



NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **322432**

(13) **B1**

(51) Int Cl.

C07D 405/12 (2006.01)

C07D 307/79 (2006.01)

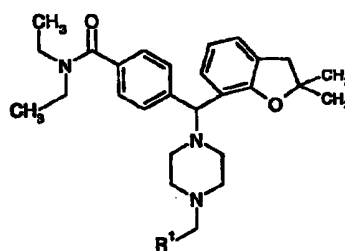
A61K 31/496 (2006.01)

A61P 25/04 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20022920	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2000.12.15 PCT/SE00/02562
(22)	Inng.dag	2002.06.18	(85)	Videreføringsdag	2002.06.18
(24)	Løpedag	2000.12.15	(30)	Prioritet	1999.12.20, SE, 9904674
(41)	Alm.tilgj	2002.07.22			
(45)	Meddelt	2006.10.02			
(73)	Innehaver	AstraZeneca AB, 15185 SÖDERTÄLJE, SE			
(72)	Oppfinner	William L Brown, c/o AstraZeneca R&D Montreal, 7171 Frederick-Banting, QCH4S1Z9 ST LAURENT, CA Christopher Walpole, c/o AstraZeneca R&D Montreal, 7171 Frederick-Banting, QCH4S1Z9 ST LAURENT, CA			
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, NO			
(54)	Benevnelse	Nye forbindelser, deres anvendelse og farmasøytiske sammensetninger som omfatter de nye forbindelsene			
(56)	Anførte publikasjoner	D1: WO 98/28270 A1			
(57)	Sammendrag				

Forbindelser med generell formel (I), der R^1 er valgt fra feny, pyridinyl, tiofenyl, furanyl, imidazolyl og tiazolyl; der hver R^1 -fenylring og R^1 -heteraromatisk ring eventuelt, og uavhengig av hverandre, kan være ytterligere substituert med 1, 2 eller 3 substituenten valgt fra rettkjedet eller C_{1-6} -alkyl, NO_2 , CF_3 , C_{1-6} -alkoksy, klor, fluor, brom og jod.



Den foreliggende oppfinnelsen er rettet på nye forbindelser, deres anvendelse og farmasøytiske sammensetninger som omfatter de nye forbindelsene. De nye forbindelsene er nyttige ved terapi, og særlig ved behandling av smerte.

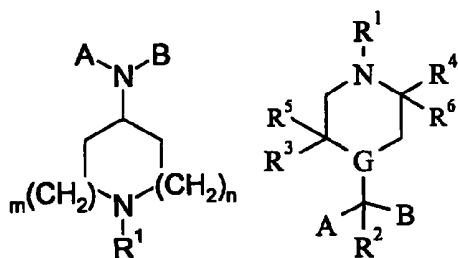
- 5 δ -reseptoren er definert som å spille en rolle ved mange kroppslige funksjoner slik som i kretsløp- og smertesystemer. Ligander for δ -reseptoren kan derfor ha potensiell anvendelse som smertestillende midler og/eller som antihypertensiva. Ligander for δ -reseptoren har også vist seg å ha immunmodulerende aktiviteter.
- 10 Identifiseringen av minst 3 forskjellige populasjoner av opioidreseptorer (μ , δ og κ) er nå godt etablert, og alle tre er tydelige i både sentral- og perifer nervesystemene hos mange arter, inkludert mennesket. Smertestillende midler er observert i forskjellige dyremodeller når en eller flere av disse reseptorene er blitt aktivert.
- 15 Med få unntak er selektive opioid- δ -ligander som i dag er tilgjengelige av peptidisk natur og er uegnede for administrering ved systemiske ruter. Et eksempel på en ikke-peptidisk δ -agonist er SNC80 (Bilsky E.J. et al., Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 273(1), s. 359-366 (1995)). Det er imidlertid fremdeles et behov for selektive δ -agonister som ikke bare har forbedret selektivitet, men også en
- 20 forbedret bivirkningsprofil.

Således var problemet bak foreliggende oppfinnelse å finne nye smertestillende midler med forbedrede smertestillende effekter, men også med en forbedret bivirkningsprofil i forhold til dagens μ -agonister, så vel som forbedret systemisk yteevne.

- 25 Smertestillende midler er blitt identifisert og slik de foreligger i den tidligere kjente teknikk, har de mange ulemper ved at de har dårlig farmakokinetikk og ikke er smertestillende når de administreres ved systemiske ruter. Det er også dokumentert at foretrukne δ -agonistforbindelser, som beskrevet innenfor den tidligere kjente teknikk viser
- 30 signifikante krampeaktive effekter når de administreres systemisk.

- Vi har nå funnet at visse forbindelser som ikke spesifikt er beskrevet her, men som er inkludert innenfor omfanget av WO 98/28270 og WO 97/23466 (deres generiske strukturer er vist nedenfor) fremviser overraskende forbedrede δ -agonistegenskaper og
- 35 *in vivo*-innflytelse relativt til forbindelser som er beskrevet i WO 98/28270 og WO 97/23466 når de administreres systemisk. Forbindelsene ifølge den foreliggende

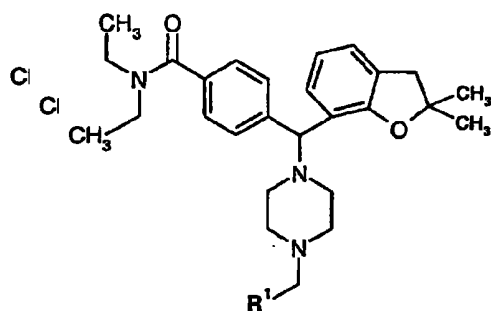
oppfinnelsen fremviser signifikant og uventet økte nivåer av δ -reseptoragonisme og metabolsk stabilitet.



WO 98/28270 ; WO 97/23466

5

Ifølge foreliggende oppfinnelsen er det tilveiebrakt nye forbindelser som er definert ved formel I



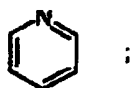
der

10 R^1 er valgt fra:

(i) fenyl; og

(ii) pyridinyl;

15



der hver R¹-fenyling og R¹-heteroaromatisk ring eventuelt og uavhengig av hverandre kan være ytterligere substituert med 1, 2 eller 3 substituenten valgt fra rettkjedet og forgrenet C₁₋₆-alkyl, NO₂, CF₃, C₁₋₆-alkoksy, klor, fluor, brom og jod, der substitusjonene på fenylingen og på den heteroaromatiske ringen kan finne sted i enhver posisjon på ringsystemene, så vel som farmasøytisk akseptable salter derav.

