



(19) **UA** (11) **73 530** (13) **C2**
(51)МПК ⁷ **C 07D 401/06, A 61K 31/445, A 61P 5/00**

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
УКРАИНЫ

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ УКРАИНЫ

(21), (22) Заявка: 2002053785, 10.11.2000

(24) Дата начала действия патента: 15.08.2005

(30) Приоритет: 10.11.1999 DK PA 1999 01618
23.11.1999 US 60/167,101

(46) Дата публикации: 15.08.2005

(86) Заявка PCT:
PCT/DK00/00624, 20001110

(72) Изобретатель:

Анкерсен Михаэль, DK

(73) Патентовладелец:

НОВО НОРДИСК А/С, DK

(54) СОЕДИНЕНИЕ СО СВОЙСТВАМИ ОСВОБОЖДЕНИЯ ГОРМОНА РОСТА

(57) Реферат:

Настоящее изобретение касается нового диастереомерного соединения, его фармацевтически приемлемых солей, композиций, которые их содержат, и их применения для лечения заболеваний, которые возникают в результате дефицита гормона роста.

Официальный бюллетень "Промышленная собственность". Книга 1 "Изобретения, полезные модели, топографии интегральных микросхем", 2005, N 8, 15.08.2005. Государственный департамент интеллектуальной собственности Министерства образования и науки Украины.

U A 7 3 5 3 0 C 2

U A 7 3 5 3 0 C 2



(19) **UA** ⁽¹¹⁾ **73 530** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) Int. Cl.⁷ **C 07D 401/06, A 61K 31/445,**
A 61P 5/00

MINISTRY OF EDUCATION AND SCIENCE OF
UKRAINE

STATE DEPARTMENT OF INTELLECTUAL
PROPERTY

(12) **DESCRIPTION OF PATENT OF UKRAINE FOR INVENTION**

(21), (22) Application: 2002053785, 10.11.2000
(24) Effective date for property rights: 15.08.2005
(30) Priority: 10.11.1999 DK PA 1999 01618
23.11.1999 US 60/167,101
(46) Publication date: 15.08.2005
(86) PCT application:
PCT/DK00/00624, 20001110

(72) Inventor:
Ankersen Michael, DK
(73) Proprietor:
NOVO NORDISK A/S, DK

(54) **A COMPOUND HAVING PROPERTIES TO RELEASE THE GROWTH HORMONE**

(57) Abstract:

The present invention relates to a novel diastereomeric compound, pharmaceutically acceptable salts thereof, compositions containing them, and their use for treating medical disorders resulting from a deficiency in growth hormone, (Fig. 1).

Official bulletin "Industrial property". Book 1 "Inventions, utility models, topographies of integrated circuits", 2005, N 8, 15.08.2005. State Department of Intellectual Property of the Ministry of Education and Science of Ukraine.

U A 7 3 5 3 0 C 2

U A 7 3 5 3 0 C 2



(19) **UA** ⁽¹¹⁾ **73 530** ⁽¹³⁾ **C2**
(51)МПК ⁷ **C 07D 401/06, A 61K 31/445, A 61P 5/00**

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ

(12) ОПИС ВИНАХОДУ ДО ПАТЕНТУ УКРАЇНИ

(21), (22) Дані стосовно заявки:
2002053785, 10.11.2000

(24) Дата набуття чинності: 15.08.2005

(30) Дані стосовно пріоритету відповідно до Паризької конвенції : 10.11.1999 DK PA 1999 01618
23.11.1999 US 60/167,101

(46) Публікація відомостей про видачу патенту (деклараційного патенту): 15.08.2005

(86) Номер та дата подання міжнародної заявки відповідно до договору РСТ:
PCT/DK00/00624, 20001110

(72) Винахідник(и):
Анкерсен Міхаель , DK

(73) Власник(и):
НОВО НОРДІСК А/С, DK

(54) СПОЛУКА З ВЛАСТИВОСТЯМИ ВИВІЛЬНЮВАТИ ГОРМОН РОСТУ

(57) Реферат:
Даний винахід стосується нової діастереомерної сполуки, її фармацевтично

прийнятних солей, композицій, що їх містять, та їх застосування для лікування захворювань, які виникають в результаті дефіциту гормону росту.

U A 7 3 5 3 0 C 2

U A 7 3 5 3 0 C 2

Опис винаходу

Даний винахід стосується нової сполуки, її фармацевтично прийнятних солей, композицій, що їх містять, та їх застосування для лікування захворювань, які є результатом дефіциту гормону росту.

Гормон росту є гормоном, який стимулює ріст усіх тканин, які здатні рости. Крім того, відомо, що гормон росту має різний вплив на обмінні процеси, наприклад, стимуляцію синтезу білків та мобілізацію вільних жирних кислот, і викликає переключення енергетичного обміну речовин з вуглеводного на жирнокислотний обмін речовин. Дефіцит гормону росту може призводити до багатьох важких захворювань, наприклад, карликовості.

Гормон росту вивільнюється з гіпофізу. Вивільнення гормону росту може стимулюватися гормоном вивільнення гормону росту (GHRH) та інгібуватися соматостатином. В обох випадках гормони вивільнюються з гіпоталамусу, але їх дія опосередковується насамперед специфічними рецепторами, розташованими в гіпофізі. Було описано й інші сполуки, які стимулюють вивільнення гормону росту з гіпофізу. Наприклад, аргінін, L-3,4-дигідроксифенілаланін (L-Допа), глюкагон, вазопресин, PACAP (пептид, який активує аденілілциклазу гіпофізу), агоністи мускаринового рецептора та синтетичний гексапептид, GHRP (пептид, який вивільнює гормон росту) вивільнюють ендогенний гормон росту або шляхом прямого впливу на гіпофіз, або впливаючи на вивільнення GHRH та/або соматостатину з гіпоталамусу.

При захворюваннях або станах, коли вимагається підвищення рівня гормону росту, білковий характер гормону росту виключає будь-яке застосування, крім парентерального введення. До того ж, інші прямо діючі природні засоби, що посилюють секрецію, наприклад, GHRH та PACAP, є довгими поліпептидами, через що перевагу віддають саме парентеральному введенню.

Застосування певних сполук для підвищення рівня гормону росту у ссавців раніше пропонувалося, наприклад, у заявках EP 18072, EP 83864, WO 8302272, WO 8907110, WO 8907111, WO 8910933, WO 8809780, WO 9118016, WO 9201711, WO 9304081, WO 9413696, WO 9517423, WO 9514666, WO 9615148, WO 9622997, WO 9635713, WO 9700894, WO 9722620, WO 9723508, WO 9740023 та WO 9810653.

Склад сполук, які вивільнюють гормон росту, є важливим для їх ефективності вивільнення гормону росту, а також їх біоаккумуляції. Таким чином, задача даного винаходу полягає в забезпеченні нової сполуки з властивостями вивільнення гормону росту. Крім того, задача полягає в забезпеченні нової сполуки, яка вивільнює гормон росту (що посилює секрецію гормону росту), які є специфічними і/або селективними і не мають або практично не мають побічних ефектів, наприклад, вивільнення LH, FSH, TSH, ACTH, вазопресину, окситоцину, кортизолу та/або пролактину. Задача також полягає в забезпеченні сполуки, яка має добру біодоступність при пероральному введенні.

Згідно з даним винаходом пропонується нова сполука, яка діє безпосередньо на клітини гіпофізу за нормальних умов експерименту *in vitro* для вивільнення з них гормону росту.

Сполука, яка вивільнює гормон росту, може застосовуватись *in vitro* як унікальний дослідний засіб для розуміння, крім іншого, шляху регулювання секреції гормону росту на рівні гіпофізу.

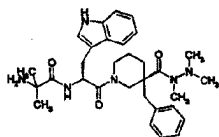
Крім того, сполука, яка вивільнює гормон росту, згідно з даним винаходом, також може вводиться *in vivo* для збільшення ендогенного вивільнення гормону росту.

Відповідним чином, даний винахід стосується сполуки, яку одержують із застосуванням процедури, описаної у прикладі 1,

або її фармацевтично прийнятної солі.

