH).

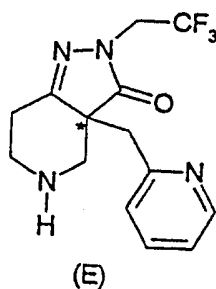


## P A T E N T O V É   N Á R O K Y

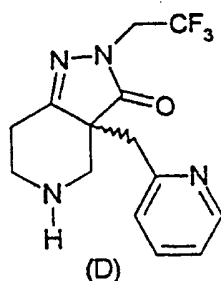
1. Sůl (L)-(+)-kyseliny vinné sloučeniny vzorce I



2. Sůl (L)-(+)-kyseliny vinné sloučeniny vzorce I podle nároku 1, kde je stereochemická konfigurace 3a-S, 1-R.
3. Sůl (L)-(+)-kyseliny vinné sloučeniny vzorce I podle nároku 1, kde je stereochemická konfigurace 3a-S, 1-S.
4. Sůl (L)-(+)-kyseliny vinné sloučeniny vzorce I podle nároku 1, kde je stereochemická konfigurace 3a-R, 1-S.
5. Sůl (L)-(+)-kyseliny vinné sloučeniny vzorce I podle nároku 1, kde je stereochemická konfigurace 3a-R, 1-R.
6. Způsob přípravy soli (D)-kyseliny vinné nebo (L)-kyseliny vinné sloučeniny vzorce E



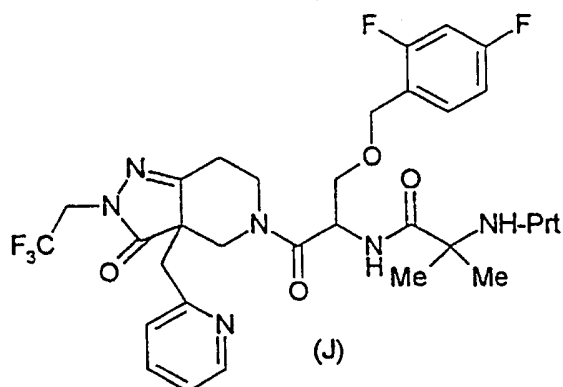
vyznačený tím, že se nechá reagovat sloučenina vzorce D



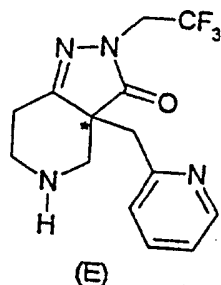
s (D)-kyselinou vinnou nebo (L)-kyselinou vinnou ve směsi aceton:voda v poměru asi 8:1 až asi 9:1 při teplotě mezi asi 0 °C až teplotě místnosti.

7. Způsob podle nároku 6 vyznačený tím, že se (D)-kyselina vinná nechá reagovat se sloučeninou vzorce D a sloučenina vzorce E má R-konfiguraci.

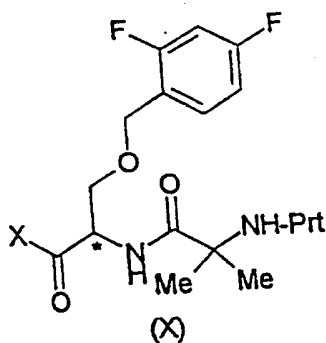
8. Způsob přípravy sloučeniny vzorce J



vyznačený tím, že se nechá reagovat sloučenina vzorce E



se sloučeninou vzorce X



kde Prt je chránicí skupina aminu a

X je OH,  $-O-C_1-C_4$ alkyl nebo halogen,

v přítomnosti organické báze a peptidového spojovacího činidla při teplotě mezi asi  $-78^{\circ}\text{C}$  až asi  $-20^{\circ}\text{C}$ .

