

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

292 709

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2001 - 4662**

(22) Přihlášeno: **23.10.1995**

(30) Právo přednosti:

21.10.1994 WO 1994/US9412117

08.12.1994 US 1994/353784

(40) Zveřejněno: **17.09.1997**

(Věstník č. 9/1997)

(47) Uděleno: **25.09.2003**

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: **12.11.2003**

(Věstník č. 11/2003)

(86) PCT číslo: **PCT/US95/13704**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 96/012697**

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁷:

C 07 C 217/58

C 07 C 211/27

C 07 C 211/30

A 61 K 31/13

A 61 K 31/135

A 61 P 19/10

A 61 P 9/12

A 61 P 19/08

(73) Majitel patentu:

NPS PHARMACEUTICALS, INC., Salt Lake City, UT, US;

(72) Původce vynálezu:

Van Wagenen Bradford C., Salt Lake City, UT, US;

Moe Scott T., Salt Lake City, UT, US;

Balandrin Manuel F., Sandy, UT, US;

Delmar Eric G., Salt Lake City, UT, US;

Nemeth Edward F., Salt Lake City, UT, US;

(74) Zástupce:

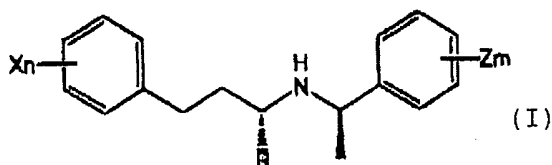
Hakr Eduard Ing., Přístavní 24, Praha 7, 17000;

(54) Název vynálezu:

Diaromatické sloučeniny modulující receptory anorganických iontů a farmaceutické prostředky, které je obsahují

(57) Anotace:

Diaromatické sloučeniny, např. sloučeniny obecného vzorce I, kde R je atom vodíku nebo methylová skupina; m a n znamenají nezávisle na sobě celé číslo od 0 do 5; každá skupina X je nezávisle halogenmethylová skupina nebo halogenalkoxyskupina obsahující 1 až 4 uhlíkové atomy a každá skupina Z je nezávisle alkoxyskupina obsahující 1 až 4 uhlíkové atomy, které jsou schopny modulovat jednu nebo více aktivit receptorů pro anorganické ionty a dále pak použití těchto sloučenin pro výrobu léčiv pro léčení onemocnění a poruch modulace aktivity receptorů pro anorganické ionty. Výhodně mohou tyto sloučeniny mimikovat či blokovat účinek extracelulárního Ca²⁺ na kalciové receptory.



CZ 292709 B6

Diaromatické sloučeniny modulující receptory anorganických iontů a farmaceutické prostředky, které je obsahují

5 Oblast techniky

Vynález popisuje návrh, vývoj, složení a použití sloučenin schopných modulovat jednu nebo více aktivit receptorů anorganických iontů.

10

Dosavadní stav techniky

Určité druhy buněk v organismu reagují nejenom na chemické signály, ale rovněž na přítomnost iontů jako například na přítomnost extracelulárních vápenatých iontů (Ca^{2+}). Změny v koncentraci extracelulárních Ca^{2+} (dále „ $[\text{Ca}^{2+}]$ “) vedou u těchto buněk k různým funkčním odpovědím. Jedním druhem takto specializovaných buněk jsou buňky příštítných tělísek sekretující parathormon (PTH). PTH je nejdůležitějším endokrinním faktorem účastnícím se regulace homeostázy Ca^{2+} v krvi a v extracelulárních tekutinách.

PTH svým působením na buňky v kostech a na ledvinové buňky zvyšuje hladinu Ca^{2+} v krvi. Toto zvýšení $[\text{Ca}^{2+}]$ poté působí jako negativní zpětnovazební signál a snižuje sekreci PTH. Reciproční vztah mezi $[\text{Ca}^{2+}]$ a sekrecí PTH vytváří základní mechanismus udržující homeostázu Ca^{2+} v organismu.

Extracelulární Ca^{2+} působí přímo na buňky příštítných tělísek a tím regulují sekreci PTH. Na buňkách příštítných tělísek byla potvrzena existence povrchového proteinu, který detekuje změny v $[\text{Ca}^{2+}]$. Brown a další, 366 Nature 574, 1993. Tento protein přítomný na povrchu buněk příštítných tělísek funguje jako receptor pro extracelulární Ca^{2+} („receptor pro vápník“), detekuje změny v $[\text{Ca}^{2+}]$ a iniciuje funkční buněčnou odpověď, kterou je v tomto případě sekrece PTH.

Extracelulární Ca^{2+} mohou působit na nejrůznější buněčné funkce; viz Nemeth a další, 11 Cell Calcium 319, 1990.

Úloha extracelulárních Ca^{2+} u parafolikulárních buněk (C–buněk) a buněk příštítných tělísek je zmíněna v Nemeth, 11 Cell Calcium 323, 1990. Bylo prokázáno, že tyto buňky exprimují podobné receptory pro Ca^{2+} . Brown a další, 366 Nature 574, 1993; Mithal a další, 9 Suppl. 1 J. Bone and Mineral Res. s282, 1993; Rogers a další, 9 Suppl. 1 J. Bone and Mineral Res. s409, 1994; Garret a další, 9 Suppl. 1 J. Bone and Mineral Res. s409, 1994. Vliv extracelulárních Ca^{2+} na osteoklasty je popsán v článku Zaidy, 10 Bioscience Reports 493, 1990. Rovněž keratinocyty, juxtaglomerulární buňky, trofoblasty, beta buňky pankreatu a tukové buňky/adipocyty reagují na zvýšení koncentrace vápenatých iontů v extracelulárním médiu. Tato buněčná odpověď je pravděpodobně odrazem aktivace receptorů pro vápník přítomných na povrchu zmíněných buněk.

Schopnost nejrůznějších sloučenin mimikovat in vitro přítomnost extracelulárních Ca^{2+} je popsána v Nemeth a další, (spermin a spermidin) v „Calcium–Binding Proteins in Health and Disease“, 1987, Academic Press, Inc., strany 33 až 35; Brown a další, (například neomycin) 128 Endocrinology 3047, 1991; Chen a další, (dilthiazem a jeho analog TA–3090) 5 J. Bone and Mineral Res. 581, 1990; a Zaidi a další, (verapanil) 167 Biochem. Biophys. Res. Commun. 807, 1990. Nemeth a další, PCT/US93/01642, Mezinárodní publikace WO 94/18959 a Nemeth a další, PCT/US92/07175, Mezinárodní publikace WO 93/04373 popisují nejrůznější sloučeniny, které mohou modulovat účinky anorganického iontu na buňku, která má na svém povrchu receptor pro tento anorganický ion.

Výše uvedené citace nezahrnují nejnovější objevy uskutečněné v průběhu posledních let.

Podstata vynálezu

5

Vynález se týká sloučenin, které jsou schopné modulovat jednu nebo více aktivit receptorů anorganických iontů. Vynález dále popisuje postupy, které k léčbě nemocí a poruch využívají modulaci aktivity receptorů anorganických iontů.

10

Ve výhodném provedení vynálezu mohou používané sloučeniny mimikovat nebo blokovat působení extracelulárního vápníku na receptor pro vápník přítomný na povrchu buněk. Mezi onemocněními nebo poruchami, které mohou být léčeny pomocí modulace aktivity receptorů anorganických iontů, patří některá/některé z následujících: (1) onemocnění neb poruchy charakterizované abnormální homeostázou anorganických iontů, výhodněji pak abnormální homeostázou vápníku; (2) onemocnění nebo poruchy charakterizované výskytem abnormálního množství extracelulárních nebo intracelulárních posílů (messengers), jejichž tvorba může být ovlivněna aktivitou receptorů anorganických iontů, výhodněji pak aktivitou receptorů pro vápník; (3) onemocnění nebo poruchy charakterizované abnormálním působením (například abnormální nebo silnější/slabší odezvou buněk) extracelulárních nebo intracelulárních posílů. Působení těchto posílů může být samo o sobě ovlivněno aktivitou receptorů anorganických iontů, výhodněji pak aktivitou receptorů pro vápník; a (4) další onemocnění nebo poruchy, u kterých bude modulace aktivity receptorů anorganických iontů, výhodněji pak modulace aktivity receptorů pro vápník, prospěšná. To platí například u onemocnění nebo poruch, u nichž může tvorba extracelulárního nebo intracelulárního posla stimulovaná aktivitou receptoru nahradit abnormální množství některého posla. Příkladem extracelulárních posílů, jejichž sekrece a/nebo působení může být ovlivněno prostřednictvím modulace aktivity receptorů anorganických iontů jsou anorganické ionty, hormony, neurotransmitery, růstové faktory a chemokiny. Příkladem intracelulárních posílů jsou cAMP, cGMP, IP₃ a diacylglycerol.

30

Sloučenina podle vynálezu tedy výhodně moduluje aktivitu receptoru pro vápník a je využívána k léčbě onemocnění nebo poruch, které mohou být ovlivněny modulací jedné nebo několika aktivit receptoru pro vápník. Proteiny fungující jako receptor pro vápník umožňují specializovaným buňkám reagovat na změny v extracelulární koncentraci Ca²⁺. Extracelulární Ca²⁺ například inhibují sekreci parathormonu z buněk příštítných tělísek, inhibují resorpci kostní tkáně způsobenou činností osteoklastů a stimulují sekreci kalcitoninu z C-buněk.

35

Ve výhodném provedení vynálezu je daná sloučenina použita k léčbě onemocnění nebo poruchy charakterizované abnormální homeostázou kostní tkáně a minerálních látek, výhodněji však abnormální homeostázou vápníku. Extracelulární Ca²⁺ podléhají dokonalé kontrole udržující jejich homeostázu a samy v organismu ovlivňují nejrozličnější procesy, jako například srážení krve, vzrušivost nervové a svalové tkáně a řádnou tvorbu kostí. Abnormální homeostáza vápníku je určena jednou nebo více z následujících charakteristik: (1) abnormálním zvýšením nebo snížením koncentrace vápníku v séru; (2) abnormálním zvýšením nebo snížením exkrece vápníku močí; (3) abnormálním zvýšením nebo snížením hladiny vápníku v kostech, které je možné například stanovit pomocí měření hustoty kostní dřeně; (4) abnormální absorpcí vápníku přijímaného v potravě; (5) abnormálním zvýšením nebo snížením produkce a/nebo uvolňování posílů, kteří ovlivňují hladinu sérového vápníku. Mezi takové posly patří například parathormon nebo kalcitonin; a (6) abnormální změnou v odpovědi vyvolané některými posly, kteří ovlivňují hladinu sérového vápníku. Abnormální zvýšení nebo snížení hladiny vápníku v těchto případech, které vlastně znamená porušení homeostázy vápníku, odpovídá změnám vyskytujícím se běžně v populaci. Tato změny jsou pak většinou spojeny s výskytem některého onemocnění nebo poruchy.

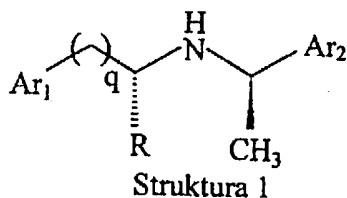
50

Příčinou onemocnění a poruch charakterizovaných abnormální homeostázou vápníku mohou být nejrozličnější buněčné defekty, jako například narušená aktivita receptorů pro vápník, chybný počet receptorů pro vápník nebo defektní intracelulární protein, který je funkčně spjat s receptorem pro

55

vápník. Například v buňkách přístitných tělísek je receptor pro vápník funkčně spojen s Gi proteinem, který po aktivaci inhibuje tvorbu cyklického AMP. Defekty v Gi mohou ovlivnit schopnost tohoto proteinu inhibovat tvorbu cyklického AMP.

- 5 Sloučeniny podle vynálezu spadají do skupiny sloučenin, které lze znázornit obecným vzorcem:



- 10 kde Ar₁ je buď naftyl nebo fenyl, který může být substituován 0 až 5 substituenty. Každý z těchto substituentů může být nezávisle na všech ostatních vybrán ze skupiny tvořené nižšími alkyly, halogeny, skupinami odvozenými od nižších alkyloxy sloučenin, nižšími thioalkyly, methylen-
dioxyskupinou, nižšími halogenalkyly, skupinami odvozenými od nižších halogenalkyloxy sloučenin, OH, CH₂OH, CONH₂, CN, acetyloxy skupinou, N(CH₃)₂, fenylovou skupinou, fenyl-
oxy skupinou, benzylovou skupinou, benzyloxy skupinou, α,α-dimethylbenzylovou skupinou, NO₂, CHO, CH₃CH(OH), acetylovou skupinou, ethylendioxy skupinou;

- 15 Ar₂ je buď naftyl nebo fenyl, který může být substituován 0 až 5 substituenty. Každý z těchto substituentů může být nezávisle na všech ostatních vybrán ze skupiny tvořené nižšími alkyly, halogeny, skupinami odvozenými od nižších alkyloxy sloučenin, nižšími thioalkyly, methylen-
dioxyskupinou, nižšími halogenalkyly, skupinami odvozenými od nižších halogenalkyloxy sloučenin, OH, CH₂OH, CONH₂, CN a acetyloxy skupinou;

- 20 q odpovídá číslicím 0, 1, 2 nebo 3; a R je buď H nebo nižší alkyl.

Předmětem vynálezu jsou také farmaceuticky použitelné soli a komplexy sloučenin podle vynálezu.

- 25 Sloučeniny podle vynálezu jsou výhodně stereochemické sloučeniny. Skupina CH₃ přítomná ve Struktuře I na straně 5 je umístěna na chirálním centru a vytváří na tomto centru α-(R)-methyl konfiguraci. Jestliže R označuje CH₃ skupinu, pak R vyskytující se ve Struktuře I je rovněž umístěno na chirálním centru a vytváří na tomto centru (R)-methyl konfiguraci. Jestliže tedy R
30 označuje CH₃ skupinu, pak sloučenina znázorněná Strukturou I je (R,R) stereoizomerem.

- Termínem aktivita receptorů anorganických iontů označujeme procesy, které jsou důsledkem aktivace receptoru anorganických iontů. Mezi takové procesy patří tvorba molekul, které fungují jako intracelulární nebo extracelulární poslové.

- 35 Mezi sloučeniny modulující aktivitu receptorů pro anorganické ionty patří iontomimetika, iontolitika, kalcimimetika a kalcilytika.

- 40 Jako iontomimetika označujeme sloučeniny, které mimikují (to znamená evokují nebo zesilují) účinky anorganického iontu na příslušný receptor anorganického iontu. Ve výhodném provedení vynálezu ovlivňují tyto sloučeniny jednu nebo více aktivit receptoru pro vápník. Jako kalcimimetika označujeme iontomimetika, která ovlivňují jednu nebo více aktivit receptoru pro vápník a vážou se na receptor pro vápník.

- 45 Jako iontolitika označujeme sloučeniny, které se vážou na některý receptor anorganických iontů a blokují (to znamená inhibují nebo potlačují) jednu nebo více aktivit receptoru anorganických iontů vyvolaných přítomností anorganického iontu. Ve výhodném provedení vynálezu ovlivňují

tyto sloučeniny jednu nebo více aktivit receptoru pro vápník. Jako kalcilytika označujeme iontolitika, která blokuji jednu nebo více aktivit receptoru pro vápník vyvolaných přítomností extracelulárního vápníku a vážou se na receptoru pro vápník.

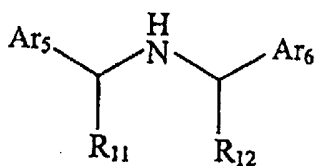
- 5 Iontomimetika a iontolitika se mohou vázat buď do stejného místa na receptoru, do kterého se vážou přirozené ligandy (to znamená anorganické ionty), nebo se mohou vázat na jiné místo (například alosterické místo). Například vazba sloučeniny NPS R-467 na receptor pro vápník má za následek aktivaci tohoto receptoru pro vápník a sloučenina NPS R-467 je tudíž klasifikována jako kalcimimetikum. NPS R-467 se nicméně na receptoru pro vápník váže do místa odlišného
10 od místa, do kterého se váže extracelulární vápník.

- Efektivita jednotlivých sloučenin je stanovována pomocí výpočtu konstant EC_{50} nebo IC_{50} pro každou takovou sloučeninu. Konstanta EC_{50} odpovídá koncentraci sloučeniny, která vyvolá poloviční odezvu ve srovnání s maximální aktivací. Konstanta IC_{50} odpovídá koncentraci sloučeniny, která způsobí snížení maximální aktivity na polovinu. Konstanty EC_{50} a IC_{50} pro sloučeniny
15 účinné k aktivaci/blokování receptoru pro vápník mohou být stanovovány pomocí měření vlivu extracelulárního vápníku na jednu nebo více aktivit receptoru pro vápník. Příklady stanovení sloučících k měření EC_{50} a IC_{50} jsou popsány v Nemeth a další, PCT/US93/01642, Mezinárodní patentové přihlášce WO 94/18959, Nemeth a další, PCT/US92/07175, Mezinárodní patentové přihlášce WO93/04373 a v následující části. Mezi taková stanovení patří měření zvýšení intra-
20 celulární koncentrace vápenatých iontů ($[Ca^{2+}]_i$), které je reakcí na aktivaci receptorů pro vápník, které jsou exprimovány na povrchu oocytů. Ve výhodném provedení vynálezu je v takovýchto stanoveních měřeno uvolňování nebo inhibice produkce hormonu, které jsou spojeny se změnou aktivity příslušného receptoru pro vápník.

- 25 Ve výhodném provedení vynálezu je sloučenina modulující receptory anorganických iontů selektivně namířena na receptory anorganických iontů na určité buňce, jejichž aktivitu má ovlivnit. Například selektivního ovlivnění aktivity receptorů pro vápník je dosaženo použitím sloučeniny, která má při dané koncentraci větší účinek na aktivitu receptorů pro vápník na jednom druhu
30 buněk než na jiném druhu buněk. Ve výhodném provedení vynálezu je rozdíl v účinku na receptory na jednotlivých druzích buněk měřený *in vitro* nebo *in vivo* desetinásobný nebo větší. Ve výhodnějším provedení vynálezu je rozdíl v účinku na receptory na jednotlivých druzích buněk měřen *in vivo*, koncentrace příslušné sloučeniny je udávána jako plazmatická koncentrace nebo koncentrace v extracelulární tekutině a měřeným účinkem je produkce extracelulárních
35 posílů, jako například kalcitoninu, parathomonu nebo plazmatické koncentrace vápníku. Ve výhodném provedení vynálezu daná sloučenina například selektivně aktivuje sekreci PTH a neovlivňuje sekreci kalcitoninu.

- Ve výhodném provedení vynálezu je daná sloučenina buď kalcimimetikem nebo kalcilytikem
40 a má konstanty EC_{50} nebo IC_{50} účinné k aktivaci/blokování receptoru pro vápník menší než nebo rovny 5 μM a dokonce ještě výhodněji menší než nebo rovny 1 μM , 100 nanomolární, 10 nanomolární nebo 1 nanomolární. Ve výhodnějším provedení vynálezu stanovení jsou intracelulární Ca^{2+} měřeny v buňkách HEK 293 transformovaných nukleovou kyselinou, které jsou nasyceny indikátorem fura-2, a které exprimují receptor pro vápník buněk příštích tělísek člověka.
45 Nižší hodnoty konstant EC_{50} nebo IC_{50} jsou výhodnější, protože umožňují *in vivo* nebo *in vitro* použití nižších koncentrací daných sloučenin. Objev sloučenin s nízkými hodnotami konstant EC_{50} a IC_{50} umožňuje navrhnout a syntetizovat další sloučeniny s obdobnou nebo ještě vyšší účinností, efektivitou a/nebo selektivitou.

V souvislosti s předkládaným vynálezem je třeba zmínit sloučeniny popsané vzorcem (viz. Struktura 3), které modulují receptory anorganických iontů:



Struktura 3 ,

kde Ar₅ je buď naftyl nebo fenyl, který může být substituován 0 až 5 substituenty. Každý z těchto substituentů může být nezávisle na všech ostatních vybrán ze skupiny tvořené nižšími alkyly, halogeny, skupinami odvozenými od nižších alkyloxy sloučenin, nižšími thioalkyly, methylenedioxy skupinou, nižšími halogenalkyly, skupinami odvozenými od nižších halogenalkyloxy sloučenin, OH, CH₂OH, CONH₂, CN, acetyloxy skupinou, benzylovou skupinou, benzyloxy skupinou, α,α-dimethylbenzylovou skupinou, acetylovou skupinou, ethylendioxy skupinou a skupinou -CH=CH-fenyl;

Ar₆ je buď naftyl nebo fenyl, který může být substituován 0 až 5 substituenty. Každý z těchto substituentů může být nezávisle na všech ostatních vybrán ze skupiny tvořené acetylovou skupinou, nižšími alkyly, halogeny, skupinami odvozenými od nižších alkyloxy sloučenin, nižšími thioalkyly, methylenedioxy skupinou, nižšími halogenalkyly, skupinami odvozenými od nižších halogenalkyloxy sloučenin, OH, CH₂OH, CONH₂, CN, karbomethoxy skupinou, OCH₂C(O)C₂H₅ a acetyloxy skupinou;

R₁₁ je buď vodík nebo methyl; a

R₁₂ je buď vodík nebo methyl.

Dále vynález popisuje farmaceutické kompozice tvořené sloučeninou modulující receptory anorganických iontů podle vynálezu a fyziologicky přijatelným nosičem. Termínem „farmakologická (farmaceutická) kompozice“ rozumíme kompozici ve formě vhodné k administraci do organismu savců, výhodněji pak do lidského organismu. Ve výhodném provedení vynálezu obsahuje farmaceutická kompozice (ve formě vhodné pro farmaceutické použití) dostatečné množství sloučeniny modulující aktivitu receptorů pro vápník, která je terapeuticky účinná v lidském organismu.

Ze stavu techniky jsou dobře známy vlastnosti, na které je třeba brát ohled při tvorbě kompozic vhodných pro administraci do organismu. Mezi tyto vlastnosti řadíme toxické účinky, rozpustnost, způsob podávání (administrace) a zachování aktivity. Farmakologická kompozice aplikovaná nitrožilně by například měla být rozpustná.

Termínem „farmaceutická kompozice“ označujeme rovněž farmaceuticky přijatelné soli (například soli získané přidáním kyseliny) a jejich komplexy. Příprava takovýchto solí může u daných sloučenin usnadnit jejich farmakologické použití tím, že u těchto sloučenin dojde (bez jakéhokoliv ovlivnění fyziologických účinků) ke změně jejich fyzikálních vlastností.

Dále vynález popisuje postupy sloužící k léčbě pacientů, při kterých jsou k modulaci aktivity receptorů anorganických iontů používány sloučeniny modulující aktivitu receptorů anorganických iontů podle vynálezu. Postupy se týkají administrace farmaceutické kompozice obsahující terapeuticky účinné množství sloučeniny modulující aktivitu receptorů anorganických iontů do organismu pacienta. Ve výhodném provedení vynálezu je onemocnění nebo porucha léčena pomocí modulace aktivity receptorů pro vápník za použití terapeuticky účinného množství sloučeniny modulující aktivitu receptorů pro vápník v organismu pacienta.

K léčbě pacientů mohou být použity sloučeniny modulující aktivitu receptorů anorganických iontů a rovněž mohou být použity kompozice obsahující tyto sloučeniny. Termínem „pacient“ označujeme savce, pro jehož organizmus bude modulace receptorů anorganických iontů prospěšná. Pacienti, kteří potřebují léčbu při níž se využívá modulace aktivity receptorů anorganických iontů, mohou být identifikováni pomocí standardních, odborníkům známých, postupů.

Ve výhodném provedení vynálezu je pacientem člověk, který má nemoc nebo poruchu popsanou jednou nebo více z následujících charakteristik: (1) abnormální homeostázu anorganických iontů, výhodněji pak abnormální homeostázu vápníku; (2) abnormální množství poslů, jejichž tvorba nebo sekrece jsou ovlivněny aktivitou receptorů anorganických iontů, výhodněji pak aktivitou receptorů pro vápník; a (3) abnormální hladinou nebo aktivitou poslů, jejichž činnost je ovlivněna aktivitou receptorů anorganických iontů, výhodněji pak aktivitou receptorů pro vápník.

Mezi nemoci charakterizované abnormální homeostázou vápníku patří hyperparathyreóza, osteoporéza a další poruchy kostí nebo poruchy spojené s metabolismem anorganických látek a rovněž další podobná onemocnění (tak jak jsou popsána například ve standardních lékařských příručkách jako například v „Harrison's Principles of Internal Medicine“). Taková onemocnění jsou léčena za použití sloučenin modulujících aktivitu receptorů pro vápník. Tyto sloučeniny na receptorech pro vápník buď mimikují nebo blokují jeden nebo více z účinků extracelulárních Ca^{2+} a přímo nebo nepřímo tudíž v organizmu pacienta ovlivňují hladinu proteinů nebo jiných sloučenin.

Termínem „terapeuticky účinné množství“ rozumíme takové množství sloučeniny, které v organizmu pacienta do určité míry zmírní jeden nebo více symptomů provázejících danou nemoc nebo poruchu. Termínem „terapeuticky účinné množství“ rovněž rozumíme takové množství sloučeniny, které v organizmu pacienta částečně nebo úplně znormalizuje jeden nebo více fyziologických nebo biochemických parametrů, které jsou spojené s nemocí nebo poruchou nebo které jsou příčinou tohoto onemocnění či poruchy.

Ve výhodném provedení vynálezu trpí pacient nemocí nebo poruchou charakterizovanou abnormální hladinou jedné nebo více komponent regulovaných aktivitou receptorů pro vápník a sloučenina účinně ovlivňuje receptory pro vápník přítomné na buňkách ze skupiny: buňky příštinných tělísek, osteoklasty kostní tkáně, juxtaglomerulární ledvinné buňky, buňky proximálního tubulu ledvin, buňky distálního tubulu ledvin, buňky centrálního nervového systému, buňky periferního nervového systému, buňky tlustého úseku vzestupného ramínka Henleovy kličky a/nebo buňky sběrného kanálku, keratinocyty přítomné v epidermis, parafolikulární buňky štítné žlázy (C-buňky), buňky střeva, krevní destičky, buňky hladké svaloviny cév, buňky srdečních síní, buňky sekretující gastrin, buňky sekretující glukagon, buňky mezangia ledvin, buňky mléčné žlázy, beta buňky, tukové buňky/buňky tukové tkáně, buňky imunitního systému, buňky gastrointestinálního traktu, buňky pokožky, buňky nadledvinek, buňky hypofýzy, buňky hypothalamu a buňky subfornikálního orgánu.

Ve výhodném provedení vynálezu se jedná o buňky ze skupiny: buňky příštinných tělísek, buňky centrálního nervového systému, buňky periferního nervového systému, buňky tlustého úseku vzestupného ramínka Henleovy kličky a/nebo buňky sběrného kanálku, parafolikulární buňky štítné žlázy (C-buňky), buňky střeva, buňky gastrointestinálního traktu, buňky hypofýzy, buňky hypothalamu a buňky subfornikálního orgánu.

Ve výhodném provedení vynálezu je sloučenina kalcimimetikem, účinně ovlivňuje receptory pro vápník přítomné na buňkách příštinných tělísek a tím snižuje v organizmu pacienta hladinu sérového parathormonu. Ve výhodnějším provedení vynálezu je hladina sérového parathormonu v organizmu pacienta snížena tak výrazně, že toto snížení zapříčiní snížení koncentrace Ca^{2+} v plazmě. V nejvýhodnějším provedení vynálezu je hladina parathormonu v séru snížena na úroveň typickou pro zdravého jedince.

V jiném výhodném provedení vynálezu je sloučenina kalcilytikem, účinně ovlivňuje receptory pro vápník přítomné na buňkách příštitných tělísek a tím zvyšuje v organismu pacienta hladinu sérového parathormonu. Ve výhodnějším provedení vynálezu je hladina sérového parathormonu v organismu pacienta zvýšena tak výrazně, že toto zvýšení způsobí zvýšení hustoty kostní tkáně pacienta.

Pacienti vyžadující takovou léčbu mohou být identifikováni pomocí standardních technik používaných v lékařství, jakými jsou například analýza krve nebo moči. Identifikace může být například provedena prostřednictvím detekce nepřítomnosti proteinu, jehož produkce nebo sekrece je ovlivněna změnami v koncentracích anorganických iontů nebo prostřednictvím detekce abnormálních hladin anorganických iontů nebo hormonů, které ovlivňují homeostázu anorganických iontů.

V aplikaci jsou uvedeny nejrůznější příklady. Záměrem zde uvedených příkladů není nikterak omezit využití vynálezu.

Další aspekty a výhody vynálezu budou zřejmé z následujících obrázků, podrobného popisu vynálezu, příkladů a nároků.

20

Stručný popis obrázků

Obrázky 1a až 1r znázorňují struktury jednotlivých sloučenin výše popsanych struktur.

Obrázky 2 a 3 poskytují souhrnné údaje o fyzikálních vlastnostech hydrochloridů NPS R-467, respektive NPS R-568. Na obrázku je znázorněna struktura molekuly, body tání, optická otáčivost a další spektroskopické údaje.

Na obrázcích 4 až 95 jsou některé sloučeniny blíže charakterizovány na základě svých hmotnostních spekter.

Obrázky 96 až 131 zobrazují údaje získané pomocí NMR spektroskopie.

Popis výhodných provedení vynálezu

Vynález popisuje sloučeniny, které jsou schopny modulovat jednu nebo více aktivit receptorů anorganických iontů, a ve výhodném provedení vynálezu sloučeniny, které mohou na buňce nesoucí receptory anorganických iontů mimikovat nebo blokovat účinky příslušného extracelulárního iontu. Ve výhodnějším provedení vynálezu je pak zmíněným extracelulárním iontem iont Ca^{2+} a daná sloučenina je účinná při mimikování/blokování účinků Ca^{2+} u buněk nesoucích receptory pro vápník. Mezi publikace, které se zabývají problematikou aktivity vápníku, receptorů pro vápník a/nebo sloučenin modulujících aktivitu receptorů pro vápník patří: Brown a další, Nature 366: 574, 1993; Nemeth a další, PCT/US93/01642, Mezinárodní publikace WO 94/18959; Nemeth a další, PCT/US92/07175, Mezinárodní publikace WO 93/04373; Shoback a Chen, J. Bone Mineral Res. 9:293, 1994; a Racke a další, FEBS Lett. 333: 132, 1993. Tyto citace nemusí zahrnovat nejnovější poznatky uskutečněné v průběhu posledních let.

I. Receptory pro vápník

Receptory pro vápník jsou přítomné na různých druzích buněk a na odlišných druzích buněk mohou mít také rozdílné aktivity. Farmakologické účinky níže vyjmenovaných buněk (při reakci na přítomnost vápníku) jsou v souladu s aktivitou receptorů pro vápník exprimovaných na jejich povrchu. Mezi tyto buňky patří: buňky příštitných tělísek, osteoklasty kostní tkáně, juxtaglomerulární ledvinové buňky, buňky proximálního tubulu ledvin, buňky distálního tubulu ledvin, buňky

centrálního nervového systému, buňky periferního nervového systému, buňky tlustého úseku vzestupného ramínka Henleovy kličky a/nebo buňky sběrného kanálku, keratinocyty přítomné v epidermis, parafolikulární buňky štítné žlázy (C-buňky), buňky střeva, krevní destičky, buňky hladké svaloviny cév, buňky srdečních síní, buňky sekretující gastrin, buňky sekretující glukagon, buňky mezangia ledvin, buňky mléčné žlázy, beta buňky, tukové buňky/buňky tukové tkáně, buňky imunitního systému, buňky gastrointestinálního traktu, buňky pokožky, buňky nadledvinek, buňky hypofýzy, buňky hypothalamu a buňky subfornikálního orgánu.

Přítomnost receptorů pro vápník byla navíc potvrzena fyzikálními daty u následujících buněk: buňky příštítných tělísek, buňky centrálního nervového systému, buňky periferního nervového systému, buňky tlustého úseku vzestupného ramínka Henleovy kličky a/nebo buňky sběrného kanálku, parafolikulární buňky štítné žlázy (C-buňky), buňky střeva, buňky gastrointestinálního traktu, buňky hypofýzy, buňky hypothalamu a buňky subfornikálního orgánu.

Na těchto buňkách různých druhů mohou být přítomny receptory pro vápník rozdílného typu. Je rovněž možné, že na buňkách jednoho druhu je přítomno více typů receptorů pro vápník. Srovnání aktivit receptorů pro vápník získaných z jednotlivých druhů buněk a jejich aminokyselinových sekvencí naznačuje, že existují rozdílné typy receptorů pro vápník. Receptory pro vápník mohou například reagovat na přítomnost různých dvojmocných a trojmocných kationtů. Receptory pro vápník přítomné na buňkách příštítných tělísek reagují na přítomnost vápníku a Gd^{3+} , zatímco osteoklasty reagují na přítomnost dvojmocných kationtů jako například Ca^{2+} , ale nereagují na přítomnost Gd^{3+} . Receptory pro vápník přítomné na buňkách příštítných tělísek jsou tudíž z farmakologického hlediska odlišné od receptorů pro vápník přítomných na osteoklastech.

Nukleotidové sekvence nukleových kyselin kódujících receptory pro vápník přítomné na buňkách příštítných tělísek a nikoliv na C-buňkách na druhé straně naznačují, že tyto receptory mají velmi podobné aminokyselinové složení. Kalcimimetické sloučeniny nicméně vykazují u buněk příštítných tělísek jiné farmakologické účinky a regulují jiné aktivity než u C-buněk. Farmakologické vlastnosti receptorů pro vápník se tedy v závislosti na druhu buněk nebo orgánu, na kterém jsou exprimovány, mohou podstatně lišit, ačkoli tyto receptory mohou mít podobnou nebo identickou strukturu.

Receptory pro vápník mají obecně nízkou afinitu k extracelulárním Ca^{2+} (zdanlivé konstanty K_d jsou obvykle větší než 0,5 mM). Receptory pro vápník mohou vázat jak volný tak navázaný efektor mechanismem definovaným v práci Cooper, Bloom a Roth, „The Biochemical Basis of Neuropharmacology“, kapitola 4, a liší se tudíž od intracelulárních receptorů pro vápník, jakými jsou například kalmodulin nebo troponiny.

Receptory pro vápník reagují na změny v hladině extracelulárního vápníku. Tyto reakce jsou závislé na typu receptoru a na buněčné linii, na jejímž povrchu je receptor exprimován. Například v experimentech prováděných in vitro na buňkách příštítných tělísek reagovaly receptory pro vápník na změny v koncentraci vápníku následovně:

1. Zvýšením hladiny vápníku uvnitř buněk. Toto zvýšení je způsobeno vnikáním vápníku z vnějšího prostředí a/nebo mobilizací zdrojů vápníku uvnitř buňky. Pro zvýšení hladiny vápníku uvnitř buněk je charakteristické:

(a) Zvýšení $[Ca^{2+}]_i$ je rychlé (s maximální odezvou v čase < 5 sekund) a přechodné a není možné jej inhibovat přidávkou 1 μM La^{3+} nebo přidávkou 1 μM Gd^{3+} , ale je naopak inhibováno předběžným působením ionomycinem (v nepřítomnosti extracelulárních Ca^{2+});

(b) Zvýšení není inhibováno přítomností dihydropyridinů;

(c) Přechodné zvýšení je inhibováno předběžným působením 10 mM fluoridu sodného po dobu 10 minut;

(d) Přechodné zvýšení je negativně ovlivněno předchozím působením aktivátoru protein kinázy C (PKC), jakými jsou například octan esteru forbolu s kyselinou myristilovou (PMA), mezerin nebo (-) -indolaktam V. Výsledným efektem působení aktivátoru protein kinázy C je posun křivky znázorňující změnu v koncentraci vápníku při reakci na změnu extracelulární koncentrace Ca^{2+} doprava, bez ovlivnění maximální dosažené hodnoty; a

(e) Zvýšení není ovlivněno předběžným působením toxinem produkovaným mikroorganizmem *Bordetella pertussis* (100 mg/ml po dobu delší než 4 hodiny).

2. Rychlé (< 30 sekund) zvýšení tvorby inositol-1, 4, 5 - trifosfátu a diacylglycerolu. Zvýšení není ovlivněno předběžným působením toxinem produkovaným mikroorganizmem *Bordetella pertussis* (100 mg/ml po dobu delší než 4 hodiny);

3. Inhibice tvorby cyklického AMP vyvolané působením dopaminu a izoproterenolu. Tato inhibice je blokována předběžným působením toxinem produkovaným mikroorganizmem *Bordetella pertussis* (100 mg/ml po dobu delší než 4 hodiny); a

4. Inhibice sekrece PTH. Tato inhibice je blokována předběžným působením toxinem produkovaným mikroorganizmem *Bordetella pertussis* (100 mg/ml po dobu delší než 4 hodiny).

Účinky vápníku na receptory pro vápník přítomné na jiných druzích buněk mohou být snadno stanoveny za použití postupů známých ze stavu techniky. Tyto účinky mohou být, co se týká zvýšení koncentrace vápníku uvnitř buněk, podobné účinkům pozorovaným u buněk příštinných tělísek. Předpokládá se nicméně, že tyto účinky se budou v dalších aspektech u jiných druhů buněk lišit. Odlišné bude například ovlivnění (spuštění nebo inhibice) uvolňování jiných hormonů než je parathormon.

II. Sloučeniny modulující receptory anorganických iontů

Sloučeniny modulující receptory anorganických iontů modulují jednu nebo více aktivit receptorů anorganických iontů. Ve výhodném provedení vynálezu patří sloučeniny modulující receptory pro vápník mezi kalcimimetika nebo kalcilytika.

Sloučeniny modulující receptory anorganických iontů mohou být identifikovány prostřednictvím screeningu sloučenin, které jsou vytvořeny modifikací struktury, která vykazuje příslušnou modulační aktivitu (to jest sloučenina základní struktury).

Výhodnou metodou pro měření aktivity receptoru pro vápník je měření změn v $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Změny v $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mohou být měřeny prostřednictvím nejrůznějších technik jakými jsou například použití buněčné linie HEK 293 nasycené indikátorem fura-2, která je transdukovaná nukleovou kyselinou, a která na svém povrchu exprimuje receptor pro vápník lidských příštinných tělísek. Jinou použitelnou technikou je detekce zvýšení proudu iontů Cl^- v oocytech rodu *Xenopus*, které jsou transformované nukleovou kyselinou kódující receptor pro vápník. (Nemeth a další, PCT/US93/01642, Mezinárodní publikace WO 94/18959). mRNA s poly(A) sekvencí může být například získána z buněk exprimujících receptor pro vápník. Mezi takové buňky patří například buňky příštinných tělísek, osteoklasty kostní tkáně, juxtaglomerulární ledvinné buňky, buňky proximálního tubulu ledvin, buňky distálního tubulu ledvin, buňky centrálního nervového systému, buňky periferního nervového systému, buňky tlustého úseku vzestupného ramínka Henleovy kličky a/nebo buňky sběrného kanálku, keratinocyty přítomné v epidermis, parafolikulární buňky štítné žlázy (C-buňky), buňky střeva, krevní destičky, buňky hladké svaloviny cév, buňky srdečních síní, buňky sekretující gastrin, buňky sekretující glukagon, buňky mezangia ledvin, buňky mléčné žlázy, beta buňky, tukové buňky/buňky tukové tkáně, buňky imunitního systému, buňky gastrointestinálního traktu, buňky pokožky, buňky nadledvinek, buňky hypofýzy, buňky hypothalamu a buňky subfornikálního orgánu. Ve výhodném provedení vynálezu je nukleová kyselina

získána z buněk příštítných tělísek, C-buněk nebo osteoklastů. Ještě výhodněji kóduje tato nukleová kyselina receptor pro vápník a je přítomná v plazmidu nebo ve vektoru.

5 Ve výhodném provedení vynálezu je sloučenina modulující receptory pro vápník kalcimimetikem a tato sloučenina in vivo inhibuje resorpci kostní tkáně uskutečňovanou činností osteoklastů; in vitro inhibuje resorpci kostní tkáně uskutečňovanou činností osteoklastů; in vivo nebo in vitro stimuluje u C-buněk sekreci kalcitoninu; in vitro inhibuje u buněk příštítných tělísek sekreci parathormonu a in vivo snižuje sekreci PTH; in vivo zvyšuje hladinu kalcitoninu; in vitro blokuje resorpci kostní tkáně uskutečňovanou činností osteoklastů a in vivo inhibuje resorpci kostní
10 tkáně.

V jiném výhodném provedení vynálezu je sloučenina modulující receptor pro vápník kalcilytikem a tato sloučenina vyvolává in vitro u buněk příštítných tělísek sekreci parathormonu a zvyšuje hladinu parathormonu in vivo.

15 Ve výhodném provedení vynálezu daná sloučenina selektivně ovlivňuje aktivitu receptorů anorganických iontů, výhodněji aktivitu receptoru pro vápník, exprimovaných na určitém druhu buněk. Termínem „selektivně“ rozumíme skutečnost, že daná sloučenina je při dané koncentraci účinnější při ovlivnění aktivity receptorů anorganických iontů na jednom druhu buněk než na
20 jiném druhu buněk. Ve výhodném provedení vynálezu je rozdíl v účinku desetinásobný nebo větší. Ve výhodném provedení vynálezu se jako koncentrace uvažuje koncentrace dané sloučeniny v krevní plazmě a měřeným účinkem je produkce extracelulárních posílů, jako například plazmatického kalcitoninu, parathormonu nebo plazmatického vápníku. Ve výhodném provedení vynálezu daná sloučenina například selektivně ovlivňuje sekreci PTH (pozitivní ovlivnění)
25 a nemá naopak vliv na sekreci kalcitoninu.

V jiném výhodném provedení vynálezu má daná sloučenina pro jeden nebo více (ale ne pro všechny) druhů buněk hodnoty konstant EC_{50} nebo IC_{50} nižší než nebo rovny $5 \mu M$. Buňky jsou vybrány ze skupiny: buňky příštítných tělísek, osteoklasty kostní tkáně, juxtaglomerulární ledvin-
30 né buňky, buňky proximálního tubulu ledvin, buňky distálního tubulu ledvin, buňky centrálního nervového systému, buňky periferního nervového systému, buňky tlustého úseku vzestupného ramínka Henleovy kličky a/nebo buňky sběrného kanálku, keratinocyty přítomné v epidermis, parafolikulární buňky štítné žlázy (C-buňky), buňky střeva, krevní destičky, buňky hladké svaloviny cév, buňky srdečních síní, buňky sekretující gastrin, buňky sekretující glukagon, buňky
35 mezangia ledvin, buňky mléčné žlázy, beta buňky, tukové buňky/buňky tukové tkáně, buňky imunitního systému, buňky gastrointestinálního traktu, buňky pokožky, buňky nadledvinek, buňky hypofýzy, buňky hypothalamu a buňky subfornikálního orgánu. Ve výhodném provedení vynálezu se jedná o buňky ze skupiny: buňky příštítných tělísek, buňky centrálního nervového systému, buňky periferního nervového systému, buňky tlustého úseku vzestupného ramínka
40 Henleovy kličky a/nebo buňky sběrného kanálku, parafolikulární buňky štítné žlázy (C-buňky), buňky střeva, buňky gastrointestinálního traktu, buňky hypofýzy, buňky hypothalamu a buňky subfornikálního orgánu. U skupiny zmíněných buněk byla přítomnost receptoru pro vápník potvrzena měřeními jakými jsou například hybridizace in situ nebo značení pomocí protilátek.

45 Ve výhodném provedení vynálezu mimikují nebo blokují sloučeniny modulující aktivitu receptorů anorganických iontů u buněk, které exprimují příslušný receptor anorganických iontů, účinky extracelulárních iontů. To znamená, že tyto sloučeniny mohou být terapeuticky účinné. Sloučeniny modulující aktivitu receptorů anorganických iontů mohou mít na buňky s odlišnou morfologií receptorů anorganických iontů (to znamená, že buňky exprimují „normální“ receptory anorganických iontů, „normální“ počet receptorů anorganických iontů, abnormální receptory anorganických iontů a abnormální počet receptorů anorganických iontů) stejné nebo rozdílné účinky.
50

Ve výhodném provedení vynálezu blokují nebo mimikují sloučeniny modulující aktivitu receptorů pro vápník u buněk, které exprimují receptory pro vápník, veškeré účinky extracelulárních vápenatých iontů. Nicméně není nezbytné, aby kalcimimetika nesla všechny aktivity příslušející
55

extracelulárním Ca^{2+} . Obdobně není potřeba, aby kalcilytika blokovala všechny aktivity vyvolané přítomností extracelulární vápníku. Dále rovněž platí, že proto, aby mohla být účinná, nemusí se různá kalcimimetika a různá kalcilytika na receptorech pro vápník vázat do stejného místa, do něhož se vážou extracelulární Ca^{2+} .

5

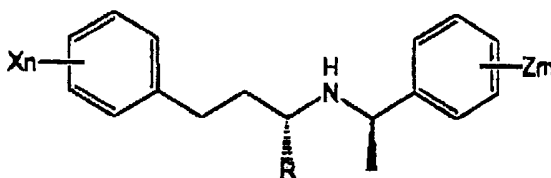
Sloučeniny modulující aktivitu receptorů anorganických iontů nemusí ovlivňovat aktivitu receptorů anorganických iontů v tom samém rozsahu nebo tím samým způsobem, jakým je ovlivňují jejich přirozené ligandy. Například kalcimimetika mohou ovlivňovat aktivitu receptorů pro vápník v jiném rozsahu a jinak dlouhou dobu tím, že se vážou do jiného vazebného místa receptoru pro vápník, než je tomu u vápenatých iontů, nebo že mají ve srovnání s vápenatými ionty k receptorům pro vápník jinou afinitu.

10

A. Kalcimimetika

15 Sloučeniny znázorněné Strukturou 1

Předkládaný vynález poskytuje diaromatickou sloučeninu obecného vzorce



kde R je atom vodíku nebo methylová skupina;

20

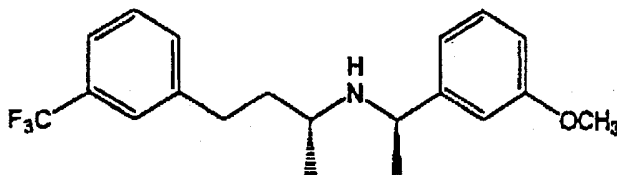
m a n znamenají nezávisle na sobě celé číslo od 0 do 5;

každá skupina X je nezávisle halogenmethylová skupina nebo halogenalkoxyskupina obsahující 1 až 4 uhlíkové atomy a

25

každá skupina Z je nezávisle alkokyskupina obsahující 1 až 4 uhlíkové atomy, nebo její farmaceuticky přijatelnou sůl nebo její komplex.

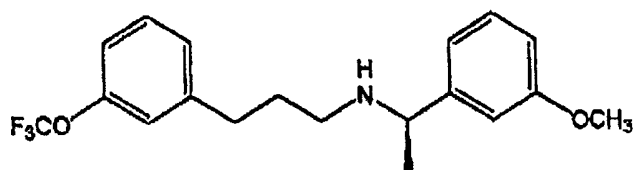
Předkládaný vynález dále poskytuje diaromatickou sloučeninu vzorce



30

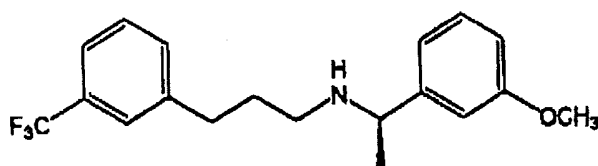
nebo její farmaceuticky přijatelnou sůl nebo její komplex.

Předkládaný vynález dále poskytuje diaromatickou sloučeninu vzorce

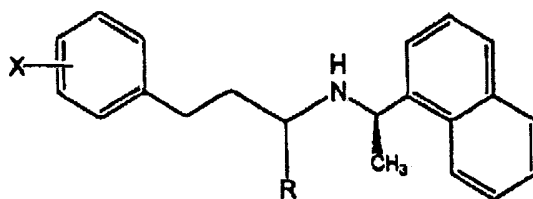


nebo její farmaceuticky přijatelnou sůl nebo její komplex.

- 5 Předkládaný vynález dále poskytuje diaromatickou sloučeninu vzorce



Předkládaný vynález dále poskytuje diaromatickou sloučeninu obecného vzorce



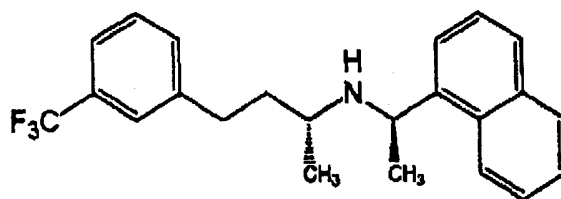
kde X je trihalogenmethylová skupina nebo trihalogenmethoxyskupina; a

10

R je -H nebo skupina -CH₃;

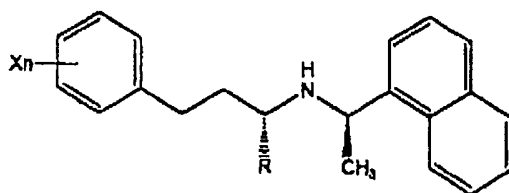
nebo její farmaceuticky přijatelnou sůl nebo její komplex.

- 15 Předkládaný vynález dále poskytuje diaromatickou sloučeninu vzorce



nebo její farmaceuticky přijatelnou sůl nebo její komplex.

Předkládaný vynález dále poskytuje diaromatickou sloučeninu obecného vzorce



kde R znamená buď atom vodíku nebo methylovou skupinu;

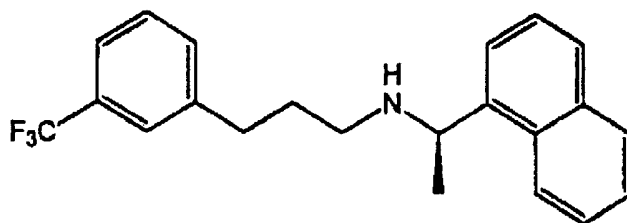
5 n je celé číslo od 0 do 5; a

X je nezávisle trihalogenmethylová skupina,

nebo její farmaceuticky přijatelnou sůl nebo její komplex.

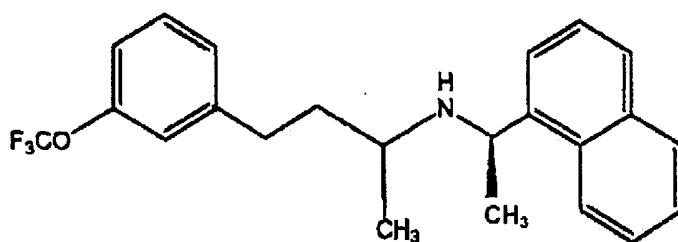
10

Předkládaný vynález dále poskytuje diaromatickou sloučeninu vzorce



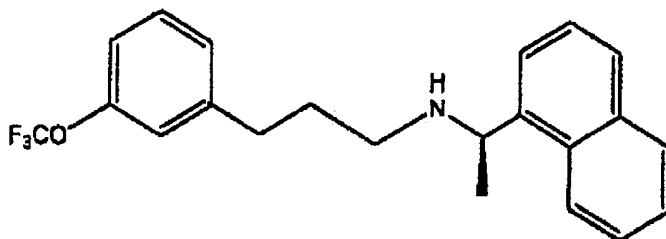
nebo její farmaceuticky přijatelnou sůl nebo její komplex.

15 Předkládaný vynález dále poskytuje diaromatickou sloučeninu vzorce



nebo její farmaceuticky přijatelnou sůl nebo její komplex.

Předkládaný vynález dále poskytuje diaromatickou sloučeninu vzorce



20

nebo její farmaceuticky přijatelnou sůl nebo její komplex.

Termínem „halogenalkyl“ označujeme alkyl substituovaný alespoň jedním halogenem. Ve výhodném provedení vynálezu je halogenem substituován pouze koncový uhlíkový atom halogenalkylu a počet atomů halogenů přítomných na tomto uhlíku se pohybuje v rozmezí 1 až 3. Ve výhodném provedení vynálezu jsou jako substituenty použity Cl nebo F.

Termínem „halogenalkoxy“ označujeme „O–halogenalkyl“, kde „O“ je atom kyslíku připojený k nižšímu halogenalkylu.

Ve výhodném provedení je skupina X vázána k fenylové skupině v poloze 3.

Do této skupiny patří i sloučeniny znázorněné Strukturou 3.

Kalcimimetická aktivita

Schopnost sloučenin mimikovat na receptorech pro vápník účinky Ca^{2+} může být stanovena za použití postupů známých ze stavu techniky. Tyto postupy jsou popsány v Nemeth a další, PCT/US93/01642, Mezinárodní publikace WO 94/18959. Kalcimimetika mají například při testování in vitro na buňkách příslušných tělísek jednu nebo více a ve výhodném provedení vynálezu všechny z následujících aktivit:

1. Sloučenina způsobuje rychlé (s maximální odezvou v čase menším než 5 sekund) a přechodné zvýšení koncentrace extracelulárního vápníku a toto zvýšení koncentrace extracelulárního vápníku není možné inhibovat přidavkem $1 \mu\text{M}$ La^{3+} nebo přidavkem $1 \mu\text{M}$ Gd^{3+} . Zvýšená $[\text{Ca}^{2+}]_i$ přetrvává i v nepřítomnosti extracelulárních Ca^{2+} , ale je inhibována předběžným působením ionomycinem (v nepřítomnosti extracelulárních Ca^{2+});
2. Sloučenina umocňuje zvýšení $[\text{Ca}^{2+}]_i$, které je vyvoláno působením extracelulárních Ca^{2+} v koncentracích, které nevedou k maximální odezvě;
3. Zvýšení $[\text{Ca}^{2+}]_i$ vyvolané přítomností extracelulárních Ca^{2+} není inhibováno prostřednictvím dihydropyridinů;
4. Přechodné zvýšení $[\text{Ca}^{2+}]_i$ způsobené účinkem dané sloučeniny je inhibováno předběžným působením 10 mM fluoridu sodného po dobu 10 minut;
5. Přechodné zvýšení $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zapříčiněné působením dané sloučeniny je negativně ovlivněno předchozím působením aktivátoru protein kinázy C (PKC), jakými jsou například octan esteru forbolu s kyselinou myristilovou (PMA), mezerin nebo (–) –indolaktam. V. Výsledným efektem působení aktivátoru protein kinázy C je posun křivky znázorňující změnu v koncentraci vápníku při reakci na změnu extracelulární koncentrace Ca^{2+} doprava, bez ovlivnění maximální dosažené hodnoty;
6. Daná sloučenina způsobuje rychlé (< 30 sekund) zvýšení tvorby inositol–1,4,5–trifosfátu a diacylglycerolu;
7. Daná sloučenina inhibuje tvorbu cyklického AMP vyvolanou působením dopaminu a izoproterenolu;
8. Daná sloučenina inhibuje sekreci PTH;
9. Předběžné působení toxinem produkovaným mikroorganizmem Bordetella pertussis (100 mg/ml po dobu delší než 4 hodiny) blokuje inhibiční účinky sloučeniny na tvorbu cyklického AMP, ale neovlivňuje zvýšení $[\text{Ca}^{2+}]_i$, zvýšení tvorby inositol–1,4,5–trifosfátu nebo diacylglycerolu a nesnižuje sekreci PTH;

10. Daná sloučenina vyvolává v oocytech rodu *Xenopus*, které jsou injikovány obohacenou frakcí polyadenylované mRNA z buněk lidských příštinných tělísek nebo z buněk příštinných tělísek skotu, zvýšení toku Cl^- . Daná sloučenina však nemá žádný vliv na oocyty rodu *Xenopus* injikované vodou nebo mRNA izolovanou z jater; a
11. Podobně při použití klonovaného receptoru pro vápník získaného z buněk příštinných tělísek vyvolává daná sloučenina u oocytů rodu *Xenopus* injikovaných specifickou cDNA nebo mRNA kódující receptor pro vápník příslušnou reakci.

Za použití dostupných technik mohou být měřeny rozdílné účinky vápníku (viz. Nemeth a další, PCT/US93/01642, Mezinárodní publikace WO 94/18959). Podobné definice pro sloučeniny, které mimikují účinky Ca^{2+} na jiných druzích buněk reagujících na přítomnost vápenatých iontů, výhodněji pak které mimikují účinky Ca^{2+} na receptorech přítomných na těchto buňkách, jsou zřejmé z příkladů a z článku Nemeth a další, PCT/US93/01642, Mezinárodní publikace WO 94/18959.

Ve výhodném provedení vynálezu má daná sloučenina jeden nebo více a ve výhodnějším provedení vynálezu všechny z následujících aktivit (tyto aktivity jsou měřeny pomocí popisovaných biostanovení nebo v článku Nemeth a další, PCT/US93/01642, Mezinárodní publikace WO 94/18959): vyvolává přechodné zvýšení hladiny intracelulárního vápníku, které má dobu trvání kratší než 30 sekund (ve výhodném provedení vynálezu je toto zvýšení způsobeno mobilizací rezerv intracelulárního vápníku); vyvolává rychlé zvýšení $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ke kterému dojde během 30 sekund; vyvolává dlouhodobé zvýšení (doba trvání delší než 30 sekund) $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (ve výhodném provedení vynálezu je toto zvýšení způsobeno vníkaním vápníku z okolního prostředí); vyvolává zvýšení hladiny inositol-1,4,5-trifosfátu a diacylglycerolu, ke kterému dojde ve výhodném provedení vynálezu v časovém úseku kratším než 60 sekund; a inhibuje tvorbu cyklického AMP vyvolanou působením dopaminu a izoproterenolu.

Ve výhodném provedení vynálezu je přechodné zvýšení $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zrušeno předběžným působením 10 mM fluoridu sodného po dobu 10 minut nebo je přechodné zvýšení $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sníženo krátkým předběžným působením (ne delším než 10 minut) aktivátoru protein kinázy C (PKC), jakými jsou například octan esteru forbolu s kyselinou myristilovou (PMA), mezerein nebo (-)-indolaktam V.

B. Kalcilytika

Schopnost sloučenin blokovat na receptorech pro vápník účinky Ca^{2+} může být stanovena za použití standardních postupů založených na objevech známých ze stavu techniky. (Viz například Nemeth a další, PCT/US93/01642, Mezinárodní publikace WO 94/18959). Sloučeniny, které blokují účinky extracelulárního vápníku mají například při testování in vitro na buňkách příštinných tělísek jednu nebo více a ve výhodném provedení vynálezu všechny z následujících aktivit:

1. Daná sloučenina buď částečně nebo úplně blokuje účinky zvýšené koncentrace extracelulárních Ca^{2+} . Zvýšená koncentrace Ca^{2+} by jinak zapříčinila:

(a) zvýšení $[\text{Ca}^{2+}]_i$,

(b) mobilizaci intracelulárních Ca^{2+} ,

(c) zvýšení tvorby inositol-1,4,5-trifosfátu,

(d) snížení tvorby cyklického AMP vyvolané působením dopaminu a izoproterenolu a

(e) inhibici sekrece PTH;

2. Daná sloučenina blokuje v oocytech rodu *Xenopus*, které jsou injikovány obohacenou frakcí polyadenylované mRNA z buněk lidských příštítných tělísek nebo z buněk příštítných tělísek skotu, zvýšení toku Cl^- , které je vyvolané působením extracelulárních Ca^{2+} nebo kalcimimetických sloučenin. Daná sloučenina však nemá žádný vliv na oocyty rodu *Xenopus* injikované vodou nebo mRNA izolovanou z jater;

3. Podobně daná sloučenina blokuje u oocytů rodu *Xenopus* injikovaných specifickou cDNA, mRNA nebo cRNA kódující receptor pro vápník odpověď vyvolanou působením extracelulárních Ca^{2+} nebo kalcimimetických sloučenin (při použití klonovaného receptoru pro vápník získaného z buněk příštítných tělísek).

Podobné definice pro sloučeniny, které blokují účinky Ca^{2+} na jiných druzích buněk reagujících na přítomnost vápenatých iontů, výhodněji pak které blokují účinky Ca^{2+} na receptorech přítomných na těchto buňkách, jsou zřejmé z uvedených příkladů a z článku Nemeth a další, PCT/US93/01642, Mezinárodní publikace WO 94/18959.

III. Léčba nemocí a poruch

V současnosti jsou známa onemocnění a poruchy, které mohou být léčeny pomocí modulační aktivity receptorů pro vápník. Onemocnění a poruchy, které mohou být léčeny pomocí modulační aktivity receptorů pro vápník, mohou být například identifikovány na základě funkčních odpovědí buněk, které jsou regulovány aktivitou receptorů pro vápník. Mezi funkční odpovědi buněk, které jsou regulovány aktivitou receptorů pro vápník, v současnosti dobře známé, patří sekrece PTH prostřednictvím buněk příštítných tělísek, sekrece kalcitoninu prostřednictvím C-buněk a resorpce kostní tkáně osteoklasty.

Takové funkční odpovědi jsou svázány s výskytem různých nemocí a poruch. Například hyperparathyreóza má za následek zvýšení hladiny PTH v krevní plazmě. Snížení hladiny plasmatického PTH je tedy účinným prostředkem, k léčbě hyperparathyreózy. Podobně zvýšená hladina kalcitoninu v plazmě je spojena s inhibicí resorpce kostní tkáně. Inhibice resorpce kostní tkáně je účinnou léčbou osteoporózy. Z toho vyplývá, že modulační aktivity receptorů pro vápník může být využito k léčbě nemocí jako například hyperparathyreózy a osteoporózy.

Sloučeniny, které moduluji aktivitu receptorů anorganických iontů a ve výhodném provedení vynálezu pak aktivitu receptorů pro vápník, mohou být prospěšné při použití u pacientů, kteří jsou postiženi onemocněním nebo poruchou. Například osteoporóza je porucha staršího věku, která je charakterizována úbytkem kostní hmoty a zvýšeným rizikem výskytu zlomenin kostí. K inhibici resorpce kostní tkáně prostřednictvím osteoklastů mohou tedy být využity sloučeniny, které tuto resorpci blokují přímo (například iontomimetické sloučeniny působící na osteoklasty) nebo nepřímo prostřednictvím zvýšení hladiny endogenního kalcitoninu (například kalcimimetika působící na C-buňky). Jinou možností je zvýšení hladiny parathormonu v krevním oběhu prostřednictvím působení kalcilytik na buňky příštítných tělísek. Toto zvýšení hladiny PTH stimuluje tvorbu kostí. Všechny tři zmíněné přístupy jsou pro pacienta trpícího osteoporózou prospěšné.

Dále je známo, že občasné podávání malých dávek PTH má za následek tvorbu kostní hmoty a podporuje řádné remodelování kostní tkáně. Sloučeniny a režim jejich podávání, který vyvolává přechodné zvýšení hladiny parathormonu (například občasné podávání iontololytika působícího na buňky příštítných tělísek), může tedy u pacientů trpících osteoporózou zvýšit hmotu kostní tkáně.

Prostřednictvím identifikace dalších funkčních odpovědí buněk, které jsou regulovány aktivitou receptorů pro vápník, a které jsou spojeny s některou nemocí nebo poruchou, mohou být identifikovány další onemocnění a poruchy. Onemocnění a poruchy, které mohou být léčeny prostřed-

nictvím modulace receptorů jiných anorganických iontů než iontů vápníku, mohou být identifikovány obdobným způsobem.

5 Sloučeniny podle vynálezu, které modulují aktivitu receptorů anorganických iontů, mohou působit na receptor anorganických iontů, tím navodit jednu nebo více funkčních odpovědí buněk na jejichž povrchu je tento receptor exprimován a tím projevit svůj terapeutický účinek. Sloučeniny podle vynálezu, které modulují aktivitu receptorů pro vápník, mohou u buněk exprimujících tento receptor navodit jednu nebo více funkčních odpovědí a tím projevit svůj terapeutický účinek. Postupy podle vynálezu mohou být použity k léčbě nejruznějších nemocí prostřednictvím ovlivnění buněk exprimujících receptory pro vápník.

Primární hyperthyreóza (HPT) je například charakterizována hyperkalcémií a abnormálně zvýšenou hladinou PTH v krevním oběhu. Poruchou spojenou s tímto převládajícím typem HPT je snížená citlivost buněk příštítných tělísek k negativní zpětnovazební regulaci způsobené přítomností extracelulárního vápníku. To znamená, že ve tkáni pacientů trpících primární HPT je „nastavená hodnota,“ („set point“) pro extracelulární Ca^{2+} posunuta doprava, což znamená, že k potlačení sekrece PTH je zapotřebí vyšších koncentrací extracelulárních Ca^{2+} , než je tomu u zdravého jedince. U primární HPT navíc dokonce vysoké koncentrace extracelulárních Ca^{2+} snižují sekreci PTH jenom částečně. U sekundární (uremické) HPT je pozorováno obdobné zvýšení „nastavené hodnoty“ pro extracelulární Ca^{2+} , ačkoliv stupeň potlačení sekrece PTH způsobené přítomností Ca^{2+} je „normální“. Změny v sekreci PTH odpovídají změnám v hladině $[\text{Ca}^{2+}]_i$; „nastavená hodnota“ pro extracelulární Ca^{2+} schopné indukovat zvýšení $[\text{Ca}^{2+}]_i$ je posunuta doprava a toto zvýšení $[\text{Ca}^{2+}]_i$ není (co do velikosti) tak výrazné.

25 Pacienti postižení sekundární HPT mohou rovněž trpět renální osteodystrofií. U těchto pacientů se kalcimimetika jeví jako užitečná při léčbě jak abnormální sekrece PTH tak osteodystrofie.

Sloučeniny mimikující účinky extracelulárních Ca^{2+} jsou prospěšné při dlouhodobé léčbě jak primární tak sekundární HPT. Tyto sloučeniny dodávají další impuls, který je potřebný k potlačení sekrece PTH, které nemůže být dosaženo pouhým navozením hyperkalcemických podmínek. Tyto sloučeniny tedy pomáhají zmírnit hyperkalcémii. Sloučeniny s vyšší účinností než jakou mají extracelulární Ca^{2+} mohou překonat zdánlivě nepotlačitelnou část sekrece PTH, která způsobuje zvláště velké problémy u nejrozšířenější formy primární HPT, která je způsobena adenomem příštítných tělísek. Jinou možností je využití skutečnosti, že tyto sloučeniny mohou snížit syntézu PTH, jelikož bylo prokázáno, že dlouhotrvající hyperkalcémie snižuje u člověka a skotu hladinu mRNA kódující preproPTH v adenomu příštítných tělísek. Dlouhotrvající hyperkalcémie rovněž in vitro potlačuje proliferaci buněk příštítných tělísek, z čehož vyplývá, že kalcimimetika mohou být rovněž účinná při omezení tvorby hyperplazií buněk příštítných tělísek charakteristických pro sekundární HPT.

40 I buňky jiného druhu než buňky příštítných tělísek mohou přímo reagovat na fyziologické změny v koncentraci extracelulárních Ca^{2+} . Například změny v koncentraci extracelulárních Ca^{2+} regulují u parafolikulárních buněk štítné žlázy (C–buněk) sekreci kalcitoninu.

45 Izolované osteoklasty reagují na zvýšení koncentrace extracelulárních Ca^{2+} odpovídajícím zvýšením $[\text{Ca}^{2+}]_i$, které má z části příčinu v mobilizaci intracelulárních Ca^{2+} . Zvýšení $[\text{Ca}^{2+}]_i$ v osteoklastech je spojeno s inhibicí resorpce kostní tkáně. Vápenaté ionty přímo stimulují uvolňování alkalické fosfatázy u osteoblastů, které se účastní tvorby kostní tkáně.

50 Zvýšená koncentrace extracelulárních Ca^{2+} snižuje, stejně jako je tomu u PTH, sekreci reninu u juxtaglomerulárních buněk ledvin. V těchto buňkách způsobují extracelulární Ca^{2+} mobilizaci zásob intracelulárních Ca^{2+} . Ostatní buňky ledvin reagují na přítomnost vápníku následujícím způsobem: u buněk proximálního tubulu inhibuje zvýšená hladina Ca^{2+} tvorbu 1, 25(OH) 2 -vitaminu D, u buněk distálního tubulu stimuluje zvýšená hladina Ca^{2+} produkci vazebného proteinu pro vápník a inhibuje zpětnou absorpci Ca^{2+} a Mg^{2+} a inhibuje účinky vasopresinu na

tlusté vzestupné ramínko Henleovy kličky (MTAL), zvýšená hladina Ca^{2+} snižuje účinky vasopresinu na buňky kortexu sběrného kanálku a ovlivňuje buňky hladké svaloviny v cévách glomerulu ledvin.

- 5 Vápník rovněž podporuje diferenciaci pohárkových buněk střeva, buněk mléčné žlázy a kožních buněk; inhibuje sekreci natriuretického peptidu srdečních síní; v krevních destičkách snižuje akumulaci cAMP; pozměňuje sekreci gastrinu a glukagonu; u buněk hladkého svalstva cév modifikuje sekreci vazoaktivních faktorů; ovlivňuje buňky centrálního nervového systému a buňky periferního nervového systému.

- 10 Existuje tedy dostatek údajů, které naznačují, že Ca^{2+} funguje nejenom jako všudypřítomný intracelulární signál, ale že rovněž působí jako extracelulární signál a může tudíž regulovat funkční odpovědi určitých specializovaných buněk. Sloučeniny podle vynálezu mohou být tedy použity k léčbě nemocí a poruch spojených s narušenými funkčními odpověďmi těchto buněk na
15 přítomnost Ca^{2+} .

- Mezi specifická onemocnění nebo poruchy způsobené narušením funkčních odpovědí buněk, které mohou být léčeny nebo kterým můžeme předcházet, řadíme onemocnění nebo poruchy centrálního nervového systému, jako například záchvaty, mrtvice, úraz hlavy, poranění míchy,
20 poškození nervových buněk navozené nedostatkem kyslíku, ke kterým dochází například při zástavě srdce nebo u neonatální respirační tísně, epilepsie, neurodegenerativní poruchy jako například Alzheimerovu nemoc, Huntingtonovu nemoc a Parkinsonovu nemoc, demenci, svalové námahy, deprese, panických stavů, úzkosti, obsedantně-kompulzivní poruchy, poruchy způsobené posttraumatickým stresem, schizofrénie, neuroleptický maligní syndrom a Tourettův
25 syndrom; poruchy vyznačující se přebytkem zpětnou absorpcí v ledvinách jako je například syndrom nepřiměřené sekrece ADH (SIADH), cirhóza, selhání srdce způsobené překrvením a nefróza; hypertenze; prevence a/nebo snížení renální toxicity (například antibiotik na bázi aminoglykosidů); dráždivý tračník jako například průjem a spastický kolon; vředovitá onemocnění gastrointestinálního traktu; onemocnění gastrointestinálního traktu charakterizovaná nadměrnou absorpcí vápníku jako například sarkoidóza; a autoimunitní onemocnění a odmítnutí
30 orgánových transplantátů.

- Ačkoliv sloučeniny podle vynálezu, modulující aktivitu receptorů pro vápník, budou obvykle používány k léčbě lidí, mohou být tyto sloučeniny rovněž použity k léčbě podobných nebo
35 identických nemocí postihujících jiné teplokrevné živočišné druhy, jako například primáty, hospodářská zvířata, jako například vepře, dobytek a drůbež; zvířata chovaná ke sportovním účelům a domácí zvířata jako například koně, psi a kočky.

IV. Administrace

- 40 Různé sloučeniny popsané ve vynálezu mohou být použity k léčbě nejrozličnějších nemocí nebo poruch. Léčebný účinek těchto sloučenin spočívá v jejich schopnosti modulovat aktivitu receptorů anorganických iontů, výhodněji pak aktivitu receptorů pro vápník. Sloučeniny podle vynálezu mohou být připraveny v nejrozličnějších kompozicích použitelných pro administraci, jako
45 například systemickou administraci a topickou nebo lokální administraci. Techniky přípravy a druhy kompozicí mohou být obecně nalezeny v Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA. Administrace iontomimetik a iontolitik je popsána v Nemeth a další, PCT/US93/01642, Mezinárodní publikace WO 94/18959.

- 50 Druh kompozice vhodný pro dávkování je, alespoň z části, závislý na způsobu použití nebo cestě, kterou je kompozice aplikována. Administraci je možné provádět orální cestou, přes pokožku nebo ve formě injekcí. Kompozice vhodná pro dávkování by měly aktivní sloučeninu umožnit dosáhnout cílové buňky, ať už je cílová buňka součástí mnohobuněčného organismu nebo se nachází v buněčné kultuře. Například farmaceutická sloučenina nebo kompozice aplikovaná do
55 krevního řečiště ve formě injekcí by měla být rozpustná. Jiné faktory ovlivňující druh použité

kompozice jsou známy ze stavu techniky a patří mezi ně problém toxicity nebo možnost použití kompozice, která „pozdrží“ účinky sloučeniny nebo kompozice.

Sloučeniny mohou být rovněž připraveny ve formě farmaceuticky přijatelných solí (například soli připravené přidavkem kyselin) a jejich komplexů. Jako farmaceuticky přijatelné soli označujeme netoxické soli v koncentracích, ve kterých jsou administrovány. Příprava takových solí může usnadnit farmakologické využití tím, že dojde ke změně fyzikálních charakteristik dané sloučeniny a přitom není u dané sloučeniny ovlivněn její fyziologický účinek. Mezi užitečné změny fyzikálních vlastností patří například snížení bodu tuhnutí, které usnadňuje administraci sloučeniny přes sliznici nebo zvýšení rozpustnosti, které usnadní administraci vyšších koncentrací dané sloučeniny.

Mezi farmaceuticky přijatelné soli patří soli získané přidavkem kyseliny. Získané soli existují například ve formě síranů, chloridů, maleátů, fosfátů, amidosíranů, octanů, citrátů, laktátů, vinnů, methansulfonátů, ethansulfonátů, benzensulfonátů, p-toluensulfonátů, cyklohexylamidosíranů a chinátů. (Viz například PCT/US92/03736). Farmaceuticky přijatelné soli mohou být získány z kyselin, jakými jsou například kyselina chlorovodíková, kyselina maleinová, kyselina sírová, kyselina fosforečná, kyselina amidosírová, kyselina octová, kyselina citrónová, kyselina mléčná, kyselina vinná, kyselina malonová, kyselina methylsulfonová, kyselina ethylsulfonová, kyselina benzensulfonová, kyselina p-toluensulfonová, kyselina cyklohexylamidosírová a kyselina chinová.

Farmaceuticky přijatelné soli mohou být připraveny pomocí standardních postupů. Daná sloučenina ve formě volné báze je kupříkladu rozpuštěna ve vhodném rozpouštědle, jakým je například vodný roztok nebo roztok směsi alkohol–voda, obsahující požadovanou kyselinu, a následně izolována odpařením roztoku. V jiném příkladu je sůl připravena reakcí volné báze a kyseliny v prostředí organického rozpouštědla.

K usnadnění administrace dané sloučeniny mohou být použity rovněž nosiče a excipienty (mastové základy). Jako příklad nosičů a excipientů je možné uvést například uhlíčitán vápenatý, hydrogenfosforečnan vápenatý, nejrůznější cukry jako například laktóza, glukóza nebo sacharóza nebo různé druhy škrobů, deriváty celulózy, želatina, rostlinné oleje, polyethylenglykoly a fyziologicky přijatelná rozpouštědla. Kompozice nebo farmaceutické kompozice mohou být administrovány nejrůznějšími způsoby, například intravenózně, intraperitoneálně, do podkožní vrstvy (subkutánně) a intramuskulárně, orálně, lokálně nebo přes sliznice.

Pro systemickou administraci je upřednostňována orální administrace. Jinou možností je administrace ve formě injekcí, například intramuskulární, intravenózní, intraperitoneální nebo subkutánní administrace. K administraci ve formě injekcí jsou sloučeniny podle vynálezu připravovány ve formě vodných roztoků, výhodněji ve formě fyziologicky přijatelných pufrů, jakými jsou například Hankův roztok nebo Ringerův roztok. Jinou možností je připravit danou sloučeninu v pevném stavu a těsně před použitím ji rozpustit nebo suspendovat ve vhodném rozpouštědle. Daná sloučenina může být rovněž lyofilizována.

Systemická administrace může být rovněž dosaženo prostřednictvím administrace přes sliznici nebo přes pokožku nebo může být daná sloučenina administrována orálně. Při administraci přes sliznici nebo přes pokožku jsou v kompozicích použity smáčecí přípravky vhodné k usnadnění překonání bariéry bránící průniku dané sloučeniny. Mezi takové smáčecí přípravky známé ze stavu techniky patří například při administraci přes sliznici soli žlučových kyselin nebo deriváty kyseliny fusidové. K usnadnění pronikání dané sloučeniny mohou být dále použity různé detergenty. Administrace přes sliznice může být dosaženo použitím nosních sprejů nebo například čípků. Pro aplikaci sloučeniny orální cestou může být daná sloučenina připravena v kompozici běžně používané k orální administraci, jako například ve formě kapsulí, tablet nebo kapalných přípravků.