Крім того, даний винахід стосується сполуки, яку одержують із застосуванням процедури, описаної у прикладі 1, і яка є

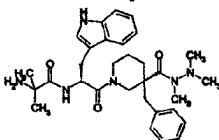
2-аміно-N-[(1R)-2-[(3R)-3-бензил-3-(N,N'-триметилгідразинокарбоніл)піперидин-1-іл]-1-(1H-індол-3-ілметил)-2-оксоетил]-2-метилпропіонамідом



або її фармацевтично прийнятною сіллю.

Крім того, даний винахід стосується сполуки

2-аміно-N-[(1R)-2-[(3R)-3-бензил-3-(N,N',N'-триметилгідразинокарбоніл)піперидин-1-іл]-1-(1H-індол-3-ілметил)-2-оксоетил]-2-метилпропіонамідом



або її фармацевтично прийнятною солі.

Структуру сполуки, яку одержують із застосуванням процедури, описаної у прикладі 1, перевіряють, наприклад, шляхом рентгеноструктурного аналізу [наприклад, як описано у роботі Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition (1995), зокрема, сторінки 160 та 561-562].

Обсяг даного винаходу охоплює будь-яку можливу комбінацію двох або більшої кількості описаних авторами

варіантів втілення.

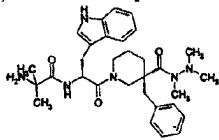
Процедура, застосована в цьому патенті, оснований на з'єднанні пептидів, добре відомому спеціалістам, і ніяким чином не повинна розглядатись як така, що обмежує винахід.

У цій процедурі перед з'єднанням амінокислотних або пептидних залишків добре відомими спеціалістам способами видаляють відповідну захисну групу, таку, як трет-бутилоксикарбоніл (Boc). Можна також уникнути застосування захисних груп. Відповідні амінокислоти можуть бути захищені і позбавлені захисту способами, відомими спеціалістам і описаними, наприклад, у роботі T.W. Green [Protective Groups in Organic Synthesis, 2. Ed., John Wiley and Sons, New York 1991].

У Прикладі 1 процедуру описано детально.

Після розділення рацемічної суміші 3-бензилпіперидин-1,3-дикарбонової кислоти 1-трет-бутилового естеру для одержання енантіомерних сполук, кінцевою сполукою, одержаною з застосуванням цієї процедури, є діастереомер

2-аміно-N-[(1R)2-[(3R)-3-бензил-3-(N,N',N'-триметилгідразинокарбоніл)піперидин-1-іл]-1-(1H-індол-3-ілметил)-2-оксоетил]-2-метилпропіонамід



замість суміші двох діастереомерів.

Сполука даного винаходу виявляє посилений опір протеолітичному розщепленню ферментами, оскільки вона не є природною, зокрема, завдяки тому, що природні амідні зв'язки замінюються неприродними міметичними амідними зв'язками. Очікується, що збільшення опору сполуки винаходу протеолітичному розщепленню порівняно з відомими пептидами, що вивільнюють гормони, має поліпшити біоаккумуляцію порівняно з біоаккумуляцією пептидів, які пропонувалися в літературі раніше.

Сполука даного винаходу необов'язково може бути у формі фармацевтично прийнятної солі, наприклад, у формі фармацевтично прийнятних кислотно-адитивних солей сполук даного винаходу, до яких належать солі, одержані шляхом реакції сполуки формули I з неорганічною або органічною кислотою, такою як соляна, гідробромнувата, сірчана, оцтова, фосфорна, молочна, малеїнова, мигдалева, фталева, лимонна, глутарова, глюконова, метансульфонова, саліцилова, бурштинова, винна, толуолсульфоокислота, трифтороцтова, сульфамінова або фумарова кислота та/або вода.

Сполука даного винаходу може вводитись у формі фармацевтично прийнятної кислотно-адитивної солі або, у певному випадку, у формі солі лужного металу або лужноземельного металу або нижчої алкіламонієвої солі. Вважають, що такі форми солей виявляють активність приблизно такого самого порядку, що й вільноосновні форми.

В іншому аспекті даний винахід стосується фармацевтичної композиції, яка включає як активний інгредієнт сполуку даного винаходу або її фармацевтично прийнятну соль разом із фармацевтично прийнятним носієм або розріджувачем.

Фармацевтичні композиції, що містять сполуку даного винаходу, одержують традиційними способами, наприклад, як описано в роботі Remington's Pharmaceutical Sciences, 1985, або Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition (1995). Композиції можуть існувати у традиційних формах, наприклад, у формі капсул, таблеток, аерозолів, розчинів, суспензій або у формах для місцевого нанесення.

Застосовуваний фармацевтичний носій або розріджувач може бути традиційним твердим або рідким носієм. Прикладами твердих носіїв є лактоза, каолін, цукроза, циклодекстрин, тальк, желатин, агар, пектин, гуміарабік, стеарат магнію, стеаринова кислота або нижчий алкіловий етер целюлози. Прикладами рідких носіїв є сироп, арахісова олія, оливкова олія, фосфоліпіди, жирні кислоти, аміни жирних кислот, поліоксіетилен або вода.

Подібним чином, носій або розріджувач може включати будь-який відомий спеціалістам матеріал уповільненого вивільнення, такий як гліцерилмоностеарат або гліцерилдистеарат, окремо або змішаний з воском.

Якщо для перорального введення застосовують твердий носій, композиція може бути таблетована, поміщена у тверду желатинову капсулу у формі порошку або гранул чи може бути у формі таблетки або пастилки. Кількість твердого носія може бути різною в широких межах, але зазвичай становить від приблизно 25мг до приблизно 1г м'якої желатинової капсули або стерильної рідини для ін'єкцій, такої як водна чи безводна рідка суспензія або розчин.

Типова таблетка, яка може бути виготовлена традиційним способом таблетування, може містити:

Ядро:		
Активна сполука (як вільна сполука або її сіль)		10мг
Колоїдний діоксид кремнію (Aerosil)		1,5мг
Целюлоза, мікрорист. (Avicel)		70мг
Модифікована целюлозна смола (Ac-Di-Sol)		7,5мг
Стеарат магнію		
Покриття:		
НРМС приблизно		9мг

5 Для назального введення композиція може містити сполуку даного винаходу, розчинену або суспендовану в рідкому носії, зокрема, водному носії, для аерозольного розпилення. Носій може містити добавки, такі як солюбілізатори, наприклад, пропіленгліколь, поверхнево-активні речовини/ посилювачі абсорбції, такі як лецитин (фосфатидилхолін) або циклодекстрин, або консерванти, такі як парабени.

Взагалі, сполуки даного винаходу відпускаються у формі одиничних доз, які містять 50-200мг активного інгредієнта разом із фармацевтично прийнятним носієм на одиничну дозу.

10 Прийнятна доза для сполук згідно з даним винаходом становить 0,01-500мг/день, наприклад, від приблизно 5 до приблизно 50мг, скажімо, 10мг на дозу при введенні пацієнтові, наприклад, людині, як медикаменту.

У ще одному аспекті даний винахід стосується фармацевтичної композиції у формі одиничної дози, яка включає як активний інгредієнт від приблизно 10 до приблизно 200мг сполуки загальної формули I або її фармацевтично прийнятної солі.

15 Було продемонстровано, що сполука даного винаходу має здатність вивільнювати ендogenous гормон росту in vivo. Таким чином, ця сполука може бути застосована для лікування при станах, які вимагають підвищеного рівня гормону росту плазми, наприклад, у людей з дефіцитом гормону росту або у літніх пацієнтів чи худоби.

20 Таким чином, в одному з аспектів даний винахід стосується фармацевтичної композиції для стимулювання вивільнення гормону росту з гіпофізу, композиції, яка включає як активний інгредієнт сполуку даного винаходу або її фармацевтично прийнятну сіль разом із фармацевтично прийнятним носієм або розріджувачем.

У ще одному аспекті даний винахід стосується способу стимулювання вивільнення гормону росту з гіпофізу, способу, що включає введення суб'єктові, який цього потребує, ефективної кількості сполуки даного винаходу або її фармацевтично прийнятної солі.

25 У ще одному аспекті даний винахід стосується застосування сполуки даного винаходу або її фармацевтично прийнятної солі для одержання медикаменту для стимулювання вивільнення гормону росту з гіпофізу.

