



NORGE

(12) **UTLEGNINGSSKRIFT**

(19) NO

(11) **178336**

(13) B

(51) Int Cl⁶ C 07 D 401/12

Styret for det industrielle rettsvern

(21) Søknadsnr	912414	(86) Int. inng. dag og	
(22) Inng. dag	20.06.91	søknadsnummer	20.12.89, PCT/SE89/00739
(24) Løpedag	20.12.89	(85) Videreføringsdag	20.06.91
(41) Alm. tilgj.	06.08.91	(30) Prioritet	22.12.88, SE, 8804629
(44) Utlegningsdato	27.11.95		16.06.89, SE, 8902170

(71) Patent søker	AB Hässle, S-431 83 Mölndal, SE
(72) Oppfinner	Arne Elof Brändström, Göteborg, SE
	Per Lennart Lindberg, Askim, SE
	Gunnel Elisabeth Sundén, Göteborg, SE
(74) Fullmektig	Lars Brevig, Bryns Patentkontor AS, Oslo

(54) **Benevnelse** **Analogifremgangsmåte for fremstilling av en terapeutisk aktiv benzimidazolforbindelse og mellomprodukter**

(56) **Anførte publikasjoner** Ingen

(57) **Sammendrag** Den nye forbindelsen 4-fluor-2-[[[4-metoksy-2-pyridinyl)metyl]sulfinyl]-1H-benzimidazol og fysiologisk akseptable salter derav samt mellomprodukter, farmasøytiske preparater inneholdene slike forbindelser som aktiv bestanddel, og anvendelsen av forbindelsen innen medisin.

Foreliggende oppfinnelse vedrører fremstilling av en ny forbindelse og terapeutisk akseptable salter derav, hvilke inhiberer eksogent eller entogent stimulert mavesyresekresjon og kan derfor benyttes ved forebygging og behandling av peptisk ulcus. Oppfinnelsen angår også mellomprodukter som kan anvendes for fremstilling av nevnte nye forbindelse.

Den nye terapeutisk aktive forbindelsen og dens salter anvendes for inhibering av mavesyresekresjon i pattedyr inkludert mennesket. Mer generelt kan forbindelsen anvendes for forebygging og behandling av inflammatoriske sykdommer i mave-tarmkanalen, og mavesyrerelaterte sykdommer i pattedyr inkludert mennesket, slik som gastritt, gastrisk ulcus, duodenal ulcus, reflux esofagitt og Zollinger-Ellison-syndrom. Videre kan forbindelsen benyttes for behandling av andre forstyrrelser i mave-tarmkanalen der gastrisk anti-sekretorisk effekt er ønskelig, for eksempel i pasienter med gastrinomer, og i pasienter med akutt blødning i den øvre delen av mave-tarmkanalen. Den kan også benyttes av pasienter i situasjoner med intensiv pleie, og pre- og postoperativt for å hindre syreaspirasjon og stressulcerasjon. Forbindelsen kan også benyttes for behandling eller profylakse av inflammatoriske tilstander i pattedyr, inkludert mennesket, spesielt de som involverer lysozymale enzymer. Tilstander som spesielt kan nevnes er reumatoid artritt og podagra. Forbindelsen kan videre være nyttig i behandlingen av sykdommer realtert til benmetabolismeforstyrrelser samt behandling av glaukom.

Det er et spesielt hovedformål med oppfinnelsen å tilveiebringe en forbindelse med et høyt biotilgjengelighetsnivå. Forbindelse vil også utvise høye stabilitetsegenskaper ved nøytral pH-verdi og en høy virkningsgrad med hensyn til inhibering av mavesyresekresjon. Biotilgjengelighet er definert som den fraksjon, eller prosent, av den administrerte dose av forbindelse som absorberes uendret i det

systemiske blod. Virkningsgraden er i foreliggende sammenheng definert som ED₅₀ verdien.

Tidligere teknikk og oppfinnelsens bakgrunn

Bezimidazolderivater som er beregnet for inhibering av mavesyresekresjon er beskrevet i en rekke patenter. Blant disse kan nevnes GB 1.500.043, GB 1.525.958, US 4.182.766, US 4.255.431. US 4.599.347, EP 124.495, US 4.555.518, US 4.727.150, US 4.628.098, EP 208.452 og Derwent abstract 87-294449/42. Benzimidazolderivater som er foreslått for bruk i behandlingen eller forebyggingen av spesielle inflammatoriske sykdommer i mave-tarmkanalen er beskrevet i US 4.539.465.

Foreliggende oppfinnelse

Forbindelser som er beskrevet i den tidligere tekikk, som angitt ovenfor, er effektive syresekresjonsinhibitorer og er således nyttige som antiulcus-forbindelser. For ytterligere å forbedre brukbarheten av denne type legemidler så har en høyere biotilgjengelighet vært ønsket, men forbindelsene bør fremdeles ha en høy virkningsgrad når det gjelder inhibering av mavesyresekresjon og også en høy kjemisk stabilitet ved nøytral pH.

