[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl[6]
A61K 38/55

[12]发明专利申请公开说明书

[21]申请号 95196581.6

[43]公开日 1997年12月24日

[11]公开号 CN 1168635A

[22]申请日 95.11.29

[30]优先权

[32]94.12.2 [33]SE[31]9404196-9

[86]国际申请 PCT/SE95/01425 95.11.29

[87]国际公布 WO96/16671 英 96.6.6

[85]进入国家阶段日期 97.6.2

[71]申请人 阿斯特拉公司

地址 瑞典南泰利耶

[72]发明人 J·E·洛夫罗施 A·L·昂格尔

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 关立新 罗才希

权利要求书 2 页 说明书 11 页 附图页数 6 页

[54]发明名称 新的抗血栓形成的制剂及制备方法和用途

[57]摘要

本发明涉及一种新的药物制剂，该制剂包括凝血酶抑制剂 HOOC-CH_2（R）Cgl-Aze-Pab 与一种或多种吸收增强剂，本发明还涉及该药物制剂的制备方法和该制剂在血栓栓塞治疗中的用途，以及应用该制剂对需要抗血栓形成治疗的病人和血栓栓塞病人进行治疗的方法。

权　利　要　求　书

1、一种药物制剂，该制剂包括治疗活性化合物 HOOC-CH_2-(R)Cgl-Aze-Pab 的或者其立体异构体或者其生理上可接受的盐和一种或多种吸收增强剂，以及任选的药物载体。

2、按权利要求 1 的药物制剂，其中吸收增强剂是表面活性剂。

3、按权利要求 2 的药物制剂，其中表面活性剂是一种烷基糖苷,如糖苷。

4、按权利要求 2 的药物制剂，其中表面活性剂是脂肪酸糖酯。

5、按权利要求 4 的药物制剂，其中脂肪酸糖酯是一硬脂酸蔗糖酯或一棕榈酸蔗糖酯。

6、按权利要求 1 的药物制剂，其中吸收增强剂是一种非甾体抗炎药物或它的衍生物。

7、按权利要求 1 的药物制剂，其中吸收增强剂是胆盐。

8、按权利要求 1 的药物制剂，其中吸收增强剂是脂质。

9、按权利要求 1 的药物制剂，其中吸收增强剂是一种皂、脂肪酸、肉毒碱的脂肪酸衍生物或一种肽。

10、按权利要求 1 的药物制剂，其中吸收增强剂是一种油。

11、按权利要求 1 的药物制剂，其中吸收增强剂是一种烯胺。

12、按权利要求 1 的药物制剂，其中吸收增强剂是一种螯合剂。

13、按权利要求 1 的药物制剂，其中吸收增强剂是一种吩噻嗪。

14、按权利要求 1 的药物制剂，其中吸收增强剂是一种美拉德反应（ Maillard reactwns ）的产物。

15、按权利要求 1 的药物制剂，其中吸收增强剂是一种聚合物。

16、按权利要求 1 的药物制剂，其中吸收增强剂是氮酮，伴刀豆球蛋白 A，磷酸酯或膦酸酯衍生物，马来酸二乙酯或丙二酸二乙基乙氧亚甲酯。

17、按权利要求 1 的药物制剂，其中吸收增强剂是脂质类、脂质和磷酯，脂质和胆盐、脂质和油、脂质和表面活性剂，脂质和聚合物的组合物。

18、按权利要求 1 的药物制剂，其中吸收增强剂是表面活性剂和油的组合物。

19、按在前任一权利要求的药物制剂，其中活性化合物 HOOC-CH_2-(R)Cgl-Aze-Pab 呈游离碱状态。

20、由在前任一权利要求限定的药物制剂的制备方法，其特征在于向化合物 HOOC-CH_2-(R)Cgl-Aze-Pab 的溶液中加入一种吸收增强剂，由缓冲剂将 pH 调节到治疗上可接受的 pH，并将所有的成分混合。

21、由在前权利要求 1 - 19 任一权利要求所限定的药物制剂在治疗血栓栓塞方面的用途。

22、对需要抗血栓形成治疗病人进行治疗的一种治疗方法，包括给该病人施用有效量的、由权利要求 1 - 19 任一权利要求所限定的药物制剂。

23、一种治疗血栓栓塞的方法，包括将限于上述 1 - 19 任何一个权利要求中的药物制剂以有效量施用于需要该治疗的病人。

24、一种增加治疗活性化合物 HOOC-CH_2-(R)Cgl-Aze-Pab 吸收的方法，该方法包括将选自表面活性剂、烷基糖苷、糖脂肪酸酯、胆盐、脂质、皂、脂肪酸或肉毒碱的脂肪酸衍生物，肽、非甾体抗炎药、油、烯胺、螯合剂、吩噻嗪、聚合物，麦拉德反应的产物、氮酮、伴刀豆球蛋白 A、磷酸酯或膦酸酯衍生物、马来酸二乙酯、丙二酸的乙基乙氧亚甲酯或其组合物的吸收增强剂加到上述活性化合物溶液中，任选地用缓冲剂将 pH 调至治疗上可接受的 pH 并且混合所有的成分。

25、按权利要求 24 的方法，其中吸收增强剂选自一硬脂酸蔗糖酯或一棕榈酸蔗糖酯。

说　明　书

新的抗血栓形成的制剂及其制备方法和用途

发明领域

本发明涉及一种新的药物制剂，包括凝血酶抑制剂 HOOC-CH_2-(R)-Cgl-Aze-Pab 与一种或多种吸收增强剂，还涉及该药物制剂的制备方法和该制剂在血栓栓塞治疗方面的用途，以及用该制剂对需要这种治疗病人进行治疗的方法。

发明背景

血液凝固既是止血（即防止血液从损坏的血管中丧失）的主要过程又是血栓形成（即由血块造成血管的病理性闭塞）的主要过程。血液凝固是一系列复杂的酶学反应的结果；最终是凝血酶原向具有活性的凝血酶的转变。

凝血酶对血液凝固起了重要的作用。它激活血小板，将纤维蛋白原转变为能自发聚合成纤维的纤维蛋白单体，而且凝血酶还能激活因子 XIII，该因子反过来又与所述聚合物交联而转变成不溶性的纤维蛋白。凝血酶进一步激活正反馈反应中的因子 V 和因子 VIII。因此预测凝血酶抑制剂将通过对血小板活化、纤维蛋白形成和纤维蛋白稳定过程的抑制作用而成为有效的抗凝剂。通过对所述正反馈机理的抑制，认为该抑制剂在导致血凝固和形成血栓过程的链早期产生抑制作用。

