



[12] **BREVET DE INVENȚIE**

**Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată
în termen de 6 luni de la data publicării**

| | |
|--|--|
| (21) Nr. cerere: 93-01692 | (61) Perfecționare la brevet: Nr. |
| (22) Data de depozit: 21.06.1991 | (62) Divizată din cererea: Nr. |
| (30) Prioritate: | (86) Cerere internațională PCT: Nr. EP 91 / 01147 21.06.1991 |
| (41) Data publicării cererii: BOPI nr. | (87) Publicare internațională: Nr. WO 93/00337 07.01.1993 |
| (42) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 30.07.1998 BOPI nr. 7/1998 | (56) Documente din stadiul tehnicii: EP 207331; 0147850 |
| (45) Data eliberării și publicării brevetului: BOPI nr. | |

| | |
|-------------------|--|
| (71) Solicitant: | DR. KARL THOMAE GMBH , BIBERACH/RISS, DE; |
| (73) Titular: | DR. KARL THOMAE GMBH , BIBERACH/RISS, DE; |
| (72) Inventatori: | GRELL WOLFGANG, BIBERACH 1, DE; GREISCHEL ANDREAS, BIBERACH 1, DE; ZAHN GABRIELE, BIBERACH 1, DE; MARK MICHAEL, BIBERACH, DE; KNORR HANSJORG, D-6507 INGELHEIM, DE; RUPPRECHT ECKHARD, AULENDORF-TANNHAUSEN, DE; MULLER ULRICH, BIBERACH, DE; |
| (74) Mandatar: | ROMINVENT S.A. (AGENȚIE PENTRU BREVETE, DESENE, MĂRCI ȘI TRANSFER TEHNOLOGIE) BUCUREȘTI |

(54) **IZOMER OPTIC AL ACIDULUI
2-ETOXI-4-[N-[1-(2-PIPERIDINOFENIL)-3-METIL-1-BUTIL]AMINO
CARBONILMETIL]-BENZOIC, PROCEDEU PENTRU PREPARAREA
ACESTUIA ȘI INTERMEDIARI PENTRU REALIZAREA
PROCEDEULUI**

(57) **Rezumat:** Invenția se referă la un izomer optic, și anume acidul (S)(+)-2-etoxi-4-[N-[1-(2-piperidinofenil)-3-metil-1-butil]aminocar-

bonilmetil]-benzoic, la un procedeu pentru prepararea acestuia și la intermediari pentru realizarea procedeeului.

Revendicări: 6

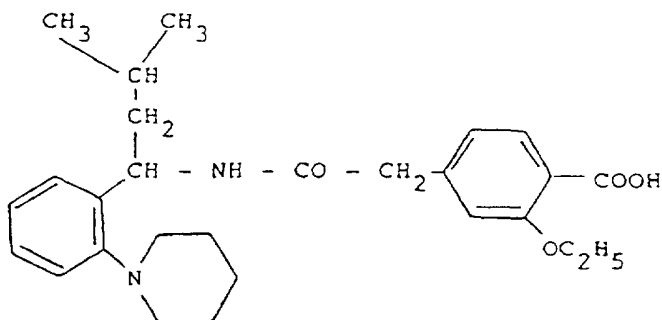
RO 113462 B1



RO 113462 B1

Invenția se referă la un izomer optic al acidului 2-etoxi-4-[N-[1-(2-piperidino-fenil)-3-metil-1-butil]aminocarbonilmetil] benzoic, la procedee de preparare a acestora și la intermediari pentru realizarea procedeelor, compusul fiind utilizabil în medicamente pentru tratamentul diabetului.

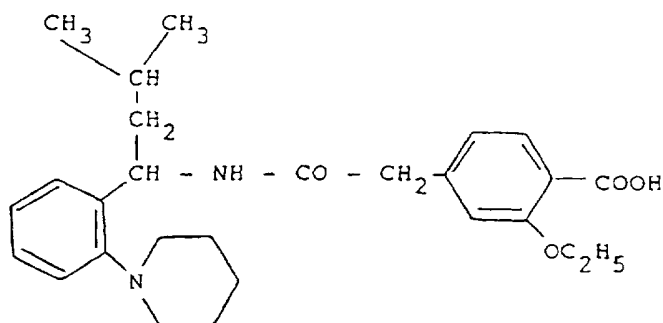
Se cunoaște racematul acidului 2-etoxi-4-[N-[1-(2-piperidino-fenil)-3-metil-1-butil]aminocarbonilmetil] benzoic (cod nr. A G - E E 388 ZW) cu formula:



(EP 0147850).

Se cunosc două forme polimorfe ale acestui compus. Acest compus și sărurile lui acceptabile fiziologic prezintă proprietăți farmacologice, valoroase și anume o acțiune asupra schimbului de substanță, intermediar, mai ales o acțiune de scădere a zahărului din sânge (EP 207331).

Invenția constă într-un izomer optic al acidului 2-etoxi-4-[N-[1-(2-piperidino-fenil)-3-metil-1-butil]aminocarbonilmetil]-benzoic cu formula:



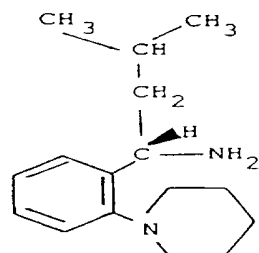
și anume, acidul (S) (+)-2-etoxi-4-[N-[1-(2-piperidino-fenil)-3-metil-1-butil]aminocarbonilmetil]benzoic, având puritatea optică de cel puțin 95 %. precum și sărurile sale cu acizi sau baze organice sau anorganice acceptabile farmaceutic

Invenția se referă la acest izomer optic care are o formă cu punct de topire ridicat are 129-131 °C și cu $[\alpha]_D^{29} = +7,45^\circ$ în metanol la o concentrație de $C = 1,06$; precum și o formă cu punct de topire scăzut de 102-103 °C și cu $[\alpha]_D^{29} = +6,7^\circ$ în metanol la o concentrație de $C = 1$.

Compusul conform invenției prezintă o acțiune de scădere a zahărului din sânge și se utilizează pentru tratamentul bolii *Diabetes mellitus*.

Invenția se referă și la procedee pentru prepararea acidului (S) (+)-2-etoxi-4-[N-[1-(2-piperidino-fenil)-3-metil-1-butil]aminocarbonilmetil] benzoic care constau în aceea că se tratează:

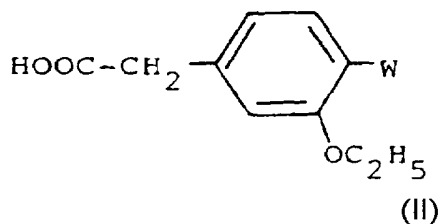
a) (S)-amine cu formula generală (I):



(I)

RO 113462 B1

cu un acid carboxilic cu formula generală (II) :



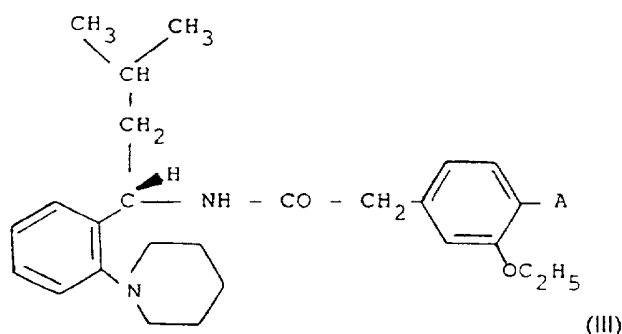
55

în care: W este o grupă carboxi sau o grupă carboxi protejată printr-un radical de protecție cum ar fi benzil, sau cu derivați ai acestuia, reactivi, obținuți eventual în amestecul de reacție cum ar fi esteri, tioesteri, halogenuri, anhidride sau imidazolide și apoi dacă este necesar se scindează o grupă de protecție utilizată, sau

60

b) se scindează un compus (S) cu formula generală (III):

65



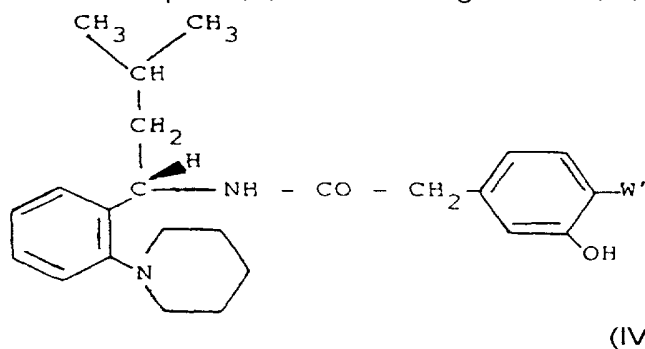
70

în care: A reprezintă o grupă care poate fi trecută prin hidroliză într-o grupă carboxi, cum ar fi amide, esteri, tioesteri, ortoesteri, iminoesteri, amidine sau anhidride, care pot fi substituie sau nesubstituie, grupa nitril, grupa tetrazolil, o grupă eventual substituită de 1,3-oxazol-2-il sau 1,3-oxazolin-2-il, o grupă care poate fi trecută prin termoliză într-o grupă carboxi, cum ar fi esterii cu alcoolii terțiar, de exemplu butil-terț-esterii sau o grupă care poate fi trecută prin hidrogenoliză într-o grupă carboxi, cum ar fi grupele aralchil, de exemplu grupa benzil sau

75

c) se tratează un compus (S) cu formula generală (IV)

80



85

90

în care: W' este o grupă carboxi sau o grupă alcoxycarbonil cu 2 până la 5 atomi de carbon în total, partea de alchil a grupei alcoxi putând fi substituită, cu un compus cu formula generală (V):

95



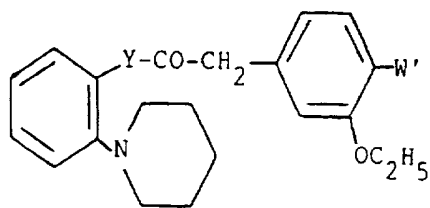
în care: Z este o grupă care se poate înlocui nucleofil, cum ar fi un atom de halogen, o grupă sulfonyloxi, sau mai poate reprezenta împreună cu atomul de hidrogen învecinat o grupă diazo, și dacă este necesar, după reacție, compusul astfel obținut se hidrolizează sau se hidrogenolizează sau

100

RO 113462 B1

d) se reduce enantiomerul selectiv, un compus cu formula generală (VI):

105

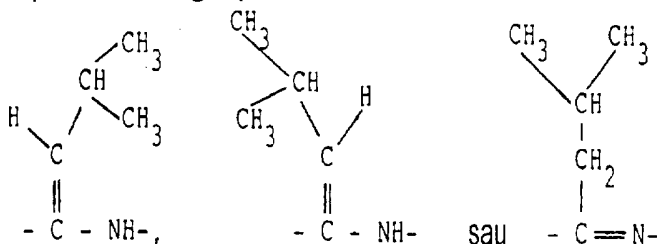


(VI)

110

în care: W' este o grupă carboxi sau o grupă alcoxycarbonil cu în total 2 până la 5 atomi de carbon, partea alchil a grupei alcoxi putând fi substituită printr-o grupă fenil și Y reprezintă o grupă cu formula:

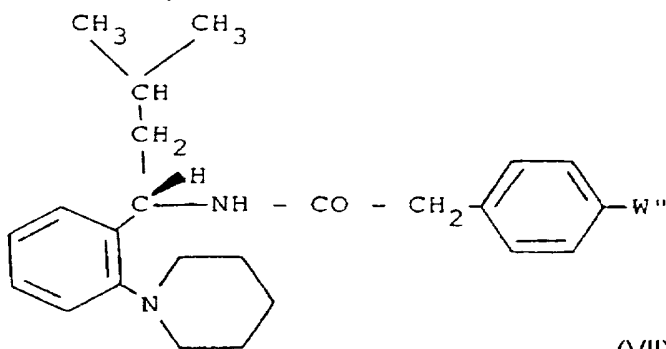
115



120

și dacă este necesar se hidrolizează un compus astfel obținut sau e) se oxidează un compus (S) cu formula generală (VII):

125



130

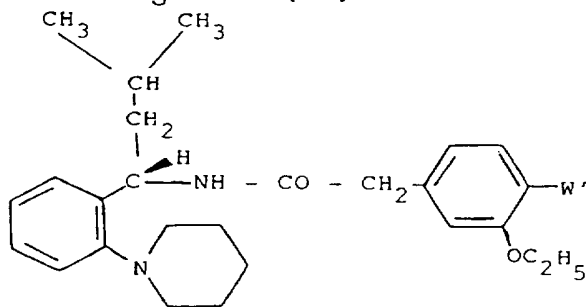
(VII)

în care W'' reprezintă o grupă care poate fi trecută prin oxidare într-o grupă carboxi, sau:

135

f) se desface un amestec constând dintr-o cantitate oarecare de enantiomer (S) cu formula generală (VIII):

140

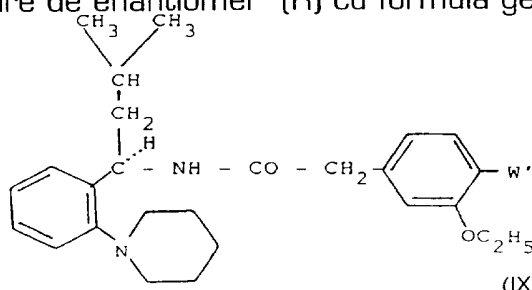


145

(VIII)

și o cantitate oarecare de enantiomer (R) cu formula generală (IX):

150

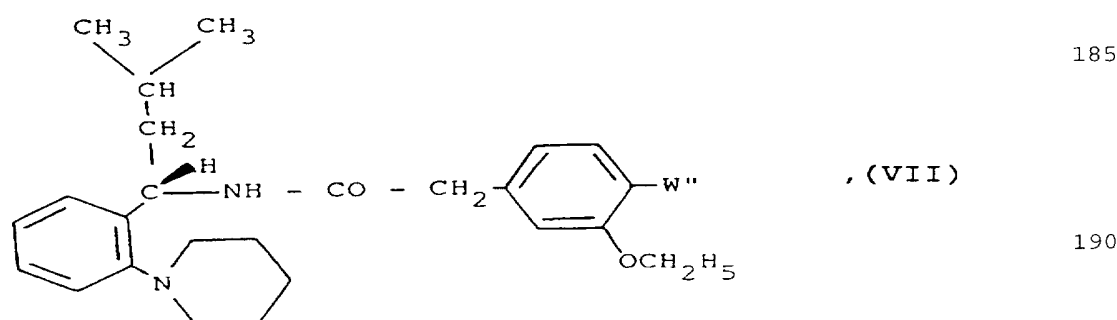
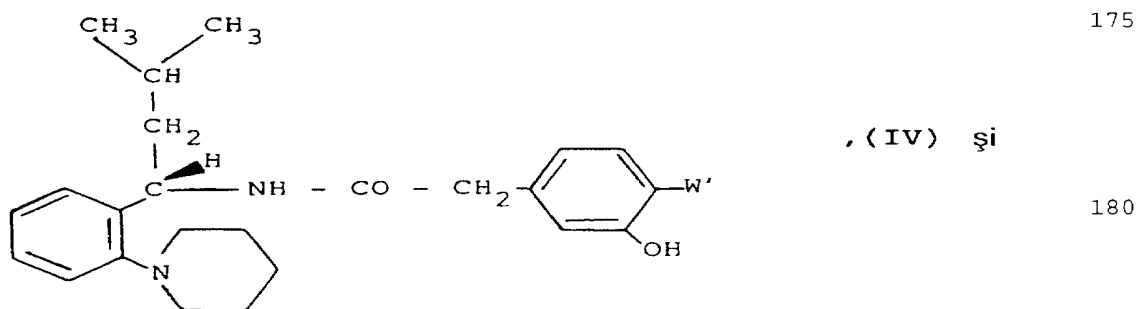
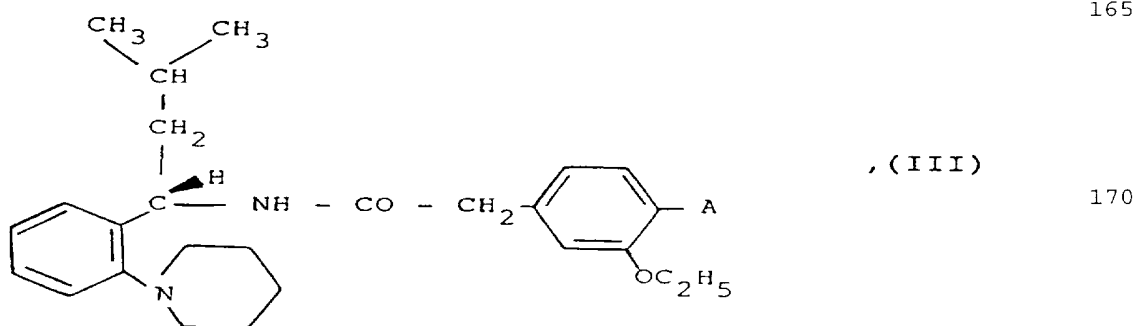


(IX)

RO 113462 B1

în care: W' reprezintă o grupă carboxi sau o grupă alcoxycarbonil cu în total 2 până la 5 atomi de carbon, partea de alchil a grupei alcoxi putând să fie substituită printr-o grupă fenil, și un compus astfel obținut, dacă este necesar, se trece prin recristalizare într-un compus cu o puritate mai ridicată a enantiomerilor, obținându-se prin cristalizare din etanol/apă, 2:1, forma cu punct de topire ridicat, punct de topire de 130-131 °C, și prin cristalizare din eter de petrol/toluen, 5:3, obținându-se forma cu punct de topire scăzut, punct de topire 99-101 °C, și compusul astfel obținut se poate trece în sărurile sale, mai ales în sărurile suportabile fiziologic, cu acizi anorganici sau organici sau baze.

Alt obiect al invenției îl constituie noi intermediari pentru realizarea procedeelelor de preparare a noului enantiomer, având formula generală:



în care: în care A este o grupă care se poate trece prin hidroliză, termoliză sau hidrogenoliză într-o grupă carboxi, W' este o grupă carboxi, sau o grupă alcoxycarbonil cu total 2 până la 5 atomi de carbon, partea de alcoxi putând fi substituită printr-o grupă fenil și W'' reprezintă o grupă care poate trece prin oxidare într-o grupă carboxi, și sărurile lor de adiție.