Det har blitt erkjent at testede 2-[(2-pyridinylmetyl)-sulfinyl]-1H-benzimidazoler viser en sterk variasjon i biotilgjengelighet samt i virkningsgrad og stabilitet, og det er vanskelig å identifisere forbindelser som er i besittelse av alle de tre fordelaktige egenskapene. Det er ingen veiledning i den tidligere teknikk med hensyn til hvordan man kan oppnå forbindelser med denne kombinasjon av egenskaper.

Det har blitt funnet at den fremstilte forbindelsen viser ytterst høy biotilgjengelighet og fremdeles er forbindelsen meget effektiv som inhibitor for mavesyresekresjon og viser en høy kjemisk stabilitet i oppløsning ved en nøytral pH-

verdi. Forbindelsen kan derfor benyttes i de ovenfor angitte indikasjoner i pattedyr, inkludert mennesket.

Forbindelsen er 4-fluor-2-[[4-metoksy-2-pyridinyl)metyl]-sulfinyl]-1H-benzimidazol (forbindelse I), og fysiologisk akseptable salter derav.

Forbindelsen har et asymmetrisk senter i svovelatomet, det vil si eksisterer som to optiske isomerer (enantiomerer). Videre omfatter oppfinnelsen to syntetiske mellomprodukter.

Fremstilling

Den nye, terapeutiske aktive forbindelsen fremstilles ifølge oppfinnelsen som følger:

Oksydasjon av 4-fluor-2-[[4-metoksy-2-pyridinyl)metyl]-tio-1H-benzimidazol (forbindelse II) for oppnåelse av forbindelsen I som, om ønsket, omdannes til et farmasøytisk akseptabelt salt. Oksydasjonen kan utføres ved bruk av et oksydasjonsmiddel slik som salpetersyre, hydrogenperoksyd, (eventuelt i nærvær av vanadiumforbindelser), persyrer, perestere, ozon, dinitrogentetraoksyd, iodosobenzen, N-halogensuksinimid, 1-klorbenzotriazol, t-butylhypokloritt, diazabicyklo-[2,2,2]-oktan-bromkompleks, natriummetaperiodat, selendioksyd, mangandioksyd, kromsyre, seriumammoniumnitrat, brom, klor og sulfurylklorid. Oksydasjonen finner vanligvis sted i et oppløsningsmiddel, slik som halogenerte hydrokarboner, alkoholer, etere, ketoner.

Oksydasjonen kan også utføres enzymatisk ved bruk av et oksyderende enzym eller mikrobiotisk ved bruk av en egnet mikroorganisme.

Avhengig av prosessbetingelsene og utgangsmaterialene så oppnås forbindelsen I enten i nøytral form eller i saltform.

Både den nøytrale forbindelsen og saltene derav er omfattet av oppfinnelsen. Således kan basiske, nøytrale eller blandede salter oppnås samt hemi-, mono-, sesqui- eller polyhydrater.

5 Alkaliske salter av forbindelse I er eksemplifisert ved dens salter med Li^+ , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} og $\text{N}^+(\text{R})_4$, hvor R er (1-4 C)alkyl. Spesielt foretrukne er Na^+ , Ca^{2+} og Mg^{2+} saltene. Spesielt foretrukne er Na^+ og Mg^{2+} saltene. Slike salter kan fremstilles ved omsetning av forbindelsen med en base som kan
10 frigjøre det ønskede kationet.

Eksempler på baser som kan frigjøre slike kationer og eksempler på reaksjonsbetingelser er angitt i det nedenstående.

15 a) salter hvor kationet er Li^+ , Na^+ eller K^+ fremstilles ved behandling av forbindelsen I med LiOH , NaOH eller KOH i et vandig eller ikke-vandig medium eller med LiOR , LiNH_2 , LiNR_2 , NaOR , NaNH_2 , NaNR_2 , KOR , KNH_2 eller KNR_2 , hvor R er
20 en alkylgruppe inneholdene 1-4 karbonatomer, i et ikke-vandig medium.

b) salter hvor kationet er Mg^{2+} eller Ca^{2+} fremstilles ved
25 behandling av forbindelsen I med $\text{Mg}(\text{OR})_2$, $\text{Ca}(\text{OR})_2$ eller CaH_2 , hvor R er en alkylgruppe inneholdene 1-4 karbonatomer, i et ikke-vandig oppløsningsmiddel slik som en alkohol (bare for alkoholatene), for eksempel ROH , eller i en eter slik som tetrahydrofuran.

