

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2003-3491**
(22) Přihlášeno: **19.06.2002**
(30) Právo přednosti: **21.06.2001 SE 2001/2069**
30.11.2001 SE 2001/4049
31.05.2002 SE 2002/1660
(40) Zveřejněno: **17.03.2004**
(Věstník č. 3/2004)
(47) Uděleno: **05.11.2008**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **17.12.2008**
(Věstník č. 51/2008)
(86) PCT číslo: **PCT/SE2002/001217**
(87) PCT číslo zveřejněno: **WO 2003/000293**

(11) Číslo dokumentu

299 859

(13) Druh dokumentu **B6**

(51) Int. Cl.

A61K 47/36 (2006.01)
A61K 47/38 (2006.01)
A61K 31/138 (2006.01)
A61K 31/397 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty.
EP 539059 A1; US 4792452.

(73) Majitel patentu:

ASTRAZENECA AB, Södertälje, SE

(72) Puvodce:

Gaik-Lim Khoo Cynthia, Trelleborg, SE
Gustafsson Helena, Göteborg, SE

(74) Zástupce:

Ing. Eduard Hakr, Přístavní 24, Praha 7, 17000

(54) Název vynálezu.

**Farmaceutická formulace a způsob její
přípravy**

(57) Anotace:

Farmaceutická formulace pro orální aplikaci, která obsahuje
iota-karagenan, jeden nebo několik neutrálních gelotvorných
polymerů a bazickou farmaceuticky aktivní složku; přičemž
tato formulace potlačuje uvolňování bazické farmaceuticky
aktivní složky z formulace při kyselém pH; způsob přípravy
zmiňované formulace; a použití zmiňované formulace pro léčeni
kardiovaskulárních poruch.

CZ 299859 B6

Farmaceutická formulace a způsob její přípravy

Oblast techniky

5

Předložený vynález se týká nové farmaceutické formulace pro orální aplikaci, která obsahuje bazickou farmaceuticky aktivní složku, jejíž rozpustnost závisí na pH, což zabraňuje uvolňování bazické farmaceuticky aktivní složky z formulace při kyselém pH (zejména pod pH 3) a s výhodou umožňuje řízené uvolňování farmaceuticky aktivní složky, které je v podstatě nezávislé na širokém rozmezí pH v gastrointestinálním traktu; dále se týká způsobu přípravy zmíněné formulace a použití zmíněné formulace v medicíně.

10

Dosavadní stav techniky

15

Účinné farmaceutické formulace pro řízené uvolňování jsou žádané farmaceutické produkty, neboť umožňují: optimalizaci podávání léku, snížit frekvenci podávání léku a minimalizovat nežádoucí vedlejší účinky. Návrhy takových systémů s řízeným uvolňováním však nejsou jednoduchou záležitostí, zvláště jestliže léčivá formulace je zamýšlena pro orální podání a musí projít gastrointestinálním traktem, který se mezi jiným během svého průběhu vyznačuje velkými rozdíly v pH.

20

Mnoho léků, které mají bazické vlastnosti, se ionizuje při nízkém pH a v této oblasti pH se výrazně více rozpouští ve srovnání s neutrálnějším prostředím. Tento projev pH–závislé rozpustnosti v gastrointestinálním traktu může mít za následek různé disoluční profily léku, spolu s odpovídajícími problémy in vivo biologické dostupnosti.

25

Bylo popsáno několik pokusů o překonání problémů, spojených se závislostí rozpustnosti bazických léčiv na pH. Patří k nim použití enterického polymeru, který je nerozpustný při nízkém pH, čímž se zpomalí uvolňování léčiva v prostředí o nízkém pH (viz například spis US 4 968 508, a A. Streubel a spol., J. Controlled Release, 67, 101–110 (2000)), nebo inkorporace organické kyseliny o nízké molekulové hmotnosti, aby se vytvořilo kyselé mikroprostředí v matrici formulace, čímž se udržuje rozpustnost léčiva na konstantní úrovni (viz například K. E. Gabr, Eur. J. Pharm. Biopharm., 38(6), 199–202 (1992), a V. K. Thoma a Th. Zimmer, Pharm. Ind. 51(1), 98–101 (1989)). Inkorporace aniontového polymeru (například alginátu sodného), vykazujícího pH–závislou rozpustnost, do léčivé formulace která rovněž obsahuje neutrální polymer, poskytla formulaci, tvořící nerozpustný gel při nízkém pH, čímž vznikne silná bariéra vůči difuzi, a to se považuje za hlavní mechanismus, zpomalující uvolňování léčiva při nízkém pH (US 4 792 452; a P. Timmins a spol., Pharmaceutical Development and Technology, 2(1), 25–31 (1997)). Jiné metody používají polymery s nábojem, aby se uvolňování léčiva ovlivňovalo buď iontovou interakcí s léčivem (viz C. Caramella a spol., Pharm. Res. 14(11), 531 (1997), H. Y. Park a spol., Drug Delivery, 5, 13–18 (1998), N. Caram–Lelham, Ph. D. Thesis, Uppsala University (1996)), nebo aby se ovlivňovaly gelotvorné a bobtnací vlastnosti těchto polymerů (viz K. M. Picker, Drug Dev. and Ind. Pharmacy, 25(3), 339–346 (1999)). Použité formulace se zpravidla zakládají na jednom typu polymeru.

30

35

40

45

Baveja a spol. (Int. J. Pharmaceutics, 39, 39–45 (1987)) našli, že když neiontový polymer (HPMC) se smísí s aniontovým polymerem (NaCMC), uvolňování se zpomalí. Range Rao a spol. (Drug Dev. Ind. Pharmacy, 14, 2 299 (1988)) popisují směsi methylcelulózy a NaCMC, které poskytují různé profily uvolňování. Směsi lambda–karagenanu a aktivní složky jsou popsány ve spisu WO 99/21 586.

50

Jsou popsány kombinace strategií, majících za cíl disoluční profil, který je nezávislý na pH (viz spisy WO 96/26 717, WO 99/29 305 a WO 99/39 698). Všechny tyto tři spisy popisují třísložkovou matricovou formulaci, obsahující tři polymery s typicky rozdílnou rozpustností ve vodě

55

a rozdílnými bobtnacími vlastnostmi, jejíž složení lze měnit a nastavením těchto vlastností lze řídit rychlost uvolňování. Dvě z těchto složek jsou gelotvorný polymer s rozpustností významně závislou na pH, jako je alginát sodný, a gelotvorný polymer s rozpustností, která je málo nebo zanedbatelně závislá na pH, jako je hydroxypropylmethylcelulóza (HPMC) nebo polyethylenoxid. Třetí složka je buďto enterický potahový polymer, jako je kopolymer kyseliny metakrylové (WO 96/26 717), EUDRAGIT® L nebo S, které jsou specifické typy polymerů kyseliny metakrylové (WO 99/29 305), nebo ve vodě nerozpustný polymer, jako je ethylcelulóza (WO 99/39 698). Tyto strategie však obecně nemají specificky cílená bazická léčiva a k tomu, aby alespoň zčásti zpomalovaly uvolňování léčiva při nízkých hodnotách pH, závisejí na polymerech typu enterického potahu, nebo na ve vodě nerozpustných polymerech, jako je polymer metakrylové kyseliny, nebo na pH-závislém gelotvorném polymeru, jako je alginát sodný.

Podstata vynálezu

Předložený vynález poskytuje farmaceutickou formulaci pro orální podání, která obsahuje iota-karagenan, jeden nebo několik neutrálních gelotvorných polymerů, a bazickou farmaceuticky aktivní složku; tato formulace inhibuje uvolňování bazické farmaceuticky aktivní složky z formulace při kyselém pH (s výhodou pod pH 3; zvláště okolo pH 1).

V podstatě pH-nezávislé uvolňování znamená, že rychlost uvolňování je významně snížena při pH 1 a lehce zvýšena nebo nezměněna při pH 6,8, takže množství bazické farmaceuticky aktivní složky, uvolněné v jakémkoliv okamžiku, se stává méně závislé na pH.

Předložený vynález dále poskytuje farmaceutickou formulaci pro orální podání, která obsahuje iota-karagenan, jeden nebo několik gelotvorných polymerů, a bazickou farmaceuticky aktivní složku.

Iota-karagenan je s výhodou přítomen ve formulaci podle vynálezu v množství přesahujícím 15 % hmotnostních, a je s výhodou přírodního původu. Jeden typ iota-karagenanu farmaceutické jakosti (dostupný od firmy FMC Biopolymer) má viskozitu ne menší než 5 centipoise (cps), s výhodou v rozmezí 5 až 10 cps (pro 1,5% roztok, který se zahřeje na 82 °C, načež se viskozita měří při 75 °C na Brookfieldově I.V viskozimetru za použití vřetene #1 při rychlosti 30 ot/min). Iota-karagenan technické jakosti (od firmy Fluka Biochemica) má s výhodou viskozitu ne menší než 14 MPa.s, pro 0,3% vodný roztok, který se zahřeje na 20 °C, načež se viskozita měří metodou padající kuličky na viskozimetru typu Haake, za použití Laudova termostatu C3 (Hakke Mess-System III) za použití pozlacených nerezových kuliček o hustotě 7,8 g/cm³.

Neutrální gelotvorný polymer je jeden, nebo směs několika neutrálních erodovatelných polymerů, majících gelotvorné vlastnosti a vykazujících v podstatě pH-nezávislou rozpustnost. Tento neutrální gelotvorný polymer je s výhodou přítomen ve formulaci v množství větším než 10 %, ale výhodněji větším než 20 % hmotnostních. (Termíny „erodovatelný“ a „eroze“ označují rozpouštění nebo rozpad (desintegraci) buďto polymeru samotného, nebo v kombinaci. Rozpouštění je možno urychlit mícháním a rozpad je možno urychlit mechanickou interakcí s tuhou látkou).

Vhodné neutrální gelotvorné polymery zahrnují polyethylenoxid (PEO), deriváty a členy skupiny PEO (například polyethylenglykol (PEG), který pokud možno existuje v tuhém stavu a má vhodnou molekulovou hmotnost nebo viskozitu). Tak například, neutrální gelotvorný polymer je polyethylenoxid nebo polyethylenglykol.

Jestliže se PEO používá jako samotný gelotvorný polymer, má s výhodou molekulovou hmotnost (MW) ≥ 4 miliony (4 M) (například MW se rovná 4 až 8 milionům), což odpovídá vodnému roztoku o viskozitě v rozmezí 1650 až 5500 MPa.s (nebo 1650 až 5500 cps, měřeno v 1% vodném roztoku při 25 °C, za použití Brookfieldova viskozimetru RVF s vřetenem č. 2 při 2 ot/min). Jiné příklady vhodných PEO zahrnují PEO o molekulové hmotnosti přibližně 5 milionů (5 M), což

odpovídá vodnému roztoku o viskozitě v rozmezí 5500 až 7500 MPa.s, nebo PEO o molekulové hmotnosti přibližně 8 milionů (8 M), což odpovídá vodnému roztoku o viskozitě v rozmezí 10 000 až 15 000 MPa.s. Toto rozmezí pokrývá hodnotu pro typickou viskozitu roztoku (v cps), měřenou při 25 °C, udávanou pro tento polymer v USP 24/NF, 2000 edition, str. 2285–2286. PEO tedy může mít molekulovou hmotnost 4 až 8 milionů.

Jestliže PEG je použit jako jediný neutrální gelotvorný polymer, má s výhodou vysokou molekulovou hmotnost, například asi 20 000, což odpovídá rozmezí viskozity 2700 až 3500 MPa.s (nebo 2700 až 3500 cps), měřené za použití 50% vodného roztoku (hmotn./hmotn.) při 20 °C na kapilárním viskozimetru (dle Ubbelohdeho nebo na ekvivalentním viskozimetru). (Viz European Pharmacopoeia 3rd Ed., 2000, Supplement str. 908–909.)

Jiné vhodné gelotvorné polymery zahrnují deriváty celulózy, jako je hydroxypropylmethylcelulóza (HPMC) nebo hydroxyethylcelulóza (HEC) (ale preferována je HPMC) o vhodné vysokých viskozitách (například „HPMC 10 000 cps“, „HPMC 15 000 cps“, „HEC typu HH“ nebo „HEC typu H“). Jestliže jsou použity jako jediný neutrální polymer, hydroxypropylmethylcelulózové polymery jako „HPMC 10 000 cps“ a „HPMC 15 000 cps“ mají zdánlivé viskozity 7500 až 14 000 MPa.s (nebo 7500 až 14 000 cps), respektive 11 250 až 21 000 MPa.s (nebo 11 250 až 21 000 cps), měřeno při 20 °C ve 2% (hmotn./hmotn.) vodném roztoku, vztaženo na sušenou látku, za použití kapilárního viskozimetru (dle Ubbelohdeho nebo na ekvivalentním viskozimetru). Jeden typ hydroxyethylcelulózového polymeru, například „Natrasol 250 Pharma, typ HH“ od firmy Hercules Incorporated (Aqualon) vykazuje typicky viskozitu přibližně 20 000 MPa.s, naměřenou na Brookfieldově viskozimetru (Synchro–Lectric Model LVF, 1% roztok, vřetenem č. 4, rychlost 30 ot/min, faktor 200, 25 °C) (viz Natrosol Physical and Chemical Properties booklet, 33.007–E6 (1993), str. 21).

Když se použije směs neutrálních gelotvorných polymerů, může tato obsahovat například směs dvou nebo několika PEO, dvou nebo několika HPMC, směs PEO a HPMC nebo směs PEO a PEG. Tak například PEO o molekulové hmotnosti 4, 5 nebo 8 milionů se může smísit s PEO o molekulové hmotnosti 1 milion, s PEO o molekulové hmotnosti 400 000, s PEO o molekulové hmotnosti 100 000 nebo s PEG o molekulové hmotnosti 6000.

Alternativně se neutrální gelotvorný polymer (například PEO) může použít v kombinaci s ne-gelotvorným neutrálním polymerem (jako je nízkomolekulární PEG, například PEG o molekulové hmotnosti nižší než 10 000). Příklady nízkomolekulárních PEG v takové kombinaci zahrnují PEG o molekulové hmotnosti 8000 (odpovídající viskozitnímu rozmezí 260 až 510 MPa.s), nebo PEG o molekulové hmotnosti 6000 (odpovídající viskozitnímu rozmezí 200 až 270 mPa.s).

Směs dvou nebo několika HPMC může zahrnovat nízkoviskózní (ne-gelotvorné) i vysokoviskózní (gelotvorné) látky. Například, „HPMC 50 cps“, „HPMC 15 cps“ a „HPMC 6 cps“, jejichž zdánlivé viskozity jsou 40 až 60 MPa.s, 11,3 až 21,0 MPa.s, respektive 4,8 až 7,2 MPa.s (podle výše definovaných metod), se mohou použít jako směsi s „HPMC 10 000 cps“ nebo s „HPMC 15 000 cps“.

Směs dvou nebo několika polymerů stejného druhu, ale různé molekulové hmotnosti, se vyznačuje lepším řízením eroze, když formulace je ve formě tablety. Čím vyšší je molekulová hmotnost použitého PEO, samotného nebo ve směsi, tím méně tohoto polymeru je potřeba k přípravě formulace podle vynálezu.

