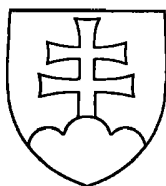


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19)

SK



ÚRAD  
PRIEMYSELNÉHO  
VLASTNÍCTVA  
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

# ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(21) Číslo dokumentu:

**617-97**

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl.<sup>6</sup> :

**A 61K 38/55**

- (22) Dátum podania: 29.11.95  
(31) Číslo prioritnej prihlášky: 9404196-9  
(32) Dátum priority: 02.12.94  
(33) Krajina priority: SE  
(40) Dátum zverejnenia: 04.03.98  
(86) Číslo PCT: PCT/SE95/01425, 29.11.95

(71) Prihlasovateľ: ASTRA Aktiebolag, Södertälje, SE;

(72) Pôvodca vynálezu: Löfroth Jan-Erik, Mölndal, SE;  
Ungell Anna-Lena, Göteborg, SE;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Antitrombotická formulácia, spôsob jej výroby a jej použitie**

(57) Anotácia:  
Opisuje sa farmaceutická formulácia obsahujúca trom-  
bínový inhibítor  $\text{HOOC-CH}_2\text{-(R)Cgl-Aze-Pab}$  v kom-  
binácii s jedným alebo viacerými činidlami zvyšujúcimi  
absorpciu, spôsob výroby takejto farmaceutickej for-  
mulácie, použitie takejto formulácie pri liečení trombo-  
embolizmu.

Nová antitrombotická formulácia, spôsob jej výroby a jej použitie

### Oblasť techniky

Predložený vynález sa týka novej farmaceutickej formulácie, obsahujúcej trombínový inhibítor  $\text{HOOC-CH}_2\text{-(R)-Cgl-Aze-Pab}$  v kombinácii s jedným alebo viacerými činidlami, zvyšujúcimi absorpciu, spôsobu prípravy takejto farmaceutickej formulácie a použitia takejto formulácie pri liečení tromboembolizmu ako aj spôsobu liečenia pacienta v prípade potreby takéhoto liečenia použitím uvedenej formulácie.

### Doterajší stav techniky

Krvná koagulácia je kľúčový proces zahrnutý ako v hemostáze (t.j. prevencii straty krvi z poškodenej cievy) tak v trombóze (t.j. patologickej oklúzii krvnej cievy krvnou zrazeninou). Koagulácia je výsledkom komplexu sérií enzymatických reakcií; jedným z konečných stupňov je konverzia proenzýmu protrombínu na aktívny enzým trombín.

Trombín hrá v koagulácii ústrednú úlohu. Aktivuje doštičky, konverguje fibrinogén na fibrínové monoméry, ktoré spontánne polymerizujú do vlákien a aktivuje faktor XIII, ktorý naopak zosieťuje polymér na nerozpustný fibrín. Trombín ďalej aktivuje faktor V a faktor VIII v pozitívnej reakcii spätnej väzby. Inhibítory trombínu sú preto považované za účinné antikoagulanty pri inhibícii doštičkovej aktivácie, tvorbe fibrínu a stabilizácii fibrínu. Pri inhibícii pozitívneho mechanizmu spätnej väzby sú takéto inhibítory považované za napomáhajúce inhibícii často v reťazci príhod, vedúcich ku koagulácii a trombóze.

Peptidické alebo peptidom podobné trombínové inhibítory, podobne ako iné peptidom podobné substancie, sú náchylné na obmedzenú alebo premennú absorpciu pri podávaní. Toto je spôsobené vplyvom rozdielnych bariér metabolického a fyzikálneho

charakteru, ako je enzymatická degradácia, sklony ku tvorbe komplexu so zložkami z formulácie alebo biologického prostredia, obmedzenie v možnostiach transportu atď. Jedným objektom predloženej farmaceutickej formulácie je uľahčiť aktívnemu činidlu prekonať takéto bariéry a získať zvýšenú a reprodukovateľnú absorpciu aktívneho činidla. Zložky formulácie, ktoré majú takýto vplyv a tak môžu napomáhať aktívnemu činidlu, sa nazývajú činidlá zvyšujúce absorpciu (absorpčné enhancery).

Zmienky o použití činidiel zvyšujúcich absorpciu vo farmaceutických formuláciách jestvujú v niekoľkých článkoch a prehľadoch v literatúre. Posilňujúce vlastnosti boli uvádzané pri rôznych typoch zložiek ako sú povrchovo aktívne činidlá a lipidy, chelátory a polyméry. Prehľad poskytuje E. J. Hoogdal a kol., *Pharmac. Theor.* zv. 44, 407 - 443 (1989). S. Muranishi, *Crit. Re. Ther. Drug Carrier Syst.*, zv. 7, 1 - 33 (1990), E. S. Swenson a W. J. Curatolo, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, zv. 8, 39 - 92 (1992) a v *Drug Absorption Enhancement* (vyd.: A B G de Boer Harwood Academic Publisher 1994).

#### Podstata vynálezu

Zistilo sa, že absorpcia terapeuticky aktívneho trombínového inhibítora  $\text{HOOC-CH}_2\text{-(R)-Cgl-Aze-Pab}$  môže byť modifikovaná inkorporovaním posilňujúcich činidiel, obsahujúcich terapeuticky aktívnu zlúčeninu.

Preto je predmetom predloženého vynálezu poskytnutie nových farmaceutických formulácií obsahujúcich trombínový inhibítor  $\text{HOOC-CH}_2\text{-(R)-Cgl-Aze-Pab}$  v kombinácii s jedným alebo viacerými absorpciu zvyšujúcimi činidlami a prípadne farmaceuticky prijateľným nosičom a spôsob prípravy takýchto farmaceutických formulácií.

Prostriedky na získanie zlepšených formulácií tohto terapeuticky aktívneho liečiva sú založené na použití činidiel zvyšujúcich absorpciu, ako sú, ale bez obmedzenia na ne, povrchovo aktívne činidlá, lipidy, iné liečivá a polyméry na

získanie pozitívnych účinkov, ktoré vedú ku zvýšenej a/alebo menej premenlivej absorpcii terapeuticky účinného činidla, keď sa uvedené činidlo podáva rôznymi spôsobmi podania, ako je orálna, rektálna, buková, nasálna, pulmorálna, inhalačná cesta atď, a kombináciou takýchto činidiel na dosiahnutie tiež pozitívnych účinkov, ktoré vedú k vyššej zvýšenej absorpcii.

Absorpciu zvyšujúce účinky opísané v tomto vynáleze je možné dosiahnuť jedným alebo viacerými aditívami ku formulácii, akými sú, avšak bez obmedzenia na ne:

nesteroidné protizápalové liečivá a deriváty, ako je salicylát sodný, 5-metoxysalicylát sodný, indomethacin a diclofenac;

surfaktanty, ako sú neiónové surfaktanty, napríklad sorbitanestery (Span séria), polysorbáty (Tween séria), polyetoxylované glykolmonoétery (ako Brij séria), polyetoxylované alkylestery (Myrj séria), polyetoxylované alkylfenoly (ako Triton séria), alkylglukozidom podobné cukrové glykozidy, napríklad dodecylmaltozid, cukrové estery mastných kyselín, napríklad laurát cukrózy, monostearát cukrózy atď a saponíny;

amfolytické surfaktanty, napríklad betaíny;

aniónové surfaktanty, napríklad sulfátované mastné alkoholy, sulfátované polyoxyetylované alkoholy, ďalšie podobné dioktylsulfosukcináty;

kationové surfaktanty, napríklad amóniové zlúčeniny.