凝血酶抑制剂这种肽，和其它肽类物质一样，引入机体后易受到限制或改变吸收。这是由于代谢屏障和物理特性不同的影响所致，如酶降解，易于和制剂中或生物环境下的成分形成配合物，对转运率的限制等。本发明药物制剂的一个目的是便于活性成分克服这种障碍，并且使活性剂得到增强的和可重复性吸收，有这种影响并因此对治疗剂有如此帮助的制剂成分称为吸收增强剂。

现有技术

在现有文献中，有几篇报道和综述涉及到吸收增强剂在药物制剂中的用途。文献报道了不同类型物质的增强特性，例如表面活性剂和脂质、螯合物和聚合物。E J Van Hoog dalem 等在制药理论（Pharmac Theor

Vol 44,407~443(1989))、S Muranishi 在治疗药物载体评论（Crit Rev Ther Drug Carrier Sys Vol 7,1-33(1990))，E S Swenson 和 W J Curatolo 在药物释放评论进展（Adv Drug Deliv Rev Vol 8,39~92,(1992)）和 Harwood 大学出版社 1994 年出版（Harwood Academic Publishers 1994）的关于药物吸收增强（in Drug Absorption Enhancement）（Ed: ABG de Boer）等提供了大量综述性文献。

本发明内容

据发现，在含有所述治疗作用的凝血酶抑制剂的药物制剂中，掺入增强剂后可改善具有治疗作用的凝血酶抑制 HOOC-CH_2-(R)-Cgl-Aze-Pab 的吸收性。

因此，本发明的一个目的是提供一种新型的药物制剂和该药物制剂的制备方法，该制剂包括凝血酶抑制剂 HOOC-CH_2-(R)-Cgl-Aze-Pab 与一种或多种吸收增强剂和任选的药学上适用的载体。

获得治疗学上有效药物改良制剂的方法是基于使用吸收增强剂，例如但不限于表面活性剂、脂质、其它药物和聚合物的使用，以便当该药物经不同的给药途径，如口服、直肠、口腔、鼻肺吸入等给药时获得治疗剂的吸收增强和/或减少吸收变化的正性结果。并且这些吸收剂的结合将导致吸收高度增强的正性协同作用。

本发明所描述的吸收增强作用意指通过制剂中的一种或多种添加剂来获得，例如，但不限于:

非甾体抗炎药物和衍生物，如水杨酸钠，5 - 甲氧基水杨酸钠、吲哚美辛和双氯灭痛;

表面活性剂，如非离子型表面活性剂，例如，脱水山梨醇酯（司盘系列）、聚山梨醇（吐温系列）、聚氧乙烯基化乙二醇、单乙醚（如 Brij 系列），聚氧化烷基酯（Myri 系列），聚氧乙基烷基酚（象 Triton 系列），象糖苷类的烷基葡萄糖苷，例如，十二烷基麦芽糖苷，脂肪酸糖酯，例如，月桂酸蔗糖酯、一硬脂酸蔗糖酯等和皂草苷;

两性表面活性剂，例如三甲胺乙内盐（甜菜碱）;

阴离子表面活性剂，例如，脂肪醇硫酸酯，聚氧乙基醇硫酸酯，其它的象磺基琥珀酸二辛酯;

阳离子表面活性剂，例如，铵化物。

胆盐，如二羟基胆盐类的脱氧胆酸钠，三羟基胆盐类的甘氨胆酸钠

和夫西地酸钠，例如，二羟基夫地酸钠；

皂类和脂肪酸及其盐，例如，辛酸、癸酸和癸酸钠；

脂质，象甘油脂，例如，甘油－辛酸酯和甘油－油酸酯；

磷脂，例如，二棕榈酰磷脂酰胆碱（ DPPC ）和二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱（ DMPC ）；

油，例如，豆油和葵花油；

烯胺，如 DL －苯丙氨酸和乙酰乙酸乙酯烯胺；

螯合剂，例如， EDTA 、 EGTA 和枸橼酸；

吩噻嗪，如氯丙嗪；

肉毒碱和肽的脂肪酸衍生物，例如，棕榈酰－ DL －肉毒碱和 N －肉豆蔻酰－ L －丙基－ L －脯氨酰－甘氨酸盐；

其它物质，例如，氮酮，伴刀豆球蛋白 A ，磷酸盐和膦酸酯衍生物，如 DL －α－甘油磷酸酯和 3 －氨基－ 1 －羟基亚丙基－ 1 ， 1 －二膦酸酯，马来酸二乙酯和丙二酸二乙基乙氧亚甲酯；

来自美拉德反应（ Maillard reactions ）的产物，例如，来自葡萄糖赖氨酸反应的化合物；

聚合物，如聚丙烯酸类，例如， Carbopol®， Poly Carbophil ；聚氨基葡萄糖和聚氨基葡萄糖衍生物；和嵌段共聚物，例如， Poloxamers ， poloxamines ，和 meroxapols 。

适用的增强剂的组合物是但不限于：

脂质和胆盐，例如，甘油－油酸酯和牛磺胆酸钠；

脂质和磷脂，例如，中链的甘油酯和卵磷脂；

表面活性剂和油，例如，脂肪酸蔗糖酯和豆油；和

聚合物和脂质，例如， polycarbophil 和甘油－油酸酯。

可用的剂型可以是根据已知技术制备的固体、半固体或液体制剂。通常活性物质的组成占制剂重量的 0.1 ~ 99 %，更具体地占需要非肠道给药的制剂重量的 0.1 ~ 50 %，占适合口服给药制剂重量的 0.2 ~ 90 %。