Når fenylingen og de heteroaromatiske ring(ene) er substituerte er de foretrukne substituentene valgt fra en hvilken som helst av NO₂, isobutyl, CF₃, metyl eller klor.

De nye forbindelsene ifølge den foreliggende oppfinnelsen er nyttige ved terapi, spesielt ved behandling av forskjellige smertetilstander slik som kronisk smerte, neuropatisk smerte, akutt smerte, cancersmerte, smerte forårsaket av reumatoid artritt, migrene, magesmerte etc. Denne listen skal imidlertid ikke tolkes som uttømmende.

Forbindelsene ifølge oppfinnelsen er anvendelige som immunmodulatorer, spesielt for autoimmune sykdommer, for hudtransplantasjoner, organtransplantasjoner og lignende kirurgiske behov for collagene sykdommer, forskjellige allergier, for anvendelse som antitumormidler og antivirale midler.

Forbindelsene ifølge oppfinnelsen er nyttige ved sykdomstilstander der degenerering eller dysfunksjon av opioidreseptorer er i stedet eller implisert i dette mønster. Dette kan involvere anvendelsen av isotopisk merkede versjoner av forbindelsene ifølge oppfinnelsen, ved diagnostiske teknikker og bilde-dannelsesapplikasjoner slik som positrons emisjonstomografi (PET).

Forbindelsene ifølge oppfinnelsen er anvendelige ved behandling av diaré, depresjon, angst, urininkontinens, forskjellige mentalsykdommer, hoste, lungeødem, forskjellige gastrointestinale forstyrrelser, spinalskader og narkotikaavhengighet, inkludert behandling av alkohol-, nikotin-, opioid- og annet rusmisbruk og for forstyrrelser i det sympatiske nervesystemet, for eksempel hypertensjon.

Forbindelsene ifølge oppfinnelsen er nyttige som smertestillende middel for anvendelse under generell anestesi og kontrollert anestesiomsorg. Kombinasjoner av midler med forskjellige egenskaper blir ofte benyttet for å oppnå en balanse av effekter som er nødvendig for å opprettholde den bedøvede tilstanden (for eksempel amnesi (hukommelsestap), analgesi (smertefrihet), muskelavslapping og sedasjon). Inhalerte

smertestillende midler, hypnotiserende midler, angstdempende midler, neuromuskulære blokkeringsmidler og opioider er inkludert i denne kombinasjonen.

5 Ifølge oppfinnelsen er det således tilveiebrakt anvendelse av en hvilken som helst av forbindelsene med formel I over, til fremstilling av et medikament for behandling av en hvilken som helst av tilstandene diskutert over.

Oppfinnelsen tilveiebringer også en farmasøytisk sammensetning som omfatter en forbindelse med formel I som definert ovenfor som en aktiv ingrediens, sammen med en
10 farmakologisk og farmasøytisk akseptabel bærer.

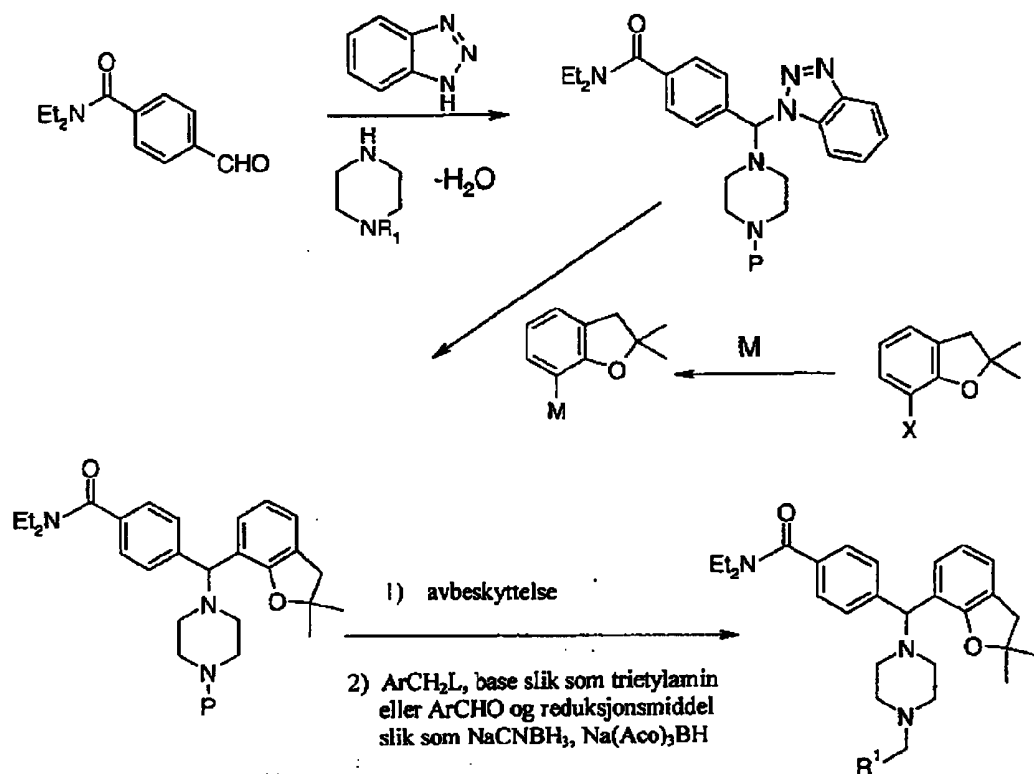
Ethvert nytt mellomprodukt som er beskrevet i Skjema I nedenfor, som kan anvendes ved syntese av forbindelser med formel I over er også inkludert innenfor omfanget av den foreliggende oppfinnelsen.

15

FREMGANGSMÅTER TIL FREMSTILLING

Forbindelsene ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan fremstilles ved den følgende syntetiske prosedyren som er beskrevet i skjema I nedenfor. Denne kjente prosedyren er beskrevet i Katritsky, A.R. Lan, X. Chem. Soc. Rev., s. 363-373 (1994), som her er
20 innarbeidet ved referanse.