Pro lokální aplikaci sloučeniny může být příslušná sloučenina připravena v kompozicích známých ze stavu techniky. Takovými kompozicemi jsou masti, gely nebo krémy.

Množství sloučeniny podle vynálezu určené k administraci může být stanoveno pomocí standardních postupů. Obvykle se terapeuticky účinné množství pohybuje v rozmezí 1 mmol až 3 mmol příslušné sloučeniny, výhodněji však v rozmezí 0,1 nmol až 1 mmol v závislosti na hodnotě příslušných konstant EC_{50} nebo IC_{50} , na věku a hmotnosti pacienta a rovněž na druhu onemocnění nebo poruchy. Obvykle jsou sloučeniny používány v množstvích v rozmezí 0,1 až 50 mg/kg, výhodněji pak v rozmezí 0,01 až 20 mg/kg živé váhy živočicha, který podstupuje léčbu.

10

Příklady provedení vynálezu

Dále uvádíme příklady ilustrující různá provedení podle vynálezu, která neomezují v žádném ohledu rozsah vynálezu. Pro ilustraci jsou v příkladech zahrnuty také sloučeniny, které přímo nejsou předmětem vynálezu.

15

Příklad 1:

20

Klonování receptoru pro vápník z adenomu lidských příštítných tělísek.

Tento příklad popisuje postup klonování receptoru pro vápník z adenomu lidských příštítných tělísek, při kterém je jako hybridizační sonda použit konstrukt pBoPCaR1 (viz. Nemeth a další, PCT/US93/01642, mezinárodní publikace WO 94/18959). Hybridizační sonda byla použita za účelem identifikace nukleové kyseliny, která kóduje receptor pro vápník exprimovaný na lidských příštítných tělískách. Tato identifikace byla prováděna v podmínkách, při kterých je snížena specifita vazby sondy na odpovídající nukleotidovou sekvenci.

25

Messengerová RNA byla izolována z adenomu příštítných tělísek odebraného 39-letému muži z Kavkazu, trpícímu primárním hyperparathyroidismem. Analýzou takto získané mRNA metodou Northern blot za použití pBoPCaR1 jako hybridizační sondy byly identifikovány dva transkripty kódující receptor pro vápník o velikostech 5 kb a 4 kb. Ze získané mRNA byla vytvořena cDNA knihovna. Na agarózové elektroforéze byly v závislosti na délce izolovány fragmenty dvojvláknové cDNA o velikosti větší než 3 kbp. Tyto fragmenty byly následně zaklonovány do vektoru lambda ZapII. Byl proveden screening pěti set tisíc rekombinantních fágů, při kterém byla jako hybridizační sonda použita cDNA inzertu pBoPCaR1 o velikosti 5,2 kbp. Inzert pBoPCaR1 byl radioaktivně označen syntézou s využitím primerů o náhodných sekvencích, při níž byl jako zdroj radionuklidu použit [^{32}P]-dCTP. Výsledná specifická aktivita inzertu pBoPCaR1 byla 1×10^9 cpm/ μ g.

30

35

40

Screening knihovny byl prováděn po dobu 20 hodin za následujících podmínek: 400 mM Na^+ , 50% formamid, teplota 38 °C. Filtry s otiskem plaků byly hybridizovány po dobu 20 hodin pomocí sondy o koncentraci 500 000 cpm/ml. Po skončení hybridizace byly filtry promývány při 40 °C v 1 x SSC po dobu 1 hodiny.

45

Pomocí hybridizační sondy pBoPCaR1 bylo při primárním screeningu identifikováno 250 pozitivních klonů. U sedmi z těchto pozitivních klonů byl proveden ještě sekundární a terciární screening za účelem izolace jednotlivých klonů, které hybridizují se sondou pBoPCaR1. Těchto sedm klonů bylo analyzováno metodou restričního mapování a metodou Southern blot. Tři z těchto klonů nesly inzert cDNA o velikosti přibližně 5 kbp a byly zřejmě klony s inzertem odpovídajícím mRNA o velikosti 5 kb. Dva z těchto klonů nesly inzert cDNA o velikosti přibližně 4 kbp a byly zřejmě klony s inzertem odpovídajícím mRNA o velikosti 4 kb.

50

Restrikční mapování zmíněných dvou různě velkých inzertů naznačuje, že tyto inzerty mají na svém 5' konci sekvenčně příbuzné oblasti, ale liší se v nukleotidové sekvenci na 3' konci. Sekvenční analýza DNA naznačuje, že menší inzert může být výsledkem procesu, při kterém dochází k alternativní polyadenylaci v místě položeném proti směru transkripce od místa, ve kterém dochází k polyadenylaci u většího inzertu.

Jak cDNA inzert o velikosti přibližně 5 kbp tak menší cDNA inzert byly zaklonovány do plazmidu pBluescript SK. Za použití T7 RNA polymerázy byly in vitro linearizované plazmidy transkribovány. Výsledkem této transkripce byl vznik odpovídajících cRNA, které byly injikovány do oocytů rodu *Xenopus* (150 ng/μl RNA; 50nl/oocyt) za účelem provedení funkční analýzy. Po uplynutí inkubačních období o délce 2 až 4 dny byla u oocytů zjišťována přítomnost funkčních receptorů pro vápník. U obou klonů došlo k expresi funkčních receptorů pro vápník. Tato skutečnost byla stanovena tak, že přidáním vhodných agonistů receptoru pro vápník došlo ke zvýšení toku chloridových iontů dovnitř oocytů. Agonisté receptorů pro vápník, mezi něž patří NPS R-467 a NPS R-568 (viz. Nemeth a další, PCT/US93/01642, mezinárodní publikace WO 94/18959) aktivovali receptory pro vápník exprimované na oocytech v koncentracích přibližně rovných koncentracím, při kterých dochází k aktivaci nativních receptorů pro vápník na buňkách příštinných tělísek. Oba klony tedy kódují funkční receptor pro vápník buněk příštinných tělísek člověka.

Jak cDNA inzert o velikosti přibližně 5 kbp tak menší cDNA inzert byly zaklonovány do plazmidu pBluescript a vzniklé plazmidy byly označeny jako pHuPCaR 5,2 a pHuPCaR 4,0. Nukleotidová sekvence a aminokyselinová sekvence obou těchto inzertů jsou znázorněny v SEQ. ID. číslo 1 a 2.

Mezi nukleotidovými sekvencemi zmíněných inzertů bylo pozorováno několik rozdílů. Sekvenční analýza zmíněných cDNA inzertů naznačuje, že existují přinejmenším dvě varianty, které se liší v sekvenci 3' nepřekládané oblasti a které mohou být produktem alternativní polyadenylace. Existují rovněž odchylky v nukleotidové sekvenci na 5' konci inzertů. Tyto rozdílné sekvence odpovídají nepřekládaným oblastem a mohly vzniknout alternativní iniciací transkripce a/nebo alternativním sestřihem mRNA.

V klonech pHuPCaR 5,2 a pHuPCaR 4,0 jsou pozorovány mezi kódujícími oblastmi příslušných cDNA ještě další úseky, ve kterých existuje odlišnost v nukleotidové sekvenci (viz. SEQ. ID. číslo 1 a 2). To znamená, že tyto dva cDNA klony kódují odlišné proteiny. Sekvenční analýza lidského genu CaR naznačuje, že 30 párů bází vyskytujících se navíc v cDNA klonu pHuPCaR 5,2 (ve srovnání s cDNA klonu pHuPCaR 4,0) je výsledkem alternativního sestřihu mRNA. Předpokládá se, že alternativní sestřih mRNA má za následek vložení 10 dalších aminokyselin do polypeptidu CaR kódovaného cDNA klonu pHuPCaR 5,2. K tomuto vložení dochází v polypeptidu kódovaném cDNA klonu pHuPCaR 4,0 mezi aminokyselinovými zbytky číslo 536 a 537. Dále pak pHuPCaR 4,0 kóduje na pozici 925 glutamin (Gln) a na pozici 990 glycin (Gly), kdežto pHuPCaR 5,2 kóduje na obou těchto pozicích arginin (Arg). Gen pro lidský CaR kóduje na pozici 925 Gln a na pozici 990 Arg. Ve srovnání s lidskou DNA je rozdíl mezi touto DNA a cDNA klonu pHuPCaR 4,0 chápán jako sekvenční polymorfismus v lidské populaci, zatímco záměna jedné báze v pHuPCaR 5,2 byla patrně způsobena mutací během klonování. Obě cDNA kódují funkční receptory pro vápník, což bylo potvrzeno v experimentech, při kterých byly oocyty rodu *Xenopus* injikovány cRNA připravenou z těchto klonů cDNA. Tyto oocyty pak reagovaly (jak ukazují měření vodivosti zprostředkované ionty Cl⁻) na přítomnost extracelulárního vápníku o koncentraci 10 mM. Je nicméně možné, že tyto dvě izoformy receptorů pro vápník jsou funkčně a/nebo farmakologicky odlišné.

Příklad 2:

Selekce rekombinantních buněk, které stabilně exprimují receptory pro vápník

- 5 Byly izolovány klonované buněčné linie, které stabilně exprimují dva lidské receptory pro vápník a jeden receptor pro vápník skotu. cDNA kódující receptory pro vápník byly zaklonovány do dvou rozdílných, komerčně dostupných vektorů; vektoru pMSG (získaný od firmy Pharmacia) a vektoru Cep4B (získaný od firmy Invitrogen). První vektor nesl jako selekční marker gen pro xanthin-guanin fosforibosyltransferázu (gpt). Produkt tohoto genu umožňuje stabilně trans-
- 10 fekovaným buňkám překonat zablokování dráhy biosyntézy purinů, kterého je dosaženo přidáváním 2 $\mu\text{g/ml}$ aminopterinu a 25 $\mu\text{g/ml}$ mykofenolové kyseliny. Druhý vektor kóduje gen, který nese rezistenci vůči antibiotiku hygromycin (použito v koncentraci 200 $\mu\text{g/ml}$). cDNA klonu pHuPCaR 5,2 a klonu pHuPCaR 4,0 (SEQ. ID. číslo 1 a 2) byly z plazmidu Bluescript vyštěpeny za použití restrikčních enzymů Not I a Hind III. Takto získané fragmenty byly buď přímo
- 15 zaligovány do vektoru Cep4B, který byl předem rozštěpen restrikčními enzymy Not I a Hind III, nebo byly vystaveny působení Klenowova fragmentu DNA polymerázy a následně zaligovány (ligace tupých konců) do vektoru pMSG rozštěpeného restrikčním enzymem Sma I.

- 20 Klonem vektoru pMSG nesoucím inzert z pHuPCaR 5,2 byly postupem zmíněným výše transfekovány buňky CHO. Selekčním postupem bylo získáno 20 rezistentních klonů, které jsou v současné době charakterizovány. Klonem vektoru Cep4B nesoucím inzert z pHuPCaR 5,2 byly postupem zmíněným výše transfekovány buňky HEK 293. Selekcí hygromycinem bylo získáno velké množství stabilně transformovaných klonů. Podobně byly připraveny klony exprimující izoformu receptoru pro vápník kódovanou inzertem z klonu pHuPCaR 4,0.

- 25 Buňky získané po selekci hygromycinem z klonů buněk HEK 293 transfekovaných vektorem Cep4B obsahujícím inzert pHuPCaR 5,2, byly vysety na Aklarovy čtverce potažené kolagenem. Tyto čtverce byly po jednom umístěny do jamek na 12-ti jamkových plotnách pro tkáňové kultury. Po dvou až šesti dnech bylo odstraněno růstové médium a buňky byly promyty vyrovná-
- 30 vacím roztokem a 1 ml pufru obsahujícím 1 μM indikátor fura2-AM, 1 mM CaCl_2 a 0,1% BSA a 1 mM CaCl_2 . Měření fluorescence jako odpovědi na přítomnost agonistů receptorů pro vápník bylo prováděno při 37 °C ve spektrofotometru při vlnové délce excitace 340 nm a vlnové délce emise 510 nm. Při kalibraci signálu byla hodnota F_{max} stanovena po přidání ionomycinu (40 μM) a zdánlivá hodnota F_{min} byla stanovena po přidání 0,3 M EGTA, 2,5 M Tris-HCl, pH = 10. Velké
- 35 zvýšení $[\text{Ca}^{2+}]_i$ bylo pozorováno jako reakce na přidání následujících agonistů receptorů pro vápník: Ca^{2+} (10 mM), Mg^{2+} (20 mM) a NPS R-467. Kontrolní linie buněk exprimující funkční receptory substance K na přítomnost těchto kalcimimetických sloučenin nereagovaly.

- 40 Dále byly získány buňky HEK 293 transfekované vektorem s inzertem pHuPCaR 4,0. U těchto buněk byla rovněž testována reakce na přítomnost kalcimimetik (jak bylo popsáno výše), ale s tím rozdílem, že tyto buňky byly během experimentu přítomny v suspenzi.

Příklad 3:

- 45 Použití buněk příštitných tělísek nasycených indikátorem fura-2 za účelem měření aktivity receptorů pro vápník

- 50 Tento oddíl popisuje postupy použité k získání buněk příštitných tělísek z organismu telat a lidského organismu a využití buněk příštitných tělísek k měření aktivity receptorů pro vápník.

- Příštitná tělíska byla získána z čerstvě zabitých telat (starých 12 až 14 týdnů). Telata byla zabita na místních jatkách a příštitná tělíska byla do laboratoře transportována v pufru pro buňky příštitných tělísek (PCB – parathyroid cell buffer) o teplotě 0 °C, jehož složení je následující (mM): NaCl, 126; KCl, 4; MgCl_2 , 1; Na-HEPES, 20; pH = 7,4; glukóza, 5,6 a proměnné
- 55

množství CaCl_2 , například 1,25 mM. Lidská příštitná tělíska byla získána od pacientů trpících primární nebo uremickou hyperparathyreózou (uremická HPT), kterým byla tato příštitná tělíska chirurgicky odstraněna. Postup při transportu byl stejný jako u příštitných tělísek telat.

- 5 Žlázy byly zbaveny přebytečného tuku a pojivové tkáně a poté byly rozstříhány pomocí malých nůžek na kostičky o hraně přibližně 2 až 3 mm. Jednotlivé buňky příštitných tělísek byly připraveny působením kolagenázy a poté purifikovány centrifugací v pufru Percoll. Výsledný preparát buněk příštitných tělísek neobsahoval téměř žádné červené krvinky, adipocyty nebo tkáň kapilár, což bylo potvrzeno pozorováním mikroskopem s fázovým kontrastem a barvením Sudánovou černí. Disociované a purifikované buňky příštitných tělísek byly přítomny ve shlucích obsahujících 5 až 20 buněk. Životaschopnost buněk stanovovaná pomocí měření exkluze trypanové modře nebo ethidium bromidu byla běžně 95 %.

- 15 Ačkoliv by mohly být buňky v tomto stavu použity k experimentům, měly by být u buněk kultivovaných přes noc stanoveny fyziologické reakce (například možnost potlačení sekrece PTH a klidová hladina $[\text{Ca}^{2+}]_i$). Primární kultura má rovněž tu výhodu, že buňky mohou být izotopově značeny až na rovnovážnou úroveň izotopu, což je nezbytné pro studie, při kterých se měří metabolismus inositol fosfátu.

- 20 Následně po purifikaci na gradientu Percoll byly buňky několikrát promyty ve směsi (1:1) ITS^- a Hamova F12–Eaglova média modifikovaného podle Dulbecca (GIBCO) s přísadkou 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycinu, 100 U/ml penicilinu a 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gentamicinu. ITS^- je předpřipravené médium obsahující inzulin, transferin, selen a bovinní sérový albumin (BSA) s kyselinou linoleovou (Collaborative Research, Bedford, MA). Následně byly buňky přeneseny do plastických lahví (75 a 150 cm^3 ; Falcon) a inkubovány přes noc při 37 °C ve vlhké atmosféře s 5% CO_2 . K těmto buněčným kulturám kultivovaným přes noc nebylo přidáváno sérum, protože přítomnost séra umožňuje buňkám, aby se přichytily k plastickým stěnám a začaly proliferovat a diferencovat. Buněčné kultury připravené za podmínek zmíněných výše mohly být z lahví odstraněny jednoduše dekantací a vykazovaly stejnou životaschopnost jako čerstvě připravené buňky μ .

- 30 Purifikované buňky příštitných tělísek byly suspendovány v roztoku 1,25 mM CaCl_2 – 2% BSA–PCB obsahujícím 1 μM acetyloxymethyl ester fura-2 a byly inkubovány při 37 °C po dobu 20 minut. Poté byly buňky krátce zcentrifugovány a suspendovány v pufru o stejném složení jaké měl předchozí pufr, ovšem již bez přítomnosti esteru fura-2, a dále inkubovány při 37 °C po dobu 15 minut. Následně byly buňky dvakrát promyty PCB obsahujícím 0,5 mM CaCl_2 a 0,5% BSA a ponechány při pokojové teplotě (přibližně 20 °C). Těsně před použitím byla buněčná suspenze pětkrát zředěna předehřátým roztokem 0,5 mM CaCl_2 –PCB, aby bylo dosaženo finální koncentrace 0,1% BSA. Koncentrace buněk v kyvetě použité k měření fluorescence byla 1 až 2 $\times 10^6$ /ml.

- 40 Fluorescence buněk nasycených indikátorem byla měřena při 37 °C na spektrofotometru (Biomedical Instrumentation Group, Pennsylvania, Philadelphia, PA) vybaveném termostatovaným držákem kyvet a magnetickým míchadlem. Pro měření byla použita vlnová délka excitace 340 nm a vlnová délka emise byla měřena při 510 nm. Naměřené hodnoty fluorescence korespondují s hladinou cystolických Ca^{2+} . Fluorescenční signály byly kalibrovány za použití digitoninu (finální koncentrace 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), kde byla stanovena hodnota maximální fluorescence (F_{max}) a EGTA (finální koncentrace 10 mM, pH = 8,3), při použití kterého byla získána hodnota minimální fluorescence (F_{min}) a disociační konstanta 224 nm. Unikání barvy je závislé na teplotě a nejintenzivnější je během prvních dvou minut po zahřátí buněk v kyvetě. Poté se množství uniklé barvy zvyšuje jen nepatrně. Za účelem korekce kalibrace vzhledem k úniku barvy byly buňky umístěny do kyvety a míchány při 37 °C po dobu 2 až 3 minut. Poté byla buněčná suspenze z kyvety odstraněna, buňky byly krátce zcentrifugovány a supernatant byl vrácen do prázdné kyvety. Supernatant byl poté vystaven působení digitoninu a EGTA za účelem stanovení množství uniklé barvy. Toto množství obvykle představuje 10 až 15 % z celkového fluorescenčního signálu závislého na přítomnosti Ca^{2+} . Odhad úniku barvy byl odečten od zdánlivé

konstanty $F_{\min}$. Příklad číslo 4: Použití buněk HEK 293/pHuPCaR 4,0 nasycených indikátorem fura-2 za účelem měření aktivity receptoru pro vápník.

- 5 Tento oddíl popisuje postupy použité ke stanovení aktivity receptorů pro vápník za využití buněk HEK 293/pHuPCaR 4,0 nasycených indikátorem fura-2. Buňky HEK 293 transfekované pHuPCaR 4,0 byly nasyceny indikátorem fura-2 pomocí inkubace buněk v Eaglově médiu modifikovaném podle Dulbecca pufrovaném roztokem 20 mM HEPES obsahujícím 5 μ M fluor-3/AM po dobu jedné hodiny při pokojové teplotě. Poté byly buňky promyty Hankovým rovnovážným roztokem pufrovaným roztokem 20 mM HEPES obsahujícím 1 mM CaCl_2 a 1 mM MgCl_2 . Testované sloučeniny byly následně přidány k buňkám a byla stanovována fluorescence. Pro měření byla použita vlnová délka excitace 340 nm a vlnová délka emise byla měřena při 510 nm.

15 Příklad 5:

Měření schopnosti jednotlivých sloučenin modulovat aktivitu receptorů pro vápník

- 20 Schopnost různých sloučenin modulovat aktivitu receptorů pro vápník byla stanovována pomocí měření zvýšení $[\text{Ca}^{2+}]_i$ v buňkách HEK 293 transfekovaných nukleovou kyselinou kódující pHuPCaR 4,0, které byly nasyceny indikátorem fura-2. Druhým systémem pro toto stanovení byly buňky příštinných tělísek nasycené indikátorem fura-2. Výsledky jednotlivých experimentů jsou shrnuty v tabulkách 1. a; 1. b. 1; 1. b. 2; 1. c a 2. V tabulkách 1. a, 1. b. 1, 1. b. 2, 1. c jsou shrnuty výsledky stanovení účinků jednotlivých sloučenin na aktivitu receptorů pro vápník při 25 různých koncentracích těchto sloučenin. Účinky jednotlivých sloučenin na aktivitu receptorů pro vápník byly stanovovány jak je popsáno v příkladu číslo 4 (to znamená, že byly použity buňky HEK 293 transfekované nukleovou kyselinou kódující pHuPCaR 4,0, které byly nasyceny indikátorem fura-2).

- 30 V tabulce 2 jsou shrnuty výsledky jednotlivých experimentů, při kterých byla pro buňky HEK 293/pHuPCaR 4,0, nebo pro buňky příštinných tělísek, které byly nasyceny indikátorem fura-2, vypočítána hodnota konstanty EC_{50} . Buňky byly nasyceny indikátorem fura-2 a stanovení bylo provedeno způsobem popsaným v příkladu číslo 2 (pro buňky příštinných tělísek) nebo v způsobem popsaným v příkladu číslo 3 (pro buňky HEK 293/pHuPCaR 4,0).

- 35 Tabulka 1. a. Kalcimimetické sloučeniny, které v koncentracích 3,3 ng/ml vyvolávají u buněk HEK-293 exprimujících lidský receptor pro vápník silnější než 40% odpověď.

Kód sloučeniny	% aktivity při čtyřech koncentracích (ng/ml)			
	3300	330	33	3,3
Referenční sloučeniny				
R-568		95	69	24
17P		101	86	54
17X		105	93	51
24X	126	109	124	109
24Y	119	120	127	102
17J	116	118	122	102
25A	122	120	114	92
17E	116	110	110	92
24Z	138	138	135	90
14S	116	106	105	88
25E	132	129	122	85
17G	125	128	119	77
14T	126	125	17	77
17H	126	124	111	74

140	119	119	102	74
25I	119	113	114	74
12J	131	130	113	68
12I	115	111	93	68
25G	130	115	99	66
9R		108	101	64
12F	118	110	101	63
12O	110	117	94	62
23Z	129	126	100	61
17M		115	99	59
16V		114	102	58
25O	126	115	96	57
25J	119	123	105	56
16L	146	138	98	56
12N	115	106	102	55
16T		97	88	55
25U	107	107	95	55
17P		101	86	54
16Q		110	88	53
23E	137	113	102	53
17C	113	120	99	52
25L	97	97	85	52
8Z		101	97	52
17X		105	93	51
13R		132	98	51
17O		112	96	51
23Q	122	114	98	51
16X		111	96	51
24V	127	98	71	50
13O		115	94	50
17N		108	86	49
21V	122	116	99	48
24M	132	134	99	48
13U		108	79	47
24P	140	138	110	46
17Y	109	94	79	46
11X		100	76	45
25H	115	107	89	45
22J		99	71	45
9C		104	82	45
13S		102	87	45
10Q	103	100	84	44
13P		110	83	44
8K		98	81	44
13N		114	88	43
10N	106	97	77	43
12H	114	115	94	43
25P	90	81	75	41
18A		111	88	40
14L		109	78	40

Tabulka 1. b. 1. Kalcimimetické sloučeniny, které v koncentracích 33 ng/ml vyvolávají u buněk HEK-293 exprimujících lidský receptor pro vápník silnější než 40% odpověď.

Kód sloučeniny	% aktivity při čtyřech koncentracích (ng/ml)			
	3300	330	33	3,3
Referenční sloučeniny				
R-568		95	69	24
17P		101	86	54
17X		105	93	51
12C	134	125	98	39
16I	121	117	96	36
17D		108	91	38
17F		111	90	28
24C	116	113	87	32
25K	124	107	86	35
13F	125	122	85	38
21F		109	85	36
21S	132	131	85	34
10F		96	84	27
14R	106	107	84	37
13G	111	128	82	29
14Z	118	103	82	20
16N	122	159	82	8
8U	123	129	82	11
23W	117	97	81	25
12G	139	139	81	35
15G		113	80	32
25M	118	110	79	25
13V		110	79	33
14P	112	103	78	30
6T	123	129	78	15
14Q		101	78	35
17L	111	104	78	31
24K		106	78	30
24U	106	106	78	25
25Q	116	95	77	20
8J		104	77	39
23H	121	114	77	28
21C=4U	134	114	76	17
25F	97	85	76	28
16R		100	76	25
17I	118	97	76	18
24J		103	75	31
21O		109	75	37
24G	109	94	75	22
15I	111	93	75	24
21D		104	75	17
20Y	117	95	74	24
10P		102	74	8
23M	113	97	74	26
14Y		109	73	17
17K	98	97	73	37
12E	117	121	73	23
17Z		99	73	37
16W		102	73	4

23K	106	107	72	24
25X	96	94	72	22
13W		109	71	12
23P	125	99	70	22
18B	111	96	69	26
21Y		100	68	36
17W		92	67	13
23A		103	67	24
23G	127	93	67	13
13M		92	66	15
21U	104	104	66	18
21R		100	66	15
10S/10T		86	65	13
17R		98	65	13
13X		102	65	13
4N		100	65	13
21E		94	64	4
15J	80	75	64	13
22Y		114	64	28
21G		88	63	18
24L		105	62	10
10V		99	62	8
10W/10X		98	61	9
17B		92	61	19
23Y	106	87	61	16
11Y		103	61	20

Tabulka 1. b. 2. Kalcimimetické sloučeniny, které v koncentracích 33 ng/ml vyvolávají u buněk HEK-293 exprimujících lidský receptor pro vápník silnější než 40% odpověď.

5

Kód sloučeniny	% aktivity při čtyřech koncentracích (ng/ml)			
	3300	330	33	3,3
Referenční sloučeniny				
R-568		95	69	24
17P		101	86	54
17X		105	93	51
18C	99	87	60	18
23T	102	74	60	31
4V		93	59	
8G		84	59	6
23I		102	58	3
21M		102	58	17
24O	137	114	58	8
3U		89	57	
9A		82	56	6
12M	98	86	56	11
12B	130	110	56	4
21P		92	56	13
8T		85	55	13
10L/10M		99	55	4
24I	109	84	55	11
14N		89	55	15
23R	104	86	54	13
23S		97	53	3

21T	133	112	53	3
10W/10X		81	53	4
13T		90	53	6
6R		94	52	7
20I		87	52	12
24A	122	85	52	9
12D	128	109	52	5
6X		84	52	10
18T	99	74	52	14
21X	119	101	51	2
23J	102	61	51	29
10Z		96	51	5
16Z		88	51	9
23N		96	50	2
16U		85	50	4
11D		96	50	4
23X		94	49	1
17A		88	49	7
20J		80	48	8
22X		86	48	10
23U		87	48	3
9Z		74	48	4
16J	92	76	47	31
25N	94	73	46	8
4P		81	46	8
23O	111	79	46	13
13Q		95	46	5
4G		83	46	
12Y		80	46	10
12L		88	45	10
23F		82	45	5
11W		81	44	2
8H		88	44	7
25V	89	59	43	26
25W	95	69	42	8
10R		82	42	7
21N	124	98	42	4
8S		73	42	7
8X		75	40	19
13E	123	94	40	2

Tabulka 1.c. Kalcimimetické sloučeniny, které v koncentracích 330 ng/ml vyvolávají u buněk HEK-293 exprimujících lidský receptor pro vápník silnější než 40% odpověď.

5

Kód sloučeniny	% aktivity při čtyřech koncentracích (ng/ml)			
	3300	330	33	3,3
Referenční sloučeniny				
R568		95	69	24
17P		101	86	54
17X		105	93	51
7X		85		
3H		84		
3L		81	28	
16O	129	81	21	2

8O/8Q	124	80	14	0
14A	98	78	10	7
23L	107	77	37	9
1T		76		
7W		76		
4H		77	37	
8D		75		
5M		73	21	
4U		72		
24E	94	71	35	6
16M	130	68	11	4
4M		68	34	
2S		67	29	
17V	91	66	27	-1
2X		66	15	
23D	91	66	35	13
4P		65	32	
5B/5C		65	20	
3M		64	19	
16K	78	62	36	8
5D		62	18	
4D		61	13	
24B	76	61	34	11
24H	81	60	32	13
5L		60	16	
2X		59	10	
5G		58	16	
3V		56	14	
2Q		56	4	
14B	75	55	11	4
13Z	93	54	22	5
8A		54		
24D	87	53	34	39
1D		53		
13I	85	52	3	1
3B		52	15	
8C		51		
14H		49	5	5
7U	112	49		
5E		48	7	
13H	88	48	36	12
13Y	106	47	2	4
4J		47	8	
14I	80	45	11	7
4B		45	8	
3D		45	4	
3R		45	2	
3A		41	7	
14J	55	41	6	5
4I		40	9	

Tabulka 2: Arylalkylaminová kalcimimetika podle obrázku 1 aktivní na receptorech parathyroidních buněk in vitro

5 (EC₅₀ ≤ 5 μM)

Kód sloučeniny, viz obr. 1	EC ₅₀ (μM)	Kód sloučeniny, viz obr. 1	EC ₅₀ (μM)
NPS R-467	2,00	11X	0,83
NPS R-568	0,60	11Y	2,80
3U	0,64	12L	1,70
3V	1,80	12U	1,20
4A	1,40	12V	0,42
AB	2,00	12W	3,20
4C	2,00	12Y	2,00
4D	4,40	12Z	0,11
4G	1,80	13Q	ca. 0,80
4H		13R	0,25
4J	2,20	13S	<0,13
4M	2,10	13U	0,19
4N	0,80	13X	<0,75
4P	1,60	14L	0,26
4R/6V	4,20	14Q	0,47
4S	3,30	14U	0,13
4T/4U	1,60	14V	1,70
4V	2,50	14Y	0,38
4W	2,30	15G	ca. 0,50
4Y	1,30	16Q	0,04
4Z/5A	4,40	16R	0,36
5B/5C	2,80	16T	0,04
5W/5Y	3,60	16V	<0,13
6E	2,70	16W	0,59
6F (R,R-)	0,83	16X	0,10
6R	3,40	17M	0,15
6T	2,90	17O	0,04
6X	2,50	17P	0,04
7W	3,20	17R	0,39
7X	1,10	17W	0,43
8D	2,50	17X	0,02
8J	0,78	20F	<1,00
8K	1,30	20I	>1,00
8R	2,60	20J	>3,00
8S	1,70	20R	2,40
8T	1,80	20S	4,20
8U	0,44	21D	3,00
8X	0,76	21F	0,38
8Z	0,40	21G	1,10
9C	0,60	21O	0,26
9D	1,40	21P	0,43
9R	0,25	21Q	1,40
9S	4,80	21R	0,37
10F	0,89	25C	>2,00
11D	1,80	25D	0,02

Příklady 6 až 17:

Syntéza sloučenin podle vynálezu

- 5 Sloučeniny podle vynálezu mohou být syntetizovány pomocí standardních technik, například takových, které jsou popsány v Nemeth a další, PCT/US93/01642, Mezinárodní patentová přihláška WO 94/18959. Níže jsou uvedeny reprezentativní příklady syntéz sloučenin podle vynálezu.
- 10 Syntéza sloučenin 9R, 14U, a 17P probíhala reduktivní aminací komerčně dostupných aldehydů nebo ketonů s primárním aminem v přítomnosti kyanoborohydridu sodného nebo triacetyloxyborohydridu sodného.
- 15 Sloučeniny 11Y, 12H, 12K, 12M, 14S, 14T, 16L – O, 17E, 17G, 17J, 24X, 24Y, 25A, 25R – 25K, and 25O byly připraveny podobným způsobem.
- 20 Při syntéze těchto tří sloučeniny (9R, 14U, a 16P) byly při použití triacetyloxyborohydridu sodného vyšší výtěžky požadovaných diastereoizomerů s vyšší diastereoselektivitou, než při použití kyanoborohydridu sodného. Obohacené směsi byla dále purifikovány až na jednotlivé diastereomery pomocí HPLC s normální fází nebo rekrytalizací z organických rozpouštědel.
- 25 Sloučeniny 8J, 8U, 11X, 17M a 25Y byly připraveny kondenzací primárního aminu s aldehydem nebo ketonem v přítomnosti izopropoxidu titaničitého. Vzniklé intermediární iminy redukovány *in situ* pomocí kyanoborohydridu sodného, borohydridu sodného nebo triacetyloxyborohydridu sodného. Intermediární enamin pro syntézu sloučeniny 8U byl katalyticky redukován pomocí hydroxidu palladnatého nebo uhlíku.
- 30 Sloučeniny 12U, 12V and 12Z byly připraveny kondenzací aminu s nitrilem v přítomnosti diizobutylaluminiumhydridu (DIBAL – H). Vzniklý intermediární imin byl redukován *in situ* pomocí kyanoborohydridu sodného nebo borohydridu sodného. Intermediární alkeny (sloučeniny 12U a 12V) byly redukovány katalytickou hydrogenací v ethanolu pomocí palladia na uhlíku.
- 35 Sloučeniny byly převedeny na odpovídající bílé krystalické hydrochloridy vytřepáním pomocí HCl z etherického roztoku volné báze.
- 40 Aminy použité pro tyto syntézy byly získány od firmy Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI, nebo od firmy Calgene Corp., Warren, NJ, nebo byly připraveny syntézou pomocí známých technik. Všechny ostatní chemikálie byly získány od firmy Aldrich Chemical Co.

Příklad 6:

Syntéza sloučeniny 25Y

- 45 N-(3-(2-fenyl)propyl)-2-(1-naftyl)ethylamin

- 50 Směs 3-fenyl-1-propylaminu (1,35 mg, 1 mmol), 1'-acetonafionu (170 mg, 1 mmol) a izopropoxidu titaničitého (355 mg, 1,3 mmol) se míchá při teplotě místnosti po dobu jedné hodiny. K reakční směsi se přidá 1M ethanolický roztok kyanoborohydridu sodného (1 ml) a směs se dále míchá po dobu 16 hodin při teplotě místnosti. Reakční směs se poté naředí etherem a vytřepává vodou (0,1 ml). Reakční směs se odstředí a je odebrána etherická fáze, která se zakoncentruje do mléčné olejovité kapaliny. Malá část tohoto materiálu (10 mg) se čistí pomocí HPLC (Phenomenex, 1,0 x 25 cm, 5 µm silikagel) v gradientu dichlormethanu až k 10% methanolu v dichlormethanu s obsahem 0,1 % izopropylmethanu. Po přečištění vznikl produkt, obsahující čistou

volnou bázi s těmito vlastnostmi: GC/EI – MS ($R_t = 10,48$ min) m/z (rel. int.) 289, (M^+ , 11), 274 (63), 184 (5), 162 (5), 155 (100), 141 (18), 115 (8), 91 (45), 77 (5).

5 Příklad 7:

Syntéza sloučeniny 8J

hydrochlorid N–(3–fenylpropyl)–1–(3–thiomethylfenyl)ethylaminu

10

3'–Aminoacetofenon (2,7 g, 20 mmol) se rozpustí ve 4 ml koncentrované HCl, 4 g ledu a 8 ml vody. Roztok se ochladí na 0 °C a po dobu 5 minut se přidává dusitan sodný (1,45 g, 21 mmol) rozpuštěný ve 3 až 5 ml vody, přičemž se teplota reakční směsi udržuje pod 6 °C. Thiomethoxid sodný (1,75 g, 25 mmol) se rozpustí v 5 ml vody a ochladí na 0 °C. K tomuto roztoku se přidává po 10 minut diazoniová sůl a teplota se přitom udržuje pod 10 °C. Reakční směs se míchá po 15
dodu další hodiny, přičemž se teplota postupně zvyšuje až dosáhne hodnoty vnější teploty. Reakční směs se poté vytřepává ve směsi etheru a vody. Etherová fáze se oddělí a poté se promyje hydrogenuhlíčanem sodným a chloridem sodným. Pak se fáze suší pomocí síranu sodného. Ether se nechá odpařit za 74% výtěžku 3'–thiomethyl–acetofenonu. Surový materiál se 20
čistí destilací za sníženého tlaku.

3–Fenylpropylamin (0,13 g, 1 mmol), 3–thiomethylacetofenon (0,17 g, 1 mmol) a izopropoxid titaničitý (0,38 g, 1,25 mmol) se smísí a nechají se 4 hodiny v klidu. Poté se přidá ethanol (1 ml) a kyanoborohydrid sodný (0,063 g, 1 mmol) a reakční směs se míchá přes noc. Poté se k reakční 25
směsi přidají 4 ml etheru a 200 μ l vody. Směs se míchá a poté se v centrifuze oddělí nerozpustné látky. Etherová vrstva se oddělí od sraženiny a rozpouštědlo se odstraní ve vakuu. Vzniklý olej se znovu rozpustí v dichlormethanu a sloučenina se čistí preparativní TLC na silikagelu. Jako elučního činidla se přitom použije 3% směs methanol/dichlormethan. Titulní sloučenina se získá jako čistý olej: GC/EI – MS ($R_t = 7,64$ min) m/z (rel. int.) 285 (M^+ , 18), 270 (90), 180 (17), 151 30
(100, 136 (32), 104 (17), 91 (54), 77 (13).

Příklad 8:

35 Syntéza sloučeniny 8U

hydrochlorid N–3–(2–methoxyfenyl)–1–propyl–(R)–3–methoxy– α –methylbenzylaminu

Směs (R)–(+)-3–methoxy– α –methylbenzylaminu (3,02 g, 20 mmol), 2–methoxycinnamaldehydu 40
(3,24 g, 20 mmol) a izopropoxidu titaničitého (9,53 g, 30 mmol, 1,5 ekv.) se míchá 2 hodiny při teplotě místnosti, poté se k ní přidá 1M ethanolický roztok kyanoborohydridu sodného (20 ml). Reakční směs se míchá přes noc (16 hodin), pak se přidá diethylether, a vytřepává se vodou (1,44 ml, 80 mmol, 4 ekv.). Po důkladném promíchání (1 hodinu) se reakční směs odstředí a etherová fáze se odejme a zakoncentruje na olej. Tento materiál se rozpustí v ledové (koncentrované) kyselině octové, vytřepává se s hydroxidem palladia a hydrogenuje se 2 hodiny vodíkem 45
o tlaku 413 kPa, při teplotě místnosti.

Katalyzátor se odstraní filtrací, vzniklý roztok se zakoncentruje do podoby hustého oleje. Tento materiál se rozpustí v dichlormethanu a neutralizuje se přídatkem 1N NaOH. Dichlormethanový 50
roztok se oddělí od vodné fáze a suší se pomocí bezvodého uhlíčitanu draselného do formy oleje. Tento se poté rozpustí etherem a vytřepává se 1M HCl v diethyletheru. Shromáždí se vzniklý precipitát (bílá pevná látka), který se promyje diethyletherem a vysuší na vzduchu.

Vzniklá volná báze má následující vlastnosti CC/EI – MS ($R_t = 9,69$ min) m/z (rel. int.) 299 55
(M^+ , 21), 284 (100), 164 (17), 150 (8), 135 (81), 121 (40), 102 (17), 91 (43), 77 (18).

Příklad 9:

Syntéza sloučeniny 9R

5

hydrochlorid (R)-N-(1-(2-naftyl)ethyl)-(R)-1-(1-naftyl)ethyl-aminu

Směs (R)-(+)-1-(1-naftyl)ethylaminu (10,0 g, 58 mmol), 2'-acetonafonu (9,4 g; 56 mmol), izopropoxidu titaničitého (20,7 g, 73,0 mmol) a absolutního ethanolu (100 ml) se po 3 hodiny zahřívá na 60 °C. Poté se přidá kyanoborohydrid sodný (NaCNBH₃, 0,67 g, 58,4 mmol). Reakční směs se míchá 18 hodin za teploty místnosti. Poté se k reakční směsi přidá 1 ml etheru a 10 ml vody, a vzniklý precipitát se odstraní centrifugací. Supernatant se nechá odpařit ve vakuu a surový produkt se čtyřikrát rekrystalizuje z horkého hexanu za vzniku 1,5 g čistého (98 %) diastereomeru. Volná báze se rozpustí v hexanu, přefiltruje, a poté se přidá HCl s etherem, čímž se vysráží produkt jako bílá sraženina s výtěžkem 1,1 g (6 %), teplota tání: měkne mezi 200 až 240 °C.

Příklad 10:

20

Syntéza sloučeniny 11x

hydrochlorid N-(4-izopropylbenzyl)-(R)-1-(1-naftyl)ethylaminu

Směs (R)-(+)-1-(1-naftyl)ethylaminu (1,06 g, 6,2 mmol), 4-izopropylbenzaldehydu (0,92 g, 6,2 mmol) a izopropoxidu titaničitého (2,2 g, 7,7 mmol) se 5 minut zahřívá na teplotu 100 °C a poté se 4 hodiny míchá za teploty místnosti. Poté se přidá kyanoborohydrid sodný (NaCNBH₃) (0,39 g, 6,2 mmol) s 1 ml ethanolu. Reakční směs se míchá 18 hodin za teploty místnosti. Poté se k reakční směsi přidá 100 ml etheru a 1 ml vody a vzniklý precipitát se odstraní centrifugací. Supernatant se nechá odpařit ve vakuu a surový produkt se chromatograficky rozdělí na silikagelu na koloně 50 mm x 30 cm. Jako elučního činidla se použije 1 % methanolu v chloroformu. Chromatograficky rozdělený materiál se poté rozpustí v hexanu a produkt se vysráží přidávkem HCl s etherem jako bílá sraženina. Výtěžek 0,67 g, 35 %, teplota tání: 257 až 259 °C.

35

Příklad 11:

Syntéza sloučeniny 12U

40 hydrochlorid N-3-(2-methylfenyl)-1-propyl-(R)-3-methoxy- α -methylbenzylaminu

Roztok 2-methylcinnamonitrilu (1,43 g, 10 mmol) v dichlormethanu (10 ml) se ochladí na 0 °C a pak se po dobu 15 minut po kapkách přidává 1M roztok diizobutylaluminiumhydridu (10 ml v dichlormethanu). Reakční směs se poté 15 minut míchá při teplotě 0 °C a po dalších 15 minut se k ní po kapkách přidává 1M roztok (R)-(+)-3-methoxy- α -methylbenzylaminu (1,51 g, 10 mmol) v dichlormethanu (10 ml). Reakční směs se poté další 1 hodinu míchá při teplotě 0 °C a pak se nalije do 100 ml ethanolického roztoku kyanoborohydridu sodného (1 g, 16 mmol). Reakční směs se v dalším kroku míchá 48 hodin při teplotě místnosti. Reakční směs se poté naředí etherem a neutralizuje se 1N NaOH.

50

Etherická fáze se odstraní a vysuší se bezvodým uhlíčitanem draselným za vzniku olejovité kapaliny. Tento materiál se chromatograficky přečistí na silikagelu. Jako elučního činidla se přitom použije gradientu od čistého dichlormethanu po 5% methanol v dichlormethanu. Výtěžkem je čistý nenasyčený meziprodukt s vlastnostmi GC/EI – MS (R_t = 10,06 min) m/z (rel. int.) 281 (M⁺, 17), 266 (59), 176 (19), 146 (65), 135 (73), 131 (100), 91 (21), 77 (13).

55

Tento nenasycený meziprodukt v ethanolu se hydrogenuje v přítomnosti palladia na uhlíku ve vodíkové atmosféře za tlaku $1,013 \cdot 10^5$ Pa. Hydrogenace probíhá 16 hodin při teplotě místnosti. Produkt této reakce se převede na hydrochloridovou sůl vytřepáním 1M HCl v diethyletheru.

5 Tento materiál (čistá volná báze) vykazoval následující vlastnosti GC/EI – MS ($R_t = 9,31$ min), m/z (rel. int.) 283 (M^+ , 21), 268 (100), 164 (12), 148 (8), 135 (85), 121 (12), 105 (49), 91 (23), 77 (21).

10 Příklad 12:

Syntéza sloučeniny 12V

hydrochlorid N-3-(3-methylfenyl)-1-propyl-(R)-3-methoxy- α -methylbenzylaminu

15

Sloučenina se připraví způsobem popsaným v příkladu 11, pouze s tím rozdílem, že se použije 2-methylcinnamonitril. Nenasyceným meziproduktem je čistá složka s vlastnostmi GC/EI – MS ($R_t = 10,21$ min) m/z (rel. int.) 281 (M^+ , 57), 266 (86), 146 (98), 135 (88), 131 (100), 115 (43), 102 (26), 91 (43), 77 (18). Redukce této látky a tvorba hydrochloridu probíhala způsobem

20 popsaným v příkladu 11. Vlastnosti produktu (čistá volná báze) byly následující GC/EI – MS ($R_t = 9,18$ min), m/z (rel. int.) 283 (M^+ , 19), 268 (100), 164 (11), 148 (8), 135 (76), 121 (16), 105 (45), 91 (23), 77 (21).

25 Příklad 13:

Syntéza sloučeniny 12Z

hydrochlorid N-3-(2-chlorfenyl)-1-propyl-(R)-1-(1-naftyl)-ethylaminu

30

Sloučenina se připraví způsobem popsaným v příkladu 11, pouze s tím rozdílem, že se použije 2-chlorhydrocinnamonitril a (R)-1-(+)-1-(1-naftyl)ethylamin v 10milimolárním měřítku. Meziprodukt se chromatograficky přečistí na silikagelu. Jako elučního činidla se přitom použije gradientu od čistého dichlormethanu po 5% methanol v dichlormethanu. Vzniká tak chromatograficky čistá složka (testováno TLC s 5% methanolem v dichlormethanu jakožto elučním

35 činidlem). Hydrochlorid tohoto meziproduktu se připraví pomocí 1M HCl v diethyletheru.

Příklad 14:

40

Syntéza sloučeniny 14U

hydrochlorid (R)-N-(1-(4-methoxyfenyl)ethyl)-(R)-1-(1-naftyl)ethylaminu

45

Směs (R)-(+)-1-(1-naftyl)ethylaminu (1,1 g, 6,2 mmol), 4'-methoxyacetofenonu (0,93 g, 6,2 mmol), izopropoxidu titaničitého (2,2 g, 7,7 mmol) a absolutního ethanolu (1 ml) se 3 hodiny zahřívá na 60 °C. Poté se přidá kyanoborohydrid sodný (NaCNBH_3) (0,39 g, 6,2 mmol) a reakční směs se míchá za teploty místnosti po dobu 18 hodin. Poté se přidá 200 ml etheru a 2 ml vody. Vzniklá sraženina se poté odstraní centrifugací. Supernatant se nechá odpařit ve vakuu a surový

50 produkt se chromatograficky rozdělí na silikagelu (kolona 25 mm x 25 cm). Jakožto elučního činidla se použije 1% methanol v chloroformu. Část tohoto produktu se použije na HPLC chromatografii na koloně Salectosil, 5 μM silikagel; 25 cm x 10,0 mm (Fenomenex, Torrance, CA) při průtokové rychlosti 4 ml/minutu. UV detekce byla prováděna při vlnové délce 275 nm. Jakožto elučního činidla bylo použito směsi 12 % ethylacetátu s 88 % hexanu. Eluční čas byl

12,0 minut. Pomocí HPLC purifikovaný diastereomer se poté rozpustí v hexanu a produkt se poté vysráží přidávkem HCl s etherem jako bílá sraženina (20 mg), teplota tání 209 až 210 °C.

5 Příklad 15:

Syntéza sloučeniny 17M

hydrochlorid N-(3-chlor-4-methoxybenzyl)-(R)-1-(1-naftyl)ethylaminu

10

Směs (R)-(+)-1-(1-naftyl)ethylaminu (6,6 g, 30 mmol), 3'-chlor-4'-methoxybenzaldehydu (6,6 g, 39 mmol) a izopropoxidu titaničitého (13,8 g, 48,8 mmol) se 30 ml absolutního ethanolu se 30 minut zahřívá na 80 °C a poté se míchá 3 hodiny za teploty místnosti. Poté se přidá kyano-borohydrid sodný (NaCNBH₃) (2,45 g, 39 mmol). Reakční směs se 18 hodin míchá za teploty místnosti. Po této době se k reakční směsi přidá 100 ml etheru a 2 ml vody a vzniklá sraženina se poté odstraní centrifugací. Supernatant se odpaří ve vakuu a surový produkt se chromatograficky přečistí na silikagelu (50 mm x 30 cm). Jako elučního činidla se použije dichlormethanu. Chromatograficky rozdělený materiál se poté rozpustí v 500 ml hexanu a odbarví se pomocí filtru Norit® (0,2 µm). Produkt se poté vysráží přidávkem HCl s etherem jako bílá sraženina (10,2 mg, výtěžek 56 %), teplota tání 241 až 242 °C.

20

Příklad 16:

25 Syntéza sloučeniny 17P

4-Methoxy-3-methylacetofenon (prekurzor sloučeniny 17P). Směs 4'-hydroxy-3'-methylacetofenonu (5,0 g, 33,3 mmol), methyljodidu (5,7 g, 40,0 mmol), granulovaného bezvodého uhličitanu draselného (23,0 g, 167 mmol), a acetonu (250 ml) se míchá 3 hodiny. Poté se reakční směs ochladí na pokojovou teplotu, filtrací se odstraní anorganické soli a nechá se odpařit ve vakuu. Surový produkt se rozpustí ve 100 ml etheru a promyje se 2 x 20 ml vody. Organická fáze se vysuší síranem sodným a nechá se odpařit. Výtěžek produktu je 4,5 g (82,4 %). Získaný keton se použije v následující reakci bez dalšího přečišťování.

30

35 hydrochlorid (R)-N-(1-(4-methoxy-3-methylfenyl)ethyl)-(R)-1-(1-naftyl)ethylaminu (Sloučenina 17P)

Směs (R)-(+)-1-(1-naftyl)ethylaminu (4,24 g, 24,8 mmol), 4'-methoxy-3'-methylacetofenonu (4,06 g, 24,8 mmol), a izopropoxidu titaničitého (8,8 g, 30,9 mmol) s 1 ml absolutního ethanolu se zahřívá 2 hodiny na 100 °C. Poté se přidá 45 ml izopropanolu a reakční směs se ochladí na 10 °C v ledové lázni. Poté se po částech 15 minut přidává triacetyloxyborohydrid sodný (NaHB(O₂CCH₃)₃, 10,5 g, 49,5 mmol). Reakční směs se 18 hodin zahřívá na teplotu 70 °C. Poté se ochladí na pokojovou teplotu a nalije se do 400 ml etheru. Suspenze se zcentrifuguje, supernatant se odebere a peleta se promyje 400 ml etheru. Organická rozpouštědla se nechají odpařit ve vakuu. Zbytek se rozpustí ve 400 ml etheru a promyje se 1N NaOH (4 x 50 ml) a 2 x 50 ml vody. Organická fáze se vysuší pomocí síranu sodného, přefiltruje se a nechá se odpařit ve vakuu. K vlhkému zbytku se přidá absolutní ethanol, který se poté důkladně odpaří na rotační odparce do formy olejovité kapaliny. Směs se poté chromatograficky rozdělí na silikagelu (50 mm x 30 cm). Jako elučního činidla se použije 1% methanol, 1% IPA:CHCl₃. Výtěžek činí 4,8 g oleje.

45

50

Požadovaný diastereomer se dále čistí pomocí HPLC chromatografie [SUPELCOSIL™ PLC – Si, 18 µm silikagel; 25 cm x 21,2 mm, výrobce Supelco; Inc., Bellefonte, PA). Průtoková rychlost 7 ml rozpouštědla za minutu, UV detekce při vlnové délce 275 nm. Jako eluční činidlo se použije směs 20 % ethylacetátu a 80 % hexanu, eluční čas je 9,5 – 11,0 min). Nástříky směsi (800 µl

aliquoty obsahující 100 mg/ml eluentu) poskytly 65 mg požadovaného izomeru. Několikánásobným nástřikem do HPLC aparatury bylo dosaženo výtěžku 1 g purifikovaného produktu. Takto rozdělený materiál se rozpustí v 50 ml hexanu a převede se na hydrochlorid přidávkem HCl s etherem. Sůl se oddělí od rozpouštědla na fritě a promyje se hexanem. Výtěžek činí 1,0 g
 5 bílé sraženiny s teplotou tání 204 až 205 °C.

Příklad 17:

10 Syntéza sloučeniny 17X

3-Chlor-4-methoxybenzaldehyd

Směs 3-chlor-4-hydroxybenzaldehydu (25 g, 160 mmol), methyljodidu (27,25 g, 192 mmol), bezvodého granulovaného uhličitanu draselného (110,6 g, 800 mmol) a acetonu (300 ml) se
 15 3 hodiny zahřívá pod zpětným chladičem. Reakční směs se poté ochladí na pokojovou teplotu. Poté se přidá 500 ml diethyletheru a směs se přefiltruje přes papírový filtr, aby se odstranily anorganické nerozpustné složky. Filtrát se nechá odpařit za sníženého tlaku, rozpustí se v 800 ml diethyletheru a promyje se 3 x 100 ml 0,1N NaOH. Organická fáze se suší pomocí síranu
 20 sodného a nechá se odpařit ve vakuu. Výtěžek surového produktu činí 24 g (92 %). Tento materiál se dále chromatograficky čistí na silikagelové koloně (50 mm x 30 cm). Jako elučního činidla se přitom použije směs hexan/ethylacetát 5:1. Výtěžek činí 15,02 g (56 %) produktu ve formě bílé sraženiny s těmito vlastnostmi: TLC (hexan – EtOAc, 5:1) $R_f = 0,24$; GC
 $R_t = 4,75$ min; MS (EI) m/z 170 (M^+), 172 ($M+2$).

25 1-Methyl-(3'-chlor-4'-methoxybenzyl)alkohol

Směs 3-chlor-4-methoxybenzaldehydu (13 g, 76,5 mmol), methylmagneziumchloridu (52 g,
 30 153 mmol) a THF (300 ml) se 3 hodiny zahřívá pod zpětným chladičem. Reakční směs se poté ochladí na teplotu místnosti. Poté se přidá po kapkách 6 ml nasyceného roztoku NH_4Cl a nato 500 ml diethyletheru a směs se přefiltruje přes filtrační papír, aby se odstranily nerozpustné anorganické složky. Filtrát se nechá odpařit za sníženého tlaku a vzniklá pevná látka se rozpustí ve 300 ml diethyletheru. Poté se promyje 4 x 25 ml vody. Organická fáze se vysuší pomocí
 35 síranu sodného a nechá se odpařit ve vakuu. Výtěžek surového produktu činí 11,3 g (80 %). Tento materiál se dále chromatograficky čistí na silikagelové koloně (50 mm x 30 cm). Jako elučního činidla se přitom použije dimethylchlorid. Výtěžek činí 11,3 g (63 %) produktu ve formě olejovité kapaliny s těmito vlastnostmi: TLC (CH_2Cl_2) $R_f = 0,25$; GC $R_t = 5,30$ min; MS (EI) m/z 186 (M^+), 188 ($M+2$).

40 3'-chlor-4'-methoxyacetofenon

Směs 1-methyl-(3'-Chlor-4'-methoxybenzyl)alkoholu (7,6 g, 41 mmol), pyridiniumchlorochromátu (PCC, 13,16 g, 61,5 mmol) ve 300 ml dichlormethanu se 2 hodiny míchá za teploty
 45 místnosti. Poté se přidá 1000 ml diethyletheru a vzniklá směs se umístí na chromatografickou kolonu obsahující silikagel (50 mm x 30 cm). Jako eluční činidlo se použije diethylether.

Výtěžek surového tuhého produktu činí 7,3 g (97 %). Analýzou tohoto materiálu pomocí GC byla prokázána jeho 99% čistota. Proto byl použit pro další reakce bez dalšího přečištění. TLC (diethylether) $R_f = 1,0$; GC $R_t = 5,3$ min; MS (EI) m/z 184 ($M+1$) 184 ($M+2$).

50 (R,R)-N-(1-Ethyl-4'-methoxy-3'-chlorfenyl)-1-(1-naftylethyl)amin

Směs 3'-chlor-4'-methoxyacetofenonu (5,3 g, 29 mmol), (R)-(+)-1-(1-naftyl)ethylaminu (4,98 g, 29 mmol), izopropoxidu titaničitého (10,2 g, 36 mmol) a izopropanolu (20 ml) se
 55 3 hodiny zahřívá na 100 °C. Poté se po částech 10 minut přidává triacetyloxyborohydrid sodný

($\text{NaBH}(\text{O}_2\text{CCH}_3)$; 12,29 g, 58 mmol). Reakční směs se 30 minut zahřívá pod zpětným chladičem, poté se 1 hodinu míchá za teploty místnosti. Směs se poté nalije do 500 ml diethyletheru. Po přidavku 2 ml vody se ze suspenze odstraní centrifugací jemné sražené částičky soli titanu. Supernatant se odebere a peleta se promyje 500 ml etheru. Spojené organické fáze se vysuší pomocí síranu sodného a poté se nechají odpařit ve vakuu. Výtěžek surového tuhého produktu činí 6,81 g, (70 %).

Tento materiál se dále chromatograficky čistí na silikagelu (50 mm x 30 cm). Jako elučního činidla se použije směs 3 % methanolu s 97 % dichlormethanu. Výsledný meziprodukt má formu olejovité kapaliny (2,01 g). Diastereomer se dále čistí rekrystalizací. Volná báze (1,98 g) se převede na svůj hydrochlorid přidavkem HCl s etherem. Tato sůl se rozpustí v 65 ml horkého izopropanolu (65 ml) a roztok se přefiltruje přes papírový filtr.

Filtrát se nechá odpařit ve vakuu a odparek se rozpustí v 30 ml izopropanolu. Po 18hodinovém stání za teploty místnosti se odebere krystalická pevná látka, promyje se 20 ml studeného izopropanolu a vysuší se. Výtěžek činí 0,87 g, (40 % volné báze) diastereomerně čistého hydrochloridu: teplota tání 236 až 237 °C; TLC (methanol/dichlormethan (99:1)) $R_f = 0,25$; GC $R_t = 11,06$ min; FTIR (v peletě KBr , cm^{-1}), 3433, 2950, 2931, 2853, 2803, 2659, 2608, 2497, 1604, 1595, 1504, 1461, 1444, 1268, 1260, 1067, 1021, 802, 781, 733; MS (EI) m/z 339 (M^+), 341 ($\text{M}+2$).

Příklad 18:

Protokol dodatečných syntéz. Příprava sloučenin 22Z a 23A

K míchanému roztoku hydridu sodného (2,173 g, 60% roztoku v oleji, 54,325 mmol) ve 100 ml dimethylformamidu se po kapkách přidá triethylfosfonoacetát (12,47 g, 55,65 mmol). Reakční směs se poté 30 minut míchá za teploty místnosti. Po této době se po kapkách přidá roztok *m*-trifluoromethoxybenzaldehydu (10,0 g, 52, 6 mmol) v 50 ml dimethylformamidu, roztok se 30 minut míchá za teploty místnosti a dalších 30 minut při teplotě 100 °C. Reakce se zastaví přidavkem vody, přenese se do dělicí nálevky s diethyletherem. Etherická fáze (50 ml) se čtyřikrát promyje 500 ml nasyceného roztoku chloridu amonného, vysuší se bezvodým síranem hořečnatým, přefiltruje se a koncentruje se. Produktem je ethyltrifluormethoxycinnamát ve formě olejovité kapaliny s následujícími vlastnostmi m/z (rel. int.) 260 (M^+ , 19), 232 (16), 215 (100), 187 (21), 101 (28).

Ethylester ve 100 ml ethanolu se redukuje ve vodíkové atmosféře 414 kPa (60 p.s.i.). Jako katalyzátoru se přitom použije 10 % hmotnostních hydroxidu palladnatého. Po redukcii (2 hodiny, teplota místnosti) se reakční směs přefiltruje a koncentruje. Produktem je ethyl-*m*-trifluormethoxyhydrocinnamát ve formě olejovité kapaliny s vlastnostmi: m/z (rel. int.) 262 (M^+ , 16), 217 (7), 188 (100), 175 (28), 103 (31), 91 (18), 77 (23).

Nasycený ethylester se 16 hodin hydrolyzuje v roztoku ethanol – 10 M hydroxid sodný (1:1). Po dokončení hydrolýzy se roztok okyselí a produkt se vytřepe do diethyletheru. Etherická fáze se vysuší bezvodým síranem hořečnatým a zakoncentruje se. Produktem je *m*-trifluormethoxyhydrocinnová kyselina ve formě pevné látky s vlastnostmi: m/z (rel. int.) 234 (M^+ , 46), 188 (100), 174 (65), 103 (27), 91 (12), 77 (17).

Vzniklá kyselina se 4 hodiny míchá v přebytku thionylchloridu za teploty místnosti. Přbytek thionylchloridu se odpaří za sníženého tlaku a teploty 100 °C. Produktem je *m*-trifluormethoxyhydrocinnamylchlorid ve formě olejovité kapaliny. Produkt se dále použije bez dalšího přečištění.

Roztok *m*-trifluormethoxyhydrocinnamylchloridu (9,8 g, 39 mmol) v tetrahydrofuranu se ochladí na -78 °C a po kapkách se k němu přidává 13 ml 3M roztoku methylmagneziumbromidu v tetra-

hydrofuranu (39 mmol). Reakční směs se 4 hodiny míchá za teploty -78°C a pak 8 hodin za teploty místnosti. Reakce se ukončí zředěnou HCl. Reakční směs se vytřepe do diethyletheru, ether se vysuší bezvodým síranem hořečnatým, přefiltruje se a zakoncentruje se do olejovité kapaliny. Chromatograficky lze tento materiál na silikagelu v hexan-acetonovém gradientu rozdělit a vyčistit tak 4-(3-trifluormethoxyfenyl)-2-butanon jako olejovitou kapalinu s vlastnostmi: m/z (rel. int.) 232 (M^+ , 68), 217 (7), 189 (59), 175 (31), 103 (28), 43 (100).

Roztok 4-(3-trifluormethoxyfenyl)-2-butanonu (2,32 g, 10 mmol), (R)-1-(3-methanoloxyfenyl)ethylaminu (1,51 g, 7,0 mmol) a izopropoxidu titaničitého (3,55 g, 12,5 mmol) se 4 hodiny míchá za teploty místnosti. K reakční směsi se poté přidá 10 ml 1M ethanolického roztoku kyanoborohydridu sodného (10 mmol) a reakční směs se míchá 16 hodin za teploty místnosti. Reakční směs se poté naředí 50 ml diethyletheru vytřepává se s 0,72 ml vod (40 mmol).

Po důkladném protřepání se roztok odstředí a etherická fáze se dekantuje a zakoncentruje do formy tuhé olejovité látky. Odparek se suspenduje v diethyletheru, přefiltruje se přes filtr $0,45\ \mu\text{m}$ CR PTFE Acrodisc a zakoncentruje se. Produktem je čirý olej. Po opakované preparativní tenkovrstevné chromatografii za použití 5 % methanolu v chloroformu jako elučního činidla vznikají dva diastereoizomery: (S,R)-N-[4-(3-trifluormethoxyfenyl)-2-butyl]-1-(3-methoxyfenyl)ethylamin – sloučenina 22z – s vlastnostmi (m/z (rel. int.) 367 (M^+ , 3), 352 (20), 232 (4), 178 (47), 135 (100), 105 (14), 91 (10), 77 (11)) a (R,R)-N-[4-(3-trifluormethoxyfenyl)-2-butyl]-1-(3-methoxyfenyl)ethylamin – sloučenina 23A; m/z (rel. int.) 367 (M^+ , 3), 352 (19), 232 (7), 178 (43), 135 (100), 105 (19), 91 (10), 77 (11).

Příprava sloučenin 22X a 22Y

Podobným způsobem se smísí stejná molární množství 4-(3-trifluormethoxyfenyl)-2-butanonu; (R)-1-(1-naftyl)ethylaminu a 1,25 ekvivalentu izopropoxidu titaničitého a intermediární imin se redukuje ethanolickým roztokem kyanoborohydridu sodného. Opakovanou preparativní tenkovrstevnou chromatografií za použití 5 % methanolu v chloroformu se připraví (S,R)-N-(4-(3-trifluormethoxyfenyl)-2-butyl)-1-(1-naftyl)ethylamin, sloučenina 22X s následujícími vlastnostmi: m/z (rel. int.) 387 (M^+ , 3), 372 (15), 198 (15), 176 (12), 155 (100), 128 (8), 115 (6), 109 (4), 103 (5), 77 (8) a (R,R)-N-[4-(3-trifluormethoxyfenyl)-2-butyl]-1-(1-naftyl)ethylamin, sloučenina 22Y, s vlastnostmi: m/z (rel. int.) 387 (M^+ , 2), 372 (12), 198 (16), 176 (11), 155 (100), 128 (8), 115 (6), 109 (4), 103 (5), 77 (8).

Příprava sloučeniny 4T

Podobným způsobem jako v předchozích příkladech se smísí stejná molární množství 4-(2-chlorfenyl)-2-butanonu, připraveného z o-chlorbenzaldehydu, a dále pak (R)-1-(3-methoxyfenyl)ethylaminu a 1,25 násobek ekvivalentního množství izopropoxidu titaničitého. Intermediární imin se redukuje ethanolickým roztokem kyanoborohydridu sodného. Opakovanou preparativní tenkovrstevnou chromatografií za použití 5 % methanolu v chloroformu se připraví (R,R)-N-(4-(2-chlorfenyl)-2-butyl)-1-(3-methoxyfenyl)ethylamin, sloučenina 4T, s vlastnostmi: m/z (rel. int.) 317 (M^+ , 3), 302 (16), 178 (62), 178 (62), 135 (100), 125 (15), 105 (10), 91 (6), 77 (8).

Příprava sloučeniny 21Y

Podobným způsobem jako v předchozích příkladech se smísí stejná molární množství 4-(3-trifluormethylfenyl)-2-butanonu, připraveného z m-trifluoromethylbenzaldehydu, a dále pak (R)-1-(3-methoxyfenyl)ethylaminu a 1,25 násobek ekvivalentního množství izopropoxidu titaničitého. Intermediární imin se redukuje ethanolickým roztokem kyanoborohydridu sodného. Opakovanou preparativní tenkovrstevnou chromatografií za použití 5 % methanolu v chloroformu se připraví (R,R)-N-[4-(3-trifluormethylfenyl)-2-butyl]-1-(3-methoxyfenyl)ethylamin, sloučenina 21Y, s vlastnostmi: m/z (rel. int.) 351 (M^+ , 2), 336 (18), 216 (4), 202 (3), 178 (45), 135 (100), 105

(13), 91 (9), 77 (81) a (S,R)-N-[4-(3-trifluormethylfenyl)-2-butyl]-1-(3-methoxyfenyl)ethylamin, sloučenina 21X.

Příprava sloučeniny 25C a 25D

5

Podobným způsobem jako v předchozích příkladech se smísí stejná molární množství 4-(3-trifluormethylfenyl)-2-butanonu, (R)-1-(1-naftyl)ethylaminu a 1,25 násobek ekvivalentního množství izopropoxidu titaničitého. Intermediální imin se redukuje ethanolickým roztokem kyanoborohydridu sodného. Opakovanou preparativní tenkovrstevnou chromatografií za použití 5 % methanolu v chloroformu se připraví (S,R)-N-[4-(3-trifluormethylfenyl)-2-butyl]-1-(1-naftyl)ethylamin, sloučenina 25C, s vlastnostmi: [m/z (rel. int.) 371 (M⁺, 3), 356 (16), 198 (15), 155 (100), 129 (8), 115 (5), 109 (3), 77 (2) a (R,R)-N-[4-(3-trifluormethylfenyl)-2-butyl]-1-(1-naftyl)ethylamin, sloučenina 25D, s vlastnostmi: m/z (rel. int.) 371 (M⁺, 3), 356 (16), 198 (15), 155 (100), 129 (8), 115 (5), 109 (3), 77 (2).

15

Příprava sloučeniny 25C a 25D

Podobným způsobem jako v předchozích příkladech se smísí stejná molární množství 4-fenyl-2-butanonu (Aldrich Chemical Co.), (R)-1-(3-methoxyfenyl)ethylaminu a 1,25 násobek ekvivalentního množství izopropoxidu titaničitého. Intermediální imin se redukuje ethanolickým roztokem kyanoborohydridu sodného. Opakovanou preparativní tenkovrstevnou chromatografií za použití 5 % methanolu v chloroformu se připraví (R,R)-N-(4-fenyl-2-butyl)-1-(3-methoxyfenyl)ethylamin, sloučenina 21D s vlastnostmi: m (rel. int.) 283 (M⁺, 4), 268 (13), 178 (45), 135 (100), 105 (15), 91 (43), 71 (11) a (S,R)-N-(4-fenyl-2-butyl)-1-(3-methoxyfenyl)ethylamin, sloučenina 21E.

25

Příprava sloučeniny 21F

Podobným způsobem jako v předchozích příkladech se smísí stejná molární množství 4-fenyl-2-butanonu (Aldrich Chemical Co.), (R)-1-(1-naftyl)ethylaminu a 1,25 násobek ekvivalentního množství izopropoxidu titaničitého. Intermediální imin se redukuje ethanolickým roztokem kyanoborohydridu sodného. Opakovanou preparativní tenkovrstevnou chromatografií za použití 5 % methanolu v chloroformu se připraví (R,R)-N-(4-fenyl-2-butyl)-1-(1-naftyl)ethylamin, sloučenina 21F, s vlastnostmi: m/z (rel. int.) 303 (M⁺, 6), 288 (14), 198 (22), 155 (100), 129 (8), 115 (5), 91 (19), 77 (4).

35

Příprava sloučeniny 12Z

Roztok 2-chlorhydrocinnamonitrilu (Aldrich Chemical Co., 1,66 g, 10 mmol) ve 100 ml dichlormethanu se za stálého míchání ochladí na -78 °C. K tomuto roztoku se po kapkách přidává 1,42 g diizobutylaluminiumhydridu (10 mmol). Reakční směs se míchá 1 hodinu za teploty místnosti, pak se ochladí na -78 °C a pak se k ní přidá roztok 1-(1-naftyl)ethylaminu (1,71 g, 10 mmol) ve 25 ml dichlormethanu. Poté se reakční směs převede do ledové lázně a míchá se 2 hodiny. Po této době se reakční směs nalije přímo do dobře míchaného ethanolického roztoku borohydridu sodného (50 ml, 0,2M, 10 mmol). Reakční směs se za teploty místnosti míchá 30 minut v přebytku borohydridu sodného. Reakce se ukončí přidávkem 10% HCl. Přidávkem 10N NaOH se reakce roztoku zalkalizuje a směs se převede do dělicí nálevky. Zde se promyje 300 ml diethyletheru. Vodní fáze se odstraní a organická fáze se poté promyje 1N NaOH (3 x 100 ml) a poté vysuší bezvodým síranem hořečnatým. Směs se zakoncentruje do formy olejovité kapaliny.

50

Chromatografií tohoto materiálu na silikagelové koloně v gradientu chloroform až 10% roztok methanolu v chloroformu se připraví 2,34 g (výtěžek 72 %) (R)-N-(3-(2-chlorfenyl)propyl)-1-(1-naftyl)ethylamin, sloučenina 12Z, ve formě čiré olejovité kapaliny s těmito vlastnostmi: m/z

(rel. int.) 323 (M^+ , 2), 308 (63), 288 (7), 196 (5), 184 (5), 155 (100), 125 (24), 115 (8), 103 (4), 91 (3), 77 (7).

Příprava sloučeniny 12B

5

Podobným způsobem jako v předchozích příkladech se smísí 4-methylcinnamonitril s diizobutylaluminiumhydridem. K intermediátnímu komplexu hliník-imin se přidá (R)-1-(3-methoxyfenyl)ethylamin. Ke vzniklému intermediátnímu iminu se přidá ethanolický roztok borohydridu sodného. Poté se chromatograficky přečistí (R)-N-[3-(4-methylfenyl)prop-2-enyl]-1-(3-methoxyfenyl)ethylamin, sloučenina 12B ve formě čiré bezbarvé olejovité kapaliny s vlastnostmi: m/z (rel. int.) 281 (M^+ , 6), 266 (5), 176 (27), 146 (75), 135 (63), 131 (100), 115 (25), 105 (21), 91 (21), 77 (21).

10

Příprava sloučeniny 12C

15

Podobným způsobem jako v předchozích příkladech se smísí 2-methylcinnamonitril s diizobutylaluminiumhydridem. K intermediátnímu komplexu hliník-imin se přidá (R)-1-(3-methoxyfenyl)ethylamin. Ke vzniklému intermediátnímu iminu se přidá ethanolický roztok borohydridu sodného. Poté se chromatograficky přečistí (R)-N-[3-(2-methylfenyl)prop-2-enyl]-1-(3-methoxyfenyl)ethylamin, sloučenina 12C, ve formě čiré bezbarvé olejovité kapaliny s vlastnostmi: m/z (rel. int.) 281 (M^+ , 4), 266 (15), 176 (18), 146 (62), 135 (58), 131 (100), 115 (23), 105 (19), 91 (38), 77 (17).

20

Příprava sloučeniny 12D

25

Podobným způsobem jako v předchozích příkladech se smísí 2,4,6-trimethylcinnamonitril s diizobutylaluminiumhydridem. K intermediátnímu komplexu hliník-imin se přidá (R)-1-(3-methoxyfenyl)ethylamin. Ke vzniklému intermediátnímu iminu se přidá ethanolický roztok borohydridu sodného. Poté se chromatograficky přečistí (R)-N-[3-(2,4,6-trimethylfenyl)prop-2-enyl]-1-(3-methoxyfenyl)ethylamin, sloučenina 12D ve formě čiré bezbarvé olejovité kapaliny s vlastnostmi: m/z (rel. int.) 309 (M^+ , 8), 294 (25), 174 (82), 159 (100), 135 (52), 129 (29), 105 (21), 91 (17), 77 (14).

30

Příprava sloučeniny 12E

35

Podobným způsobem jako v předchozích příkladech se smísí 4-izopropylcinnamonitril s diizobutylaluminiumhydridem. K intermediátnímu komplexu hliník-imin se přidá (R)-1-(3-methoxyfenyl)ethylamin. Ke vzniklému intermediátnímu iminu se přidá ethanolický roztok borohydridu sodného. Poté se chromatograficky přečistí (R)-N-[3-(4-izopropylfenyl)prop-2-enyl]-1-(9-methoxyfenyl)ethylamin, sloučenina 12E, ve formě čiré bezbarvé olejovité kapaliny s vlastnostmi: m/z (rel. int.) 309 (M^+ , 9), 294 (7), 174 (98), 159 (22), 135 (80), 117 (100), 105 (35), 91 (37), 77 (19).

40

Příprava sloučeniny 12F

45

Obdobným způsobem jako v předcházejícím příkladu se smísí 2,4-dimethylcinnamonitril s diizobutylaluminiumhydridem. K intermediátnímu komplexu hliník-imin se přidá (R)-1-(3-methoxyfenyl)ethylamin. Ke vzniklému intermediátnímu iminu se přidá ethanolický roztok borohydridu sodného. Poté se chromatograficky přečistí (R)-N-[3-(2,4-dimethylfenyl)prop-2-enyl]-1-(3-methoxyfenyl)ethylamin, sloučenina 12F, ve formě čiré bezbarvé olejovité kapaliny s vlastnostmi: m/z (rel. int.) 295 (M^+ , 8), 294 (15), 174 (29), 160 (75), 145 (100), 135 (68), 117 (21), 105 (30), 91 (26), 77 (19).

50

Příprava sloučeniny 12G

Obdobným způsobem jako v předcházejícím příkladu se smísí 3-methylcinnamonitril s diizobutylaluminiumhydridem. K intermediátnímu komplexu hliník-imin se přidá (R)-1-(3-methoxyfenyl)ethylamin. Ke vzniklému intermediátnímu iminu se přidá ethanolický roztok borohydridu sodného. Poté se chromatograficky přečistí (R)-N-[3-(3-methylfenyl)prop-2-enyl]-1-(3-methoxyfenyl)ethylamin, sloučenina 12G, ve formě čiré bezbarvé olejovité kapaliny s vlastnostmi: m/z (rel. int.) 281 (M^+ , 5), 266 (9), 176 (24), 146 (71), 135 (62), 131 (100), 115 (23), 105 (19), 91 (41), 77 (18).