30 Ifølge oppfinnelsen tilveiebringes også to mellomprodukter som er kjennetegnet ved at de utgjøres av: 4-fluor-2-merkpto-1H-benzimidazol og 4-fluor-2-[[4-metoksy-2-pyridinyl)metyl]tio]-1H-benzimidazol.

35 Utgangsmaterialene som er beskrevet i mellomproduktseksemplene kan oppnås ifølge i og for seg kjente fremgangsmåter.

For klinisk bruk blir forbindelsen I formulert til farmasøytiske preparater for oral, rektal, parenteral eller andre administrasjonsmåter. Den farmasøytiske formuleringen inneholder forbindelse I normalt i kombinasjon med en farmasøytisk akseptabel bærer. Bæreren kan være i form av et fast, halvfast eller flytende fortynningsmiddel, eller en kapsel. Mengden av aktiv forbindelse I er vanligvis mellom 0,1 og 95 vekt-% av preparatet, mellom 0,2 og 20 vekt-% i preparater for parenteral bruk og mellom 1 og 50 vekt-% i preparater for oral administrasjon.

Ved fremstillingen av farmasøytiske formuleringer inneholdene forbindelse I i form av doseringsenheter for oral administrasjon kan den valgte forbindelsen blandes med en fast, pulverformig bærer slik som laktose, sakkarose, sorbitol, mannitol, stivelse, amylopektin, cellulosederivater, gelatin eller en annen egnet bærer, stabiliserende stoffer slik som alkaliske forbindelser for eksempel karbonater, hydroksyder og oksyder av natrium, kalium, kalsium, magnesium og lignende samt med smøremidler slik som magnesiumstearat, kalsiumstearat, natriumstearylformarat og polyetylglykolvokser. Blandingen blir deretter bearbeidet til granuler eller presset til tabletter. Granuler og tabletter kan belegges med et enterisk belegg som beskytter den aktive forbindelsen overfor syrekatalysert nedbrytning så lenge som doseringsformen befinner seg i maven. Det enteriske belegget velges blant farmasøytisk akseptable materialer for enterisk belegging, for eksempel bivoks, skjellakk eller anioniske filmdannende polymerer slik som celluloseacetatphtalat, hydroksypropylmetylcellulosephtalat, delvis metylforestrede metakrylsyrepolymerer og lignende, om foretrukket i kombinasjon med en egnet mykner. Forskjellige farvestoffer kan tilsettes til belegget for å skjelne mellom tabletter eller granuler med forskjellige aktive forbindelser eller med forskjellige mengder av tilstedeværende aktiv forbindelse.

Myke gelatinkapsler kan fremstilles med kapsler inneholdene en blanding av den aktive forbindelse I, vegetabilsk olje, fett, eller en annen egnet bærer for myke gelatinkapsler. Myke gelatinkapsler kan også forsynes med enterisk belegg som
5 beskrevet ovenfor. Harde gelatinkapsler kan inneholde granuler eller enterisk belagte granuler av den aktive forbindelsen. Harde gelatinkapsler kan også inneholde den aktive forbindelsen i kombinasjon med en fast, pulverformig bærer slik som laktose, sakkarose, sorbitol, mannitol,
10 potetstivelse, amylopektin, cellulosederivater eller gelatin. De harde gelatinkapslene kan forsynes med enteriske belegg som beskrevet ovenfor.

Doseringsenheter for rektal administrasjon kan fremstilles i
15 form av suppositorier som inneholder den aktive substans blandet med en nøytral fettbasis, eller de kan fremstilles i form av en rektal gelatinkapsel som inneholder den aktive substansen i en blanding med en vegetabilsk olje, paraffin-olje eller annen egnet bærer for rektale gelatinkapsler,
20 eller de kan fremstilles i form av et ferdiglaget mikro-lavement, eller de kan fremstilles i form av en tørr mikro-lavementformulering for rekonstitusjon i et egnet oppløsningsmiddel like for administrasjon.

25 Flytende preparat for oral administrasjon kan fremstilles i form av siruper eller suspensjoner, for eksempel oppløsninger eller suspensjoner inneholdene 0,2-20 vekt-% av den aktive bestanddel og resten bestående av sukker eller sukker-alkoholer og en blanding av etanol, vann, glyserol, propylen-
30 glykol og/eller polyetylenglykol. Slike flytende preparater kan om ønsket inneholde fargemidler, aromamidler, sakkarin og karboksymetylcellulose eller andre fortykningsmidler. Flytende preparater for oral administrasjon kan også fremstilles i form av et tørt pulver beregnet for rekon-
35 stitusjon med et egnet oppløsningsmiddel før bruk.

