



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 14 688 T2 2004.04.22**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 045 842 B1**

(51) Int Cl.<sup>7</sup>: **C07D 401/00**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 14 688.3**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US98/17850**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 944 579.6**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 99/010338**

(86) PCT-Anmeldetag: **28.08.1998**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **04.03.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **25.10.2000**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **14.05.2003**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **22.04.2004**

(30) Unionspriorität:  
**924008 29.08.1997 US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
**DE, FR, GB, IT, NL**

(73) Patentinhaber:  
**University of Florida, Gainesville, Fla., US**

(72) Erfinder:  
**MEYER, Edwin, Gainesville, US; KEM, R., William, Gainesville, US; VAN HAAREN, Frans, Gainesville, US; ZOLTEWICZ, A., John, Gainesville, US; DEFIEBRE, M., Christopher, Fort Worth, US; PAPKE, Roger, Gainesville, US; DAY, L., Arthur, Gainesville, US**

(74) Vertreter:  
**Glawe, Delfs, Moll, Patentanwälte, 20148 Hamburg**

(54) Bezeichnung: **BENZYLIDENE- UND CINNAMYLIDENE-ANABASEINE ALS NEURONALE NIKOTIN ALPHA-7 REZEPTORAGONISTEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

### Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich allgemein auf das Gebiet der Pharmakologie. Insbesondere betrifft sie neue auf Anabasein bezogene Zusammensetzungen und Verfahren zur Verwendung dieser Zusammensetzungen für Behandlungsformen, die mit Defekten oder Funktionsstörungen von Nikotinsubtypenrezeptoren in Verbindung stehen.

[0002] Im Gehirn wurden eine Vielzahl an Nikotinrezeptorsubtypen gefunden. Nikotin ist eine Droge, die offenbar alle diese Rezeptorsubtypen, ebenso wie der endogene Transmitter Acetylcholin, aktivieren kann. Nikotin selbst hat beides, positive und negative Eigenschaften im Menschen, in Abhängigkeit von der betroffenen Rezeptorsubpopulation. Die beiden quantitativ im Gehirn überwiegenden Rezeptorsubtypen sind Alpha7 und Alpha4beta2.

[0003] Eine Vielfalt an molekularen, biochemischen und physiologischen Untersuchungen zeigt das Vorhandensein vielzähliger Nikotinrezeptoruntereinheiten im Gehirn und anderen Geweben. Einer der vorwiegenden Nikotinrezeptorsubtypen im Gehirn weist die  $\alpha 7$ -Untereinheit, besonders in den telencephalischen Bereichen, wie beispielsweise Hippocampus und Neocortex, auf. Diese Rezeptoren fungieren als Homooligomere bei Expression in Oocyten, wo sie eine charakteristische, hohe Bindungsaffinität zu  $\alpha$ -Bungarotoxin, hohe Calcium-Permeabilität und schnelle Unempfindlichkeit zeigen. Jüngste Untersuchungen mit selektiven  $\alpha 7$ -Agonisten weisen darauf hin, daß diese Rezeptoren in das Gedächtnis bezogene Verhalten als, auch in die Aufrechterhaltung der intrazellulären Calcium-Homöostasis involviert sind.

[0004] Der am besten untersuchte selektive  $\alpha 7$ -Agonist ist GTS-21, (E-3-[2,4-Dimethoxybenzyliden]anabasein, auch bezeichnet als DMXB). GTS-21 verstärkt die Leistung in verschiedenen räumlichen und nicht räumlichen Gedächtnis bezogenen Paradigmen bei Ratten und Kaninchen. Es wirkt sich auch auf die nervenschützende Aktivität gegen den tropischen Faktorentzug in PC12 Zellen (Martin, et al., 1994), die NMDA-Aktivierung in primären neuronalen Kulturen (Shimohama, et al., 1996) und die fimbria Transectionen in vivo aus. Trotz dieser, das Verhalten und den Nervenschutz beeinflussenden Wirkungen von GTS-21 ist es jedoch nur ein bescheidener, teilweise wirksamer Agonist auf  $\alpha 7$ -Rezeptoren, mit etwa 20% der Aktivität von ACh selbst.

[0005] Es wurde ein völlig wirksamer und starker  $\alpha 7$ -Agonist, das 3-Cinnamyliden substituierte Anabasein DMAC oder E, E-3-(4-Dimethylaminocinnamyliden)anabasein, beschrieben. Diese Zusammensetzung hat auch eine gedächtnisverstärkende Aktivität bei Nagern, eine nervenschützende Aktivität wurde aber nicht dokumentiert. DMAC bewirkt auch die ungewöhnliche Eigenschaft, daß es die  $\alpha 7$ -Rezeptoren nach der Aktivierung über einen längeren Zeitraum inhibiert. Obwohl die biologische Bedeutung dieser inhibitorischen Aktivität bis jetzt unbekannt ist, könnte man erwarten, daß die Langzeitwirkung der Zusammensetzung, abhängig von der Rezeptoraktivierung, wie dem Nervenschutz, behindert wird.

[0006] Was die strukturellen Aktivitätsunterschiede zwischen GTS-21 und DMAC betrifft, ist unbekannt, in welchem Maße die völlige agonistische Wirksamkeit oder die bestimmte antagonistische Aktivität der letztgenannten Zusammensetzung aus der Cinnamylidenanabasein-Struktur oder von anderen Substituentenunterschieden hergeleitet ist.

[0007] Im Tabakrauch vorliegendes Nikotin ist beides, verstärkendes und süchtig machendes Mittel. Beim süchtigen Rauchen sind alle N-Acetylcholin Rezeptorsubtypen durch Nikotin potentiell aktiviert, einschließlich derer, die nicht direkt in die Hervorrufung der Verstärkung involviert sind. Gegenwärtig verfügbare Ersatztherapien mit z. B. Nikotin enthaltenden Kaugummis und Pflastern aktivieren ebenfalls alle Rezeptorsubtypen. Obwohl Nikotinkaugummis und Pflaster einige Entziehungssymptome blockieren, bewirken sie ebenfalls eine Verstärkung. Obwohl schwer zu quantifizieren, scheint die durch Nikotinkaugummi und Pflaster bewirkte Höhe der Verstärkung nicht so groß zu sein, wie die durch das Rauchen bewirkte, denkbar ist, daß Kaugummi und Pflaster nicht so wirkungsvoll wie Zigaretten in der Zufuhr von Nikotin sind um die Verstärkung zu bewirken (de Fiebre, et al.; Collins, et al.). Somit scheint der Mißbrauch von Kaugummis und Pflastern kein Hauptproblem bei der Verwendung dieser Mittel in Raucherentzugsprogrammen zu sein. Die Rückfallrate nach der Anwendung von Kaugummis oder Pflastern bleibt jedoch meistens genauso hoch, als wenn keine Ersatztherapie angewandt wurde. Obwohl Kaugummi und Pflaster die Entzugssymptome abschwächen, können ihre nicht optimalen Verstärkungseigenschaften die Sucht bei der Erholung der Raucher verlängern und zu der hohen Rückfallrate nach ihrer Anwendung beitragen.

[0008] Stoffe, die die Aktivierung der Nikotinrezeptoren hemmen, vermitteln die psychologischen Belohnungs/Suchteigenschaften des Tabaks, werden durch Rauchen oder oral als Pulver (sog. „Schnupftabak“) verabreicht und stellen die ultimative Therapie zum Erreichen eines tabakabstinenten Zustandes dar. Dies wurde vorher nicht erreicht, da die bekannten Nikotinrezeptorantagonisten (Beispiele: Mecamylamin, Tubocurarin) für diese besonderen Nikotinrezeptoren nicht selektiv sind. Solche Antagonisten wirken auf das autonome Nervensystem und an der neuromuskulären Synapse, wobei verschiedenste toxische Nebeneffekte, einschließlich des autonomen Blockierens (was verschiedenste Veränderungen einschließlich niedrigen Blutdrucks bewirkt) und des neuromuskulären Blockierens (was Atmungsdepression bewirkt), verursacht werden.

[0009] Es ist ebenfalls dokumentiert, daß Rauchen und Trinken in dem Maße positiv korrelieren, daß diejeni-

gen, die rauchen, gewöhnlich auch trinken und umgekehrt. Es wurde gezeigt, daß Ethanol das Rauchen erhöhen kann (Burton and Tiffany, 1997). Untersuchungen an Ratten zeigten, daß die Verabreichung von Nikotin den Ethanolkonsum erhöhen kann. (Blomquist, et al., 1996). Andere Untersuchungen zeigten, daß sich eine Kreuztoleranz zwischen Ethanol und Nikotin entwickelt (Collins, et al., 1996) und daß die Sensitivität auf Ethanol und Nikotin genetisch korrelieren (de Fiebre, et al., 1992). Das deutete darauf hin, daß Ethanol und Nikotin einen oder mehrere gemeinsame Wirkungspunkte bei einen oder mehreren Nikotinrezeptorsubtypen haben könnten. In vor kurzem durchgeführten Untersuchungen wurde festgestellt, daß offenbar der Alpha7-Nikotinrezeptor-subtyp durch Ethanol beeinflusst wird (Yu, et al., 1996).

[0010] Es wurde spekuliert, daß die Aktivierung des Gehirn-Alpha7-Rezeptors in die Verbreitung verschiedener Typen von Anfällen (z. B. Nikotin-induzierte Anfälle, (Marks et al., 1989)) verwickelt ist.

[0011] Die Ischämie und die resultierende Glutamat-Freisetzung sind wesentliche Ursachen für neuronale Einbußen bei Schlaganfällen, Schwemmungen und anderen Insulten des Gehirns. Glutamat wird als wesentliches Excitotoxin angesehen, das für vieles des Zellsterbens nach einem Ischämie-Anfall verantwortlich ist.

[0012] Nikotinrezeptoren wurden an den neuromuskulären Verbindungen, als auch in elektrischen Organen von Spezien wie *Torpedo californica*, wo sie penthemische Transmembranringe aus vier Untereinheiten, bezeichnet als  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  und  $\gamma$ , bilden (Deneris, et. al., 1991), charakterisiert. Wenig ist bekannt über Nikotinrezeptoren im Gehirn, jedoch wurde mittels Ligandenbindung, elektrophysiologischer und molukularbiologischer Techniken viele Rezeptorsubtypen mit neuen Eigenschaften und Funktionen gezeigt (Martin, et al., 1994; Wright, et al., 1993). Zumindest die 6  $\alpha$ -Untereinheiten ( $\alpha 2 - \alpha 7$ ,  $\alpha 9$  bei Säugern,  $\alpha 8$  bei Küken), die 3  $\beta$ -Untereinheiten ( $\beta 2 - \beta 4$ ), aber nicht die  $\delta$ - oder  $\gamma$ -Untereinheiten im Gehirn wurden kloniert. Die  $\alpha 7$ -Untereinheit, welche offenbar funktionelle homooligomerische Rezeptoren bildet (Koike, et al., 1989), ist nach quantitativen Bindungsstudien der vorwiegende Nikotinrezeptorsubtyp im Gehirn (Couturier, et al., 1990). Ihre Dichte im Hippocampus und Neocortex, zusammen mit der gedächtnisverstärkenden Wirkung selektiver  $\alpha 7$ -Nikotinagonisten wie bspw. 3-(2,4-Dimethoxybenzyliden)anabasein (DMXB) (Pugh, et al., 1994), weist auf eine signifikante Rolle der  $\alpha 7$ -Rezeptoren beim Lernen und Erinnern hin. Des weiteren sind diese Rezeptoren stark durchlässig für  $Ca^{2+}$  und schnell insensitiv nach der Aktivierung (Alkondon, et al., 1994; Koike, et al., 1989). Diese Kanaleigenschaften weisen auf eine moduläre Funktion bezüglich der neuronalen  $Ca^{2+}$ -Homöostasis hin, was die festgestellte Involvierung in die Synapsenbildung und neuronale Vitalität erklären könnte. Es wurde herausgefunden, daß sie selektive  $\alpha 7$ -Aktivierung zum Schutz der Neuronen gegen den NGF-Verlust in vitro dient, genauso wie gegen die neuronale Degeneration, die der Axotomie folgt in vivo. Vor kurzem wurde ein mutierter  $\alpha 7$ -Rezeptor, der nicht zur Insensibilisierung in der Lage ist, mit der Neurotoxizität in *C. elegans* in Verbindung gebracht (Treinin und Chalfie, 1995).

[0013] Der Verlust an cholinischen Neuronen bei der Alzheimer Krankheit und anderen neuropathologischen Störungen (z.-B. pugilistische Dementie, alkoholinduzierte Dementie,) wird als grundlegend für zumindest einige der Gedächtnisverluste, die bei diesen Krankheiten beobachtet werden, angesehen. Der Verlust dieser chollinearischen Neuronen in Tiermodellen kann durch Einsatz von neurotrophen Faktoren, insbesondere von Nervenwachstumsfaktoren (NGF), vermieden werden. NGF wurde dementsprechend als potentielle Behandlung der Alzheimer-Krankheit entwickelt. NGF kreuzt jedoch nicht die Blut-Gehirn-Schranke, was dessen Nützlichkeit bei der Behandlung von Gehirnerkrankungen einschränkt.

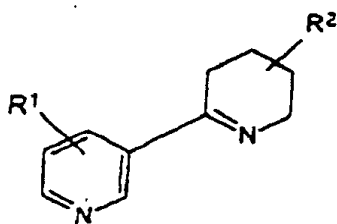
[0014] Abstracts von Veröffentlichungen American Chemical Society 210, (2), 1995, Medi 113, erwähnt eine potentielle therapeutische Nützlichkeit verschiedener Zusammensetzungen einschließlich 3-(2, 4)-Dimethoxybenzylidinanabasein zur Behandlung, einschließlich dem Rauchentzug. MOL. PHARMACOL. (1995) 47: 164-171 offenbart in vitro Tests von drei Anabasein-abgeleiteten Zusammensetzungen, einschließlich DMAC. Es ist offenbart, daß die Zusammensetzungen  $\alpha 7$ -Agonisten sein können, aber die selben Zusammensetzungen ebenfalls als selektive  $\alpha 7$ -Antagonisten einsetzbar sind. DRUG DEV. RES. (1994) 31 (2), 127-134 diskutiert die Wirkungen von Anabasein bezogenen Analogen auf die Rattengehirnnikotinrezeptorbindung und auf das Vermeidungsverhalten.

[0015] Die vorliegende Erfindung betrifft zwei Klassen von Zusammensetzungen, neue Cinnamylidenanabaseine und Benzylidenanabaseine, deren Ziel der Alpha7-Rezeptorsubtyp ist, wobei sie wenig oder kaum den Alpha4beta2 oder anderer Subtypen aktivieren. Verschiedenste Untersuchungen an Menschen und Tieren zeigen, daß diese Zusammensetzungen nützlich sein werden bei der Therapie und Behandlung, die auf diese Rezeptoren abzielen, einschließlich der Methoden, die mit dem Tabakentzug verbundene Nebeneffekte verringern; eine antialkoholische Wirkung haben; eine anti-Schlaganfallwirkung haben, ohne die Nebeneffekte zu haben, die mit den weniger spezifischen Rezeptoragonisten verbunden sind; und die Alterseffekte verringern, die die Lern- und Erinnerungsbeeinträchtigungen betreffen.

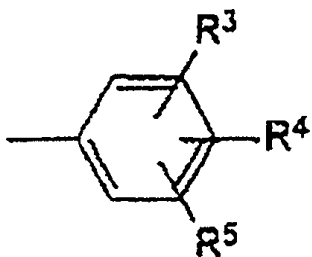
[0016] Die vorliegende Erfindung betrifft somit viele Probleme, die mit Defekten oder Fehlfunktionen von Gehirnnikotinrezeptortypen verbunden sind durch die Bereitstellung von Zusammensetzungen, deren Ziel der Alpha7-Nikotinrezeptorsubtyp ist, wobei sie gering oder kaum den Alpha4beta2 oder anderer Rezeptorsubtypen aktivieren.

[0017] Die Erfindung ist in den Ansprüchen definiert. Ein Aspekt der vorliegenden Erfindung umfaßt neue Zu-

sammensetzungen enthaltend eine Verbindung der Formel:



wobei  $R^1$  für Wasserstoff oder  $C_1$ - $C_4$ -Alkyl; und  $R^2$  für  $=CHCH=CHX$  steht, wobei X für

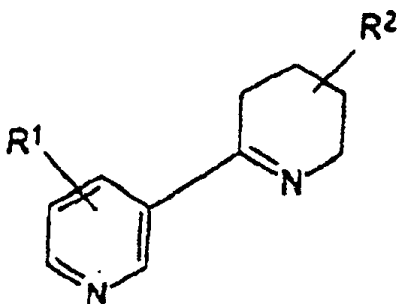


steht, wobei  $R^3$ ,  $R^4$  und  $R^5$  aus der aus Wasserstoff,  $C_1$ - $C_4$ -Alkyl, das gegebenenfalls durch N,N-Dialkylamino mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen in den einzelnen Alkylgruppen substituiert ist,  $C_1$ - $C_6$ -Alkoxy, das gegebenenfalls durch N,N-Dialkylamino mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen in den einzelnen Alkylgruppen substituiert ist, Carboalkoxy mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen in der Alkoxygruppe, Amino, Amido mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen in der Acylgruppe, Cyano, N,N-Dialkylamino mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen in den einzelnen Alkylgruppen, Halogen, Hydroxyl und Nitro bestehenden Gruppe ausgewählt sind, wobei wenigstens einer der Reste  $R^1$ ,  $R^3$ ,  $R^4$  und  $R^5$  nicht für Wasserstoff steht und wobei  $R^3$  nicht für 4-N,N-Dialkylamino steht, wenn  $R^1$ ,  $R^4$  und  $R^5$  jeweils für Wasserstoff stehen; oder ein organisches oder anorganisches, pharmazeutisch unbedenkliches Salz davon.

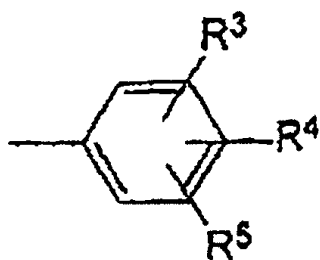
[0018] In bevorzugten Ausführungsformen ist  $R^2$  in der 3-Stellung des Tetrahydropyridinrings gebunden. In weiteren bevorzugten Ausführungsformen ist  $R^3$ , das bevorzugt in der 4-oder 2-Stellung des Phenylrings gebunden sein kann, aus der aus Amino, Hydroxyl, Chlor, Cyano, Dimethylamino, Methyl, Methoxy, Pentoxy, Isopentoxy, Propoxy, Isopropoxy, Acetylamin, Acetoxy und Nitro bestehenden Gruppe ausgewählt, mit Hydroxyl, Acetylamin, Acetoxy, und Methoxy als besonders bevorzugte Gruppen. Es kann ebenfalls wünschenswert sein, daß  $R^1$  und  $R^4$  für Wasserstoff stehen, wobei  $R^3$  in der 2-Stellung des Phenylrings steht und eine Amino-, Hydroxyl-, Chlor-, Cyano-, Dimethylamino-, Methyl-, Methoxy-, Acetylamin-, Acetoxy- oder Nitro-Gruppe ist und  $R^5$ , welches in der 4-Stellung des Phenylrings gebunden ist, ein Methoxy oder Hydroxyl ist. Andere bevorzugte Zusammensetzungen schließen solche Zusammensetzungen ein, in denen  $R^1$ ,  $R^4$  und  $R^5$  Wasserstoff ist.

[0019] Die vorliegende Erfindung umfaßt des weiteren neue Cinnamylidenanabaseine. Die Bezeichnung „Cinnamylidenanabaseine“ bezieht sich auf Zusammensetzungen, welche beides, Cinnamylidengruppen und Anabaseingruppen, enthalten, wie bspw. die Cinnamylidenzusammensetzungen in Tabelle 1, Tabelle 2 und Tabelle 3. Folglich sind einige bevorzugte Cinnamylidenanabaseine, die von dieser Erfindung umfaßt werden, jedoch nicht die Erfindung limitieren, 3-(4-Acetylaminocinnamyliden)anabasein, 3-(4-Hydroxycinnamyliden)anabasein, 3-(4-Methoxycinnamyliden)anabasein, 3-(4-Hydroxy-2-Methoxycinnamyliden)anabasein, 3-(2,4-Dimethoxycinnamyliden)anabasein und 3-(4-Acetoxy-cinnamyliden)-anabasein.

[0020] Ein wichtiger Aspekt der vorliegenden Erfindung umfaßt die Verwendung einer therapeutisch wirksamen Menge einer Zusammensetzung der Formel



oder eines pharmazeutisch unbedenklichen, organischen oder anorganischen Salzes davon, wobei  $R^1$  für Wasserstoff oder  $C_1$ - $C_4$ -Alkyl und  $R^2$  für  $=CHX$ ,  $=CCH_3X$  oder  $=CHCH=CHX$  steht, wobei X für



steht, wobei  $R^3$ ,  $R^4$  und  $R^5$  aus der aus Wasserstoff,  $C_1$ - $C_4$ -Alkyl, das gegebenenfalls durch N,N-Dialkylamino mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen in den einzelnen Alkylgruppen substituiert ist,  $C_1$ - $C_6$ -Alkoxy, das gegebenenfalls durch N,N-Dialkylamino mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen in den einzelnen Alkylgruppen substituiert ist, Carboalkoxy mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen in der Alkoxygruppe, Amino, Amido mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen in der Acylgruppe, Cyano, N,N-Dialkylamino mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen in den einzelnen Alkylgruppen, Halogen, Hydroxyl und Nitro bestehenden Gruppe ausgewählt sind, wobei es sich bei der Verbindung nicht um 3-(2,4-Dimethoxybenzyliden)anabasein handelt, zur Herstellung eines Medikaments mit einer therapeutischen Wirkung ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:

- a) der Abschwächung bzw. der Verhinderung von Tabakentzugserscheinungen in einem Säugetier,
- b) der Stimulierung von durch Ethanol antagonisierten  $\alpha 7$ -Rezeptoren im Hirn eines Säugetieres,
- c) dem Schutz gegen durch Ischämie induzierten Zellverlust in einem Säugetier.

[0021] Bevorzugt ist  $R^2$  in der 3-Stellung des Tetrahydropyridinrings gebunden und  $R^3$ , das bevorzugt in der 4-Stellung des Phenylrings gebunden ist, ist aus der Amino, Hydroxyl, Chlor, Cyano, Dimethylamino, Methyl, Methoxy, Isopropoxy und Nitro bestehenden Gruppe ausgewählt mit Hydroxyl, Isopropoxy, Amino, Acetylamin, Acetoxy und Methoxy als besonders bevorzugte Gruppen. Eine andere bevorzugte Ausführungsform ist die Methode, bei der die Zusammensetzung eine solche ist, daß  $R^1$  und  $R^5$  beide Wasserstoff sind,  $R^3$  ist ein Methoxy und  $R^4$  ist ein Hydroxyl oder Methoxy. Es kann wünschenswert sein,  $R^3$  und  $R^4$  entweder in der 4- oder 2-Stellung des Phenylrings zu haben. Ein weiteres Beispiel einer bevorzugten Zusammensetzung, die in den beschriebenen Methoden dieser Erfindung verwendet wird, ist, wo  $R^1$  Wasserstoff ist,  $R^3$ ,  $R^4$  und  $R^5$  alle Methoxy sind oder wobei  $R^3$  4-Dimethylamino und  $R^4$  und  $R^5$  beide Wasserstoff sind.

[0022] Soweit der Begriff „Benzylidenanabaseine“ verwendet wird, bezieht er sich auf Zusammensetzungen, die beides, Benzylidengruppen und Anabaseingruppen, enthalten. Somit sind Benzylidenanabaseine, welche bei der Anwendung der Methoden vorliegender Erfindung verwendet werden können, jedoch nicht durch diese limitiert sind, 3-(2,4-Dimethoxybenzyliden)anabasein, 3-(4-Hydroxybenzyliden)anabasein, 3-(4-Methoxybenzyliden)anabasein, 3-(4-Aminobenzyliden)anabasein, 3-(4-Hydroxy-2-Methoxybenzyliden)anabasein, 3-(2-Hydroxy-4-Methoxybenzyliden)anabasein, 3-(4-Isopropoxybenzyliden)-anabasein, (7'-Methyl-3-(2,4-Dimethoxybenzyliden))anabasein.

[0023] Beispiele für Benzylidenanabaseine oder Cinnamylidenanabaseine, die in der Lage sind selektiv  $\alpha 7$ -Rezeptoren zu aktivieren, schließen die folgenden Verbindungen ein ohne dadurch limitierend zu sein 3-(2,4-Dimethoxybenzyliden)anabasein, 3-(4-Hydroxybenzyliden)anabasein, 3-(4-Methoxybenzyliden)anabasein, 3-(4-Aminobenzyliden)anabasein, 3-(4-Hydroxy-2-Methoxybenzyliden)anabasein, 3-(2-Hydroxy-4-Methoxybenzyliden)anabasein, 3-(4-Isopropoxybenzyliden)-anabasein, (7'-Methyl-3-(2,4-Dimethoxybenzyliden))anabasein, 3-(4-Acetylaminocinnamyliden)anabasein, 3-(4-Hydroxycinnamyliden)anabasein, 3-(4-Methoxycinnamyliden)anabasein, 3-(4-Hydroxy-2-Methoxycinnamyliden)anabasein, 3-(2,4-Dimethoxycinnamyliden)anabasein und 3-(4-Acetoxy-cinnamyliden)anabasein.

[0024] Die Verwendung von „in der Lage zur selektiven Aktivierung des  $\alpha 7$ -Rezeptors zu sein“ betrifft Zusammensetzungen, die den nikotinischen  $\alpha 7$ -Rezeptor aktivieren ohne spürbar andere Rezeptorsubtypen, bspw. die  $\alpha 4\beta 2$ -Rezeptoren, zu aktivieren.