Invenția prezintă avantaje prin aceea că enantiomerul (S) conform invenției prezintă proprietăți superioare de scădere a zahărului din sânge, nefiind necesară o doză mare de medicament.

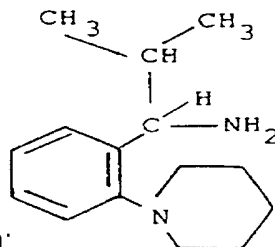
Prezenta invenție se referă, deci, la noul acid (S) (+) 2-etoxi-4-[N-[1-(2-piperidinofenil)-3-metilbutil]aminocarbonilmetil]benzoic sau un acid (S) (+) 2-etoxi-4-[N-[1-(2-piperidinofenil)-3-metil-1-butil]aminocarbonilmetil]benzoic, care

RO 113462 B1

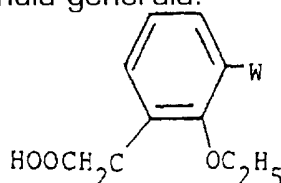
205 este practic pur din punct de vedere optic, de exemplu are o puritate optică de cel puțin $e = 95\%$, de preferință 98 până la 100 %, la sărurile sale acceptabile fiziologic, cu acizi sau baze anorganice și poate fi introdus în compoziții ca atare sau sărurile acestuia acceptabile fiziologic și la procedee pentru prepararea acestora.

Conform invenției, noul compus se obține prin următoarele metode:

210 a) Reacția (S)-aminei cu formula :



215 cu un acid carboxilic cu formula generală:



220 în care: W este o grupă carboxi sau o grupă carboxi protejată printr-un radical de protecție sau cu un derivat al acestuia obținut eventual în amestecul de reacție, capabil de a reacționa și în cazul necesar, scindarea ulterioară a radicalului de protecție.

225 Ca derivați capabili de reacție ai unui compus cu formula generală (II), se pot lua în considerație, de exemplu, esterii lor, ca etil-, metil-, sau benzil-esterul, tioesterii lor, ca metiltioesterul sau etiltioesterul, halogenurile lor, cum ar fi clorura acidă, anhidridele lor sau imidazolizii.

230 Reacția este efectuată în mod adecvat într-un solvent, cum ar fi clorura de metilen, cloroform, tetraclorură de carbon, eter, tetrahidrofuran, dioxan, benzen, toluen, acetonitril, sau dimetilformamida, eventual în prezența unui agent care activează acidul sau a unui agent deshidratant, de exemplu în prezența etilesterului acidului cloroformic, izobutilesterului acidului cloroformic, 235 clorurii de tionil, tricolorurii de fosfor, pentoxidului de fosfor, N,N'-diclohexilcarbodiimidei, N,N'-diclohexilcarbodiimidei/n-hidroxi-succinimidei, N,N'-carbonildiimidazolului sau N,N'-tionildiimidazolului sau trifenilfosfin/tetraclorurii de carbon, sau a unui agent care activează grupa amino, de exemplu, tricolorura de fosfor, și eventual în prezența unei baze anorganice cum ar fi carbonatul de 240 sodiu sau a unei baze organice terțiare, cum ar fi trietilamina sau piridina, care pot servi în același timp ca solvenți, la temperaturi între -25 și 250 °C, de preferință însă la temperaturi între -10 °C și temperatura de fierbere a solventului utilizat. Reacția poate fi efectuată și fără solvent, apoi apa ce se 245 formează în timpul reacției poate fi separată prin distilare azeotropă, de exemplu prin încălzire cu toluen pe separatorul de apă, sau prin adaos al unui agent de uscare, cum ar fi sulfatul de magneziu sau cu sită moleculară.

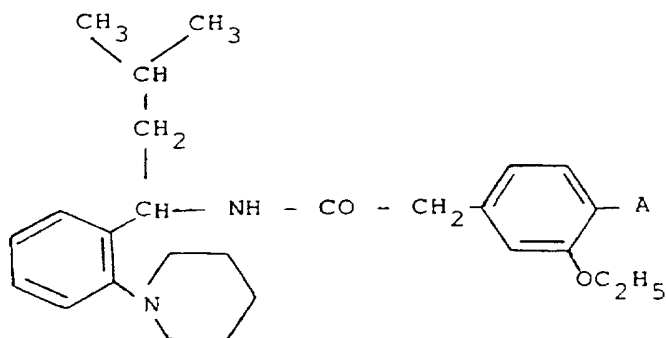
În cazul în care este necesar, separarea ulterioară a unui radical de protecție este efectuată de preferință hidrolitic, în mod adecvat fie în prezența unui acid cum ar fi acidul clorhidric, acidul sulfuric, acidul fosforic, acidul 250 trifluoroacetic sau acidul tricolorhidric, sau în prezența unei baze, ca hidroxidul de sodiu, sau hidroxidul de potasiu, într-un solvent adecvat, ca apa, metanol/apă, etanol, etanol/apă, apă/izopropanol sau apă/dioxan la temperaturi între -10 și +120 °C, de exemplu la temperaturi între temperatura camerei și temperatura de fierbere a amestecului de reacție.

RO 113462 B1

Un radical terțiar de butil utilizat ca radical de protecție poate fi scindat și în mod termic, eventual într-un solvent inert cum ar fi clorură de metilen, cloroform, benzen, toluen, tetrahidrofuran, dioxan sau acid acetic glacial și de preferință în prezența unui acid puternic cum ar fi acidul trifluoracetic, acid bromhidric, acid *p*-toluensulfonic, acid sulfuric, acid fosforic sau acid polifosforic.

Apoi un radical de benzen utilizat ca radical de protecție poate fi scindat și hidrogenolitic în prezența unui catalizator de hidrogenare cum ar fi paladiu/cărbune într-un solvent adecvat cum ar fi metanol, etanol, etanol/apă, acid acetic glacial, etil-esterul acidului acetic, dioxan sau dimetilformamidă.

b) Scindarea unui compus (S) cu formula generală (III):



(III)

în care A reprezintă o grupare care poate fi trecută într-o grupare carboxi, prin hidroliză, termoliză sau hidrogenoliză.

Ca grupe hidrolizabile se pot lua în considerație de exemplu derivați funcționali ai grupei carboxi ca amidele, esterii, tioesterii, ortoesterii, imino-esterii, amidinele sau anhidridele, substituie sau nesubstituie, gruparea nitril, gruparea tetrazolil, o grupare eventual substituită de 1,3-oxazol-2-il sau 1,3-oxazolin-2-il și ca grupe termolitic scindabile, de exemplu esterii cu alcoolii terțiar, de exemplu butil terțesterii și ca grupe scindabile hidrogenolitic de exemplu grupele aralchilice, de exemplu grupa benzil.

Hidroliza se realizează în mod adecvat fie în prezența unui acid cum ar fi acidul clorhidric, acidul sulfuric, acidul fosforic, acidul trifluoracetic sau acidul tricloracetic sau în prezența unei baze cum ar fi hidroxidul de sodiu sau hidroxidul de potasiu într-un solvent sau apă/dioxan la temperaturi între -10 și +120 °C, de exemplu la temperaturi cuprinse între temperatura camerei și temperatura de fierbere a amestecul de reacție.

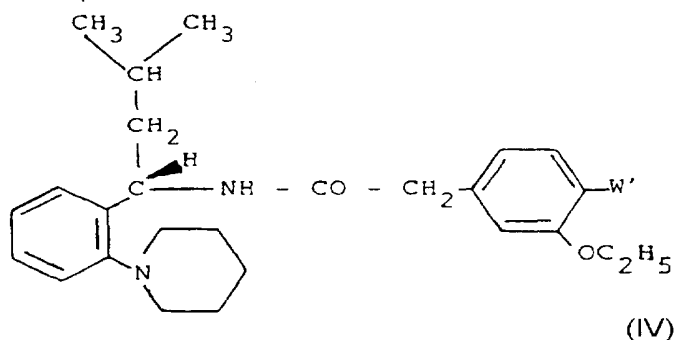
Dacă A dintr-un compus cu formula generală (III), are semnificația unei grupări nitril sau aminocarbonil, atunci aceste grupări pot fi trecute în grupa carboxi cu ajutorul unui acid fosforic 100 % la temperaturi între 100 și 180 °C de preferință la temperaturi între 120 și 160 °C sau/și cu un azotit, de exemplu azotitul de sodiu, în prezența unui acid cum ar fi acidul sulfuric, aceștia fiind folosiți în mod adecvat în acelaș timp ca solvenți, la temperaturi între 0 și 50 °C.

Dacă A dintr-un compus cu formula generală (III) reprezintă de exemplu grupa butiloxicarbonil, atunci grupa *tert*-butil poate fi scindată și termic, eventual într-un solvent inert cum ar fi clorura de metilen, cloroform, benzen, toluen, *tetra*-hidrofuran, dioxan sau acid acetic glacial și de preferință în prezența unui acid puternic cum ar fi acidul trifluoracetic, acidul bromhidric, acidul *p*-toluensulfonic, acidul sulfuric, acidul fosforic sau acidul polifosforic, la temperaturi între 0 și 100 °C, de preferință la temperatura între 20 °C și temperatura de fierbere a solventului utilizat.

RO 113462 B1

Dacă A dintr-un compus cu formula generală (III) reprezintă de exemplu grupa benziloxycarbonil, atunci grupa benzil poate fi scindată și hidrogenolitic în prezența unui catalizator de hidrogenare cum ar fi paladiu/cărbune într-un solvent adecvat cum ar fi metanol, etanol, metanol/apă, etanol/apă, acid acetic glacial, etil-esterul acidului acetic, dioxan sau dimetilformamidă, de preferință, la temperaturi între 0 și 50 °C, de exemplu la temperatura camerei și la o presiune a hidrogenului de 1 până la 5 bari.

c) Reacția unui compus (S) cu formula generală (IV):



în care: W' este o grupă carboxi sau o grupă alcoxycarbonil cu în total 2 până la 5 atomi de carbon, partea de alchil a grupei alcoxi putând fi substituită printr-o grupă fenil, cu un compus cu formula generală (V):



în care: Z este o grupă nucleofilă înlocuibilă, cum ar fi un atom de halogen sau o grupă sulfonyloxi sau poate să reprezinte și împreună cu atomul de hidrogen învecinat o grupă diazo și dacă este necesar, este urmată de o hidroliză sau de o hidrogenoliză.

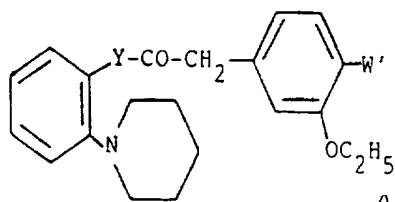
Reacția este efectuată în mod adecvat cu o halogenură corespunzătoare, cu un ester de acid sulfuric sau cu diesterul acidului sulfuric, de exemplu cu bromură de etil, iodură de etil, dietilsulfat, etilesterul acidului *p*-toluensulfonic sau cu etilesterul acidului metansulfonic sau cu diazoetan în prezența unei baze cum ar fi hidrura de sodiu, carbonatul de potasiu, hidroxid de sodiu, *tert*-butilat de potasiu sau trietilamină, de preferință într-un solvent adecvat cum ar fi acetona, dietileterul, tetrahidrofuran, dioxan, piridina sau dimetilformamidă, la temperaturi între 0 și 100 °C, de preferință la temperaturi între 20 și 50 °C.

Dacă W' reprezintă într-un compus cu formula generală (IV), o grupă carboxi, atunci aceasta poate fi trecută în compusul corespunzător de ester.

În cazul necesar, hidroliza care urmează poate fi realizată fie în prezența unui acid cum ar fi acidul clorhidric, acid sulfuric, acidul fosforic, acidul trifluoroacetic sau acidul tricloroacetic sau în prezența unei baze cum ar fi hidroxidul de sodiu sau hidroxidul de potasiu într-un solvent adecvat cum ar fi apa, metanolul, metanol/apă, etanol, etanol/apă, apă/izopropanol sau apă/dioxan la temperaturi între -10 și +120 °C de exemplu la temperaturi între temperatura ambiantă și temperatura de fierbere a amestecului de reacție, sau hidrogenoliza care urmează să se efectueze în prezența unui catalizator de hidrogenare cum ar fi paladiu/cărbune într-un solvent adecvat cum ar fi metanol, etanol, etanol/apă, acid acetic glacial, etil esterul acidului acetic, dioxan sau dimetilformamidă la o presiune a hidrogenului de 1 până la 10 bari.

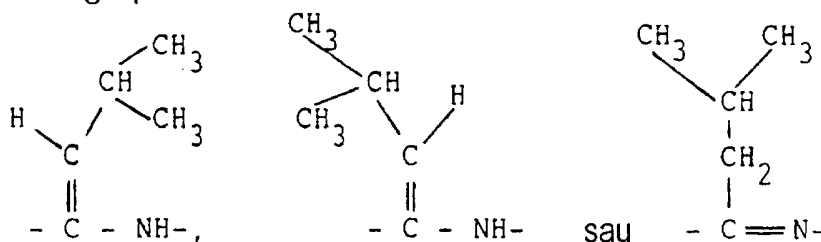
RO 113462 B1

d) Raducerea enantioselectivă a unui compus cu formula generală (VI):



(VI)

în care: W' este o grupă carboxi sau o grupă alcoxicarbonil cu în total 2 până la 5 atomi de carbon, partea de alchil putând să fie substituită printr-o grupă fenil și Y este o grupare cu formula:



și în cazul necesar urmată de hidroliză.

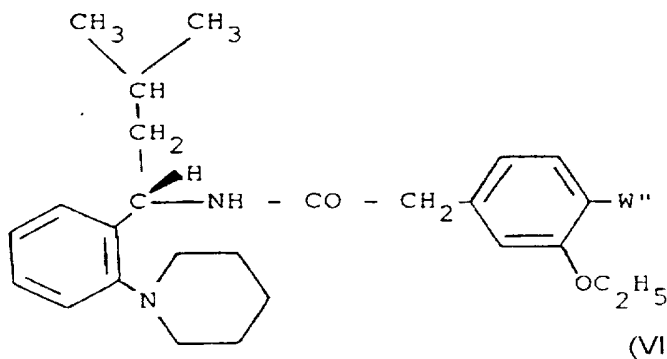
Reducerea este efectuată de preferință cu hidrogen în prezența unui catalizator de hidrogenare chiral adecvat, într-un solvent adecvat cum ar fi metanol, etanol, izopropanol, acetat de etil, dioxan, tetrahidrofuran, metanol/tetrahidrofuran, metanol/clorură de metil, etanol/clorură de metilen, sau izopropanol/clorură de metilen, la temperaturi între 0 și 100 °C, de preferință, totuși la temperaturi între 20 și 50 °C și la presiune de hidrogen între 1 și 1000 bari, de preferință între 5 și 100 bari, și în mod adecvat cu adaos de 0,1 până la 5 %, de preferință 0.3 până la 1 % tetraizopropilat de titan (IV) și de preferință, sub excluderea oxigenului din aer. De preferință reducerea se efectuează cu forma (Z) a unui compus cu formula generală (VI).

Drept catalizatori de hidrogenare chirali se iau în considerare complecși de liganzi metalici cum ar fi $Ru(OCO-CH_3)_2/(S)-BINAP/$, $Ru_2Cl_4/(S)-BINAP/2$ x $N(C_2H_5)_3$, $Rh/(S)-BINAP-NBD/ClO_4$ sau $Rh/(-)-NORPOS-COD/BF_4$.

La hidrogenarea catalitică poate fi redusă în același timp o grupă de benzil-carbonil și trecută în grupa carboxi.

Dacă este necesar, hidroliza care urmează se efectuează fie în prezența unui acid cum ar fi acidul clorhidric, acidul sulfuric, acidul fosforic, acidul trifluoracetic sau acidul tricloracetic sau în prezența unei baze cum ar fi hidroxidul de sodiu sau hidroxidul de potasiu într-un solvent adecvat, catalizator apa, metanol, metanol/apă, etanol, etanol/apă, apă/izopropanol sau apă/dioxan la temperaturi între -10 și 120 °C de exemplu la temperaturi între temperatura ambiantă și temperatură de fierbere a amestecul de reacție.

e) Oxidarea unui compus (S) cu formula generală (VII):



(VII)

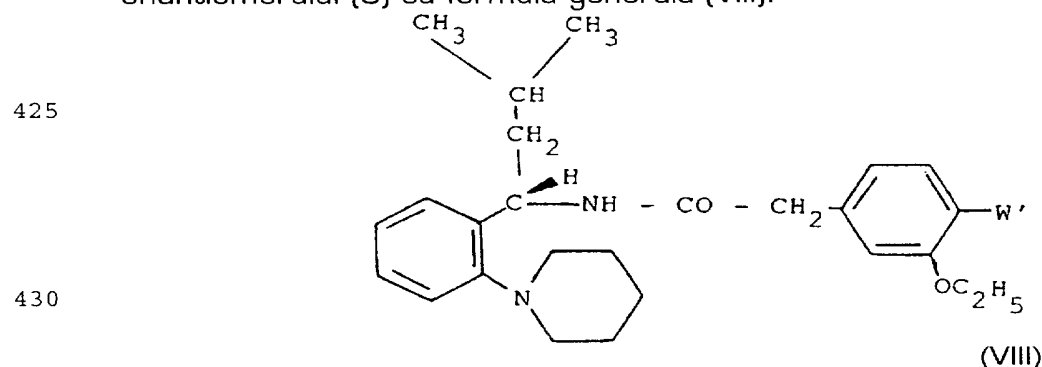
RO 113462 B1

în care: W' reprezintă o grupă care poate fi trecută prin oxidare într-o grupă carboxi.