Oppløsninger for parenteral administrasjon kan fremstilles som en oppløsning av forbindelsen I i et farmasøytisk akseptabelt oppløsningsmiddel, fortrinnsvis i en konsentrasjon fra 0,1-10 vekt-%. Disse oppløsningene kan også
5 inneholde stabiliseringsmidler og/eller buffermidler og kan fremstilles i forskjellige enhetsdoseampuller eller -flasker. Oppløsninger for parenteral administrasjon kan også fremstilles som et tørt preparat beregnet for rekonstitusjon med et egnet oppløsningsmiddel like før bruk.

10 Den typiske daglige dose av den aktive substans vil avhenge av forskjellige faktorer slik som for eksempel hver pasients individuelle krav, adminsitrasjonsmåten og sykdommen. Generelt vil orale og parenterale doseringer være i området
15 5-500 mg pr dag av aktiv substans.

Oppfinnelsen illustreres ved følgende eksempler.

Eksempel 1

20 Fremstilling av 4-fluor-2-[[[(4-metoksy-2-pyridinyl)metyl]-sulfinyl]-1H-benzimidazol

4-fluor-2-[[[(4-metoksy-2-pyridinyl)metyl]tio]-1H-benzimidazol
25 (1,31 g, 0,0045 mol) ble oppløst i metylenklorid (60 ml). NaHCO₃ (0,76 g, 0,0090 mol) oppløst i vann (10 ml) ble tilsatt og blandingen ble avkjølt til +2°C. m-klorperbenzoesyre, 84 % (1,64 g, 0,0045 mol) oppløst i metylenklorid (10 ml) ble tilsatt dråpevis under omrøring.

30 Omrøring ble fortsatt ved +2°C i 15 min. Etter separering ble det organiske laget ekstrahert med en vandig 0,20 M NaOH oppløsning (2 x 25 ml, 0,010 mol). De kombinerte vandige oppløsningene ble nøytralisert til pH 7-8 med 0,1 M HCl i
35 nærvær av metylenklorid (100 ml). Etter separering ble det vandige laget ekstrahert med metylenklorid og de kombinerte organiske oppløsningene ble tørket over MgSO₄. Oppløsningen

ble inndampet og tittelforbindelsen ble oppnådd (1,06 g, 77 %). NMR-data for sluttproduktet er gitt i det nedenstående.

Eksempel 2

Fremstilling av 4-fluor-2-[[(4-metoksy-2-pyridinyl)metyl]-sulfinyl]-1H-benzimidazol, natriumsalt

4-fluor-2-[[(4-metoksy-2-pyridinyl)metyl]sulfinyl]-1H-benzimidazol (5 g, 16,3 mmol) oppløst i diklormetan (100 ml) og natriumhydroksyd (0,64 g, 16 mmol) oppløst i vann (100 ml), ble overført til en skilletrakt. Blandingen ble rystet til likevekt hvorved oppløsningsmiddelfasene ble separert. Vannoppløsningen ble vasket med diklormetan (2 x 25 ml) og deretter frysetørket. Resten ble omkrystallisert fra etylacetat/dietyleter.

Utbytte: 4,7 g (89 %) av tittelforbindelsen.

NMR-data er gitt i det nedenstående.

TABELL 1

Eks. oppløsningsmiddel	NMR-data δ ppm
1. CDCl_3 (500 MHz)	3,65(s, 3H), 4,55(d, 1H), 4,75(d, 1H), 6,65(d, 1H), 6,75(dd, 1H), 7,05(dd, 1H), 7,25(dt, 1H), 7,3-7,4(b, 1H) 8,35(d, 1H)
2. D_2O δ (D_2O , 4,82)	3,44(s, 3H), 4,63(d, 1H), 4,73(d, 1H), 6,40(s, 1H), 6,79(m, 1H), 6,94(m, 1H), 7,14(m, 1H) 7,48(d, 1H), 8,24(d, 1H)

Fremstilling av mellomprodukter

Eksempel I 1

Fremstilling av 4-fluor-2-merkaptto-1H-benzimidazol

1,2-diamino-3-fluorbenzen (1,6 g, 12,7 mmol) og kaliumetyl-xantogenat (2,64 g, 16,5 mmol) ble oppløst i etanol (25 ml)

og vann (6 ml). Blandingen ble tilbakeløpskokt i 14 timer og deretter konsentrert på en rotasjonsfordamper. Vann (20 ml) ble tilsatt og oppløsningen ble surgjort med 2M saltsyre. Bunnfallet ble frafiltrert og tørket. På denne måten ble
 5 tittelforbindelsen oppnådd (1,23 g, 58 %). NMR er gitt nedenfor.