Příprava sloučeniny 25E

Obdobným způsobem jako v předcházejícím příkladu se smísí cinnamonitril s diizobutylaluminiumhydridem. K intermediátnímu komplexu hliník-imin se přidá (R)-1-(3-methoxyfenyl)ethylamin. Ke vzniklému intermediátnímu iminu se přidá ethanolický roztok borohydridu sodného. Poté se chromatograficky přečistí (R)-N-(3-fenylprop-2-enyl)-1-(3-methoxyfenyl)ethylamin, sloučenina 25E, ve formě čiré bezbarvé olejovité kapaliny s vlastnostmi: m/z (rel. int.) 267 (M^+ , 3), 252 (14), 176 (17), 135 (62), 117 (100), 105 (28), 91 (56), 77 (33).

Příprava sloučeniny 25G

Podobným způsobem jako v předchozích příkladech se smísí α -methylcinnamonitril s diizobutylaluminiumhydridem. K intermediátnímu komplexu hliník-imin se přidá (R)-1-(3-methoxyfenyl)ethylamin. Ke vzniklému intermediátnímu iminu se přidá ethanolický roztok borohydridu sodného. Poté se chromatograficky přečistí (R)-N-(2-methyl-3-fenylprop-2-enyl)-1-(3-methoxyfenyl)ethylamin, sloučenina 25G, ve formě čiré bezbarvé olejovité kapaliny s vlastnostmi: m/z (rel. int.) 281 (M^+ , 5), 266 (18), 190 (12), 146 (78), 135 (82), 131 (100), 115 (21), 105 (21), 91 (62), 77 (19).

Příprava sloučeniny 6X

K míchanému roztoku hydridu sodného (1,8 g, 75 mmol) ve 150 ml dimethylformamidu se přidá roztok diethylkyanomethylfosfonátu (13,5 g, 75 mmol) v 50 ml dimethylformamidu. Reakční směs se 30 minut míchá za teploty místnosti. Po této době se k reakční směsi přidá 10,54 g 3-chlorbenzaldehydu (75 mmol) a směs se míchá 1 hodinu za teploty místnosti a dalších 30 minut při teplotě 60 °C. Reakce se ukončí přidávkou 200 ml vody. Poté se směs převede do dělicí nálevky s 300 ml diethyletheru. Po důkladném protřepání se organická fáze promyje vodou (5 x 300 ml). Organická fáze se poté vysuší bezvodým uhlíčitanem draselným a zakoncentruje. Výtěžek činí 11,6 g 3-chlorcinnamonitrilu ve formě pevné látky. Sraženina se rozpustí v 50 ml tetrahydrofuranu a přidá se k ní přebytek diboranu. Reakční směs se míchá 30 minut za teploty místnosti, a poté se nalije na led s 10% HCl. Kyselá vodná fáze se promyje 2x200 ml diethyletheru. Poté se vodní fáze zneutralizuje přidávkou 10N NaOH a extrahuje se diethyletherem (200 ml). Etherický extrakt se vysuší bezvodým uhlíčitanem draselným a zakoncentruje se do formy olejovité kapaliny. K tomuto roztoku (0,6 g, 3,54 mmol) 3-(3-chlorfenyl)propylaminu se přidá 3-(3-trichlorfenyl)propylamin (0,6 g, 3,54 mmol), 3'-methoxyacetofenon (0,53 g, 3,54 mmol) a 1,25 molární nadbytek izopropoxidu titaničitého (1,26 g, 4,43 mmol). Reakční směs se míchá 4 hodiny za teploty místnosti. K intermediátnímu iminu se přidá 5 ml 1M ethanolického roztoku kyanoborohydridu sodného (5 mmol) a směs se míchá 16 hodin za teploty místnosti. Reakce se ukončí přidávkou 50 ml diethyletheru a 0,32 ml vody (17,7 mmol). Po důkladném protřepání se z roztoku odstraní centrifugací etherická fáze, která se zakoncentruje do formy mléčné zabarvené sraženiny. Tento materiál se resuspenduje v diethyletheru a přefiltruje se pomocí 0,45 μ M CR PTFE Acrodisc filtru. Promytá etherická fáze se poté zakoncentruje do formy olejovité kapaliny. Z této kapaliny se pomocí chromatografie na silikagelu a preparativní tenkovrstvé chromatografie s použitím 3 % methanolu v dichlormethanu (s obsahem 1 %

izopropylaminu) jakožto elučního činidla připraví N-[3-(3-chlorfenyl)propyl]-1-(3-methoxyfenyl)ethylamin, sloučenina 6X s těmito vlastnostmi: m/z (rel. int.) 303 (M^+ , 3), 288 (40), 196 (3), 164 (8), 135 (100), 125 (46), 103 (26), 91 (29), 77 (29).

5 Příprava sloučeniny 6V

Stejná molární množství 3-(4-chlorfenyl)propylaminu, připraveného podobným způsobem z chlorbenzaldehydu, 3'-methoxyacetofenonu a 1,25 molární přebytek izopropoxidu titaničitého se míchají 4 hodiny za teploty místnosti. K intermediárnímu iminu se přidá 5 ml 1M ethanolického roztoku kyanoborohydridu sodného (5 mmol). Po zpracování a chromatografickém přečištění se získá N-[3-(4-chlorfenyl)propyl]-1-(3-methoxyfenyl)ethylamin, sloučenina 6V, ve formě olejovité kapaliny s vlastnostmi: m/z (rel. int.) 303 (M^+ , 8), 288 (91), 196 (4), 164 (10), 135 (100), 125 (61), 103 (21), 91 (21), 77 (18).

15 Příprava sloučeniny 20A

Podobným způsobem jako v předchozím příkladu se smísí stejná molární množství 1-(1-methoxyfenyl)ethylaminu, 4-t-butylacetofenonu a 1,25 molární přebytek izopropoxidu titaničitého. Reakční směs se míchá 4 hodiny za teploty místnosti a k intermediárnímu iminu se přidá 5 ml 1M ethanolického roztoku kyanoborohydridu sodného (5 mmol). Po zpracování a chromatografickém přečištění se získá (R)-N-[1-(4-t-butylfenyl)ethyl]-1-(1-naftyl)ethylamin, sloučenina 20A, ve formě olejovité kapaliny s vlastnostmi: m/z (rel. int.) 331 (M^+ , 12), 316 (29), 161 (70), 155 (100), 131 (14), 127 (13), 115 (10), 105 (6), 91 (10), 77 (7).

25 Příprava sloučenin 25H a 25I

Podobným způsobem jako v předchozích příkladech se smísí ekvivalentní molární množství (R)-1-(3-methoxyfenyl)ethylaminu, trans-4-fenyl-3-buten-2-onu a 1,25 molární přebytek izopropoxidu titaničitého. Reakční směs se míchá 4 hodiny za teploty místnosti a k intermediárnímu iminu se přidá 5 ml 1M ethanolického roztoku kyanoborohydridu sodného (5 mmol). Po zpracování a chromatografickém přečištění se získá (R,R)-N-(2-methyl-4-fenylbut-3-enyl)-1-(3-methoxyfenyl)ethylamin, sloučenina 25H, ve formě olejovité kapaliny s vlastnostmi: m/z (rel. int.) 283 (M^+ , 4), 268 (13), 178 (40), 135 (100), 105 (15), 91 (47), 77 (13) a (S,R)-N-(2-methyl-4-fenylbut-3-enyl)-1-(3-methoxyfenyl)ethylamin, sloučenina 25I, ve formě olejovité kapaliny s vlastnostmi: m/z (rel. int.) 283 (M^+ , 4), 268 (13), 178 (40), 135 (100), 105 (15), 91 (47), 77 (13).

Příprava sloučenin 16M a 16L

Podobným způsobem jako v předchozích příkladech se smísí ekvivalentní molární množství (R)-1-(3-methoxyfenyl)ethylaminu, 3-methoxyacetofenonu a 1,25 molární přebytek izopropoxidu titaničitého. Reakční směs se míchá 4 hodiny za teploty místnosti a k intermediárnímu iminu se přidá 5 ml 1M ethanolického roztoku kyanoborohydridu sodného (5 mmol). Po zpracování a chromatografickém přečištění je výtěžkem (R,R)-N-(1-(4-methoxyfenyl)ethyl)-1-(3-methoxyfenyl)ethylamin, sloučenina 16L ve formě olejovité kapaliny s vlastnostmi: m/z (rel. int.) 284 ($M-1$, 1), 270 (85), 150 (83), 135 (100), 120 (12), 105 (28), 91 (25), 77 (23), (S,R)-N-[1-(4-methoxyfenyl)ethyl]-1-(3-methoxyfenyl)ethylamin, sloučenina 16M, ve formě olejovité kapaliny s vlastnostmi: m/z (rel. int.) 284 ($M-1$, 1), 270 (53), 150 (98), 135 (100), 120 (11), 105 (33), 91 (25), 77 (23).

50

Příprava sloučeniny 5B/5C

Podobným způsobem jako v předchozích příkladech se 4-chloracetofenon použije pro přípravu 3-methyl-3-(4-chlorfenyl)cinnamonitrilu. Nitril se poté 2 hodiny katalyticky redukuje vodíkem o tlaku 413 kPa na hydroxidu palladia v prostředí kyseliny octové za vzniku 3-methyl-3-(4-

55

chlorfenyl)propylaminu. Stejná molární množství tohoto aminu, 3'-methoxyacetofenonu a 1,25 násobek molárního ekvivalentu izopropoxidu titaničitého se míchají 4 hodiny za teploty místnosti a k intermediárnímu iminu se přidá 5 ml 1M ethanolického roztoku kyanoborohydridu sodného (5 mmol). Po zpracování a chromatografickém přečištění je výtěžkem N-(3-methyl-3-(4-chlorfenyl)propyl)-1-(3-methoxyfenyl)ethylamin, sloučenina 5B/5C, ve formě olejovité kapaliny s vlastnostmi: m/z (rel. int.) 317 (M^+ , 12), 302 (74), 210 (2), 182 (4), 164 (12), 135 (100), 121 (25), 103 (40), 91 (19), 77 (28).

Příprava sloučeniny 4Z/5A

Podobným způsobem jako v předchozích příkladech se použije 3-chloracetofenon pro přípravu 3-methyl-3-(3-chlorfenyl)cinnamonitrilu. Nitril se poté 2 hodiny katalyticky redukuje vodíkem o tlaku 413 kPa na hydroxid palladnatém v prostředí kyseliny octové za vzniku 3-methyl-3-(3-chlorfenyl)propylaminu. Stejná molární množství tohoto aminu, 3'-methoxyacetofenonu a 1,25 násobek molárního ekvivalentu izopropoxidu titaničitého se míchají 4 hodiny za teploty místnosti a k intermediárnímu iminu se přidá 5 ml 1M ethanolického roztoku kyanoborohydridu sodného (5 mmol). Po zpracování a chromatografickém přečištění se získá N-[3-methyl-3-(3-chlorfenyl)propyl]-1-(3-methoxyfenyl)ethylamin, sloučenina 4Z/5A, ve formě olejovité kapaliny s vlastnostmi: m/z (rel. int.) 283 (M^+ , 17), 268 (71), 164 (13), 135 (100), 121 (21), 105 (27), 91 (26), 77 (14).

Příprava sloučeniny 4Y

Podobným způsobem jako v předchozích příkladech se použije 2-chloracetofenon pro přípravu 3-methyl-3-(2-chlorfenyl)cinnamonitrilu. Nitril se poté 2 hodiny katalyticky redukuje vodíkem o tlaku 413 kPa na hydroxid palladnatém v prostředí kyseliny octové za vzniku 3-methyl-3-(2-chlorfenyl)propylaminu. Stejná molární množství tohoto aminu, 3'-methoxyacetofenonu a 1,25 násobek molárního ekvivalentu izopropoxidu titaničitého se míchají 4 hodiny za teploty místnosti a k intermediárnímu iminu se přidá 5 ml 1M ethanolického roztoku kyanoborohydridu sodného (5 mmol). Po zpracování a chromatografickém přečištění je výtěžkem N-[3-methyl-3-(2-chlorfenyl)propyl]-1-(3-methoxyfenyl)ethylamin, sloučenina 4Y, ve formě olejovité kapaliny s vlastnostmi: m/z (rel. int.) 283 (M^+ , 17), 268 (71), 154 (13), 185 (100), 121 (21), 105 (27), 91 (26), 77 (14).

Příprava sloučeniny 6T

K roztoku NPS R-568 (30,3 g, 100 mmol) v dichlormethanu se po kapkách přidá za teploty -78°C bromid boritý (50 g, 200 mmol) a reakční směs se míchá po dobu jedné hodiny za teploty místnosti. Poté se reakční směs nalije na led. Bromovodík se extrahuje z vodní fáze chloroformem. Chloroformová fáze se poté promyje 4 x 100 ml 50% HCl a vysuší bezvodým síranem hořečnatým. 3,25 g (20 mmol) vzniklého hydrochloridu (R)-N-[3-(3-chlorfenyl)propyl]-1-(3-hydroxyfenyl)ethylaminu ve formě sraženiny se přidá k roztoku hydridu sodného (0,48 g, 20 mmol) v dimethylformamidu a reakční směs míchá 1 hodinu za teploty místnosti. Poté se k reakční směsi přidá 1,71 g ethyljodidu (11 mmol) a směs se míchá 16 hodin za teploty místnosti. Po zpracování a chromatografickém přečištění na silikagelu v 3 % methanolu v chloroformu se získá (R)-N-[3-(2-chlorfenyl)propyl]-1-(3-ethoxyfenyl)ethylamin, sloučenina 6T, ve formě olejovité kapaliny s vlastnostmi: m/z (rel. int.) 316 (M^+ , 1), 302 (100), 282 (11), 196 (5), 178 (7), 149 (74), 121 (34), 103 (25), 91 (28), 77 (29).

Příprava sloučeniny 6R

Podobným způsobem jako v předchozích příkladech se použije roztok NPS R-467 k přípravě (R)-N-(3-fenylpropyl)-1-(3-ethoxyfenyl)ethylaminu, sloučeniny 6R, ve formě olejovité kapaliny s vlastnostmi: m/z (rel. int.) 283 (M^+ , 10), 268 (74), 178, (11), 162 (8), 149 (100), 121 (30), 103 (16), 91 (86), 77 (29).

Příprava sloučeniny 3U

Stejná molární množství 3,3-difenylpropylaminu (2,11 g, 10 mmol), 1'-acetonafonu (1,70 g, 10 mmol) a 1,25 násobné molární množství izopropoxidu titaničitého (3,55 g, 12,5 mmol) se míchají 4 hodiny za teploty místnosti. K reakční směsi se poté přidá 12,5 ml 1M ethanolického roztoku kyanoborohydridu sodného (12,5 mmol) a směs se míchá 16 hodin při teplotě místnosti. Poté se reakční směs naředí 50 ml diethyletheru a protřepe se s 0,72 ml vody (40 mmol). Po důkladném protřepání se jednotlivé fáze oddělí centrifugací a etherická složka se dekantuje. Poté se tato fáze zahustí do podoby mléčné olejovité kapaliny, která se suspenduje v diethyletheru a přefiltruje pomocí 0,45 μ M CR PTFE Acrodisc filtru. Filtrát v diethyletheru se zákonzentruje a výsledná sloučenina 3U (N-(3,3-difenylpropyl)-1-(1-naftyl)ethylamin) ve formě čiré a bezbarvé olejovité kapaliny vykazuje následující vlastnosti: m/z (rel. int.) 365 (M^+ , 17), 350 (19), 181 (23), 155 (100), 141 (25), 115 (11), 91 (13), 77 (6).

Příprava sloučeniny 6F

Podobným způsobem jako v předchozím příkladu se smísí stejná molární množství 1-(3-methoxyfenyl)ethylaminu (1,51 g, 10 mmol) a 2'-acetonafonu (1,70 g, 10 mmol) s 1,25 násobným molárním množstvím izopropoxidu titaničitého (3,55 g, 12,5 mmol) a reakční směs se míchá 4 hodiny za teploty místnosti. Dalším zpracováním vzniká N-[1-(2-naftyl)ethyl]-1-(3-methoxyfenyl)ethylamin, sloučenina 6F ve formě čiré, bezbarvé olejovité kapaliny vykazuje následující vlastnosti: m/z (rel. int.) 305 (M^+ , 1), 290 (35), 170 (49), 155 (100), 135 (55), 115 (8), 105 (10), 91 (9), 77 (10).

Příprava sloučeniny 4G

Podobným způsobem jako v předchozích příkladech se smísí stejná molární množství (R)-1,5-fenylethylaminu a 1'-acetonafonu s 1,25 molárním násobkem izopropoxidu titaničitého a reakční směs se míchá 4 hodiny za teploty místnosti. Vzniklý intermediární imin se redukuje ethanolickým roztokem kyanoborohydridu sodného. Dalším zpracováním a chromatografickým přečištěním vzniká N-(1-(1-naftyl)ethyl)-1-fenylethylamin, sloučenina 4G, ve formě čiré, bezbarvé olejovité kapaliny vykazuje následující vlastnosti: m/z (rel. int.) 275 (M^+ , 16), 260 (79), 155 (100), 127 (27), 105 (70), 77 (32).

Příprava sloučeniny 4H

Podobným způsobem jako v předchozích příkladech se smísí stejná molární množství (R)-1-fenylethylaminu a 2'-acetonafonu s 1,25 molárním násobkem izopropoxidu titaničitého. Vzniklý intermediární imin se redukuje ethanolickým roztokem kyanoborohydridu sodného. Dalším zpracováním a chromatografickým přečištěním vzniká N-[1-(2-naftyl)ethyl]-1-fenylethylamin, sloučenina 4H, ve formě čiré, bezbarvé olejovité kapaliny vykazuje následující vlastnosti: m/z (rel. int.) 275 (M^+ , 1), 260 (61), 155 (100), 120 (36), 105 (55), 77 (15).

Příprava sloučeniny 6E

Podobným způsobem jako v předchozích příkladech se smísí stejná molární množství 1-(3-methoxyfenyl)ethylaminu a 1'-acetonafonu s 1,25 molárním přebytkem izopropoxidu titaničitého. Vzniklý intermediární imin se redukuje ethanolickým roztokem kyanoborohydridu sodného. Dalším zpracováním a chromatografickým přečištěním vzniká N-1-(1-naftyl)ethyl-1-(3-methoxyfenyl)ethylamin, sloučenina 6E ve formě čiré, bezbarvé olejovité kapaliny vykazuje následující vlastnosti: m/z (rel. int.) 305 (M^+ , 10), 290 (30), 170 (43), 155 (100), 135 (69), 115 (9), 105 (15), 91 (14), 77 (18).

Příklad 19: Farmaceutické kompozice

- 5 Příprava farmaceutických kompozic podle vynálezu vhodných k administraci kalcimimetik lidským pacientům je znázorněna v tabulce 3

Tabulka 3

Složka	mg na kapsuli	g na reprezentativní dávku 5000 kapsulí
NPS R-568	56,0	280,0
Předběžně zgelovatělý škrob	134,0	670,0
Mikrokrystalická celulóza	34,0	170,0
Koloidní oxid křemičitý	1,0	5,0
Celkem	225,0 mg	1125 g

- 10 Jiné příklady kompozic a dávkových forem s hydrochloridem NPS (R)-568 jsou takové, které jsou vhodné pro dlouhotrvající uvolňování, a které lze připravit standardními technikami.

- 15 Správné dávkování může být rovněž provedeno standardními technikami. V jedné sadě pokusů vykazovaly například orální dávky 10 až 100 mg hydrochloridu NPS R- (568) farmakologický účinek u lidských pacientů. Po orálním podání hydrochloridu NPS (R)-568 byly v lidské plazmě detekovány vysoké koncentrace konjugátu o-glukuronidu se sloučeninou 17Q, což je hlavní metabolit látky NPS (R)-568. Tento konjugát glukuronidu a sloučeniny 17Q může mít prospěšný účinek.

- 20 Standardními technikami lze rovněž určit jiné vhodné dávkovací koncentrace pro látku NPS (R)-568.

- 25 Vhodná dávková množství, farmaceutické kompozice a aplikační formu dalších sloučenin podle vynálezu může určit odborník na základě způsobů podle vynálezu.

- 30 Další formy provedení vynálezu jsou popsány v nárocích. Popsaná provedení vynálezu však nejsou v žádném případě omezující a odborník může na jejich základě připravit mnohé další modifikace.

(1) INFORMACE O SEKVENCI ID.Č.: 1

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

5 (A) DÉLKA: 5006 párů bází
 (B) TYP: nukleová kyselina
 (C) POČET VLÁKEN: jedno
 (D) TOPOLOGIE: lineární

10 (ii) TYP MOLEKULY: cDNA komplementární k mRNA

(ix) VLASTNOSTI:

15 (A) JMÉNO/KLÍČ: CDS
 (B) POZICE: 436..3699
 (D) DALŠÍ INFORMACE:

(xi) POPIS SEKVENCE: Sekvence id. č.: 1:

```
GCTGCTGTGG CCGGACCCGA AGGCGGGCGC CGGGAGCGCA 40
GCGAGCCAGA CGCGCCTCTC CAAGACCGTG ACCTTGGCAT 80
AGGGAGCGGG GCTGCGCGCA GTCCTGAGAT CAGACCAGAG 120
CTCATCCTCG TGGAGACCCA CGGCCGAGGG GCCGGAGCTG 160
CCTCTGTGCG AGGGAGCCCT GGCCGCGGCG CAGAAGGCAT 200
CACAGGAGGC CTCTCCATGA TGTGGCTTCC AAAGACTCAA 240
GGACCACCCA CATTACAAGT CTGGATTGAG GAAGGCAGAA 280
ATGGAGATTC AAACACCACG TCTTCTATTA TTTTATTAAT 320
CAATCTGTAG ACATGTGTCC CCACTGCAGG GAGTGAAGTG 360
CTCCAAGGGA GAAACTTCTG GGAGCCTCCA AACTCCTAGC 400
TGTCTCATCC CTTGCCCTGG AGAGACGGCA GAACC 435
ATG GCA TTT TAT AGC TGC TGC TGG GTC CTC TTG GCA 471
Met Ala Phe Tyr Ser Cys Cys Trp Val Leu Leu Ala
```

1

5

10

CTC ACC TGG CAC ACC TCT GCC TAC GGG CCA GAC CAG	507
Leu Thr Trp His Thr Ser Ala Tyr Gly Pro Asp Gln	
15 20	
CGA GCC CAA AAG AAG GGG GAC ATT ATC CTT GGG GGG	543
Arg Ala Gln Lys Lys Gly Asp Ile Ile Leu Gly Gly	
25 30 35	
CTC TTT CCT ATT CAT TTT GGA GTA GCA GCT AAA GAT	579
Leu Phe Pro Ile His Phe Gly Val Ala Ala Lys Asp	
40 45	
CAA GAT CTC AAA TCA AGG CCG GAG TCT GTG GAA TGT	615
Gln Asp Leu Lys Ser Arg Pro Glu Ser Val Glu Cys	
50 55 60	
ATC AGG TAT AAT TTC CGT GGG TTT CGC TGG TTA CAG	651
Ile Arg Tyr Asn Phe Arg Gly Phe Arg Trp Leu Gln	
65 70	
GCT ATG ATA TTT GCC ATA GAG GAG ATA AAC AGC AGC	687
Ala Met Ile Phe Ala Ile Glu Glu Ile Asn Ser Ser	
75 80	
CCA GCC CTT CTT CCC AAC TTG ACG CTG GGA TAC AGG	723
Pro Ala Leu Leu Pro Asn Leu Thr Leu Gly Tyr Arg	
85 90 95	
ATA TTT GAC ACT TGC AAC ACC GTT TCT AAG GCC TTG	759
Ile Phe Asp Thr Cys Asn Thr Val Ser Lys Ala Leu	
100 105	
GAA GCC ACC CTG AGT TTT GTT GCT CAA AAC AAA ATT	795
Glu Ala Thr Leu Ser Phe Val Ala Gln Asn Lys Ile	
110 115 120	
GAT TCT TTG AAC CTT GAT GAG TTC TGC AAC TGC TCA	831
Asp Ser Leu Asn Leu Asp Glu Phe Cys Asn Cys Ser	
125 130	
GAG CAC ATT CCC TCT ACG ATT GCT GTG GTG GGA GCA	867
Glu His Ile Pro Ser Thr Ile Ala Val Val Gly Ala	
135 140	
ACT GGC TCA GGC GTC TCC ACG GCA GTG GCA AAT CTG	903
Thr Gly Ser Gly Val Ser Thr Ala Val Ala Asn Leu	
145 150 155	
CTG GGG CTC TTC TAC ATT CCC CAG GTC AGT TAT GCC	939
Leu Gly Leu Phe Tyr Ile Pro Gln Val Ser Tyr Ala	
160 165	
TCC TCC AGC AGA CTC CTC AGC AAC AAG AAT CAA TTC	975
Ser Ser Ser Arg Leu Leu Ser Asn Lys Asn Gln Phe	
170 175 180	

AAG TCT TTC CTC CGA ACC ATC CCC AAT GAT GAG CAC	1011
Lys Ser Phe Leu Arg Thr Ile Pro Asn Asp Glu His	
185 190	
CAG GCC ACT GCC ATG GCA GAC ATC ATC GAG TAT TTC	1047
Gln Ala Thr Ala Met Ala Asp Ile Ile Glu Tyr Phe	
195 200	
CGC TGG AAC TGG GTG GGC ACA ATT GCA GCT GAT GAC	1083
Arg Trp Asn Trp Val Gly Thr Ile Ala Ala Asp Asp	
205 210 215	
GAC TAT GGG CGG CCG GGG ATT GAG AAA TTC CGA GAG	1119
Asp Tyr Gly Arg Pro Gly Ile Glu Lys Phe Arg Glu	
220 225	
GAA GCT GAG GAA AGG GAT ATC TGC ATC GAC TTC AGT	1155
Glu Ala Glu Glu Arg Asp Ile Cys Ile Asp Phe Ser	
230 235 240	
GAA CTC ATC TCC CAG TAC TCT GAT GAG GAA GAG ATC	1191
Glu Leu Ile Ser Gln Tyr Ser Asp Glu Glu Glu Ile	
245 250	
CAG CAT GTG GTA GAG GTG ATT CAA AAT TCC ACG GCC	1227
Gln His Val Val Glu Val Ile Gln Asn Ser Thr Ala	
255 260	
AAA GTC ATC GTG GTT TTC TCC AGT GGC CCA GAT CTT	1263
Lys Val Ile Val Val Phe Ser Ser Gly Pro Asp Leu	
265 270 275	
GAG CCC CTC ATC AAG GAG ATT GTC CGG CGC AAT ATC	1299
Glu Pro Leu Ile Lys Glu Ile Val Arg Arg Asn Ile	
280 285	
ACG GGC AAG ATC TGG CTG GCC AGC GAG GCC TGG GCC	1335
Thr Gly Lys Ile Trp Leu Ala Ser Glu Ala Trp Ala	
290 295 300	
AGC TCC TCC CTG ATC GCC ATG CCT CAG TAC TTC CAC	1371
Ser Ser Ser Leu Ile Ala Met Pro Gln Tyr Phe His	
305 310	
GTG GTT GGC GGC ACC ATT GGA TTC GCT CTG AAG GCT	1407
Val Val Gly Gly Thr Ile Gly Phe Ala Leu Lys Ala	
315 320	
GGG CAG ATC CCA GGC TTC CGG GAA TTC CTG AAG AAG	1443
Gly Gln Ile Pro Gly Phe Arg Glu Phe Leu Lys Lys	
325 330 335	
GTC CAT CCC AGG AAG TCT GTC CAC AAT GGT TTT GCC	1479
Val His Pro Arg Lys Ser Val His Asn Gly Phe Ala	
340 345	

AAG GAG TTT TGG GAA GAA ACA TTT AAC TGC CAC CTC Lys Glu Phe Trp Glu Glu Thr Phe Asn Cys His Leu 350 355 360	1515
CAA GAA GGT GCA AAA GGA CCT TTA CCT GTG GAC ACC Gln Glu Gly Ala Lys Gly Pro Leu Pro Val Asp Thr 365 370	1551
TTT CTG AGA GGT CAC GAA GAA AGT GGC GAC AGG TTT Phe Leu Arg Gly His Glu Glu Ser Gly Asp Arg Phe 375 380	1587
AGC AAC AGC TCG ACA GCC TTC CGA CCC CTC TGT ACA Ser Asn Ser Ser Thr Ala Phe Arg Pro Leu Cys Thr 385 390 395	1623
GGG GAT GAG AAC ATC AGC AGT GTC GAG ACC CCT TAC Gly Asp Glu Asn Ile Ser Ser Val Glu Thr Pro Tyr 400 405	1659
ATA GAT TAC ACG CAT TTA CGG ATA TCC TAC AAT GTG Ile Asp Tyr Thr His Leu Arg Ile Ser Tyr Asn Val 410 415 420	1695
TAC TTA GCA GTC TAC TCC ATT GCC CAC GCC TTG CAA Tyr Leu Ala Val Tyr Ser Ile Ala His Ala Leu Gln 425 430	1731
GAT ATA TAT ACC TGC TTA CCT GGG AGA GGG CTC TTC Asp Ile Tyr Thr Cys Leu Pro Gly Arg Gly Leu Phe 435 440	1767
ACC AAT GGC TCC TGT GCA GAC ATC AAG AAA GTT GAG Thr Asn Gly Ser Cys Ala Asp Ile Lys Lys Val Glu 445 450 455	1803
GCG TGG CAG GTC CTG AAG CAC CTA CGG CAT CTA AAC Ala Trp Gln Val Leu Lys His Leu Arg His Leu Asn 460 465	1839
TTT ACA AAC AAT ATG GGG GAG CAG GTG ACC TTT GAT Phe Thr Asn Asn Met Gly Glu Gln Val Thr Phe Asp 470 475 480	1875
GAG TGT GGT GAC CTG GTG GGG AAC TAT TCC ATC ATC Glu Cys Gly Asp Leu Val Gly Asn Tyr Ser Ile Ile 485 490	1911
AAC TGG CAC CTC TCC CCA GAG GAT GGC TCC ATC GTG Asn Trp His Leu Ser Pro Glu Asp Gly Ser Ile Val 495 500	1947
TTT AAG GAA GTC GGG TAT TAC AAC GTC TAT GCC AAG Phe Lys Glu Val Gly Tyr Tyr Asn Val Tyr Ala Lys 505 510 515	1983

AAG GGA GAA AGA CTC TTC ATC AAC GAG GAG AAA ATC Lys Gly Glu Arg Leu Phe Ile Asn Glu Glu Lys Ile 520 525	2019
CTG TGG AGT GGG TTC TCC AGG GAG CCA CTC ACC TTT Leu Trp Ser Gly Phe Ser Arg Glu Pro Leu Thr Phe 530 535 540	2055
GTG CTG TCT GTC CTC CAG GTG CCC TTC TCC AAC TGC Val Leu Ser Val Leu Gln Val Pro Phe Ser Asn Cys 545 550	2091
AGC CGA GAC TGC CTG GCA GGG ACC AGG AAA GGG ATC Ser Arg Asp Cys Leu Ala Gly Thr Arg Lys Gly Ile 555 560	2127
ATT GAG GGG GAG CCC ACC TGC TGC TTT GAG TGT GTG Ile Glu Gly Glu Pro Thr Cys Cys Phe Glu Cys Val 565 570 575	2163
GAG TGT CCT GAT GGG GAG TAT AGT GAT GAG ACA GAT Glu Cys Pro Asp Gly Glu Tyr Ser Asp Glu Thr Asp 580 585	2199
GCC AGT GCC TGT AAC AAG TGC CCA GAT GAC TTC TGG Ala Ser Ala Cys Asn Lys Cys Pro Asp Asp Phe Trp 590 595 600	2235
TCC AAT GAG AAC CAC ACC TCC TGC ATT GCC AAG GAG Ser Asn Glu Asn His Thr Ser Cys Ile Ala Lys Glu 605 610	2271
ATC GAG TTT CTG TCG TGG ACG GAG CCC TTT GGG ATC Ile Glu Phe Leu Ser Trp Thr Glu Pro Phe Gly Ile 615 620	2307
GCA CTC ACC CTC TTT GCC GTG CTG GGC ATT TTC CTG Ala Leu Thr Leu Phe Ala Val Leu Gly Ile Phe Leu 625 630 635	2343
ACA GCC TTT GTG CTG GGT GTG TTT ATC AAG TTC CGC Thr Ala Phe Val Leu Gly Val Phe Ile Lys Phe Arg 640 645	2379
AAC ACA CCC ATT GTC AAG GCC ACC AAC CGA GAG CTC Asn Thr Pro Ile Val Lys Ala Thr Asn Arg Glu Leu 650 655 660	2415
TCC TAC CTC CTC CTC TTC TCC CTG CTC TGC TGC TTC Ser Tyr Leu Leu Leu Phe Ser Leu Leu Cys Cys Phe 665 670	2451
TCC AGC TCC CTG TTC TTC ATC GGG GAG CCC CAG GAC Ser Ser Ser Leu Phe Phe Ile Gly Glu Pro Gln Asp 675 680	2487

TGG Trp 685	ACG Thr	TGC Cys	CGC Arg	CTG Leu	CGC Arg 690	CAG Gln	CCG Pro	GCC Ala	TTT Phe	GGC Gly 695	ATC Ile	2523
AGC Ser	TTC Phe	GTG Val	CTC Leu 700	TGC Cys	ATC Ile	TCA Ser	TGC Cys 705	ATC Ile	CTG Leu	GTG Val	AAA Lys	2559
ACC Thr 710	AAC Asn	CGT Arg	GTC Val	CTC Leu	CTG Leu 715	GTG Val	TTT Phe 715	GAG Glu	GCC Ala	AAG Lys	ATC Ile 720	2595
CCC Pro	ACC Thr	AGC Ser	TTC Phe	CAC His 725	CGC Arg	AAG Lys	TGG Trp	TGG Trp	GGG Gly 730	CTC Leu	AAC Asn	2631
CTG Leu	CAG Gln 735	TTC Phe	CTG Leu	CTG Leu	GTT Val	TTC Phe	CTC Leu 740	TGC Cys	ACC Thr	TTC Phe	ATG Met	2667
CAG Gln 745	ATT Ile	GTC Val	ATC Ile	TGT Cys	GTG Val 750	ATC Ile	TGG Trp	CTC Leu	TAC Tyr	ACC Thr 755	GCG Ala	2703
CCC Pro	CCC Pro	TCA Ser	AGC Ser 760	TAC Tyr	CGC Arg	AAC Asn	CAG Gln	GAG Glu 765	CTG Leu	GAG Glu	GAT Asp	2739
GAG Glu 770	ATC Ile	ATC Ile	TTC Phe	ATC Ile	ACG Thr	TGC Cys 775	CAC His	GAG Glu	GGC Gly	TCC Ser	CTC Leu 780	2775
ATG Met	GCC Ala	CTG Leu	GGC Gly	TTC Phe 785	CTG Leu	ATC Ile	GGC Gly	TAC Tyr	ACC Thr	TGC Cys 790	CTG Leu	2811
CTG Leu	GCT Ala	GCC Ala 795	ATC Ile	TGC Cys	TTC Phe	TTC Phe	TTT Phe 800	GCC Ala	TTC Phe	AAG Lys	TCC Ser	2847
CGG Arg 805	AAG Lys	CTG Leu	CCG Pro	GAG Glu	AAC Asn 810	TTC Phe	AAT Asn	GAA Glu	GCC Ala	AAG Lys 815	TTC Phe	2883
ATC Ile	ACC Thr	TTC Phe	AGC Ser 820	ATG Met	CTC Leu	ATC Ile	TTC Phe	TTC Phe 825	ATC Ile	GTC Val	TGG Trp	2919
ATC Ile 830	TCC Ser	TTC Phe	ATT Ile	CCA Pro	GCC Ala	TAT Tyr 835	GCC Ala	AGC Ser	ACC Thr	TAT Tyr	GGC Gly 840	2955
AAG Lys	TTT Phe	GTC Val	TCT Ser	GCC Ala 845	GTA Val	GAG Glu	GTG Val	ATT Ile	GCC Ala 850	ATC Ile	CTG Leu	2991

GCA GCC AGC TTT GGC TTG CTG GCG TGC ATC TTC TTC Ala Ala Ser Phe Gly Leu Leu Ala Cys Ile Phe Phe 855 860	3027
AAC AAG ATC TAC ATC ATT CTC TTC AAG CCA TCC CGC Asn Lys Ile Tyr Ile Ile Leu Phe Lys Pro Ser Arg 865 870 875	3063
AAC ACC ATC GAG GAG GTG CGT TGC AGC ACC GCA GCT Asn Thr Ile Glu Glu Val Arg Cys Ser Thr Ala Ala 880 885	3099
CAC GCT TTC AAG GTG GCT GCC CGG GCC ACG CTG CGC His Ala Phe Lys Val Ala Ala Arg Ala Thr Leu Arg 890 895 900	3135
CGC AGC AAC GTC TCC CGC AAG CGG TCC AGC AGC CTT Arg Ser Asn Val Ser Arg Lys Arg Ser Ser Ser Leu 905 910	3171
GGA GGC TCC ACG GGA TCC ACC CCC TCC TCC TCC ATC Gly Gly Ser Thr Gly Ser Thr Pro Ser Ser Ser Ile 915 920	3207
AGC AGC AAG AGC AAC AGC GAA GAC CCA TTC CCA CGG Ser Ser Lys Ser Asn Ser Glu Asp Pro Phe Pro Arg 925 930 935	3243
CCC GAG AGG CAG AAG CAG CAG CAG CCG CTG GCC CTA Pro Glu Arg Gln Lys Gln Gln Gln Pro Leu Ala Leu 940 945	3279
ACC CAG CAA GAG CAG CAG CAG CAG CAG CCC CTG ACC CTC Thr Gln Gln Glu Gln Gln Gln Gln Pro Leu Thr Leu 950 955 960	3315
CCA CAG CAG CAA CGA TCT CAG CAG CAG CCC AGA TGC Pro Gln Gln Gln Arg Ser Gln Gln Gln Pro Arg Cys 965 970	3351
AAG CAG AAG GTC ATC TTT GGC AGC GGC ACG GTC ACC Lys Gln Lys Val Ile Phe Gly Ser Gly Thr Val Thr 975 980	3387
TTC TCA CTG AGC TTT GAT GAG CCT CAG AAG AAC GCC Phe Ser Leu Ser Phe Asp Glu Pro Gln Lys Asn Ala 985 990 995	3423
ATG GCC CAC AGG AAT TCT ACG CAC CAG AAC TCC CTG Met Ala His Arg Asn Ser Thr His Gln Asn Ser Leu 1000 1005	3459
GAG GCC CAG AAA AGC AGC GAT ACG CTG ACC CGA CAC Glu Ala Gln Lys Ser Ser Asp Thr Leu Thr Arg His 1010 1015 1020	3495

CAG CCA TTA CTC CCG CTG CAG TGC GGG GAA ACG GAC Gln Pro Leu Leu Pro Leu Gln Cys Gly Glu Thr Asp 1025 1030	3531
TTA GAT CTG ACC GTC CAG GAA ACA GGT CTG CAA GGA Leu Asp Leu Thr Val Gln Glu Thr Gly Leu Gln Gly 1035 1040	3567
CCT GTG GGT GGA GAC CAG CGG CCA GAG GTG GAG GAC Pro Val Gly Gly Asp Gln Arg Pro Glu Val Glu Asp 1045 1050 1055	3603
CCT GAA GAG TTG TCC CCA GCA CTT GTA GTG TCC AGT Pro Glu Glu Leu Ser Pro Ala Leu Val Val Ser Ser 1060 1065	3639
TCA CAG AGC TTT GTC ATC AGT GGT GGA GGC AGC ACT Ser Gln Ser Phe Val Ile Ser Gly Gly Gly Ser Thr 1070 1075 1080	3675
GTT ACA GAA AAC GTA GTG AAT TCA TAAAATGGAA Val Thr Glu Asn Val Val Asn Ser 1085	3709
GGAGAAGACT GGGCTAGGGA GAATGCAGAG AGGTTTCTTG	3749
GGGTCCCAGG GATGAGGAAT CGCCCCAGAC TCCTTTCCTC	3789
TGAGGAAGAA GGGATAATAG ACACATCAAA TGCCCCGAAT	3829
TTAGTCACAC CATCTTAAAT GACAGTGAAT TGACCCATGT	3869
TCCCTTTAAA ATTAAAAAAA AGAAGAGCCT TGTGTTTCTG	3909
TGGTTGCATT TGTCAAAGCA TTGAGATCTC CACGGTCAGA	3949
TTTGCTGTTC ACCCACATCT AATGTCTCTT CCTCTGTTCT	3989
ATCCCACCCA ACAGCTCAGA GATGAACTA TGGCTTTAAA	4029
CTACCCTCCA GAGTGTGCAG ACTGATGGGA CATCAAATTT	4069
GCCACCACTA GAGCTGAGAG TCTGAAAGAC AGAATGTCAC	4109
CAGTCCTGCC CAATGCCTTG ACAACAGACT GAATTTTAAA	4149
TGTTCACAAC ATAAGGAGAA TGTATCTCCT CCTATTTATG	4189
AAAACCATAT GATATTTTGT CTCCTACCTG CTGCTGCTAT	4229
TATGTAACAT CCAGAAGGTT TGCACCCCTC CTATACCATA	4269
TGTCTGGTTC TGTCCAGGAC ATGATACTGA TGCCATGTTT	4309
AGATTCCAGG ATCACAAGAA TCACCTCAAA TTGTTAGGAA	4349

GGGACTGCAT AAACCAATGA GCTGTATCTG TAATTAATAT	4389
TCCTATATGT AGCTTTATCC TTAGGAAAAT GCTTCTGTTG	4429
TAATAGTCCA TGGACAATAT AAAGTAAAA ATGTCAGTCT	4469
GGTTTATATA AGGCAGTATT ATTGAGCTCT ATTTCCCCAC	4509
CCCACTATCC TCACTCCCAT AAGCTAAGCC TTATGTGAGC	4549
CCCTTCAGGG ACTCAAGGGT CCAGAAGTCC CTCCCATCTC	4589
TACCCCAAAG AATTCCTGAA GCCAGATCCA CCCTATCCCT	4629
GTACAGAGTA AGTTCTCAAT TATTGGCCTG CTAATAGCTG	4669
CTAGGGTAGG AAAGCGTGGT TCCAAGAAAG ATCCACCCTC	4709
AAATGTCGGA GCTATGTTCC CTCCAGCAGT GGTATTAATA	4749
CTGCCGGTCA CCCAGGCTCT GGAGCCAGAG AGACAGACCG	4789
GGGTTCAAGC CATGGCTTCG TCATTGCAA GCTGAGTGAC	4829
TGTAGGCAGG GAACCTTAAC CTCTCTAAGC CACAGCTTCT	4869
TCATCTTTAA AATAAGGATA ATAATCATTC CTTCCCCTCA	4909
GAGCTCTTAT GTGGATTAAA CGAGATAATG TATATAAAGT	4949
ACTTTAGCCT GGTACCTAGC ACACAATAAG CATTCAATAA	4989
ATATTAGTTA ATATTAT	5006

(2) INFORMACE O SEKVENCI ID.Č.: 2

5

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA:	3809 párů bází
(B) TYP:	nukleová kyselina
(C) POČET VLÁKEN:	jedno
(D) TOPOLOGIE:	lineární

10

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA komplementární k mRNA

15

(ix) VLASTNOSTI:

(A) JMÉNO/KLÍČ:	CDS
(B) POZICE:	373..3606
(D) DALŠÍ INFORMACE:	

20

(xi) POPIS SEKVENCE: Sekvence id. č.: 2:

CAACAGGCAC CTGGCTGCAG CCAGGAAGGA CCGCACGCCC	40
---	----

TTTCGCGCAG GAGAGTGGAA GGAGGGAGCT GTTTGCCAGC	80
ACCGAGGTCT TGCGGCACAG GCAACGCTTG ACCTGAGTCT	120
TGCAGAATGA AAGGCATCAC AGGAGGCCTC TGCATGATGT	160
GGCTTCCAAA GACTCAAGGA CCACCCACAT TACAAGTCTG	200
GATTGAGGAA GGCAGAAATG GAGATTCAAA CACCACGTCT	240
TCTATTATTT TATTAATCAA TCTGTAGACA TGTGTCCCCA	280
CTGCAGGGAG TGAAC TGCTC CAAGGGAGAA ACTTCTGGGA	320
GCCTCCAAAC TCCTAGCTGT CTCATCCCTT GCCCTGGAGA	360
GACGGCAGAA CC ATG GCA TTT TAT AGC TGC TGC TGG Met Ala Phe Tyr Ser Cys Cys Trp 1 5	396
GTC CTC TTG GCA CTC ACC TGG CAC ACC TCT GCC TAC Val Leu Leu Ala Leu Thr Trp His Thr Ser Ala Tyr 10 15 20	432
GGG CCA GAC CAG CGA GCC CAA AAG AAG GGG GAC ATT Gly Pro Asp Gln Arg Ala Gln Lys Lys Gly Asp Ile 25 30	468
ATC CTT GGG GGG CTC TTT CCT ATT CAT TTT GGA GTA Ile Leu Gly Gly Leu Phe Pro Ile His Phe Gly Val 35 40	504
GCA GCT AAA GAT CAA GAT CTC AAA TCA AGG CCG GAG Ala Ala Lys Asp Gln Asp Leu Lys Ser Arg Pro Glu 45 50 55	540
TCT GTG GAA TGT ATC AGG TAT AAT TTC CGT GGG TTT Ser Val Glu Cys Ile Arg Tyr Asn Phe Arg Gly Phe 60 65	576
CGC TGG TTA CAG GCT ATG ATA TTT GCC ATA GAG GAG Arg Trp Leu Gln Ala Met Ile Phe Ala Ile Glu Glu 70 75 80	612
ATA AAC AGC AGC CCA GCC CTT CTT CCC AAC TTG ACG Ile Asn Ser Ser Pro Ala Leu Leu Pro Asn Leu Thr 85 90	648
CTG GGA TAC AGG ATA TTT GAC ACT TGC AAC ACC GTT Leu Gly Tyr Arg Ile Phe Asp Thr Cys Asn Thr Val 95 100	684
TCT AAG GCC TTG GAA GCC ACC CTG AGT TTT GTT GCT Ser Lys Ala Leu Glu Ala Thr Leu Ser Phe Val Ala 105 110 115	720

CAA AAC AAA ATT GAT TCT TTG AAC CTT GAT GAG TTC	756
Gln Asn Lys Ile Asp Ser Leu Asn Leu Asp Glu Phe	
120 125	
TGC AAC TGC TCA GAG CAC ATT CCC TCT ACG ATT GCT	792
Cys Asn Cys Ser Glu His Ile Pro Ser Thr Ile Ala	
130 135 140	
GTG GTG GGA GCA ACT GGC TCA GGC GTC TCC ACG GCA	828
Val Val Gly Ala Thr Gly Ser Gly Val Ser Thr Ala	
145 150	
GTG GCA AAT CTG CTG GGG CTC TTC TAC ATT CCC CAG	864
Val Ala Asn Leu Leu Gly Leu Phe Tyr Ile Pro Gln	
155 160	
GTC AGT TAT GCC TCC TCC AGC AGA CTC CTC AGC AAC	900
Val Ser Tyr Ala Ser Ser Ser Arg Leu Leu Ser Asn	
165 170 175	
AAG AAT CAA TTC AAG TCT TTC CTC CGA ACC ATC CCC	936
Lys Asn Gln Phe Lys Ser Phe Leu Arg Thr Ile Pro	
180 185	
AAT GAT GAG CAC CAG GCC ACT GCC ATG GCA GAC ATC	972
Asn Asp Glu His Gln Ala Thr Ala Met Ala Asp Ile	
190 195 200	
ATC GAG TAT TTC CGC TGG AAC TGG GTG GGC ACA ATT	1008
Ile Glu Tyr Phe Arg Trp Asn Trp Val Gly Thr Ile	
205 210	
GCA GCT GAT GAC GAC TAT GGG CGG CCG GGG ATT GAG	1044
Ala Ala Asp Asp Tyr Gly Arg Pro Gly Ile Glu	
215 220	
AAA TTC CGA GAG GAA GCT GAG GAA AGG GAT ATC TGC	1080
Lys Phe Arg Glu Glu Ala Glu Glu Arg Asp Ile Cys	
225 230 235	
ATC GAC TTC AGT GAA CTC ATC TCC CAG TAC TCT GAT	1116
Ile Asp Phe Ser Glu Leu Ile Ser Gln Tyr Ser Asp	
240 245	
GAG GAA GAG ATC CAG CAT GTG GTA GAG GTG ATT CAA	1152
Glu Glu Glu Ile Gln His Val Val Glu Val Ile Gln	
250 255 260	
AAT TCC ACG GCC AAA GTC ATC GTG GTT TTC TCC AGT	1188
Asn Ser Thr Ala Lys Val Ile Val Val Phe Ser Ser	
265 270	
GGC CCA GAT CTT GAG CCC CTC ATC AAG GAG ATT GTC	1224
Gly Pro Asp Leu Glu Pro Leu Ile Lys Glu Ile Val	
275 280	

CGG Arg 285	CGC Arg	AAT Asn	ATC Ile	ACG Thr	GGC Gly 290	AAG Lys	ATC Ile	TGG Trp	CTG Leu	GCC Ala 295	AGC Ser	1260
GAG Glu	GCC Ala	TGG Trp	GCC Ala 300	AGC Ser	TCC Ser	TCC Ser	CTG Leu	ATC Ile 305	GCC Ala	ATG Met	CCT Pro	1296
CAG Gln 310	TAC Tyr	TTC Phe	CAC His	GTG Val	GTT Val	GGC Gly 315	GGC Gly	ACC Thr	ATT Ile	GGA Gly	TTC Phe 320	1332
GCT Ala	CTG Leu	AAG Lys	GCT Ala	GGG Gly 325	CAG Gln	ATC Ile	CCA Pro	GGC Gly	TTC Phe 330	CGG Arg	GAA Glu	1368
TTC Phe	CTG Leu	AAG Lys 335	AAG Lys	GTC Val	CAT His	CCC Pro	AGG Arg 340	AAG Lys	TCT Ser	GTC Val	CAC His	1404
AAT Asn 345	GGT Gly	TTT Phe	GCC Ala	AAG Lys	GAG Glu 350	TTT Phe	TGG Trp	GAA Glu	GAA Glu	ACA Thr 355	TTT Phe	1440
AAC Asn	TGC Cys	CAC His	CTC Leu 360	CAA Gln	GAA Glu	GGT Gly	GCA Ala	AAA Lys 365	GGA Gly	CCT Pro	TTA Leu	1476
CCT Pro	GTG Val 370	GAC Asp	ACC Thr	TTT Phe	CTG Leu	AGA Arg 375	GGT Gly	CAC His	GAA Glu	GAA Glu	AGT Ser 380	1512
GGC Gly	GAC Asp	AGG Arg	TTT Phe	AGC Ser 385	AAC Asn	AGC Ser	TCG Ser	ACA Thr	GCC Ala 390	TTC Phe	CGA Arg	1548
CCC Pro	CTC Leu	TGT Cys 395	ACA Thr	GGG Gly	GAT Asp	GAG Glu	AAC Asn 400	ATC Ile	AGC Ser	AGT Ser	GTC Val	1584
GAG Glu 405	ACC Thr	CCT Pro	TAC Tyr	ATA Ile	GAT Asp 410	TAC Tyr	ACG Thr	CAT His	TTA Leu	CGG Arg 415	ATA Ile	1620
TCC Ser	TAC Tyr	AAT Asn	GTG Val 420	TAC Tyr	TTA Leu	GCA Ala	GTC Val 425	TAC Tyr	TCC Ser	ATT Ile	GCC Ala	1656
CAC His 430	GCC Ala	TTG Leu	CAA Gln	GAT Asp	ATA Ile	TAT Tyr 435	ACC Thr	TGC Cys	TTA Leu	CCT Pro	GGG Gly 440	1692
AGA Arg	GGG Gly	CTC Leu	TTC Phe	ACC Thr 445	AAT Asn	GGC Gly	TCC Ser	TGT Cys	GCA Ala 450	GAC Asp	ATC Ile	1728

AAG AAA GTT GAG GCG TGG CAG GTC CTG AAG CAC CTA Lys Lys Val Glu Ala Trp Gln Val Leu Lys His Leu 455 460	1764
CGG CAT CTA AAC TTT ACA AAC AAT ATG GGG GAG CAG Arg His Leu Asn Phe Thr Asn Asn Met Gly Glu Gln 465 470 475	1800
GTG ACC TTT GAT GAG TGT GGT GAC CTG GTG GGG AAC Val Thr Phe Asp Glu Cys Gly Asp Leu Val Gly Asn 480 485	1836
TAT TCC ATC ATC AAC TGG CAC CTC TCC CCA GAG GAT Tyr Ser Ile Ile Asn Trp His Leu Ser Pro Glu Asp 490 495 500	1872
GGC TCC ATC GTG TTT AAG GAA GTC GGG TAT TAC AAC Gly Ser Ile Val Phe Lys Glu Val Gly Tyr Tyr Asn 505 510	1908
GTC TAT GCC AAG AAG GGA GAA AGA CTC TTC ATC AAC Val Tyr Ala Lys Lys Gly Glu Arg Leu Phe Ile Asn 515 520	1944
GAG GAG AAA ATC CTG TGG AGT GGG TTC TCC AGG GAG Glu Glu Lys Ile Leu Trp Ser Gly Phe Ser Arg Glu 525 530 535	1980
GTG CCC TTC TCC AAC TGC AGC CGA GAC TGC CTG GCA Val Pro Phe Ser Asn Cys Ser Arg Asp Cys Leu Ala 540 545	2016
GGG ACC AGG AAA GGG ATC ATT GAG GGG GAG CCC ACC Gly Thr Arg Lys Gly Ile Ile Glu Gly Glu Pro Thr 550 555 560	2052
TGC TGC TTT GAG TGT GTG GAG TGT CCT GAT GGG GAG Cys Cys Phe Glu Cys Val Glu Cys Pro Asp Gly Glu 565 570	2088
TAT AGT GAT GAG ACA GAT GCC AGT GCC TGT AAC AAG Tyr Ser Asp Glu Thr Asp Ala Ser Ala Cys Asn Lys 575 580	2124
TGC CCA GAT GAC TTC TGG TCC AAT GAG AAC CAC ACC Cys Pro Asp Asp Phe Trp Ser Asn Glu Asn His Thr 585 590 595	2160
TCC TGC ATT GCC AAG GAG ATC GAG TTT CTG TCG TGG Ser Cys Ile Ala Lys Glu Ile Glu Phe Leu Ser Trp 600 605	2196
ACG GAG CCC TTT GGG ATC GCA CTC ACC CTC TTT GCC Thr Glu Pro Phe Gly Ile Ala Leu Thr Leu Phe Ala 610 615 620	2232

GTG	CTG	GGC	ATT	TTC	CTG	ACA	GCC	TTT	GTG	CTG	GGT	2268
Val	Leu	Gly	Ile	Phe	Leu	Thr	Ala	Phe	Val	Leu	Gly	
				625					630			
GTG	TTT	ATC	AAG	TTC	CGC	AAC	ACA	CCC	ATT	GTC	AAG	2304
Val	Phe	Ile	Lys	Phe	Arg	Asn	Thr	Pro	Ile	Val	Lys	
		635					640					
GCC	ACC	AAC	CGA	GAG	CTC	TCC	TAC	CTC	CTC	CTC	TTC	2340
Ala	Thr	Asn	Arg	Glu	Leu	Ser	Tyr	Leu	Leu	Leu	Phe	
645					650					655		
TCC	CTG	CTC	TGC	TGC	TTC	TCC	AGC	TCC	CTG	TTC	TTC	2376
Ser	Leu	Leu	Cys	Cys	Phe	Ser	Ser	Ser	Leu	Phe	Phe	
			660						665			
ATC	GGG	GAG	CCC	CAG	GAC	TGG	ACG	TGC	CGC	CTG	CGC	2412
Ile	Gly	Glu	Pro	Gln	Asp	Trp	Thr	Cys	Arg	Leu	Arg	
	670					675					680	
CAG	CCG	GCC	TTT	GGC	ATC	AGC	TTC	GTG	CTC	TGC	ATC	2448
Gln	Pro	Ala	Phe	Gly	Ile	Ser	Phe	Val	Leu	Cys	Ile	
				685					690			
TCA	TGC	ATC	CTG	GTG	AAA	ACC	AAC	CGT	GTC	CTC	CTG	2484
Ser	Cys	Ile	Leu	Val	Lys	Thr	Asn	Arg	Val	Leu	Leu	
		695					700					
GTG	TTT	GAG	GCC	AAG	ATC	CCC	ACC	AGC	TTC	CAC	CGC	2520
Val	Phe	Glu	Ala	Lys	Ile	Pro	Thr	Ser	Phe	His	Arg	
705					710					715		
AAG	TGG	TGG	GGG	CTC	AAC	CTG	CAG	TTC	CTG	CTG	GTT	2556
Lys	Trp	Trp	Gly	Leu	Asn	Leu	Gln	Phe	Leu	Leu	Val	
			720						725			
TTC	CTC	TGC	ACC	TTC	ATG	CAG	ATT	GTC	ATC	TGT	GTG	2592
Phe	Leu	Cys	Thr	Phe	Met	Gln	Ile	Val	Ile	Cys	Val	
	730					735					740	
ATC	TGG	CTC	TAC	ACC	GCG	CCC	CCC	TCA	AGC	TAC	CGC	2628
Ile	Trp	Leu	Tyr	Thr	Ala	Pro	Pro	Ser	Ser	Tyr	Arg	
				745					750			
AAC	CAG	GAG	CTG	GAG	GAT	GAG	ATC	ATC	TTC	ATC	ACG	2664
Asn	Gln	Glu	Leu	Glu	Asp	Glu	Ile	Ile	Phe	Ile	Thr	
		755					760					
TGC	CAC	GAG	GGC	TCC	CTC	ATG	GCC	CTG	GGC	TTC	CTG	2700
Cys	His	Glu	Gly	Ser	Leu	Met	Ala	Leu	Gly	Phe	Leu	
765					770					775		
ATC	GGC	TAC	ACC	TGC	CTG	CTG	GCT	GCC	ATC	TGC	TTC	2736
Ile	Gly	Tyr	Thr	Cys	Leu	Leu	Ala	Ala	Ile	Cys	Phe	
			780					785				

TTC TTT GCC TTC AAG TCC CGG AAG CTG CCG GAG AAC	2772
Phe Phe Ala Phe Lys Ser Arg Lys Leu Pro Glu Asn	
790 795 800	
TTC AAT GAA GCC AAG TTC ATC ACC TTC AGC ATG CTC	2808
Phe Asn Glu Ala Lys Phe Ile Thr Phe Ser Met Leu	
805 810	
ATC TTC TTC ATC GTC TGG ATC TCC TTC ATT CCA GCC	2844
Ile Phe Phe Ile Val Trp Ile Ser Phe Ile Pro Ala	
815 820	
TAT GCC AGC ACC TAT GGC AAG TTT GTC TCT GCC GTA	2880
Tyr Ala Ser Thr Tyr Gly Lys Phe Val Ser Ala Val	
825 830 835	
GAG GTG ATT GCC ATC CTG GCA GCC AGC TTT GGC TTG	2916
Glu Val Ile Ala Ile Leu Ala Ala Ser Phe Gly Leu	
840 845	
CTG GCG TGC ATC TTC TTC AAC AAG ATC TAC ATC ATT	2952
Leu Ala Cys Ile Phe Phe Asn Lys Ile Tyr Ile Ile	
850 855 860	
CTC TTC AAG CCA TCC CGC AAC ACC ATC GAG GAG GTG	2988
Leu Phe Lys Pro Ser Arg Asn Thr Ile Glu Glu Val	
865 870	
CGT TGC AGC ACC GCA GCT CAC GCT TTC AAG GTG GCT	3024
Arg Cys Ser Thr Ala Ala His Ala Phe Lys Val Ala	
875 880	
GCC CGG GCC ACG CTG CGC CGC AGC AAC GTC TCC CGC	3060
Ala Arg Ala Thr Leu Arg Arg Ser Asn Val Ser Arg	
885 890 895	
AAG CGG TCC AGC AGC CTT GGA GGC TCC ACG GGA TCC	3096
Lys Arg Ser Ser Ser Leu Gly Gly Ser Thr Gly Ser	
900 905	
ACC CCC TCC TCC TCC ATC AGC AGC AAG AGC AAC AGC	3132
Thr Pro Ser Ser Ser Ile Ser Ser Lys Ser Asn Ser	
910 915 920	
GAA GAC CCA TTC CCA CAG CCC GAG AGG CAG AAG CAG	3168
Glu Asp Pro Phe Pro Gln Pro Glu Arg Gln Lys Gln	
925 930	
CAG CAG CCG CTG GCC CTA ACC CAG CAA GAG CAG CAG	3204
Gln Gln Pro Leu Ala Leu Thr Gln Gln Glu Gln Gln	
935 940	
CAG CAG CCC CTG ACC CTC CCA CAG CAG CAA CGA TCT	3240
Gln Gln Pro Leu Thr Leu Pro Gln Gln Gln Arg Ser	
945 950 955	

CAG CAG CAG CCC AGA TGC AAG CAG AAG GTC ATC TTT Gln Gln Gln Pro Arg Cys Lys Gln Lys Val Ile Phe 960 965	3276
GGC AGC GGC ACG GTC ACC TTC TCA CTG AGC TTT GAT Gly Ser Gly Thr Val Thr Phe Ser Leu Ser Phe Asp 970 975 980	3312
GAG CCT CAG AAG AAC GCC ATG GCC CAC GGG AAT TCT Glu Pro Gln Lys Asn Ala Met Ala His Gly Asn Ser 985 990	3348
ACG CAC CAG AAC TCC CTG GAG GCC CAG AAA AGC AGC Thr His Gln Asn Ser Leu Glu Ala Gln Lys Ser Ser 995 1000	3384
GAT ACG CTG ACC CGA CAC CAG CCA TTA CTC CCG CTG Asp Thr Leu Thr Arg His Gln Pro Leu Leu Pro Leu 1005 1010 1015	3420
CAG TGC GGG GAA ACG GAC TTA GAT CTG ACC GTC CAG Gln Cys Gly Glu Thr Asp Leu Asp Leu Thr Val Gln 1020 1025	3456
GAA ACA GGT CTG CAA GGA CCT GTG GGT GGA GAC CAG Glu Thr Gly Leu Gln Gly Pro Val Gly Gly Asp Gln 1030 1035 -1040	3492
CGG CCA GAG GTG GAG GAC CCT GAA GAG TTG TCC CCA Arg Pro Glu Val Glu Asp Pro Glu Glu Leu Ser Pro 1045 1050	3528
GCA CTT GTA GTG TCC AGT TCA CAG AGC TTT GTC ATC Ala Leu Val Val Ser Ser Ser Gln Ser Phe Val Ile 1055 1060	3564
AGT GGT GGA GGC AGC ACT GTT ACA GAA AAC GTA GTG Ser Gly Gly Gly Ser Thr Val Thr Glu Asn Val Val 1065 1070 1075	3600
AAT TCA TAAAATGGAA GGAGAAGACT GGGCTAGGGA Asn Ser	3636
GAATGCAGAG AGGTTTCTTG GGGTCCCAGG GATGAGGAAT	3676
CGCCCCAGAC TCCTTTCCTC TGAGGAAGAA GGGATAATAG	3716
ACACATCAAA TGCCCCGAAT TTAGTCACAC CATCTTAAAT	3756
GACAGTGAAT TGACCCATGT TCCCTTTAAA AAAAAAAAAA	3796
AAAAAGCGGC CGC	3809

Popis obrázků:

Obr. 1a – 1r popisují strukturní vzorce sloučenin

- 5 Obr. 2 a 3 popisují fyzikálně-chemické vlastnosti a spektrální charakteristiky příslušných sloučenin, včetně jejich teplot tání (mp), optické otáčivosti, mol. hmotnosti apod.

Obr. 4 až 95 popisují hmotnostní spektra NPS sloučenin (ionizace nárazem elektronů, 70 eV).

- 10 Obr. 96, 98, 100, 102, 104, 109, 115, 117, 119 a 121 popisují ^1H -NMR spektra hydrochloridů sloučenin 9C (Obr. 96), 9R (Obr. 98), 11X (Obr. 100), 13U (Obr. 102), 13X (Obr. 104), 16Q (Obr. 109), 16W (Obr. 115), 16X (Obr. 117), 17M (Obr. 119) a 17O (Obr. 121), měřená na přístroji Varian při 300 MHz; chemické posuny v rozsahu 0 až 5 ppm byly měřeny v 1% roztoku deuterovaného methanolu v deuteriochloroformu (5 mg/ml), chemické posuny v rozsahu 5 až 12 ppm pak v deuteriochloroformu (60 mg/ml).

- 20 Obr. 106, 107, 111, 113, 123, 125, 126, 128, 129 a 131 popisují ^1H -NMR spektra hydrochloridů sloučenin 14L (Obr. 106), 14U (Obr. 107), 16R (Obr. 111), 16T (Obr. 113), 17P (Obr. 123), 17W (Obr. 125), 17X (Obr. 126), 25U (Obr. 128), 25V (Obr. 129) a 25W (Obr. 131), měřená na přístroji Varian při 300 MHz; chemické posuny v rozsahu 0 až 10 ppm byly měřeny v 1% roztoku deuterovaného methanolu v deuteriochloroformu (5 mg/ml), chemické posuny v rozsahu 10 až 12 ppm pak v deuteriochloroformu (60 mg/ml).

- 25 Obr. 97 (hydrochlorid sloučeniny 9C), 99 (hydrochlorid sloučeniny 9R), 101 (hydrochlorid sloučeniny 11X), 103 (hydrochlorid sloučeniny 13U), 105 (hydrochlorid sloučeniny 13X), 108 (hydrochlorid sloučeniny 14U), 110 (hydrochlorid sloučeniny 16Q), 112 (hydrochlorid sloučeniny 16R), 114 (hydrochlorid sloučeniny 16T), 116 (hydrochlorid sloučeniny 16W), 118 (hydrochlorid sloučeniny 16X), 120 (hydrochlorid sloučeniny 17M), 122 (hydrochlorid sloučeniny 17O) a 124 (hydrochlorid sloučeniny 17P) popisují ^{13}C -NMR spektra shora uvedených hydrochloridů, měřená na přístroji Varian při 75 MHz, a to v deuteriochloroformu (60 mg/ml).

- 30 Obr. 127 (hydrochlorid sloučeniny 17X) a 130 (hydrochlorid sloučeniny 25V) popisují ^{13}C -NMR spektra shora uvedených hydrochloridů, měřená na přístroji Varian při 75 MHz v deuteriochloroformu obsahujícím 1 % deuterovaného methanolu (20 mg/ml).

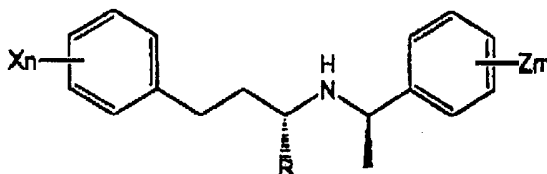
- 35 Ve shora zmíněných NMR spektrech jsou ponechána následující mezinárodně uznávaná a používaná označení:

- | | | | |
|----|---------------|---|---|
| 40 | (PPM) | – | chemické posuny v ppm |
| | MULTIPLICITY | – | multiplicita (tvar signálu): |
| | s | = | singlet |
| | bs | = | široký singlet |
| 45 | d | = | dublet |
| | dd | = | dvojitý dublet |
| | t | = | triplet |
| | q | = | kvartet |
| | m | = | multiplet |
| 50 | COUPLING (HZ) | – | interakční konstanta (Hz) |
| | ASSIGNMENZ | – | přirazený (aliph = alifatický řetězec, RIGHT SIDE = pravá strana, LEFT SIDE = levá strana, OR = nebo, arom = aromatický systém, naphthyl = naftyl, phenyl = fenyl). |

55

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Diaromatická sloučenina obecného vzorce



5

kde R je atom vodíku nebo methylová skupina;

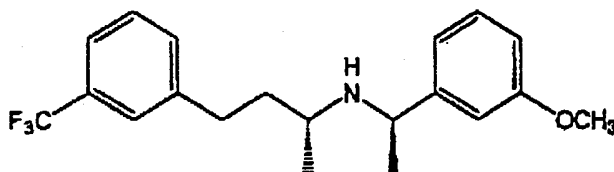
m a n znamenají nezávisle na sobě celé číslo od 0 do 5;

10 každá skupina X je nezávisle halogenmethylová skupina nebo halogenalkoxyskupina obsahující 1 až 4 uhlíkové atomy a

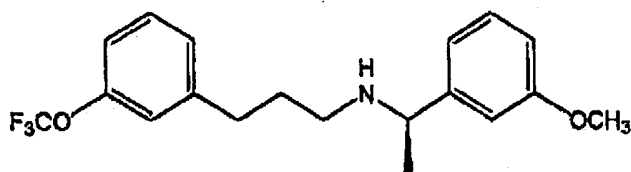
každá skupina Z je nezávisle alkoxyskupina obsahující 1 až 4 uhlíkové atomy,

15 nebo její farmaceuticky přijatelná sůl nebo její komplex.

2. Diaromatická sloučenina podle nároku 1 vzorce



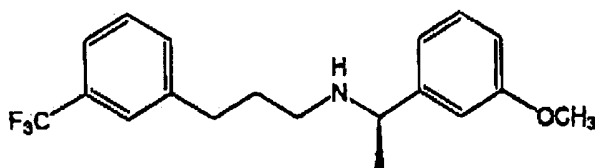
3. Diaromatická sloučenina vzorce



20

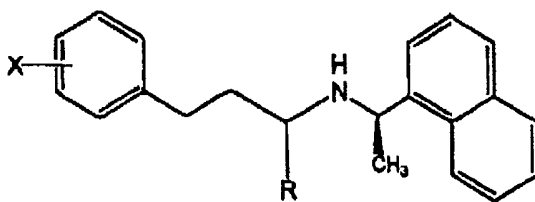
nebo její farmaceuticky přijatelná sůl nebo její komplex.

4. Diaromatická sloučenina vzorce



25 nebo její farmaceuticky přijatelná sůl nebo její komplex.

5. Diaromatická sloučenina obecného vzorce

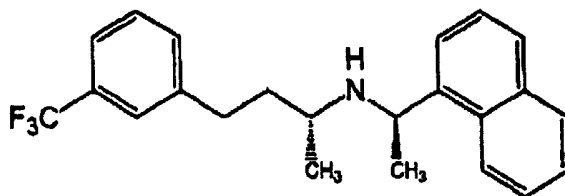


kde X je trihalogenmethylová skupina nebo trihalogenmethoxyskupina; a

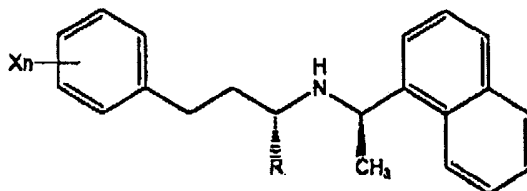
R je $-H$ nebo skupina $-CH_3$;

nebo její farmaceuticky přijatelná sůl nebo její komplex.

6. Diaromatická sloučenina podle nároku 5 vzorce



7. Diaromatická sloučenina obecného vzorce:



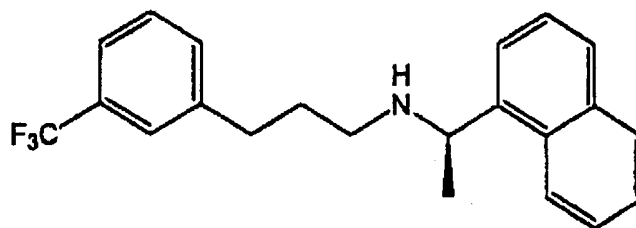
kde R znamená buď atom vodíku nebo methylovou skupinu;

n je celé číslo od 0 do 5; a

X je nezávisle trihalogenmethylová skupina,

nebo její farmaceuticky přijatelná sůl nebo její komplex.

8. Diaromatická sloučenina vzorce



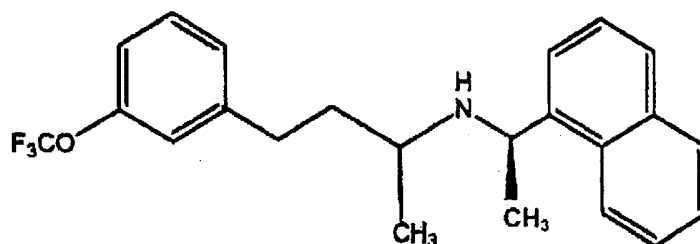
nebo její farmaceuticky přijatelná sůl nebo její komplex.

5

9. Diaromatická sloučenina, její farmaceuticky přijatelná sůl nebo její komplex podle nároku 5, kde X znamená trifluormethylovou skupinu nebo trifluormethoxyskupinu a R je -H nebo skupina -CH₃.

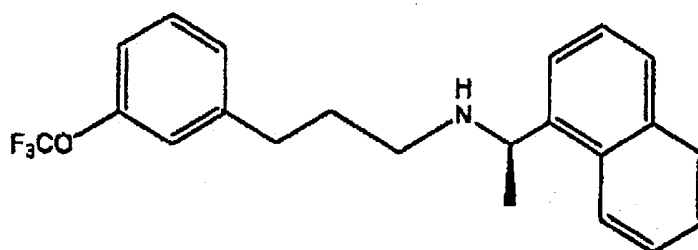
10. Diaromatická sloučenina, její farmaceuticky přijatelná sůl nebo její komplex podle nároku 5 nebo 9, kde X je vázána k fenylové skupině v poloze 3.

11. Diaromatická sloučenina podle nároku 10 vzorce



15. nebo její farmaceuticky přijatelná sůl nebo její komplex.

12. Diaromatická sloučenina podle nároku 10 vzorce



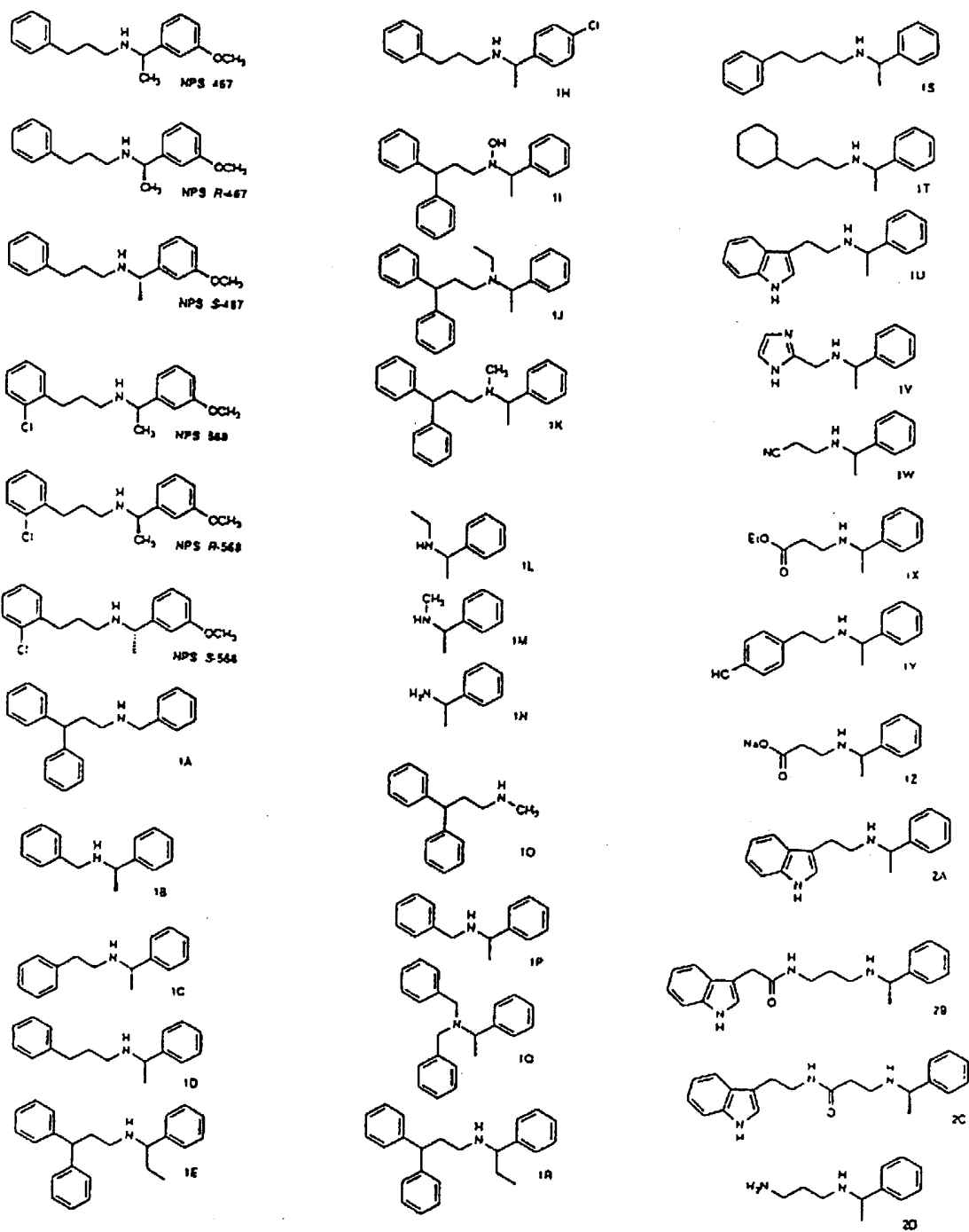
nebo její farmaceuticky přijatelná sůl nebo její komplex.