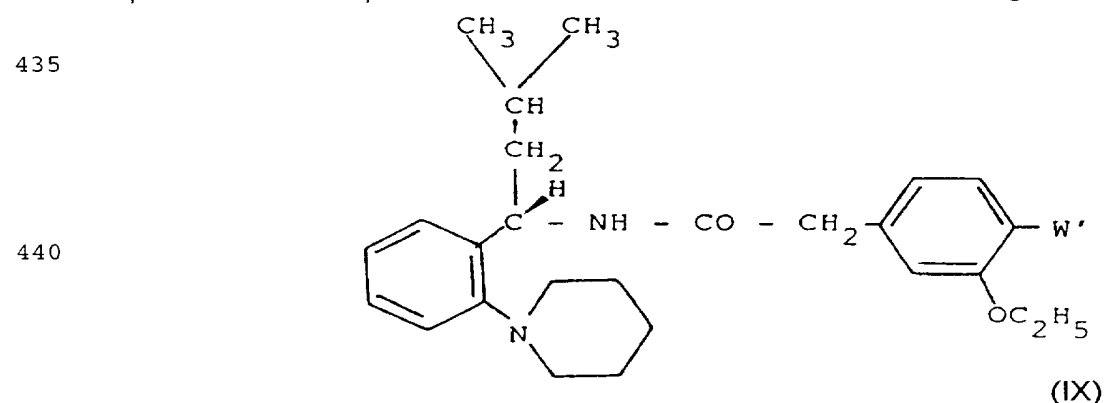
410 Drept o asemenea grupă oxidabilă se pot lua în considerație de exemplu grupa formil și acetalii ei, o grupă hidroximetil și eterii ei, o grupă acil nesubstituită sau substituită cum ar fi grupă acetil, cloracetil, propionil, o grupă acid malonic-(1)-il sau grupă ester malonic-(1)-il.

415 Reacția se efectuează cu un agent de oxidare într-un solvent adecvat cum ar fi apa, acidul acetic glacial, clorura de metilen, dioxanul sau glicoldimetileterul la temperaturi între 0 și 100 °C, mai adecvat totuși la temperaturi între 20 °C și 50 °C, Reacția este efectuată totuși de preferință cu oxid de argint/leșie de sodă caustică, bioxid de mangan/acetona sau clorură de metilen, apă oxigenată/leșie de sodă caustică, brom sau clor/leșie de sodă caustică sau leșie de potasiu caustică, trioxid de crom/piridină sau clorcromat de piridiniu.

420 f) Desfacerea unui amestec constând dintr-o cantitate oarecare a enantiomerului (S) cu formula generală (VIII):



și a unei cantități oarecare din (R)-enantiomerul cu formula generală (IX):



445 în care W' este o grupă carboxi sau alcoxicarbonil, cu un total de 2 până la 5 atomi de carbon, partea de alchil a grupei alcoxi putând fi substituită printr-o grupă fenil, de preferință un amestec 50/50, prin aducții diastomerice, complexi sau săruri și dacă este necesar urmată de hidroliza sau hidrogenoliză. Desfacerea se efectuează de preferință cu ajutorul coloanelor sau prin cromatografie HPL prin formarea aducțiilor diastomeri sau complexelor la faza chirală.

450 Dacă este necesar, hidroliza ulterioară se efectuează fie în prezența unui acid cum ar fi acidul clorhidric, acidul sulfuric, acidul fosforic, acidul trifluoroacetic sau acidul tricloroacetic sau în prezența unei baze cum ar fi hidroxidul de sodiu sau hidroxidul de potasiu într-un solvent adecvat catalizator

455 apa, metanol, metanol/apă, etanol, etanol/apă, apă/izopropanol sau apă/dioxan la temperaturi între -10 și 120 °C, de exemplu la temperaturi între temperatura ambiantă și temperatură de fierbere a amestecului de reacție sau

RO 113462 B1

hidrogenoliza care urmează se efectuează în prezența unui catalizator de hidrogenare cum ar fi paladiu/carbone, într-un solvent adecvat precum metanolul, etanolul, etanol/apă, acid acetic glacial, etilesterul acidului acetic, dioxan sau dimetilformamidă la o presiune a hidrogenului de la 1 până la 10 bari. 460

(S)-enantiomerul astfel obținut, conform invenției, cu o puritate optică de minimum 90 % se poate trece prin cristalizare fracționată într-un (S)-enantiomer de cel puțin 95 %, de preferință 98 până la 100 % puritate optică. 465

Acest lucru este valabil pentru compușii (S) cu formulele generale (III), (IV) și (VII) mai ales pentru esterii lor.

Enantiomerul (S) astfel obținut, conform invenției, se poate trece în sărurile sale, mai ales sărurile sale fiziologic suportabile pentru aplicarea farmaceutică, cu ajutorul acizilor anorganici sau organici, dar și cu baze. Ca acizi se pot lua în considerație de exemplu acid clorhidric, acid bromhidric, acid sulfuric, acid fosforic, acid lactic, acid citric, acid tartric, acid succinic, acid maleic sau acid fumaric și ca baze hidroxidul de sodiu, hidroxidul de potasiu, hidroxidul de calciu, ciclohexilamină, etanolamină, dietanolamină, trietanolamină, etilendiamină sau lizină. 470 475

Compușii utilizați ca substanțe inițiale cu formulele: (I) până la (IX) sunt cunoscuți parțial din literatura respectivă și se obțin după procedee cunoscute în sine.

(S)-amina cu formula (I) poate fi obținută din amina racemică corespunzătoare prin scindare de racemat, de exemplu cu ajutorul cristalizării fracționate a sărurilor diastereomere cu acizi optic activi, corespunzători, de preferință cu acidul N-acetil-L-glutamic, și în cazul necesar prin recristalizare precum și descompunerea ulterioară a sărurilor, prin cromatografie în coloană HPL pe faze chirale, eventual sub forma unui derivat de acil sau prin formarea de compuși diastereomeri, separarea acestora și scindarea ulterioară. 480 485

Apoi (S)-amina cu formula (I) poate fi obținută prin reducere enantioselectivă cu ajutorul hidrogenului în prezența unui catalizator de hidrogenare chiral adecvat pornind de la o N-acil-chetimină respectiv enamidă corespunzătoare, în mod adecvat cu adaos de 0,5 până la 5 % tetraizopropilat de titan, și eventual urmată de scindarea radicalului acil precum și a radicalului formil sau acetil, prin reducere diastereoselectivă a unei chetimine substituie chiral corespunzător la atomul de azot sau a unei hidrazine cu ajutorul hidrogenului, în prezența unui catalizator de hidrogenare adecvat, în mod corespunzător cu adaos de 0,1 până la 5 % tetraizopropilat de titan și eventual urmată de scindarea radicalului ajutător chiral, de exemplu a radicalului de (S)-1-1-fenetil prin hidrogenoliza catalitică, sau prin adăție diastereoselectivă a unui compus metalorganic corespunzător, de preferință a unui compus Grignard sau a unui compus de litiu, la o aldimină substituită corespunzător la atomul de azot în mod chiral, eventual cu adaos de 0,1 până la 10 % tetraizopropilat de titan, urmată de hidroliza și eventual separarea diastereomerilor obținuți urmată de scindarea radicalului ajutător chiral de exemplu a radicalului (R)-1-fenetil prin hidrogenoliza catalitică, și dacă este necesar prin formare de săruri cu acizi adecvați optic activi, de preferință cu acid N-acetil-L-glutamic, și dacă este necesar prin recristalizarea odată sau de mai multe ori precum și descompunerea ulterioară a sării în enantiomeri cu puritate optică. 490 495 500 505

Compușii inițiali folosiți ca materie primă cu formulele generale (III), (IV) și (VII) se obțin prin descompunerea (S)-aminei (I) cu un acid carboxilic corespunzător respectiv cu derivații lui reactivi și eventual urmată de scindarea unui radical de protecție utilizat. 510

RO 113462 B1

Compusul utilizat ca materie primă cu formula generală (VI) se obține prin acilarea compusului imino corespunzător sau alchil complecșilor metaloorganici ai acestuia cu acidul carboxilic corespunzător sau cu derivați activi ai acestuia și eventuala scindare ulterioară a unei grupe de ester.

515 Noul enantiomer (S) este practic lipsit de toxicitate; de exemplu după aplicarea o singură dată de 1000 mg/kg p.o., suspensie în metilceluloză 1 %, la câte 5 șobolani masculi și 5 șobolani femele, nu a murit nici-un animal în decursul unui timp de observație ulterior de 14 zile.

520 Pe baza proprietăților sale farmacologice, enantiomerul (S) obținut conform invenției, A G-E E 623 ZW, și sărurile lui fiziologic suportabile se pretează la tratarea bolii Diabetes mellitus. Pentru aceasta, A G-E E 623 ZW sau sărurile sale fiziologic suportabile se pot amesteca eventual în combinație cu alte substanțe active, în formule obișnuite galenice de preparate cum ar fi tabletele, drageurile, capsulele, pulberile, supozitoarele, suspensiile sau soluțiile

525 injectabile. Doza individuală la adult este în acest caz de 0,1 până la 20 mg, de preferință 0,25 până la 5 mg, mai ales încă de 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3 sau 5,0 mg, odată, de două ori sau de trei ori pe zi.

Un alt obiect al invenției de față este noua (S)-amină cu formula (I), care reprezintă un produs intermediar valoros pentru obținerea (S)-enantiomerilor,

530 precum și sărurile sale de adiție cu acizi anorganici sau organici.

Un alt obiect al invenției de față îl constituie noi compuși cu formula generală (III), (IV) și (VII), care reprezintă produși intermediari valoroși pentru obținerea noului (S)-enantiomer, precum și sărurile lui de adiție cu acizii anorganici și organici.

535 Se dau în continuare exemple de realizare a invenției:

Exemplul 1. *Etilesterul acidului (S)-2-etoxi-4-[N-[1-(2-piperidino-fenil)-3-metil-1-butil]aminocarbonilmetil]benzoic.*

La o soluție de 0,47 g (1,91 mmoli) de (S)-3-metil-1-(2-piperidino-fenil)-1-butilamină, ee = 98,5 %, în 5 ml acetonitril anhidru se adaugă succesiv 0,48

540 g (1,91 mmoli) acid 3-etoxi-4-etoxicarbonil-fenil-acetic, 0,60 g (2,29 mmoli), trifenilfosfină, 0,80 ml (5,73 mmoli) de trietilamină și 0,18 ml (1,91 mmoli) tetraclorură de carbon și se agită 20 h la temperatura ambiantă. Apoi se evaporă în vid și se divide între acetat de etil și apă. Extractul organic se usucă și se filtrează și se evaporă în vid. Reziduul de la evaporare se purifică prin

545 cromatografie în coloană pe gel de silice, toluen/acetat de etil = 10/1. Cantitatea obținută: 0,71 g (77,3 % din cea teoretică), punct de topire 110-112 °C.

| | | | | | | |
|------------|---|-------|---|------|---|------|
| Calculat : | C | 72,47 | H | 8,39 | N | 5,83 |
| Găsit : | | 72,29 | | 8,42 | | 5,80 |

550 Puritatea enantiomerilor se determină cu ajutorul HPLC, pe o coloană HPLC cu faze chirale a firmei Baker, la care (S)-N-3,5-dinitrobenzoil-leucină este legată covalent pe aminopropil-gelul de silice, mărimea particulelor: 5 μm, formă sferică, lățimea porilor 60 Å; lungimea coloanei: 250 metodă la un diametru interior de 4,6 mm; agent de curgere: n-hexan/tetrahidrofuran/clorură de metilen/etanol, 90/10/1/1, viteza de curgere: Peak 1 (R) / Peak 2 (S) = 0,75 %: 99,25 %, ee = 98,5 % (S).

Exemplul 2. *Etilesterul acidului (S)-2-etoxi-4-[N-[1-(2-piperidino-fenil)-3-metil-1-butil]aminocarbonilmetil]benzoic.*

560 La o soluție de 2,71 g (11 mmoli) de (S)-3-metil-1-(2-piperidino-fenil)-1-butilamină anhidră (ee = 98,5 %) în 30 ml toluen absolut se adaugă la temperatura camerei 2,77 g (11 mmoli) acid 3-etoxi-4-carbonil-fenilacetic și se

RO 113462 B1

agită până se obține dizolvarea. Apoi se adaugă 2,38 g (11 mmoli) de N,N'-d ciclohexilcarbodiimidă și se agită la temperatura camerei. După 24 h se adaugă încă 0,54 g (2,14 mmoli) de acid 3-etoxi-4-carbonil-fenilacetic și 0,48 g (2,33 mmoli) de de N,N'-d ciclohexilcarbodiimidă și se agită peste noapte. 565
 Apoi se răcește la o temperatură interioară de +5 °C și se separă pe filtru Nutsche de precipitatul depus, care se spală odată cu 5 ml toluen. Filtratele de toluen unificate se concentreză la un volum de circa 10 ml în vid. Soluția astfel obținută se încălzește pe baia de aburi și se încălzește și se tratează în porții cu eter de petrol, în total 55 ml, până ce rămâne o turbureală, se răcește în gheață, având loc o cristalizare. Se trece prin filtrul Nutsche și se usucă la 75 °C /4 mm Hg. Produsul obținut, 4,57 g; punct de topire 111-112 °C; e e = 98,9 %, se suspendă în 50 ml de eter de petrol. Se încălzește pe baia de abur și se adaugă în porții atâta toluen, în total 8 ml, până ce se obține dizolvarea. Apoi se răcește în gheață și se separă pe filtrul Nutsche de 570
 cristalizat, care se usucă la 75 °C/4 mm Hg. Cantitatea obținută = 3,93 g, 74,3 % din cea teoretică. Punct de topire = 117-118 °C.

| | | | | | | | |
|--|------------|---|-------|---|------|---|------|
| | Calculat = | C | 72,47 | H | 8,39 | N | 5,83 |
| | Găsit = | C | 72,44 | H | 8,43 | N | 5,93 |

$[\alpha]_D^{20} = 9,4^\circ$, c = 1,01 în metanol. Puritatea enantiomerilor : e e = 99,9 %, 580
 metodă HPLC: vezi exemplul 1.

Exemplul 3. Acid (S)-2-etoxi-4-[N-[1-(2-piperidino-fenil)-3-metil-1-butil]amino-carbonil-metil]benzoic.

Se amestecă prin agitare soluția de 3,78 g, 7,88 mmol, de etilester al acidului-(S)-2-etoxi-4-/N-/1-(2-piperidino-fenil)-3-metil-1-butil-/aminocarbonylmetil-/benzoic, e e = 99,9 %, în 37 ml de etanol în baia de 60 °C și se adaugă 10 ml, 10 mmol, de leșie de sodă caustică 1 N. După o agitare de 4 ore la 60 °C se adaugă la cald 10 ml, 10 mmol, de acid clorhidric 1 N și se lasă să se răcească la temperatura camerei. După însămânțare cu cristale și staționare peste noapte se răcește încă timp de o oră sub agitare în gheață. 590
 Se separă cristalizatul de filtrat în filtrul Nutsche și se spală cristalizatul de două ori cu câte 5 ml apă. Apoi se usucă la 75 °C până la sfârșit la 100 °C/4 Torr în dulapul de uscare sub vid peste pentoxid de fosfor. Cantitatea obținută = 3,13 g, 87,7 % din cea teoretică. Punct de topire = 130-131 °C, forma cu punct de topire ridicat. 595

| | | | | | | | |
|--|------------|---|-------|---|------|---|------|
| | Calculat = | C | 71,64 | H | 8,02 | N | 6,19 |
| | Găsit = | C | 71,49 | H | 7,87 | N | 6,39 |

$[\alpha]_D^{20} = +7,45^\circ$, c = 1,06 în metanol.

Puritatea enantiomerilor se determină cu ajutorul HPLC pe o coloană HPLC cu faze chirale cu faza AGP, α -1-acid glicoproteinic; diametrul interior = 4,0 mm; lungime = 100 mm; diametrul particulelor = 5 μ m. Temperatura = 20 °C; mediu de curgere = soluție apoasă de KH₂PO₄ 0,1 %, (=A) + acetoneitril 20 % (=B), creșterea gradientului în cadrul a 4 min la 40 % (B); viteza de curgere = 1 ml/minut; detecția UV la 249 nm. Timpul de retenție enantiomerul (S) = 2,7 minute; Timpul de retenție enantiomerul (R) = 4,1 min. 600

Găsit = (S) : (R) = 99,85 % : 0,15 %; e e = 99,7 % (S). 605

La recristalizarea unei probe din metanol/apă, 2/1, nu se modifică punctul de topire.

La încălzirea unei probe în eter de petrol/toluen, 5/3, filtrarea părții nedizolvate, punct de topire = 130-131 °C, și răcirea rapidă a filtratului se obține forma cu punct de topire scăzut a compusului din titlu, cu punct de topire 99-101 °C. 610

RO 113462 B1

Calculat = C 71,64 H 8,02 N 6,19
 Găsit = 71,66 7,97 6,44

615 Forma cu punct de topire scăzut și forma cu punct de topire ridicat se deosebesc în spectrele lor infraroșii în soluție, clorură de metilen.

Dacă se încălzește o probă cu formă cu punct de topire scăzut peste punctul ei de topire, atunci se observă un al doilea punct de topire la 127-130°C.

620 Dacă se cristalizează o probă cu forma cu punct de topire scăzut din metanol/apă, 2/1, atunci se obține forma cu punct de topire ridicat.

Forma cu punct de topire ridicat și cu punct de topire scăzut au fost cercetate cu "Differential Scanning Calorimetry (DCS) " / Aparat Mettler, sistem TA-300; celula de măsurare = DCS 20; Fa. Mettler, CH-8306 Greifensee, Elveția, cu următoarele rezultate:

| | Rata de încălzire 10 °K/min | Rata de încălzire 10 °K/min |
|-----|---|---|
| 630 | Compusul din exemplul 3 Forma cu punct de topire ridicat | Vârf de topire unitar cu temperatura de topire de 133 °C; entalpia de topire = 100 J/g |
| 635 | Forma cu punct de topire scăzut | Vârf de topire unitar cu temperatura de topire de 132 °C; entalpia de topire = 99,1 J/g |
| 640 | | 1. Vârf la 57 °C (f. scăzut); endoterm |
| 645 | | 2. Vârf endoterm la 104°C. Temp.de topire 102 °C, Entalpia de top. 52 J/g |
| | | 3. Decurgerea exotermă a liniei de bază prin cristalizarea subst.topite la 104 °C |
| | | 4. Vârf endoterm la 131 °C, Temp.de topire 130 °C, Entalpia de top. 52 J/g |

Exemplul 4 Etilesterul acidului (S)-2-etoxi-4-[N-[1-(2-piperidino-fenil)-3-metil-1-butil]amino-carbonilmetil]benzoic.