Eksempel 1 2

10 Fremstilling av 4-fluor-2-[[[4-metoksy-2-pyridinyl)metyl]-tio]-1H-benzimidazol benyttet som utgangsmateriale

Til en oppløsning av 4-fluor-2-merkapto-1H-benzimidazol (1,15 g, 0,0068 mol) i metanol (60 ml) ble NaOH (0,54 g, 0,014 mol)
 15 oppløst i vann (3 ml) og 4-metoksy-2-klormetylpyridinhydroklorid (1,32 g, 0,0068 mol) oppløst i metanol (20 ml) tilsatt i den gitte rekkefølge. Blandingen ble tilbakeløpskokt i 1 time hvorved oppløsningen ble inndampet. Resten ble skilt mellom metylenklorid og vann. Etter separering ble den
 20 organiske oppløsningen tørket over MgSO₄ og inndampet hvilket ga en olje som ble rensset på silitiumdioksydgel (50 g) ved anvendelse av 1 % metanol i metylenklorid som elueringsmiddel. På denne måten ble tittelforbindelsen oppnådd (1,35 g, 69 %). NMR-data for produktet er angitt nedenfor.

TABELL 1

Eks. oppløsningsmiddel NMR-data δ ppm (500 MHz)

1. DMSO 6,95(d, 1H), 7,00(dd, 1H), 7,10(dt, 1H)

2. CDCl₃ 3,90(s, 3H), 4,30(s, 2H), 6,85(dd, 1H),
 6,90(d, 1H), 6,90(dd, 1H), 7,10(dt, 1H),
 7,2-7,4(b, 1H), 8,50(d, 1H)

35 Den beste måte for utførelse av oppfinnelsen som i øyeblikket er kjent er å benytte natriumsaltet av forbindelsen av formel I, det vil si forbindelsen som er beskrevet i eksempel 2.

Farmasøytiske preparater inneholdene forbindelse I som aktiv bestanddel er illustrert i de følgende formuleringer.

Sirup

En sirup inneholdene 1 % (vekt pr volum) av aktiv substans ble fremstilt fra følgende bestanddeler:

Forbindelse ifølge eksempel 1	1,0 g
Sukker, pulver	30,0 g
Sakkarin	0,6 g
Glyserol	5,0 g
Aromamiddel	0,05 g
Etanol 96 %	5,0 g
Destillert vann q.s. til et sluttvolum på	100 ml

Sukker og sakkarin ble oppløst i 60 g varmt vann. Etter avkjøling ble den aktive forbindelsen tilsatt til sukkeroppløsningen og glyserol og en oppløsning av aromamidler oppløst i etanol ble tilsatt. Blandingen ble fortynnet med vann til et sluttvolum på 100 ml.

Enterisk belagte tabletter

En enterisk belagt tablett inneholdene 50 mg aktiv forbindelse ble fremstilt fra følgende bestanddeler:

I Forbindelse ifølge eksempel 1 som Mg salt	500 g
Laktose	700 g
Metylcellulose	6 g
Polyvinylpyrrolidon, tverrbundet	50 g
Magnesiumstearat	15 g
Natriumkarbonat	6 g
Destillert vann	q.s.

II	Celluloseacetatphtalat	200 g
	Cetylalkohol	15 g
	Isopropanol	2000 g
	Metylenklorid	2000 g

I Forbindelsen ifølge eksempel 1, pulver, ble blandet med laktose og granulert med en vannoppløsning av metylcellulose og natriumkarbonat. Den våte massen ble presset gjennom en sikt og granulatet tørket i en ovn. Etter tørking ble granulatet blandet med polyvinylpyrrolidon og magnesiumstearat. Den tørre blandingen ble presset til tablettkjerner (10 000 tabletter), idet hver tablett inneholdt 50 mg aktiv substans, i en tableteringsmaskin ved bruk av stanser av en diameter på 7 mm.

II En oppløsning av celluloseacetatphtalat og cetylalkohol i isopropanol/metylenklorid ble sprøytet på tablettene I i et Accela Cota® Manesty-beleggningsutstyr. En sluttlig tablettvekt på 110 mg ble oppnådd.

Oppløsning for intravenøs administrasjon

En parenteral formulering for intravenøs bruk inneholdene 4 mg aktiv forbindelse pr ml ble fremstilt fra følgende bestanddeler:

Forbindelse ifølge eksempel 2	4 g
Sterilt vann til et sluttvolum på	1000 ml

Den aktive forbindelsen ble oppløst i vann til et sluttvolum på 1000 ml. Oppløsningen ble filtrert gjennom et 0,22 µm filter og umiddelbart fordelt i 10 ml sterile ampuller. Ampullene ble forseglet.

Kapsler

Kapsler inneholdene 30 mg aktiv forbindelse ble fremstilt fra følgende bestanddeler:

5	Forbindelse ifølge eksempel 1	300 g
	Laktose	700 g
	Mikrokrystallinsk cellulose	40 g
	Hydroksypropylcellulose, lavsubstituert	62 g
	Dinatriumhydrogenfosfat	2 g
10	Renset vann	q.s.

