



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **315605**

(13) B1

(51) Int Cl⁷

C 07 D 213/02, A 61 K 31/44

Patentstyret

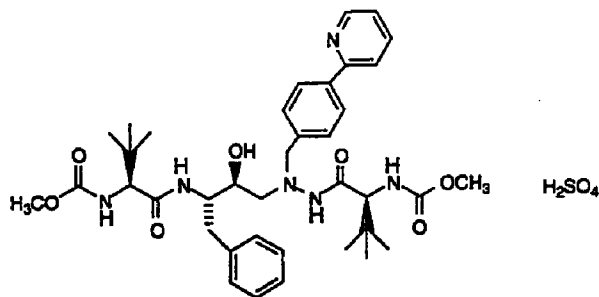
(21) Søknadsnr	20003692	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	1998.12.22, PCT/US98/27382
(22) Inng. dag	2000.07.19	(85) Videreføringsdag	2000.07.19
(24) Løpedag	1998.12.22	(30) Prioritet	1998.01.20, US, 71968
(41) Alm. tilgj.	2000.07.19		
(45) Meddelt dato	2003.09.29		
(71) Patenthaver	Bristol-Myers Squibb Co, P O Box 4000, Princeton, NJ 08543-4000, US		
(72) Oppfinner	Janak Singh, Lawrenceville, NJ 08648, US Pudipeddi Madhusudhan, North Brunswick, NJ 08902, US Mark D Lindrud, Basking Ridge, NJ 07920, US		
(74) Fullmektig	Bryn Aarflot AS, 0104 Oslo		

(54) Benevnelse **Bisulfat av HIV-protease-inhibitor**

(56) Anførte publikasjoner Ingen

(57) Sammendrag

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer det krystallinske bisulfatsaltet med formelen som er funnet å ha uventet høy løselighet/oppløsningshastighet og oral biologisk tilgjengelighet i forhold til den fri baseform av denne HIV-proteaseinhibitor azapeptid-forbindelse.



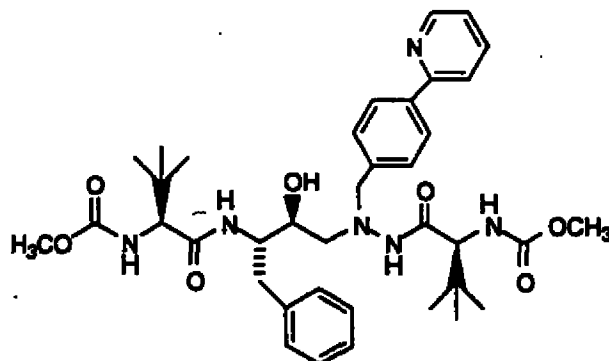
II

BISULFATSALT AV HIV-PROTEASE-INHIBITOR

BAKGRUNN FOR OPPFINNELSEN

1. Oppfinnelsesområde

Den foreliggende oppfinnelse tilveiebringer det nye krystallinske bisulfat-salt av azapeptid HIV-protease-inhibitoren med formelen

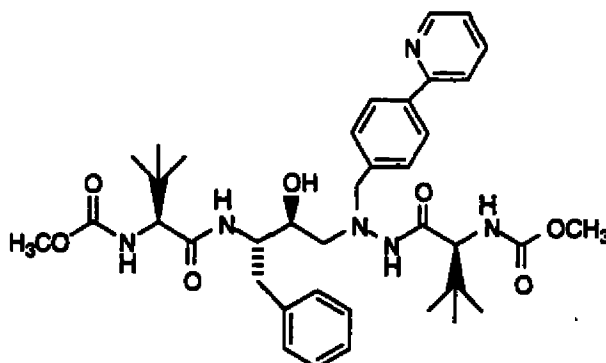


I

som viser uventede vandige løselighets-oppløsningsegenskaper sammenlignet med andre salter og signifikant forbedret oral biologisk tilgjengelighet i dyr sammenlignet med den fri basen. Bisulfatsaltet er således anvendelig for farmasøytiske doseringsformer av den ovenfor angitte protease-inhibitor, spesielt orale doseringsformer.

