(12) **PATENT**

(19) NO (11) **322359** (13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.
C07D 295/033 (2006.01)
A61K 31/40 (2006.01)
A61P 25/08 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20022044	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1999.11.01 PCT/EP99/08317
(22)	Inng.dag	2002.04.30	(85)	Videreføringsdag	2002.04.30
(24)	Løpedag	1999.11.01	(30)	Prioritet	1999.11.01, WO, PCT/EP99/08317
(41)	Alm.tilgj	2002.04.30			
(45)	Meddelt	2006.09.18			

(73) Innehaver Merz Pharma GmbH & Co KgaA, Postfach 11 13 53, D-60048 Frankfurt am Main, DE
(72) Oppfinner Wojciech Danysz, Vor den Gärten 16, 61130 NIDDERAU, DE
Markus Gold, Kranichstrasse 9, 64569 NAUHEIM, DE
Ivars Kalvinsh, Miera 17-8, 2169 SALASPILS, LV
Christopher Graham Raphael Parsons, Alt Praunheim 99, D-60488 Praunheim, DE
Valerjans Kauss, A Deglava 108/2-36, 1082 RIGA, LV
Aigars Jirgensons, Hospitalu iela 3-103, 1013 RIGA, LV
(74) Fullmektig Tandbergs Patentkontor AS, Postboks 7085 Majorstua, 0306 OSLO, NO

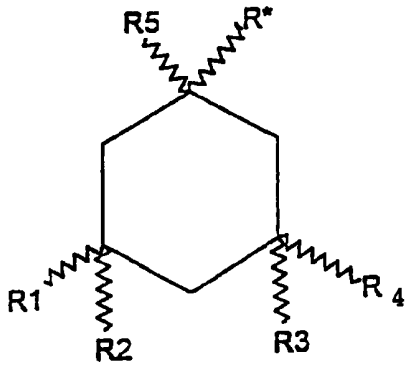
(54) Benevnelse **1-(syklisk amino)-alkylsykloheksanforbindelser, farmasøytiske preparater derav og deres anvendelse som antikonvulsive midler**

(56) Anførte publikasjoner Ingen

(57) Sammendrag

Visse 1-(syklisk amino)-alkylsykloheksaner er systemisk aktive ikke-konkurrerende NMDA-reseptorantagonister og er derfor anvendelige for å lindre tilstander som følger av forstyrrelser i den glutamatergiske overføring. Enda viktigere er det at disse forbindelser oppviser fremragende antikonvulsiv aktivitet og aktivitet mot anfall, som ikke oppvises av nærbeslektede ikke sykliske aminoforbindelser. Det beskrives også farmasøytiske preparater inneholdende forbindelsene og en fremgangsmåte for behandling av tilstander som lindres ved bruk av disse, spesielt lindring av kramper og anfall, samt fremgangsmåter for fremstilling av de angjeldende aktive 1-(syklisk amino)alkylsykloheksanforbindelser og for fremstilling av legemidler på basis av disse.

Den foreliggende oppfinnelse vedrører 1-(syklisk amino)-alkylsykloheksanforbindelser med den generelle formel:



hvor:
R* er $-(CH_2)_n-(CR^6R^7)_m-NR^8R^9$,
n+m er 0, 1 eller 2,
R^1-R^7 uavhengig av hverandre er valgt blant hydrogen og lavere alkyl (1-6C), og
R^8 og R^9 sammen betegner lavere alkylen, $-(CH_2)_x-$, hvor x er 2-5, grenseverdiene inkludert,
og enantiomerer, optiske isomerer, hydrater og farmasøytisk aksepterbare salter derav, samt farmasøytiske preparater inneholdende slike forbindelser, samt deres fremstilling og anvendelse som antikonvulsive midler for behandling av kramper eller anfall hos et levende dyr.

Av særlig interesse er forbindelser med den ovenstående formel hvor i det minste R^1, R^4 og R^5 er lavere alkyl, og spesielt de forbindelser hvor R^1-R^5 er metyl, de forbindelser hvor x er 4 eller 5, og spesielt forbindelsen N-(1,3,3,5,5-pentametyl-sykloheksyl)-pyrrolidin, foruten optiske isomerer, enantiomerer, hydrater og farmasøytisk aksepterbare salter derav.

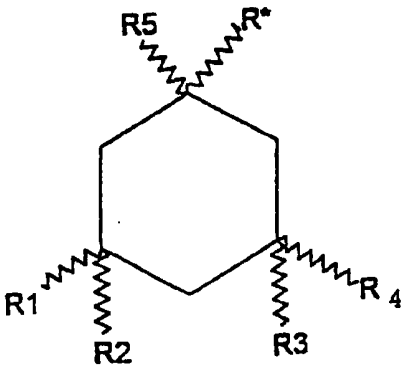
I søkerens publiserte patentsøknad WO 99/01416, publisert 14. januar 1999, er det omtalt forbindelser med den ovenstående formel, hvor imidlertid R^8 og R^9 er valgt blant hydrogen og lavere alkyl (1-6C), farmasøytiske preparater derav og deres anvendelse som NMDA-reseptorantagonister. Det har nå vist seg at

forbindelser med den ovenstående formel hvor R^8 og R^9 sammen betegner lavere alkylen, $-(CH_2)_x-$, hvor x er 2-5, grenseverdier inkludert, og spesielt N-(1,3,3,5,5-pentametylsykloheksyl)-pyrrolidin, og optiske isomerer, enantiomerer, hydrater og farmasøytisk aksepterbare salter derav - i tillegg til å oppvise NMDA-antagonistegenskaper - ganske uforutsigbart oppviser en høy grad av antikonvulsiv aktivitet i oppflammingsmodellen, mens andre NMDA-antagonister, til tross for sågar kraftigere NMDA-antagonistiske egenskaper, ikke er aktive.