žlčové soli ako sú dihydroxyžlčové soli, ako deoxycholát sodný, trihydroxyžlčové soli, ako glykocholát sodný a fuzidáty, napríklad dihydrofuzidát sodný;

mydlá a mastné kyseliny a ich soli, napríklad oktánová kyselina, dekánová kyselina a dekanoát sodný;

lipidy, ako sú glyceridy, napríklad glycerylmonooktanoát a glycerylmonooleín;

fosfolipidy, napríklad DPPC a DMPC;

oleje, napríklad olej zo sójových bôbov a slnečnicový olej;

enamíny, ako je DL-fenylalanín a etylacetoacetátenamín;

chelatačné činidlá, napríklad EDTA, EGTA a kyselina citrónová;

fenotiazíny, ako je chlórpromazín;

deriváty mastných kyselín karnitínu a peptidov, napríklad palmitoyl-DL-karnitín a N-myristoyl-L-propyl-L-prolyl-glycinát;

iné zložky, napríklad azon, konkavalin A, fosfátové a fosfonátové deriváty, ako je DL- $\alpha$ -glycerofosfát a 3-amino-1-hydroxypropylidén-1,1-difosfonát, dietylmaleát a dietyloxymetylénmalonát;

produkty Maillardových reakcií, napríklad zlúčeniny z reakcie glukozalyzín;

polyméry, ako sú kyseliny polyakrylové, napríklad Carbo-pol<sup>R</sup>, polykarbofil;

chitozan a deriváty chitozanu; a

blokové kopolyméry, napríklad poloxaméry, poloxamíny a meroxapoly.

Za vhodné sa považujú kombinácie činidiel zvyšujúcich absorpciu, ale nie sú na ne obmedzené:

lipidy a žlčové soli, napríklad monooleín a taurocholát sodný;

lipidy a fosfolipidy, napríklad glyceridy so stredným reťazcom a lecitíny;

surfaktanty a oleje, napríklad sacharózové estery mastnej kyseliny a sójového oleja; a

polyméry a lipidy, napríklad polykarbofil a monooleín.

Použitou dávkovou formou môže byť pevný, polopevný alebo kvapalný prípravok pripravený známymi technikami. Zvyčajne bude účinná zložka tvoriť medzi 0,1 a 99 % hmotn. prípravku, špecifickejšie medzi 0,1 a 50 % hmotnosti prípravku uvažovaných na parenterálne podanie a medzi 0,2 a 90 % hmotnosti prípravku vhodných na orálne podanie.

Vhodnými dennými dávkami terapeuticky aktívneho liečiva pri terapeutickom ošetrovaní ľudí sú asi 0,001 až 100 mg/kg telesnej hmotnosti pri perorálnom podaní a 0,001 až 50 mg/kg telesnej hmotnosti pri parenterálnom podaní.

Činidlo zvyšujúce absorpciu alebo kombinácia činidiel zvyšujúcich absorpciu bude tvoriť medzi 0,1 a 99 % hmotnosti prípravku. Takto získané formulácie budú zvyšovať absorpciu a/alebo minimalizovať variabilitu absorpcie terapeuticky účinného liečiva rôznymi mechanizmami.

Farmaceutické formulácie podľa predloženého vynálezu, obsahujúce modifikovaný dipeptid  $\text{HOOC-CH}_2\text{-(R)-Cgl-Aze-Pab}$  a činidlá zvyšujúce absorpciu, sú uvažované na profylaxiu a liečbu v arteriálnom ako aj venóznom tromboembolizme.

Ďalším predmetom vynálezu je spôsob výroby uvedenej farmaceutickej formulácie, zahrňujúci prídanie činidiel zvyšujúcich absorpciu k roztoku terapeuticky účinnej zlúčeniny  $\text{HOOC-CH}_2\text{-(R)-Cgl-Aze-Pab}$ , prípadne upravenie pH pufovacím

čínidlom na terapeuticky prijateľné pH, napríklad medzi 5 až 9, výhodne medzi 7 a 8, napríklad 7,4 a zmiešaním všetkých zložiek. Pufrovacím čínidlom môže byť fosfátový pufer ako je  $K_2HPO_4 : Na_2HPO_4$ . K farmaceutickej formulácii podľa predloženého vynálezu sa môžu pridať ďalšie zložky bežne používané vo farmaceutických formuláciách, ako sú nosiče, izotonické činidlá, ako je NaCl, známe odborníkom v odbore.

#### Popis obrázkov na výkresoch

Obrázok 1 predstavuje vplyv čínidiel zvyšujúcich absorpciu, na permeabilitu intestinálnej membrány pre  $HOOC-CH_2-(R)-Cgl-Aze-Pab$ .

Nasledujúci opis ilustruje predmet vynálezu.

#### Príklady uskutočnenia vynálezu

##### Všeobecné experimentálne postupy

Hmotnostné spektrá boli zaznamenané na hmotnostnom spektrometre Finnigan MAT TSQ 700 triple quadropole, vybavenom elektrosprejovým rozhraním.

$^1H$  NMR a  $^{13}C$  NMR merania sa uskutočňovali na spektrometroch BRUKER AC-P a BRUKER AM 100, prvom pracujúcom pri frekvencii  $^1H$  500,14 MHz a  $^{13}C$  frekvencii 125,76 MHz a druhom pracujúcom pri  $^1H$  a  $^{13}C$  frekvencii 300,13 MHz a 75,46 MHz.

Vzorky boli asi 10 až 50 mg rozpustené v 0,6 ml jedného z nasledujúcich rozpúšťadiel:  $CDCl_3$  (izotopická čistota > 99,8 %),  $CD_3OD$  (izotopická čistota > 99,95 %), alebo  $D_2O$  (izotopická čistota > 99,98 %). Všetky rozpúšťadlá boli zakúpené od Dr. Glaser AG, Basilej.

Hodnoty  $^1H$  a  $^{13}C$  chemických posunov v  $CDCl_3$  a  $CD_3OD$  sú vzťahnuté na trimetylsilán ako vnútorný štandard.  $^1H$  chemické posuny v  $D_2O$  sú vzťahnuté na sodnú soľ kyseliny 3-(trimetyl-

silyl)-d<sub>4</sub>-propánovej a <sup>13</sup>C chemické posuny v D<sub>2</sub>O sú vzťahnuté na 1,4-dioxán (67,3 ppm), obidva ako vnútorné štandardy. Kalibrácia s vnútorným štandardom môže v niektorých prípadoch vyvolávať malé rozdiely v posunoch vzhľadom na vnútorný štandard, avšak rozdiel v <sup>1</sup>H chemickom posune je menší ako 0,02 ppm a v <sup>13</sup>C menší ako 0,1 ppm.

<sup>1</sup>H NMR spektrum peptidových sekvencií, obsahujúcich prolínový alebo "prolínu podobný" zvyšok, často vykazuje dva súbory rezonancií. Toto zodpovedá existencii dvoch podieľajúcich sa konformérov vzhľadom na rotáciu okolo amidovej väzby. Konforméry sa nazývajú cis a trans. V zlúčeninách obsahujúcich takéto sekvencie sekvencie (R)Cha-Aze- a (R)Cha-Pic často poskytujú zvýšenie ku trans rovnováhe s jedným konformérom ako prevládajúcim konformérom (> 90 %). V takýchto prípadoch sa uvádzajú iba <sup>1</sup>H chemické posuny hlavného rotaméru. Iba v prípadoch, kedy signály minoritného rotaméru sú jasne rozštiepené, sa uvádzajú v NMR dokumentácii. Rovnaké kritérium platí pre NH-signály v CDCl<sub>3</sub>, iba v tých prípadoch, kedy sú signály jasne rozštiepené, sa uvádzajú v NMR-dokumentácii. To znamená, že počet protónov uvádzaný pre niektoré medziprodukty je menší ako počet protónov očakávaných podľa chemického vzorca.