30 Спеціалістам добре відомо, що гормон росту застосовується і може застосовуватися найрізноманітнішими способами. Таким чином, сполука даного винаходу може вводитися з метою стимулювання вивільнення гормону росту з гіпофізу і в такому разі може мати практично такий самий вплив або застосування, що й сам гормон росту. Сполуки даного винаходу застосовують для стимуляції вивільнення гормону росту у літніх пацієнтів, запобігання катаболічним побічним ефектам глюкокортикоїдів, профілактики та лікування остеопорозу, лікування синдрому хронічної втоми (CFS), лікування синдрому гострої втоми та втрати м'язової маси після вибіркового хірургічного втручання, стимуляції імунної системи, прискорення загоєння ран, прискорення зростання кісток, прискорення при ускладнених переломах, наприклад, дистракційного остеогенезу, лікування виснаження внаслідок переломів, лікування затримки росту, лікування затримки росту в результаті ниркової недостатності, лікування кардіоміопатії, лікування виснаження у зв'язку з хронічними хворобами печінки, лікування тромбцитопенії, лікування затримки росту у зв'язку з хворобою Крона, лікування синдрому короткого кишечника, лікування виснаження у зв'язку з хронічною обструктивною легеневою хворобою (COPD), лікування ускладнень, пов'язаних із трансплантацією, лікування фізіологічної низькорослості, включаючи лікування дітей з дефіцитом гормону росту, та низькорослості, пов'язаної з хронічними захворюваннями, лікування ожиріння та затримки росту, пов'язаної з ожирінням, лікування анорексії, лікування затримки росту, пов'язаної з синдромом Прадера-Віллі та синдромом Тернера; прискорення росту у пацієнтів, які мають синдром часткової нечутливості до гормону росту, прискорення одужання та скорочення періоду госпіталізації опікових пацієнтів; лікування внутрішньоматкової затримки росту, дисплазії скелета, гіперкортицизму та синдрому Кушинга; викликання пульсууючого вивільнення гормону росту; заміни гормону росту у пацієнтів, що зазнали стресу, лікування остеохондродисплазії, синдрому Нунана, шизофренії, депресій, хвороби Альцгеймера, повільного загоєння ран та психосоціальної депривації, лікування катаболізму у зв'язку з легеневою дисфункцією та вентиляторною залежністю; лікування серцевої недостатності або пов'язаної з нею судинної дисфункції, лікування порушення серцевої функції, лікування або профілактики інфаркту міокарда, зниження кров'яного тиску, захисту від дисфункції шлуночка або профілактики реперфузії; лікування дорослих пацієнтів від хронічного діалізу; послаблення білкової катаболічної реакції після радикального хірургічного втручання, зменшення кахексії та втрати білків через такі хронічні захворювання, як рак або СНІД; лікування гіперінсулінемії, включаючи незидіобластоз, допоміжного лікування для індукування овуляції; стимуляції розвитку тимуса та профілактики пов'язаного зі старінням зниження функції тимуса, лікування пацієнтів з пригніченим імунітетом; лікування саркопенії, лікування виснаження у зв'язку зі СНІДом; поліпшення сили та рухливості м'язів, підтримання товщини шкіри, метаболічного гомеостазу та ниркового гомеостазу у ослаблених пацієнтів літнього віку, стимуляції остеобластів, корекції кісток та росту хрящів; регуляції приймання їжі; стимуляції імунної систем у свійських тварин та лікування пов'язаних зі старінням порушень свійських тварин, сприяння ростові худоби та стимуляції росту шерсті овець, збільшення удійності худоби, лікування метаболічного синдрому (синдрому X), лікування резистентності до інсуліну, включаючи інсулінонезалежний цукровий діабет, у ссавців, наприклад, людини, лікування резистентності до інсуліну у ділянці серця, поліпшення якості сну та корекції відносного гіпосоматропізму при старінні через значне збільшення швидкого сну та зменшення латентності швидкого сну, лікування гіпотермії, лікування крихкості, пов'язаної зі старінням, лікування застійної серцевої недостатності, лікування переломів стегна, лікування імунодефіциту осіб зі зниженим співвідношенням T4/T8 клітин, лікування м'язової атрофії, лікування пошкодження скелетних м'язів літніх пацієнтів, підвищення активності білкової кінази B (PKB), поліпшення загальної легеневої функції, лікування порушень сну, лікування

затримки росту у зв'язку з астмою, лікування затримки росту у зв'язку з ювенільним ревматоїдним артритом та лікування затримки росту у зв'язку з кістозним фіброзом.

Для вищезгаданих показань доза може бути різною залежно від способу введення та потрібної терапії. Однак зазвичай пацієнтам та тваринам вводять дозу на рівні від 0,0001 до 100мг/кг маси тіла на день для досягнення ефективного вивільнення ендогенного гормону росту. Крім того, сполука даного винаходу при введенні у вищевказаних дозах не має або практично не має побічних ефектів, таких як, наприклад, вивільнення LH, FSH, TSH, АСТН, вазопресину, окситоцину, кортизолу та/або пролактину. Як правило, дозовані форми, придатні для перорального, назального, пульмонального або кризьшкірного введення, включають від приблизно 0,0001мг до приблизно 100мг, в оптимальному варіанті — від приблизно 0,001мг до приблизно 50мг сполук даного винаходу, змішаних із фармацевтично прийнятним носієм або розріджувачем.

Фармацевтична композиція винаходу необов'язково може включати сполуку даного винаходу у комбінації з однією або кількома сполуками, які виявляють різну активність, наприклад, антибіотиками або іншими фармакологічно активними матеріалами.

Шлях введення може бути будь-яким шляхом, який ефективно переносить активну сполуку до підходящого або потрібного місця дії, наприклад, пероральним, назальним, пульмональним, кризьшкірним або парентеральним, причому перевагу віддають пероральному шляхові.

Крім фармацевтичного застосування сполуки даного винаходу, корисними можуть бути *in vitro* засоби дослідження регуляції вивільнення гормону росту.

Сполука даного винаходу також може бути корисною як *in vivo* засіб для оцінки здатності гіпофізу до вивільнення гормону росту. Наприклад, можуть бути піддані аналізу на гормон росту зразки сироватки, взяті до та після введення сполуки людині. Порівняння гормону росту в кожному зразку сироватки прямо визначає здатність гіпофізу пацієнта до вивільнення гормону росту.

Сполука даного винаходу може вводиться тваринам, які мають промислове або сільськогосподарське значення, для збільшення швидкості та міри їх росту, а також для підвищення удійності.

Сполука даного винаходу також може застосовуватись у комбінації з іншими засобами, що поліпшують секрецію, такими як GHRP (2 або 6), GHRH та його аналоги, гормон росту та його аналоги або соматомедина, включаючи IGF-1 та IGF-2.

Сполуку даного винаходу піддають *in vitro* аналізу на її ефективність та потенційну здатність вивільнювати гормон росту в первинних культурах гіпофізу щурів, і такий аналіз здійснюють описаним нижче способом.

Виділення клітин гіпофізу щурів являє собою дещо змінений спосіб, описаний у роботі O. Sartor et al., *Endocrinology* 116. 1985, pp. 952-957. Самців-альбіносів щура Спрага-Долі (250 +/-25 грамів) закуповували у Mollegaard, Ulle Skensved, Данія. Щурів розсаджували по клітках групами (чотири тварини на клітку) і поміщували в кімнати з 12-годинним світловим циклом. Кімнатна температура становила від 19 до 24°C, а відносна вологість — від 30 до 60%.