650 0,79 g, (1,65 mmol) de etilester al acidului (Z)-2-etoxi-4-[N-[1-(2-piperidino-fenil)-3-metil-1-buten-il]amino-carbonilmetil]benzoic cu punct de topire 124-127 °C se dizolvă în 10 ml amestec de solvenți degazat, metanol/clorură de metilen= 5/1, sub atmosferă de argon și se adaugă la o soluție de 17 mg de catalizator NOYORI Ru(O-acetit)₂-[(S)-BINAP], obținut din[Ru(COD)Cl₂]_n cu (S)-BINAP/(S)-2,2'-bis-(difenil-fosfino)-1,1'-binafenil/, trietilenă și acetat de sodiu,

655 și 3 mg de tetraizopropilat de titan în 10 ml amestecul de solvent degazat, metanol/clorură de metilen = 5/1. Amestecul de reacție se reduce într-o autoclavă evacuată la 10⁻² nbari. Se spală de cinci ori cu hidrogen de 5 bari și se hidrogenează apoi la 30 °C și 100 bari până la sfârșitul absorbției de hidrogen, 154 h. Se evaporă soluția cafenie-roșie în vid, se dizolvă reziduul de

660 la evaporare în 80 ml eter, se filtrează de fulgi cafenii nedizolvați cu ajutorul cărbunelui activ și de evaporă filtratul limpede de culoare galben deschis în vid. Reziduul de la evaporare, 0,60 g, se fierbe în 60 ml n-hexan sub reflux și se filtrează fierbinte de partea nedizolvată. Filtratul se lasă să stea peste noapte la temperatura camerei. Se filtrează pentru separarea cristalelor formate.

665 Substanța obținută= 0,45 g, 56,7 % din cantitatea teoretică, punct de topire 131 - 133 °C, după sistematizarea începând cu 120 °C. Puritatea enantio

RO 113462 B1

merilor: $e = 39\%$ (S) / metoda HPCL: vezi exemplul 1.

Exemplul 5. Etilesterul acidului (S)-2-etoxi-4-[N-[1-(2-piperidino-fenil)-3-metil-1-butil]amino-carbonilmetil]benzoic.

La o soluție de 0,68 g, (1,15 mmol), de etilester al acidului (S)-2-hidroxi-4-[N-[1-(2-piperidino-fenil)-3-metil-1-butil]aminocarbonilmetil]benzoic. Punct de topire = 125-126 °C; $[\alpha]_D^{20} = +12,87^\circ$, $c = 1,01$ în metanol/în 5 ml dimetilformamidă anhidră se adaugă 0,05 g, 1,15 mmol, hidrură de sodiu 55 % în ulei și se agită 0,5 h la temperatura camerei. Apoi se adaugă prin picurare soluția de 0,12 ml, (1,15 mmol), iodură de etil în 2,5 ml dimetilformamidă anhidră și se agită 5 h la temperatura camerei. Se evaporă în vid, se divide între leșie caustică diluată și cloroform, se usucă extractul organic, se filtrează și se evaporă în vid. Reziduul de la evaporare se purifică prin cromatografie în coloană pe gel de silice, toluen/acetat de etil = 10/1. Cantitatea obținută = 0,48 g, 67 % din cea teoretică. Punct de topire = 110-112 °C.

| | | | | | | |
|------------|---|-------|---|------|---|------|
| Calculat = | C | 72,47 | H | 8,39 | N | 5,83 |
| Găsit = | | 72,61 | | 8,54 | | 5,97 |

Puritate enantiomerilor: $e = 98,5\%$ (S) / Metoda HPLC: vezi exemplul 1.

Exemplul 6. Etilesterul acidului (S)-2-etoxi-4-[N-[1-(2-piperidino-fenil)-3-metil-1-butil]amino-carbonilmetil]benzoic se obține din acid (S)-2-hidroxi-4-[N-[1-(2-piperidino-fenil)-3-metil-1-butil]amino-carbonilmetil]benzoic în mod analog cu exemplul 5, cu ajutorul a 2 echivalenți de hidrură de sodiu și 2 echivalenți de iodură de etil. Cantitatea obținută este 42 % din cea teoretică. Punct de topire = 110-112 °C.

| | | | | | | |
|------------|---|-------|---|------|---|------|
| Calculat = | C | 72,47 | H | 8,39 | N | 5,83 |
| Găsit = | | 72,61 | | 8,54 | | 5,99 |

Puritatea enantiomerilor: $e = 98,3\%$ (S) / metoda HPLC: vezi exemplul 1.

Exemplul 7. Etilesterul acidului (S) (+)-2-etoxi-4-[N-[1-(2-piperidino-fenil)-3-metil-1-butil]amino-carbonilmetil]benzoic și etilesterul acidului (R) (-)-2-etoxi-4-[N-[1-(2-piperidino-fenil)-3-metil-1-butil]amino-carbonilmetil]benzoic.

920 mg etilesterul acidului (+)-2-etoxi-4-[N-[1-(2-piperidino-fenil)-3-metil-1-butil]amino-carbonilmetil]benzoic se separă în doze individuale de câte 10 mg pe o coloană HPLC preparativă cu faze chirale a firmei Baker, la care (S)-N-3,5-dinitrobenzoil-leucina este legată covalent pe aminopropil-gel de silice, mărimea particulelor: 40 μm; lungimea coloanelor: 250 mm la un diametru interior de 20 mm; agent de curgere: n-hexan/tetrahidrofuran/etanol/clorură de metilen, 180/20/3/2; viteza de curgere: 21,25 ml/minut; temperatura: 27 °C; detecția UV la 285 nm, fiind eluat mai întâi enantiomerul (R) (-) (vârful 1) și apoi enantiomerul (S) (+) (vârful 2).

Din fracțiunile corespunzător separate și colectate se obțin după evaporat în vid: Frațiune "Pic 1" (R): 425 mg (brută), Frațiune "Pic 2" (S): 325 mg (brută).

Pentru separarea impurităților, între altele stabilizatorul conținut în tetrahidrofuran 2,6-di-terț-butil-4-metil-fenol, cele două fracțiuni se purifică fiecare prin cromatografie în coloană pe gel de silice, toluen/acetona, 10/1.

Enantiomerul (R) (-): Cantitatea obținută = 234,5 mg, 51 % din cea teoretică. Punct de topire = 122-124 °C, eter de petrol + acetona.

| | | | | | | |
|------------|---|-------|---|------|---|------|
| Calculat = | C | 72,47 | H | 8,39 | N | 5,83 |
| Găsit = | | 72,40 | | 8,18 | | 5,71 |

$[\alpha]_D^{20} = -8,3^\circ$, $c = 1$ în metanol.

Enantiomerul (S) : Cantitatea obținută = 131,2 mg, 28,5 % din cea teoretică. Punct de topire = 122-124 °C, eter de petrol + acetona, 8/1.

RO 113462 B1

| | | | | | | |
|----------|-----|-------|---|------|---|------|
| Calculat | = C | 72,47 | H | 8,39 | N | 5,83 |
| Găsit | = | 72,28 | | 8,44 | | 5,70 |

720 $[\alpha]_D^{20} = + 8,3^\circ$, $c = 1$ în metanol.

Pentru separarea enantiomerilor de mai sus se pretează și o coloană OD Chiral a firmei Daicel. Pe o coloană de 250 mm lungime și 4,6 mm diametru interior, agent de curgere: etanol absolut/(n-hexan + 0,2 % dietilamină) = 5/95; temperatura = 40 °C; detecție UV la 245 nm, se eluează enantiomerul

725 (R) după 6,8 minute și enantiomerul (S) după 8,5 minute.

Exemplul 8. Acidul (R)(-)-2-etoxi-4-[N-[1-(2-piperidino-fenil)-3-metil-1-butil]amino-carbonil-metil]benzoic x 0,4 H₂O.

Se obțin din 150 mg, 0,312 mmol, etil ester al acidului (R) (-)-2-etoxi-4-[N-[1-(2-piperidino-fenil)-3-metil-1-butil]amino-carbonilmetil]benzoic, punct de

730 topire 122-124 °C; $[\alpha]_D^{20} = + 8,3^\circ$, $c = 1$ în metanol, prin saponificare cu leșie de sodă caustică în etanol analog cu exemplul 3. Cantitatea obținută este 95,8 mg, 66,7 % din cea teoretică. Punct de topire = 103-105 °C, toluen/eter de petrol.

| | | | | | | |
|-----------------------------------|-----|-------|---|------|---|------|
| Calculat (x 0,4 H ₂ O) | = C | 70,51 | H | 8,01 | N | 6,09 |
| Găsit | = | 70,88 | | 7,79 | | 5,81 |

735 Molpic - M⁺: calculat = 452
găsit = 452

$[\alpha]_D^{20} = - 6,5^\circ$, $c = 1$ în metanol. Puritatea enantiomerilor: e e= 99,7 (R) / metodă HPLC: vezi exemplul 3.

740 **Exemplul 9.** Acidul (S)(+)-2-etoxi-4-[N-[1-(2-piperidino-fenil)-3-metil-1-butil]amino-carbonil-metil]benzoic x 0,4 H₂O, se obțin din 89 mg (0,198 mmol), etilester al acidului (S) (+)-2-etoxi-4-[N-[1-(2-piperidino-fenil)-3-metil-1-butil]minocarbonil-metil]benzoic, punct de topire 122-124 °C; $[\alpha]_D^{20} = + 8,3^\circ$, $c=1$ în metanol, prin saponificare cu leșie de sodă caustică în etanol analog cu

745 exemplul 3.

Cantitatea obținută este 44,5 mg, 48,8 % din cea teoretică. Punctul de topire este 102-103 °C, toluen/eter de petrol.

| | | | | | | |
|-----------------------------------|-----|-------|---|------|--|--|
| Calculat (x 0,4 H ₂ O) | = C | 70,51 | H | 8,01 | | |
| Găsit | = | 70,88 | | 8,06 | | |

750 $[\alpha]_D^{20} = + 6,7^\circ$, $c = 1$ în metanol. Puritatea enantiomerilor: e e= 99,6 % (S), metoda HPLC, vezi exemplul 3.

Exemplul 10. Acidul (S)-2-etoxi-4-[N-[1-(2-piperidino-fenil)-3-metil-1-butil]amino-carbonil-metil]benzoic .

Se hidrogenează 0,26 g (0,47 mmol) de benzilester al acidului (S)-2-etoxi-4-[N-[1-(2-piperidino-fenil)-3-metil-1-butil]aminocarbonil-metil]benzoic, punct de topire 91-92 °C; $[\alpha]_D^{20} = + 9,5^\circ$, $c = 1$ în metanol, în 10 ml etanol pe 0,12 g paladiu/cărbune, 10 %, la 50 °C și hidrogen 5 bar. După 5 h, se filtrează catalizatorul peste diatomit și se evaporă în vid. Reziduul de la evaporare se catalizează din etanol/apă, 2/1. Cantitatea obținută este 0,15 g , 70 % din cea teoretică. Punct de topire = 130-131 °C,

| | | | | | | |
|----------|-----|-------|---|------|---|------|
| Calculat | = C | 71,64 | H | 8,02 | N | 6,19 |
| Găsit | = | 71,76 | | 8,12 | | 6,05 |

Puritatea enantiomerilor: e e= 99,6 %, metoda HPLC, vezi exemplul 3.

Exemplul 11. Acidul (S)-2-etoxi-4-[N-[1-(2-piperidino-fenil)-3-metil-1-butil]amino-carbonil-metil]benzoic .

765 Se încălzesc 102 mg (0,2 mmol), de *tert*-butilester al acidului (S)-2-etoxi-4-[N-[1-(2-piperidino-fenil)-3-metil-1-butil]aminocarbonil-metil]benzoic, punct de topire 122-123 °C; $[\alpha]_D^{20} = + 8,7^\circ$, $c = 1$ în metanol în 5 ml benzen în-

RO 113462 B1

preună pe câteva cristale de acid *p*-toluensulfonic hidratat o jumătate de zi pe reflux. Apoi se formează produsul dorit conform cromatogramei în strat subțire conform valorii R_f și spectrului de masă. Punct de topire 129-131 °C Moleak M^+ : calculat = 452; găsit = 452. 770

Exemplul 12. Acidul *(S)*-2-etoxi-4-[N-{1-(2-piperidino-fenil)-3-metil-1-butil}amino-carbonil-metil]benzoic .

Se amestecă 200 mg (0,395 mmol) *tert.*butilester al acidului *(S)*-2-etoxi-4-[N-{1-(2-piperidino-fenil)-3-metil-1-butil}amino-carbonilmetil]benzoic, punct de topire 122-123 °C; $[\alpha]_D^{20} = + 8,7^\circ$, $c = 1$ în metanol, în 2 ml clorură de metilen împreună cu 0,45 g (3,95 mmol), de acid trifluoracetic peste noapte la temperatura camerei. Se evaporă în vid și se repartizează reziduul de evaporare între soluția apoasă de carbonat acid de sodiu și acetat de etil. Se usucă extractul organic, se filtrează și se evaporă în vid. Reziduul de la evaporare se cristalizează din etanol/apă, 2/1. Cantitatea obținută este 115 mg, 64,7 % din cea teoretică. Punct de topire = 126-128 °C, 775

| | | | | | | |
|------------|---|-------|---|------|---|------|
| Calculat = | C | 71,64 | H | 8,02 | N | 6,19 |
| Găsit = | | 71,39 | | 7,91 | | 6,06 |

$[\alpha]_D^{20} = + 6,97^\circ$, $c = 0,975$ în metanol. Puritatea enantiomerilor: $e = 99,6\%$, metoda HPLC, vezi exemplul 3. 780

Materiile prime se obțin astfel:

A. *(S)*-1-(2-piperidino-fenil)-3-metil-1-butilamină.

O soluție agitată de 122 g (0,495 mol), de 1-(2-piperidino-fenil)-3-metil-1-butilamină în 1000 ml acetonă, se tratează cu 93,7 g (0,495 mol), acid N-acetil-L-glutaminic. Se încălzește pe baie cu aburi sub reflux și se adaugă metanol în porții, în total circa 80 ml, până ce se ajunge la o soluție limpede. După răcire și staționare la temperatura camerei peste noapte se absorb cristalele obținute, acestea se spală de două ori cu cât 200 ml acetonă rece la -15 °C și se usucă aceste cristale. Produsul obținut 98,9 g, punct de topire 163-166 °C; $[\alpha]_D^{20} = + 0,286^\circ$, $c = 1$ în metanol, se recrystalizează din 1000 ml acetonă cu adaus de 200 ml metanol, obținându-se *(S)*-1-(2-piperidino-fenil)-3-metil-1-butanmina ca sare de aditie cu acid N-acetil-L-glutamic. Cantitatea obținută este 65,1 mg, 60,4 % din cea teoretică. Punct de topire = 168-171 °C, 790

| | | | | | | |
|------------|---|-------|---|------|---|------|
| Calculat = | C | 63,42 | H | 8,56 | N | 9,65 |
| Găsit = | | 63,64 | | 8,86 | | 9,60 |

$[\alpha]_D^{20} = 0,357^\circ$, $c = 1$ în metanol. 795

Amina liberă se obține ca ulei prin punerea în libertate, de exemplu cu o soluție de hidroxid de sodiu sau de amoniac, extracție de exemplu, cu toluen, eter, acetat de etil sau clorură de metilen precum și uscarea, filtrarea și concentrarea prin evaporare a extractului în vid. 800

Configurația *(S)* a aminei a fost dovedită după cum urmează. Reacția aminei cu *(S')*-1-fenetilizocianat în eter la derivatul de uree corespunzător, punct de topire 183-184 °C; $[\alpha]_D^{20} = -2,25^\circ$, $c = 1$ în metanol, creșterea de cristale din etanol/apă, 8/1, urmată de analiza structurii la raze Roentgen, care a dat configurația *(S,S')* pentru derivatul de uree și configurația *(S)* pentru amina introdusă. 810

Puritatea enantiomerului a fost determinată după cum urmează: 815

1. Acetilarea unei probe de amină cu 1,3 echivalenți de anhidridă acetică în acid acetic glacial la 20 °C peste noapte.

2. Cercetarea derivatului de N-acetil, punct de topire 128-132 °C, cu ajutorul HPLC pe o coloana HPLC cu faze chirale a firmei Baker, la care *(S)*-N-{3,5-

RO 113462 B1

820 dinitrobenzoi]-2-fenil-glicina este legată covalent de aminopropil-gelul de silice, mărimea particulelor = 5 μm, sferică, lățimea porilor 60 Å; lungimea coloanelor = 250 mm la un diametru interior de 4,6 mm; agent de curgere = n-hexan/izopropanol, 100/5; viteza de curgere = 2 ml/minut; temperatura = 20 °C; detecția UV la 254 nm.

825 Găsit = Pic 1 (R): Pic 2 (S) = 0,75 %: 99,25 %; e e (exces enantiomer)= 98,5 % (S).

Cu ajutorul soluției eterice de acid clorhidric se poate trece amina-(S) în clorhidratul hidratat corespunzător. Punct de topire = 135-145 °C, cu descompunere.

830 Calculat (x H₂O) = C 56,99 H 8,97 N 8,31 Cl 21,02
 Găsit = 56,85 8,93 8,38 21,25
 $[\alpha]_D^{20} = + 26,1^\circ$, c = 1 în metanol.

B. *N-acetil-N-[1-(2-piperidino-fenil)-3-metil-1-buten-1-il]-amina.*

835 La o soluție de 20 g (81,8 mmol) de izobutil-(2-piperidino-fenil)-chetimină proaspăt obținută în 200 ml acetonitril se adaugă la temperatura camerei, 4,7 ml (81,8 mmol), acid acetic glacial, 25,7 g (98,2 mmol), trifenilfosfină, 34,2 ml (245 mmol) trietilamină și 7,9 ml (81,8 mmol), tetraclorură de carbon și se agită 18 h la temperatura camerei. Apoi se concentrează prin evaporare în vid și se divide între acetat de etil și apă. Se usucă extractul organic și se
 840 filtrează și se evaporă în vid. Reziduul de evaporare se purifică prin cromatografie pe coloană de gel de silice, toluen/acetat de etil, 10/1, fiind eluată mai întâi forma (E) și apoi forma (Z).

Forma (E).

- Substanța obținută: 6,1 g, 26 % din cea teoretică.
 845 - Punct de topire: 135-137 °C, acetat de etil/eter de petrol.
 - Calculat: C 75,48 H 9,15 N 9,78
 - Găsit : 75,47 9,35 9,70

Forma (Z).