Rýchla chromatografia sa uskutočnila na Merck silikagéle 60 (40 až 63 mm, 230 až 400 mesh) pod tlakom vzduchu.

Sušenie vymrazovaním sa uskutočnilo na zariadení Leybold-Heraeus, model Lyovac GT 2.

Prípravy východiskových materiálov

4-Aminometyl-1-(N-benzyloxykarbonylamidino)benzén  
(H-Pab(Z))

(i) 4-Kyanobenzylazid

Roztok 20,23 g (0,31 mol) azidu sodného v 50 ml vody sa pridá k 49,15 g (251 mmol) 4-kyanobenzylbromidu v 200 ml DMF

pri laboratórnej teplote. Prebieha exotermná reakcia a po 1,5 hodine sa reakčná zmes zriedi 200 ml toluénu (upozornenie: na zabránenie oddelenia potencionálne výbušných azidových zlúčenín sa odporúča pridať toluén k reakčnej zmesi pred prídavkom vody) a 500 ml vody. Vodná fáza sa extrahuje ďalšími 2 x 50 ml toluénu. Spojené organické extrakty sa premyjú 2 x 250 ml vody a soľankou a napokon sa sušia ( $\text{MgSO}_4$ ) a prefiltrujú. Roztok sa použije ako taký v nasledujúcom stupni.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  4,4 (s, 2H), 7,4 (d, 2H), 7,7 (d, 2H).

(ii) 4-Amidinobenzylazid

Chlorovodík sa prebubláva zmesou 250 ml absolútneho etanolu a roztokom zo stupňa (i) (približne 200 ml) pri teplote  $-5\text{ }^\circ\text{C}$  do nasýtenia. Uschováva sa pri teplote  $8\text{ }^\circ\text{C}$  počas 24 hodín a odparí sa väčšina rozpúšťadla a nasledujúcim vyzrážaním prídavkom bezvodého éteru sa získajú biele kryštály, ktoré sa izolujú filtráciou a rozpustia v 1,8 l alkoholického amoniaku. Po 48 hodinách sa väčšina rozpúšťadla odstráni a pridá sa 200 ml 3,75 M roztoku NaOH, čím sa vyzráža 4-amidinobenzylazid vo forme bezfarebných kryštálov. Kryštály sa izolujú filtráciou. V tomto stupni je výťažok 4-amidinobenzylazidu 22,5 g (celkom 5 %).

Hydrochlorid etylimidatobenzylazidu:

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  1,6 (t, 3H), 4,5 (s, 2H), 4,65 (q, 2H), 4,8 (š s, 2H), 7,6 (d, 2H), 8,1 (d, 2H).

4-Amidinobenzylazid:

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  4,3 (s, 2H), 5,7 (š s, 3H), 7,3 (d, 2H), 7,6 (d, 2H).

$^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): amidínový uhlík:  $\delta$  165,5.

(iii) 4-(Benzyloxykarbonylamidino)benzylazid

Kryštály zo stupňa (ii) sa rozpustia v 500 ml metylénchloridu a výsledný roztok sa suší ( $K_2CO_3$ ), filtruje a pridá sa 27 ml (194 mmol) trietylamínu K roztoku sa za miešania pomaly pridá 25 ml benzylochlóroformiátu za chladenia reakčnej zmesi na ľadovom kúpeli. Po 30 minútach sa pridajú ďalšie 2 ml benzylochlóroformiátu a v miešaní sa pokračuje ďalších 30 minút. Následne sa pridá voda a pH vodnej fázy sa upraví na hodnotu 7 s 2 M HCl. Organická fáza sa suší ( $MgSO_4$ ) a rozpúšťadlo sa odstráni vo vákuu. 4-(Benzyloxykarbonylamidino)benzylamid sa napokon izoluje vo forme bezfarebných kryštálov z éteru/metylénchloridu/hexánu.

$^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  4,4 (s, 2H), 5,3 (s, 2H), 6,3 - 7,0 (š s, 1H), 7,3 - 7,4 (m, 5H), 7,5 (d, 2H), 7,9 (d, 2H), 9,3 - 9,6 (š s, 1H).

$^{13}C$  NMR (125 MHz,  $CDCl_3$ ): amidínový uhlík:  $\delta$  167,5.

(iv) 4-Aminometyl-1-(N-benzyloxykarbonylamidino)benzén  
(H-Pab(Z))

26,3 g (100 mmol) trifenyľfosfínu sa pridá pri laboratórnej teplote k 4-(benzyloxykarbonylamidino)benzylazidu zo stupňa (iii) rozpustenému v 160 ml THF. Po 16 hodinách sa pridá ďalších 6,6 g (25 mmol) trifenyľfosfínu a roztok sa nechá stáť počas 4 hodín pred odstránením rozpúšťadla vo vákuu. Zvyšok sa rozpustí v metylénchloride a extrahuje sa 2 M HCl. Vodná fáza sa premyje metylénchloridom a éterom a následne sa zalkalizuje 3,75 M roztokom hydroxidu sodného. Extrakciou s metylénchloridom nasledovanou sušením ( $K_2CO_3$ ) a odstránením rozpúšťadla vo vákuu sa získa 20 g (celkový výťažok vzťahnuté na kyanobenzylbromid je 28 %) žltého oleja, ktorý stáťm tuhne.

$^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  1,2 - 2,2 (š 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 (š s, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): amidínové a karbonylové uhličky:  
 $\delta$  164,6 a 168,17.

H-Aze-OMe x HCl

Pripraví sa podľa postupu opísaného Seebachom D. a kol.,  
v Liebigs Ann. Chem., str. 687, 1990.

Boc-(R)Cgl-OH

Boc-(R)-Pgl-OH, 32,6 g (0,13 mol) sa rozpustí v 300 ml metanolu a pridá sa 5 g  $\text{Rh}/\text{Al}_2\text{O}_3$ . Roztok sa hydrogenuje pri tlaku 5,2 až 2,8 MPa počas 3 dní. Po filtrácii a odparení rozpúšťadla poukazuje NMR na prítomnosť asi 25 % metylesteru zlúčeniny uvedenej v názve. Surový materiál sa rozpustí v 500 ml THF a 300 ml vody a pridá sa 20 g LiOH. Zmes sa mieša cez noc a THF sa odparí. Zvyšná vodná fáza sa okyslí  $\text{KHSO}_4$  a extrahuje sa trikrát etylacetátom. Spojené organické vrstvy sa premyjú vodou, vysušia ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) a odparením sa získa 28,3 g (83 %) požadovaného produktu.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0,9 - 1,7 (m, 20H), 4,0 - 4,2 (m, 1H), 5,2 (d, 1H).

Boc-(R)-Aze-OH

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

K zmesi 3,68 g (15 mmol) Boc-(R)Cgl-OH, 2,27 g (15 mmol) H-Aze-OMe x HCl a 2,75 g (22,5 mmol) DMAP v 40 ml  $\text{CH}_3\text{CN}$  sa pri teplote 5 °C za miešania pridá 3,16 g (16,5 mmol) EDC. Reakčná zmes sa mieša pri laboratórnej teplote počas 48 hodín. Rozpúšťadlo sa odparí a zvyšok sa rozpustí v 150 ml EtOAc a 20 ml  $\text{H}_2\text{O}$ . Oddelená organická vrstva sa premyje 2 x 20 ml 0,5 M  $\text{KHSO}_4$ , 2 x 10 ml  $\text{NaHCO}_3$  (nasýtený), 1 x 10 ml  $\text{H}_2\text{O}$ , 1 x 10 ml soľanky a vysuší sa ( $\text{MgSO}_4$ ). Odparením rozpúšťadla sa získa 4,91 g (92 %) zlúčeniny uvedenej v názve, ktorá sa bez ďalšieho čistenia použije v nasledujúcom stupni.