适合人体治疗的治疗活性药物的日给药剂量在肠道给药中为每公斤体重 0.001 ~ 100 mg，而非肠道给药每公斤体重为 0.001 ~ 50 mg。

增强剂或增强剂组合物将构成制剂重量的 0.1 ~ 99 %。如此获得的制剂将经过不同的机理增加治疗药物的吸收和/或减少治疗药物的吸收可变性。

本发明的药物制剂包括修饰的二肽 HOOC-CH_2-(R)Cgl-Aze-Pab 和所述的吸收增强剂，将用于预防及治疗动脉和静脉血栓栓塞。

本发明的另一目的是制备上述药物制剂的方法，它包括向治疗活性化合物 HOOC-CH_2-(R)Cgl-Aze-Pab 的溶液中加入吸收增强剂，任选地用缓冲剂将溶液的 pH 调至治疗上适用的 pH 范围内，例如 5 - 9，优选 7 - 8，例如 7.4，并将所有的成分混合。缓冲剂可以是磷酸盐缓冲液，如 K_2HPO_4： NaH_2PO_4。像载体、等渗剂如 NaCl 等本技术领域中的技术人员已知的药物制剂中常用的其它成分，也可以加到本发明的药物制剂中。

附图简述

图 1 显示了两种吸收增强剂对 HOOC-CH_2-(R)Cgl-Aze-Pab 在肠膜中渗透性的影响。

发明详述

下列描述是对发明各方面的说明

实验部分

一般实验方法

质谱在 Finnigan MAT TSQ 700 型备有电子喷涂设备的三节四极质谱仪上记录。

^1H NMR 和 ^{13}C NMR 谱用 BRUKER AC-P 300 和 BRUKER AM 500 光谱仪测定，前者 ^1H 在 500.14 MHz 和 ^{13}C 在 125.76 MHz 下测定，而后者 ^1H 在 300.13 MHz 和 ^{13}C 在 75.46 MHz 下测定。

约为 10 ~ 50 mg 的样品溶解在 0.6 ml 的下列溶剂之一中： $CDCl_3$（同位素纯度>99.8 %），CD_3OD（同位素纯度>99.95 %）或 D_2O（同位素纯度>99.98 %）。所有溶剂购自 Dr. Glaser AG, Basel。

^1H 和 ^{13}C 在 $CDCl_3$ 和 CD_3OD 的化学位移值是相对于作为外标物的四甲基硅烷的化学位移值。在 D_2O 中的 ^1H 的化学位移值相对于 3 -（三甲基硅基）- d_4 - 丙酸钠盐的位移值，而 D_2O 中的 ^{13}C 的化学位移值相对于 1，4 - 二氧六环（67.3 ppm）的位移值，这两种都作为外标物。与内标物相比，用外标物校正可能在某些情况下造成微小的位移差，然而，^1H 的化学位移差小于 0.02 ppm 而 ^{13}C 的化学位移差小于 0.1 ppm。

含有一个脯氨酸或一个“类脯氨酸”残基的肽序列的 ^1H NMR 谱常显示出两套共振信号。这表示相应地存在两种起作用的相对于绕酰胺键

转动的构象异构体，这里脯氨酸有酰胺键的 N - 部分。该两种构象取名为顺式和反式。含有该序列的序列（ R ） Cha-Aze-和（ R ） Cha-Pil-常导致顺式和反式的平衡，用一种构象异构体作为优势构象体（>90 %）。那种情况下，只报主要旋转异构体的 ^{1}H 化学位移。仅在非优势旋转异构体的位移信号能被清楚地解析的情况下才将其报道在 NMR 文献中。同样的标准对 $CDCl_3$ 中 NH - 信号适用，仅在信号可被解析的情况下才将其报道在 NMR 文献里。这意味着对一些中间体所报的质子数比从化学式预料的质子数少。

快速层析在常压下 60 号的硅胶中（ 40 ~ 63 mm， 230 - 400 目）进行。

冷冻干燥在 Leybold-Heraeus， Lyovac GT 2 型装置中进行。

起始原料的制备

4 - 氨甲基 - 1 - （ N - 苄氧碳酰脒基）- 苯（ H-Pab(2)）

（ i ） 4 - 氰苄基叠氮

室温下将叠氮化钠 20.23 g（ 0.31 mol ）溶于 50 ml 水所得的溶液加入 4 - 氰苄基溴 49.15 g（ 251 mmol ）的 DMF 200 ml 的溶液中。发生放热反应， 1.5 小时后用 200 ml 的甲苯稀释反应混合物（注意：为避免潜在爆炸性叠氮化合的分离，建议加水前向反应混合物加入甲苯）和 500 ml 水。水相用另外的甲苯 2 × 50 ml 提取。合并的有机提取液用 2 × 50 ml 水和盐水洗，最后干燥（ $MgSO_4$ ）并过滤。

该溶液用于下步反应中。

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$); δ 4.4 (s, 2H), 7.4 (d, 2H), 7.7 (d, 2H).

（ ii ） 4 - 脒基苄基叠氮

在 - 5 ℃以上，将氯化氢发泡通过 250 ml 无水乙醇和步骤（ i ）所得溶液（约 200 ml ）的混合物中直至达到饱和。在 8 ℃存放 24h 蒸发大部分溶剂，随后经加入无水乙醚产生白色结晶而沉淀，过滤出生成的白色结晶并将其溶解在 1.8 升的酒精氨溶液中。 48 小时后除去大部分溶剂并加入 200 ml 3.75 M 的 NaOH 溶液，析出无色的 4 - 脒基苄基叠氮结晶。由过滤分出结晶。此刻 4 - 脒基苄基叠氮的产量为 22.5 g（总计 51 %）。乙基咪唑并苄基叠氮化物盐酸盐（ Ethylimidatobenzyl azide

hydrochloride）：

^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD); δ 1.6 (t, 3H), 4.5 (s, 2H), 4.65 (q, 2H), 4.8 (br s, 2H), 7.6 (d, 2H), 8.1 (d, 2H)

4－脒基苄基叠氮：

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$); δ 4.3 (s, 2H), 5.7 (br s, 3H), 7.3 (d, 2H), 7.6 (d, 2H).