Sammenfatning av oppfinnelsen

Det som anses å være omfattet av den foreliggende oppfinnelse, kan sammenfattes blant annet som følger:

en 1-(syklisk amino)-alkylsykloheksanforbindelse med formelen:



hvor:

R* er $-(CH_2)_n-(CR^6R^7)_m-NR^8R^9$,

n+m er 0, 1 eller 2,

R^1-R^7 uavhengig av hverandre er valgt blant hydrogen og lavere alkyl (1-6C), idet minst R^1, R^4 og R^5 er lavere alkyl, og

R^8 og R^9 sammen betegner lavere alkylen, $-(CH_2)_x-$, hvor x er 2-5, grenseverdiene inkludert, og enantiomerer, optiske isomerer, hydrater og farmasøytisk aksepterbare salter derav.

en slik forbindelse hvor R^1-R^5 er metyl;

en slik forbindelse hvor x er 4 eller 5; og

en slik forbindelse valgt blant N-(1,3,3,5,5-

pentametylsykloheksyl)-pyrrolidin og optiske isomerer, enantiomerer, hydrater og farmasøytisk aksepterbare salter derav.

Oppfinnelsen omfatter også et farmasøytisk preparat omfattende en effektiv mengde av en slik forbindelse i kombinasjon med én eller flere farmasøytisk aksepterbare fortynnere, eksipienser eller bærere;

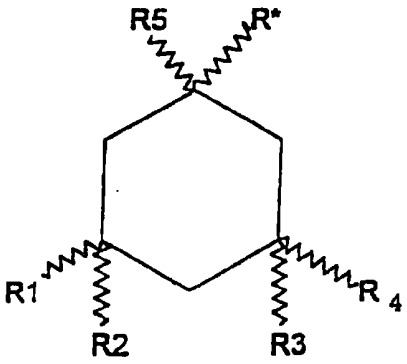
et slikt farmasøytisk preparat hvor den effektive mengde er en effektiv antikonvulsiv mengde;

et slikt farmasøytisk preparat hvor R^1-R^5 er metyl;

et slikt farmasøytisk preparat hvor x er 4 eller 5; og

et slikt farmasøytisk preparat hvor forbindelsen er valgt blant N-(1,3,3,5,5-pentametylsykloheksyl)-pyrrolidin og optiske isomerer, enantiomerer, hydrater og farmasøytisk aksepterbare salter derav.

Videre omfatter oppfinnelsen en metode for behandling av kramper eller anfall hos et levende dyr, omfattende administrering til nevnte dyr av et kvantum av en 1-(syklisk amino)-alkylsykloheksanforbindelse valgt fra gruppen av forbindelser med formelen:



hvor

R* er $-(CH_2)_n-(CR^6R^7)_m-NR^8R^9$,

n+m er 0, 1 eller 2,

R^1-R^7 uavhengig av hverandre er valgt blant hydrogen og lavere alkyl (1-6C), og

R^8 og R^9 sammen betegner lavere alkylen, $-(CH_2)_x-$, hvor x er 2-5, grenseverdiene inkludert, og optiske isomerer, enantiomerer,

hydrater og farmasøytisk aksepterbare salter derav, som er effektive for det nevnte formål;

en slik metode hvor minst R^1, R^4 og R^5 er lavere alkyl;

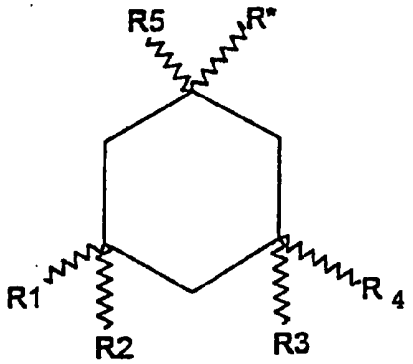
en slik metode hvor R^1-R^5 er metyl;

en slik metode hvor x er 4 eller 5;

en slik metode hvor forbindelsen er valgt fra gruppen bestående av N-(1,3,3,5,5-pentametylsykloheksyl)-pyrrolidin og optiske isomerer, enantiomerer, hydrater og farmasøytisk aksepterbare salter derav; og

en slik metode hvor forbindelsen administreres i form av et farmasøytisk preparat derav, omfattende forbindelsen i kombinasjon med én eller flere farmasøytisk aksepterbare fortynnere, eksipienser eller bærere.

Videre omfatter oppfinnelsen anvendelse av en 1-(syklisk amino)-alkylsykloheksanforbindelse valgt fra gruppen bestående av forbindelser med formelen:



hvor

R* er $-(CH_2)_n-(CR^6R^7)_m-NR^8R^9$,

n+m er 0, 1 eller 2,

R^1-R^7 uavhengig av hverandre er valgt blant hydrogen og lavere alkyl (1-6C), og

R^8 og R^9 sammen betegner lavere alkylen, $-(CH_2)_x-$, hvor x er 2-5, grenseverdiene inkludert, og optiske isomerer, enantiomerer, hydrater og farmasøytisk aksepterbare salter derav, for fremstilling av et legemiddel for behandling av et levende dyr for å lindre kramper eller anfall;

en slik anvendelse hvor minst R^1, R^4 og R^5 er lavere alkyl;

en slik anvendelse hvor R^1-R^5 er metyl;

en slik anvendelse hvor x er 4 eller 5; og

en slik anvendelse hvor forbindelsen er valgt fra gruppen bestående av N-(1,3,3,5,5-pentametylsykloheksyl)-pyrrolidin og optiske isomerer, enantiomerer, hydrater og farmasøytisk aksepterbare salter derav.

