

**UNIVERZITA PARDUBICE**

**FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ**

***ÚSTAV ORGANICKÉ CHEMIE A TECHNOLOGIE***

STUDIUM STABILITY ANTIKOAGULANCIA DABIGATRANU  
V KYSELÉM A BAZICKÉM PROSTŘEDÍ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

AUTOR PRÁCE: Veronika Hladíková

VEDOUCÍ PRÁCE: Doc. Ing. Jiří Hanusek, Ph.D.

2012

**UNIVERSITY OF PARDUBICE**

**FAKULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY**

***INSTITUTE OF ORGANIC CHEMISTRY AND TECHNOLOGY***

STUDY OF STABILITY OF ANTICOAGULANT DABIGATRAN IN ACID  
AND ALKALINE MEDIUM

BACHELOR WORK

AUTHOR: Veronika Hladíková

SUPERVISOR: Doc. Ing. Jiří Hanusek, Ph.D.

2012

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2011/2012

## **ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE**

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Veronika Hladíková**  
Osobní číslo: **C09229**  
Studijní program: **B2830 Farmakochemie a medicínální materiály**  
Studijní obor: **Farmakochemie a medicínální materiály**  
Název tématu: **Studium stability antikoagulancia Dabigatranu v kyselém a bazickém prostředí.**  
Zadávací katedra: **Ústav organické chemie a technologie**

### **Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :**

1. Proveďte literární rešerši týkající se přípravy a použití antikoagulancia Dabigatranu.
2. Charakterizujte produkty hydrolýzy Dabigatranu v kyselém a bazickém prostředí.
3. S využitím kinetických metod sledujte hydrolýzu Dabigatranu.
4. Získané experimentální výsledky diskutujte a spolu s literární rešerší zpracujte formou závěrečné zprávy.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Všechna dostupná chemická literatura.**

Vedoucí bakalářské práce:

**doc. Ing. Jiří Hanusek, Ph.D.**

Ústav organické chemie a technologie

Datum zadání bakalářské práce:

**24. února 2012**

Termín odevzdání bakalářské práce:

**22. června 2012**



prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.

děkan

L.S.



prof. Ing. Miloš Sedlák, DrSc.

vedoucí katedry

V Pardubicích dne 24. února 2012

## **Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 22. června 2012

Veronika Hladíková

## **Poděkování**

Na tomto místě bych chtěla poděkovat svému vedoucímu panu Doc. Ing. Jiřímu Hanuskovi, Ph.D za odborné vedení, všestrannou pomoc a trpělivost, kterou mi věnoval, při vytváření této práce.

Dále děkuji své rodině a přátelům, kteří mi byli oporou nejen při studiu.

## **Souhrn**

První část této bakalářské práce se zabývá literární rešerší popisující vlastnosti léku na srážení krve Dabigatran etexilátu a jeho farmakologicky aktivní formy Dabigatranu. Dále je popsán mechanismus srážení krve, vlastnosti léku, jeho farmakokinetické parametry a jeho příprava.

Druhá, experimentální část, popisuje sloučeniny vzniklé alkalickou a kyselou hydrolýzou. Bylo zjištěno, že hlavní hydrolytické produkty vznikají štěpením esterové a karbamátové vazby Dabigatran etexilátu. V menší míře se uplatňuje i štěpení amidické vazby. Kinetickým pokusem bylo prokázáno, že uvedené hydrolytické procesy jsou velmi pomalé – vyžadují min. 24 hod. při laboratorní teplotě – a svědčí tak o vysoké stabilitě Dabigatranu.

## **Klíčová slova**

Hemokoagulace, proléčivo, dabigatran, dabigatran etexilát

## **Summary**

The first part of the bachelor work describes properties of the anticoagulant drug Dabigatran etexilate and its pharmaceutically active form Dabigatran, mechanism of blood clotting, pharmacokinetics parameter and preparation of this drug.

The second experimental part describes compounds produced by alkaline and basic hydrolysis. It was found that major hydrolytic products are generating by fission ester and carbamate bind of Dabigatran. The destruction of amidine bind is applied in a lesser extent. It was proven by kinetic experiment that hydrolytic processes are very slow – they require at least 24 hours at room temperature – and testify to the high stability of Dabigatran.

## **Key word**

Coagulation, prodrug, dabigatran, dabigatran etexilate



## Obsah

1)	Úvod.....	10
2)	Historie.....	11
3)	Mechanismus srážení krve.....	13
4)	Dabigatran .....	16
4.1	Fyzikálně-chemické vlastnosti.....	16
4.2	Charakteristika .....	17
4.3	Farmakokinetika.....	18
4.4	Dávkování.....	19
4.5	Indikace .....	19
4.6	Kontraindikace .....	19
4.7	Lékové interakce .....	20
4.8	Opatření .....	20
4.9	Klinické studie .....	20
5)	Příprava Dabigatranu a Dabigatran etexilátu .....	22
5.1	Příprava podle původního patentu WO 9837075.....	22
5.2	Modifikovaná příprava podle patentu WO2009111997A1 .....	24
5.3	Příprava využívající chránící oxaldiazolovou skupinu .....	25
6)	Stabilita Dabigatranu v kyselém a bazickém prostředí.....	27
7)	Experimentální část .....	28
7.1	Rozklad Dabigatran etexilátu ve vodně-ethanolickém roztoku $K_2CO_3$ .....	28
7.2	Rozklad Dabigatran etexilátu ve vodně-ethanolickém roztoku NaOH .....	28
7.3	Rozklad Dabigatran etexilátu ve vodně-ethanolickém roztoku HCl .....	29
7.4	Měření NMR spekter.....	29
7.5	Kinetická měření .....	29
7.6	Měření HPLC-MS.....	29
8)	Výsledky a diskuse .....	30
8.1	Reakce s vodně-ethanolickým roztokem uhličitanu draselného .....	30
8.2	Reakce s vodně-ethanolickým a vodným roztokem hydroxidu sodného .....	33
8.3	Reakce s kyselinou chlorovodíkovou .....	34
8.4	Kinetická měření .....	35
8.5	Závěr.....	36
9)	Literatura: .....	37

# 1. Úvod

Dabigatran – léčivo snižující srážení krve

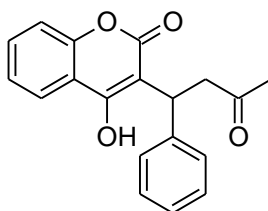
Na krvácení následkem poranění reaguje organismus uzavřením rány v cévách. Tento proces má několik fází. Trombocyty (krevní destičky) se nahromadí jako zátka v místě poškození stěny cévy. Trombocyty uvolňují látky, které aktivují faktory krevního srážení. Tyto faktory spolu s vitamínem K v krvi působí na látku fibrinogen (protein rozpustný v plazmě) a mění ho na nerozpustný protein fibrin. Vlákna fibrinu se zaplétají do trombocytové zátky a vytvářejí krevní sraženinu. Po zahojení rány je vzniklá sraženina rozpuštěna pomocí enzymu plazminu (fibrinolýza).

S těmito procesy mohou být spojeny některé poruchy jako je například nekontrolovatelné vytváření krevních sraženin (trombóza), které může zabránit přístupu krve k životně důležitým orgánům. Tromboembolické nemoci jsou považovány za hlavní příčinu úmrtnosti na světě<sup>1,2</sup>, a proto antitrombotické terapie hrají důležitou roli v prevenci a léčbě tromboembolických poruch.<sup>3</sup>

Jedním z nových léčiv, používaných při antitrombotické terapii, je látka s generickým názvem Dabigatran. Dabigatran byl poprvé popsán v roce 1998 německými vědci v patentu WO 9837075.<sup>4</sup> Jako první ho uvedla na trh společnost Boehringer Ingelheim pod obchodním názvem Pradaxa® v Evropě a Austrálii, Pradax® v USA. Prodává se ve formě tvrdých tobolek s neprůhlednou vrchní částí světle modré barvy a s neprůhlednou částí krémové barvy, velikost 0, 1 nebo 2 podle gramáže (150 mg, 110 mg nebo 75 mg), plněné žlutými peletami. Vrchní část tobolky je potištěna symbolem firmy Boehringer Ingelheim, spodní část nápisem „R150“, „R110“ nebo „R75“ opět podle gramáže. Tobolky, mimo účinnou látku, obsahují také řadu pomocných látek jako je kyselina vinná, arabská klovatina, hypromelosa, dimetikon 350, mastek a hyprolosa. Obal tobolky obsahuje keragenan, chlorid draselný, oxid titaničitý, indigokarmín, oranžovou žluť, hypromelosu a čištěnou vodu.<sup>5</sup>

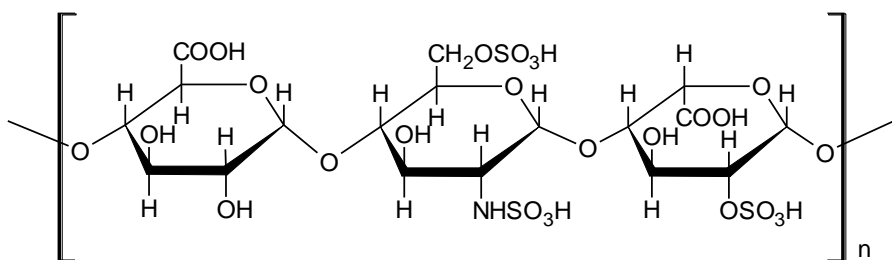
## 2. Historie

Prvními přípravky používanými ke snížení srážlivosti krve při léčbě kardiovaskulárních a tromboembolických chorob byly po více než 50 let hepariny a antagonisté vitamínu K, jako je warfarin.<sup>6-8,10</sup> Jejich užívání je spojeno s několika klinickými nedostatky. Warfarin (Obr. 1) je syntetický derivát kumarinu, který snižuje riziko cévní mozkové příhody u pacientů s nevalvulární fibrilací síní o 68%. Je sice velmi efektivní, ale jeho užívání je provázeno obtížemi, jako je nepředvídatelná farmakokinetika<sup>3</sup>, zpožděný nástup účinku, individuální dávkování, interakce s jídlem a léky.<sup>6</sup> Užívání warfarinu je spojováno s nadměrnou krvácivostí.<sup>6,9</sup>



Obr. 1 – Warfarin

Dalším používaným léčivem je nefrakcionovaný heparin, který se používá k prevenci a léčbě trombózy od roku 1930. Nízkomolekulární hepariny, deriváty nefrakcionovaného heparinu, byly zavedeny v Evropě v roce 1980.<sup>10</sup> Také užívání heparinu (Obr. 2) souvisí s krvácením. Protože je heparin peptidové povahy musí být podáván parenterálně<sup>2,3</sup> v ambulantních podmínkách.<sup>10</sup> Parenterální podávání je hlavní překážkou subakutní a chronické léčby tromboembolických onemocnění.<sup>2</sup>



Obr. 2 – Heparin

Tato omezení podnítila úsilí o vývoj nových antikoagulancií, které jsou účinné, bezpečné a pohodlně se užívají.<sup>6</sup> V posledním desetiletí se výzkum zaměřil na vývoj nových antikoagulancií, které by doplnily antagonisty vitamínu K.<sup>11</sup>

Nejdříve byl výzkum zaměřen na látky působící prostřednictvím cílené inhibice faktorů v koagulační kaskádě, zejména aktivovaného faktoru X (Xa). Dalším zaměřením výzkumu byly řízené inhibitory trombinu (DTIs), které byly dále zkoumány v profylaxi.<sup>12</sup> Jako první orální přímý inhibitor trombinu byl vyvinut ximelagatran<sup>1,6,10</sup>, který měl srovnatelnou účinnost s warfarinem v profylaxi žilního tromboembolismu, stejně jako v prevenci cévní mozkové příhody při fibrilaci síní. Studie však ukázaly, že je hepatotoxický.<sup>1,6,10,12</sup> Nejvíce studovaný z nových orálních přímých inhibitorů trombinu (DTIs) je dabigatran etexilát. Na rozdíl od ximelagatranu není dlouhodobé užívání spojeno s hepatotoxicitou.<sup>7</sup>