20

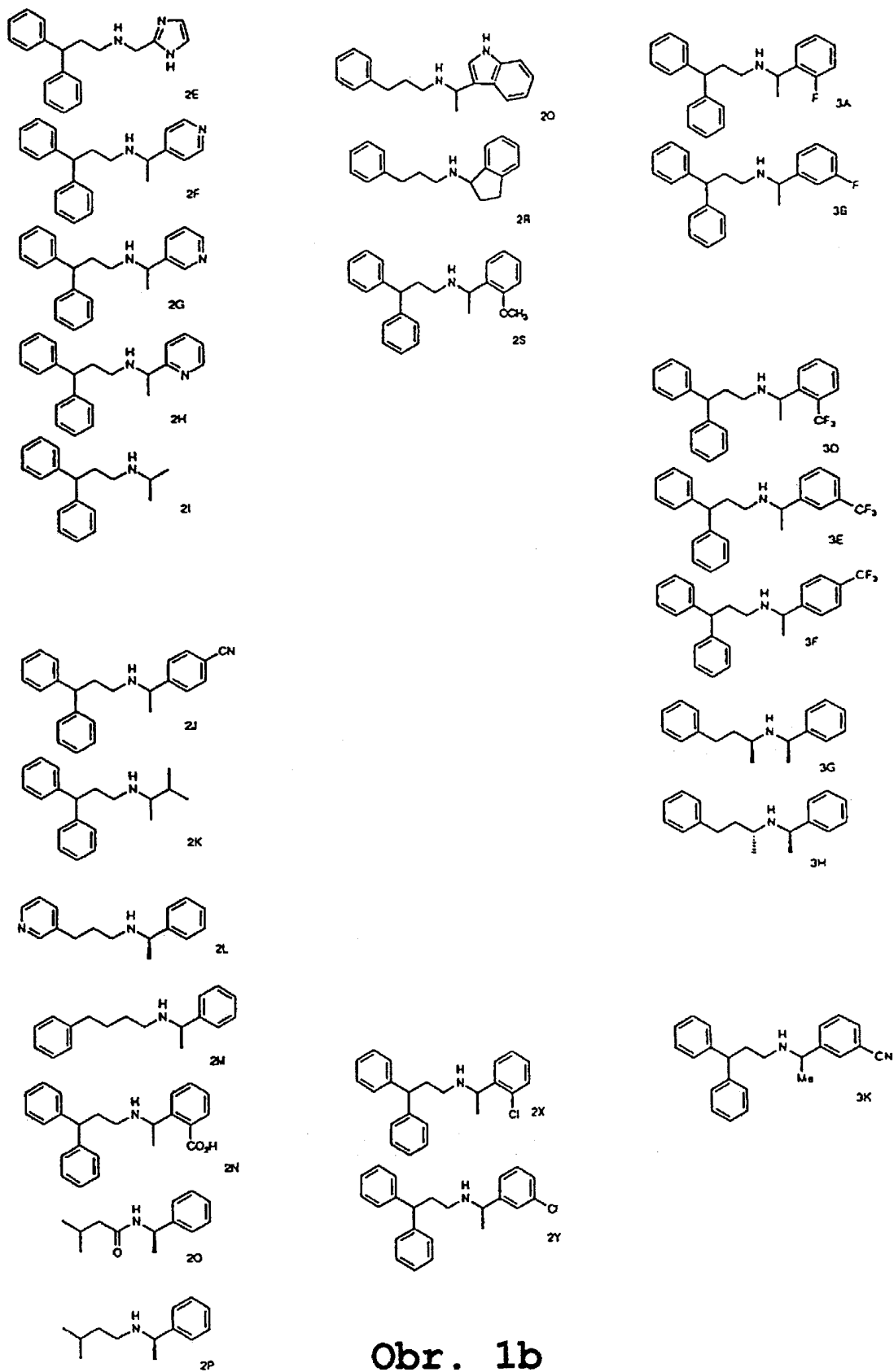
13. Kompozice pro modulování aktivity receptoru vápníku, vyznačující se tím, že obsahuje diaromatickou sloučeninu podle kteréhokoli z nároků 1 až 12 nebo její farmaceuticky přijatelnou sůl nebo její komplex.

25. 14. Kompozice pro léčení pacienta, který má onemocnění charakterizované abnormální hladinou iontů vápníku nebo látek, jejichž hladinu ovlivňuje hladina iontů vápníku, vyznačující se tím, že obsahuje diaromatickou sloučeninu podle kteréhokoli z nároků 1 až 12 nebo její farmaceuticky přijatelnou sůl nebo její komplex.

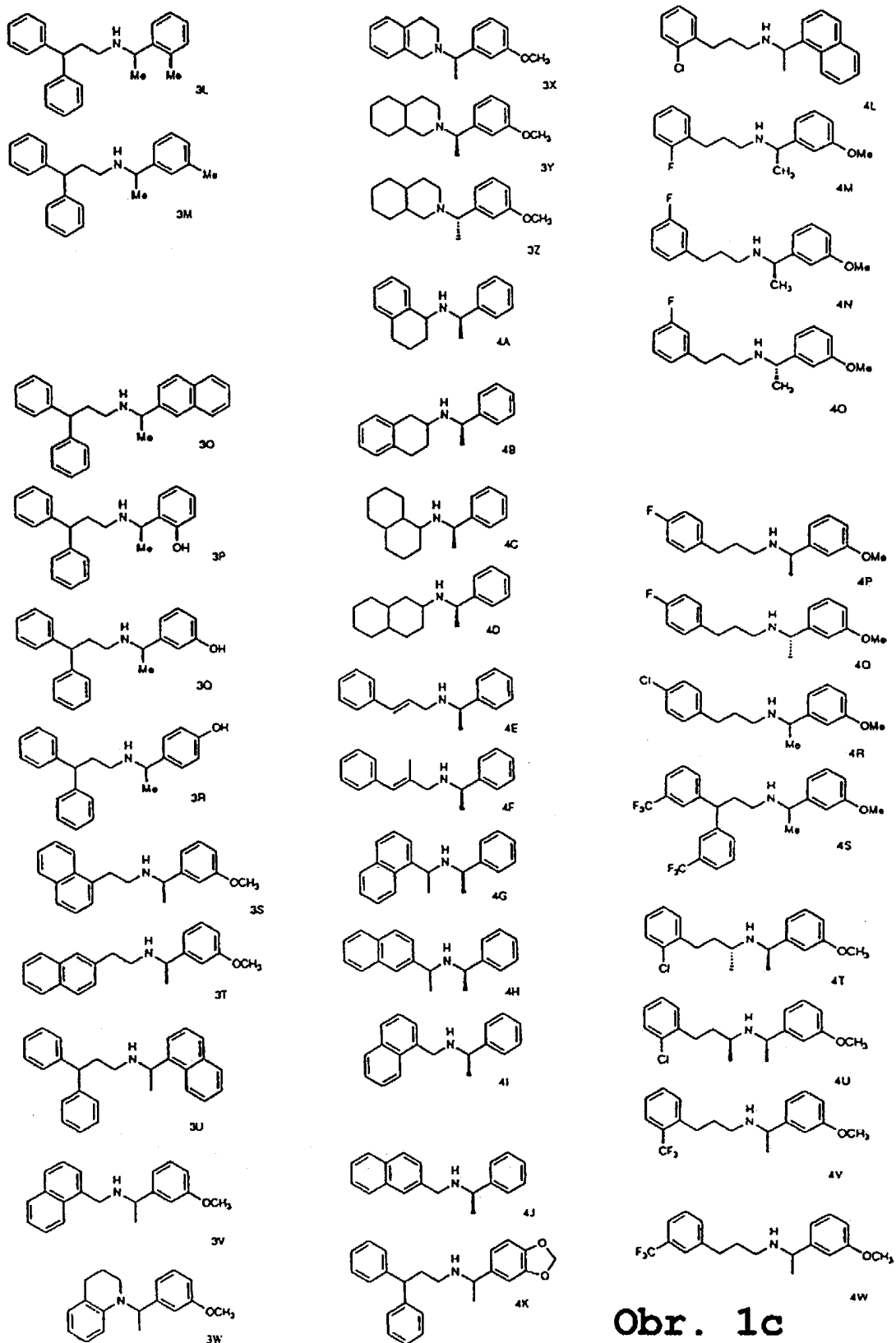
15. Kompozice pro léčení primárního nebo sekundárního hyperparathyroidismu, **v y z n a č u - j í c í s e t í m**, že obsahuje diaromatickou sloučeninu podle kteréhokoli z nároků 1 až 12 nebo její farmaceuticky přijatelnou sůl nebo její komplex.
- 5 16. Kompozice pro léčení Pagetovy choroby, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje diaromatickou sloučeninu podle kteréhokoli z nároků 1 až 12 nebo její farmaceuticky přijatelnou sůl nebo její komplex.
- 10 17. Kompozice pro léčení hyperkalcemických onemocnění, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje diaromatickou sloučeninu podle kteréhokoli z nároků 1 až 12 nebo její farmaceuticky přijatelnou sůl nebo její komplex.
- 15 18. Kompozice pro léčení osteoporózy, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje diaromatickou sloučeninu podle kteréhokoli z nároků 1 až 12 nebo její farmaceuticky přijatelnou sůl nebo její komplex.
- 20 19. Kompozice pro léčení vysokého krevního tlaku, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje diaromatickou sloučeninu podle kteréhokoli z nároků 1 až 12 nebo její farmaceuticky přijatelnou sůl nebo její komplex.
- 25 20. Kompozice pro léčení renální osteodystrofie, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje diaromatickou sloučeninu podle kteréhokoli z nároků 1 až 12 nebo její farmaceuticky přijatelnou sůl nebo její komplex.
- 30 21. Kompozice pro snížení hladiny PTH v krvi, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje diaromatickou sloučeninu podle kteréhokoli z nároků 1 až 12 nebo její farmaceuticky přijatelnou sůl nebo její komplex.
- 35 22. Farmaceutická kompozice pro snížení hladiny vápenatých iontů v krvi, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje diaromatickou sloučeninu podle kteréhokoli z nároků 1 až 12 nebo její farmaceuticky přijatelnou sůl nebo její komplex.



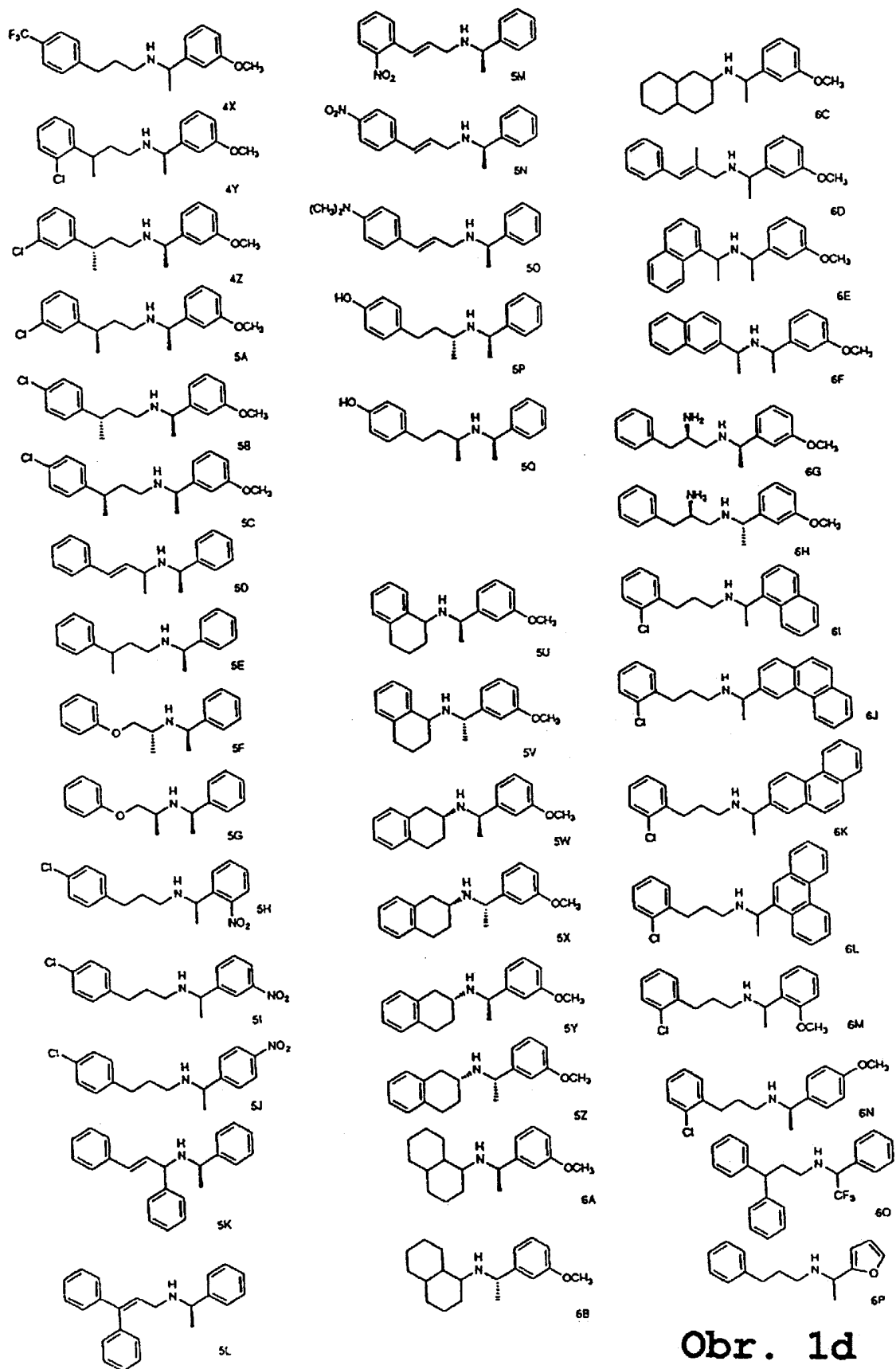
Obr. 1a



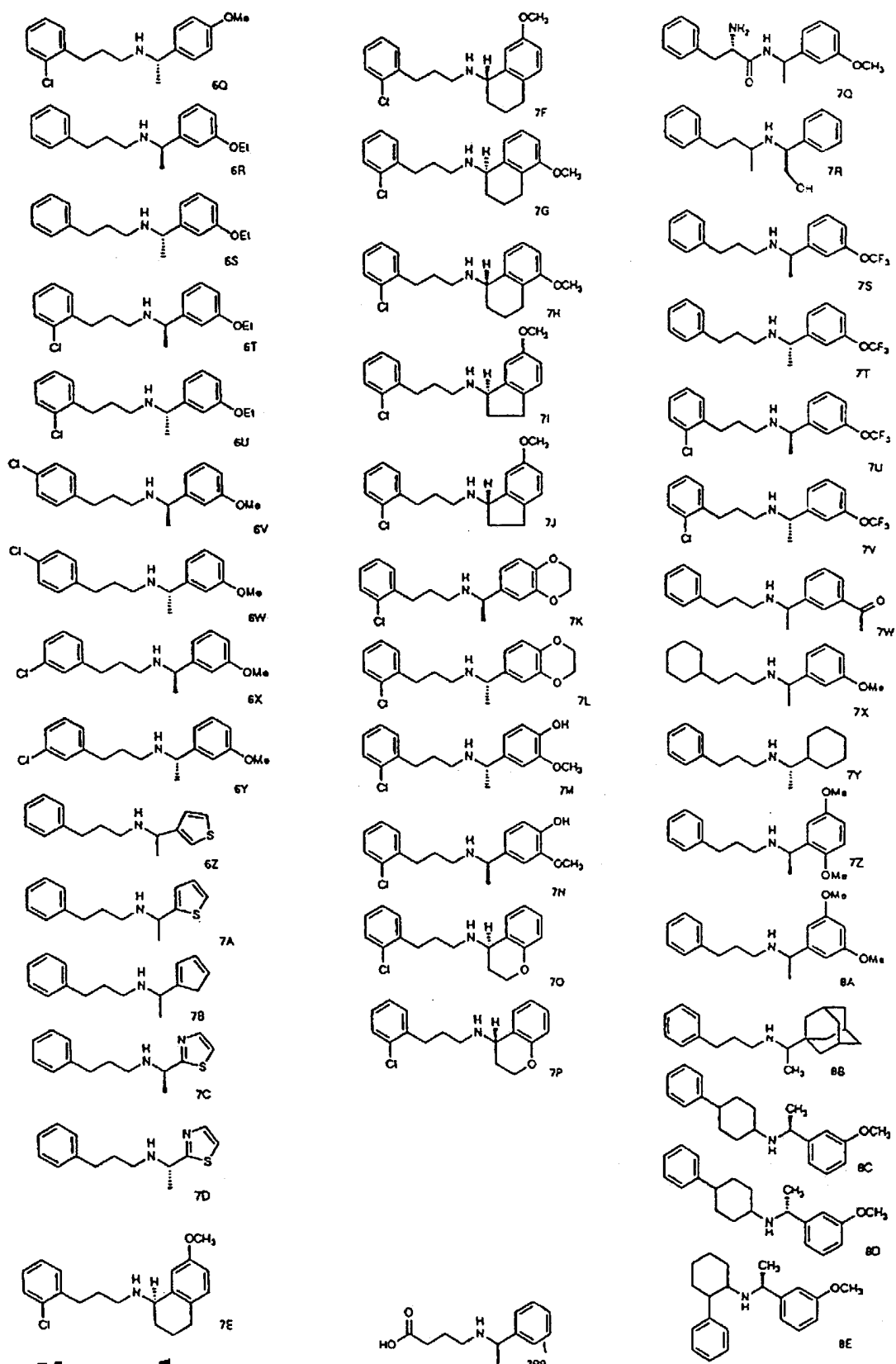
Obr. 1b



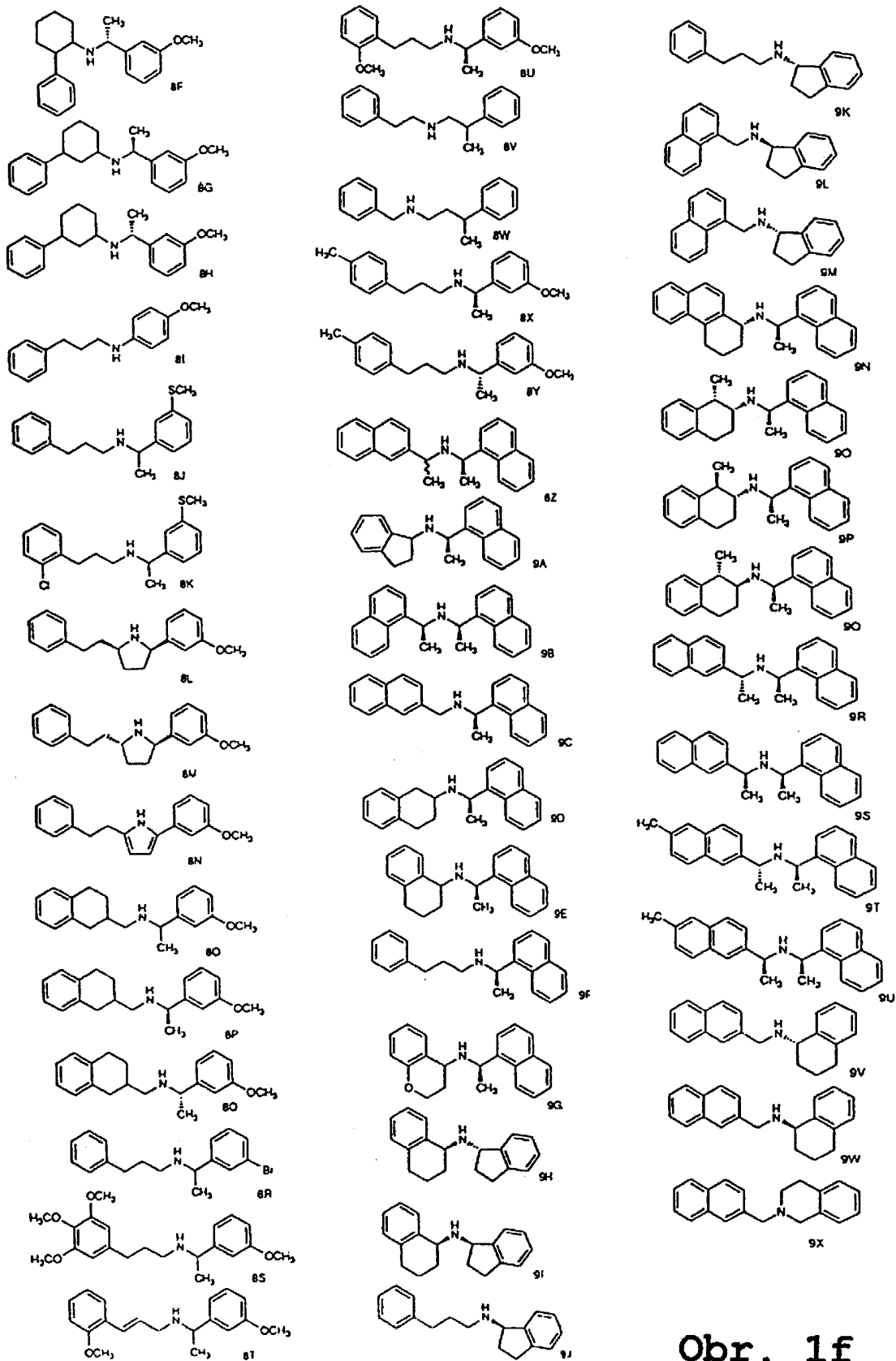
Obr. 1c



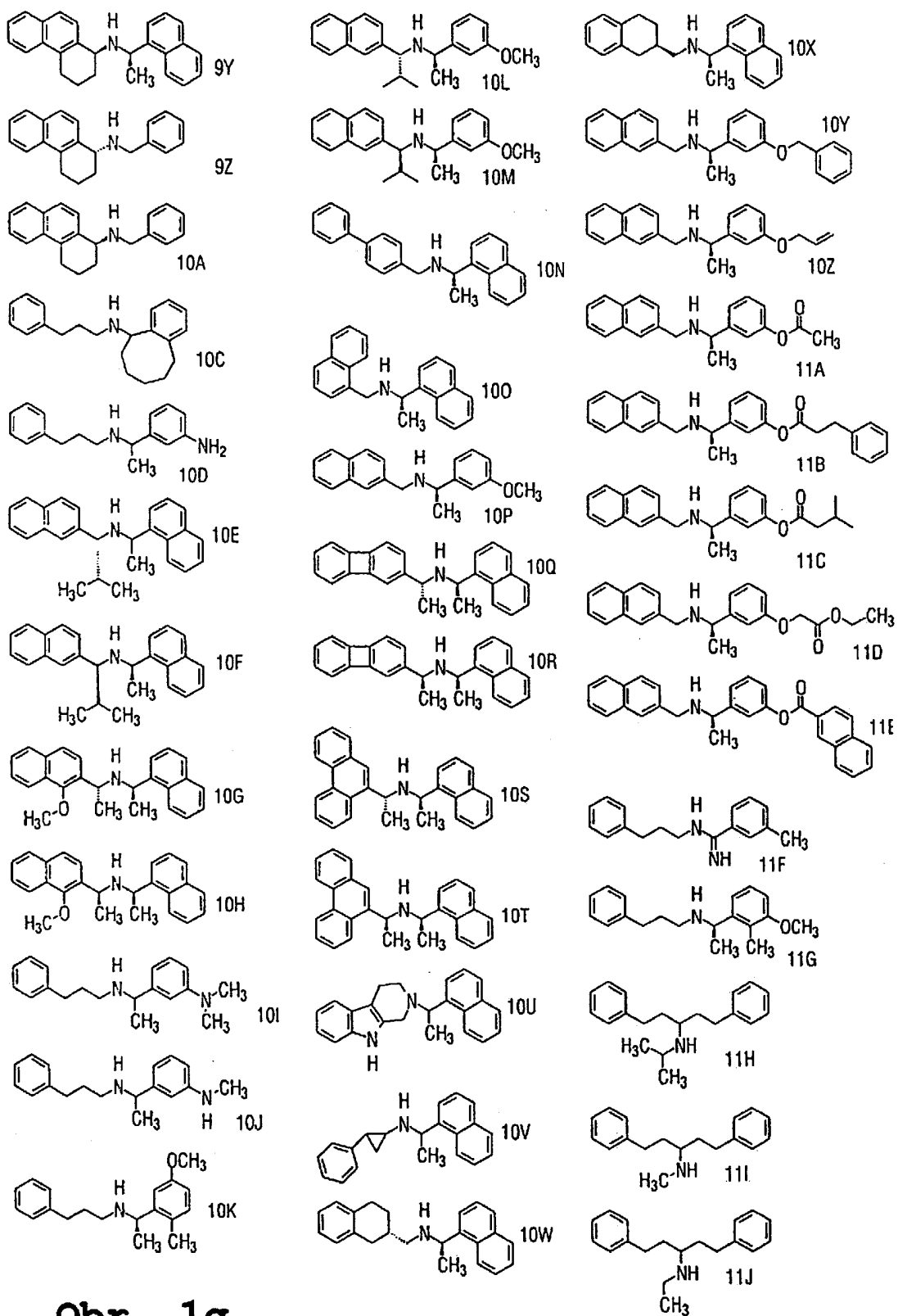
Obr. 1d



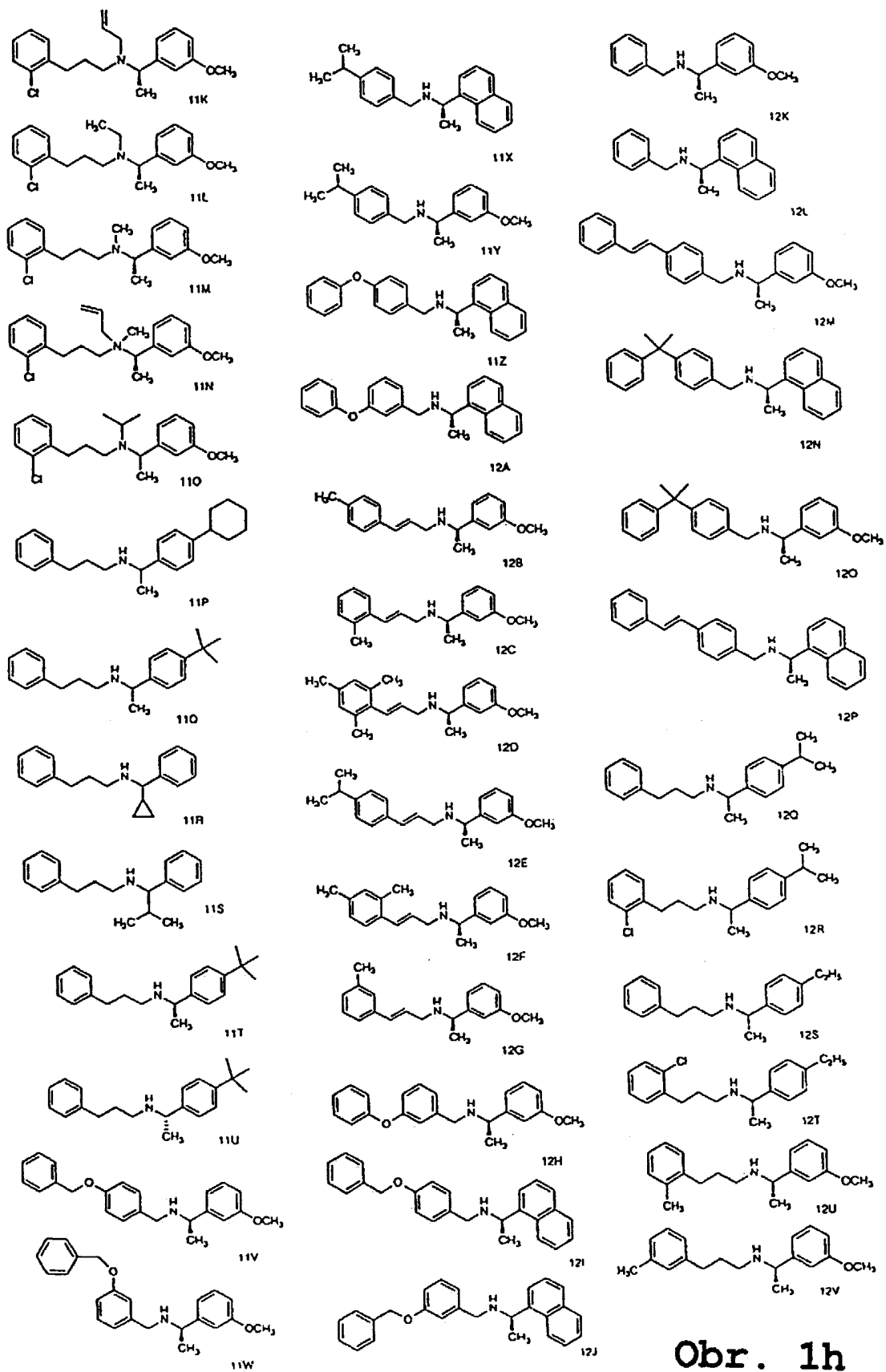
Obr. 1e



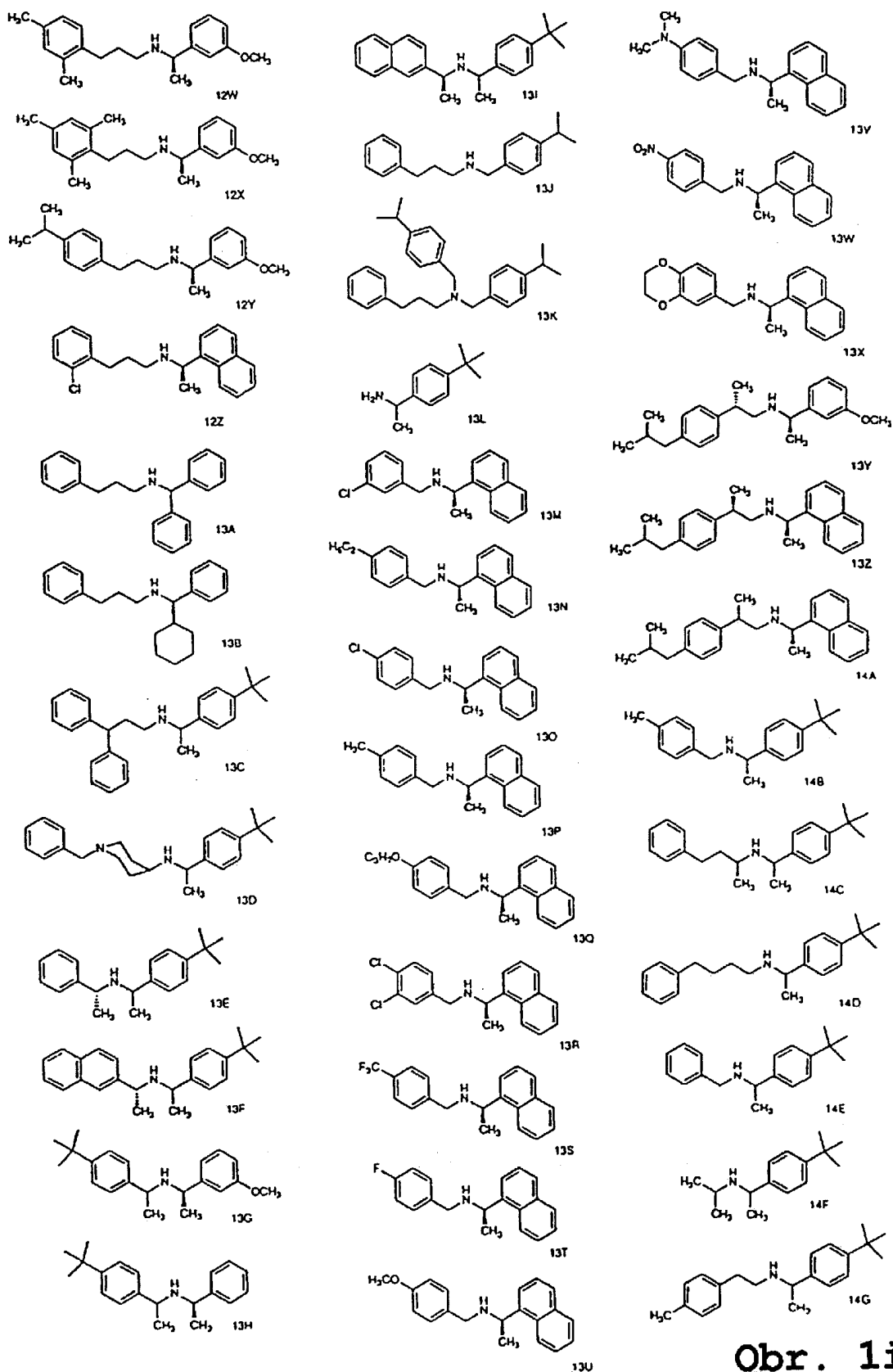
Obr. 1f



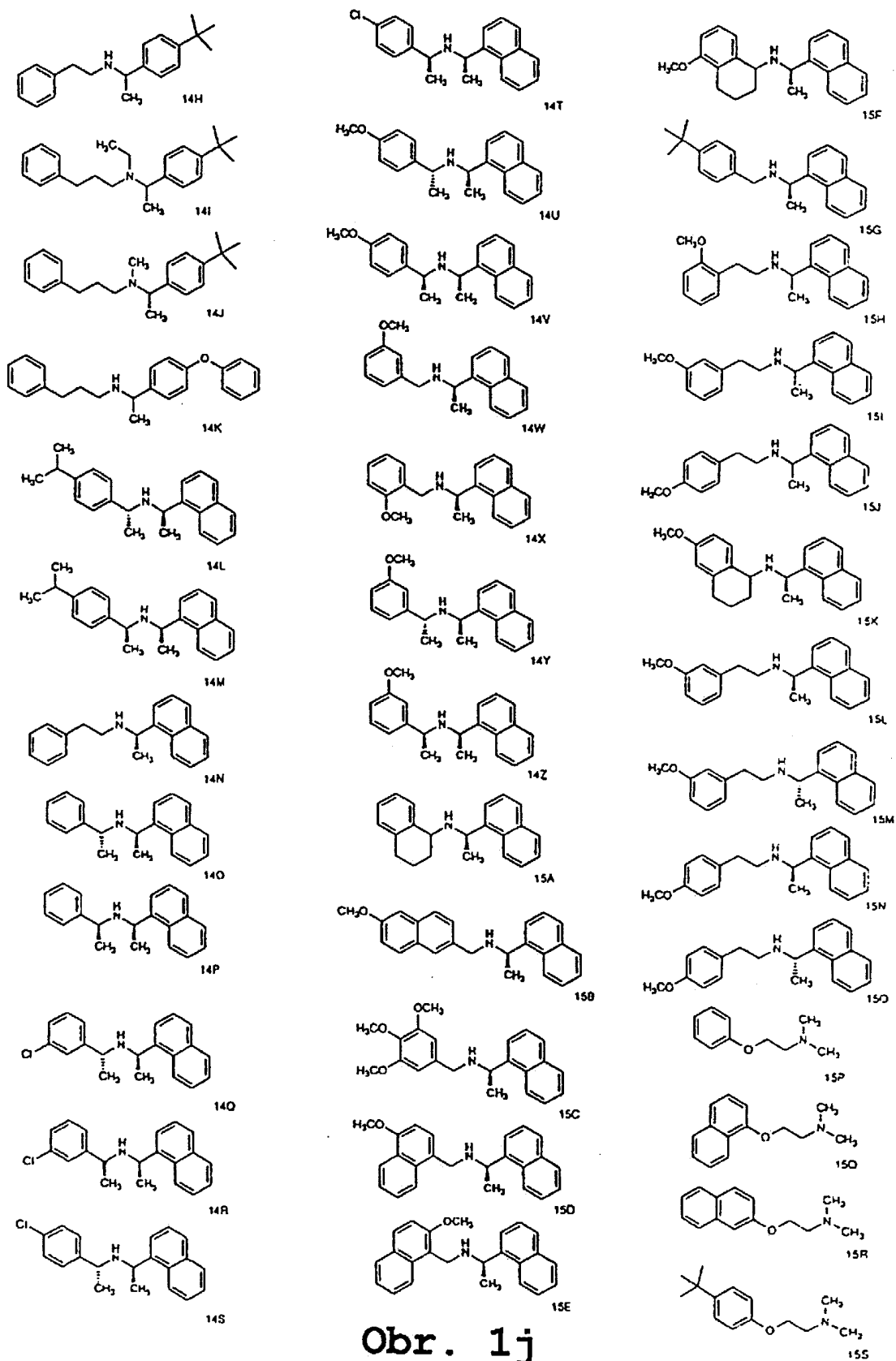
Obr. 1g



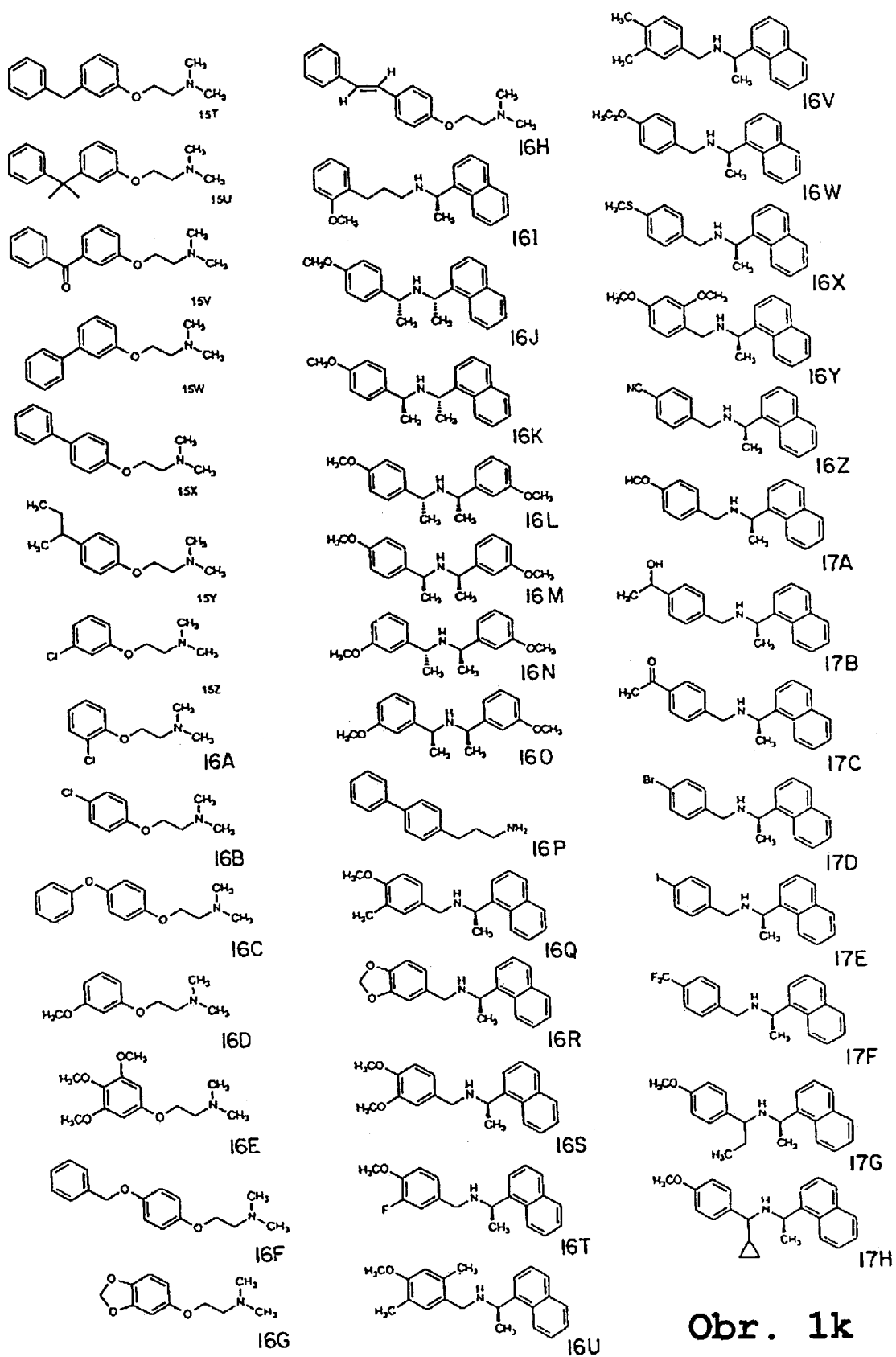
Obr. 1h



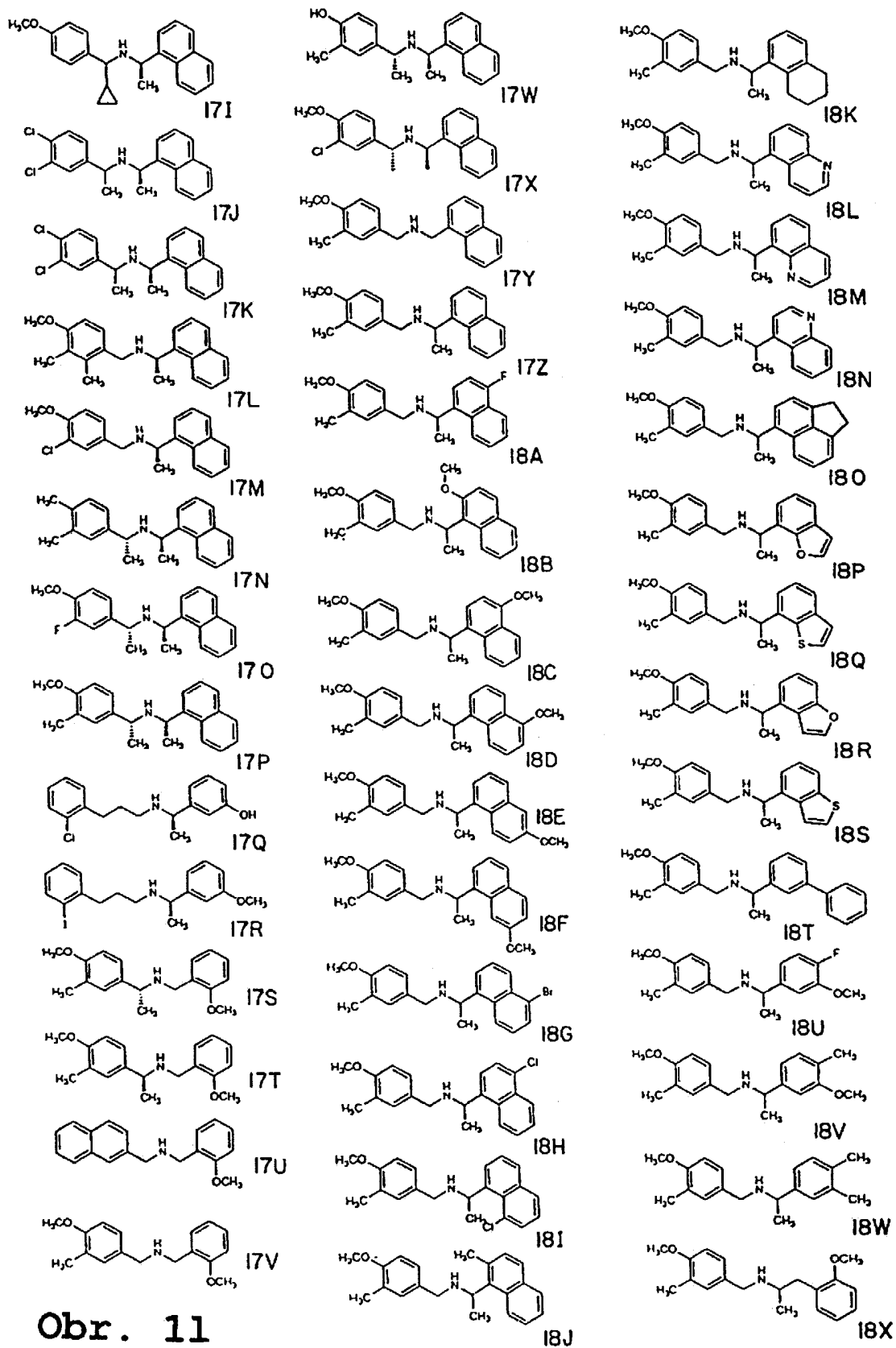
Obr. 1i

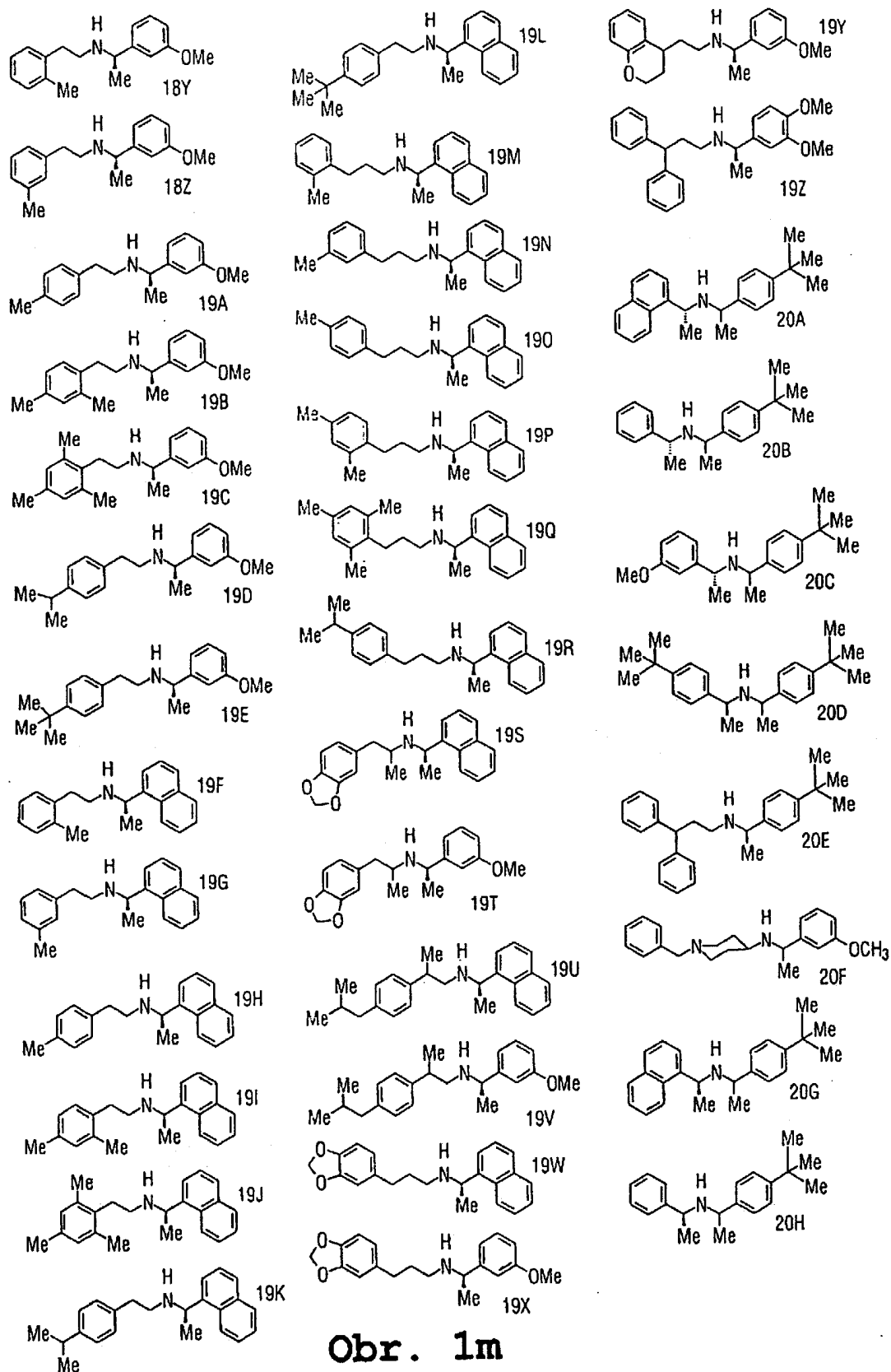


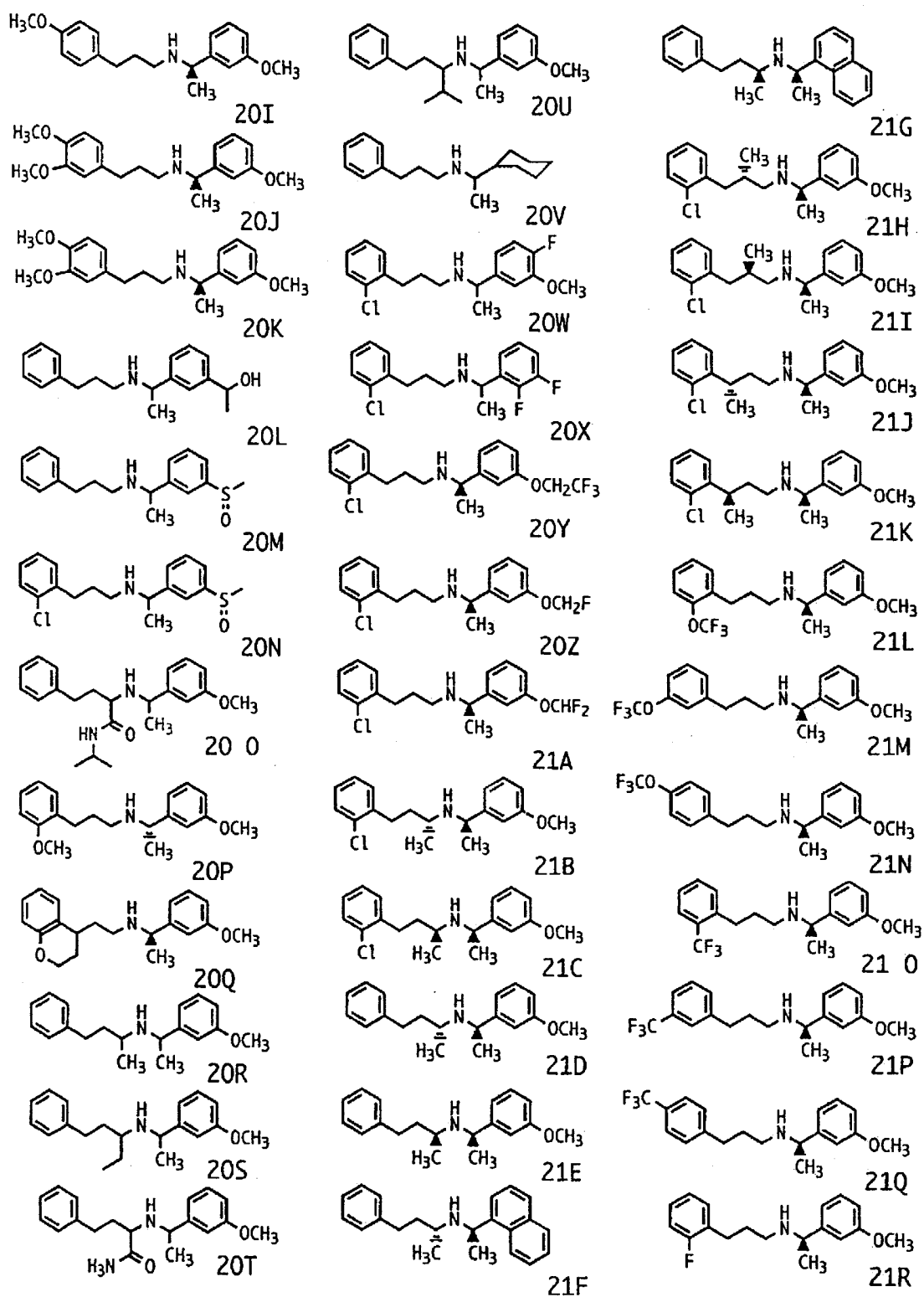
Obr. 1j



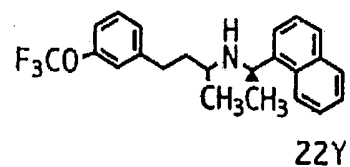
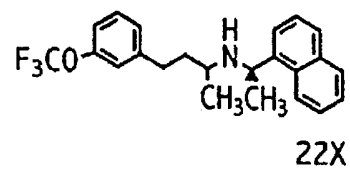
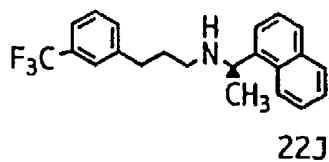
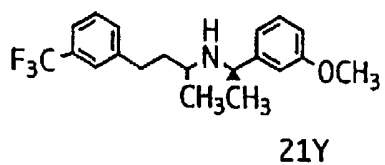
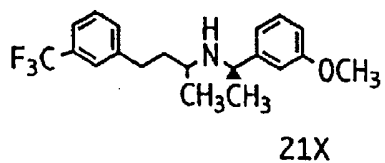
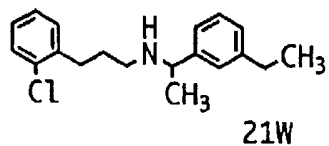
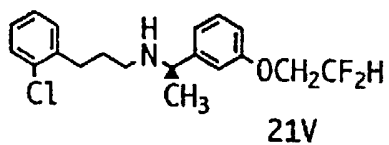
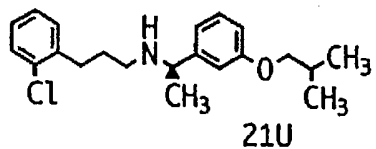
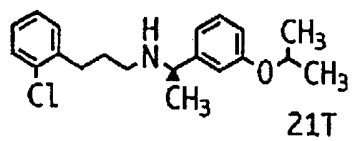
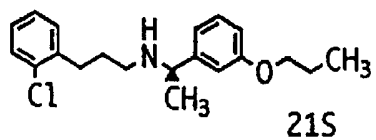
Obr. 1k



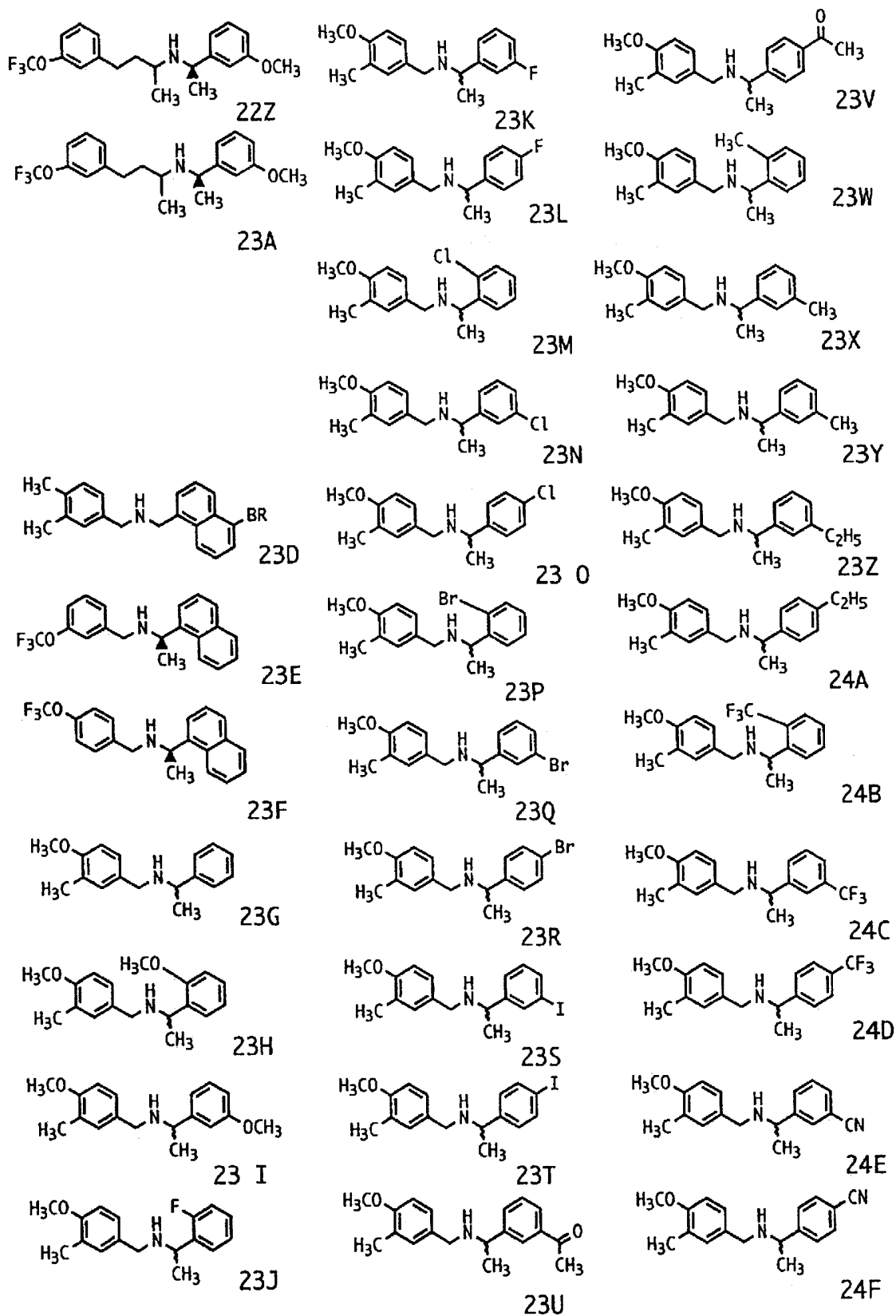




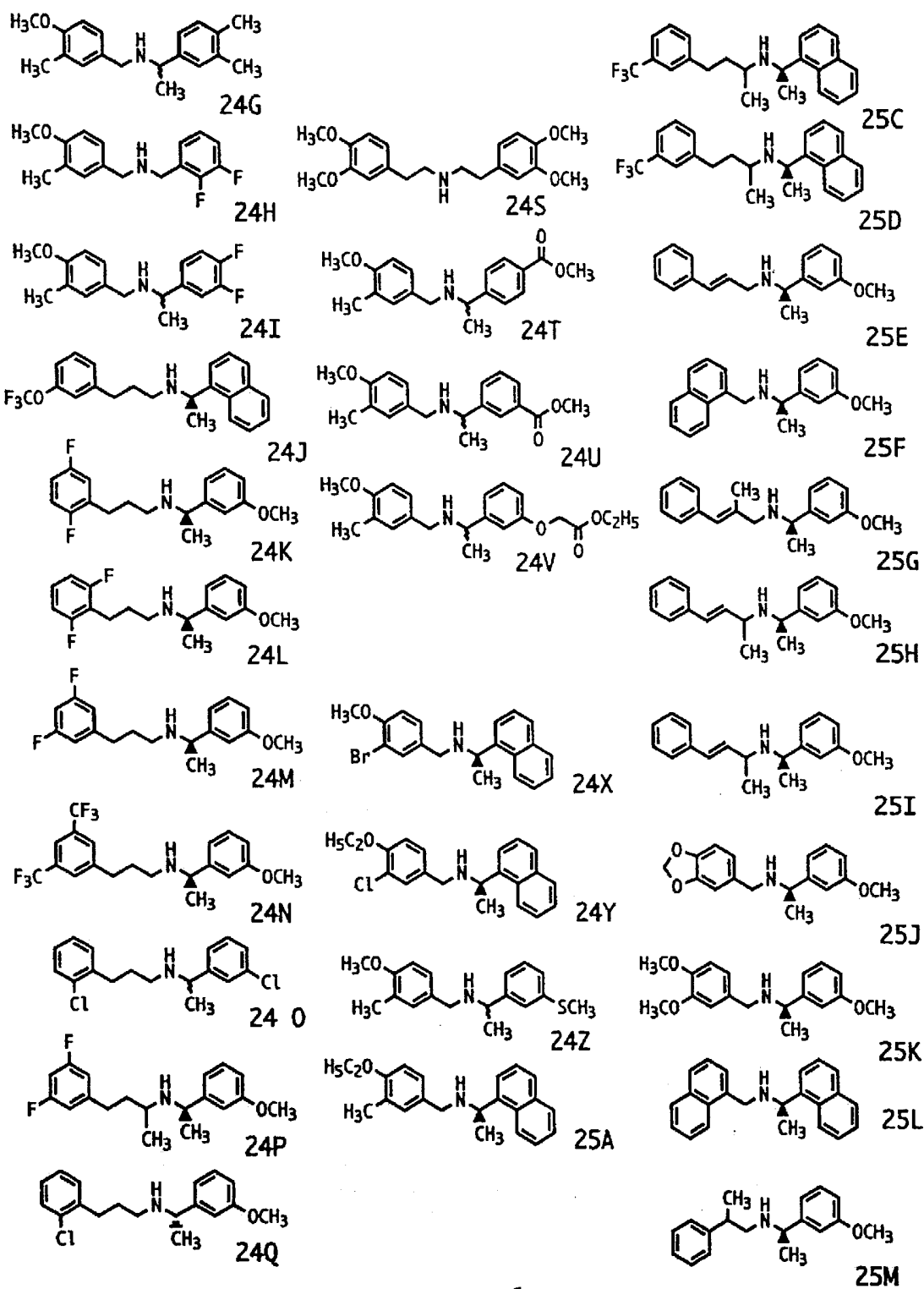
Obr. 1n



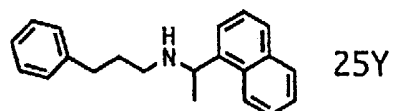
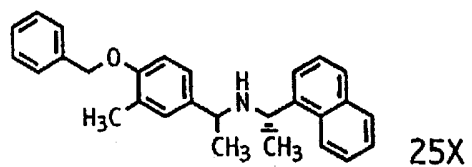
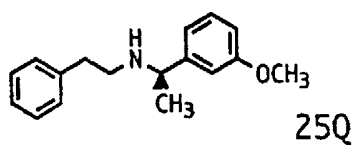
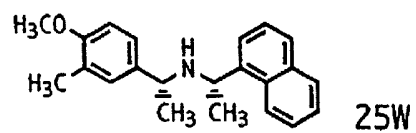
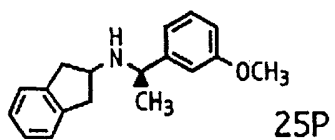
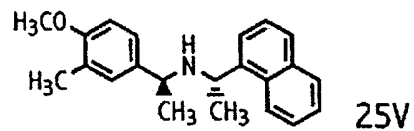
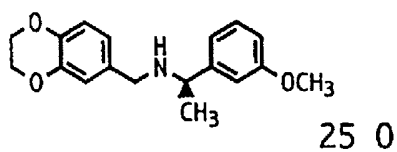
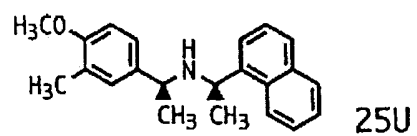
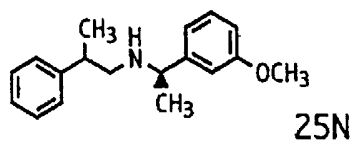
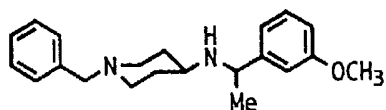
Obr. 10



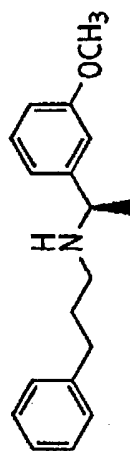
Obr. 1p



Obr. 1q



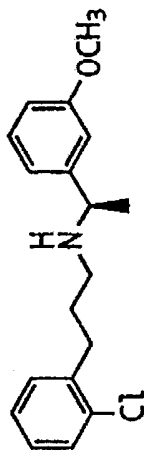
Obr. 1r



NPS R-467 ·HCl

mp 157.4-158 °C; $[\alpha]_D^{20} +41.7^\circ$ (c 6.11, CHCl₃); UV (EtOH) 276 (ϵ 1900), sh 282 nm (ϵ 1700); ¹H NMR (CDCl₃) δ 1.83 (3H, d, J=7, C-CH₃), 2.29 (2H, q, J=8), 2.51 (2H, q, J=6), 2.65 (2H, br m), 3.87 (3H, s, -OCH₃), 4.11 (1H, br q, CH), 6.91 (1H, dd, J=8, J=2), 7.05-7.07 (3H, m), 7.11-7.21 (3H, m), 7.27-7.32 (2H, m) 9.8 (1H, br s), 10.2 (1H, br s); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 20.3, 27.0, 32.3, 44.9, 55.3, 58.8, 111.8, 115.3, 119.7, 125.8, 127.9 (2C), 128.1 (2C), 130.0, 137.2, 139.6, 161.1; GC/El-MS 269 (M⁺, 17), 254 (100), 164 (8), 135 (50), 121 (8), 105 (7), 91 (23), 77 (7); (M⁺) m/z 269.1796,

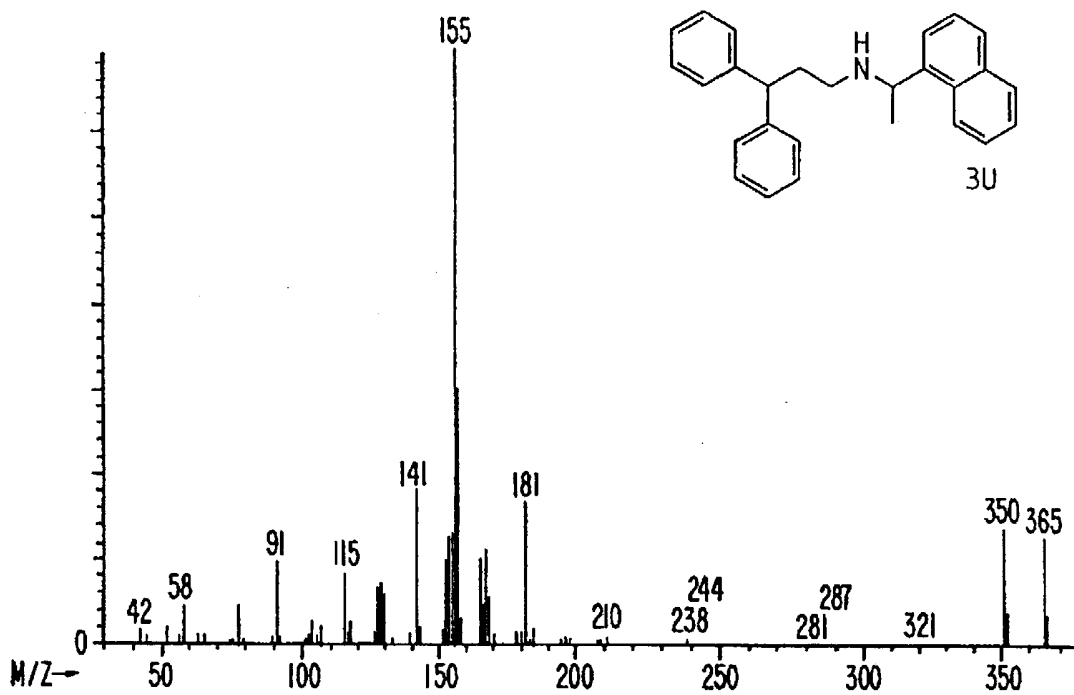
Obr. 2



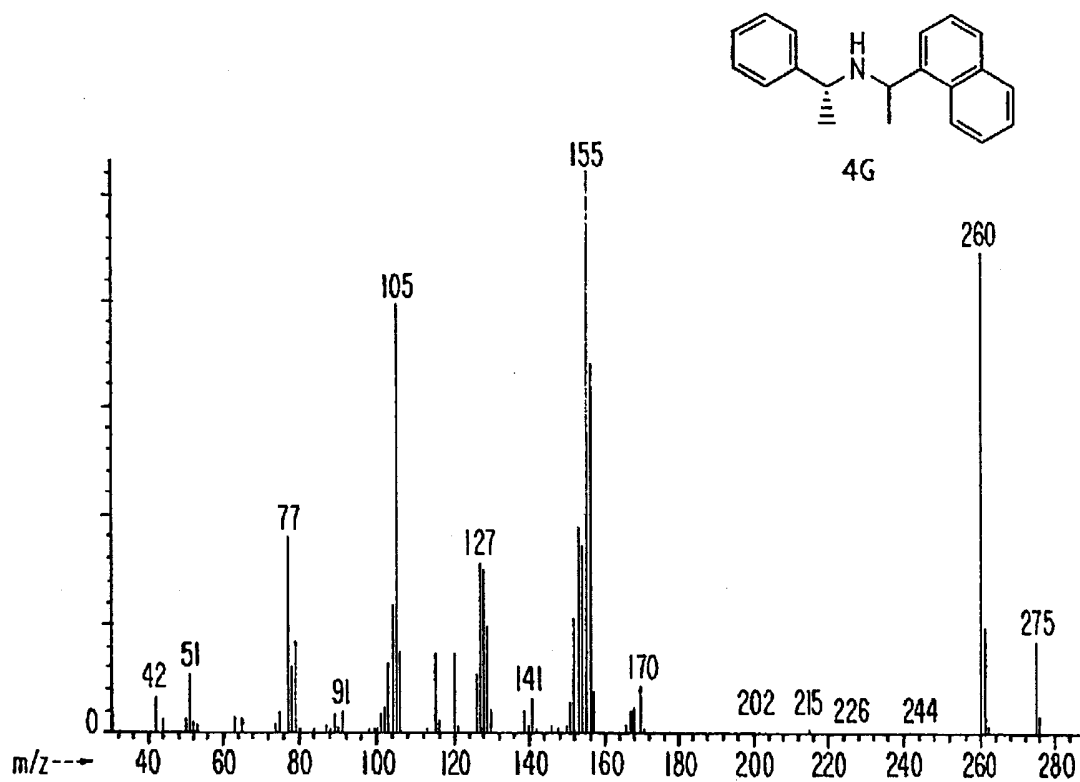
NPS R-568 ·HCl

mp 188.188.5 °C; $[\alpha]_D^{20} +37.8^\circ$ (c 6.80, CHCl_3); UV (EtOH) 274 (ϵ 2200), sh 282 nm (ϵ 1900); ^1H NMR (CDCl_3) δ 1.85 (3H, d, $J=7$, C- CH_3), 2.24 (2H, q, $J=8$), 2.66 (2H, q, $J=7$), 2.68 (2H, br q, $J=7$), 3.87 (3H, s, - OCH_3), 4.15 (1H, br t, $J=7$, CH), 6.90 (1H, dd, $J=8$, $J=2$), 7.06-7.15 (4H, m), 7.23-7.32 (3H, m), 9.85 (1H, br s), 10.2 (1H, br s); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 20.2, 25.2, 30.0, 44.7, 55.6, 58.6, 112.0, 115.3, 119.7, 126.5, 127.4, 129.1, 129.9, 130.0, 133.4, 137.1, 137.2, 160.0; GC/EL-MS 303 (M^+ , 2), 288 (100), 268 (17), 196 (4), 164 (8), 135 (56), 126 (21), 103 (9); 91 (7), 77 (7); HR-EL-MS (M^+) m/z 303.1403,