I tillegg omfatter oppfinnelsen en fremgangsmåte for fremstilling av en slik forbindelse, hvilken fremgangsmåte omfatter det trinn å omsette det tilsvarende 1-(fritt amino)-alkylsykloheksan med (1) et omega-halogenalkylnitril og syklisering av den resulterende N-(omega-cyanalkyl)-forbindelse til den tilsvarende 1-(syklisk amino)-alkylsykloheksanforbindelse eller med (2) en alfa,omega-dihalogenalkylforbindelse.

Fremgangsmåter og kjemi

Utgangsmaterialene for fremstilling av forbindelsene ifølge oppfinnelsen er kjent i faget. I søkerens tidligere publiserte patentsøknad WO 99/01416, PCT/EP98/04026, beskrives mange 1-amino-alkylsykloheksylaminforbindelser. Det vises f.eks. til Forbindelse 5 på side 9 i publikasjonen og de mange eksempler på denne gjennom publikasjonen. Utgangsmaterialene for den foreliggende oppfinnelse har den ovenfor angitte formel, hvor imidlertid både R^8 og R^9 er hydrogen. Av særlig interesse som utgangsmateriale er en forbindelse valgt fra gruppen bestående av:

1-amino-1,3,5-trimetylsykloheksan,
1-amino-1(trans),3(trans),5-trimetylsykloheksan,
1-amino-1(cis),3(cis),5-trimetylsykloheksan,
1-amino-1,3,3,5-tetrametylsykloheksan,
1-amino-1,3,3,5,5-pentametylsykloheksan,
1-amino-1,3,5,5-tetrametyl-3-etylsykloheksan,
1-amino-1,5,5-trimetyl-3,3-dietylsykloheksan,
1-amino-1,5,5-trimetyl-cis-3-etylsykloheksan,
1-amino-(1S,5S)cis-3-etyl-1,5,5-trimetylsykloheksan,
1-amino-1,5,5-trimetyl-trans-3-etylsykloheksan,
1-amino-(1R,5S)trans-3-etyl-1,5,5-trimetylsykloheksan,
1-amino-1-etyl-3,3,5,5-tetrametylsykloheksan, og

1-amino-1-propyl-3,3,5,5-tetrametylsykloheksan, og farmasøytisk aksepterbare syreaddisjonssalter av disse. Forbindelsene ifølge oppfinnelsen fremstilles ut fra disse ved at man omdanner den frie aminoforbindelse, fortrinnsvis i form av et syreaddisjonssalt som f.eks. hydrokloridet eller lignende, i en totrinns ringslutningsprosess som innebærer dannelse av en N-cyanalkylforbindelse som mellomprodukt og ringslutning av denne for dannelse av den ønskede 1-(syklisk amino)-alkylsykloheksanforbindelse hvor 1-aminogruppen foreligger i form av en syklisk gruppe, som f.eks. et pyrrolidin eller et piperidin eller lignende, hvilke forbindelser er gjenstand for den foreliggende oppfinnelse.

Nærmere redegjørelse for oppfinnelsen

De følgende nærmere redegjørelser og detaljerte eksempler er kun gitt i illustrasjonsøyemed og skal ikke anses som begrensende for oppfinnelsen.

Eksempler

1-amino-alkylsykloheksanforbindelsene i hvilke 1-aminogruppen er syklisk, dvs. hvor R^8 og R^9 sammen betegner lavere alkylen $-(CH_2)_x-$ hvor x er 2-5, grenseverdier inkludert, slik at 1-aminogruppen $-NR^8R^9$ får form av et syklisk amin, fremstilles på den følgende måte:

Fremstilling av N-(3-cyanpropyl)-1,3,3,5,5-pentametylsykloheksylamin

En blanding av 2,06 g (10 mmol) 1,3,3,5,5-pentametylsykloheksylamin-hydroklorid, 1,55 g (10,5 mmol) 4-brombutyronitril og 3,18 g (30 mmol) natriumkarbonat i 50 ml tetrahydrofuran ble kokt med tilbakeløpskjøling i 85 timer, hvoretter den ble hellet over i 100 ml vann og ble ekstrahert med 3 x 30 ml eter. De sammenslåtte organiske faser ble vasket med 20 ml saltoppløsning og tørket over K_2CO_3. Oppløsningen ble filtrert og inndampet, og råproduktet ble renset ved kromatografering på silikagel under eluering med heksan-eter (10:1), (6:1), (4:1) hvorved det ble oppnådd 1,86 g (86%) av det ønskede produkt som en fargeløs olje.

PMR-spektrum: ($CDCl_3$, TMS) δ: 0,87 (6H, s, c-Heks 3,5-CH_3); 1,06 (3H, s, c-Heks 1-CH_3); 1,18 (6H, s, 3,5-CH_3); 0,9-1,6 (7H, m, c-Heks ringprotoner og NH); 1,75 (2H, m, -CH_2-); 2,43 (2H, t, J=7Hz, CH_2N) og 2,66 ppm. (2H, t, J=7Hz, CH_2CN).

Fremstilling av MRZ 2/705, nemlig: N-(1,3,3,5,5-pentametylsyklo-heksyl)-pyrrolidin-hydroklorid

1,2 g (5,1 mmol) N-(3-cyanpropyl)-1,3,3,5,5-pentametyl-sykloheksylamin i 120 ml etanol og 4 ml kons. HCl ble hydrogenert over 250 mg 10% Pd/C ved 7 bar i 40 timer (etter 24 timer ble ytterligere 260 mg katalysator tilsatt). Katalysatoren ble fjernet ved filtrering gjennom en celittpute, og oppløsningsmidlet ble avdampet. Residuet ble behandlet med acetonitril, det faste stoff ble frafiltrert, og filtratet ble inndampet. Råproduktet ble krystallisert fra eter, hvorved det ble oppnådd 0,67 g (49%) N-(1,3,3,5,5-pentametylsykloheksyl)-pyrrolidin-hydroklorid (0,67 g, 49%) med sm.p. 156-158 °C.