^{13}C-NMR(125 MHz， $CDCl_3$)：脒碳：δ 165.5 。

（iii）4－（苄氧碳酰脒基）苄基叠氮

将上述（ii）所得结晶溶解于 500 ml 的二氯甲烷中，干燥所得溶液（K_2CO_3），过滤并加入 27 ml（194 mmol）的三乙胺。将 25 ml 的氯甲酸苄酯在搅拌下慢慢地加到上述溶液中的同时用冰浴冷却反应混合物。30 分钟后再加入 2 ml 的氯甲酸苄酯，并再继续搅拌 30 分钟，接着加入水，水相用 2 M HCl 调至 pH7 。干燥有机相（$MgSO_4$）后真空除去溶剂。最后从乙醚/二氯甲烷/己烷中分离出无色的 4－（苄氧碳酰脒基）苄基叠氮结晶。

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$); δ 4.4 (s, 2H), 5.3 (s, 2H), 6.3-7.0 (br s, 1H), 7.3-7.4 (m, 5H), 7.5 (d, 2H), 7.9 (d, 2H), 9.3-9.6 (br s, 1H).

^{13}C-NMR(125 MHz， $CDCl_3$)：脒碳：δ 167.5 。

（iv）4－氨甲基－1－（N－苄氧碳酰脒基）－苯（H-Pab(z)）

室温下将三苯基膦 26.3 g（100 mmol）加到上述（iii）中的溶于 THF 160 ml 的 4－（苄氧碳酰脒基）苄基叠氮溶液中。16h 后再加入三苯基膦 6.6 g（25 mmol），将溶液放置 4h 后真空除去溶剂。残物溶于二氯甲烷后用 2 M HCl 提取。水相用二氯甲烷和乙醚洗，随后用 3.75 M NaOH 溶液碱化。接着用二氯甲烷提取并干燥（K_2CO_3），而后真空下除去溶剂得到经静置可固化的黄色油 20 g（以氰苄基溴开始其总产率为 28 %）

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$); δ 1.2-2.2 (br s, 2H), 3.8 (s, 2H), 5.2 (s, 2H), 7.2-7.35 (m, 5H), 7.4 (d, 2H), 7.8 (d, 2H), 9.1-9.6 (br s, 1H).

^{13}C-NMR(125 MHz， $CDCl_3$): 脒碳: δ 164.6 。碳酰基碳: δ 168.17 。

H-Aze-OMe x HCl

按 Seebach D 等在利比希化学记事（ Liebigs Ann Chem p687, 1990 ）所述方法制备。

Boc-(R)Cgl-OH

Boc-(R)-Pgl-OH 32.6 g （ 0.13 mol ）溶于 300 ml 的甲醇后加入 Rh/Al_2O_3 5g 。该溶液在 5.2 ~ 2.8 MPa 下氢化 3 天。过滤后并将溶剂蒸发， NMR 显示约 25 % 的标题化合物的甲酯存在。将粗产物溶于 THF 500 ml 中，再加 300 ml 水和 20g 的 LiOH 。过夜搅拌该混合物后蒸去 THF 。余下的水相用 $KHSO_4$ 酸化并用乙酸乙酯提取 3 次。合并的有机层用水洗，干燥（ $NaSO_4$ ）后蒸发，得到所需要的产物 28.3 g （ 83 % ）。

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 0.9-1.7 (m, 20H), 4.0-4.2 (m, 1H), 5.2 (d, 1H).

Boc-(R)-Cgl-Aze-OH

(i) Boc-(R)Cgl-Aze-OMe

搅拌下于 5 ℃向 Boc-(R)Cgl-OH 3.86 g （ 15 mmol ）、 H-Aze-OMe x HCl 2.27 g （ 15 mmol ）和 DMAP 2.75 g （ 22.5 mmol ）在 CH_3CN 40 ml 的混合物中加入 EDC 3.16g （ 16.5 mmol ）。该反应混合物室温下搅拌 48h 。蒸发溶剂后残留物溶于 EtoAc 150 ml 和 H_2O 20 ml 中。分出的有机层用 2 × 20 ml 0.5 M $KHPO_4$， 2 × 10 ml $NaHCO_3$（饱和的）， 1 × 10 ml H_2O， 1 × 10 ml 盐水洗涤后干燥（ $MgSO_4$ ）。蒸发溶剂，得到标题化合物 4.91 g （ 92 % ），此化合物不需进一步纯化用于下步反应。

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 0.1 g/ml):主要的旋转异构体, 0.83-1.35 (m, 5H), 1.38 (s, 9H), 1.47-1.84 (m, 6H), 2.18-2.27 (m, 1H), 2.50-2.62 (m, 1H), 3.72 (s, 3H), 3.94-4.06 (m, 1H), 4.07-4.15 (m, 1H), 4.39-4.47 (m, 1H), 4.68 (dd, J=9.1, J=5.1, 1H), 5.09 (d, J=9.2, 1H).

来自次要的旋转异构体可解析的峰, 2.27-2.35 (m, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.80-3.87 (m, 1H), 3.88-3.95 (m, 1H), 4.92 (d, J=9.2, 1H), 5.21 (dd, J=9.1, J-5, 1H).

（ ii ） Boc-(R)Cgl-Aze-OH

按照所描述的 Boc-(R)Cha-Pic-OEt（参见下文）方法将 Boc-(R)Cgl-Aze-OMe 进行水解。产品从乙醇/丙酮/水（ 1/1/3.95 ）体系中结晶，产率 80 %。

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 0.85-1.3 (m, 5H), 1.40 (s, 9H), 1.5-1.9 (m, 6H), 1.95-2.2 (m, 2H), 3.92 (m, 1H), 4.09 (m, 1H), 4.35 (m, 1H), 4.95 (m, 1H), 5.16 (bd, 1H).

化合物 HOOC-CH_2-(R)Cgl-Aze-Pab 的制备

（ i ） Boc-(R)Cgl-Aze-Pab(Z)

搅拌下向 Boc-(R)Cgl-Aze-OH 3.40 g（ 10 mmol ）（参见起始原料的制备）和 DMAP 5.13 g（ 42 mmol ）在 120 ml 的 CH_3CN 的混合物中加入 H-Pab(Z)× HCl 3.18g（参见起始原料的制备）。室温搅拌 2h 后将反应混合物冷却至－ 8 ℃，并加入 EDC 2.01 g（ 10.5 mmol ）。待反应物温度升至室温后再继续搅拌 47h 。将溶剂蒸发，残留物溶于 200 ml 的 EtOAc 中。有机相用 H_2O 1 × 50 ml、 0.5 M $KHSO_4$ 1 × 50 + 2 × 25 ml，$NaHCO_3$（饱和的） 2 × 25 ml， H_2O 1 × 50 ml 洗涤后干燥。蒸发溶剂后得到标题化合物 5.21 g（ 86 % ）。

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 0.8-1.9 (m, 20H; 其中 1.30 (s, 9H)), 2.35-2.6 (m, 2H), 3.74 (bt, 1H), 4.10 (m, 1H), 4.25-4.4 (m, 2H), 4.45-4.6 (m, 1H,旋转异构体), 4.75-5.0 (m, 1H,旋转异构体), 5.08 (bd, 2H), 5.15 (s, 2H), 7.15-7.35 (m, 5H), 7.41 (d, 2H), 7.77 (d; 2H), 8.21 (m, 1H).