2. Teknisk bakgrunn

Publisert PCT-patentsøknad WO97/40029 beskriver en rekke azapeptid-HIV-protease-inhibitorer som er rapportert å ha en høy grad av inhiberende aktivitet mot HIV-viruset. Et av midlene som inngår innenfor omfanget av WO97/40029 er forbindelsen med strukturformelen



I

og det kjemiske navn [3S-(3R*, 8'R*, 9'R*, 12*)]-3,12-bis(1,1-dimetyletyl)-8-hydroksy-4,11-diokso-9-(fenylmetyl)-6-[[4-(2-pyridinyl)-fenylmetyl]-2,5,6,10,13-pentaazatetradekanedikarboksytsyre, dimetylester og er under evaluering som en mulig andre generasjons HIV-protease-inhibitor.

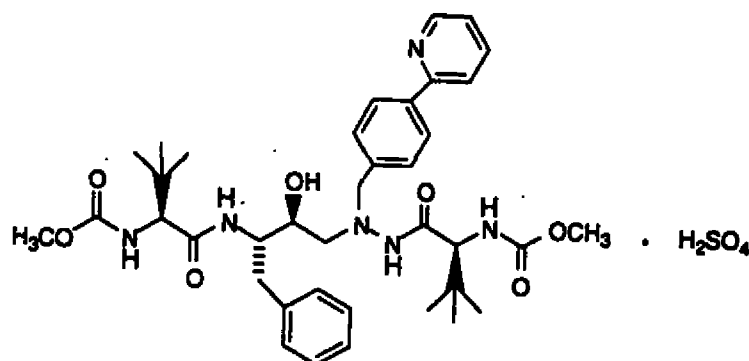
5

WO97/40029 beskriver den fri baseform av azapeptid-derivater så som forbindelse I og også forskjellige farmasøytiske syreaddisjonssalter. Selv om flere organiske og uorganiske syrer er nevnt som mulige saltdannelsesmidler innbefattet svovelsyre, er ikke det spesielle bisulfatsaltet nevnt som er gjenstand
10 for den foreliggende søknad.

SAMMENFATNING AV OPPFINNELSEN

Den foreliggende oppfinnelse tilveiebringer bisulfatsaltet av forbindelse I ovenfor med strukturformelen

15



20

II

DETALJERT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

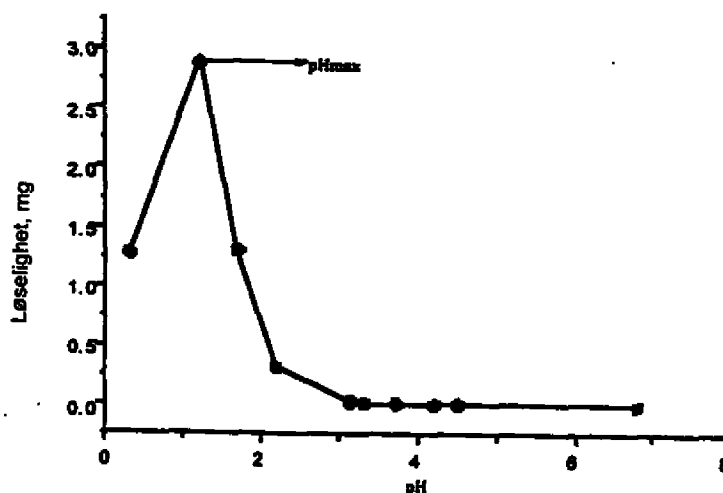
25 Forbindelse I som beskrevet ovenfor er en svak organisk base med en vandig løselighet på mindre enn 1 µg/ml ved 24 ±3°C. Den krystallinske fri baseform som en suspensjon i vann eller olje har dårlig oral biologisk tilgjengelighet i dyr, spesielt fordi den er ekstremt lite løselig i disse bærere.