Přesná formulace podle vynálezu závisí na molekulové hmotnosti a distribuci molekulové hmotnosti u zvoleného gelotvorného polymeru, právě tak jako na kvalitě každého z použitých polymerů.

V jednom z aspektů vynálezu neutrální gelotvorný polymer je PEO o molekulové hmotnosti přibližně 4 miliony nebo více, PEG o molekulové hmotnosti přibližně 20 000 nebo více, nebo deri-

vát celulózy o zdánlivé viskozitě přibližně 7500 cps nebo vyšší (měřeno jak popsáno výše).

Poměr neutrálního gelotvorného polymeru (například PEO, PEG nebo HPMC, zvláště PEO nebo HPMC, nebo jejich vzájemné směsi, nebo 2 nebo několik PEO nebo HPMC) k iota-karagenanu se s výhodou pohybuje v rozmezí 20:80 až 80:20 (zvláště přibližně 40:60 až 60:40, například přibližně 50:50).

Bazické farmaceuticky aktivní složky obsahují jednu nebo několik bazických skupin, které mají pKa s výhodou od 1 do 12 (například od 1 do 10, zvláště od 1 do 7) a popřípadě obsahují také jednu nebo několik bazických skupin majících pKa vyšší než 10. Bazická farmaceuticky aktivní složka může tak mít jednu nebo několik hodnot pKa, ale alespoň jedna z nich má hodnotu s výhodou od 1 do 12 (například od 1 do 10, zvláště od 1 do 7). Příklady bazických skupin v těchto bazických farmaceuticky aktivních složkách, majících pKa od 1 do 12 (například od 1 do 10) zahrnují hydroxyamidiny, sekundární nebo terciární aminy, nebo primární a sekundární amidy.

Vhodné bazické farmaceuticky aktivní složky vykazují s výhodou nízkou až střední rozpustnost ve vodě (například rozpustnost ve vodě až 50 mg/ml, zvláště 0,001 až 20 mg/ml, při 25 °C a při pH 7,0) a jsou kladně nabitě jedním nebo několika kladnými náboji (v závislosti na počtu a pKa bazických skupin ve farmaceuticky aktivní složce) při nízkém pH (například při pH 1 až 6, zvláště při pH 1 až 2).

Vhodná bazická farmaceuticky aktivní složka je například sloučenina, vykazující kardiiovaskulární aktivitu (jako je peptidický, nebo peptidu podobný, inhibitor trombinu). Peptidické inhibitory trombinu mají molekulovou hmotnost pod 1000, obsahují 1, 2, 3 nebo 4 peptidické vazby a vykazují pH-závislou rozpustnost. Zahrnují peptidické inhibitory trombinu (a jejich profarmaka), které jsou genericky, a konkrétněji, popsány v přehledném článku Claessona (Blood Coagul. Fibrin. 5, 411 (1994)), právě tak jako ty, které jsou popsány v patentovém spisu US 4 346 078; v mezinárodních patentových přihláškách WO 97/23 499, WO 97/02 284, WO 97/46 577, WO 98/01 422, WO 93/05 069, WO 93/11 152, WO 95/23 609, WO 95/35 309, WO 96/25 426, WO 94/29 336, WO 93/18 060 a WO 95/01 168, a EP přihláškách č. 623 596, 648 780, 468 231, 559 046, 641 779, 185 390, 526 877, 542 525, 195 212, 362 002, 364 344, 530 167, 293 881, 686 642, 669 317 a 601 459. Peptidické inhibitory trombinu (nebo jejich profarmaka) zvláště zahrnují inogatran, melagatran {HOOCC-CH₂-RCgl-Aze-Pab-H; glycyl, N-[2-[[[4-(aminoiminomethyl)fenyl]methyl]amino]karbonyl]-1-azetidiny]-1-cyklohexyl-2-oxoethyl]-, [2R-[2S]]-} a H376/95 {ximelagatran; EtO₂C-CH₂-RCgl-Aze-Pab OH; viz příklad 17 ve WO 97/23 499; glycyl, N-[1-cyklohexyl-2-[2-[[[4-(hydroxyimino)aminomethyl]fenyl]-methyl]amino]karbonyl]-1-azetidiny]-2-oxoethyl]-, ethylester, [S-(R*,S*)]-}.

V jiném aspektu vynálezu peptidické inhibitory trombinu (nebo jejich profarmaka) zahrnují inogatran, melagatran, H376/95, Ph(3-Cl)(5-OCH₂CH₂F)-(R)CH(OH)C(O)-Aze-Pab(OMe) a Ph(3-Cl)-(5-OCHF₂)-(R)CH(OH)C(O)-Aze-Pab(OMe).

V dalším aspektu předložený vynález poskytuje formulaci jak je popsána výše, ve které bazická farmaceuticky aktivní složka je:

- Ph(3-Cl)(5-OCHF₂)-(R)CH(OH)C(O)-(S)Aze-Pab(OMe) (sloučenina A);
 Ph(3-Cl)(5-OCHF₂)-(R)CH(OH)C(O)-(S)Aze-Pab(2,6-diF)(OMe) (sloučenina D);
 Ph(3-Cl)(5-OCH₂CH₂F)-(R)CH(OH)C(O)-(S)Aze-Pab(OMe) (sloučenina E);
 Ph(3-Cl)(5-OCHF₂)-(R)CH(OH)C(O)-(S)Aze-Pab(OH) (sloučenina F);
 Ph(3-Cl)(5-OCHF₂)-(R)CH(OH)C(O)-(S)Aze-Pab(2,6-diF)(OH) (sloučenina G);
 Ph(3-Cl)(5-OCH₂CH₂F)-(R)CH(OH)C(O)-(S)Aze-Pab(OH) (sloučenina H).

Sloučeninu G je možno připravit metodami, které jsou podobné metodám, popsaným níže pro přípravu sloučenin F a H.

5 V jiném aspektu se vynález týká farmaceutické formulace, ve které bazická farmaceuticky aktivní složka je:

1. 4-({3-[7-(3,3-dimethyl-2-oxobutyl)-9-oxa-3,7-diazabicyklo[3.3.1]non-3-yl]propyl}-amino)benzonitril (kterážto sloučenina je v dalším označována jako sloučenina B);
- 10 2. terc-butyl-2-{7-[3-(4-kyanilanilino)propyl]-9-oxa-3,7-diazabicyklo[3.3.1]non-3-yl}-ethylkarbamát;
3. terc-butyl-2-{7-[4-(4-kyanfenyl)butyl]-9-oxa-3,7-diazabicyklo[3.3.1]non-3-yl}ethylkarbamát; nebo
- 15 4. terc-butyl-2-{7-[(2S)-3-(4-kyanfenyloxy)-2-hydroxypropyl]-9-oxa-3,7-diazabicyklo[3.3.1]non-3-yl}ethylkarbamát (kterážto sloučenina je v dalším označována jako sloučenina C);
- 20 přičemž tyto sloučeniny byly popsány ve spisu WO 01/28 992.

V dalším aspektu vynálezu bazická farmaceuticky aktivní složka je metoprolol nebo jeho sůl (jako je jeho sukcínát nebo tartrát).

25 Formulace podle předloženého vynálezu může obsahovat: přídavky pro zpracování, stabilizátory, změkčovadla, barviva, mazadla (jako je stearyl fumarát sodný), pojiva, plniva nebo povrchově aktivní látky, nebo jiné excipienty, běžně používané při přípravě farmaceutických prostředků.

30 V jednom z konkrétních aspektů vynálezu, formulace podle předloženého vynálezu obsahuje mazadlo (jako je stearyl fumarát sodný).

V jiném aspektu předloženého vynálezu, molární poměr iota-karagenanu k bazické farmaceuticky aktivní složce se pohybuje v rozmezí 3:1 až 1:3.

35 V dalším aspektu, farmaceutická formulace podle předloženého vynálezu obsahuje 15 až 80 % iota-karagenanu.

V jiném aspektu, farmaceutická formulace podle předloženého vynálezu obsahuje 15 až 80 % jednoho nebo několika gelotvorných polymerů.

40 V dalším aspektu, farmaceutická formulace podle předloženého vynálezu obsahuje 1 až 50 % bazické farmaceuticky aktivní složky.

45 V ještě dalším aspektu, farmaceutická formulace podle předloženého vynálezu obsahuje 0 až 10 % (zvláště 1 až 10 %) přídavku pro zpracování, stabilizátoru, změkčovadla, barviva, mazadla, pojiva nebo plnidla, nebo jiného excipientu, běžně používaného při přípravě farmaceutických prostředků.

50 Máme za to, že inhibice uvolňování bazické farmaceuticky aktivní složky z formulace při kyselém pH (zvláště v podstatě pH-nezávislého řízeného uvolňování) je založena na následujícím mechanismu. Při nízkém pH by bazické farmaceuticky aktivní ingredientní léčivo mělo mít relativně vysokou rozpustnost, protože existuje v silně ionizovaném stavu, a proto bychom očekávali, že se bude rychle uvolňovat z jakékoliv neutrální matrice. Domníváme se, že při kyselém pH a v přítomnosti iota-karagenanu se negativně nabitý iota-karagenan a kladně nabitě léčivo přitahují, což zpomaluje uvolňování léčiva a tím přispívá ke konstantnějšímu disolučnímu profilu.

Při vyšším pH, kdy farmaceutické léčivo není tak silně ionizováno, nebo není ionizováno vůbec, a proto by se mělo pomalu uvolňovat z jakékoliv neutrální matrice, máme za to, že výše zmíněná iontová interakce je rovněž méně významná a disoluční profil je řízen převážně kombinací bobtnacích, gelotvorných a erozních profilů neutrálního gelotvorného polymeru(polymerů) a anionto-
 5 vého polymeru, iota-karagenanu, které jsou použity ve formulaci.

Výsledné bobtnací, gelotvorné a erozní vlastnosti formulace podle vynálezu souvisejí s vlastnostmi jako je molekulová hmotnost a distribuce molekulární hmotnosti gelotvorného polymeru-
 (polymerů) i aniontového polymeru, a také souvisí s pH-závislou rychlostí hydrolyzy aniontového
 10 polymeru. Je tedy možno získat různé rychlosti uvolňování bazické farmaceuticky aktivní složky úpravou charakteru (například molekulové hmotnosti nebo distribuce molekulové hmotnosti) gelotvorného polymeru, množství iota-karagenanu ve formulaci a/nebo poměru gelotvorného polymeru k iota-karagenanu.

Formulace podle předloženého vynálezu může být ve formě pevné dávkové formy (jako jsou tablety, tobolky, pelety nebo prášek, dispergovaný ve vhodném zásobníku, nebo ve formě kombinované formulace (jako jsou potahované pelety, podávané jako tablety, tobolky nebo sáčky)).

V jednom z aspektů vynález poskytuje tablety, obsahující 20 až 500 mg (zvláště 40 až 60 mg)
 20 bazické farmaceuticky aktivní složky (jako je H376/95; nebo sloučenina A, B nebo C).

Když je farmaceutická formulace podle předloženého vynálezu ve formě tablet, jsou tyto tablety s výhodou připraveny tak, aby se všechna bazická farmaceuticky aktivní složka, v ionizované
 nebo neionizované formě podle pH v každé části gastrointestinálního traktu, uvolnila během přibližně 20 hodin, například 18 až 22 hodin (alternativně 20 až 26 hodin).
 25

Ještě další aspekt se týká přípravy formulace podle předloženého vynálezu, spočívající ve smíšení iota-karagenanu, jednoho nebo několika neutrálních gelotvorných polymerů a bazické farmaceuticky aktivní složky, a popřípadě v komprimaci zmíněné směsi (s výhodou za přítomnosti mazadla (jako je stearylumarát sodný, prodáváný pod jménem PRUV^{1M})), za účelem přípravy tablet.
 30

Tabletová formulace se může připravit například přímou komprimací nebo granulací za vlhka.

Při přímé komprimaci se bazická farmaceuticky aktivní složka pečlivě smísí s gelotvorným polymerem a iota-karagenanem a podle potřeby s přídavnými excipienty. Prosáté mazadlo (jako je stearylumarát sodný) se přidá k této směsi a znovu se s ní promíchá. Výsledná směs se pak komprimuje do tablet.
 35

Při granulaci za vlhka se bazická farmaceuticky aktivní složka pečlivě smísí s gelotvorným polymerem a iota-karagenanem. Výsledná směs se pak může zvlhčit:
 40

Roztokem vhodného pojiva (jako je polyvinylpyrrolidon (PVP), rozpuštěný ve vhodném rozpouštědle (jako je ethanol nebo voda)); nebo vhodným rozpouštědlem (jako je ethanol nebo
 45 voda); a vzniklá směs se granuluje za použití standardních nebo modifikovaných postupů (jako je sprejová granulace). Po vysušení vzniklého granulátu (například v sušárně při vhodné teplotě (jako například přibližně 50 °C) po vhodnou dobu (jako je 20 až 24 hodin)) se granulát roztřepe (například mletím za sucha nebo za vlhka), smísí se s mazadlem (jako je stearylumarát sodný, stearát hořečnatý nebo talek) a vzniklá kompozice se lisuje do tablet. Vysušený granulát se může
 50 použít k plnění tobolek (jako jsou želatinové tobolky).

Další aspekt předloženého vynálezu se týká způsobu přípravy formulace jak byla popsána výše.

Sloučeniny, aktivní vůči trombinu, a jejich profarmaka se mohou použít pro terapii a/nebo profylaxi trombózy a nadměrné srážlivosti v krvi a/nebo tkáních živočichů, včetně člověka. Je známo,
 55

že nadměrná srážlivost může vést k trombo-embolickým onemocněním. Stav, související s nadměrnou srážlivostí a trombo-embolickými onemocněními, které je možno zmínit, zahrnují zděděnou nebo získanou rezistenci vůči aktivovanému proteinu C, jako je mutace faktoru v („factor v Leiden“) a zděděné nebo získané deficiencie antitrombinu III, proteinu C, proteinu s nebo
 5 heparinového kofaktoru II. Jiné stavy, o kterých je známo, že souvisejí s nadměrnou srážlivostí a trombo-embolickým onemocněním, zahrnují cirkulující antifosfolipidové protilátky („Lupus anticoagulant“), homocysteinémií, heparinem indukovanou trombocytopenií a defekty fibrinolýzy, právě tak jako koagulační syndromy (například roztroušenou intravaskulární koagulací (DIC) a obecně vaskulární poranění (například v důsledku chirurgického zákroku).

10 V dalším aspektu se předložený vynález týká formulace, jak byla výše popsána, pro použití v terapii (léčbě i profylaxi), například jako léčivo (jako je léčivo pro kardiovaskulární poruchy, například tromboembolismus).

15 Formulace podle předloženého vynálezu je užitečná pro přípravu léčebného prostředku, použitelného v terapii.

Jiný aspekt předloženého vynálezu se týká způsobu terapie kardiovaskulárních poruch (například tromboembolizmu) u teplokrevných živočichů, trpících nebo ohrožených uvedenými poruchami,
 20 který spočívá v podání terapeuticky účinné dávky sloučeniny podle vynálezu jedinci, který takovou terapii potřebuje.

Jisté peptidické inhibitory trombinu, nebo jejich profarmaka, se mohou připravit postupy, popsanými níže.