Щурів декапітували і розрізали гіпофіз. Нейропромійні частки видаляли, а решту тканини відразу поміщували в ізоляційний буфер при температурі льоду (середовище Гея (Gibco 041-04030) з 0,25% D-глюкози, 2% заміної амінокислоти (Gibco 043-01140) та 1% альбуміну сироватки великої рогатої худоби (BSA) (Sigma A-4503)). Тканину розрізали на дрібні фрагменти і переносили в ізоляційний буфер з 3,8мг/мл трипсину (Worthington #3707 TRL-3) та 330мг/мл ДНКазу (Sigma D-4527). Цю суміш інкубували при 70об/хв протягом 35хв при 37 °С в атмосфері 95/5% O₂/CO₂. Тканину після цього тричі промивали у вищезгаданому буфері. Застосовуючи стандартну пастерку, тканину після цього відсмоктували в окремі клітини. Після диспергування клітини фільтрували кризь нейлоновий фільтр (160мм) для видалення зайвої тканини. Суспензію клітин тричі промивали ізоляційним буфером з інгібітором трипсину (0,75мг/мл, Worthington #2829) і остаточно ресуспендували в культуральному середовищі; DMEM (Gibco 041-01965) з 25мМ HEPES (Sigma H-3375), 4мМ глутаміну (Gibco 043-05030H), 0,075% бікарбонату натрію (Sigma S-8875), 0,1% заміної амінокислоти, 2,5% ембріональної телячої сироватки (FCS, Gibco 011-06290), 3% конячої сироватки (Gibco 034-06050), 10% свіжої щурачої сироватки, 1нМ T₃ (Sigma T-2752) та 40мг/л дексаметазону (Sigma D-4902) pH 7,3, до густини 2x10⁵ клітин/мл. Клітини висівали у мікротитрувальні планшети (Nunc, Данія), 200мл/лунку, і культивували протягом 3 днів при 37°C та 8% CO₂.

Випробування сполуки

Після культивування клітини двічі промивали стимуляційним буфером (збалансований сольовий розчин Хенкса (Gibco 041-04020) з 1% BSA (Sigma A-4503), 0,25% D-глюкози (Sigma G-5250) та 25мМ HEPES (Sigma H-3375) pH 7,3) і попередньо інкубували протягом 1год при 37 °С. Буфер замінювали на 90мл стимуляційного буфера (37°C). Додавали 10мл розчину випробуваної сполуки і планшети інкубували протягом 15хв при 37°C і 5% CO₂. Середовище декантували і піддавали аналізу на вміст гормону росту (GH) у випробувальній системі rGH SPA.

Сполуку випробували у дозах від 10пМ до 100мМ. Залежність реакції від дози вибудовували користуючись рівнянням Хілла (Fig P, Biosoft). Ефективність (максимальне вивільнення GH, E_{max}) виражали у % від E_{max} від GHRP-6. Потенційну здатність (EC₅₀) визначали як концентрацію, що викликає половину від максимальної стимуляції вивільнення GH.

Сполуки даного винаходу оцінюють на метаболічну стійкість, застосовуючи процедуру описану нижче:

Сполуку розчиняють у концентрації 1мг/мл у воді. 25мл цього розчину додають до 175мл відповідного ферментного розчину (що в результаті дає співвідношення фермент:субстрат (маса/маса) приблизно 1:5).

Розчин залишають до наступного дня при 37°C. 10мл розчинів різного ступеня розщеплення піддають аналізу порівняно з відповідним "нульовим" зразком, застосовуючи електророзпилювальну мас-спектрометрію (ESMS) з нагнітанням потоку при спостереженні за вибраним молекулярним іоном. Якщо сигнал послаблюється більше ніж на 20% порівняно з "нульовим" зразком, решту розчину піддають аналізу шляхом високоефективної рідинної хроматографії (HPLC) та мас-спектрометрії з метою точного визначення ступеня та місця (місць) розщеплення.

Для випробування стійкості брали кілька стандартних пептидів (ACTH 4-10, ангіотензин 1-14 та глюкагон) з метою перевірки здатності різних розчинів до розщеплення пептидів.

Стандартні пептиди (ангіотензин 1-14, ACTH 4-10 та глюкагон) закупували у Sigma, MO, США)

Усі ферменти (трипсин, хімотрипсин, еластазоамінопептидазу M та карбоксипептидазу Y та B) закупували у Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Germany)

Панкреатична ферментна суміш: трипсин, хімотрипсин та еластаза в 100мм амонійбікарбонату, pH 8,0 (концентрація в усіх випадках 0,025мг/мл).

Карбоксипептидазна суміш: карбоксипептидаза Y та B у 50мм амоніацетат, pH 4,5 (концентрація в усіх випадках 0,025мг/мл).

Розчин амінопептидази M: амінопептидаза M (0,025мг/мл) у 100мм амонійбікарбонату, pH 8,0.

Мас-спектрометричний аналіз здійснювали, застосовуючи два різні мас-спектрометри. Потрійний квадрупольний пристрій для LC-MS Sciex API III (Sciex instruments, Thomhill, Ontario), оснащений електророзпилювальним джерелом іонів, та часопролітний пристрій з плазмовим осадженням Bio-Ion 20 (Bio-Ion Nordic AB, Uppsala, Швеція).

Визначення кількості сполуки (до та після розщеплення) здійснювали на пристрої API III, застосовуючи відстеження одиничного молекулярного іона з нагнітанням потоку аналіту. Потік рідини (MeOH:вода 1:1) зі швидкістю 100мл/хв контролювали за допомогою пристрою для HPLC ABI 140B (Perkin-Elmer Applied Biosystems Divisions, Foster City, CA). Параметри пристрою встановлювали згідно зі стандартними робочими умовами, і відстеження SIM здійснювали, застосовуючи найбільш інтенсивний молекулярний іон (у більшості випадків він відповідає подвійно зарядженому молекулярному іонові).

Крім того, ідентифікація продуктів розщеплення включала застосування мас-спектрометрії з десорбцією плазми (PDMS) з нанесенням зразків на вкриті нітроцелюлозою мішені та стандартними параметрами вимірювання. Точність визначених таким чином мас, як правило, є кращою за 0,1%.

Відокремлення та виділення продуктів розщеплення здійснювали, застосовуючи HPLC-колонку NY-TACH C-18 зі зворотною фазою, 4,6x105мм (Hewlett-Packard Company, Palo Alto, CA) зі стандартним ацетонітрилом: градієнт відокремлення TFA. Застосовуваною системою HPLC була HP1090M (Hewlett-Packard Company, Palo Alto, CA).

Похідна пептиду	Іон MW/SIM (amu)	Карбокси-пептидазна суміш	Панкр. ферментна суміш
Стандарти			
ACTH4-10	1124,5/562,8	+	
Глюкагон	3483/871,8	-	
Інсулін (B23-29)	859,1/430,6		
Ангіотензин 1-14	1760,1/881,0	-	
GHRP-2	817,4/409,6	-	-
GHRP-6	872,6/437,4	-	-
+: Стійка (менше 20% послаблення сигналу SIM через 24год у розщеплювальному розчині)			
-: Нестійка (більше 20% послаблення сигналу SIM через 24год у розщеплювальному розчині)			

Сполуку даного винаходу піддають оцінці на її біодоступність при пероральному введенні, і таку оцінку здійснюють описаним нижче способом.

Фармакокінетику сполуки досліджують на собаках породи бігль, яких утримують без їжі.

Внутрішньовенне та пероральне введення випробуваної сполуки у 5% розчині глюкози здійснювали з тижневим інтервалом.

Зразки крові забирали безпосередньо перед введенням ліків (початок відліку), а потім 0,08, 0,25, 0,50, 0,75, 1,0, 1,5, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0 та 6,0 годин після введення.

Зразки плазми до аналізу зберігали замороженими (<-18°C).

Для визначення кількості сполуки у плазмі застосовували спосіб HPLC з видобуванням твердої фази та ультрафіолетовим детектуванням.

Біоаккумуляція сполуки даного винаходу при пероральному введенні становить близько 50%.

Фармакокінетичні параметри для сполук розраховували некомпартментальними способами з застосуванням фармакокінетичної програми на базі PC WinNonlin, версія 1,1 (Scientific Consulting Inc., Apex, NC, США).

Будь-яка описана авторами нова особливість або комбінація особливостей вважається суттєвою для даного винаходу.

ПРИКЛАДИ:

Спосіб одержання сполуки даного винаходу та композицій, що містять цю сполуку, далі пояснюється на нижчеподаних прикладах, які, однак, не повинні тлумачитись як такі, що обмежують обсяг винаходу.

Структура сполуки підтверджується або високоефективною рідинною хроматографією (HPLC), або ядерним магнітним резонансом (ЯМР, Bruker 400мгц), або рідинною хроматографією-мас-спектрометрією (LC-MS). Зсуви

ЯМР (d) представлено у мільйонних частинах (млн.⁻¹), і даються лише вибрані піки, т. пл. означає точку плавлення, представлену в °С. Колонкову хроматографію здійснюють, застосовуючи технологію, описану в роботі W.C. Still et al., J. Org. Chem. 1978, 43, 2923-2925 на силікагелі Merck 60 (Art 9385). Сполуки, які застосовували як вихідні матеріали, є або відомими сполуками, або сполуками, які легко можна одержати відомими способами. Застосованим розчином метанол/аміак є 10% розчин аміаку в метанолі.

