



NORGE

(12) PATENT

(19) NO

(11) 309086

(13) B1

(51) Int Cl<sup>7</sup> C 07 C 405/00

## Patentstyret

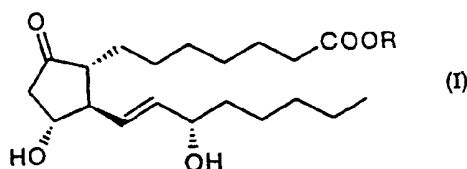
|                   |            |                                      |                           |
|-------------------|------------|--------------------------------------|---------------------------|
| (21) Søknadsnr    | 19963408   | (86) Int. inng. dag og søknadsnummer |                           |
| (22) Inng. dag    | 1996.08.15 | (85) Videreføringsdag                |                           |
| (24) Løpedag      | 1996.08.15 | (30) Prioritet                       | 1995.08.16, JP, 230763/95 |
| (41) Alm. tilgj.  | 1997.02.17 |                                      |                           |
| (45) Meddelt dato | 2000.12.11 |                                      |                           |

|                  |                                                                                                                                                                     |
|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (71) Patenthaver | Ono Pharmaceutical Co Ltd,<br>1-5, Doshomachi 2-chome, Chuo-ku, Osaka-shi, Osaka 541-8526, JP                                                                       |
| (72) Oppfinner   | Akio Nishiura, Mishima-gun, Osaka, JP<br>Takuya Seko, Mishima-gun, Osaka, JP<br>Ryoji Matsumoto, Mishima-gun, Osaka, JP<br>Shin-ichi Hamano, Mishima-gun, Osaka, JP |
| (74) Fullmektig  | Oslo Patentkontor AS, 0259 Oslo                                                                                                                                     |

(54) Benevnelse Prostaglandinderivater, fremgangsmåte ved fremstilling og anvendelse derav samt liposomformulering

(56) Anførte publikasjoner Ingen

(57) Sammendrag Det er beskrevet prostaglandin E<sub>1</sub> esterderivater av formel (I) :



hvor R er

(i)  $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CO}-\text{R}^1$ , eller

(ii)  $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{R}^2$ , og

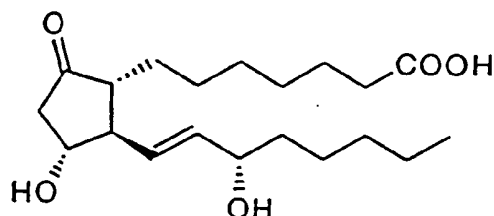
$\text{R}^1$  og  $\text{R}^2$  hver uavhengig er  $\text{C}_{10-20}$ -alkyl;

og cyklodekstrinklatrater derav, liposomformuleringer inneholdende dem, fremgangsmåter for fremstilling derav og farmasøytiske sammensetninger inneholdende dem som aktiv bestanddel.

Forbindelsene av formel (I) har den effekt at de øker blodstrøm og er anvendelige for forebygging og/eller behandling av perifere sirkulatoriske lidelser, decubitus eller hudsår, eller for opprettholdelse av blodstrøm.

Foreliggende oppfinnelse vedrører prostanglandin  $E_1$  (heretter forkortet til  $PGE_1$ )-esterderivater eller cyclodekstrinklatrater derav, liposomformuleringer inneholdende disse, fremgangsmåter for deres fremstilling og farmasøytiske blandinger inneholdende dem som aktiv bestanddel.

$PGE_1$  er representert ved den følgende struktur av formel:



og har forskjellige fysiologiske egenskaper. Spesielt har  $PGE_1$  en hypotensiv, vasodilatorisk, blodstrømningsøkende og anti-blodplateeffekt på blodkar.

På grunn av sine forskjellige fysiologiske egenskaper har  $PGE_1$  blitt anvendt i medisinen. Allerede har  $PGE_1$  blitt benyttet for behandling av perifere arterielle okklusive sykdommer, trombotisk anginetisk oblitterens osv., for å opprettholde blodstrømmen etter rekonstruktiv vaskulær kirurgi, opprettholde et lavt blodtrykksnivå ved kirurgiske inngrep, som bedøvelsesmiddel osv.

For å benytte  $PGE_1$  for å forbedre perifere sirkulatoriske lidelser er det imidlertid to problemer:

(1)  $PGE_1$  har mange fysiologiske egenskaper. Dersom én fysiologisk virkning av  $PGE_1$  anvendes i terapi, blir derfor andre effekter i seg selv bieffekter.

(2)  $PGE_1$  blir raskt inaktivert av sitt metaboliserende enzym in vivo.

Perifere sirkulatoriske lidelser er sykdommer som ledsages

av forskjellige iskemiske symptomer, såsom smerte, psychro-  
esthesia osv., hvor hindringer induseres av trombusdannelse  
i perifere blodkar og etter sårdannelse. For å behandle  
denne lidelse er det nødvendig å forbedre blodsirkulasjonen  
ved å øke blodstrømmen i den perifere sirkulasjon.

Dersom en stor mengde  $PGE_1$  injiseres i blodkaret på en  
gang, virker den imidlertid ikke bare på perifer sirkula-  
sjon, men også på aortiske serier, og følgelig finnes det  
mulighet for alvorlig hypotensjon. For å forhindre dette  
problem bør  $PGE_1$  injiseres i kontrollerte doser, slik at  
det virker på den perifere sirkulasjon, men virker i mindre  
grad på aortiske serier.

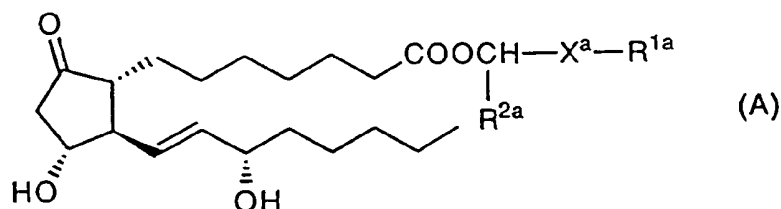
På den annen side er det kjent at  $PGE_1$  blir meget raskt  
metabolisert. Følgelig er det, for å opprettholde effekten,  
nødvendig at  $PGE_1$  tilføres sekvensielt in vivo. Som et re-  
sultat av vurdering av disse effekter i kombinasjon er det  
ønskelig å fremstille en forbindelse som blir omdannet til  
 $PGE_1$  in vivo etter tilførsel, og hvis omdannelseshastighet  
er moderat langsom, slik at effekten blir opprettholdt.