For utvikling av farmasøytiske formuleringer, spesielt orale
30 doseringsformer, må den aktive bestanddel ha tilstrekkelig oral biologisk tilgjengelighet. Da den fri baseform av forbindelse I ikke har noen slik biologisk tilgjengelighet, ble syreaddisjonssalter utforsket av de foreliggende oppfinnere.

En rekke vanlig brukte syreaddisjonssalter så som hydrokloridet, benzensulfonatet, metansulfonatet, p-toluensulfonatet, fosfatet, nitrattet, 1,2-etandisulfonatet, isetionatet og sulfatet ble evaluert i tillegg til bisulfatet ifølge foreliggende oppfinnelse. Alle disse salter i sin krystallinske form viste lavere vandig løselighet (1-3 mg/ml eller mindre ved $24 \pm 3^\circ\text{C}$) enn bisulfatet som hadde en løselighet under de samme betingelser på ca. 4-5 mg/ml.

Fast-fase-transformasjon ble observert når de andre syreaddisjons-salter nevnt ovenfor ble oppslemmet i vann, sannsynligvis på grunn av deres dissosiasjon under dannelse av den fri base. I de fleste tilfeller fulgtes denne transformasjonen av geldannelse. Til forskjell fra de andre saltene nevnt ovenfor, 10 forhindrer det ekstra protonet i bisulfatsaltet omdannelsen i den fri base, hvilken, som nevnt ovenfor, er meget uløselig i vann og har dårlig oral biologisk tilgjengelighet. De uvanlige løselighetsegenskapene til bisulfatet i vann er videre anskueliggjort i det følgende.

15 Generelt kan omdannelse av salter til den ikke-ioniserte form eller motsatt vei forklares på grunnlag av pH-løselighetsteori. Løseligheten av den fri base i vann ble bestemt som en funksjon av pH ved $24 \pm 3^\circ\text{C}$ og er vist nedenunder. Den pH ved hvilken forbindelsen viser den høyeste løselighet er referert til som pH_{maks} og ble funnet å være ca. 1,2. Det er blitt rapportert i litteraturen at ved $\text{pH} > \text{pH}_{\text{maks}}$ 20 av en svakt basisk organisk forbindelse er likevektsfastfasen i en vandig suspensjon av forbindelsen den fri base. Ved $\text{pH} < \text{pH}_{\text{maks}}$ går likevektsfast-stoffet over i den tilsvarende saltform. Uttrykket "likevektsfastfase" refererer til det ikke-oppløste eller overskudd av faststoff i en suspensjon av forbindelsen i vann etter tilstrekkelig ekvibreringstid. Når et salt av en svak base ekvibreres i vann i en 25 mengde som overskrider dens løselighetsgrense (dvs. en suspensjon av salt i vann), kan den resulterende pH i suspensjonen falle på hver side av pH_{maks} avhengig av syrens styrke blant andre faktorer. Når den resulterende pH er større enn pH_{maks} , går det oppslemmede faststoff over i den fri base.



I

Undersøkelser utført med metansulfonat og hydrokloridsalter spesielt, av den fri base bekreftet de ovenfor beskrevne generelle resultater som er rapportert i litteraturen. Mengder i overskudd av løseligheten av disse salter ble ekvibrert i vann ved $24 \pm 3^\circ\text{C}$ i minst 24 timer. pH i suspensjonen etter ekvibrering var $2,1 \pm 0,1$, som er større enn pH_{maks} . De uløste faststoffer fra disse suspensjoner ble isolert, lufttørket og karakterisert. Ved termisk og element-analyse ble de uløste faststoffer fra disse suspensjoner identifisert som den fri base. Denne egenskap ble forventet basert på pH-løselighetsprofilen som er vist i kurven ovenfor og undersøkelsene som er rapportert i litteraturen.