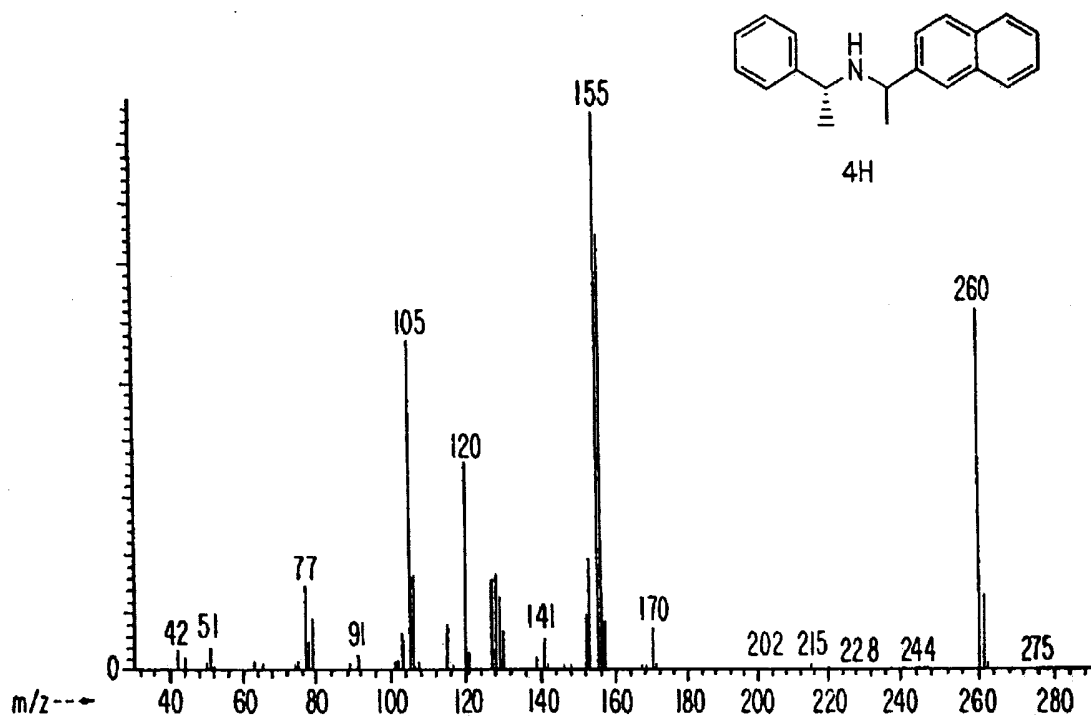
Obr. 3



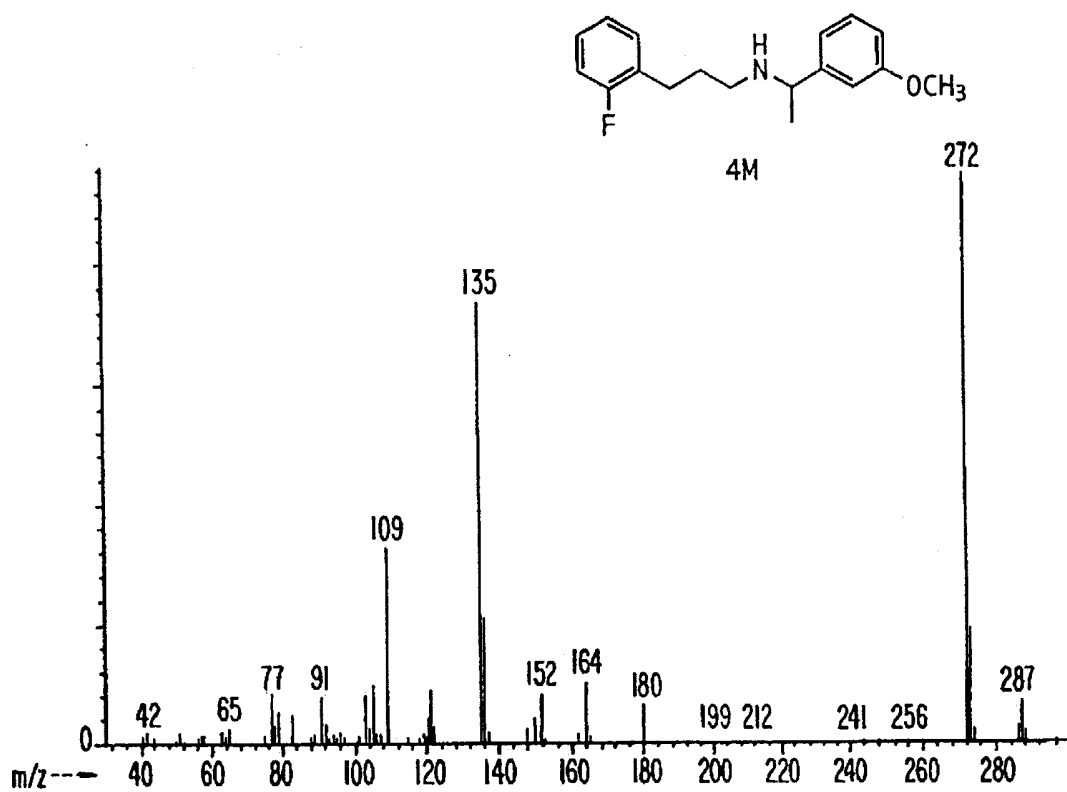
Obr. 4



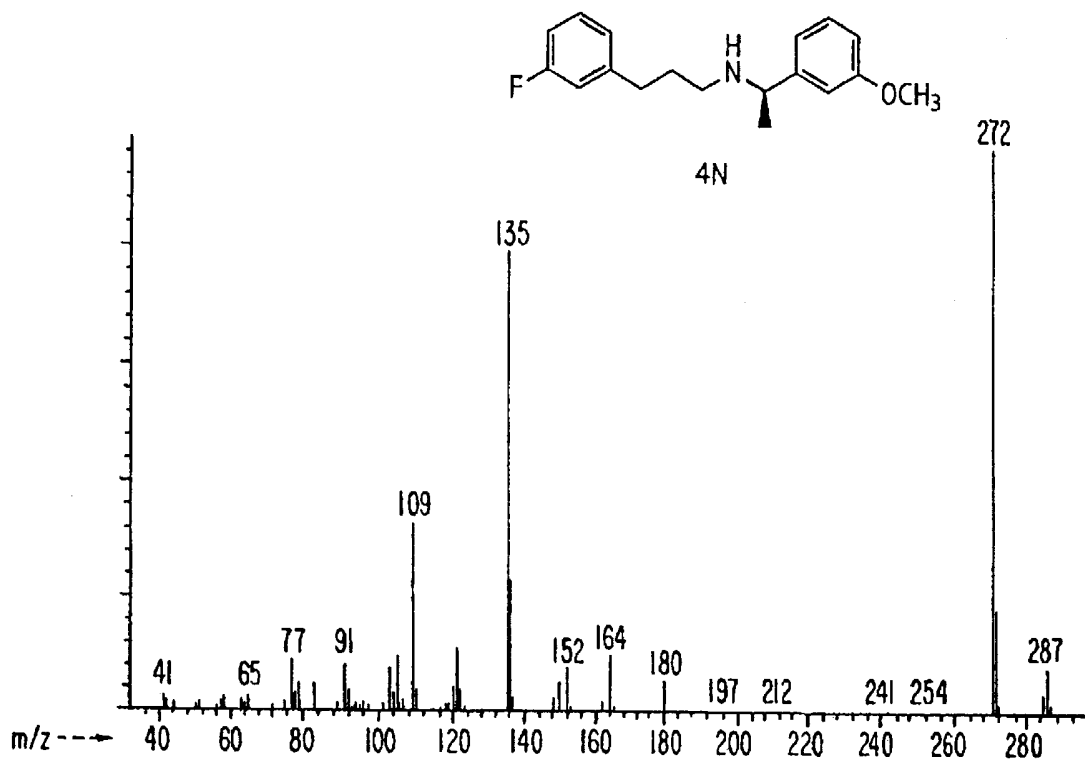
Obr. 5



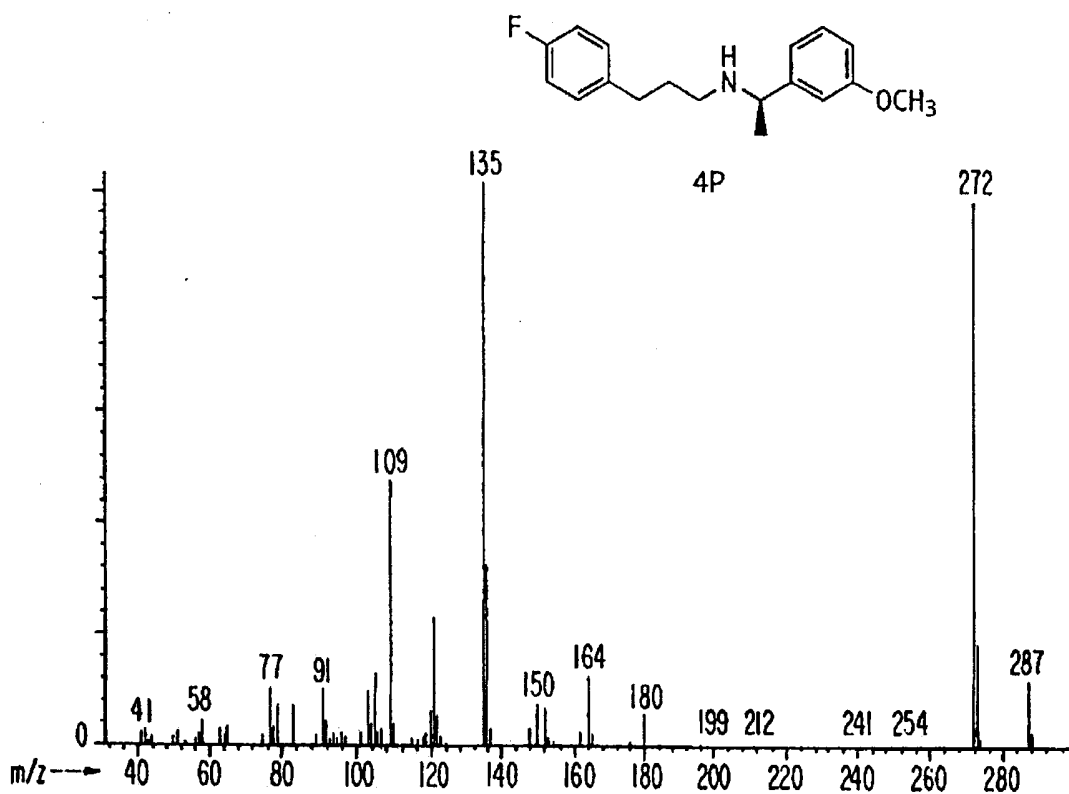
Obr. 6



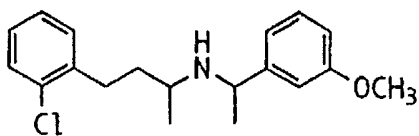
Obr. 7



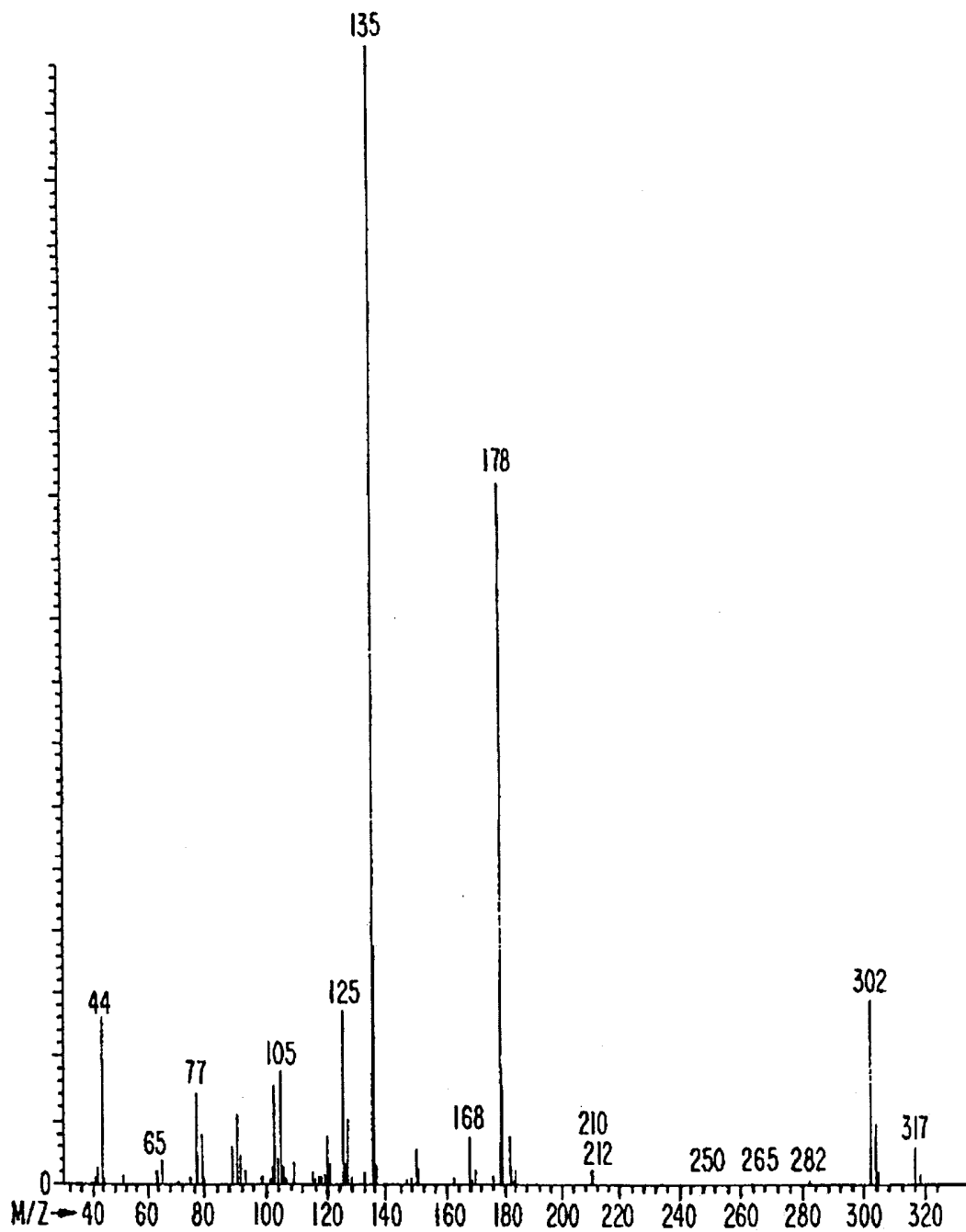
Obr. 8



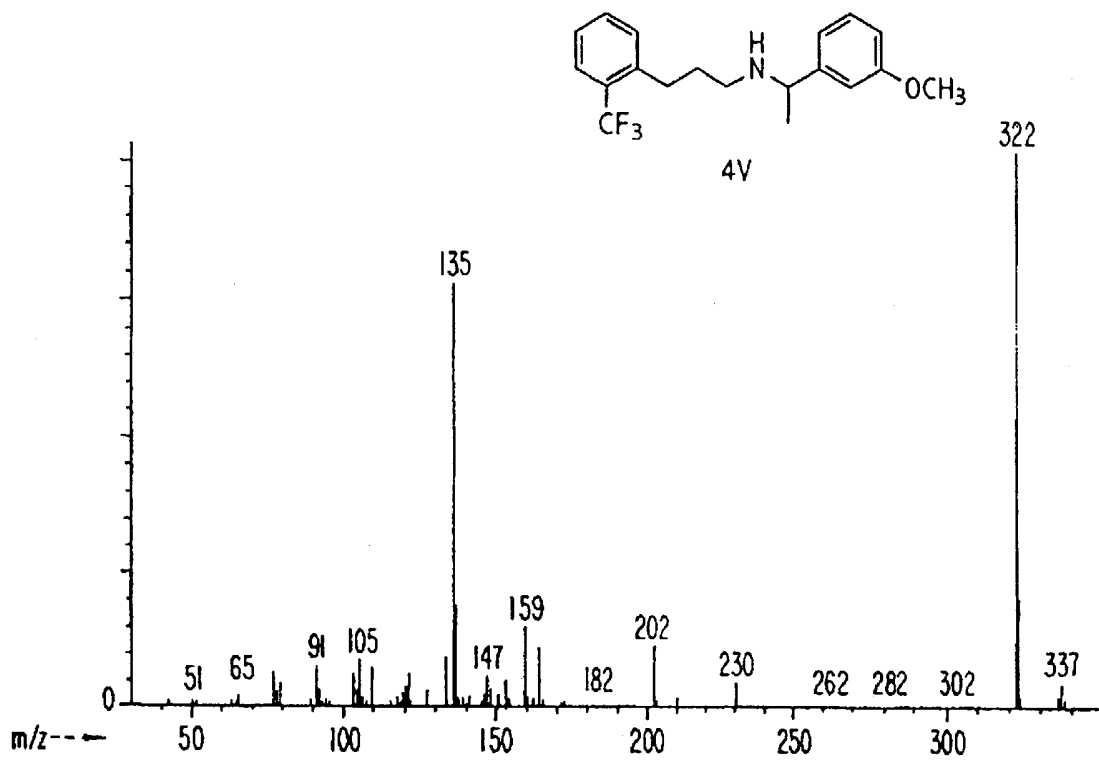
Obr. 9



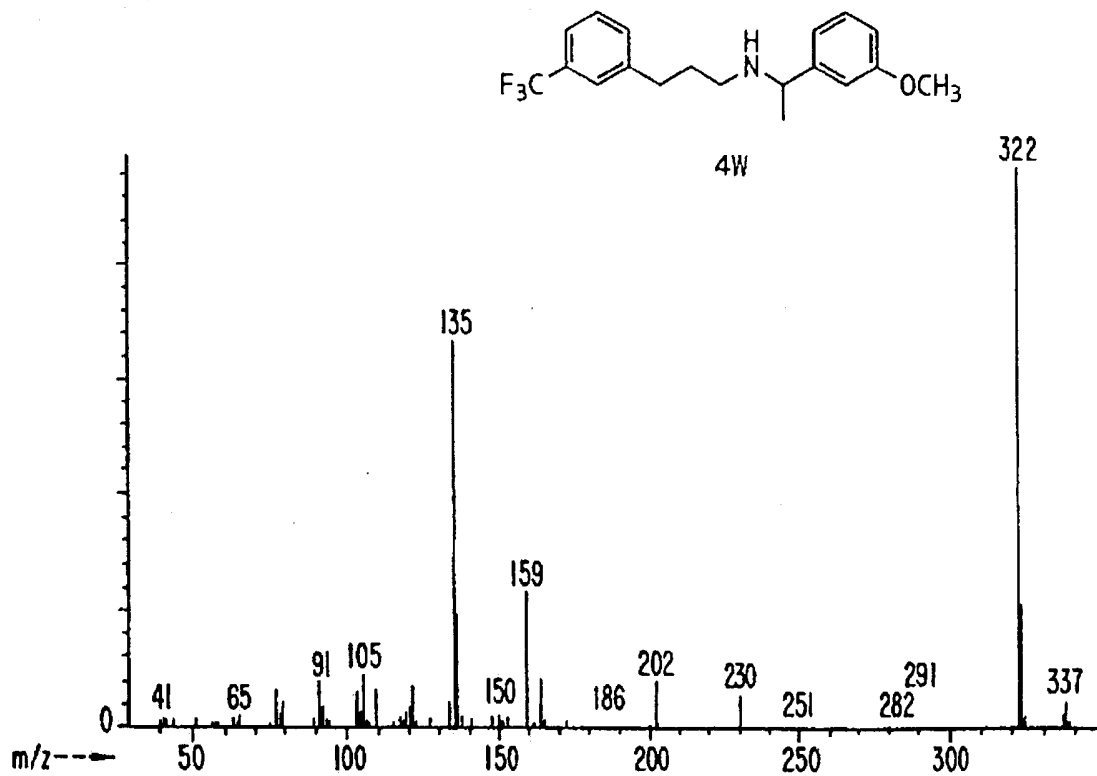
4T



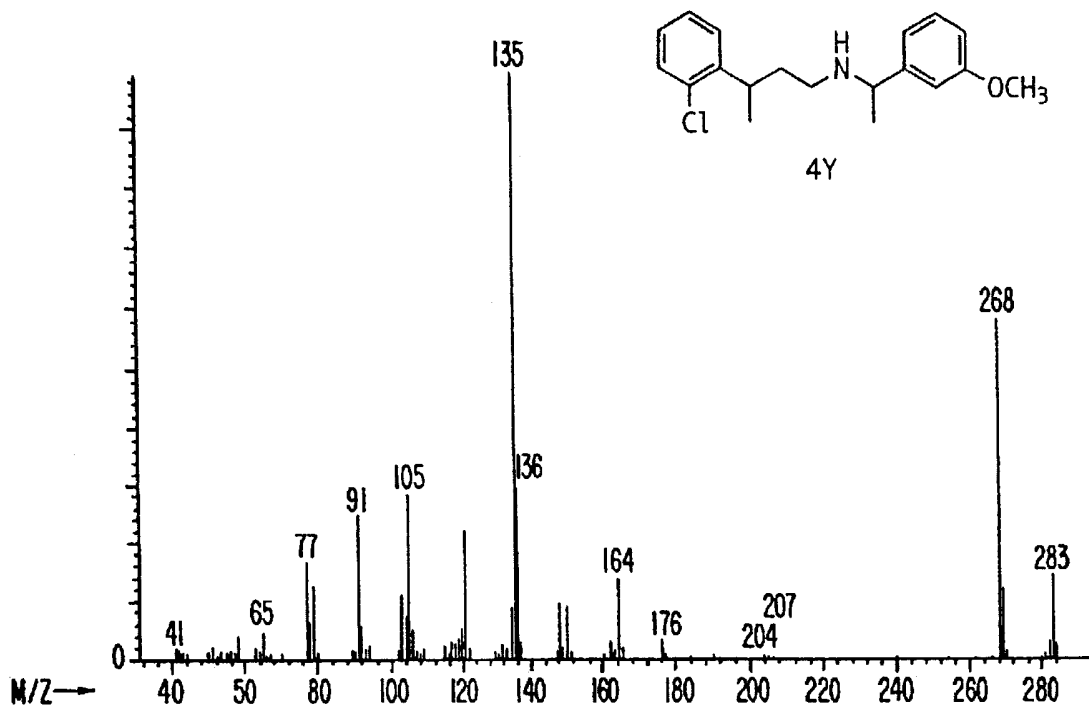
Obr. 10



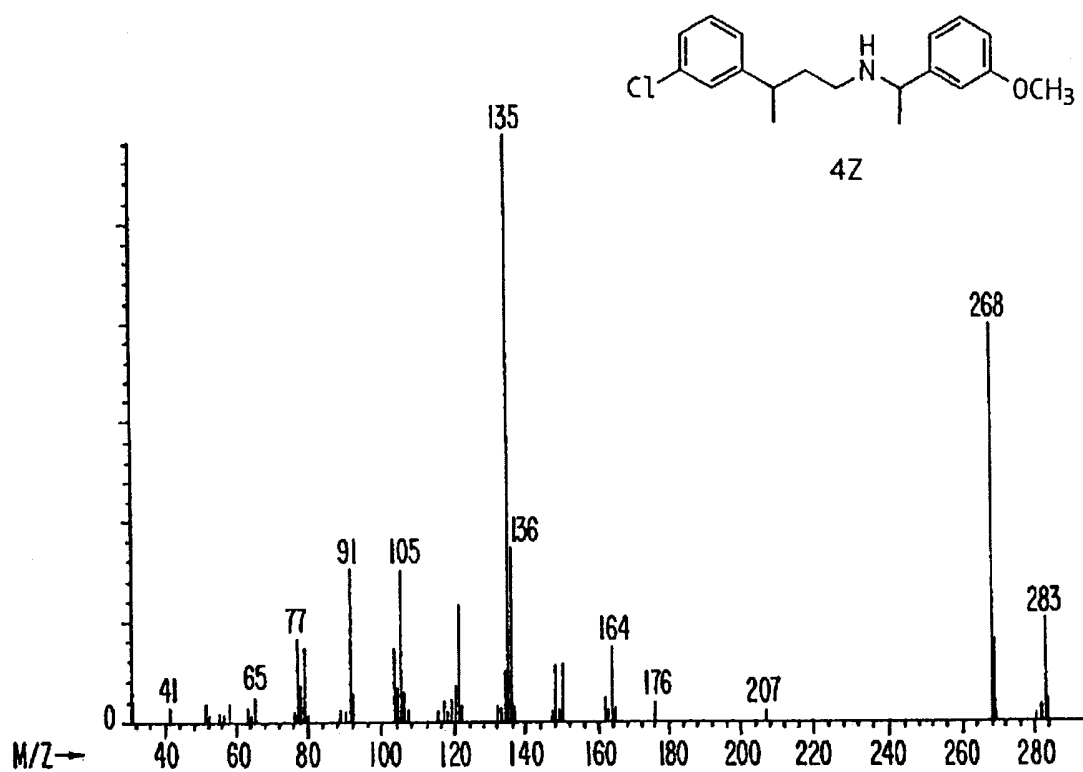
Obr. 11



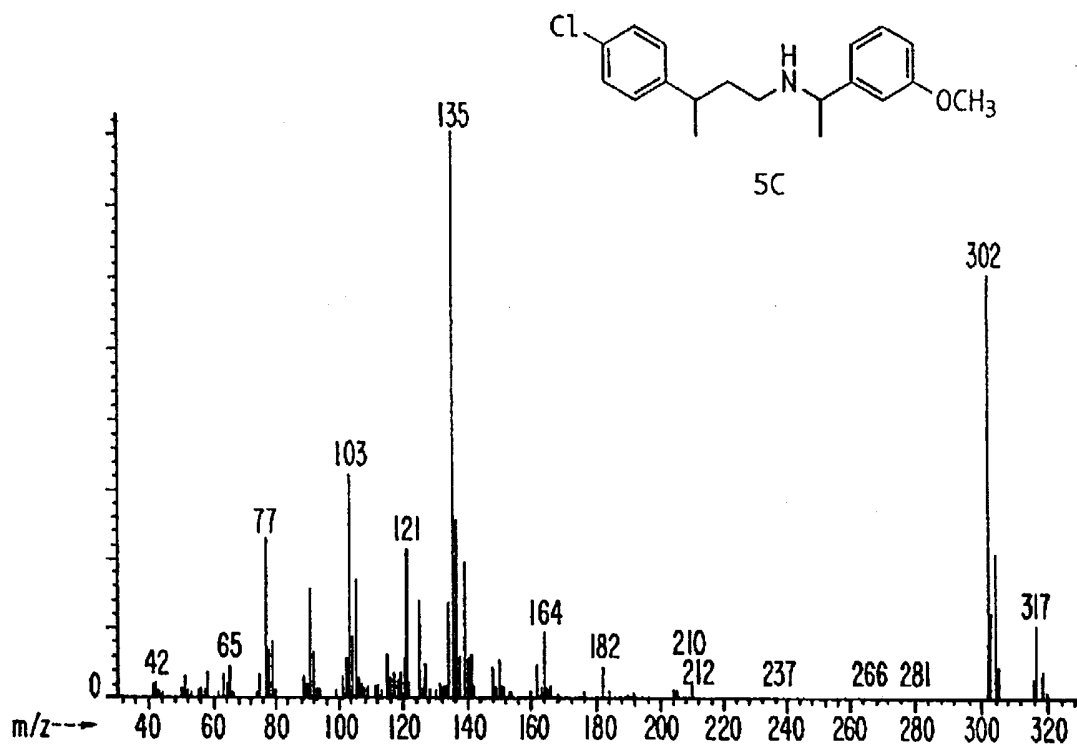
Obr. 12



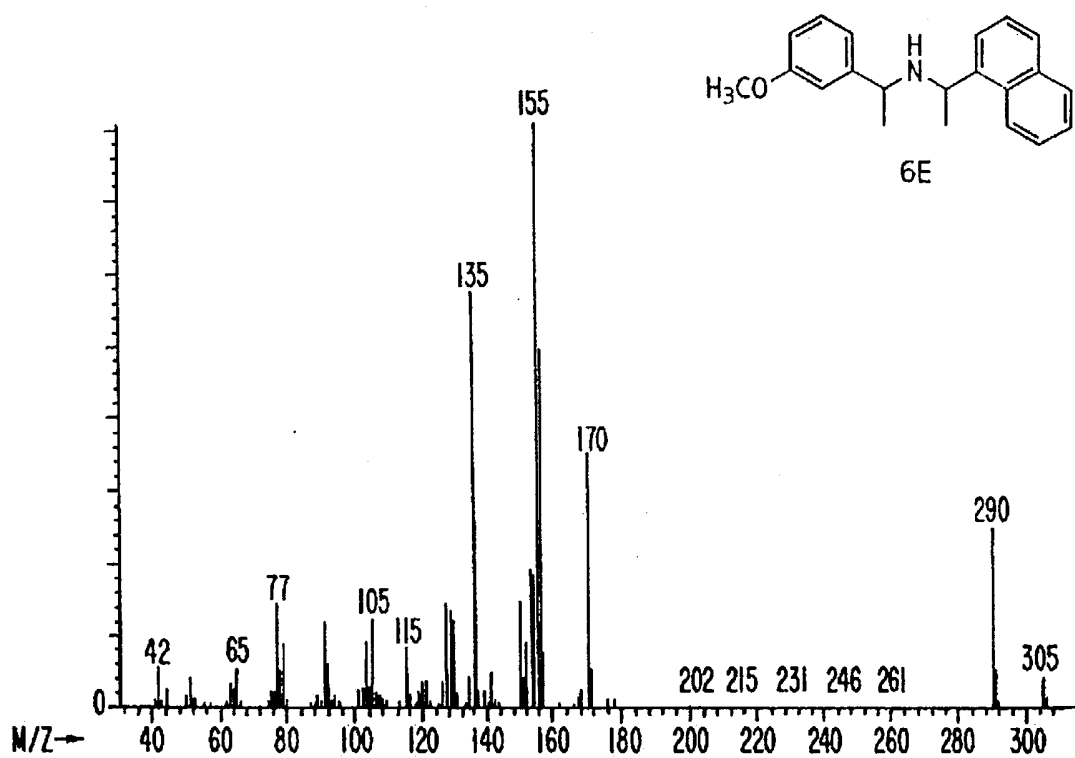
Obr. 13



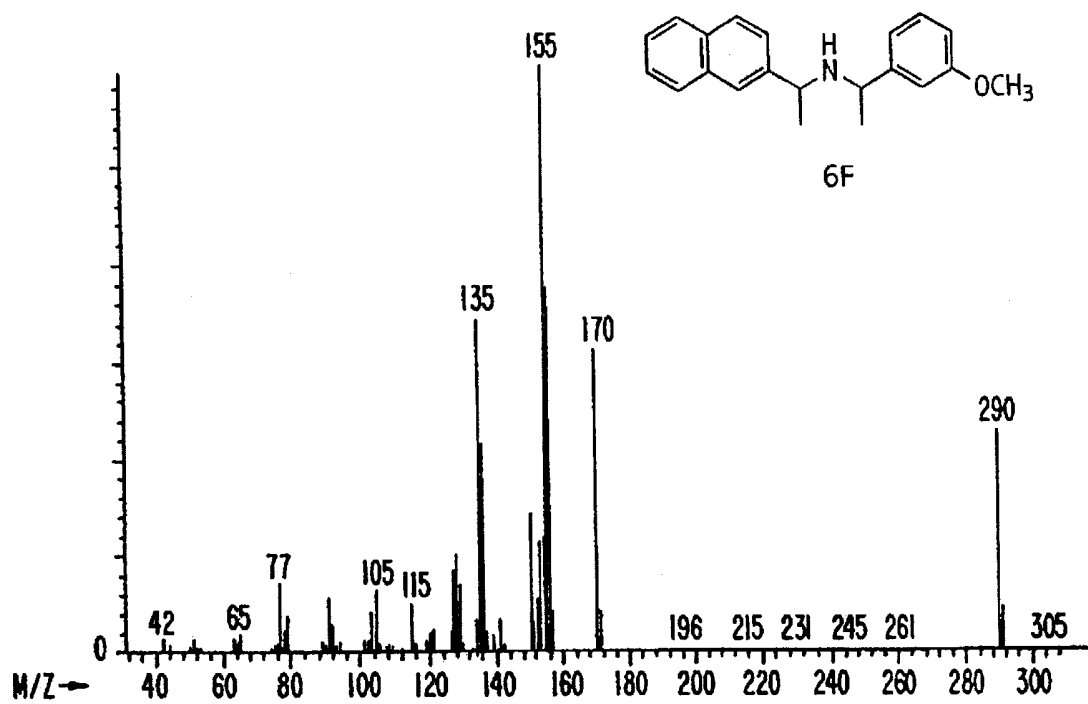
Obr. 14



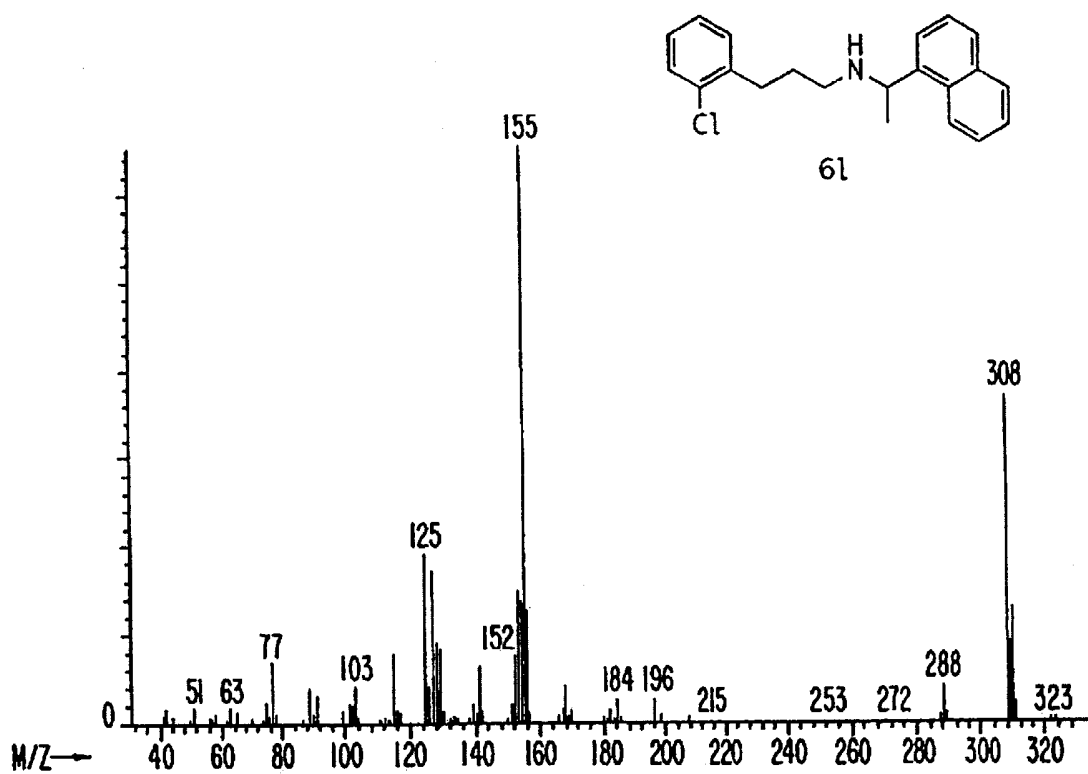
Obr. 15



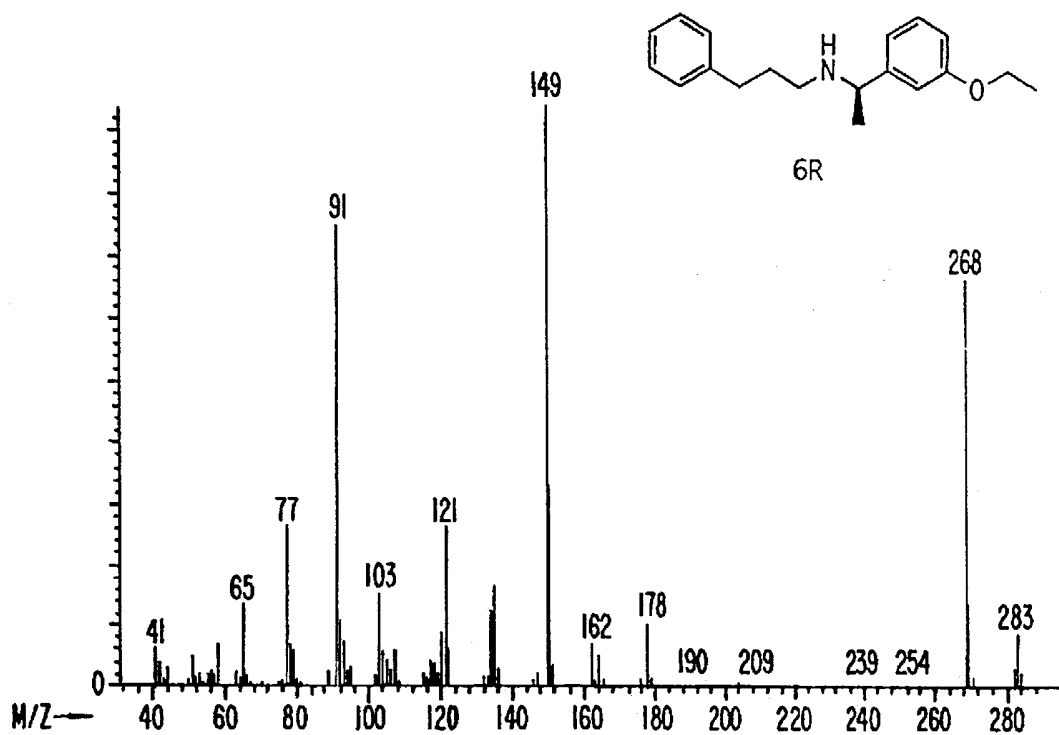
Obr. 16



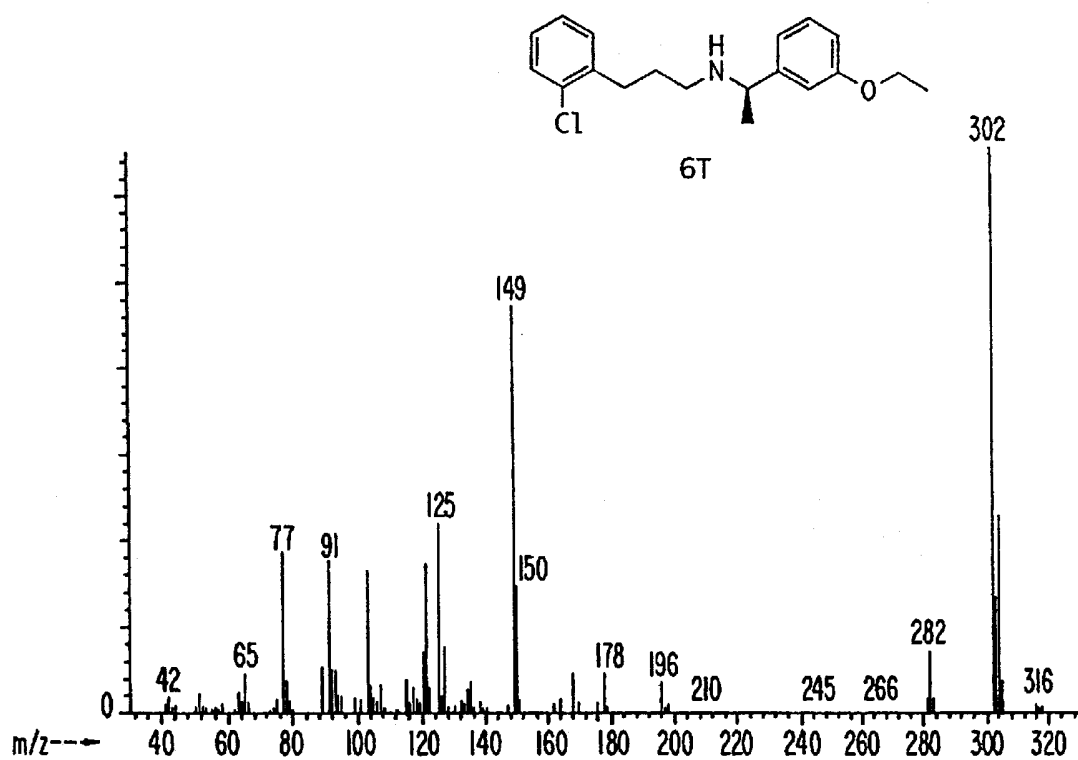
Obr. 17



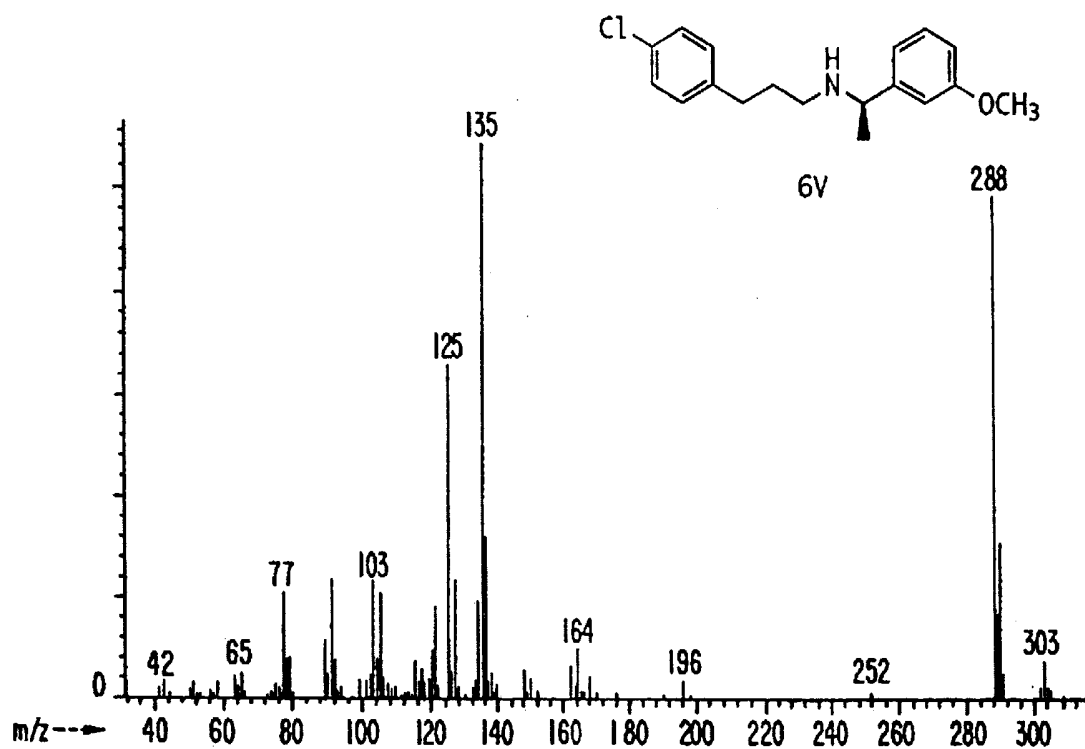
Obr. 18



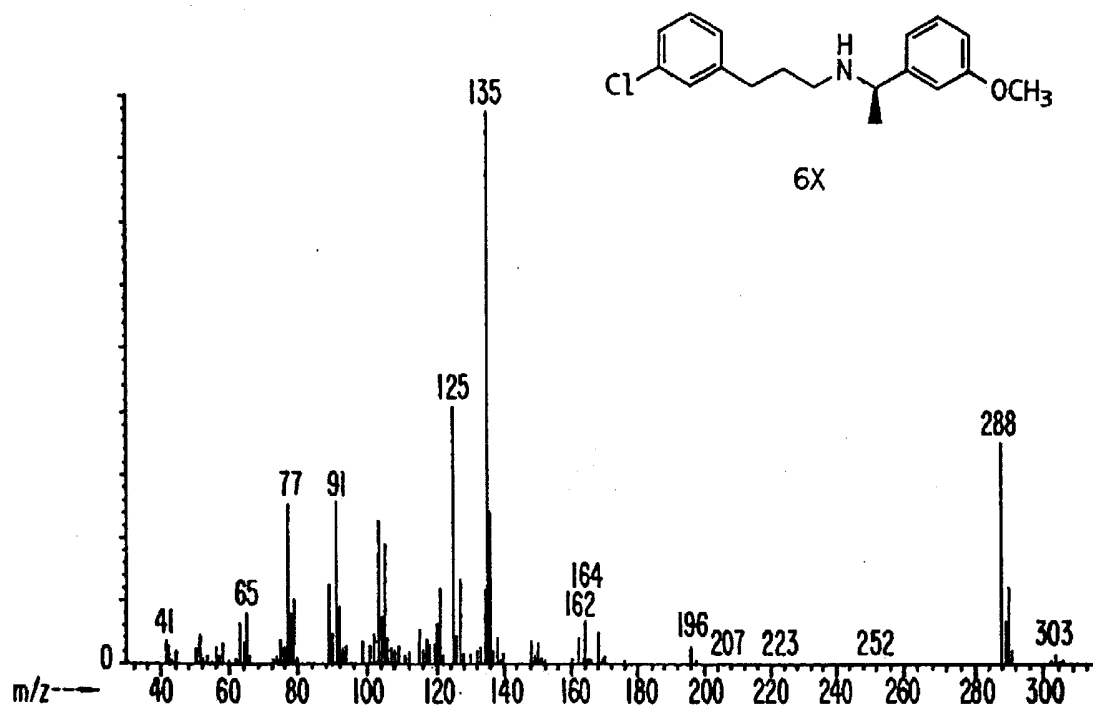
Obr. 19



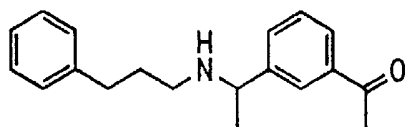
Obr. 20



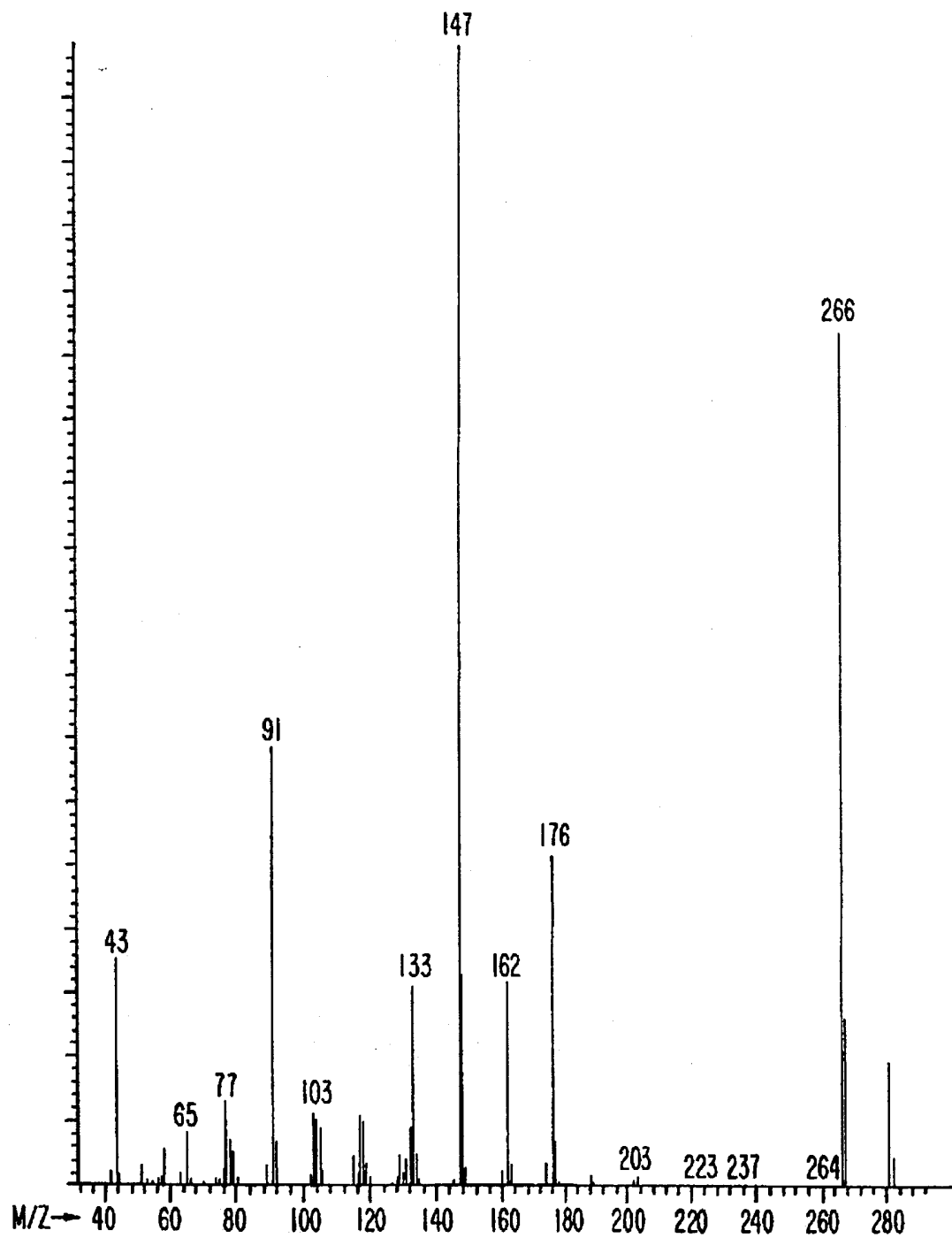
Obr. 21



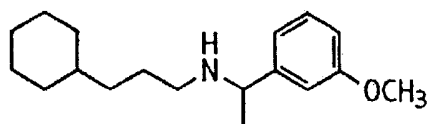
Obr. 22



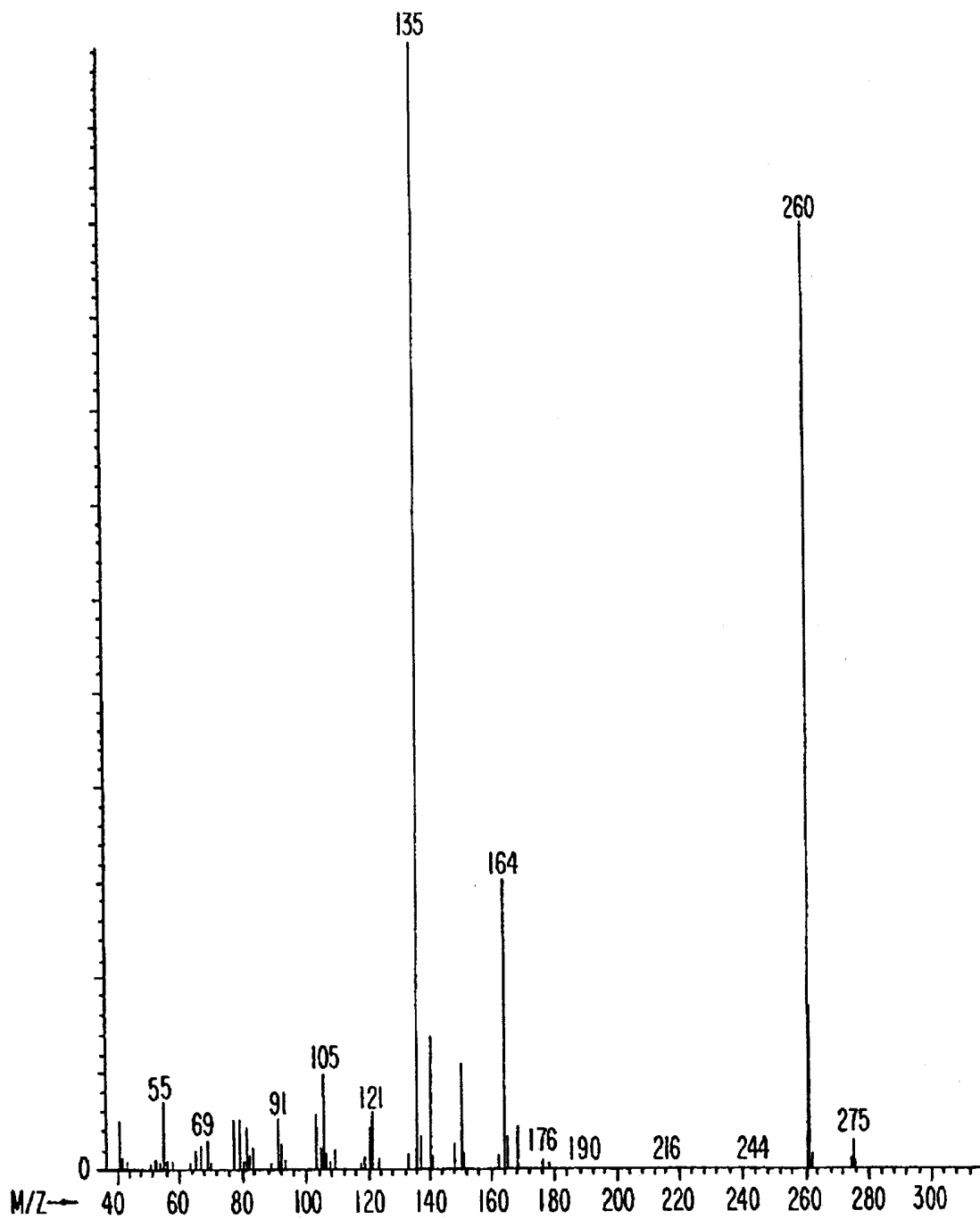
7W



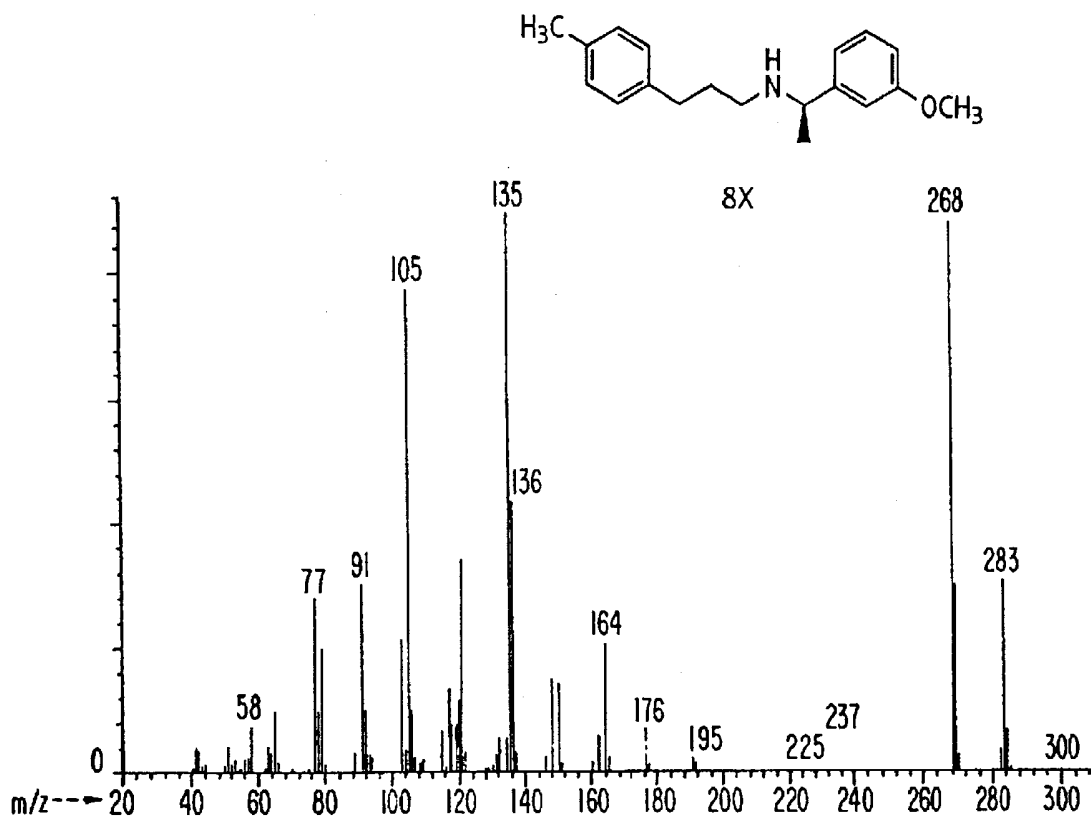
Obr. 23



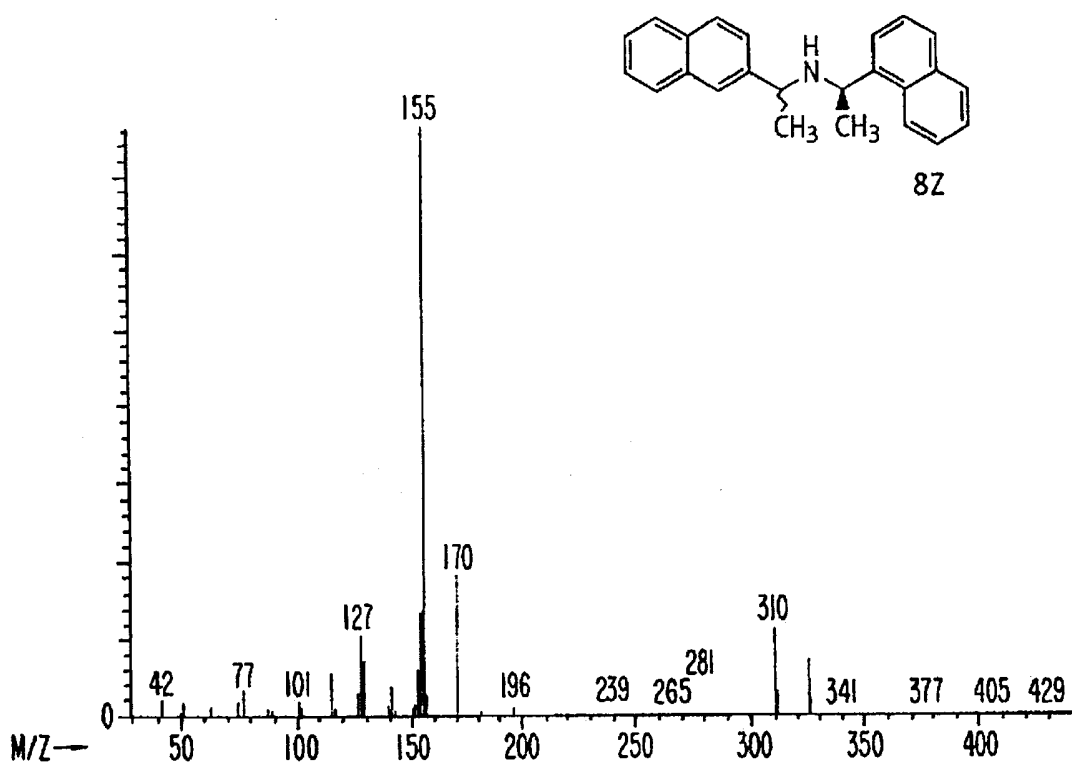
7X



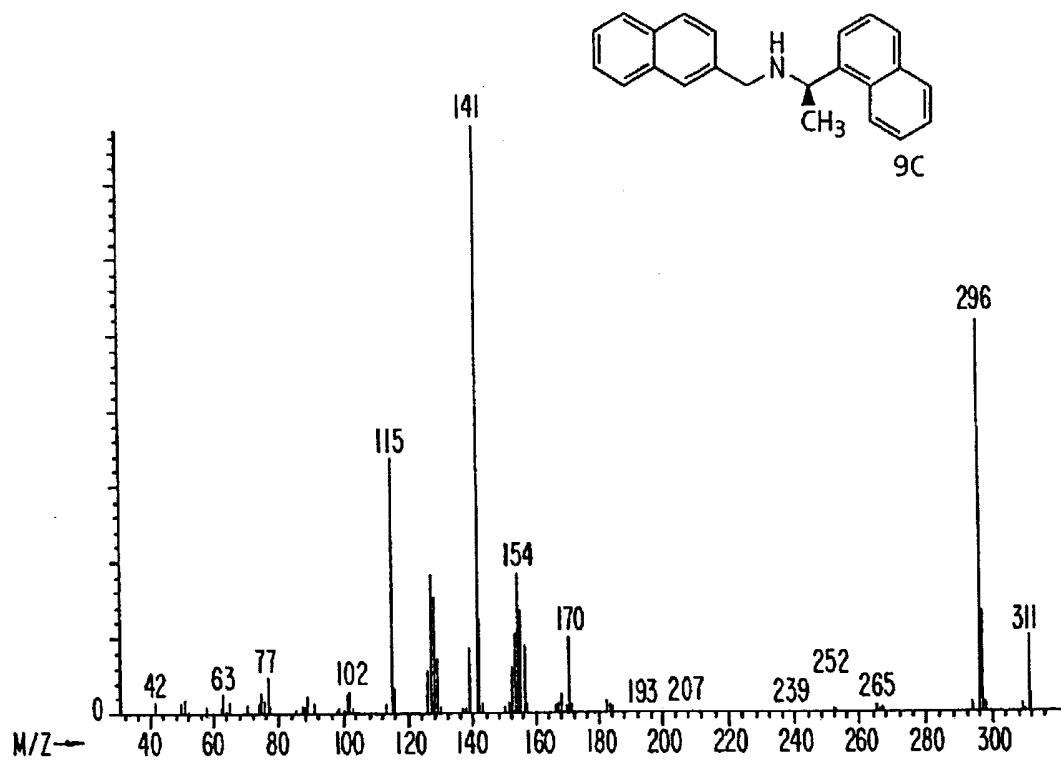
Obr. 24



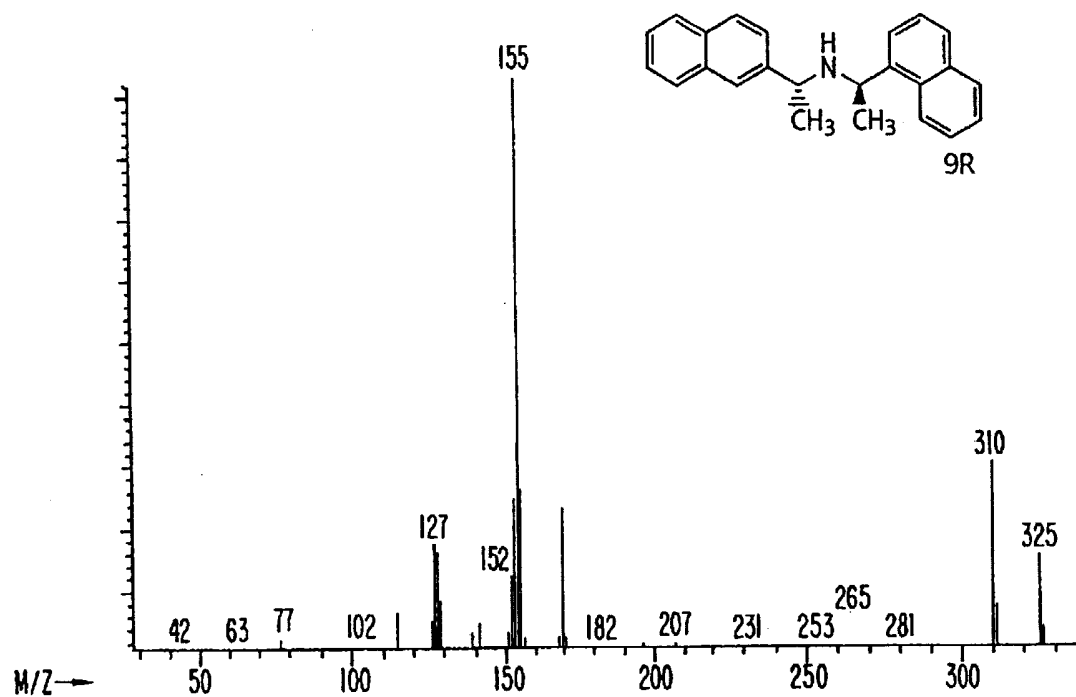
Obr. 25



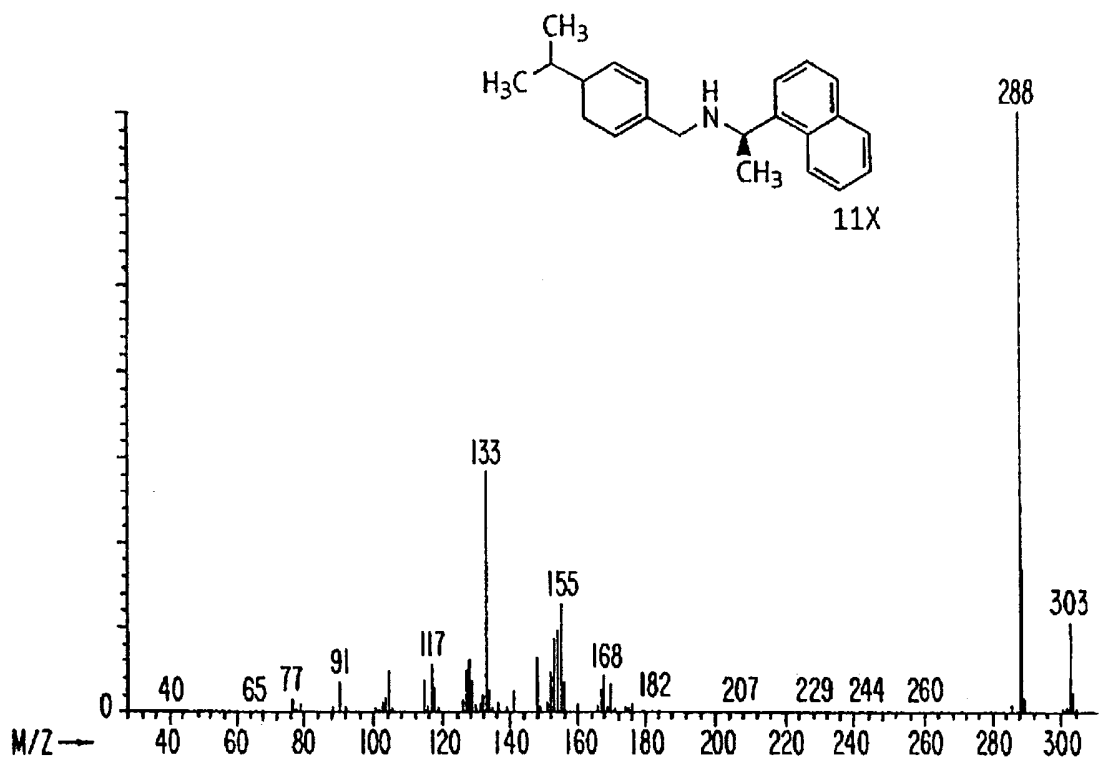
Obr. 26



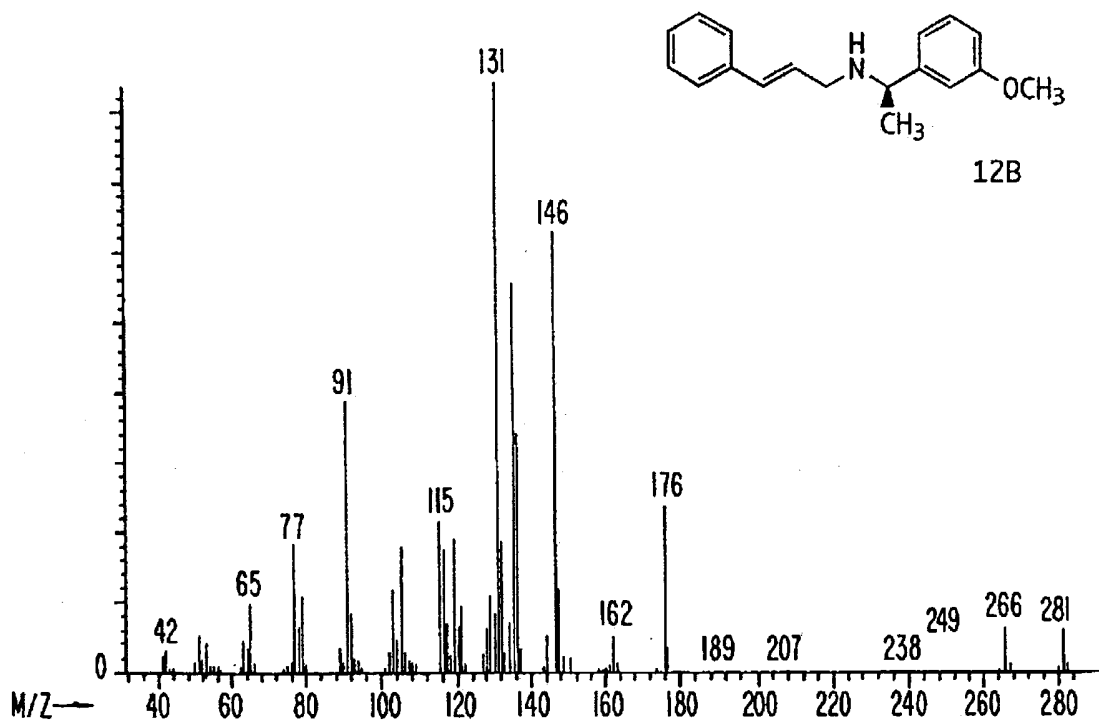
Obr. 27



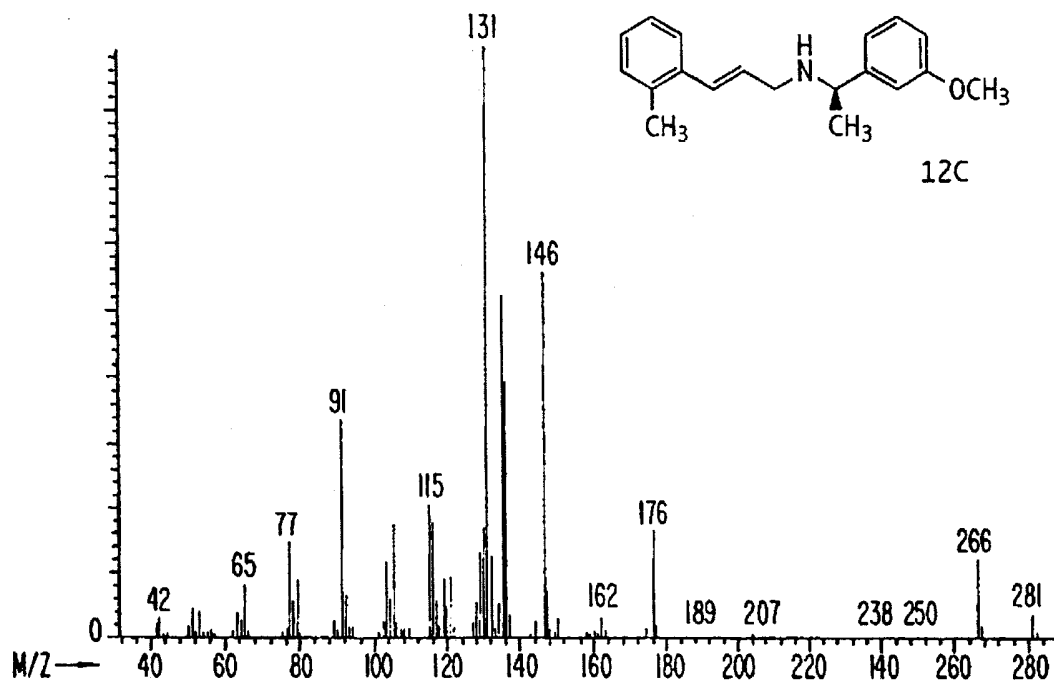
Obr. 28



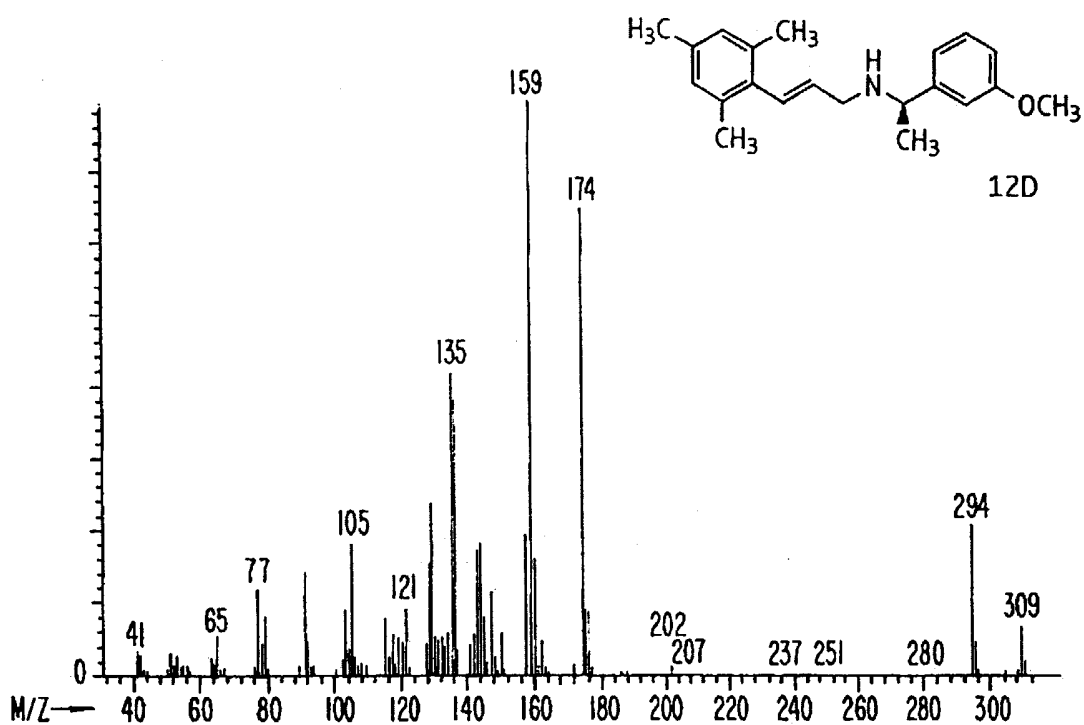
Obr. 29



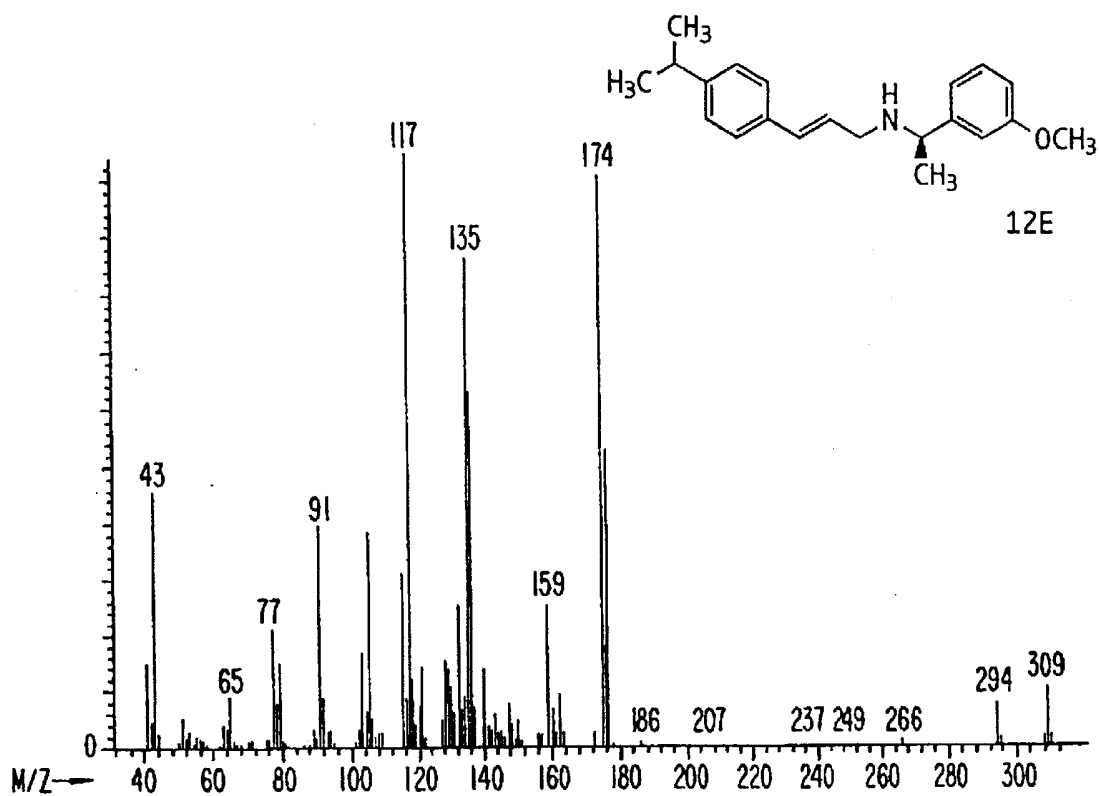
Obr. 30



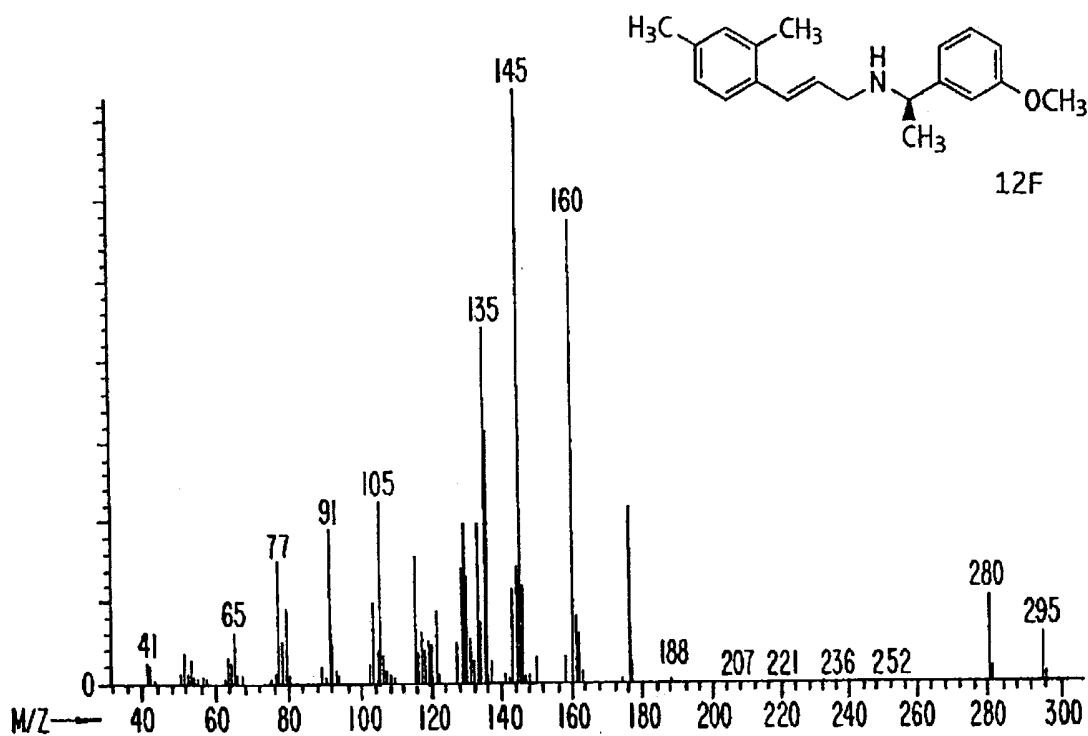
Obr. 31



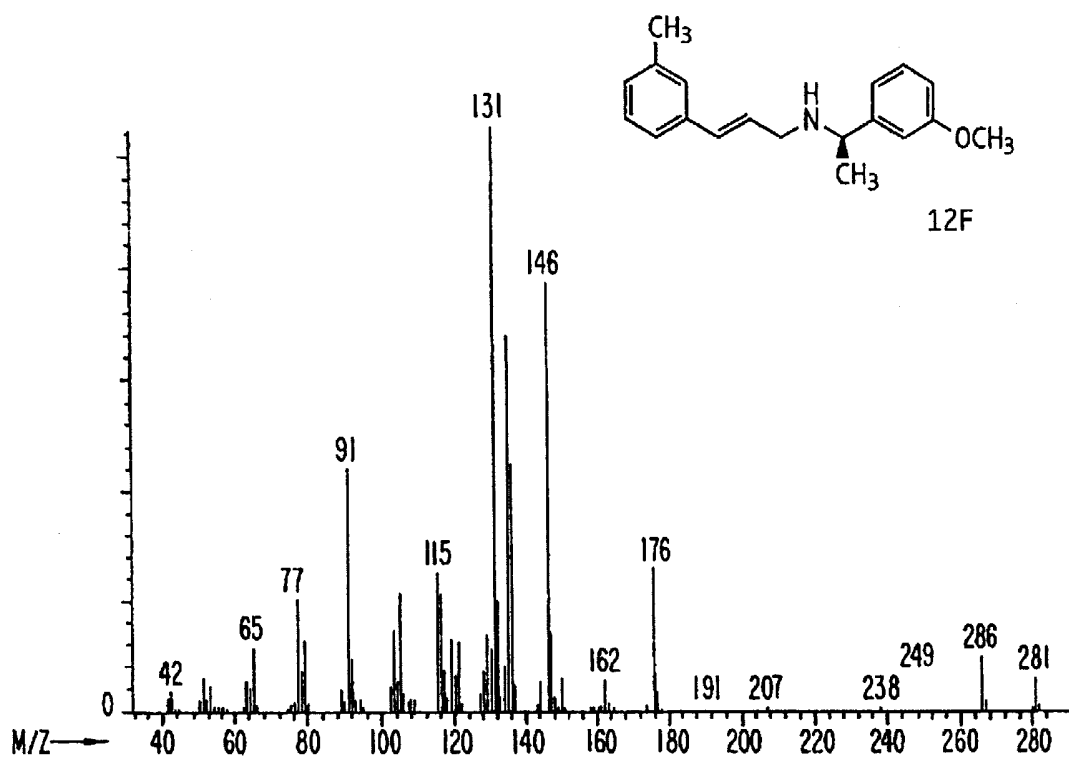
Obr. 32



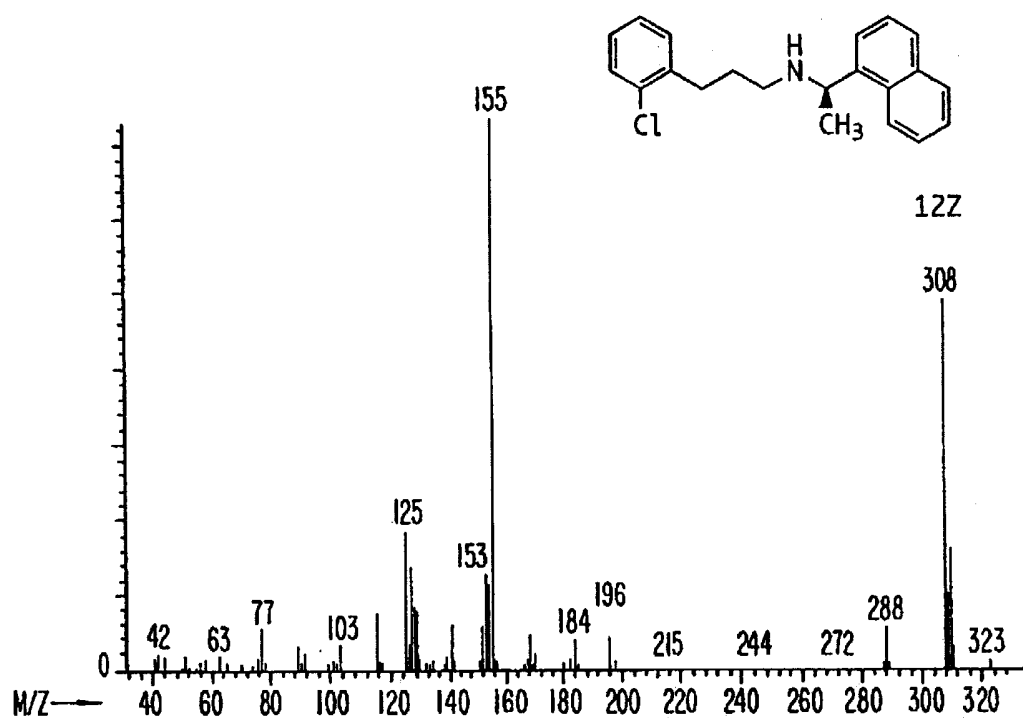
Obr. 33



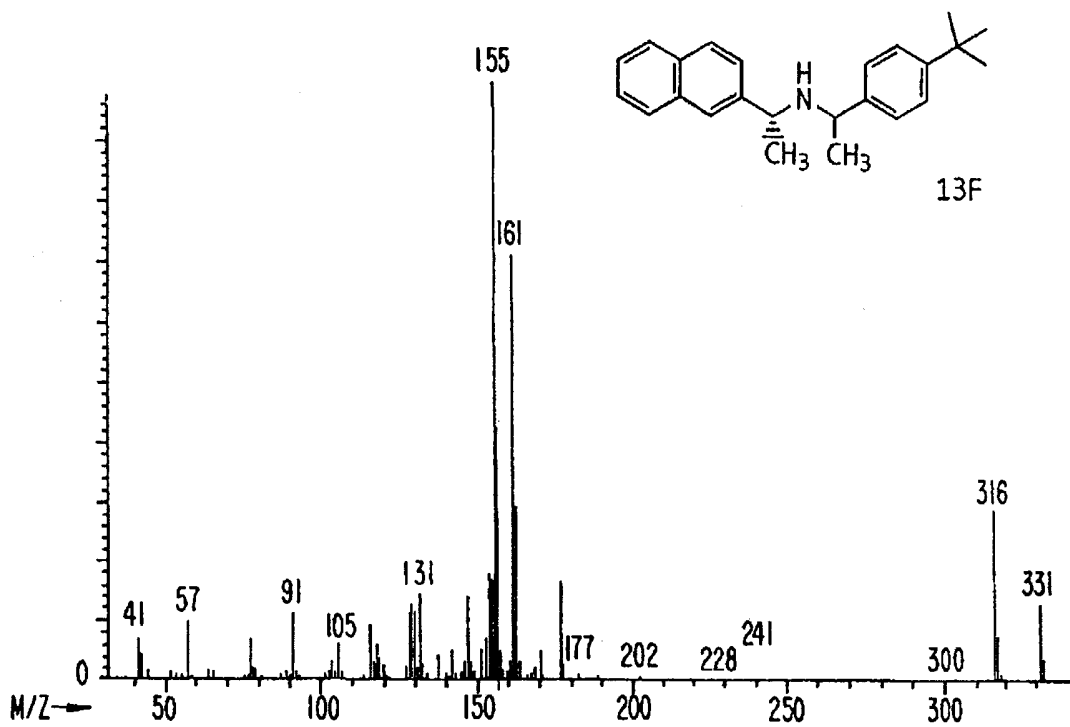
Obr. 34



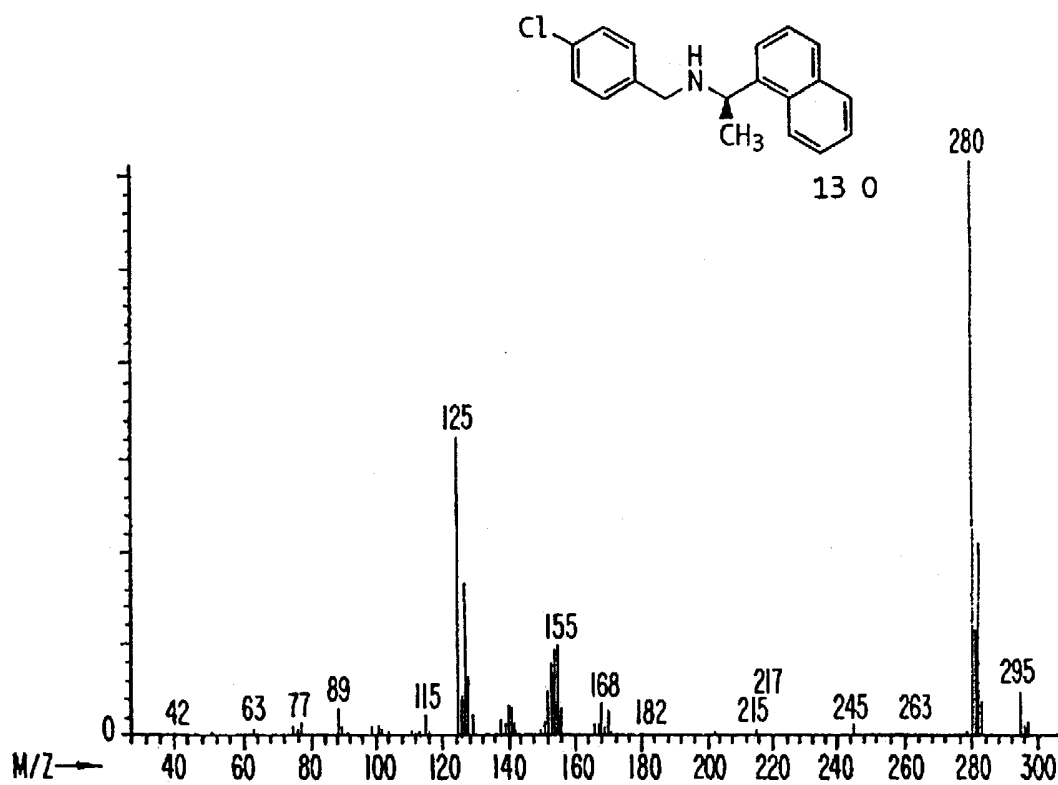
Obr. 35



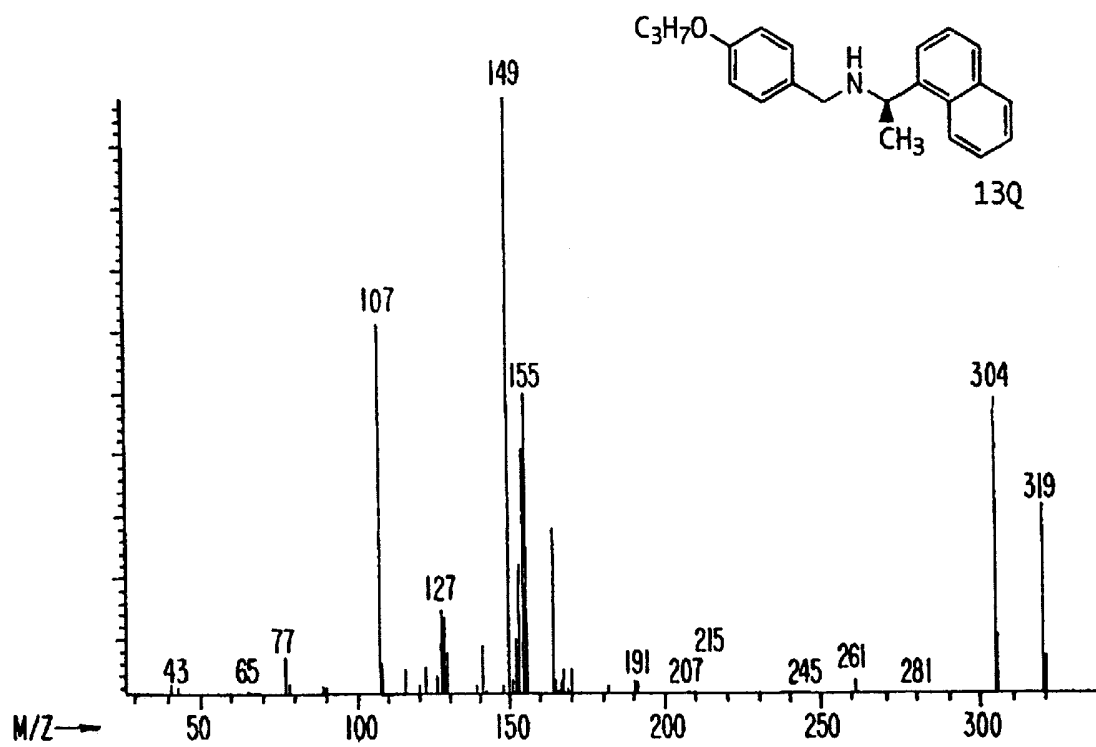
Obr. 36



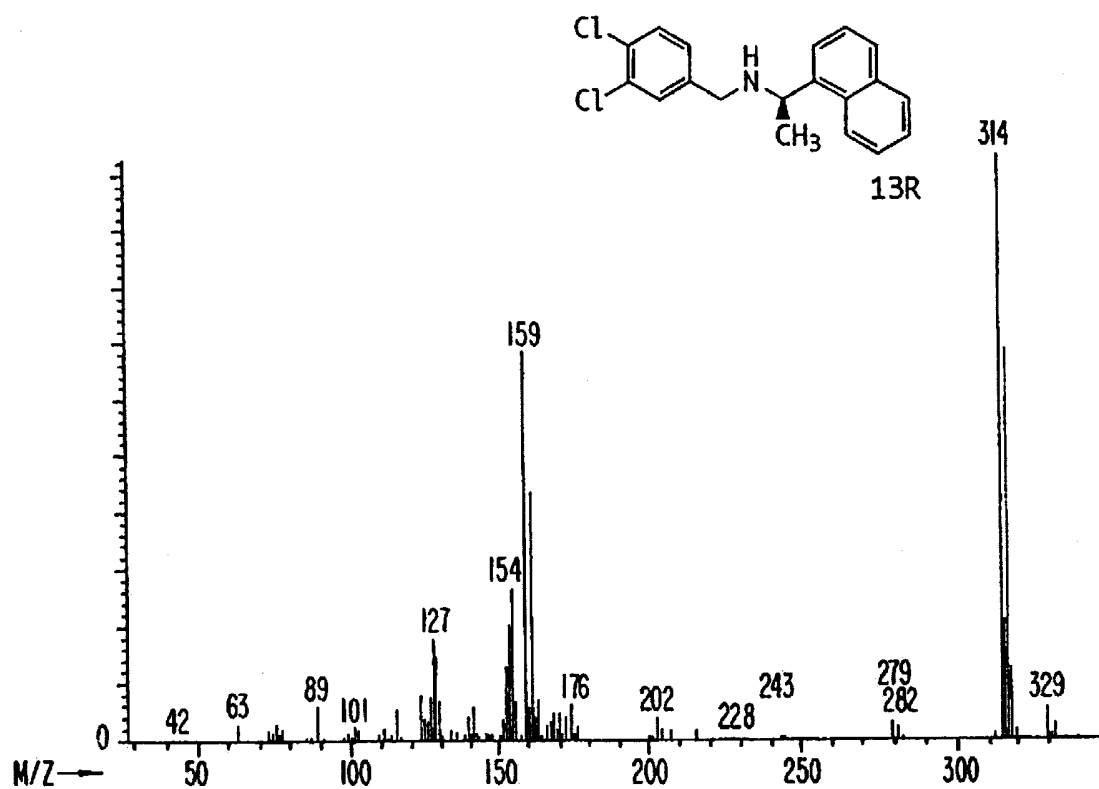
Obr. 37



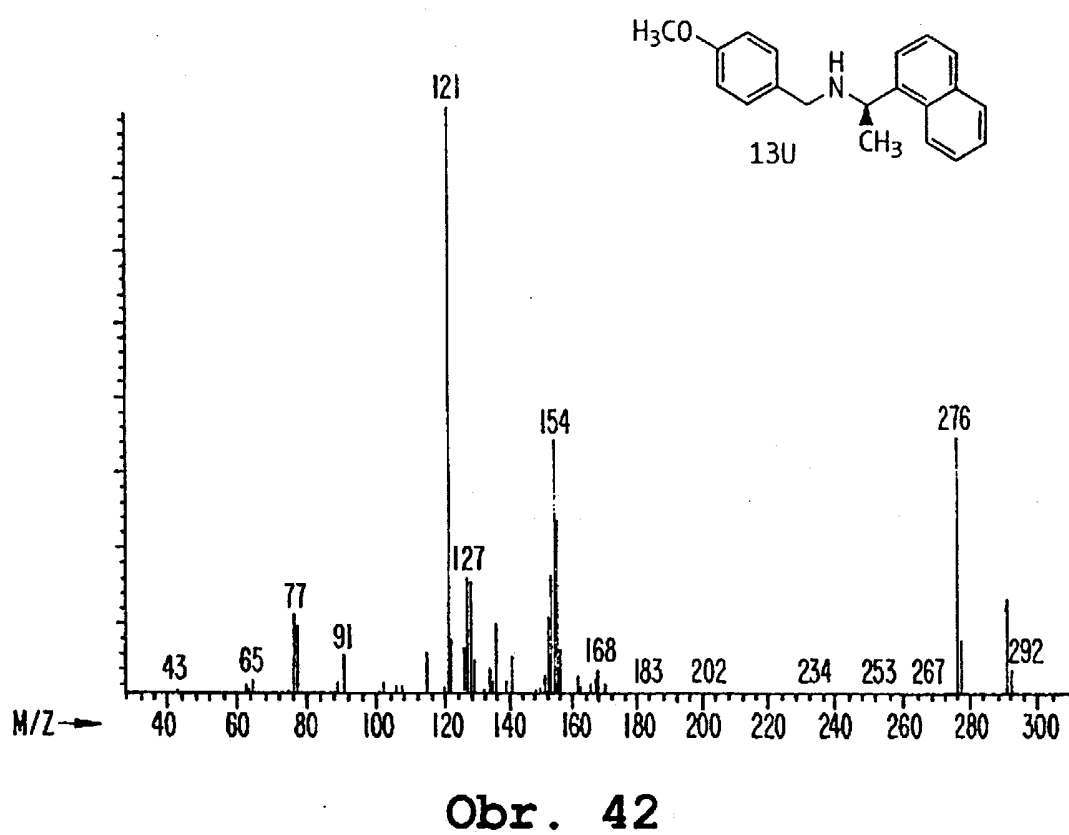
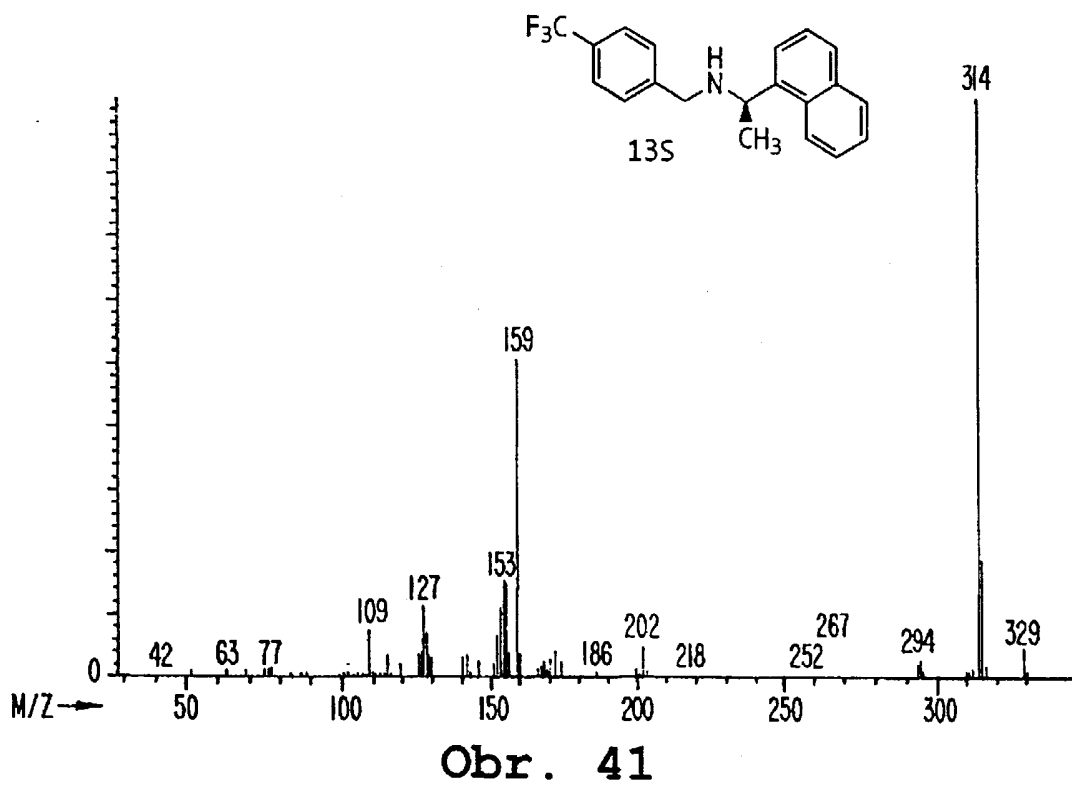
Obr. 38