Skjema I



P = en beskyttelsesgruppe slik som Bn, Boc, CBz

M = Li, Mg, Zn

5 X = Br, I

L = Cl, Br, OMs, OTs, I

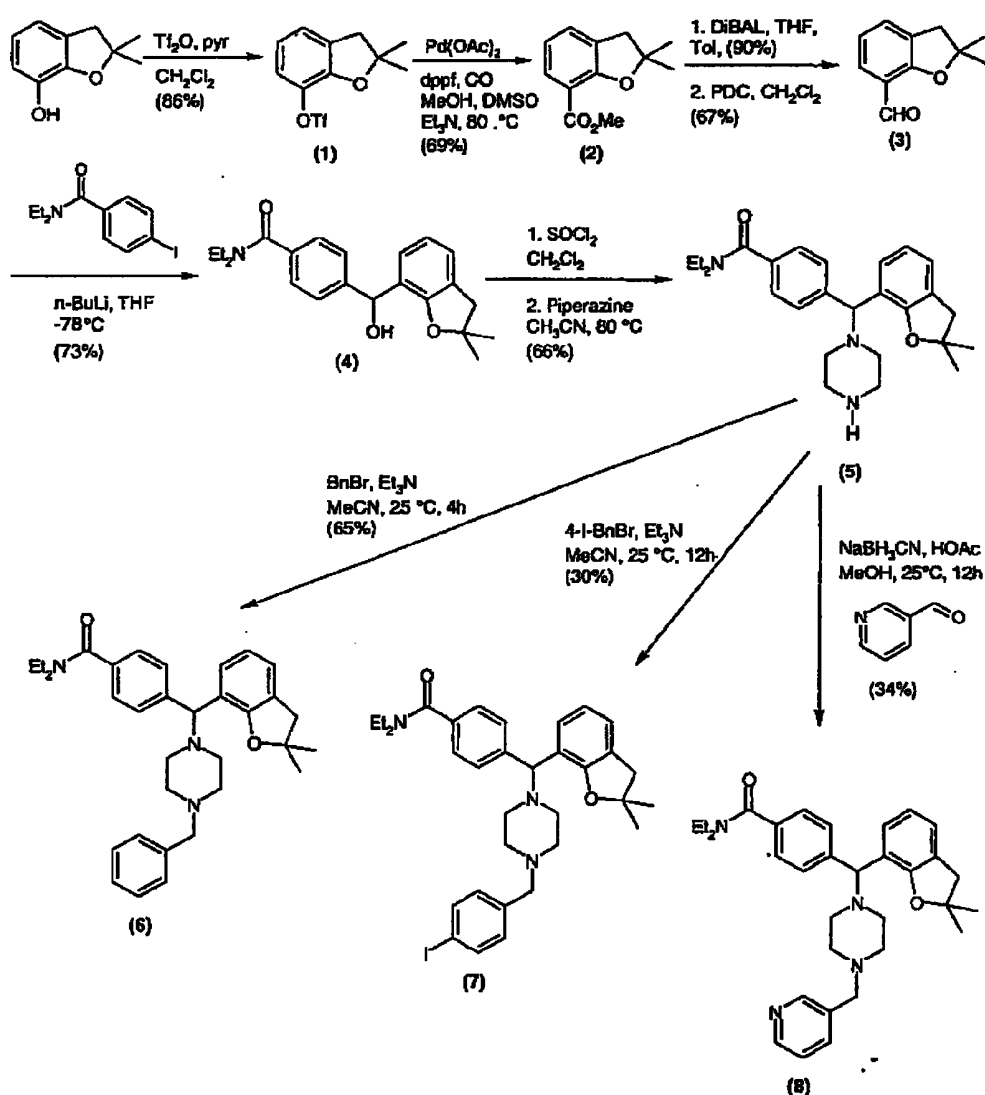
R¹ = som definert i formel (I) over

EKSEMPLER

- 10 Oppfinnelsen vil nå bli beskrevet i mer detalj med de følgende eksemplene, som ikke skal anses som begrensende for oppfinnelsen.

Forbindelsene ifølge Eksempel 1-3 ble fremstilt ifølge den syntetiske prosedyren som er beskrevet i Skjema 1 nedenfor.

Skjema 1



Eksempel 1

Fremstilling av 4-[(4-benzyl-1-piperazinyl)(2,2-dimetyl-2,3-dihydro-1-benzofuran-7-yl)metyl]-N,N-dietylbenzamiddihydroklorid (forbindelse 6)

(i) Fremstilling av 2,2-dimetyl-2,3-dihydro-1-benzofuran-7-yl-trifluormetansulfonat (forbindelse 1)

2,2-dimetyl-2,3-dihydro-1-benzofuran-7-ol (19 g, 0,11 mol) og pyridin (18 ml, 0,23 mol) ble oppløst i CH_2Cl_2 evd 0 °C. Triflicanhydrid (trifluormetansulfonsyreanhydrid) (23 ml, 0,14 mol) ble tilsatt dråpevis. Etter røring i 1 time ved 25 °C ble blandingen

fortynnet med CH_2Cl_2 og vasket med HCl (aq.), tørket (MgSO_4) og fordampet under vakuum.

Utbytte 32 g (96%) av forbindelse 1, som ikke behøvde renses, men som ble benyttet direkte i det påfølgende trinnet.

^1H NMR (CDCl_3) δ 1,50 (s, 6H), 3,09 (s, 2H), 6,81 (m, 1H), 7,03 (m, 1H), 7,11 (m, 1H), MS (EI) m/e 296, 163, 135, 107.

(ii) Fremstilling av metyl 2,2-dimetyl-2,3-dihydro-1-benzofuran-7-karboksylat (forbindelse 2)

Forbindelse 1 fremstilt det det forutgående trinnet over (32 g, 0,11 mol) ble oppløst i DMSO (200 ml), MeOH (100 ml) og Et_3N (34 ml, 0,25 mol). Karbonmonoksid ble ført gjennom løsningen i 2-3 minutter og deretter ble palladiumacetat (0,24 g) og dppf (1,1 g) tilsatt og blandingen ble varmet ved 70°C ved CO-atmosfære. Etter 4 timer ble mer palladiumacetat (0,10 g) og dppf (0,50 g) tilsatt. Etter 12 timer ble EtOAc og vann tilsatt og den organiske fasen ble vasket med HCl (aq.), saltoppløsning, tørket (MgSO_4) og fordampet. Kromatografi på silika (0-20% EtOAc i heptan) ga 12 g (52%) av forbindelse 2.