Oppfinnerne har funnet en forbindelse som gradvis blir om-  
dannet til  $PGE_1$  in vivo etter tilførsel. Som et resultat  
har oppfinnerne funnet at dette kan oppnås med forbindelser  
hvor karboksylsyregruppen ved en posisjon i  $PGE_1$  er esterifisert med en spesiell alkohol.

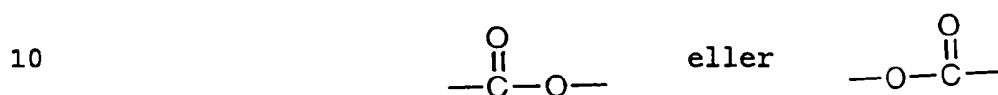
Videre har oppfinnerne også funnet at effekten kan bli for-  
bedret ved å inneslutte forbindelsene ifølge foreliggende  
oppfinnelse i en lukket vesikkel omfattende et fosfolipid  
bi-lag, kalt et liposom.

Det er beskrevet i japansk patent Kokai nr. 59-206349 at  
forbindelsene av formel (A)

3



hvor  $R^{1a}$  er alkyl,  $R^{2a}$  er hydrogen eller lavere alkyl,  $X^a$  er



15 har en hypotensiv effekt, anti-blodplateeffekt osv. og blir benyttet som hypotensive midler og midler for behandling av trombose, og spesielt er en forbindelse som omdannes til en fettemulsjon foretrukket.

I formel (A) er det en metylenkjede ( $-\text{CH}_2-$ ) eller metylenkjede substituert med en alkylgruppe:



25 mellom karboksylgruppene i  $\text{PGE}_1$  og esterbindingen representert av  $X^a$  ( $-\text{COO}-$  eller  $-\text{OCO}-$ ).

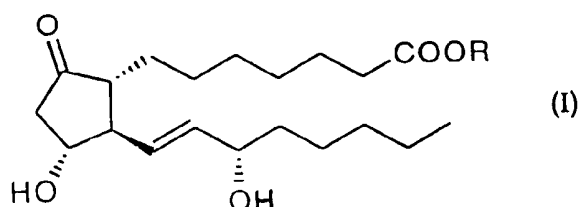
30 På den annen side, i den tilsvarende enhet av foreliggende oppfinnelse av formel (I) angitt nedenfor, når R er representert av (i)  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CO}-\text{R}^1$ , er den bundet via etylenkjeden ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ), og følgelig er begge forskjellige i dette henseende.

35 Når R er representert av (ii)  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CO}-\text{CH}_2\text{O}-\text{R}^2$ , er den bundet via etylen, og videre er den bundet til  $\text{R}^2$  via en eterbinding ( $-\text{CH}_2\text{O}-$ ), og følgelig er begge forskjellige i dette henseende.

Forbindelsen ifølge foreliggende oppfinnelse har utmerket selektivitet og mykningsvarighet.

Videre har liposomformuleringer av forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse utmerket varighet og frigjøring av aktivt middel.

Foreliggende oppfinnelse gir følgelig et prostanglandin E<sub>1</sub> esterderivat av formel (I):



hvor R er

(i)  $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CO}-\text{R}^1$ , eller

(ii)  $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{R}^2$ , og

$\text{R}^1$  og  $\text{R}^2$  er uavhengig av hverandre  $\text{C}_{10}$ - $\text{C}_{12}$ -alkyl, eller et cyclodekstrin-klatrat derav.

Foreliggende oppfinnelse gir også en liposomformulering omfattende en forbindelse av formel (I) eller et cyclodekstrinklatrat derav som en aktiv bestanddel, en fremgangsmåte for fremstilling av en forbindelse av formel (I) eller et cyclodekstrinklatrat derav; samt en farmasøytisk blanding omfattende en forbindelse av formel (I) eller et cyclodekstrinklatrat derav som en aktiv bestanddel.

Fra beskrivelsen vil det bli forstått av fagmannen at alle isomerer er innbefattet i foreliggende oppfinnelse. For eksempel innbefatter alkylgrupper rettkjedede og også forgrenede forbindelser.

I formel (I) betyr  $\text{C}_{10-20}$  alkylgrupper representert av  $\text{R}^1$  eller  $\text{R}^2$  decyl, undecyl, dodecyl, tridecyl, tetradecyl,

pentadecyl, heksadecyl, heptadecyl, oktadecyl, nonadecyl, eicosyl og isomerene derav.

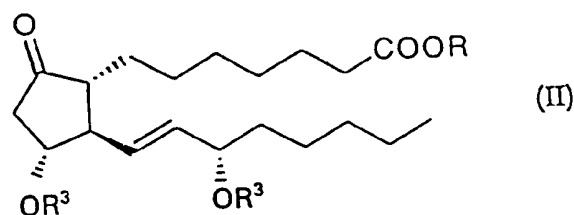
Foretrukket er  $R^1$   $C_{10-12}$  alkyl, fortrinnsvis er  $R^2$   $C_{11-17}$  alkyl og isomerer derav. Spesielt foretrukket er  $R^1$  undecyl,  $R^2$  er foretrukket dodecyl eller heksadecyl.

Cyklodekstrinklatrater av  $PGE_1$ -derivatene av formel (I) kan bli fremstilt ved metoden beskrevet i US patent nr.

3.816.393 eller 4.054.736, ved å bruke  $\alpha$ -,  $\beta$ - eller  $\gamma$ -cyklodekstriner eller en blanding derav.

Omdannelse av dem til sine cyklodekstrinklatrater tjener til å øke stabiliteten og oppløseligheten i vann av  $PGE_1$ -derivater av formel (I), og er derfor nyttig fordi dette letter tilføring som farmasøytika.

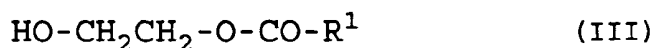
Forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse av formel (I) kan bli fremstilt ved fjerning av  $R^3$ -gruppen fra en forbindelse av formel (II):



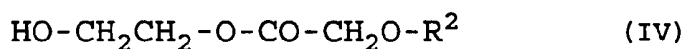
hvor  $R^3$  er en hydroksylbeskyttende gruppe som kan bli fjernet under sure betingelser, f.eks. tetrahydropyran-2-yl, metoksymetyl eller 2-etoksyetyl, og R er som tidligere definert. Elimineringsreaksjonen av  $R^3$ -gruppen kan bli utført i en vandig oppløsning av organisk syre (f.eks. eddiksyre eller p-toluensulfonsyre) eller i uorganisk syre (f.eks. saltsyre eller svovelsyre) i nærvær av et vannblandbart organisk oppløsningsmiddel (f.eks. en lavere alkanol såsom metanol eller etanol) eller en eter (såsom dioksan eller tetrahydrofuran) ved en temperatur på fra romtemperatur til  $75^\circ\text{C}$ . Den ovennevnte reaksjon kan for-

trinnsvis bli utført i et blandet oppløsningsmiddel omfattende eddiksyre, vann og tetrahydrofuran ved en temperatur på fra 40°C til 50°C.