PMR-spektrum: (DMSO-d_6, TMS) δ: 0,97 (6H, s, 3,5-CH_3); 1,11 (6H, s, 3,5-CH_3); 0,8-1,4 (2H, sykloheksan 4-CH_2); 1,41 (3H, s, 1-CH_3); 1,69 (4H, m, sykloheksan 2,6-CH_2); 1,84 (4H, m, pyrrolidin 3,4-CH_2); 3,20 (4H, m, pyrrolidin 2,5-CH_2); 10,9 ppm (1H, br s, HN*).

Elementæranalyse: $C_{15}H_{29}N*HCl*0,5H_2O$:

Funnet (%)	C 67,7; H 11,5; N 5,5.
Beregnet (%)	C 67,0; H 11,6; N 5,2.

Andre 1-(syklisk amino)-forbindelser fremstilles på samme måte ved at man starter med det utvalgte alkylsubstituerte sykloheksylamin, vanligvis i form av et addisjonssalt som f.eks. hydrokloridet, og det valgte ω-brom-alkylnitril, som f.eks. 4-brombutyronitril, 3-brompropionitril, 2-bromacetonitril, og 5-bromvaleronitril, på samme måte som ved den foranstående fremstillingsprosedyre, for dannelse først av den utvalgte N-ω-cyanalkyl-alkylsykloheksylamin-forbindelse, med påfølgende ringslutning av N-ω-cyanalkyl-alkylsykloheksylamin-forbindelsen til den resulterende N-(alkylsykloheksyl)-(syklisk amino)-forbindelse, nemlig pyrrolidinet, piperidinet eller annen syklisk aminforbindelse, hvor nitrogenatomet og R^8 og R^9 sammen danner den sykliske aminogruppe, idet R^8 og R^9 sammen betegner en lavere

alkylenkjede med formelen $-(CH_2)_x-$, hvor x er 2-5, ytterverdiene inkludert.

Således fremstilles N-(1,3,3,5,5-pentametylsyklo-heksyl)-piperidin-hydroklorid eller annet syreaddisjonssalt og tallrike andre lavere-alkyl-substituerte sykloheksaner med en 1-pyrrolidino- eller 1-piperidinogruppe eller annen 1-(syklisk amino)-gruppe i henhold til oppfinnelsen, avhengig av ω-brom-alkylnitril-utgangsmaterialene og de alkylsubstituerte syklo-heksylamin-utgangsmaterialer som velges for reaksjonen.

Fremgangsmåten som benyttes, kan derfor hensiktsmessig beskrives som en omsetning av det tilsvarende 1-(fritt amino)-alkylsykloheksan med et omega-halogenalkylnitril og ringslutning av den tilsvarende N-(omega-cyanalkyl)-forbindelse til den tilsvarende 1-(syklisk amino)-alkylsykloheksanforbindelse. Halogenet er fortrinnsvis brom, og det som utgangsmateriale benyttede amin omsettes fortrinnsvis i form av et syreaddi-sjonssalt, som f.eks. hydrokloridet. Ved at man starter med de foretrukne utgangsmaterialer som angitt i det foranstående, kan de følgende forbindelser lett fremstilles:

N-(1,3,5-trimetylsykloheksyl)-pyrrolidin eller -piperidin,
N-[1(trans),3(trans),5-trimetylsykloheksyl]-pyrrolidin eller -piperidin,
N-[1(cis),3(cis),5-trimetylsykloheksyl]-pyrrolidin eller -piperidin,
N-(1,3,3,5-tetrametylsykloheksyl)-pyrrolidin eller -piperidin,
N-(1,3,3,5,5-pentametylsykloheksyl)-pyrrolidin eller -piperidin,
N-(1,3,5,5-tetrametyl-3-etylsykloheksyl)-pyrrolidin eller -piperidin,
N-(1,5,5-trimetyl-3,3-dietylsykloheksyl)-pyrrolidin eller -piperidin,
N-(1,5,5-trimetyl-cis-3-etylsykloheksyl)-pyrrolidin eller -piperidin,
N-[(1S,5S)cis-3-etyl-1,5,5-trimetylsykloheksyl]-pyrrolidin eller -piperidin,
N-(1,5,5-trimetyl-trans-3-etylsykloheksyl)-pyrrolidin eller -piperidin,
N-[(1R,5S)trans-3-etyl-1,5,5-trimetylsykloheksyl]-pyrrolidin eller -piperidin,

N-(1-etyl-3,3,5,5-tetrametylsykloheksyl)-pyrrolidin eller -piperidin, og
N-(1-propyl-3,3,5,5-tetrametylsykloheksyl)-pyrrolidin eller -piperidin,
samt farmasøytisk aksepterbare salter av hvilke som helst av de ovenstående forbindelser.

R^1-R^7 kan således f.eks. være metyl, etyl, propyl eller en kombinasjon av disse lavere alkylgrupper, idet - som ovenfor angitt - i det minste R^1, R^4 og R^5 fortrinnsvis er én av disse grupper. I de mest foretrukne forbindelser har R^1-R^5 betydningen metyl.