### 3. Mechanismus srážení krve

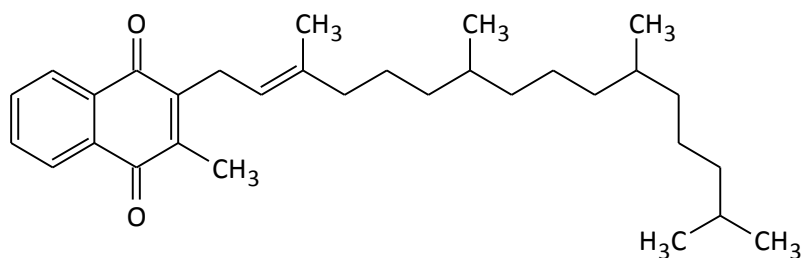
Pokud je cévní stěna neporušena, je nejdokonalejší ochranou před krvácením. Na poranění reaguje reflexním smrštěním neboli vazokonstrikcí – zabrání tím dalšímu úniku krve z poškozené části.<sup>13</sup> Při zástavě krvácení (hemostáze), ke které dochází při poranění cévy, se uplatňují tři mechanismy:<sup>14</sup>

- Reakce cévy
- Destičková zátka
- Srážení krve

Reakce cévy spočívá ve stahu hladké svaloviny stěny poraněné cévy, díky kterému se může omezit krvácení až na několik minut, v závislosti na typu poranění a průměru cévy.<sup>14</sup>

Destičková zátka dočasně uzavírá především drobnější poraněné cévy. Destičková zátka se tvoří tak, že destičky přilnou k poraněnému místu (adheze) a aktivují se<sup>13</sup>, to znamená, že začnou vysílat množství vzájemně se propojujících výběžků a uvolňovat obsah granul. Uvolňované látky podporují přilnutí dalších destiček (agregace), které vyústí ve vznik destičkové zátky.<sup>14</sup>

Srážení krve (hemokoagulace) je proces, během kterého se tekutá krev mění na nerozpustný gel (fibrin). Vyžaduje přítomnost řady srážecích faktorů.<sup>14</sup> Označují se římskými číslicemi a jejich aktivované formy označujeme přidáním malého a.<sup>13</sup> Je jich celkem 13, 12 z nich se nachází trvale v krevní plazmě v neaktivované formě. Faktory se tvoří převážně v játrech, pro plnohodnotnou tvorbu některých z nich (II, VII, IX, X) je zapotřebí vitamín K (Obr. 3). Faktor III, tzv. tkáňový faktor, častěji zvaný tromboplastin, se uvolňuje z membrán poškozených tkáňových buněk a krvinek.<sup>14</sup>



Obr. 3 – Vitamín K

Podstatou srážení krve je přeměna plazmatické bílkoviny fibrinogenu ve vláknitý fibrin, ke které dochází v kaskádě postupně se aktivujících chemických enzymatických reakcí, nezbytná je přítomnost  $\text{Ca}^{2+}$ .<sup>14</sup>

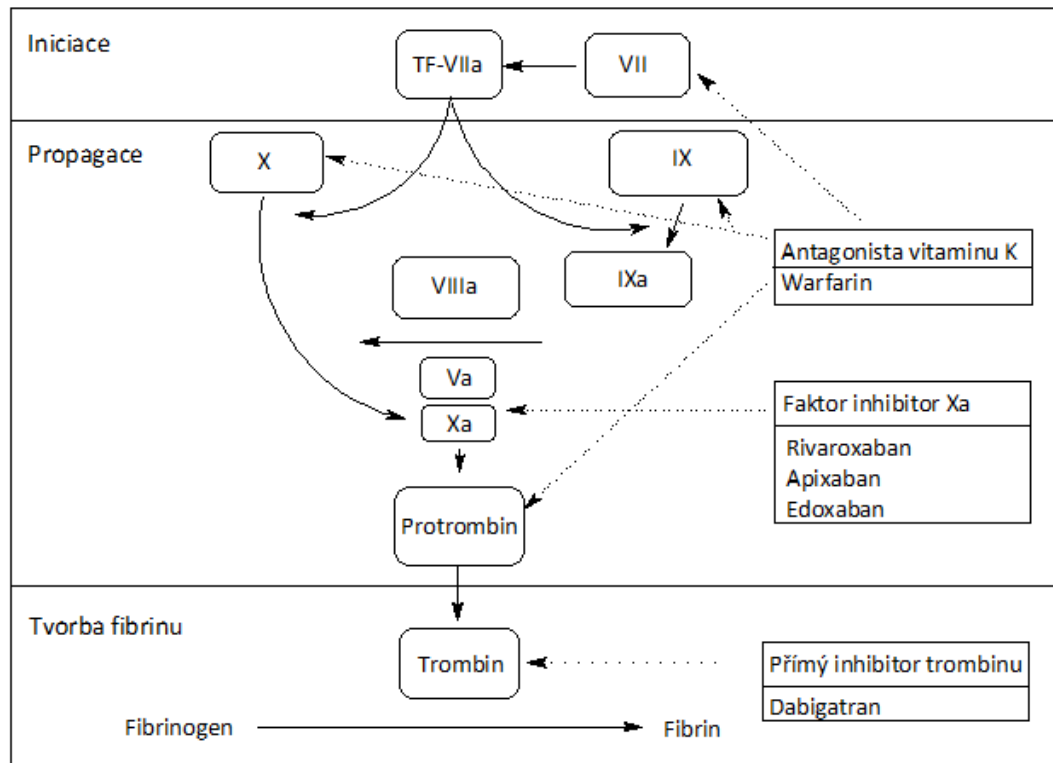
U zdravého člověka zabraňuje normálně probíhající hemostáza vzniku krvácení a krevním ztrátám. Přitom je třeba rozlišovat mezi primární a sekundární hemostázou. Pod pojmem primární hemostáza rozumíme zástavu menších krvácení vlivem vazokonstrikce a ucpáním defektu cévní stěny trombocyty. Sekundární hemostáza je charakterizována tvorbou fibrinových sraženin v důsledku činnosti exogenního a endogenního koagulačního systému.<sup>15</sup>

Plazmatické faktory, které se podílejí na srážení krve, mohou být aktivovány ve vnitřním systému na negativně nabitých površích (fosfolipidy trombocytů), nebo v zevním systému za účasti tkáňové trombokinázy. Obě cesty aktivují koagulační faktor X na faktor Xa. Následně vzniklý trombin působí na fibrinogen, který se přemění na fibrin.<sup>15</sup> Trombin je klíčový enzym hemostatických reakcí a je jediným koagulačním enzymem, který štěpí fibrinogen na fibrin.<sup>6,8,9</sup> Trombin dále aktivuje faktor XIII, jehož působení je nutné k vytvoření nerozpustného a stabilního fibrinu, vznikem kovalentních vazeb mezi fibrinovými vlákny, čímž stabilizuje fibrinovou síť.<sup>15</sup>

Aktivací kofaktorů VIII a V se koagulační kaskáda zrychluje více než  $10^5$  krát. Kontaktní aktivací na cizorodých površích, které působí jako spouštěči endogenního koagulačního systému, se intravaskulárně aktivuje srážení krve (např. aktivace hemokoagulace na ateroskleroticky změněných stěnách tepen). Exogenní koagulační systém se naproti tomu aktivuje tkáňovou trombokinázou uvolněnou při poranění (např. řezná rána, operace).<sup>15</sup>

Kvůli zachování rovnováhy organismu existují systémy, které naopak mají za úkol potlačovat vznik krevního koagula. V případě nerovnováhy se objevuje buď zvýšená tendence ke vzniku krevních sraženin, nebo naopak k projevům krvácení. Trombóza spočívá v tvorbě sraženiny uvnitř cévy, která neslouží zástavě krvácení při poranění, ale chorobně zabraňuje průtoku krve postiženou cévou (tvorba sraženiny na nesprávném místě).<sup>15</sup>

Proces zástavy krvácení, který je nezbytný v místě poranění cévy, může za chorobných podmínek proběhnout, aniž by byla céva poraněna, tj. vytvoří se sraženina na nesprávném místě a ucpáním koronární tepny vyvolá infarkt nebo ucpáním mozkové tepny záchvat mrtvice. Ve venózním řečišti se může tvorba sraženin projevovat např. jako žilní trombóza v oblasti pánve a dolních končetin, odkud hrozí nebezpečí embolie plicních tepen.<sup>15</sup>

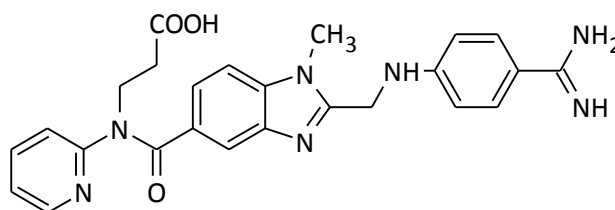
Obr. 4 – Srážení krve<sup>6</sup>

## 4. Dabigatran

### 4.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti

<b>Generický název:</b>	Dabigatran
<b>Chemický název:</b>	2-[[[4-amidinofenyl)amino]methyl]-1-methyl-1 <i>H</i> -benzimidazol-5-oyl]-2-pyridyl-3-aminopropanová kyselina
<b>CAS název:</b>	<i>N</i> -[[2-[[[4-(Aminoiminomethyl)fenyl]amino]methyl]-1-methyl-1 <i>H</i> -benzimidazol-5-yl]karbonyl]-2-pyridinyl-β-alanin
<b>CAS číslo:</b>	211914-51-1
<b>Sumární vzorec:</b>	C <sub>25</sub> H <sub>25</sub> N <sub>7</sub> O <sub>3</sub>

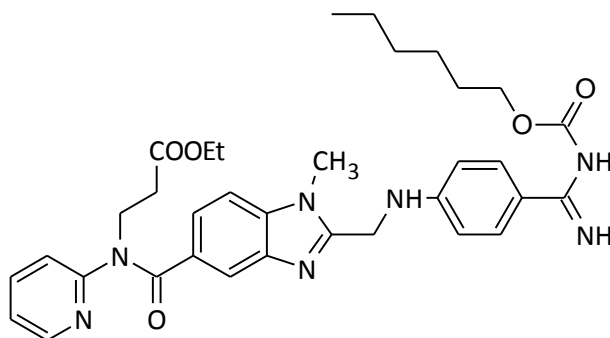
**Strukturní vzorec:**



<b>Molekulová hmotnost:</b>	471,511 g/mol
<b>Elementární analýza:</b>	C 63,68 %, H 5,34 %, N 20,79 %, O 10,18 %
<b>Barva, skupenství:</b>	Bílé krystaly
<b>Bod tání:</b>	276 – 277 °C
<b>Rozpustnost:</b>	ve vodě 1,8 mg/ml <sup>16</sup>
<b>Log P:</b>	(systém voda - oktanol) 2,4



<b>Generický název:</b>	Dabigatran etexilát
<b>Chemický název:</b>	ethyl-3-([2-[[[4-( <i>N</i> -n-hexyloxykarbonyl)karbamimidoyl]-fenylamino]methyl]]-1-methyl-1 <i>H</i> -benzimidazol-5-oyl]-2-pyridyl)amino)propanonát
<b>CAS název:</b>	<i>N</i> -[[2-[[[4-[[ <i>N</i> -(hexyloxy)karbonyl]amino]iminomethyl]fenyl]amino]methyl]-1-methyl-1 <i>H</i> -benzimidazol-5-yl]karbonyl]-2-pyridinyl-β-alanin ethyl ester
<b>CAS číslo:</b>	211915-06-9
<b>Sumární vzorec:</b>	C <sub>34</sub> H <sub>41</sub> N <sub>7</sub> O <sub>5</sub>
<b>Strukturální vzorec:</b>	