HPLC-аналіз:

Спосіб А1.

RP-аналіз здійснювали, застосовуючи ультрафіолетове детектування при 214, 254, 276 та 301нм на 218TP54 4,6ммх250мм 5м C-18 силікагелевій колонці (The Separations Group, Hesperia), яку елюювали при 1мл/хв і 42°С. Колонку врівноважували 5% ацетонітрилом у буфері, що складався з 0,1М сульфату амонію, який доводили до рН 2,5 за допомогою 4М сірчаної кислоти. Після введення зразок елюювали градієнтом від 5% до 60% ацетонітрилу у тому самому буфері протягом 50хв.

Спосіб В1.

RP-аналіз здійснювали, застосовуючи ультрафіолетове детектування при 214, 254, 276 та 301нм на 218TP54 4,6ммх250мм 5м C-18 силікагелевій колонці (The Separations Group, Hesperia), яку елюювали при 1мл/хв і 42°С. Колонку врівноважували 5% (ацетонітрил+0,1 % TFA) у водному розчині TFA у воді (0,1%). Після введення зразок елюювали градієнтом від 5% до 60% (ацетонітрил+0,1% TFA) у тому самому водному буфері протягом 50хв.

Спосіб h8:

RP-аналіз здійснювали, застосовуючи ультрафіолетове детектування при 214 та 254нм на 218TP54 4,6ммх150мм C-18 силікагелевій колонці, яку елюювали при 1мл/хв і 42 °С. Колонку врівноважували 5% ацетонітрилу, 85% води та 10% розчину 0,5% трифторооцтової кислоти у воді і елюювали лінійним градієнтом від 5% ацетонітрилу, 85% води та 10% розчину 0,5% трифторооцтової кислоти до 90% ацетонітрилу та 10% розчину 0,5% трифторооцтової кислоти за 15хв.

Хіральна HPLC:

Хіральну HPLC здійснювали, застосовуючи ультрафіолетове детектування при 225 та 254нм на 4,6мм X 250мм колонці Chiracel OJ, оснащеною 4,6ммх80мм попередньою колонкою Chiracel OJ, (обидві від Daicel Chemical Industries, LTD), які елюювали при 0,7мл/хв при кімнатній температурі. Зразок елюювали ізократичним елюентом гептану(92):iPrOH(8):TPA(0,1).

LC-MS-аналіз:

LC-MS-аналізи здійснювали на системі PE Sciex AP1100 LC/MS, застосовуючи симетричну колонку Waters® 3ммх150мм 3,5м C-18 та розпилення позитивних іонів при швидкості потоку 20мл/хв. Колонку елюювали лінійним градієнтом 5-90% ацетонітрилу, 85-0% води та 10 % трифторооцтової кислоти (0,1%)/ води за 15хв при швидкості потоку 1мл/хв.

Скорочення:

TLC: тонкошарова хроматографія

DMSO: диметилсульфоксид

хв: хвилини

год: години

Woc: трет-бутилоксикарбоніл

DMF: диметилформамід

THF: тетрагідрофуран

EDAC: N-етил-N'-диметиламінопропілкарбодимідгідрохлорид

HOAt: 1-гідроксис-7-азабензотриазол

DIEA: діізопропілетиламін

TFA: трифторооцтова кислота

Складові блоки:

N-метильовані амінокислоти, застосовані у представлених нижче прикладах, одержували, як описано у Can. J. Chem. 1977, 55, 906.

N',N'-диметилгідрозид мурашиної кислоти

Суміш 50мл метилформату та 50мл 1,1-диметилгідрозину перемішували протягом 3 днів при кімнатній температурі. Концентрували in vacuo для утворення кристалів, які перемішували в EtOH(3):гептані(95), охолоджували в холодильнику до наступного дня і фільтрували: 50,7г (575ммоль) (Вихід: 88%)

N,N,N'-триметилгідрозин. дигідрохлорид

У дволітрову колбу з трьома шийками та круглим дном, оснащену магнітною мішалкою та лійкою для подачі, подавали 20,4г LiAlH₄, відкачували повітря і промивали азотом. Лійку для подачі після цього оснащали азотним барботером і повільно додавали 250мл сухого тетрагідрофурану (екзотермічно). Суспензію сірого кольору енергійно перемішували і по краплях протягом 1 години додавали розчин 40,0г N,N'-диметилгідрозиду мурашиної кислоти в 250мл сухого тетрагідрофурану. Перемішували до наступного дня при кімнатній температурі. Реакцію контролювали за допомогою TLC (CH₂Cl₂(100):MeOH(10):NH₃(1)).

У другу дволітрову колбу з трьома шийками та круглим дном, оснащену конденсатором сухого льоду, подавали 350мл 4,8М HCl/CH₃OH і поміщували у баню з сухим льодом (-70°С). Потім її з'єднували з реакційною колбою через вігреух-конденсатор, і реакційну колбу поміщували на олійну баню. До реакційної суміші обережно додавали суміш 200мл тетрагідрофурану та 200мл MeOH. Дистиляцію продукту та розчинника

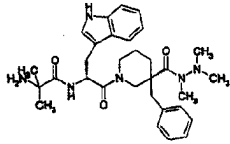
здійснювали шляхом повільного нагрівання до 130 °С, в результаті чого збирали кристалічну дигідрохлоридну сіль триметилгідазину (при -70°С). Баню з сухим льодом видаляли і температури давали піднятися до кімнатної температури. Концентрація in vacuo давала рідку безбарвну олію, яку висушували до наступного дня, застосовуючи високовакуумний насос: 45,2г (309ммоль) (Вихід: 68%). Цей дуже гігроскопічний продукт тримали в атмосфері азоту.

Інші вихідні матеріали можна придбати у Aldrich.

Приклад 1

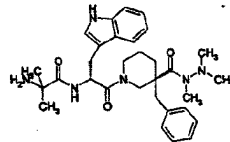
Процедура одержання сполуки, яка є або

2-аміно-N-[(1R)-2-[(3R)-3-бензил-3-(N,N,N'-триметилгідазинокарбоніл)піперидин-1-іл]-1-(1H-індол-3-ілметил)-2-оксоетил]-2-метилпропіонамідом



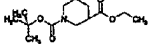
або

2-аміно-N-[(1R)-2-[(3S)-3-бензил-3-(N,N,N'-триметилгідазинокарбоніл)піперидин-1-іл]-1-(1H-індол-3-ілметил)-2-оксоетил]-2-метилпропіонамідом



Етап а

3-етилловий естер піперидин-1,3-дикарбонОВОї кислоти 1-трет-бутилового естеру

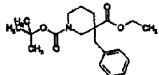


В однілітрову колбу з однією шийкою та круглим дном, оснащену магнітною мішалкою та лійкою для подачі завантажували гранули NaOH (15,6г), тетрагідрофуран (400мл) та етилніпекотат (50мл, 324ммоль). До перемішуваної суміші при кімнатній температурі по краплях додавали розчин CoC_2O (84,9г, 389ммоль), розчиненого в тетрагідрофурані (150мл) (1год, білий твердий осад, розчинений з гранулами NaOH, екзотерм.). Суміш перемішували до наступного дня при кімнатній температурі. Цю суміш додавали до ЕЮАс (500мл) та H_2O (2000мл), і водний шар реекстрагували EtOAc (2X500мл) і комбіновані органічні шари промивали сольовим розчином (100мл), висушували над MgSO_4 , фільтрували і концентрували in vacuo для одержання 3-етиллового естеру піперидин-1,3-дикарбонОВОї кислоти 1-трет-бутилового естеру (82,5г) у вигляді рідкої жовтої олії.