[0025] Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist die Verwendung einer therapeutisch wirksamen Menge einer Benzylidenanabaseinverbindung oder einer Cinnamylidenanabaseinverbindung oder eines pharmazeutisch unbedenklichen Salzes davon, mit der  $\alpha 7$ -Rezeptoren selektiv aktiviert werden können, zur Herstellung eines Medikaments mit einer therapeutischen Wirkung ausgewählt aus der aus:

- a) der Behandlung von Tabakentzugssymptomen,
- b) der Stimulierung von durch Ethanol antagonisierten  $\alpha 7$ -Rezeptoren im Hirn,
- c) dem Schutz gegen durch Ischämie induzierten Zellverlust

bestehenden Gruppe, wobei die Verbindung aus der aus 3-(4-Hydroxybenzyliden)anabasein, 3-(4-Methoxybenzyliden)anabasein, 3-(4-Aminobenzyliden)anabasein, 3-(4-Hydroxy-2-Methoxybenzyliden)anabasein, 3-(2-Hydroxy-4-methoxybenzyliden)anabasein, 3-(4-Isopropoxybenzyliden)-anabasein, (7'-Methyl-3-(2,4-Di-

methoxybenzyliden))anabasein, 3-(4-Acetylamminocinnamyliden)anabasein, 3-(4-Hydroxycinnamyliden)anabasein, 3-(4-Methoxycinnamyliden)-anabasein, 3-(4-Hydroxy-2-Methoxycinnamyliden)anabasein, 3-(2,4-Dimethoxycinnamyliden)anabasein und 3-(4-Acetoxycinnamyliden)anabasein bestehenden Gruppe ausgewählt ist.

[0026] Der Zellverlust kann durch einen Schlaganfall oder Glutamat-induzierte Excitotoxizität verursacht sein. Somit ist diese Erfindung nützlich zum Schutz gegen ein durch Ischämie induzierten Zellverlust und umfaßt die Verabreichung einer therapeutisch wirksamen Menge an Benzylidenanabasein oder Cinnamylidenanabasein, die selektiv  $\alpha 7$ -Rezeptoren aktivieren können, oder eines pharmazeutisch unbedenklichen Salzes davon, an ein danach bedürftiges Tier.

[0027] Die Erfindung ist ebenfalls nützlich bei der Prophylaxe gegen Zellverlust aus fokalen ischämischen Insult, wobei die Menge an Alpha7-Nikotinagonisten vor dem Eintreten der Ischämie in einer Menge, die wirksam gegen den Zellverlust schützt, verabreicht wird. Bevorzugte Alpha7-Nikotinagonisten sind ein Benzylidenanabasein oder Cinnamylidenanabasein.

[0028] Weitere Anwendungen der Erfindung umfassen eine Methode zur Behandlung von altersbedingten Lern- oder Gedächtnisschwächen, wobei einem danach bedürftigem Tier eine therapeutisch wirksame Menge eines Cinnamylidenanabaseins, wobei das Cinnamylidenanabasein nicht 3-Cinnamylidenanabasein oder 3-(4-Dialkylaminocinnamyliden)anabasein ist, verabreicht wird.

[0029] Die nachfolgenden Zeichnungen sind Bestandteil der vorliegenden Beschreibung und dienen zur weiteren Darstellung verschiedener Aspekte der vorliegenden Erfindung. Die Erfindung ist besser verständlich, wenn sich auf eine oder mehrere dieser Zeichnungen in Kombination mit der genaueren Beschreibung der hier dargestellten spezifischen Ausführungsformen, bezogen wird.

[0030] **Fig. 1.** Gezeigt ist 3-(2,4-Dimethoxybenzyliden)anabasein (auch bekannt als „DMXB“ oder „GTS-21“), ein Modell für Benzylidenanabaseine mit Alpha7-selektiver nikotinischer agonistischer Aktivität. Andere 3-(Benzyliden)anabaseine sind identisch bis auf verschiedene Substituenten an der Benzylidenhälfte.

[0031] **Fig. 2.** Gezeigt ist die Wirkung von Cinnamylidenanabaseinen auf das passive Vermeidungsverhalten bei Ratten die bilaterale nucleus basalis Verletzungen erhielten. Die unverletzte Kontrollklappe war  $247 \pm 35$  Sec durchschnittlich  $\pm$ . (A) ist 3- Cinnamylidenanabasein; (B) ist 4- 3-Methoxycinnamyliden)anabasein; (C) ist 3-(4-Methoxycinnamyliden)anabasein. Die Dosen sind IP in mg/kg wobei ■ ist 0, # ist 0,1; ist 0,2; ist 1,0 und ist 3,0 mg/kg. \* zeigt an, daß  $p < 0,05$  ist, im Vergleich zu der salzigen Kontrolle, Einweg ANOVA. Alle Werte sind Durchschnittswerte  $\pm$  SEM ( $n = 4 - 6$ /Gruppe).

[0032] **Fig. 3.** Gezeigt ist die Wirkung einer zerebralen Ischämie (Schlaganfall) auf den Gehirnzelltod und die Fähigkeit des Benzylidenanabasein-alpha7-Nikotinagonisten gegen diesen Zelltod zu schützen. Ratten erhielten einen 30-minütigen Ischämieanfall durch Abschnüren ihrer Halbschlagader; die Menge des Zelltodes (proportional zur Infarktgröße) wurde 24 h später festgestellt. Einige Tiere erhielten die Benzylidenanabaseinzusammensetzung DMXB (1 mg/kg IP, Salzgewicht) eine Stunde vor der Abschnürung, oder den Nikotinagonisten Mecamylamin (0,5 mg/kg IP) oder beide, Mecamylamin und DMXB, oder DMXB, 5 min nach der Abschnürung. Nur DMXB allein, gegeben vor der Abschnürung, schützt gegen den Zellverlust (\*  $p < 0,05$  im Vergleich zu der salzinjizierten Kontrolle; Einweg ANOVA,  $n = 4 - 5$ /Gruppe).

[0033] **Fig. 4.** Gezeigt sind die Wirkungen von 100 mM Ethanol auf die Empfänglichkeit von n-Acetylcholin-Rezeptorsubtypen auf eine EC50 Konzentration an Nikotin.

[0034] **Fig. 5.** Gezeigt ist die Hemmung der Nikotinselbstverabreichung bei Ratten durch die Injektion von DMXB (GTS-21), im Vergleich zu der Injektion der Salzkontrolle.

[0035] **Fig. 6A.** Die Wirkungen von DMXB auf EAA-induzierte Cytotoxizität in kultivierten neokortikalen Neuronen. Keine Behandlung.

[0036] **Fig. 6B.** Wie in **Fig. 6A** wurden die Zellen mit 1 mM Glutamat für 10 min inkubiert und danach das Glutamat für 1 h ausgewaschen.

[0037] **Fig. 6C.** Wie in **Fig. 6A** wurden die Zellen 24 h vor der Glutamatbehandlung 10  $\mu$ M DMXB ausgesetzt.

[0038] **Fig. 6D.** Wie in **Fig. 6A** wurden die Zellen einer gemeinsamen Anwendung von 10  $\mu$ M DMXB und 1 nM  $\alpha$ -Bungarotoxin vor der Glutamatbehandlung ausgesetzt. Maßstab 50  $\mu$ M.

[0039] **Fig. 6E.** Hemmung der Neurotoxizität durch DMXB Vorbehandlung. Nach 24-stündiger Behandlung mit DMXB wurde 1 mM EAA für 10 min oder 1 h hinzugegeben, gefolgt von einem EAAfreien Medium für 1 h, oder nicht. % der Kontrolle ist das Verhältnis von lebenden Zellen, die EAA ausgesetzt waren, zu denen, die dies nicht waren.

[0040] **Fig. 6F.** DMXB oder MK801 (von jedem 10  $\mu$ M) wurden simultan mit 1 mM Glutamat für 10 min angewendet. \* und # beziehen sich auf  $p < 0,05$  von Glutamat oder NMDA allein. Die Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ).

[0041] **Fig. 7.** Die Wirkungen von cholinischen Antagonisten auf DMXB-induzierten Schutz von Glutamatcytotoxizität. Jeder Antagonist wurde dem Medium zugegeben, welches für 24 Stunden 1  $\mu$ M DMXB oder 10  $\mu$ M Nikotin enthält. HEX, 1  $\mu$ M Hexamethonium.

[0042] MEC, 1  $\mu$ M Mecamylamin. MLA, 10 nM Methyllycaconitin. BTX, 1 nM (Alpha)-Bungarotoxin. ATR, 1

$\mu\text{M}$  Atropin. \* und # bedeuten  $p < 0,05$  im Vergleich zu DMXB oder Nikotin allein ( $n = 5$ ).

[0043] **Fig. 8A.** Die Wirkungen von DMXB auf die Infarktgröße, welche einem fokalen ischämischen Insult folgt. Coronale Sektion 5 mm posterior zum frontalen Pol, wo die Infarktgröße am größten war. Der schattierte Bereich ist von einem typisch gefärbten salzinjizierten Tier mit 28% Infarkt (Durchschnittswert). Unten: coronale Sektion, dieselben Koordinaten des mit DMXB behandelten Tieres mit 19% Infarkt (Durchschnittswert).

[0044] **Fig. 8B.** Die Wirkungen von DMXB auf die Infarktgröße die einem fokalen ischämischen Insult folgt. Die Infarktgröße als eine Fraktion der des gesamten coronalen Bereiches von 5 mm posterior bis zum Frontalpol. Die Arzneimittel wurden 24 h vor der Ischämie injiziert. MEC: 0,5 mg/kg IP Mecamylamin; DMXB: 1 mg/kg IP. Rechtes Feld: DMXB während der Ischämie injiziert, \*  $p < 0,05$  im Vergleich zu der Salzinjektion; Einweg ANOVA ( $n = 6 - 8$ ).

[0045] **Fig. 9.** Vergleich von Cinnamylidenstrukturen mit einer Benzylidenstruktur (GTS-21).

[0046] **Fig. 10.** Die Wirkungen von Mecamylamin auf DMXB induzierte Verbesserung im passiven Vermeidungsverhalten. Erwachsene Sprague Dawley Albinoratten wurden bilateral nucleus basalis verwundet und einen Monat später auf passives Vermeidungsverhalten, wie im Text beschrieben, getestet. Die Latenzen für die Trainings- und Testintervalle wurden 15 min nach der IP-Injektion des SalzvehICLES festgestellt, 0,5 mg/kg DMXB, 0,2 mg/kg Mecamylamin (MEC) oder beide Arzneimittel, und beschrieben als Durchschnitt  $\pm$  SEM von 5 Tieren/Gruppe. \*  $p < 0,05$  im Vergleich zu der salzinjizierten Gruppe, Einweg ANOVA.

[0047] **Fig. 11.** Die Wirkungen von DMXB auf das Training in der Morris-Wasseraufgabe bei bilateral nucleus basalis verwundeten Ratten. Die Tiere, die verwundet oder scheinoperiert waren, begannen ihr Training 1 Monat später, wie im Text beschrieben. Salzverdünnungen, 0,5 mg/kg DMXB, 0,2 mg/kg Mecamylamin (MEC) oder beide Arzneimittel wurden jeden Tag, in der verwundeten und nicht verwundeten Gruppe 15 min vor dem ersten Versuch IP injiziert. Die Werte sind Durchschnittszeiten, die notwendig waren um das Ziel zu finden (Maximum: 60 sek) ( $n = 5$ ). Vergleiche innerhalb der Gruppe sind in Tabelle 1 beschrieben.

[0048] **Fig. 12.** Die Wirkungen von DMXB auf die Versuchssperformance in der Morris-Wasseraufgabe bei bilateral nucleus basalis verwundeten Ratten. Die Tiere wurden verwundet, trainiert und injiziert wie in **Fig. 3** beschrieben. Die Zeit, die in dem Zielquadrat während des 60-Sekunden-Versuchsintervalls am Tag 4 aufgewendet wurde, wurde für jede Gruppe festgestellt und als Durchschnitt  $\pm$  SEM von 5 Tieren/Gruppe dargestellt.

\*  $p < 0,05$  im Vergleich zu der verwundeten Gruppe, der Salz injiziert wurde (Einweg ANOVA).

[0049] **Fig. 13A.** Die Wirkungen von chronischen Injektionen von DMXB oder Nikotin auf hochaffines [ $^3\text{H}$ ]ACh oder [ $^{125}\text{I}$ ] $\alpha$ -Bungarotoxin (BTX)-Binden in Ratteneocortices. Erwachsenen männlichen Ratten wurden mit einem Salzvehicle 1 mg/kg DMXB oder 0,2 mg/kg Nikotin (NIC) täglich für 2 Wochen (IP) injiziert. Nach dieser Zeit wurden die Neocortices entfernt und auf hochaffine [ $^3\text{H}$ ]ACh oder [ $^{125}\text{I}$ ] $\alpha$ -Bungarotoxin-Bindungen untersucht, wie im Text beschrieben. Jeder Wert ist der Durchschnitt  $\pm$  SEM von 4 Tieren/Gruppe; \*  $p < 0,05$  im Vergleich zu dem salzinjizierten Kontrollwert (Einweg ANOVA). Reaktionen der Ratten- $\alpha 7$ -AChR auf 3-CA, 2-MeOCA und 4-McOCA. Konzentrations-Reaktionswechselwirkungen für die agonistaktivierten Spitzenspannungen der Oocyten, denen RNA injiziert wurde, die für die Ratten- $\alpha 7$  Untereinheit kodiert. Alle Reaktionen wurden anfangs relativ zu der individuellen Oocytenreaktion auf 500  $\mu\text{M}$  ACh, das 5 min vor der Arzneimittelanwendung angewendet wurde, gemessen. Die Reaktionen wurden relativ zu der maximalen Reaktion, wie sie mittels ACh erhalten werden, normalisiert, so daß eine Reaktion von 1 eine volle Wirksamkeit darstellt. Das Verhältnis von 500  $\mu\text{M}$  ACh Kontrollreaktion zu dem ACh Maximum wurde aus Papke et al., 1997, entnommen.

[0050] **Fig. 13B.** Die Wirkungen von chronischen Injektionen von DMXB oder Nikotin auf die hochaffine [ $^3\text{H}$ ]ACh oder [ $^{125}\text{I}$ ] $\alpha$ -Bungarotoxin-(BTX)-Bindung in Ratteneocortices. Erwachsenen männlichen Ratten wurden mit einem Salzvehicle 1 mg/kg DMXB oder 0,2 mg/kg Nikotin (NIC) täglich für 2 Wochen (IP) injiziert. Bei der Zeit wurden die Neocortices entfernt und auf hochaffine [ $^3\text{H}$ ]ACh oder [ $^{125}\text{I}$ ] $\alpha$ -Bungarotoxin-Bindung untersucht, wie im Text beschrieben. Jeder Wert ist ein Durchschnitt  $\pm$  SEM von 4 Tieren/Gruppe; \*  $p < 0,05$  im Vergleich zu dem salzinjizierten Kontrollwert (Einweg ANOVA). Reaktionen der Ratten- $\alpha 7$ -AChR auf 3-CA, 2-MeOCA und 4-McOCA. Resthemmung der Kontroll-(500  $\mu\text{M}$ ) ACh-Reaktionen von Ratten- $\alpha 7$ -injizierten Oocyten nach der Anwendung von 3-CA, 2-MeOCA oder 4-MeOCA bei spezifischen Konzentrationen. Alle Reaktionen sind relativ zu der Oocytenreaktion auf 500  $\mu\text{M}$  ACh, angewendet 5 min vor der experimentellen Agonistenanwendung, dargestellt.

[0051] **Fig. 14A.** Reaktionen von  $\alpha 4\beta 2$ -AChR auf 3-CA, 2-MeOCA oder 4-McOCA. Konzentration-Reaktionswechselwirkungen für die agonistaktivierten Spitzenspannungen der Oocyten, denen RNA injiziert wurde, welche für Ratten- $\alpha 4\beta 2$ -Untereinheiten kodiert. Die Reaktionen sind als erstes relativ zu der Reaktion auf 10  $\mu\text{M}$  ACh, angewendet 5 min vor der Arzneimittelanwendung, und dann normalisiert auf die maximale Reaktion, erhalten mit ACh, dargestellt, so daß eine Reaktion von 1 die volle Wirksamkeit darstellt. Der Wert zwischen 10  $\mu\text{M}$  ACh und der maximalen ACh-Reaktion wurde in separaten Untersuchungen festgestellt.

[0052] **Fig. 14B.** Reaktionen von  $\alpha 4\beta 2$ -AChR auf 3-CA, 2-MeOCA oder 4-McOCA. Resthemmung der Kontroll-(10  $\mu\text{M}$ ) ACh-Reaktionen von Ratten- $\alpha 4\beta 2$ -injizierten Oocyten nach der Anwendung von 3-CA, 2-MeOCA oder 4-MeOCA bei den speziellen Konzentrationen. Die Reaktionen sind relativ zu den individuellen Oocyten-Reaktionen auf 10  $\mu\text{M}$  ACh, angewendet 5 min vor der experimentellen Agonistenanwendung, dargestellt.

[0053] **Fig. 15.** Die Wirkungen von Cholin auf die Neuritvitalität in differenzierten PC12-Zellen unter NGF-Entzug. PC12-Zellen, welche sich über einen Zeitraum von 1 Woche differenziert hatten und denen dann NGF + Serum entzogen wurde, wurden für 4 Tage einem serumfreien Medium ausgesetzt mit oder ohne 100 ng/ml NGF, die spezielle CholinKonzentration betrug  $\pm 10 \mu\text{l}$  Mecamylamin. Die Fraktion an PC12-Zellen, die Neuriten zu dieser Zeit bilden, wurden quantifiziert und als Durchschnitt SEM von 3–4 Platten/Gruppe dargestellt, \*  $p < 0,05$  im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Einweg ANOVA).

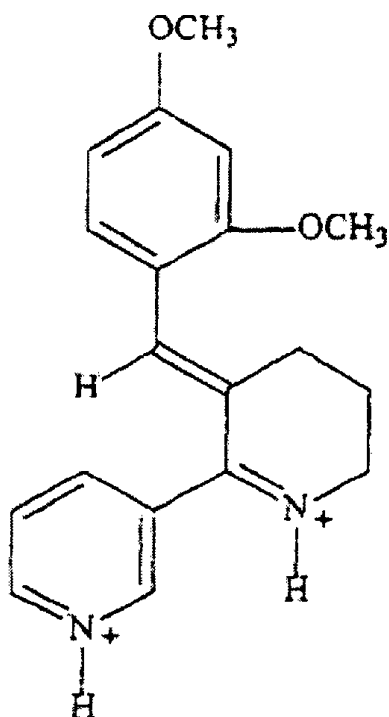
[0054] Die selektive Aktivierung von Alpha7, im Gegensatz zu Alpha4beta2-Nikotinrezeptoren durch Benzyliden- und Cinnamylidenanabaseine, wie in den speziellen Beispielen illustriert, hat zu der Entwicklung verschiedener potentieller therapeutischer Anwendungen in einer Vielzahl von Behandlungen geführt, die mit den Wirkungen auf Alpha7-Nikotinrezeptoren verbunden sind. So sind die Benzyliden- und Cinnamyliden-anabaseine nützlich bei der Linderung der Symptome, die mit dem Tabakentzug und dem Alkoholkonsum verbunden sind, für den Schutz vor Ischämie und Schlaganfall und für die Behandlung von altersbedingten Lern- und Gedächtnisschwächen.

[0055] Die nikotinische Alpha7-Rezeptoraktivierung ist eine der Komponenten der Wirkungen von Tabak/Nikotin, welches den Entzug so schwierig macht. Das selektive Abzielen auf Nikotinrezeptorsubtypen, wie den Alpha7-Subtyp, bei Tabakentzugstherapien läßt Behandlungen erwarten, welche die Entzugssymptome blockieren, ohne eine direkte Verstärkung zu bewirken. Derartige Behandlungen versprechen effektiver zu sein als Behandlungen mit Nikotin enthaltenden Kaugummis oder Pflastern, da die Sucht bei den sich erholenden Rauchern nicht länger anhalten könnte.

[0056] Es gibt keine Nachweis dafür, daß Alpha7-Rezeptoren Nikotinsucht bei Ratten oder anderen Spezies induzieren. Al-pha-Bungarotoxin scheint nicht die verstärkende Wirkung von Nikotin zu blockieren, so daß diese Wirkung offensichtlich nicht Alpha7 vermittelt stattfindet. Aus diesem Grunde ist zu erwarten, daß die Anabaseine der vorliegenden Erfindung, aufgrund des Vorzuges ihrer Fähigkeit selektiv Alpha7-Rezeptoren zu aktivieren, Entzugssymptome reduzieren, ohne das Abhängigkeitsverhalten zu verstärken.

[0057] Außerdem ist zu erwarten, daß die Alpha4beta2-antagonistischen Eigenschaften dieser Mittel diesen erlauben, mit jeglichen Abhängigkeitswirkungen, die durch diese Rezeptoren vermittelt werden, wechselzuwirken. Nikotin ist hoch potent zu Alpha4beta2-Rezeptoren, und diese Rezeptoren sind üblicherweise hochreguliert bei chronischem Nikotineinfluß, der bei Abhängigkeit typisch ist (Rowell and Li, 1997). Da Benzyliden und Cinnamyliden-anabaseine eine Subgruppe der Nikotinrezeptoren stimulieren, welche durch Nikotin selbst aktiviert werden, sollten diese Zusammensetzungen vor Nebeneffekten, wie sie beim Tabakentzug auftreten, schützen, ohne dasselbe Muster an Abhängigkeitseigenschaften, wie sie bei Nikotin auftreten, zu zeigen. Es ist zu erwarten, daß die Fähigkeit der hier offenbarten Anabaseine und der Cinnamylidenanabaseine, die Alpha4beta2-Rezeptoren zu blockieren, der Hochregulation dieser Rezeptoren, wie sie bei chronischer Verabreichung beobachtet wird, entgegenzuwirken. Die Kombination von Alpha7-Agonist und alpha4beta2Antagonist-Aktivität hat ein potentielles und nützliches Profil, um den Patienten beim Entzug zu helfen, wobei sie nicht-verstärkenden Wirkungen oder Entzugssymptomen ausgesetzt sind.





3-(2,4-Dimethoxybenzyliden)anabasein („DMXB" oder „GTS-21")

[0058] Während Ethanol viele Wirkungen auf verschiedene Gehirnproteine zeigt, werden die durch Benzyliden- und Cinnamyliden-anabaseine aktivierten Gehirnproteine, wie z. B. nikotinische Alpha7-Rezeptoren, durch Ethanol hypofunktional, indem sie sie als Hauptprime zur Behandlung von alkoholinduziertem Rausch und zur Erholung von Nebeneffekten, wie sie bei Alkoholentzug auftreten, plazieren. Somit ist zu erwarten, daß Anabaseine, wie DMXB, der hemmenden Aktivität von Ethanol an diesen Rezeptoren entgegenwirken, wobei sie die Rauscheigenschaften des Ethanols abschwächen.

[0059] Ein Screening verschiedener nikotinischer Rezeptorsubtypen wies darauf hin, daß Alpha7-Nikotinrezeptoren sensitiv zu dem Antagonismus von Ethanol waren, während andere Rezeptortypen nicht betroffen waren (**Fig. 4**). Die Wirkung an den Alpha7-Rezeptoren ist deshalb in die Rauscheigenschaften des Ethanols verwickelt, so daß zu erwarten ist, daß die selektive Aktivierung der Alpha7-Rezeptoren zum Schutz vor zumindest einigen der Effekte des akuten Alkoholrausches nützlich ist. Benzyliden und Cinnamylidenanabaseine sind nützlich als Ausnüchterungsspielle, als Therapie für Entzugserscheinungen bei Alkoholikern und als potentielle medikamentöse Behandlung gegen den Rausch.

[0060] Die unverzügliche Glutamatfreisetzung durch Ischämie ist ein Hauptgrund für den neuronalen Verlust bei Schlaganfällen. Glutamat ist als wichtiges Excitotoxin, verantwortlich für vieles des Zelltodes nach einem Ischämieanfall, bekannt. Shimohama et al. (1994) zeigten, daß nikotinische Agonisten gegen Glutamat induzierte Toxizität in Gehirnneuronen in vitro schützen können. Die Erfinder schlußfolgerten, daß Benzyliden- und Cinnamylidenanabaseine-Zusammensetzungen gegen den Zelltod schützen könnten, der mit Ischämieanfällen oder Schlaganfall verbunden ist, als auch gegen Glutamatinduzierte Toxizitäten im Gehirn.

[0061] In Untersuchungen mit Anabasein-Zusammensetzungen zeigten die Erfinder, daß eine solche Wirkung in vivo, mit einem Modell alpha7-Nikotinagonisten, den prototypischen Benzylidenanabasein-Wirkstoff DMXB, sichtbar ist. Die Ergebnisse zeigen, daß DMXB gegen durch zerebrale Ischämie in Tieren verursachte Schlaganfälle schützt. Tiere, denen 1 mg/kg DMXB 1 h vor dem fokalen ischämischen Schlaganfall injiziert wurde, hatten einen nicht so hohen Zellverlust, gemessen als Schlaganfallgebiet, wie die salzinjizierten Kontrollen. Die Ergebnisse weisen darauf hin, daß die Wirkung durch die nikotinischen Rezeptoren vermittelt wurde, worauf die Blockadewirkung des Mecamylamin, welches mit dem DMXB injiziert wurde (**Fig. 3.**), hinweist. Diese Untersuchungen deuten darauf hin, daß Benzyliden- und Cinnamylidenanabaseine prophylaktisch verwendet werden können, um vor Schaden, wie er bei Schlaganfällen und transienten Ischämieanfällen, als auch bei anderen ähnlichen Krankheiten, die mit Glutamat induzierter Excitotoxizität verbunden sind, zu schützen.