<b>Molekulová hmotnost:</b>	627,743 g/mol
<b>Elementární analýza:</b>	C 65,05 %, H 6,58 %, N 15,62 %, O 12,74 %
<b>Barva, skupenství:</b>	Bezbarvé krystaly
<b>Bod tání:</b>	128 - 129 °C <sup>17</sup>

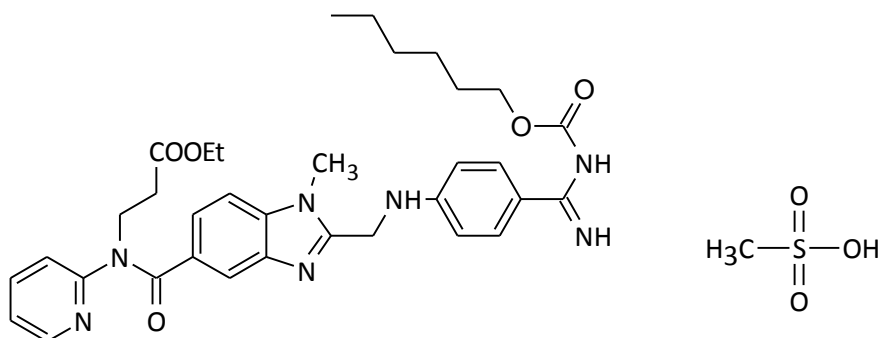
#### 4.2 Charakteristika

Dabigatran se vratně váže na aktivní enzymatickou stranu trombinu a je jeho přímým, specifickým inhibítorem (DTIs).<sup>6</sup> Inhibuje také volný trombin, trombin navázaný na fibrin a agregaci krevních destiček navozenou trombinem.<sup>9</sup>

Dabigatran je polární molekula ve formě zwitter-iontu<sup>1</sup>, která se špatně absorbuje ve střevech a po orální absorpci nemá žádnou biologickou dostupnost. Jeho lipofilita je zvýšena dvojitou esterovou funkcí.<sup>3</sup> Dabigatran etexilát je proléčivo, které je podáváno orálně, rychle se vstřebává<sup>1</sup> a po absorpci je rychle přeměňován katalyzovanou hydrolýzou v plazmě a jaterní esterázou na farmakologicky aktivní molekulu Dabigatran.<sup>6,9</sup>

Velkou výhodou je předvídatelná farmakokinetika, tudíž může být podáván bez nutnosti laboratorního monitorování. Na rozdíl od warfarinu a heparinu nemá specifické antidotum, což se může jevit jako značná nevýhoda, zvláště pokud je používán ambulantním pacientem, u kterého je těžší zajistit správné dávkování.<sup>12,18</sup>

Bylo popsáno několik solí dabigatran etexilátu, včetně methansulfonátu neboli mesylátu (Obr. 5).<sup>19</sup> Mesylát, který je farmaceuticky akceptovatelnou solí, se nejčastěji vyskytuje v krystalické formě označované jako polymorf I, která je charakterizována bodem tání 180 °C.<sup>20</sup>



Obr. 5 – Dabigatran mesylát

Polymorfismus je důležitá vlastnost některých molekul a molekulárních komplexů. V závislosti na krystalizačních podmínkách může molekula krystalovat v různých strukturách neboli polymorfech. Polymorfy mají stejný molekulární vzorec, ale odlišné fyzikální vlastnosti, jako je například bod tání a často i farmakokinetické parametry. Rozdílné fyzikální vlastnosti různých polymorfů jsou způsobeny orientací a mezimolekulárními interakcemi sousedních molekul.<sup>21</sup>

#### 4.3 Farmakokinetika

Dabigatran je eliminován primárně močí (okolo 80 %), zbytek je konjugován a vylučován žlučí.<sup>9</sup> Poločas rozpadu je po jednorázovém podání kolem 8 hodin a po opakovaném podání 14–17 hod, což umožňuje podávání jednou denně.<sup>9,10</sup> Absolutní

biologická dostupnost po perorálním podání je 6,5 %.<sup>6,9,10</sup> Vazba na plazmatické bílkoviny je nízká (35 %). Distribuční objem je 60 – 70 l.<sup>7,12</sup>

System cytochromu P – 450, který je zdrojem mnoha lékových interakcí, se neúčastní metabolismu dabigatranu<sup>1,6</sup>, proto je riziko interakcí s léky malé.<sup>12</sup>

Dabigatran se lépe vstřebává v kyselém prostředí. Byly vyvinuty nové kapsle, které obsahují malé kuličky, jejichž jádro je tvořeno kyselinou vinnou a potaženo dabigatran etexilátem. Výhodou této úpravy je, že si dabigatran etexilát přináší sebou své optimální pH na místo absorpce (tj. trávicího traktu).<sup>10</sup> Proto změny pH v žaludku nemají významný vliv na jeho absorpci<sup>11,12</sup> a to i v přítomnosti inhibitorů protonové pumpy. Jinak by došlo ke snížení absorpce o 20 – 25 %.<sup>22</sup>

#### **4.4 Dávkování**

Užívání léku je orálně jednou denně. Doporučené dávkování je 220 mg denně (2 kapsle 110 mg).<sup>9</sup> Tobolku je třeba spolknout celou a zapít trochou vody.<sup>12</sup> Přípravek může být užíván s jídlem nebo bez jídla.<sup>5,9</sup>

Při středně závažném poškození ledvin (nebo při současném užívání amiodaronu) může být dávka upravena na 150 mg denně (2 kapsle 75 mg). Po totální výměně kolenního kloubu se podává po dobu 10 dní jako prevence žilního tromboembolismu. Po totální výměně kyčelního kloubu po dobu 28 – 35 dní.

#### **4.5 Indikace**

V roce 2008 byl dabigatran etexilát schválen v EU, Velké Británii, Austrálii a Kanadě k primární prevenci žilních tromboembolií (krevních sraženin) u dospělých pacientů, kteří podstoupili elektivní náhradu kyčelního nebo kolenního kloubu.<sup>9,22</sup> V roce 2011 se začal používat také jako prevence cévní mozkové příhody a systémové embolie u dospělých pacientů s non - valvulární fibrilací síní.<sup>11,12</sup>

#### **4.6 Kontraindikace**

Kromě případů přecitlivělosti na účinnou látku, nebo kteroukoli pomocnou látku obsaženou v přípravku, je dabigatran kontraindikován při poškození ledvin (clearance kreatinu 30 mL/L). Dále při predispozici ke krvácení, orgánových lézích s rizikem krvácení, při poškození

jater a při souběžné léčbě silnými inhibitory P - glykoproteinu (např. guanidin). Neinteraguje s potravinami.<sup>9</sup>

#### **4.7 Lékové interakce**

Dabigatran interaguje s nefrakciovaným heparinem, jeho deriváty, inhibitory aktivovaného faktoru X (Xa) (např. fondaparinux), jinými inhibitory trombinu (např. desirudin) a antitrombotiky (např. clopidogrel, ticlopidine, dextran).<sup>9</sup>

Dabigatran může interagovat s inhibitory P - glykoproteinu a s některými léky, zahrnující srdeční léky amiodaron a verapamil, antibiotikem clarithromycin a antimykotiky jako je ketoconazol a itraconazol.<sup>9</sup>

#### **4.8 Opatření**

Při používání dabigatran etexilátu je nutné monitorovat krvácení a u pacientů s rizikem krvácení provádět preventivní opatření. Nejsou k dispozici adekvátní údaje o podávání přípravku těhotným ženám. Studie u zvířat prokázaly reprodukční toxicitu. Potenciální riziko u člověka je neznámé. Přípravek tedy nesmí být podáván během těhotenství a u kojících žen nebo dětí mladších 18 - ti let.<sup>9</sup>

#### **4.9 Klinické studie**

Účinnost a bezpečnost dabigatranu byla studována v několika studiích. Ve studiích *in vivo* a *ex vivo* u zvířat byla prokázána antitrombotická účinnost a antikoagulační aktivita dabigatranu po intravenózním podání a dabigatran etexilátu po perorálním podání v různých zvířecích modelech trombózy.<sup>5</sup> Byly provedeny tyto studie:

Prevence cévní mozkové příhody u pacientů s fibrilací síní

- PETRO Prevence embolických a trombotických příhod u pacientů s perzistentní fibrilací síní (z angl The prevention of embolic and thrombotic events in patients with persistent atrial fibrillation)
- RE-LY Randomizované hodnocení dlouhodobé antikoagulační léčby (z ang. Randomized evaluation of long-term anticoagulation therapy).

Prevence žilní tromboembolie (VTE) po operacích s náhradou velkých kloubů

- BISTRO I Boehringer Ingelheim study in Thrombosis I

- BISTRO II Boehringer Ingelheim study in Thrombosis II
- RE-MODEL primární prevence VTE po TKR (Evropská unie, Jižní Afrika, Austrálie)
- RE-NOVATE Primární prevence VTE po THR
- RE-MOBILIZE primární prevence VTE po TKR (Severní Amerika)

Prevence opakující se VTE

- RE-COVER léčba akutního VTE<sup>12</sup>

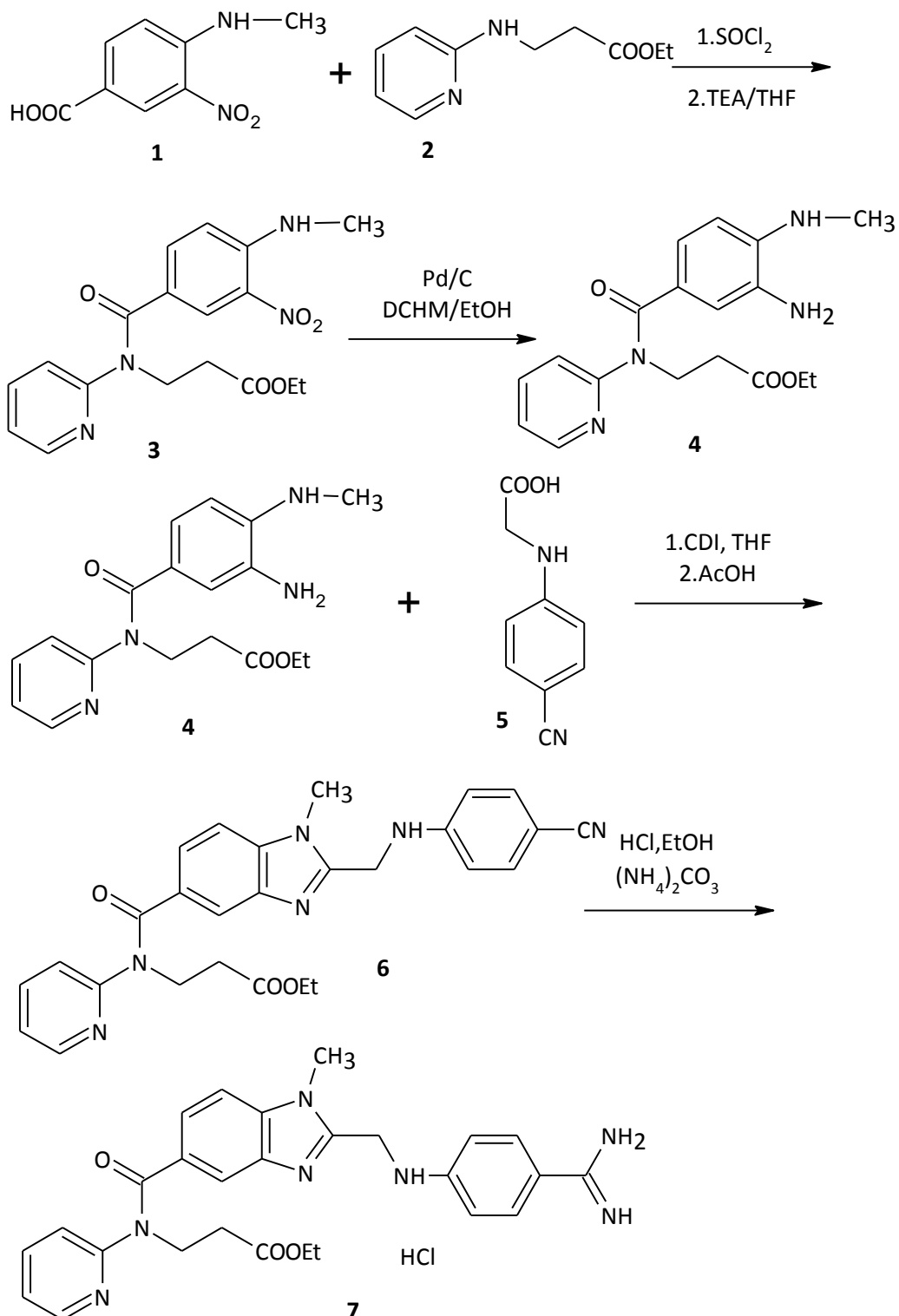
Klinický důkaz účinnosti dabigatran etexilátu pochází ze studie RE-LY, ve které byly srovnávány dvě dávky dabigatran etexilátu (110 mg a 150 mg dvakrát denně) podávané u pacientů s fibrilací síní se středním až vysokým rizikem cévní mozkové příhody a systémové embolie (ve srovnání s warfarinem). Studie RE-LY ukázala, že dabigatran etexilát v dávce 110 mg dvakrát denně není horší než warfarin v prevenci cévní mozkové příhody a systémové embolie u jedinců s fibrilací síní. Výskyt závažného krvácení byl u této dávky srovnatelný s warfarinem.<sup>5,7,23,24</sup>

