



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **77644** (13) **C2**  
(51) **МПК (2006)**  
**A61K 31/40**  
**A61P 15/08 (2006.01)**

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

**(54) ЗАСТОСУВАННЯ ІНГІБІТОРА ДИПЕПТИДИЛПЕПТИДАЗИ IV ДЛЯ ПОКРАЩЕННЯ ФЕРТИЛЬНОСТІ**

1

(21) 2001096488  
(22) 21.03.2000  
(24) 15.01.2007  
(86) РСТ/IB00/00382, 21.03.2000  
(31) 9906714.2  
(32) 23.03.1999  
(33) GB  
(46) 15.01.2007, Бюл. № 1, 2007 р.  
(72) Брока П'єр, FR  
(73) ФЕРРИНГ Б.В., NL  
(56) WO A 98/19998 14.05.1998  
WO A 93/08259 29.04.1993  
(57) 1. Застосування інгібітора дипептидилпептидази IV для виготовлення фармацевтичної композиції для покращення фертильності.  
2. Застосування за п.1 для лікування безпліддя або для сприяння заплідненню.  
3. Застосування за п.1 або 2, де фармацевтичну композицію використовують для лікування без-

2

пліддя, викликаного синдромом полікістозу яєчників.  
4. Застосування за п. 1, 2 або 3 де інгібітор дипептидилпептидази IV містить аміноацилпіролідіннітрил.  
5. Застосування за будь-яким з пп. 1-4, де фармацевтичній композиції надано форму для перорального введення.  
6. Застосування за п.5, де фармацевтична композиція є таблеткою або капсулою.  
7. Застосування за будь-яким з пп. 1-6, де один або декілька інгібіторів дипептидилпептидази IV є єдиним компонентом фармацевтичної композиції.  
8. Спосіб лікування безпліддя або сприяння заплідненню, в якому пацієнту вводять фармацевтичну композицію, що містить інгібітор дипептидилпептидази IV.

Даний винахід стосується агентів та композицій для покращення фертильності у тварин, зокрема у особин жіночої статі, та людей.

Інгібітори ДП-IV

Дипептидилпептидаза IV (ДП-IV, також дипептидиламінопептидаза IV, ДПП-IV, ДАП-IV, EC 3.4.14.5) є серіпептидазою, що відщиплює амінокінцевий дипептид від пептидів та протеїнів. Вона розпізнає субстрати, в яких N-термінальною послідовністю є X-пролін або X-аланін. Інгібітори ДП-IV були запропоновані як терапевтичні агенти для лікування запалень та СНІДу. Головним чином, відомі інгібітори ДП-IV аналогічні субстратам. Приклади інгібіторів ДП-IV наведені в: [DD 296075A5 (Neubert et al., November 1991), WO91/16339 (Bachovchin et al., October 1991), WO93/08259 (Bachovchin et al., April 1993), WO95/15309 (Jenkins et al., June 1995), WO98/19998 (Villhauer, May 1998), WO99/46272 (Scharpe et al., September 1999) та WO99/61431 (Demuth et al., December 1999)]. Проліки деяких із цих інгібіторів також опи-

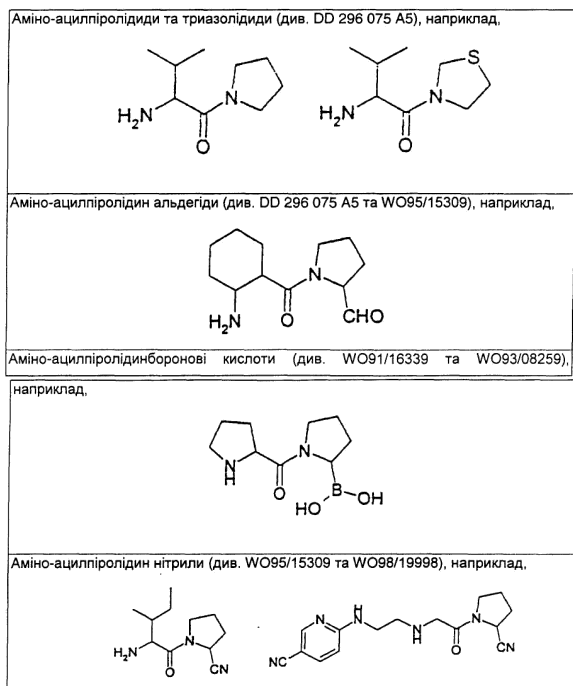
сані в [WO99/67278 та WO99/67279 (Demuth et al., December 1999)].

