(19) DANMARK

Patentdirektoratet
TAASTRUP

(12) **PATENTSKRIFT** (11) **169403 B1**

(21) Patentansøgning nr.: **4156/86** (51) Int.Cl.5 **C 07 C 233/51**

(22) Indleveringsdag: **01 sep 1986**

(41) Alm. tilgængelig: **03 mar 1987**

(45) Patentets meddelelse bkg. den: **24 okt 1994**

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: **02 sep 1985 JP 193565/85**

(73) Patenthaver: ***AJINOMOTO CO. INC.; 5-8, Kyobashi 1 Chome; Chuo-ku; Tokyo, JP**

(72) Opfinder: **Koji *Fukushima; JP, Yoshiko *Seto; JP, Kazuhiro *Kawada; JP, Koji *Toi; JP, Izumi *Kumashiro; JP**

(74) Fuldmægtig: **Budde, Schou & Co. A/S**

(54) **Phenylalaninderivater eller salte deraf absorptionsfremmende middel deraf og farmaceutisk præparat deraf**

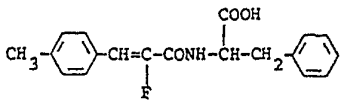
(56) Fremdragne publikationer

---

(57) Sammendrag:

4156-86

Et phenylalaninderivat med strukturformlen



og salte deraf. Derivaterne og saltene er anvendelige til fremme af absorptionen af medikamenter, såsom insulin.

DK 169403 B1

Den foreliggende opfindelse angår et hidtil ukendt phenylalaninderivat og farmaceutisk acceptable salte deraf og også et absorptionsfremmende middel indeholdende phenylalaninderivatet eller et ikke-toksisk salt deraf. Dette middel kan anvendes til fremme af oralabsorptionen af insulin. Opfindelsen angår også et farmaceutisk præparat deraf.

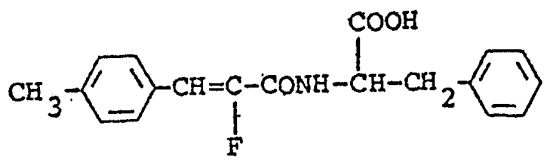
Kendte absorptionsfremmende midler omfatter phenylanalinderivater (JP-PA nr. 190.926/1984), benzoylpiperazinderivater (JP-PA nr. 5115/1984) og hydroxybenzoatderivater (Biochimica et Biophysica Acta, 775, 269-271, 1984).

Medikamenter af polypeptidtypen, såsom insulin, indgives kun ved injektion, idet de bliver inaktive ved virkningen af proteinødelæggende enzymer i fordøjelsesvæsken ved oral indgift, og fordi de ikke kan adsorberes gennem intestinaltragten på grund af deres høje molekylvægt. Ikke alle patienter bryder sig imidlertid om indgift ved injektion, og derfor er udviklingen af absorptionsfremmende midler med lav toksisitet for mennesker ønskelig.

Den foreliggende opfindelse beskriver et absorptionsfremmende middel indeholdende et phenylalaninderivat som den virksomme ingrediens (JP-PA nr. 190.926/1984), og det er et håb, at dette middel er klinisk anvendeligt, især ved behandling af diabetes ved anvendelse af insulin, hvilket kræver en kontinuerlig indgift over et længere tidsrum, og hvor der ønskes lave doser deraf og kraftige, ikke-toksiske absorptionsfremmende midler dertil.

Man har forsøgt at løse ovennævnte problemer og har derved udviklet den foreliggende opfindelse.

Den foreliggende opfindelse angår således en hidtil ukendt forbindelse N-(α-fluor-4-methylcinnamoyl)-phenylalanin, som har følgende strukturformel



og salte deraf. Den foreliggende opfindelse angår også et absorptionsfremmende middel kendetegnet ved at indeholde mindst ét sådant phenylalaninderivat eller salt som ingrediens. Phenylanalinderivatet kan være i L-form, D-form eller DL-form. Den foreliggende opfindelse angår ligeledes et farmaceutisk præparat kendetegnet ved at det (a) indeholder et phenylalaninderivat eller et farmaceutisk acceptabelt salt deraf ifølge krav 1 og b) insulin.