25 Obecné postupy

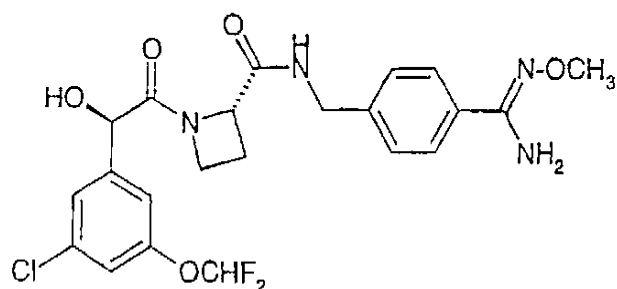
30 TLC se provádí na silikagelu. Chirální HPLC analýza se provádí na 46 mm x 250 mm koloně Chiracel OD s 5cm předkolonkou. Teplota kolony se udržuje na 35 °C, průtok 1,0 ml/min. Používá se UV detektor Gilson 115 UV při vlnové délce 228 nm. Jako mobilní fáze se používají hexany, ethanol a kyselina trifluoroctová, jejichž příslušné poměry jsou udány u jednotlivých sloučenin. Typicky, produkt se rozpustí v minimálním množství ethanolu a tento roztok se zředí mobilní fází.

35 V níže uvedených preparacích se LC-MS/MS provádí na přístroji HP-1100 s injektorem CTC-PAL a s použitím kolony 5 Tm, 4x100 mm ThermoQuest, Hypersil BDS-C18. Použije se MS detektor API-3000 (Sciex), průtok 1,2 ml/min a mobilní fáze (gradient) sestává z 10 až 90 % acetonitrilu s 90 až 10 % 4 mM vodného octanu amonného, přičemž oba obsahují 0,2 % kyseliny mravenčí.

40 Hmotová spektra o nízkém rozlišení (LRMS) se měří na spektrometru Micromass ZQ v ESI posneg switching ion modu (hmotnostní rozsah m/z 100 až 800); a hmotnostní spektra o vysokém rozlišení (HRMS) se měří na spektrometru Micromass LTC v ES negativním ionizačním modu (rozsah m/z 100 až 1000); jako vnitřní hmotový standard se použije Leucine Enkefalin
 45 (C₂₈H₃₇N₅O₇).

¹H NMR spektra se měří za použití tetramethylsilanu jako vnitřního standardu.

Příprava $\text{Ph}(3\text{-Cl})(5\text{-OCHF}_2)\text{-(R)CH(OH)C(O)\text{-(S)Azc-Pab(OMe)}$ (sloučenina A)



5 (i) 3-Chlor-5-methoxybenzaldehyd

3,5-Dichloranisol (74,0 g; 419 mmol) v THF (200 ml) se přikape ke kovovému hořčíku (14,2 g; 585 mmol, promytý 0,5N HCl) v THF (100 ml) při 25 °C. Po přidání se přikape 1,2-dibromethan (3,9 g; 20,8 mmol). Výsledná tmavohnědá směs se zahřívá k refluxu 3 hodiny. Pak se směs zchladí na 0 °C a přidá se N,N-dimethylformamid (60 ml) v jedné dávce. Směs se rozdělí mezi diethylether (3 x 400 ml) a 6N HCl (500 ml). Spojené organické extrakty se promyjí solankou (300 ml), vysuší se nad Na_2SO_4 , zfiltrují se a zahustí ve vakuu. Zbylý olej se podrobí flash chromatografii (2 x) na silikagelu v soustavě hexan-ethylacetát (4:1), čímž se získá 38,9 g (54 %) substituí sloučeniny ve formě žlutého oleje.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ 9,90 (s, 1H); 7,53 (s, 1H); 7,38 (s, 1H); 7,15 (s, 1H); 3,87 (s, 3H).

(ii) 3-Chlor-5-hydroxybenzaldehyd

20 Roztok 3-chlor-5-methoxybenzaldehydu (22,8 g; 134 mmol; viz. stupeň (i) výše) v dichlormethanu (250 ml) se ochladí na 0 °C. Pak se k němu během 15 minut přikape bromid boritý (15,8 ml; 167 mmol). Směs se míchá 2 hodiny a pak se pomalu přidá voda (50 ml). Roztok se extrahuje ethyletherem (2 x 100 ml), organické vrstvy se spojí, vysuší se nad Na_2SO_4 , zfiltrují se a zahustí ve vakuu. Flash chromatografie na silikagelu v soustavě hexan-ethylacetát (4:1) poskytne substituí sloučeninu (5,2 g; 25 %).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ 9,85 (s, 1H); 7,35 (s, 1H); 7,20 (s, 1H); 7,10 (s, 1H); 3,68 (s, 1H).

(iii) 3-Chlor-5-difluormethoxybenzaldehyd

30 Roztok 3-chlor-5-hydroxybenzaldehydu (7,5 g; 48 mmol; viz. stupeň (ii) výše) ve 2-propanolu (250 ml) a 30% KOH (100 ml) se zahřívá k refluxu. Do této reakční směsi se 2 hodiny uvádí za míchání CHClF_2 . Reakční směs se ochladí, okyselí 1N HCl a extrahuje ethylacetátem (2 x 100 ml). Organické vrstvy se promyjí solankou (100 ml), vysuší se nad Na_2SO_4 , zfiltrují se a zahustí ve vakuu. Zbytek se podrobí flash chromatografii na silikagelu v soustavě hexan:ethylacetát (4:1), čímž se získá substituí sloučenina (4,6 g; 46 %).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ 9,95 (s, 1H); 7,72 (s, 1H); 7,52 (s, 1H); 7,40 (s, 1H); 6,60 (t, $J_{\text{HF}} = 71,1$ Hz, 1H).

40 (iv) $\text{Ph}(3\text{-Cl})(5\text{-OCHF}_2)\text{-(R,S)CH(OTMS)CN}$

Roztok 3-chlor-5-difluormethoxybenzaldehydu (4,6 g; 22,3 mmol; viz. stupeň (iii) výše) v dichlormethanu (200 ml) se ochladí na 0 °C. Pak se přidá ZnI_2 (1,8 g; 5,6 mmol) a trimethyl-

silylkyanid (2,8 g; 27,9 mmol) a reakční směs se nechá ohřát na laboratorní teplotu a míchá se 15 hodin. Pak se směs částečně zahustí ve vakuu, čímž se získá subtitulní sloučenina ve formě kapaliny, která se použije přímo ve stupni (v), bez dalšího čištění nebo charakterizace.

5 (v) $\text{Ph}(3\text{-Cl})(5\text{-OCHF}_2)\text{-(R,S)CH(OH)C(NH)OEt}$

Ph(3-Cl)(5-OCHF₂)-(R,S)CH(OTMS)CN (6,82 g; předpokládáno 22,3 mmol; viz stupeň (iv) výše) se přikape ke HCl/EtOH (500 ml). Reakční směs se míchá 15 hodin a pak se částečně zahustí ve vakuu, čímž se získá subtitulní sloučenina ve formě kapaliny, která se použije přímo ve stupni (vi), bez dalšího čištění nebo charakterizace.

(vi) $\text{Ph}(3\text{-Cl})(5\text{-OCHF}_2)\text{-(R,S)CH(OH)C(O)OEt}$

15 Ph(3-Cl)(5-OCHF₂)-(R,S)CH(OH)C(NH)OEt (6,24 g; předpokládáno 22,3 mmol; viz stupeň (v) výše) se rozpustí v THF (250 ml), přidá se 0,5M Na₂SO₄ (400 ml) a reakční směs se míchá 65 hodin při 40 °C. Pak se reakční směs částečně zahustí ve vakuu, aby se odstranila většina THF a zbytek se extrahuje Et₂O (3 x 100 ml), vysuší se nad Na₂SO₄, zfiltruje se a zahustí ve vakuu. Získá se tak subtitulní sloučenina ve formě tuhé látky, která se použije ve stupni (vii) bez dalšího čištění nebo charakterizace.

20 (vii) $\text{Ph}(3\text{-Cl})(5\text{-OCHF}_2)\text{-(R,S)CH(OH)C(O)OH}$

25 Roztok Ph(3-Cl)(5-OCHF₂)-(R,S)CH(OH)C(O)OEt (6,25 g; předpokládáno 22,3 mmol; viz stupeň (vi) výše) ve 2-propanolu (175 ml) a 20% KOH (350 ml) se míchá při teplotě místnosti 15 hodin. Reakční směs se pak částečně zahustí ve vakuu, aby se odstranila většina 2-propanolu. Zbýlá směs se okyselí 1M Na₂SO₄, extrahuje se Et₂O (3 x 100 ml), vysuší se nad Na₂SO₄ a zahustí se ve vakuu. Získaný tuhý zbytek se podrobí flash chromatografii na silikagelu v soustavě CHCl₃-MeOH-konc.NH₄OH (6:3:1), čímž se získá amonná sůl subtitulní sloučeniny. Tato amonná sůl se pak rozpustí ve směsi ethylacetátu (75 ml) a vody (75 ml) a okyselí se 2N HCl. Organická vrstva se oddělí a promyje solankou (50 ml), vysuší se nad Na₂SO₄ a zahustí se ve vakuu. Získá se tak subtitulní sloučenina (3,2 g; 57 %, stupeň (iv) až (vii)).

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD), δ 7,38 (s, 1H); 7,22 (s, 1H); 7,15 (s, 1H); 6,89 (t, J_{H-F} = 71,1 Hz, 1H); 5,16 (s, 1H).

35 (viii) $\text{Ph}(3\text{-Cl})(5\text{-OCHF}_2)\text{-(R)CH(OH)C(O)OH}$ (a) a
 $\text{Ph}(3\text{-Cl})(5\text{-OCHF}_2)\text{-(S)CH(OAc)C(O)OH}$ (b)

40 Směs Ph(3-Cl)(5-OCHF₂)-(R,S)CH(OH)C(O)OH (3,2 g; 12,7 mmol; viz stupeň (vii) výše) a lipázy PS „Amano“ (~2,0 g) ve vinylacetátu (125 ml) a MTBE (125 ml) se refluxuje 48 hodin. Reakční směs se ochladí, zfiltruje se přes celit[®] a filtrační koláč se promyje ethylacetátem. Filtrát se zahustí ve vakuu a zbytek se podrobí flash chromatografii na silikagelu v soustavě CHCl₃-MeOH-konc.NH₄OH (6:3:1), čímž se získají amonné soli subtitulních sloučenin (a) a (b). Sloučenina (a) ve formě své soli se rozpustí ve vodě, okyselí se 2N HCl a extrahuje se ethylacetátem. Organická vrstva se promyje solankou, vysuší se nad Na₂SO₄, zfiltruje se a zahustí ve vakuu, čímž se získá subtitulní sloučenina (a) (1,2 g; 37 %).

Pro sloučeninu (a):

50 ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD), δ 7,38 (s, 1H); 7,22 (s, 1H); 7,15 (s, 1H); 6,89 (t, J_{H-F} = 71,1 Hz, 1H); 5,17 (s, 1H).

(ix) $\text{Ph}(3\text{-Cl})(5\text{-OCHF}_2)\text{-(R)CH(OH)C(O)-Aze-Pab(Teoc)}$

K roztoku $\text{Ph}(3\text{-Cl})(5\text{-OCHF}_2)\text{-(R)CH(OH)C(O)OH}$ (1,1 g; 4,4 mmol; viz stupeň (viii) výše) a H-Aze-Pab(Teoc) (viz mezinárodní patentovou přihlášku WO 00/42 059; 2,6 g; 5,7 mmol) v dimethylformamidu (50 ml) se při 0 °C přidá PyBOP (2,8 g; 5,3 mmol) a kolidin (1,3 g; 10,6 mmol). Reakční směs se míchá 2 hodiny při 0 °C a pak při teplotě místnosti dalších 15 hodin. Pak se reakční směs zahustí ve vakuu a zbytek podrobí flash chromatografii na silikagelu (3 x), napřed v soustavě $\text{CHCl}_3\text{-EtOH}$ (9:1), pak v soustavě EtOAc-EtOH (20:1), a nakonec v soustavě $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-CH}_3\text{OH}$ (95:5), čímž se získá substituídní sloučenina (1,0 g; 37 %) ve formě bílé tuhé látky.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CD_3OD , směs rotamerů), δ 7,79 až 7,85 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H); 7,15 až 7,48 (m, 5H); 6,89 a 6,91 (t, $J_{\text{HF}} = 71,1$ Hz, 1H); 5,12 a 5,20 (s, 1H); 4,75 až 4,85 (m, 1H); 3,97 až 4,55 (m, 6H); 2,10 až 2,75 (m, 2H); 1,05 až 1,15 (m, 2H); 0,09 (s, 9H). MS (m/z): 611 ($M + 1$)⁺.

(x) $\text{Ph}(3\text{-Cl})(5\text{-OCHF}_2)\text{-(R)CH(OH)C(O)-Aze-Pab(OMe,Teoc)}$

$\text{Ph}(3\text{-Cl})(5\text{-OCHF}_2)\text{-(R)CH(OH)C(O)-Aze-Pab(Teoc)}$ (0,40 g; 0,65 mmol; viz stupeň (ix) výše) se rozpustí ve 20 ml acetonitrilu a přidá se 0,50 g (6,0 mmol) hydrochloridu *O*-methylhydroxylaminu. Směs se zahřívá 2 hodiny při 70 °C, pak se rozpouštědlo odpaří a zbytek se rozdělí mezi vodu a ethylacetát. Vodná fáze se ještě dvakrát extrahuje ethylacetátem a spojené organické fáze se promyjí vodou, solankou, vysuší se nad Na_2SO_4 , zfiltrují se a odpaří. Výtěžek produktu je 0,41 g (91 %).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), δ 7,83 (bt, 1H); 7,57 (bs, 1H); 7,47 (d, 2H); 7,30 (d, 2H); 7,20 (m, 1H); 7,14 (m, 1H); 7,01 (m, 1H); 6,53 (t, 1H); 4,89 (s, 1H); 4,87 (m, 1H); 4,47 (m, 2H); 4,4 až 4,2 (b, 1H); 4,17 až 4,1 (m, 3H); 3,95 (s, 3H); 3,67 (m, 1H); 2,68 (m, 1H); 2,42 (m, 1H); 0,97 (m, 2H); 0,01 (s, 9H).

(xi) $\text{Ph}(3\text{-Cl})(5\text{-OCHF}_2)\text{-(R)CH(OH)C(O)-(S)Aze-Pab(OMe)}$

$\text{Ph}(3\text{-Cl})(5\text{-OCHF}_2)\text{-(R)CH(OH)C(O)-Aze-Pab(OMe,Teoc)}$ (0,40 g; 0,62 mmol; viz stupeň (x) výše) se rozpustí v 5 ml TFA a nechá se 30 minut reagovat. TFA se odpaří a zbytek se rozdělí mezi ethylacetát a vodný roztok NaHCO_3 . Vodná fáze se dvakrát extrahuje ethylacetátem a spojené organické fáze se promyjí vodou, solankou, vysuší se nad Na_2SO_4 , zfiltrují se a rozpouštědlo se odpaří. Produkt se podrobí lyofilizaci ze směsi voda-acetonitril. Není nutné žádné čištění; výtěžek 0,28 g (85 %).