[0062] 3-Cinnamylidenanabasein-Zusammensetzungen wurden synthetisiert und es wurde festgestellt, daß sie Wirkungen auf Hirnzellen aufweisen, abgeleitet von ihrer selektiven Wirkung auf Alpha7-Nikotinrezeptoren, was ihnen die folgenden Eigenschaften verleiht: 1) Verbesserung bei lern- und gedächtnisbedingten Verhalten bei Tieren, die sich sonst hypofunktional erweisen; 2) Schutz gegen Gehirnzelltod in verschiedenen Modellen, welche relevant für die Alzheimer-Krankheit und Schlaganfall sind; 3) Die Fähigkeit vor ethanolinduziertem Rausch, der durch die Nikotinrezeptoren vermittelt wird, zu schützen, als auch die Entzugserscheinungen, die

mit dem Ethanolentzug verbunden sind, zu verringern; und 4) Die Fähigkeit die Entzugserscheinungen, die mit dem Tabakentzug verbunden sind, zu verhindern.

[0063] Die hiermit offenbarte pharmazeutische Zusammensetzung kann oral verabreicht werden, z. B. mit einem flüssigen Trägerstoff oder mit einem assimilierbaren, essbaren Träger, oder sie können in eine harte oder weiche Schale einer Gelatine kapsel eingeschlossen werden oder sie können in Tabletten gepreßt werden oder sie können direkt mit den Nahrungsmitteln des Essens aufgenommen werden. Zur oralen therapeutischen Verabreichung können die wirksamen Zusammensetzungen mit dem Trägerstoff zusammengeführt werden und in Form von verdaulichen Tabletten, bukkalen Tabletten, Pastillen, Kapseln, Elixiren, Suspensionen, Sirupen, Waffeln und dergleichen verwendet werden. Solche Präparate und Zusammensetzungen sollten mindestens 0,1% der wirksamen Zusammensetzung enthalten. Der Prozentanteil der Zusammensetzungen und Präparate kann natürlich variieren und praktischerweise zwischen etwa 2 bis etwa 60% des Gewichtes der Einheit sein. Die Menge an wirksamen Stoffen einer solchen therapeutisch nützlichen Zusammensetzung ist eine solche, daß eine geeignete Dosis erreicht wird.

[0064] Die Tabletten, Pastillen, Pillen, Kapseln und dergleichen können außerdem folgendes enthalten: ein Bindemittel wie Tragantgummi, Akazie, Getreidestärke oder Gelantine; Trägerstoffe wie Calciumzweiphosphat; einen Zerfallstoff, wie Getreidestärke, Kartoffelstärke, Alginsäure und dergleichen; ein Gleitmittel, wie z. B. Magnesiumstearat; und ein Süßmittel, wie z. B. Sucrose, Lactose oder Saccharin können hinzugegeben werden oder ein Geschmacksmittel, wie z. B. Pfefferminz, Öl von Wintergrün oder Kirschgeschmack. Wenn die Dosiseinheit eine Kapsel ist, kann sie zusätzlich zu den Materialien des obengenannten Types einen flüssigen Träger enthalten. Verschiedene andere Materialien können zur Ummantelung oder zur anderweitigen Veränderung der physischen Form der Dosiseinheit vorliegen. Zum Beispiel können Tabletten, Pillen oder Kapseln mit Schellack, Zucker oder beiden ummantelt sein. Ein Sirup eines Elixiers kann die wirksamen Zusammensetzungen, Sucrose als Süßmittel, Methyl und Propylparabene als Konservierungsmittel, ein Farbstoff und Geschmacksstoff, wie z. B. Kirschen oder Organgengeschmack enthalten. Natürlich sollte jegliches Material, welches bei der Zubereitung jeglicher Dosisform Verwendung findet, pharmazeutisch rein und in den verwendeten Mengen im wesentlichen nicht toxisch sein. Desweiteren können die wirksamen Zusammensetzungen in Präparate und Formulierungen eingebracht sein, die diese anhaltend freisetzen.

[0065] Die wirksamen Zusammensetzungen können ebenfalls parenteral oder intraperitoneal verabreicht werden. Lösungen der wirksamen Zusammensetzungen als freie Basen oder pharmakologisch unbedenkliche Salze können in Wasser zubereitet werden und in geeigneter Weise mit einem Tensid wie Hydroxypropylzellulose gemischt werden. Dispersionen können ebenfalls in Glycerol, flüssigen Polyethylenglycolen und Mischungen davon und in Öl zubereitet werden. Unter üblichen Lager- und Verwendungsbedingungen enthalten diese Zubereitungen ein Konservierungsmittel, um das Wachstum von Mikroorganismen zu verhindern.

[0066] Die zur Injektion geeigneten pharmazeutischen Formen umfassen sterile, wäßrige Lösungen und Dispersionen und sterile Pulver zur ad hoc Herstellung von sterilen injizierbaren Lösungen oder Dispersionen. In allen Fällen muß die Formulierung steril und in einem solchen Maße flüssig sein, daß sie leicht einzuspritzen ist. Sie muß unter den Herstellungs- und Lagerbedingungen stabil sein und gegen die kontaminierende Wirkung von Mikroorganismen, wie Bakterien oder Pilze, geschützt sein. Der Träger kann ein Lösungsmittel oder ein Dispersionsmedium sein, welches z. B. Wasser, Ethanol, Polyol (z. B. Glycerol, Propylenglycol und flüssiges Polyethylenglycol und dergleichen), geeignete Mischungen davon und pflanzliche Öle enthält. Die richtigen Flußeigenschaften können bspw. durch die Verwendung von einer Umhüllung, bspw. aus Lecithin, durch die Beibehaltung der erforderlichen Teilchengröße in dem Falle einer Dispersion und durch die Verwendung von Tensiden aufrechterhalten werden. Der Schutz vor der Wirkung von Mikroorganismen kann durch verschiedene antibakterielle und gegen Pilze wirkende Mittel, z. B. Parabene, Chlorbutanol, Phenol, Sorbinsäure, Thimerosal und dergleichen erreicht werden. In vielen Fällen ist es wünschenswert isotonische Mittel einzubringen, z. B. Zucker oder Natriumchlorid.

[0067] Eine verlängerte Aufnahme der injizierbaren Zusammensetzungen kann durch die Verwendung von Mitteln, welche die Aufnahme hinauszögern, z. B. Aluminiummonostearat und Gelantine, in den Zusammensetzungen erreicht werden.

[0068] Die sterilen injizierbaren Lösungen werden hergestellt, indem die wirksamen Zusammensetzungen in der erforderlichen Menge in das entsprechende Lösungsmittel mit verschiedenen anderen, soweit erforderlichen, oben aufgezählten Inhaltsstoffen gegeben und danach filtersterilisiert werden. Im allgemeinen werden die Dispersionen durch Zugabe der verschiedenen sterilisierten wirksamen Inhaltsstoffe in ein steriles Vehicle, welches das Basisdispersionsmedium und die erforderlichen anderen Inhaltsstoffe von den oben aufgezählten enthält, hergestellt. Im Falle der sterilen Pulver zur Herstellung von sterilen injizierbaren Lösungen sind die bevorzugten Zubereitungsmethoden die Vakuumtrockentechnik und die Gefriertrockentechnik, die ein Pulver des wirksamen Inhaltsstoffes plus einige zusätzliche gewünschte Inhaltsstoffe von einer vorher steril gefilterten Lösung ergeben.

[0069] Der hier verwendete „pharmazeutisch akzeptable Träger“ schließt jegliche und alle Lösungsmittel, Dispersionsmedien, Umhüllungen, antibakterielle und gegen Pilze wirkende Mittel, isotonische und die Aufnahme

verzögernde Mittel und dergleichen ein. Die Verwendung solcher Medien und Mittel für pharmazeutisch wirksame Substanzen ist im Stand der Technik gut bekannt. Sie werden als therapeutische Zusammensetzungen in Betracht gezogen, mit Ausnahme der üblichen Medien oder Mittel, welche mit den wirksamen Inhaltsstoffen nicht kompatibel sind. Ergänzende wirksame Inhaltsstoffe können den Zusammensetzungen ebenfalls zugesetzt werden.

[0070] Zur oralen Prophylaxe können die wirksamen Zusammensetzungen in Trägerstoffe gegeben werden und in Form von unverdaulichen Mundwässern und Zahnputzmitteln verwendet werden. Ein Mundwasser kann durch Zugabe einer erforderlichen Menge des wirksamen Inhaltsstoffes in ein geeignetes Lösungsmittel, z. B. eine Natriumboratlösung (Dobell's Lösung), hergestellt werden. Alternativ kann der wirksame Inhaltsstoff einem antiseptischen Mundwasser zugegeben werden, welches Natriumborat, Glycerin und Kaliumbicarbonat enthält. Der wirksame Inhaltsstoff kann ebenfalls in Zahnputzmitteln dispergiert werden, einschließlich: Geles, Pasten, Pulvern und Gematschen (slurries). Der wirksame Inhaltsstoff kann in einer therapeutisch wirksamen Menge einem pasteusen Zahnputzmittel zugegeben werden, welches Wasser, Bindungsmittel, Schleifmittel, Geschmacksmittel, Schaummittel und Benetzungsmittel enthalten kann.

[0071] Der Begriff „pharmazeutisch akzeptabel“ bezieht sich auf molekulare Einheiten und Zusammensetzungen, die keine allergische oder ähnliche Abwehrreaktion hervorrufen, wenn sie dem Menschen verabreicht werden. Die Herstellung von flüssigen Zusammensetzungen, welche wirksame Inhaltsstoffe enthalten, ist aus dem Stand der Technik gut bekannt. Gewöhnlich werden solche Zusammensetzungen als Injektion oder als flüssige Lösungen oder Suspensionen hergestellt; ebenfalls können feste Formen hergestellt werden, welche zur Lösung oder Suspendierung in Flüssigkeiten vor der Injektion geeignet sind. Das Präparat kann ebenfalls emulgiert sein.

[0072] Die Zusammensetzung kann in neutraler Form oder Salzform formuliert sein. Pharmazeutisch akzeptable Salze schließen die Säureadditionssalze ein, welche mit anorganischen Säuren, wie z. B. Salzsäure oder Phosphorsäure, oder solchen organischen Säuren wie Essig-, Oxal-, Tartar-, Mandelsäure und dergleichen gebildet werden. Salze, welche mit der freien Carboxylgruppe gebildet werden, können ebenfalls von anorganischen Basen, wie z. B. Natrium-, Kalium-, Ammonium-, Calcium- oder Eisenhydroxiden, und solchen organischen Basen wie Isopropylamin, Trimethylamin, Histidin, Procain und dergleichen, abgeleitet sein. Nach der Formulierung wird die Lösung entsprechend der Dosenformulierung und in einer solchen Menge, daß sie therapeutisch wirksam ist, verabreicht. Die Formulierungen sind in einer Vielzahl von Dosierungsformen, wie z. B. als injizierbare Lösung, Arzneimittel abgebende Kapsel und dergleichen zu verabreichen.

[0073] Zur parenteralen Verabreichung, z. B. in einer wäßrigen Lösung, sollte die Lösung, wenn notwendig, gepuffert sein und das Verdünnungsmittel zuerst mit ausreichend Salz oder Glucose isotonisiert worden sein. Diese speziellen wäßrigen Lösungen sind besonders geeignet für die intravenöse, intramuskuläre, subkutane und intraperitoneale Verabreichung. In diesem Zusammenhang sind sterile wäßrige Medien, welche verwendet werden können, dem Fachmann aus dem Stand der Technik im Lichte der vorliegenden Offenbarung bekannt. Zum Beispiel kann eine Dosis in 1 ml isotonisierter Natriumchloridlösung gelöst und entweder zu 1000 ml einer hypodermoclysen Flüssigkeit zugegeben werden, oder an der beabsichtigten Infusionsstelle injiziert werden (siehe z. B. „Remington's Pharmaceutical Sciences“ 15. Auflage, Seiten 1035–1038 und 1570–1580). In Abhängigkeit von dem Zustand des zu behandelnden Objektes sind einige Abweichungen in der Dosis notwendig. Die Person, welche für die Verabreichung verantwortlich ist, wird in jedem Fall die entsprechende Dosis für das individuelle Objekt festlegen. Außerdem sollten die Präparate bei der Verabreichung an den Menschen steril, pyrogen, sein und dem allgemeinen Sicherheits- und Reinheitsstandards genügen, wie sie das FDA-Amt für Biologie fordert.

[0074] Die folgenden Beispiele wurden aufgenommen, um bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung darzustellen. Es sollte durch die Fachleute gewürdigt werden, daß die in den Beispielen offenbarten Techniken, welche die durch die Erfinder erfundenen Techniken darstellen, bei der Anwendung der Erfindung gut funktionieren und somit als bevorzugte Formen ihrer Praktizierung anzusehen sind. Jedoch sollten die Fachleute im Lichte der vorliegenden Erfindung zu würdigen wissen, daß viele Änderungen in den speziellen Ausführungsformen gemacht werden können, welche offenbart sind und immer noch ein ähnliches oder gleiches Ergebnis bewirken, ohne aus dem Schutzbereich der Erfindung zu fallen.

### 5.1 Beispiel 1 – Rezeptorbindungseigenschaften von Benzylidenanabaseinen

[0075] Benzylidenanabasein-Zusammensetzungen (siehe **Fig. 1**) verdrängen die hohe Affinitäts-alpha-Bungarotoxin-Bindung von den Rattengehirnmembranen mit höherer Affinität als Nikotin (Tabelle 1). Die Fähigkeit von Benzylidenanabaseinen als Agonisten auf Alpha7-Rezeptoren, jedoch nicht auf Alpha4beta2-Rezeptoren, zu wirken, wurde ebenfalls in Oocyten gezeigt. Jeder Benzylidenanabasein-aktivierte Alpha7-Rezeptor wurde mit den endogenen Acetylcholintransmitter verglichen (Tabelle 1). Demgegenüber rief keines dieser Mittel eine signifikante Aktivierung von Alpha4beta2-Rezeptoren hervor (Tabelle 1). Diese Mittel wirkten ebenfalls antagonistisch gegenüber dem Alpha7-Rezeptor und dem Alpha4beta2-Rezeptor, eine frühere Beobachtung, die

nach der Rezeptoraktivierung vorkam. Die Blockade des Alpha4beta2-Rezeptors, beobachtet bei höheren Konzentrationen als der Alpha7-Aktivierung, könnte ebenfalls für die therapeutische Wirkung wichtig sein.

TABELLE 1

Wirkungen verschiedener 3-Benzylidenanabasein-Zusammensetzungen auf die Alpha7- und Alpha4beta2-Rezeptoraktivierung

Zusammensetzung	Alpha7-Bindung <sup>1</sup>	Alpha7-Aktivierung <sup>2</sup>	Alpha4beta2-Aktivierung <sup>3</sup>
DMXB	52	0,2	<0,01
3-(4-Hydroxybenzyliden)anabasein	69	0,31	0,02
3-(4-Methoxybenzyliden)anabasein		0,07	0,05
3-(4-Aminobenzyliden)anabasein (GTS-13)	93	0,72	0,05
3-(4-Hydroxy-2-Methoxybenzyliden)anabasein	84	0,41	0,04
3-(4-Methoxy-2-Hydroxybenzyliden)anabasein	45	0,29	0,01
7'-Methyl-DMXB		0,32	0,02

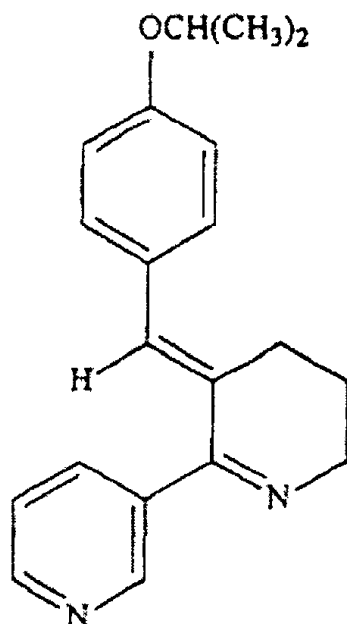
<sup>1</sup>% Hemmung der hohenaffinen Alpha-Bungarotoxin-Bindung (1 nM) bei einer Konzentration von 1 µM.

<sup>2</sup>Reaktion auf die Ratten-alpha7-Rezeptor-Aktivierung bei Xenopus-Oocyten bei 20 µM des Arzneimittels, normalisiert zu 500 µM Acetylcholin (maximale Reaktion).

<sup>3</sup>Wirkung auf die Ratten-alpha4beta2-Rezeptor-Aktivierung bei Xenopus-Oocyten bei maximaler Arzneimittelkonzentration im Vergleich zu der maximalen Acetylcholin-Konzentration.

## 5.2. Beispiel 2 – Herstellung von 3-(4-Isopropoxybenzyliden)anabaseindihydrochlorid („GTS-85“)

[0076] Eine Mischung aus 4-Isopropoxybenzaldehyd (197 mg, 1,2 mmol), Anabasein (233 mg, 1 mmol), 4 Tropfen konzentrierter HCl und 25 ml reinen Ethanols wurden über 6 h lang refluxiert. Ein gelbes Präzipitat wurde nach Zugabe von 40 ml Ethylacetat erhalten. Das Produkt wurde mit Ethylacetat gewaschen um das 4-Isopropoxybenzaldehyd, das nicht reagierte, zu entfernen. Die Rekristallisierung von heißem Ethanoylethylacetat ergab das 3-(4-Isopropoxybenzyliden)anabaseindihydrochlorid (310 mg, 68% Ausbeute).  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{DM-SO} - d_6$ ): 8,91( $\text{H}_2$ , Dublett,  $J = 3,84$  Hz), 8,81( $\text{H}_6$ , Dublett,  $J = 0,93$  Hz), 8,17( $\text{H}_4$ , Dublett,  $J = 7,29$  Hz), 7,77( $\text{H}_5$ , Dublett,  $J = 5,5$  Hz), 7,64( $\text{H}_{9,13}$ , Dublett,  $J = 8,8$  Hz), 7,19( $\text{H}_{10,12}$ , Singlett), 7,09 ( $\text{H}_{10,12}$ , Dublett,  $J = 8,61$  Hz), 4,00(Isopropoxy-C2, Triplett,  $J = 8,3$  Hz), 3,80( $\text{H}_6$ , Triplett,  $J = 5,64$  Hz), 2,96( $\text{H}_4$ , Triplett,  $J = 12,03$  Hz), 2,07( $\text{H}_5$ , Triplett,  $J = 9,4$  Hz), 1,45(Propoxy-C2,3, Dublett,  $J = 12,52$  Hz).



## 3-(4-Isopropoxybenzyliden)anabaseindihydrochlorid („GTS-85“) 5.3. Beispiel 3 – Herstellung von neuen Cinnamylidenderivaten von Anabasein

[0077] Herstellung von trans-3-(4-Acetoxy-cinnamyliden)anabaseindihydrobromid durch Kondensation von trans-4-Acetoxy-cinnamaldehyd mit Anabaseindihydrobromid.

## 5.3.1 trans-4-acetoxy-cinnamische Säure

[0078] Eine Mischung von 3,28 g (20 mmol) von 4-hydroxycinnamischer Säure in 10 ml trockenen Pyridin und 5 ml (53 mmol) Essigsäureanhydrid wurden erwärmt und für 20 min refluxiert. Die gelbe Lösung wurde auf Eis/2N HCl (50/50) gegossen und für 10 min gerührt. Der sich daraus ergebende Feststoff wurde gefiltert, mit Wasser gewaschen und luftgetrocknet. Die Rekristallisierung des Rohmaterials von Aceton ergab 2,14 g (10,4 mmol, 51%) eines weißen Feststoffes mit einem Schmelzpunkt von 210°C.

## 5.3.2 trans-4-acetoxy-cinnamisches Säurechlorid

[0079] Zu 4-acetoxy-cinnamische Säure (2,00 g, 10,5 mmol), die in 40 ml Benzen und 2,00 g (16,8 mmol) Thionylchlorid suspendiert war, wurden 10 Tropfen N,N-Dimethylformamid zugegeben. Nachdem die Suspension erwärmt und für 2 h refluxiert war, wurde die gelbe Lösung unter reduziertem Druck konzentriert und der dabei resultierende grünliche Feststoff in Benzen aufgenommen. Die Lösung wurde filtriert, um das unlösliche Material zu entfernen. Die Entfernung des Lösungsmittels und das Trocknen in vacuo ergab 2,00 g (8,89 mmol, 85%) des weißlichen Säurechlorids, welches im nächsten Schritt ohne weitere Säuberung verwendet wurde.

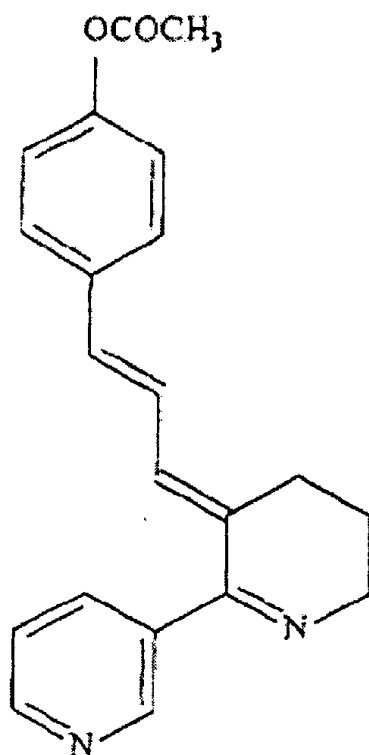
## 5.3.3 trans-4-Acetoxy-cinnamaldehyd

[0080] Zu einer umgewälzten Lösung von 2,00 g (9,62 mmol) von 4-acetoxy-cinnamischen Säurechlorid in 20 ml trockenen THF wurden 10 ml Lithium Tri-*t*-Butoxyaluminumhydrid (1N in THF) bei -65°C über eine Zeit von 15 min zugegeben. Nachdem alles zugegeben war, wurde die heterologe Reaktionsmischung für 1 h bei dieser Temperatur gerührt. Danach wurde das Kühlbad entfernt und der Reaktionsmischung die Möglichkeit gegeben,

sich auf Raumtemperatur zu erwärmen, um eine klare gelbe Lösung zu geben. Die Reaktion wurde dann gequenchet durch Zugabe von 50 ml 1N HCl und 60 ml Ether. Die organische Schicht wurde separiert und die wäßrige Phase mit Ether (30 ml) extrahiert. Die gemeinsame organische Phase wurde mit Wasser (50 ml) und einer wäßrigen Lösung gesättigten  $\text{NaHCO}_3$  (50 ml) gewaschen und dann über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet. Die Entfernung des Lösungsmittels gab 1,43 g eines grünlichen Öls, welches mittels Chromatographie über Kieselerde unter Verwendung von Hexan/Ethylacetat (70/30) gereinigt wurde, um 910 mg (4,79 mmol, 50%) des weißlichen 4-Acetoxycinnamaldehyd mit einem Schmelzpunkt von 77–80°C zu geben. Die Zusammensetzung wurde in Dichloromethan gelöst, bevor sie auf die Säule gegeben wurde. Es wurde ebenfalls 460 mg eines gelblichen Nebenproduktes gesammelt, welches durch die  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) als der entsprechende Alkohol identifiziert wurde.

#### 5.3.4 Kondensation von trans-4-Acetoxycinnamaldehyd mit Anabasein

[0081] Anabaseindihydrobromidmonohydrat (100 mg, 0,294 mmol) und 200 mg (1,05 mmol) von 4-Acetoxycinnamaldehyd wurden in 5 ml Essigsäure, welche 5 Tropfen Essigsäureanhydrid enthält, gelöst. Die Mischung wurde in einer verschlossenen Röhre für 24 h auf 70°C erwärmt und der sich dabei ergebende gelbe Feststoff durch Filtration isoliert, mit Ether gewaschen und in vacuo bei 100°C getrocknet.  $^1\text{H}$  NMR deckte die Anwesenheit einer kleinen Menge von Aldehyd auf; deshalb wurde das Material erwärmt und in Essigsäure, welche einige Tropfen Essigsäureanhydrid enthielt, refluxiert. Die Trocknung in vacuo bei 100°C gab 86 mg (0,17 mmol, 59%) eines orangen Feststoffes mit einem Schmelzpunkt >220°C. Elementaranalyse für  $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{Br}_2\text{N}_2\text{O}_2$ . Errechnet: C, 51, 04, H, 4, 49, N, 5, 67. Gefunden: C, 50,97; H, 4,06; N, 5,21.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  8,93 (1H, Dublett,  $J = 4$  Hz), 8,84 (1H, Singlett), 8,13 (1H, Dublett,  $J = 8$  Hz), 7,74 (3H Multiplett), 7,50 (1H, Multiplett), 7,33 (1H, Dublett,  $J = 11$  Hz), 7,20 (2H, Dublett,  $J = 8$  Hz), 7,00 (1H, Dublett,  $J = 11$  Hz), 5,29 (breit), 3,80 (2H, Triplet,  $J = 6$  Hz), 2,95 (2H, Triplet,  $J = 6$  Hz), 2,28 (3H, Singlett), 2,08 (2H, Multiplett).



trans-3-(4-Acetoxycinnamyliden)anabasein

#### 5.4 Beispiel 4 – Herstellung von trans-3-(4-Hydroxycinnamyliden)anabaseindihydrobromidmonohydrat durch Kondensation von trans 4-Hydroxycinnamaldehyd mit Anabasein.