У наступній таблиці наведено основні типи сполук-інгібіторів ДП-IV, а також їх специфічні приклади, яким віддається перевага при використанні у даному винаході; в ній також вказані патентні публікації, з ширшого спектру сполук яких взяті ці типи і приклади. Підкреслюється, що всі інгібітори ДП-IV, розкриті у цитованих описах DD та WO, можуть використовуватися у даному винаході, і посилення позитивно спрямоване на ці попередні описи для одержання повної інформації про загальні та специфічні формули, а також про окремі сполуки, що стосуються цього. Наприклад, вказані в наведеній нижче таблиці піролідінові та тριαзолідинові кільця можуть замінюватися рядом інших гетероциклів з різними розмірами кільця та/чи вказані аміноацилові частки можуть замінюватися рядом інших, як згадується у вказаних публікаціях, з метою використання інгібіторів ДП-IV у даному винаході.

(13) **C2**

(11) **77644**

(19) **UA**



### Синдром полікістозу яєчників

Синдром полікістозу яєчників (СПКЯ, синдром Штейна-Левенталю) - це стан, який характеризується потовщенням оваріальної капсули і утворенням множинних фолікулярних кіст, та приводить до безпліддя та аменореї. Рівні циркулюючих гормонів - порушуються, лютеїнізуючого гормону (ЛГ) і стероїдів - підвищуються, а фолікулостимулюючого гормону (ФСГ) - зменшуються. Хоча вважають, що такий стан є наслідком анормальної секреції гонадотропного релізінг-гормону (ГнРГ) з гіпоталамусу, фізіологічний дефект, що є основою СПКЯ, залишається предметом дослідження. Використання програми лікування, що контролює рівні ЛГ та ФСГ, може мати результатом запліднення, але така програма - комплексна і дорога. Ми виявили, що інгібітори ДП-IV виявилися корисними при лікуванні СПКЯ.

Першим аспектом даного винаходу є фармацевтична композиція для лікування безпліддя, яка характеризується вмістом інгібіторів ДП-IV. Другим аспектом даного винаходу є нове використання інгібіторів ДП-IV, а саме при лікуванні безпліддя, особливо безпліддя у жінок, викликаного СПКЯ. Третім аспектом даного винаходу є спосіб для сприяння запліднення у суб'єктів з СПКЯ, предметом якого є призначення композиції, що містить інгібітор ДП-IV.

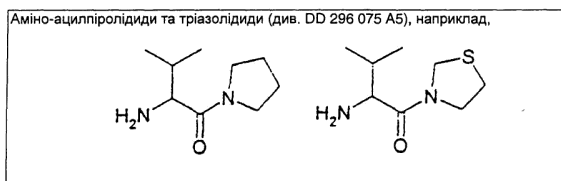
Використання інгібіторів ДП-IV таким чином має багато переваг над теперішніми програмами лікування, що включають агоністи ГнРГ, а також ФСГ та ЛГ. ЛГ і ФСГ є великими пептидами, виділеними із природних джерел (як правило, з сечі жінок після менопаузи) або одержаними в культурі з використанням рекомбінантних клітин. Виділення із сечі вимагає уваги через ризик передавання хвороби та наявність антигенних протеїнових за-