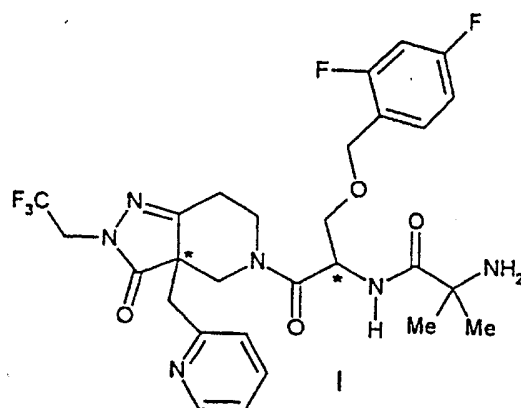
9. Způsob podle nároku 8 vyznačený tím, že peptidovým spojovacím činidlem je anhydrid l-propanfosfonové kyseliny a sloučenina vzorce X má R-konfiguraci a sloučenina vzorce E má R-konfiguraci.

10. Způsob podle nároku 9 vyznačený tím, že Prt je terc.-butoxykarbonyl.

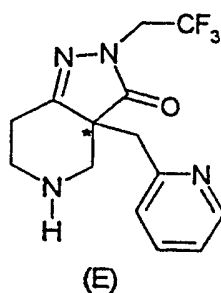
11. Způsob přípravy soli (L)-(+)-kyseliny vinné sloučeniny vzorce I

16.12.99

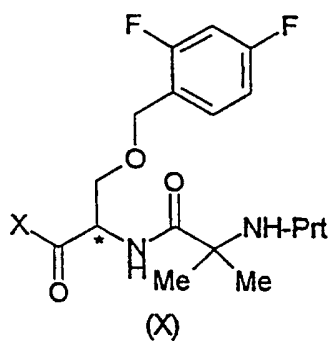
- 51 -



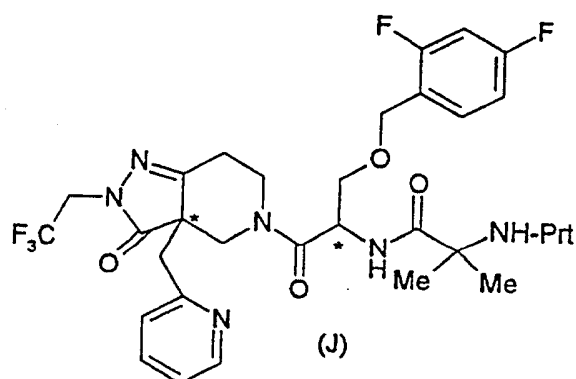
vyznačený tím, že se nechá reagovat sloučenina vzorce E



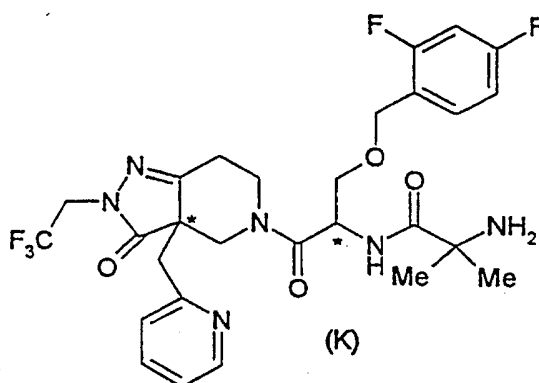
se sloučeninou vzorce X



kde Prt je chránicí skupina aminu a  
 X je OH,  $-O(C_1-C_4)$ alkyl nebo halogen,  
 v přítomnosti organické báze a peptidového spojovacího činidla při teplotě mezi asi  $-78^{\circ}\text{C}$  až asi  $-20^{\circ}\text{C}$ , čímž se získá  
 sloučenina vzorce J



sloučenina vzorce J se deprotektuje za příslušných deprotekčních podmínek, čímž se získá sloučenina vzorce K



sloučenina vzorce K se nechá reagovat s (L)-(+)-kyselinou vinnou v reakčním inertním rozpouštědle, čímž se získá sůl (L)-(+)-kyseliny vinné sloučeniny vzorce I.