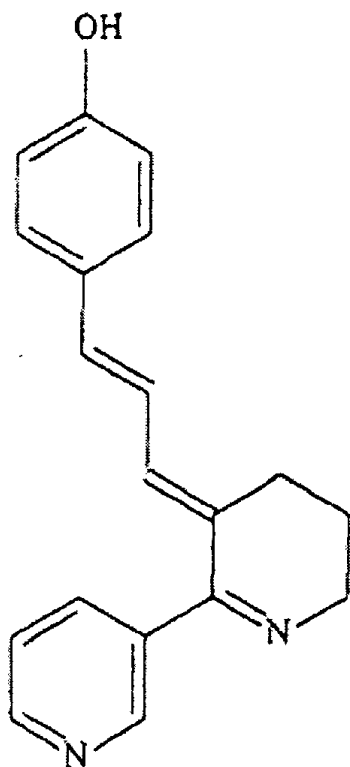
##### 5.4.1 trans-4-Hydroxycinnamaldehyd

[0082] Einer Eiswasser-gekühlten Lösung von trans-4-Acetoxycinnamaldehyd (1,10 g, 5,78 mmol) in 25 ml Chloroform wurden 250 mg Natriummetall, gelöst in 5 ml Methanol, zugegeben. Die gelbe Mischung stand 30 min bei Raumtemperatur. Der Reaktionsmischung wurden 50 ml 1 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  zugegeben und die organische Schicht separiert. Die wäßrige Phase wurde mit Chloroform extrahiert ( $5 \times 30$  ml) und die kombinierte organi-

sche Phase über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet. Dann wurde das Lösungsmittel entfernt und der grünliche Feststoff in Ethylacetat (40 ml) gelöst, mit 5 g Kieselerde gemischt und bis zur Trockenheit verdampft. Das Material wurde dann in einem Lösungsmittel gelöst und auf eine Kieselerdesäule gebracht, welche mit einer Mischung aus Ethylacetat zu Hexan (3 zu 7) vorbehandelt wurde, und mit einer Mischung von Ethylacetat und Hexan (30% ansteigend bis 50% Ethylacetat) eluiert und gab eine Ausbeute von 710 mg (4,80 mmol, 82%) eines leicht gelblichen Feststoffes mit einem Schmelzpunkt von 135–137°C.

#### 5.4.2 Kondensation von trans-4-Hydroxycinnamaldehyd mit Anabasein

[0083] Anabaseindihydrobromidmonohydrat (100 mg, 0,294 mmol) und 100 mg (0,65 mmol) 4-Hydroxycinnamaldehyd, gelöst in 5 ml Essigsäure, wurden in einer verschlossenen Röhre für 24 h auf 70°C erwärmt. Nachdem die Flüssigkeit von den dunklen roten Kristallen mit einer Pasteurpipette entfernt wurde, wurden 3 ml Essigsäure hinzugegeben und die Lösung mit Ultraschall behandelt. Der Feststoff wurde gefiltert, mit Ether gewaschen und in vacuo bei 100°C getrocknet und ergab eine Ausbeute von 132 mg (0,280 mmol, 96%) eines dunklen roten kristallinen Feststoffes mit einem Schmelzpunkt von >220°C. Elementaranalyse für  $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{Br}_2\text{N}_2\text{O} \cdot \text{H}_2\text{O}$ . Errechnet: C, 48,53; H, 4,72; N, 5,96. Gefunden: C, 48,90; H, 4,40; N, 5,94.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DM-SO-d}_6$ ):  $\delta$  8,92 (1H, Dublett,  $J = 5$  Hz), 8,83 (1H, Singlett), 8,11 (1H, Dublett,  $J = 7$  Hz), 7,75 (1H, Dublett von Dubletten,  $J = 5$  Hz und 7,5 Hz), 7,59 (2H, Dublett,  $J = 8$  Hz), 7,29 (2H, Multiplett), 6,98 (1H, Dublett,  $J = 10$  Hz), 6,82 (2H, Dublette,  $J = 8$  Hz), 5,9 (breit), 3,77 (2H, Multiplett), 2,90 (2H, Multiplett), 2,05 (2H, Multiplett).



trans-3-(4-Hydroxycinnamyliden)anabasein

#### 5.5 Beispiel 5 – Herstellung von trans-3-(4-Acetylaminocinnamyliden)anabasein durch Kondensation von trans-4-Acetylaminocinnamaldehyd mit Anabaseindihydrobromid.

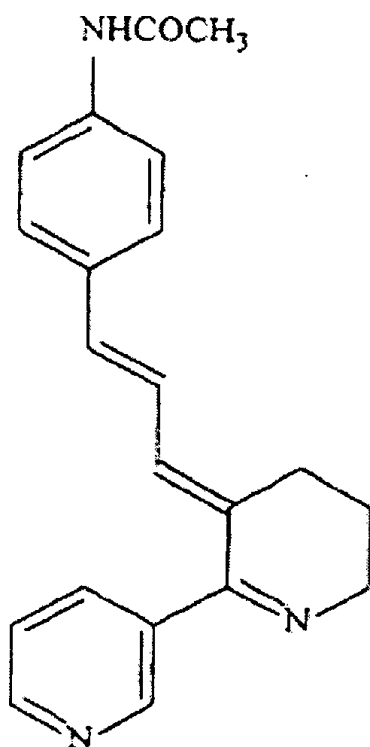
##### 5.5.1 trans-4-Acetylaminocinnamaldehyd

[0084] Eine Lösung von 0,8 ml (0,63 g, 14 mmol) Acetaldehyd in 40 ml Ethanol wurde tropfenweise über einen Zeitraum von 25 min einer eiskalten Lösung von 2,0 g (12 mmol) 4-Acetylaminobenzaldehyd in 60 ml ethanolischem KOH (2%) zugegeben. Die Umwälzung wurde bei dieser Temperatur für 3 h fortgesetzt. Die Mischung wurde dann mit konzentrierter HCl neutralisiert und das Lösungsmittel unter verringertem Druck verdampft. Der Rest wurde mittels Chromatographie über Kieselerde mit einem Elutionslösungsmittel von 1 : 1 Ethylacetat Hexan gereinigt. Das gewonnene Material wurde rekristallisiert aus Toluol und ergab 325 mg (1,72 mmol, 12%) eines gelben Feststoffes mit einem Schmelzbereich von 167–173°C. Das zeigte die Anwesenheit einer Verunreinigung (15%), wahrscheinlich das entsprechende cis-Isomer.

## 5.5.2 Kondensation von trans-4-Acetylamino-cinnamaldehyd mit Anabasein

[0085] Anabaseindihydrobromidmonohydrat (100 mg, 0,294 mmol) und 100 mg (0,53 mmol) 4-Acetylamino-cinnamaldehyd, gelöst in 5 ml Essigsäure, welches 5 Tropfen Essigsäureanhydrid enthielt, wurde auf 70°C in einer geschlossenen Röhre für 24 h erwärmt. Das schwarze Reaktionsgemisch wurde mit 20 ml Ether verdünnt. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation isoliert und mit Essigsäure (5 ml) und Ether (3 × 10 ml) gewaschen. Der rötliche Feststoff wurde in 30 ml H<sub>2</sub>O gelöst, unter Verwendung von 20 ml 10% wäßrigen Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> basisch gemacht und mit Dichloromethan (4 × 25 ml) extrahiert. Die kombinierte organische Phase wurde über Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> getrocknet und das Lösungsmittel in vacuo entfernt. Das gelbe Öl (etwa 150 mg) wurde mittels Chromatographie über Tonerde der Aktivität II unter Verwendung von frisch destilliertem Aceton gereinigt. Tonerde der Aktivität II wurde aus 20 g basischer Tonerde (Aktivität I) durch Behandlung mit 0,8 ml H<sub>2</sub>O erhalten; die Suspension wurde für 10 min geschüttelt und in einem geschlossenen Behälter für 30 min vor der Verwendung stehengelassen. Die gelben Fraktionen wurden vereint und in vacuo konzentriert um ein gelbliches oranges Öl zu geben, welches unter Rühren in Ether kristallisierte. Die Base wurde durch Filtration isoliert und bei 100°C in vacuo getrocknet, um 66 mg (0,20 mmol, 67%) eines orangen Feststoffes zu geben mit einem nicht korrigierten Schmelzpunkt von 199–202. Die Elementaranalyse für C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O·¼ H<sub>2</sub>O. Errechnet: C, 75,08; H, 6,54; N, 12,51.

Gefunden: C, 75,51; H, 6,43; N, 12,29. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 8,69 (1H Singlett), 8,63 (1H, Dublett, J = 4 Hz), 7,78 (1H, Dublett, J = 8 Hz), 7,51 (2H, Multiplett), 7,34 (3H, Multiplett), 7,01 (1H Dublett von Dubletten, J = 11 Hz und 15 Hz), 6,56 (1H, J = 15 Hz), 6,33 (1H, J = 11 Hz), 3,87 (2H, Triplet, J = 5 Hz), 2,75 (2H, Triplet, J = 5 Hz), 2,18 (3H, Singlett), 1,89 (2H, Multiplett).



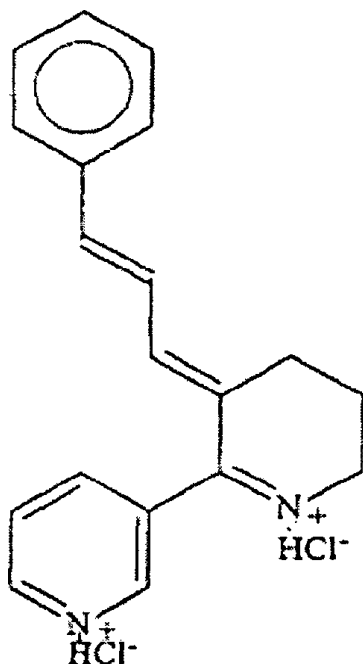
trans-3-(4-Acetylamino-cinnamyliden)anabasein

## 5.6 Beispiel 6 – Herstellung von trans-3-(Cinnamyliden)anabaseindihydrochlorid

[0086] Einer Lösung von Anabaseindihydrochlorid (180 mg, 0,770 mmol), trans-Cinnamaldehyd (0,25 ml, 1,9 mmol) und Ethanol (20 ml) wurde wäßrige konzentrierte HCl (8 Tropfen) zugegeben. Die Lösung wurde erwärmt und für 4 h refluxiert. Die Reaktionsmischung wurde auf 0°C gekühlt und dann tropfenweise Ethylether hinzugegeben, bis kein neues Präzipitat erschien (ca. 10–20 ml). Das Produkt wurde abgefiltert, um nach dem Trocknen 200 mg eines feinen gelben Pulvers zu geben, welches durch Lösung in warmen Isopropylalkohol und dessen Präzipitation mit Ether rekristallisiert wurde. Das Ergebnis waren 180 mg eines gelben Feststoffes (Schmelzpunkt 210–213°C, zersetzt, 68% Ausbeute). <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 8,93 (H6', 1H, Dublett, J = 5 Hz), 8,86 (H2', 1H, Singlett), 8,17 (H4', 1H, Dublett, J = 9 Hz), 7,77 (H5', 1H, Dublett von Dubletten), 7,70 (H2, H6, 2H, Multiplett), 7,52 (Hβ, 1H, Dublett von Dubletten, J = 13 Hz und J = 17 Hz), 7,40 (H3, H4, H5, 3H, Multiplett), 7,29 (Hα, 1H, Dublett, J = 17 Hz), 6,98 (Hy, 1H, Dublett, J = 12 Hz), 5,4 (N–H, 2H, breit), 3,78 (CH<sub>2</sub>, 2H, Multi-



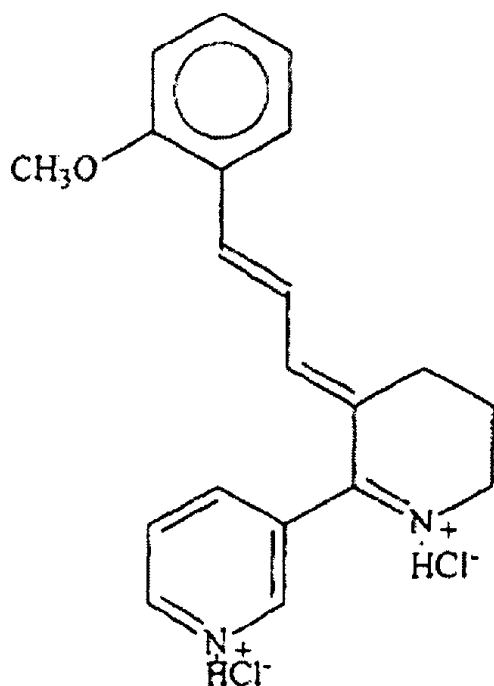
plett), 2,93(CH<sub>2</sub>, 2H, Multiplett), 2,04 ppm (CH<sub>2</sub>, 2H, Multiplett). Elementaranalyse für C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>Cl<sub>2</sub>. Errechnet : C, 65,70; H, 5,80; N, 8,07. Gefunden: C, 65,69, H, 5,85, N, 7,98.



trans-3-(Cinnamyliden)anabasein

#### 5.7. Beispiel 7 – Herstellung von trans-3-(2-Methoxycinnamyliden)anabaseindihydrochlorid.

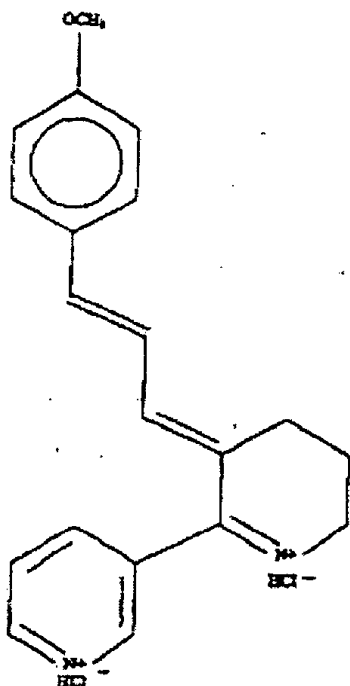
[0087] Einer Lösung von Anabaseindihydrochlorid (200 mg, 0,86 mmol), trans-2-Methoxycinnamaldehyd (348 mg, 2,10 mmol) und 20 ml Ethanol wurde konzentrierte HCl (8 Tropfen) zugegeben. Die Lösung wurde erwärmt und für 4 h unter Rühren refluxiert. Die Reaktionsmischung wurde dann auf 0°C gekühlt und das Produkt mit Diethylether (ca. 10–20 ml) präzipitiert. Das Produkt wurde durch Filtration gesammelt und ergab 220 mg eines gelben Feststoffes. Der Feststoff wurde durch Lösung in warmen Isopropylalkohol und Präzipitation mit Diethylether rekristallisiert und ergab eine Ausbeute von 200 mg eines orangen Feststoffes (Schmelzpunkt 212–213°C, Zersetzung, 62% Ausbeute). Ein Teil wurde in die freie Base umgewandelt unter Verwendung von gesättigtem wäßrigen NaHCO<sub>3</sub> und das Produkt in Ethylacetat extrahiert; ein gelber Feststoff wurde dann erhalten. <sup>1</sup>H NMR der freien Base (CDCl<sub>3</sub>): δ 8,63(H2', 1H, Dublett, J = 2 Hz), 8,57(H6', 1H, Dublett von Dubletten, J = 2 Hz und 6 Hz), 7,70(H4', 1H, Dublett von Tripletten, J = 2 Hz, 2 Hz und 9 Hz), 7,42 (H6, 1H, Dublett von Dubletten, J = 2 Hz und 8 Hz), 7,27 (H5', 1H, Dublett von Dubletten, J = 2 Hz, 6 Hz und 9 Hz), 7,17(H4, 1H, Dublett von Tripletten, J = 2 Hz, 8 Hz und 8 Hz), 7,05(Hß, 1H, Dublett von Dubletten, J = 12 Hz und 17 Hz), 6,90 (Hα, 1H, Dublett, J = 17 Hz), 6,85(H5, 1H, Triplet, J = 8 Hz und 8 Hz), 6,78(H3, 1H, Dublett, J = 8 Hz), 6,32 (Hy, 1H, Dublett, J = 12 Hz), 3,80 (CH<sub>2</sub>, 2H, Multiplett), 3,78 (CH<sub>3</sub>O, 3H, Singlett), 2,68(CH<sub>2</sub>, 2H, Multiplett), 1,80 ppm (CH<sub>2</sub>, 2H, Multiplett). Elementaranalyse für C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>O · H<sub>2</sub>O. Errechnet: C, 60,76, H, 6,12, N, 7,08. Gefunden: C, 60,54, H, 6,03, N, 6,76.



trans-3-(2-Methoxycinnamyliden)anabasein

## 5.8. Beispiel 8 – Herstellung von trans-3-(4-Methoxycinnamyliden)anabaseindihydrochlorid.

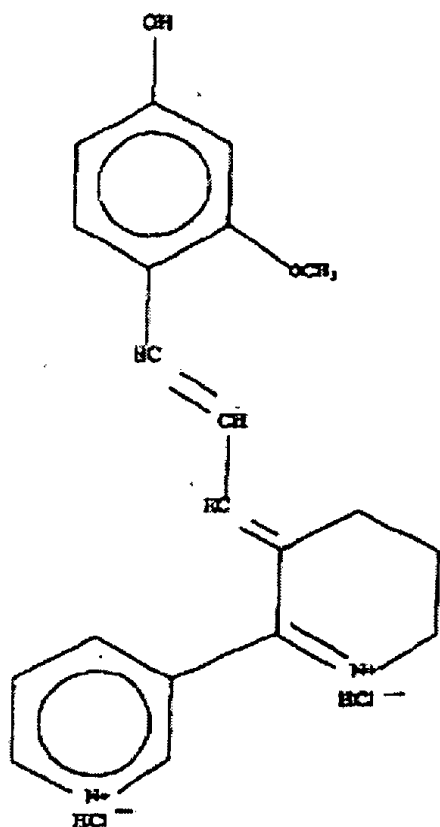
[0088] Einer Lösung von Anabaseindihydrochlorid (400 mg, 1,70 mmol) und trans-4-Methoxycinnamaldehyd (696 mg, 4,30 mmol) in 20 ml Ethanol wurde konzentrierte HCl (16 Tropfen) zugegeben. Die Lösung wurde erwärmt und für 4 h unter Rühren refluxiert. Das Reaktionsgemisch wurde auf 0°C gekühlt und das Produkt mit Diethylether (ca. 20–40 ml) präzipitiert. Das Produkt wurde durch Filtration gesammelt und gab 410 mg eines gelben Feststoffes. Der Feststoff wurde durch Lösung in warmen Isopropylalkohol und Präzipitation mit Diethylether rekristallisiert und ergab eine Ausbeute von 350 mg eines orangefarbenen Feststoffes (Schmelzpunkt 217–21°C, Zersetzung, 54% Ausbeute). <sup>1</sup>H NMR (Dihydrochlorid, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 8,98 (H6', 1H, Dublett, J = 6 Hz), 8,94 (H2', 1H, Singlett), 8,32 (H4', 1H, Dublett, J = 9 Hz), 8,78 (H5', 1H, Dublett von Dubletten, J = 9 Hz und 6 Hz), 7,66 (H2, H6, 2H, Dublett, J = 10 Hz), 7,38 (Hβ, 1H, Dublett von Dubletten, J = 17 Hz und 12 Hz), 7,24 (Hα, 1H, Dublett, J = 17 Hz), 6,95 (H3, H5 und Hγ, 3H, Multiplett), 5,9 (N–H, 2H, breit), 3,76 (CH<sub>3</sub>, 3H, Singlett), 3,74 (CH<sub>2</sub>, 2H, Multiplett), 2,89 (CH<sub>2</sub>, 2H, Multiplett), 2,04 ppm (CH<sub>2</sub>, 2H, Multiplett). Elementaranalyse für C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>OCl<sub>2</sub>. Errechnet: C, 63,67; H, 5,88; N, 7,43. Gefunden: C, 63,32; H, 5,87; N, 7,32.



trans-3-(4-Methoxycinnamyliden)anabaseindihydrochlorid

#### 5.9. Beispiel 9 – Herstellung von trans-3-(4-Hydroxy-2-methoxycinnamyliden)anabaseindihydrochlorid („GTS-86“)

[0089] Eine Mischung von 4-Hydroxy-2-methoxycinnamaldehyd (178 mg, 0,93 mmol), Anabasein (150 mg, 0,63 mmol), 12 Tropfen konzentrierter HCl und 30 ml reinen Ethanols wurden für 4 h refluxiert. Ein gelbes Präzipitat wurde nach Zugabe von 50 ml Ethylacetat erhalten. Das Produkt wurde mit Ethylacetat gewaschen um das nicht reagierte 4-Hydroxy-2-methoxycinnamaldehyd zu entfernen. Die Rekristallisierung aus warmen Ethanoether gab das trans-3-(4-Hydroxy-2-methoxycinnamyliden)anabaseindihydro-Chlorid (205 mg, 83%), (DMSO-d<sub>6</sub>): 8,98 (H<sub>2</sub>', Dublett,  $J = 4,7$  Hz), 8,89 (H<sub>6</sub>', Dublett,  $J = 1,9$  Hz), 8,14 (H<sub>4</sub>', Dublett,  $J = 9,9$  Hz), 7,74 (H<sub>5</sub>', Dublett von Dubletten,  $J = 5,2$  Hz und  $4,7$  Hz), 7,54 (H<sub>4</sub>', Dublett,  $J = 9,9$  Hz), 7,74 (H<sub>5</sub>', Dublett von Dubletten,  $J = 5,2$  Hz und  $4,7$  Hz), 7,54 (H<sub>15</sub>', Dublett,  $J = 8,8$  Hz), 6,82–7,34 (H<sub>7,8,9</sub>', Multiplett), 6,57 (H<sub>19</sub>', Dublett,  $J = 10,8$  Hz), 6,49 / H<sub>12</sub>', Dublett,  $J = 2,3$  Hz), 3,76 (H<sub>6</sub>', Triplet,  $J = 7,4$  Hz), 3,63 (OMe, Singlett), 2,71 (H<sub>4</sub>', Triplet,  $J = 5,9$  Hz), 1,79 (H<sub>5</sub>', Triplet,  $J = 7,4$  Hz), 10,51 (N<sub>1</sub>H<sup>+</sup>, breit), 12,70 (N<sub>2</sub>H<sup>+</sup>, breit). MS (FAB) (M – 2Cl) + 321.



trans-3-(4-Hydroxy-2-methoxycinnamyliden)anabaseindihydrochlorid („GTS-86“)

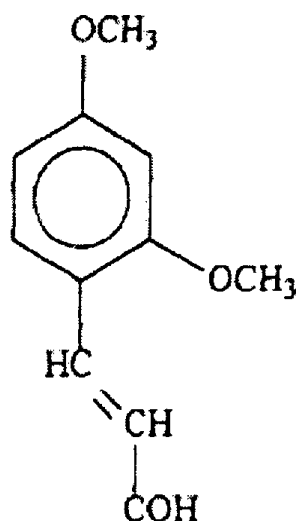
5.10 Beispiel 10 – Herstellung von trans-3-(2,4-Dimethoxycinnamyliden)anabaseindihydrochlorid („GTS-87“).

#### 5.10.1 Acetaldehyd-N-tert-butylimin

[0090] Es wurde Acetaldehyd (8,8 g, 0,2 M) tropfenweise und unter Umrühren zu 1 h tert-Butylamin (14,6 g, 0,2 M) bei 0°C zugegeben. Wasserfreies Kaliumcarbonat (3,0 g) wurde dem Reaktionsgemisch zugegeben und für 6 h gerührt und dann auf Bariumoxid (2,4 g) dekantiert. Nachdem die Mischung für 5 h gerührt wurde, wurde sie filtriert und das organische Filtrat destilliert, um das Imin als eine farblose Flüssigkeit bei reduziertem Druck zu separieren (Ausbeute 80%).

#### 5.10.2 2,4-Dimethoxycinnamaldehyd

[0091] Zu einer gekühlten Lösung (–78°C) von Lithiumdiisopropylamid in 8 ml Tetrahydrofuran wurde Acetaldehyd N-tert-Butylimin (0,4 ml, 3,0 mmol) zugegeben und die Mischung für 30 min gerührt. Es wurde Diethylchlorophosphat (518 mg, 3,0 mmol) zugegeben und die Lösung bei –78°C für 2 h gerührt, dann über einen Zeitraum von 3 h auf –10°C gewärmt und erneut auf –78°C gekühlt. 2,4-Dimethoxybenzaldehyd (232 mg, 2,0 mmol) wurden der gelben Lösung zugegeben und die Mischung für 30 min gerührt und über Nacht auf Raumtemperatur erwärmt. Die Mischung wurde dann mit Oxalsäure (6 mmol in 20 ml Wasser) behandelt und dann 20 ml Benzen zugegeben. Das Zweiphasensystem wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und die Schichten separiert. Die wäßrige Schicht wurde mit Ether extrahiert und die organische Schicht wurde kombiniert und aufeinanderfolgend mit 5% Oxalsäure, 15% Natriumbicarbonat und Salzlösung gewaschen. Die Trocknung (Kaliumcarbonat) und Konzentrierung der organischen Phase gefolgt von einer Reinigung des Rückstandes (Destillierung oder präparative TLC, Kieselerdegel, 30 Ethylacetat-Hexan) folgte, ergab 261 mg 2,4-Dimethoxycinnamaldehyd (Ausbeute 68%).