Den aktive forbindelsen ble blandet med de tørre bestanddelene og granulert med en oppløsning av dinatriumhydrogenfosfat. Den våte massen ble presset gjennom en ekstruder og sferonisert og tørket i en virvelsjikttørker.

500 g av de ovenfor oppnådde pellets ble først belagt med en oppløsning av hydroksypropylmetylcellulose, 30 g, i vann, 750 g, ved bruk av en virvelsjikt-beleggningsanordning. Etter tørking ble pelletene belagt med et annet belegg som angitt nedenfor:

Beleggningsoppløsning:

25	Hydroksypropylmetylcellulosephtalat	70 g
	Cetylalkohol	4 g
	Aceton	200 g
	Etanol	600 g
30	De sluttlige belagte pelletene ble fylt i kapsler.	

Suppositorier

Suppositorier ble fremstilt fra følgende bestanddeler ved bruk av en sveisemetode. Hvert suppositorium inneholdt 40 mg aktiv forbindelse.

Forbindelse ifølge eksempel 1	4 g
Witepsol H-15	180 g

Den aktive forbindelsen ble blandet homogent med Witepsol H-15 ved en temperatur på 41°C. Den smeltede massen ble volumfylt i på forhånd fremstilte suppositoriumpakninger til en nettovekt på 1,84 g. Etter avkjøling ble pakningene varmekforseglet. Hvert suppositorium inneholdt 40 mg aktiv forbindelse.

Biologiske effekter

Biotilgjengelighet

Valg av arter for testing.

Resultatene fra tester på to forskjellige dyrearter, rotte og hund, varierer med hensyn til målt nivå av biotilgjengelighet for den samme forbindelsen. Det antas at rotten er den mer relevante art for testing av biotilgjengelighet. Dette er basert på den antagelse at levermetabolisme har den mest dominerende virkning på biotilgjengelighet, og at det levermetaboliske mønster i mennesket for denne type av forbindelser er temmelig lik det til hannrotten (mer enn for hunnrotten og hunden). Testresultater for biotilgjengelighet i hannrotten vil dessuten ha tilbøyelighet til å gi en bredere "spredning" sammenlignet med testresultatene i hunn, og således vil hannrottemodellen gi klarere forskjeller i biotilgjengelighet mellom forskjellige forbindelser. Sagt på en annen måte så kan biotilgjengeligheten slik den er testet i hannrotten forventes å gi en bedre vurdering av de relative forskjeller i mennesket mellom forskjellige testforbindelser sammenlignet med testresultatene oppnådd ved bruk av de samme forbindelsene i hund.

Bestemmelse av biotilgjengelighet.

Biotilgjengelighet bestemmes ved å beregne kvotienten mellom arealet under plasmakonsentrasjonskurven (AUC) etter
5 intraduodenal (id) administrasjon og intravenøs (iv) administrasjon fra rotte eller hund. Lave, terapeutisk relevante doser ble benyttet. Denne metoden er vitenskapelig anerkjent som effektiv for bestemmelse av biotilgjengelighet (se for eksempel: M. Rowland og T. N. Tozer, Clinical
10 Pharmacokinetics, 2. utg., Lea & Febiger, London 1989, side 42). Dataene fra både rotte og hund er angitt i tabell 3.

Grov screeningmodell.

15 Siden biotilgjengelighetsmodellen som er beskrevet ovenfor er tids- og arbeidskrevende og nødvendiggjør et stort antall plasmanalyser, så har også en grov screeningmodell, basert på relative virkningsgrader for inhibering av syresekresjon, blitt benyttet (se for eksempel: A. Goth, Medical Pharma-
20 cology, 7. utg., C. V. Mosby Company, Saint Louis 1974, side 19). Forholdet (betegnet "biotilgjengelighet" i tabell 3) mellom ED₅₀ ved intravenøs administrasjon og ED₅₀ ved intraduodenal administrasjon ble således beregnet. Disse data er også angitt i tabell 3.

25

Virkningsgrad

Virkningsgraden for inhibering av syresekresjon har blitt målt i hannrotte og hund, både intravenøst og intraduodenalt.
30 Når det gjelder relevansen av de animalske forsøksdata for virkningsgrad til en gitt forbindelse i mennesket for forbindelser av den type som fremstilles ifølge oppfinnelsen så antas det at virkningsgrad i mennesket vil tilsvare et nivå et eller annet sted mellom det som måles i hannrotte og
35 det som måles i hund. Data for virkningsgrad fra de to dyreartene er angitt i tabell 3.

Biologiske forsøk

Inhibering av mavesyresekresjon i bevisst hannrotte.