Alternativ fremgangsmåte

De samme forbindelser kan fremstilles ved omsetning av det tilsvarende 1-(fritt amino)-alkylsykloheksan med den utvalgte alfa,omega-dihalogenalkylforbindelse, f.eks. 1,3-dibrompropan, 1,4-dibrombutan eller 1,5-dibrompentan, i henhold til det følgende representative eksempel:

N-(1,3,3,5,5-pentametylsykloheksyl)-pyrrolidin-hydroklorid

12 g (58,3 mmol) 1,3,3,5,5-pentametylsykloheksylamin-hydroklorid, 48,4 g (350 mmol) kaliumkarbonat og 7,32 ml (61,3 mmol) 1,4-dibrombutan ble kokt med tilbakeløpskjøling i 250 ml acetonitril i 60 timer. Etter avkjøling til romtemperatur ble blandingen filtrert og utfelningen vasket med 600 ml dietyleter. Filtratet ble konsentrert i vakuum i en roterende inndamper, og residuet ble underkastet fraksjonert destillasjon ved redusert trykk (11 mm Hg). Fraksjonen ved 129 °C ble oppsamlet, hvilket ga 8,95 g av en fargeløs olje. Denne ble oppløst i 120 ml dietyleter, og 30 ml av en 2,7 M oppløsning av HCl i dietyleter ble tilsatt. Den resulterende utfelning ble frafiltrert, vasket med 3 x 30 ml dietyleter og tørket i vakuum over NaOH, hvorved det ble oppnådd 12,9 g (68%) N-(1,3,3,5,5-pentametylsykloheksyl)-pyrrolidin-hydrokloridhydrat med sm.p. 158 °C.

PMR-spektrum: (DMSO-d_6, TMS) d: 0,97 (6H, s, 3,5-CH_3); 1,11 (6H, s, 3,5-CH_3); 0,8-1,4 (2H, sykloheksan 4-CH_2); 1,41 (3H, s, 1-CH_3); 1,69 (4H, m, sykloheksan 2,6-CH_2); 1,84 (4H, m, pyrrolidin 3,4-CH_2); 3,20 (4H, m, pyrrolidin 2,5-CH_2); 10,9 ppm (1H, br s, NH+).

Elementæranalyse: ($C_{15}H_{29}n*HCl*H_2O$)

Funnet (%) C 65,0; H 11,7; N 5,0.

Beregnet (%) C 64,8; H 11,6; N 5,0.

Farmakologiske resultater

A. De følgende tabeller 1 og 2 gir farmakologiske resultater oppnådd for forbindelsen MRZ 2/705 ifølge den foreliggende oppfinnelse.

Tabell 1

MRZ 2/	MES ED_{50} mg/kg i.p.		TI Strekk	TI Rot.	Min. dødelighet mg/kg i.p.
705	9,55	(4,3-21,1)	3,9	5,4	>50

Virkning av MRZ 2/705 på kramper frembrakt gjennom maksimalt elektrosjokk (MES). Verdiene er ED_{50}-verdier i mg/kg (95% konfidensgrenser er gitt mellom parenteser). Den terapeutiske indeks (TI) ble også beregnet som ED_{50} for hemming av strekkerefleksen (Strekk) og for svekking eller rotastav-svikt (Rot.) dividert med ED_{50}-verdien for kramper som følge av anfall frembrakt av MES.

Tabell 2

MRZ	MK-801 Ki (µM)	SEM	Koblingsklemme IC_{50} (µM)	SEM	Glut. toks. IC_{50} (µM)	SEM
705	7,14	1,7	25,40	4,1	12,32	1,19

Virkning av MRZ 2/705 på [^{3}H]-(+)-MK-801-binding, NMDA-frembrakte strømstyrker ved koblingsklemme-forsøk, og glutamat-toksisitet i dyrkede kortikale neuroner. Bindende Ki-verdier er middelverdier ± SEM for 3-5 forsøk og ble bestemt i henhold til Cheng-Prusoff-relasjonen med en Kd for MK-801 på 4,6 nM. IC_{50}-verdier (± SEM) ved koblingsklemme-forsøk og glutamat-toksisitetsforsøk ble bestemt ut fra data for minst 3 konsentrasjoner

som gir mellom 15 og 85% hemming og minst 5 celler/brønn pr. konsentrasjon.

B. Antikonvulsiv aktivitet av MRZ 2/705 i amygdalaoppflammings-modellen

Innledning

Forbindelsen MRZ 2/705 ble testet i amygdalaoppflammingsmodellen på rotter. I denne modell ble rotter med kronisk implanterte stimulerende og registrerende elektroder i amygdala gjort mer følsomme for anfall gjennom gjentatt, til å begynne med subkonvulsiv elektrisk stimulering (Goddard et al., 1969, Sato et al., 1990). Så snart en økt følsomhet, kjennetegnet ved generaliserte motoriske rykninger (anfall) er blitt utviklet, sies dyret å være fullstendig oppflammet. For prosedyrer for substansiell skreening bestemmes den individuelle terskelstrømstyrke som frembringer etterutladninger på det stimulerte sted.

Materialer og metoder

Dyr

Wistar hunnrotter som veide 200-220 g, ble anskaffet (Harlan Windelmann Versuchstierzucht, Borchen, Tyskland) og ble holdt i et regulert miljø (24-25 °C, 50-60% fuktighet, sykluser med 12 h lys og 12 h mørke) med fri tilgang til standard laboratoriefôde (Altromin 1324 standarddiett) og vann fra springen. Alle forsøk ble utført på samme døgntid, om morgenen, for å redusere eventuelle virkninger av cirkadiske variasjoner til et minimum. Under forsøksperioden hadde dyrene en kroppsvekt på mellom 265 g og 414 g. Disse dyr var tidligere blitt oppflammet og benyttet for testing av andre forbindelser. Perioden mellom de tidligere og de her omtalte undersøkelser var tilstrekkelig lang (minst én måned), slik at det hadde gått rikelig med tid for en fullstendig gjenvinning fra det tidligere testede legemiddel.