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 0,1 g/ml): hlavný rotamér, 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).

Rozštiepené piky z minoritného rotaméru: 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,  $J = 9,1$ ,  $J \approx 5$ , 1H).

(ii) Boc-(R)Cgl-Aze-OH

Hydrolýza Boc-(R)Cgl-Aze-OMe sa uskutoční postupom opísaným pre Boc-(R)Cha-Pic-OEt (pozri infra). Produkt sa kryštalizuje z EtOH/acetónu/vody (1/1/3,95) a získa sa výťažok 80 %.

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0,85 - 1,3 (m, 5H), 1,40 (s, 9H), 1,5 - 1,9 (m, 6H), 1,95 - 2,2 (m, 1H), 3,92 (m, 1H), 4,09 (m, 1H), 4,36 (m, 1H), 4,95 (m, 1H), 5,16 (š d, 1H).

Príprava zlúčeniny  $\text{HOOC-CH}_2\text{-(R)Cgl-Aze-Pab}$

(i) Boc-(R)Cgl-Aze-Pab(Z)

K zmesi 3,40 g (10 mmol) Boc-(R)Cgl-Aze-OH (pozri príprava východiskových látok) a 5,13 g DMAP (4 mmol) v 120 ml  $\text{CH}_3\text{CN}$  sa za miešania pridá 3,18 g H-Pab(Z) x HCl (pozri príprava východiskových látok). Po 2 hodinách miešania pri laboratórnej teplote sa zmes ochladí na teplotu  $-8^\circ\text{C}$  a pridá sa 2,01 g (10,5 mmol) EDC. Zmes sa nechá zahriať na laboratórnu teplotu a v miešaní sa pokračuje počas ďalších 47 hodín. Rozpúšťadlo sa odparí a zvyšok sa rozpustí v 200 ml EtOAc. Organická fáza sa premyje 1 x 50 ml vody, 1 x 50 + 2 x 25 ml  $\text{KHSO}_4$ , 2 x 25 ml  $\text{NaHCO}_3$  (nasýtený), 1 x 50 ml vody a vysuší sa. Odparením rozpúšťadla sa získa 5,21 g (86 %) zlúčeniny uvedenej v názve.

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0,8 - 1,9 (m, 20H; z toho 1,30

(s, 9H), 2,35 - 2,6 (m, 2H), 3,74 (š t, 1H), 4,10 (m, 1H), 4,25 - 4,4 (m, 2H), 4,45 - 4,6 (m, 1H, rotaméry), 4,75 - 5,0 (m, 1H, rotaméry), 5,08 (š d, 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)

K studenému (teplota ľadového kúpeľa) roztoku 18,8 g HCl(g) v 195 ml EtOAc sa pridá 4,69 g (7,743 mmol) Boc-(R)Cgl-Aze-Pab(Z) spolu so 40 ml EtOAc. Reakčná zmes sa nechá zahriať na laboratórnu teplotu a mieša sa počas 30 minút. K číremu roztoku sa pridá 140 ml Et<sub>2</sub>O za vytvorenia zrazeniny. Reakčná zmes sa ponechá pri laboratórnej teplote počas ďalšej 1 hodiny a 40 minút. Zrazenina sa odfiltruje, rýchle sa premyje 150 ml Et<sub>2</sub>O a vysuší vo vákuu. Zrazenina sa rozpustí v 50 ml vody a zalkalizuje 15 ml 2 M NaOH. Alkalická vodná fáza sa extrahuje 1 x 100 + 1 x 50 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Spojené organické fázy sa premyjú 1 x 20 ml vody, 1 x 20 ml soľanky a vysušia sa (MgSO<sub>2</sub>). Odparením sa získa 3,44 g (88 %) zlúčeniny uvedenej v názve.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 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<sub>2</sub>-(R)Cgl-Aze-Pab(Z)

1,13 g (2,2 mmol) H-(R)Cgl-Aze-Pab(Z), 0,9 g (2,6 mmol) benzyl-2-(orto-nitrobenzénsulfonyloxy)acetátu ((2-NO<sub>2</sub>)Ph-SO<sub>2</sub>-OCH<sub>2</sub>-COOBn) (pozri príprava východiskových látok), 0,99 g (5,6 mmol) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 113 ml CH<sub>3</sub>CN sa zmieša a zahrieva na teplote 60 °C na olejovom kúpeľi počas 3 hodín. Rozpúšťadlo sa odparí vo vákuu, pridá sa EtOAc a zmes sa premyje vodou, organická fáza sa extrahuje 1 M KHSO<sub>4</sub> a táto vodná fáza sa premyje EtOAc. Kyslá vodná fáza sa zalkalizuje 1 N NaOH na pH >8 a extrahuje sa EtOAc. Organická fáza sa premyje vodou, vysuší (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), prefiltruje a odparením vo vákuu sa získa 1,17 g zvyšku, ktorý sa dvakrát podrobí rýchlej chromatografii pri použití najskôr

$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}(\text{NH}_3\text{-nasýtený})$  95/5 a potom dietyléteru/ $\text{MeOH}(\text{NH}_3\text{-nasýtený})$  9/1 ako eluentov za získania 0,525 g (36 %) zlúčeniny uvedenej v názve.

Alkylácia sa tiež uskutočnila pri použití benzyl-2-(para-nitrobenzénsulfonyloxy)acetátu ( $((4\text{-NO}_2)\text{Ph-SO}_2\text{-OCH}_2\text{-COOBn})$ ) (pozri príprava východiskových látok) pri použití rovnakého postupu ako vyššie, za získania zlúčeniny uvedenej v názve v 52 % výťažku.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  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)  $\text{HOOC-CH}_2\text{-(R)Cgl-Aze-Pab} \times 2 \text{ HCl}$

$\text{BnOOC-CH}_2\text{-(R)Cgl-Aze-Pab(Z)}$ , 20 mg (0,031 mmol), sa rozpustí v 5 ml metanolu. Pridá sa niekoľko kvapiek chloroformu a 5 % Pd/C a zmes sa hydrogenuje pri atmosferickom tlaku počas 1 hodiny. Po filtrácii a odparení sa produkt lyofilizuje z vody za získania 11 mg (72 %) zlúčeniny uvedenej v názve.

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  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).

$^{13}\text{C}$  NMR (75,5 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ): amidínové a karbonylové uhľíky:  $\delta$  167,3, 167,9, 169,9 a 172,4.

(ivb)  $\text{HOOC-CH}_2\text{-(R)Cgl-Aze-Pab}$

$\text{BnOOC-CH}_2\text{-(R)Cgl-Aze-Pab(Z)}$  sa rozpustí v EtOH (99 %) a hydrogenuje sa nad 5 % Pd/c pri atmosferickom tlaku počas 5 hodín. Filtráciou katalyzátora cez celit a odparením rozpúšťadla sa získa zlúčenina uvedená v názve v 97 % výťažku.