De farmaceutisk acceptable salte af phenylalaninderivatet er uorganiske salte, f.eks. natrium-, kalium-calcium- eller aluminiumsalte, eller organiske salte, f.eks. ammonium-, N-acetyl-glucosamin-, arginin- eller lysinsalte.

Derivatet eller saltet kan indgives oralt eller parenteralt, f.eks. gennem rektum, til opnåelse eller fremme af absorptionen.

N-(4-Methylcinnamoyl)-L-phenylalanin og N-(α--fluorcinnamoyl)-L-phenylalanin er beskrevet i ovennævnte JP-PA nr. 190.926/1984. Som resultat af forsøg med absorptionsfremmende virkninger og sikkerheden ved forbindelserne ifølge den foreliggende opfindelse har det vist sig, at de her omhandlede forbindelser er meget bedre end de 2 ovennævnte forbindelser. I mindre indgiftsdoser har de her omhandlede forbindelser således betragtelige absorptionsfremmende virkninger og har højere værdier for gennemsnitlig oral, dødelig dosis ($LD_{50}$).

Det her omhandlede, absorptionsfremmende middel anvendes fortrinsvis i en mængde på fra 0,1 til 2000 mg, især 0,2-500 mg, pr. 25 enheder af insulin.

Det absorptionsfremmende middel kan indgives i præparatform sammen med medikamentet. Derivatet eller saltet kan således formuleres til præparater, såsom tabletter, kapsler, eliksirer, opløsninger eller suspensioner.

N-(α-Fluor-4-methylcinnamoyl)-phenylalaninet ifølge den foreliggende opfindelse eller saltet deraf og insulin, kan indgives til en patient, der behøver behandling,

i et dosisområde på f.eks. 0,1-1000 mg, sædvanligvis flere gange om dagen, dvs. i en samlet, daglig dosis på 0,2-2000 mg. Dosen varierer som følge af alvorligheden af sygdommen, patientens legemsvægt og andre faktorer, der kendes af fagfolk.

Insulin og det absorptionsfremmende middel kan formuleres til et farmaceutisk præparat som beskrevet nedenfor. Ca. 0,2-500 mg af phenylalaninderivatet eller saltet og insulin blandes til enhedsdosisformer, der sædvanligvis anvendes eller behøves i farmaceutisk praksis, sammen med farmaceutisk acceptable grundmasser, bærestoffer, excipienter, bindemidler, antiseptiske midler, stabilisatorer eller smagsstoffer. Mængden af hvert aktivt stof i disse præparater eller fremstillinger justeres på en sådan måde, at man opnår en passsende dosis indenfor det foreskrevne område.

Specifikke materialer, der kan inkorporeres i tabletter, kapsler og lign., er f.eks. bindemidler, såsom traganth gummi, gummi arabicum, majsstivelse og gelatine, excipienter, såsom mikrokrystallinsk cellulose, opkvældningsmidler, såsom majsstivelse, prægelatineret stivelse og argininsyre, smøremidler, såsom magnesiumstearat, sødemidler, såsom saccharose, lactose og saccharin, og smagsstoffer, såsom pebermynte, olie fra Gaultheria adenothrix Maxim og kirsebær.

Forskellige andre materialer kan være til stede som overtræksmateriale eller for at variere den fysiske tilstand af enhedsdosisformerne. Tabletter kan f.eks. være overtrukne med shellak og/eller sukker. Sirupper eller eliksirer kan indeholde aktive forbindelser, saccharose som sødemiddel, methylparaben som kirsebær-smagsstof og propylparaben som orange-smagsstof.

Der anvendes enteriske overtræk. Eksempelvis kan anvendes en 8%'s vandig hydroxyphenylmethylcelluloseopløsning som præ-overtræksmiddel til dannelse af et underovertræk og en 10%'s vandig hydroxypropylmethylcellulosephthalatopløsning eller en 3%'s vandig polyacetynopløsning som overtræksmidler.

Hvis enhedsdosisformen af præparatet er en kapsel, kan et flydende bærestof, såsom en fedtolie, yderligere være inkorporeret deri.