- Substanța obținută: 3,1 g, 13 % din cea teoretică.
 850 - Punct de topire: 140-143 °C, acetat de etil.
 - Calculat: C 75,48 H 9,15 N 9,78
 - Găsit : 75,56 9,30 9,79

C. *N-acetil-N-[1-(2-piperidino-fenil)-3-metil-1-buten-1-il]amina.*

855 La o soluție agitată de 44 g (0,18 mol), proaspăt preparată de izobutil-(2-piperidino-fenil)-chetimină în 440 ml toluen se picură la o temperatură interioară de 0 °C, 17 ml (0,18 mol), anhidridă acetică. Se mai agită încă 3 h la 0 °C și 15 h la temperatura camerei, se evaporă apoi în vid, se dizolvă reziduul de la evaporare în acetat de etil și se scutură de mai multe ori cu soluție apoasă de carbonat acid de sodiu. Faza organică se usucă, se filtrează
 860 și se evaporă în vid. Reziduul de la evaporare se purifică prin cromatografie pe coloană de gel de silice, toluen/acetat de etil, 5/1, fiind eluată mai întâi forma (E) și apoi forma (Z).

Forma (E): Cantitatea obținută: 3,0 g, 5,8 % din cea teoretică.

865 Forma (Z): Cantitatea obținută: 17,8 g, 24,5 % din cea teoretică, Punct de topire: 139-141 °C, acetat de etil,
 Calculat: C 75,48 N 9,15 N 9,78
 Găsit : 75,68 8,99 9,86

D. *N-acetil-N-[(S)-1-(2-piperidino-fenil)-3-metil-1-butil]amină*

870 0,57 g (1,99 mmol), (Z) N-acetil-N-[1-(2-piperidino-fenil)-3-metil-1-buten-1-il]amină cu punct de topire 139-141 °C se dizolvă în 10 ml de amestec de

RO 113462 B1

solvenți degazați, metanol/clorură de metilen, 5/1, sub atmosferă de argon și se adaugă la o soluție de 16,8 mg, 1 mol %, de catalizator NOYORI Ru(O-acetil)₂[(S)-BINAP], obținut din [Ru(COD)Cl₂]_n cu (S)-BINAP = (S)-2,2'-bis(di-pneilfosfiino)-1,1'-binaftil/, trietilenă și acetat de sodiu, și 3,4 mg, 0,5 mol %, tetraizopropilat de titan în 10 ml amestec de solvenți degazați, metanol/clorură de metilen, 5/1. Amestecul de reacție se restrânge într-o autoclavă care se evacuează la 10⁻² mbar. Se spală de mai multe ori cu hidrogen la 4 bar și apoi se hidrogenează la 30 °C și 100 bar până la sfârșitul preluării de hidrogen, 170 h. Apoi se evaporă soluția cafenie-roșie în vid, se fierbe reziduul de la evaporare cu 30 ml de *n*-hexan sub reflux și se filtrează fierbinte de partea insolubilă. La răcirea filtratului are loc cristalizarea. Cantitatea obținută: 0,31 g, 54 % din cea teoretică. Punct de topire: 127-131 °C. Puritatea enantiomerului: e e = 82 % (S). Metoda HPLC: vezi exemplul A.

Din partea insolubilă obținută la fierbere cu 30 ml *n*-hexil se poate obține prin fierbere mai departe cu *n*-hexan, filtrarea și cristalizare din soluția de hexan 14 % din N-acetilamina racemică cu punct de topire 154-156 °C.

E. (S)-1-(2-piperidino-fenil)-3-metil-1-butilamină.

Se încălzește 1 g (3,47 mmol) de N-acetil-N-[(S)-1-(2-piperidino-fenil)-3-metil-1-butil]amină, punct de topire: 128-133 °C; e e=99,4 %, în 10 ml de acid clorhidric concentrat 5,5 h sub reflux, se răcește și se toarnă într-un amestec de amoniac concentrat și gheață. Se extrage de două ori cu acetat de etil, se spală faza organică cu apă se usucă și se filtrează și se evaporă în vid. Cantitatea obținută: 0,84 g, 98,8 % din cea teoretică, amină uleioasă.

Prin reacțilare cu 0,42 ml (1,3 echivalenți), de anhidridă acetică în 8,4 ml acid acetic glacial peste noapte la temperatura camerei, evaporare în vid, divizarea reziduului de evaporare între acetat de etil și soluție saturată apoasă de bicarbonat de sodiu precum și uscare, filtrare și evaporarea extractului organic în vid se obțin 0,83 g, 84,7 % din cantitatea teoretică, de N-acetil-N-[(S)-1-(2-piperidino-fenil)-3-metil-1-butil]amină, punct de topire: 130-132 °C; e e=99,4 %.

F. Etilsterul acidului 2-etoxi-4-[N-(1-(2-piperidino-fenil)-3-metil-1-buten-1-il)-aminocarbonilmetil]-benzoic, se obține din izobutil-(2-piperidino-fenil)-chetimină și acid 3-etoxi-4-etoxi-carbonil-fenilacetic analog cu exemplul B. Purificare prin cromatografie pe coloană de gel de silice, toluen/acetona, 10/1, fiind eluată mai întâi forma (E) și apoi forma (Z).

Forma (E): Randamentul: 4 % din teorie. Punct de topire: 101-103 °C,

| | | | | | | |
|------------|---|-------|---|------|---|------|
| Calculat : | C | 72,77 | H | 8,00 | N | 5,85 |
| Găsit : | | 72,74 | | 7,78 | | 5,86 |

Forma (Z): Randamentul: 28,1 % din teorie. Punct de topire: 124-127

°C, eter de petrol/toluen, 5/1,

| | | | | | | |
|-----------|---|-------|---|------|---|------|
| Calculat: | C | 72,77 | H | 8,00 | N | 5,85 |
| Găsit : | | 72,90 | | 7,86 | | 5,83 |

G. N-[(S')-1-fenetil]-N-[(S)-1-(2-piperidino-fenil)-3-metil-1-butil]amină.

17 g (49 mmol) de N-[(S')-1-fenetil]izobutil-(2-piperidino-fenil)-chetimidă cu punct de fierbere 150-155 °C / 0,3 mm Hg / obținută din izobutil-(2-piperidino-fenil)-acetona și (S')-1-fenetil-amină. Fa. Fluka, e e=99,6, în toluen + trietilamină prin picurarea unui adaus de soluție de tetraclorură de titan în toluen/se dizolvă în 170 ml etanol anhidru. Se adaugă 1,7 g tetraizopropilat de titan și 8 g de nichel Raney și se hidrogenează la 50 °C și 200 bar hidrogen. După 20 h se mai adaugă încă 8 g nichel Raney și se hidrogenează în aceleași condiții încă 52 h. Se filtrează pentru separarea de catalizator peste un strat

RO 113462 B1

de Celite pe o frită G 3 și se evaporă filtratul în vid. Cantitatea obținută: 13,1 g, 76,6 % din cea teoretică. Punct de fierbere: 152 °C / 0,2 mm Hg
Calculat: C 82,23 H 9,78 N 7,88
Găsit : 82,00 10,03 7,74
[α]_D²⁰ = -55,3 °, c c = 1,1 în metanol. Puritatea diastomerilor se determină cu ajutorul HPLC pe un Lichrosorb coloană RP18 -HPLC, lungimea coloanei: 250 mm la un diametru interior de 4 mm; mărimea particulelor 7 μm. Agent de curgere: metanol/dioxan/soluție apoasă 0,1 % acetat de sodiu, reglată cu acid acetic la pH = 4,05, 135/60/5; temperatura: 23 °C; detectarea UV la 254 nm. Găsit Pic 1 (S,S'): Pic 2 (R,S') = 98,4 %: 1,4 %, de (diastereomeric exces) = 97,0 % (S,S').

H. (S)-1-(2-piperidino-fenil)-3-metil-1-butilamină

12,5 g (36 mmol) de N-[(S')-1-feniletil]-N-[(S)-1-(2-piperidino-fenil)-3-metil-1-butil]amină cu 97,0 % (S,S') se dizolvă în 125 ml apă și 3,6 ml acid clorhidric concentrat. Se adaugă 1,3 g paladiu/cărbune (10 %) și se hidrogenează la 50 °C hidrogen la 5 bar. După terminarea absorbției de hidrogen (10 h) se filtrează pentru separarea catalizatorului peste un strat de Celit. Filtratul se trece cu amoniac concentrat sub adaus de gheață la pH alcalin și se extrage cu acetat de etil. Extractul organic se usucă și se filtrează și se evaporă în vid. Cantitatea obținută: 6,4 g, 72,1 % din cea teoretică, Punct de fierbere: 115-117 °C / 0,4 mm Hg. Puritatea enantiomerului: e e = 93,5 % (S) / metoda HPLC, după acetilare prealabilă: vezi exemplul A.

I. N-[(R')-1-fenetil]-N-[(S)-1-(2-piperidino-fenil)-3-metil-1-butil]amină

La o soluție de 27,4 mmol (4 echivalenți), de bromură de izobutil-magneziu în 22 tetrahidrofuran anhidru, agitată într-o baie de 60 °C, se picură soluția de 2 g, (6,84 mmol), N-[(R')-1-fenetil]-(2-piperidino-benzaldimină)/obținută din cantități echimolare de 2-piperidino-benzaldehidă și (R')-1-fenetilamină prin staționare la temperatura camerei peste noapte și urmată de uscare cu sulfat de sodiu în soluție de eter/ în tetrahidrofuran anhidru în cantitate de 20 ml. După 18 h se mărește temperatura băii la 80 °C și se adaugă alți doi echivalenți de bromură de izobutil-magneziu în 11 ml de tetrahidrofuran. După agitare de încă 12 h la 80 °C se mai adaugă încă odată câte 2 echivalenți de soluție de bromură de izobutil-magneziu. După circa 90 h la 80 °C, se răcește, se tratează cu acid clorhidric concentrat, în exces și se evaporă în vid cu jet de apă până la substanța uscată. Reziduul după evaporare se dizolvă în apă și se alcalinizează cu amoniac concentrat. Se extrage cu eter, se usucă extractul organic peste sulfat de sodiu, se filtrează și se evaporă în vid. Reziduul după evaporare se purifică prin cromatografie pe coloană de gel de silice, toluen/acetona, 95/5. Cantitatea obținută: 0,20 g, 8,3 % din cea teoretică; Punct de topire: sub 29 °C.

Puritatea diastomerului se determină ca în exemplul G cu ajutorul HPLC. Găsit: Pic 1 (R,R'): Pic 2 (S,R') = 4,4 %: 95,4 %, de diastereometric exces = 91,2 % (S,R')

La o încărcătură analoagă cu 2,0 g de bază Schiff și un total de 6 echivalenți de bromură de izobutil-magneziu în toluen/tetrahidrofuran, 4/1, precum și cu adaus de 5 % tetraizopropilat de titan (IV) se încălzește timp de 60 h la 100 °C într-o bombă de sticlă se obține un randament de 5 % cu un randament = 97,6% (S,R').

K. (S)-1-(2-piperidino-fenil)-3-metil-1-butilamină.

Se hidrogenează soluția din 0,15 g, 0,428 mmol, de N-[(R')-1-fenetil]-N-[(S)-1-(2-piperidino-fenil)-3-metil-1-butil]amină, randament = 91,2 %, 0,47

RO 113462 B1

mmol, de acid clorhidric 1 N și 1,5 ml apă la 50 °C și hidrogen la 3,4 bari. Se filtrează peste diatomit se alcalinizează cu amoniac concentrat și se extrage cu acetat de etil. Se usucă extractul, se filtrează și se evaporă în vid. Cantitatea obținută: 0,066 g, 52,8 % din cea teoretică. Punct de topire: sub 20 °C. Puritatea enantiomerilor: $e_e = 87,6\%$ (S) / Metoda HPLC, după acetilarea prealabilă: vezi exemplul A /.

Cei doi enantiomeri, și anume acidul (S) (+)-2-etoxi-4-[N-[1-(2-piperidinofenil)-3-metil-1-butil]-amino-carbonilmetil]-benzoic (cod. Nr. A G - E E 623 ZW) și acidul (R) (-)-2-etoxi-4-[N-[1-(2-piperidino-fenil)-3-metil-1-butil]-amino-carbonilmetil]-benzoic (cod.nr. A G - E E 624 ZW), au fost cercetați asupra acțiunii de scădere a zahărului din sânge la șobolani femele, cântărind 180-220 g și care au fost înfometate 24 h înainte de începerea experimentului.

Substanțele de investigat s-au suspendat în metilceluloză 1,5 % imediat înaintea începerii testului și s-au administrat în esofag.

S-au luat probe de sânge imediat înaintea administrării substanței și la 1, 2, 3, 4, 5 și 6 h după administrare, în fiecare caz din plexul venos retroorbital. 50 μ l de sânge s-au deproteinizat cu 0,5 ml acid percloric 0,33 N și s-au centrifugat. S-a măsurat glucoza în supernatant prin metoda hexokinazei folosind un fotometru analitic.

Evaluarea statistică se face cu testul Student T, cu $p=0,05$ ca limită a semnificației.

Tabelul 1 prezintă valori semnificative statistic ca derivații procentuale față de control.

Tabelul 1

| Substanța | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 h |
|---------------------------------------|------|------|------|------|-----|-----|
| A G - E E 623 ZW 0,015 mg/kg p. O. | -17 | -36 | -37 | -32 | -35 | -35 |
| A G - E E 624 ZW 1,0 mg/kg p. O | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | - | - |

n.s. = nesemnificativ statistic

- = ne-măsurat

S-a găsit că enantiomerul (S) (A G - E E 623 ZW) este enantiomerul eficient și efectul lui durează mai mult de 6 h la șobolan.

Pe baza celor observate la șobolani, pare adecvat a se folosi în exclusivitate la om A G - E E 623 ZW, reducând doza cu 50 %, comparativ cu doza de A E - E E 388 ZW. Acest fapt s-a confirmat la om, după cum se va vedea ulterior. Totuși, din studiile pe om s-a găsit că A E - E E 623 are proprietăți farmacocinetice surprinzătoare care nu au fost prevăzute din datele existente ale A G - E E 388 ZW.

A G - E E 623 ZW are avantaje terapeutice surprinzătoare față de racematul A G - E E 388 ZW.

Studiile s-au făcut pe voluntari bărbați, sănătoși, la care s-au determinat nivelele de glucoză și substanță activă în timp.

În studiul 1, randomizat, probă orală dublă, grup de comparație, la 12 subiecți de testare s-a dat dimineața, pe nemâncare, o capsulă placebo sau o capsulă din concentratele conținând 2 mg A G - E E 388 ZW micronizat. La 5,5 h după administrare orală s-a dat un prânz standard (L), la 7 h după administrare s-a dat o gustare (S) și la 10 h după administrare s-a dat o cină standard (D). La diferite perioade de timp s-au luat probe de sânge. S-a determinat concentrația de glucoză din sângele integral folosind metoda hexo-

RO 113462 B1

chinazei, vezi mai sus. Concentrațiile de A A - E E 388 ZW s-au determinat din plasmă folosind o metodă HPLC ne-stereoselectivă, cu detectare electrochimică și o limită de detecție de 5 ng/ml, vezi A. Greischel, K. Beschke, H. Rapp, și W. Roth în Journal of Chromatography Biomedical Application intitulat "Quantitation of the new Hypoglycemic Agent A G - E E 388 ZW in Human Plasma by automated High-Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection".

Tabelul 2 conține nivelele medii de glucoză găsite la grupul testat, experimentate cu abateri procentuale față de grupul placebo, cât și concentrările medii de A G - E E 388 ZW în ng/ml, împreună cu abaterea standard (SD).

Tabelul 2 Studiul 1

| Timp după administrare h | Glucoză abatere față de placebo, % | Concentrație A E - E E 388 ZW | |
|--------------------------------|--|----------------------------------|-----------|
| | | medie, ng/ml | SD, ng/ml |
| 0 | n.s. | 0,0 | 0,0 |
| 0,60 | n.s. | 55,8 | 32,9 |
| 0,75 | - 9 | 82,9 | 17,9 |
| 1,00 | -17 | 82,8 | 18,3 |
| 1,50 | -27 | 64,7 | 8,2 |
| 2,00 | -24 | 58,3 | 12,0 |
| 2,50 | -19 | - | - |
| 3,00 | n.s. | 29,4 | 7,6 |
| 4,00 | -24 | 16,3 | 6,9 |
| 5,00 | - 9 | 9,0 | 6,2 |
| 5,5 (L) | n.s. | - | - |
| 6,00 | n.s. | 4,2 | 4,5 |
| 7,0 (S) | n.s. | - | - |
| 8,00 | - 5 | 1,2 | 2,9 |
| 9,00 | n.s. | - | - |
| 10,00 (D) | n.s. | 0,0 | 0,0 |

n.s. = ne semnificativ statistic

- = nemăsurat

(L) = prânz

(S) = gustare

(D) = cina

S-a găsit că nivelul substanței active atinge limita de detecție după 5 h și că durata de activitate a A G - E E 388 ZW este de aproximativ 5 h. Există, astfel, o corecție bună între curba nivelului A G - E E 388 ZW din plasmă și efectul de scădere a zahărului din sânge.

În studiul 2, randomizat, deschis, încrucișat, la 12 subiecți pentru testare s-a dat dimineața, pe nemâncate, fie o capsulă conținând 2 mg A G - E E 388 ZW micronizat, fie o tabletă uscată prin pulverizare conținând 2 mg A G - E E 388 ZW.

La două ore după administrarea orală s-a dat un mic dejun standard (B), la 5 ore după administrare s-a dat un prânz standard (L) și la 10.5 ore după administrare s-a dat o cină standard (D). La diferiți timpi s-au luat probe de sânge. S-a măsurat glucoza din sângele integral și s-a măsurat concentrația de substanță activă din plasmă, ca în studiul 1.

RO 113462 B1

Tabelul 3 prezintă nivelele medii de glucoză, în mmoli/l, găsite după administrarea capsulelor sau tabletelor și abaterile standard, cât și concentrațiile medii de A G - E E 388 ZW, în ng/ml, și abaterile standard (SD).