Forbindelsen av formel (II) kan fremstilles ved omsetning av den fri karboksylsyre som tilsvarer forbindelsene av formel (II), med en forbindelse med formel (III)



eller en forbindelse med formel (IV):

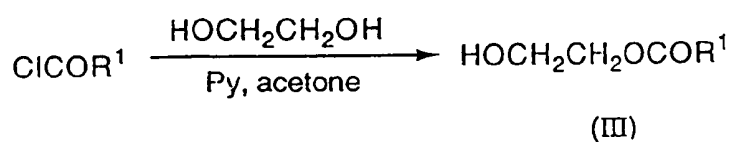


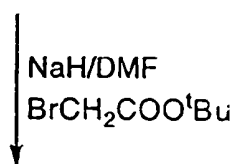
hvor de forskjellige symboler er som definert ovenfor, i et inert organisk oppløsningsmiddel (f.eks. en eter såsom tetrahydrofuran eller dioksan) i nærvær av trifenylfosfin eller diethylazodikarbonylat (heretter forkortet til DEAD) ved en temperatur på fra 0°C til romtemperatur.

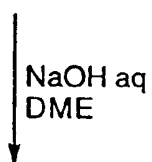
Av de fri karboksylsyrer benyttet som utgangsmateriale tilsvarende forbindelsene av formel (II), er (13E)-(11 $\alpha$ ,15S)-9-okso-11,15-bis(tetrahydropyran-2-yloxy)prost-13-enoinsyre, for eksempel, en kjent forbindelse beskrevet i J. Am. Chem. Soc., 92 2586 (1970).

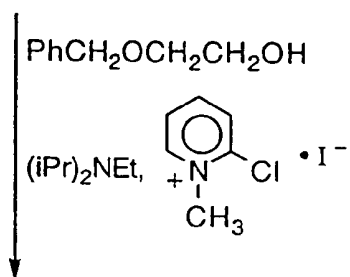
De andre fri karboksylsyrer tilsvarende forbindelsen av formel (II), og forbindelsene av formel (III) og (IV), er i og for seg kjente eller kan lett bli fremstilt fra kjente forbindelser ved i og for seg kjente metoder.

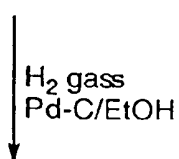
For eksempel kan forbindelsene av formel (III) og (IV) bli fremstilt ved metoden beskrevet i de følgende Skjema (A) og Skjema (B).

SKJEMA ASKJEMA B

$$\text{HOR}^2$$


$$^t\text{BuOCOCH}_2\text{OR}^2$$


$$\text{HOCOCH}_2\text{OR}^2$$


$$\text{PhCH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCOCH}_2\text{OR}^2$$


$$\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{OCOCH}_2\text{OR}^2 \quad (\text{IV})$$

I de ovenfornevnte skjemaer har forkortelsene de følgende betydninger, og  $R^1$  og  $R^2$  er som definert ovenfor.

- Py: pyridin,  
5 DMF: dimetylformamid,  
 $t$ Bu: tert-butyl,  
DME: dimetoksyetan,  
iPr: isopropyl,  
Et: etyl,  
10 THF: tetrahydrofuran,  
Ph: fenyl,  
EtOH: etanol.

- 15 Til tross for at den har en kraftig og vedvarende blodstrømningsøkende effekt, har  $PGE_1$  esterderivater av formel (I) og cyklodekstrinklatrater derav kun en svak hypotensiv effekt og kan følgelig bli benyttet som midler for forebygging og/eller behandling av perifer sirkulatorisk lidelse (f.eks. perifer arteriell okklusiv sykdom eller trombotisk anginetisk obliterens), decubitus, hudsår (f.eks. sår som  
20 stammer fra brannskader, diabetiske sår, stenose av femoralarterie og operasjonsstress), og for å opprettholde blodstrøm etter rekonstruktiv vaskulær kirurgi.

- 25 Blodstrømningsøkende effekt og hypotensiv effekt av forbindelsen ifølge foreliggende oppfinnelse blir f.eks. bestemt ved de følgende forsøk.

- 30 Hannrotter som veide 200-350 g ble bedøvet med uretan (25% uretan, 6 ml/kg s.c.). Carotid-arterien og halspulsåren ble kanylert med polyetylenrør for måling av henholdsvis blodtrykk og medikamentinjeksjon. Blodtrykk ble funnet med engangs trykktransducerset (Spectramed, Ltd) og nedtegnet med en rekticoder (model RJG-4128, Nihon kohden, Ltd).

- 35 Blodstrømmen ble overvåket som kutan blodstrøm av dorsum pedis under anvendelse av en laser-Doppler strømningsmåler av festbar type (modell ALF21, Advance, Ltd). Målinger ble

tatt inntil verdiene vente tilbake til nivået som var observert før injeksjon av medikamentene. Injeksjonstiden var omkring 10 sekunder. Den hypotensive effekt og blodstrømningsøkende effekt ble regnet ut som henholdsvis den maksimale hypotensive aktivitet (mmHg) og arealet under kurven (AUC) etter injeksjon av medikamenter.

Resultatene ble representert ved dosen som var nødvendig for å danne en effektiv økning i blodstrømmen (hovedeffekt) og ved den hypotensive effekt (bieffekt) ved samme dose.

Forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse ble tilført i form av en liposomformulering (fremstilt i eksempel 4). Som sammenligningsforbindelse ble PGE<sub>1</sub>-1-decanoyloksyetyler beskrevet i eksempel 10 i beskrivelsen av japansk patent Kokai nr. 59-206349, tilført i form av en lipidsuspensjon (fremstilt i referanseeksempel 8) i foreliggende beskrivelse). Effektiviteten av økning av blodstrøm ble bestemt ved følgende metode. Det vil si at det er kjent at PGE<sub>1</sub> lipidemulsjon (i salg) viser effektivitet ved 5 µg/kg i.v. injeksjon i rottesykdomsmodellen [beskrevet i Drug Exp. Clin. Res., 12, 917 (1986)]. I det ovennevnte eksperimentelle forsøkssystem for forbindelsene ifølge foreliggende forbindelse var AUC for PGE<sub>1</sub>-lipidemulsjon (5 µg/kg i.v.) 771 på den blodstrømningsøkende effekt, slik at dette ble benyttet som en effektiv verdi for økningen i blodstrøm.

Tabell 1

| Eksempel                 | Blodstrømaufgøkjende effekt |           |                                                   | Hypotensiv effekt                 |                                                |
|--------------------------|-----------------------------|-----------|---------------------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------------------|
|                          | Dose<br>(µg/kg)             | Total AUC | Dose (A) krevet for<br>å oppnå AUC=771<br>(µg/kg) | Maksimum<br>hypotensjon<br>(mmHg) | Maksimum<br>hypotensjon ved<br>dose (A) (mmHg) |
| 1                        | 1                           | 175       |                                                   | 3                                 |                                                |
|                          | 3                           | 1914      | 1.47                                              | 7                                 | 4.3                                            |
|                          | 10                          | 3528      |                                                   | 13                                |                                                |
| 2                        | 3                           | 329       |                                                   | 3                                 |                                                |
|                          | 10                          | 807       | 8.14                                              | 7                                 | 6.1                                            |
|                          | 30                          | 3248      |                                                   | 20                                |                                                |
| 3                        | 1                           | 227       |                                                   | 2                                 |                                                |
|                          | 3                           | 4028      | 1.14                                              | 9                                 | 2.8                                            |
|                          | 10                          | 5391      |                                                   | 9                                 |                                                |
| Sammenl.-<br>forbindelse | 1                           | 92        |                                                   | 1                                 |                                                |
|                          | 3                           | 222       | 16.70                                             | 9                                 | 30.2                                           |
|                          | 10                          | 498       |                                                   | 18                                |                                                |

Tabell 1 viser de følgende data:

(1) Blodstrømningsøkningseffekten (hovedeffekt) av forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse er omkring 2 til 15 ganger bedre enn den for sammenligningsforbindelsen.

(2) På den annen side er den hypotensive effekt (bieffekt) av forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse ved den effektive dose en tiendedel til en femtedel av den hos sammenligningsforbindelsen.

Det vurderes slik at forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse er signifikant bedre enn sammenligningsforbindelsen dersom de blir brukt for forebygging og/eller behandling av perifer sirkulatorisk lidelse, decubitus, hudsår, eller for å opprettholde blodstrøm etter rekonstruktiv vaskulær kirurgi.

Toksisiteten av forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse er meget liten, og følgelig kan forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse være passende for farmasøytisk bruk.

For de ovenfor beskrevne formål kan forbindelsen av formel (I) ifølge foreliggende oppfinnelse og cyklodekstrinklater derav normalt bli tilført systemisk eller partielt, vanligvis ved parenteral tilførsel.

Dosene som skal tilføres bestemmes avhengig av f.eks. alder, kroppsvekt, symptomer, den ønskede terapeutiske effekt, tilføringsruten og behandlingens varighet. I et voksent menneske er dosene pr. person generelt fra 0,1  $\mu$ g til 500  $\mu$ g ved parenteral tilførsel (fortrinnsvis intravenøs tilførsel), opptil flere ganger pr. dag, eller kontinuerlig tilførsel i fra 1 til 24 timer pr. døgn fra vene.

Som nevnt ovenfor avhenger dosene som skal benyttes av

forskjellige betingelser. Følgelig finnes det tilfeller hvor doser som er lavere enn eller høyere enn områdene angitt ovenfor kan bli brukt.

- 5 Forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse kan bli tilført i form av f.eks. injeksjoner, linimenter eller suppositorier for parenteral tilførsel.

- 10 Injeksjoner for parteneal tilførsel innbefatter sterile vandige eller ikke-vandige oppløsninger, suspensjoner og emulsjoner. Vandige oppløsninger og suspensjoner kan innbefatte destillert vann for injeksjon eller fysiologisk saltoppløsning. Ikke-vandige oppløsninger og suspensjoner kan f.eks. innbefatte propylenglykol, polyetylenglykol, vegetabilsk olje, såsom olivenolje, alkohol, såsom etanol, eller  
15 Polysorbate 80®.

- Injeksjoner kan omfatte ytterligere bestanddeler som er andre enn inerte fortynningsmidler, f.eks. konserveringsmidler, fuktemidler, emulgeringsmidler, dispergeringsmidler, stabiliseringsmidler og midler som hjelper til med oppløsning (f.eks. glutaminsyre eller asparaginsyre).  
20

- De kan bli sterilisert f.eks. ved filtrering gjennom et bakterieutskillende filter, ved innlemming av steriliseringsmidler i blandingene eller ved bestråling. De kan også bli fremstilt i form av sterile faste stoffer som kan bli oppløst i sterilt vann eller annen form for steril(e) fortynningsmiddel(er) for injeksjon umiddelbart før bruk.  
25

- 30 Andre sammensetninger for parenteral tilførsel innbefatter væsker for eksternt bruk og enderme linimenter, salver, suppositorier for rektal tilførsel og pessarer for vaginal tilførsel, som omfatter en eller flere av den/de aktive bestanddel(er) og kan bli fremstilt ved i og for seg kjente metoder.  
35

Videre innbefatter foreliggende oppfinnelse liposomformuleringer inneholdende  $\text{PGE}_1$  esterderivater av formel (I) eller cyklodekstrinklatrater derav, som aktive bestanddeler.

5 Liposomformuleringene er uni- eller multilamellære fine sfæriske vesikler omfattende fosfatidylcholin (f.eks. naturlige fosfolipider avledet fra eggeplomme eller soya-bønne og syntetiske fosfolipider, såsom dimyristoylfosfatidylcholin, distearoylfosfatidylcholin og dipalmitoylfosfatidylcholin) som membranmateriale. Innkapslingen av medikamentene i liposomene gjør det mulig at medikamentene blir  
10 avlevert til målorganet og frigjøringen av medikamentene blir forlenget.

15 Additiver andre enn den aktive bestanddel, som f.eks. er sukkere (f.eks. laktose eller mannitol), nøytrale fosfolipider (f.eks. kolesterol eller triglycerid) eller ladede lipider (f.eks. fosfatidinsyre eller stearylamin) kan bli blandet i liposomformuleringene.