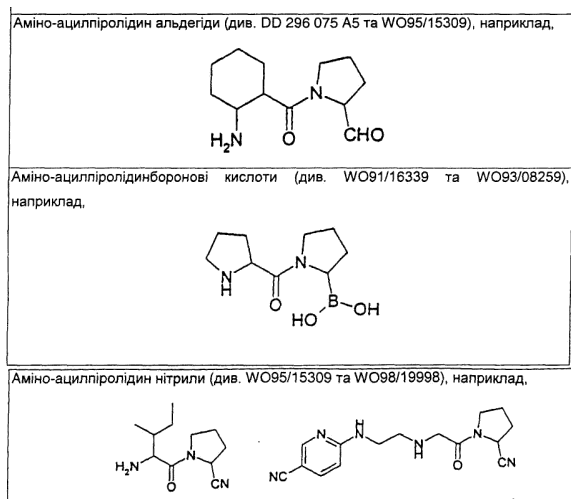
бруднювачів. Не схоже, щоб рекомбінантні гормони передавали людські патогени, але вони потенційно заражаються антигенним протеїном, і вважаються дешевшими за сечевий білок. Крім того, рекомбінантні пептиди не мають повністю "олюдненої" структури гідроксилування, яка може призвести до антигенності та зниженої ефективності. Агоністи ГнРГ, як правило, є декапептидами, які вимагають багатошагового синтезу. Навпаки, інгібіторами ДП-IV є маленькі молекули, легкодоступні для використання стандартними синтетичними способами. Вони - не антигенні, їх легко очистити, і вони - недорогі.

Ще одна перевага в тому, що інгібітори ДП-IV у багатьох випадках є біологічно активними після орального застосування, на противагу агоністам ГнРГ, ФСГ та ЛГ, які потрібно застосовувати шляхом ін'єкцій. Таким чином, використання інгібіторів ДП-IV призводить до менш інвазивного способу, який є менш стресовим для пацієнта.

Фармацевтична композиція даного винаходу є особливо ефективною при лікуванні безпліддя у жінок. Переважно безпліддя є результатом синдрому полікістозу яєчників. Композиція характеризується вмістом інгібітора ДП-IV. Композиція також може містити відомі фармацевтично прийнятні наповнювачі, такі як розріджувачі, носії, наповнювачі, в'язучі речовини, диспергуючі агенти, стабілізуючі агенти тощо.

В контексті даного винаходу, сполука вважається інгібітором ДП-IV, якщо вона інгібує активність фермента при концентрації 1мкМ. Переважно, така сполука інгібує активність ДП-IV при концентрації нижче 100нМ і не інгібує інші ферменти при концентрації нижче 1мкМ. У наведеній нижче таблиці показані основні типи сполук-інгібіторів ДП-IV, їх специфічні приклади, яким віддається перевага при використанні у даному винаході; там також наведені патентні публікації, з ширшого спектру сполук яких взяті ці типи і приклади. Звертаємо увагу на те, що всі інгібітори ДП-IV, розкриті в цитованих описах DD і WO можна використовувати у даному винаході, і посилання позитивно спрямовується на попередні описи для одержання повної інформації про загальні та специфічні формули, а також про окремі сполуки, що стосуються цього. Наприклад, в нижченаведеній таблиці показано, що піролідинове та триазолідинове кільця можуть заміщуватися іншими гетероциклами з різними розмірами кілець, та/чи вказані аміноацилові частки можуть заміщуватися рядом інших, як вказано у даних публікаціях з метою застосування інших інгібіторів ДП-IV у даному винаході.





Переважає при застосуванні винаходу інгібітор ДП-IV є аміно-ацилпіролідіновий нітрил. Особливо віддається перевага аміно-ацилпіролідіновим нітрилам, які розкриті в WO95/15309 та WO98/19998.

Композиціям згідно даного винаходу можна надавати різної форми для призначення людині різними відомими способами, включаючи оральне застосування, трансмукосальне застосування (як, наприклад, транбукальне, під'язикове, внутрішньоносове, вагінальне, та ректальне застосування), трансдермальне застосування та ін'єкції (включаючи внутрішньовенні, внутрішньом'язові та підшкірні ін'єкції). Віддається перевага оральному застосуванню. У цьому випадку композиції надається форма таблетки або капсули.