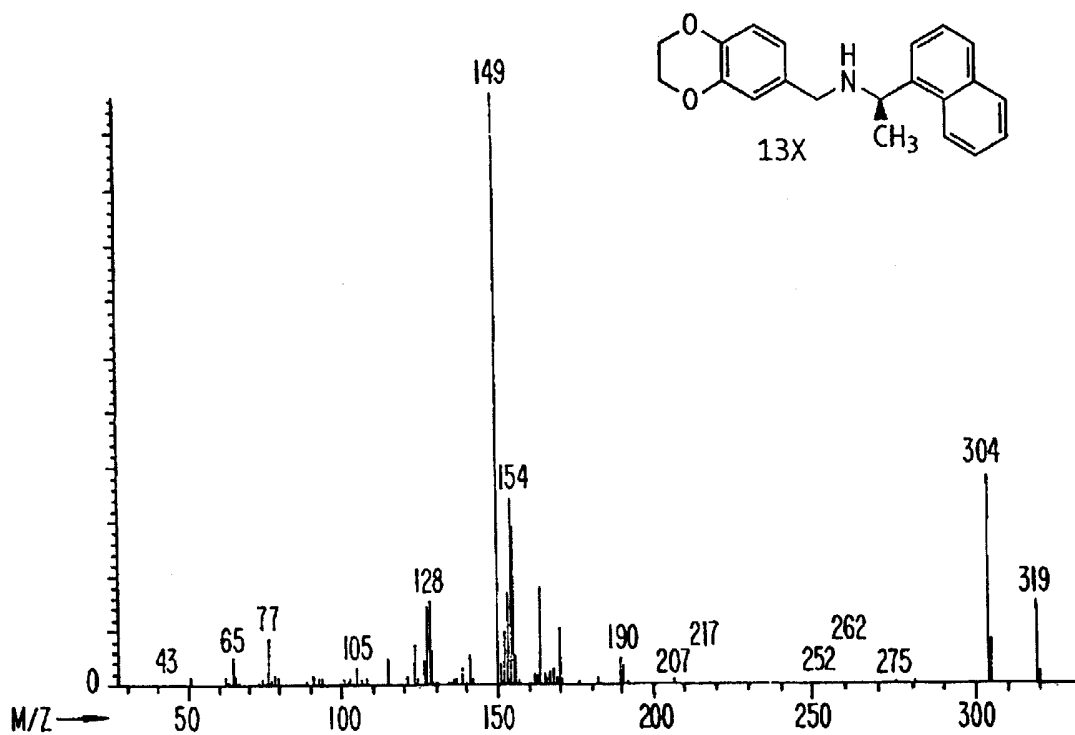


Obr. 39

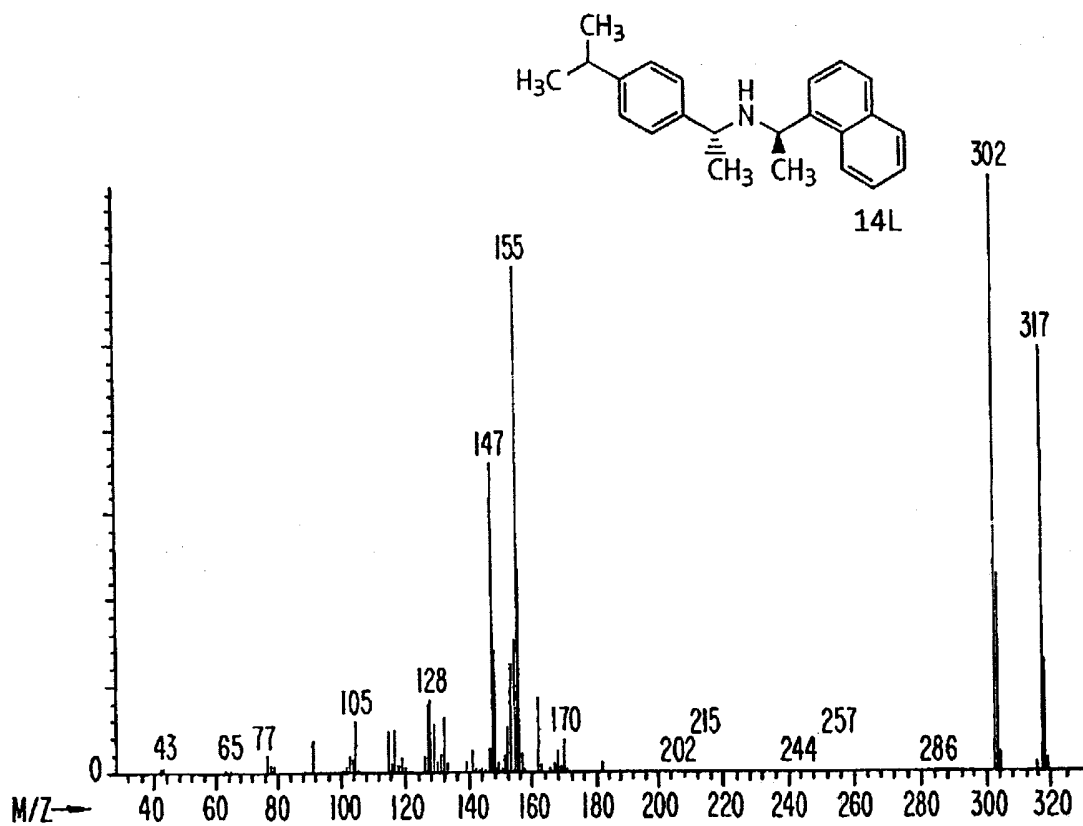


Obr. 40

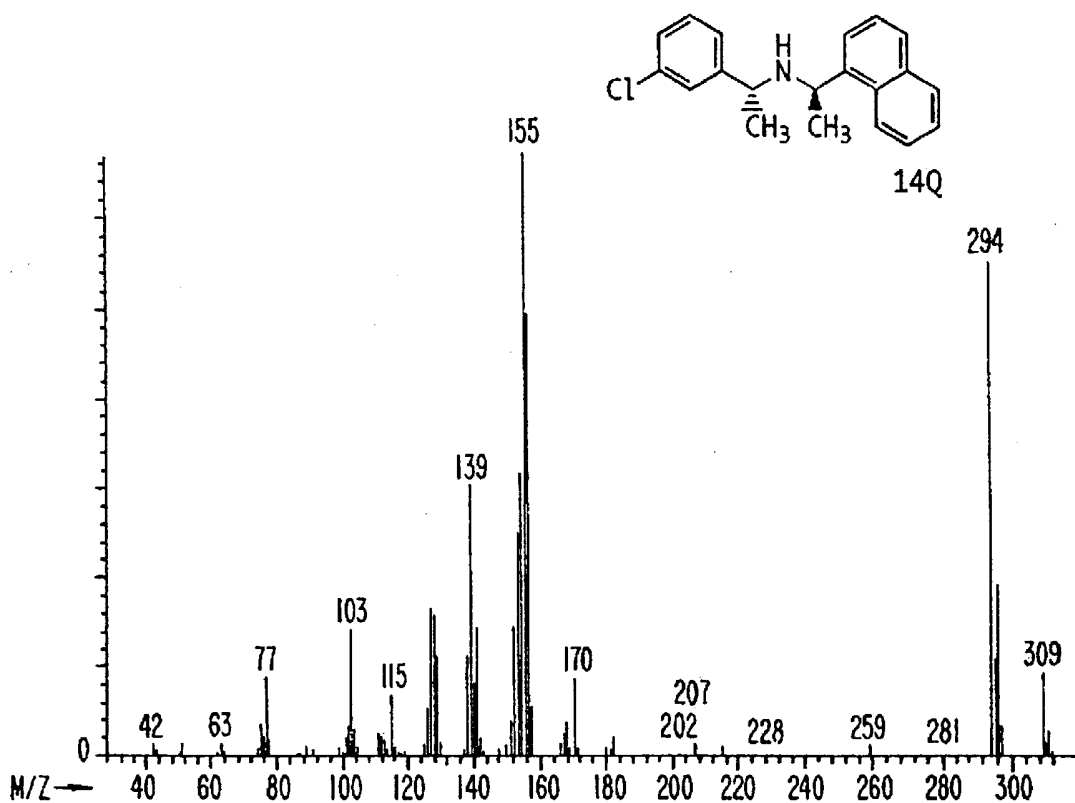




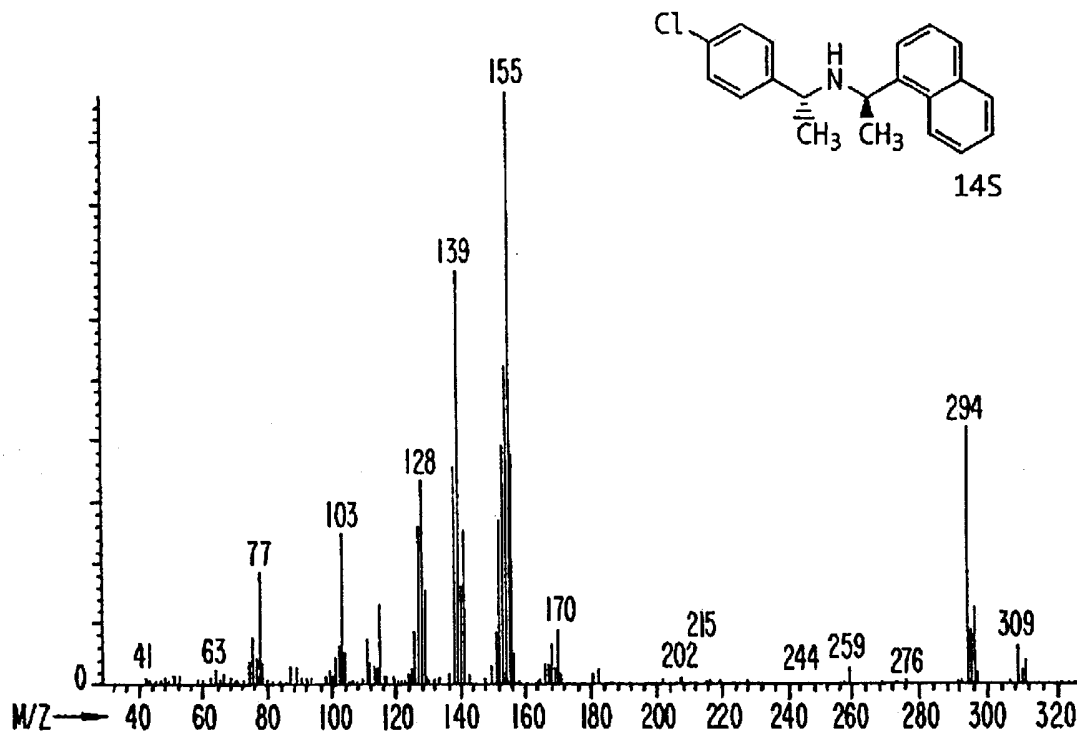
Obr. 43



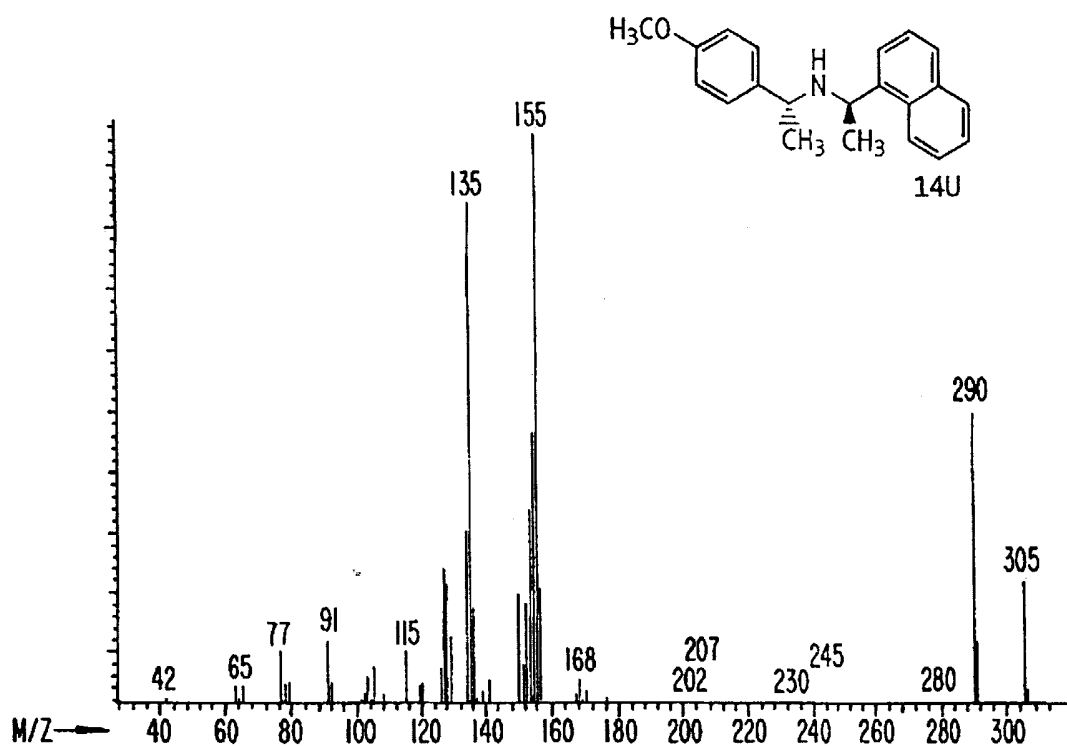
Obr. 44



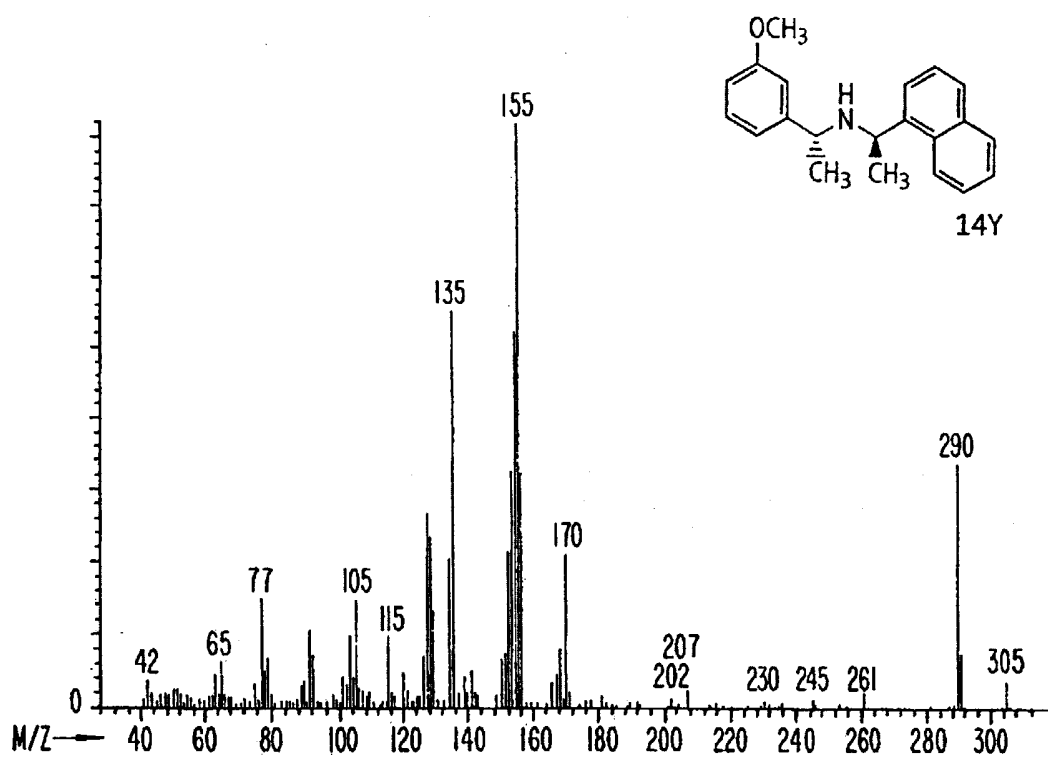
Obr. 45



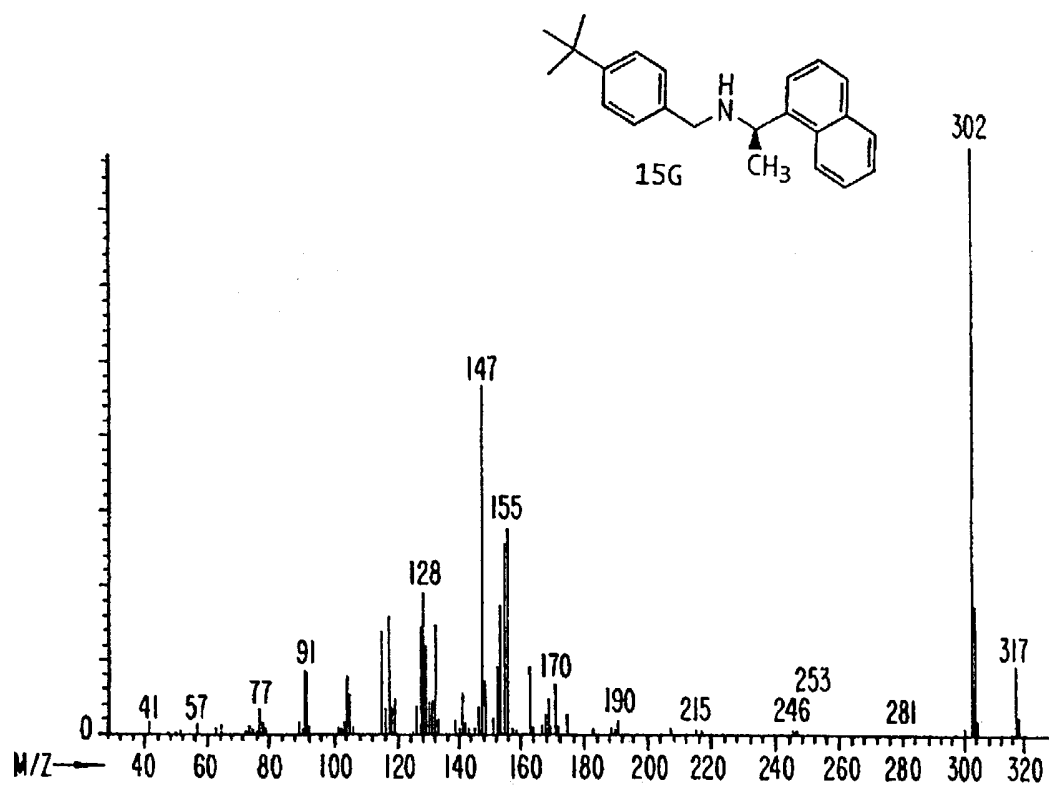
Obr. 46



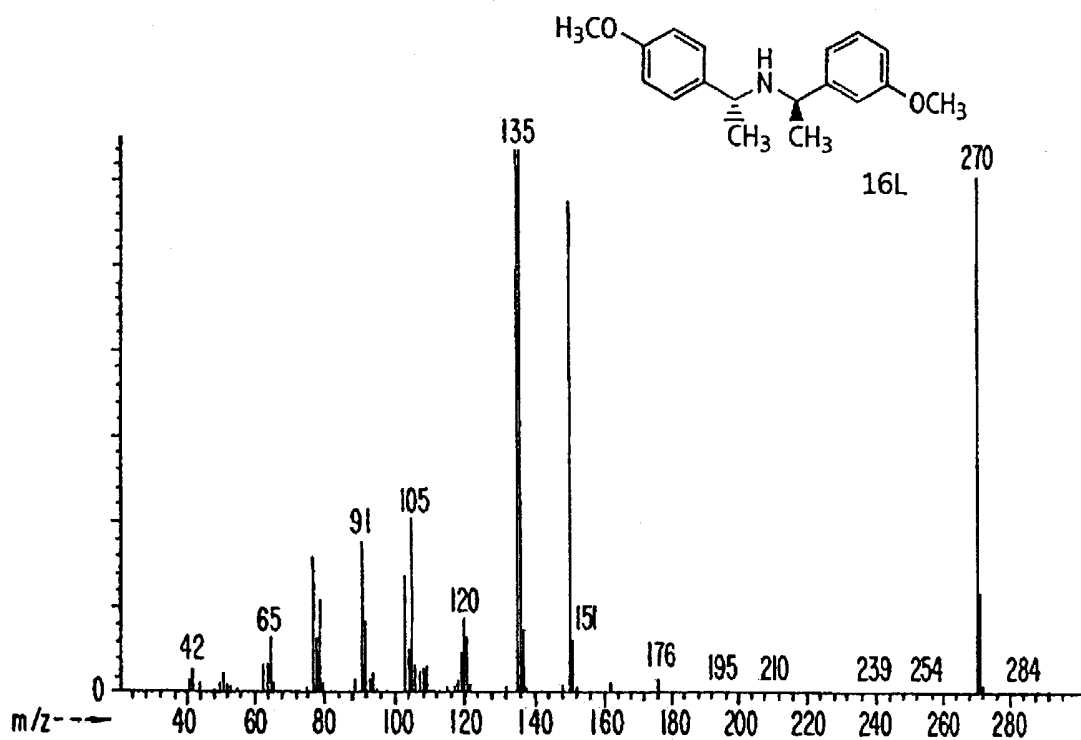
Obr. 47



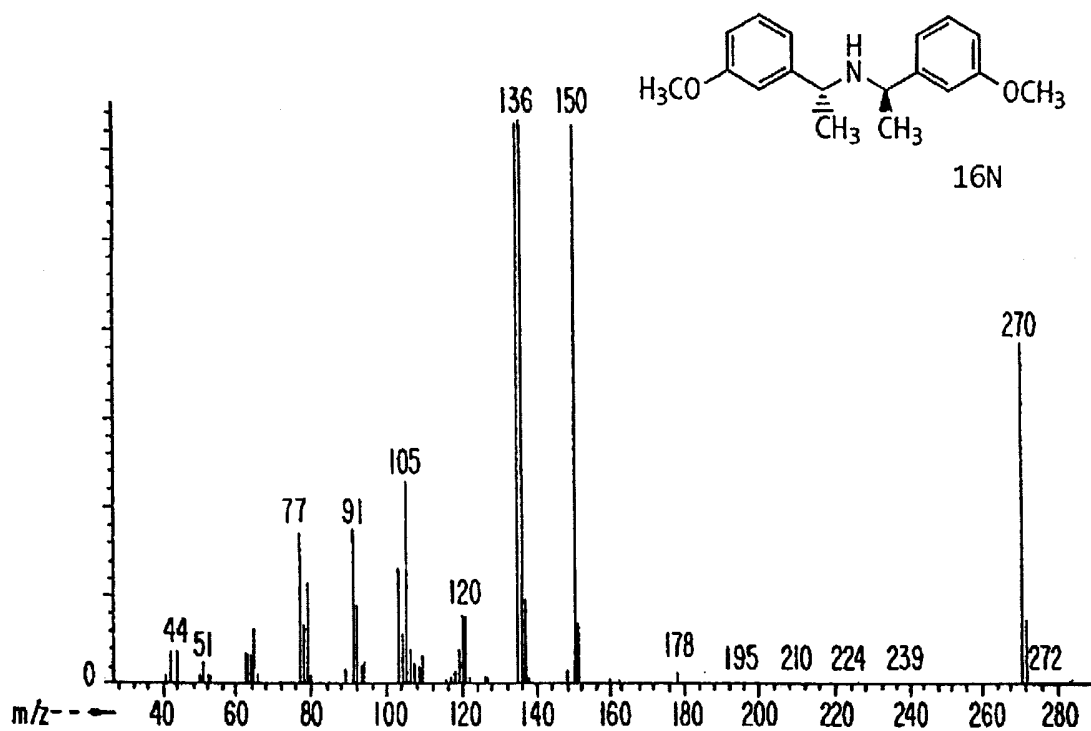
Obr. 48



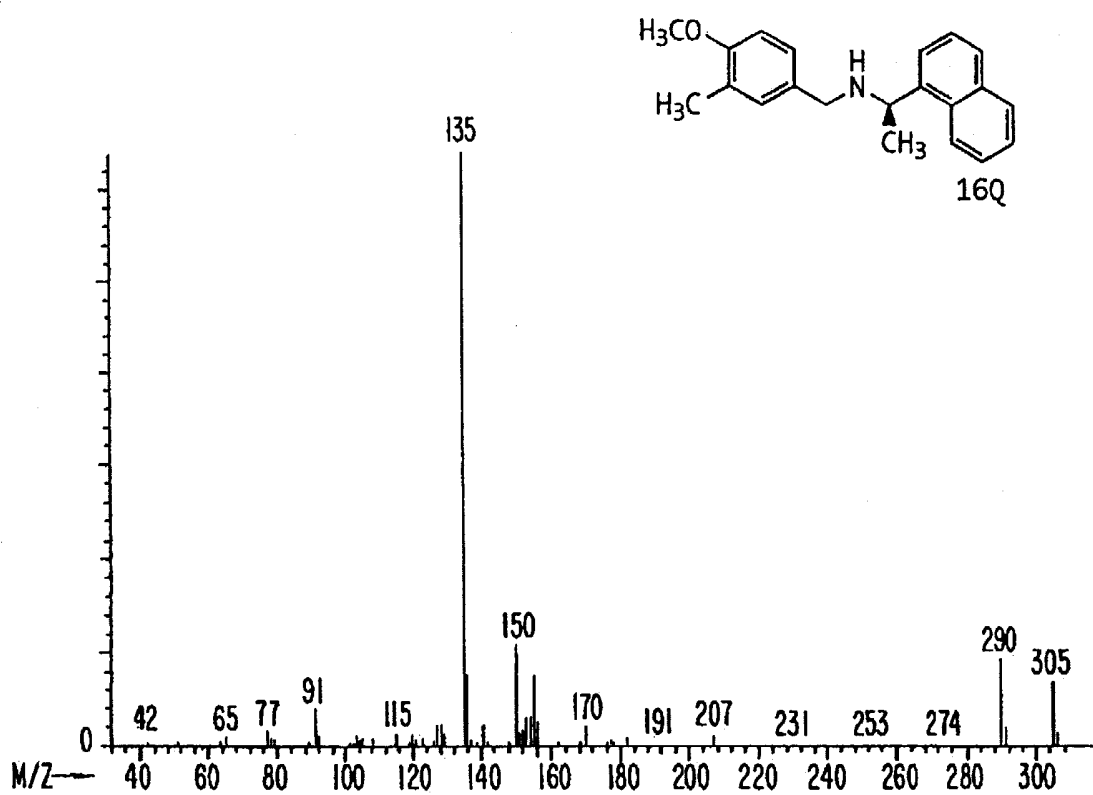
Obr. 49



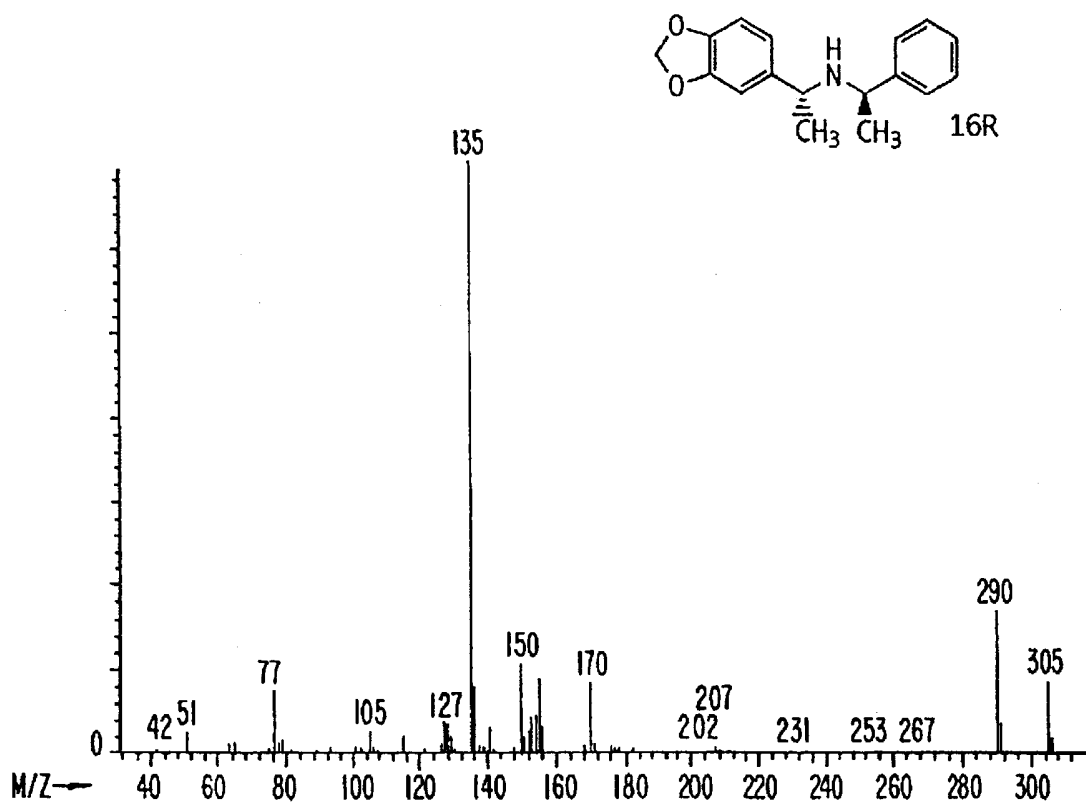
Obr. 50



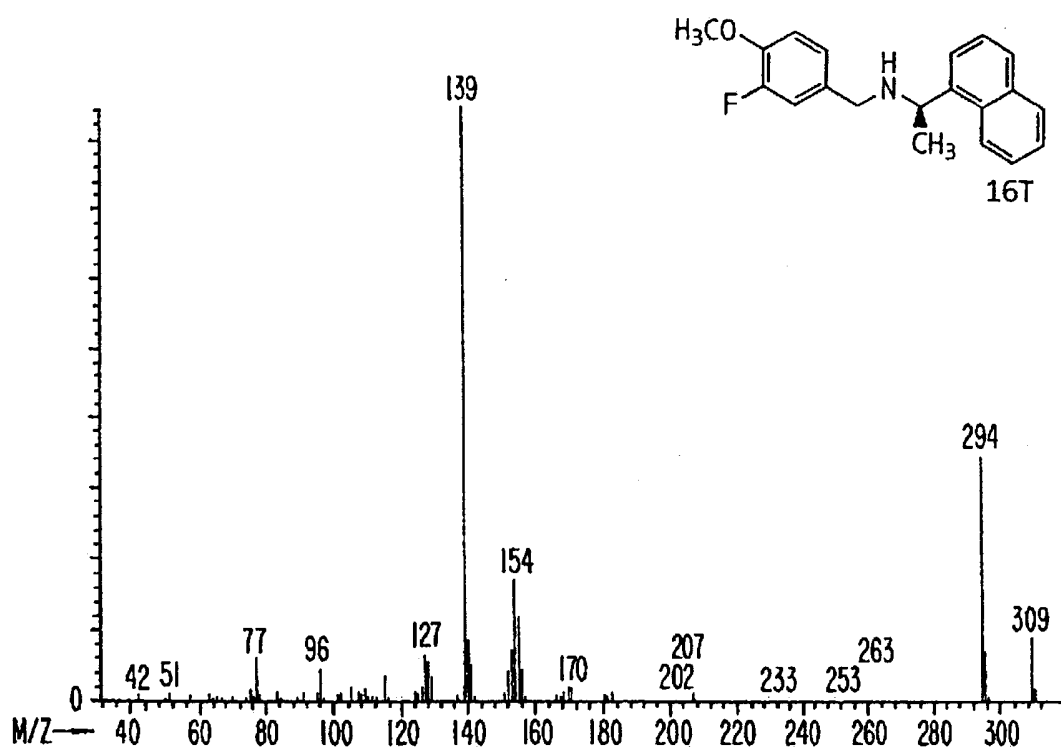
Obr. 51



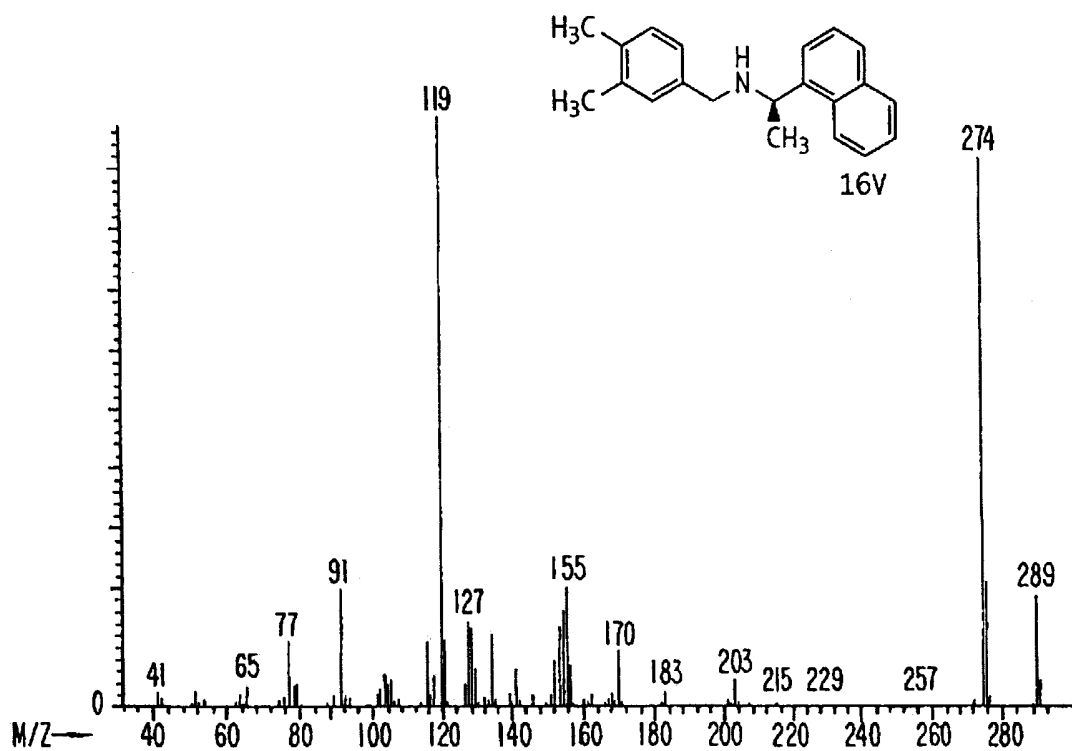
Obr. 52



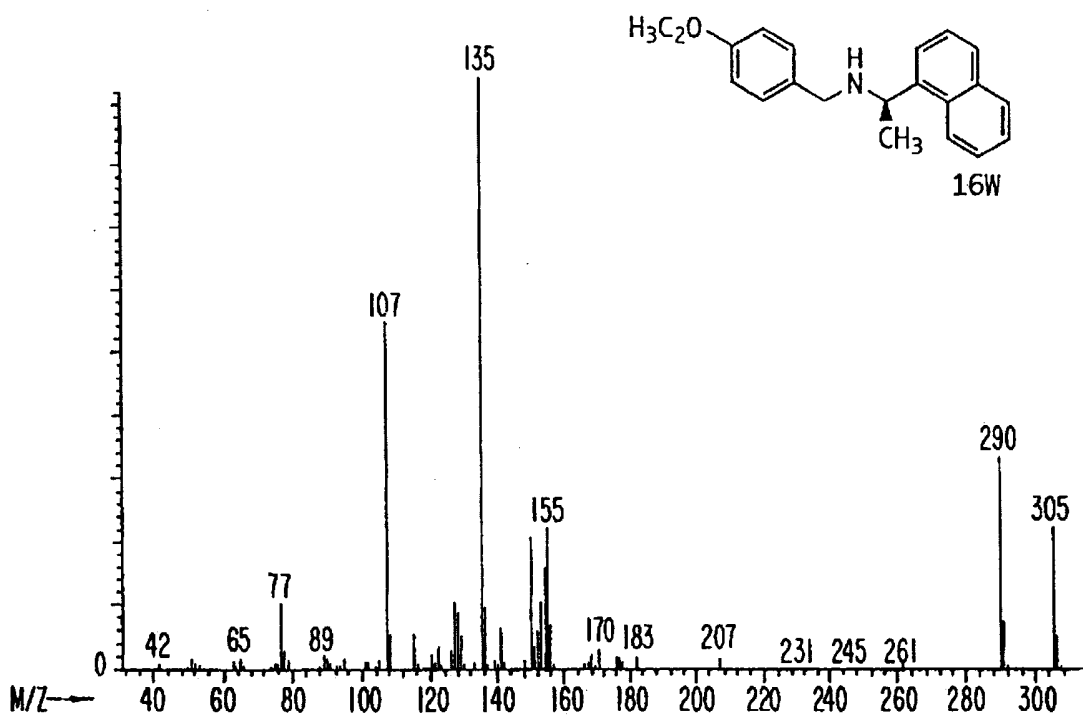
Obr. 53



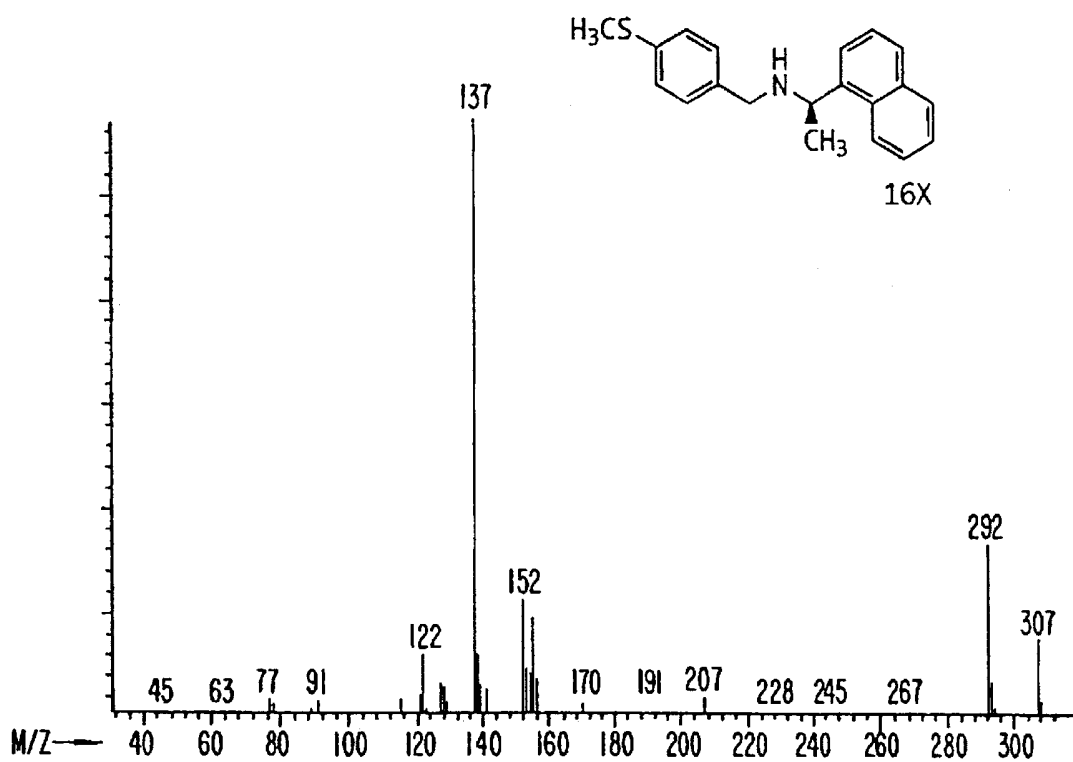
Obr. 54



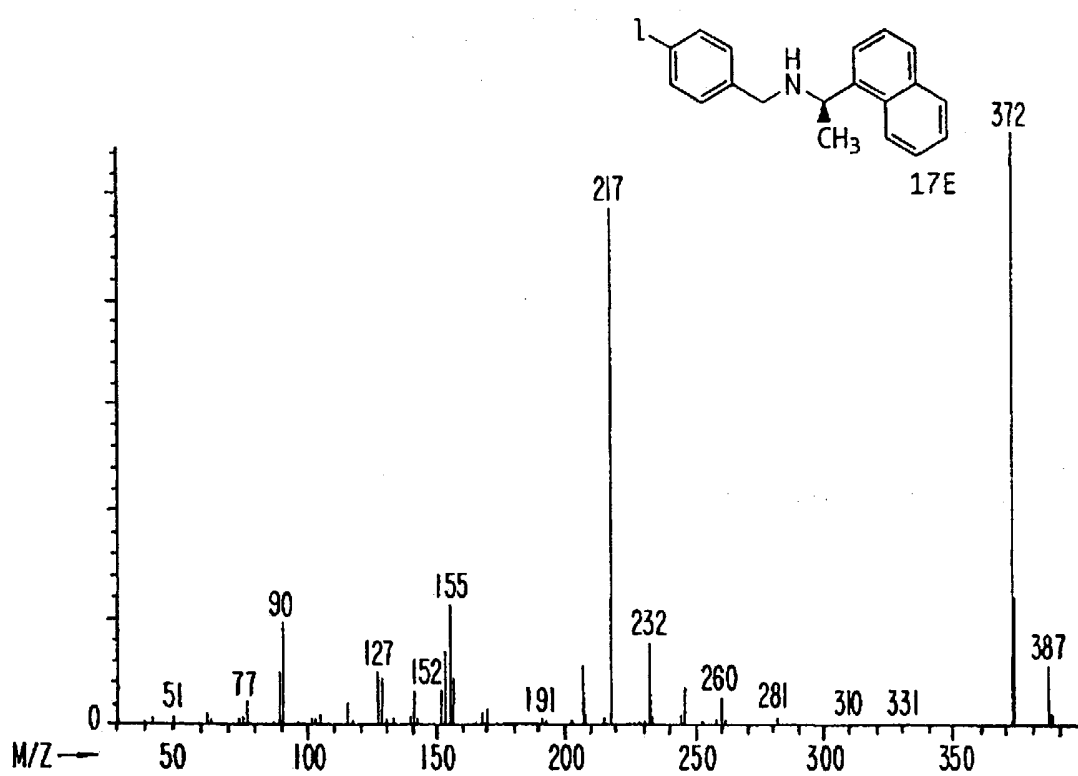
Obr. 55



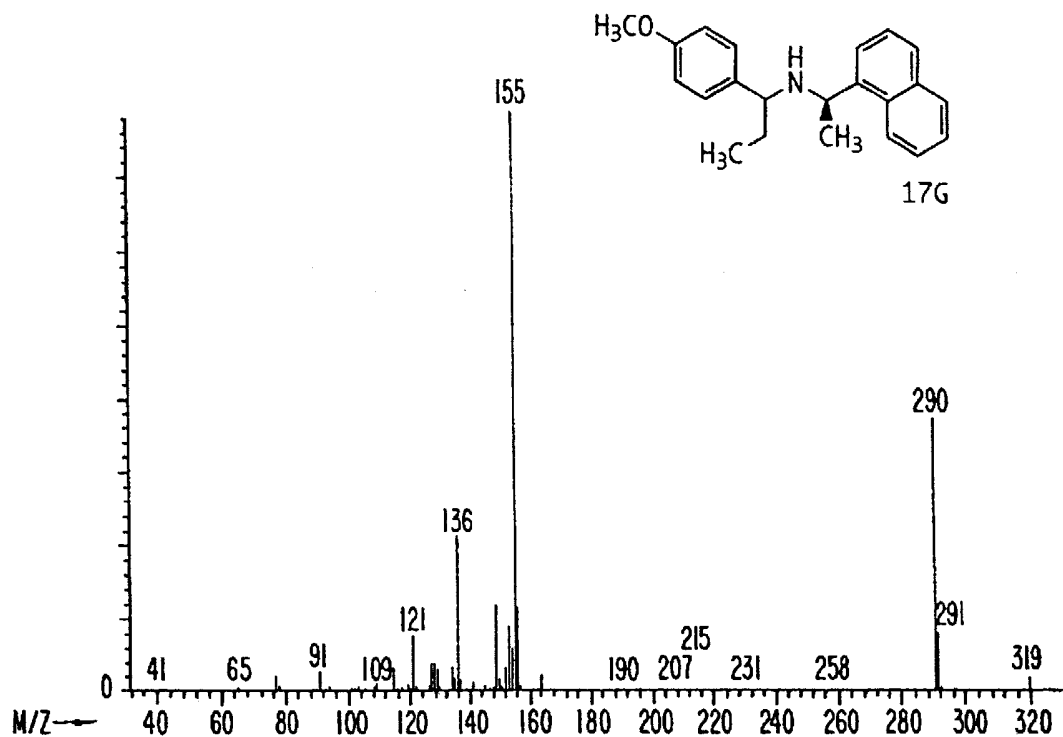
Obr. 56



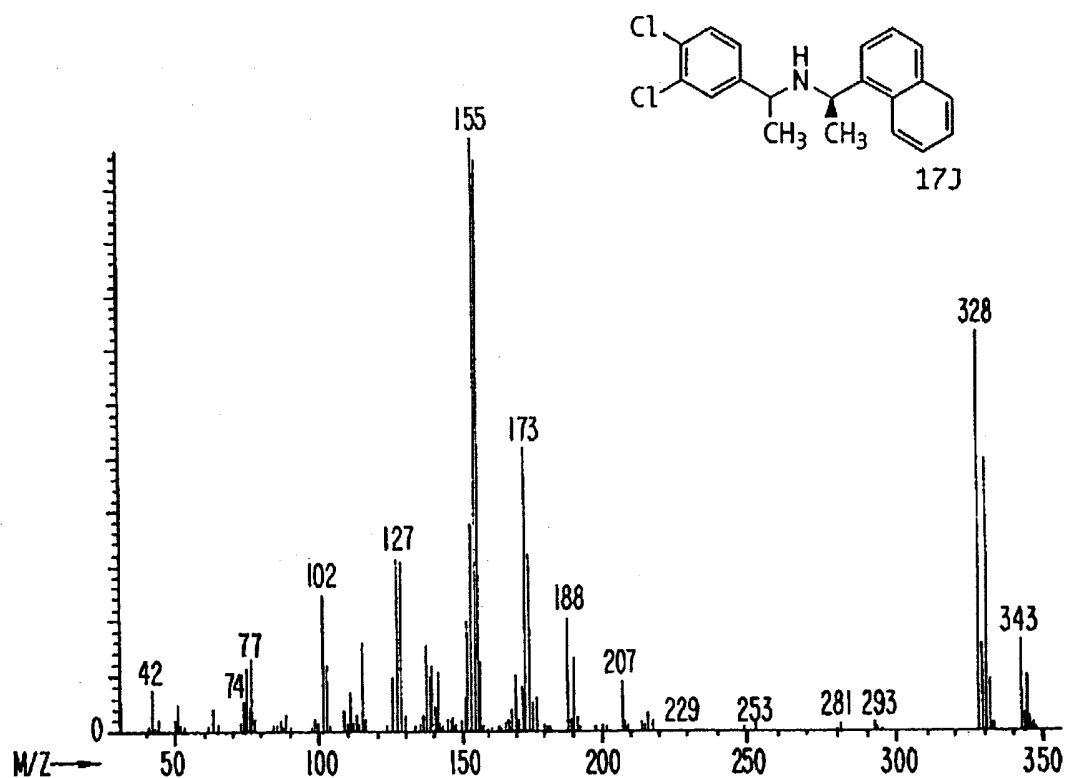
Obr. 57



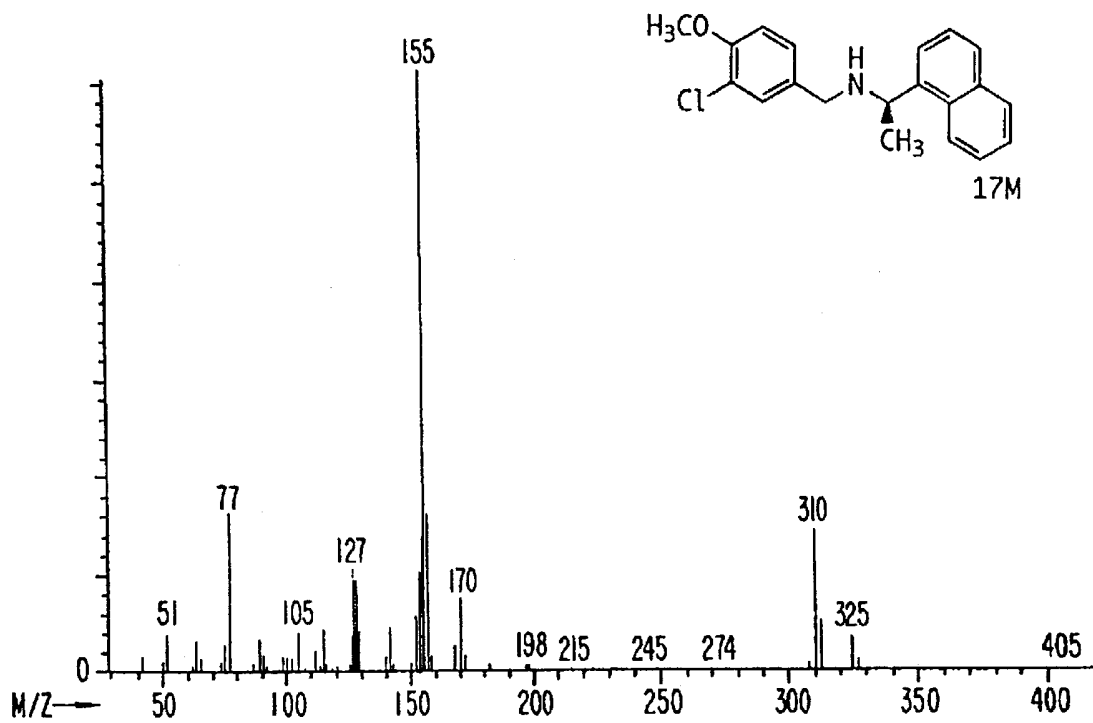
Obr. 58



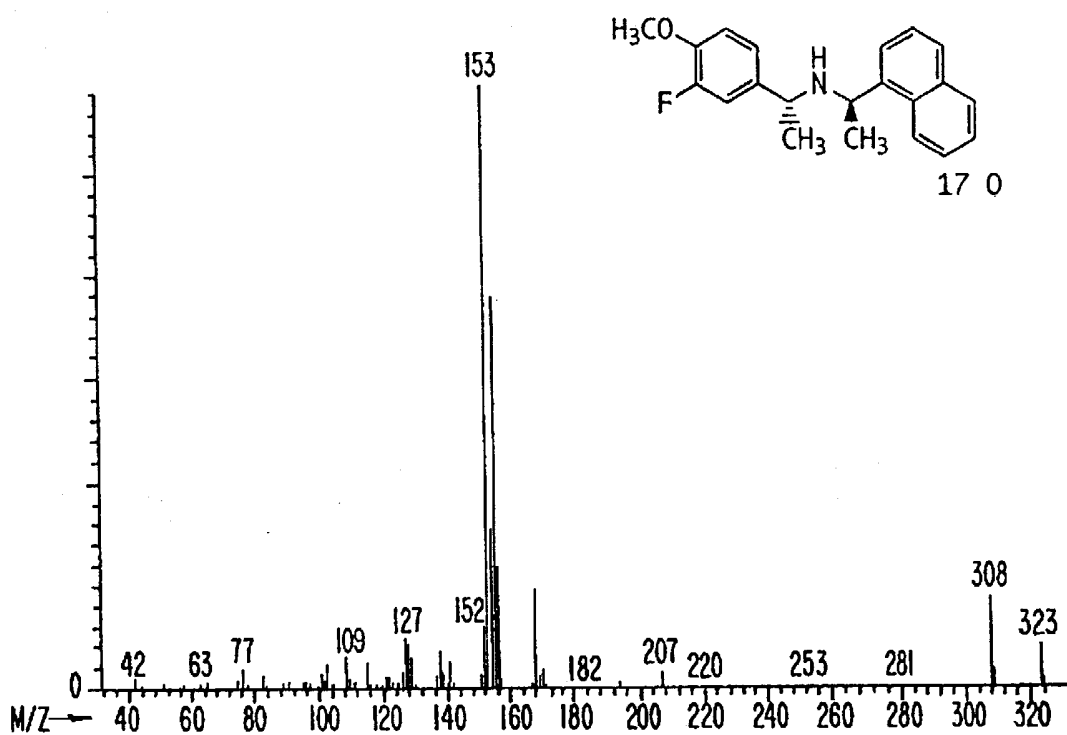
Obr. 59



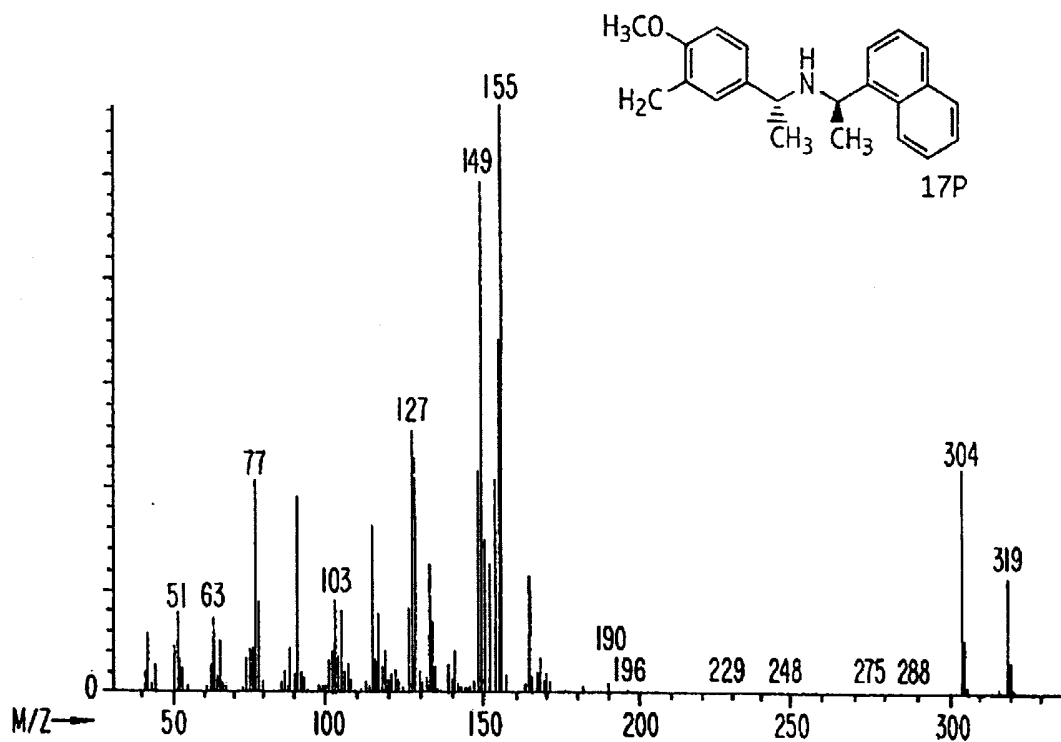
Obr. 60



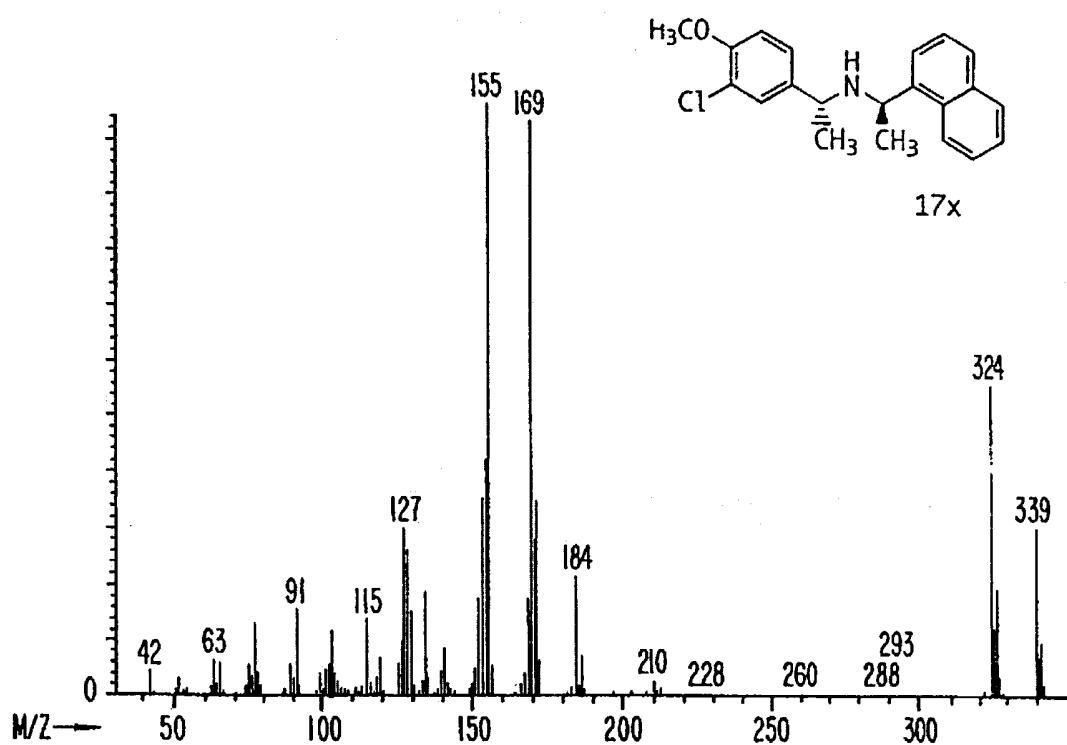
Obr. 61



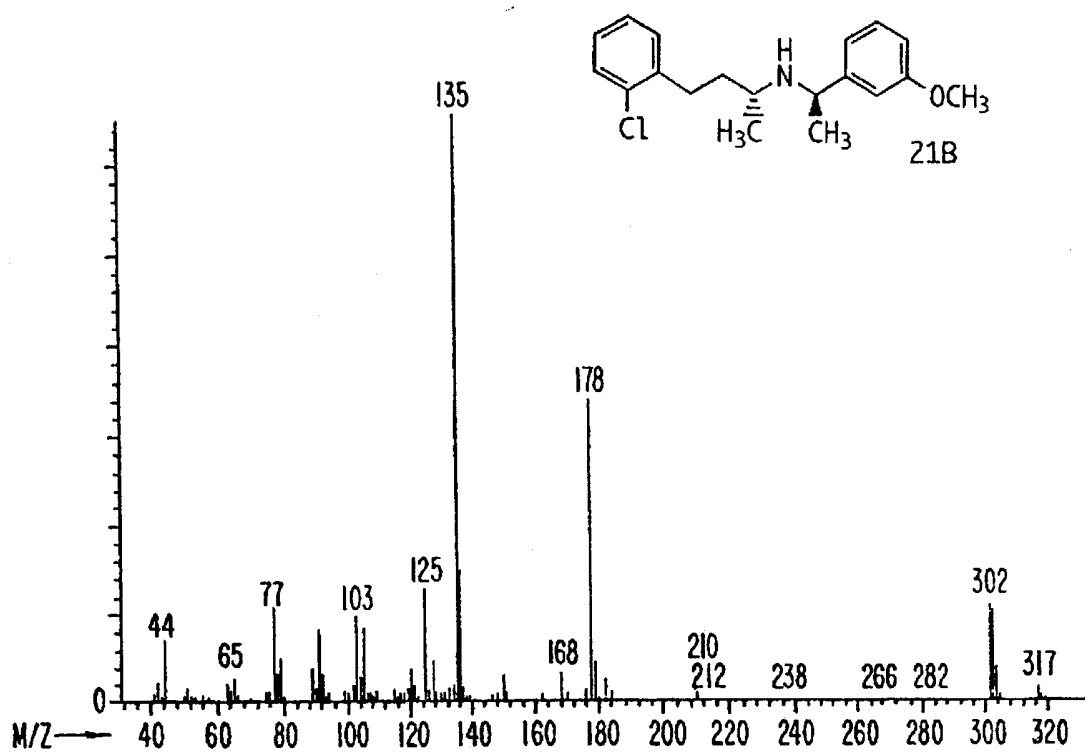
Obr. 62



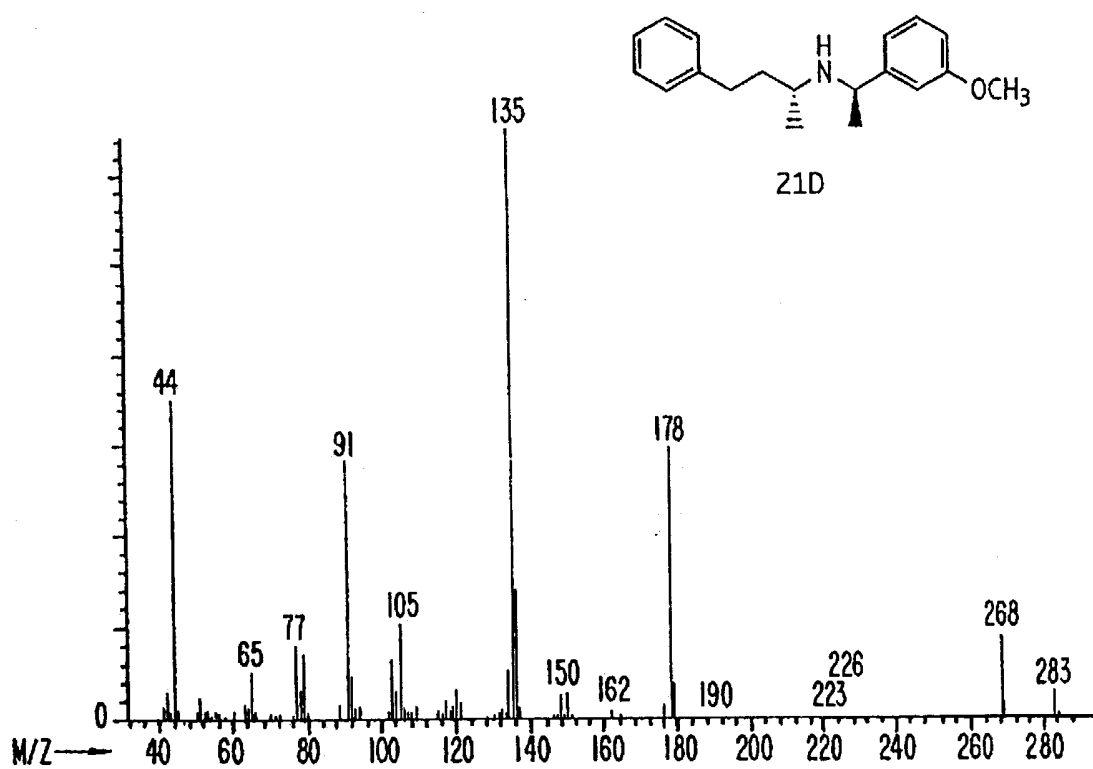
Obr. 63



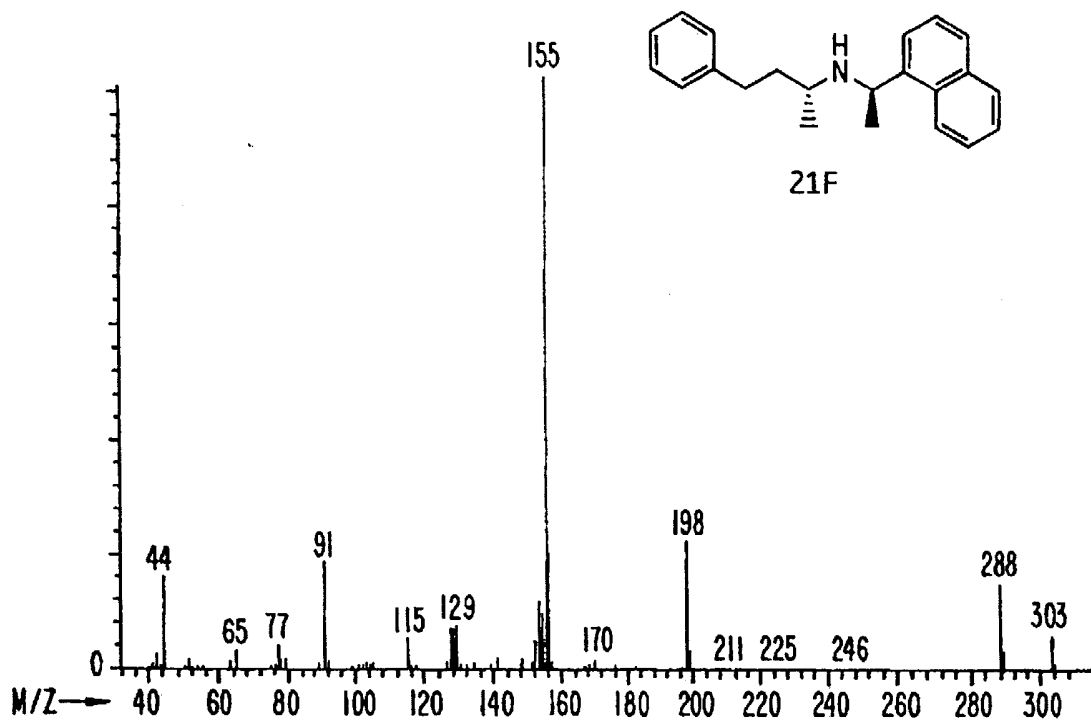
Obr. 64



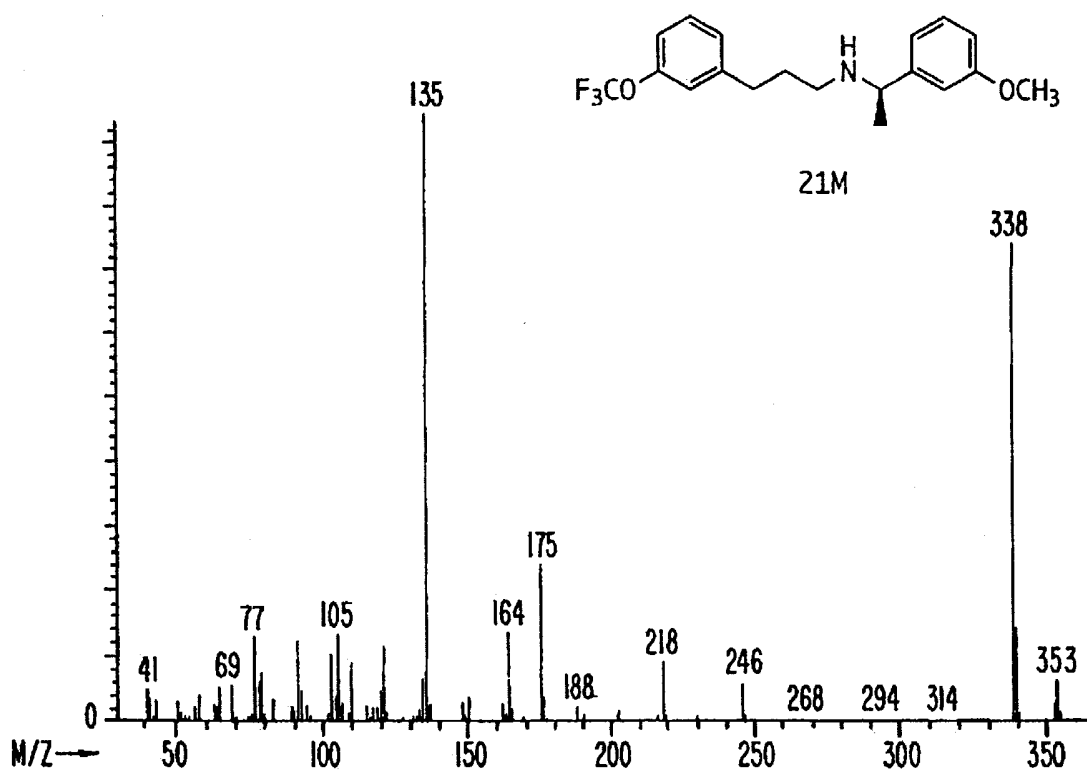
Obr. 65



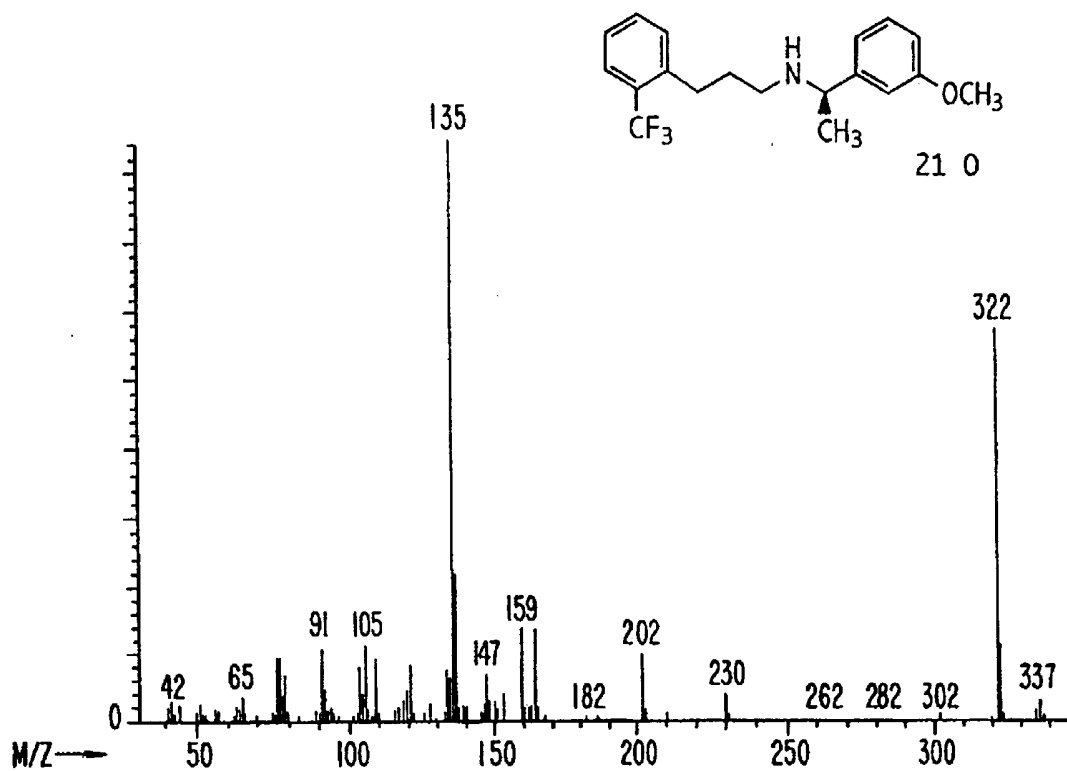
Obr. 66



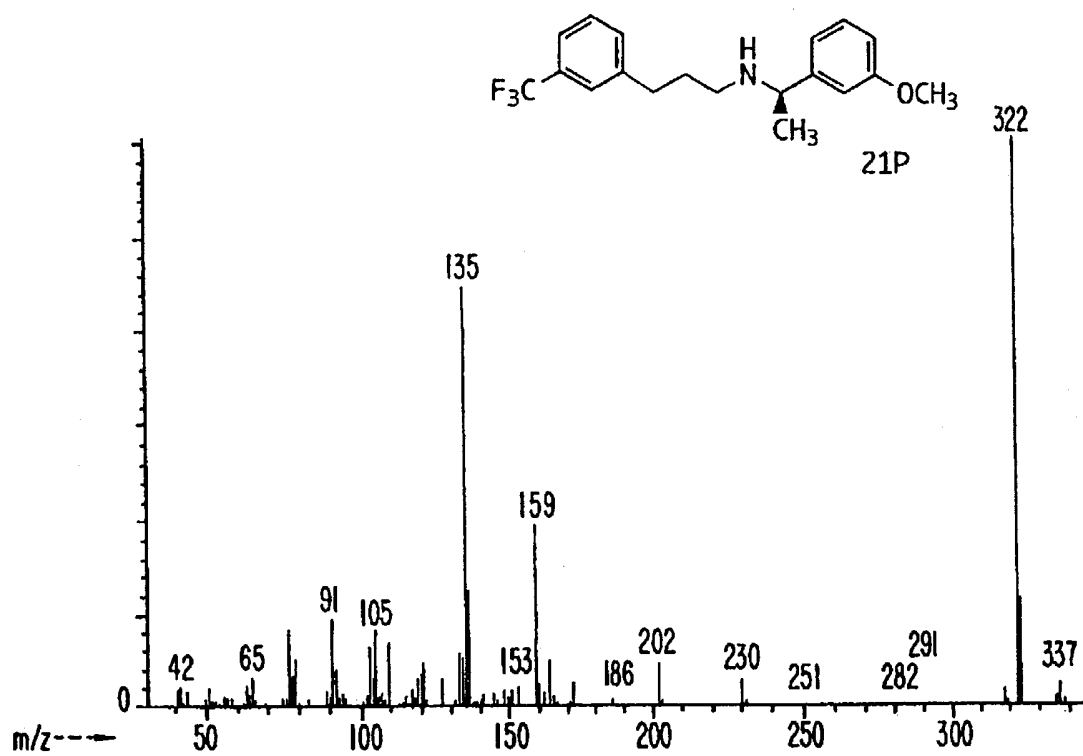
Obr. 67



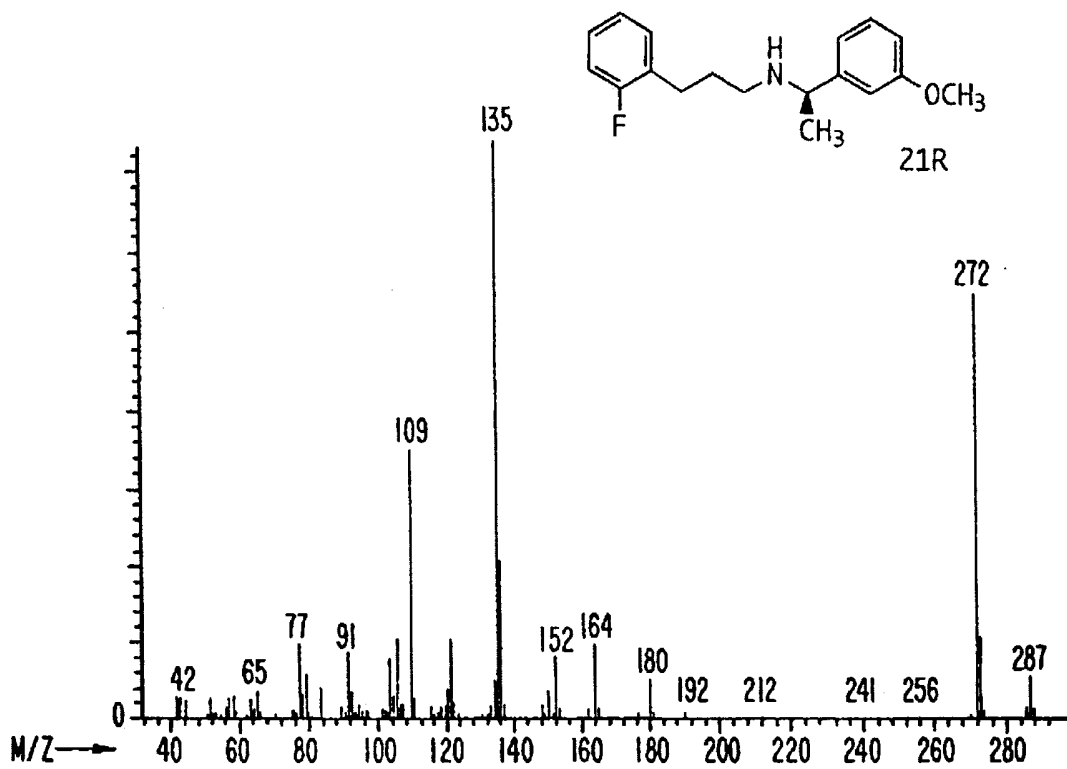
Obr. 68



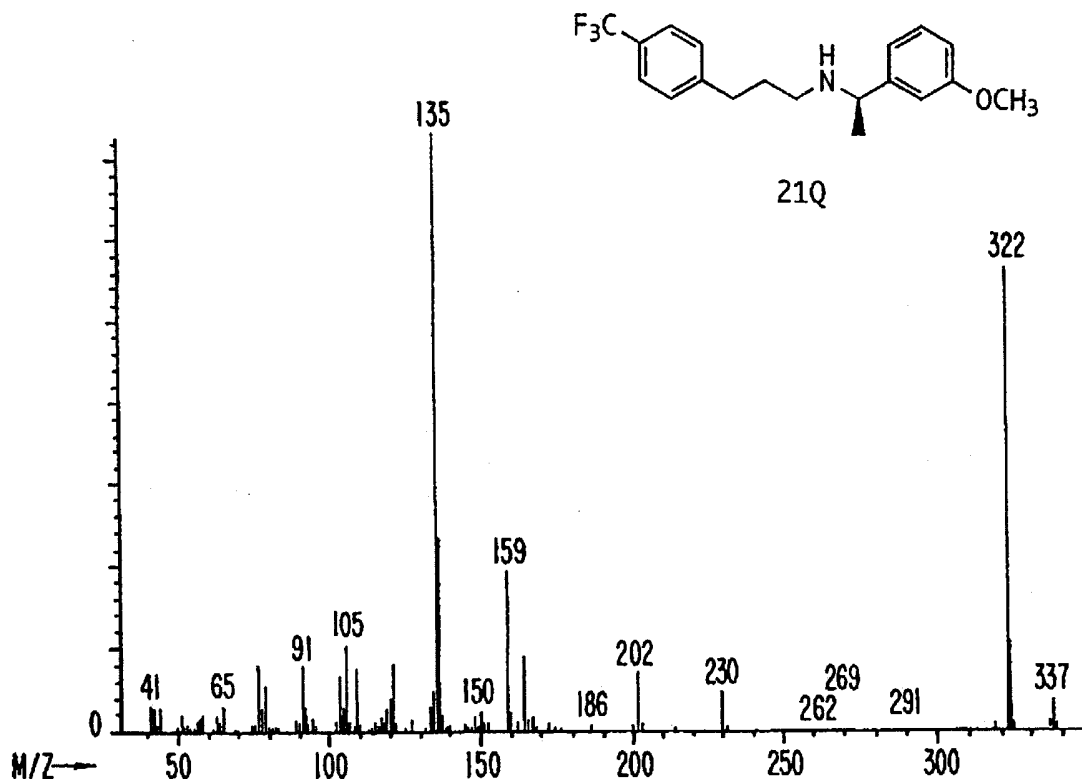
Obr. 69



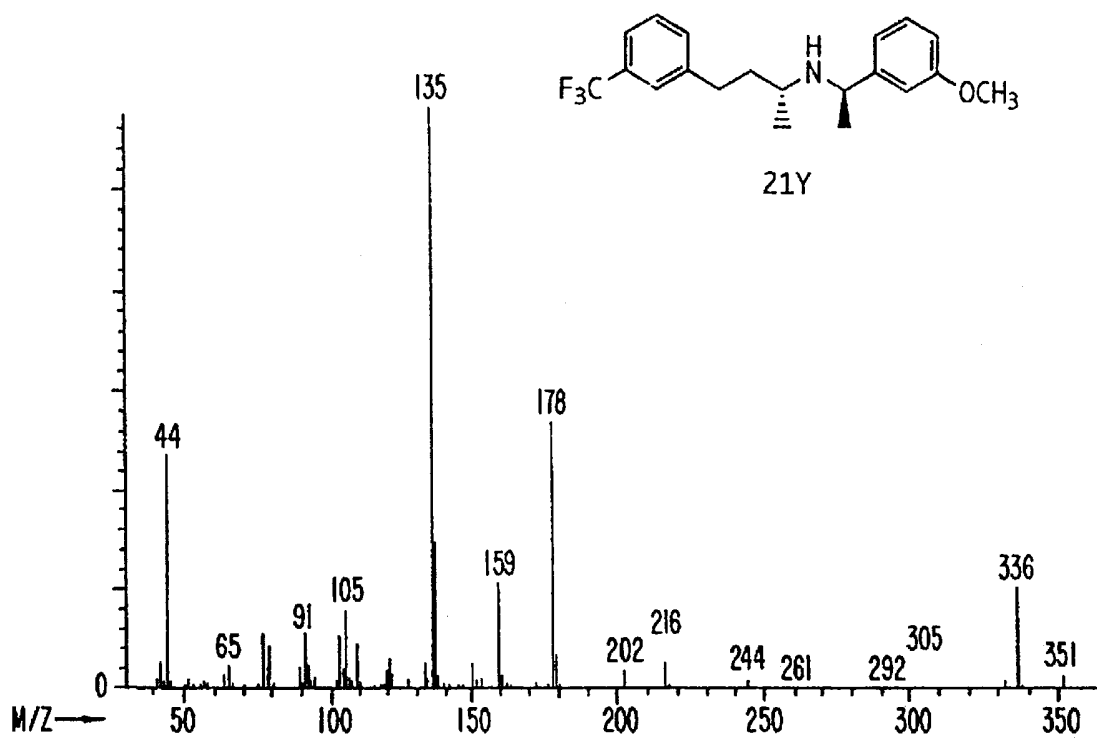