Aseptiske præparater kan formuleres ifølge den sædvanlige praksis til fremstilling af farmaceutiske dosisformer, hvor en aktiv forbindelse opløses eller suspenderes i en grundmasse, såsom vand.

Om nødvendigt kan yderligere inkorporeres en puffer, et antiseptisk middel eller en antioxidant.

Den foreliggende opfindelse illustreres ved hjælp af de følgende eksempler.

Eksempel 1

Fremstilling af N-(α-fluor-4-methylcinnamoyl)-L-phenylalanin

100 ml thionylchlorid sættes til 12,5 g (0,069 mol) α-fluor-4-methylkanelsyre, og blandingen omrøres ved 90°C i 3 timer. Thionylchloridet afdestilleres under formindsket tryk, og remanensen tørres og opløses i 80 ml acetone.

13,2 g (0,080 mol) L-phenylalanin og 43 ml (0,086 mol) 6 N NaOH opløses i et opløsningsmiddel fremstillet ved blanding af 77 ml vand med 240 ml acetone. Medens blandingen afkøles til mindre end 10°C, tilsættes acetoneopløsningen af α-fluor-4-methylkanelsyrechlorid fremstillet som beskrevet ovenfor og 38 ml (0,076 mol) 2 N NaOH skiftevis i løbet af 20 minutter. Derefter omrøres blandingen ved normal temperatur i 30 minutter, og reaktionsopløsningen syrnes ved tilsætning af 2 N HCl. Derefter tilsættes gradvist 200 ml vand. De således udfældede krystaller udvindes ved filtrering og tørres til opnåelse af 16,7 g rå krystaller. De rå krystaller omkrystalliseres fra en blanding af methanol og vand til opnåelse af 15,5 g

N-(α-fluor-4-methylcinnamoyl)-L-phenylalanin i form af hvide, nålelignende krystaller med smp. 163-163,5°C.

Elementæranalyse for $C_{19}H_{18}NO_3F$:

Beregnet: C: 69,30%, H: 5,35%, N: 4,26%, F: 5,45%.

Fundet: C: 69,71%, H: 5,54%, N: 4,28%, F: 5,80%.

Optisk rotation: $[\alpha]_D^{25} = -51,2^\circ$ (c = 0,5, methanol).

IR-spektrum: $\gamma_{max}$ KBr = 3380, 3040, 1740, 1715, 1650 $cm^{-1}$.

NMR-spektrum: $\delta$ $CDCl_3$ = 8,50, 7,32, 7,13, 6,80, 6,67, 4,93, 3,20, 2,30.

Eksempel 2

Fremstilling af N-(α-fluor-4-methylcinnamoyl)-D-phenylalanin

Fremgangsmåden ifølge eksempel 1 gentages under anvendelse af D-phenylalanin i stedet for L-phenylalanin til opnåelse af 15,3 g N-(α-fluor-4-methylcinnamoyl)-D--phenylalanin i form af hvide, nålelignende krystaller med smp. 163-163,5°C.

Elementæranalyse for $C_{19}H_{18}NO_3F$:

Beregnet: C: 69,53%, H: 5,51%, N: 4,30%, F: 5,37%.

Fundet: C: 69,71%, H: 5,54%, N: 4,28%, F: 5,80%.

Optisk rotation $[\alpha]_D^{25} = +50,6^\circ$ (c = 0,5, methanol).

IR-spektrum. $\gamma_{max}$ KBr: 3380, 3050, 1740, 1715, 1650 $cm^{-1}$.

NMR-spektrum: $\delta$ $CDCl_3$ = 9,07, 7,37, 7,13, 6,87, 6,70, 4,93, 3,20, 2,30.

Eksempel 3

Forsøg med absorptionsfremme

Et forsøg til fremme af absorptionen af insulin udføres ved hjælp af de her omhandlede absorptionsfremmende midler og 2 kendte absorptionsfremmende midler. Insulin i en fastsat dosis (23,3 enhed/mg) og det absorptionsfremmende midddel, som anført i den følgende tabel, opløses eller suspenderes i en 0,05 M phosphatpuffer. Derefter får grupper på 5 6-7 uger gamle hunmus af typen ICR-DCI, som ikke er blevet fodret i 18 dage, oralt indgivet 0,5 ml af den forudbestemte pufferopløsning. Et forudbestemt tidsrum senere bestemmes blodglucoseværdien af hver gruppe af mus. Resultaterne er anført i tabellen.