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , zmes dvoch rotamérov): hlavný rotamér:  $\delta$  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 (š d, 1H), 2,32 - 2,42 (m, 1H), 2,54 - 2,64 (m, 1H), 2,95 - 3,10 (AB-systém plus d, 3H), 4,18 - 4,25 (š q, 1H), 4,28 - 4,32 (š q, 1H), 4,43 - 4,60 (AB-systém, 2H), 4,80 - 4,85 (dd, 1H), 7,48 - 7,54 (d, 2H), 7,66 - 7,71 (d, 2H).

Rozštiepené signály z minoritného rotaméru sa objavujú pri  $\delta$  0,95 (m), 1,43 (m), 2,24 (m), 2,84 (d), 3,96 (m), 4,03 (m), 7,57 (š d), 7,78 (š d).

$^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ : amidínové a karbonylové uhličky:  $\delta$  168,0, 173,0, 176,3 a 179,0.

#### Príprava formulácií

Formulácia A:  $\text{HOOC-CH}_2\text{-(R)Cgl-Aze-Pab}$  (zásada) 1,1 mg/10 ml  
sacharózový monostearát (S-1570) 1,1 mg/10 ml  
fosfátový pufer ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  :  $\text{Na}_2\text{PO}_4$ ) 0,1 M  
pH 7,4 ad 10 ml

Formulácia B:  $\text{HOOC-CH}_2\text{-(R)Cgl-Aze-Pab}$  (zásada) 1,1 mg/10 ml  
sacharózový monopalmitát (p-1570) 1,1 mg/10 ml  
fosfátový pufer ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  :  $\text{Na}_2\text{PO}_4$ ) 0,1 M  
pH 7,4 ad 10 ml

Formulácia C:  $\text{HOOC-CH}_2\text{-(R)Cgl-Aze-Pab}$  (zásada) 1,1 mg/10 ml  
solutol 50 mg/10 ml  
NaCl 0,9 g/l  
pH 7,4 ad 10 ml

Formulácia D:  $\text{HOOC-CH}_2\text{-(R)Cgl-Aze-Pab}$  (zásada) 1,1 mg/10 ml  
dokusát sodný (dioktylsulfosukcinát sodný)  
2,2 mg/10 ml  
NaCl 0,9 g/l  
pH 7,4 ad 10 ml

Formulácia E:  $\text{HOOC-CH}_2\text{-(R)Cgl-Aze-Pab}$  (zásada) 1,1 mg/10 ml  
dodecylmaltozid 2,2 mg/10 ml  
NaCl 0,9 g/l  
pH 7,4 ad 10 ml

Formulácia F:  $\text{HOOC-CH}_2\text{-(R)Cgl-Aze-Pab}$  (zásada) 1,1 mg/10 ml  
EDTA 17 mg/ml  
NaCl 0,9 g/l  
pH 7,4 ad 10 ml

Formulácia G:  $\text{HOOC-CH}_2\text{-(R)Cgl-Aze-Pab}$  (zásada) 1,1 mg/10 ml  
palmitoyl-dl-karnitín 2,2 mg/10 ml  
NaCl 0,9 g/l  
pH 7,4 ad 10 ml

Formulácia H:  $\text{HOOC-CH}_2\text{-(R)Cgl-Aze-Pab}$  (zásada) 0,5 mg/ml  
EDTA 2 % hmotn./hmotn.  
NaCl 0,9 g/l

Formulácia I:  $\text{HOOC-CH}_2\text{-(R)Cgl-Aze-Pab}$  (zásada) 0,43 mg/ml  
Captex 72 % hmotn./hmotn.  
Capmul 22 % hmotn./hmotn.  
Tween 80 3 % hmotn./hmotn.  
NaCl 0,9 g/l

Formulácia J:  $\text{HOOC-CH}_2\text{-(R)Cgl-Aze-Pab}$  (oleátová soľ) 0,43 mg/ml  
olivový olej 100 % hmotn./hmotn.  
kyselina olejová

Formulácia K:  $\text{HOOC-CH}_2\text{-(R)Cgl-Aze-Pab}$  (zásada) 0,43 mg/ml  
polykarbofil (Carbopol) 0,5 % hmotn./hmotn.  
fosfátový pufer 0,1 M  
pH 7,4

Formulácie A až G sa testovali v ileu krysy alebo v kolónových segmentoch napojených v Ussing-komorách (opísali Artursson a kol., Pharm. Res., zv. 10, č. 8, str. 1123 - 1129, 1993). Vzorky roztokov na oboch stranách intestinálnych membrán

sa odoberali v pravidelných časových intervaloch a analyzovali na koncentráciu  $\text{HOOC-CH}_2\text{-(R)Cgl-Aze-Pab}$ . Schopnosť prekonať intestinálnu membránu sa testovala ako meranie permeability. Koeficient permeability sa vypočítal pri použití ustáleného stavu vyskytujúcej sa rýchlosti,  $dQ/dt$  zlúčeniny na serozálnej strane segmentov povrchovej plochy A a počiatočná koncentrácia na mukozálnej strane  $C_0$ , podľa rovnice  $P_{app} = dQ/dt \cdot 1/AC_0$ .

Výsledky testovaných formulácií A a B sú uvedené na obr. 1, testovaných formulácií C a D na obr. 2, testovaných formulácií E a F na obr. 3 a formulácie G na obr. 4. N na obrázkoch označuje počet použitých krýs. Výsledky ukazujú, že sacharózové estery, monostearát a monopalmitát, ako aj glukózový ester, dodecylmaltozid, zvyšujú permeabilitu  $\text{HOOC-CH}_2\text{-(R)Cgl-Aze-Pab}$  dvoj- až trojnásobne cez intestinálnu membránu. Rovnaká magnitúda zvýšenia permeability cez membránu sa takto dá pozorovať pri použití formulácií obsahujúcich surfaktant solutol alebo dokusát sodný, derivát mastnej kyseliny palmitoyl-dl-karnitín alebo vápnikový chelátor EDTA. Všetky tieto činidlá zvyšujúce absorpciu, zvyšujú intestinálnu permeabilitu trombínového inhibítora  $\text{HOOC-CH}_2\text{-(R)Cgl-Aze-Pab}$  do systémového obehu a tým zvyšujú biovyužiteľnosť.

Formulácie H, I, J a K sa testovali in vivo na krysom modele pri použití intraduodenálne katetrizovaných neanestizovaných zvierat. Formulácie I, J a K sa podávali ako bolus injekcie, zatiaľ čo formulácia H sa podala ako 60 minútová infúzia. Vzorky krvi sa odoberali v určených časových bodoch až do 4 hodín po podaní rôznych formulácií. Koncentrácia  $\text{HOOC-CH}_2\text{-(R)Cgl-Aze-Pab}$  sa analyzovala v plazme a biovyužiteľnosť sa vypočítala z plochy pod krivkou (Area under the curve - AUC) pri použití štandardných farmakokinetických metód (Rowland a Tozer, Clinical Pharmacokinetics, concept and applications, 1980).

Výsledky testovaných formulácií H a I, J, K in vivo na krysách sú uvedené na obr. 5 a 6. Biovyužiteľnosť sa zvyšuje medzi dvojnásobkom až desaťnásobkom pri použití rôznych

formulácií v porovnaní s kontrolným pokusom, kde sa použil fosfátový pufer s pH 8.

Všetky testované formulácie zvyšujú využiteľnosť trombí-nového inhibítora  $\text{HOOC-CH}_2\text{-(R)Cgl-Aze-Pab}$  po podaní do duodena. Je preto pravdepodobné, že bežne používané činidlá na zvýšenie absorpcie z gastrointestinálneho traktu budú viac či menej ovplyvňovať biovyužiteľnosť tohto liečiva pri orálnom podaní a budú tiež zvyšovať jeho biovyužiteľnosť pri iných spôsoboch podania, ako je rektálne, bukálne, nasálne alebo pulmorálne podanie.