Obr. 70



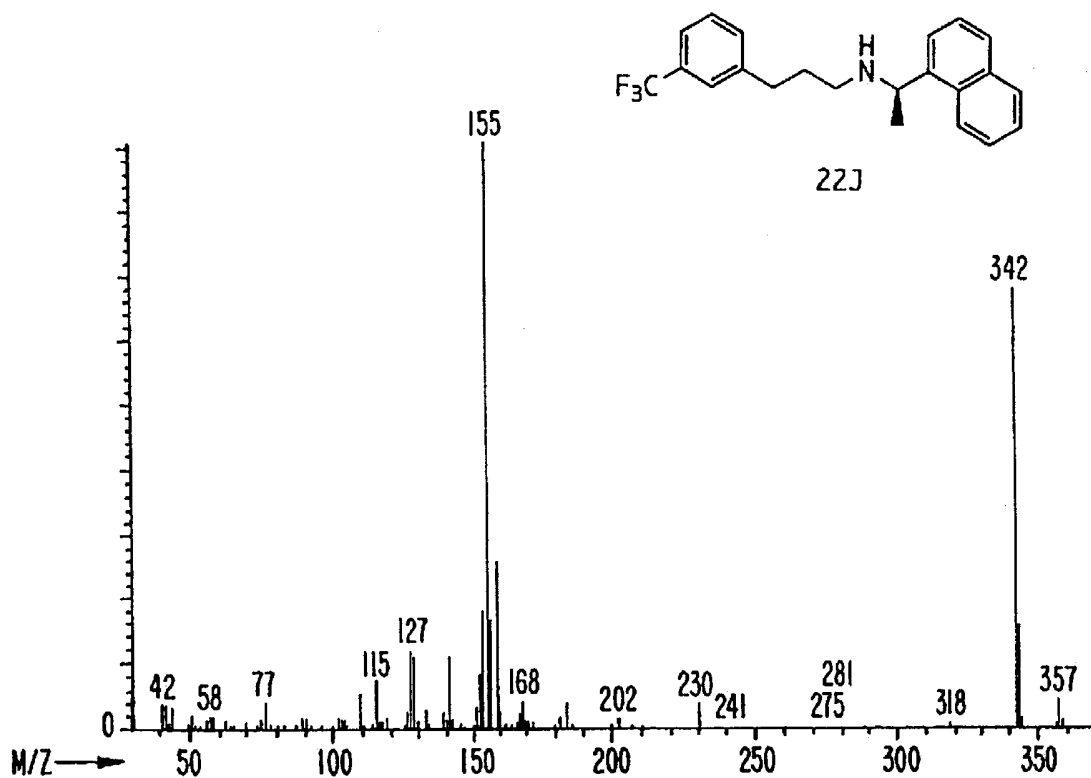
Obr. 71



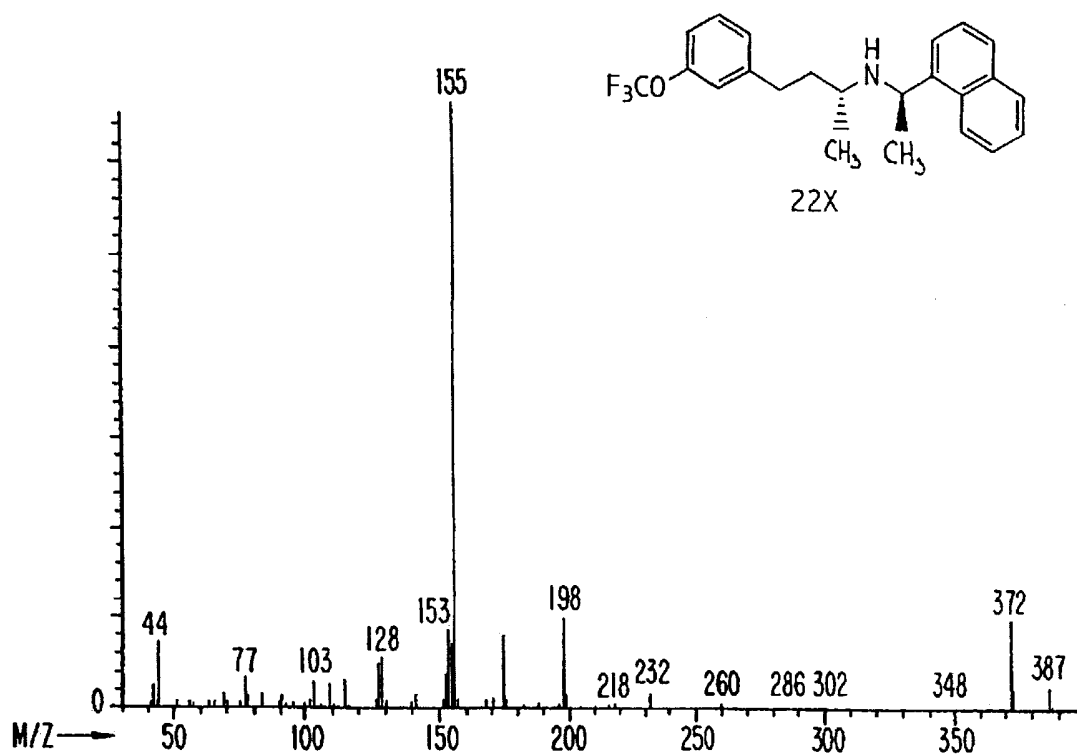
Obr. 72



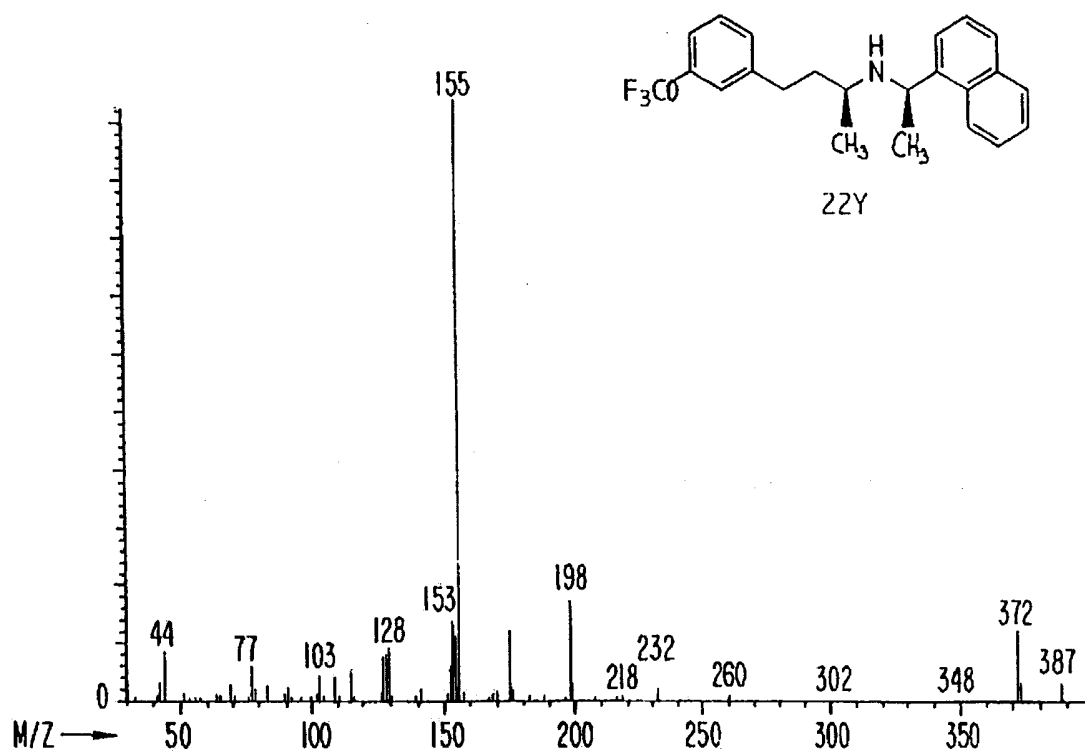
Obr. 73



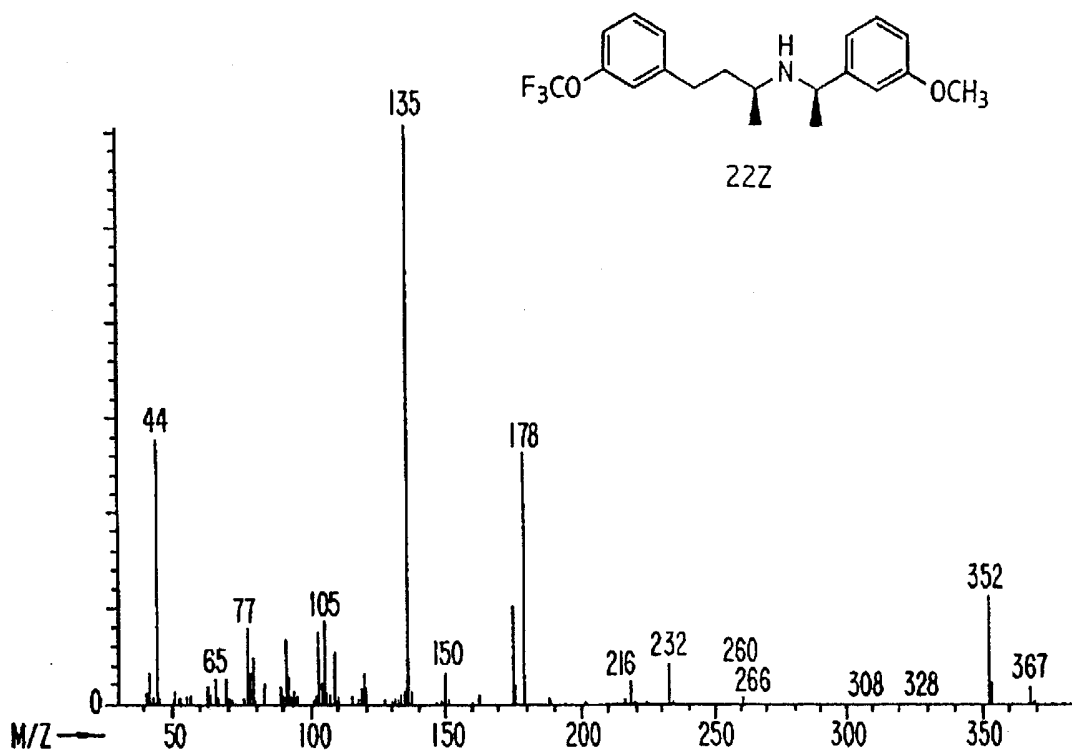
Obr. 74



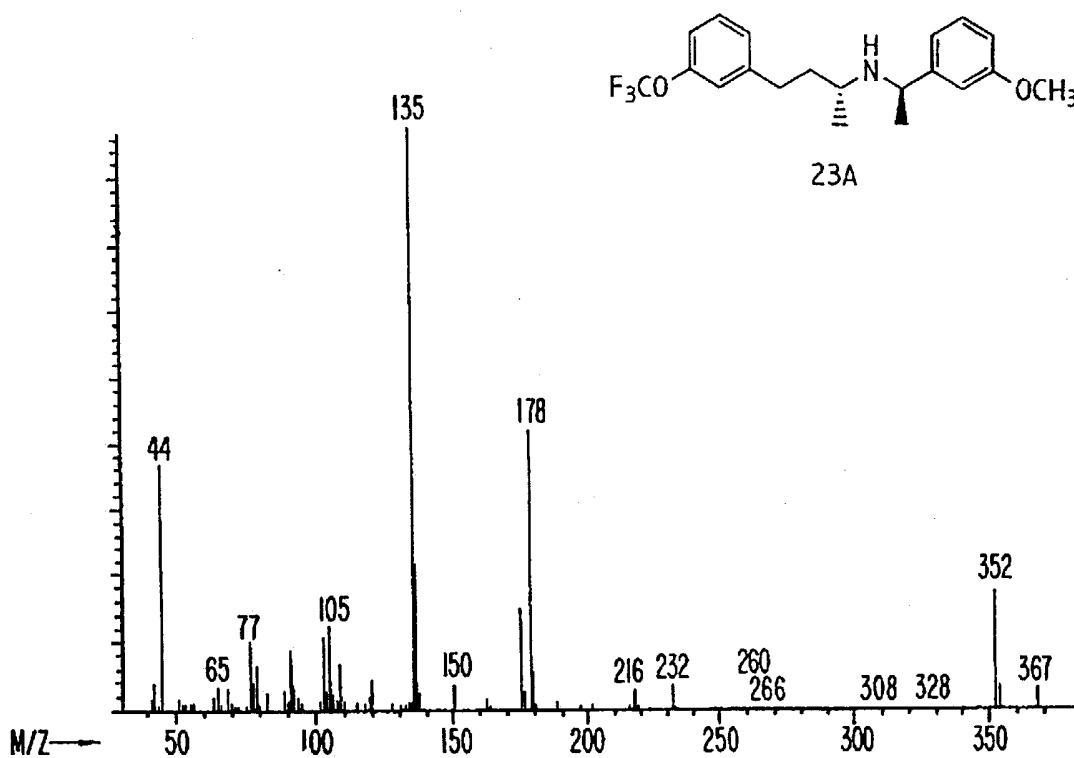
Obr. 75



Obr. 76

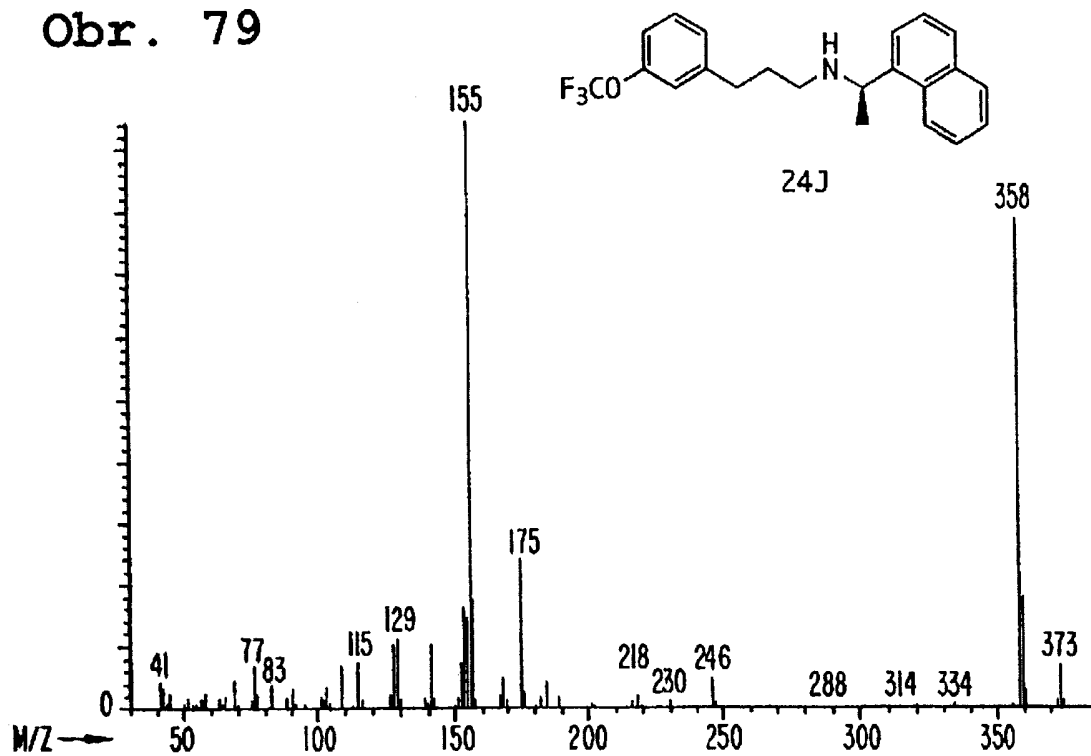


Obr. 77

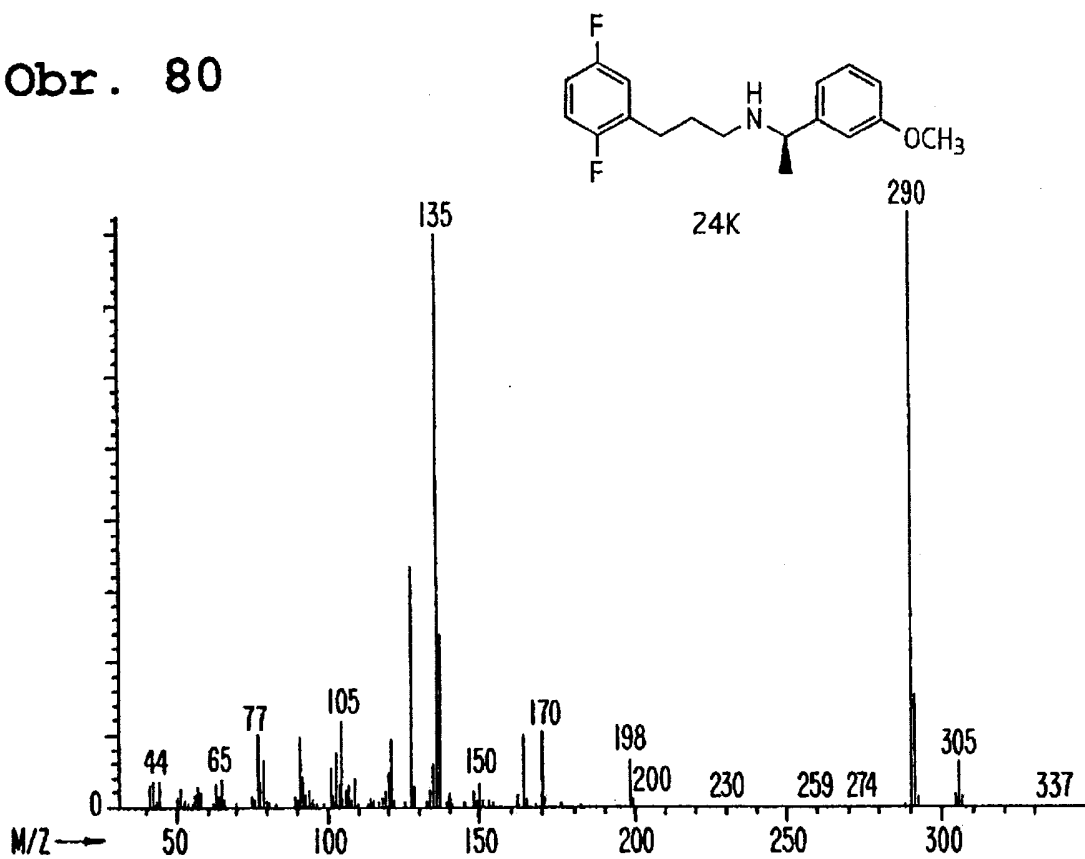


Obr. 78

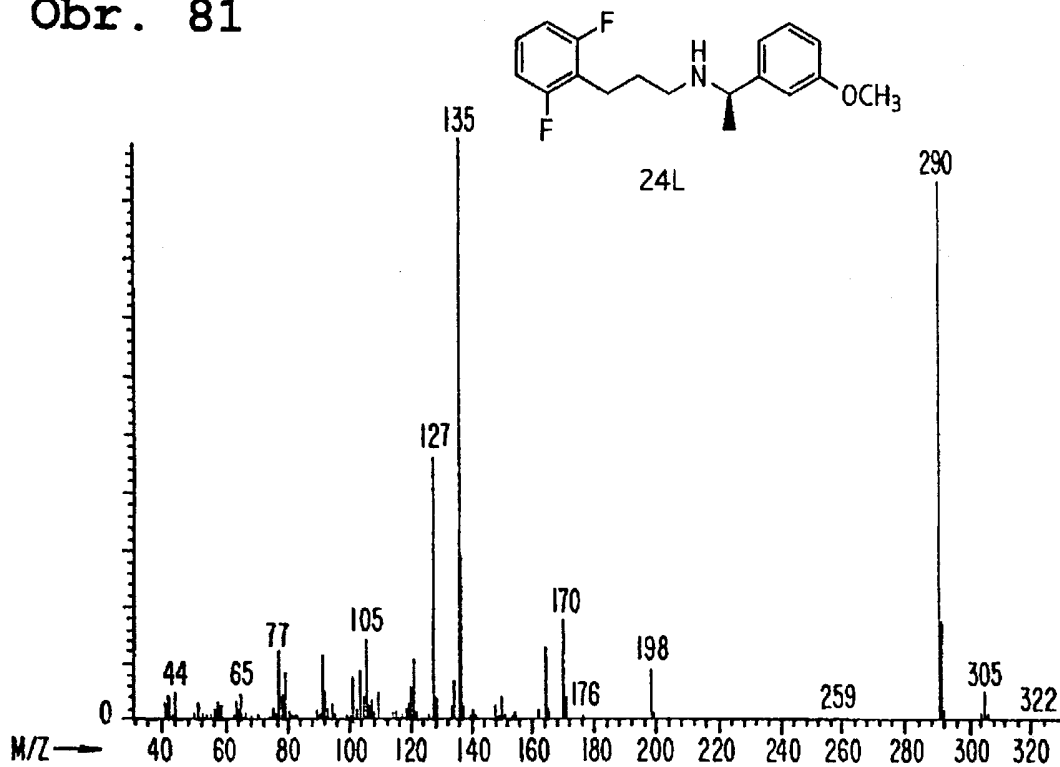
Obr. 79



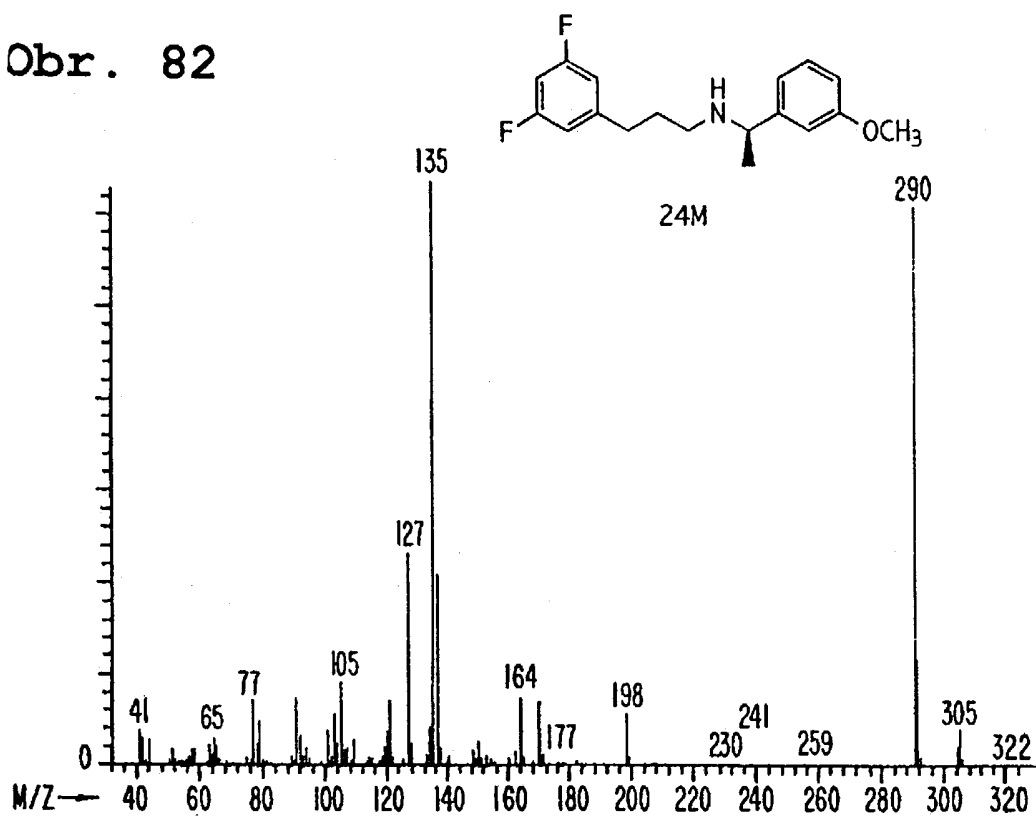
Obr. 80

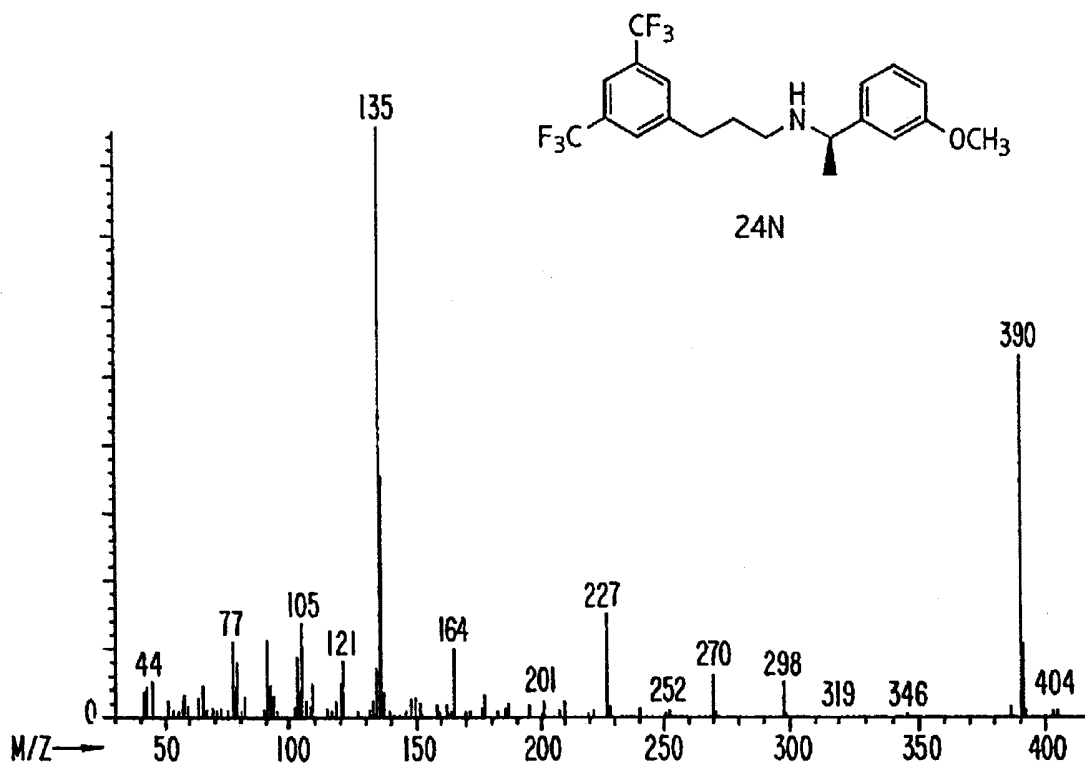


Obr. 81

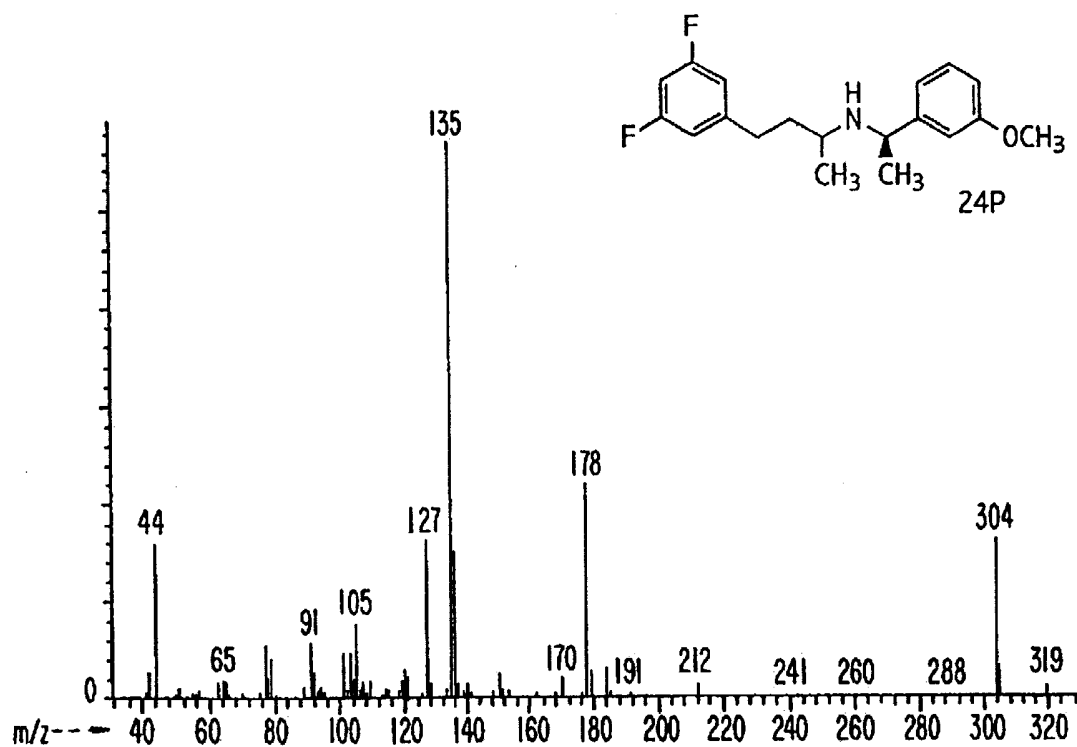


Obr. 82

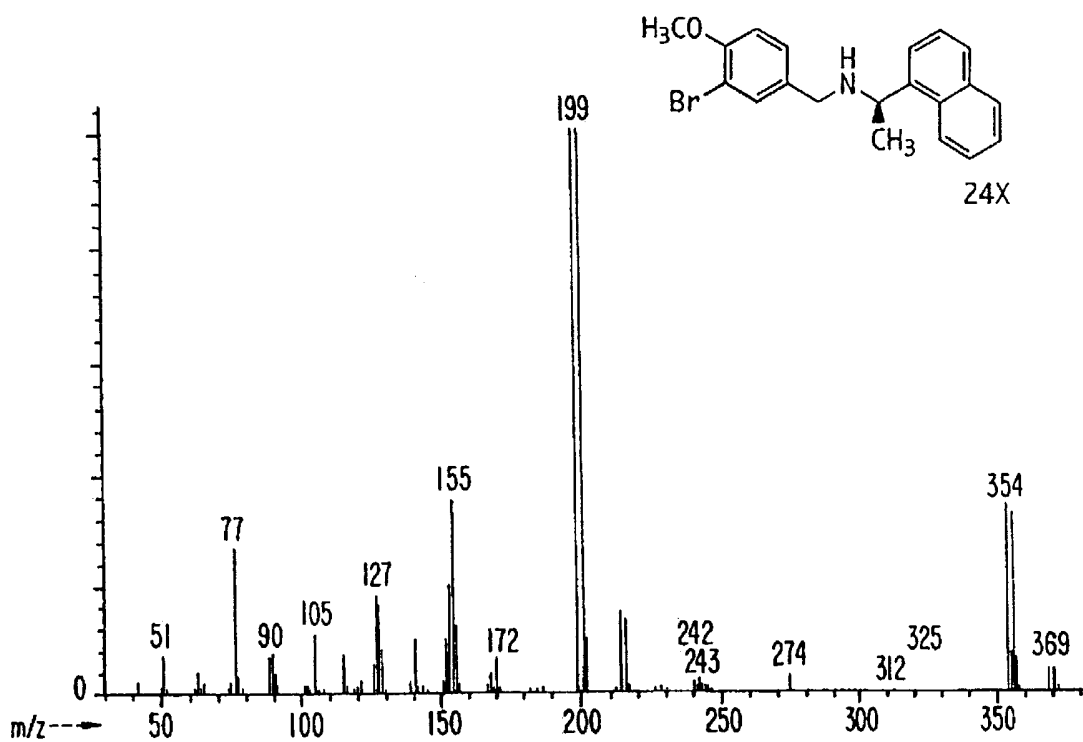




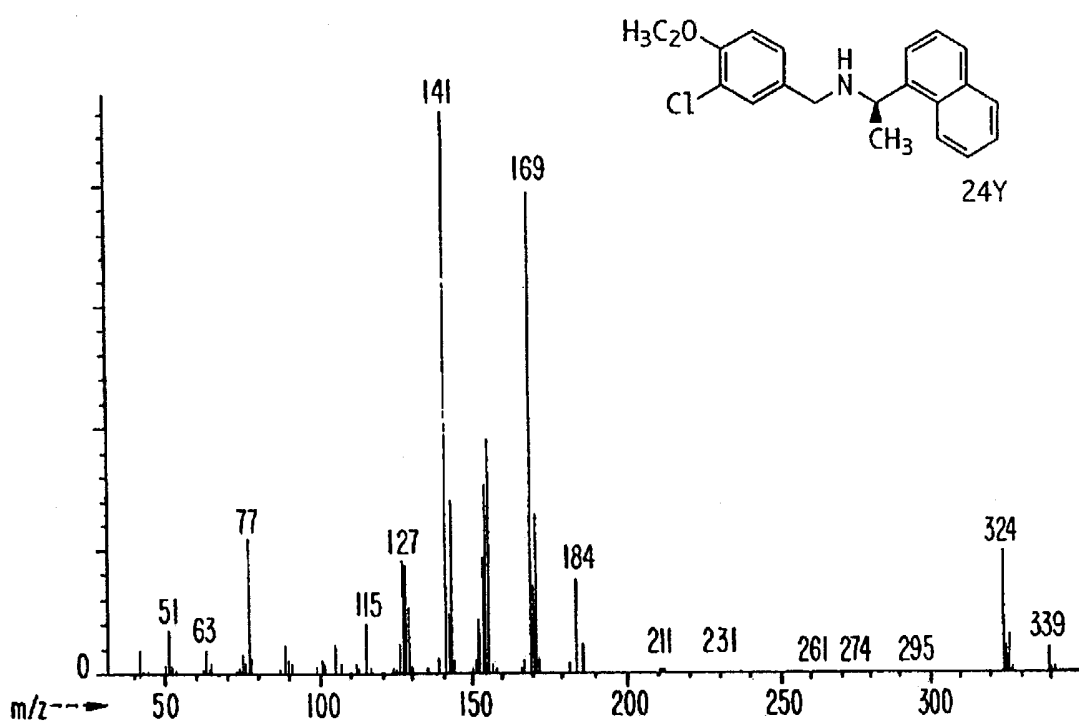
Obr. 83



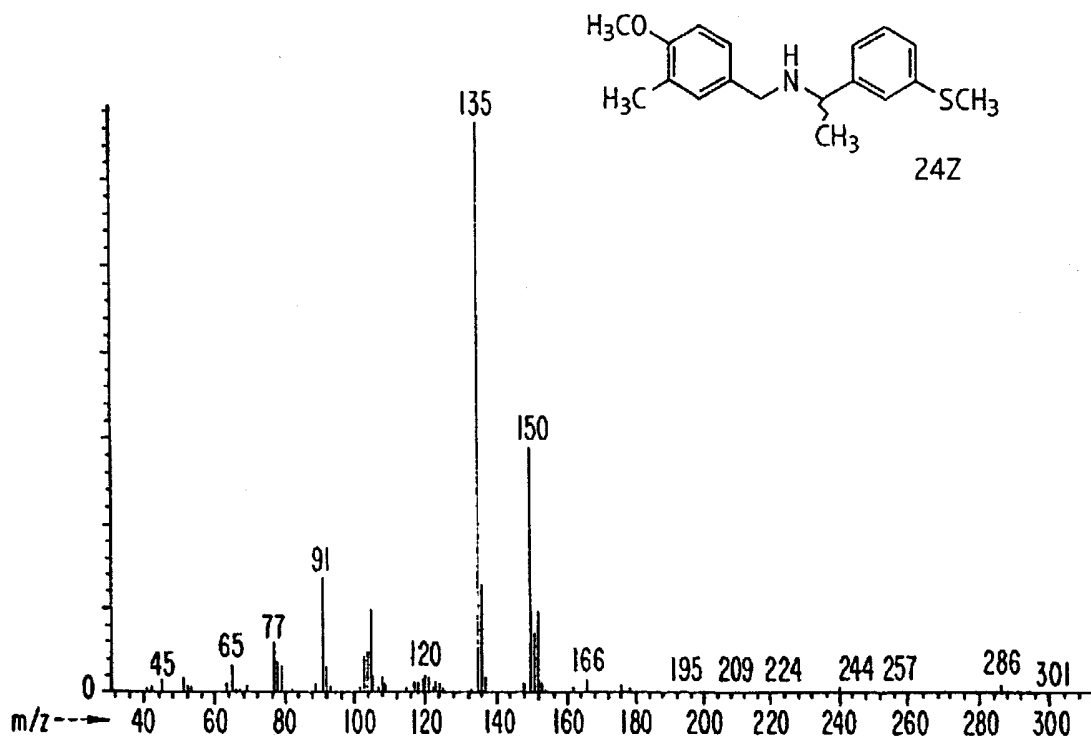
Obr. 84



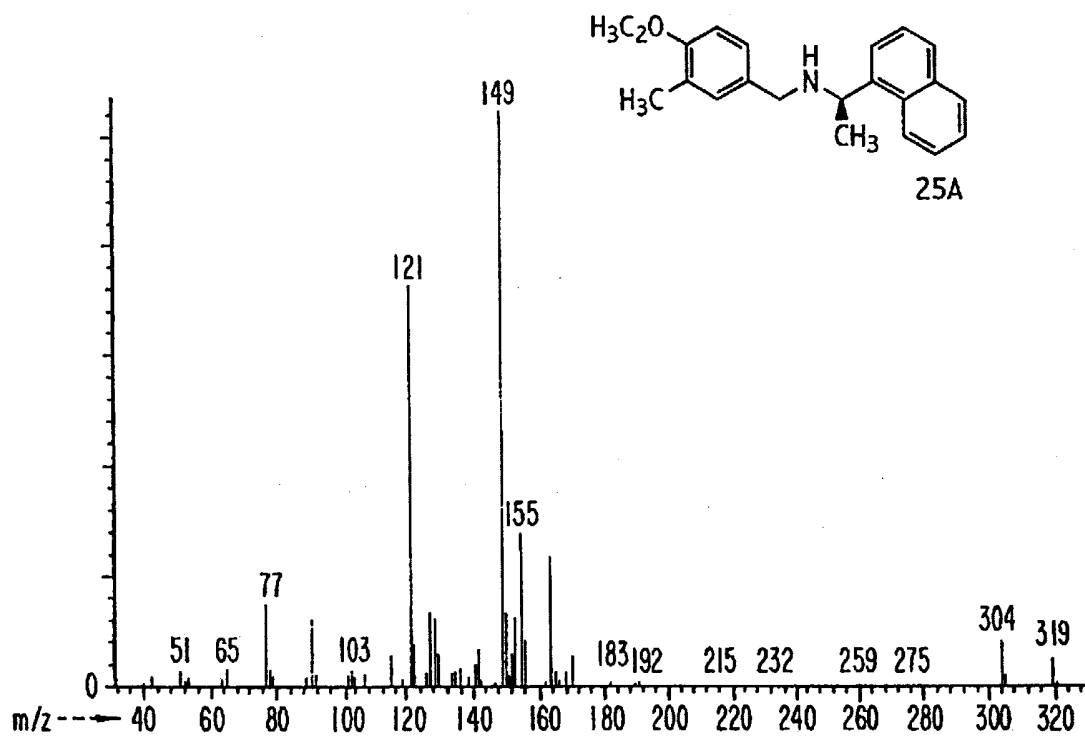
Obr. 85



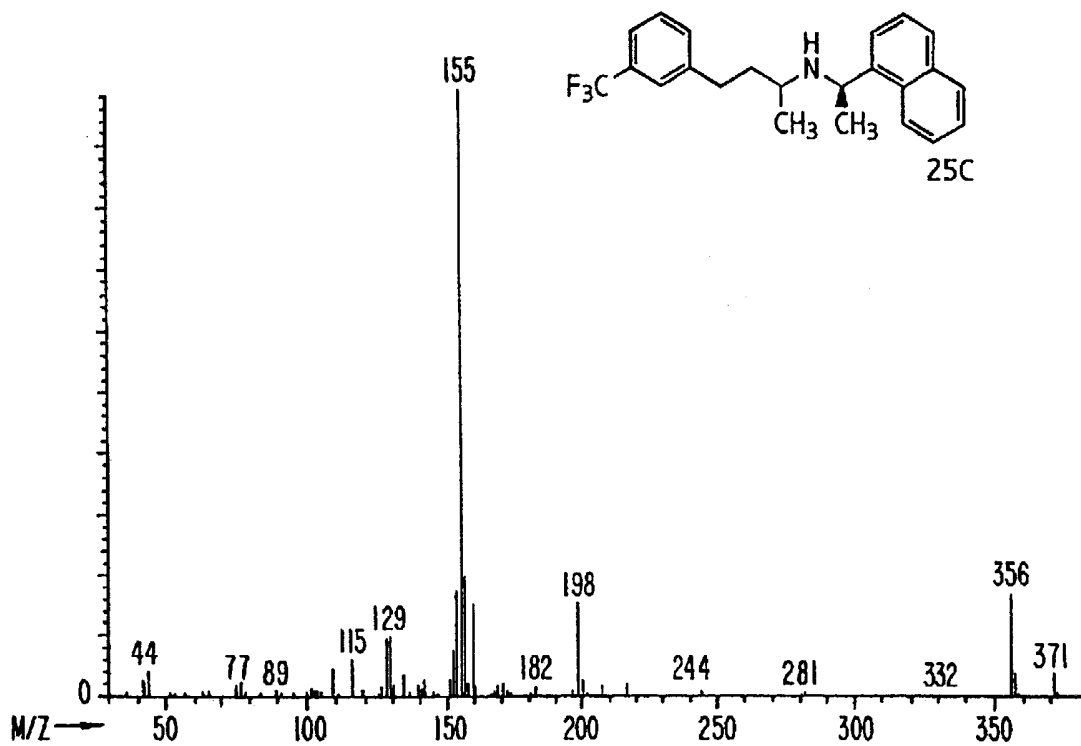
Obr. 86



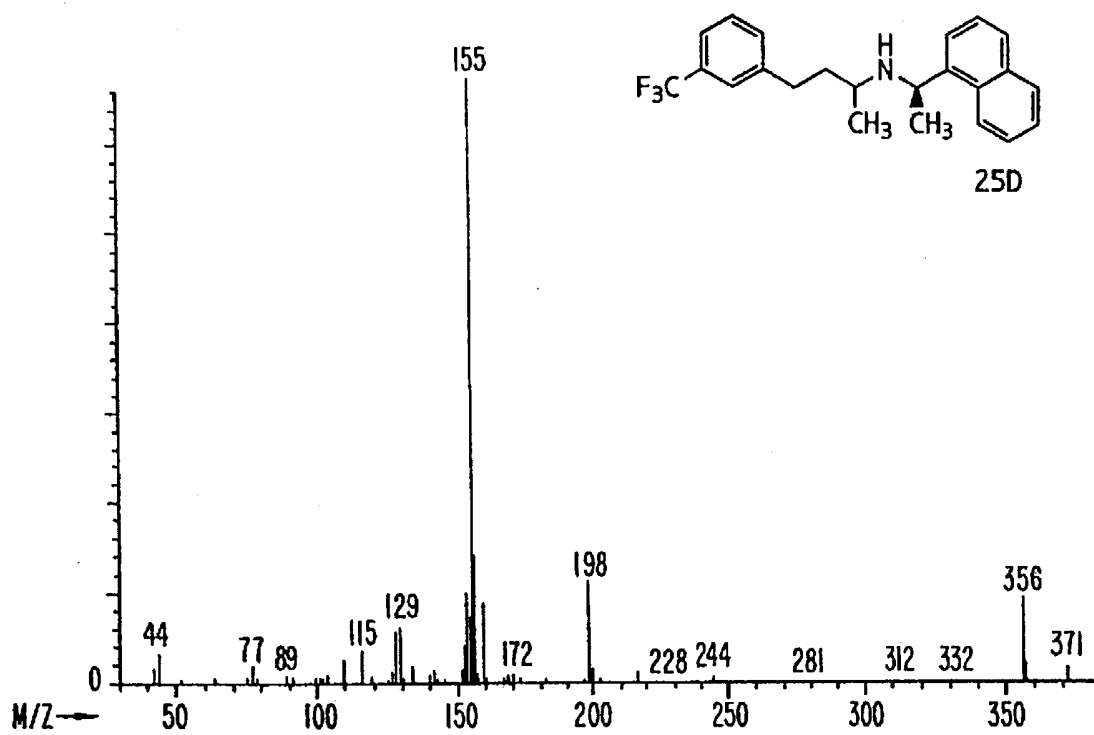
Obr. 87



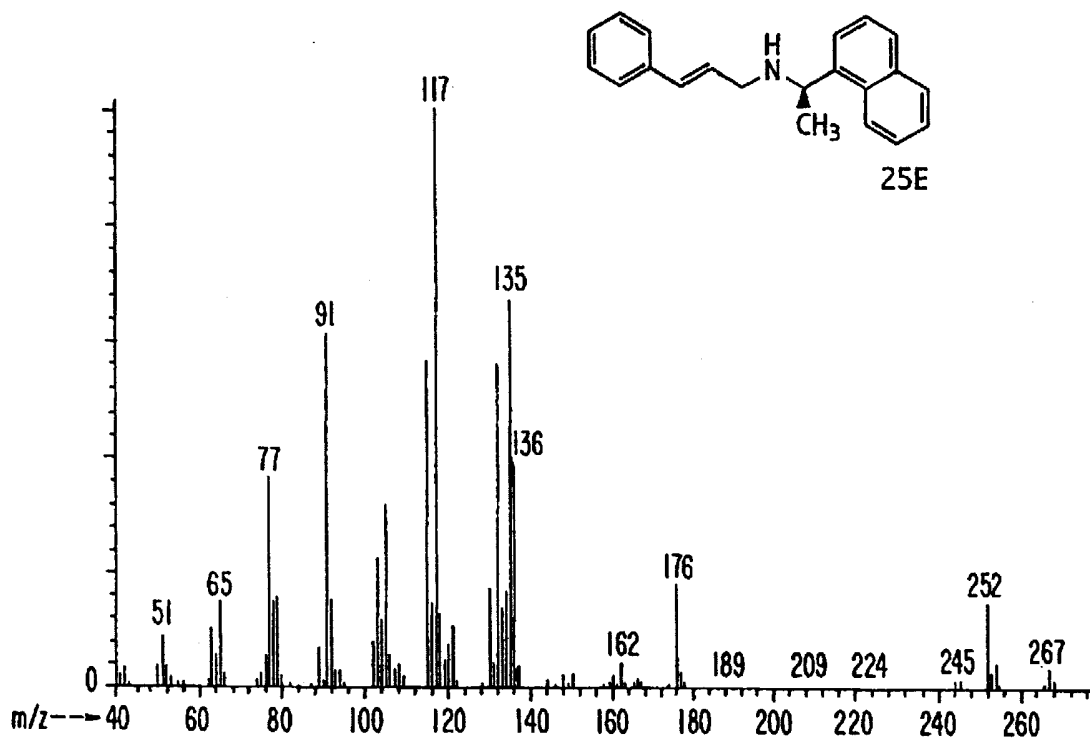
Obr. 88



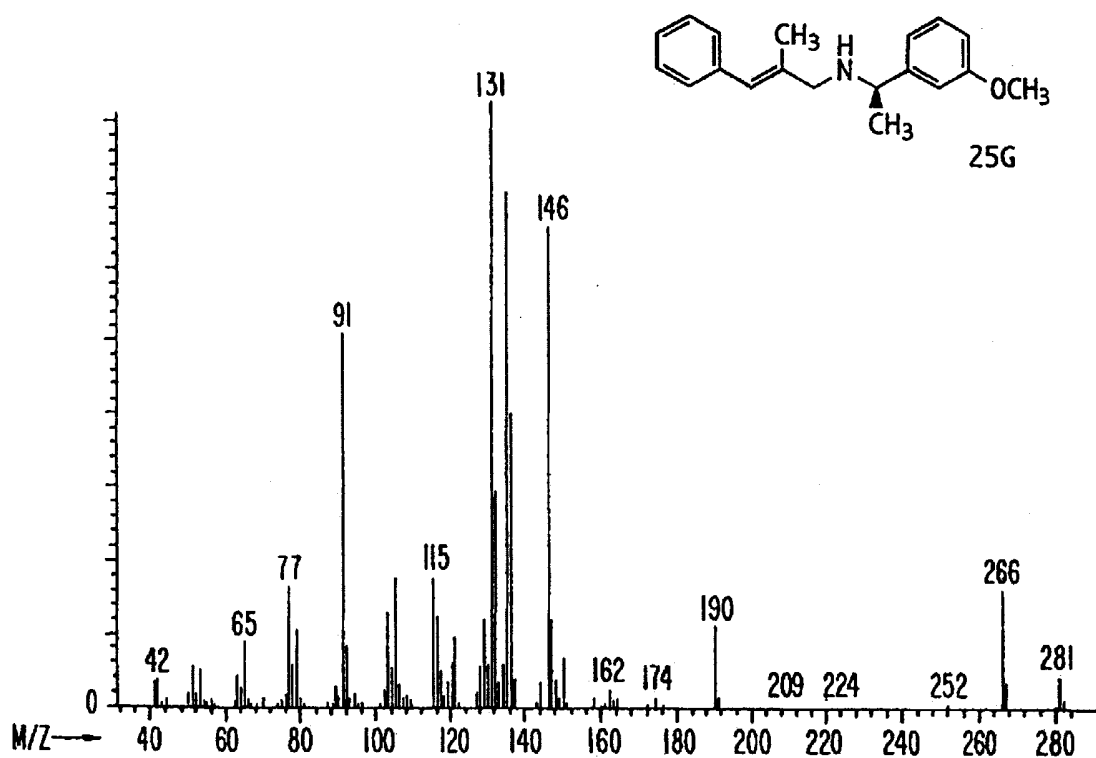
Obr. 89



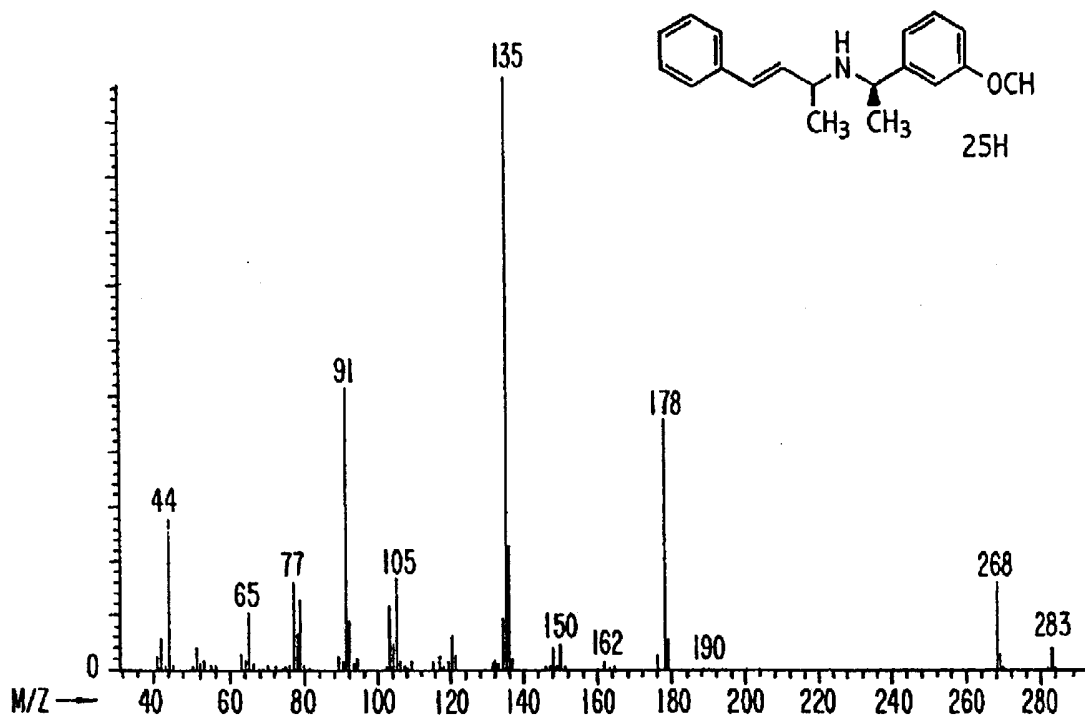
Obr. 90



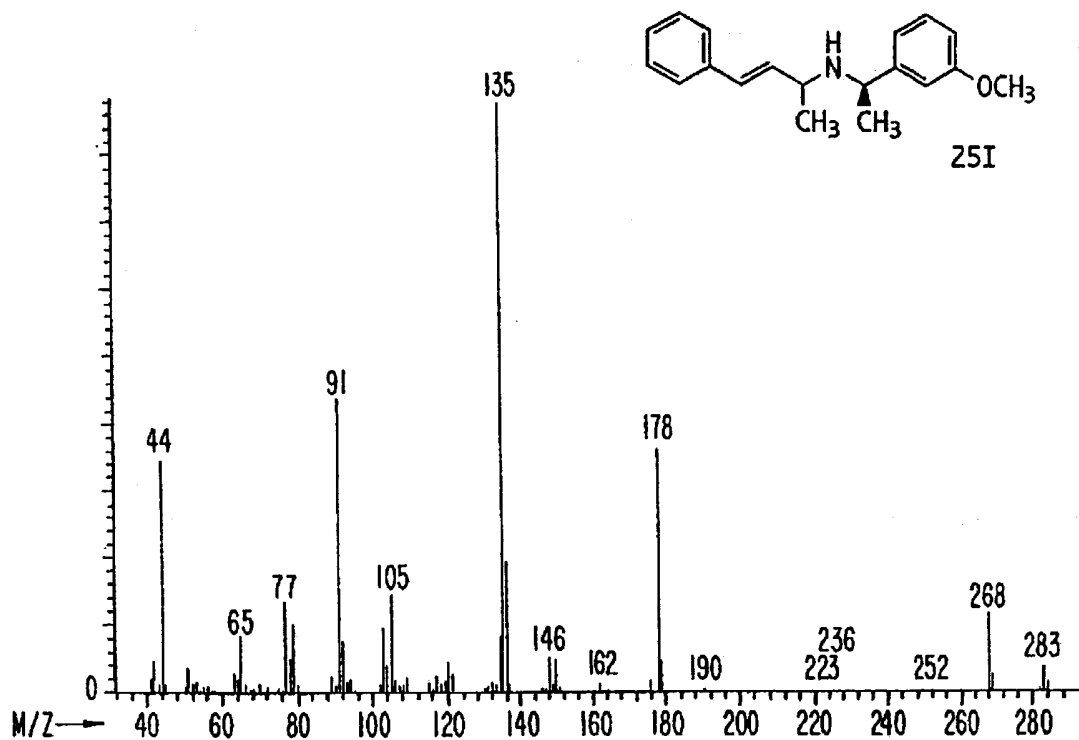
Obr. 91



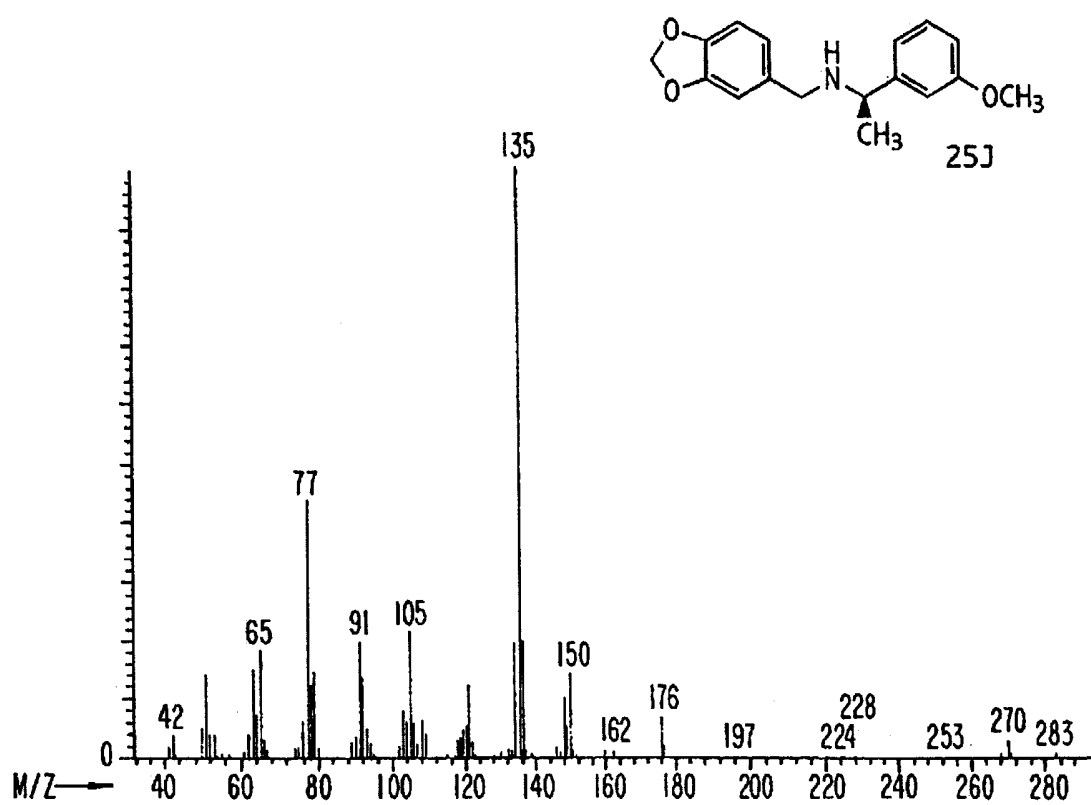
Obr. 92



Obr. 93

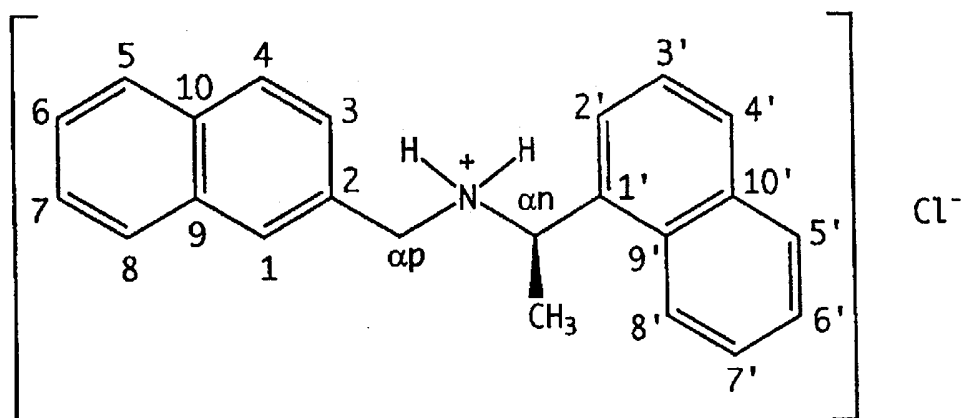


Obr. 94

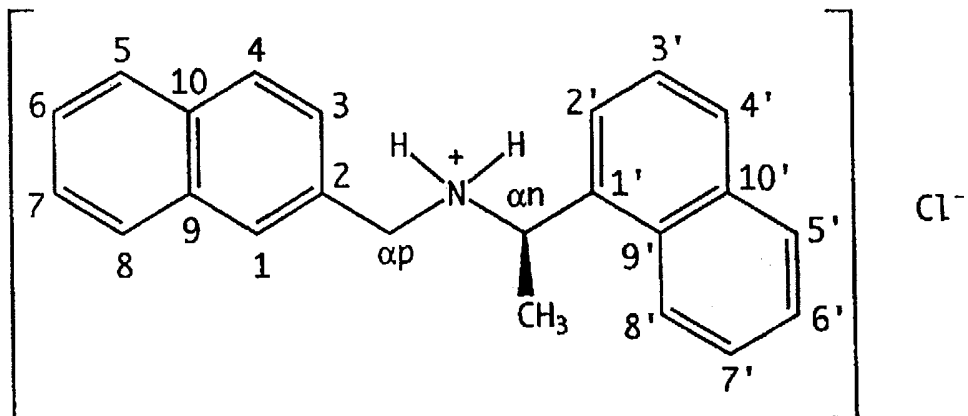


Obr. 95

Obr. 96

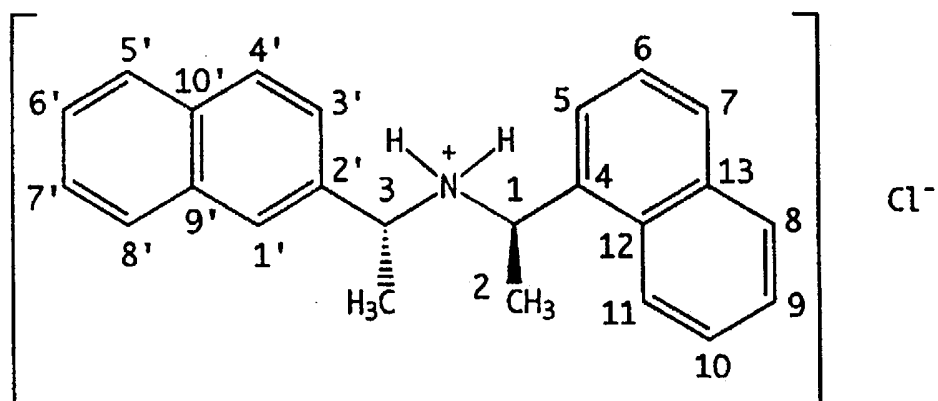


3H	1,85	d	J=6,8	alif -CH ₃
1H	4,05	d	J=13,2	-CH ₂ -
1H	4,16	d	J=13,4	-CH ₂ -
1H	5,06	q	J=7,0	alif -CH-
8H	7,21-7,47	m	n.a.	
1H	7,54	d	J=8,8	
2H	7,65-7,73	m	n.a.	
2H	7,89	d	J=7,8	
1H	8,43	d	J=7,2	
1H	10,47	bs	n.a.	alif -NH ₂ ⁺
1H	10,84	bs	n.a.	alif -NH ₂ ⁺