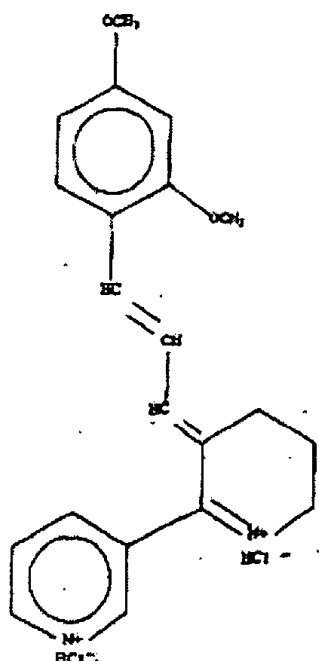


2,4-Dimethoxycinnamaldehyd

[0092]

## 5.10.3 trans-3-(2,4-Dimethoxycinnamyliden)anabaseindihydrochlorid („GTS-87")

[0093] Eine Mischung aus 2,4-Dimethoxycinnamaldehyd (230 mg, 1,2 mmol), Anabasein (233 mg, 1 mmol), 4 Tropfen konzentrierter HCl und 5 ml reinen Ethanols wurde 6 h refluxiert. Ein gelbes Präzipitat wurde nach Zugabe von 50 ml Ethylacetat erhalten. Das Produkt wurde mit Ethylacetat gewaschen, um das nicht reagierte 2,4-Dimethoxycinnamaldehyd zu entfernen. Die Rekristallisation aus warmen Ethanolether ergab das trans-3-(2,4-Dimethoxycinnamyliden)anabaseindihydrochlorid (317 mg, 78% Ausbeute).  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ): 8,89( $\text{H}_2$ , Dublett,  $J = 4,5$  Hz), 8,79( $\text{H}_6$ , Dublett,  $J = 2,0$  Hz), 8,18( $\text{H}_4$ , Dublett,  $J = 9,0$  Hz), 7,64( $\text{H}_5$ , Dublett von Dubletten,  $J = 5,2$  Hz und 4,7 Hz), 7,42( $\text{H}_{15}$ , Dublett,  $J = 8,8$  Hz), 6,72–7,44( $\text{H}_{7,8,9}$ , Multiplett), 6,65( $\text{H}_{14}$ , Dublett,  $J = 10,1$  Hz), 6,52( $\text{H}_{12}$ , Dublett,  $J = 2,1$  Hz), 3,79( $\text{H}_6$ , Triplet,  $J = 7,1$  Hz), 3,65 (OMe, Singlett), 2,75( $\text{H}_4$ , Triplet,  $J = 5,9$  Hz), 1,76( $\text{H}_5$ , Triplet,  $J = 7,4$  Hz). MS(FAB) ( $M + H$ ) + 408.



trans-3-(2,4-Dimethoxycinnamyliden)anabaseindihydrochlorid („GTS-87")

## 5.11 Beispiel 11 – Rezeptoreigenschaften und therapeutische Wirkung von Cinnamylidenanabaseinen

[0094] Es wurde festgestellt, daß Cinnamylidenanabasein-Zusammensetzungen die Alpha-Bungarotoxin-Bindung hoher Affinität bei Rattengehirnmembranen mit einer höheren Affinität verschieben, als man es

aus Untersuchungen mit Benzylidenanabaseinen (Tabelle 2) vorhersagen könnte. Des weiteren verschieben die Cinnamylidenanabaseine die hoch affine Cytisinbindung bei Rattenmembranen mit geringerer Affinität als andere Typen von Benzylidenanabaseinen. Diese Beobachtungen stehen in Einklang mit den Cinnamylidenanabaseinen, welche eine gewisse Selektivität für Alpha7-Rezeptorsubtypen über anderen Typen von Nikotinrezeptoren haben, insbesondere  $\alpha 4\beta 2$ -Rezeptoren, basierend auf den Rezeptortypen, an welche Alpha-Bungarotoxin und Cytisin im Gehirn binden.

[0095] Die Fähigkeit von Cinnamylidenanabaseinen als Agonisten auf die Alpha7-Rezeptoren, aber nicht auf die  $\alpha 4\beta 2$ -Rezeptoren zu wirken, wurde in *Xenopus* Oocyten gezeigt. Jedes der untersuchten Cinnamylidenanabaseine rief eine signifikante oder vollständige Aktivierung der Alpha7-Rezeptoren hervor im Vergleich zu dem endogenen Transmitter Acetylcholin (Tabelle 2). Im Gegensatz dazu rief keines dieser Mittel eine signifikante Aktivierung der  $\alpha 4\beta 2$ -Rezeptoren hervor (Tabelle 2). Diese Mittel wirken ebenfalls antagonistisch auf den Alpha7-Rezeptor und den  $\alpha 4\beta 2$ -Rezeptor, eine frühere Beobachtung, die nach der Rezeptoraktivierung stattfand. Die Blockade des  $\alpha 4\beta 2$ -Rezeptors, obwohl bei höheren Konzentrationen als der Alpha7-Aktivierung beobachtet, könnte für die therapeutische Aktivität ebenfalls wichtig sein, wie weiter unten beschrieben wird. Außerdem sind die Cinnamylidenanabaseine die erste Klasse von Zusammensetzungen, von denen bekannt ist, daß sie eine vollständige agonistische Wirksamkeit und hohe agonistische Wirksamkeit auf die Alpha7-Rezeptoren haben, was einen Grad an möglichen therapeutischen Vorteilen bereitstellt wie sie bei partiellen Agonisten nicht beobachtet wurden.

[0096] E,E-3-(Cinnamyliden)anabasein(3-CA), E,E-3-(2-Methoxycinnamyliden)anabasein(2-McOCA), und E,E-3-(4-Methoxycinnamyliden)anabasein(4-McOCA) verschob die [ $^{125}$ I]  $\alpha$ -Bungarotoxin-Bindung von Rattenhirnmembranen und aktivierte die Ratten- $\alpha 7$ -Rezeptoren in einem Oocyten Expressionssystem mit voller Wirksamkeit. Die Wirksamkeitsreihe für das Binden und die Rezeptoraktivierung war 2-MeOCA > 4-MeOCA = 3-CA und 2-MeOCA = 3-CA > 4-McOCA. Keine Zusammensetzung aktivierte Oocyten-expressionierende  $\alpha 4\beta 2$ -Rezeptoren. Obwohl jedes Cinnamylidenanabasein eine Hemmung der  $\alpha 7$ -Rezeptoren über einen längeren Zeitraum verursachte, wie es durch ACh-Anwendung 5 min später gemessen wurde, lag diese Inhibierung bei unter 20% (3-CA) bis 90% (2-McOCA) bei identischen 10  $\mu$ M Konzentrationen. Diese Zusammensetzungen verbesserten das passive Vermeidungsverhalten in nucleus basalis verwundeten Ratten, wobei 2-MeOCA sich in dieser Beziehung als am stärksten wirksam erwies. Im Gegensatz dazu war nur 3-CA neuroschützend gegen den Neuritenverlust während des NGF-Entzugs in differenzierten PC12-Zellen. Cholin, ein wirksamer  $\alpha 7$ -Agonist ohne antagonistischer Wirksamkeit, war in diesem Modell ebenfalls schützend. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß die neuritschützende Wirkung von  $\alpha 7$ -Rezeptoragonisten sensitiver zu möglichen langzeitantagonistischen Eigenschaften sein können als akute Verhaltenswirkungen.

[0097] Es ist zu erwarten, daß die Alpha7-selektive Wirkung dieser Arzneimittel diesen eine Vielzahl von Aktivitäten von therapeutischen Wert gibt, einschließlich: 1) Gedächtnisfehlfunktionen, wie sie mit der Alzheimer-Krankheit und anderen Fehlfunktionen, die mit Lern- und Gedächtnisschwächen assoziiert sind, gekoppelt sind; 2) Gehirnzellenverlust wie er mit Schlaganfall, Ischämie oder der Alzheimer-Krankheit verbunden ist; 3) Behandlung von Alkoholentzug und Rausch; und 4) Zigarettenentzug. Eine Stütze für die Verwendung von Alpha7-Rezeptoragonisten für jede dieser Indikationen ist in den folgenden Studien aufgezeigt.

[0098] Verschiedene DMAC Analoge wurden synthetisiert wobei die 3-Cinnamylidenanabasein-Struktur entweder keine Substituentengruppe oder eine Methoxygruppe in der 2- oder 4-Stellung enthielt. Diese wurden charakterisiert im Verhältnis zu der  $\alpha 7$ -Rezeptorbindung im Rattengehirngewebe,  $\alpha 7$ -Rezeptoraktivität (agonistische und antagonistische) in einem Oocyten Expressionssystem, Verbesserung in dem passiven Vermeidungsverhalten in nucleus basalis verwundeten Ratten, und dem Neuritschutz in differenzierten PC12-Zellen mit NGF-Entzug. Cholin wurde ebenfalls, in Bezug auf seine neuroschützende Wirkung, als ein typischer  $\alpha 7$ -selektiver Agonist ohne antagonistische Aktivität, untersucht.

### 5.11.1 Synthese von Cinnamyliden

#### Herstellung von E,E-3-(Cinnamyliden)anabaseinen.

[0099] Alle Chemikalien wurden von Aldrich Chemical Company, Inc. erworben, Cinnamylidenanabaseine wurden wie folgt synthetisiert und charakterisiert:

E,E-3(Cinnamyliden)anabaseindihydrochlorid: Zu einer Lösung von Anabaseindihydrochlorid 1 (180 mg, 0,772 mmoles), trans-Cinnamaldehyd (0,25 ml, 1,9 mmol) und Ethanol (20 ml) wurde wäßrige konzentrierte HCl (8 Tropfen) zugegeben. Die Lösung wurde erwärmt und refluxiert für 4 h. Die Reaktionsmischung wurde auf 0°C gekühlt und dann Diethylether tropfenweise zugegeben, bis kein zusätzliches Präzipitat erschien (ca. 10-20 ml). Das Produkt wurde gefiltert und gab nach dem Trocknen 200 mg eines feinen gelben Pulvers, welches durch Lösung in warmen Isopropylalkohol und Präzipitation mit Ether rekristallisiert wurde. Das Ergebnis waren 180 mg (0,519 mmol) eines gelben Feststoffes (Schmelzpunkt 210–213°C Zersetzung, 76% Ausbeute).  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  8,93 (H6', d, 5 Hz, 1H), 8,86 (H2', s, 1H), 8,17 (H4', d, 9 Hz, 1H), 7,77 (H5', dd, 1H), 7,70

(H<sub>2</sub>, H<sub>6</sub>, m, 2H), 7,52 (H<sub>ß</sub>, dd, 13 und 17 Hz, 1H), 7,40 (H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>, m, 3H), 7,29 (H<sub>α</sub>, d, 17 Hz, 1H), 6,98 (H<sub>γ</sub>, d, 12 Hz, 1H), 5,4 (N–H, b, 2H), 3,78 (CH<sub>2</sub>, m, 2H), 2,93 (CH<sub>2</sub>, m, 2H), 2,04 ppm (CH<sub>2</sub>, m, 2H). Anal. berechnet für C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: C, 65,70; H, 5,80; N, 8,07. Gefunden: C, 65,69; H, 5,85; N, 7,98.

#### E,E-3-(2-Methoxycinnamyliden)anabaseindihydrochlorid:

[0100] Einer Lösung von Anabaseindihydrochlorid (200 mg, 0,858 mmol), trans-2-Methoxycinnamaldehyd (348 mg, 2,10 mmol) und 20 ml Ethanol wurde konzentrierte HCl (8 Tropfen) zugegeben. Die Lösung wurde erwärmt und für 4 h unter Rühren refluxiert. Die Reaktionsmischung wurde auf 0°C gekühlt und das Produkt mit Diethylether (ca. 10–20 ml) präzipitiert. Das Produkt wurde durch Filtration gesammelt und gab 220 mg eines gelben Feststoffes. Der Feststoff wurde durch Lösung in warmen Isopropylalkohol und Präzipitation mit Diethylether rekristallisiert und gab einen Ertrag von 200 mg (0,506 mmol) eines orangen Feststoffes (Schmelzpunkt 212–213°C Zersetzung, 59% Ausbeute). Ein Teil wurde in die freie Base durch Verwendung von gesättigter wässriger NaHCO<sub>3</sub> umgewandelt und das Produkt in Ethylacetat extrahiert; dann wurde ein gelber Feststoff gesammelt. <sup>1</sup>H NMR der freien Base (CDCl<sub>3</sub>): δ 8,63 (H<sub>2</sub>', d, 2 Hz, 1H), 8,57 (H<sub>6</sub>', dd, 2 und 6 Hz, 1H), 7,70 (H<sub>4</sub>', dr, 2, 2 und 9 Hz, 1H), 7,42 (H<sub>6</sub>, dd, 2 und 8 Hz, 1H), 7,27 (H<sub>5</sub>', ddd, 2, 6 und 9 Hz, 1H), 7,17 (H<sub>4</sub>, dr, 2, 8 und 8 Hz, 1H), 7,05 (H<sub>ß</sub>, dd, 12 und 17 Hz, 1H), 6,90 (H<sub>α</sub>, d, 17 Hz, 1H), 6,85 (H<sub>5</sub>, t, 8 und 8 Hz, 1H), 6,78 (H<sub>3</sub>, d, 8 Hz, 1H), 6,32 (H<sub>γ</sub>, d, 12 Hz, 1H), 3,80 (CH<sub>2</sub>, m, 2H), 3,78 (CH<sub>3</sub>O, s, 3H), 2,68 (CH<sub>2</sub>, m, 2H), 1,80 ppm (CH<sub>2</sub>, m, 2H). Anal. berechnet für C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>O. H<sub>2</sub>O: C, 60,76; H, 6,12; N, 7,08. Gefunden: C, 60,54; H, 6,03; N, 6,76.

#### E,E-3-(4-Methoxycinnamyliden)anabaseindihydrochlorid:

[0101] Zu einer Lösung aus Anabaseindihydrochlorid (400 mg, 1,72 mmol), trans-4-Methoxycinnamaldehyd (696 mg, 4,30 mmol) und 20 ml Ethanol wurde konzentrierte HCl (16 Tropfen) zugegeben. Die Lösung wurde erwärmt und für 4 h unter Umrühren refluxiert. Das Reaktionsgemisch wurde auf 0°C gekühlt und das Produkt mit Diethylether (ca. 20–40 ml) präzipitiert. Das Produkt wurde durch Filtration gesammelt und gab 410 mg eines gelben Feststoffes. Der Feststoff wurde durch Lösung in warmen Isopropylalkohol und Präzipitation mit Diethylether rekristallisiert und gab eine Ausbeute von 350 mg (0,928 mmol) eines orangen Feststoffes (Schmelzpunkt 217–219°C, Zersetzung, 54% Ausbeute). <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 8,98 (H<sub>6</sub>', d, 6 Hz, 1H), 8,94 (H<sub>2</sub>', s, 1H), 8,32 (H<sub>4</sub>', d, 9 Hz, 1H), 8,78 (H<sub>5</sub>', dd, 9 und 6 Hz), 7,66 (H<sub>2</sub>, 6 d, 10 Hz, 2H), 7,38 (H<sub>ß</sub>, dd, 17 und 12 Hz), 7,24 (H<sub>α</sub>, d, 17 Hz, 1H), 6,95 (H<sub>3</sub>, 5 und H<sub>γ</sub>, m, 3H), 5,9 (NH, b, 2H), 3,76 (CH<sub>3</sub>, s, 3H), 3,74 (CH<sub>2</sub>, m, 2H), 2,89 (CH<sub>2</sub>, m, 2H), 2,04 ppm (CH<sub>2</sub>, m, 2H). Anal. berechnet für C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>OCl<sub>2</sub>: C, 63,67; H, 5,88; N, 7,43. Gefunden: C, 63,32; H, 5,87; N, 7,32.

### 5.11.2 Tiere

[0102] Männliche Sprague Dawley-Albinoratten (250–350g) wurden aus dem Charles River Laboratories (Boston, MA) erworben und in den University of Florida Health Center Vivarium entsprechend den NIH-Richtlinien in einem 12 h : 12 h Tag: Nacht-Rhythmus gehalten. Sie hatten ad libitum Zugang zu Futter (Purina-Rattenfutter) und Wasser. Xenopus-Weibchen wurden in Aquarien gehalten und die Temperatur genau bei 18°C gehalten, um mögliche Probleme durch saisonale Schwankungen der Vitalität der Oocyten zu verringern. Die Frösche wurden mit „frog brittle“ (Nasco) gefüttert und in einem 12 h Licht Dunkelheit Rhythmus gehalten.

### 5.11.3 Oocyten-Gewinnung

[0103] Die Oocyten wurden behandelt und gewonnen wie früher beschrieben (de Fiebre, et al., 1995). Die Frösche wurden durch Eintauchen in 0,1% (3)-Aminobenzoessäureethylester betäubt und einige Lappen des Ovariums durch einen kleinen Schnitt in der abdominalen Wand chirurgisch entfernt. Die Oocyten wurden von den Follikelzellen entfernt mittels einer Behandlung mit Collagenase (in calciumfreier Barth'slösung: 88 mM NaCl, 1 mM KCl, 15 mM Hepes pH 7,6, 0,33 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,1 mg/ml Gentamicinsulfat) über 2 h bei Raumtemperatur und die Oocyten im Stadium 5 wurden isoliert. Die Oocyten wurden abgespült und bei 18°C in Barth'ssalzlösung (88 mM, NaCl, 1 mM KCl, 15 mM Hepes pH 7,6, 0,3 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 0,41 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,82 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,1 mg/ml Gentamicinsulfat) gelagert bevor und nach der Mikroinjektion mit RNA. Die Mikroinjektion wurde mit einem Drummond Scientific „Nanoject Variable“ automatischen Injektor durchgeführt. Die Oocyten wurden mit einer 50 nl-Lösung einer speziellen Ratten-Nikotin-Untereinheit mRNA-Spezies (2–10 mg/ml; erhalten von der cDNA des HIP 306 Plasmide, welcher freundlicherweise von Dr. Jim Boulter, Salk Institute zur Verfügung gestellt wurde) injiziert und 2–7 Tage bei 18°C inkubiert vor der elektrophysiologischen Behandlung.

[0104] Vor der elektrophysiologischen Behandlung wurden die Oocyten in einer Warner Instruments RC-8 Aufzeichnungskammer mit einer Perfusionslösung perfundiert, welche 115 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM He-

pes pH 7,2, 1,8 mM  $\text{CaCl}_2$  und 1  $\mu\text{M}$  Atropin zum Blockieren der muskarienischen Reaktion enthält. Die Perfusion wurde mit einer Rate von 10 ml/min fortgesetzt. Die Arzneimittel wurden in der Perfusionslösung verdünnt und unter Verwendung einer Solenoidklappe angewandt, um zwischen Perfusionslösung und Arzneimittellösung zu wechseln. Die Stromreaktionen auf die Arzneimittelverabreichung wurde untersucht unter zwei Elektrodenspannungsklemmen mit einem Haltepotential von  $-70$  mV unter Verwendung einer Dagan Corp.-TEV-200-Spannungsklemme, die zu einem 386-SX-IBM-Computer unter Verwendung eines TL-1-DMA-Interfaces (Axon Instruments) verbunden war. Die Mikropipetten wurden mit 3 M KCl gefüllt und hatten einen Widerstand von 0,5–2 MOhm. Die Arzneimittelreaktion wurde mit der PClamp Software (Axon Instruments) analysiert. Oocyten mit einem Ruhepotential von weniger als  $-30$  mV wurden verworfen.

#### 5.11.3 Hochaffinitäts $^{125}\text{I}$ ]-Bungarotoxinbindung

[0105] Die Ratten wurden geköpft und die zerebralen Cortex entfernt und in 10 vol eiskaltem Krebs-Ringer-Hepes-(KRH) Puffer; (NaCl, 118 mM; KCl 4,8 mM;  $\text{MgSO}_4$ , 1,2 mM;  $\text{CaCl}_2$ , 2,5 mM; und Hepes, 20 mM; pH auf 7,5 mit NaOH eingestellt) homogenisiert und dann auf hohe Affinitäts $^{125}\text{I}$ ]-Bungarotoxinbindung untersucht. Atropin (1  $\mu\text{M}$ ) und Physostigmin (10  $\mu\text{M}$ ) wurden entsprechend zugegeben, um vor muskarinischer Rezeptorbindung und ACh-Hydrolyse zu schützen. Die Bindungsuntersuchungen wurden bei  $4^\circ\text{C}$  in KRH-Puffer durchgeführt. Die Endinkubation enthielt 500–800  $\mu\text{g}$  Protein/250  $\mu\text{l}$  mit 0,5 nM  $^{125}\text{I}$ ]-Bungarotoxin. Die Bindung wurde beendet durch Verdünnung mit 3 ml eiskaltem KRH-Puffer, unmittelbar folgend der Filtration durch Glasfieberfilter, die mit Puffer vollgesaugt waren, der 0,55 Polyethylenimin enthielt. Die Filter wurden viermal mit 3 ml Aliquoten des eiskalten Puffers gewaschen. Die nicht spezifische Bindung wurde mit 100  $\mu\text{M}$  unmarkierten Nikotin festgestellt.

#### 5.11.4 Neuroschutzuntersuchung

[0106] Die PCI2-Zellkulturenmethode nach Greene und Tischler (1976) wurde modifiziert. Die Zellen wurden mit 30–40% Konfluenz ausplattiert und wuchsen in Dulbecco's Modified Eagle Medium, welches 10% hitzeinaktiviertes Pferdeserum, 5% fötales Kälberserum, 100 Einheiten/ml Penicillin, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Streptomycin und 0,5 mM 1-Glutamin enthält. Die Kulturen wurden gehalten bei  $37^\circ\text{C}$ , 94%  $\text{O}_2$ /6%  $\text{CO}_2$  und 90–92% Feuchtigkeit in Kulturplatten, welche mit Poly-1-Lysin (10 g/l) überzogen sind. Die Kulturen wurden für 7 Tage in serumsupplementierten Medium gehalten, zu welchem 100 ng/ml Ratten-2,5 S NGF am Tag 1 zugegeben wurden. Am Tag 7 wurde das konditionierte Medium durch serumfreies Medium, welches die speziellen Arzneimittel enthielt, ersetzt. Vier Tage später wurde die Zelldichte geschätzt unter Verwendung der NIH-Bildprogrammversion 1,47 und die Anzahl der neuritexpressierenden Zellen wurde manuell im Blindmodus gezählt, wie bereits früher beschrieben (Martin et al., 1994). Ein Nikon-Umkehrmikroskop (100fache Vergrößerung) war an einen Mac II Computer gekoppelt via einer monochromen Videokamera (Cohu, Inc., San Diego, CA). Pro Platte wurden 4 zufällige Flächen ausgezählt und es gab 4 Platten pro Behandlungsgruppe, es sei denn, es ist anders angegeben. Neuriten sind als Fortsätze von mindestens zweifacher Länge des Perikarions definiert. Um die Zuverlässigkeit der Bildanalyse einschätzen zu können, wurde zur direkten Quantifizierung der Zellen ein Retikulum in gleicher Weise verwendet wie das in Zufallsproben analysierte.

#### 5.11.5 Passives Vermeidungsverhalten

[0107] Das passive Vermeidungsverhalten wurde in nucleus basalis verwundeten Ratten nach intraperitonealen (IP) Injektionen der Arzneimittel (Basisgewicht) oder 0,9% Salzlösung gemessen. Zur Verwundung wurden 5 Monate alte männliche Sprague Dawley-Ratten mit 30 mg/kg Natriumpentobarbital (IP) betäubt und ihnen dann beidseitig eine Infusion mit 1  $\mu\text{l}$  von 5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  Ibotensäure in phosphatgepufferter Salzlösung, pH 7,4, in die nucleus basalis gegeben. Die Infusionskoordinaten waren anterior 7,0 mm, lateral 2,6 mm und vertikal 6,5 mm gemäß Paxinos und Watson (Paxinos und Watson, 1986).

[0108] Nach dem chirurgischen Eingriff wurden die Tiere in ihre individuellen Käfige zurückgebracht und für einige Tage mit halbfestem Brei aus Purina Rattenfutter gefüttert. Einen Monat später wurden die Tiere in einem zweikammerigen passiven Vermeidensparadigma trainiert. 15 min nach der IP-Arzneimittelinjektion wurden sie in den hellen Bereich gebracht und ihnen die Möglichkeit gegeben, die angrenzende dunkle Kammer aufzusuchen. Tiere, die die zweite Kammer aufsuchten, erhielten einen schwachen Elektroschock (0,8 mA) für 1 sek auf die Füße. Die Ratten wurden 24 h später für bis zu 5 min auf Latenz getestet; dieser Test begann ebenfalls 15 min nach der Injektion. Die statistischen Analysen verwendeten die Reihenfolge der nicht-parametrischen Vergleiche von Latenzen.

[0109] Nach den Verhaltensmessungen wurden die histologischen Einschätzungen der ibotenischen Säureverteilungen in der Nucleus Basalis unter Verwendung der Cholinesterasefärbung in Formalin fixierten Geweben gemacht. Diese Injektionen verringern typischerweise die Anzahl der cholinesterasegefärbten Zellen bei



über 80% in der Nucleus Basalis mit ebenfalls einigem Färbungsverlust der Globus Pallidus und Thalamus, wie durch das NIH Bildprogramm 1,47 festgestellt wurde.

### 5.11.6 Ergebnisse

[0110] Die Rattengehirnmembrane binden zu [ $^{125}$ I] $\alpha$ -Bungarotoxin in einer 100  $\mu$ M Nikotin-verschiebenden Art mit einem  $K_d$  von 1,9 nM gemäß der Scatchard Analyse ( $r = 0,98$ ; Einzelstellenmodell). Jedes der 3-Cinnamylidenanabaseine blockierte voll-ständig die hohe Affinität, Nikotin-verschiebende [ $^{125}$ I] $\alpha$ -Bungarotoxin-Bindung von Rattengehirnmembranen in einer konzentrationsabhängigen Art ( $IC_{50}$  Werte: 3-CA, 80 nM; 4-McOCA, 54 nM; 2-McOCA, 8 nM) (**Fig. 10**).

[0111] ACh zeigte eine typische agonistische Aktivität auf  $\alpha 7$  und  $\alpha 4\beta 2$  Nikotinrezeptoren, die in *Xenopus* Oozyten exprimiert werden (**Fig. 11** und **Fig. 12**). Die Cinnamylidenanabasein-Zusammensetzungen waren ebenfalls wirksam bezüglich der Aktivierung der Ratten  $\alpha 7$ -homo-oligomeren Rezeptoren, ohne Aktivität auf die  $\alpha 4\beta 2$ -Kombination. 3-CA und 2-MeOCA hatten ähnliche  $\alpha 7$ - $EC_{50}$ -Wirksamkeitswerte ( $3,2 \pm 0,7 \mu$ M und  $6,2 \pm 2,2 \mu$ M), während 4-MeOCA 2–3 mal geringer wirksam war ( $EC_{50} = 15,9 \pm 7,9 \mu$ M).