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3), δ 7,89 (bt, 1H); 7,57 (d, 2H); 7,28 (d, 2H); 7,18 (m, 1H); 7,13 (m, 1H); 6,99 (m, 1H); 6,51 (t, 1H); 4,88 (s, 1H); 4,87 (m, 1H); 4,80 (bs, 2H); 4,48 (dd, 1H); 4,43 (dd, 1H); 4,10 (m, 1H); 3,89 (s, 3H); 3,68 (m, 1H); 2,68 (m, 1H); 2,40 (m, 1H).

$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz; CDCl_3): (karbonylové a/nebo amidinové uhlíkové atomy, rotamery) δ 172,9; 170,8; 152,7; 152,6.

HRMS: vypočteno pro $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{ClF}_2\text{N}_4\text{O}_5$ ($M - \text{H}$) 495,1242, nalezeno 495,1247.

Příprava sloučeniny D ($\text{Ph}(3\text{-Cl})(5\text{-OCHF}_2)\text{-(R)CH(OH)C(O)-(S)Aze-Pab(2,6-diF)(OMe)}$)

(i) 2,6-Difluor-4-[(methylsulfinyl)(methylthio)methyl]benzonitril

(Methylsulfinyl)(methylthio)methan (7,26 g; 0,0584 mol) se rozpustí ve 100 ml suchého THF v atmosféře argonu a roztok se ochladí na -78 °C. Pak se přikape za míchání butyllithium v hexanu (16 ml 1,6M roztoku; 0,0256 mol). Směs se míchá 15 minut. Mezitím se roztok 3,4,5-trifluor-

benzonitrilu (4,0 g; 0,025 mmol) ve 100 ml suchého THF ochladí na $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ v atmosféře argonu a kanylou se do něho během 35 minut přidá první roztok. Po 30 minutách se odstraní chladicí lázeň a když teplota reakční směsi dosáhne teploty místnosti, směs se nalije do 400 ml vody. THF se odpaří a zbylá vodná fáze se extrahuje třikrát diethyletherem. Spojené etherické fáze se promyjí vodou, vysuší se nad Na_2SO_4 a odpaří se. Získá se 2,0 g (30 %) produktu.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3), δ 7,4 až 7,25 (m, 2H); 5,01 (s, 1H, diastereomer); 4,91 (s, 1H, diastereomer), 2,88 (s, 3H, diastereomer); 2,52 (s, 3H, diastereomer); 2,49 (s, 3H, diastereomer); 2,34 (s, 3H, diastereomer); 1,72 (br, 1H).

(ii) 2,6-Difluor-4-formylbenzonitril

2,6-Difluor-4-[(methylsulfinyl)(methylthio)methyl]benzonitril (2,17 g; 8,32 mmol; viz stupeň (i) výše) se rozpustí v 90 ml THF a přidá se 3,5 ml koncentrované kyseliny sírové. Směs se nechá stát 3 dny při teplotě místnosti a pak se nalije do 450 ml vody. Extrahuje se třikrát ethylacetátem a spojené organické fáze se promyjí dvakrát vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného a solankou, vysuší se nad Na_2SO_4 a rozpouštědlo se odpaří. Výtěžek 1,36 g (98 %). Poloha formylové skupiny se určí pomocí ^{13}C NMR spektroskopie. Signál fluorovaných atomů uhlíku při 162,7 ppm vykazuje očekávané interakční schéma se dvěma interakčními konstantami velikosti 260 Hz a 6,3 Hz, odpovídajícími ipso-, respektive meta-interakci atomů fluoru.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3), δ 10,35 (s, 1H); 7,33 (m, 2H).

(iii) 2,6-Difluor-4-hydroxymethylbenzonitril

2,6-Difluor-4-formylbenzonitril (1,36 g; 8,13 mmol; viz stupeň (ii) výše) se rozpustí ve 25 ml methanolu a roztok se vychladí v ledové lázni. K roztoku se po částech přidává borohydrid sodný (0,307 g; 8,12 mmol) za míchání a reakční směs se pak ponechá 65 minut. Rozpouštědlo se odpaří a zbytek se rozdělí mezi diethylether a vodný roztok hydrogenuhličitanu sodného. Etherická vrstva se promyje ještě vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného a solankou, vysuší se nad Na_2SO_4 a rozpouštědlo se odpaří. Surový produkt brzy zkrystaluje a může se použít bez čištění dále. Výtěžek 1,24 g (90 %).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3), δ 7,24 (m, 2H); 4,81 (s, 2H); 2,10 (br, 1H).

(iv) 4-Kyan-2,6-difluorbenzyl-methansulfonát

K ledem chlazenému roztoku 2,6-difluor-4-hydroxymethylbenzonitrilu (1,24 g; 7,32 mmol; viz stupeň (iii) výše) a methansulfonylechloridu (0,93 g; 8,1 mmol) v 60 ml methylenchloridu se za míchání přidá triethylamin (0,81 g; 8,1 mmol). Po 3 hodinách při $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ se směs promyje dvakrát 1M HCl a jednou vodou, vysuší se nad Na_2SO_4 a rozpouštědlo se odpaří. Produkt se může použít bez dalšího čištění, výtěžek 1,61 g (89 %).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3), δ 7,29 (m, 2H); 5,33 (s, 2H); 3,07 (s, 3H).

(v) 4-Azidomethyl-2,6-difluorbenzonitril

Směs 4-kyan-2,6-difluorbenzyl-methansulfonátu (1,61 g; 6,51 mmol; viz stupeň (iv) výše) a azidu sodného (0,72 g; 0,0111 mol) v 10 ml vody a 20 ml dimethylformamidu se míchá přes noc při teplotě místnosti. Výsledná směs se pak nalije do 200 ml vody a extrahuje se třikrát diethyletherem. Spojené etherické fáze se promyjí pětkrát vodou, vysuší se nad Na_2SO_4 a rozpouštědlo se odpaří. Malý vzorek se odpaří pro účely NMR analýzy a produkt se zkrystaluje. Zbytek se opatrně odpaří, ale ne zcela dosucha. Podle NMR spektra a analytické HPLC se předpokládá téměř kvantitativní výtěžek (teorie 1,26 g).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ 7.29 (m, 2H); 4.46 (s, 2H).

(vi) 4-Aminomethyl-2,6-difluorbenzonitril

5 Reakce se provede způsobem, popsaným v J. Chem. Res. (M) (1992), 3 128. K suspenzi 520 mg 10% Pd/C (50 % vlhkosti) ve 20 ml vody se přidá roztok borohydridu sodného (0.834 g; 0.0221 mol) ve 20 ml vody. Dojde k vývoji malého množství plynu. 4-Azidomethyl-2,6-difluorbenzonitril (1.26 g; 6.49 mmol; viz stupeň (v) výše) se rozpustí v 50 ml THF a během 15 minut se přidá k výše uvedené vodné směsi v ledové lázni. Směs se míchá 4 hodiny, načež se k ní přidá
10 20 ml 2M HCl a zfiltruje se přes celit. Celit se promyje ještě vodou a spojené vodné fáze se promyjí ethylacetátem a pak se zalkalizují 2M NaOH. Extrahuje se třikrát methylenchloridem a spojené organické fáze se promyjí vodou, vysuší nad Na₂SO₄ a rozpouštědlo se odpaří. Výtěžek je 0.87 g (80 %).

15 ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ 7.20 (m, 2H); 3.96 (s, 2H); 1.51 (br, 2H).

(vii) 2,6-Difluor-4-terc-butoxykarbonylaminomethylbenzonitril

K roztoku 4-aminomethyl 2,6-difluorbenzonitrilu (0.876 g; 5.21 mmol; viz stupeň (vi) výše) v 50 ml THF se přidá roztok di-terc butyldikarbonátu (1.14 g; 5.22 mmol) v 10 ml THF. Směs se míchá 3.5 hodiny, pak se THF odpaří a zbytek se rozdělí mezi vodu a ethylacetát. Organická
20 vrstva se promyje třikrát 0.5M HCl a vodou, vysuší se nad Na₂SO₄ a rozpouštědlo se odpaří. Produkt se může použít bez dalšího čištění. Výtěžek je 1.38 (99 %).

25 ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), δ 7.21 (m, 2H); 4.95 (br, 1H); 4.43 (br, 2H); 1.52 (s, 9H).

(viii) Boc-Pab(2,6-diF)(OH)

Směs 2,6-difluor-4-terc-butoxykarbonylaminomethylbenzonitrilu (1.38 g; 5.16 mmol; viz stupeň (vii) výše), hydrochloridu hydroxylaminu (1.08 g; 0.0155 mol) a triethylaminu (1.57 g; 0.0155 mol) ve 20 ml ethanolu se míchá 36 hodin při laboratorní teplotě. Pak se rozpouštědlo odpaří a zbytek se rozdělí mezi vodu a methylenchlorid. Organická vrstva se promyje vodou, vysuší nad Na₂SO₄ a rozpouštědlo se odpaří. Produkt se může použít bez dalšího čištění. Výtěžek
30 1.43 g (92 %).

35 ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD), δ 7.14 (m, 2H); 4.97 (br, 1H); 4.84 (br, 2H); 4.40 (br, 2H); 1.43 (s, 9H).

(ix) Boc-Pab(2,6-diF).HOAc

40 Reakce se provede postupem, popsaným Judkinsem a spol. (Synth. Comm. (1998), 4351). Boc-Pab(2,6-diF)(OH) (1.32 g; 4.37 mmol; viz stupeň (viii) výše), anhydrid kyseliny octové (0.477 g; 4.68 mmol) a 442 mg 10% Pd/C (50 % vlhkosti) ve 100 ml kyseliny octové se hydrogenuje 3.5 hodiny při tlaku 0.506625 MPa (5 atm). Směs se zfiltruje přes celit, promyje se ethanolem
45 a rozpouštědlo se odpaří. Zbytek se podrobí lyofilizaci z acetonitrilu a vody s několika kapkami ethanolu. Subtitulní produkt je možno použít bez dalšího čištění. Výtěžek produktu je 1.49 g (99 %).

50 ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD), δ 7.45 (m, 2H); 4.34 (s, 2H); 1.90 (s, 3H); 1.40 (s, 9H).

(x) Boc-Pab(2,6-diF)(Teoc)

K roztoku Boc-Pab(2,6-diF).HOAc (1.56 g; 5.49 mmol; viz stupeň (ix) výše) ve 100 ml THF a 1 ml vody se přidá 2-(trimethylsilyl)ethyl-p-nitrofenylkarbonát (1.67 g; 5.89 mmol). Pak se
55 během 5 minut přikape roztok uhličitanu draselného (1.57 g; 0.0114 mol) ve 20 ml vody a směs

se míchá přes noc. THF se odpaří a zbytek se rozdělí mezi vodu a methylenchlorid. Vodná vrstva se extrahuje methylenchloridem a spojené organické fáze se promyjí dvakrát vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného, vysuší se nad Na_2SO_4 a rozpouštědlo se odpaří. Zbytek se podrobí flash chromatografii na silikagelu v soustavě heptanethylacetát (2:1), čímž se získá 1,71 g (73 %) čistého produktu.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3), δ 7,43 (m, 2H); 4,97 (br, 1H); 4,41 (br, 2H); 4,24 (m, 2H); 1,41 (s, 9H); 1,11 (m, 2H); 0,06 (s, 9H).

(xi) Boc-Aze-Pab(2,6-diF)(Teoc)

Boc-Pab(2,6-diF)(Teoc) (1,009 g; 2,35 mmol; viz stupeň (x) výše) se rozpustí v 50 ml ethylacetátu, nasyceného plynným chlorovodíkem. Směs se nechá stát 10 minut, rozpouštědlo se odpaří, odparek se rozpustí v 18 ml DMF a pak se ochladí v ledové lázni. Přidá se Boc-Aze-OH (0,450 g; 2,24 mmol), PyBOP (1,24 g; 2,35 mmol) a nakonec diisopropylethylamin (1,158 g; 8,96 mmol). Reakční směs se 2 hodiny míchá, pak se nalije do 350 ml vody a extrahuje se třikrát ethylacetátem. Spojené organické fáze se promyjí solankou, vysuší se nad Na_2SO_4 a rozpouštědlo se odpaří. Zbytek se podrobí flash chromatografii na silikagelu v soustavě heptan-ethylacetát (1:3), čímž se získá 1,097 g (96 %) žádaného produktu.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3), δ 7,46 (m, 2H); 4,65 až 4,5 (m, 3H); 4,23 (m, 2H); 3,87 (m, 1H); 3,74 (m, 1H); 2,45 až 2,3 (m, 2H); 1,40 (s, 9H); 1,10 (m, 2H); 0,05 (s, 9H).

(xii) $\text{Ph}(3\text{-Cl})(5\text{-OCHF}_2)\text{-(R)CH(OH)C(O)-Aze-Pab(2,6-diF)(Teoc)}$

Boc-Aze-Pab(2,6-diF)(Teoc) (0,256 g; 0,500 mmol; viz stupeň (xi) výše) se rozpustí ve 20 ml ethylacetátu, nasyceného plynným chlorovodíkem. Směs se nechá stát 10 minut, rozpouštědlo se odpaří a odparek se rozpustí v 5 ml DMF. Pak se přidá $\text{Ph}(3\text{-Cl})(5\text{-OCHF}_2)\text{-(R)CH(OH)C(O)-OH}$ (0,120 g; 0,475 mmol; viz přípravu sloučeniny A (viii) výše), PyBOP (0,263 g; 0,498 mmol) a nakonec diisopropylethylamin (0,245 g; 1,89 mmol). Reakční směs se míchá 2 hodiny a pak se nalije do 350 ml vody a extrahuje se třikrát ethylacetátem. Spojené organické fáze se promyjí solankou, vysuší se nad Na_2SO_4 a rozpouštědlo se odpaří. Zbytek se podrobí flash chromatografii na silikagelu v ethylacetátu, čímž se získá 0,184 g (60 %) žádaného podtitulního produktu.

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD , směs rotamerů), δ 7,55 až 7,45 (m, 2H); 7,32 (m, 1H, majoritní rotamer); 7,27 (m, 1H, minoritní rotamer); 7,2 až 7,1 (m, 2H); 6,90 (t, 1H, majoritní rotamer); 6,86 (t, 1H, minoritní rotamer); 5,15 (s, 1H, majoritní rotamer); 5,12 (m, 1H, minoritní rotamer); 5,06 (s, 1H, minoritní rotamer); 4,72 (m, 1H, majoritní rotamer); 4,6 až 4,45 (m, 2H); 4,30 (m, 1H, majoritní rotamer); 4,24 (m, 2H); 4,13 (m, 1H, majoritní rotamer); 4,04 (m, 1H, minoritní rotamer); 3,95 (m, 1H, minoritní rotamer); 2,62 (m, 1H, minoritní rotamer); 2,48 (m, 1H, majoritní rotamer); 2,22 (m, 1H, majoritní rotamer); 2,10 (m, 1H, minoritní rotamer); 1,07 (m, 2H); 0,07 (m, 9H).