Tabelul 3 Studiul 2

| Timp după administrare ore | Glucoză mmoli/l | | | | Concentrație A E - E E 388 ZW, mg/ml | | | |
|----------------------------|-----------------|-----|---------|-----|--------------------------------------|------|---------|------|
| | Capsule | | Tablete | | Capsule | | Tablete | |
| | medie | SD | medie | SD | medie | SD | medie | SD |
| 0 | 5,0 | 0,2 | 4,9 | 0,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 0,20 | 5,0 | 0,3 | 5,0 | 0,4 | 0,9 | 3,1 | 15,0 | 14,3 |
| 0,33 | 4,9 | 0,3 | 4,9 | 0,4 | 17,5 | 12,3 | 55,6 | 36,0 |
| 0,55 | 4,9 | 0,3 | 4,6 | 0,5 | 44,9 | 21,5 | 75,6 | 34,6 |
| 0,75 | 4,6 | 0,3 | 4,4 | 0,5 | 66,4 | 20,6 | 83,5 | 25,6 |
| 1,00 | 4,4 | 0,4 | 4,1 | 0,5 | 73,7 | 15,5 | 81,3 | 22,5 |
| 1,50 | 3,9 | 0,6 | 3,8 | 0,4 | 65,1 | 16,9 | 65,9 | 17,5 |
| 2,00 (B) | 4,4 | 1,0 | 4,7 | 0,9 | 50,8 | 13,5 | 51,3 | 14,9 |
| 3,00 | 4,4 | 1,0 | 4,7 | 0,9 | 27,9 | 8,1 | 32,4 | 12,8 |
| 4,00 | 4,0 | 0,6 | 4,2 | 0,3 | 16,8 | 5,1 | 19,1 | 8,0 |
| 5,00 (L) | 4,2 | 0,4 | 4,2 | 0,5 | 12,2 | 3,4 | 13,2 | 6,1 |
| 6,00 | 4,8 | 0,8 | 5,2 | 0,7 | 7,8 | 4,3 | 9,5 | 5,7 |
| 9,00 | 5,0 | 0,3 | 5,0 | 0,5 | 3,3 | 3,5 | 5,2 | 3,6 |
| 10,00 (D) | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 24,00 | 4,9 | 0,2 | 4,8 | 0,2 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |

(-) = nemăsurat

Nivelele de A G - E E 388 ZW cresc mult mai rapid după administrarea tabletei și ating valoarea maximă mai devreme decât după administrarea unei capsule. Limita de detecție A G - E E 388 ZW se atinge după aproximativ 6 ore. În concordanță cu curba nivelului în plasmă efectul de scădere a zahărului din sânge se instalează rapid. Nivelele de glucoză revin la valoarea lor inițială după 6 ore.

În studiul 3, deschis, încrucișat, un singur subiect a luat, pe nemâncate, o capsulă din concentratele conținând 2 mg sau 4 mg A G - E E 388 ZW micronizat sau 2 mg A G - E E 623 ZW sau o capsulă de placebo în 4 zile diferite. Subiectul a continuat să mănânce pe întreaga durată a experimentului. S-au luat probe de sânge la timpi diferiți. S-a măsurat glucoza în sângele integral și s-a determinat concentrația de materie activă în plasmă, conform studiului 1.

Tabelul 4 prezintă nivelele de glucoză găsite, ca abatere procentuală față de nivelul măsurat la timpul zero și concentrațiile de materie activă în ng/ml.

Tabelul 4 Studiul 3

| Timp după administrare h | Glucoză % abatere față de t=0 | | | Concentrație materie activă ng/ml | | | |
|--------------------------|-------------------------------|----------|---------|-----------------------------------|---------|-----------|-----------|
| | 2 mg | | 4 mg | 2 mg | 2 mg | 4 mg | 2 mg |
| | Placebo | AG-EE388 | AG-EE38 | AG-EE623 | AG-EE38 | AG-EE 388 | AG-EE 623 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | 0 | - |
| 0,50 | -2 | 0 | -1 | -10 | 11 | 0 | - |
| 0,75 | 2 | 0 | -1 | -14 | 16 | 10 | - |
| 1,00 | -6 | -5 | -7 | -18 | 40 | 72 | - |
| 1,25 | 0 | -12 | -15 | -29 | 44 | 130 | 0 |
| 1,50 | -2 | -18 | -21 | -43 | 68 | 150 | 22 |

RO 113462 B1

1140

Continuare tabel

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|------|------|-----|-----|-----|-----|----|-----|----|
| | 1,75 | -3 | -23 | -32 | -40 | 82 | 148 | 24 |
| 1145 | 2,00 | -2 | -29 | -38 | -33 | 82 | 141 | 7 |
| | 2,50 | -2 | -27 | -34 | -33 | 80 | 119 | 0 |
| | 3,00 | 1 | -21 | -28 | -31 | 72 | 109 | 0 |
| | 3,50 | -4 | - | -24 | - | 59 | 84 | 0 |
| | 4,00 | 1 | -17 | -26 | -20 | 32 | 71 | 0 |
| 1150 | 5,00 | -2 | -17 | -24 | -22 | 0 | 64 | - |
| | 6,00 | -5 | -16 | -23 | -28 | - | 49 | 0 |
| | 7,00 | -7 | - | -20 | -22 | - | 21 | 0 |
| | 8,00 | -10 | - | -25 | -26 | - | 18 | - |

1175

388 = A G - E E 388 ZW

623 = A G - E E 623 ZW

- = nemăsurat

1180

Tabelul 4 prezintă, așa cum s-a așteptat, că 4 mg A G - E E 388 ZW micșorează glucoza din sânge mai brusc decât 2 mg de A G - E E 388 ZW și scăderea maximă după 4 mg de A G - E E 388 ZW, - 38 %, și după 2 mg de A G - E E 623 ZW, -43 %, este identică. Cu toate acestea, efectul a 2 mg de A G - E E 623 ZW tinde să se instaleze mai rapid, 0,5 h, decât cel a 4 mg de A G - E E 388 ZW, aproximativ 1,0 h, și după 2 mg de A G - E E 623 ZW el atinge maximul mai rapid, 1,5 h, decât după 4 mg de A G - E E 388 ZW, 2,0 ore. După administrarea a 4 mg de A G - E E 388 ZW sau a 2 mg de A G - E E 623 ZW, efectul de scădere a zahărului din sânge, după ce atinge valoarea maximă, scade practic la fel până la sfârșitul testului, 8 h. După cum se vede din comparație cu datele placebo, pare să existe, încă, efectul de scădere a zahărului din sânge la 8 h după administrare.

1170

Analiza concentrației de materie activă permite următoarele observații:

1175

După administrarea a 2 sau 4 mg de A G - E E 388 ZW concentrația maximă de materie activă este 82 sau, respectiv 150 ng/ml. Maximele se ating după 1,75 și respectiv 1,5 h, mai devreme decât reducerile maximelor de zahăr în sânge după 2 h. La administrarea de 4 mg se poate detecta încă 18 ng/ml materie activă în plasmă la 8 h după administrare. După administrare a 2 mg de A G - E E 623 ZW, nivelul maxim este neașteptat de scăzut, de 22-24 ng/ml; el atinge numai aproximativ o treime din nivelul găsit, 82 ng/ml, după aceeași doză de A G - E E 388 ZW. Nivelul de materie activă scade extrem de rapid sub limita de detecție.

1180

Pentru a verifica rezultatele studiului 3, în special concentrația scăzută de materie activă și scăderea surprinzător de rapidă a concentrației de materie activă, având în vedere durata relativ lungă a efectului, după administrarea A G - E E 623 ZW, s-a efectuat studiul 4, nerandomizat, probă orală dublă, la fiecare dozaj comparat cu placebo, grup de comparație. La 6 subiecți de testare s-a dat dimineața, pe nemâncate, 0,5 mg, 1,0 mg de A G - E E 623 ZW sub formă de tablete uscate prin pulverizare sau tablete sau o tabletă placebo sau tablete preparate în mod analog. La 0,25 h după administrare orală s-a dat un mic dejun standard (B), la 5,5 h după administrare s-a dat un prânz standard (L) și la 10 h după administrare s-a dat o cină standard (D). La diferiți timpi s-au luat probe de sânge. Concentrațiile de glucoză s-au determinat din sânge integral conform studiului 1. Concentrațiile de A G - E E 623 ZW în plasmă s-au determinat prin imunoevaluarea enzimei competitive stereospecifice (ELISA) cu o limită de detecție de

1185

RO 113462 B1

0,5 ng/ml.

Tehnica ELISA folosită pentru A G - E E 623 ZW se bazează pe anticorpii policlonali de iepure direcționați contra A G - E E 623 ZW legat covalent de albumina serului uman. Reacția cu A G - E E 624 ZW este mai mică de 1:100. Imunoplăcuțele microtitru s-au acoperit cu acești anticorpi și după spălarea și blocarea plăcuțelor s-au incubat cu probe de plasmă standard sau necunoscută, la 4 °C, timp de o oră cu agitare. Apoi, s-a adăugat A G - E E 623 ZW cuplat cu peroxidază de hrean și s-a inoculat încă 4 h în aceleași condiții. S-a folosit 1,2-fenilendiamină ca substrat pentru cuantificarea fotometrică a moleculelor cuplate de enzimă.

Tabelul 5 prezintă nivelele medii de glucoză găsite în grupele testate, ca abateri procentuale față de grupul placebo și concentrațiile medii de A G - E E 623 ZW în ng/ml împreună cu abaterile standard (SD).

Tabelul 5 Studiul 4 (Partea I)

| Timp după administrarea A G-E E 623 ZW | Glucoză mmoli/l | | | | | | | |
|--|-----------------|-------|--------|-------|------|-------|------|-------|
| | 0 mg | | 0,5 mg | | 1 mg | | 2 mg | |
| | h | media | SD | media | SD | media | SD | media |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| 0 | 4,96 | 60,16 | 5,21 | 0,23 | 4,62 | 0,06 | 4,67 | 0,13 |
| 0,25-(B) | 4,82 | 0,08 | 5,09 | 0,22 | 4,62 | 0,16 | 5,14 | 0,50 |
| 0,50 | 4,68 | 0,14 | 5,01 | 0,10 | 4,57 | 0,12 | 4,38 | 0,08 |
| 0,75 | 5,82 | 0,24 | 5,85 | 0,24 | 5,38 | 0,49 | 4,54 | 0,22 |
| 1,00 | 6,31 | 0,22 | 5,88 | 0,32 | 4,72 | 0,52 | 4,27 | 0,36 |
| 1,50 | 4,52 | 0,18 | 4,05 | 0,35 | 2,98 | 0,32 | 2,65 | 0,15 |
| 2,00 | 4,07 | 0,15 | 3,50 | 0,28 | 3,20 | 0,17 | 2,74 | 0,24 |
| 3,00 | 3,36 | 0,13 | 3,90 | 0,16 | 3,69 | 0,13 | 3,07 | 0,20 |
| 4,00 | 4,49 | 0,06 | 4,08 | 0,12 | 4,05 | 0,13 | 3,64 | 0,15 |
| 5,00 | 4,39 | 0,12 | 4,32 | 0,06 | 3,94 | 0,10 | 3,88 | 0,15 |
| 5,00 (L) | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 6,00 | 6,74 | 0,15 | 6,63 | 0,27 | 4,48 | 0,28 | 6,47 | 0,35 |
| 8,00 | 5,39 | 0,39 | 5,61 | 0,33 | 5,37 | 0,21 | 4,61 | 0,27 |
| 10,00-(D) | 4,86 | 0,20 | 4,81 | 0,13 | 4,57 | 0,27 | 4,45 | 0,21 |
| 24,00 | 4,53 | 0,10 | 4,82 | 0,20 | 4,69 | 0,11 | 4,77 | 0,06 |

Tabelul 5 Studiul 4 (Partea II)

| Timp după administrarea A G-E E 623 ZW | Concentrația A G-E E 623 ZW ng/ml | | | | | | |
|--|-----------------------------------|-------|--------|-------|--------|-------|------|
| | 0,5 mg | | 1,0 mg | | 2,0 mg | | |
| | h | media | SD | media | SD | media | SD |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | |
| 0 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 0,25-(B) | 8,40 | 5,40 | 14,50 | 13,70 | 24,10 | 19,00 | |
| 0,50 | 4,70 | 8,50 | 27,90 | 17,90 | 50,40 | 26,30 | |
| 0,75 | 1,60 | 5,90 | 24,20 | 10,00 | 41,10 | 16,10 | |
| 1,00 | 7,00 | 3,80 | 15,30 | 6,50 | 29,90 | 11,40 | |
| 1,50 | 2,60 | 2,10 | 7,80 | 3,50 | 13,50 | 6,10 | |
| 2,00 | 1,20 | 1,40 | 4,70 | 2,40 | 8,80 | 4,40 | |
| 3,00 | 0,30 | 0,60 | 1,40 | 1,40 | 4,30 | 3,00 | |
| 4,00 | 0,00 | 0,00 | 0,70 | 1,00 | 1,50 | 2,00 | |
| 5,00 | 4,39 | 0,12 | 4,32 | 0,06 | 3,94 | 0,10 | |

RO 113462 B1

1250

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|------|-----------|------|------|------|------|------|------|
| | 5,00 (L) | - | - | - | - | - | - |
| | 6,00 | 0,00 | 0,00 | 0,30 | 0,70 | 0,20 | 0,60 |
| 1255 | 8,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | 10,00-(D) | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | 24,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |

1260

S-a găsit că micșorarea zahărului în sânge începe după 0,75 h, 2 mg sau după 1,0 h, 1 mg, atinge un maxim după 1,5 h și se menține până la 2h, 1 mg sau până la 5 h, 2 mg, după administrare. Nivelele maxime de A G - E E 623 ZW se ating la 0,5 h după administrare. Comparativ cu nivelele maxime ale

1265

A G - E E 388 ZW de 83,5 + 25,5 ng/ml, vezi tabelul 3, după administrarea unei tablete concentratele ținând 2 mg A G - E E 388 ZW, nivelul maxim al A G - E E 623 ZW de 50 + 26,3 ng/ml după administrarea unei tablete conținând 2 mg al A G - E E 623 ZW este semnificativ mai scăzut. Nivelul A G - E E 623 ZW din plasmă este sub limita de detecție după numai 3 h, 1 mg sau 4 h, 2 mg, după administrare. Comparativ, nivelul de A G - E E 388 ZW nu scade sub limita de detecție timp de 6 h după administrarea unei tablete de 2 mg, vezi tabelul 3.

1270

Astfel, rezultatele studiului 4 confirmă rezultatele surprinzătoare obținute în studiul 3 și anume:

1275

a) Nivelele de A G - E E 623 ZW scad mult mai rapid spre zero decât cele de A G - E E 388 ZW, chiar atunci când doza este absolut identică, după cum rezultă din comparația următoare, tabelul 6.

1280

b) În legătură cu scăderea zahărului din sânge obținută, nivelele de A G - E E 623 ZW în plasmă sunt substanțial mai scăzute decât cele așteptate prin înjumătățirea dozei de A G - E E 388 ZW.

Tabelul 6

1285

| Studiul nr. | Substanța A G - E E | Doza mg | Concentrație maximă ng/ml | Forma de administ. | Concentrație Ng/ml | | |
|-------------|---------------------|---------|---------------------------|--------------------|--------------------|---------|---------|
| 1 | 388 | 2 | 83+18 | capsulă | 16+7 | 9+6 | 4+4 |
| 2 | 388 | 2 | 74+15 | capsulă | 17+5 | 12+3 | 8+4 |
| 2 | 388 | 2 | 84+25 | tabletă | 19+5 | 13+6 | 10+6 |
| 3 | 388 | 2 | 82 | capsulă | 32 | 0 | - |
| 1290 | 3 | 4 | 150 | capsulă | 71 | 64 | 49 |
| 3 | 623 | 2 | 24 | capsulă | 0 | - | 0 |
| 4 | 623 | 1 | 28+18 | tabletă | 0,7+1 | 0,3+0,7 | 0,3+0,7 |
| 4 | 623 | 2 | 50+26 | tabletă | 1,5+2 | 0,4+0,9 | 0,2+0,6 |

1295

Rezultatele surprinzătoare ale studiilor 3 și 4 ar putea fi explicate dacă enantiomerul -(S) eficient (A G - E E 623 ZW) s-ar elimina din sânge mult mai rapid decât enantiomerul -(R) ineficient (A G - E E 624 ZW).

1300

Când se administrează racemat (A G - E E 388 ZW) nivelele înalte în plasmă care durează mai mult ar putea fi micșorate, în principal, de enantiomerul (R) ineficient (A G - E E 624 ZW).

1310

Pentru o mai bună claritate s-a efectuat Studiul 5, randomizat, deschis, încrucișat. La 12 subiecți pentru testare s-a administrat dimineata, pe nemân-cate, 1 mg de A G - E E 388 ZW, fie ca infuzie intravenoasă timp de 15 min, fie pe cale orală sub formă de soluție buvabilă sau de capsulă, micronizat. La 2 h după administrare s-a dat un mic dejun (B) standard și la 5 h după

RO 113462 B1

administrare s-a dat un prânz standard (L) și la 10 după administrare s-a dat o cină standard (D). La diferite perioade de timp s-au luat probe de sânge. Concentrația de glucoză s-a măsurat în plasmă ca în Studiul 1. Concentrația de A G - E E 388 ZW s-a măsurat în plasmă conform cu Studiul 1, folosind metoda HPLC ne-stereoselectivă și concentrația de A G - E E 623 ZW s-a măsurat în plasmă, conform Studiului 4 cu A G - E E 623 ZW specific. Concentrațiile de A G - E E 624 ZW în plasmă s-au calculat ca diferențe între două concentrații găsite.

$$C_{\text{AGE E 624 ZW}} = C_{\text{AGE E 623 ZW}} + C_{\text{AGE E 624 ZW}} - C_{\text{AGE E 623 ZW}}$$

Tabelul 7 prezintă nivelele medii de glucoză din plasmă măsurate în mmoli/l, împreună cu abaterile standard (SD), concentrația medie de A G - E E 388 ZW măsurată (388) și concentrația medie de A G - E E 623 ZW, inclusiv abaterile standard, cât și concentrația medie de A G - E E 624 ZW (624) calculată în ng/ml.