20 Liposomformuleringene kan bli fremstilt ved i og for seg kjente metoder. For eksempel er egnede metoder beskrevet i detalj i Liposome Technology bind 1, 2 og 3, utgitt av Gregoriadis, G. (publisert i 1993).  $\text{PGE}_1$ -esterderivatene av  
25 formel (I) eller cyklodekstrinklatrater derav og liposommembranmaterialet er generelt tilstede i et vektforhold på fra 1:1 til 1:400. Det foretrukne vektforhold er fra 1:10 til 1:200. Et spesielt foretrukket vektforhold er 1:10 til 1:50.

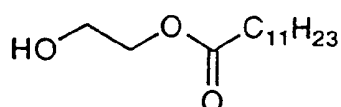
30 De følgende referanseeksempler og eksempler illustrerer foreliggende oppfinnelse, men begrenser ikke dens omfang.

35 Oppløsningsmidlene i parentes viser de fremkallende eller eluerende oppløsningsmidler, og forholdene mellom oppløsningsmidlene som benyttes er pr. volum i kromatografiske separasjoner.

Oppløsningsmidlene i parentes i NMR viser oppløsningsmidlene som benyttes for måling.

5 Referanseeksempel 1

**Laurinsyre-2-hydroxyetylester**



10

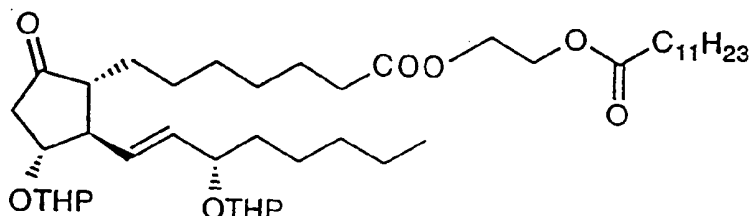
Under avkjøling med is ble etylenglykol (434 mg) oppløst i aceton (20 ml), og pyridin (632 mg) ble tilsatt til dette og så ble lauroylklorid (1532 mg) tilsatt dråpevis. Oppløsningen ble oppvarmet til romtemperatur, og den ble omrørt i 2 timer. Blandingen ble inndampet. Til residuet ble det tilsatt vann, og oppløsningen ble ekstrahert med etylacetat. Det organiske lag ble vasket med vann (tre ganger), tørket over magnesiumsulfat og inndampet. Residuet ble renset med silikagelkolonne-kromatografi (n-heksan : etylacetat = 4 : 1) for å gi tittelforbindelsen (1,63 g) med de følgende fysiske data.

20

TLC:Rf: 0,38 (n-heksan : etylacetat = 4 : 1).

25 Referanseeksempel 2

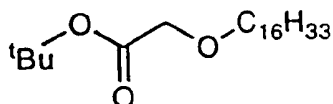
**(13E)-(11 $\alpha$ ,15S)-9-okso-11,15-bis (tetrahydropyran-2-yl-oksy)-prost-13-enonsyre-2-(dodecanoyloksy)etylester**



ml), og trifenyfosfin (366,5 mg) og alkoholderivat (fremstilt i referanseeksempel 1 (341,6 mg) ble tilsatt til dette. Etter at en oppløsning av dietylazodikarboksylat (heretter forkortet til DEAD) (243,6 mg) i THF (1 ml) ble tilsatt dråpevis til reaksjonsoppløsningen, ble temperaturen i denne øket til romtemperatur, og den ble omrørt i 1,5 timer. Til reaksjonsoppløsningen ble det tilsatt vann, og oppløsningen ble ekstrahert med etylacetat (to ganger). Det organiske lag ble vasket med en mettet vandig løsning av natriumklorid, tørket over magnesiumsulfat og inndampet. Residuet ble renset ved silikagelkolonne-kromatografi (n-heksan : etylacetat = 4 : 1) for å gi tittelforbindelsen (466 mg) med de følgende fysikalske data. TLC: R<sub>f</sub> 0,42 (n-heksan : etylacetat = 4 : 1).

### Referanseeksempel 3

#### **Heksadecyloksyeddiksyre-t-butylester**



Natriumhydrid (532,5 mg) ble suspendert i DMF (15 ml) og en oppløsning av heksadecanol (4,0 g) i DMF (10 ml) ble tilsatt dråpevis, og natriumjodid (15 mg) ble tilsatt til dette. Etter omrøring i 1 time ved 80°C, ble det erholdt en høyviskid melkeaktig oppløsning. Løsningen ble avkjølt til romtemperatur, og en α-bromeddiksyre-t-butylester (2,6 g) ble tilsatt. Etter at reaksjonsblandingen var blitt omrørt i 1 time ble vann tilsatt for å stoppe reaksjonen. Blandingen ble ekstrahert med et blandet oppløsningsmiddel (n-heksan : etylacetat = 1 : 1) (tre ganger). Det organiske lag ble vasket med en mettet vandig oppløsning av natriumklorid, tørket over magnesiumsulfat og inndampet. Residuet ble renset ved silikagelkolonne-kromatografi (n-heksan : etylacetat = 20 : 1) for å gi en blanding (2,53 g) av tittelforbindelsen og heksadecyloksyeddiksyre-heksadecylester

(biprodukt).

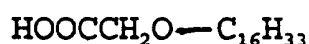
TLC: Rf 0,45 (n-heksan : etylacetat = 10 : 1),

NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 4,12 (t, J=5,8 Hz), 4,06 (s), 3,52 (t, J=4,8 Hz), 1,62 (m), 1,26 (m), 0,88 (t, J=7,0 Hz).

5

#### Referanseeksempel 4

#### **Heksadecyloksyeddisyre**



10

Blandingen av t-butylesterderivat og heksadecylesterderivat (fremstilt i referanseeksempel 3 (1,45 g)) ble oppløst i dimetoksyetan (5 ml) og 1N vandig oppløsning av natriumhydroksyd (2 ml) ble tilsatt til dette, og det ble kokt under tilbakeløp. Denne blanding ble ekstrahert med eter for å fjerne urenheter. Det vandige lag ble surgjort ved å tilsette 1N saltsyre, og det ble ekstrahert med et blandet oppløsningsmiddel (n-heksan : etylacetat = 1 : 1) (tre ganger) og vasket med en vandig oppløsning av natriumklorid, tørket over magnesiumsulfat og inndampet. Residuet ble rensset med silikagelkolonne-kromatografi (n-heksan : etylacetat = 1 : 1) for å gi tittelforbindelsen (698 mg) med de følgende fysiske data.