(xiii) $\text{Ph}(3\text{-Cl})(5\text{-OCHF}_2)\text{-(R)CH(OH)C(O)-Aze-Pab(2,6-diF)(OMe,Teoc)}$

Směs $\text{Ph}(3\text{-Cl})(5\text{-OCHF}_2)\text{-(R)CH(OH)C(O)-Aze-Pab(2,6-diF)(Teoc)}$ (64 mg; 0,099 mmol; viz stupeň (xii) výše) a hydrochlorid O-methylhydroxylaminu (50 mg; 0,60 mmol) ve 4 ml acetonitrilu se zahřívá 3 hodiny na 70 °C. Rozpouštědlo se odpaří a zbytek se rozdělí mezi vodu a ethylacetát. Vodná vrstva se extrahuje dvakrát ethylacetátem a spojené organické fáze se promyjí vodou, vysuší se nad Na_2SO_4 a rozpouštědlo se odpaří. Produkt je možno použít bez dalšího čištění. Výtěžek 58 mg (87 %).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3), δ 7,90 (bt, 1H); 7,46 (m, 1H); 7,25 až 6,95 (m, 5H); 6,51 (t, 1H); 4,88 (s, 1H); 4,83 (m, 1H); 4,6 až 4,5 (m, 2H); 4,4 až 3,9 (m, 4H); 3,95 (s, 3H); 3,63 (m, 1H); 2,67 (m, 1H); 2,38 (m, 1H); 1,87 (br, 1H); 0,98 (m, 2H); 0,01 (s, 9H).

(xiv) $\text{Ph}(3\text{-Cl})(5\text{-OCHF}_2)\text{-(R)CH(OH)C(O)-(S)Aze-Pab}(2,6\text{-diF})(\text{OMe})$

Ph(3-Cl)(5-OCHF₂)-(R)CH(OH)C(O)-Aze-Pab(2,6-diF)(OMe, Teoc) (58 mg; 0,086 mmol; viz stupeň (xiii) výše) se rozpustí ve 3 ml TFA, ochladí se v ledové lázni a nechá se 2 hodiny reagovat. Pak se TFA odpaří a zbytek se rozpustí v ethylacetátu. Organická vrstva se promyje dvakrát vodným roztokem uhličitanu sodného a vodou, vysuší se nad Na₂SO₄ a rozpouštědlo se odpaří. Zbytek se podrobí lyofilizaci z vody a acetonitrilu, čímž se získá 42 mg (92 %) titulní sloučeniny.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), δ 7,95 (bt, 1H); 7,2 až 7,1 (m, 4H); 6,99 (m, 1H); 6,52 (t, 1H); 4,88 (s, 1H); 4,85 až 4,75 (m, 3H); 4,6 až 4,45 (m, 2H); 4,29 (br, 1H); 4,09 (m, 1H); 3,89 (s, 3H); 3,69 (m, 1H); 2,64 (m, 1H); 2,38 (m, 1H); 1,85 (br, 1H).

¹³C NMR (100 MHz; CDCl₃): (karbonylové a/nebo amidinové uhlíky) δ 172,1; 169,8; 151,9.

APCI-MS: (M + 1) = 533/535 m/z.

Příprava sloučeniny E ($\text{Ph}(3\text{-Cl})(5\text{-OCH}_2\text{CH}_2\text{F})\text{-(R)CH(OH)C(O)-(S)Aze-Pab}(\text{OMe})$)

(i) (2-Monofluorethyl)methansulfonát

K magneticky míchanému roztoku 2-fluorethanolu (5,0 g; 78,0 mmol) v dichlormethanu (90 ml) se v dusíkové atmosféře při 0 °C přidá triethylamin (23,7 g; 234 mmol) a methansulfonyl chlorid (10,7 g; 93,7 mmol). Směs se míchá 1,5 hodiny při 0 °C, zředí se dichlormethanem (100 ml) a promyje se 2N HCl (100 ml). Vodná vrstva se extrahuje dichlormethanem (50 ml) a spojené organické extrakty se promyjí solankou (75 ml), vysuší se nad Na₂SO₄, zfiltrují se a zahustí ve vakuu, čímž se získá subtitulní sloučenina (9,7 g; 88 %) ve formě žlutého oleje, který se použije bez dalšího čištění.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), δ 4,76 (t, J = 4 Hz, 1H); 4,64 (t, J = 4 Hz, 1H); 4,52 (t, J = 4 Hz, 1H); 4,43 (t, J = 4 Hz, 1H); 3,09 (s, 3H).

(ii) 3-Chlor-5-monofluorethoxybenzaldehyd

K roztoku 3-chlor-5-hydroxybenzaldehydu (8,2 g; 52,5 mmol); (viz experiment (ii) v přípravě sloučeniny A) a uhličitanu draselného (9,4 g; 68,2 mmol) v DMF (10 ml) se v atmosféře dusíku přikape při teplotě místnosti roztok (2-monofluorethyl)methansulfonátu (9,7 g; 68,2 mmol; viz stupeň (i) výše) v DMF (120 ml). Směs se zahřívá 5 hodin na 100 °C a pak se míchá přes noc při teplotě místnosti. Reakční směs se ochladí na 0 °C, nalije se do ledové 2N HCl a extrahuje se ethylacetátem. Spojené organické extrakty se promyjí solankou, vysuší se nad Na₂SO₄, zfiltrují se a zahustí se ve vakuu. Hnědý olej se podrobí chromatografii na silikagelu v soustavě hexan-ethylacetát (4:1), čímž se získá subtitulní sloučenina (7,6 g; 71 %) ve formě žlutého oleje.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), δ 9,92 (s, 1H); 7,48 (s, 1H); 7,32 (s, 1H); 7,21 (s, 1H); 4,87 (t, J = 4 Hz, 1H); 4,71 (t, J = 3 Hz, 1H); 4,33 (t, J = 3 Hz, 1H); 4,24 (t, J = 3 Hz, 1H).

(iii) $\text{Ph}(3\text{-Cl})(5\text{-OCH}_2\text{CH}_2\text{F})\text{-(R,S)CH(OTMS)CN}$

K roztoku 3-chlor-5-monofluorethoxybenzaldehydu (7,6 g; 37,5 mmol; viz stupeň (ii) výše) a jodidu zinečnatého (3,0 g; 9,38 mmol) v dichlormethanu (310 ml) se při 0 °C v atmosféře dusíku přikape trimethylsilylkyanid (7,4 g; 75,0 mmol). Směs se míchá při 0 °C 3 hodiny a při teplotě místnosti přes noc. Pak se směs zředí vodou (300 ml), organická vrstva se oddělí, vysuší se nad Na₂SO₄, zfiltruje se a zahustí se ve vakuu, čímž se získá subtitulní sloučenina (10,6 g; 94 %) ve formě hnědého oleje, který se použije bez dalšího čištění nebo charakterizace.

(iv) $\text{Ph}(3\text{-Cl})(5\text{-OCH}_2\text{CH}_2\text{F})\text{-(R,S)CH(OH)C(O)OH}$

Koncentrovaná kyselina chlorovodíková (100 ml) se přidá k $\text{Ph}(3\text{-Cl})(5\text{-OCH}_2\text{CH}_2\text{F})\text{-(R,S)CH(OH)C(O)OH}$ (OTMS)CN (10,6 g; 5,8 mmol; viz stupeň (iii) výše) a roztok se míchá 3 hodiny při 100 °C. Po ochlazení na teplotu místnosti se reakční směs dále ochladí na 0 °C, pomalu se zalkalizuje 3N NaOH (~300 ml) a promyje se etherem (3 x 200 ml). Vodná vrstva se okyselí 2M HCl (80 ml) a extrahuje ethylacetátem (3 x 300 ml). Spojené ethylacetátové extrakty se vysuší nad Na_2SO_4 , zfiltrují se a zahustí se ve vakuu, čímž se získá subtitulní sloučenina (8,6 g; 98 %) jako slabě žlutá tuhá látka, která se použije bez dalšího čištění. $R_f = 0,28$ ($\text{CHCl}_3\text{-MeOH-konc. NH}_4\text{OH}$ 90:8:2).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CD_3OD), δ 7,09 (s, 1H); 7,02 (s, 1H); 6,93 (s, 1H); 5,11 (s, 1H); 4,77 až 4,81 (m, 1H); 4,62 až 4,65 (m, 1H); 4,25 až 4,28 (m, 1H); 4,15 až 4,18 (m, 1H).

(v) $\text{Ph}(3\text{-Cl})(5\text{-OCH}_2\text{CH}_2\text{F})\text{-(S)CH(OAc)C(O)OH}$ (a) a
 $\text{Ph}(3\text{-Cl})(5\text{-OCH}_2\text{CH}_2\text{F})\text{-(R)CH(OH)C(O)OH}$ (b)

Roztok $\text{Ph}(3\text{-Cl})(5\text{-OCH}_2\text{CH}_2\text{F})\text{-(R,S)CH(OH)C(O)OH}$ (8,6 g; 34,5 mmol; viz stupeň (iv) výše) a lipázy PS „Amano“ (4,0 g) ve vinylacetátu (250 ml) a MTBE (250 ml) se zahřívá v atmosféře dusíku 3 dny na 70 °C. Po ochlazení na teplotu místnosti se enzym odstraní filtrací přes celit[®]. Filtrační koláč se promyje ethylacetátem a filtrát se zahustí ve vakuu. Zbytek se chromatografuje na silikagelu v soustavě $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-Et}_3\text{N}$ (90:8:2), čímž se získá triethylamoniová sůl subtitulní sloučeniny (a) ve formě žlutého oleje. Navíc se získá i trimethylamoniová sůl subtitulní sloučeniny (b) (4,0 g). Sůl subtitulní sloučeniny (b) se rozpustí ve vodě (250 ml), okyselí se 2N HCl a extrahuje se ethylacetátem (3 x 200 ml). Spojené organické extrakty se vysuší nad Na_2SO_4 , zfiltrují se a zahustí ve vakuu, čímž se získá subtitulní sloučenina (b) (2,8 g; 32 %) jako žlutý olej.

Pro sloučeninu (b):

$R_f = 0,28$ ($\text{CHCl}_3\text{-MeOH-konc. NH}_4\text{OH}$ 90:8:2)

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CD_3OD), δ 7,09 (s, 1H); 7,02 (s, 1H); 6,93 (s, 1H); 5,11 (s, 1H); 4,77 až 4,81 (m, 1H); 4,62 až 4,65 (m, 1H); 4,25 až 4,28 (m, 1H); 4,15 až 4,18 (m, 1H).

(vi) $\text{Ph}(3\text{-Cl})(5\text{-OCH}_2\text{CH}_2\text{F})\text{-(R)CH(OH)C(O)-(S)Aze Pab (OMe)}$

K roztoku $\text{Ph}(3\text{-Cl})(5\text{-OCH}_2\text{CH}_2\text{F})\text{-(R)CH(OH)C(O)OH}$ (818 mg; 3,29 mmol; viz stupeň (v) výše) v DMF (30 ml) se v atmosféře dusíku při 0 °C přidá $\text{HAze-Pab(OMe).2HCl}$ (1,43 g; 4,27 mmol; viz mezinárodní patentovou přihlášku WO 00/42 059), PyBOP (1,89 g; 3,68 mmol) a DIPEA (1,06 g; 8,23 mmol). Reakční směs se míchá 2 hodiny při 0 °C a pak při teplotě místnosti přes noc. Pak se reakční směs zahustí ve vakuu a zbytek se dvakrát podrobí chromatografii na silikagelu, napřed v soustavě $\text{CHCl}_3\text{-EtOH}$ (15:1) a pak v soustavě EtOAc-EtOH (20:1), čímž se získá titulní sloučenina (880 mg; 54 %).

$R_f = 0,60$ ($\text{CHCl}_3\text{-EtOH}$ 10:1).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CD_3OD , složitá směs rotamerů), δ 7,58 až 7,60 (d, $J = 8$ Hz, 2H); 7,34 (d, $J = 7$ Hz, 2H); 7,05 až 7,08 (m, 2H); 6,95 až 6,99 (m, 1H); 5,08 a 5,13 (m, 1H); 4,77 až 4,82 (m, 1H); 4,60 až 4,68 (m, 1H); 3,99 až 4,51 (m, 7H); 3,82 (s, 3H); 2,10 až 2,75 (m, 2H).

$^{13}\text{C NMR}$ (150 MHz; CD_3OD): (karbonylové a/nebo amidinové atomy uhlíku), δ 173,3; 170,8; 152,5. APCI-MS: $(M + 1) = 493$ m/z.

Příprava sloučeniny F ($\text{Ph}(3\text{-Cl})(5\text{-OCHF}_2)\text{-(R)CH(OH)C(O)-Aze-Pab(OH)}$)

(i) $\text{Ph}(3\text{-Cl})(5\text{-OCHF}_2)\text{-(R)CH(OH)C(O)-Aze-Pab(OH, Teoc)}$

5 $\text{Ph}(3\text{-Cl})(5\text{-OCHF}_2)\text{-(R)CH(OH)C(O)-Aze-Pab(Teoc)}$ (0,148 g; 0,24 mmol; viz přípravu sloučeniny D, stupeň (ix)) se rozpustí v 9 ml acetonitrilu a přidá se 0,101 g (1,45 mmol) hydrochloridu hydroxylaminu. Směs se zahřívá 2,5 hodiny na 70 °C, zfiltruje se přes celit[®] a rozpouštědlo se odpaří. Surový produkt (0,145 g; 75% čistota) se bez čištění použije přímo v dalším stupni.

10 (ii) $\text{Ph}(3\text{-Cl})(5\text{-OCHF}_2)\text{-(R)CH(OH)C(O)-Aze-Pab(OH)}$

$\text{Ph}(3\text{-Cl})(5\text{-OCHF}_2)\text{-(R)CH(OH)C(O)-Aze-Pab(OH, Teoc)}$ (0,145 g; 0,23 mmol; viz stupeň (i) výše) se rozpustí v 0,5 ml dichlormethanu a 9 ml TFA. Reakční směs se nechá reagovat 60 minut. Pak se TFA odpaří a zbytek se přečistí preparativní HPLC. Frakce produktu se spojí a podrobí se lyofilizaci (2 x), čímž se získá 72 mg (celkový výtěžek dvou stupňů 62 %) titulní sloučeniny.

MS (m/z) 482 (M-1) ; 484 (M+1) .

20 ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD), δ 7,58 (d, 2H); 7,33 (m, 3H); 7,15 (m, 2H); 6,89 (t, 1H, majoritní rotamer); 6,86 (t, 1H, minoritní rotamer); 5,18 (s, 1H, majoritní rotamer; a m, 1H, minoritní rotamer); 5,12 (s, 1H, minoritní rotamer); 4,77 (m, 1H, majoritní rotamer); 4,42 (m, 2H); 4,34 (m, 1H, majoritní rotamer); 4,14 (m, 1H, majoritní rotamer); 4,06 (m, 1H, minoritní rotamer); 3,95 (m, 1H, minoritní rotamer); 2,66 (m, 1H, minoritní rotamer); 2,50 (m, 1H, majoritní rotamer); 2,27 (m, 1H, majoritní rotamer); 2,14 (m, 1H, minoritní rotamer).

25 ¹³C NMR (100 MHz; CD₃OD): (karbonylové a/nebo amidinové atomy uhlíku, rotamery) δ 172,4; 172,3; 172,0; 171,4; 152,3; 152,1.