Implantering av elektroder

For implantering av oppflammingselektroder ble rotter bedøvet med kloralhydrat (360 mg/kg, i/p.). Skallens overflate ble eksponert, og en bipolar elektrode ble implantert i den høyre hjernehalvdel mot den basolaterale amygdala under anvend-

else av de følgende sterotaksiske koordinater i henhold til Paximos' og Watsons atlas (1986): 2,2 mm kaudalt, 4,8 mm lateralt, 8,5 mm ventralt (alt i forhold til bregma). Elektrodene besto av to tvundne teflonbelagte tråder av rustfritt stål (diameter 250 µm), som i spissen var anordnet 0,5 mm fra hverandre. En skrue, som tjente som en jordingselektrode, ble anbrakt over den venstre parietale cortex. Bipolare elektroder og jordingselektroder ble forbundet med plugger, og elektrodemontasjen og festeskruene ble holdt på plass med karylisk tannlim påført på den eksponerte skalleoverflate. Etter det kirurgiske inngrep ble rottene behandlet med antibiotika i 1 uke for å hindre infeksjon.

Oppflammingsprosedyre og forsøk utført på fullt oppflammede dyr

Etter en gjenvinningsperiode på to uker etter inngrepet ble stimuleringer med konstant strømstyrke (500 µA, 1 msek, monofase-firkantbølgepulser, 50 Hz i 1 s) påtrykket amygdala én gang daglig (fem ganger pr. uke), inntil minst 10 sekvensielle fullt oppflammede trinn-5-anfall var blitt frembrakt. Graden av anfall (SS = "seizure severity") ble bestemt i henhold til Racine (1972): 1 urørlighet, lukking av øynene, rykninger i ørene, tvinning av værhår, snusing, faciale rykninger; 2 hodenikking sammen med en sterkere grad av faciale rykninger; 3 rykninger i ett av forbena; 3,5 bilaterale rykninger, uten at dyret setter seg på bakbena; 4 bilaterale rykninger ledsaget av rygging; 4,5 generaliserte rykningsanfall uten rygging og fall (f.eks. på grunn av direkte tap av balanse); 5 rygging og fall ledsaget av generaliserte rykningsanfall. For disse fullt oppflammede rotter ble etterutladningsterskelen (ADT = "afterdischarge threshold") bestemt ved administrering av en rekke stimuleringer med 1 minutts intervall, økende i trinn på ca. 20% av den tidligere benyttede strømstyrke. Etterutladningsterskelen ble definert som den laveste strømstyrke som ga en etterutladning av varighet minst 5 s. Bestemmelsen av etterutladningsterskelen ble gjentatt to ganger for å få bekreftet reproduserbarheten, før dyrene ble benyttet for testing av antikonvulsive legemidler.

I samtlige forsøk ble anfallets varighet og varigheten av etterutladningen registrert i tillegg til graden av anfall og etterutladningsterskelen. Anfallets varighet 1 (SD1 = "seizure duration 1") var varigheten av anfall i lemmene og/eller motoriske anfall. Anfallene i lemmene, som ofte forekom etter avsluttede sekundært generaliserte anfall, ble ikke inkludert i varigheten av anfallet. Varighet av anfall 2 (SD2 = "seizure duration 2") var tiden fra stimuleringen til endt postiktal depresjonsfase.

Etterutladningsvarighet 1 (ADD1 = "afterdischarge duration 1") ble definert som perioden med høy amplitude (frekvens på minst 1 Hz og det dobbelte av amplituden før stimuleringen) i elektroencefalogrammet (EEG) for BLA-elektroden, inklusive stimuleringstiden. Dersom den første høyamplitudeperiode ble direkte etterfulgt av en topp med en annen amplitude, ble tiden fra stimuleringen og til slutten av toppene med høy og lav amplitude tatt som etterutladningsvarighet 2 (ADD2). Sekundære etterutladninger som av og til forekommer etter en periode med stille EEG, ble i samtlige protokoller merket med en X.

Legemiddelforsøk

Stoffet MRZ 2/705 ble oppløst i destillert vann og administrert i.p. Det anvendte volum var 3 ml/kg kroppsvekt. Dosene som ble benyttet ved forsøkene, var på 5, 10 og 20 mg/kg.

Dyrene ble tillatt å venne seg til laboratoriemiljøet, hvoretter kroppstemperaturen ble målt og dyrene ble anbrakt i åpne bur for konstant observasjon. 15 og 30 minutter etter administreringen av legemiddel eller vehikkel ble adferdsendringene og kroppstemperaturen bestemt. Ugunstige virkninger ble notert og bedømt under observeringen i åpne bur og i et åpent felt. I tillegg ble rottene underkastet testen med roterende stav (polypropylen, skumbelagt stav, 5 cm i diameter, 8 rpm). Dyrene ble ansett for ikke å ha bestått denne test, når de falt de ned fra staven i hvert av tre på hverandre følgende forsøk av 1 minutts varighet.