Når en overskuddsmengde av bisulfatsaltet ble ekvibrert i vann, opptrådte en modifikasjon i den faste fase i likevekt med løsning. Imidlertid var den uløste, faste fase etter ekvibrering ikke den fri base, selv om pH ($1,9 \pm 0,2$) av suspensjonen var større enn pH_{maks} og sammenlignbar med pH i suspensjonene av metansulfonat og hydrokloridsaltene beskrevet ovenfor. Den faste fase, etter minst 24 timers ekvibrering, ble identifisert ved elementanalyse som en hydratisert form av 2:1 salt av den fri baseform og svovelsyre (referert til som sulfatsaltet). Denne egenskapen til bisulfatsaltet er uventet basert på pH-løselighetsteorien.

Når en overskuddsmengde av sulfatsaltet igjen ble ekvibrert i vann, opptrådte en modifikasjon i den faste fase i likevekt med løsning. Det uløste

faststoffet fra denne suspensjonen ble isolert, lufttørket og karakterisert. Termisk og elementanalyse av denne uløste fastfase liknet på den fri basens, selv om omdannelsen av sulfatsaltet til den fri basen ikke var så definitiv som for metansulfonat- og hydrokloridsaltene. Fra et farmasøytisk synspunkt er saltenes tendens til å omdannes til den fri base i et vandig miljø ikke ønskelig på grunn av den lave orale biologiske tilgjengeligheten til den fri base. Således var bisulfatsaltet på grunn av sine enestående løselighetsegenskaper i vann, uventet overlegent.

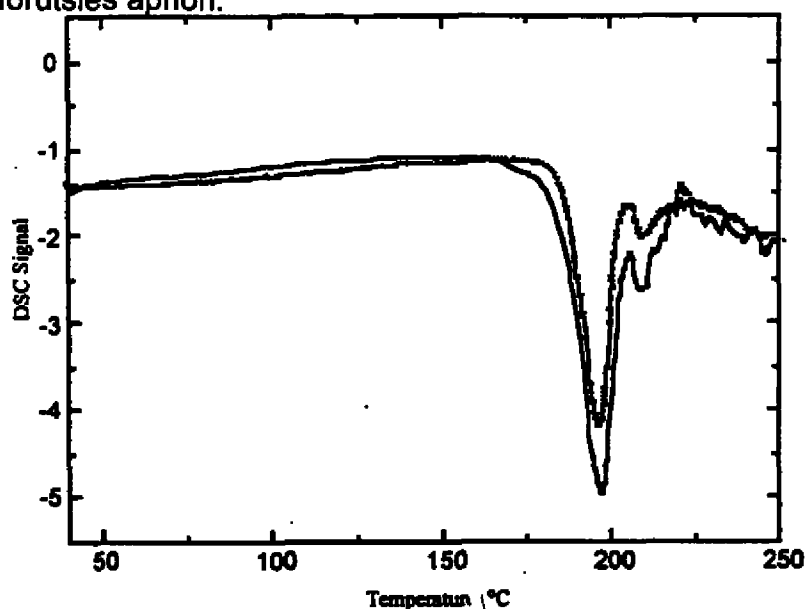
Løselighetsegenskapene til bisulfat i vann var også uventet i betraktning av samvirke av forbindelse i fri base og svovelsyre i vann. Løselighetsegenskapene til bisulfatsaltet i vann var også uventet i betraktning av samvirke av forbindelse i fri base og svovelsyre i vann. For eksempel viste den fri base en løselighet på mindre enn 1 mg/ml i vann ved pH på ~1,8 justert med svovelsyre, sammenlignet med 4-5 mg/ml løselighet av bisulfatsaltet i vann ved sammenlignbare pH-betingelser. Basert på pH-løselighetsteori, forventes den fri base og saltet å vise lignende løselighet ved en gitt pH.

De økede løselighets/oppløselighets-egenskaper av bisulfatet bidrar til dets bedre orale biologiske tilgjengelighet hos dyr i forhold til den fri base.