Graden af fald i blodglucoseværdien i tilfælde af N-(α-fluorcinnamoyl)-L-phenylalanin og i tilfælde af N-(4-methylcinnamoyl)-L-phenylalanin, de kendte absorptionsfremmende midler, er lille sammenlignet med en kontrolgruppe. På den anden side har N-(α-fluor-4-methylcinnamoyl)-L--phenylalanin og N-(α-fluor-4-methylcinnamoyl)-D-phenylalanin ifølge den foreliggende opfindelse fremragende virkning ved formindskelse af blodsukkerværdien.

Eksempel 4

Toksicitetsforsøg

Forudbestemte mængder af de i tabellen anførte absorptionsfremmende midler suspenderes hver især i en 0,5%'s CMC-natriumsaltopløsning. Grupper på 10 hanmus af typen ICR, 4 uger gamle, får oralt indgivet en suspension. 2 uger senere bestemmes $LD_{50}$-værdierne. Resultaterne er anført i tabellen.

Som det kan ses af tabellen, har N-(α-fluor-4--methylcinnamoyl)-L-phenylalanin og N-(α-fluor-4-methylcinnamoyl)-D-phenylalanin ifølge den foreliggende opfindelse en fremragende $LD_{50}$-værdi sammenlignet med den af kendte absorptionsfremmende midler.

Med henblik på ovennævnte resultater kan det ses, at N-(α-fluor-4-methylcinnamoyl)-L-phenylalanin og N-(α-fluor-4-methylcinnamoyl)-D-phenylalanin er meget bedre og mere anvendelige som absorptionsfremmende midler for insulin, både hvad angår deres virkning og sikkerhed.

Tabel

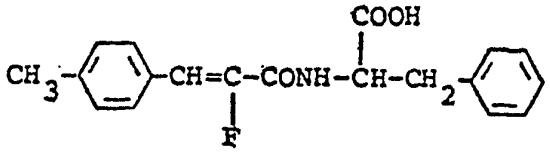
| Prøve | | Forsøgsbetingelser | | | Blod-sukker (mg/dl) | $LD_{50}$ (g/kg) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Mængde insulin (enhed/kg) | Mængde af prøve (mg/kg) | Tid (minutter) | | |
| Kontrol | | 50 | - | 30 | 82,4±8,1 | - |
| Kendt forbindelse | N-(α-fluorcinnamoyl)-L-phenylalanin | " | 150 | " | 80,6±5,5 | 0,5∿1,0 |
| | N-(4-methylcinnamoyl)-L-phenylalanin | " | " | " | 78,0±7,8 | 1,0∿2,0 |
| Forbindelse iflg. den foreliggende opfindelse | N-(α-fluor-4-methylcinnamoyl)-L-phenylalanin | " | " | " | 55,8±5,3 | 3,0∿4,0 |
| | N-(α-fluor-4-methylcinnamoyl)-D-phenylalanin | " | " | " | 53,0±5,7 | 3,0∿4,0 |



DK 169403 B1

**Patentkrav:**

1. Phenylalaninderivat, kendetegnet ved, at det har strukturformlen



eller et farmaceutisk acceptabelt salt deraf.

2. Farmaceutisk acceptabelt salt af et derivat ifølge krav 1.

3. Absorptionsfremmende middel, kendetegnet ved, at det indeholder et phenylalaninderivat ifølge krav 1 eller et salt ifølge krav 2.

4. Farmaceutisk præparat, kendetegnet ved, at det (a) indeholder et phenylalaninderivat ifølge krav 1 eller et salt ifølge krav 2 og (b) insulin.

5. Præparat ifølge krav 4, kendetegnet ved, at det indeholder et farmaceutisk acceptabelt bærestof eller fortyndingsmiddel.