Даний винахід пропонує нове застосування сполук, відомих як інгібітори ДП-IV, які є терапевтичними агентами для лікування безпліддя, особливо безпліддя у жінок, викликаного синдромом полікістозу яєчників.

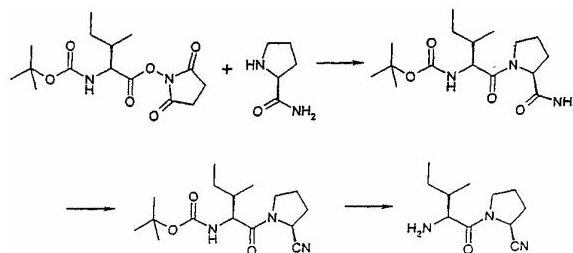
Даний винахід пропонує удосконалений спосіб для лікування безпліддя, особливо безпліддя у людей, викликаного СПКЯ, за яким пацієнту призначається фармацевтична композиція, що містить терапевтично ефективну кількість інгібітора ДП-IV. Лікування може включати використання згаданої композиції окремо або в поєднанні з іншими агентами, розкритими до цього. Застосовувати можна у вигляді разової дози або розділених доз з інтервалом, наприклад, 2-6 годин. Курс лікування може тривати один день або кілька днів чи тижнів до досягнення клінічного кінцевого результату. Прикладами прийнятних кінцевих точок є зачаття (у випадку запліднення без стороннього впливу) та вдале взяття незаплідненої яйцеклітини або вдалої імплантації ембріона (у випадку запліднення зі стороннім впливом). Особливості режиму дозування та терміну вживання визначаються лікарем.

#### Приклади

##### Приклад 1. Приготування інгібіторів

Інгібітори ДП-IV можна приготувати за відомими з літератури способами. Синтез аміноацилпіролідінових нітрилів описано в WO95/15309 та WO98/19998. Наступний спосіб взято з цих способів.

#### Приклад 1А - Синтез (2S)-N-ізолейцилпіролідін-2-карбонітрилу.



(а)

Трет-Бутилоксикарбоніл-

ізолейцилпролінамід

До суспензії пролінамідгідрохлориду (225мг, 1,50ммоль) в сухому дихлорометані (15мл), яку помішували, додавали діізопропілетиламін для одержання чистого основного (рН 9) розчину. N-(трет-бутилоксикарбоніл-ізолейцилокси)сукцинамід (328мг, 1,0ммоль) додавали до однієї порції і суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 16 годин над азотом. Розчинник випаровували у вакуумі і залишок розділяли між етил ацетатом та 0,3N розчином гідрогенсульфату калію. Органічний шар промивали насиченим розчином гідрогенкарбонату натрію, водою та соляним розчином, просували над сульфатом натрію і концентрували у вакуумі. Залишок очищали шляхом фільтрування через силікагель, елюючи гексан/етил ацетатом (10:90), а потім етилацетатом. В результаті концентрації елюату, що містить продукт, одержали сполуку, зазначену в заголовку, у вигляді безбарвного піноскла; 301мг (92%).

<sup>1</sup>H-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>): δ 6,90 (1H, ш. с); 5,51 (1H, ш. с); 5,18 (1H, д., J=9,6Гц); 4,62 (1H, дд, J=2,6 і 7,0Гц); 4,29 (1H, дд, J=8,4 і 9,2Гц); 3,79-3,58 (2H, м.); 2,36 (1H, м.); 2,09-1,57 (5H, м.); 1,43 (9H, с); 1,17 (1H, м.); 0,95 (3H, д., J=6,6Гц); 0,90 (3H, т., J=7,3Гц) м.ч.

(б)

(2S)-N-(трет-бутилоксикарбоніл-ізолейцил)піролідін-2-карбонітрил

До розчину аміду частини (а) (203мг, 0,62ммоль) в сухому піридині (10мл), який розмішували, над азотом додавали імідазол (84мг, 1,24ммоль). Суміш охолоджували до -35°C, а потім по краплях додавали оксихлорид фосфору (0,25мл, 2,48ммоль). Суміш перемішували протягом 1 години, за цей час температура піднімалася до -20°C, і розчинник випаровували у вакуумі. Залишок очищали хроматографією на силікагелі, і одержали зазначену в заголовку сполуку у вигляді безбарвного масла; вихід - 180мг (94%).