15

20

TLC : Rf 0,25 (n-heksan : etylacetat = 1 : 1),

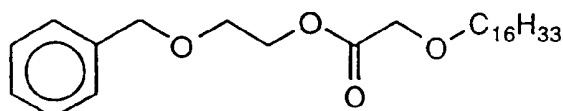
25

NMR : (CDCl<sub>3</sub>): δ 4,10 (2H, s), 3,5 (2H, t, J=6,2 Hz), 1,75-1,50 (2H, m), 1,36 (26H, m), 0,85 (3H, t, J=6,8 Hz).

#### Referanseeksempel 5

#### **Heksadecyloksyeddisyre 2-(benzyloksy)etylester**

30



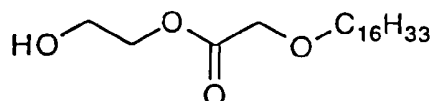
35

Til en oppløsning av karboksylsyrederivatet (fremstilt i referanseeksempel 4 (698 mg)) og 2-(benzyloksy)etanol (710

mg) i diklormetan (10 ml) ble det tilsatt diisopropyletyl-  
amin (2,2 ml), og 2-klor-1-metylpyridinjodid (891 mg), suk-  
sessivt, og reaksjonsoppløsningen ble omrørt i 1,5 t. Vann  
ble tilsatt til reaksjonsoppløsningen og oppløsningen ble  
5 ekstrahert med diklormetan (to ganger). Det organiske lag  
ble vasket med fortynnet saltsyre og en mettet vandig opp-  
løsning av natriumklorid, suksessivt, tørket over magne-  
siumsulfat og inndampet. Residuet ble rensset med silikagel-  
kolonnekromatografi (n-heksan : etylacetat = 10 : 1), for å  
10 gi tittelforbindelsen (425 mg med de følgende fysiske data.  
TLC : Rf 0,63 (n-heksan : etylacetat = 3 : 1),  
NMR (CDCl<sub>3</sub>) : δ 7,30 (5H, m), 4,57 (2H, s), (4,34 (2H, t,  
J=4,8 Hz), 3,52 (2H, t, J=6,6 Hz), 1,57 (4H, m), 1,27 (24H,  
m), 0,88 (3H, t, J=6,8 Hz).

#### Referanseeksempel 6

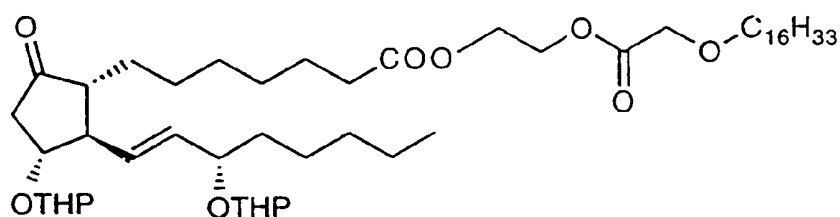
#### Heksadecyloksyeddiksyre-2-hydroksyetylester



Etter at 10% palladium-karbon (110 mg) var suspendert i  
etylacetat, ble hydrogengass tilsatt. En oppløsning av  
25 benzylderivater fremstilt i referanseeksempel 5 (365 mg)) i  
etylacetat (5 ml) ble tilsatt til reaksjonsoppløsningen, og  
den ble omrørt i 1 t under en atmosfære av hydrogengass.  
Etter å ha bekreftet at flekken tilsvarende utgangsmateria-  
let var forsvunnet på TLC, ble hydrogengass fjernet og pal-  
ladium-karbon ble fjernet ved å bruke Celite®. Oppløsnings-  
30 midlet ble inndampet. Residuet ble rensset med silikagelko-  
lonne-kromatografi (n-heksan : etylacetat = 2 : 1) for å gi  
tittelforbindelsen (275 mg) med de følgende fysiske data.  
TLC : Rf 0,32 (n-heksan : etylacetat = 2 : 1),  
35 NMR (CDCl<sub>3</sub>) : δ 4,30 (2H, d, J=4,8 Hz), 4,12 (2H, s), 3,85  
(2H, m), 3,52 (2H, t, J=6,2 Hz), 1,70-1,50 (2H, m), 1,26  
(26H, m), 0,86 (3H, t, J=6,8 Hz).

Referanseeksempel 7

(13E) - (11 $\alpha$ , 15S) - 9-okso-11,15-bis (tetrahydropyran-2-yl) -  
prost-13-enonsyre-2-heksadecyloksyacetoksy) etylester

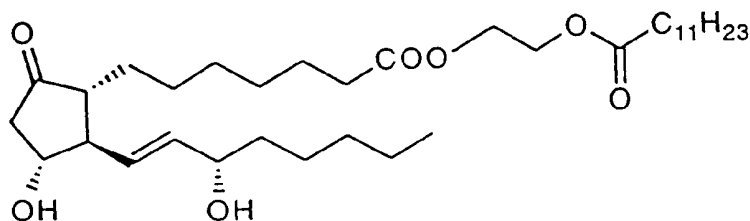


Med den samme fremgangsmåte som i referanseeksempel 2 (ved å bruke alkoholderivat (258 mg) fremstilt i referanseeksempel 6 istedenfor laurinsyre-2-hydroksyetylester), ble tit-  
telforbindelsen (268 mg) med de følgende fysiske data frem-  
stilt.

TLC : R<sub>f</sub> 0,45 (n-heksan : etylacetat = 5: 2).