Pacienti podstupující významnější elektivní ortopedické operace (v jedné studii šlo o náhradu kolenního kloubu, ve druhé o náhradu kloubu kyčelního) dostávali přípravek Pradaxa v dávce 75 mg nebo 110 mg během 1 - 4 hodin po operaci, poté v dávce 150 mg nebo 220 mg jednou denně při zabezpečené hemostáze nebo enoxaparin 40 mg den před operací a poté denně. Ve studii RE-MODEL (s náhradou kolenního kloubu) trvala léčba 6 – 10 dní, ve studii RE-NOVATE (s náhradou kyčelního kloubu) 28 – 35 dní. Primárním cílovým parametrem v obou studiích byl souhrn žilních tromboembolií a mortality z jakékoliv příčiny. Výsledky obou studií ukázaly, že antitrombotický účinek přípravku Pradaxa v dávce 220 mg a 150 mg nebyl statisticky slabší než účinek enoxaparinu, pokud jde o celkový počet žilních tromboembolií a mortalitu ze všech příčin.<sup>5,7,23,24</sup>

## 5. Příprava Dabigatranu a Dabigatran etexilátu

### 5.1 Příprava podle původního patentu WO 9837075

Příprava Dabigatranu a Dabigatran etexilátu byla poprvé popsána v roce 1998. Postup lze znázornit následujícím schématem:



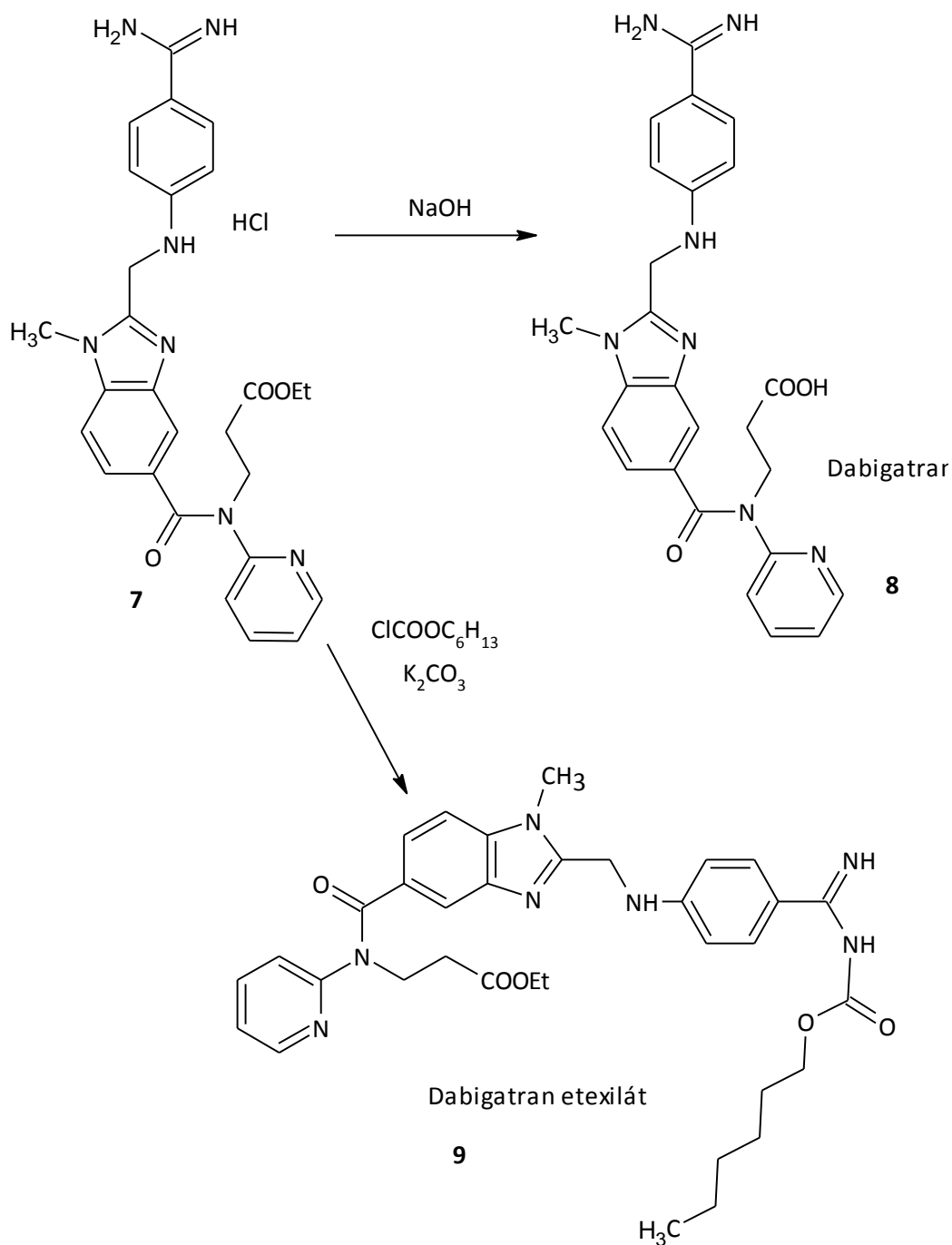


Schéma 1

V prvním stupni výroby reaguje chlorid 4-(methylamino)-3-nitrobenzoové kyseliny (**1**) s ethyl-3-(pyridin-2-yl)aminopropanoátem (**2**) v tetrahydrofuranu za použití triethylaminu jako báze. Produktem reakce je ethyl-3-[[4-(methylamino)-3-nitrobenzoyl](pyridin-2-yl)amino}propanoát (**3**).

Tato látka vzniká ve formě oleje s obsahem nečistot 20 – 40 %. Aby mohla být použita pro výrobu aktivní farmaceutické substance API (z angl. Active Pharmaceutical Ingredient), vyžaduje složité čistící operace, jako je např. chromatografie.

Dále se redukuje látka **3** na ethyl-3-[[3-amino-4-(methylamino)benzoyl](pyridin-2-yl)amino]propanoát (**4**). Redukce nitroskupiny na amino se provádí katalytickou hydrogenací za použití palladia na aktivním uhlí za vysokého tlaku. Tento postup je však technologicky velmi náročný a přináší bezpečnostní a ekologická rizika. Pracuje se za vysokého tlaku, proto je potřeba speciálního zařízení. Použité katalyzátory jsou toxické a jejich cena se negativně promítne do ekonomiky celého procesu.

V dalším kroku reaguje látka **4** s [(4-kyanfenyl)amino]octovou kyselinou (**5**) za vzniku látky **6**. Nitril rovněž vyžaduje chromatografické čištění, což lze v průmyslovém měřítku jen velmi těžko realizovat. Tento způsob čištění zatěžuje ekonomiku a má i negativní vliv na výtěžek. Poté se provádí kysele katalyzovaná adice amoniaku, jehož zdrojem je uhličitán amonný, na nitrilovou funkci.

Posledním stupněm je reakce vzniklého meziprojektu s hexylchloroformiátem za vzniku Dabigatran etexilátu.

Provedení podle WO 9837075 neumožňuje přípravu dabigatran etexilátu o vysoké čistotě, která je nezbytná u farmaceutické substance, a ve výtěžku akceptovatelném v průmyslovém měřítku. Vzhledem k těmto nedostatkům byla vyvinuta snaha o zlepšení výroby, a proto bylo popsáno mnoho dalších postupů.

## **5.2 Modifikovaná příprava podle patentu WO2009111997A1**

Tento postup<sup>25</sup> popsáný v roce 2008 se liší od původního patentu pouze v některých použitých činidlech a způsobu čištění meziprojektů. Jeho aplikací dochází k podstatnému zlepšení čistoty a výtěžků problematických kroků.

První rozdíl spočívá v převedení produktu acylace (**3**) na hydrochlorid. Tuto látku lze přechistit jednoduchou krystalizací, například ze směsi ethanol, acetonitril, což vede k produktu vysoké čistoty, často s obsahem nečistot menším než 1 %.

Potřebný chlorovodík se používá ve formě roztoku v organickém rozpouštědle. Nejvhodnější je diethylether, ale s výhodou se používají rozpouštědla z řady etherů, esterů, ketonů nebo alkoholů.

Při redukci nitroskupiny na aminoskupinu je levnějším činidlem dithioničitan sodný a reakce se provádí ve směsi rozpouštědel ethanol + voda. Není nutné pracovat za zvýšeného tlaku ani při vysoké teplotě. Postup je tedy daleko jednodušší a ekonomičtější.



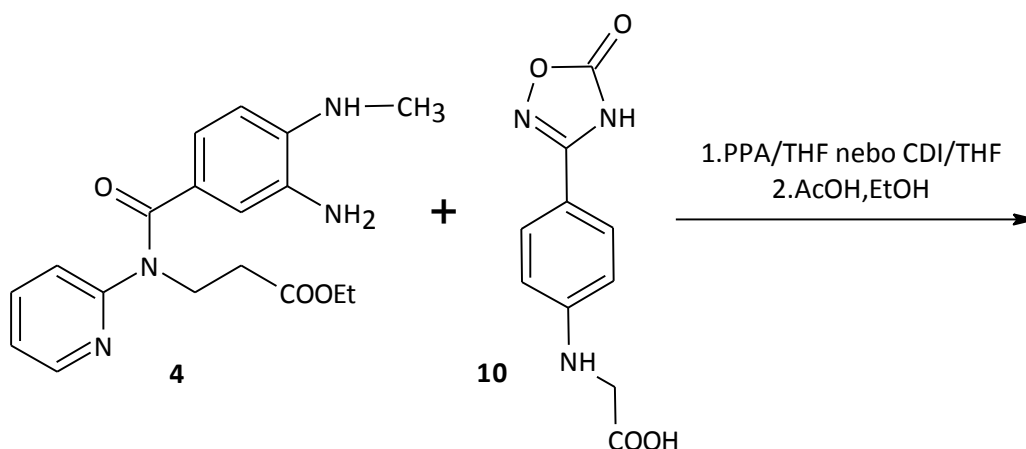
Do dalšího stupně vstupuje látka **3** ve formě hydrochloridu, což má pozitivní vliv na průběh reakce a na čistotu produktu. Touto obměnou postupu, která vede ke z kvalitnění meziprojektu, je možno získat látku **4** s minimálním obsahem nečistot (5 % nebo i méně než 1 %).