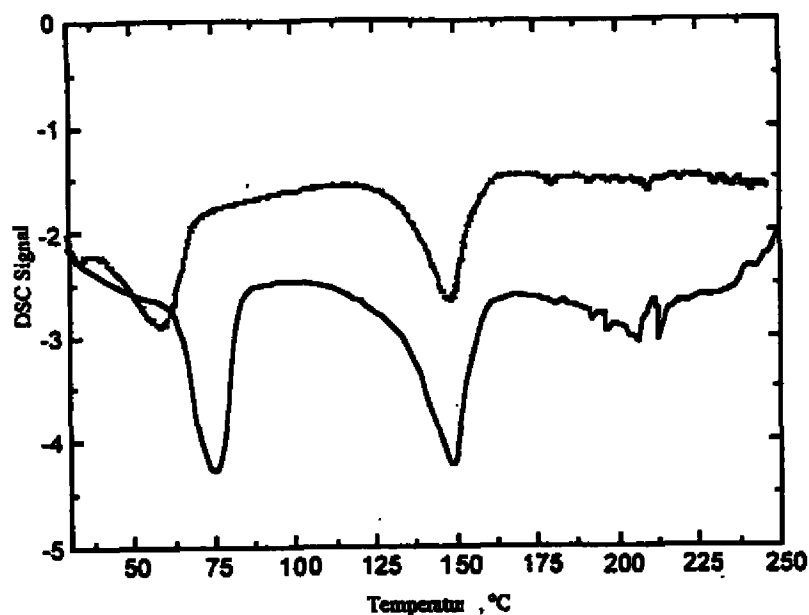
Den absolute orale biologiske tilgjengelighet av bisulfatsaltet ble funnet å være ca 20% hos hunder, og når de administreres i ikke-formulert fast form plassert i en gelatinkapsel. Til sammenligning, hadde den krystallinske fri base minimal oral biologisk tilgjengelighet i hunder.

I tillegg til den optimale løselighet, er tilfredsstillende fysisk stabilitet i fast tilstand en annen ønskelig egenskap hos farmasøytiske saltformer. Uttrykket "fysisk stabilitet" indikerer saltets evne til å bibeholde sin krystallstruktur (inneholdende eventuelle krystalliseringsløsningsmidler) under lagrings/stress-betingelser. Lignende forandringer i den fysikalske natur av saltformen som indikert ved termiske metoder, så som "differential scanning calorimetry" er uønsket. Bisulfatsaltet viste fremragende fysisk stabilitet i fast tilstand ved lagring ved 40°C/75% relativ fuktighet (RH) i så lenge som 9 måneder som vist i lla nedenfor. "Differential scanning calorimetry" avslørte ingen signifikante forandringer i de termiske egenskapene til den stressede prøve av bisulfatsaltet

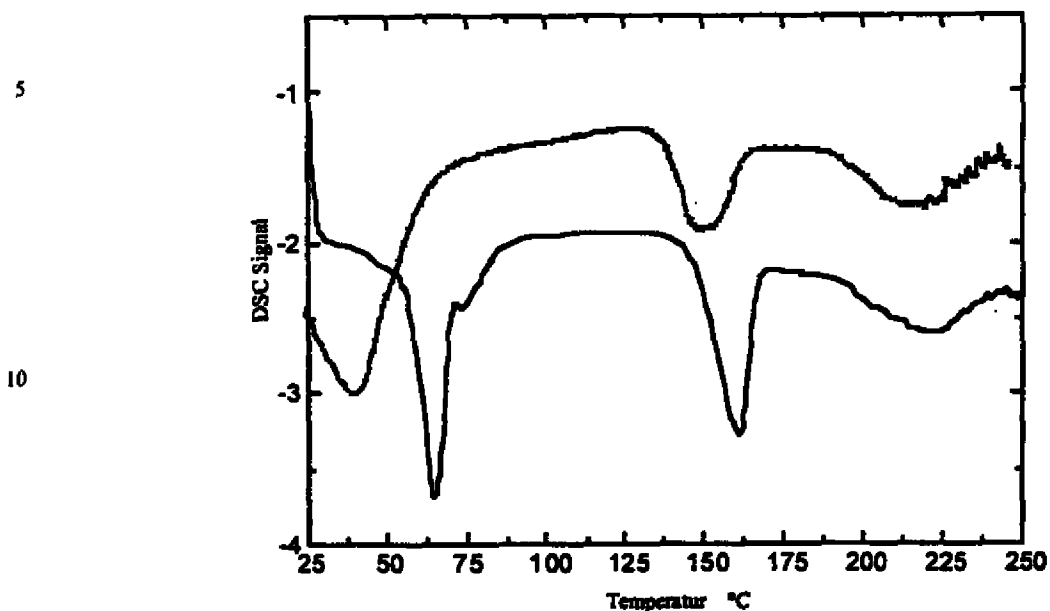
sammenlignet med en ikke-stressert prøve (lagret ved 2-8°C i en lukket beholder). Metansulfonatet, hydrikloridet og sulfatsaltene derimot, viste signifikante forandringer i sine termiske egenskaper ved lagring ved 40°C/75% RH i så kort tid som 2 uker, som vist i lib, c og d. Skjønt forskjeller i fysikalsk stabilitet av saltformer ikke er uvanlige, kan ikke et spesielt salts tendens til å danne solvater (eller krystallmodifikasjoner) og dets evne til å beholde krystalliseringsløsningns- midlet (den fysikalske stabilitet av krystallmodifiseringer) under lagrings-/stress- betingelser forutsies apriori.