## P A T E N T O V É N Á R O K Y

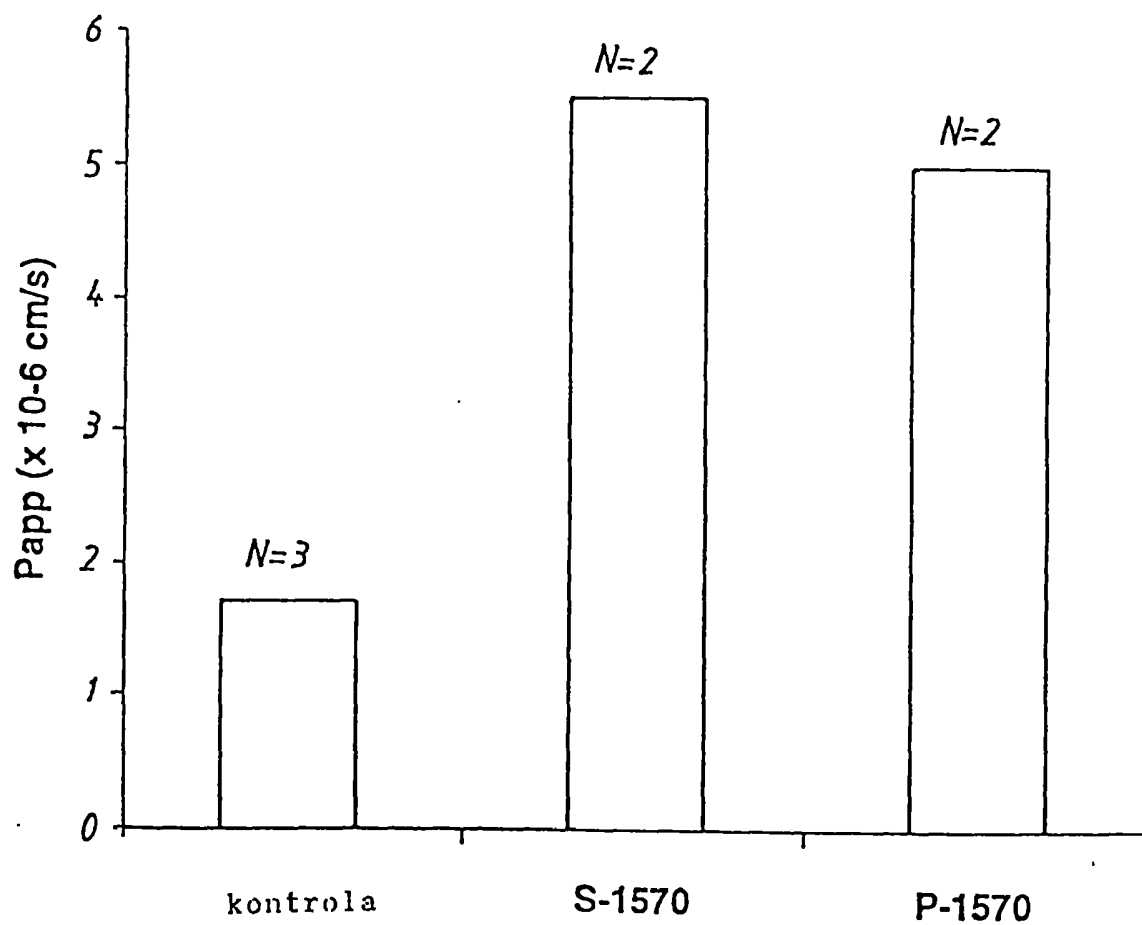
1. Farmaceutická formulácia, vyznačujúca sa tým, že obsahuje terapeuticky účinnú zlúčeninu  $\text{HOOC-CH}_2\text{-(R)Cgl-Aze-Pab}$  ako takú alebo jej stereoizomér alebo jej fyziologicky priateľnú soľ a jedno alebo viac činidiel, zvyšujúcich absorpciu a prípadne farmaceutický nosič.
2. Farmaceutická formulácia podľa nároku 1, vyznačujúca sa tým, že činidlom zvyšujúcim absorpciu je surfaktant.
3. Farmaceutická formulácia podľa nároku 2, vyznačujúca sa tým, že surfaktantom je alkylglykozid, ako je cukrový glykozid.
4. Farmaceutická formulácia podľa nároku 2, vyznačujúca sa tým, že surfaktantom je cukrový ester mastnej kyseliny.
5. Farmaceutická formulácia podľa nároku 4, vyznačujúca sa tým, že cukrovým esterom mastnej kyseliny je sacharózový monostearát alebo sacharózový monopalmitát.
6. Farmaceutická formulácia podľa nároku 1, vyznačujúca sa tým, že činidlom zvyšujúcim absorpciu je nesteriodné protizápalové liečivo alebo jeho derivát.
7. Farmaceutická formulácia podľa nároku 1, vyznačujúca sa tým, že činidlom zvyšujúcim absorpciu je žlčová soľ.
8. Farmaceutická formulácia podľa nároku 1, vyznačujúca sa tým, že činidlom zvyšujúcim absorpciu je lipid.
9. Farmaceutická formulácia podľa nároku 1, vyznačujúca sa tým, že činidlom zvyšujúcim absorpciu je mydlo, mastná kyselina alebo derivát mastnej kyseliny karnitínu alebo peptid.

10. Farmaceutická formulácia podľa nároku 1, vyznačujúca sa tým, že činidlom zvyšujúcim absorpciu je olej.
11. Farmaceutická formulácia podľa nároku 1, vyznačujúca sa tým, že činidlom zvyšujúcim absorpciu je enamín.
12. Farmaceutická formulácia podľa nároku 1, vyznačujúca sa tým, že činidlom zvyšujúcim absorpciu je chelatačné činidlo.
13. Farmaceutická formulácia podľa nároku 1, vyznačujúca sa tým, že činidlom zvyšujúcim absorpciu je fenotiazín.
14. Farmaceutická formulácia podľa nároku 1, vyznačujúca sa tým, že činidlom zvyšujúcim absorpciu je produkt Maillardových reakcií.
15. Farmaceutická formulácia podľa nároku 1, vyznačujúca sa tým, že činidlom zvyšujúcim absorpciu je polymér.
16. Farmaceutická formulácia podľa nároku 1, vyznačujúca sa tým, že činidlom zvyšujúcim absorpciu je azon, konkavalín A, fosfátový alebo fosfonátový derivát, dietylmaleát alebo dietyletoxymetylénmalonát.
17. Farmaceutická formulácia podľa nároku 1, vyznačujúca sa tým, že činidlom zvyšujúcim absorpciu je kombinácia lipidov, lipid a fosfolipid, lipid a žlčová soľ, lipid a olej, lipid a surfaktant alebo lipid a polymér.
18. Farmaceutická formulácia podľa nároku 1, vyznačujúca sa tým, že činidlom zvyšujúcim absorpciu je kombinácia surfaktantov a olejov.
19. Farmaceutická formulácia podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, vyznačujúca sa tým, že účinná zlúčenina  $\text{HOOC-CH}_2\text{-(R)Cgl-Aze-Pab}$  je vo forme voľnej zásady.