12. Způsob podle nároku 11 vyznačený tím, že Prt je terc.-butoxykarbonyl.

13. Způsob podle nároku 12 vyznačený tím, že peptidovým spojovacím činidlem je cyklický anhydrid 1-propanfosfonové

kyseliny a sloučenina vzorce I má absolutní a relativní konfiguraci 3a-(R), 1-(R).

14. Způsob zvýšení hladin endogenního růstového hormonu u lidí nebo jiných živočichů, vyznačený tím, že se člověku nebo živočichu podává účinné množství soli (L)-(+)-kyseliny vinné sloučeniny vzorce I podle nároku 1.

15. Farmaceutická kompozice vyznačená tím, že obsahuje farmaceuticky akceptovatelný nosič a určité množství soli (L)-(+)-kyseliny vinné sloučeniny vzorce I podle nároku 1.

16. Farmaceutická kompozice vhodná pro zvýšení endogenní produkce nebo uvolňování růstového hormonu u člověka nebo jiného živočicha vyznačená tím, že obsahuje farmaceuticky akceptovatelný nosič, účinné množství soli (L)-(+)-kyseliny vinné sloučeniny vzorce I podle nároku 1 a sekretagog růstového hormonu vybraný ze skupiny zahrnující GHRP-6, hexarelin, GHRP-1, uvolňovací faktor růstového hormonu (GRF), IGF-1, IGF-2, B-HT920 nebo jejich analogy.

17. Způsob pro léčení nebo prevenci osteoporózy vyznačený tím, že zahrnuje podávání člověku nebo jinému živočichu v případě takového léčení nebo prevence, určitého množství soli (L)-(+)-kyseliny vinné sloučeniny vzorce I podle nároku 1, které je účinné při léčení nebo prevenci osteoporózy.

18. Způsob léčení nebo prevence nemocí nebo stavů, které mohou být léčeny nebo předcházeny růstovým hormonem, vyznačený tím, že se člověku nebo jinému živočichu v případě takového léčení nebo prevence podává množství soli (L)-(+)-kyseliny vinné sloučeniny vzorce I podle nároku 1, které je účinné při podněcování uvolňování endogenního růstového hormonu.

19. Způsob podle nároku 18 vyznačený tím, že nemocí nebo stavem je městnavé selhání srdce, obezita nebo slabost spojená se stárnutím.

20. Způsob podle nároku 19 vyznačený tím, že nemocí nebo stavem je městnavé selhání srdce.

21. Způsob podle nároku 19 vyznačený tím, že nemocí nebo stavem je slabost spojená se stárnutím.

22. Způsob akcelerace nápravy zlomenin kostí, zmírnění katabolické odezvy proteinu po větší operaci, snížení kachexie nebo ztrát proteinu vlivem chronické nemoci, akcelerace hojení ran, akcelerace uzdravení popálených pacientů, nebo pacientů, kteří podstoupili větší chirurgický zákrok, vyznačený tím, že se podává savci v případě potřeby takovéhoho léčení množství soli (L)-(+)-kyseliny vinné sloučeniny vzorce I podle nároku 1, které je účinné při podněcování uvolňování endogenního růstového hormonu.

23. Způsob podle nároku 22 vyznačený tím, že je pro urychlování uzdravování pacientů, kteří podstoupili větší chirurgický zákrok.

24. Způsob podle nároku 22 vyznačený tím, že je určen pro urychlení nápravy zlomeniny kostí.

25. Způsob pro zvýšení síly svalů, mobility, udržování tloušťky kůže, metabolické homeostáze nebo renální homeostáze, vyznačený tím, že zahrnuje podávání člověku nebo jinému živočichu v případě potřeby takovéhoho léčení množství soli (L)-(+)-kyseliny vinné sloučeniny vzorce I podle nároku 1, které je účinné při podněcování uvolňování endogenního růstového hormonu.