5 Hannrotter av Sprague-Dawley-stammen ble benyttet. De ble utstyrt med kanylerør i maven (lumen) og den øvre delen av duodenum, for oppsamling av gastriske sekresjoner og administrasjon av testsubstanser, respektivt. Det ble gitt adgang til en fjorten dagers rekonvalesensperiode etter
10 inngrep før testing begynte.

Før sekretoriske tester ble dyrene holdt borte fra mat, men ikke vann, i 20 timer. Maven ble gjentatte ganger vasket gjennom den gastriske kanylen og 6 ml Ringer-glykose ble gitt
15 s.c. Syresekresjon ble stimulert med en infusjon i løpet av 3,5 timer (1,2 ml/time, s.c.) av pentagastrin og carbachol (20 og 110 nmol/kg time, respektivt), og i løpet av denne tiden ble gastriske sekresjoner oppsamlet i 30 minutters fraksjoner. Testsubstanser eller bærer ble gitt iv eller id
20 ved 90 min etter starten av stimuleringen, i et volum på 1 ml/kg. Mavesaftprøver ble titrert til pH 7,0 med NaOH, 0,1 mol/l, og syreproduksjon beregnet som produktet av titreringsmiddelvolum og konsentrasjon. Ytterligere beregninger ble basert på gruppe-middelresponser fra 4-5 rotter. Syreproduk-
25 sjonen i løpet av periodene etter administrasjon av testsubstanser eller bærer ble uttrykt som fraksjonsresponser, idet syreproduksjonen i 30 min perioden forut for administrasjon ble satt til 1,0. Prosentvis inhibering ble beregnet fra fraksjonsresponsene som ble utløst av testforbindelse og
30 bærer. ED₅₀ verdier ble oppnådd fra grafisk interpolasjon på log dose-responskurver, eller bestemt fra enkeltdoseforsøk ved å anta en lignende helling for alle dose-responskurver. Et anslag over biotilgjengeligheten ble oppnådd ved beregning av forholdet ED₅₀ iv/ED₅₀ id. De rapporterte resultatene er
35 basert på mavesyresekresjon i løpet av den andre timen etter legemiddel/bærer-administrasjon.

Biotilgjengelighet i hannrotte.

Voksne hannrotter av Sprague-Dawley-stammen ble benyttet. En dag før forsøkene ble alle rottene forsynt med kanyle på den venstre halspulsåren under bedøvelse. Rottene som ble benyttet for de intravenøse forsøkene ble også utstyrt med kanyle i halsvenen. (Ref. V. Popovic og P. Popovic, J. Appl. Physiol. 1960; 15, 727-728). Rottene som ble benyttet for de intraduodenale forsøkene ble også utstyrt med kanyle i den øvre delen av duodenum. Kanylene ble lagt utvendig ved halsgropen. Rottene ble oppbevart individuelt etter inngrep og ble holdt borte fra mat, men ikke vann, før administrasjon av testsubstansene. Den samme dosen (4 μ mol/kg) ble gitt iv og id som en bolus i ca 1 minutt (2 ml/kg).

Blodprøver (0,1-0,4 g) ble trukket gjentatte ganger fra halspulsåren ved intervaller på opp til 4 timer etter gitt dose. Prøvene ble frosset så snart som mulig inntil analyse av testforbindelsen.

Arealet under kurven for blodkonsentrasjon mot tid, AUC, ble bestemt ved hjelp av den lineære trapesregelen og ekstrapolert til uendelig ved å dividere den sist bestemte blodkonsentrasjonen med elimineringsgradkonstanten i den avsluttende fasen. Den systemiske biotilgjengelighet (F %) etter intraduodenal administrasjon ble beregnet som:

$$F(\%) = \frac{AUC_{id}}{AUC_{iv}} \times 100$$

Inhibering av mavesyresekresjon og biotilgjengelighet i bevisst hund.

Harrier-hunder av begge kjønn ble benyttet. De ble utstyrt med et duodenalrør for administrasjon av testforbindelser eller bærer og et ventrikulært kanylerør for oppsamling av gastriske sekresjoner.

Før sekresjonstestene ble dyrene fastet i ca 18 timer, men ble gitt fri adgang til vann. Mavesyresekresjon ble stimulert ved en 4 timers infusjon av histamindihydroklorid (12 ml/time) ved en dose som ga ca 80 % av den individuelle maksimale sekretoriske respons, og mavesyre oppsamlet i etter hverandre følgende 30 minutters fraksjoner. Testsubstans eller bærer ble gitt id eller iv 1 time etter starten av histamininfusjonen, i et volum på 0,5 ml/kg kroppsvekt. Surheten til mavesaftprøvene ble bestemt ved titrering til pH 7,0 og syreproduksjonen ble beregnet. Syreproduksjonen i oppsamlingsperiodene etter administrasjon av testsubstans eller bærer ble uttrykt som fraksjonsrespons, idet syreproduksjonen i fraksjonen forut for administrasjon ble satt til 1,0.