^1H NMR (CDCl_3) δ 1,52 (s, 6H), 3,00 (s, 2H), 3,88 (s, 3H), 6,82 (m, 1H), 7,27 (m, 1H), 7,70 (m, 1H), MS (EI) m/e 206, 174, 159, 146, 131.

(iii) Fremstilling av 2,2-dimetyl-2,3-dihydro-1-benzofuran-7-karbaldehyd (forbindelse 3)

Forbindelse 2 (5,0 g, 24 mmol) ble oppløst i toluen (100 ml) og DIBAL i toluen (33 ml, 1,5 M, 50 mmol) og ble tilsatt ved -78°C under en nitrogenatmosfære. Etter 30 minutter ble reaksjonen opparbeidet ved tilsetning av HCl (aq.), den organiske fasen ble tørket (MgSO_4) og fordampet under vakuum. Resten ble oppløst i CH_2Cl_2 (50 ml) og finmalt pyridiniumdikromat (PDC) (11 g, 29 mmol) ble tilsatt i porsjoner. Blanding ble oppvarmet ved 40°C og porsjoner av PDC (1 g) ble tilsatt inntil reaksjonen var fullført. Fortynning med heptan, filtrering gjennom silika og fordampning ga et råprodukt som ble renses ved kromatografi på silika (0-20% EtOAc i heptan) for å gi forbindelse 3 (3,3 g, 19 mmol), 67% fra forbindelse 2.

^1H NMR (CDCl_3) δ 1,54 (s, 6H), 3,03 (s, 2H), 6,88 (m, 1H), 7,34 (m, 1H), 7,58 (m, 1H), 10,22 (s, 1H). MS (EI) m/e 176, 161, 147, 130.

(iv) & (v) Fremstilling av 4-[(2,2-dimetyl-2,3-dihydro-1-benzofuran-7-yl)(hydroksy)metyl]-N,N-dietylbenzamid (forbindelse 4) og 4-[(2,2-dimetyl-2,3-dihydro-1-benzofuran-7-yl)(1-piperaziny)metyl]-N,N-dietylbenzamid (forbindelse 5)

N,N-dietyl-4-jodbenzamid (forbindele I) (14 g, 47 mmol) ble oppløst i THF (150 ml) og
 5 avkjølt til -78°C under en nitrogenatmosfære. n-BuLi (21 ml, 2,2M løsning i heksan, 47 mmol) ble tilsatt dråpevis. Røring ble opprettholdt i 30 minutter ved -78°C . Aldehydet (forbindelse 3) (4,1 g, 24 mmol) ble tilsatt dråpevis oppløst i THF (2 ml). NH_4Cl (aq.) ble tilsatt etter 30 minutter. Etter konsentrasjon under vakuum, ekstraksjon med EtOAc/vann, tørking (MgSO_4) og fordamping av den organiske fasen, ble resten renset
 10 ved kromatografi på silika til (forbindelse 4) (6,1 g, 17 mmol). Etter behandling med SOCl_2 (1,5 ml, 20 mmol) i tørr CH_2Cl_2 (200 ml) ved $0-25^{\circ}\text{C}$ i 1 time, ble løsningsmiddelet fordampet under vakuum. Resten ble oppløst i MeCN (100 ml) og reagert med piperazin (5,8 g, 68 mmol) ved 80°C i 12 timer. Etter konsentrasjon under vakuum og kromatografi på silika (0-15% MeOH i CH_2Cl_2 , med 1% NH_4OH) ble
 15 (forbindelse 5) (4,9 g, 11 mmol) oppnådd. Dihydroklorid ble fremstilt med HCl (aq.) og lyofilisering.

Smp. $13+-40^{\circ}\text{C}$ (di-HCl-salt).

IR (KBr, ν_{max}) 2982, 2722, 241, 1628, 1450, 1371, 1292, 1140.

^1H NMR (CD_3OD) δ 1,1, 1,2 (2m, 6H), 1,36, 1,43 (2s, 6H), 2,72 (m, 4H), 2,95 (m, 2H),
 20 3,25 (m, 6H), 3,5 (m, 2H), 4,8 (s, 1H), 6,74-7,60 (m, 7H).

Anal. ($\text{C}_{26}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_3$) C, H, N.

(vi) Fremstilling av tittelforbindelsen 4[(4-benzyl-1-piperaziny)(2,2-dimetyl-2,3-dihydro-1-benzofuran-7-yl)metyl]-N,N-dietylbenzamid dihydroklorid (forbindelse 6)

25 Forbindelse 5 (0,62 g, 1,5 mmol) og trietylamin (0,41 ml, 2,9 mmol) ble oppløst i MeCN (5 ml) og reagert med benzylbromid (0,17 ml, 1,5 mmol) ved 25°C . Etter 2 timer ble en andre porsjon benzylbromid tilsatt og etter 4 timer ble reaksjonen opparbeidet ved konsentrasjon under vakuum og kromatografi på silika (0-10% MeOH i CH_2Cl_2) til å gi tittelforbindelsen 6 (0,49 g, 0,95 mmol). Dihydrokloridet ble fremstilt med HCl (aq.)
 30 og lyofilisering.

MS (ES) 512,08 (MH⁺).

IR (NaCl, fritt amin, ν_{max}) 2969, 2806, 2360, 1630, 1451, 1368, 1289, 1135 cm^{-1} .

^1H NMR (CDCl_3 , fritt amin) δ 1,1, 1,2 (2m, 6H, amid-Me), 1,36, 1,46 (2s, 6H, Me2C),
 2,5 (m, 8H, piperazin-H), 2,92 (m, 2H, ArCH₂), 3,2, 3,5 (2m, amid-CH₂), 3,51 (s, 2H,
 35 ArCH₂N), 4,62 (s, 1H, AR₂CH), 6,72-7,52 (m, 7H, Ar-H).

Anal. ($\text{C}_{33}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_2 \times 3,4 \text{ HCl}$) C, H; N: beregnet: 6,61; funnet: 7,19.