26. Způsob pro léčení nebo prevenci osteoporózy vyznačený tím, že se podává člověku nebo jinému živočichu s osteoporózou účinné množství bisfosfonatové sloučeniny a soli (L)-(+)-kyseliny vinné sloučeniny vzorce I podle nároku 1.

27. Způsob léčení osteoporózy podle nároku 26 vyznačený tím, že bisfosfonatovou sloučeninou je ivandronat.

28. Způsob léčení osteoporózy podle nároku 26 vyznačený tím, že bisfosfonatovou sloučeninou je alendronat.

29. Způsob léčení nebo prevence osteoporózy vyznačený tím, že se podává člověku nebo jinému živočichu s osteoporózou účinné množství estrogenu nebo Premarinu<sup>®</sup> a soli (L)-(+)-kyseliny vinné sloučeniny vzorce I podle nároku 1 a případně progesteronu.

30. Způsob léčení osteoporózy vyznačený tím, že se podává člověku nebo jinému živočichu s osteoporózou účinné množství kalcitoninu a soli (L)-(+)-kyseliny vinné sloučeniny vzorce I podle nároku 1.

31. Způsob zvýšení IGF-1 hladin u člověka nebo jiného živočicha deficitního na IGF-1 vyznačený tím, že se podává člověku nebo jinému živočichu s deficitem IGF-1 účinné množství soli (L)-(+)-kyseliny vinné sloučeniny vzorce I podle nároku 1.

32. Způsob léčení osteoporózy vyznačený tím, že se podává člověku nebo jinému živočichu s osteoporózou účinné množství agonisty estrogenu nebo antagonisty estrogenu a soli (L)-(+)-kyseliny vinné sloučeniny vzorce I podle nároku 1.



33. Způsob podle nároku 32 vyznačený tím, že agonistou nebo antagonistou estrogenu je tamoxifen, droloxifen, raloxifen nebo idoxifen.

34. Způsob podle nároku 32 vyznačený tím, že agonistou nebo antagonistou estrogenu je

cis-6-(4-fluorfenyl)-5-[4-(2-piperidin-1-ylethoxy)fenyl]-5,6,7,8-tetrahydronaftalen-2-ol,

(-)-cis-6-fenyl-5-[4-(2-pyrrolidin-1-ylethoxy)fenyl]-5,6,7,8-tetrahydronaftalen-2-ol,

cis-6-fenyl-5-[4-(2-pyrrolidin-1-ylethoxy)fenyl]-5,6,7,8-tetrahydronaftalen-2-ol,

cis-1-[6'-pyrrolidinoethoxy-3'-pyridyl]-2-fenyl-6-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydronaftalen,

1-(4'-pyrrolidinoethoxyfenyl)-2-(4"-fluorfenyl)-6-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin,

cis-6-(4-hydroxyfenyl)-5-[4-(2-piperidin-1-yl-ethoxy)fenyl]-5,6,7,8-tetrahydronaftalen-2-ol, nebo

1-(4'-pyrrolidinoethoxyfenyl)-2-fenyl-6-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin.

35. Způsob zvýšení svalové hmoty vyznačený tím, že se podává člověku nebo jinému živočichu v případě potřeby takového léčení účinné množství soli (L)-(+)-kyseliny vinné sloučeniny vzorce I podle nároku 1.

36. Způsob podpory růstu dětí deficitních na růstový hormon vyznačený tím, že se dítěti deficitnímu na růstový hor-

mon podává účinné množství soli (L)-(+)-kyseliny vinné sloučeniny vzorce I podle nároku 1.

37. Způsob léčení inzulinové rezistence u savců vyznačený tím, že se takovému savci podává účinné množství soli (L)-(+)-kyseliny vinné sloučeniny vzorce I podle nároku 1.