（ ii ） H-(R)Cgl-Aze-Pab(Z)

向冷却的（冰浴温度） $HCl_{(g)}$ 18.8 g 的 EtOAc 195 ml 的溶液中一起加入 Boc-(R)Cgl-Aze-Pab(Z) 4.69 g （ 7.743 mmol ）和 EtOAc 40 ml 。待反应物的温度升至室温后搅拌 30 分钟。向澄清的溶液中加入 Et_2O 140 ml 后其有沉淀生成。该反应物室温放置 1h 40 min 。滤出沉淀，用 Et_2O 150 ml 快速洗涤后真空干燥。沉淀溶于 H_2O 50ml 后用 2M NaOH 15 ml 碱化。用 CH_2Cl_2 1 × 100 + 1 × 50 ml 提取碱化后的水相。用 H_2O 1 × 20 ml 、盐水 1 × 20 ml 洗涤合并的有机相后干燥（ $MgSO_4$ ）。将溶剂蒸发后得到标题化合物 3.44 g （ 88 % ）。

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 0.8-2.0 (m, 11H), 2.51 (m, 1H), 2.67 (m, 1H), 3.07 (d, 1H), 4.11 (m, 1H), 4.18 (m, 1H), 4.43 (dd, 1H), 4.53 (dd, 1H), 4.91 (m, 1H), 5.22 (s, 2H), 7.2-7.4 (m, 7H), 7.45 (d, 2H), 8.51 (d, 2H).

（ iii ） BnOOC-CH_2-(R)Cgl-Aze-Pab(Z)

将 H-(R)Cgl-Aze-Pab(Z) 1.13 g （ 2.2 mmol ）、苄基－ 2 －（邻－硝基苯磺酰氧基）醋酸酯（(2 － NO_2)Ph-SO_2-OCH_2-COOBn ） 0.9 g （ 2.6 mmol ）（见起始原料制备）、 K_2CO_3 0.99 g （ 5.6 mmol ）和 CH_3CN 113 ml 混合后在 60 ℃ 油浴上加热 3h 。真空蒸发溶剂。加入 EtoAc 后用水洗涤混合物，有机相用 1 M $KHSO_4$ 提取后该水相用 EtOAc 洗涤。酸化后的水相用 1N NaOH 碱化至 pH>8 后用 EtOAc 提取。有机相用 H_2O 洗后干燥（ Na_2SO_4 ）、过滤和真空蒸发，得到 1.17 g 残留物，所得到残留物先用 CH_2Cl_2/MeOH （ NH_3 －饱和） 95/5 ，后用乙醚/MeOH （ NH_3 饱和的） 9/1 为洗脱剂的两次快速层析后得到标题化合物 0.525 g （ 36 % ）。

也可用苄基－ 2 －（对－硝基苯磺酰氧基）醋酸酯（(4 － NO_2)Ph-

SO_2-OCH_2-COOBn ）用上述同样的方法进行烷基化反应（参见起始原料的制备）。得到产率为 52 % 的标题化合物。

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 0.85-2.15 (m, 11H), 2.48 (m, 1H), 2.63 (m, 1H), 2.88 (d, 1H), 3.24 (d, 1H), 3.27 (d, 1H), 3.95 (m, 1H), 4.05 (m, 1H), 4.44 (m, 1H), 4.55 (m, 1H), 4.91 (m, 1H), 5.07 (s, 2H), 5.22 (s, 2H), 7.2-7.4 (m, 10H), 7.45 (d, 2H), 7.79 (d, 2H), 8.42 (m, 1H).

（ iva ） HOOC-CH_2-(R)Cgl-Aze-Pab × 2HCl

将 BnOOC-CH_2-(R)Cgl-Aze-Pab(Z), 20 mg（ 0.031 mmol ）溶于甲醇 5 ml。加几滴氯仿和 5 % Pd/C 后反应混合物常压氢化 1h。过滤、蒸发后，产物从水中冻干，结果得到标题化合物 11 mg（ 72 % ）。

^{1}H-NMR (500 MHz, D_2O): δ 1.0-2.0 (m, 11H), 2.10 (m, 1H), 2.44 (m, 1H), 2.82 (m, 1H), 3.90 (s, 2H), 4.09 (d, 1H), 4.4-4.55 (m, 2H), 4.66 (s, 2H), 5.08 (m, 1H), 7.65 (d, 2H), 7.89 (d, 2H).

^{13}C-NMR (75.5 MHz, D_2O): 脒基和碳酰基碳: δ 167.3, 167.9, 169.9 和 172.4。

BnOOC-CH_2-(R)Cgl-Aze-Pab(Z)溶于 EtOH（ 99 % ）后常压 5 % Pd/C 催化氢化 5h。通过 Cellite 滤出催化剂后蒸发溶剂得到产率为 97 % 的标题化合物。

^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD, 两种旋转异构体的混合物): 主要的旋转异构体: δ 1.00-1.12 (m, 1H), 1.13-1.34 (m, 4H), 1.55-1.70 (m, 3H), 1.73-1.85 (m, 2H), 1.94-2.02 (bd, 1H), 2.32-2.42 (m, 1H), 2.54-2.64 (m, 1H), 2.95-3.10 (AB-系统相加 d, 3H), 4.18-4.25 (bq, 1H), 4.28-4.32 (bq, 1H), 4.43-4.60 (AB- 系统 , 2H), 4.80-4.85 (dd, 1H), 7.48-7.54 (d,2H), 7.66-7.71 (d, 2H).

出现的次要旋转异构体的可解析的信号: δ 0.95 (m), 1.43 (m), 2.24 (m), 2.84 (d), 3.96 (m), 4.03 (m), 7.57 (bd), 7.78 (bd).