Získaný nitril **6** se převádí na sůl s kyselinou šťavelovou. Tato sůl se přečistí krystalizací z polárního protického rozpouštědla, jako je například ethanol. Takto lze nitril získat ve výtěžku 80 – 90 %, který je akceptovatelný pro průmyslovou výrobu.

Výchozí [(4-kyanfenyl)amino]octová kyselina (**5**) se připravuje reakcí 4-kyanilanilinu s kyselinou chlorooctovou za přítomnosti báze. Tento reakční krok probíhá s poměrně nízkým výtěžkem okolo 50 %. Proto byl tento postup modifikován a provádí se s kyselinou bromooctovou. Touto obměnou je dosaženo výrazně vyššího výtěžku okolo 85 - 90 %. Příčinou je pravděpodobně vyšší schopnost bromidového aniontu odstupovat při nukleofilních reakcích v porovnání s chloridovým aniontem. Tato schopnost se pak projeví při reakci 4-kyanilanilinu, který je slabým nukleofilem, s bromooctovou kyselinou na zvýšeném výtěžku reakce. Dále je možno pokračovat podle postupu popsáno v patentu WO 9837075. Celý postup zefektivní výrobu dabigatranu v průmyslovém měřítku. Výrazně se zvýší výtěžnost procesu a zjednoduší se čistící operace.<sup>25</sup>

### 5.3 Příprava využívající chránící oxaldiazolovou skupinu

Další možný postup byl popsán v roce 2006 a je na základě následujícího schématu<sup>26</sup> vycházejícího z ethyl-3-[[3-amino-4-(methylamino)benzoyl](pyridin-2-yl)amino]propanoátu (**4**) a [[4-(5-oxo-4,5-dihydro-1,2,4-oxadiazol-3-yl)fenyl]amino]octové kyseliny (**10**):



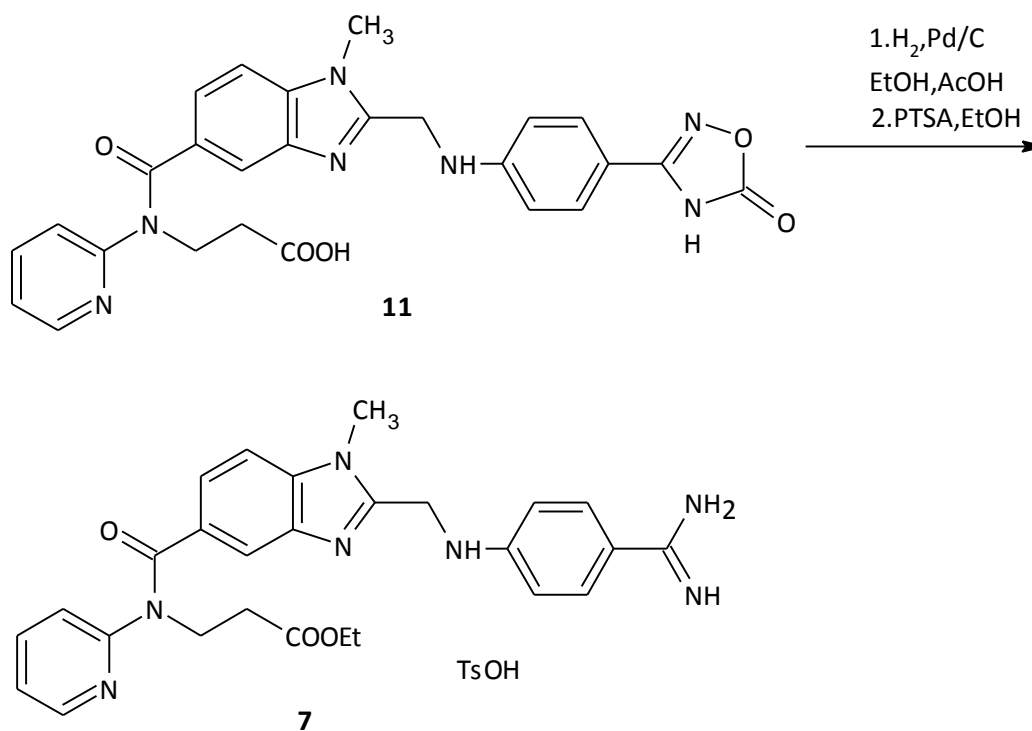


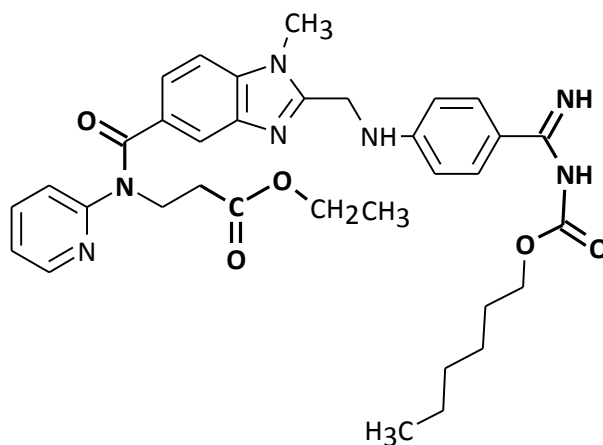
Schéma 2

Tato acylační a cyklizační reakce může být prováděna v přítomnosti 1,1'-karbonyldiimidazolu nebo polyfosforečné kyseliny v tetrahydrofuranu. V dalším kroku se používá kyselina octová v ethanolu. Takto vzniklá sloučenina se katalyticky hydrogenuje, za použití palladia na aktivním uhlí, v ethanolu jako rozpouštědla na látku **7** ve formě tosylátu. Dále se postupuje stejně jako v předchozích příkladech. Tento proces dává vysoké výtěžky a vysokou čistotu produktů bez nutnosti chromatografického čištění.<sup>26</sup>

Další přípravy dabigatranu jsou obměny původního postupu uvedeného v patentu WO 9837075, které používají podobné látky a obměňují rozpouštědla a podmínky.<sup>19,25-27</sup>

## 6. Stabilita Dabigatranu v kyselém a bazickém prostředí

Molekula Dabigatranu obsahuje několik funkčních skupin, které mohou podléhat hydrolýze. Jedná se zejména o skupinu esterovou, amidovou, amidinovou a karbamátovou.



Pro posouzení stability dabigatranu bylo zvoleno několik prostředí:

1. 1 M roztok  $K_2CO_3$                       stabilita vůči alkalické hydrolýze za mírných podmínek
2. 1 M roztok NaOH                              stabilita vůči alkalické hydrolýze
3. 1 M roztok HCl                                stabilita vůči kyselé katalyzované hydrolýze

## 7. Experimentální část

Dabigatran etexilát byl získán od společnosti Zentiva k.s..

### 7.1 Rozklad Dabigatran etexilátu ve vodně-ethanolickém roztoku $K_2CO_3$

Do 100 ml kulaté baňky bylo předloženo 0,3 g ( $4,78 \cdot 10^{-4}$  mol) dabigatran etexilátu s 20 ml 1 M vodného roztoku  $K_2CO_3$  a 20 ml ethanolu a poté mícháno 16 hod. při laboratorní teplotě. Vzniklý roztok se dělil na dvě vrstvy, které byly rozděleny na děliče. Horní vrstva byla na vakuové odparce zahuštěna odpařením ethanolu. Poté byla přelita do malé kádinky a zneutralizována 36 % kyselinou chlorovodíkovou na pH 6. Z této horní vrstvy se vysrážely žluté krystaly. Kádinka byla dána po dobu asi 1 hodiny do ledu. Poté byl zahuštěný roztok s vysráženými krystaly kvantitativně převeden do krystalizační misky a ponechán 6 dní krystalovat (k odpaření rozpouštědla). Krystaly byly extrahovány 3 × 10 ml ethanolu. Poté byl extrakt odpařen na vakuové odparce. Vniklé krystaly byly dány do exsikátoru k odpaření veškerého rozpouštědla. Poté byly krystaly zváženy. Bylo získáno 0,11 g produktu, který byl analyzován LC-MS.

Spodní vrstva byla zahuštěna odpařením zbytků ethanolu na vakuové odparce. Tento zahuštěný roztok byl neutralizován 36 % kyselinou chlorovodíkovou na pH 6. Vyloučilo se 50 mg krystalků, které byly odfiltrovány a analyzovány  $^1H$  NMR spektroskopii (Obr. 7). Filtrát byl po odfiltrování pevného podílu extrahován 3 × 10 ml chloroformu a extrakt byl po vysušení odpařen na vakuové odparce. Bylo získáno 24 mg produktu. (Obr. 8)

### 7.2 Rozklad Dabigatran etexilátu ve vodně-ethanolickém roztoku NaOH

Do kulaté baňky bylo předloženo 0,3 g ( $4,78 \cdot 10^{-4}$  mol) dabigatran etexilátu s 20 ml 1 M vodného roztoku NaOH a 20 ml ethanolu a poté mícháno 24 hod. při laboratorní teplotě. Čirý roztok byl poté neutralizován 36 % kyselinou chlorovodíkovou na pH 6, přelit do krystalizační misky a ponechán volně odpařit. Směs organických produktů a anorganických solí byla extrahována 3 × 10 ml ethanolu. Extrakt byl odpařen na vakuové odparce a vzniklé krystaly (0,10 g) byly analyzovány pomocí LC-MS.

Pokud byl rozklad prováděn pouze ve vodném NaOH (postupně se rozpouštějící suspenze), byl kromě produktů pozorovaných u předchozího pokusu izolován i nezreagovaný Dabigatran (0,13 g) a další produkt obsahující pouze fragment dabigatranového skeletu (Obr. 11).

### 7.3 Rozklad Dabigatran etexilátu ve vodně-ethanolickém roztoku HCl

Do kulaté baňky bylo předloženo 0,3 g ( $4,78 \cdot 10^{-4}$  mol) dabigatran etexilátu s 20 ml 1 M vodného roztoku HCl a 20 ml ethanolu a poté mícháno 24 hod. Roztok byl poté neutralizován hydroxidem sodným na pH 6. Po neutralizaci se vyloučily krystalky, které byly odfiltrovány na fritě a vysušeny v exsikátoru. Bylo získáno 52 mg výchozího Dabigatranu. Filtrát byl na vakuové odparce zahuštěn. Vyloučilo se 74 mg produktu. Filtrát nebyl dále zpracováván.

### 7.4 Měření NMR spekter

NMR spektra byla měřena na spektrometru Bruker Avance III 400 při frekvencích 400,13 MHz ( $^1\text{H}$ ) a 100,61 MHz ( $^{13}\text{C}$ ). Jako rozpouštědlo byl použit hexadeuterovaný dimethylsulfoxid (DMSO- $d_6$ ). Chemické posuny  $\delta_{\text{H}}$  byly vztaženy ke středům signálu multipletu rozpouštědla  $\delta_{\text{H}} = 2,50$  ppm.

### 7.5 Kinetická měření

Kinetické měření bylo provedeno na přístroji HP UV/VIS 8453 Diode Array v kyvetě tloušťky 1 cm temperované na 25 °C. Do kyvety byly pipetovány 2 ml 1 M roztoku hydroxidu sodného v 50 % vodném ethanolu a nechány 3 minuty temperovat. Po temperaci bylo do kyvety nastříknuto takové množství ethanolického roztoku Dabigatranu, aby se hodnoty absorbance nalézaly v rozmezí 0,2 – 0,8. K výpočtu pozorované rychlostní konstanty bylo použito programu KINETIKA. Pozorovaná rychlostní konstanta byla vypočtena při vlnové délce, při které docházelo k největší změně absorbance – tj. v oblasti absorpčního pásu produktu ( $\lambda = 325$  nm).