<sup>1</sup>H-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>): δ 5,14 (1H, д., J=9,2Гц); 4,80 (1H, дд, J=2,6 і 7,1Гц); 4,22 (1H, дд, J=7,9 і 9,1Гц); 3,81 (1H, м.); 3,71 (1H, м.); 2,30-2,12 (4H, м.); 1,75 (1H, м.); 1,60 (1H, м.); 1,42 (9H, с); 1,19 (1H, м.); 0,97 (3H, д., J=6,9Гц); 0,91 (3H, т., J=7,3Гц) м.ч.

<sup>13</sup>C-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>): δ 171,7; 155,6; 118,0; 79,6; 56,0; 46,5; 46,0; 37,8; 29,6; 28,1; 25,0; 24,2; 15,2; 10,9м.ч.

(в) (2S)-N-(ізолейцил)-піролідін-2-карбонітрил трифторацетат

Нітрил частини (б) розчиняли у трифторооцтовій кислоті і розчин перемішували при кімнатній

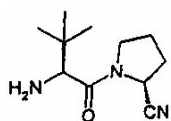
температурі протягом 1 години. Розчинник випаровували у вакуумі і залишок розчиняли у воді. Розчин ліофілізували для одержання зазначеної у заголовку сполуки у вигляді білої збитої твердої речовини; вихід - 60мг.

FAB мас-спектр.: розраховано м/е 209,3; знайдено 210,2 (M+H)<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H-ЯМР (D<sub>2</sub>O): δ 4,3 (1H, м.); 3,64 (1H, д., J=5,6Гц); 3,16 (2H, м.); 1,86-1,48 (5H, м.); 0,98 (1H, м.); 0,68 (1H, м.); 0,51 (3H, д., J=6,9Гц); 0,38 (3H, т., J=7,3Гц) м.ч.

<sup>13</sup>C-ЯМР (D<sub>2</sub>O): δ 169,7; 119,7; 57,3; 48,6; 48,1; 36,9; 30,2; 25,8; 24,5; 15,4; 11,5м.ч.

Приклад 1Б - Синтез (2S)-N-((2'S)-2'-аміно-3',3'-диметилбутаніл)піролідін-2-карбонітрил.



Дану сполуку готували за способом прикладу 1А шляхом заміщення похідної ізолейцилу відповідною похідною трет-бутилгліцину.

<sup>1</sup>H-ЯМР (CD<sub>3</sub>OD): δ 4,86-4,81 (1H, м.); 4,04 (1H, с); 3,77-3,71 (2H, м.); 3,34 (2H, с); 2,34-2,08 (4H, м.); 1,14 (9H, с.) м.ч.

<sup>13</sup>C-ЯМР (CD<sub>3</sub>OD): δ 167,40, 117,99, 58,78, 46,53, 34,21, 29,54, 25,22, 25,03м.ч.

Приклад 2. Тваринна модель безпліддя у людини

Пацюки Zucker Diabetic Fatty (ZDF) розглядаються як прийнятна модель для демонстрування потенційної придатності терапевтичного агента при безплідді у людини, особливо викликаного СПКЯ. Гормональний стан цих тварин змінюється, якщо вони страждають ожирінням, яке ідентичне хворобі людини, коли вважається, що воно пов'язане з СПКЯ.

Тварини

Особини чоловічої та жіночої статі пацюків Zucker Diabetic Fatty, які страждають ожирінням, а також фертильні худі чоловічі та жіночі особини тримали в індивідуальних клітках і годували кормом Purina 5008 (6,5% жиру). На 6,5 тижднів життя пацюків, що страждали ожирінням, розділили на 3 групи:

1. Контрольна група - пацюків ZDF (n=8), які страждали ожирінням, лікували розчинником.