Bivirkninger ble bedømt på følgende måte: **ataksi**: 0 = fraværende, 1 = lett ataksi i bakføttene, 2 = mer utpreget ataksi med trekking på bakføttene, 3 = ytterligere økt ataksi og

mer utpreget trekking på bakføttene, 4 = markert ataksi og tap av balanse under bevegelse fremover, 5 = meget markert ataksi med hyppig tap av balanse, og 6 = varig tap av opprettingsrefleksen; **sedasjon**: 0 = fraværende, 1 = svakt redusert bevegelse fremover, 2 = redusert bevegelse med hvileperioder mellom perioder med bevegelse, 3 = redusert bevegelse med mer hyppige hvileperioder, og 4 = ingen bevegelse fremover, og dyret sitter rolig med lukkede øyne; **ytterligere uheldige virkninger**: 0 = fraværende, 1 = usikre/tvetydige, 2 = tilstedeværende, og 3 = intense.

Den statistiske signifikans av dataene for anfall ble beregnet etter Wilcoxons signerte rangeringstest for parede replikasjoner.

Resultater

MRZ 2/705 ga en doseavhengig antikonvulsiv virkning på amygdala-oppflammede rotter.

Med de forskjellige doser ble det funnet en midlere økning av etterutladningsterskelen på 36% (5 mg/kg), 50% (10 mg/kg) og 95% (20 mg/kg) over kontrollterskelen. Denne økning viste seg å være signifikant etter doser på 10 og 20 mg/kg (fig. 3).

I tillegg til å forhøye etterutladningsterskelen førte den høyeste testede dose (20 mg/kg) til en reduksjon i graden av anfall, varigheten av motorikkanfallene og varighetene av etterutladninger på en signifikant måte. Med lavere doser forble disse anfallsparametre uendrede, eller de ble bare svakt påvirket.

Med alle tre doser ble det funnet tegn på sedasjon. Svak ataksi ble registrert etter doser på 10 og 20 mg/kg, men ingen svikt i evnen til å bestå testen med roterende stav ble observert.

Konklusjoner

Ved de foreliggende undersøkelser økte stoffet MRZ 2/705 etter utladningsterskelen kraftig for fullt oppflammede rotter. Med høyere doser reduserte dessuten testforbindelsen varigheten av anfallet, varigheten av etterutladningen og graden av anfallet som ble registrert ved ADT-strøm. Disse resultater

viser at MRZ 2/705 har en kraftig antikonvulsiv virkning og hemmer både initiering av anfall og spredning av anfall.

Med hensyn til forutsigbarheten ved oppflammings-modellen for påvisning av legemiddelvirkning mot kompleks-partielle anfall hos mennesker (SATO et al., 1990; Löscher og Schmidt, 1994), forutsier de foreliggende data en antikonvulsiv aktivitet av MRZ 2/705 ved tinningslapp-epilepsi. Videre frembrakte ikke forbindelsen alvorlige, ugunstige adferdsvirkninger i de testede doser, og den har således en gunstig profil med hensyn til bivirkninger.

Fig. 3 sammenfatter oppflammingsdataene ved forskjellige doser av testforbindelsen MRZ 2/705. Dataene er middelverdier ± SEM. De enkelte kurver gir resultater hva angår etterutladningsterskel (ADT), graden av anfall (SS), anfallets varighet (SD) og etterutladningens varighet (ADD).

Tegningene:

Figurene 1A og 1B viser verdier oppnådd for virkningene ifølge tabeller 1 og 2 ved bruk av MRZ 2/705.

Fig 2 viser verdier oppnådd for forskjellige nærbeslektede, men ikke-sykliske aminoforbindelser og MRZ 2/705 og for referansestandarder ved den spesifikke [^{3}H]-MK-801-bindingstest, avsatt som funksjon av konsentrasjonen.

Fig. 3 sammenfatter oppflammingsdataene for forskjellige doser av testforbindelsen MRZ 2/705.

Forbindelsene ifølge oppfinnelsen finner således anvendelse for behandling av forstyrrelser hos et levende dyr, spesielt et menneske, så vel med NMDA-indikasjoner som ved ikke-NMDA-indikasjoner, i tillegg til at de oppviser fremragende antikonvulsiv aktivitet og aktivitet mot anfall, slik det spesielt vises ved "oppflammings"-modellen.

Metoden for behandling av et levende dyrelegeme med en forbindelse ifølge oppfinnelsen for å lindre den utvalgte sykdom i denne, spesielt kramper eller anfall, utføres på en hvilken som helst anerkjent måte innen farmasien, ved bruk av den valgte dose som er effektiv for å lindre den gitte sykdom som det ønskes å lindre.

Anvendelse av forbindelsene ifølge oppfinnelsen for fremstilling av et legemiddel eller behandlingen av et levende dyr for å lindre den utvalgte sykdom, spesielt kramper eller anfall, foretas på den vanlige måte, omfattende det trinn å blande en effektiv mengde av en forbindelse ifølge oppfinnelsen med en farmasøytisk aksepterbar fortynner, eksipiens eller bærer, og behandlingsmetoden, de farmasøytiske preparater og anvendelsen av en forbindelse ifølge oppfinnelsen for fremstilling av et legemiddel er alle i henhold til redegjørelsene i søkerens tidligere publiserte WO 99/01416 for de beslektede 1-(ikke-syklisk amino)-forbindelser, og representative syreaddisjonssalter og fremgangsmåten for fremstilling av disse er også beskrevet i denne tidligere publiserte patentsøknad for de tilsvarende 1-(ikke-syklisk amino)-alkylsykloheksanforbindelser.

Representative farmasøytiske preparater fremstilt ved blanding av den aktive bestanddel med en egnet farmasøytisk aksepterbar eksipiens, fortynner eller bærer, innbefatter tabletter, kapsler, oppløsninger for injeksjon, væskeformige orale preparater, aerosolpreparater, TDS-preparater og nanopartikkelpreparater, hvilke legemidler således er egnet for oral administrering, injeksjon eller dermal administrering, hvilket også er i overensstemmelse med eksemplene på farmasøytiske preparater som er gitt i søkerens publiserte patentsøknad WO 99/01416 for de tilsvarende 1-(ikke-syklisk amino)-alkylsykloheksaner.