EKSEMPEL 2**Fremstilling av 4-((2,2-dimetyl-2,3-dihydro-1-benzofuran-7-yl)[4-(4-jodbenzyl)-1-piperazinyll]metyl)-N,N-dietylbenzamiddihydroklorid (forbindelse 7)**

Fremgangsmåte som for forbindelse 6. Forbindelse 5 (0,12 g, 0,29 mmol) ble reagert

- 5 med 4-jodbenzylbromid (96 mg, 0,32 mmol) i 48 timer for å gi tittelforbindelsen 7 (56 mg, 88 μ mol).

MS (ES) 638,24 (MH⁺).

IR (NaCl, fritt amin, $\nu_{\max}$) 2969, 2810, 1630, 1451, 1288, 1135, 1007 cm^{-1} .

- ¹H NMR (CDCl₃, fritt amin) δ 1,1, 1,2 (2m, 6H, amid-Me), 1,36, 1,45 (2s, 6H, Me₂C),
 10 2,4 (m, 8H, piperazin-H), 2,94 (m, 2H, ArCH₂), 3,2, 3,5 (2m, amid-CH₂), 3,43 (s, 2H, ArCH₂N), 4,62 (s, 1H, AR₂CH), 6,73 (m, 1H, Ar-H), 6,94 (d, J=7,3 Hz, 1H, ArH), 7,05 (d, J=8,0 Hz, 2H, ArH), 7,19 (d, J=6,6 Hz, 1H, ArH), 7,25 (d, J=8,0 Hz, 2H, ArH), 7,48 (d, J=8,0 Hz), 2H, ArH), 7,61 (d, J=8,0 Hz, 2H, ArH).

Anal. (C₂₆H₃₇Cl₂N₃O₂) C, H, N.

15

EKSEMPEL 3**Fremstilling av 4-((2,2-dimetyl-2,3-dihydro-1-benzofuran-7-yl)[4-(3-pyridinylmetyl)-1-piperazinyll]metyl)-N,N-dietylbenzamiddihydroklorid (forbindelse 8)**

- 20 Forbindelse 5 (0,20 g, 0,47 mmol) ble oppløst i MeOH (2 ml) med 3-pyridinkarboksaldehyd (90 μ l, 0,95 mmol) og HOAc (3 μ l, 50 μ mol).

- Natriumcyanoborhydrid (60 mg, 0,95 mmol) ble tilsatt ved 0°C og reaksjonen ble rørt i 48 timer ved 25°C. Reaksjonen ble opparbeidet ved konsentrasjon under vakuum, ekstraksjon (CH₂Cl₂/K₂CO₃(aq.)) og kromatografi p silika (0-10% MeOH i CH₂Cl₂) til å
 25 gi tittelforbindelsen 8 (82 mg, 0,16 mmol). Dihydroklorid ble fremstilt med HCl (aq.) og lyofilisering.

MS 513,25 (MH⁺).

IR (NaCl, fritt amin, $\nu_{\max}$) 2970, 2808, 2360, 1631, 1452, 1425, 1290, 1135, 1096, 1009 cm^{-1} .

- ¹H NMR (CDCl₃, fritt amin) δ 1,1, 1,2 (2m, 6H, amid-Me), 1,36, 1,46 (2s, 6H, Me₂C),
 30 2,5 (m, 8H, piperazin-H), 2,94 (m, 2H, ArCH₂), 3,2, 3,5 (2m, amid-CH₂), 3,51 (s, 2H, ArCH₂N), 4,64 (s, 1H, AR₂CH), 6,72-7,66 (m, 9H, Ar-H), 8,44-8,54 (m, 2H, Ar-H).

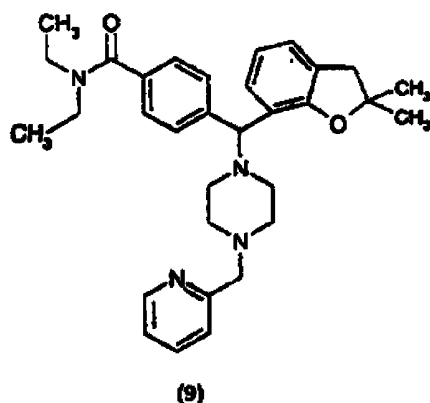
Anal. (C₃₂H₄₂Cl₂N₄O₂) C, H, N.

35

EKSEMPEL 4

Fremstilling av 4-((2,2-dimetyl-2,3-dihydro-1-benzofuran-7-yl)[4-(2-pyridinylmetyl)-1-piperazinyl]metyl)-N,N-dietylbenzamidditrifluoracetat (forbindelse 9)

5



Tittelforbindelsen 9 ble fremstilt ved oppløsning av forbindelse 5 (0,45 g, 0,98 mmol) i MeOH (10 ml) med 2-pyridinkarboksaldehyd (110 µl, 1,18 mmol) og HOAc (3 µl, 50 µmol). Natriumcyanoborhydrid (70 mg, 1,18 mmol) ble tilsatt ved 0°C og reaksjonen ble rørt i 48 t ved 25°C. Reaksjonen ble opparbeidet ved konsentrasjon under vakuum, ekstraksjon (CH₂Cl₂/K₂CO₃(aq.)) og kromatografi på reversfase HPLC ti å gi tittelforbindelsen 9, 461 mg (63%).
MS 513,04 (MH⁺).

15

FARMASØYTISKE SAMMENSETNINGER

De nye forbindelsene ifølge den foreliggende forbindelsen kan administreres oralt, intramuskulært, subkutant, topisk, intranasalt, intraperitonealt, intratoraksialt, intravenøst, epiduralt, intratekalt, intracerebroventrikulært og ved injeksjon i leddene.

20

En foretrukket administreringsrute er oral, intravenøs eller intramuskulær.

Doseringen vil avhenge av administreringsruten, alvorligheten av sykdommen, alderen og vekten til pasienten og andre faktorer som normalt vurderes av den behandlende legen ved bestemmelse av de individuelle regimet og doseringsnivå som er det ment passende for den aktuelle pasient.