38. Způsob podle nároku 37 vyznačený tím, že stavem spojeným s inzulinovou rezistencí je typ I diabetes, typ II diabetes, hyperglykémie, zhoršená tolerance glukosy nebo syndrom rezistence na inzulin.

39. Způsob podle nároku 37 vyznačený tím, že stav spojený s inzulinovou rezistencí je spojen s obezitou nebo stářím.

40. Způsob zvýšení hladin endogenního růstového hormonu vyznačený tím, že se podává člověku nebo jinému živočichu v případě této potřeby účinné množství agonisty funkčního somatostatinu a soli (L)-(+)-kyseliny vinné sloučeniny vzorce I podle nároku 1.

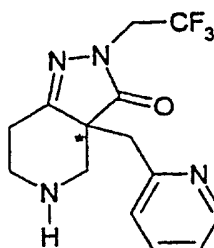
41. Způsob podle nároku 40 vyznačený tím že funkčním agonistou somatostatinu je alfa-2-adrenergický agonist.

42. Způsob léčení nebo prevence městnavého selhání srdce, obezity nebo slabosti spojené se stárnutím vyznačený tím, že se podává člověku nebo jinému živočichu v případě takovéto potřeby účinné množství funkčního agonisty somatostatinu a soli (L)-(+)-kyseliny vinné vzorce I podle nároku 1.

43. R,S-enantiomerní směs, R-enantiomer nebo S-enantiomer sloučeniny vzorce

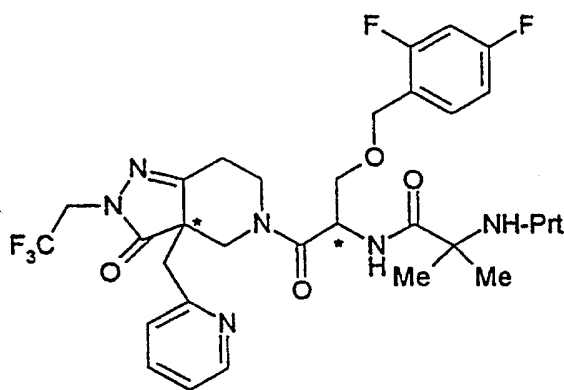
18.12.99

- 58 -



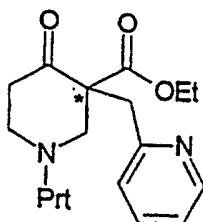
44. Sůl (D)-kyseliny vinné nebo (L)-kyseliny vinné sloučeniny podle nároku 43.

45. 3a-(R,S),1-(R) diastereoisomerní směs, 3a(R),1-(R) diastereoisomer nebo 3a-(S)-1-(R) diastereoisomer sloučeniny vzorce

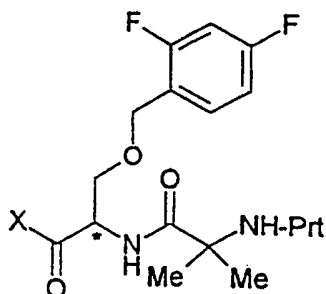


kde Prt je chránicí skupina aminu vybraná ze skupiny zahrnující t-BOC, FMOC a CBZ.

46. R,S-enantiomerní směs, R-enantiomer nebo S-enantiomer sloučeniny vzorce



47. R,S-enantiomerní směs, R-enantiomer nebo S-enantiomer sloučeniny vzorce



kde X je OH,  $-O(C_1-C_4)$ alkyl nebo halogen a Prt je chránicí skupina aminu.

48. Sloučenina podle nároku 47, kde X je OH, Prt je BOC a stereocentrum je v R-konfiguraci.

49. Způsob léčení poruchy spánku u savců trpících poruchami spánku vyznačený tím, že se tomuto savci podává účinné množství soli (L)-(+)-kyseliny vinné sloučeniny vzorce I podle nároku 1.

Zastupuje: JUDr. Ing. Milan Hořejš