20. Spôsob výroby farmaceutickej formulácie definovanej v ktoromkoľvek z predchádzajúcich nárokov, vyznačujúci sa tým, že sa pridá činidlo zvyšujúce absorpciu k roztoku zlúčeniny  $\text{HOOC-CH}_2\text{-(R)Cgl-Aze-Pab}$ , pufrovacím činidlom sa upraví pH na terapeuticky prijateľné pH a všetky zložky sa zmiešajú.
21. Použitie farmaceutickej formulácie definovanej v ktoromkoľvek z predchádzajúcich nárokov 1 až 19, na liečenie tromboembolizmu.
22. Spôsob liečenia pacienta v prípade potreby antitrombotického liečenia, zahrňujúci podanie účinného množstva farmaceutickej formulácie definovanej v ktoromkoľvek z nárokov 1 až 19 tomuto pacientovi.
23. Spôsob liečenia tromboembolizmu, zahrňujúci podanie účinného množstva farmaceutickej formulácie definovanej v ktoromkoľvek z nárokov 1 až 19, pacientovi v prípade potreby takéhoto liečenia.
24. Spôsob zvyšovania absorpcie terapeuticky účinnej zlúčeniny  $\text{HOOC-CH}_2\text{-(R)Cgl-Aze-Pab}$ , vyznačujúci sa tým, že zahrňuje pridanie činidla zvyšujúceho absorpciu, vybraného zo surfaktantu, alkylglykozidu, cukrového esteru mastnej kyseliny, žlčovej soli, lipidu, mydla, mastnej kyseliny alebo derivátu karnitínu mastnej kyseliny, peptidu, nesteroidného protizápalového liečiva, oleja, enamínu, chelatačného činidla, fenotiazínu, polyméru, produktu Maillardových reakcií, azonu, konkavalínu A, fosfátových alebo fosfonátových derivátov, dietylmaleátu, dietyletoxymetylmalonátu alebo ich kombinácií k roztoku uvedenej účinnej zlúčeniny a prípadne upravenie pH pufrovacím činidlom na terapeuticky prijateľné pH a zmiešanie všetkých zložiek.
25. Spôsob podľa nároku 24, vyznačujúci sa tým, že činidlo zvyšujúce absorpciu je vybrané z monostearátu sacharózy alebo monopalmitátu sacharózy.