Příprava sloučeniny H ($\text{Ph}(3\text{-Cl})(5\text{-OCH}_2\text{CHF}_2)\text{-(R)CH(OH)C(O)-Aze-Pab(OH)}$)

30 (i) $\text{Ph}(3\text{-Cl})(5\text{-OCH}_2\text{CHF}_2)\text{-(R)CH(OH)C(O)-Aze-Pab(Z)}$

Boc-Aze-Pab(Z) (viz mezinárodní patentovou přihlášku WO 97/02 284; 92 mg; 0,197 mmol) se rozpustí v 10 ml ethylacetátu, nasyceného plynným chlorovodíkem, a nechá se reagovat 10 minut. Rozpouštědlo se odpaří a zbytek se smíchá s $\text{Ph}(3\text{-Cl})(5\text{-OCH}_2\text{CHF}_2)\text{-(R)CH(OH)C(O)OH}$ (50 mg; 0,188 mmol), PyBOP (109 mg; 0,209 mmol) a nakonec s diisopropylethylaminem (96 mg; 0,75 mmol) ve 2 ml DMF. Směs se míchá 2 hodiny, pak se nalije do 50 ml vody a extrahuje se třikrát ethylacetátem. Spojené organické fáze se promyjí vodou, vysuší se nad Na₂SO₄ a rozpouštědlo se odpaří. Surový produkt se podrobí flash chromatografii na silikagelu v soustavě EtOAc:MeOH (9:1). Získá se 100 mg (87 %) produktu.

45 ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD, směs rotamerů), δ 7,85 až 7,75 (m, 2H); 7,45 až 7,25 (m, 7H); 7,11 (m, 1H, majoritní rotamer); 7,08 (m, 1H, minoritní rotamer); 7,05 až 6,9 (m, 2H); 6,13 (bt, 1H); 5,25 až 5,05 (m, 3H); 4,77 (m, 1H, částečně překryt signálem CD₃OH); 4,5 až 3,9 (m, 7H); 2,64 (m, 1H, minoritní rotamer); 2,47 (m, 1H, majoritní rotamer); 2,25 (m, 1H, majoritní rotamer); 2,13 (m, 1H, minoritní rotamer).

(ii) $\text{Ph}(3\text{-Cl})(5\text{-OCH}_2\text{CHF}_2)\text{-(R)CH(OH)C(O)-Aze-Pab(OH)}$

50 Hydrochlorid hydroxylaminu (65 mg; 0,94 mmol) a triethylamin (0,319 g; 3,16 mmol) se smísí v 8 ml THF a podrobí se sonikaci 1 hodinu při 40 °C. Přidá se $\text{Ph}(3\text{-Cl})(5\text{-OCH}_2\text{CHF}_2)\text{-(R)CH(OH)C(O)-Aze-Pab(Z)}$ (96 mg; 0,156 mmol; viz stupeň (i) výše) a dalších 8 ml THF. Směs se míchá 4,5 dne při 40 °C. Rozpouštědlo se odpaří a surový produkt se přečistí preparativní RPLC v soustavě CH₃CN-0,1M NH₄OAc (40:60). Výtěžek 30 mg (38 %), čistota 99 %.

55

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD, směs rotamerů), δ 7,6 až 7,55 (m, 2H); 7,35 až 7,3 (m, 2H); 7,12 (m, 1H, majoritní rotamer); 7,09 (m, 1H, minoritní rotamer); 7,05 až 6,9 (m, 2H); 6,15 (triplet multipletů, 1H); 5,15 (m, 1H, minoritní rotamer); 5,13 (s, 1H, majoritní rotamer); 5,08 (s, 1H, minoritní rotamer); 4,77 (m, 1H, majoritní rotamer); 4,5 až 4,2 (m, 5H); 4,08 (m, 1H, majoritní rotamer); 3,97 (m, 1H, minoritní rotamer); 2,66 (m, 1H, minoritní rotamer); 2,50 (m, 1H, majoritní rotamer); 2,27 (m, 1H, majoritní rotamer); 2,14 (m, 1H, minoritní rotamer).

¹³C NMR (100 MHz; CD₃OD): (karbonylové a/nebo amidinové atomy uhlíku, směs rotamerů) δ 172,8; 172,2; 171,4; 159,1; 158,9; 154,2.

APCI-MS: (M+1) = 497/499 m/z.

Zkratky

15	Ac	= acetyl;
	APCI	= chemická ionizace při atmosférickém tlaku (ve vztahu k MS);
	API	= ionizace při atmosférickém tlaku (ve vztahu k MS);
	Aze(&(S)-Aze)	= (S)-azetidin-2-karboxylát (pokud není uvedeno jinak);
	Boc	= terc-butyloxykarbonyl;
20	Br	= široký (ve vztahu k NMR);
	Cgl	= cyklohexylglycin;
	CI	= chemická ionizace (ve vztahu k MS);
	D	= dublet (ve vztahu k NMR);
	DCC	= dicyklohexylkarbodiimid;
25	Dd	= dublet dubletů (ve vztahu k NMR);
	DIBAL-H	= diisobutylaluminiumhydrid;
	DIPEA	= diisopropylethylamin;
	DMAP	= 4-(N,N-dimethylamino)pyridin;
	DMF	= N,N-dimethylformamid;
30	DMSO	= dimethylsulfoxid;
	DSC	= diferenční skenovací kolorimetrie;
	DVT	= trombóza hluboké žíly;
	EDC	= hydrochlorid 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylkarbodiimidu;
	ES	= elektrospray;
35	ESI	= „electrospray interface“;
	Et	= ethyl;
	ether	= diethylether;
	EtOAc	= ethylacetát;
	EtOH	= ethanol;
40	Et ₂ O	= diethylether;
	HATU	= O-(azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluorofosfát;
	HBTU	= [N,N,N',N'-tetramethyl-O-(benzotriazol-1-yl)uronium-hexafluorofosfát];
	Hex	= hexany;
	HOAc	= kyselina octová;
45	HPLC	= vysoce účinná kapalinová chromatografie;
	LC	= kapalinová chromatografie;
	M	= multiplet (ve vztahu k NMR);
	Me	= methyl;
	MeOH	= methanol;

	MS	= hmotnostní spektroskopie;
	MTBE	= methyl-terc-butylether;
	NMR	= nukleární magnetická rezonance;
	Oac	= acetát;
5	Pab	= para-amidinobenzylamino;
	Pab-OH	= 4-aminomethyl-benzamidoxim (4-aminomethyl-1-(amino-hydroxyimino-methyl) benzen;
	II-Pab	= para-amidinobenzylamin;
	Pd/C	= palladium na uhlí;
10	Ph	= fenyl;
	PyBOP	= (benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinofosfoniumhexafluorofosfát;
	q	= kvartet (ve vztahu k NMR);
	QF	= tetrabutylamoniumfluorid;
	s	= singlet (ve vztahu k NMR);
15	t	= triplet (ve vztahu k NMR);
	TBTU	= [N,N,N',N'-tetramethyl-O-(benzotriazol-1-yl)uronium-tetrafluorborát;
	TEA	= triethylamin;
	Teoc	= 2-(trimethylsilyl)ethoxykarbonyl;
	TEMPO	= 2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinyloxylový volný radikál;
20	TFA	= kyselina trifluoroctová;
	TGA	= termogravimetrická analýza;
	THF	= tetrahydrofuran;
	TLC	= tenkovrstvá chromatografie;
	UV	= ultrafialový.

25

Předpony n-, s-, i- a t- mají obvyklé významy, a to: normální, sekundární, iso a terciární.

Příklady provedení vynálezu

30

Příklady 1 až 5 a 8 až 14 ilustrují vynález, zatímco příklady 6 a 7 jsou uvedeny pouze pro účely porovnání a nejsou součástí předloženého vynálezu. V příkladech a obrázcích poměry v závorkách se vztahují k hmotnostním poměrům neutrálního gelotvorného polymeru k iota-karagenanu a neberou v úvahu bazickou farmaceuticky aktivní složku nebo jakoukoliv jinou složku, která může být přítomna.

35

Doprovodné obrázky:

40

Obrázek 1. Uvolňování H376/95 ze směsí s různými poměry iotakaragenanu ku PEO, 4M. Tablety se analyzují 2 hodiny při pH 1 a zbývající dobu při pH 6,8.

45

Obrázek 2. Uvolňování H376/95 ze směsí, s poměrem 20:80 PEO s různou molekulovou hmotností ku iota-karagenanu. Tablety se analyzují 2 hodiny při pH 1 a zbývající dobu při pH 6,8.

Obrázek 3. Uvolňování H376/95 ze směsí s poměrem 80:20 PEO s různou molekulovou hmotností ku iota-karagenanu. Tablety se analyzují 2 hodiny při pH 1 a zbývající dobu při pH 6,8.

50

Obrázek 4. Uvolňování H376/95 ze směsí s různými poměry iotakaragenanu ku HPMC, 10 000 cps. Tablety se analyzují 2 hodiny při pH 1 a zbývající dobu při pH 6,8.

- Obrázek 5. Uvolňování H376/95 ze směsi s poměrem 50:50 PEO, 4M ku iota–karagenanu. Tablety se analyzují 24 hodiny v různých umělejších médiích.
- 5 Obrázek 6. Uvolňování H376/95 z neutrálního gelotvorného polymeru PEO, 4M, analyzované v různých umělejších médiích.
- Obrázek 7. Uvolňování H376/95 z aniontového polymeru iota–karagenanu, analyzované v různých umělejších médiích.
- 10 Obrázek 8. Uvolňování sloučeniny A ze směsi s poměrem 50:50 iota–karagenanu ku PEO, 4M, při pH 1 a 6.8. Tablety se analyzují 24 hodiny v různých umělejších médiích.
- 15 Obrázek 9. Uvolňování sloučeniny A ze směsi s poměrem 50:50 iota–karagenanu ku HPMC, 10 000 cps, při pH 1 a 6.8. Tablety se analyzují 24 hodiny v různých umělejších médiích.
- Obrázek 10. Uvolňování sloučeniny B z iota karagenanu, smíchaného s neutrálním polymerem PEO, 4M, v poměrech 50:50 a 80:20. Tablety se analyzují 2 hodiny při pH 1 a zbý-
 20 vající dobu při pH 6.8.
- Obrázek 11. Uvolňování sloučeniny B z iota–karagenanu, smíchaného s neutrálním polymerem HPMC, 10 000 cps, v poměru 50:50. Tablety se analyzují 2 hodiny při pH 1 a zbý-
 25 vající dobu při pH 6.8.

Příklad 1

- 30 Tento příklad ukazuje uvolňování H376/95 ze směsi o různém poměru PEO, 4M, ku iota kara-
 genanu. Tablety se analyzují 2 hodiny při pH 1 a zbývající dobu při pH 6.8.

	Poměr PEO, 4M k iota–karagenanu	80:20	50:50	20:80
35	H376/95	50,5 mg	50,5 mg	50,5 mg
	polyethylenoxid, 4M	160,0 mg	100,0 mg	40,0 mg
	iota karagenan	40,0 mg	100,0 mg	160,0 mg
	stearylumarát sodný	2,5 mg	2,5 mg	2,5 mg
	hmotnost tablety	253 mg	253 mg	253 mg

- 40 Tablety se připraví přímou kompresí. Aktivní složka, PEO 4M a iota–karagenan se pečlivě smísí a mazadlo (stearylumarát sodný) se přidá přes síto 0,7 mm. Po dalším konečném smísení se směs lisuje v jednoduchém tabletovacím lisu za použití 9 mm razníku. Tablety se analyzují 2 hodiny v rozpouštěcí lázni UPS II (50 ot/min, 37 °C, umělejší média), obsahující 0,1M HCl, pH 1. Pak se tablety přenesou do rozpouštěcí lázně s 0,1M fosfátovým pufrem, pH 6,8, a jsou analyzovány dále. Výsledky analýzy jsou uvedeny v obrázku 1. Formulace s poměrem 50:50 vykazuje v podstatě pH–nezávislý disoluční profil v rozmezí pH mezi 1 až 6,8. Dodatečně se dá
 45 usoudit, že smísením aniontového polymeru iota karagenanu a neutrálního gelotvorného polymere-
 ru PEO 4M v různých poměrech lze modifikovat rychlost uvolňování v prostředích o různém pH.

50

Příklad 2

Tento příklad ukazuje uvolňování H376/95 ze směsí o poměru 20:80 PEO různé molekulové hmotnosti k iota–karagenanu. Tablety se analyzují 2 hodiny při pH 1 a zbývající dobu při pH 6,8.

5

Poměr PEO 4M nebo 8M k iota–karagenanu	20:80
H376/95	50,5 mg
polyethylenoxid	40,0 mg
10 iota–karagenan	160,0 mg
stearyl fumarát sodný	2,5 mg
hmotnost tablety	253 mg

15

Tablety se připraví a analyzují jak je popsáno v příkladu 1. Výsledky analýzy jsou uvedeny v obrázku 2 a ukazují, že použití neutrálního gelotvorného polymeru o vyšší molekulové hmotnosti poskytuje nižší rychlost uvolňování při neutrálním pH. Rychlost uvolňování v oblasti nízkého pH není ovlivněna, protože formulace obsahuje dostatečné množství aniontového polymeru.

20 Příklad 3

Tento příklad ukazuje uvolňování H376/95 ze směsí o poměru 80:20 PEO různé molekulové hmotnosti k iota–karagenanu. Tablety se analyzují 2 hodiny při pH 1 a zbývající dobu při pH 6,8.

25

Poměr PEO 1M nebo 4M k iota–karagenanu	80:20
H376/95	50,5 mg
polyethylenoxid	160,0 mg
iota–karagenan	40,0 mg
30 stearyl fumarát sodný	2,5 mg
hmotnost tablety	253 mg

35

Tablety se připraví a analyzují jak je popsáno v příkladu 1. Obrázek 3 ukazuje, jak použití gelotvorného polymeru o vyšší molekulové hmotnosti může snížit rychlost uvolňování při neutrálním pH. Současně zpomalovací účinek při pH 1 je méně zřetelný, protože je použito menší množství iota–karagenanu ve srovnání s příklady na obrázku 2.

40 Příklad 4

40

Tento příklad ukazuje uvolňování H376/95 ze směsí o různém poměru iota–karagenanu k HPMC, 10 000 cps. Tablety se analyzují 2 hodiny při pH 1 a zbývající dobu při pH 6,8.

45

Poměr HPMC k iota–karagenanu	80:20	50:50	20:80
H376/95	50,5 mg	50,5 mg	50,5 mg
HPMC, 10 000 cps	160,0 mg	100,0 mg	40,0 mg
iota–karagenan	40,0 mg	100,0 mg	160,0 mg
stearyl fumarát sodný	2,5 mg	2,5 mg	2,5 mg
50 hmotnost tablety	253 mg	253 mg	253 mg

Tablety se připraví a analyzují jak je popsáno v příkladu 1. Výsledky analýzy v různých rozpouštěcích médiích jsou uvedeny na obrázku 4. Formulace s poměrem 50:50 znovu ukazuje v podstatě pH-nezávislý disoluční profil v oblasti pH 1 až 6,8. Můžeme vyvodit závěr, že rychlost uvolňování může být opět modifikována smísením jiných neutrálních gelotvorných polymerů, v tomto případě HPMC, 10 000 cps. s aniontovým polymerem, iota-karagenanem, v různých poměrech.