[0112] Der agonistischen Aktivität nachfolgende, antagonistische Eigenschaften wurden als Verringerung der Reaktionsfähigkeit auf ACh, welches 5 min nach der Anwendung der Zusammensetzung angewandt wurde, gemessen und der ACh-Anwendung, anstelle der Anabaseinderivate, angepaßt (**Fig. 13A** und **Fig. 13B**). Wie bereits vorher festgestellt, hatte die ACh-Anwendung keine lange hemmende Wirkung. Jedoch zeigten die Cinnamylidenanabaseine eine konzentrationsabhängige antagonistische Aktivität, die in ihrer relativen Wirksamkeit variierte, was bei der agonistischen Aktivität beobachtet wurde. Die  $IC_{50}$ -Werte für 3-CA, 2-MeOCA und 4-MeOCA betrugen  $15 \pm 6 \mu$ M,  $2,3 \pm 0,7 \mu$ M und  $5,0 \pm 2,3 \mu$ M. Zwischen diesen drei Zusammensetzungen gab es keine deutliche Abhängigkeit zwischen den agonistischen und antagonistischen Wirksamkeiten für die  $\alpha 7$ -Rezeptoren. Keine dieser Zusammensetzungen zeigte einen signifikanten Antagonismus auf  $\alpha 4\beta 2$ -Rezeptoren herauf bis zu einer Konzentration von 30  $\mu$ M (**Fig. 14A** und **Fig. 14B**).

[0113] Im Vergleich zu den scheinoperierten Kontrollen, gaben die beidseitig Nucleus Basalis verwundeten Ratten, denen die Salzlösung injiziert wurde, eine mangelhafte Vorstellung bei dem passiven Vermeidungsparadigma (**Fig. 2**). Jedes der drei Cinnamylidenanabaseine verbesserte bei den verwundeten Tieren das passive Vermeidungsverhalten auf eine invertierte U-förmige, dosisabhängige Art bei IP-Verabreichung. 2-MeOCA war das am stärksten die Leistung verstärkende Mittel dieser Gruppe. Innerhalb der Dosisbreite, in welcher die Test-Vorstellung verbessert war, änderte keines der Mittel die Leistung während des Trainingsintervalles, was darauf hinweist, daß keine arzneimittelinduzierte Veränderung der Lokomotorfunktion vorlag; höhere Dosen bewirkten, daß die Tiere nicht trainierbar waren mit offensichtlichem Verlust der Koordination ohne Krämpfe oder Bewußtlosigkeit.

[0114] Die Entfernung von NGF aus den differenzierten PC12-Kulturen führte 4 Tage später zu einem signifikanten Neuritverlust im Vergleich zu den Platten, in denen NGF verblieb (**Fig. 11**). 3-CA schützte in einer Konzentration von 10  $\mu$ M gegen den NGF-Entzug mit Neuritverlust, während die anderen beiden Zusammensetzungen keine Wirkung zeigten. Cholin schützt ebenfalls gegen den NGF-Entzug induzierten Zelltod über einen Konzentrationsbereich von 1–10 mM, für den vorher gezeigt wurde, daß er diese Rezeptoren selektiv in Oocyten aktiviert (**Fig. 15**).

### 5.11.7 Diskussion

[0115] Bindungsstudien und physiologische Studien haben gezeigt, daß die 3-Cinnamylaminanabasein-Struktur ausreicht, um ihr die hohe Affinität und agonistische Wirkung auf Ratten  $\alpha 7$ -Rezeptoren zu verleihen. Das einfachste 3-Cinnamylidenanabasein, 3-CA, war potent und wirksam und zeigte ebenfalls eine relativ geringe antagonistische Aktivität. Der Zusatz einer Methoxygruppe entweder in der 2- oder 4-Stellung verleiht wesentliche zusätzliche Eigenschaften auf den  $\alpha 7$ -Rezeptor. Der Zusatz der Methoxygruppe in der 2-Stellung verleiht die höchste Affinität für  $\alpha 7$  für jede Zusammensetzung, die bisher in dieser Klasse bekannt war, während sich gleichfalls die antagonistische Wirksamkeit erhöht. Ähnlich zu den bekannten DMAC, welches ebenfalls ein 4-substituiertes Cinnamylidenanabasein ist (de Fiebre, et al., 1995), hat das 4-substituierte Cinnamylidenanabasein (4-McOCA) agonistische und antagonistische Rezeptoreigenschaften: geringere Affinität zu dem  $\alpha 7$ -Rezeptor als das nichtsubstituierte, jedoch eine höhere antagonistische Wirksamkeit.

[0116] Eines der am längsten bestehenden Probleme des Vergleichs der Ergebnisse von  $\alpha 7$ -Bindungsuntersuchungen mit Untersuchungen von Rezeptorfunktionen ist die viel höhere Wirksamkeit der Agonisten in dem erstgenannten System. Diese Diskrepanz ist für die Cinnamylidenanabaseine ebenfalls sichtbar, wobei die Verschiebung des  $\alpha$ -Bungarotoxins durch jeden Liganden bei einer Konzentration beobachtet wird, die 10–100 mal geringer ist als die, die zur Aktivierung des Rezeptors notwendig ist. Oocyten-Expressionsuntersuchungen ergaben agonistische Wirksamkeiten, die denen in Rattengehirnen beobachteten ähneln, so daß dieses Phänomen kein Ergebnis eines Artefakts in den Oozyten-Expressionssystem ist. Statt dessen ist die schnelle De-

sensitivierung des  $\alpha 7$ -Rezeptors, welche eintritt, bevor in dem Superfusionssystem die Spitze der Agonistenkonzentration erreicht werden kann, zu finden und scheint zumindest ein grundlegender Faktor des Bindungs/Wirksamkeitsunterschiedes zu sein.

[0117] Obwohl das Gehirn viele Nikotinrezeptorsubtypen aufweist, scheinen, basierend auf Bindungs- und immunologischen Untersuchungen, die zwei überwiegenden aus  $\alpha 4\beta 2$ - und  $\alpha 7$ -Untereinheiten zu bestehen. Alle der bis heute charakterisierten 3-Cinnamylidenanabaseine (DMAC, 3-CA, 2-McOCA, 4-McOCA) aktivieren selektiv  $\alpha 7$ -Rezeptoren stärker als  $\alpha 4\beta 2$ , was auf einen gewissen Grad an Nikotinrezeptorselektivität hinweist. Die stärkere DMAC-Selektivität gegenüber anderen Kombinationen von Nikotinrezeptoruntereinheiten wurde ebenfalls beobachtet (de Fibre, et al., 1995). Das 3-substituierte Benzylidenanabasein DMXB ist ebenfalls ein selektiver Agonist für  $\alpha 7$  versus anderen Nikotinrezeptorsubtypen, obwohl es im Vergleich zu den Cinnamylidensubstituierten Analogen der vorliegenden Untersuchung nur eine schwache partielle agonistische Aktivität auf diese Rezeptoren aufweist.

[0118] Ibotenat behandelte Nucleus Basalis verwundete Ratten stellen ein gutes Untersuchungsmodell für gedächtnisbezogene Fehlfunktionen beim passiven Vermeidungsverhalten dar. Die  $\alpha 7$ -Rezeptoraktivierung reicht aus, um diesen Typ des Verhaltens zu verbessern, und folgerichtig wurden die Rezeptoren im Hippocampus und Neocortex, Bereiche, die mit dem Lernen und dem Verhalten verbunden sind, lokalisiert. Die relativen Wirksamkeiten der drei neuen Zusammensetzungen in diesem Verhaltensparadigma stimmen mit ihrer Rezeptorbindung oder Aktivierung überein. Es gab keine Wechselbeziehung zwischen der Verhaltensaktivität und der antagonistischen Aktivität. In diesem Verhaltensparadigma ist DMAC ebenfalls wirksam (Meyer, et al., 1994), während es eine wirksame antagonistische Aktivität besitzt. Es scheint daher, daß das Besitzen einer antagonistischen Aktivität diesen Typ des lern- und gedächtnisbezogenen Verhaltens nicht stört.

[0119] NGF-Entzug in differenzierten PC12-Zellen wurde umfangreich als ein Modell für die neuronale Atrophy charakterisiert (Martin, et al., 1994). Es wurde gezeigt, daß die  $\alpha 7$ -Aktivierung durch GTS 21 ausreicht, um in diesem Modell die Neurotoxizität zu verringern (Martin, et al., 1994). Die vorliegenden Ergebnisse stimmen mit dieser Beobachtung überein, da Cholin als auch 3-CA zytoschützende Aktivität zeigen. Für Cholin wurde gezeigt, daß es Ratten- $\alpha 7$ -Rezeptoren mit einer Wirksamkeit, die 10fach geringer als die von ACh ist, aktiviert, und ohne Effekt auf  $\alpha 4$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 2$  oder  $\beta 4$  enthaltende Subtypen wirkt (Papke, et al., 1996). Die Wirksamkeit von Cholin auf Oocyten exprессиerte  $\alpha 7$ -Rezeptoren ist daher vergleichbar zu der beim Neuroschutz in vorliegender Untersuchung beobachteten.

[0120] Weder 2-MeOCA noch 4-MeOCA zeigen den Neuritschutz bei derselben 10  $\mu$ M-Konzentration, bei der 3-CA wirksam war. Diese Konzentration wurde auf der Basis von Ergebnissen von Oocyten-Untersuchungen ausgewählt, da sie einen Vergleich der relativen Wichtigkeit der agonistischen gegenüber der antagonistischen Aktivität im Neuritschutz, besonders beim Vergleich von 3-CA zu 2-McOCA, erlaubt. Auf den Oocyten-Rezeptor-Expressions-Ergebnissen basierend wurde abgeschätzt, daß 10  $\mu$ M 3-CA und 2-MeOCA ähnliche Fraktionen (über 75%) der  $\alpha 7$ -Rezeptoren aktivieren würden, jedoch unterschiedlich die  $\alpha 7$ -Rezeptoren hemmen würden: weniger als 20% Hemmung für 3-CA und über 90% Hemmung für 2-McOCA. Auf diesen Vergleich basierend scheint es, daß die neuroschützende Wirkung in den PC12-Zellenmodell durch den  $\alpha 7$ -Rezeptor-Antagonismus abgeschwächt ist, wenn ein ähnliches Niveau der Rezeptoraktivierung vorliegt. Das stimmt mit der Beobachtung überein, daß Cholin keine antagonistische Wirkung auf  $\alpha 7$ -Rezeptoren hat (Papke, et al., 1996). Für 4-MeOCA ist es schwierig zu klären, ob das Fehlen des Neuritschutzes in der schwachen agonistischen Wirksamkeit oder einem starken Antagonismus, oder beidem, begründet ist.

[0121] Die offensichtliche Sensitivität der Neuritschutzaktivität auf die antagonistischen Eigenschaften der  $\alpha 7$ -Mittel kann in dem langen Veranlagungszeitraum dieser Untersuchungen liegen. Im Unterschied zu den Verhaltensuntersuchungen, welche kurz nach der Verabreichung des Arzneimittels durchgeführt wurden, fanden die vorliegenden Neuroschutzuntersuchungen über 4 Tage statt. Alternativ ist es möglich, daß es verschiedene Mechanismen gibt, die der neuroschützenden versus Verhaltenswirkung zugrundeliegen. Die Rolle des  $\alpha 7$ -Rezeptors bei der Aufrechterhaltung der Calciumhomöostasis und intrazellulären Transduktionsprozessen kann verschieden sensitiv zu den antagonistischen Eigenschaften der  $\alpha 7$ -Agonisten sein als die akuten Änderungen im Membranpotential, welche ausreichend sein können, um das Verhalten zu verändern.

## 5.12 Beispiel 12 – Cinnamylidenanabaseine zur Behandlung der Alzheimer-Krankheit und anderen pathologischen Zuständen, die das Lernen und Erinnern stören

[0122] Nikotin verbessert das lern- und gedächtnisbezogene Verhalten bei Menschen und Tieren. Zum Beispiel bei der Alzheimer-Krankheit verbessert Nikotin die Leistung bei mehreren gedächtnisbezogenen Aufgaben, dennoch sind die mit dieser Krankheit verbundenen Nebeneffekte so stark gewesen, daß hohe Dosen nicht toleriert werden können. Schwache, obgleich selektive  $\alpha 7$ -Rezeptoragonisten mit Benzylidenanabasein-Strukturen verbessern das Lernen und das Erinnern in einer Vielzahl von Tiermodellen, einschließlich des passiven Vermeidungsverhaltens, des aktiven Vermeidungsverhaltens, und im Morris Water-Versuch. Diese Mittel sind nur bei ziemlich hohen Dosen im Vergleich zu Nikotin wirksam, jedoch könnte es sein, daß ihre Fä-

higkeit zur nur partiellen Aktivierung der  $\alpha 7$ -Rezeptoren (im Gegensatz zu der vollen Aktivierung durch die hierin beschriebenen Cinnamylidenanabaseine) ein Faktor in dieser Beobachtung war, genauso wie in der Beobachtung, daß der Bereich der wirksamen Dosen zur Verbesserung des lern- und gedächtnisbezogenen Verhaltens nicht viel stärker als die von Nikotin selbst war.

[0123] Die offenbarten  $\alpha 7$ -selektiven Cinnamylidenanabasein-Zusammensetzungen verbessern das Lern- und Gedächtnisverhalten bei Verwendung eines passiven Vermeidungsparadigmas und cholinergischen hypofunktionalen Ratten, welche nucleus basalis Verletzungen erhielten, vergleichbar zu cholinergischen Verlusten bei der Alzheimer-Krankheit (**Fig. 2**). Die hohe Wirksamkeit eines der Cinnamylidenanabaseine, trans-3-(2-Methoxycinnamyliden)anabasein neben seinem weiten wirksamen Dosis-Reaktionsbereich (unter 0,1 mg/kg bis mindestens 3 mg/kg) zeigt, daß die Cinnamylidenanabaseine therapeutische Vorteile gegenüber den Benzolidenabaseinen haben werden. Der breite Dosis-Reaktionsbereich zeigt auf, daß Patienten seltener eine Dosis erhalten müssen, da es einen breiten Bereich von Arzneimittelkonzentrationen im Gehirn gibt, die verhaltenswirksam sind. Die hohe Wirksamkeit zeigt auf, daß geringe Dosen zur Verbesserung des gedächtnisbezogenen Verhaltens wirksam sein werden, was allgemein mit weniger Nebeneffekten verbunden ist.

[0124] Trans-3-(2-Methoxycinnamyliden)anabasein war von geringerer Wirksamkeit als die vorliegenden Zusammensetzungen.

[0125] Die  $\alpha 4\beta 2$ -Rezeptorblockierungswirkung der offenbarten Cinnamylidenanabaseine könnte ebenfalls wichtig für ihre therapeutische Wirkung beim Lernen und Erinnern sein. Mäuse, die genetisch derart verändert wurden, daß sie in ihrem Gehirn keine  $\alpha 4\beta 2$ -Rezeptoren haben, zeigten bei lern- und gedächtnisbezogenen Aufgaben eine bessere Vorstellung als normale Tiere. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß die Cinnamylidenanabasein-Zusammensetzungen verbesserte gedächtnis- und lernverstärkende Wirkungen haben im Vergleich zu bereits existierenden Mitteln. Ein hoher therapeutischer Index ist zu erwarten bei einer Kombination von vollständiger  $\alpha 7$ -Wirksamkeit und  $\alpha 4\beta 2$ -Blockade.

### 5.13 Beispiel 13 – Cinnamylidenanabaseine als neuroschützende Mittel

[0126] Es wurde gefunden, daß Cinnamylidenanabaseine differenzierte cholinergische PC12-Neuronen schützen, welche im übrigen zum Überleben NGF-abhängig sind (Tabelle 3). Es ist bekannt, daß PC12-Zellen beides,  $\alpha 7$ - und NGF-Rezeptoren, besitzen. Das NGF-Entzugsmodell zeigt Apoptose, wie durch den Verlust der Neuriten belegt, es sei denn, es wird ein neuroschützendes Mittel zugegeben (Rukenstein, et al., 1991). Es wurde herausgefunden, daß dieses neuronale Überlebensmodell sensitiv auf Arzneimittel reagiert, welche die Proteinkinase-C-Aktivität stimulieren oder Calcium-Influx erhöhen (Rukenstein, et al., 1991). Wenn die  $\alpha 7$ -Rezeptoren aktiviert sind, erhöhen sie beides, den Calcium-Influx und die Proteinkinase-C-Aktivität. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß die Cinnamylidenanabaseine die zytoschützende Wirkung des NGF in differenzierten Zellen ersetzen können und daß diese Zusammensetzungen deshalb bei solchen Bedingungen, wie z. B. der Alzheimer-Krankheit, für welche NGF derzeit als potentielle Behandlung gedacht ist, nützlich sein können. Wie von den Erfindern erwartet, schützen die Cinnamylidenanabaseine, wenn in dem NGF-Entzugsmodell das NGF entfernt wurde. Apoptose kann an den verschiedensten neuropathologischen Zuständen beteiligt sein. Da die zytoschützende Wirkung durch ein all-gemeines Phänomen der Rezeptoraktivierung (Calcium und Proteinkinase-C-Aktivierung (Rukenstein, et al., 1991) vermittelt sein kann, ist es wahrscheinlich, daß die damit verbundenen Mittel mit  $\alpha 7$ -Aktivierungskapazität gleichfalls ähnlich zytoschützend sind. Desweiteren, da die Nikotinmittel gegen den Herzschlag-induzierten Zelltod schützen können, ist es wahrscheinlich, daß diese Cinnamylidene in diesem Sinne ebenfalls wirksam sind (z. B. **Fig. 3**).

TABELLE 2

## Rezeptor-Eigenschaften der Cinnamyliden-Zusammensetzungen

Zusammensetzung	Alpha7- Bindung <sup>1</sup>	Alpha4beta2- 2 Bindung <sup>2</sup>	Alpha7- Aktivierung <sup>3</sup>	Alpha4beta2- Aktivierung <sup>4</sup>	Alpha7- Antagonismus <sup>5</sup>	Alpha4beta2- Antagonismus <sup>6</sup>
<i>trans</i> -3-Cinnamylidenanabasein	94,7	6,2	92	<3	45	10
<i>trans</i> -3-(2-Methoxycinnamyliden)anabasein	94,9	29	96	<3	90	10
<i>trans</i> -3-(4-Methoxycinnamyliden)anabasein	94,1	32	45	<2	75	34

<sup>1</sup> % Hemmung der Alpha-Bungarotoxin Bindung bei einer Konzentration von 1  $\mu$ M (höhere Zahl = höhere Affinität)

<sup>2</sup> % Hemmung der Cystin-Bindung bei einer Konzentration von 1  $\mu$ M (höhere Zahl = höhere Affinität)

<sup>3</sup> % Beobachtete Reaktion mit 500  $\mu$ M Acetylcholin (höhere Zahl = stärkere agonistische Aktivität)

<sup>4</sup> % Beobachtete Reaktion mit 10  $\mu$ M Acetylcholin (höhere Zahl = stärkere agonistische Aktivität)

<sup>5</sup> % des Antagonismus des Acetylcholin nach Verabreichung des Arzneimittels (höhere Zahl = mehr Antagonismus)

<sup>6</sup> % des Antagonismus des Acetylcholin nach Verabreichung des Arzneimittels (höhere Zahl = mehr Antagonismus)

TABELLE 3

<b>Schutz von NGF-abhängigen PC12-Kulturzellen</b>	
<b>Zusammensetzung</b>	<b>Neuritzählungen</b>
Keine	83 ± 12
NGF (100 ng/ml	342 ± 56*
<i>trans</i> -3-Cinnamylidenanabasein	185 ± 19*
<i>trans</i> -3-(2-Methoxycinnamyliden)anabasein	213 ± 26*
<i>trans</i> -3-(4-Methoxycinnemyliden)anabasein	155 ± 23*

[0127] PC12-Zellen wurden eine Woche mit NGF differenziert. Die Arzneimittel wurden für einen 4-Tage-Intervall nach der Entfernung von Serum und NGF verabreicht. Die Neuriten wurden gezählt und als Durchschnittswert ± SEM von mindestens 3 Platten/Gruppe dargestellt. Die Arzneimittelkonzentrationen betrugen (außer für NGF) 10 µM.  $p < 0,5$  im Vergleich zu der Behandlung ohne Arzneimittel (Einweg ANOVA).

## 5.14 Beispiel 14 - Rezeptor-Bindungseigenschaften der Benzyliden- und Cinnamyliden-anabaseine

[0100]

TABELLE 4

Rezeptorbindung Oocyten										
Zusammensetzung	Syn	Stab	$\alpha 4$	$\alpha 7$	$\alpha 4$	$\alpha 7$	Agonist/ Antagonist	PC12 Cyto.	PA Verhalt.	NB Verwundung
GTS-21 DMXB	±	±	72	52	<,01	<,20	,20	+	+++	+
GTS-13 PABA										
3-(4-Aminobenzyliden)anabasein	+	+	>90	93	?	,72	,69	+	+++	?
--Acetate--	+	?	78,1	59,2	?	,50	,46	?	?	?
GTS-2 3-(4-Methoxybenzyliden)anabasein	+	+	>80	--	?	?	?	?	++	
GTS-7 3-(4-Hydroxybenzyliden)anabasein	+	+	>90	69,3	?	?	?	--	±	
GTS-80 3-(2,4-Dimethoxy- $\alpha$ -methylbenzyliden)	+	+	41	85	?	?	?	?	?	
GTS-62 3-(4-Hydroxy-2-methoxybenzyliden)anabasein	+	+	87	84	?	,43	,35	?	+(+)	
GTS-51 3-(2-Hydroxy-4-methoxybenzyliden)anabasein	+	+	>60	?	?	,29	,26	--	++(+)	

TABELLE 4 (Fortsetzung)

Zusammensetzung	Rezeptorbindung Oocyten									
	Syn	Stab	α4	α7	α4	α7	Agonist/ Antagonist	PC12 Cyto.	PA Verhalt.	NB Verwundung
trans-3-(Cinnamyliden)anabasein	+	+	6,2	94,7	,026	,92	,50	+	++	
trans-3-(2-Methoxycinnamyliden)anabasein	+	+	29,2	94,9	,022	,96	,08	--	+++	
trans-3-(4-Methoxycinnamyliden)anabasein	+	+	31,8	94,1	>0,05	,45	,104	--	++	
GTS-82 oder 86??										
trans-3-(4-Hydroxy-2-Methoxycinnamyliden)anabasein	+	+	53	90	--	--	--	--	--	
GTS-87 trans-3-(2,4-Dimethoxycinnamyliden)anabasein	+	+	--	76						
GTS-81 trans-3-(4-Nitrocinnamyliden)anabasein										

Antagonisten

15	3-(4-Dimethylaminopropoxybenzyliden)anabasein	+	58	87	?	,03	,02	(?)	(?)	
	Reduziertes GTS -									
	3-(4-Dimethoxybenzyliden)anabasein	+	50	9	?	?	?	+	--	

(+) = dazwischen oder unbekannt  
+ = bis jetzt nicht aktiv  
++ = ≥0,5  
+++ = 0,2  
++++ = 0,1  
+++++ = <0,1

5.15 Beispiel 15 – Hemmung der Nikotin-Selbstverabreichung durch Anabaseine

[0128] Der am meisten akzeptierte Tierest zum Nachweis der Fähigkeit, die Nikotinbelohnung zu hemmen,

ist der Nikotin-Selbstverabreichungstest. Die Erfinder haben diese hochentwickelte Technik benutzt, um zu zeigen, daß DMXB, eine Zusammensetzung, welche als Nikotinantagonist auf putative Rezeptoren wirkt, wobei sie die Nikotinbelohnung vermittelt, die Nikotin-Selbstverabreichung bei der erwachsenen Ratte hemmt, die die Fähigkeit und die Motivation zur Aufnahme von Nikotin erworben hat. Der Vorteil dieser Zusammensetzung ist, daß sie dies erreicht, ohne andere Funktionen des Tiers nachteilig zu beeinflussen, einschließlich der spontanen lokomotorischen Aktivität.

[0129] 11 männliche Sprague Dawley-Ratten wurden als erstes darauf trainiert, den linken Hebel in einer zweihebeligen Versuchskonditionierungskammer zu drücken. 23 h vor der ersten Trainingsbehandlung hatten sie limitierten Zugang zu Futter und erhielten dann 20 g Futter für den Rest der Untersuchung. Sobald die Individuen in zuverlässiger Weise den linken Hebel drückten, wurde ihnen in die rechte juguläre Vene chirurgisch ein Katheter implantiert. Das Katheter bestand aus drei separaten Rohrstücken, ein 37 mm Silicongummrohrstück, welches in das Blutkreislaufsystem führte (Silastic Medical Grade Tubing), ein 65 mm langes Polyethylenrohr (Intramedic, PE10) und ein 170 mm langes Polyethylenrohr mit demselben inneren Durchmesser (Intramedic, PE20). Das Katheter führte zwischen den Schulterblättern heraus und konnte an ein Drehteil gehangen werden, welches selbst mit einer pneumatischen Spritze verbunden war. Nikotinbitartrat (0,01 mg/kg der freien Base) konnte in einem Volumen von 0,1 ml/kg über 0,7 sek verabreicht werden. Sobald sich die Objekte von dem chirurgischen Eingriff erholt hatten, wurden sie darauf trainiert, die pneumatische Spritze zu aktivieren, um einen festgelegten Ratio-2-Plan (FR 2) einzuhalten. Jeder Nikotinverabreichung folgte eine Auszeit (TO) von 60 sek. Jede tägliche experimentelle Behandlung dauerte 50 min. Nach verschiedenen Behandlungen unter diesen Bedingungen erhielten die Objekte 15 min vor dem Beginn der Selbstverabreichungsbehandlung eine intraperitoneale (IP) Injektion einer physiologischen Salzlösung (1 ml/kg). Am nächsten Tag wurde dem Objekt, ebenfalls 15 min. vor dem Beginn der Behandlung, eine IP-Injektion mit 8 mg/kg von GTS-21 verabreicht. **Fig. 5** zeigt, daß nach GTS-21 das Objekt weniger willens zu einer Nikotinselbstverabreichung war als nach der Verabreichung von Salzlösung (gepaart  $t(10) = 2,48$ ,  $p < 0,05$ ).