25

Ved fremstilling av farmasøytiske sammensetninger fra forbindelsene ifølge denne oppfinnelsen kan inerte, farmasøytisk akseptable bærere enten være fast eller flytende form. Fastform preparater inkluderer pulvere, tabletter, dispergerbare granulater, kapsler, ampuller og stikkpiller.

5

En bærer på fastform kan være en eller flere substanser som også kan fungere som fortynningsmidler, smaksmidler, oppløsningsmidler, smøremidler, suspensjonsmidler, bindemidler eller tabletdisintegreringsmidler; og det kan også være et innkapslende materiale.

10

I pulvere er bæreren et finfordelt faststoff som er i en blanding med den finfordelte aktive komponenten. I tabletter er den aktive komponenten blandet med bæreren som har de nødvendige bindingsegenskapene i passende porsjoner og sammenpresset i den ønskede form og størrelse.

15

For fremstilling av stikkpillesammensetninger blir det et lavsmeltende voks, slik som en blanding av fettsyreglyserider og kakaosmør først smeltet og den aktive ingrediensen dispergeres deri ved for eksempel røring. Den smeltede homogene blandingen blir deretter helt over i støpeformer av passende størrelse og avkjølt og størknet.

20

Egnede bærere er magnesiumkarbonat, magnesiumstearat, talkum, laktose, sukker, pektin, dekstrin, stivelse, tragant, metylcellulose, natriumkarboksymetylcellulose, et lavt smeltende voks, kakaosmør og lignende.

25

Farmasøytisk akseptable salter er acetat, benzensulfonat, benzoat, bikarbonat, bitartrat, bromid, kalsiumacetat, kamsylat, karbonat, klorid, citrat, dihydroklorid, edetat, edisylat, estolat, esylat, fumarat, glykaptat, glukonat, glutamat, glykolyarsanilat, heksylresorcinat, hydrabamin, hydrobromid, hydroklorid, hydroksynaftoat, jodid, isetionat, laktat, laktobionat, malat, maleat, mandelatmesylat, metylbromid, metylnitrat,

30

metylsulfat, mukat, napsylat, nitrat, pamoat (embonat), pantotenat, fosfat(difosfat, polygalakturonat, salicylat, stearat, subacetat, suksinat, sulfat, tannat, tartrat, teoklat, trietijodid, benzatin, klorprokain, cholin, dietanolamin, etylendiamin, meglumin, prokain, aluminium, kalsium, litium, magnesium, kalium, natrium og sink. Foretrukne farmasøytisk akseptable salter er hydrokloridene og bitartratene. Hydrokloridsaltene er

35

spesielt foretrukne.

Betegnelsen sammensetning er ment å inkludere formuleringen av den aktive komponenten med innkapslende materiale som en bærer, hvilket frembringer en kapsel der den aktive komponenten (med eller uten andre bærere) er omgitt av en bærer som således er i forbindelse med den. På lignende måte er ampuller inkludert.

5

Tabletter, pulvere, ampuller og kapsler kan anvendes som faste doseringsformer som er egnet for oral administrering.

Sammensetninger i flytende form inkluderer oppløsninger, suspensjoner og emulsjoner.

10

Sterilt vann eller vannpropylenglykolløsninger av de aktive forbindelsene kan nevnte som et eksempel på flytende preparater som er egnet for parenteral administrering. Flytende sammensetninger kan også formuleres i løsning i vandig polyetylenglykol-løsning.

15

Vandige løsninger for oral administrering kan fremstilles ved å oppløse den aktive komponenten i vann og tilsette egnede fargestoffer, smaksstoffer, stabiliserende midler og fortykningsmidler som ønsket. Vandige suspensjoner for oral bruk kan fremstilles ved å dispergere den finfordelte aktive komponenten i vann sammen med et viskø materiale slik som naturlige syntetiske gummier, harpikser, metylcellulose, natrium-

20

karboksymetylcellulose og andre suspensjonsmidler som er kjent innenfor det farmasøytiske formuleringsområdet.

Foretrukket er de farmasøytiske sammensetningene på enhetsdoseringsform. På slik form fordeles sammensetningen i enhetsdoser som inneholder passende mengder av den aktive komponenten. Enhetsdoseringsformen kan være et innpakket preparat, der

25

pakningen inneholder adskilte mengder av preparatene, for eksempel innpakkede tabletter, kapsler og pulvere i flasker eller ampuller. Enhetsdoseringsformen kan også være en kapsel, ampulle eller tablett i seg selv. Eller den kan være det passende antallet av en hvilken som helst av disse innpakkede formene.

30

BIOLOGISK EVALUERING

***In vitro* modell**

Cellekultur

Humane 293S-celler som uttrykker klonet human μ , δ og κ -reseptorer og

35

neomycinresistens ble dyrket i en suspensjon ved 37°C og 5% CO₂ i en ristekolbe som inneholdt kalsiumfritt DMEM 10% FBS, 5% BCS, 0,1% Pluronic F-68 og 600 µg/ml geneticin.

Membranfremstilling

Celler ble pelletert og resuspendert i lysebuffer (50 mM Tris, pH 7,0, 2,5 mM EDTA med PMSF tilsatt rett før bruk til 0,1 mM fra en 0,1 M stamløsning i etanol) inkubert på is i 15 minutter, deretter homogenisert med en plytron i 30 sekunder. Suspensjonen ble rotet ved 1000 g (maks) i 10 min ved 4°C. Supernatanten ble samlet opp på is og pelletene ble resuspendert og rotet som tidligere. Supernatantene fra begge rotasjonsprosedyrene ble forenet og rotet ved 46.000 g (maks) i 30 min. Pellettene ble resuspendert i kald Tris-buffer (50 mM Tris/Cl, pH 7,0) og rotet igjen. De endelige pellettene ble resuspendert i membranbuffer (50 mM Tris, 0,32 M sukrose, pH 7,0). Allikoter (1 ml) i polypropylenrør ble fryst ned i tørris/etanol og lagret ved -70°C frem til anvendelse. Proteinkonsentrasjonene ble bestemt ved et modifisert Lowry assay med SDS.