Tabelul 7, Studiul 5

| Admi- nistrare | Timp după admini- strare (h) | Glucoză mmoli/l/ | | Concentrație /ng/ml | | | | | |
|-------------------|------------------------------------|---------------------|------|---------------------|-----------|--------------|-----------|-----------------------|--------------------|
| | | medie | SD | 388 medie | 388 SD | 623 medie | 623 SD | 624-calculat medie | 624-calculat SD |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| 1.v. | 0,00 | 6,10 | 0,66 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 0,08 | 6,54 | 0,75 | 33,3 | 12,9 | 14,1 | 6,6 | 19,2 | 8,6 |
| | 0,17 | 6,46 | 0,63 | 74,8 | 18,3 | 27,7 | 8,2 | 47,1 | 13,8 |
| | 0,25 | 6,46 | 0,70 | 103,8 | 23,6 | 34,2 | 8,5 | 69,7 | 17,5 |
| | 0,28 | 6,46 | 0,73 | 101,8 | 15,2 | 32,3 | 5,3 | 69,4 | 12,0 |
| | 0,33 | 6,40 | 0,76 | 85,6 | 15,0 | 22,9 | 4,6 | 62,9 | 11,6 |
| | 0,42 | 6,01 | 0,70 | 69,6 | 13,7 | 16,9 | 4,3 | 52,7 | 11,2 |
| | 0,50 | 5,86 | 0,91 | 60,1 | 13,4 | 13,2 | 3,2 | 46,9 | 11,4 |
| | 0,85 | 5,14 | 0,81 | 44,2 | 13,5 | 8,2 | 2,9 | 36,0 | 11,7 |
| | 1,00 | 4,57 | 0,61 | 35,8 | 10,9 | 6,0 | 2,7 | 29,8 | 9,6 |
| | 1,25 | 4,40 | 0,58 | 31,4 | 10,2 | 4,2 | 2,1 | 27,0 | 9,1 |
| | 1,50 | 4,55 | 0,70 | 27,0 | 9,6 | 3,1 | 1,7 | 23,9 | 8,7 |
| | (B)-2,00 | 5,11 | 0,57 | 21,0 | 9,0 | 1,5 | 1,1 | 19,3 | 8,3 |
| | 2,50 | 7,14 | 0,79 | 17,6 | 7,8 | 0,8 | 1,1 | 16,8 | 7,3 |
| | 3,00 | 6,31 | 1,79 | 13,5 | 7,5 | 0,6 | 1,1 | 12,9 | 6,9 |
| 4,00 | 5,58 | 0,93 | 9,4 | 6,5 | 0,2 | 0,5 | 9,2 | 6,2 | |
| (L)-5,00 | 5,48 | 0,70 | 7,0 | 5,7 | 0,0 | 0,0 | 7,0 | 5,7 | |
| 6,00 | 6,53 | 1,04 | 4,0 | 4,8 | 0,0 | 0,0 | 4,0 | 4,8 | |
| 9,00 | 6,49 | 0,68 | 1,5 | 2,7 | 0,0 | 0,0 | 1,5 | 2,7 | |
| (D)-10,00 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 24,00 | 6,24 | 0,77 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| p.o. soluție | 0,00 | 5,85 | 0,42 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 0,25 | 6,13 | 0,52 | 16,6 | 8,1 | 7,8 | 4,1 | 8,8 | 6,8 |
| | 0,50 | 5,99 | 0,48 | 36,1 | 10,3 | 12,4 | 3,6 | 22,7 | 9,1 |
| | 0,75 | 5,83 | 0,48 | 40,2 | 11,4 | 10,0 | 3,3 | 30,2 | 10,3 |
| | 1,00 | 5,77 | 0,35 | 39,1 | 13,1 | 7,8 | 5,2 | 31,3 | 12,4 |
| | 1,50 | 5,40 | 0,30 | 30,8 | 11,9 | 3,4 | 2,5 | 27,3 | 11,0 |
| | (B)-2,00 | 5,11 | 0,48 | 24,0 | 10,7 | 2,2 | 1,8 | 21,8 | 10,1 |
| | 3,00 | 5,40 | 1,42 | 14,8 | 8,6 | 0,8 | 1,1 | 13,9 | 8,3 |
| | 4,00 | 4,86 | 0,59 | 8,7 | 7,5 | 0,2 | 0,6 | 8,4 | 7,3 |
| | (L)-5,0 | 5,12 | 0,54 | 5,6 | 5,6 | 0,0 | 0,0 | 5,6 | 5,6 |
| 6,00 | 5,60 | 0,99 | 3,5 | 4,9 | 0,0 | 0,0 | 3,5 | 4,9 | |
| 9,00 | 5,68 | 0,69 | 1,8 | 2,7 | 0,0 | 0,0 | 1,8 | 2,7 | |

RO 113462 B1

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|------|---------|-----------|------|------|------|------|-----|-----|------|------|
| 1365 | | (D)-10,00 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | 24,00 | 5,60 | 0,59 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 1370 | p.o. | 0,00 | 5,32 | 0,64 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| | capsule | 0,25 | 6,08 | 0,60 | 1,9 | 4,4 | 0,7 | 1,6 | 1,2 | 2,8 |
| | | 0,50 | 5,87 | 0,67 | 23,9 | 10,0 | 7,3 | 7,2 | 16,6 | 13,1 |
| | | 0,75 | 5,85 | 0,64 | 34,0 | 19,8 | 9,7 | 6,6 | 24,4 | 16,1 |
| | | 1,00 | 5,57 | 0,62 | 35,3 | 15,0 | 7,9 | 3,9 | 27,5 | 13,5 |
| 1375 | | 1,50 | 5,24 | 0,44 | 31,4 | 9,0 | 4,3 | 2,3 | 27,2 | 9,1 |
| | | (B)-2,00 | 5,04 | 0,57 | 29,5 | 8,0 | 3,1 | 2,6 | 26,2 | 7,3 |
| | | 3,00 | 5,40 | 1,13 | 18,4 | 13,2 | 1,4 | 1,7 | 17,0 | 11,9 |
| | | 4,00 | 4,43 | 0,65 | 10,4 | 9,5 | 0,3 | 0,7 | 10,1 | 8,2 |
| | | (L)-5,00 | 4,71 | 0,54 | 7,0 | 6,2 | 0,2 | 0,4 | 6,8 | 6,0 |
| 1380 | | 6,00 | 5,41 | 1,08 | 3,4 | 5,2 | 0,0 | 0,0 | 3,4 | 5,2 |
| | | 9,00 | 5,42 | 0,79 | 1,4 | 2,6 | 0,0 | 0,0 | 1,4 | 2,6 |
| | | (D)-10,00 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | 24,00 | 5,44 | 0,62 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |

1385

Concentrația de materie activă din studiul 5, tabelul 7, face posibil calculul parametrilor farmacocinetici; pentru 0,5 mg A G-E E 623 ZW după administrare orală, soluție buvabilă; capsule, sub formă de 1,0 mg de racemat A G-E E 388 ZW. Tabelul 8 prezintă parametri farmacocinetici calculați fără un model; în tabel se prezintă, pentru comparație și parametri analogi care pot fi calculați pentru A G-E E 623 ZW după administrare orală, tablete, de 0,5 mg A G-E E 623 ZW, din datele studiului 4, Tabelul 5.

1390

Tabelul 8

| 1395 | Parametru | Studiul 4 (Tablete) | Studiul 5 (Soluție) | Studiul 5 (Capsule) |
|------|----------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | A G-E E 623 ZW | | | |
| | C_{max} /ng/ml/ | 15,0+8,0 | 13,2+3,4 | 11,4+5,9 |
| 1400 | t_{max} /ore/ | 0,6+0,1 | 0,6+0,2 | 0,9+0,5 |
| | $AUC_{0-\infty}$ /ngxh/ml/ | 14,3+8,6 | 16,7+8,5 | 16,0+8,1 |
| | $t_{1/2z}$ /ore/ | 0,5+0,2 | 0,9+0,4 | 0,8+0,5 |
| | MRT_{tot} /ore/ | 0,9+0,2 | 1,3+0,3 | 1,5+0,5 |

1405

Semnificatia parametrilor:

C_{max} = concentrația maximă în plasmă

t_{max} = timpul concentrației maxime în plasmă

1410

$AUC_{0-\infty}$ = aria de sub curbă, de la 0 la ∞ . Aria rămasă de la ultima valoare la ∞ s-a calculat din dreapta de progresie lineară, logaritmică, $1nC = a + zxt$

$t_{1/2z}$ = timpul de înjumătățire calculat din dreapta de regresie lineară logaritmică a ultimelor valori: $t_{1/2z} = 1n2/z$.

MTR_{tot} = timpul de rezidență mediu total

1415

După cum se poate vedea, parametrii pentru A G-E E 623 ZW calculați din studiile 4 și 5 se corelează bine. Aceasta înseamnă că administrarea orală a A G-E E 623 ZW sub formă de racemat A G-E E 388 ZW, adică împreună cu aceeași cantitate de A G-E E 624 ZW, nu are avantaje farmacocinetice față de administrarea orală a A G-E E 623 ZW pur.

1420

Mai mult, concentrația de materie activă din studiul 5 (tabelul 7) face posibil calculul paramertilor farmacocinetici ai A G-E E 623 ZW și A G-E E 624 ZW, după administrare siimultană sub formă de racemat A G-E E 388 ZW. Parametrii calculați fără un model sunt prezentați în tabelul 9.

Tabelul 9 Studiul 5

| Administrare | Parametru | Enantiomer (S) | Enantiomer (R) |
|----------------------|----------------------|-------------------|----------------|
| 1 | 2 | 3 | 4 |
| i, v, | C_{max} /ng/ml/ | 36,3 + 6,9 | 75,4 + 12,6 |
| | t_{max} /ore/ | 0,25 + 0,04 | 0,27 + 0,03 |
| | AUC_{0-} /ngxh/ml/ | 20,8 + 7,1 | 134 + 58 |
| | $t_{1/2z}$ /ore/ | 0,9 + 0,8 | 2,4 + 1,1 |
| | MRT_{intr} /ore/ | 0,9 + 0,6 | 3,3 + 1,7 |
| | CL /ml/min/ | 443 + 140 | 75 + 34 |
| | p.o. soluție | C_{max} /ng/ml/ | 13,2 + 3,4 |
| t_{max} /ore/ | | 0,60 + 0,20 | 1,00 + 0,30 |
| AUC_{0-} /ngxh/ml/ | | 16,7 + 8,5 | 111 + 62 |
| $t_{1/2z}$ /ore/ | | 0,9 + 0,4 | 2,3 + 1,7 |
| MRT_{tot} /ore/ | | 1,3 + 0,3 | 3,4 + 2,0 |
| f /%/ | | 76 + 20 | 83 + 32 |

Parametrii din tabelul 9 reprezintă:

- C_{max} = concentrația maximă în plasmă
- t_{max} = timpul concentrației maxime în plasmă
- AUC_{0-} = aria de sub curbă, de la 0 la
- $t_{1/2z}$ = timpul de înjumătățire
- MRT_{intr} = timpul de rezidență mediu intrinsec
- CL = claritate
- MRT_{tot} = timpul de rezidență mediu total
- f = biodisponibilitate (irală)

Diferența interesantă dintre cei doi enantiomeri este faptul că enantiomerul eficient A G-E E 623 ZW în ciuda unei perioade de activitate relativ lungi este eliminat, în mod surprinzător, mai rapid decât enantiomerul ineficient A G-E E 624 ZW, după cum se vede și în Fig 1 și 2. După administrarea racematului, enantiomerul ineficient A G-E E 624 ZW, este prezent nu numai ca un aditiv inutil în plasmă, ale cărei concentrații în plasmă sunt la fel cu ale enantiomerului eficient, A G-E e 623 ZW, dar este prezent în nivele care durează mai mult timp și la un maxim mai ridicat. Efectul acestui fapt, după cum se prezintă în tabelul 6, de exemplu după administrarea unei tablete concentrate conținând 2 mg A G-E E 388 ZW sau a unei tablete conținând 1 mg A G-E E 623 ZW, este acela că concentrațiile maxime sunt 84 + 25 și respectiv 28 + 18 ng/ml și concentrațiile după 4 ore sunt 19 + 8 și respectiv 0,7 + 1,0 ng/ml, după 5 ore 13 + 6 și respectiv 0,3 + 0,7 ng/ml și după 6 ore 10 + 6 și respectiv 0,3 + 0,7 ng/ml

Astfel, comparativ cu administrarea A G-E E 388 ZW, avantajul surprinzător al administrării A G-E E 623 ZW este acela că se evită nivelele înalte și durate ale substanței în organism, care sunt necesare, care reprezintă o importanță majoră în terapia de durată cum este aceea a diabetului zaharat.

Studiile descrise arată că noul enantiomer -(S) și anume acidul (S) (+) 2-etoxi-4-/N-/1-(2-piperidino-fenil)-3-metil-1-butil-/amino-carbonilmetil-/benzoic, ca purtător al activității de scădere a zahărului în sânge este mult superior față de A G-E E 388 ZW, datorită eliminării surprinzătoare de rapide din sânge care nu a fost prevăzută având în vedere durata de activitate relativ lungă și merg dincolo de avantajul "normal" al unui enantiomer față de racemati și anume avantajul înjumătățirii dozei.

Se indică mai jos câteva posibilități de obținere a unor preparate farmaceutice.

a) Obținerea unor tablete cu 0,25 mg A G-E E 623 ZW. O tabletă conține:

RO 113462 B1

- 0,250 mg materie activă
- 0,125 mg N-metilglucamină
- 0,038 mg polivinilpirolidină
- 0,075 mg polimer de polioxietilenpolioxipropilenă
- 0,150 mg celuloză microcristalină

1485

Modul de preparare

Substanțele active și auxiliare se dizolvă în apă la 90 °C, respectiv celuloza microcristalină se suspendă și dispersia se evaporă în vid. Masa uscată se sitează pe sită cu ochiuri de 1 mm.

1490

La granulatul de materie activă se adaugă prin amestecare următorii componenți pro tabletă:

- 24,862 mg carboximetilamidon de sodiu
- 24,000 mg de celuloză microcristalină
- 0,500 mg stearat de magneziu

1495

Total = 50,000 mg

Din acest amestec se presează tablete rotunde, biplane de 50 mg și 5 mm diametru.

b) Obținerea unor tablete cu 0,5 mg A G-E E 623 ZW. O tabletă conține:

- 0,500 mg materie activă
- 0,250 mg N-metilglucamină
- 0,075 mg polivinilpirolidină
- 0,150 mg polimer de polioxietilenpolioxipropilenă
- 0,300 mg celuloză microcristalină

1500

Modul de preparare:

1505

Materia activă și substanțele auxiliare se dizolvă în apă la 90 °C respectiv se suspendă celuloza microcristalină și dispersia se evaporă în vid. Masa uscată se sitează pe sită cu ochiuri de 1 mm lățime.

La granulatul de materie activă se adaugă prin amestecare per tabletă următoarele părți componente:

1510

- 24,225 mg carboximetilamidon de sodiu
- 24,000 mg celuloză microcristalină
- 0,500 mg stearat de magneziu
- 50,000 mg Total

1515

Din acest amestec se prepară tablete rotunde, biplane de 50 mg și diametrul de 5 mm.

C. Obținerea unor tablete cu 1,0 mg A G-E E 623 ZW.

O tabletă conține:

- 1,00 mg materie activă
- 0,50 mg N-metilglucamidă
- 0,15 mg polivinilpirolidină
- 0,03 mg polimer de polioxietilenpolioxipropilenă
- 0,60 mg celuloză microcristalină

1520

Modul de preparare.

1525

Substanța activă și substanțele auxiliare se dizolvă în apă la 90 °C respectiv se suspendă celuloza microcristalină și dispersia se evaporă în vid. Masa uscată se sitează pe sită cu ochiuri de 1 mm lățime.

La granulatul de materie activă se adaugă prin amestecare per tabletă următoarele părți componente:

1530

- 23,22 mg carboximetilamidon de sodiu
- 24,00 mg celuloză microcristalină
- 0,5 mg stearat de magneziu
- 50,00 mg Total

RO 113462 B1

Din acest amestec se presează tablete biplane având diametrul de 5 mm și greutatea de 50 mg.

D. Obținerea unor tablete cu 1,5 mg A G-E E 623 ZW. 1535

O tabletă conține:

1,500 mg materie activă

0,750 mg N-metilglucamina

0,225 mg polivinilpirolidonă

0,045 mg polimer de polioxietilenpolioxopropilenă 1541

0,900 mg de celuloză microcristalină

Modul de preparare:

Materia activă și substanțele auxiliare se dizolvă în apă la 90 °C respectiv se suspendă celuloză microcristalină și dispersia se evaporă în vid. Masa uscată se sitează pe sită cu ochiuri având deschiderea de 1 mm. 1547

La granulatul de materie activă se adaugă prin amestecare per tabletă următoarele părți constitutive:

23,080 mg carboximetilamidon de sodiu

23,000 mg celuloză microcristalină

0,500 mg stearat de magneziu 1553

50,000 mg Total

Din acest amestec se preparară tablete biplane de 50 mg și având diametrul de 5 mm.

E. Obținerea unor tablete cu 2,0 mg A G-E E 623 ZW. 1559

O tabletă conține:

2,00 mg materie activă

1,00 mg L-lisină

1,00 mg polivinilpirolidonă

1,00 mg polimer de polioxietilenpolioxipropilenă 1565

4,00 mg celuloză microcristalină

Modul de preparare:

Părțile componente se dizolvă în apă de 90 °C respectiv celuloza microcristalină se suspendă și dispersia se prelucrează într-un uscător de dispersie. Apoi se adaugă pe tabletă următoarele părți constitutive:

20,35 mg celuloză microcristalină 1571

20,00 mg carboximetilamidon de sodiu

0,65 mg de stearat de magneziu

50,00 mg Total

Din acest amestec se presează tablete rotunde biconvexe de 50 mg având diametrul de 5 mm și se acoperă cu un strat de gust de hidroxipropilmetilceluloză. 1577

F. Obținerea unor tablete cu 2,5 mg A G-E E 623 ZW. 1583

O tabletă conține:

2,50 mg materie activă

1,25 mg L-lisină 1589

1,25 mg polivinilpirolidonă

1,25 mg polimer de polioxietilenpolioxipropilenă

4,10 mg celuloză microcristalină

Modul de preparare:

Părțile componente se dizolvă în apă de 90 °C respectiv celuloza microcristalină, se suspendă și dispersia se prelucrează într-un uscător de pulverizare. Apoi se adaugă per tabletă următoarele părți constitutive: 1595

RO 113462 B1

19,50 mg celuloză microcristalină
19,50 mg carboximetilamidon de sodiu
0,65 mg stearat de magneziu
50,00 mg Total

1585

Din acest amestec se presează tablete rotunde, biconvexe de 50 mg și diametrul de 5 mm și se acoperă cu un strat cu gust din hidroxipropilmetilceluloză.