$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3): δ 1,25 (t, 3H, CH_3); 1,45 (s, 9H, 3XCH_3); 2,05 (m, 1H); 2,45 (m, 1H); 2,85 (m, 1H); 3,95 (d (широк.), 1H); 4,15 (q, 2H, CH_2)

Етап б

3-етилловий естер 3-бензилпіперидин-1,3-дикарбонОВОї кислоти 1-трет-бутилового естеру (рацемічна суміш)

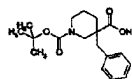


З дволітрової колби з трьома шийками та круглим дном, оснащеної магнітною мішалкою, термометром, азотним барботером та лійкою для подачі відкачували повітря, промивали азотом, завантажували безводним тетрагідрофураном (500мл) і охолоджували до -70°С. Потім додавали діізопропіламін літію (164мл 2,0M розчину в тетрагідрофурані, 327ммоль). До перемішуваного розчину при -70°С по краплях протягом 45хв додавали розчин 3-етиллового естеру піперидин-1,3-дикарбонОВОї кислоти 1-трет-бутилового естеру (80г, 311ммоль) у безводному тетрагідрофурані (50мл) (температура від -70°С до -60°С, прозорий червоний розчин). Суміш перемішували протягом 20хв., після чого протягом 40хв. по краплях додавали розчин бензилброміду (37мл, 311ммоль) у безводному тетрагідрофурані (250мл) (температура від -70°С до -60°С). Суміш перемішували протягом 1 години при -70°С, а потім залишали до наступного дня при кімнатній температурі (блідо-оранжевий колір). Реакційну суміш концентрували in vacuo до приблизно 300мл, переносили до ділильної лійки, розріджували CH_2Cl_2 (900мл) і промивали H_2O (900мл). Через погане відокремлення водний шар реекстрагували CH_2Cl_2 (200мл), комбіновані органічні шари промивали водним розчином NaHSO_4 (200мл, 10%), водним розчином NaHCO_3 (200мл, насичен.), H_2O (200мл), сольовим розчином (100мл), висушували над MgSO_4 , фільтрували і концентрували in vacuo для одержання олії, яку розчиняли в EtOAc (1):гептані(10) і окиснювали до наступного дня. Утворені тверді речовини видаляли шляхом фільтрації, промивали гептаном і висушували in vacuo для одержання рацемічної суміші 3-етиллового естеру 3-бензилпіперидин-1,3-дикарбонОВОї кислоти 1-трет-бутилового естеру (81,4г).

HPLC (h8):	Rt=15,79хв.	
LC-MS:	Rt=7,67хв.	(m+1)=348,0

Етап в

1-трет-бутиловий естер 3-бензилпіперидин-1,3-дикарбонової кислоти (рацемічна суміш)



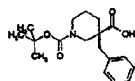
5 3-етиловий естер 3-бензилпіперидин-1,3-дикарбонової кислоти 1-трет-бутилового естеру (81 г, 233ммоль) розчиняли в EtOH (400мл) та NaOH (400мл, 16% водний розчин) в однієї шийкою та круглим дном, оснащений конденсатором та магнітною мішалкою. Суміш піддавали дефлегмації протягом 10год в атмосфері азоту і охолоджували до кімнатної температури, концентрували in vacuo до приблизно 600мл (твердий осад), розріджували H₂O (400мл), охолоджували в льодяній ванні і при енергійному перемішуванні підкислювали 4M H₂SO₄ до pH=3 (кінцева температура 28°C). Суміш екстрагували EtOAc (2X700мл) і комбіновані органічні шари промивали сольовим розчином (200мл), висушували над MgSO₄, фільтрували і концентрували in vacuo для одержання олії, яку розчиняли в EtOAc (1):гептані(10) і окиснювали до наступного дня. Утворені кристали видаляли шляхом фільтрації, промивали гептаном і висушували in vacuo для одержання рацемічної суміші 1-трет-бутилового естеру 3-бензилпіперидин-1,3-дикарбонової кислоти (66,0г)

HPLC (h8):	Rt=12,85хв.	
LC-MS:	Rt=5,97хв.	(m+1)=320,0

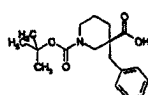
Хіральна HPLC(Chiracel OJ, гептан(92):iPrOH(8):TPA(0,1)):	Rt=8,29хв.	46,5%
	Rt=13,69хв.	53,5%

Етап г

25 1-трет-бутиловий естер (3R)-3-бензилпіперидин-1,3-дикарбонової кислоти або 1-трет-бутиловий естер (3S)-3-бензилпіперидин-1,3-дикарбонової кислоти
(Зворотне розчинення 1-трет-бутилового естеру 3-бензилпіперидин-1,3-дикарбонової кислоти)



30 або



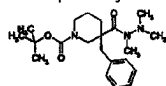
35 1-трет-бутиловий естер 3-бензилпіперидин-1,3-дикарбонової кислоти (76г, 238ммоль) розчиняли в EtOAc (S₁O L) у п'ятилітровій колбі з однією шийкою, оснащений магнітною мішалкою. Потім додавали H₂O (30мл), R(+)-1-фенетиламін (18,2мл, 143ммоль) та Et₃N (13,2мл, 95ммоль) і суміш перемішували до наступного дня при кімнатній температурі, в результаті чого осаджувалися білі кристали (41,9г), які видаляли шляхом фільтрації, промивали EtOAc і висушували in vacuo. Осад розчиняли в суміші водного NaHSO₄ (300мл, 10%) та EtOAc (6X)мл, шари відокремлювали і водний шар реекстрагували EtOAc (100мл). Комбіновані органічні шари промивали сольовим розчином (100мл), висушували над MgSO₄ і фільтрували. Розчинник видаляли in vacuo для одержання безбарвної олії, яку розчиняли в EtOAc (1):гептані(10) і окиснювали до наступного дня. Утворені кристали видаляли шляхом фільтрації, промивали гептаном і висушували in vacuo для одержання однієї сполуки, яка є або 1-трет-бутиловим естером (3R)-3-бензилпіперидин-1,3-дикарбонової кислоти, або 1-трет-бутиловим естером (3S)-3-бензилпіперидин-1,3-дикарбонової кислоти (27,8г).

Хіральна HPLC (Chiracel OJ, гептан(92):iPrOH(8):TPA(O₁)):

Rt=7,96хв. 95,8% ee

Етап д

50 Трет-бутиловий естер (3R)-3-бензил-3-(N,N,N'-триметилгідразинокарбоніл)піперидин-1-карбонової кислоти або трет-бутиловий естер (3S)-3-бензил-3-(N,N,N'-триметилгідразинокарбоніл)піперидин-1-карбонової кислоти



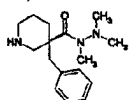
55 Триметилгідрзиндигідрохлорид (15,3г, 104ммоль) суспендували у тетрагідрофурани (250мл) в однієї шийкою та круглим дном, оснащений великою магнітною мішалкою та лійкою для подачі/азотним барботером. Після цього колбу поміщували у водяну баню (темп.: 10-20 °C), додавали бром-трис-піролідино-фосфоній-гексафторофосфат (40,4г, 86,7ммоль) і при енергійному перемішуванні по краплях додавали діізопропілетиламін (59мл, 347ммоль). Суміш (з інтенсивним осадженням) перемішували протягом 5хв і протягом 1,5год повільно додавали розчин продукту етапу г, який був або 1-трет-бутиловим естером (3R)-3-бензилпіперидин-1,3-дикарбонової кислоти, або 1-трет-бутиловим естером (3S)-3-бензилпіперидин-1,3-дикарбонової кислоти (27,7г, 86,7ммоль) у тетрагідрофурани (250мл). Суміш перемішували до наступного дня при кімнатній температурі. Реакційну суміш розріджували EtOAc (1000мл), промивали H₂O (500мл), водним розчином NaHSO₄, (200мл, 10%), водним розчином NaHCO₃ (200мл, насиченим), сольовим розчином (200мл), висушували над MgSO₄, фільтрували і концентрували in vacuo для одержання рідкої оранжевої олії. Суміш розчиняли в EtOAc (300мл), додавали до SiO₂ (150г) і концентрували in vacuo до одержання білого порошку, який наносили на фільтр з SiO₂ (150г), промивали гептаном (1л) і

потрібну сполуку виділяли з застосуванням EtOAc (2,51). Після концентрації in vacuo одержували продукт, який був або трет-бутиловим естером (3R)-3-бензил-3-(N,N',N'-триметилгідразинокарбоніл)-піперидин-1-карбонової кислоти, або трет-бутиловим естером (3S)-3-бензил-3-(N,N',N'-триметилгідразинокарбоніл)-піперидин-1-карбонової кислоти (49г) у вигляді оранжевої олії.