Příklad 5

Tento příklad ukazuje uvolňování H376/95 ze směsi o poměru 50:50 PEO 4M k iota-karagenanu. Tablety se analyzují 24 hodiny v různých médiích.

Poměr PEO 4M k iota-karagenanu	50:50
H376/95	50,5 mg
polyethylenoxid, 4M	100,0 mg
iota-karagenan	100,0 mg
stearylumarát sodný	2,5 mg
hmotnost tablety	253 mg

Tablety se připraví přímým lisováním, jak je popsáno v příkladu 1. Analýzy se provádějí v rozpouštěcích lázních (USP přístroj 2 s tabletami, umístěnými v košíku¹ po proudu kapaliny), kde se tři tablety analyzují 24 hodiny v každém z médií: 0,1M HCl, a 0,1M fosfátový pufr pH 6,8 s 5 % ethanolu (EtOH), přidaného pro lepší rozpustnost léčiva. Výsledky, uvedené na obrázku 5, jasně ukazují, že je možno připravit tablety s pH-nezávislým disolučním profilem, když se použije kompozice se stejnými díly PEO, 4M a iota-karagenanu.

[¹ Na zakázku zhotovený čtverhranný košík z pletivového drátu, který v jedné z hořejších úzkých stran je přiletován ke konci ocelové tyčky. Tyčka se protáhne krytem rozpouštěcí nádoby a upevnění se dvěma teflonovými matkami 3,2 cm od středu nádoby. Nižší okraj dna košíku se umístí 1 cm nad lopatkou míchadla. Košík se orientuje po proudu a zkoumaná tableta je v jeho rohu.]

Příklad 6

Tento příklad ukazuje uvolňování H376/95 z neutrálního gelotvorného polymeru PEO 4M v nepřítomnosti iota-karagenanu v různých umělejších médiích.

H376/95	50,5 mg
polyethylenoxid, 4M	200,0 mg
stearylumarát sodný	2,5 mg
hmotnost tablety	253 mg

Tablety se připraví přímým lisováním, jak je popsáno v příkladu 1. Analýzy se provádějí odděleně v různých rozpouštěcích lázních. Tablety v nádobách obsahujících 0,1M HCl se analyzují 2 hodiny. Když se jako rozpouštěcí médium použije 0,1M fosfátový pufr pH 6,8, tablety se analyzují 20 hodin. Výsledky na obrázku 6 ukazují, že rychlost uvolňování při pH 1 je výrazně vyšší než rychlost při pH 6,8, což naznačuje, že použití samotného neutrálního polymeru nestačí k dosažení pH-nezávislého disolučního profilu pro bazické léčivo s pH-závislou rozpustností.

Příklad 7

Tento příklad ukazuje uvolňování H376/95 z aniontového polymeru iota–karagenanu v nepřítomnosti neutrálního gelotvorného polymeru v různých umělejších médiích.

5

H376/95	50,5 mg
iota–karagenan	200,0 mg
stearylformát sodný	2,5 mg
hmotnost tablety	253 mg

10

Tablety se připraví přímým lisováním, jak je popsáno v příkladu 1. Analýzy se provádějí oddělečně v různých rozpouštěcích lázních, podobně jako v příkladu 6. Obrázek 7 ukazuje, jak rychlost uvolňování při pH 1 je nižší ve srovnání s rychlostí při pH 6,8. Tento efekt jsme nepozorovali při použití jakéhokoli jiného homopolymeru, testovaného jako maticový polymer.

15

Příklad 8

20 Tento příklad ukazuje uvolňování sloučeniny A ze směsi PEO 4M a iota–karagenanu v poměru 50:50. Tablety se analyzují 24 hodin v různých umělejších.

	Hmotnost (mg)
Sloučenina A	50,0;
25 iota–karagenan (Fluka)	100,0;
PEO, 4M (Union Carbide)	100,0;
PRUV ^{IM}	2,5.

30 Aktivní složka se smísí manuálně s polymery a mazadlem. Směs se pak přímo lisuje do tablet.

Příklad 9

35 Tento příklad ukazuje uvolňování sloučeniny A ze směsi HPMC, 10 000 cps, a iota–karagenanu v poměru 50:50. Tablety se analyzují 24 hodin v různých umělejších.

	Hmotnost (mg)
Sloučenina A	50,0;
40 iota–karagenan (Fluka)	100,0;
HPMC, 10 000 cps	100,0;
PRUV ^{IM}	2,5.

45 Aktivní složka se smísí manuálně s polymery a mazadlem. Směs se pak přímo lisuje do tablet.

Určení kumulativního uvolnění sloučeniny A z tablet v příkladech 8 a 9

50 Dvě individuální tablety se testují na uvolňování léčiva v 900 ml média za použití USP rozpouštěcího přístroje 2 (lopatka a košík¹) při 50 ot/min a 37 °C. Použitá rozpouštěcí média jsou 0,1M kyselina chlorovodíková (pH 1) a 0,1M natriumfosfátový pufr (pH 6,8) s 5 % ethanolu pro zlepšení rozpustnosti léčiva. Je ověřeno, že přídavek ethanolu neovlivňuje významně rychlost uvolňování z těchto kompozic. In-line kvantitativní stanovení se provede za použití systému

vláknové optiky (C Technologies) při analytické vlnové délce 235 nm pro 0,1M HCl jako rozpouštěcí médium, a při analytické vlnové délce 250 nm, když se jako rozpouštěcí médium použije modifikovaný fosfátový pufr pH 6,8. Vlnová délka 350 nm se použije jako referenční vlnová délka pro obě média.

5

[¹ Na zakázku zhotovený čtverhranný košík z pletivového drátu, který v jedné z hořejších úzkých stran je přiletován ke konci ocelové tyčky. Tyčka se protáhne krytem rozpouštěcí nádoby a upevní se dvěma teflonovými matkami 3,2 cm od středu nádoby. Nižší okraj dna košíku se umístí 1 cm nad lopatkou míchadla. Košík se orientuje po proudu a zkoumaná tableta je v jeho rohu.]

10

Příklad 10

15

Tento příklad ukazuje uvolňování sloučeniny B ze směsi PEO 4M a iota-karagenanu v poměru 50:50.

	Hmotnost (mg)	Množství (%)
Sloučenina B	41,0	16
iota-karagenan (Fluka)	104,0	41 („50“)
PEO, 4M (Union Carbide)	104,0	41 („50“)
PRUV	2,5	1

Tablety se připraví jak je popsáno v příkladu 9. Uvolňovací data jsou uvedena na obrázku 10.

20

Příklad 11

Tento příklad ukazuje uvolňování sloučeniny B ze směsi PEO 4M a iota-karagenanu v poměru 80:20.

	Hmotnost (mg)	Množství (%)
Sloučenina B	41,0	16
iota-karagenan (Fluka)	41,8	17 („20“)
PEO, 4M (Union Carbide)	167,2	66 („80“)
PRUV	2,5	1

25

Tablety se připraví jak je popsáno v příkladu 9. Uvolňovací data jsou uvedena na obrázku 10.

Příklad 12

Tento příklad ukazuje uvolňování sloučeniny B ze směsi HPMC, 10 000 cps, a iota-karagenanu v poměru 50:50.

	Hmotnost (mg)	Množství (%)
Sloučenina B	41,0	16
iota-karagenan (Fluka)	104,0	41 („50“)
HPMC, 10 000 cps (60SH)	104,0	41 („50“)
PRUV	2,5	1

5

Tablety se připraví jak je popsáno v příkladu 9. Uvolňovací data jsou uvedena na obrázku 11.

Příklad 13

10

Přímé lisování sloučeniny C s HPMC 10 000 cps

Aktivní látka se smísí s excipienty. Stearylfulmarát sodný se použije jako mazadlo. Směs se lisuje do tablet ve výstředníkovém lisu.

	Hmotnost	Množství
Sloučenina C	50 mg	16,2 %
HPMC, 10 000 cps	255,0 mg	82,8 %
stearylfulmarát sodný	2,5 mg	1,0 %

15

Uvolňování:

Čas (min)	% uvolněná v pufru pH 1,1	% uvolněná v pufru pH 6,8
0	0	0
15	-	-
30	8	-
45	-	-
60	13	7
120	20	12
180	26	-
240	31	19
360	40	25
480	48	31
600	55	36
720	61	41
840	66	45
960	71	49
1080	75	53
1200	79	56

Přímé lisování sloučeniny C s HPMC 10 000 cps a iota-karagenanem v poměru 50:50

- 5 Aktivní látka se smísí s excipienty. Stearyl fumarát sodný se použije jako mazadlo. Směs se lisuje do tablet ve výstředníkovém lisu.

	Hmotnost	Množství
Sloučenina C	50 mg	16,2 %
HPMC, 10 000 cps	127,0 mg	41,4 %
iota-karagenan (Fluka)	127,0 mg	41,4 %
stearyl fumarát sodný	3,0 mg	1,0 %

Uvolňování

Čas (min)	% uvolněná v pufru pH 1,1	% uvolněná v pufru pH 6,8
0	0	-
15	-	-
30	3	-
45	-	-
60	4	4
120	7	8
180	10	-
240	12	16
360	17	27
480	22	38
600	27	51
720	32	63
840	37	75
960	41	87
1080	46	94
1200	50	97

5 Rychlost uvolňování se stanoví následovně. Tři individuální tablety se testují na uvolňování
léčiva v 900 ml média za použití USP rozpouštěcího přístroje 2 (lopatka a košík¹) při 50 ot/min
a 37 °C. Použitá rozpouštěcí média jsou 0,1M kyselina chlorovodíková (pH 1) a 0,1M natrium-
fosfátový pufr (pH 6,8). In-line kvantitativní stanovení se provede za použití systému vláknové
optiky (C Technologies) při analytické vlnové délce 220 nm pro 0,1M HCl jako rozpouštěcí
10 médium, a při analytické vlnové délce 260 nm, když se jako rozpouštěcí médium použije fosfáto-
vý pufr pH 6,8. Vlnová délka 350 nm se použije jako referenční vlnová délka pro obě média.
Během prvních dvou hodin analýzy se uvolňování měří každých 15 minut a pak každou hodinu
až do konce analýzy.

15 [¹ Na zakázku zhotovený čtverhranný košík z pletivového drátu, který v jedné z hořejších úzkých
stran je přiletován ke konci ocelové tyčky. Tyčka se protáhne krytem rozpouštěcí nádoby a upev-
ní se dvěma teflonovými matkami 3,2 cm od středu nádoby. Nižší okraj dna košíku se umístí
1 cm nad lopatkou míchadla. Košík se orientuje po proudu a zkoumaná tableta je v jeho rohu.]

Příklad 14

	Hmotnost	Množství
Sloučenina D	100 mg	20 %
HPMC, 10 000 cps	200 mg	40 %
iota-karagenan	200 mg	40 %
stearylfumarát sodný	5 mg	1 %

Tato formulace se může připravit jak je popsáno v příkladu 13.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Farmaceutická formulace pro orální aplikaci, **vyznačující se tím**, že obsahuje iota-karagenan, jeden nebo několik neutrálních gelotvorných polymerů a bazickou farmaceuticky aktivní složku, přičemž tato formulace potlačuje uvolňování bazické farmaceuticky aktivní složky z formulace při kyselém pH.

2. Formulace podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že v ní bazická farmaceuticky aktivní složka obsahuje bazickou skupinu, mající pKa od 1 do 10.

3. Formulace podle nároku 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že v ní bazická farmaceuticky aktivní složka je ximelagatran nebo $\text{Ph}(3\text{-Cl})(5\text{-OCHF}_2)\text{-(R)CH(OH)C(O)-(S)Aze-Pab(OMe)}$; $\text{Ph}(3\text{-Cl})(5\text{-OCHF}_2)\text{-(R)CH(OH)C(O)-(S)Aze-Pab}(2,6\text{-diF})(\text{OMe})$ nebo $\text{Ph}(3\text{-Cl})(5\text{-OCH}_2\text{CH}_2\text{F})\text{-(R)CH(OH)C(O)-(S)Aze-Pab(OMe)}$, kde Ph je fenylová skupina, Aze je S-azetidin-2-karboxylová kyselina, Cgl je cyklohexylglycin, Pab je *para*-amidinobenzylamino skupina a Pab-OH je 4-aminomethyl-benzamidoxim.

4. Formulace podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že v ní bazická farmaceuticky aktivní složka je:

4-({3-[7-(3,3-dimethyl-2-oxobutyl)-9-oxa-3,7-diazabicyklo[3.3.1]non-3-yl]propyl}amino)-benzonitril;

terc-butyl-2-{7-[3-(4-kyanilanilino)propyl]-9-oxa-3,7-diazabicyklo[3.3.1]non-3-yl}ethylkarbamát;

terc-butyl-2-{7-[4-(4-kyanfenyl)butyl]-9-oxa-3,7-diazabicyklo[3.3.1]non-3-yl}ethylkarbamát; nebo

terc-butyl-2-{7-[(2s)-3-(4-kyanfenoxy)-2-hydroxypropyl]-9-oxa-3,7-diazabicyklo[3.3.1]non-3-yl}ethylkarbamát.

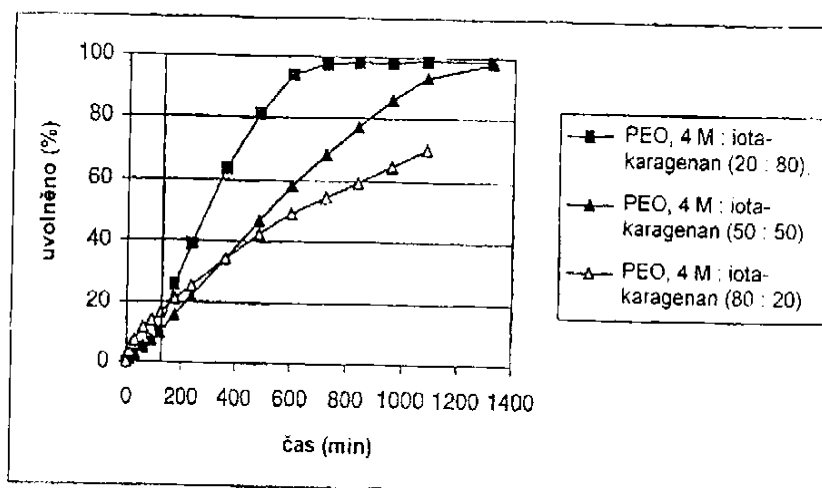
5. Formulace podle nároků 1, 2, 3 nebo 4, **vyznačující se tím**, že v ní neutrální gelotvorný polymer je polyethylenoxid, polyethylenglykol nebo směs dvou nebo několika různých polyethylenoxidů.