### 7.6 Měření HPLC-MS

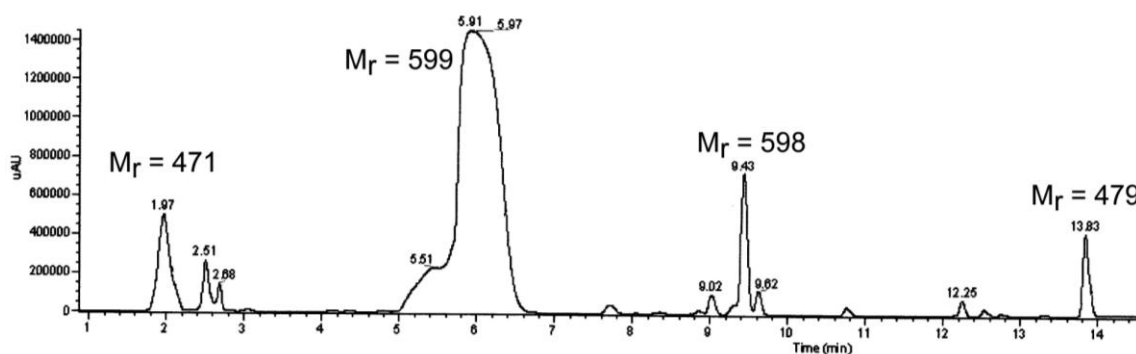
Měření HPLC-MS byla provedena na koloně Kinetex C18, 150 × 4,6 mm, 2,6  $\mu\text{m}$  mobilní fází acetonitril/vodný 0,1 M pufr (mravenčan amonný) gradientovou elucí při pH 6,3 při průtoku 600  $\mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$  a teplotě 30 °C. Detekce byla provedena UV detektorem při 230 nm. MS spektra byla změřena na přístroji LTQ Orbitrap s iontovým zdrojem. Byly snímány kladné ionty (ESI).

## 8. Výsledky a diskuse

Z důvodu nízké rozpustnosti Dabigatran etexilátu ve vodě jsem pro studium jeho stability vybrala 50 % vodný ethanol, kde je již jeho rozpustnost dostatečná a přitom se stále jedná o velmi polární rozpouštědlo podobné samotné vodě.

### 8.1 Reakce s vodně-ethanolickým roztokem uhličitanu draselného

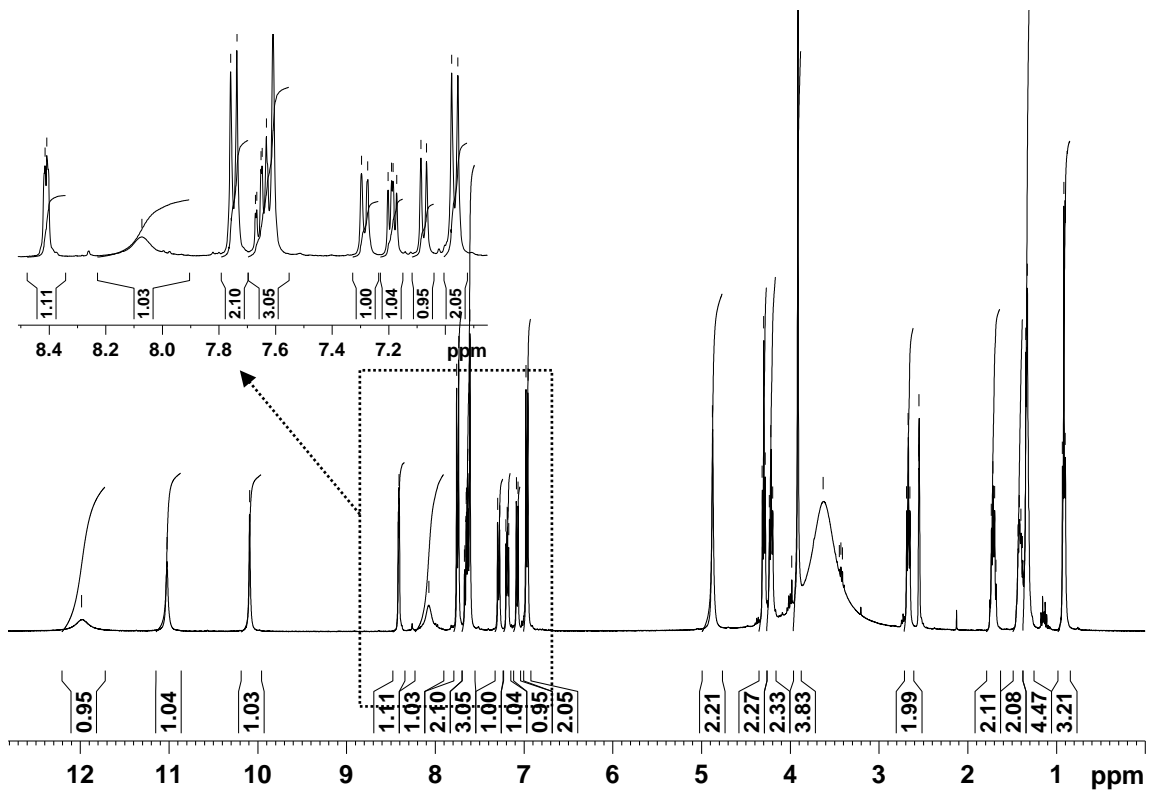
Zpracováním horní ethanolické vrstvy reakční směsi po reakci s 1 M vodně-ethanolickým uhličitanem draselným jsem získala směs produktů, které byly na pracovišti Zentivy k.s. analyzovány pomocí kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (Obr. 6).



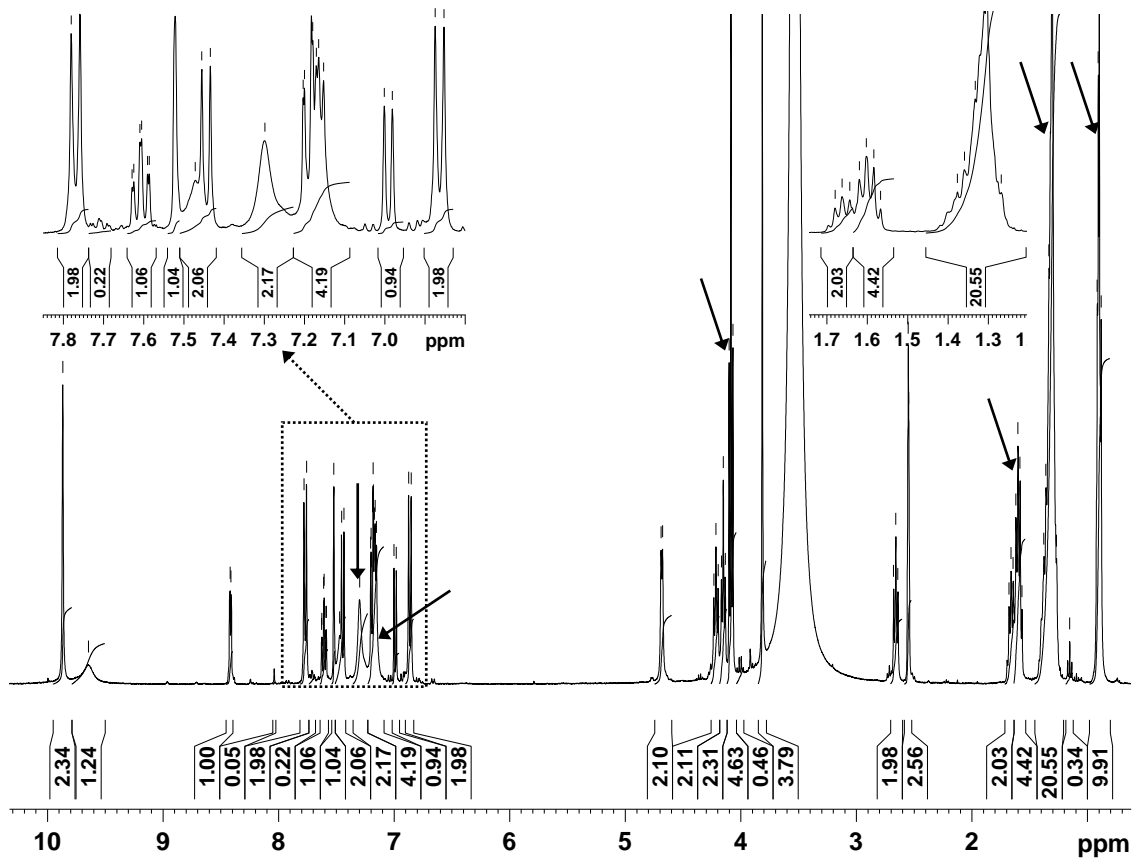
Obr. 6 – Chromatogram získaný po hydrolyze ve vodně-ethanolickém roztoku  $K_2CO_3$

Touto metodou bylo potvrzeno, že dominantním produktem rozkladu (72 % dle kapalinové chromatografie) s relativní molekulovou hmotností  $M_r = 599$  je produkt hydrolyzy esterové skupiny **12**. Minoritními složkami jsou i produkt hydrolyzy a dekarboxylace karbamátové skupiny **8** ( $M_r = 471$ , 8 % dle LC) a další dvě neznámé látky s  $M_r = 598$  a 479, jejichž strukturu se však pro jejich malé zastopení nepodařilo určit.

Spodní vodně-ethanolická vrstva obsahovala dle  $^1H$  NMR spektroskopie jednak další 50 mg podíl kyseliny **12** (Obr. 7) získané po okyselení v téměř čistém stavu a dále hexylkarbamát (cca 66 % z extrahovaných 24 mg) a další sloučeninu obsahující podobný spinový systém jako výchozí Dabigatran etexilát, avšak s poněkud odlišnými chemickými posuny jednotlivých protonů a bez dvou typických širokých singletů, odpovídajících amidinové skupině. Namísto nich je ve spektru pozorován jeden široký singlet při 9.6 ppm, který by mohl odpovídat uskupení  $-CONH-$  (Obr. 8).



Obr. 7 -  $^1\text{H}$  NMR spektrum kyseliny **12** vyloučené z vodné vrstvy po okyselení HCl.



Obr. 8 –  $^1\text{H}$  NMR spektrum podílu extrahovaného z vodné vrstvy chloroformem. Šipkou jsou označeny signály příslušející hexyl-karbamátu.

Hydrolýza esterové funkční skupiny probíhá nejspíše mechanismem BAc2 – tj. atakem rovnovážně přítomného hydroxidového iontu na karboxylátovou skupinu s následným odštěpením ethanolátového aniontu. Naproti tomu může hydrolýza karbamátové funkční skupiny probíhat buď analogickým mechanismem BAc2, anebo alternativním mechanismem E1cB. Z literatury<sup>28</sup> je známo, že O-alkyl karbamáty podléhají spíše prvnímu zmiňovanému mechanismu. Po samotné hydrolýze následuje samovolná dekarboxylace za vzniku produktu **8**. Je známo, že hydrolýza esterů probíhá mnohem rychleji, než hydrolýza karbamátů, o čemž svědčí i relativní zastoupení obou hlavních produktů v surové reakční směsi. Přítomnost hexylkarbamátu v reakční směsi ukazuje, že místem ataku hydroxidového iontu může být i uhlík amidinové skupiny.