Prosentvis inhibering ble beregnet fra fraksjonsrespons utløst av testforbindelse og bærer. ED₅₀ verdier ble oppnådd ved grafisk interpolasjon på log dose-responskurver eller bestemt fra enkeltdoseforsøk under antakelse av den samme helling på dose-responskurven for alle testforbindelser. Alle rapporterte resultater er basert på syreproduksjon 2 timer etter dosering.

Blodprøver for analyse av konsentrasjon av testforbindelse i plasma ble tatt ved intervaller på opp til 3 timer etter dosering. Plasma ble separert og frosset innen 30 minutter etter oppsamling. AUC (areal under kurven for plasmakonsentrasjon - tid), ekstrapolert til uendelig tid, ble beregnet ved hjelp av den lineære trapesregelen. Den systemiske biotilgjengelighet (F %) etter id administrasjon ble beregnet som $100 \times (AUC_{id}/AUC_{iv})$.

Kjemisk stabilitet

Den kjemiske stabiliteten til forskjellige forbindelser I ble fulgt kinetisk ved lav konsentrasjon ved 37°C i vandig bufferoppløsning ved forskjellige pH-verdier. Resultatene i

tabell 3 viser halveringstiden ($t_{1/2}$) ved pH 7, det vil si tidsperioden etter hvilken halve mengden av de opprinnelige forbindelsene forblir uendret.

5 Resultater av biologiske og stabilitetstester

Tabell 3 gir en sammenfatning av de testdata som er tilgjengelige for forbindelse I og en strukturelt nær beslektet forbindelse som generisk er beskrevet i den tidligere teknik, betegnet Ref. i tabell 3, nemlig 5-fluor-2-[[[4-isopropoksy-2-pyridinyl)metyl]sulfinyl]-1H-benzimidazol beskrevet i US 4.727.150. Som det fremgår fra tabell 3 har forbindelse I en høy biotilgjengelighet ($F = 96\%$ i rotte), høy virkningsgrad ($ED_{50iv} = 0,96 \mu\text{mol/kg}$, $ED_{50id} = 2,4 \mu\text{mol/kg}$ i rotte) og høy kjemisk stabilitet ($t_{1/2} = 23$ timer). Ved å betrakte den mest fremtredene egenskap for foreliggende forbindelse, biotilgjengeligheten, har dessuten forbindelse I en mye høyere verdi (96% mot 31%) sammenlignet med den til Ref.-forbindelsen, og er også bedre når det gjelder de andre egenskapene ($ED_{50iv} = 1,8 \mu\text{mol/kg}$, $ED_{50id} = 4,0 \mu\text{mol/kg}$ og $t_{1/2} = 14$ timer for Ref.-forbindelsen).

TABELL 3. Biologiske testdata og stabilitetsdata

Testforbindelse	Inhibering av syresekresjon		"Biotilgjengelighet" målt med den grove screeningmodellen Rotte ED ₅₀ iv/ED ₅₀ id (%)				Biotilgjengelighet målt med AUL-modellen F %	Kjemisk stabilitet ved pH 7		
	Hund ED ₅₀ (µmol/kg)								Rotte ED ₅₀ (µmol/kg)	
	adm. vei								adm. vei	
	iv	id	iv	id	Hund	Rotte				
1	0,80	0,9	0,96	2,2	95	96	23			
Ref.	n.t.	1)	1,8	4,0	n.t.	31	14			

n.t. = ikke testet
 1) Hund 1 3 µmol/kg ga 95 % inhibering
 Hund 2 3 µmol/kg ga 98 % inhibering

Ingen ED₅₀ verdi kunne således bestemmes

P a t e n t k r a v

1.

5 Analogifremgangsmåte for fremstilling av terapeutisk aktiv 4-fluor-2-[[(4-metoksy-2-pyridinyl)metyl]sulfinyl]-1H-benzimidazol (forbindelse I) og fysiologisk akseptable salter derav, k a r a k t e r i s e r t v e d oksydasjon av 4-fluor-2-[[(4-metoksy-2-pyridinyl)metyl]tio]-1H-benzimidazol,
10 hvoretter den således oppnådde forbindelse I, om ønsket, omdannes til et farmasøytisk akseptabelt salt.

2.

15 Forbindelse, k a r a k t e r i s e r t v e d at den utgjøres av 4-fluor-2-merkaptio-1H-benzimidazol.

3.

20 Forbindelse, k a r a k t e r i s e r t v e d at den utgjøres av 4-fluor-2-[[(4-metoksy-2-pyridinyl)metyl]tio]-1H-benzimidazol.

25

30

35