Eksempel 1

PGE<sub>1</sub> (dodecanoyloksy) etylester



Til en oppløsning av bis(tetrahydropyran-2-yloksy)derivat (fremstilt i referanseeksempel 2 (460 mg)) i THF (2 ml) ble  
det tilsatt 65% eddiksyre (20 ml), og reaksjonsoppløsningen ble omrørt i 1 time ved 45°C. Reaksjonsoppløsningen ble  
avkjølt til romtemperatur, og vann ble tilsatt til reaksjonsoppløsningen og den ble ekstrahert med etylacetat (tre  
ganger). Det organiske lag ble vasket med vann, en mettet vandig oppløsning av natriumbikarbonat og en mettet vandig  
oppløsning av natriumklorid, suksessivt, tørket over magnesiumsulfat og inndampet. Residuet ble rensset med silikagel-

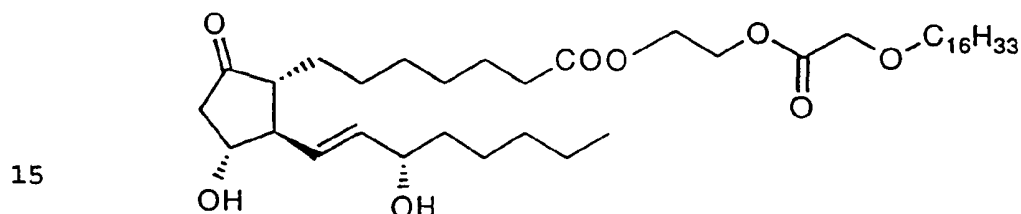
kolonnekromatografi (n-heksan : etylacetat = 1 : 1) for å gi tittelforbindelsen (178 mg) med de følgende fysiske data.

TLC : Rf 0,60 (etylacetat)

5 NMR (CDCl<sub>3</sub> : δ 5,77-5,48 (2H, m), 4,26 (4H, s), 4,20-3,97 (2H, m), 3,10-2,90 (1H, m), 2,83-2,67 (1H, m), 2,45-2,13 (7H, m), 2,07-1,93 (1H, m), 0,95-0,83 (6H, m).

### Eksempel 2

10 PGE<sub>1</sub>-2- (heksadecyloksyacetoksy) etylester



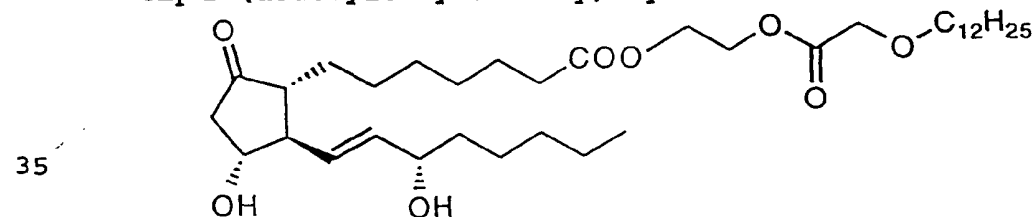
Ved samme fremgangsmåte som i eksempel 1 (ved å bruke bis(tetrahydropyran-2-yloksy)derivat (260 mg) fremstilt i referanseeksempel 7 istedenfor bis(tetrahydropyran-2-yloksy)derivat brukt i eksempel 1), ble tittelforbindelsen (145,5 mg) med de følgende fysiske data fremstilt.

TLC : Rf 0,45 (n-heksan : etylacetat = 1 : 3),

25 NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 5,78-5,50 (2H, m), 4,24-4,20 (4H, m), 4,20-3,98 (4H, m), 3,55 (2H, t, J=7,0 Hz), 3,08-2,95 (1H, bs), 2,72 (1H, dd, J=12,7 5Hz), 2,42-2,15 (5H, m), 2,15-1,90 (2H, m), 1,90-1,48 (10H, m), 1,48-1,18 (34H, m), 1,00-0,90 (6H, m).

### Eksempel 3

30 PGE<sub>1</sub> 2- (dodecyloksyacetoksy) etylester



Ved samme fremgangsmåte som i referanseeksempel 3, referanseeksempel 4, referanseeksempel 5, referanseeksempel 6, referanseeksempel 7 og eksempel 2 (utgående fra tetradekanol istedenfor heksadekanol) ble tittelforbindelsen med de følgende fysiske data fremstilt.

NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  5,78-5,48 (2H, m), 4,24-4,20 (4H, m), 4,20-3,98 (4H, m), 3,55 (2H, t,  $J=7,0$  Hz), 3,40-3,10 (1H, bs), 2,72 (1H, dd,  $J=12,7.5$  Hz), 2,52-2,10 (5H, m), 2,15-1,90 (1H, m), 1,90-1,48 (8H, m), 1,48-1,18 (28H, 15 m), 1,00-0,90 (6H, m).

#### Eksempel 4

##### **Fremstilling av liposomformuleringene**

Dimyristoylfosfatidylcholin (heretter forkortet DMPC, 6 mg) og forskjellige  $\text{PGE}_1$ -esterdrivater ifølge foreliggende oppfinnelse (3,90  $\mu\text{g}$ ) ble oppløst i kloroform, og en tørr lipidfilm av disse ble fremstilt ved å fjerne kloroform og ved å la stå under redusert trykk i 1 time.

Den tørre lipidfilm ble dispergert i 10% maltoseoppløsning (3 ml) ved å bruke en hvirvelblander (type S-100, Taiyokagaku Inc.) og en vandig suspensjon (medikamentkonsentrasjon: 1, 3, 10, 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) ble fremstilt. Små unilamellære liposomer ble fremstilt fra de ovennevnte multilamellære liposomoppløsninger ved de følgende metoder.

##### **(1) Ultralydmetode**

De multilamellære liposomoppløsninger (3 ml) som var fremstilt ved ovennevnte metode ble overført til plastrør og ble ultralydbehandlet med en ultralydprobe (type Sonifier cell disruptor 200, Bronson) ved betingelsene 50% pulsert virkning i 15 min. De fremstilte oppløsninger ble passert gjennom et membranfilter med porediameter 0,2  $\mu\text{m}$  for å fjerne titanpartikler, og liposomformuleringer med gjennom-

snittlig diameter på 40-70 nm ble dannet.

## (2) Ekstrusjonsmetode

5 I ekstrusjonsapparaturen (The Extruder, LipexBiomembranes Inc.) ble to polykarbonatmembranfiltere med porediameter på 0,1  $\mu\text{m}$  stablet, og de multilamellære liposomoppløsninger (3 ml) fremstilt ved ovennevnte metode ble tilsatt. Ekstrusjonsapparaturen ble plassert i et vannbad holdt ved 40-  
10 50°C. Etter at de multilamellære liposomoppløsninger var passert gjennom to stablede membranfiltere tre ganger, ble de dannede små unilamellære liposomer passert gjennom polykarbonat membranfiltrene med porediameter 0,05  $\mu\text{m}$  byttet fra 0,1  $\mu\text{m}$ , tre ganger. Den midlere diameter av de  
15 endelig fremstilte lipomformuleringer var 50-60  $\mu\text{m}$ .