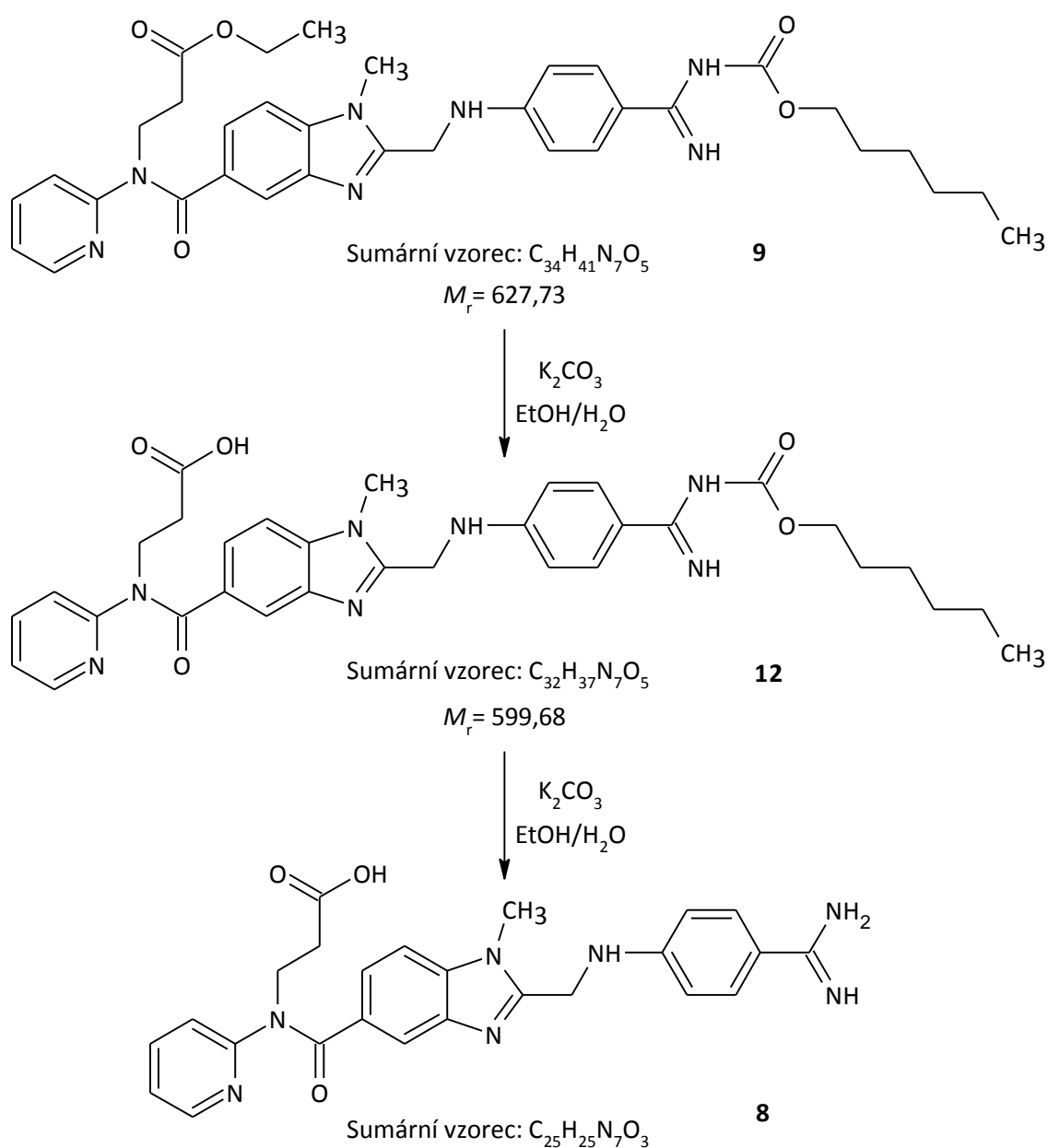
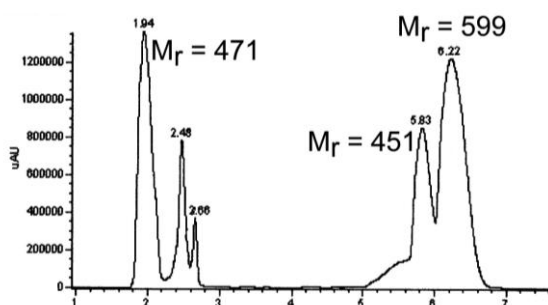


Schéma 3



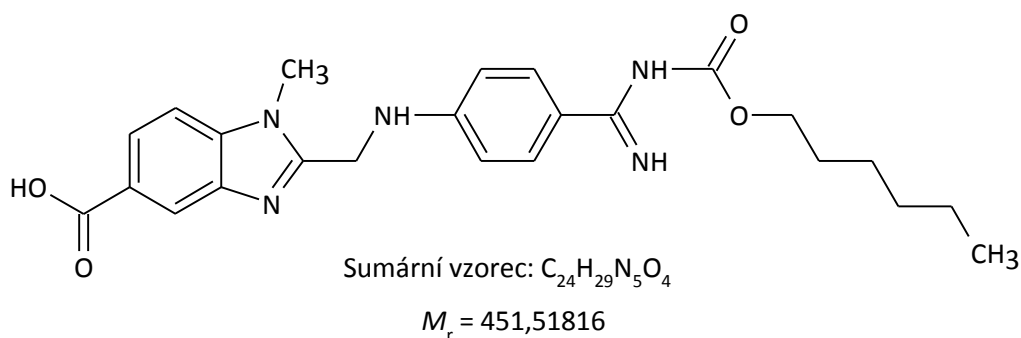
## 8.2 Reakce s vodně-ethanolickým a vodným roztokem hydroxidu sodného

Vodně-ethanolický roztok hydroxidu sodného byl vybrán jako mnohem silnější bazické prostředí. LC-MS analýzou produktů (Obr. 9) bylo zjištěno, že stejně jako v předchozím případě vzniká nejprve kyselina **12** (cca 40 %), která se dále rozkládá na derivát **8** (25 %). Kromě nich je však v reakční směsi zastoupena i sloučenina **13** s  $M_r = 451$  a sumárním vzorcem  $C_{24}H_{29}N_5O_4$  (cca 22 %), což odpovídá produktu hydrolyzy amidické skupiny kyseliny **12** (Obr. 10). Zbývajících 13 % tvoří další neidentifikované minoritní produkty. Uplatnění hydrolyzy málo reaktivní amidické skupiny je v souladu s vyšší koncentrací hydroxidového iontu.

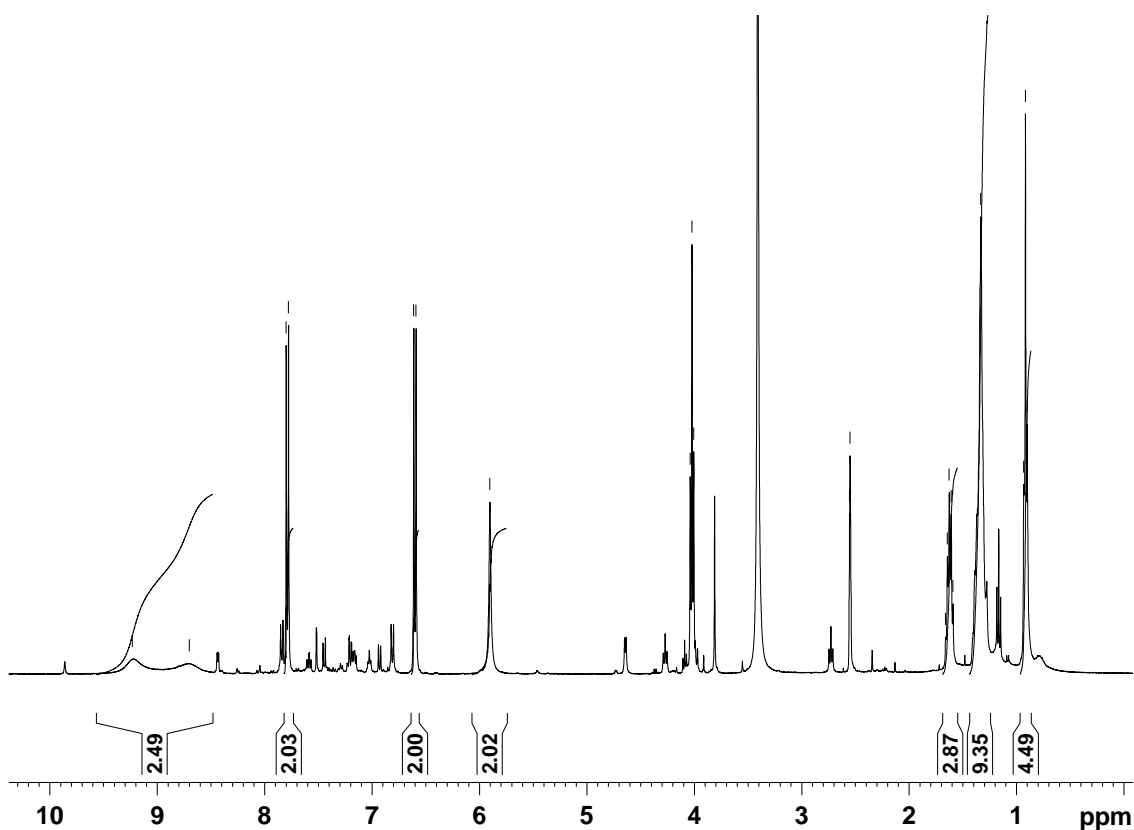


Obr. 9 – Chromatogram získaný po hydrolyze ve vodně-ethanolicském roztoku NaOH

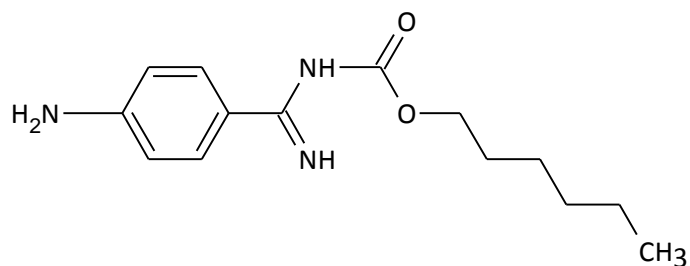
Ve vodném NaOH je reakce komplikována heterogenním uspořádáním a proto bylo možné i po 24 hod. kromě výše uvedených produktů izolovat nezreagovaný dabigatran etexilát (0,13 g) a další produkt rozkladu (40 mg), jehož  $^1H$  NMR (Obr. 11) spektrum odpovídá struktuře na Obr. 12.  $M_r = 451,51816$



Obr. 10 – Produkt hydrolyzy amidické skupiny kyseliny



Obr. 11 –  $^1\text{H}$  NMR spektrum podílu extrahovaného z vodné vrstvy toluenem. Majoritní signály odpovídají sloučenině na Obr. 12, minoritní výchozímu Dabigatran etexilátu.