2. Група з режимом лікування один раз на день - пацюкам ZDF (n=8), які страждали ожирінням, давали сполуку прикладу 1Б орально раз на день (10мг/кг/день).

3. Група з режимом лікування два рази на день - пацюкам ZDF (n=8), які страждали ожирінням, давали сполуку прикладу 1Б орально двічі на день (10мг/кг/день).

Способи

Проби крові та гіпофізу у худих і товстих пацюків брали вкінці експеримента. Концентрацію гіпофізарного ЛГ та тестостерону плазми визначали радіоімунаналізом. Естральну циклічність визначали аналізом піхвового мазка.

2.1 - Гіпофізарний ЛГ

Гіпофіз товстих пацюків містив більше ЛГ, ніж

у худих пацюків (8,1±0,6 мкг/гіпофіз vs 6,3±0,6мкг/гіпофіз, для товстих і худих пацюків, відповідно; p<0,05). Лікування товстих пацюків сполукою прикладу 1Б нормалізувало вміст ЛГ гіпофізу до рівня худих пацюків (8,1±0,6мкг/гіпофіз vs 5,2±0,4мкг/гіпофіз, для контрольної групи та товстих пацюків, що лікуються, відповідно, p<0,05).

2.2 - Тестостерон плазми

Рівні тестостерону плазми у товстих самців були нижчими за рівні у худих самців (1145±328нг/мл vs 2410±239нг/мл, для товстих та худих пацюків відповідно; p<0,05). Лікування товстих пацюків сполукою прикладу 1Б нормалізувало рівні тестостерону плазми до рівня худих (2410±239нг/мл vs 2392±759нг/мл, для худих та товстих пацюків, що лікуються, відповідно, p<0,05).

2.3 - Циклічність

Товсті самки мали анормальну естральну циклічність порівняно з худими пацюками. Лікування сполукою прикладу 1Б нормалізувало естральну циклічність у товстих самок пацюків.

Одержані результати показують, що інгібітори ДП-IV є корисними при лікуванні безпліддя як в особин чоловічої, так і особин жіночої статі, особливо при СПКЯ.

Приклад 3. Технологія приготування лікарського засобу

3А - Таблетки з вмістом 50мг сполуки

Таблетки, що містять 50мг сполуки прикладу 1А, як активного агента, готуються таким чином:

Сполука прикладу 1А (як трифтороацетат)	154,5г
Кукурудзяний крохмаль	53,5г
Гідроксипропілцелюлоза	13,5г
Кальцієва сіль карбоксиметилцелюлози	11,0г
Стеарат магнію	2,0г
Лактоза	165,5г
Разом	400,0г

Матеріали змішуються, а потім пресуються для одержання 2000 таблеток вагою 200мг, кожна з яких містить 50мг сполуки прикладу 1А.

3Б - Вагінальні супозиторії з вмістом 100мг сполуки

Супозиторії для вагінального застосування з вмістом 100мг сполуки прикладу 1А, як активного агента, готуються наступним чином:

Сполука прикладу 1А (як трифтороацетат)	154,5г
Кукурудзяний крохмаль	210,0г
Колоїдний кремнезем	2,5г
Повідон 30	49,0г
Стеарат магнію	23,0г
Адипинова кислота	57,0г
Бікарбонат натрію	43,0г
Лауріловий сульфат натрію	5,0г
Лактоза	456,0г
Разом	1000,0г

Матеріали змішуються, а потім пресуються для одержання 1000 супозиторіїв вагою 1г, кожен з яких містить 100мг сполуки прикладу 1А.

Вищенаведені приклади ілюструють але не обмежують об'єм винаходу. Розширення, які будуть розглядатися спеціалістом у даній галузі як еквівалентні, включаються в об'єм винаходу і формулу, яка далі визначає цей об'єм.

Один або більше інгібіторів ДП-IV можуть використовуватися як самостійний компонент, актив-

ний для визначених цілей композиції та способу винаходу.