### Eksempel 5

#### Fremstilling av liposomformuleringene

20 Ved samme fremgangsmåte som i eksempel 4 (ved å bruke egglecitin (6 mg) istedenfor dimyristoylfosfatidylcholin og  $\text{PGE}_1$  esterderivater ifølge foreliggende oppfinnelse (30  $\mu\text{g}$ -600  $\mu\text{g}$ )), ble liposomformuleringene dannet.

#### 25 Formuleringseksempel 1

Liposomformuleringene av  $\text{PGE}_1$  dekanoyloksyetyler (fremstilt i eksempel 4) ble oppdelt i 1 ml ampuller og frysetørket for de foreslåtte injeksjonsprodukter.

30

### Referanseeksempel 8

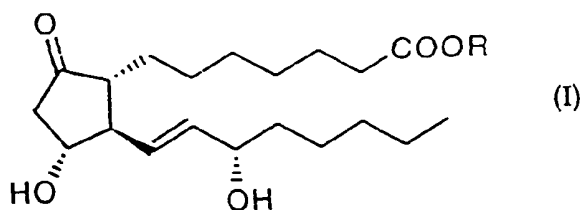
#### Lipidemulsjon av $\text{PGE}_1$ -1-dekanoyloksyetyler

35 Renset eggeplomme-fosfolipid (48 mg),  $\text{PGE}_1$ -1-dekanoyloksyetyler (15  $\mu\text{g}$ -450  $\mu\text{g}$ ), natriumoleat (1 mg) og fosfatidinsyre (1 mg) ble tilsatt til renset soyabønneolje (200 mg) og oppløst ved 40-70°C. Destillert vann (2 ml) ble

tilsatt, og blandingene ble grovemulgert i 30 min ved å bruke en høyhastighetshomogenisator. Videre ble det til de dannede emulsjoner tilsatt glyserin (10 mg) og destillert vann for injeksjon (800  $\mu$ l, 20-40°C), suksessivt. De ble  
5 emulgert i 30 min ved å bruke en probe-sonikator og homogene finlipidemulsjoner (gjennomsnittlig diameter: 200-400 nm) ble dannet.

## P a t e n t k r a v

1. Prostaglandin E<sub>1</sub> esterderivat,  
karakterisert ved at det har formel (I)



hvor R er

(i)  $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CO}-\text{R}^1$ , eller

(II)  $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{R}^2$ , og

$\text{R}^1$  og  $\text{R}^2$  hver uavhengig er  $\text{C}_{10-20}$ -alkyl;  
eller et cyclodekstrinklatrat derav.

2. Forbindelse ifølge krav 1,

karakterisert ved at R er

(i)  $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CO}-\text{R}^1$ , og

$\text{R}^1$  er  $\text{C}_{10-12}$ -alkyl.

3. Forbindelse ifølge krav 1,

karakterisert ved at R er

(ii)  $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{R}^2$ , og

$\text{R}^2$  er  $\text{C}_{11-17}$ -alkyl.

4. Forbindelse ifølge krav 2,

karakterisert ved at den er

PGE<sub>1</sub> 2-(dodecanoyloksy)etylester.

5. Forbindelse ifølge krav 3,

karakterisert ved at PGE<sub>1</sub> er 2-dodecyl-  
oksyacetoksy)etylester, eller

PGE<sub>1</sub> 2-(heksadecyloksyacetoksy)etylester.

6. Liposomformulering, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter et prostanglandin E<sub>1</sub>-derivat av formel (I) som angitt i hvilket som helst av kravene 1-5 eller et cyklodekstrinklatrat derav, som aktiv bestanddel.

5

7. Liposomformulering ifølge krav 6, k a r a k t e r i s e r t v e d at liposommembran-materialet omfatter dimyristoylfosfatidylcholin.

10

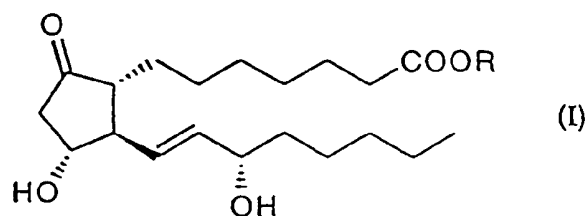
8. Liposomformulering ifølge krav 6, k a r a k t e r i s e r t v e d at at liposommembran-materialet omfatter egglecitin.

15

9. Liposomformulering ifølge hvilket som helst av kravene 6-8, k a r a k t e r i s e r t v e d at den er fremstilt ved frysetørking.

10. Fremgangsmåte ved fremstilling av en forbindelse av formel (I):

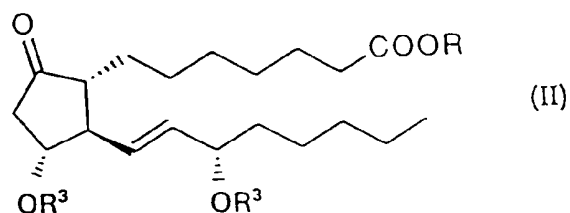
20



25

hvor R er som angitt i krav 1, eller et cyklodekstrinklatrat derav, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter å fjerne R<sup>3</sup>-gruppen fra en forbindelse av formel (II):

30



35

hvor R er som tidligere definert og  $R^3$  er en hydroksyl-  
beskyttende gruppe som kan bli fjernet under sure betingel-  
ser og, om ønsket, omdannelse av forbindelsen med formel  
(I) således erholdt til et cyklodekstrinklatrat derav.

5

11. Farmasøytisk blanding,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter et  
prostaglandin  $E_1$ -derivat av formel (I) som angitt i hvil-  
ket som helst av kravene 1-5 eller et cyklodekstrinklatrat  
10 derav, eller en liposomformulering ifølge hvilket som helst  
av kravene 6-9, som aktiv bestanddel, og et farmasøytisk  
akseptabelt bæremateriale.

15

12. Anvendelse av prostaglandin  $E_1$ -derivat av formel (I)  
som angitt i hvilket som helst av kravene 1-5 eller et  
cyklodekstrinklatrat derav, ved fremstilling av et medika-  
ment for forebyggelse og/eller behandling av perifere  
sirkulatoriske lidelser, decubitus eller hudsår.

20

13. Anvendelse av prostaglandin  $E_1$ -derivat av formel (I)  
som angitt i hvilket som helst av kravene 1-5 eller et  
cyklodekstrinklatrat derav, ved fremstilling av et medika-  
ment for opprettholdelse av blodstrøm etter rekonstruktiv  
vaskulær kirurgi.