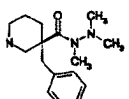
HPLC (h8): Rt=14,33хв.

Етап е

Триметилгідрозид (3R)-3-бензил-піперидин-3-карбонової кислоти або триметилгідрозид (3S)-3-бензил-піперидин-3-карбонової кислоти



або



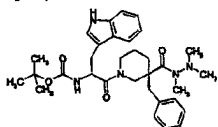
Продукт етапу д, який є або трет-бутиловим естером, (3R)-3-бензил-3-(N,N',N'-триметилгідразинокарбоніл)-піперидин-1-карбонової кислоти, або трет-бутиловим естером (3S)-3-бензил-3-(N,N',N'-триметилгідразинокарбоніл)-піперидин-1-карбонової кислоти (56,7г, 100,9ммоль), розчиняли в EtOAc (500мл) (прозорий безбарвний розчин) у дволітровій колбі з однією шийкою та круглим дном, оснащеною магнітною мішалкою. Після цього колбу розміщували на водяну баню (темп. 10-20°C) і протягом 5хв крізь розчин пропускали HCl-газ (пилоподібний осад). Після перемішування протягом 1год (осадження великої кількості білих кристалів) розчин промивали N2 для видалення надлишку HCl. Осад видаляли шляхом обережної фільтрації, промивали EtOAc (2X100мл) і висушували у вакуумі при 40 °C до наступного дня для одержання продукту, який є або триметилгідрозидом (3R)-3-бензил-піперидин-3-карбонової кислоти, або триметилгідрозидом (3S)-3-бензил-піперидин-3-карбонової кислоти (37,0г).

HPLC (h8): Rt=7,84хв.

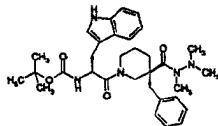
Етап є

Трет-бутиловий естер

[(1R)-2-[(3R)-3-бензил-3-(N,N',N'-триметилгідразинокарбоніл)-піперидин-1-іл]-1-((1H-індол-3-іл)метил)-2-оксоетил]карбамінової кислоти або трет-бутиловий естер [(1R)-2-[(3S)-3-бензил-3-(N,N',N'-триметилгідразинокарбоніл)-піперидин-1-іл]-1-((1H-індол-3-іл)метил)-2-оксоетил]карбамінової кислоти



або

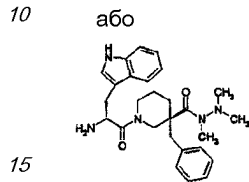
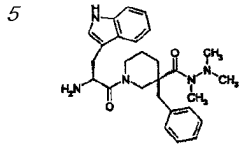


Вос-D-Трр-ОН (32,3г, 106ммоль) розчиняли в диметилацетаміді (250мл) у колбі з однією шийкою та круглим дном (500мл), оснащений магнітною мішалкою та азотним барботером. Розчин охолоджували до 0-5°C і додавали 1-гідрокси-7-азабензотриазол (14,4г, 106ммоль), 1-етил-3-(3-диметиламінопропіл)карбодіімідгідрохлорид (20,3г, 106ммоль), N-метилморфолін (11,6мл, 106ммоль). Після перемішування протягом 20хв. при 0-5 °C додавали продукт етапу є, який був або триметилгідрозидом (3R)-3-бензил-піперидин-3-карбонової кислоти, або триметилгідрозидом (3S)-3-бензил-піперидин-3-карбонової кислоти (37,0г, 106ммоль), та N-метилморфолін (24,4мл, 223ммоль). Реакційну суміш перемішували до наступного дня при кімнатній температурі. Потім цю суміш додавали до EtOAc (750мл) і промивали водним розчином NaHSO₄ (300мл, 10%). Шарам давали відокремитись і водний шар реекстрагували EtOAc (500мл). Комбіновані органічні шари промивали H₂O (100мл), водним розчином NaHCO₃ (300мл, насиченим), H₂O (100мл), сольовим розчином (300мл), висушували над MgSO₄, фільтрували і концентрували in vacuo для одержання продукту, який є або трет-бутиловим естером [(1R)-2-[(3R)-3-бензил-3-(N,N',N'-триметилгідразинокарбоніл)піперидин-1-іл]-1-((1H-індол-3-іл)метил)-2-оксоетил]карбамінової кислоти, або трет-бутиловим естером [(1R)-2-[(3S)-3-бензил-3-(N,N',N'-триметилгідразинокарбоніл)піперидин-1-іл]-1-((1H-індол-3-іл)метил)-2-оксоетил]карбамінової кислоти (56,7г) у вигляді оранжевої олії.

HPLC (h8):	Rt=14,61хв.	
LC-MS:	Rt=7,35хв.	(m+1)=562,6

Етап ж

Триметил гідразид 1-[(2R)-2-аміно-3-(1H-індол-3-іл)пропіоніл]-(3R)-3-бензилпіперидин-3-карбонової кислоти або триметилгідразид 1-[(2R)-2-аміно-3-(1H-індол-3-іл)пропіоніл]-(3S)-3-бензилпіперидин-3-карбонової кислоти



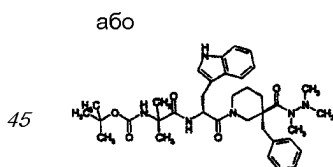
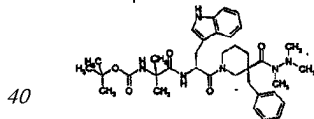
Продукт етапу є, який є або трет-бутиловим естером [(1R)-2-[(3R)-3-бензил-3-(N,N',N'-триметилгідразинокарбоніл)піперидин-1-іл]-1-((1H-індол-3-іл)метил)-2-оксоетил]карбамінової кислоти, або трет-бутиловим естером [(1R)-2-[(3R)-3-бензил-3-(N,N',N'-триметилгідразинокарбоніл)піперидин-1-іл]-1-((1H-індол-3-іл)метил)-2-оксоетил]карбамінової кислоти (56,7г, 100,9ммоль) розчиняли в EtOAc (500мл) (прозорий безбарвний розчин) у колбі з однією шийкою та круглим дном (2л), оснащеною магнітною мішалкою. Після цього колбу розміщували на водяну баню (темп. 10-20°C) і крізь розчин протягом 10хв пропускали HCl-газ (інтенсивне осадження олії). Суміш промивали N₂ для видалення надлишку HCl, а потім розділяли на олійний та EtOAc-шари. EtOAc-шар видаляли. Олію розчиняли в H₂O (500мл), CH₂Cl₂ (1000мл) і додавали тверду сіль Na₂CO₃ до pH>7. Шари відокремлювали і органічний шар промивали H₂O (100мл), сольовим розчином (100мл), висушували над MgSO₄, фільтрували і концентрували in vacuo для одержання продукту, який є або триметилгідразидом 1-[(2R)-2-аміно-3-(1H-індол-3-іл)пропіоніл]-(3R)-3-бензилпіперидин-3-карбонової кислоти, або триметилгідразидом 1-[(2R)-2-аміно-3-(1H-індол-3-іл)пропіоніл]-(3S)-3-бензилпіперидин-3-карбонової кислоти (27г) у вигляді оранжевої піни.

HPLC(h8): Rt=10,03хв.