Et typisk farmasøytisk preparat fremstilles således ved å blande de følgende bestanddeler til et tablettpreparat inneholdende et 1-(syklisk amino)-sykloheksan ifølge oppfinnelsen som aktiv bestanddel.

Tablettpreparat

Et egnet preparat for en tablett inneholdende 10 mg aktiv bestanddel, er som følger:

	mg
Aktiv bestanddel	10
Laktose	63
Mikrokrystallinsk cellulose	21
Talkum	4
Magnesiumstearat	1
Kolloidalt silisiumdioksid	1

Det vil forstås at oppfinnelsen ikke skal anses å være begrenset i alle detaljer til de eksakte preparater, metoder, prosedyrer eller utførelsesformer som er vist og beskrevet, idet selvfølgelige modifikasjoner og ekvivalenter vil være åpenbare for en fagmann på området, og oppfinnelsen er derfor kun begrenset av den fulle rekkevidde som rettslig kan tilkjennes de vedheftede patentkrav.

REFERANSER:

Goddard, G.V., D.C. McIntyre og C.K. Leech, 1969, "A permanent change in brain function resulting from daily stimulation", Exp. Neurol. *25*:295-330.

Löscher, W. og D. Schmidt, 1994, "Strategies in antiepileptic drug development: Is rational drug design superior to random screening and structural variation?", Epilepsy Res. *17*:95-134.

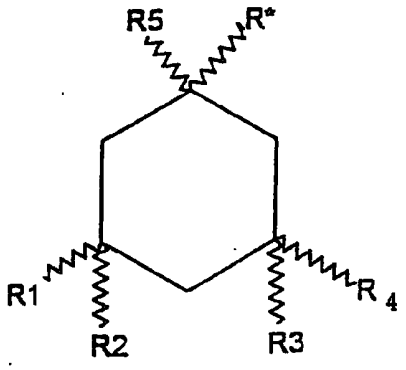
Racine, R.J., 1972, "Modification of seizure activity by electrical stimulation", II. Motor seizure Electroencephalograph. Clin. Neurophys. *32*:295-299.

Sato, M., R.J. Racine og D.C. McIntyre, 1990, "Kindling: Basic mechanisms and clinical validity", Electroencephalograph. Clin. Neurophys. *76*:459-472.

Se også: Ebert og Löscher, "Pathophysiology of the Kindling phenomenon: Implications for the development of new antiepileptic drugs", Neuroforum 3/99, s. 76.

Patentkrav

1. 1-(syklisk amino)-alkylsykloheksanforbindelser med den generelle formel:



hvor:
R* er $-(CH_2)_n-(CR^6R^7)_m-NR^8R^9$,
n+m er 0, 1 eller 2,
R^1-R^7 uavhengig av hverandre er valgt blant hydrogen og lavere alkyl (1-6C), idet minst R^1, R^4 og R^5 er lavere alkyl, og
R^8 og R^9 sammen betegner lavere alkylen, $-(CH_2)_x-$, hvor x er 2-5, grenseverdiene inkludert,
og enantiomerer, optiske isomerer, hydrater og farmasøytisk aksepterbare salter derav.

2. Forbindelse ifølge krav 1,
karakterisert ved at R^1-R^5 er metyl.

3. Forbindelse ifølge krav 1,
karakterisert ved at x er 4 eller 5.

4. Forbindelse ifølge krav 2,
karakterisert ved at x er 4 eller 5.

5. Forbindelse ifølge krav 1,
karakterisert ved at forbindelsen er valgt blant N-(1,3,3,5,5-pentametylsykloheksyl)-pyrrolidin og optiske isomerer, enantiomerer, hydrater og farmasøytisk aksepterbare salter av denne forbindelse.

6. Farmasøytisk preparat, k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter en effektiv mengde av en forbindelse ifølge krav 1 i kombinasjon med én eller flere farmasøytisk aksepterbare fortynnere, eksipienser eller bærere.

7. Farmasøytisk preparat ifølge krav 6, k a r a k t e r i s e r t v e d at den effektive mengde er en effektiv antikonvulsiv mengde.

8. Farmasøytisk preparat ifølge krav 6, k a r a k t e r i s e r t v e d at R^1-R^5 er metyl.

9. Farmasøytisk preparat ifølge krav 6, k a r a k t e r i s e r t v e d at x er 4 eller 5.

10. Farmasøytisk preparat ifølge krav 8, k a r a k t e r i s e r t v e d at x er 4 eller 5.

11. Farmasøytisk preparat ifølge krav 6, k a r a k t e r i s e r t v e d at forbindelsen er valgt blant N-(1,3,3,5,5-pentametylsykloheksyl)-pyrrolidin og optiske isomerer, enantiomerer, hydrater og farmasøytisk aksepterbare salter av denne forbindelse.

12. Anvendelse av et 1-(syklisk amino)-alkylsykloheksan ifølge kravene 1-5 for fremstilling av et legemiddel for behandling av et levende dyr, for lindring av kramper eller anfall.

13. Fremgangsmåte for fremstilling av en forbindelse ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter det trinn å omsette det tilsvarende 1-(fritt amino)-alkylsykloheksan med (1) et omega-halogenalkylnitril og syklisering av den resulterende N-(omega-cyanalkyl)-forbindelse til den tilsvarende 1-(syklisk amino)-alkylsykloheksanforbindelse eller med (2) en alfa,omega-dihalogenalkylforbindelse.