#### 5.16 Beispiel 16 – DMXB-Schutz gegen die durch NMDA-ausgelöste Excitotoxizität

[0130] Dieses Beispiel zeigt, daß die  $\alpha 7$ -Aktivierung durch DMXB gegen die durch N-Methyl-D-Aspartat-(NMDA)-Rezeptoraktivierung ausgelöste Excitotoxizität schützt. NMDA-Rezeptoren sind hoch permeant für Calciumionen, jedoch im Gegensatz zu  $\alpha 7$ -Nikotinrezeptoren induzieren sie Calcium vermittelte Excitotoxizität, indem sie nach der Aktivierung über einen längeren Zeitraum in einem offenen Zustand verbleiben.

[0131] Es wurde bereits früher herausgefunden, daß die Aktivierung von  $\alpha 7$ -Nikotinrezeptoren Neuronen gegen den durch trophischen Faktoren-Entzug verursachte apoptotische Degeneration schützt. Die Erfinder zeigten, daß der selektive  $\alpha 7$ -Rezeptoragonist Dimethoxybencylidenanabasein (DMXB) ebenfalls primäre neokortikale Neuronen von Ratten gegen NMDA-Rezeptor vermittelte Excitotoxizität schützt. Der dosisabhängige DMXB induzierte Neuroschutz wurde beobachtet, wenn die Verabreichung 24 h vorher erfolgte, nicht hingegen bei einer begleitenden Verabreichung von stimulierenden Aminosäuren. Dies wurde gehemmt durch den nikotinischen, aber nicht muskarinischen Antagonisten DMXB. Der Schutz wurde hauptsächlich in penumbralen Gebieten beobachtet und mit dem nikotischen Antagonisten Mecamylamin gehemmt, was darauf hinweist, daß die  $\alpha 7$ -Rezeptoraktivierung neuroschützend ist.

##### 5.16.1 Methoden

##### Primäre neokortikale neuronale Rattenkulturen

[0132] Neuronen-angereicherte Kulturen wurden von der zerebralen Rattenkortex an den Embryonentagen 16–18 isoliert und dann unter Bedingungen, bei denen teilende, nicht-neuronale Zellen abgetötet werden, auf Kunststoffdeckgläsern kultiviert (01). Es wurden nur reife Kulturen (10–11 Tage nach dem Ausplattieren) verwendet. Die Neurotoxizität wurde induziert, indem man exzitatorische Aminosäuren (EAA), für 10 min (Glutamat oder NMDA) oder 60 min (Kainat) anwendete, gefolgt von einem 60-minütigen EAA-freien Zeitraum. Die lebenden Zellen wurden mittels des Trypan-Blau-Ausschlußverfahrens festgestellt und als Fraktion der gezählten Gesamtzellen dargestellt.

##### Fokales Ischämie-Modell

[0133] Männliche Sprague Dawley-Albinoratten (250–300 g) wurden mit einer subkutanen Injektion von Ketamin, Xylazin und Acepromazin (3 : 3 : 1 Mischung, 0,7 cc/kg) betäubt. Das Atropin (0,4 mg/kg IP) wurde einige Minuten vor dem Sezieren der Halsschlagader von dem Vagus injiziert. Die innere Halsschlagader (ICA) wurde bis zu ihrer Verzweigung in die terminale ICA seziiert und die pterygopalatinalen Arterien wurden deutlich definiert. Die pterygopalatine Arterie wurde an, und fluchtend mit, der terminalen ICA angeklammert. Ein an-



derer Clip wurde bei der allgemeinen Halsschlagader (CCA) verwendet. Die distale Seite der externen Halsschlagader (ECA) wurde koaguliert und ein gerader Aneurysma-Clip 4 mm distal zu der proximalen ICA-Verzweigung verwendet. Eine Naht wurde durch den arteriotomisierten ECA-Stumpf in die ICA geführt, bis sich die Spitze gegen den Aneurysma-Clip stützte. Die Naht wurde 30 min später entfernt, wobei die Körpertemperatur zwischen 36,5–37,5°C aufrechterhalten wurde. Der ECA-Stumpf wurde mit einem bipolaren elektrischen Brenneisen koaguliert.

[0134] Die Clips wurden entfernt und die Wunden vor dem Zünähen mit Salzlösung gespült.

[0135] Die Ratten wurden 24 h nach dem Schlaganfall betäubt und ihr Gehirn entfernt und koronal geschnitten (2 mm). Die Schnitte wurden für 20 min bei 37°C in eine 2% Lösung 2, 3, 5-Triphenyltetrazoliumcholid (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) gelegt. Die Schnitte wurden entnommen, in eine Petrischale gelegt und mit 10% Formaldehydlösung bedeckt. Um für jeden Schnitt das vom Herzschlag betroffene und das gesamte Gehirngebiet abschätzen zu können, wurde die Konturfunktion des NIH-Bildcomputerprogramms (Version 1,47) verwendet. Die Infarktgröße wurde als Prozentsatz des gesamten Gehirnbereichs berechnet.

### 5.16.2 Ergebnisse

[0136] Die akute Anwendung einer 1 mM-Konzentration von jedem EAA reichte aus, um 1 h später 50–60% der Neuronen abzutöten. DMXB schützt gegen die NMDA Rezeptor vermittelte Toxizität in primären neuronalen Kulturen von Rattengehirnen auf eine konzentrationsabhängige Art, wenn es 24 h vor entweder dem Glutamat oder dem NMDA verabreicht wird (**Fig. 6E**). Es kann keine Wirkung auf die Kainat-induzierte Toxizität, welche durch einen nicht-NMDA-Rezeptor vermittelt wird, haben. Im Unterschied zu der blockierenden Wirkung des NMDA-Rezeptor-Antagonisten MK-801, wurde für DMXB bei der begleitenden Verabreichung mit Glutamat kein neuroschützender Effekt beobachtet (**Fig. 6F**). DMXB behinderte nicht die hohe Affinität der [<sup>3</sup>H]MK801-Bindung an Rattengehirnmembranen in Konzentrationen bis hoch zu 30 µM, was gegen eine neuroschützende Wirkung via direkter NMDA-Rezeptor-Blockade spricht. Diese Ergebnisse weisen auf eine indirekte oder nicht-konkurrierende Schwächung der NMDA-induzierten Excitotoxizität durch DMXB hin.

[0137] DMXB induzierter Neuroschutz war zu den nichtselektiven nikotinischen Rezeptor-Antagonisten Hexamethonium, Methyllaconitin und Mecamylamin, genauso wie dem α7-selektiven Antagonisten α-Bungarotoxin, sensitiv (**Fig. 7**). Der nicht-selektive Agonist Nikotin schützt ähnlich gegen den neuronalen Verlust auf eine methyllaconitinsensitive Art, was in Übereinstimmung steht mit der vorher beschriebenen Wirkung in diesem Modell (Akaike, et al., 1994).

[0138] Die in vitro Ergebnisse veranlaßten eine in vivo Untersuchung der Wirkungen der DMXB-Behandlung auf die fokale, ischämieinduzierte Infarktgröße, die dem Verschuß der mittleren zerebralen Arterie folgt. Der meiste Schaden wurde bei dem lateralen Caudate und dem Neocortex, maximal 5 mm posterior zu dem frontalen Pol, welcher für die statistische Analyse verwendet wurde, lokalisiert (**Fig. 8A, Fig. 8B**). DMXB schützt in erster Linie in dem posterioren Schlaganfallgebiet, einschließlich der Bereiche des lateralen Caudate Nucleus und der occipitalen Cortex. Diese penumbralen Bereiche entsprechend denen, die durch MK801 geschützt werden (Papke, 1993). Der Antagonist Mecamylamin hemmt diese neuroschützende Wirkung des DMXB, was die Beteiligung des Nikotins bestätigt. DMXB war bei Verabreichung während des 30 min ischämischen Schlaganfalls wirkungslos, was in Einklang steht mit dem in vitro fehlendem Neuroschutz, wie er bei der begleitenden Verabreichung von Glutamat beobachtet wurde. Die Notwendigkeit, die α7-Rezeptoren vor der NMDA-Rezeptoraktivierung zu aktivieren, um den Neuroschutz zu beobachten, könnte der Grund sein für die Unfähigkeit des endogenen Acetylcholins neuroschützend zu sein, wenn es während der Ischämie-Attacken freigesetzt wird.

[0139] Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß die schützende Wirkung des Nikotins gegen die NMDA induzierte Toxizität in primären neokortikalen Neuronen, zumindest teilweise, durch die α7-Rezeptorsubpopulation vermittelt wird. Die α7-Rezeptoraktivierung reicht aus, um Neuronen in Degenerationsmodellen, welche zumindest teilweise apoptotischer Natur sind, wie z. B. differenzierte PC12-Zellen nach NGF-Entzug und septale cholinergische Neuronen nach Axotomie, zu schützen. Cholin tut in dem sympathetischen Ganglion ebenfalls die Neuronen während dem NGF-Entzug mittels Nikotinrezeptoraktivierung bei Konzentrationen, welche selektiv für die α7-Rezeptoren sind, aufrechterhalten (Steinbach und Ifune, 1989). Die neuroschützende Wirkung des Cholins erfordert rezeptorvermittelte Anhebungen der intrazellulären Ca<sup>2+</sup> Spiegel, was das Konzept stützt, daß die α7-Rezeptoraktivierung gegen den trophischen Faktorentzug mittels Ca<sup>2+</sup> auslösenden Mechanismus schützt.

[0140] Nikotin vermindert in verschiedenen nicht-neuronalen Zellen mittels eines Proteinkinase-C-(PKC)-abhängigen Mechanismus die Apoptose, und dieses Calcium-sensitive Enzym scheint in PC12-Zellen durch α7-Agonisten aktiviert zu werden. Insgesamt deuten diese Ergebnisse auf ein Modell hin, in dem die α7-Aktivierung die intrazellulären Calciumionenkonzentrationen transient erhöht, gefolgt von einer PKC-Aktivierung.

[0141] Im Lichte der vorliegenden Offenbarung können alle hierin offenbaren und beanspruchten Zusammensetzungen und Methoden ohne übermäßigem Experimentieren hergestellt und ausgeführt werden. Obwohl

die Zusammensetzungen und Methoden dieser Erfindung in Form von bevorzugten Ausführungsformen beschrieben sind, ist den Fachleuten klar, daß die Zusammensetzungen und Verfahren oder die Abfolge der Schritte der hierin beschriebenen Verfahren im Rahmen des Umfangs der Erfindung variieren können. Insbesondere ist offensichtlich, daß verschiedene Mittel, die sowohl chemisch als auch physiologisch verwandt sind, die hierin beschriebenen Mittel ersetzen können, wobei dieselben oder ähnlichen Ergebnisse erreicht werden. All derartige, den Fachleuten des Standes der Technik offenkundige Substituenten und Modifikationen sind als von dem Umfang der Erfindung, die durch die Ansprüche definiert ist, als von der Erfindung eingeschlossen zu betrachten.

- [0142] Akaike, Tamura, Takeharu, Shimohama, Kimura, "Nicotineinduced protection of cultured cortical neurons against N-methyl-D-aspartate receptor-mediated glutamate cytotoxicity," *Brain Res.*, 644: 181–186, 1994.
- [0143] Alkondon and Albuquerque, "Diversity of nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal neurons. I. Pharmacological and functional evidence for distinct structural subtypes," *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 265: 1455–1469, 1993.
- [0144] Alkondon, Reinhardt, Lobron, Herrosen, Maelicke, Albuquerque, "Diversity of nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal neurons. II. The rundown and inward rectifications of agonist-elicited whole-cell currents and identification of receptor subunits by in situ hybridization," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 271: 494–499, 1994.
- [0145] Arneric, Sullivan, Briggs, Donnelly-Roberts, Anderson, Raszkievicz, Hughes, Cadman, Adams, Garvey, et al., "(S)-3-methyl-5-(1-methyl-2-pyrrolidinyl) isoxazole (ABT 418): a novel cholinergic ligand with cognition enhancing and anxiolytic activities: I. In vitro characterization," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 270: 310–318, 1994. Bederson, Pitts, Tsuji, Nishimura, Davis, Bartkowski, "Rat middle cerebral artery occlusion: Evaluation of the model and development of a neurological examination," *Stroke*, 17: 472–479, 1986.
- [0146] Blomquist, Ericson, Johnson, Engel, Soderpalm, "Voluntary ethanol intake in the rat: effects of nicotinic acetylcholine receptor blockade or subchronic nicotine treatment," *Eur. J. Pharmacol.*, 314: 257–267, 1996.
- [0147] Burton and Tiffany, "The effect of alcohol consumption on craving to smoke," *Addiction*, 92: 15–26, 1997.
- [0148] Choi, "Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage," *Trends Neurosci.*, 11: 465–469, 1988.
- [0149] Clarke, Schwartz, Paul, Pert, Pert, "Nicotinic binding in rat brain: autoradiographic comparison of [<sup>3</sup>H] acetylcholine, [<sup>3</sup>H] nicotine, and [<sup>125</sup>I] -bungarotoxin," *J. Neurosci.*, 5: 1307–1315, 1985. Collins, Wilkins, Slobe, Cao, Bullock, "Long-term ethanol and nicotine treatment elicit tolerance to ethanol," *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 20: 990–999, 1996.
- [0150] Colquhoun, Ogden, Mathie, "The nicotinic acetylcholine receptor: molecular architecture of a ligand-regulated ion channel," *Trends Pharmacol. Sci.*, 8: 465–472, 1987. Connor, Langlais, and Thal, "Behavioral impairments after lesions of the nucleus basalis by ibotenic acid and quisqualic acid," *Brain Res.*, 555: 84–90, 1991.
- [0151] Couturier, Bertrand, Matter, Hernandez, Bertrand, Miller, Soledad. V., Barkas, T. and Ballivet, M.: "A neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit ( $\alpha$  – 7) is developmentally regulated and forms a homo-oligomeric channel blocked by  $\alpha$ -bungarotoxin," *Neuron*, 5: 8476–856, 1990.
- [0152] Couturier, Bertrand, Matter, Hernandez, Bertrand, Miller, Soledad, Barkas, Ballivet, "A neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit ( $\alpha$ 7) is developmentally regulated and forms a homo-oligomeric channel blocked by  $\alpha$ -BTX," *Neuron*, 5: 846–856, 1990.
- [0153] de Fiebre and Collins, "Classical genetic analyses of responses to nicotine and ethanol in crosses derived from long- and short-sleep mice," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 261: 173–180, 1992.
- [0154] de Fiebre, Meyer, Kem and Papke, "Characterization of a family of anabaseine-derived compounds reveals that the 3-(4)-dimethylamino-cinnamylidene derivative is a selective agonist at neuronal nicotinic  $\alpha$ 7/a-bungarotoxin receptor subtypes," *Mol. Pharmacol.*, 47: 164–171, 1995.
- [0155] Decker, Brioni, Sullivan, Buckley, Radek, Raszkievicz, Kang, Kim, Giardina, Wasicak, et al., "(S)-3-methyl-5-(1-methyl-2-pyrrolidinyl) isoxazole (ABT 418): a novel cholinergic ligand with cognition enhancing and anxiolytic activities," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 270:319-328, 1994.
- [0156] Dekker, Gage and Thai, "Delayed treatment with nerve growth factor improves acquisition of a spatial task in rats with lesions of the nucleus basalis magnocellularis: evaluation of the involvement of different neurotransmitter systems," *Neuroscience*, 48: 111–119, 1992.
- [0157] Deneris, Connolly, Rogers and Duvoisin, "Pharmacological and functional diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors," *TIPS*, 12: 34–40, 1991 10.
- [0158] Dixon and Massey, *Introduction to Statistical Analyses*, McGraw-Hill Book Co., New York, 1969.
- [0159] Deneris, Connolly, Rogers, Duvoisin, "Pharmacological and functional diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors," *TIPS*, 12: 34–40, 1991.
- [0160] Flores, Rogers, Pabreza, Wolfe and Kellar, "A subtype of nicotinic cholinergic receptor in rat brain is composed of  $\alpha$ 4 and  $\beta$ 2 subunits and is up-regulated by chronic nicotine treatment," *Molec. Pharmacol.*, 41:

31–37, 1992.

- [0161] Henningfield and Goldberg, "Stimulus properties of nicotine in animals and human volunteers: a review," In: Behavioral Pharmacology: the Current Status, Seiden and Balster; eds., pp. 433–449, Alan R. Liss, New York, 1984.
- [0162] Hunter, Papke, de Fiebre and Meyer, "Facilitation of hippocampal LTP by an apparent  $\alpha 7$  nicotinic agonist," *Neurosci. Lett.*, 168: 130–134, 1994.
- [0163] Hunter, Zornetzer, Jarvik and McGaugh, "Modulation of learning and memory: effects of drugs influencing neurotransmitters," In: Drugs, Neurotransmitters, and Behavior, Handbook of Psychopharmacology, Vol. 8, Iversen et al., eds., pp 531–577, Plenum Press, New York, 1977.
- [0164] Koike, Martin, Johnson, "Role of  $\text{Ca}^{2+}$  channels in the ability of membrane depolarization to prevent neuronal death induced by trophic-factor deprivation: Evidence that levels of internal  $\text{Ca}^{2+}$  determine nerve growth factor dependence of sympathetic ganglion cells., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 6421–6425, 1989.
- [0165] Marks, Stitzel, Romm, Wehner and Collins, "Nicotinic binding sites in rat and mouse brain: comparison of acetylcholine, nicotine and  $\alpha$ -bungarotoxin," *Mol. Pharmacol.*, 30: 427–436, 1986.
- [0166] Marrain, Russell, Todd, *Biochem. J.*, 45: 533, 1949. Martin, Panickar, King, Deyrup, Hunter, and Meyer, "Cytoprotective actions of 2,4-dimethoxybenzylidene anabaseine in differentiated PC12 cells and septal cholinergic cells, *Drug Develop. Res.*, 31: 127–134, 1994.
- [0167] Meyer, Arendash, Judkins, Ying, Wade, and Kem, "Effects of nucleus basalis lesions on the muscarinic and nicotinic modulation of acetylcholine release in the rat cerebral cortex," *J. Neurochem.*, 49: 1758–1762, 1987.
- [0168] Meyer, de Fiebre, Hunter, Simpkins and de Fiebre, "Effects of anabaseine related analogs on rat brain nicotinic receptor binding and on avoidance behavior," *Drug Dev. Res.*, 31: 135–141, 1994.
- [0169] Morris, "Spatial localization does not require the presence of local cues," *Learn. Motiv.*, 12:239–260, 1981.
- [0170] Newhouse, Sunderland, Tarlot, Blumhardt, Weingartner, Mellow and Murphey, "Intravenous nicotine in Alzheimer's disease: a pilot study," *Psychopharmacology*, 95: 171–175, 1988.
- [0171] Pabreza, Dhawan and Kellar, "[ $^3\text{H}$ ]Cytisine binding to nicotinic cholinergic receptors in brain," *Mol. Pharmacol.*, 39: 9–12, 1990.
- [0172] Page, Everitt, Robbins, Marston, and Wilkinson, "Dissociable effects on spatial maze and passive avoidance acquisition and retention following AMPA and ibotenic acid induced excitotoxic lesions of the basal forebrain in rats: differential dependence on cholinergic neuronal loss," *Neuroscience*, 43: 457–472, 1991.
- [0173] Papke, "The kinetic properties of neuronal nicotinic receptors: genetic basis of functional diversity," *Prog. Neurobiol.*, 41: 509–531, 1993.
- [0174] Papke, Bencherif and Lippiello, "An evaluation of neuronal nicotinic acetylcholine receptor activation by quaternary nitrogen compounds indicates that choline is selective for the  $\alpha 7$  subtype," *Neurosci., Lett.*, 213: 201–204, 1996.
- [0175] Paxinos and Watson, "The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates," Academic Press, Orlando, Florida, 1986.
- [0176] Paylo and Rudy, "Cholinergic receptor blockade can impair the rat's performance on both the place learning and cued versions of the Morris water task: the role of age and pool wall brightness," *Behav. Brain. Res.*, 36: 79–90, 1990.
- [0177] Pearl and Darling, *J. Org. Chem.*, 22: 1266, 1957. Pomerleau and Pomerleau, "Introduction in Pomerleau and Pomerleau (eds); Nicotine Replacement: A Critical Evaluation", New York, Alan R. Liss, pp. 1–9, 1988.
- [0178] Prehn, Binctokas, Marcucilli, Krajewski, Reed, Miller, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 12599–12603, 1994.
- [0179] Pugh and Berg, "Neuronal acetylcholine receptors that bind  $\alpha$ -bungarotoxin mediate neurite retraction in calcium-dependent manner" *J. Neurosci.*, 14: 889–896, 1994.
- [0180] Raw, Jarvis, Feyerabend, Russell, "Comparison of nicotine chewing gum and psychological treatments for dependent smokers," *Br. Med. J.*, 281: 481–482, 1980.
- [0181] Rowell and Li, "Dose-response relationship for nicotine-induced up-regulation of rat brain nicotinic receptors," *J. Neurochem.*, 68: 1982–1989, 1997.
- [0182] Rukenstein, Rydel and Greene, "Multiple agents rescue PC12 cells from serum free cell death by translation and transcription independent mechanisms," *J. Neurosci.*, 11: 2552–2563, 1991.
- [0183] Sahakian, Jones, Levy, Gray and Warburton, "The effects of nicotine on attention, information processing, and short-term memory in patients with dementia of the Alzheimer type," *Brit. J. Psychiat.*, 154: 797–805, 1989.
- [0184] Seguela, Wadiche, Dineley-Miller, Dani, Patrick, "Molecular cloning, functional properties and distribution of rat brain  $\alpha 7$ : A nicotinic  $\text{Ca}^{4+}$  ion channel highly permeable to calcium," *J. Neurosci.*, 13: 596–604, 1993.
- [0185] Shimohama, Day, Greenwald, Shafron, Simpkins, Meyer, "Alpha7 nicotinic receptor activation protects against NMDA-induced toxicity in vitro and focal ischemia induced neurotoxicity," *Brain Res.*, Brain Res., 716:

233-6, 1996.

[0186] Steinbach and Ifune, "How many kinds of nicotinic acetylcholine receptors are there?" Trends Neurosci., 12: 3-6, 1989.

[0187] Treinin and Chalfie, "A mutated acetylcholine receptor subunit causes neuronal degeneration in *C. elegans*," Neuron, 14: 871-877, 1995.

[0188] U. S. Patent No. 5,602,257.

[0189] Vijayaraghavan, Pugh, Zhang, Rathouz, Berg, "Nicotinic receptors that bind  $\alpha$ -bungarotoxin an neurons raise intracellular free  $\text{Ca}^{2+}$ ," Neuron, 8: 353-62, 1992.

[0190] Vorlander, Chem. Ber., 39: 808, 1906.

[0191] Wahlestedt, Golanov, Yamamoto, Yee, Ericson, Yoo, Inturhsi, Reis, "Antisense oligodeoxynucleotides to NMDA-R1 receptorchannel protect cortical neurons from excitotoxicity and reduce focal ischoemic infarctions," Nature, 363: 260-263, 1993.

[0192] Warburton, "Psychopharmacological aspects of nicotine," In: Nicotine Psychopharmacology, Molecular, Cellular and Behavioral Aspects, Wonnacott, et al., eds., pp 77-111, Oxford University Press, New York, 1990.

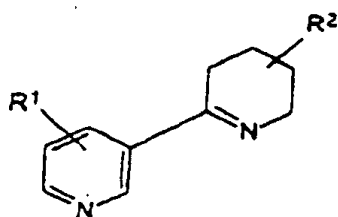
[0193] Woodruf-Pak, Li and Kem, "A nicotinic agonist (GTS-21), eyeblink classical conditioning and nicotinic receptor binding in rabbit brain," Brain Res., 645: 309-17, 1994. Wright, Zhong, Zheng, Larrick, "Nicotine inhibition of apoptosis suggests a role in tumor promotion," FASEB J, 7: 55 1045, 1993.

[0194] Yu, Zhang, Eisele, Benrand, Changeux and Weight, "Ethanol inhibition of nicotinic acetylcholine type  $\alpha$ -7 receptors involves the amino-terminal domain of the receptor," Mol. Pharmacol., 50: 1010-1016, 1996.

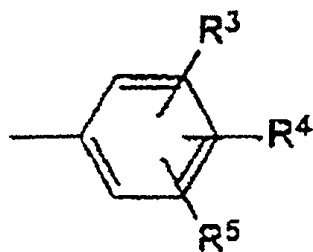
[0195] Zoltewicz, Prokai-Tatrai, Bloom, Kein, "Long range transmission of polar effects in cholinergic 3-arylidene anabaseines. Conformations calculated by molecular modeling," Heterocyclics, 35: 171-179. 1993.