Етап з

Трет-бутиловий естер

35 {1-[(1R)-2-[(3R)-3-бензил-3-(N,N',N'-триметилгідразинокарбоніл)піперидин-1-іл]-1-(1H-індол-3-іл)метил)-2-оксоетилкарбамоїл]-1-метилетил}карбамінової кислоти або трет-бутиловий естер {1-[(1R)-2-[(3S)-3-бензил-3-(N,N',N'-триметилгідразинокарбоніл)піперидин-1-іл]-1-(1H-індол-3-іл)метил)-2-оксоетилкарбамоїлі-1-метилетил}карбамінової кислоти

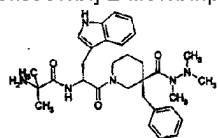


50 Вос-Aib-OH (11,9г, 58,4ммоль) розчиняли в диметилацетаміді (125мл) у колбі з однією шийкою та круглим дном (500мл), оснащений магнітною мішалкою та азотним барботером. До перемішаного розчину при кімнатній температурі додавали 1-гідрокси-7-азабензотриазол (7,95г, 58,4ммоль), 1-етил-3-(3-диметиламінопропіл)карбодіімідгідрохлорид (11,2г, 58,4ммоль), та діізопропілетиламін (13,0мл, 75,8ммоль). Через 20хв (жовтий з осадом) додавали розчин продукту етапу ж, який є або триметилгідразидом 1-[(2R)-2-аміно-3-(1H-індол-3-іл)пропіоніл]-(3R)-3-бензилпіперидин-3-карбонової кислоти, або триметилгідразидом 1-[(2R)-2-аміно-3-(1H-індол-3-іл)пропіоніл]-(3S)-3-бензилпіперидин-3-карбонової кислоти (27,0г, 58,4ммоль) у диметилацетаміді (125мл). Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 3год. Цю суміш додавали до EtOAc (750мл) і промивали водним розчином NaHCO₃ (300мл, 10%). Шарам давали відокремитись і водний шар реекстрагували EtOAc (500мл). Комбіновані органічні шари промивали H₂O (100мл), водним розчином NaHCO₃ (300мл, насиченим), H₂O (100мл), сольовим розчином (300мл), висушували над MgSO₄, фільтрували і концентрували in vacuo до приблизно 500мл. Потім додавали SiO₂ (150г) і решту EtOAc видаляли in vacuo для одержання сухого порошку, який наносили на фільтр з SiO₂ (150г), промивали гептаном (1л) і потрібну сполуку виділяли з застосуванням EtOAc (2,5л). Після концентрації in vacuo одержували продукт, який є або трет-бутиловим естером {1-[(1R)-2-[(3R)-3-бензил-3-(N,N',N'-триметилгідразинокарбоніл)піперидин-1-іл]-1-(1H-індол-3-іл)метил)-2-оксоетилкарбамоїл]-1-метилетил}карбамінової кислоти, або трет-бутиловим естером {1-[(1R)-2-[(3S)-3-бензил-3-(N,N',N'-триметилгідразинокарбоніл)піперидин-1-іл]-1-(1H-індол-3-іл)метил)-2-оксоетилкарбамоїл]-1-метилетил}карбамінової кислоти, 33,9г у вигляді оранжевої піни.

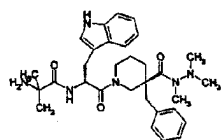
HPLC(h8): Rt=14,05хв.

Етап и

2-аміно-N-[(1R)-2-[(3R)-3-бензил-3-(N,N',N'-триметилгідразинокарбоніл)піперидин-1-іл]-1-(1H-індол-3-ілметил)-2-оксоетил]-2-метилпропіонамід, фумарат або
2-аміно-N-[(1R)-2-[(3S)-3-бензил-3-(N,N',N'-триметилгідразинокарбоніл)піперидин-1-іл]-1-(1H-індол-3-ілметил)-2-оксоетил]-2-метилпропіонамід, фумарат



або



Продукт етапу з, який є або трет-бутиловим естером

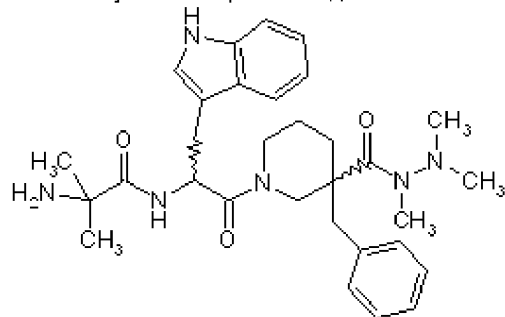
{1-[(1R)-2-[(3R)-3-бензил-3-(N,N',N'-триметилгідразинокарбоніл)піперидин-1-іл]-1-(1H-індол-3-ілметил)-2-оксо-етилкарбамоїл]-1-метилетил}карбамінової кислоти, або трет-бутиловим естером
{1-[(1R)-2-[(3S)-3-бензил-3-(N,N',N'-триметилгідразинокарбоніл)піперидин-1-іл]-1-(1H-індол-3-ілметил)-2-оксо-етилкарбамоїл]-1-метилетил}карбамінової кислоти (23,8г, 36,8ммоль) розчиняли в EtOAc (800мл) (прозорий жовтий розчин) у колбі з однією шийкою та круглим дном (1л), оснащених магнітною мішалкою. Після цього колбу розміщували на водяну баню (температура 10-20 °C) і крізь розчин протягом 5хв пропускали HCl-газ (пилподібний осад). Після перемішування протягом 1 год (осаження великої кількості жовтого порошку) розчин промивали N₂ для видалення надлишку HCl. Осад видаляли шляхом обережної фільтрації і висушували у вакуумі при 40°C до наступного дня.

Некристалічний осад розчиняли в H₂O (500мл) і промивали EtOAc (100мл). Потім додавали CH₂Cl₂ (1000мл) та тверду сіль MgCO₃ до pH>7. 2 шари відокремлювали один від одного і водний шар реекстрагували CH₂Cl₂ (200мл). Комбіновані органічні шари промивали сольовим розчином (100мл), висушували над MgSO₄ і фільтрували. Розчинник випарювали в умовах зниженого тиску і піддавали зворотному розчиненню в EtOAc (500мл) у колбі з однією шийкою та круглим дном (1л), оснащених магнітною мішалкою. Поволі додавали суспензію фумарової кислоти (3,67г) в ізопропанолі (20мл) та EtOAc (50мл) (5хв.), в результаті чого осаджувалася біла кристалічна сіль. Через 1 годину осад відокремлювали шляхом фільтрації і висушували до наступного дня у вакуумі при 40 °C для одержання фумаратної солі сполуки, яка є або
2-аміно-N-[(1R)-2-[(3R)-3-бензил-3-(N,N',N'-триметилгідразинокарбоніл)піперидин-1-іл]-1-(1H-індол-3-ілметил)-2-оксоетил]-2-метилпропіонамідом або
2-аміно-N-[(1R)-2-[(3S)-3-бензил-3-(N,N',N'-триметилгідразинокарбоніл)піперидин-1-іл]-1-(1H-індол-3-ілметил)-2-оксоетил]-2-метилпропіонамідом (13,9г), у вигляді білого порошку.

HPLC(A1):	Rt=33,61хв.	
HPLC(B1):	Rt=34,62хв.	
LC-MS:	Rt=5,09хв.	(t+1)=547,4

Формула винаходу

1.
2-аміно-N-[(1R)-2-[(3R)-3-бензил-3-(N,N',N'-триметилгідразинокарбоніл)піперидин-1-іл]-1-(1H-індол-3-ілметил)-2-оксоетил]-2-метилпропіонамід



або його фармацевтично прийнятна сіль.

2. Фармацевтична композиція, яка містить як активний інгредієнт сполуку за п. 1 разом із фармацевтично прийнятним носієм або розріджувачем.

3. Фармацевтична композиція за п. 2 для стимулювання вивільнення гормону росту з гіпофізу.
4. Фармацевтична композиція за п. 2 або 3 для введення тваринам для збільшення швидкості та міри росту, для збільшення їх удійності та росту шерсті, або для лікування захворювань.
5. Спосіб стимулювання вивільнення гормону росту з гіпофізу ссавця, який включає введення вищезгаданому ссавцеві ефективної кількості сполуки за п. 1 або фармацевтичної композиції згідно з будь-яким з пп. 2-4.
6. Спосіб збільшення швидкості та міри росту, збільшення удійності та росту шерсті, або лікування захворювань, який включає введення суб'єктові, який цього потребує, ефективної кількості сполуки за п. 1 або фармацевтичної композиції згідно з будь-яким з пп. 2-4.
7. Застосування сполуки за п. 1 або її фармацевтично прийнятної солі для одержання медикаменту.
8. Застосування за п. 7 для одержання медикаменту для стимулювання вивільнення гормону росту з гіпофізу ссавця.

Офіційний бюлетень "Промислова власність". Книга 1 "Винаходи, корисні моделі, топографії інтегральних мікросхем", 2005, N 8, 15.08.2005. Державний департамент інтелектуальної власності Міністерства освіти і науки України.

U A 7 3 5 3 0 C 2

U A 7 3 5 3 0 C 2