^{13}C-NMR (125 MHz， CD_3OD): 脒基和碳酰基碳: δ 168.0， 173.0， 176.3 和 179.0 。

制剂的制备

制剂 A: HOOC-CH_2-(R)Cgl-Aze-Pab（主药） 1.1 mg/10 ml 蔗糖－硬脂酸酯（ S-1570 ） 1.1 mg/10 ml 磷酸盐缓冲剂（ KH_2PO_4： Na_2HPO_4 ） 0.1 M pH7.4 加到 10 ml 。

制剂 B: HOOC-CH_2-(R)Cgl-Aze-Pab（主药） 1.1 mg/10 ml 蔗糖－棕榈酸酯（ P-1570 ） 1.1 mg/10 ml 磷酸盐缓冲剂（ KH_2PO_4： Na_2HPO_4 ） 0.1 M pH7.4 加到 10 ml 。

制剂 A 和 B 的试验在安放到 Ussing 室中的大鼠结肠段上进行（ Artursson 等人药理学研究(Pharm Research) Vol 10, No 8 , p 1123-29 (1993 ）。在不同的时间间隔取膜两侧的样品溶液并对 HOOC-CH_2-(R)Cgl-Aze-Pab 的浓度进行分析。试验对肠膜的穿过能力作为渗透性的指标。渗透性系数用化合物在稳定状态时在表面积为 A 的浆膜的变化率 dQ/dt 和它在粘膜侧初始浓度 C_0，根据公式 Papp=dQ/dt*1/AC_0 来计算。

结果显示在图 1 中，图中的 N 代表实验中所用的大鼠的数量。结果表明，凝血酶抑制剂 HOOC-CH_2-(R)Cgl-Aze-Pab 通过肠膜进入循环系统的渗透性比两种对照的蔗糖酯，一硬脂酸蔗糖酯和一棕榈酸蔗糖酯强 2－3 倍。因此，该结果的显著结论是，吸收增强剂的存在增加了治疗活性剂的生物利用度。

缩写词:

Aze=(S)－氮杂环丁烷－2－羧酸

Cgl=(S)－环己基甘氨酸

Pab=1－脒基－4－氨甲基苯

图 1

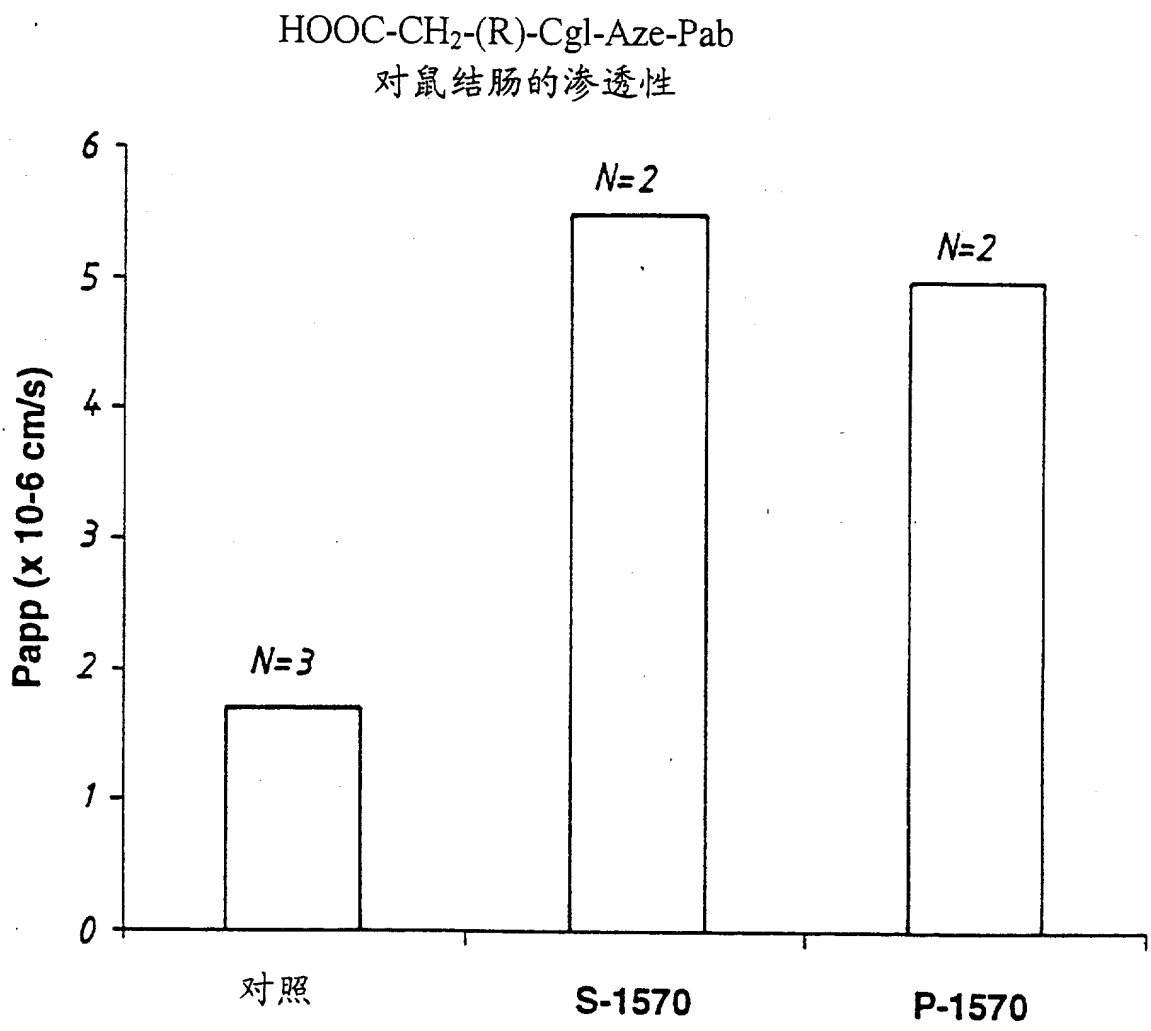

HOOC-CH2-(R)-Cgl-Aze-Pab
对鼠结肠的渗透性
Papp (x 10-6 cm/s)
0
1
2
3
4
5
6
N=3
N=2
N=2
对照
S-1570
P-1570