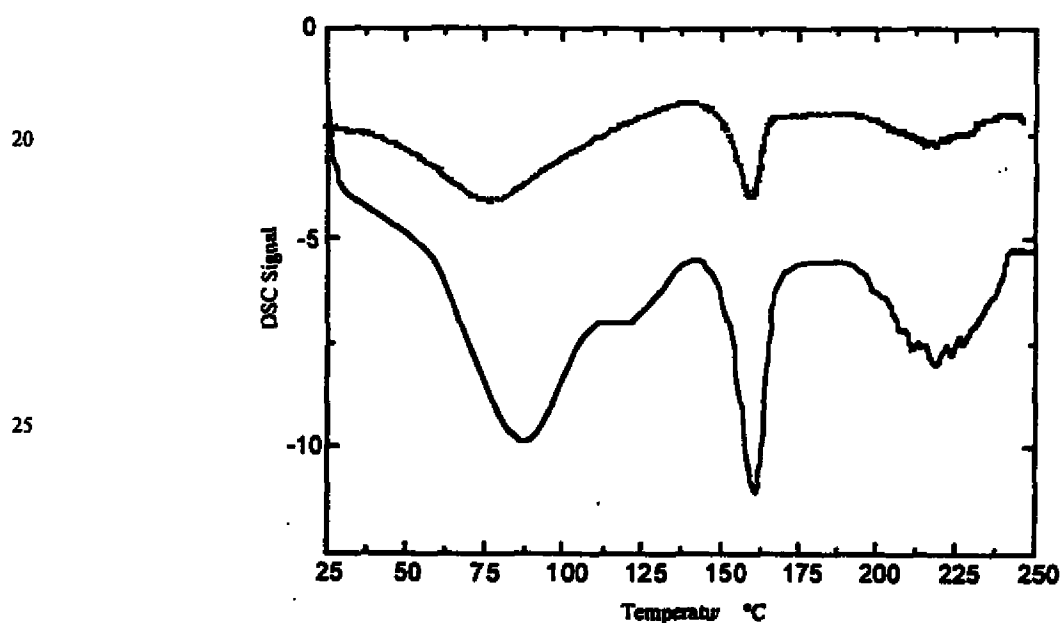
Ila. Fysikalsk stabilitet av bisulfatsaltet. Den heltrukne linje representerer det ikke-stressede materialet. Den hakkede linje representerer materialet stresset ved 40°C/75% RH i 9 måneder.



IIb. Fysikalsk stabilitet for hydrokloridsaltet. Den heltrukne linje representerer det ikke-stressede materialet. Den hakkede linje representerer materialet stresset ved 40°C/ 75 % RH i 2 uker.



15 IIc. Fysikalsk stabilitet for metansulfonatsaltet. Den heltrukne linje representerer ikke-stresset materiale. Den hakkede linje representerer materiale stresset ved 40°C/75% RH i to uker.