15 Bindingsassay

Membraner ble opptint ved 37°C, avkjølt på is, ført 3 ganger gjennom en 25-målesprøyte og fortynnet i bindingsbuffer (50 mM Tris, 3 mM MgCl₂, 1 mg/ml BSA (Sigma A-7888), pH 7,4, som ble lagret ved 4°C etter filtrering gjennom et 0,22 µm filter, og hvortil nylige 5 µg/ml aprotinin, 10 µM bestatin, 10 µM diprotin A, intet DTT) var tilsatt. Allikvoter på 100 µl (for µg protein, se Tabell 1) ble tilsatt til isavkjølte 12 x 75 mm polypropylenrør som inneholdt 100 µl av den passende radioliganden (se Tabell 1) og 100 µl av testpeptider ved varierende konsentrasjoner. Total (TB) og ikke-spesifikk (NS) ble henholdsvis bestemt i fravær og nærvær av 10 µM nalokson. Rørene ble rotet og inkubert ved 25°C i 60-75 min, hvorefter inneholdende raskt blir vakuumbfiltrert og vasket med omtrent 12 ml/rør isvasket buffer (50 mM Tris, pH 7,0, 3 mM MgCl₂) gjennom GF/B filtre (Whatman) som var forhåndsneddykket i minst 2 t i 0,1% polyetylenimin. Radioaktiviteten (dpm) som ble bibeholdt på filterene ble målt med en β-teller etter nedsenking av filterne i minst 12 t i miniflasker som inneholdt 67 ml scintillasjonsfluid. Dersom assayet settes opp i 96-plasserte dypbrønnsplater foregår filtreringen over 96-plasserte PEI-gjennomdykkede unifiltre som ble vasket med 3 x 1 ml vaskebuffer og tørket i en ovn ved 55°C i 2 timer. Filterplatene ble talt opp på en TopCount (Packard) etter tilsetning av 50 µl MS-20 scintillasjonsfluid/brønn.

Data analyse

35 Den spesifikke bindingen (SB) ble beregnet som TB-NS og SB i nærvær av forskjellige testpeptider ble uttrykt som prosent av kontroll SB. Verdier for IC₅₀ og Hill koeffisient (n_H) for ligander ved utskriftning av spesifikt bundet radioligand ble beregnet fra logit

plots eller kurvetilpasningsprogrammer slik som Ligand, GraphPad Prism, SigmaPlot eller ReceptorFit. Verdier for K_i ble beregnet fra Cheng-Prusoff ligningen.

Gjennomsnittlige $\pm$ S.E.M.-verdier (standardavvik) for IC_{50} , K_i og n_H ble rapportert for ligander testet i minst tre forskyvningskurver. Biologiske data er rapportert nedenfor i

5 Tabell 1.

Eks #	H Delta	HDelta		Rottehjerne		Musehjerne		MLM		RLM	
		EC50	% EMAX	EC50	% EMAX	EC50	% EMAX	10000 % rem.	100000 % rem.	10000 % rem.	100000 % rem.
3	3,519	19,47	103,1	133,72	92,97						
4	3,264	7,38	103,9	72,59	118,04	144,13	118,5	44,5	93	42,5	90,5

Tabell 1 Oppsummering av biologiske data.

Reseptormetningseksperimenter

- 10 Radioligand K_D -verdier ble bestemt ved å utføre bindingsassayet på cellemembraner med de passende radioligandene ved konsentrasjoner som strekker seg fra 0,2 til 5 ganger den estimerte K_D (opp til 10 ganger dersom mengder av radioligand som er nødvendig er mulige). Den spesifikke radioligandbindingen ble uttrykt som pmol/mg membranprotein. Verdier av K_D og B_{max} fra individuelle eksperimenter ble oppnådd fra
- 15 ikke-lineære tilpasninger av spesifikk binding (B) mot nM fritt (F) radioligand fra individuelle ifølge en en-stedsmodell.

Bestemmelse av mekano-allodynia ved å benytte von Frey testing

- Testingen ble utført mellom 08:00 og 16:00 ved å benytte fremgangsmåten beskrevet av
- 20 Chapland et al, (1994). Rotter ble plassert i plexiglassbur på toppen av en tråddukbunt som tillater tilgang for poten og ble hensatt for tilvending i 10-15 min. Arealet som ble testet var midtfotsålen av den venstre bakpoten for å unngå de mindre sensitive fotsonene. Potene ble berørt med en serie på 8 von Frey hår med lagritmisk voksende stivhet (0,41, 0,69, 1,20, 2,04, 3,63, 5,50, 8,51 og 15,14 gram; Stoelting, III, USA). Von
- 25 Frey håret ble brukt fra undersiden av trådristgulvet, vinkelrett på fotsåleoverflaten med tilstrekkelig kraft til å forårsake en svak krumming mot poten og holdes der i tilnærmet 6-8 sek. En positiv respons ble notert dersom poten ble trekt skarpt tilbake. Unnvikelse umiddelbart ved fjerning av håret ble også ansett som en positiv respons. Vandring ble betraktet som en uklar respons og ved slike tilfeller ble stimulansen gjentatt.

Testprotokoll

Dyrene ble testet på postoperativ dag 1 med hensyn til den FCA-behandlede gruppen. 50% tilbaketrekningsterskelen ble bestemt ved å benytte opp-ned metoden ifølge Dixon (1980). Testingen ble startet med 2,04 g hår i midten av serien. Stimulansene ble alltid presentert på en etterfølgende måte, enten oppstigende eller nedstigende. I fravær av en potetiltrekningrespons mot det initielt utvalgte håret, ble en sterke stimulans presentert; ved tilfellet av potetiltrekning ble den neste svakere stimulasen valgt. Optimal terskelberegning ved denne metoden krever 6 responser i den umiddelbare nærheten av 50%-terskelen og opptelling av disse 6 responsene begynte når den første forandringen i respons forekom, for eksempel når terskelen først ble overtrådt. Ved tilfeller der terskelen falt utenfor stimulansområdet, ble verdier på 15,14 (normal sensitivitet) eller 0,41 (maksimal allodyni) henholdsvis angitt. Det oppnådde mønsteret av positive og negative responser ble satt opp i tabellform ved å benytte X = ingen tiltrekning, O = tiltrekning, og 50% tiltrekningsterskelen ble interpolert ved å benytte formelen:

$$50\% \text{ g terskel} = 10^{(X_f + k_g)} / 10.000$$

der X_f = verdi for det siste von Frey-håret som ble benyttet (logg-enheter); k = tabellverdi (fra Chaplan et al. (1994)) for mønsteret for positive/negative responser; og δ = gjennomsnittlig differanse mellom stimulanser (logg-enheter): Her $\delta = 0,224$.