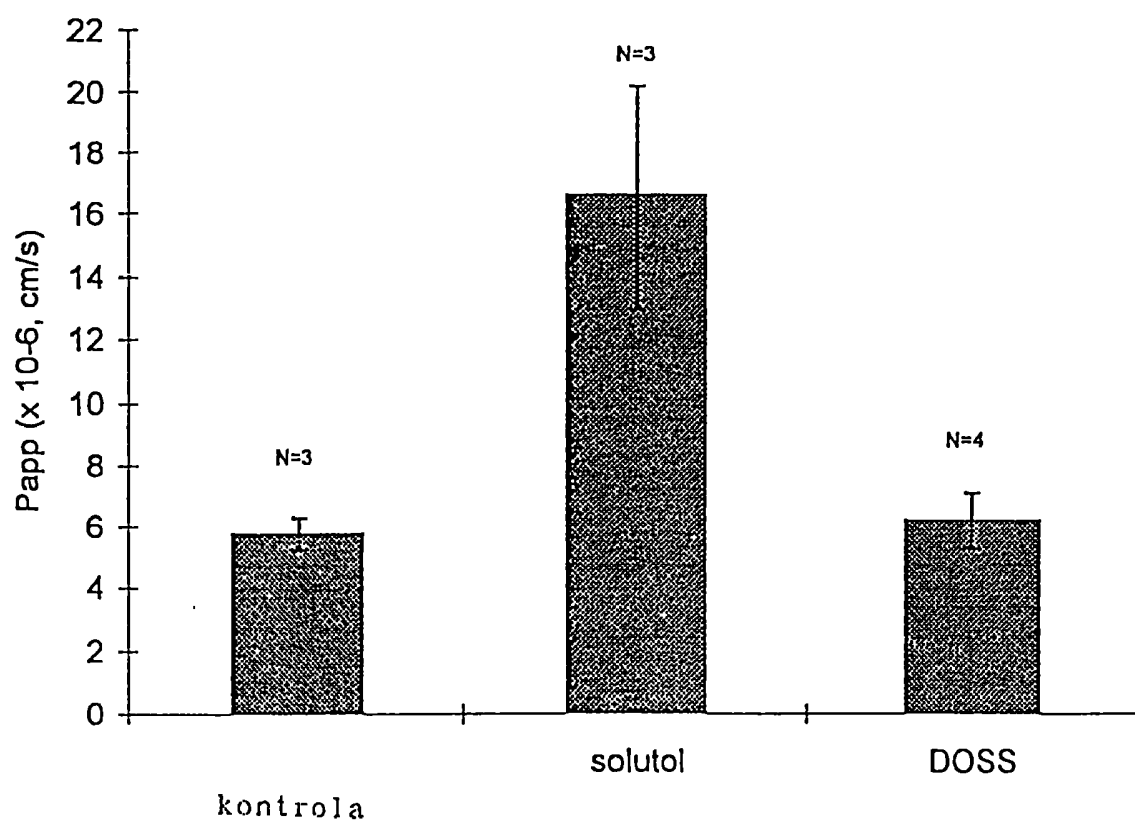
Obr. 1

Permeabilita  $\text{HOOC-CH}_2\text{-(R)Cgl-Aze-Pab}$  v kolónie krysy

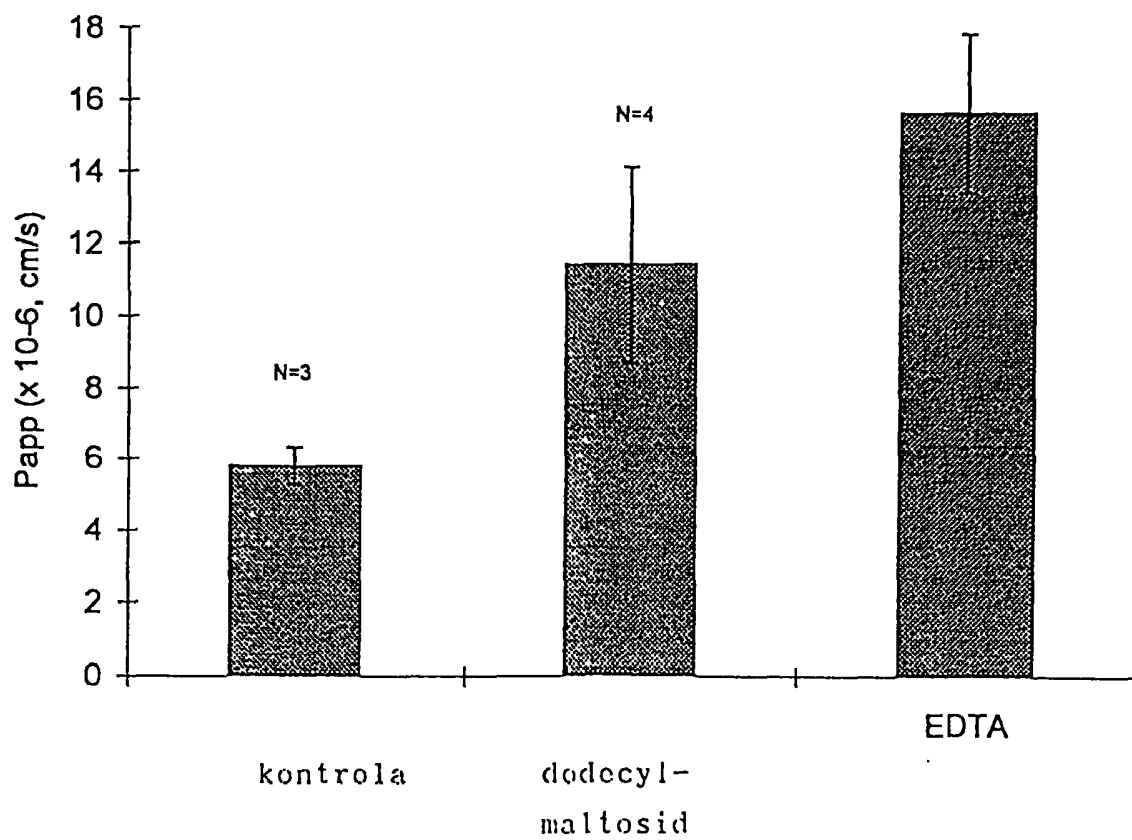


Obr. 2

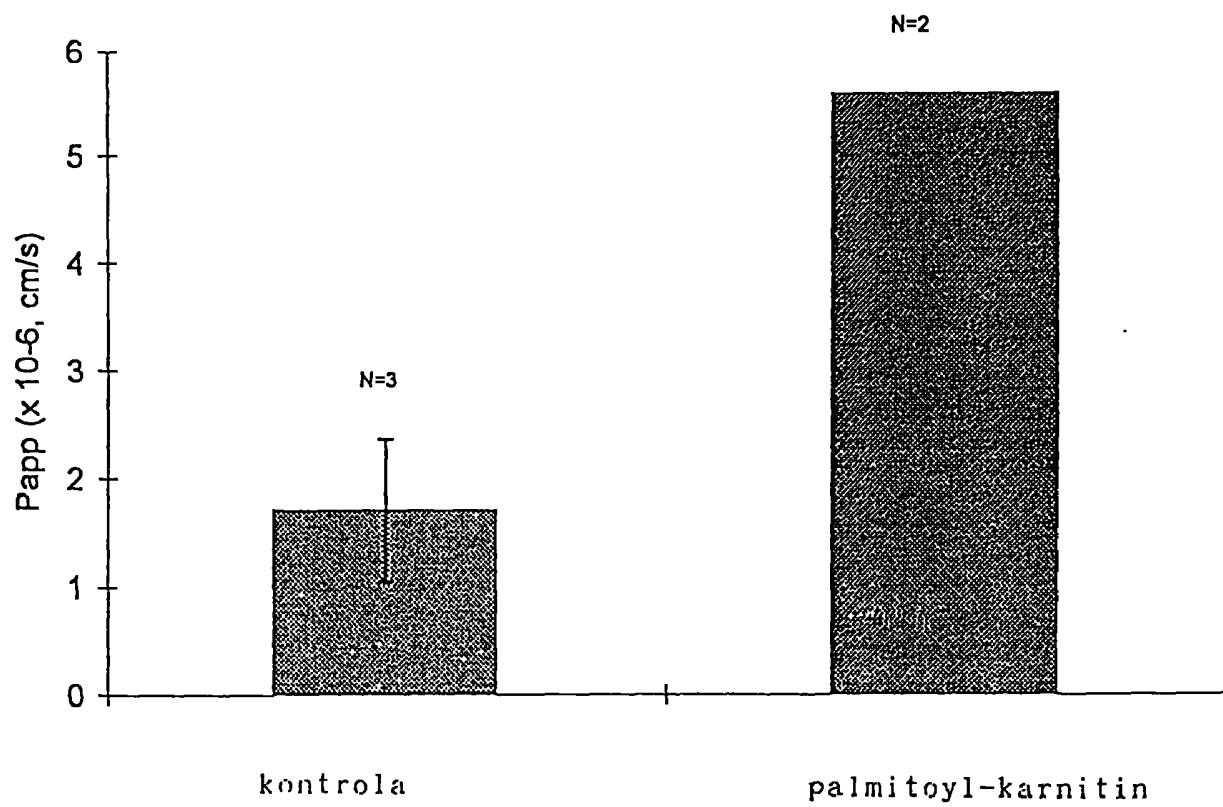
Permeabilita  $\text{HOOC-CH}_2\text{-(R)Cgl-Aze-Pab}$  v ileu krysy



Obr. 3

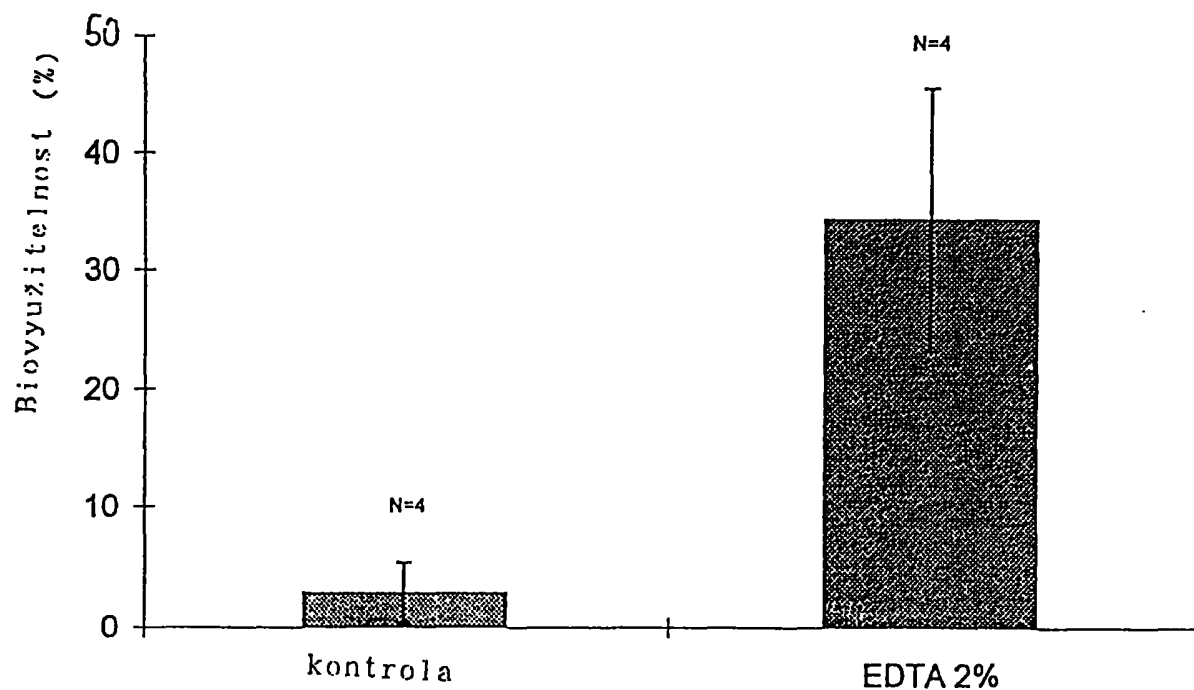
Permeabilita  $\text{HOOC-CH}_2\text{-(R)Cgl-Aze-Pab}$  v ileu krysy

Obr. 4

Permeabilita  $\text{HOOC-CH}_2\text{-(R)Cgl-Aze-Pab}$  v kolóne krysy

Obr. 5

Biovyužitelnosť  $\text{HOOC-CH}_2\text{-(R)Cgl-Aze-Pab}$  v priebehu súčasného podania 2 hmotn./hmotn. EDTA in vivo u krýs



Obr. 6

Biovyužitelnosť  $\text{HOOC-CH}_2\text{-(R)Cgl-Aze-Pab}$  v priebehu súčasného podania s činidlami, zvyšujúcimi absorpciu u krýs