30 II d. Fysikalsk stabilitet for sulfatsaltet. Den heltrukne linje representerer ikke-stresset materiale. Den hakkede linje representerer materialet stresset ved 40°C/75% RH i to uker.

Bisulfatsaltet kan fremstilles ved å danne en løsning av fri base av forbindelse I med svovelsyre i løsningsmidler så som acetonitril, isopropanol, etanol eller aceton, og deretter isolere det derved produserte bisulfatsalt.

På grunn av dets høye biologiske tilgjengelighet samt dets gode
5 krystallinitet og stabilitet, er bisulfatsaltet meget anvendelig ved fremstilling av orale doseringsformer av forbindelse I. Eksemplene som følger illustrerer fremstilling av representative orale formuleringer.

Bisulfatsaltet og formuleringer derav anvendes som beskrevet i WO97/40029 for behandling av sykdommer forårsaket av virus, spesielt retrovirus
10 så som HIV-viruset.

BESKRIVELSE AV SPESIFIKKE UTFØRELSESFORMERM

Eksempel 1

15 Fremstilling av bisulfatsalt fra etanol

Til en 500 ml tre-halset rundkolbe utstyret med en rører på oversiden og dråpetrakt, sattes 15,013g (0,0213 mol) fri base forbindelse I og 113 ml 200 proof etanol under røring. Til denne suspensjonen sattes 1,28 ml konsentrert svovel-
20 syre dråpevis over 90 sekunder. Etter tilsetning av svovelsyre, oppnåddes en klar, ravfarget løsning. Løsningen ble filtrert ved bruk av #1 Whatman filterpapir og vasket med 5 ml 200 proof etanol. Til denne løsningen sattes 58 ml heptan og 37,5 mg (0,25 vekt%) podingskrystaller av forbindelsen med formel II, etterfulgt av 55 ml ytterligere heptan. Den resulterende blanding ble rørt i 6 timer ved 300
25 opm. Den resulterende krystallinske oppslemming ble filtrert og vasket med 50 ml etanol/heptan (1:1) løsning og tørket under vakuum ved 60°C natten over, hvilket ga 15,11 g av det ønskede krystallinske bisulfatsalt (88,4 mol% utbytte) med formel II ovenfor.

Karakteriserende egenskaper for bisulfatsaltet

Anal. Ber. for $C_{38}H_{52}N_6O \cdot 1,0 H_2SO_4$: C, 56,84; H, 6,78; N, 10,37; S, 3,99.

Funnet: C, 56,72; H, 6,65; N, 10,41; S, 3,83.

5 smp: 195,0°C.

$H_2O = 0,28\%$ (KF).

Eksempel 2

Fremstilling av bisulfatsalt fra aceton

10 5M H_2SO_4 (8,52 ml, 42,6 mm) ble satt dråpevis til en suspensjon av den fri baseforbindelse med formel I (30,0 g, 42,6 mm) i aceton (213 ml), rørt mekanisk i et 50°C oljebak. En klar oppløsning med oppnådd nesten umiddelbart.

Løsningen ble podet med krystaller av den fri baseforbindelse med formel II. Atter to minutter ble en felling dannet som ble en pasta. Blandingen ble rørt ved 50°C i

15 1 time, og ved 25°C i 30 minutter og ved 0°C i 2 timer. Det faste stoff ble filtrert, og det første filtratet ble brukt til å overføre det gjenværende materialet i kolber til filt-trakten. Produktet ble vasket med aceton, deretter heptan, og dørket under vakuum over natten, hvilket ga 31,48 g (korrigert utbytte 92%) av bisulfatsaltet med formel II, smp. 198-199 °C spaltning.

20

Anal. Kalkulert. $C_{38}H_{52}N_6O_7 \cdot 1,0 H_2SO_4 \cdot 0,2 H_2O$: C, 56,59; H, 6,80; N, 10,42; S, 3,98; H_2O , 0,45.

Funnet: C, 56,66; H, 6,78; N, 10,50; S, 4,20; H_2O , 0,45 (KF).