1590

G. Obținerea unor tablete cu 3,0 mg A G-E E 623 ZW.

O tabletă conține:

3,00 mg materie activă
1,50 mg L-lisină
1,50 mg polivinilpirolidonă
1,50 mg polimer de polioxietilenpolioxipropilenă

1605

Modul de preparare:

Părțile componente se dizolvă în apă de 90 °C și soluția se prelucrează într-un uscător de pulverizare. Apoi se adaugă per tabletă următoarele părți constitutive:

1600

21,5 mg celuloză microcristalină
21,5 mg carboximetilamidon de sodiu
50,0 mg Total

Din acest amestec se presează tablete rotunde, biconvexe de 50 mg și diametrul de 5 mm și se acoperă cu un strat cu gust din hidroxipropilmetilceluloză.

1605

H. Obținerea unor tablete cu 5,0 mg A G-E E 623 ZW.

O tabletă conține:

5,0 mg materie activă
2,5 mg L-lisină
2,5 mg polivinilpirolidonă
2,5 mg polimer de polioxietilenpolioxipropilenă

1610

Modul de preparare:

Părțile componente se dizolvă în apă de 90 °C și soluția se prelucrează într-un uscător de pulverizare. Apoi se adaugă per tabletă următoarele părți constitutive:

1615

19,0 mg celuloză microcristalină
18,5 mg carboximetilamidon de sodiu
50,0 mg Total

Din acest amestec se presează tablete rotunde, biconvexe de 50 mg și diametrul de 5 mm și se acoperă cu un strat cu gust din hidroxipropilmetilceluloză.

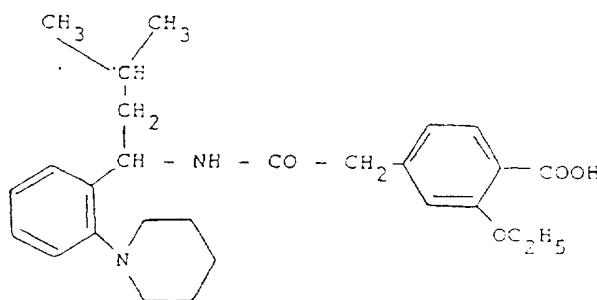
1620

Revendicări

1627

1. Izomer optic al acidului 2-etoxi-4-[N-[1-(2-piperidino-fenil)-3-metil-1-butil]amino-carbonilmetil]-benzoic cu formula:

1630



RO 113462 B1

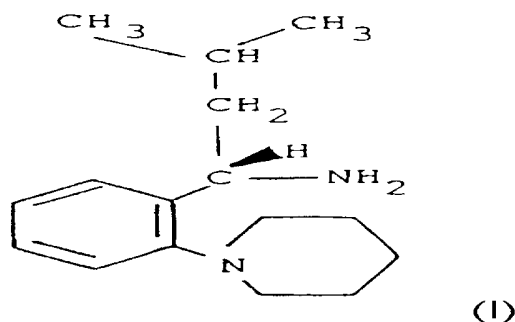
caracterizat prin aceea că este acidul (S) (+)-2-etoxi-4-[N-[1-(2-piperidino-fenil)-3-metil-1-butil]amino-carbonilmetil]-benzoic, având puritatea optică de cel puțin 95 %, precum și sărurile sale cu acizi sau baze organice sau anorganice acceptabile farmaceutic. 1635

2. Izomer optic, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** are o formă cu punct de topire ridicat de 129-131 °C și cu $[\alpha]_D^{29} = +7,45^\circ$ în metanol la o concentrație de $C = 1,06$. 1740

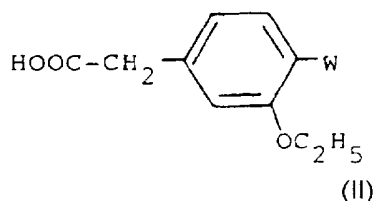
3. Izomer optic, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** are o formă cu punct de topire scăzut de 102-103 °C și cu $[\alpha]_D^{29} = +6,7^\circ$ în metanol la o concentrație de $C = 1$.

4. Izomer optic al acidului 2-etoxi-4-[N-[1-(2-piperidino-fenil)-3-metilbutil]amino-carbonilmetil]-benzoic, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** prezintă o acțiune de scădere a zahărului din sânge și se utilizează pentru tratamentul bolii Diabetus mellitus. 1845

5. Procedeu pentru prepararea acidului (S) (+)-2-etoxi-4-[N-[1-(2-piperidino-fenil)-3-metil-1-butil]aminocarbonilmetil]benzoic, **caracterizat prin aceea că** se tratează: a) (S)-amină cu formula generală (I): 1950

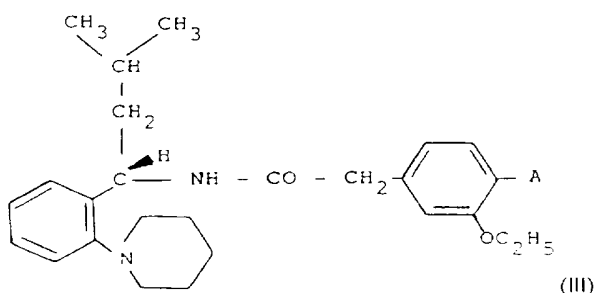


cu un acid carboxilic cu formula generală (II) :



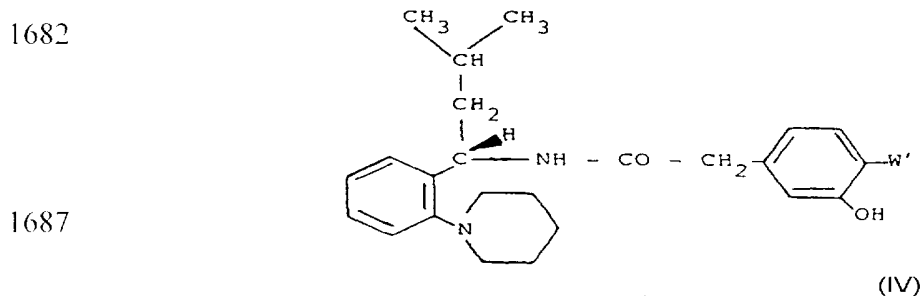
în care: W este o grupă carboxi sau o grupă carboxi protejată printr-un radical de protecție cum ar fi benzil sau cu derivați ai acestuia, reactivi, obținuți eventual în amestecul de reacție cum ar fi esteri, tioesteri, halogenuri, anhidride sau imidazolide și apoi dacă este necesar se scindează o grupă de protecție utilizată, sau 1955

b) se scindează un compus (S) cu formula generală (III):



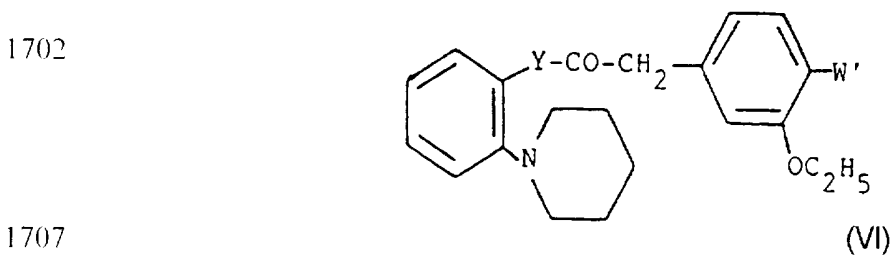
RO 113462 B1

- 1672 în care : A reprezintă o grupă care poate fi trecută prin hidroliză într-o grupă carboxi, cum ar fi amide , esteri , tioesteri , ortoesteri , iminoeteri , amidine sau anhidride , care pot fi substituie sau nesubstituie , grupa nitril, grupa tetrazolil, o grupă eventual substituită de 1,3-oxazol-2-il sau 1,3-oxazolin-2-il, o grupă care poate fi trecută prin termoliză într-o grupă carboxi, cum ar fi esterii cu alcoolii terțieri, de exemplu butil-terț-esterii sau o grupă care poate fi trecută prin hidrogenoliză într-o grupă caarboxi, cum ar fi grupele aralchil, de exemplu grupa benzil sau
- 1677 c) se tratează un compus (S) cu formula generală (IV)

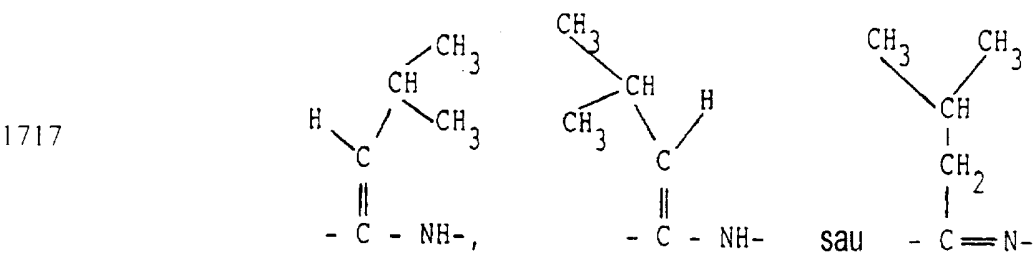


- 1692 în care : W' este o grupă carboxi sau o grupă alcoxycarbonil cu 2 până la 5 atomi de carbon în total, partea de alchil a grupei alcoxi putând fi substituit cu o grupare fenil, cu un compus cu formula generală (V) :
- $$Z - CH_2 - CH_3 \quad (V)$$

- 1697 în care : Z este o grupă care se poate înlocui nucleofil cum ar fi un atom de halogen, o grupă sulfonyloxi, sau mai poate reprezenta împreună cu atomul de hidrogen învecinat o grupă diazo, și dacă este necesar, după reacție, compusul astfel obținut se hidrolizează sau se hidrogenolizează sau
- d) se reduce enantiomerul selectiv, un compus cu formula generală (VI)



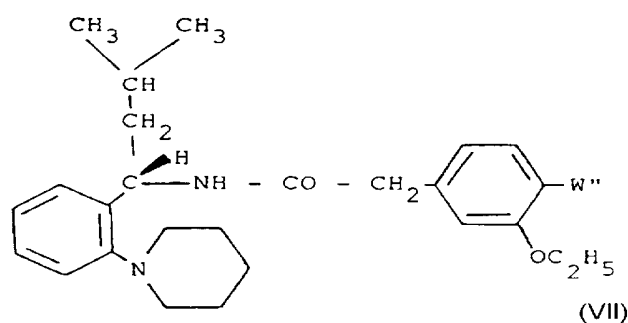
- 1712 în care : W' este o grupă carboxi sau o grupă alcoxycarbonil cu în total 2 până la 5 atomi de carbon , partea alchil a grupei alcoxi putând fi substituită printr-o grupă fenil și Y reprezintă o grupă cu formula :



1722

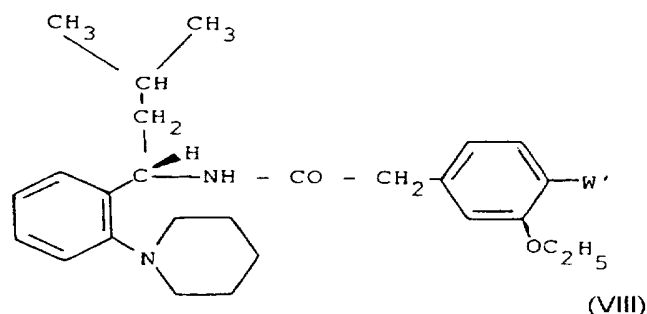
RO 113462 B1

și dacă este necesar se hidrolizează un compus astfel obținut sau
e) se oxidează un compus (S) cu formula generală (VII) :

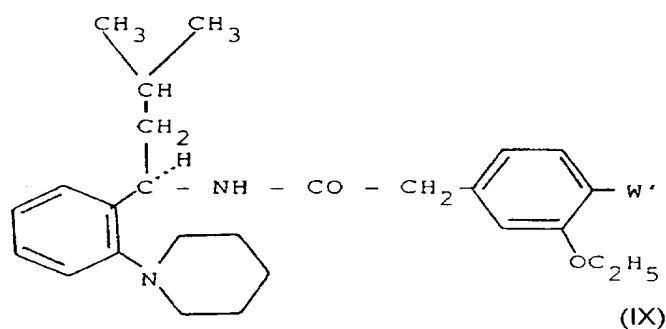


în care W'' reprezintă o grupă care poate fi trecută prin oxidare într-o grupă
carboxi, sau

f) se desface un amestec constând dintr-o cantitate oarecare de
enantiomer (S) cu formula generală (VIII) :



și o cantitate oarecare de enantiomer (R) cu formula generală (IX) :



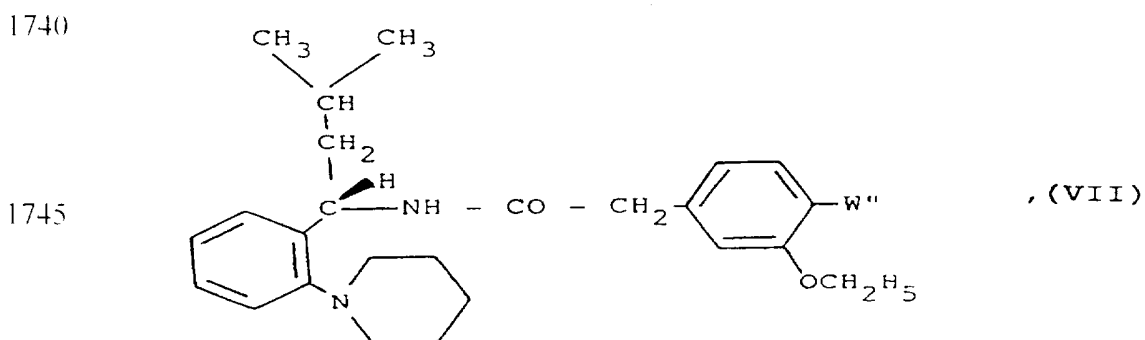
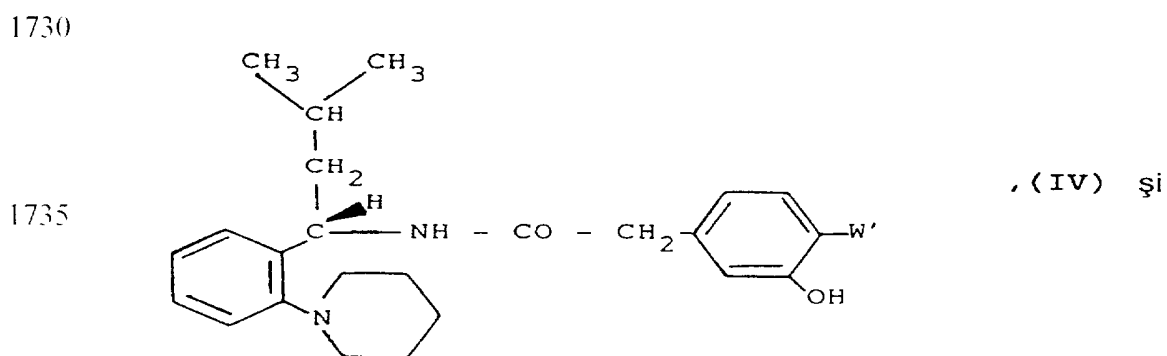
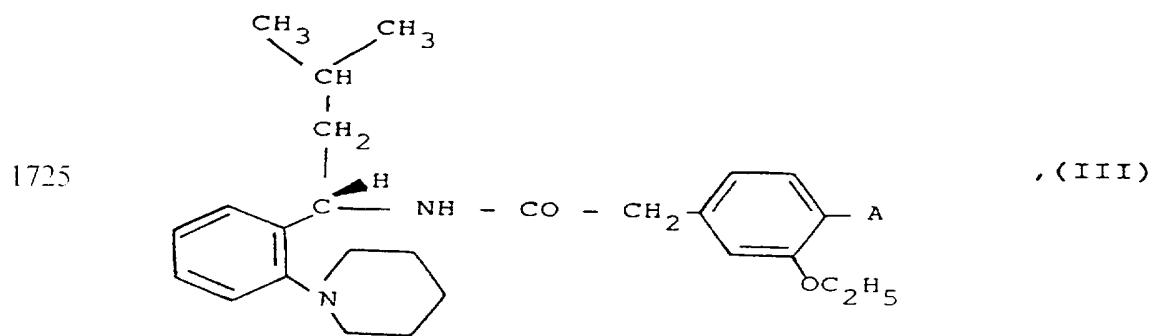
în care : W' reprezintă o grupă carboxi sau o grupă alcoxycarbonil cu în total
2 până la 5 atomi de carbon , partea de alchil a grupei alcoxi putând să fie
substituită printr-o grupă fenil, și un compus astfel obținut, dacă este necesar,
se trece prin recristalizare într-un compus cu o puritate mai ridicată a
enantiomerilor, obținându-se prin cristalizare din etanol/apă , 2:1 , forma cu
punct de topire ridicat, punct de topire de 130-131 °C , și prin cristalizare din
eter de petrol/toluen, 5:3 , obținându-se forma cu punct de topire scăzut,
punct de topire 99-101 °C , și compusul astfel obținut se poate trece în
sărurile sale, mai ales în sărurile suportabile fiziologic, cu acizi anorganici sau
organici sau baze .

1710

1715

6. Intermediari pentru realizarea procedurii de preparare, **caracte-**
rizați prin aceea că au formula generală :

1720



1750 în care : în care A este o grupă care se poate trece prin hidroliză, termoliză sau hidrogenoliză într-o grupă carboxi , W' este o grupă carboxi, sau o grupă alcoxycarbonil cu total 2 până la 5 atomi de carbon , partea de alcoxi putând fi substituită printr-o grupă fenil și W'' reprezintă o grupă care poate trece prin oxidare într-o grupă carboxi, și sărurile lor de adăție .

Președintele comisiei de examinare: **chim. Hăulică Mariela**
 Examinator: **ing. Orăseanu Cornelia**