图 2:HOOC-CH_2-(R)-Cgl-Aze-Pab 对鼠回肠的渗透性

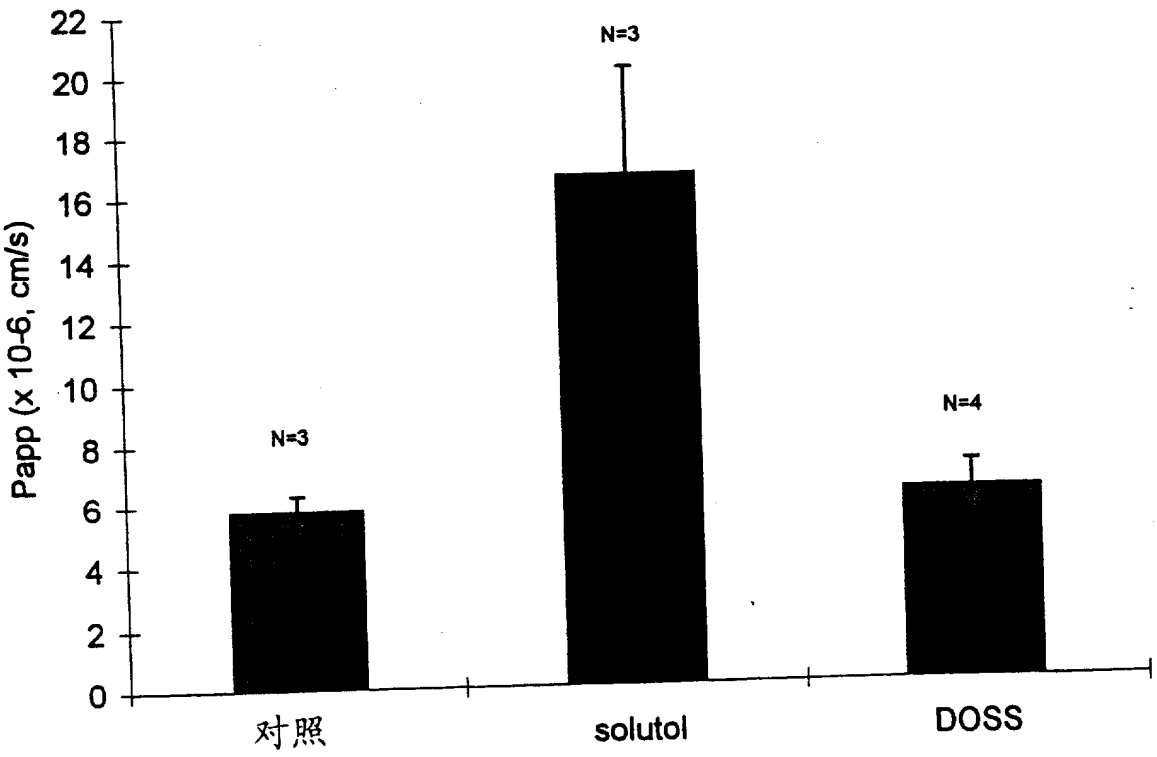


图 3 HOOC-CH_2-(R)-Cgl-Aze-Pab 对鼠回肠的渗透性

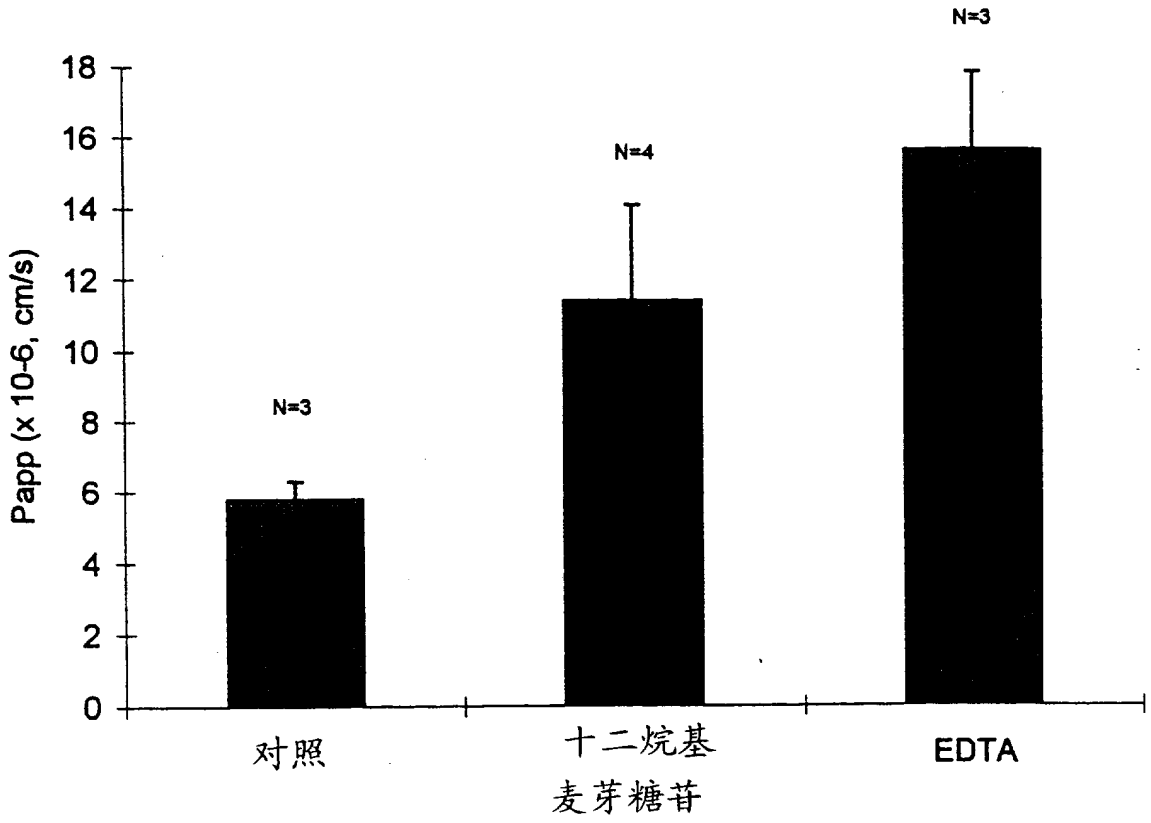


图 4 HOOC-CH_2-(R)-Cgl-Aze-Pab 对鼠结肠的渗透性