25

Eksempel 3

Fremstilling av bisulfatsalter fra isopropanol

Vandig svovelsyre (5,0 M, 0,20 ml, 1 mM) ble satt til en suspensjon av den fri baseforbindelse med formel I (0,704 g, 1,00 mM) i isopropanol (4,0 ml) avkjølt i et isbad. Isbadet ble fjernet og blandingen rørt ved romtemperatur.

30 Suspensjonen var gått i løsning etter 15 minutter. Løsningen ble podet med krystaller fremstilt som i Eksemplene 1 eller 2 ovenfor og rørt i 5 timer. Det faste stoff ble filtrert, og filtratet ble brukt til å overføre det faste stoff fra kolben til

trakten. Produktet ble vasket med heptan og tørket under vakuum, hvilket ga 0,752 g krystallinsk bisulfatsalt med formel II, utbytte 90%. smp. 160-190°C, spaltning.

Anal. Beregnet for $C_{38}H_{52}N_6O_7 \cdot 1,0, H_2SO_4 \cdot 2,0 H_2O$; C, 54,40; H, 6,97; N, 10,02; S, 3,82; H_2O , 4,29.

Funnet: C, 54,25; H, 6,73; N, 10,02; S, 3,67; H_2O , 4,53 (KF).

Krystallene som oppnåddes fra isopropanol viste et forskjellig røntgenpulverdiffraksjonsmønster fra krystallene oppnådd fra acetonitril, etanol-heptan eller aceton. De er referert til som Type-II krystaller. Type-I-krystaller viser seg å være et vannfritt, desolvatisert krystallinsk materiale, mens Type-II-krystaller er en hydratisert, hygroskopisk krystallinsk form.

Eksempel 4

15 Fremstilling av kapselformuleringer av bisulfatsalt

A. Kapsler (50 og 200 mg fri base-ekvivalent).

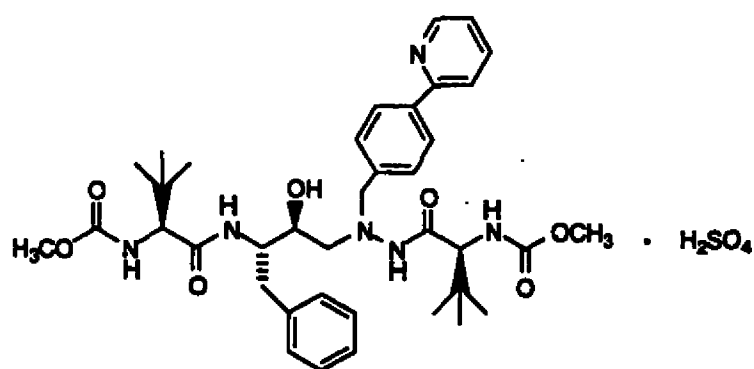
Kapsler tilveiebringes for oral administrering, hvori kapselen har en størrelse # 0, grå, opak, hardgelatinkapsel inneholdende bisulfatsaltet av formel II formulert som et vått granulat med laktose, krospovidon og magnesiumstearat.

B. Kapsler (100 mg fri base-ekvivalent)

Kapsler fremstilles for oral administrering, hvori kapselen er en størrelse # 0, grå, opak, hardgelatinkapsel inneholdende bisulfatsaltet med formel II oppslemmet i Gelucire 44/14. Gelucire 44/14 er et mettet polyglykolisert glycerid inneholdende mono- gi- og triglycerider og mono- og di -fettsyreestere av polyetylenglykol. Kapsler fremstilles ved å smelte Gelucire 44/14 ved 45-70°C etterfulgt av tilsetning av bisulfatsaltet under røring. Den smeltede blanding fylles i hardgelatinkapsler og får avkjøles og størkne.

Patentkrav

1. Bisulfatsalg, karakteriseret ved formelen

**II**

2. Farmasøytisk doseringsform, karakteriseret ved at den omfatter bisulfatsaltet ifølge krav 1 og en farmasøytisk akseptabel bærer.