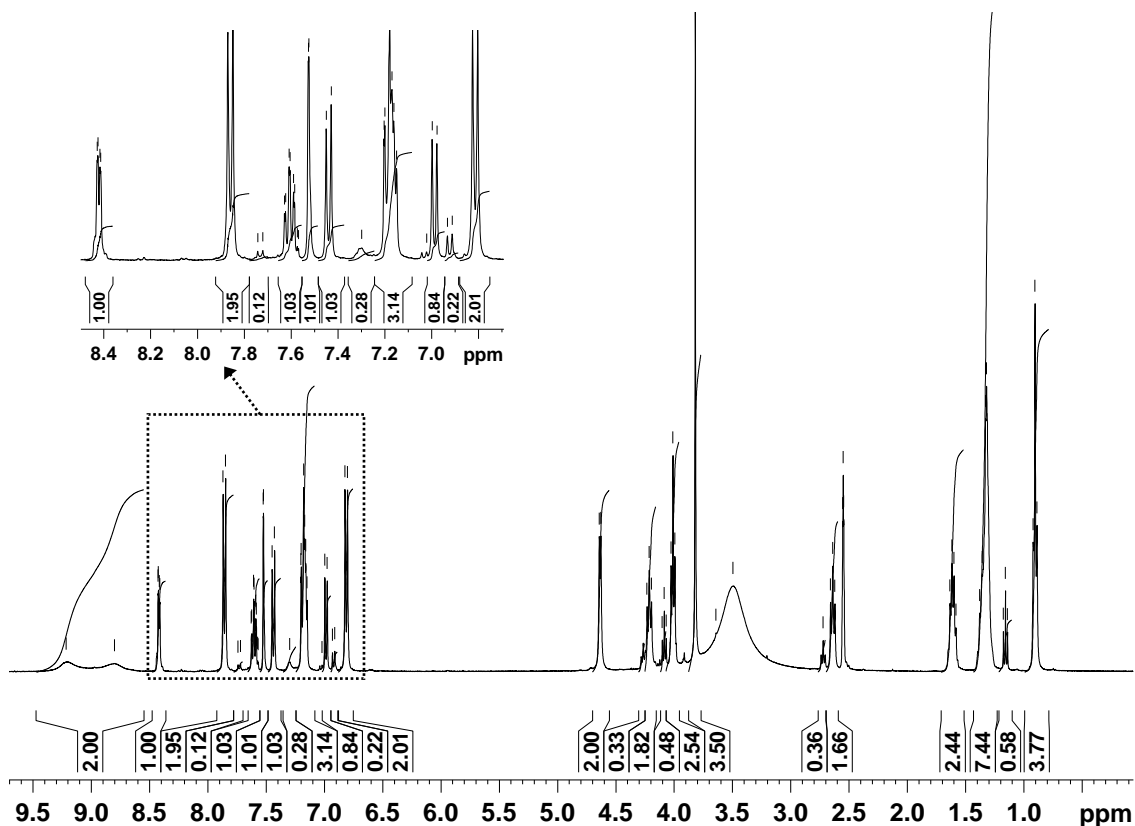


Obr. 12 – Produkt rozkladu Dabigatran etexilátu

### 8.3 Reakce s kyselinou chlorovodíkovou

Reakce v kyselém prostředí byla realizována ve vodně-ethanické HCl. Po 24 hod. bylo izolováno 50 mg výchozího Dabigatranu a 74 mg neznámého produktu jehož  $^1\text{H}$  NMR (Obr. 13) spektrum neodpovídá ani výchozímu Dabigatranu, ani dříve pozorovaným produktům rozkladu v bazickém prostředí. Spinový systém tohoto produktu se liší od Dabigatranu chybějící ethoxyskupinou, což by napovídalo, že opět vzniká kyselina **12**. Jeho  $^1\text{H}$  NMR spektrum se však neshoduje se spektrem této kyseliny (Obr. 7). Důvodem může být například to, že v případě

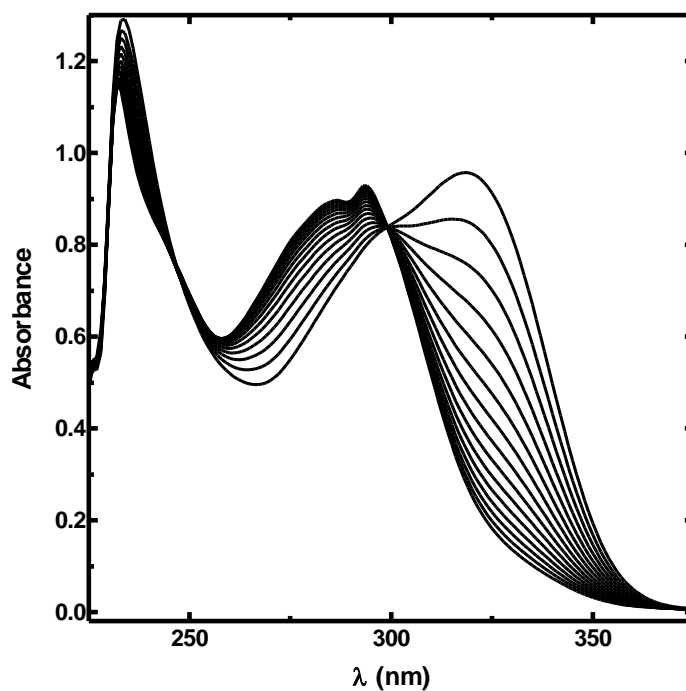
kyselá hydrolýza byla kyselina **12** izolována ve formě hydrochloridu, jehož spektrum se od samotné kyseliny **12** může lišit.



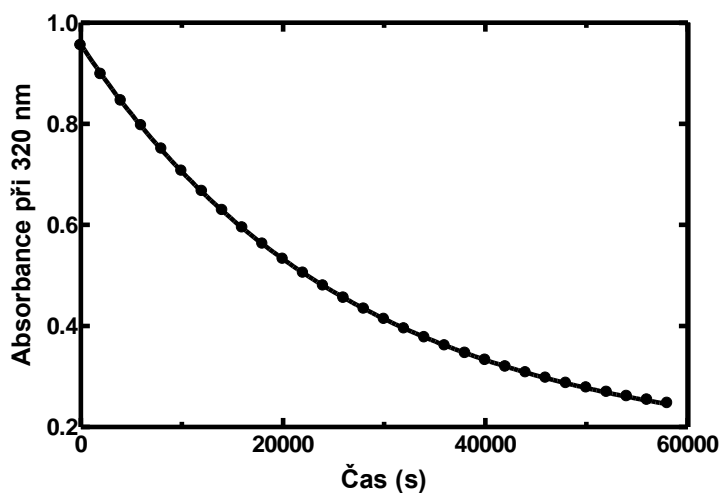
Obr. 13 – Spektrum produktu hydrolýzy Dabigatran etexilátu ve vodně-ethanolké HCl.

#### 8.4 Kinetická měření

Z důvodu komplikovaného chování Dabigatranu při hydrolýze ve vodně-ethanolkém roztoku NaOH bylo provedeno pouze orientační kinetické měření (Obr. 14, 15). Bylo potvrzeno, že rychlost degradace je velmi pomalá – za podmínek pseudoprvního řádu (tj. při velkém nadbytku NaOH) trvá reakce více než 24 hod. ( $k_{\text{poz}} = 3,78 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ;  $\tau_{1/2} = 18\,330 \text{ s}$ ). Z tohoto důvodu nebylo možné provést systematictější studii. Je však pravděpodobné, že uvedená pozorovaná rychlostní konstanta přísluší spíše štěpení karbamátové vazby (tj. vzniku sloučeniny **8**) než vazby esterové. Ethylestery se totiž hydrolyzují poměrně snadno. Isosbestický bod v Obr. 14 je důkazem, že za uvedených podmínek neprobíhá následná reakce produktu **8**.



Obr. 14 – Spektrální záznam hydrolyzy Dabigatran etexilátu v 1 M vodně-ethanolickém NaOH.



Obr. 15 – Kinetická křivka hydrolyzy Dabigatranu v 1 M vodně-ethanolickém NaOH při 320 nm.

## 8.5 Závěr

Závěrem lze říci, že Dabigatran etexilát je vysoce hydrolyticky stabilní molekula, k jejímuž rozkladu jsou potřeba vysoké koncentrace silných kyselin nebo bazí. To potvrzuje i možnost jejího perorálního použití. Nejsnadněji podléhá hydrolyze esterová vazba, následuje hydrolyza karbamátového uskupení a nejpomaleji probíhá hydrolyza amidové skupiny.

## 9. Literatura:

1. Stangier J.; *Clin. Pharmacokinet.* **2008**, *47*, 285-295.
2. Huel N. H, Nar H., Pripke H., Ries U., Stassen J. M., Wiene W.; *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1757-1766.
3. Blech S., Ebner T., Ludwig-Schwellinger E., Stangier J., Roth W.; *Drug Metab. Dispos.*, **2008**, *36*, 386-399.
4. Huel N., Ries U., Pripke H., Wiene W., Stassen J. M. (Boehringer Ingelheim Pharma KG, DE) WO 9837075, **1998**.
5. [http://www.emea.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicine\\_s/000829/human\\_med\\_000981.jsp&mid=WC0b01ac058001d124](http://www.emea.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicine_s/000829/human_med_000981.jsp&mid=WC0b01ac058001d124) 5. 6. 2012.
6. Ogawa S., Keretsune Y., Yasaka M., Aizava Y.; *Circ. J.* **2011**, *75*, 1539-1547.
7. Lee C. J., Ansell J. E., *Brit. J. Clin. Pharma*, **2011**, *72*, 581-592.
8. Siddique A.; *Therapy*, **2008**, *5*, 793-796.
9. Abhishek A. V.; *MJA* , **2010**, *192*, *7*, 407-412.
10. Maegdefessel L., Spin J. M., Azuma J., Tsao P.; *Vascular Health and risk management*, **2010**, *6*, 339-349.
11. Douketis D. D., *Pol. Arch. Med. Wewn*, **2011**, *121*, 73-79.
12. Tran A., Chemg-Lai A.; *Cardiology in review*. **2011**, *19*, 154-161.
13. Zvarová M., Celerová J.; Hematologie a transfúzní služba učební texty pro studenty SZŠ Lipová v Brně, Brno, **2005**, 69-73.
14. Merkunová A.; Orel M.; Anatomie a fyziologie člověka pro humanitní obory, Grada publishing a.s., **2007**, 80-81.
15. Fölsch U. R.; Kochsiek K., Schmidt R. F.; Pathophysiologie, Grada Publishing a.s, **2003**, 193-195.
16. Meergans D., Paetz J.(Ratiopharm GMBH) WO 2011110478, **2011**.
17. <http://themerckindex.chemfinder.com/themerckindex/Forms/Search/ContentArea/CHEM/BioVizSearch.aspx?FormGroupId=200000&AppName=THEMERCKINDEX&AllowFullSearch=true&KeepRecordCountSynchronized=false&SearchCriteriaId=23&SearchCriteriaValue=dabigatran&CurrentIndex=0> 5. 6. 2012.
18. Stoellberger C., Finsterer J.; *Pharmaceuticals*, **2012**, *5*, 155-168.
19. Segade R., Pasto Aquila (Esteve Química s.a) WO 2012004397, **2012**.
20. Kroselj V.(Krka Tovarna Zdravil D.D) WO2012001156, **2012**.

21. Leksic E., Dogan J., Ceric H. (Teva Pharmaceuticals USA) WO2012027543, **2012**.
22. Brighton T. ; *Aust. Prescr.*, **2010**, 33, 38-41.
23. Eriksson B. I., Dahl O. E., Ahnfelt L., Kalebo P., Stangier J., Nehmiz G., Hermasson K., Kohlbrenner V.; *J. Thromb. Haemost*, **2004**, 2, 1573-1580.
24. Eriksson B. I., Dahl O. E., *J. Thromb. Haemost*, **2005**, 3, 103–111.
25. Jirman J., Richter J., Lustig P. (Zentiva k.s.) WO2009111997A1, **2009**.
26. Zerban G., Hausherr, A.; Schlarb, K.; Schmitt, H. P.; Weyell, Bj.; Koch, G.; Hamm R. (Boehring Ingelheim), WO 2006000353, **2006**.
27. Filser Ch., Hamm R., Hausherr A., Koch G., Scholz U., Zerban G.; (Boehring Ingelheim), WO2009153215, **2009**.
28. Adams P., Baron F. A. *Chem. Rev.* **1965**, 65, 567–602.

## ÚDAJE PRO KNIHOVNICKOU DATABÁZI

Název práce	Studium stability antikoagulancia Dabigatranu v kyselém a bazickém prostředí
Autor práce	Veronika Hladíková
Obor	Farmakochemie a medicínální materiály
Rok obhajoby	2012
Vedoucí práce	Doc. Ing. Jiří Hanusek, PhD.
Anotace	<p>První část této bakalářské práce se zabývá literární rešerší popisující vlastnosti léku na srážení krve Dabigatran etexilátu a jeho farmakologicky aktivní formy Dabigatranu. Dále je popsán mechanismus srážení krve, vlastnosti léku, jeho farmakokinetické parametry a jeho příprava.</p> <p>Druhá, experimentální část, popisuje sloučeniny vzniklé alkalickou a kyselou hydrolýzou. Bylo zjištěno, že hlavní hydrolytické produkty vznikají štěpením esterové a karbamátové vazby Dabigatran etexilátu. V menší míře se uplatňuje i štěpení amidické vazby. Kinetickým pokusem bylo prokázáno, že uvedené hydrolytické procesy jsou velmi pomalé – vyžadují min. 24 hod. při laboratorní teplotě – a svědčí tak o vysoké stabilitě Dabigatranu.</p>
Klíčová slova	Hemokoagulace, proléčivo, Dabigatran, Dabigatran etexilát