21,18	CH_3	alif $-CH_3$
48,5	CH_2	$-CH_2-$
51,46	CH	$-CH-$
121,42	CH	
125,21	CH	
125,99	CH	
126,04	CH	
126,15	CH	
126,63	CH	
126,69	CH	
126,91	Q	
127,37	CH	
127,45	CH	
127,93	CH	
128,52	CH	
129,04	CH	
129,24	CH	
130,32	Q	
130,83	CH	
132,23	Q	
132,59	Q	
133,15	Q	
133,66	Q	

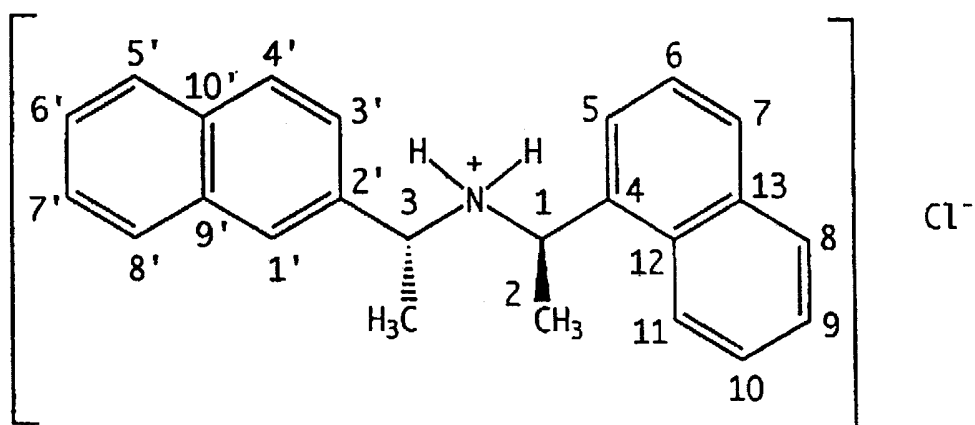
Obr. 97



3H	1,97	d	J=6,8	alif -CH ₃
3H	2,03	d	J=6,8	alif -CH ₃
1H	4,17	q	J=6,9	alif -CH-
1H	4,81	q	J=6,9	alif -CH-
2H	6,77-6,85	m	n.a.	
1H	7,14	bs	n.a.	
4H	7,33-7,52	m	n.a.	
6H	7,74-7,94	m	n.a.	
1H	8,69	bs	n.a.	
1H	10,82	bs	n.a.	alif -NH ₂ ⁺
1H	10,89	bs	n.a.	alif -NH ₂ ⁺

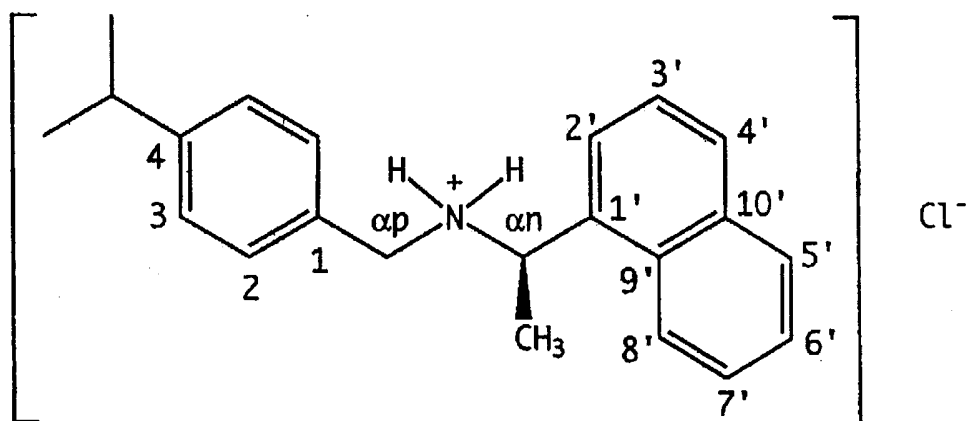
Obr. 98

Obr. 99



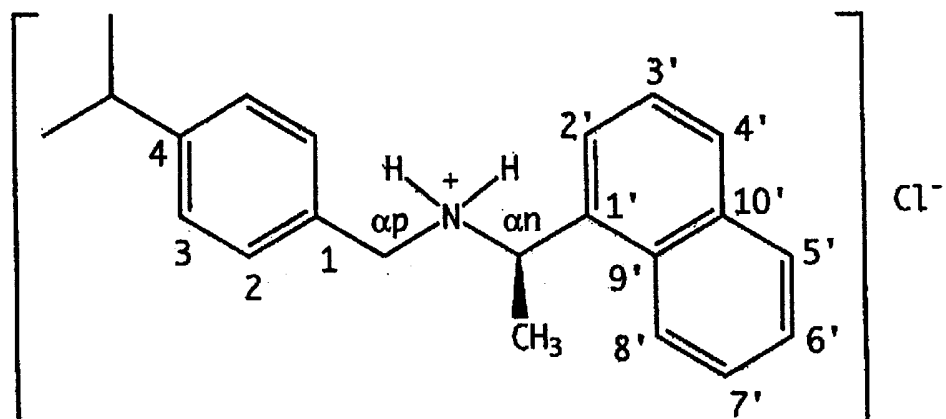
20,83	CH_3	alif $-\text{CH}_3$
21,87	CH_3	alif $-\text{CH}_3$
51,37	CH	$-\text{CH}_2-$
57,27	CH	$-\text{CH}-$

121,40	CH
124,65	CH
125,50	CH
125,82	CH
126,09	CH
126,22	CH
126,62	CH
127,49	CH
128,01	CH
128,76	CH
129,08	CH
129,25	CH
130,19	Q
132,74	Q
132,78	Q
132,95	Q
133,27	Q
133,53	Q



6H	1, 17	d	J=7, 1	-CH(CH ₃) ₂
3H	1, 86	d	J=6, 8	alif -CH ₃
1H	2, 84	p	J=7, 0	-CH(CH ₃) ₂
1H	3, 88	d	J=13, 3	-CH ₂ -
1H	3, 97	d	J=13, 3	-CH ₂ -
1H	5, 02	q	J=6, 8	alif -CH-
1H	7, 03	d	J=8, 1	3
1H	7, 17	d	J=8, 1	2
3H	7, 40-7, 54	m	n.a.	
1H	7, 68	dd	J ₁ =J ₂ =7, 9	3'
1H	7, 89	d	J=8, 3	4' 5'
1H	7, 91	d	J=8, 1	4' 5'
1H	8, 41	d	J=7, 1	2'
1H	10, 38	bs	n.a.	alif-NH ₂ +
1H	10, 77	bs	n.a.	alif-NH ₂ +

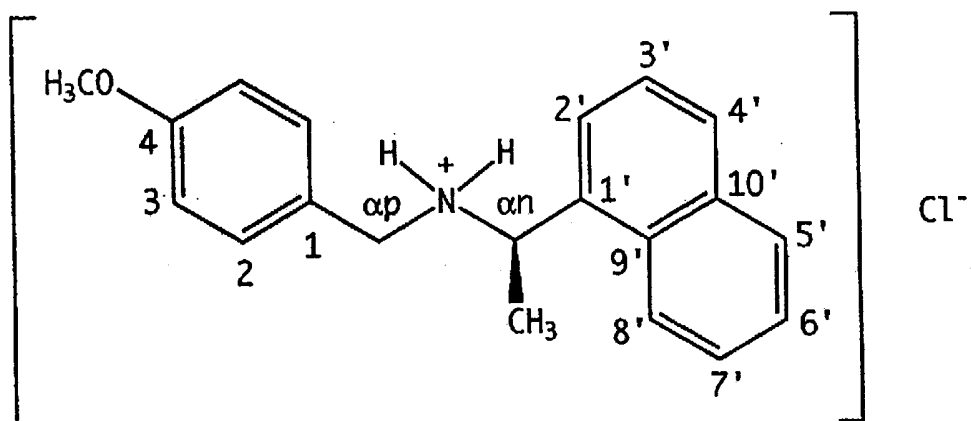
Obr. 100



21, 33	CH ₃	alif -CH ₃
23, 58	CH ₃	-CH(CH ₃) ₂
33, 66	CH	arom-CH
48, 27	CH ₂	-CH ₂ -
51, 52	CH	alif-CH-

121, 57	CH
---	---
---	---
125, 17	CH
125, 94	CH
126, 05	CH
126, 65	CH
127, 05	Q
129, 10	CH
130, 02	CH
130, 39	Q
130, 90	CH
132, 43	Q
133, 71	Q
149, 84	Q

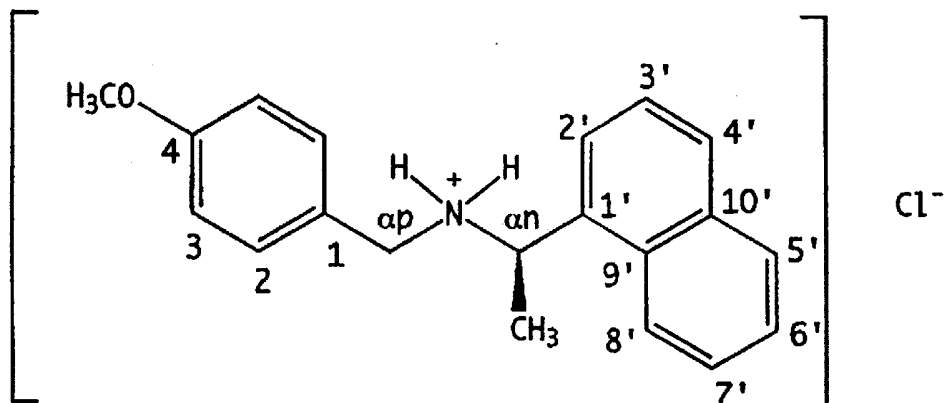
Obr. 101



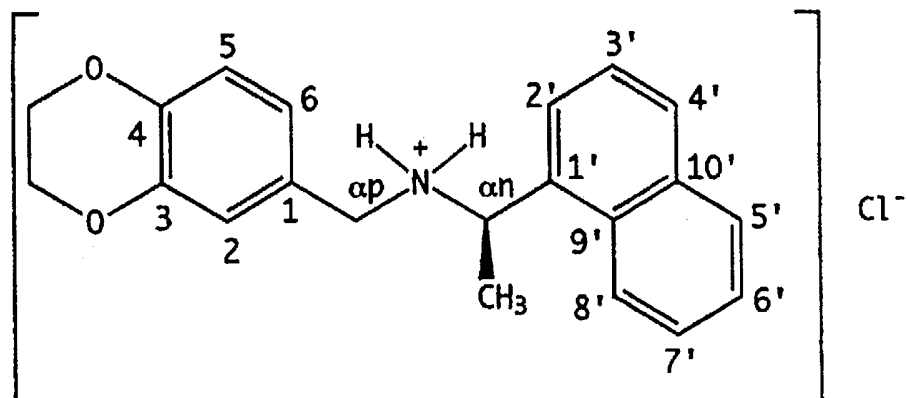
3H	1,92	d	J=6,6	alif -CH ₃
3H	3,64	s	n.a.	-OCH ₃
1H	3,85	d	J=13,4	-CH ₂ -
1H	3,93	d	J=13,5	-CH ₂ -
1H	5,04	q	J=6,9	alif -CH-
2H	6,72 (6,71 vvp)	d	J=8,3	3
2H	7,21 (7,10 vvp)	d	J=8,0	2
2H	7,47-7,55	m	n.a.	
1H	7,60	d	J=8,3	
1H	7,69	dd	J=7,9/7,5	3'
1H	7,90	d	J=7,9	4' 5'
1H	7,92	d	J=7,7	4' 5'
1H	8,42	d	J=7,3	2'
1H	10,35	bs	n.a.	alif -NH ₂ +
1H	10,73	bs	n.a.	alif -NH ₂ +

Obr. 102

Obr. 103

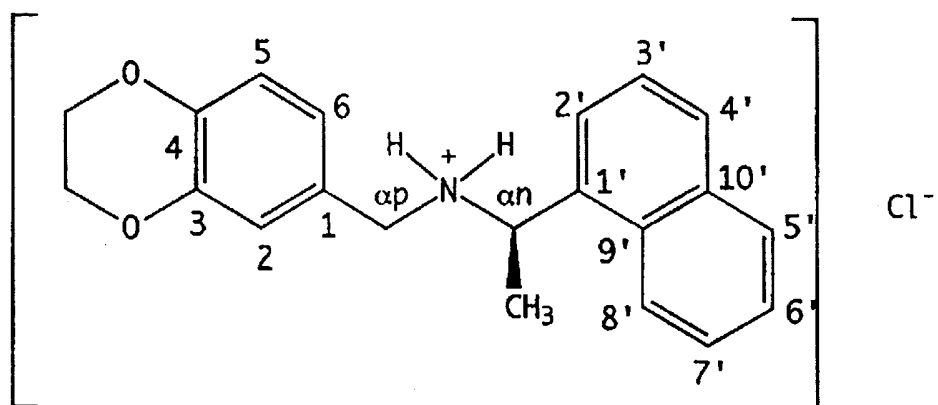


21, 16	CH ₃	alif -CH ₃
47, 86	CH ₂	-CH ₂ -
51, 28	CH	-CH-
54, 94	CH ₃	O-CH ₃
113, 82	CH	3'
121, 47	CH	
121, 58	Q	arom-C-CH ₂ NH ₂
---	---	
125, 03	CH	
125, 91	CH	
125, 94	CH	
126, 68	CH	
129, 06	CH	
---	---	
130, 25	Q	
---	---	
---	---	
132, 27	CH	2'
133, 63	Q	NH ₂ -CH ₂ -C-naftyl
159, 95	Q	arom-C-OCH ₃



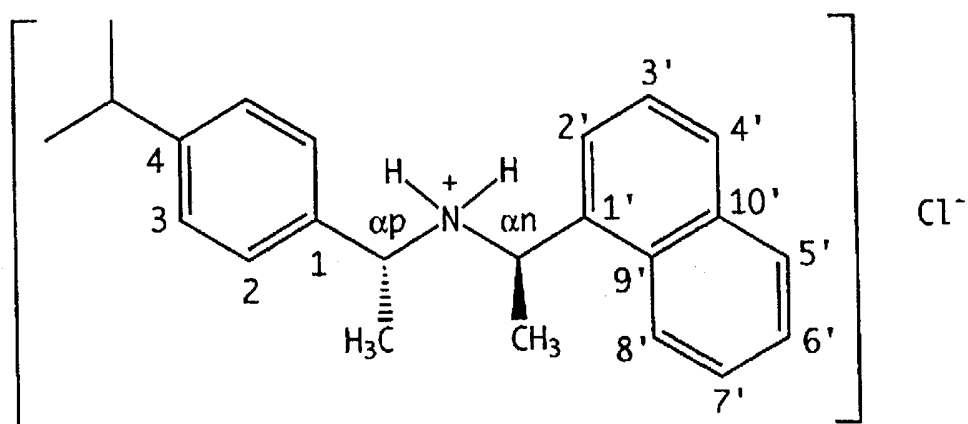
3H	1, 91	d	J=6, 7	alif -CH ₃
1H	3, 75	d	J=13, 3	-CH ₂ -
1H	3, 91	d	J=13, 3	-CH ₂ -
4H	4, 10	m	n.a.	-O-CH ₂ CH ₂ -O-
1H	5, 03	q	J=7, 0	alif -CH-
3H	6, 70-6, 80	m	n.a.	
4H	7, 47-7, 56	m	n.a.	
1H	7, 66	dd	J ₁ =J ₂ =8, 1	3'
1H	7, 90	d	J=7, 4	4' 5'
1H	7, 91	d	J=7, 4	4' 5'
1H	8, 28	d	J=7, 2	2'
1H	10, 34	bs	n.a.	alif -NH ₂ +
1H	10, 83	bs	n.a.	alif -NH ₂ +

Obr. 104



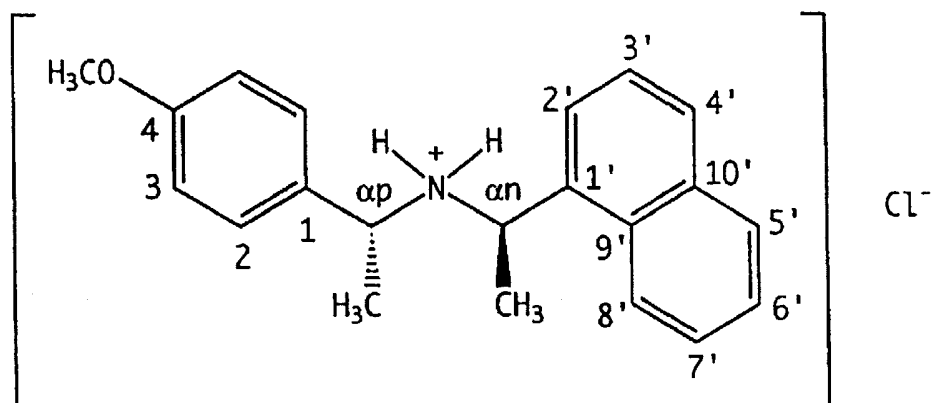
20, 87	CH ₃	alif -CH ₃
47, 87	CH ₂	-CH ₂ -
51, 16	CH	-CH-
63, 86	CH ₂	-O-CH ₂ -CH ₂ -O-
64, 09	CH ₂	-O-CH ₂ -CH ₂ -O-
117, 40	CH	
119, 66	CH	
121, 45	CH	
122, 61	Q	
123, 67	CH	
124, 83	CH	
125, 85	CH	
125, 96	CH	
126, 76	CH	
129, 09	CH	
129, 22	CH	
130, 31	Q	
132, 17	Q	
133, 67	Q	
143, 28	Q	-O-C-arom
144, 17	Q	-O-C-arom

Obr. 105



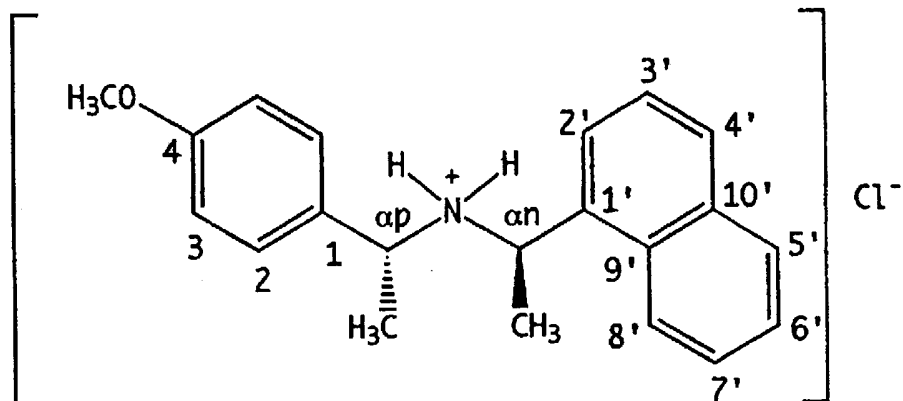
3H	1,236	d	J=7,0	-CH(CH ₃) ₂
3H	1,242	d	J=6,9	-CH(CH ₃) ₂
3H	1,84	d	J=6,8	alif -CH ₃
3H	1,86	d	J=6,8	alif -CH ₃
1H	2,88	p	J=6,8	-CH(CH ₃) ₂
1H	3,97	bq	J=6,7	alif -CH-
1H	4,77	bq	J=6,9	alif -CH-
1H	6,95	d	J=8,2	H-3'
1H	7,05	d	J=8,3	H-2'
1H	7,26	dd	J ₁ =J ₂ =7,1	
1H	7,48	dd	J ₁ =J ₂ =7,7	
1H	7,68	dd	J ₁ =J ₂ =7,7	
1H	7,90	d	J=7,7	
1H	7,91	d	J=7,9	
1H	8,24	bd	J=6,5	
2H	10,71	bs	n.a.	alif -NH ₂ ⁺

Obr. 106



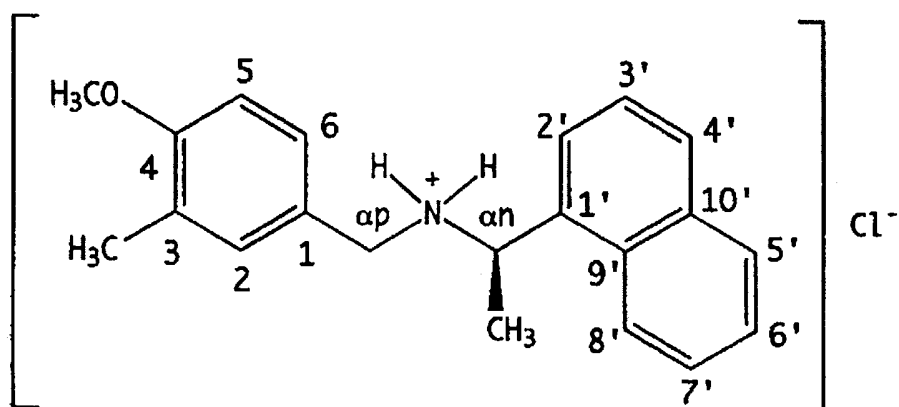
3H	1,93	d	J=6,8	alif -CH ₃
3H	1,94	d	J=6,7	alif -CH ₃
3H	3,80	s	n.a.	-OCH ₃
1H	4,01	q	J=7,0	alif -CH-
1H	4,82	q	J=6,9	alif -CH-
2H	6,73	d	J=8,8	3
2H	7,07	d	J=8,6	2
1H	7,15	bd	J=7,3	8'
1H	7,33	dd	J ₁ =J ₂ =7,7	7'
1H	7,49	dd	J ₁ =J ₂ =7,6	6'
1H	7,70	dd	J ₁ =J ₂ =7,8	3'
1H	7,90	d	J=8,1	4' 5'
1H	7,91	d	J=8,0	4' 5'
1H	8,44	bd	J=5,4	2'
2H	10,65	bs	n.a.	alif -NH ₂ ⁺

Obr. 107



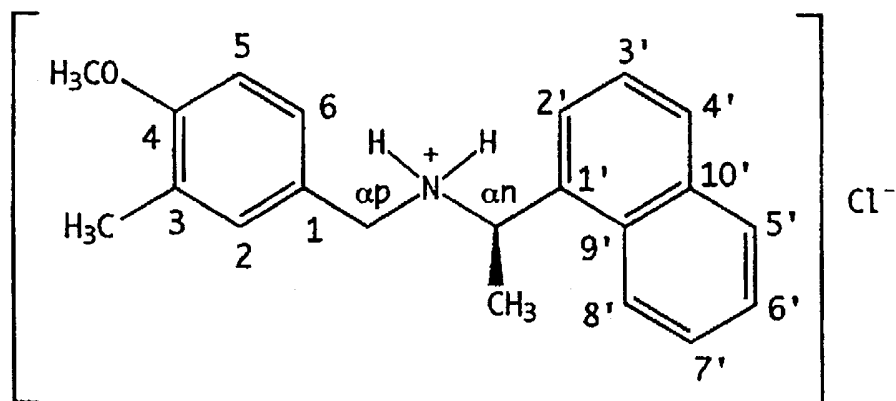
21, 11	CH ₃	alif -CH ₃
21, 93	CH ₃	alif -CH ₃
51, 29	CH	-CH-
55, 30	CH ₃	O-CH ₃
56, 61	CH	-CH-
114, 30	CH	3'
121, 77	CH	
---	---	
125, 38	CH	
125, 91	CH	
126, 17	CH	
126, 40	CH	
127, 88	Q	
128, 96	CH	
128, 99	CH	
128, 79	CH	
130, 22	Q	
---	---	
132, 88	Q	
133, 70	Q	
159, 97	Q	arom-C-OCH ₃

Obr. 108



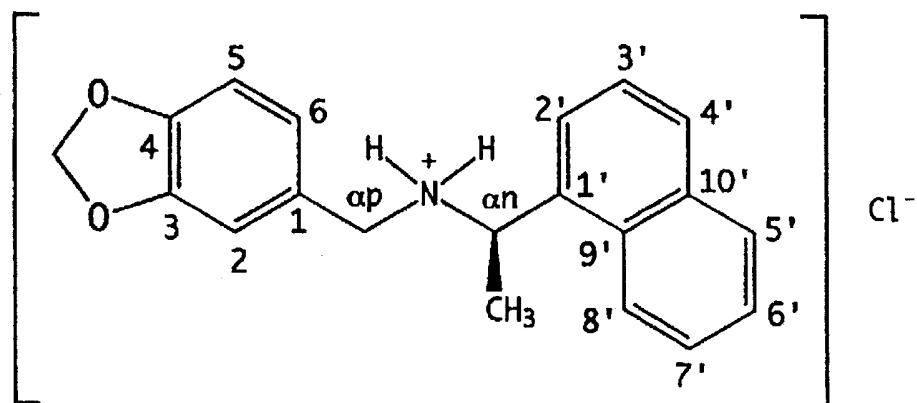
3H	1,85	d	J=6,7	alif -CH ₃
3H	2,01	s	n.a.	arom-CH ₃
3H	3,77	s	n.a.	-OCH ₃
1H	3,80	d	J=13,1	-CH ₂ -
1H	3,97	d	J=13,2	-CH ₂ -
1H	5,00	q	J=6,7	alif-CH-
1H	6,69 (6,59 vyp.)	d	J=8,4	5
1H	6,78 (6,90 vyp.)	bs	n.a.	2'
1H	7,22 (6,88 vyp.)	bd	J=8,2	6'
3H	7,44-7,57	m	n.a.	
1H	7,70	dd	J=7,6/7,8	3'
1H	7,91	d	J=8,1	4' 5'
1H	7,92	d	J=8,1	4' 5'
1H	8,44	d	J=7,1	2'
1H	10,35	bs	n.a.	alif -NH ₂ +
1H	10,70	bs	n.a.	alif -NH ₂ +

Obr. 109



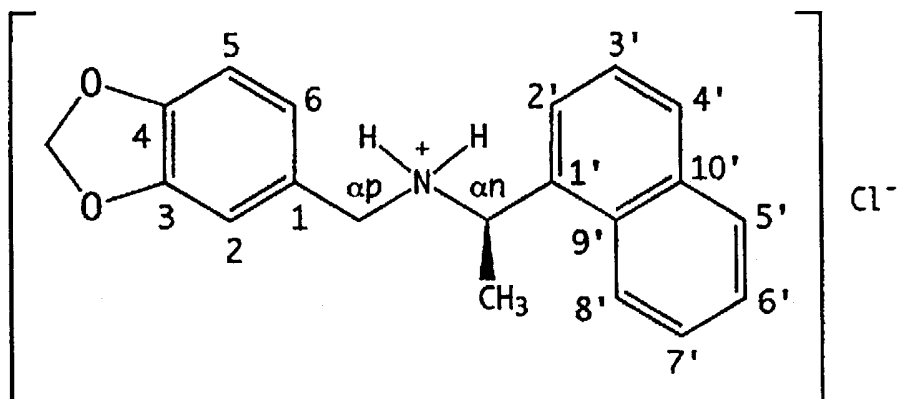
15,74	CH ₃	arom-CH ₃
22,32	CH ₃	alif -CH ₃
47,85	CH ₂	-CH ₂ -
51,01	CH	-CH-
55,09	CH ₃	O-CH ₃
109,81	CH	5'
121,56	CH	
121,01	Q	arom-C-CH ₂ NH ₂
---	---	
125,13	CH	
125,90	CH	
126,03	CH	
126,61	CH	
129,05	CH	
129,72	CH	
130,31	Q	
---	---	
132,44	Q	
133,23	CH	6'
133,68	Q	NH ₂ -CH ₂ -C-naftyl
158,16	Q	arom-C-OCH ₃

Obr. 110



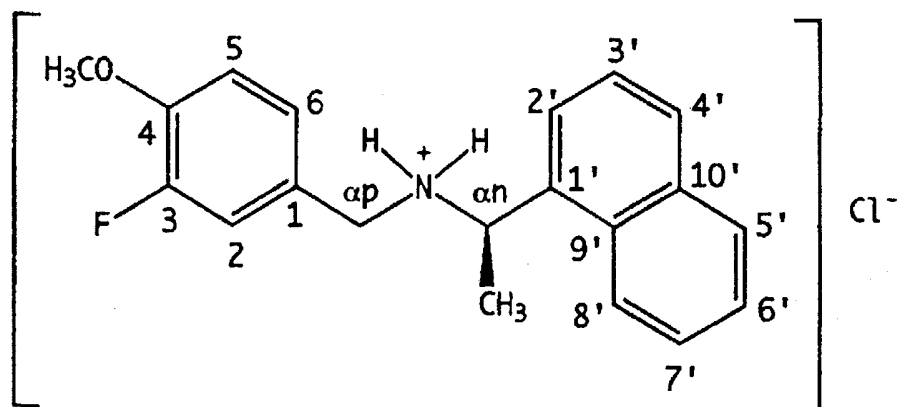
3H	1, 88	d	J=6, 8	alif -CH ₃
1H	3, 85	d	J=13, 4	-CH ₂ -
1H	3, 94	d	J=13, 4	-CH ₂ -
1H	5, 06	q	J=6, 7	alif -CH-
2H	5, 90	dd	J ₁ =2, 2; J ₂ =1, 4	-O-CH ₂ -O-
2H	6, 65	s	n.a.	
1H	6, 85	s	n.a.	
2H	7, 50-7, 58	m	n.a.	
2H	7, 63-7, 70	m	n.a.	
1H	7, 92	d	J=8, 1	4' 5'
1H	7, 94	d	J=9, 5	4' 5'
1H	8, 12	d	J=6, 7	2'
1H	10, 37	bs	n.a.	alif -NH ₂ +
1H	10, 80	bs	n.a.	alif -NH ₂ +

Obr. 111



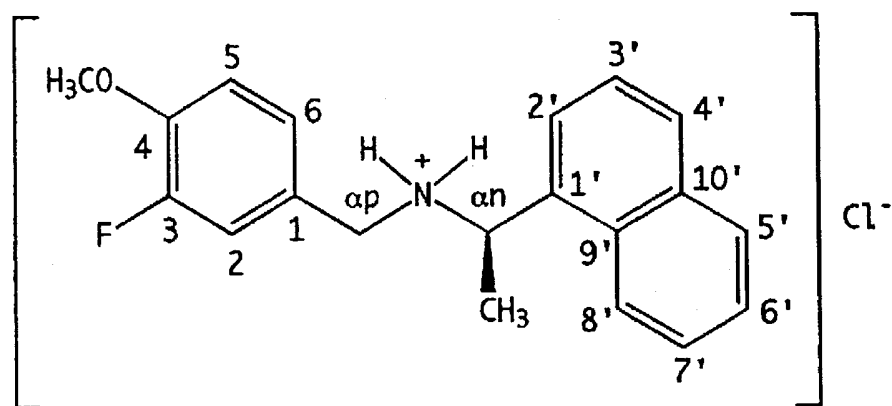
21, 20	CH ₃	alif -CH ₃
48, 39	CH ₂	-CH ₂ -
51, 26	CH	-CH-
101, 16	CH ₂	-O-CH ₂ -O-
108, 19	CH	
110, 11	CH	
121, 25	CH	
123, 18	Q	
124, 13	CH	
124, 21	CH	
125, 49	CH	
126, 05	CH	
126, 89	CH	
129, 03	CH	
129, 88	CH	
130, 22	Q	
131, 93	Q	
133, 63	Q	
147, 77	Q	-O-C-arom
148, 26	Q	-O-C-arom

Obr. 112



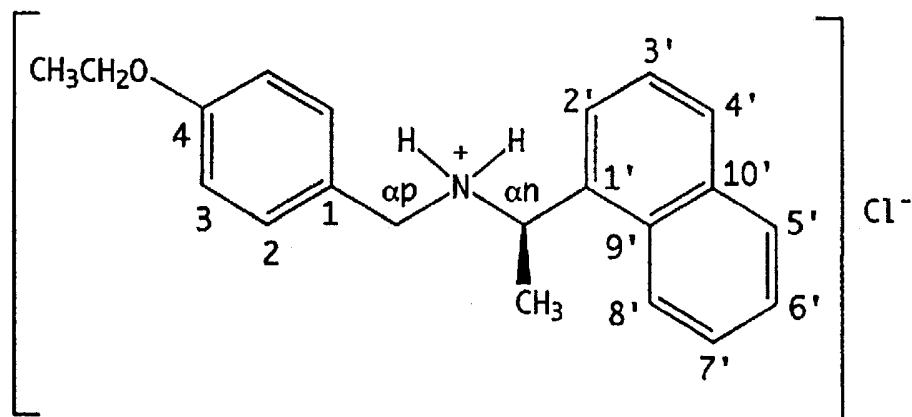
3H	1,89	d	J=6,6	alif -CH ₃
3H	3,80	s	n.a.	-OCH ₃
1H	3,85	d	J=13,7	-CH ₂ -
1H	3,95	d	J=13,3	-CH ₂ -
1H	5,09	q	J=6,6	alif -CH-
1H	6,84	t	J=8,2	
2H	7,01-7,08	m	n.a.	
2H	7,53-7,56	m	n.a.	
2H	7,64-7,72	m	n.a.	
2H	7,93	d	J=7,6	4' 5'
1H	8,19	d	J=7,1	2'
1H	10,41	bs	n.a.	alif -NH ₂ +
1H	10,82	bs	n.a.	alif-NH ₂ +

Obr. 113



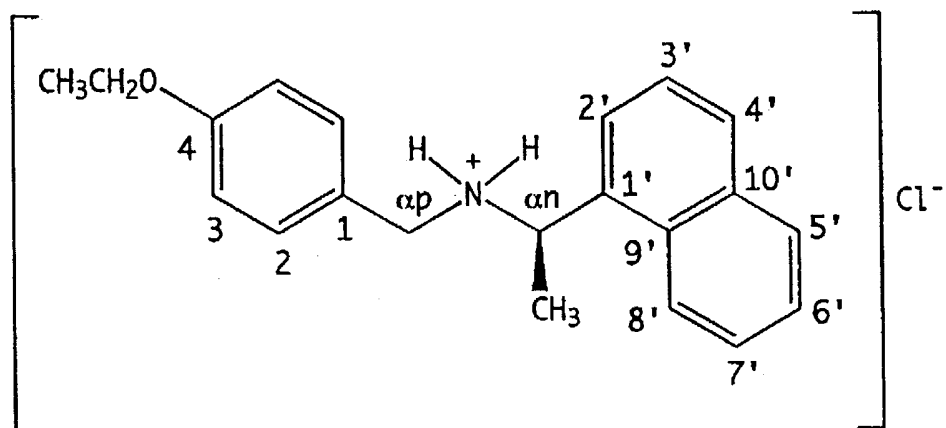
20, 71	CH_3	alif $-\text{CH}_3$
47, 67	CH_2	$-\text{CH}_2-$
51, 47	CH	$-\text{CH}-$
55, 91	CH_3	$\text{O}-\text{CH}_3$
113, 12	CH	
113, 13	CH	
117, 99	CH	
118, 24	CH	
121, 30	CH	
122, 22	Q	
122, 31	Q	
124, 61	CH	
125, 76	CH	
126, 16	CH	
126, 92	CH	
127, 00	CH	
129, 17	CH	
129, 47	CH	
130, 29	Q	
131, 92	Q	
133, 73	Q	
148, 21	Q	
148, 35	Q	
150, 01	Q	
153, 29	Q	

Obr. 114



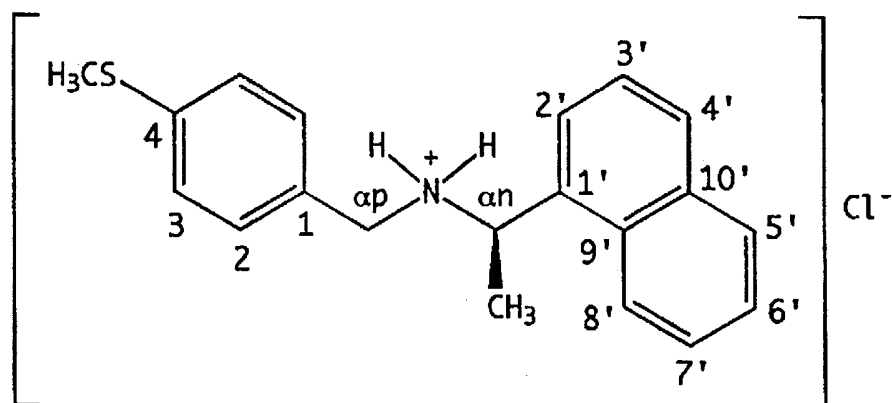
3H	1,35	t	J=6,9	-OCH ₂ CH ₃
3H	1,86	d	J=6,8	alif -CH ₃
4H	3,81-3,96	m		-CH ₂ A CH ₂
1H	5,00	q	J=6,7	alif -CH-
1H	6,70	d	J=8,4	3
1H	7,19	d	J=8,6	2
2H	7,44-7,54	m	n.a.	
1H	7,58	d	J=8,3	
1H	7,68	dd	J ₁ =J ₂ =7,7	3'
1H	7,89	d	J=7,7	4' 5'
1H	7,91	d	J=7,7	4' 5'
1H	8,42	d	J=7,0	2'
1H	10,30	bs	n.a.	alif -NH ₂ +
1H	10,72	bs	n.a.	alif -NH ₂ +

Obr. 115



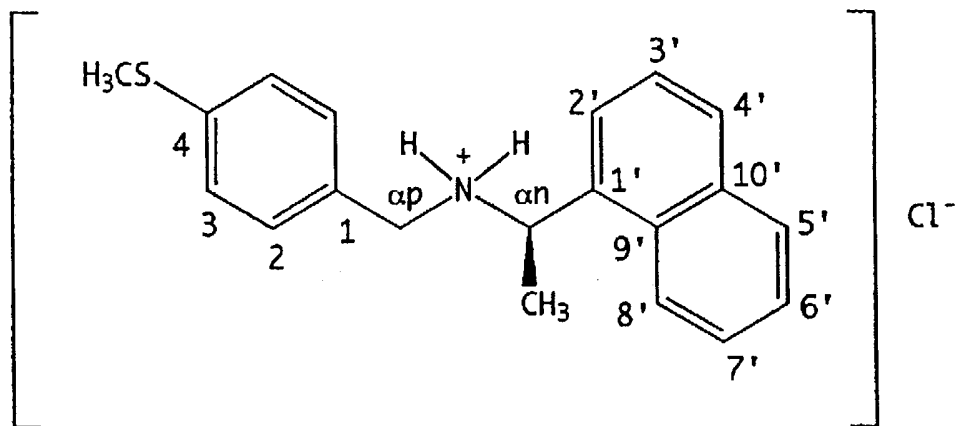
14, 51	CH ₃	CH ₃ -CH ₂ -O-
21, 20	CH ₃	alif -CH ₃
47, 91	CH ₂	-CH ₂ -
51, 27	CH	-CH-
63, 16	CH ₂	CH ₃ -CH ₂ -O-
114, 36	CH	3'
121, 43	Q	arom-C-CH ₂ NH ₂
121, 52	CH	
---	---	
125, 07	CH	
125, 93	CH	
125, 99	CH	
126, 70	CH	
129, 08	CH	
---	---	
130, 29	Q	
---	---	
132, 25	CH	2'
132, 33	Q	
133, 67	Q	NH ₂ -CH ₂ -C-naftyl
159, 38	Q	arom-C-OCH ₃

Obr. 116



3H	1,87	d	J=6,8	alif -CH ₃
3H	2,38	s	n.a.	-SCH ₃
1H	3,82	d	J=13,4	-CH ₂ -
1H	3,91	d	J=13,2	-CH ₂ -
1H	5,04	q	J=6,6	alif -CH-
1H	7,03	d	J=8,2	H-3'
1H	7,20	d	J=8,2	H-2'
2H	7,45-7,55	m	n.a.	
1H	7,59	d	J=7,9	
1H	7,68	dd	J ₁ =J ₂ =7,4	3'
1H	7,90	d	J=8,1	4' 5'
1H	7,91	d	J=7,0	4' 5'
1H	8,39	d	J=7,3	2'
1H	10,38	bs	n.a.	alif -NH ₂ ⁺
1H	10,78	bs	n.a.	alif -NH ₂ ⁺

Obr. 117



14, 95
21, 18
48, 02
51, 57

CH₃
CH₃
CH₂
CH

S-CH₃
alif -CH₃
-CH₂-
-CH-

121, 44
121, 10

125, 81
125, 95
125, 99
126, 77
129, 12
129, 20
130, 30

CH
CH

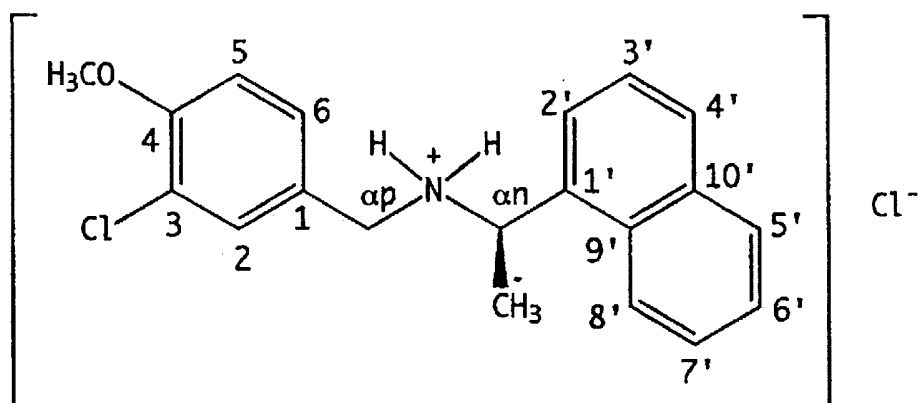
CH
Q
CH
CH
CH
CH
Q

131, 29
132, 16
133, 67
140, 18

CH
CH
Q
Q

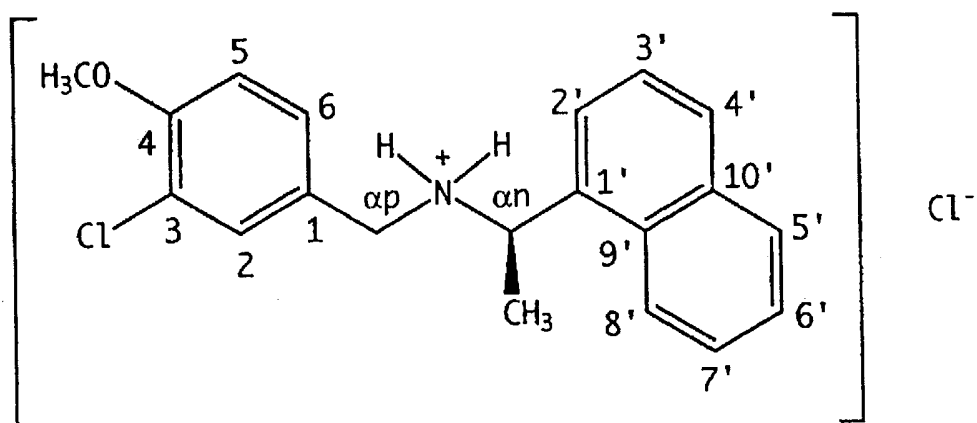
2'
NH₂-CH₂-C- naftyl
arom-C-SCH₃

Obr. 118



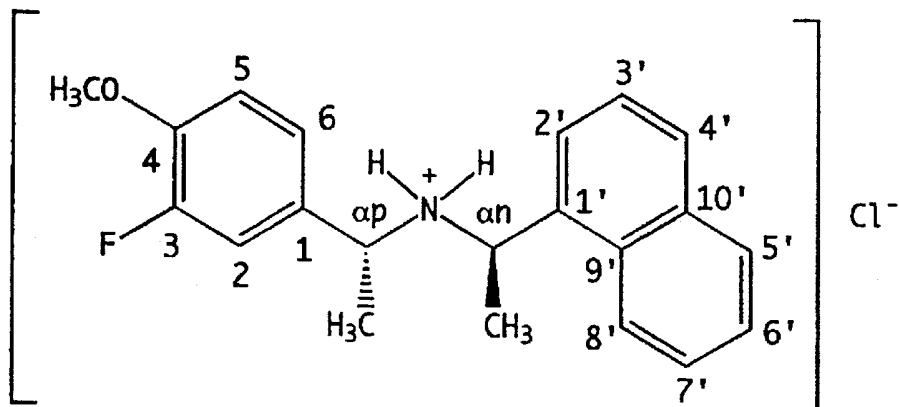
3H	1,88	d	J=6,6	alif -CH ₃
3H	3,85	s	n.a.	-OCH ₃
1H	3,82	d	J=13,1	-CH ₂ -
1H	3,95	d	J=13,2	-CH ₂ -
1H	5,03	q	J=7,0	alif -CH-
1H	6,79 (6,69 vvp.)	d	J=8,5	5
1H	7,10 (7,13 vvp.)	s	n.a.	2
1H	7,33 (7,01 vvp.)	d	J=8,3	6
2H	7,48-7,57	m	n.a.	
1H	7,62	d	J=7,7	
1H	7,69	dd	J=7,4/8,1	3'
1H	7,92	d	J=7,7	4' 5'
1H	7,94	d	J=7,7	4' 5'
1H	8,38	d	J=7,5	2'
1H	10,42	bs	n.a.	alif -NH ₂ ⁺
1H	10,79	bs	n.a.	alif -NH ₂ ⁺

Obr. 119



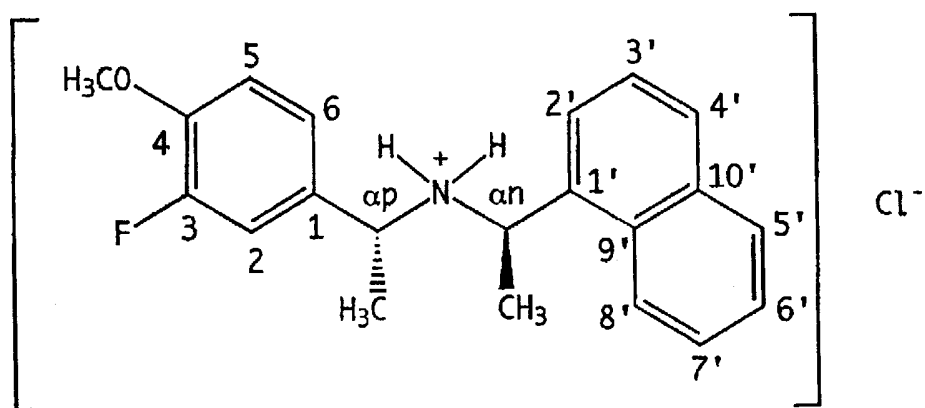
21, 32	CH ₃	alif -CH ₃
47, 45	CH ₂	-CH ₂ -
51, 47	CH	-CH-
55, 96	CH ₃	O-CH ₃
111, 88	CH	5'
121, 33	CH	
122, 27	Q	arom- <u>C</u> -CH ₂ NH ₂
122, 65	Q	arom- <u>C</u> -Cl
125, 14	CH	
126, 01	CH	
126, 14	CH	
127, 05	CH	
129, 21	CH	
129, 35	CH	
130, 30	Q	
130, 69	CH	
132, 09	Q	
132, 71	CH	6'
133, 76	Q	NH ₂ -CH ₂ - <u>C</u> -naftyl
155, 52	Q	arom- <u>C</u> -OCH ₃

Obr. 120



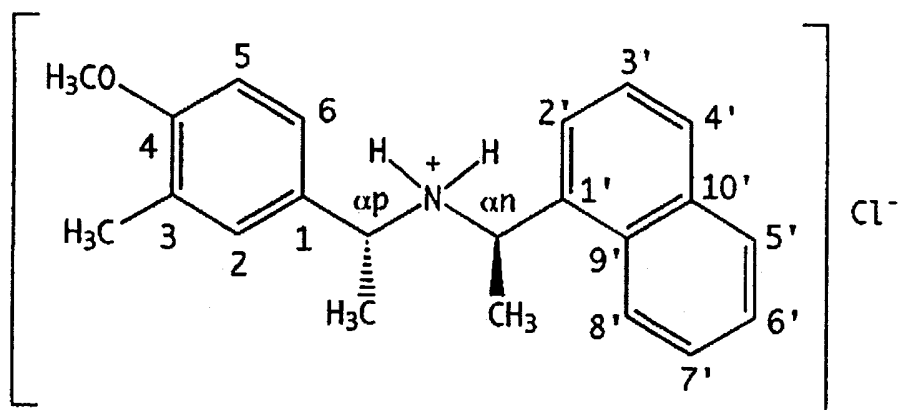
3H	1,86	d	J=7,0	alif -CH ₃
3H	1,99	d	J=6,8	alif -CH ₃
3H	3,87	s	n.d.	-OCH ₃
1H	3,91	q	J=7,0	alif -CH-
1H	4,80	q	J=6,7	alif -CH-
1H	6,79	dd	J ₁ =J ₂ =8,5	
1H	6,89	dd	J ₁ =12,0 J ₂ =2,0	
1H	6,96	d	J=8,7	
1H	7,16	bd	J=7,14	8'
1H	7,34	dd	J ₁ =J ₂ =8,3	7'
1H	7,49	dd	J ₁ =J ₂ =7,2	6'
1H	7,71	dd	J ₁ =J ₂ =8,1	3'
1H	7,90	d	J=8,1	4' 5'
1H	7,91	d	J=7,8	4' 5'
1H	8,53	bs	n.d.	2'
1H	10,64	bs	n.d.	alif -NH ₂ ⁺

Obr. 121



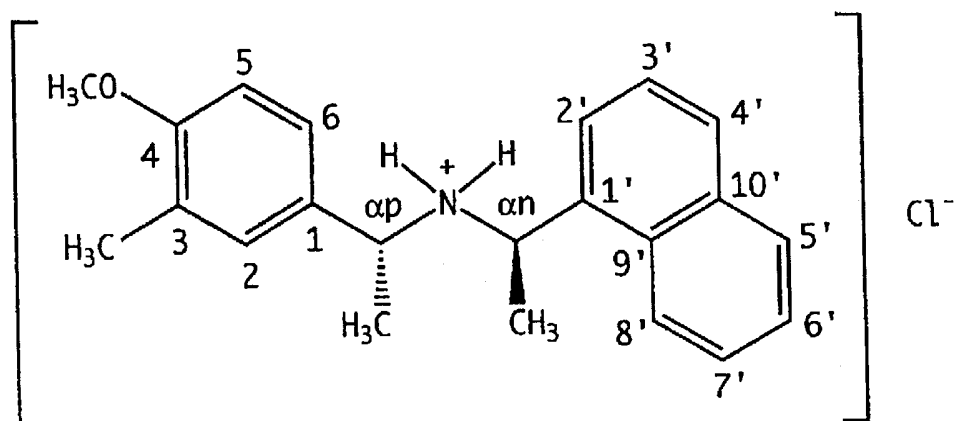
20, 89	CH ₃	alif -CH ₃
21, 78	CH ₃	arom-CH ₃
51, 26	CH	-CH-
56, 12	CH ₃	O-CH ₃
56, 19	CH	-CH-
113, 44	CH	
116, 27	CH	
116, 52	CH	
121, 31	CH	
124, 39	CH	
124, 43	CH	
125, 24	CH	
125, 97	CH	
126, 03	CH	
126, 45	CH	
128, 35	Q	
128, 43	Q	
128, 98	CH	
129, 10	CH	
130, 05	Q	
132, 45	Q	
133, 61	Q	
147, 96	Q	
148, 10	Q	
150, 26	Q	
153, 55	Q	

Obr. 122



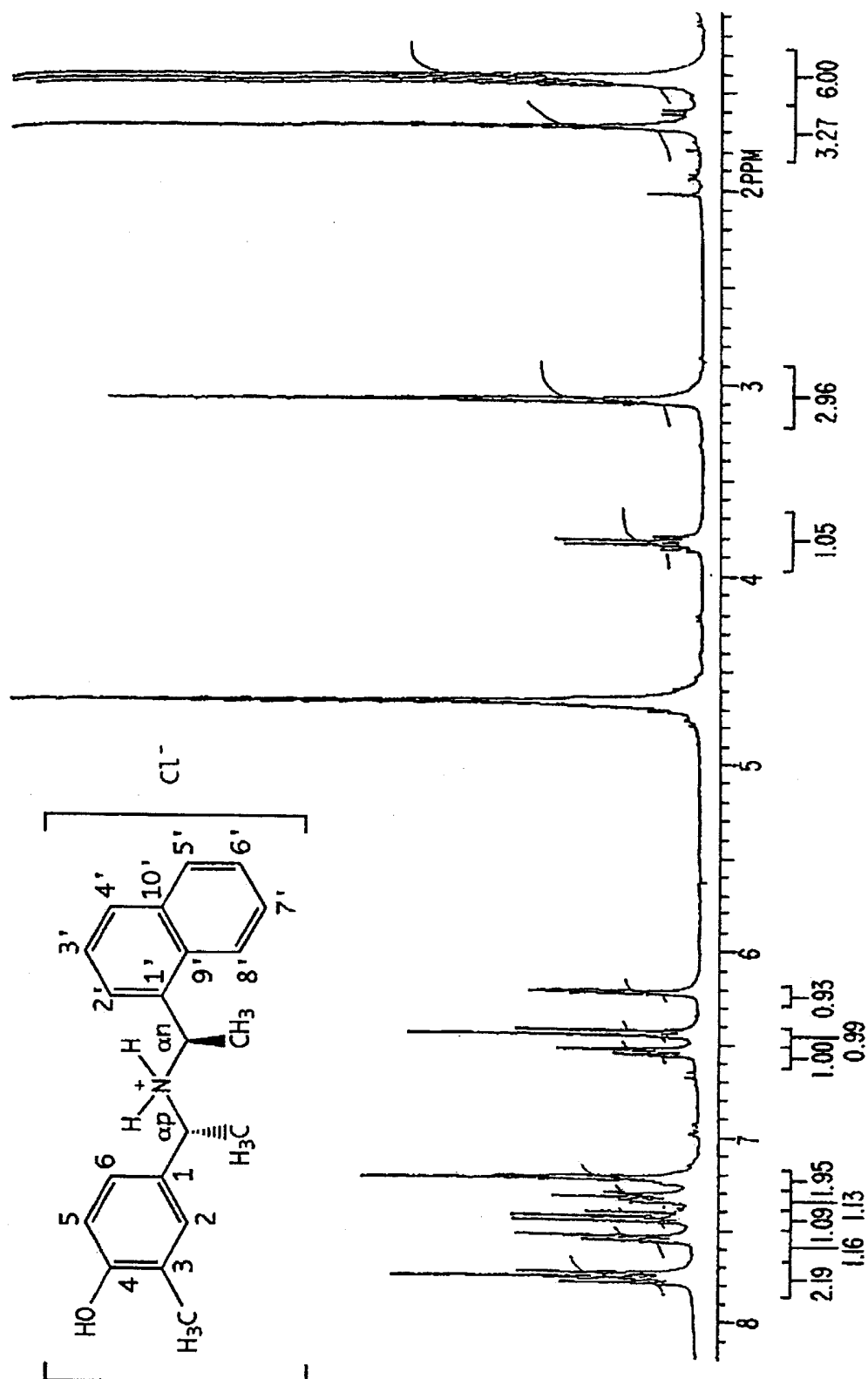
3H	1,82	d	J=6,7	fenyl -CH ₃
3H	1,83	d	J=6,7	naftyl -CH ₃
3H	1,93	s	n.a.	arom-CH ₃
3H	3,83	s	n.a.	-OCH ₃
1H	3,90	q	J=6,9	fenyl -CH-
1H	4,74	q	J=7,0	naftyl -CH-
1H	6,52	d	J=1,6	2
1H	6,70	d	J=8,5	5
1H	7,03	dd	J ₁ =8,4, J ₂ =2,2	6
1H	7,17	bd	J=9,2	8'
1H	7,34	dd	J ₁ =J ₂ =8,4	7'
1H	7,51	dd	J ₁ =J ₂ =8,2	6'
1H	7,68	dd	J ₁ =J ₂ =7,9	3'
1H	7,91	d	J=8,0	4' 5'
1H	7,92	d	J=7,8	4' 5'
1H	8,21	bd	J=6,6	2'
1H	8,65	bs	n.a.	alif -NH ₂ ⁺
1H	10,58	bs	n.a.	alif -NH ₂ ⁺

Obr. 123

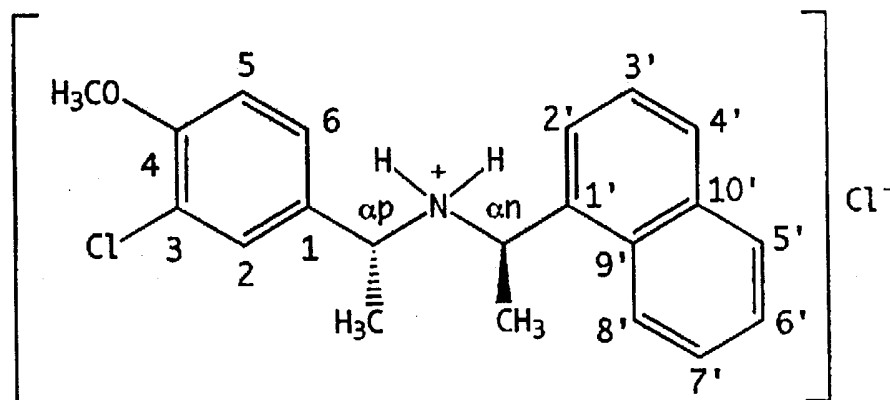


15,7	CH ₃	arom-CH ₃
20,5	CH ₃	fenyl-CH ₃
21,6	CH ₃	naftyl -CH ₃
51,0	CH	naftyl -CH-
55,2	CH ₃	O-CH ₃
56,3	CH	fenyl -CH-
110,2	CH	5
121,5	CH	8' 6'
124,8	CH	2'
125,8	CH	3' 6'
125,8	CH	3' 6'
126,3	CH	7'
126,5	CH	8' 6'
126,6	Q	
127,0	Q	
128,8	CH	4' 5'
129,0	CH	4' 5'
130,1	Q	
130,9	CH	2
132,6	Q	
133,6	Q	
158,1	Q	

Obr. 124

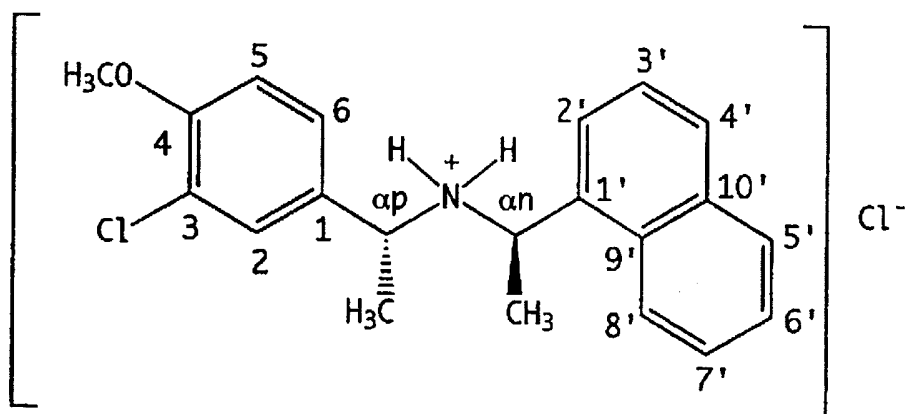


Obr. 125



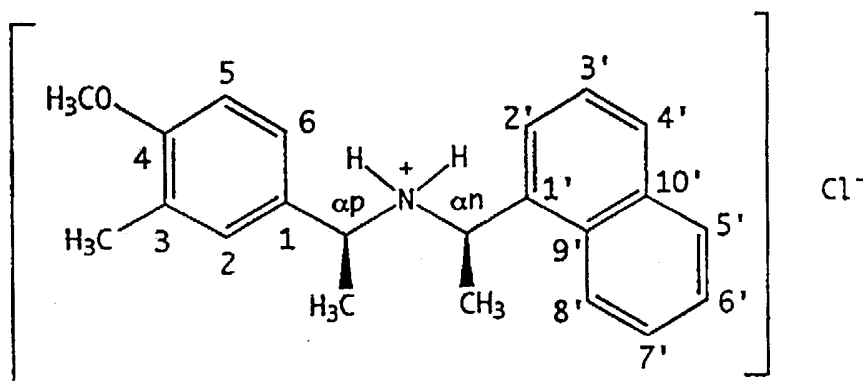
3H	1,86	d	J=7,0	fenyl -CHCH ₃
3H	1,90	d	J=6,8	naftyl -CHCH ₃
3H	3,90	s	n.a.	-OCH ₃
1H	3,91	q	J=~6,4	fenyl -CHCH ₃
1H	4,79	q	J=6,7	naftyl -CHCH ₃
1H	6,79	d	J=2,0	2
1H	6,84	d	J=8,5	5
1H	7,19	bd	J=7,6	8'
1H	7,26	dd	J ₁ =8,4, J ₂ =1,7	6
1H	7,38	dd	J ₁ =J ₂ =7,0	7'
1H	7,52	dd	J ₁ =J ₂ =8,1	6'
1H	7,69	dd	J ₁ =J ₂ =8,1	3'
1H	7,92	d	J=8,2	4' nebo 5'
1H	7,94	d	J=8,1	4' nebo 5'
1H	8,30	bd	J=5,0	2'
2H	10,72	vbs	n.a.	alif -NH ₂ ⁺

Obr. 126



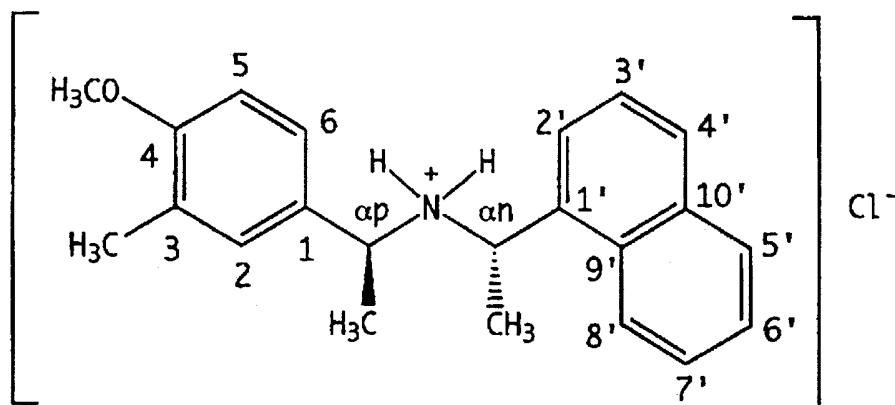
---	---	
20,6	CH ₃	fenyl-CHCH ₃
21,7	CH ₃	naftyl -CHCH ₃
51,2	CH	naftyl-CHCH ₃
55,9	CH	fenyl -CHCH ₃
56,2	CH ₃	O-CH ₃
112,4	CH	5
121,2	CH	8'
122,5	Q	
125,1	CH	2'
125,9	CH	3'
126,2	CH	6'
126,8	CH	6 7'
127,6	CH	6 7'
128,4	Q	
129,0	CH	4' 5'
129,3	CH	4' 5'
130,1	Q	
130,7	CH	2'
132,2	Q	
133,7	Q	
155,4	Q	3

Obr. 127



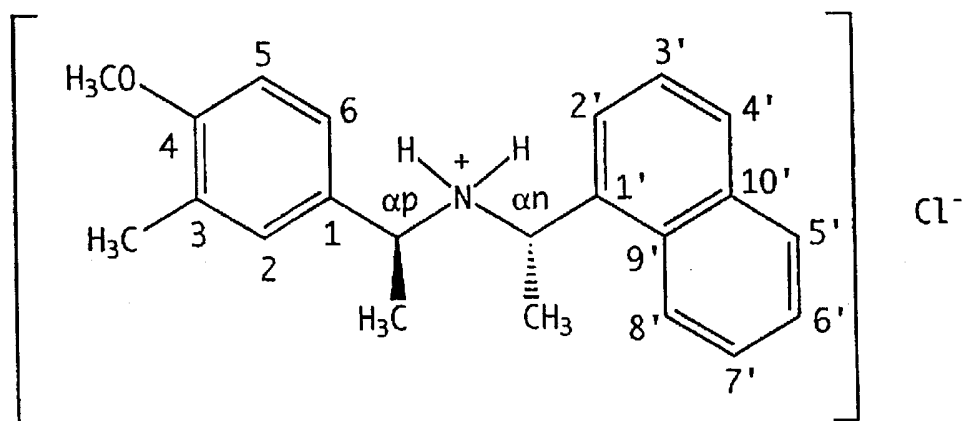
# OF H's	δ (PPM)	MULTIPLICITY	COUPLING (Hz)	ASSIGNMENT
3H	1,74	d	J=6,7	aliph-CH3
3H	1,90	d	J=6,0	aliph-CH3
3H	2,23	s	n.a.	arom-CH3
3H	3,88	s	n.a.	-OCH3
1H	4,25	bd	J=7.3	-CH-
1H	4,90	bq	J=6.5	-CH-
1H	6.87	d	J=8,4	
1H	7.17	bs	n.a.	
1H?	7,20-7,27	m	n.a.	
2H?	7,35-7,46	m	n.a.	
1H	7,50	dd	J1=J2=8,1	
1H	7,59	dd	J1=J2=7,9	
1H	7,87	d	J=6,7	
1H	7,89	d	J=6,6	
1H	8,02	d	J=7,0	
1H	8,97	bs	n.a.	-NH2+-
1H	10,83	bs	n.a.	-NH2+-

OBR. 128



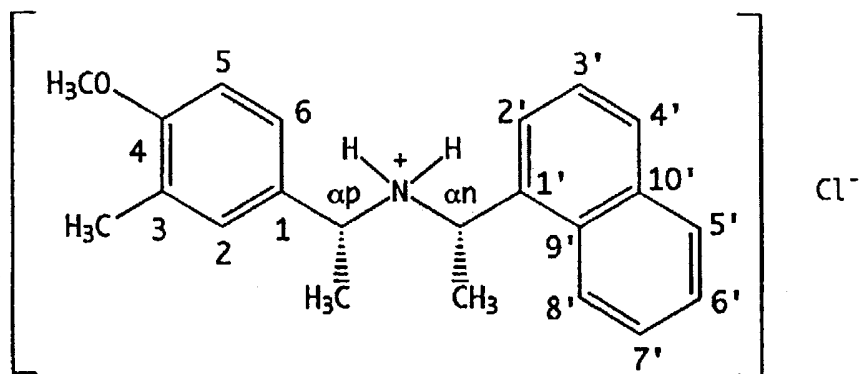
9H	1,92	bs	n.a.	fenyl -CH ₃ naftyl -CH ₃ arom-CH ₃
3H	3,83	s	n.a.	-OCH ₃
1H	3,95	bq	J=6,0	fenyl -CH-
1H	4,79	bq	J=5,5	naftyl -CH-
1H	6,57	bs	n.a.	2
1H	6,71	d	J=8,2	5
2H	7,10-7,17	m	n.a.	
1H	7,30-7,35	m	n.a.	
1H	7,50	dd	J ₁ =J ₂ =7,7	6'
1H	7,70	dd	J ₁ =J ₂ =7,3	3'
1H	7,91	d	J=7,8	4' 5'
1H	7,92	d	J=8,0	4' 5'
1H	8,39	bd	J=2,8?	2'
1H	8,63	bs	n.a.	alif -NH ₂ +
1H	10,59	bs	n.a.	ALIF -NH ₂ +

Obr. 129



15, 8	CH_3	arom- CH_3
20, 97	CH_3	alif- CH_3
22, 0	CH_3	alif- CH_3
51, 2	CH	-CH-
55, 4	CH_3	- OCH_3
56, 6	CH	-CH-
110, 3	?	
121, 8	CH	
125, 5	CH	
125, 8	CH	
126, 2	CH	
126, 3	CH	
126, 9	CH	
127, 0	Q	
127, 2	CH	
128, 8	Q	
128, 9	?	
130, 3	Q	
131, 2	CH	
133, 0	Q	
133, 7	Q	
158, 1	Q	

Obr. 130



3H	1,74	d	J=6,1	alif -CH3
3H	1,89	d	J=6,0	alif -CH3
3H	2,24	s	n.d.	arom-CH3
3H	3,89	s	n.a.	-OCH3
1H	4,27	bq	J=6,2	-CH-
1H	4,92	bq	J=5,1	-CH-
1H	6,89	d	J=7,7	
1H	7,18	bs	n.d.	
1H	7,26	bd	J=7,9	
2H?	7,36-7,47	m	n.d.	
1H	7,51	dd	J1=J2=7,6	
1H	7,61	dd	J1=J2=7,5	
1H	7,88	d	J=8,0	
1H	7,90	d	J=7,5	
1H	7,99	d	J=6,9	
1H	9,10	bs	n.a.	-NH2+-
1H	10,67	bs	n.a.	-NH2+-

Obr. 131

Konec dokumentu