6. Formulace podle nároků 1, 2, 3 nebo 4, **vyznačující se tím**, že v ní neutrální gelotvorný polymer je hydroxypropylmethylcelulóza nebo směs dvou nebo několika hydroxypropylmethylcelulóz.
- 5 7. Formulace podle nároků 1, 2, 3 nebo 4, **vyznačující se tím**, že v ní neutrální gelotvorný polymer je směs hydroxypropylmethylcelulózy a polyethylenoxidu.
8. Formulace podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačující se tím**, že v ní poměr neutrálního gelotvorného polymeru k iota-karagenanu se pohybuje v rozmezí 20:80 až 80:20.
- 10 9. Formulace podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačující se tím**, že v ní bazická farmaceuticky aktivní složka je metoprolol.
- 15 10. Způsob přípravy formulace podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že se smísí iota-karagenan, jeden nebo několik neutrálních gelotvorných polymerů a bazická farmaceuticky aktivní složka.
- 20 11. Použití formulace podle nároku 1 pro přípravu léčebného prostředku pro terapii kardiovaskulární poruchy.

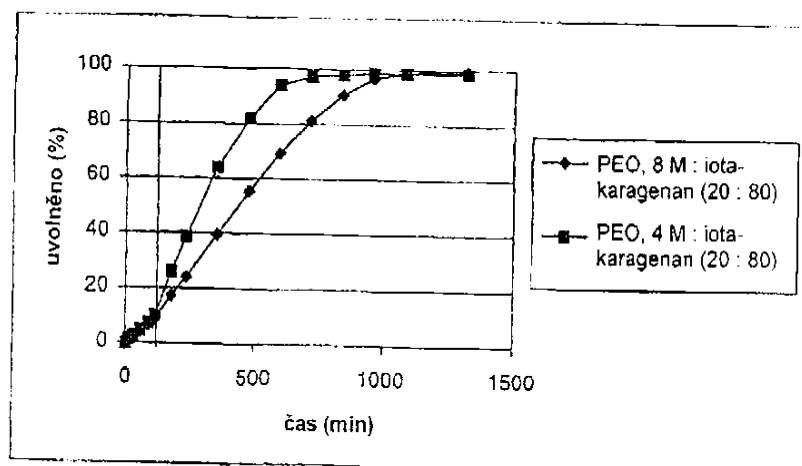
25

6 výkresů

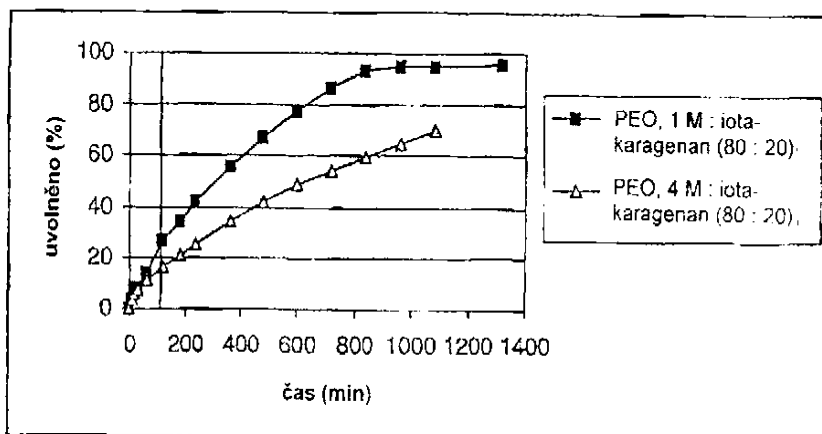
Obrázek 1



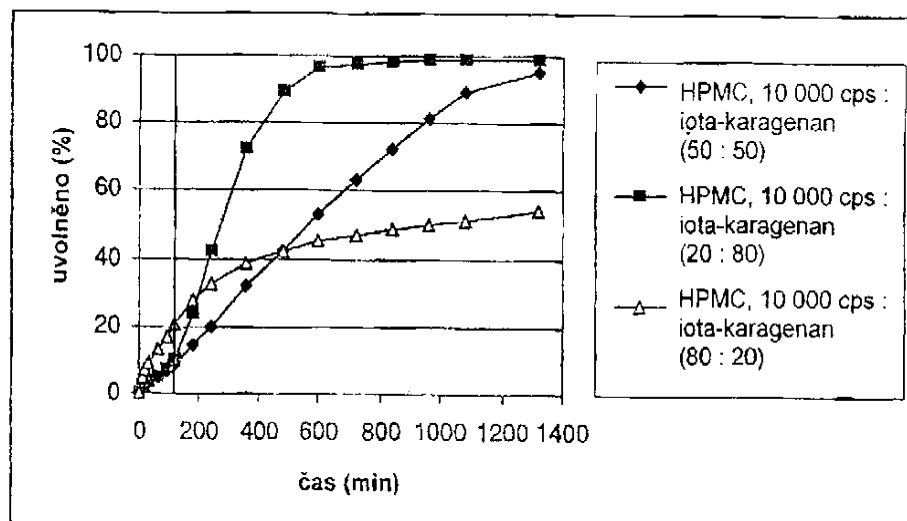
Obrázek 2



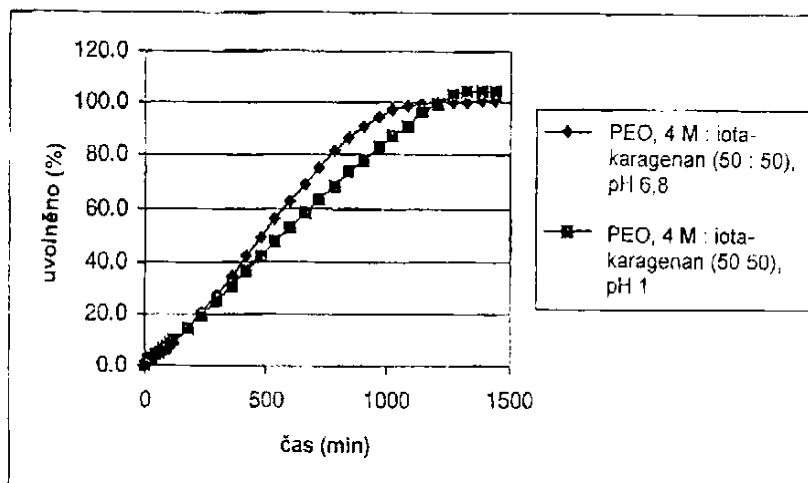
Obrázek 3



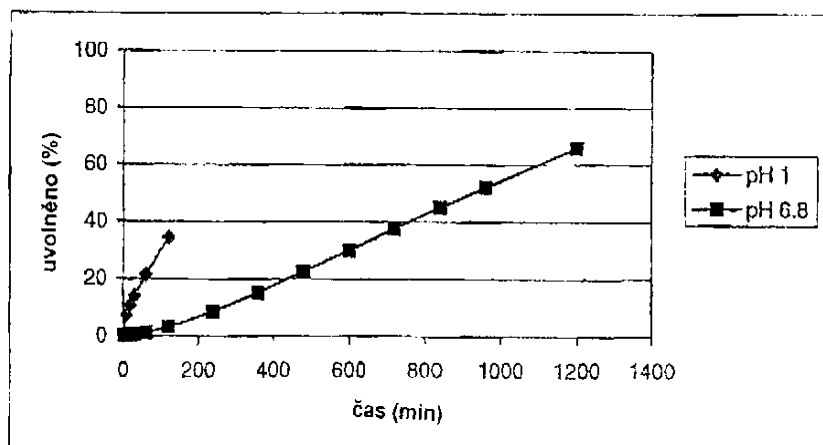
Obrázek 4



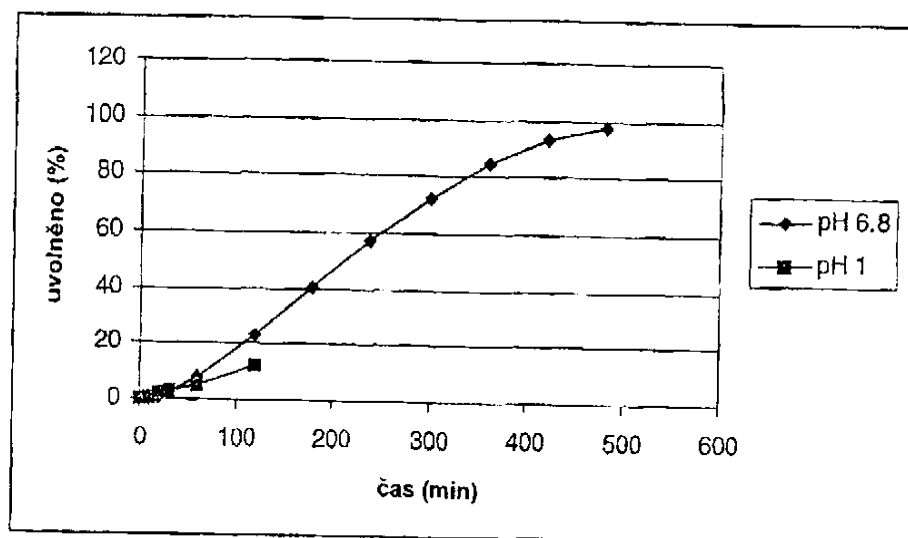
Obrázek 5



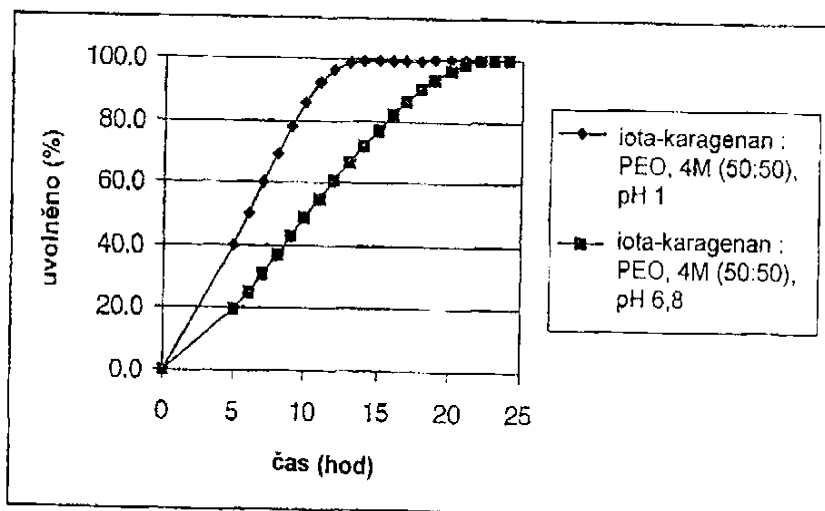
Obrázek 6



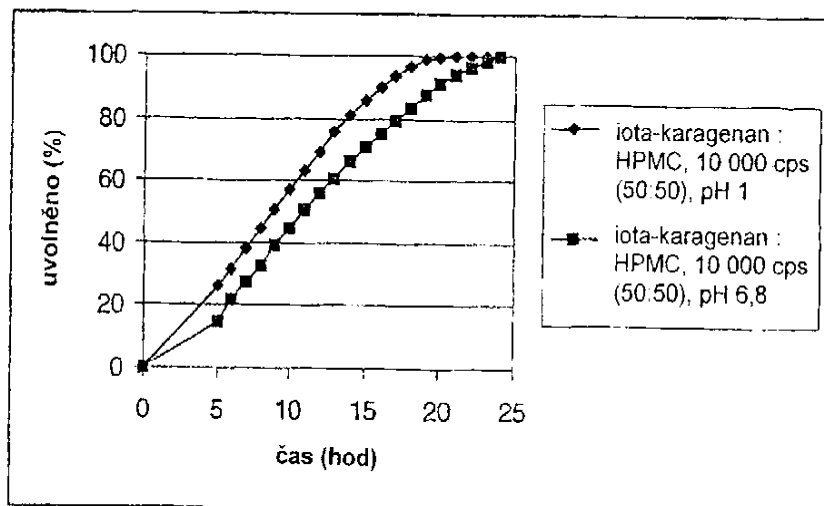
Obrázek 7



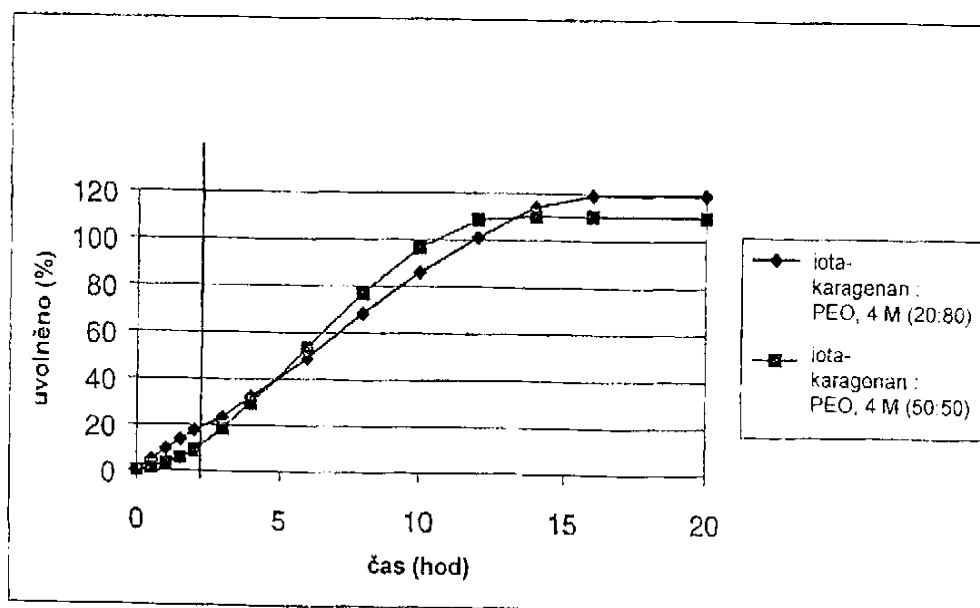
Obrázek 8



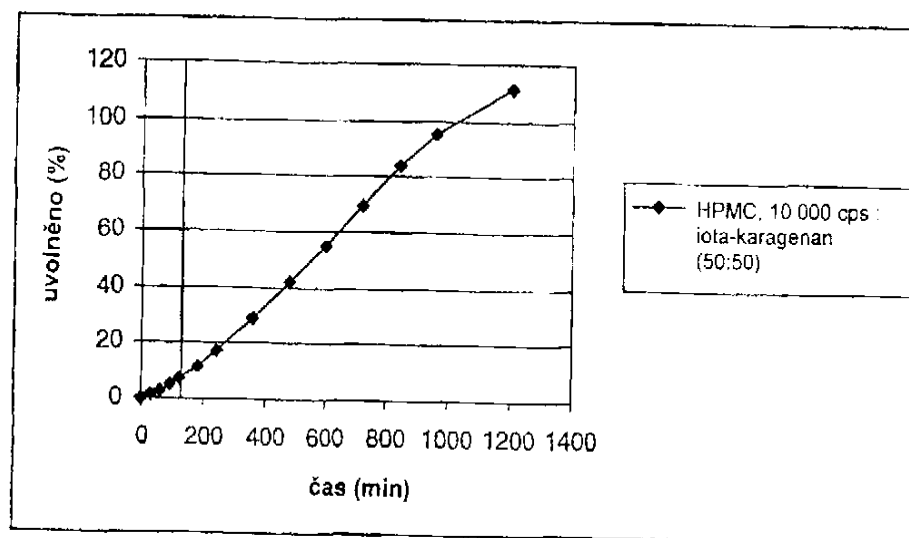
Obrázek 9



Obrázek 10



Obrázek 11



Konec dokumentu