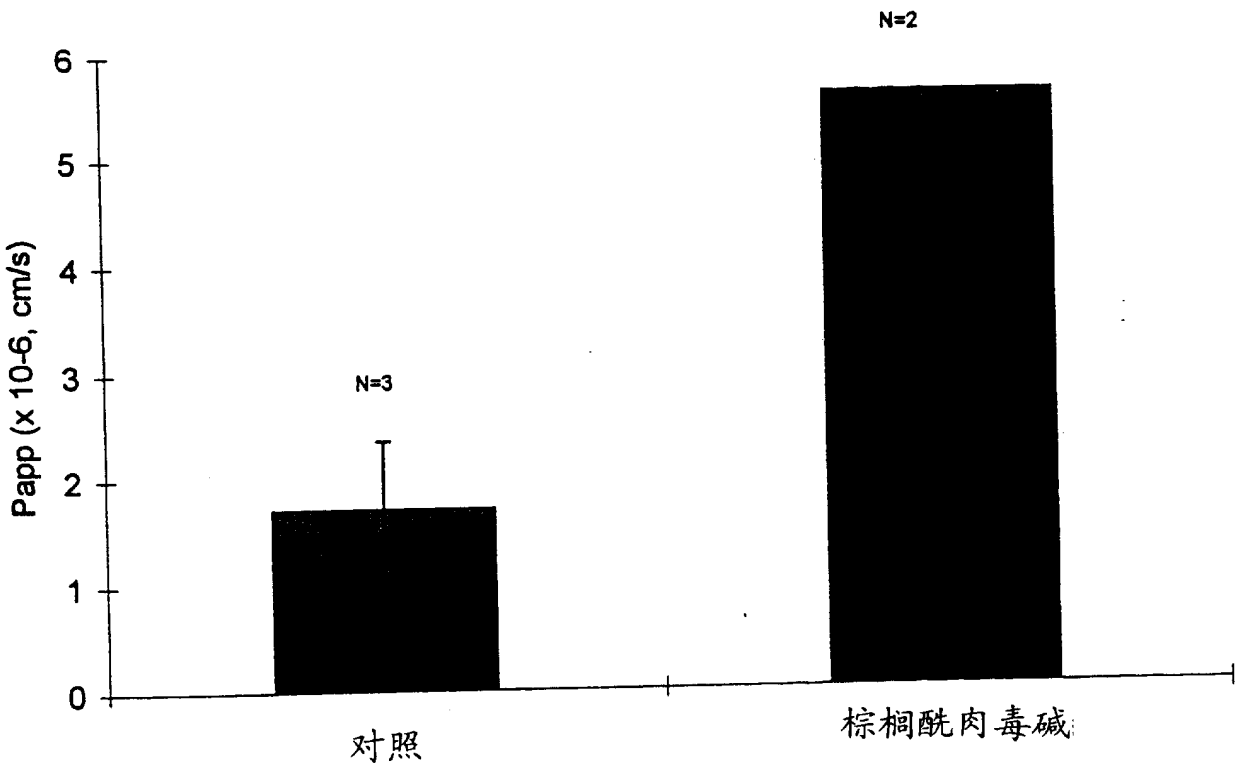


图 5 与 2 % EDTA 合并给药时 HOOC-CH_2-(R)-Cgl-Aze-Pab 在鼠体内生物利用度

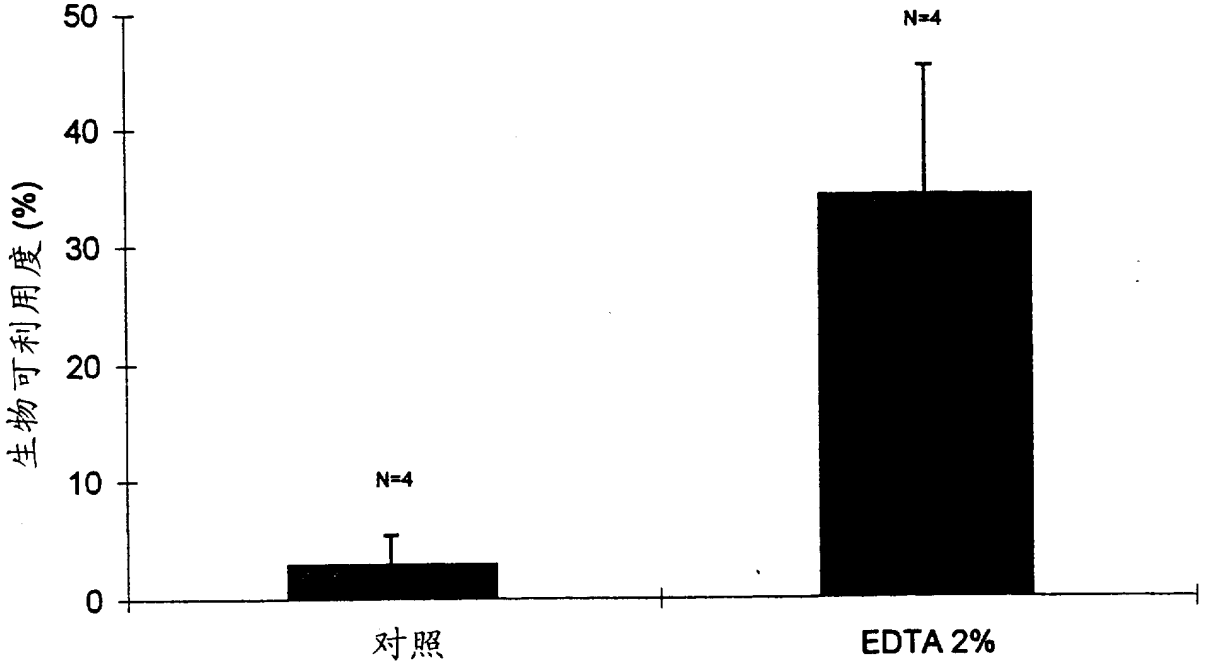


图 6：与增强剂共同给药期间 HOOC-CH_2-(R)-Cgl-Aze-Pab 在鼠中的生物利用度