Von Frey-terskelen ble omdannet til prosent av maksimal mulig effekt (% MPE) ifølge Chaplan et al., 1994. Den følgende ligningen ble benyttet for å beregne % MPE:

$$\% \text{ MPE} = \frac{\text{Legemiddelbehandlet terskel (g)} - \text{allodyn timerskel (g)}}{\text{Kontrollterskel (g)} - \text{allodyn timerskal (g)}} \times 100$$

Administrering av testsubstans

Rotter ble gitt (subkutan, intraperitonealt eller oralt) en testsubstans før starten av von Frey-testingen og tiden mellom administrering av testforbindelsen og von Frey-testen varierte avhengig av testforbindelsens natur.

Writhing test

Eddiksyre vil frembringe magesammentrekninger når det administreres intraperitonealt til mus. Disse vil da utvide kroppen sin i et typisk mønster når smertestillende

legemidler administreres, observeres denne beskrevne bevegelsen mindre hyppig og legemiddelet utvelges som en potensiell god kandidat.

Enn fullstendig og typisk Writhing refleks vurderes kun når de følgende elementene er tilstede: dyret er ikke i bevegelse; den nedre delen av ryggen er svakt nedsenket; fotsåleaspektet i begge potene kan observeres.

(i) Fremstilling av løsninger

Eddiksyre (AcOH): 120 µl eddiksyre tilsettes til 19,88 ml destillert vann for å oppnå et sluttvolum på 20 ml med en sluttkonsentrasjon på 0,6% AcOH. Løsningen blandes (roteres) deretter og er klar for injeksjon.

Forbindelse (legemiddel): Hver forbindelse fremstilles og oppløses i det mest egnede bindemiddel ifølge standard prosedyrer.

15

(ii) Administrering av løsninger

Forbindelsen (legemiddelet) administreres oralt, intraperitonealt (i.p.), subkuttant (s.c.) eller intravenøst (i.v.) i 10 ml/kg (ved å vurdere den gjennomsnittlige musekroppsvekten) 20, 30 eller 40 minutter (ifølge forbindelsesklassen og dets karakteristika) før testing. Når forbindelsen tilføres sentralt: intraventrikulært (i.c.v.) eller intratekalt (i.t.) administreres et volum på 5 µl.

25

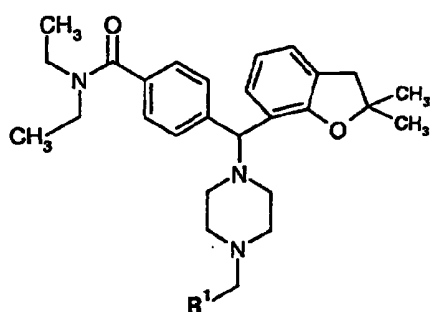
(iii) Testing

Dyret (musen) observeres i en periode på 20 minutter og antallet tilfeller (Writhing refleks) anmerkes og tas til følge ved slutten av eksperimentet. Musene holdes i individuelle "skoese"-bur med kontaktunderlag. Totalt 4 mus observeres vanligvis samtidig: en kontroll og tre legemiddeldoser.

P a t e n t k r a v

1.

Forbindelse med formel I



5 der

 R^1 er valgt fra:

(i) fenyl; og

10

(ii) pyridinyl



15 der hver R^1 -fenylring og R^1 -heteroaromatisk ring eventuelt og uavhengig av hverandre kan være ytterligere substituert med 1, 2 eller 3 substituenten valgt fra rettkjedet og forgrenet C_{1-6} -alkyl, NO_2 , CF_3 , C_{1-6} -alkoksy, klor, fluor, brom og jod, der substitusjonene på fenylringen og på den heteroaromatiske ringen kan finne sted i enhver posisjon på ringsystemene;

20

så vel som farmasøytisk akseptable salter og isomerer derav.

2.

Forbindelse ifølge krav 1, der den eventuelle substituenten(e) på den aromatiske eller
 25 heteroaromatiske ringen(e) er valgt fra en hvilken som helst av NO_2 , isobutyl, CF_3 , metyl eller klor.

3.

Forbindelse ifølge krav 1 eller 2 valgt fra en hvilken som helst av:

- 4-[(4-benzyl-1-piperazinyll)((2,2-dimetyl-2,3-dihydro-1-benzofuran-7-yl)metyl)-
N,N-dietylbenzamid dihydroklorid (forbindelse 6);
- 4-[(2,2-dimetyl-2,3-dihydro-1-benzofuran-7-yl)[4-(4-jodbenzyl)-1-
piperzinyll)metyl]-N,N-dietylbenzamid dihydroklorid (forbindelse 7);
- 4-[(2,2-dimetyl-2,3-dihydro-1-benzofuran-7-yl)[4-(3-pyridinylmetyl)-1-
piperzinyll)metyl]-N,N-dietylbenzamid dihydroklorid (forbindelse 8); og
- 4-[(2,2-dimetyl-2,3-dihydro-1-benzofuran-7-yl)[4-(2-pyridinylmetyl)-1-
piperzinyll)metyl]-N,N-dietylbenzamid ditrifluoracetat (forbindelse 9).

4.

Forbindelse ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, i form av dets hydroklorid-, sulfat-, tartrat- eller citratsalter.

5.

Forbindelse ifølge et hvilket som helst av kravne 1 til 6, for anvendelse i terapi.

6.

Anvendelse av en forbindelse med formel I ifølge krav 1, til fremstilling av et medikament for behandling av smerte.

7.

Anvendelse av en forbindelse med formel I ifølge krav 1, til fremstilling av et medikament for behandling av gastrointestinale forstyrrelser.

8.

Anvendelse av en forbindelse med formel I ifølge krav 1, til fremstilling av et medikament for behandling av spinalskader.

9.

Anvendelse av en forbindelse med formel I ifølge krav 1, til fremstilling av et medikament for behandling av forstyrrelser i det sympatiske nervesystemet.

10.

Farmasøytisk sammensetning som omfatter en forbindelse med formel I ifølge krav 1
som en aktiv ingrediens, sammen med en farmakologisk og farmasøytisk akseptabel
5 bærer.