### Patentansprüche

1. Stoffzusammensetzung, enthaltend eine Verbindung der Formel:



wobei  $\text{R}^1$  für Wasserstoff oder  $\text{C}_1$ - $\text{C}_4$ -Alkyl und  $\text{R}^2$  für  $=\text{CHCH}=\text{CHX}$  steht, wobei X für



steht, wobei  $\text{R}^3$ ,  $\text{R}^4$  und  $\text{R}^5$  aus der aus Wasserstoff,  $\text{C}_1$ - $\text{C}_4$ -Alkyl, das gegebenenfalls durch N,N-Dialkylamino mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen in den einzelnen Alkylgruppen substituiert ist,  $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$ -Alkoxy, das gegebenenfalls durch N,N-Dialkylamino mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen in den einzelnen Alkylgruppen substituiert ist, Carboalkoxy mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen in der Alkoxygruppe, Amino, Amido mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen in der Acylgruppe, Cyano, N,N-Dialkylamino mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen in den einzelnen Alkylgruppen, Halogen, Hydroxyl und Nitro bestehenden Gruppe ausgewählt sind, wobei wenigstens einer der Reste  $\text{R}^1$ ,  $\text{R}^3$ ,  $\text{R}^4$  und  $\text{R}^5$  nicht für Wasserstoff steht und wobei  $\text{R}^3$  nicht für 4-N,N-Dialkylamino steht, wenn  $\text{R}^1$ ,  $\text{R}^4$  und  $\text{R}^5$  jeweils für Wasserstoff stehen; oder ein organisches oder anorganisches, pharmazeutisch unbedenkliches Salz davon.

2. Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei  $\text{R}^2$  in der 3-Stellung des Tetrahydropyridinrings gebunden ist.

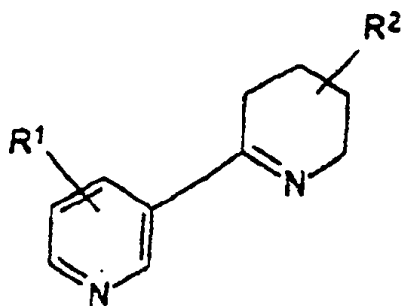
3. Zusammensetzung nach Anspruch 2, wobei  $\text{R}^3$ , das in der 4-oder der 2-Stellung des Phenylrings gebunden ist, aus der aus Amino, Hydroxyl, Chlor, Cyano, Dimethylamino, Methyl, Methoxy, Acetylamino, Acetoxy und Nitro bestehenden Gruppe ausgewählt ist.

4. Zusammensetzung nach Anspruch 3, wobei  $R^1$  und  $R^4$  für Wasserstoff stehen,  $R^3$  für Methoxy steht und in der 2-Stellung des Phenylrings gebunden ist und  $R^5$ , das in der 4-Stellung des Phenylrings gebunden ist, für Methoxy oder Hydroxyl steht.

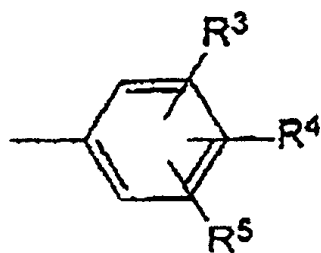
5. Zusammensetzung nach Anspruch 3, wobei  $R^3$  aus der aus Hydroxyl, Acetamino, Acetoxy und Methoxy bestehenden Gruppe ausgewählt ist und wobei  $R^1$ ,  $R^4$  und  $R^5$  für Wasserstoff stehen.

6. Stoffzusammensetzung, enthaltend ein Cinnamylidenanabasein ausgewählt aus der aus  
 3-(4-Acetylamino-cinnamyliden)anabasein,  
 3-(4-Hydroxycinnamyliden)anabasein,  
 3-(4-Methoxycinnamyliden)anabasein,  
 3-(4-Hydroxy-2-Methoxycinnamyliden)anabasein,  
 3-(2,4-Dimethoxycinnamyliden)anabasein und  
 3-(4-Acetoxy-cinnamyliden)anabasein bestehenden Gruppe.

7. Verwendung einer therapeutisch wirksamen Menge einer Verbindung der Formel:



oder eines pharmazeutisch unbedenklichen, organischen oder anorganischen Salzes davon, wobei  $R^1$  für Wasserstoff oder  $C_1$ - $C_4$ -Alkyl und  $R^2$  für  $=CHX$ ,  $=CCH_3X$  oder  $=CHCH=CHX$  steht, wobei X für



steht, wobei  $R^3$ ,  $R^4$  und  $R^5$  aus der aus Wasserstoff,  $C_1$ - $C_4$ -Alkyl, das gegebenenfalls durch N,N-Dialkylamino mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen in den einzelnen Alkylgruppen substituiert ist,  $C_1$ - $C_6$ -Alkoxy, das gegebenenfalls durch N,N-Dialkylamino mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen in den einzelnen Alkylgruppen substituiert ist, Carboalkoxy mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen in der Alkoxygruppe, Rmino, Amido mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen in der Acylgruppe, Cyano, N,N-Dialkylamino mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen in den einzelnen Alkylgruppen, Halogen, Hydroxyl und Nitro bestehenden Gruppe ausgewählt sind, wobei es sich bei der Verbindung nicht um 3-(2,4-Dimethoxybenzyliden)anabasein handelt, zur Herstellung eines Medikaments mit einer therapeutischen Wirkung ausgewählt aus der aus:

- a) der Abschwächung bzw. der Verhinderung von Tabakentzugserscheinungen in einem Säugetier,
  - b) der Stimulierung von durch Ethanol antagonisierten Alpha7-Rezeptoren im Hirn eines Säugetieres,
  - c) dem Schutz gegen durch Ischämie induzierten Zellverlust in einem Säugetier
- bestehenden Gruppe.

8. Verwendung nach Anspruch 7, wobei  $R^2$  in der 3-Stellung des Tetrahydropyridinrings gebunden ist. Verwendung nach Anspruch 8, wobei  $R^3$ , das in der 4-Stellung des Phenylrings gebunden ist, aus der aus Amino, Hydroxyl, Chlor, Cyano, Dimethylamino, Methyl, Methoxy, Isopropoxy und Nitro bestehenden Gruppe ausgewählt ist.

9. Verwendung nach Anspruch 9, wobei  $R^1$  für Wasserstoff,  $R^3$  für Methoxy,  $R^4$  für Hydroxyl oder Methoxy und  $R^5$  für Wasserstoff steht.

10. Verwendung nach Anspruch 10, wobei  $R^3$  in der 4-Stellung des Phenylrings und  $R^4$  in der 2-Stellung

des Phenylrings gebunden ist.

11. Verwendung nach Anspruch 10, wobei R<sup>3</sup> in der 2-Stellung des Phenylrings und R<sup>4</sup> in der 4-Stellung des Phenylrings gebunden ist.

12. Verwendung nach Anspruch 8, wobei R<sup>1</sup> für Wasserstoff steht und R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> und R<sup>5</sup> jeweils für Methoxy stehen.

13. Verwendung nach Anspruch 10, wobei R<sup>3</sup> für 4-Dimethylamino steht und R<sup>4</sup> und R<sup>5</sup> beide für Wasserstoff stehen.

14. Verwendung nach Anspruch 7, wobei R<sup>2</sup> in der 3-Stellung des Tetrahydropyridinrings gebunden ist.

15. Verwendung nach Anspruch 15, wobei R<sup>3</sup>, das in der 4-oder der 2-Stellung des Pyridinrings gebunden ist, aus der aus Amino, Hydroxyl, Chlor, Cyano, Dimethylamino, Methyl, Methoxy, Acetylamino, Acetoxy und Nitro bestehenden Gruppe ausgewählt ist.

16. Verwendung nach Anspruch 16, wobei R<sup>1</sup> und R<sup>4</sup> für Wasserstoff stehen, R<sup>3</sup> für Methoxy steht und in der 2-Stellung des Phenylrings gebunden ist und R<sup>5</sup>, das in der 4-Stellung des Phenylrings gebunden ist, für Methoxy oder Hydroxy steht.

17. Verwendung nach Anspruch 16, wobei R<sup>3</sup> aus der aus Hydroxyl, Acetamino, Acetoxy und Methoxy bestehenden Gruppe ausgewählt ist und wobei R<sup>1</sup>, R<sup>4</sup> und R<sup>5</sup> für Wasserstoff stehen.

18. Verwendung nach Anspruch 10, wobei es sich bei dem Säugetier um einen Menschen handelt.

19. Verwendung einer therapeutisch wirksamen Menge einer Benzylidenanabasein- oder einer Cinnamylidenanabaseinverbindung oder eines pharmazeutisch unbedenklichen Salzes davon, mit der Alpha7-Rezeptoren selektiv aktiviert werden können, zur Herstellung eines Medikaments mit einer therapeutischen Wirkung ausgewählt aus der aus der aus:

- a) der Behandlung von Tabakentzugssymptomen,
  - b) der Stimulierung von durch Ethanol antagonisierten Alpha7-Rezeptoren im Hirn,
  - c) dem Schutz gegen durch Ischämie induzierten Zellverlust
- bestehenden Gruppe, wobei die Verbindung aus der aus

3-(4-Hydroxybenzyliden)anabasein,  
 3-(4-Methoxybenzyliden)anabasein,  
 3-(4-Aminobenzyliden)anabasein,  
 3-(4-Hydroxy-2-Methoxybenzyliden)anabasein,  
 3-(2-Hydroxy-4-Methoxybenzyliden)anabasein,  
 3-(4-Isopropoxybenzyliden)anabasein,  
 (7'-Methyl-3-(2,4-Dimethoxybenzyliden))anabasein,  
 3-(4-Acetylamino-cinnamyliden)anabasein,  
 3-(4-Hydroxycinnamyliden)anabasein,  
 3-(4-Methoxycinnamyliden)anabasein,  
 3-(4-Hydroxy-2-Methoxycinnamyliden)anabasein,  
 3-(2,4-Dimethoxycinnamyliden)anabasein und  
 3-(4-Acetoxy-cinnamyliden)anabasein  
 bestehenden Gruppe ausgewählt ist.

20. Verwendung nach Anspruch 7, wobei der Zellverlust die Folge eines Schlaganfalls ist.

21. Verwendung nach Anspruch 7, wobei der Zellverlust die Folge einer Glutamat induzierten Excitotoxizität ist.

22. Verwendung eines nikotinären Alpha7-Agonisten zur Herstellung eines Medikaments für die Prophylaxe gegen Zellverlust aus fokalen ischämischen Schädigungen, wobei das Medikament für die Verabreichung an ein Säugetier vor dem Eintreten des ischämischen Ereignisses in einer gegen den Zellverlust wirksamen Menge formuliert ist, wobei die Verbindung aus der aus

3-(2,4-Dimethoxybenzyliden)anabasein,

3-(4-Hydroxybenzyliden)anabasein,  
3-(4-Methoxybenzyliden)anabasein,  
3-(4-Aminobenzyliden)anabasein,  
3-(4-Hydroxy-2-Methoxybenzyliden)anabasein,  
3-(2-Hydroxy-4-Methoxybenzyliden)anabasein,  
3-(4-Isopropoxybenzyliden)anabasein,  
(7'-Methyl-3-(2,4-Dimethoxybenzyliden))anabasein,  
3-(4-Acetylamino-cinnamyliden)anabasein,  
3-(4-Hydroxycinnamyliden)anabasein,  
3-(4-Methoxycinnamyliden)anabasein,  
3-(4-Hydroxy-2-Methoxycinnamyliden)anabasein,  
3-(2,4-Dimethoxycinnamyliden)anabasein und  
3-(4-Acetoxy-cinnamyliden)anabasein  
bestehenden Gruppe ausgewählt ist.

23. Verwendung einer therapeutisch wirksamen Menge eines Cinnamylidenanabaseins zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von altersbedingten Lern- bzw. Gedächtnisschwächen, wobei das Cinnamylidenanabasein aus der aus

3-(4-Acetylamino-cinnamyliden)anabasein,  
3-(4-Hydroxycinnamyliden)anabasein,  
3-(4-Methoxycinnamyliden)anabasein,  
3-(4-Hydroxy-2-Methoxycinnamyliden)anabasein,  
3-(2,4-Dimethoxycinnamyliden)anabasein und  
3-(4-Acetoxy-cinnamyliden)anabasein  
bestehenden Gruppe ausgewählt ist.

Es folgen 13 Blatt Zeichnungen

## Anhängende Zeichnungen

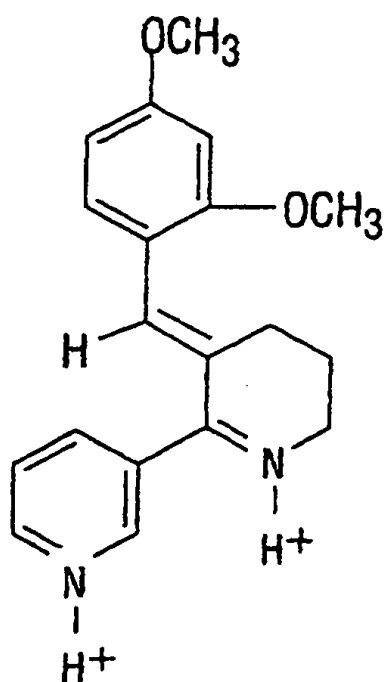


FIG. 1

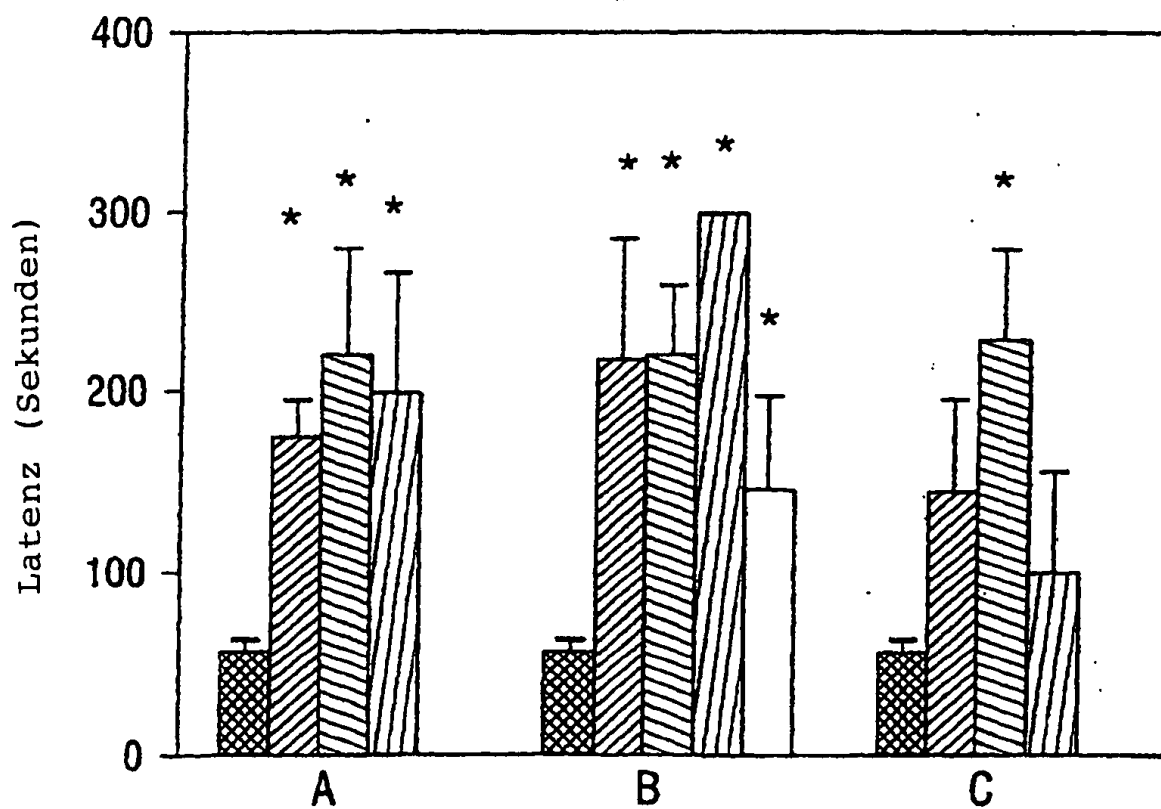


FIG. 2



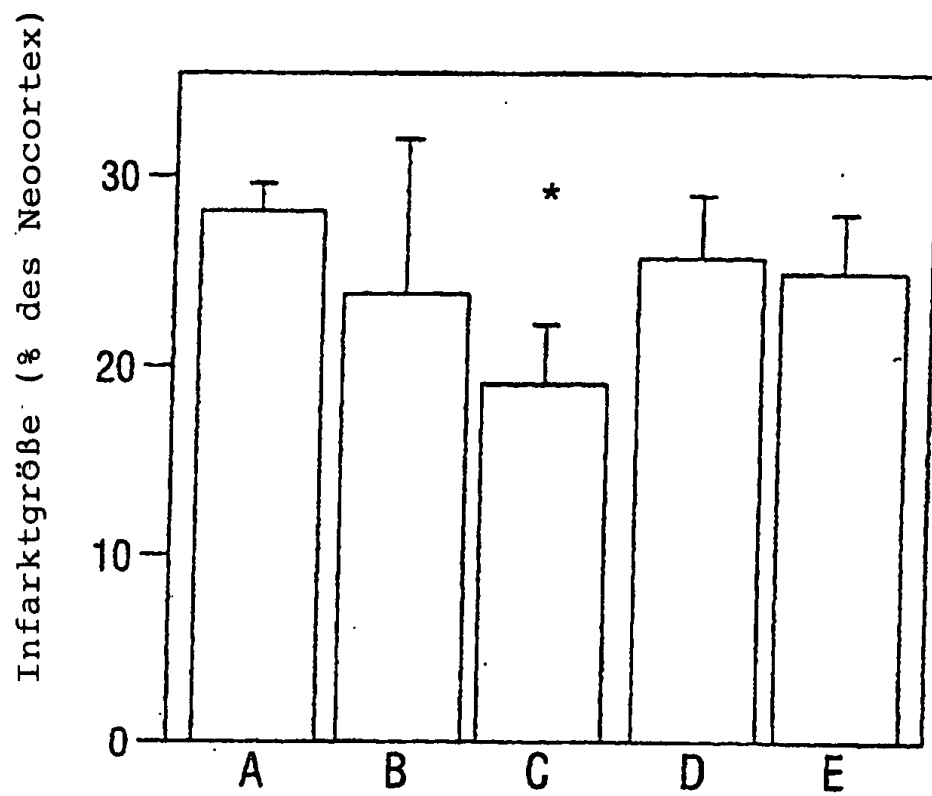


FIG. 3

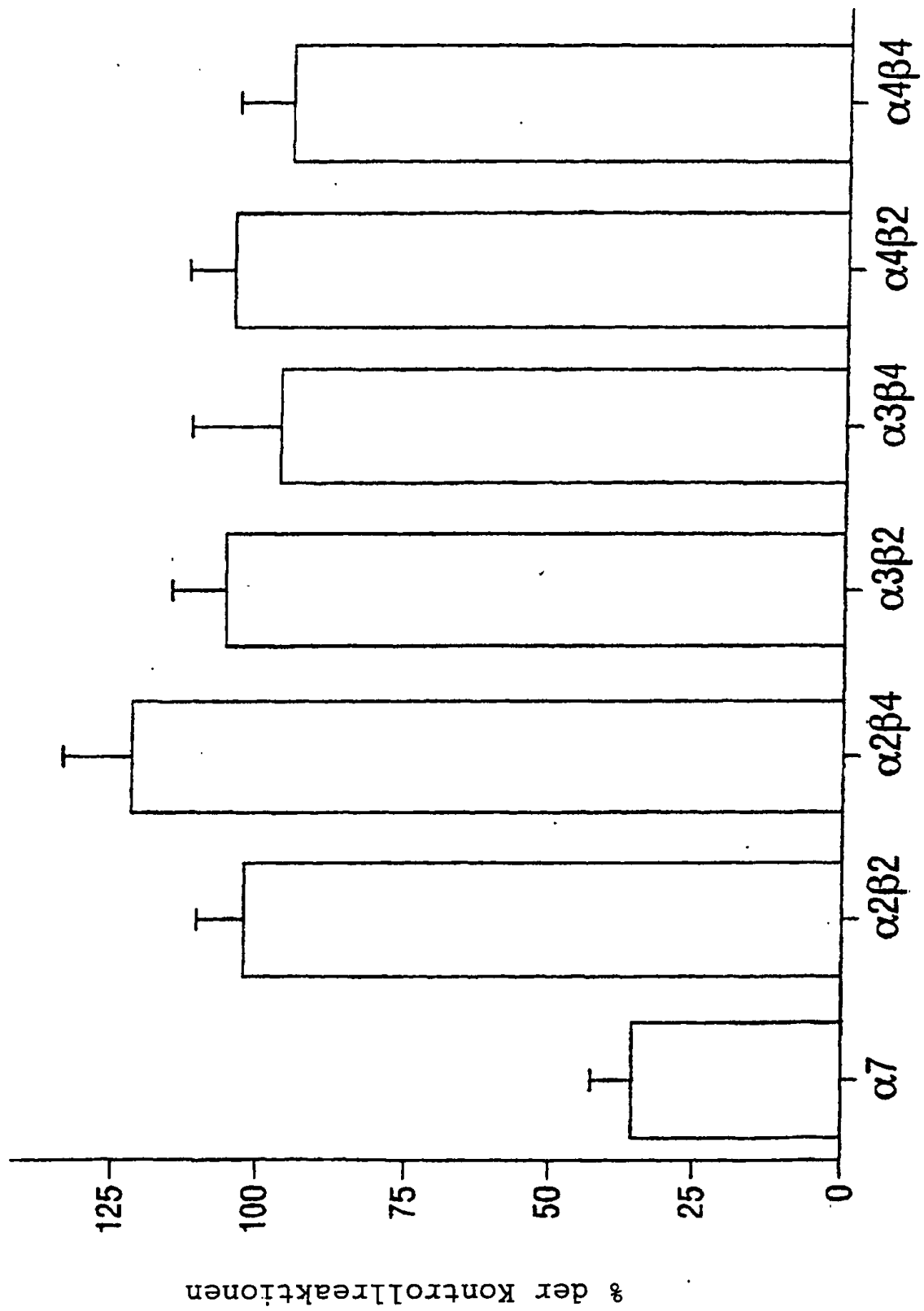


FIG. 4

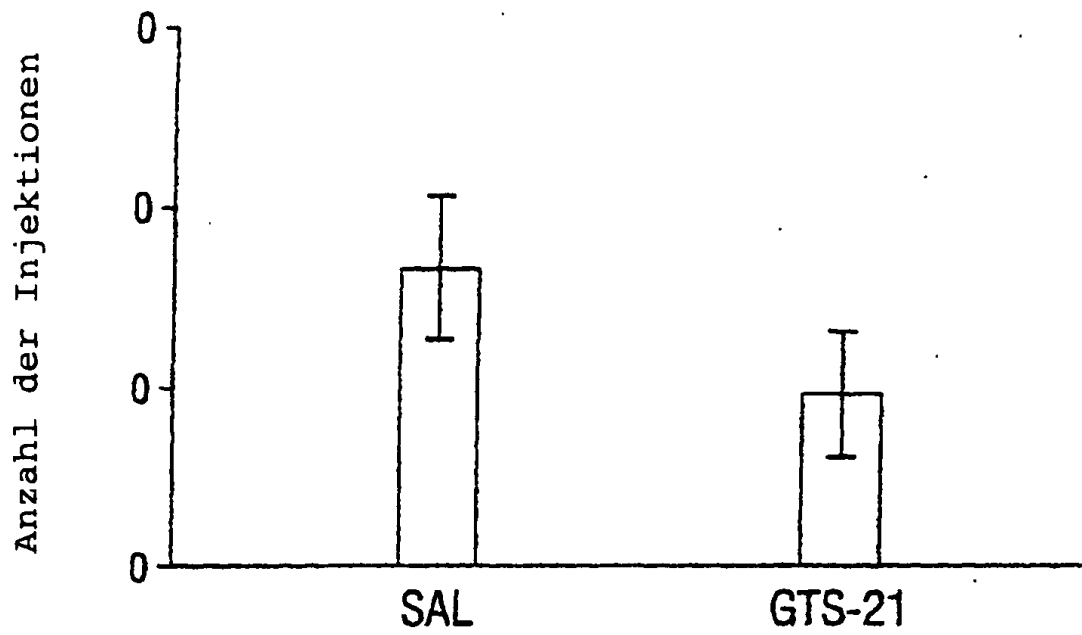


FIG. 5

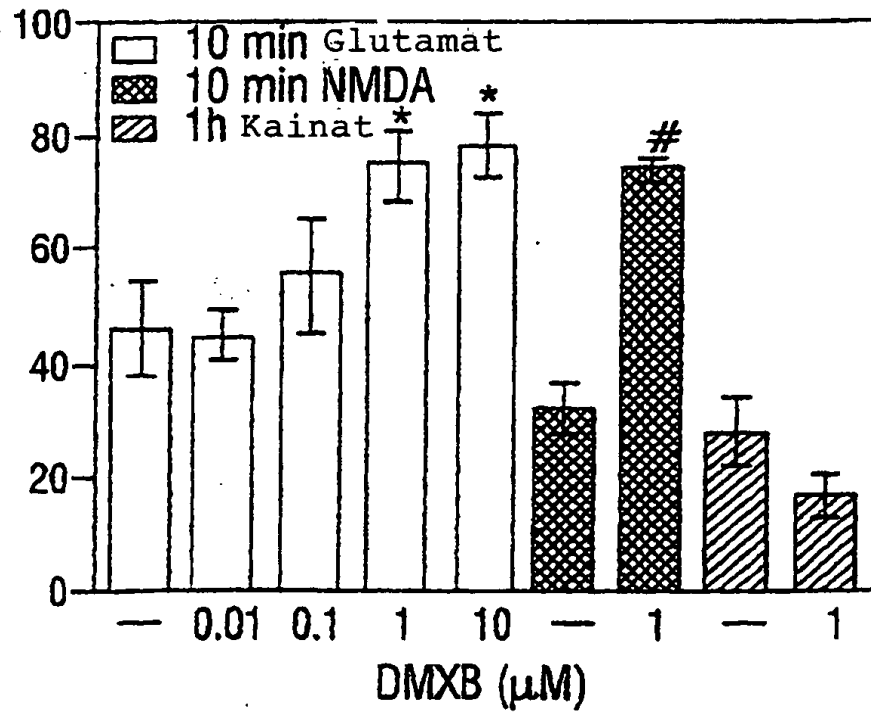


FIG. 6E

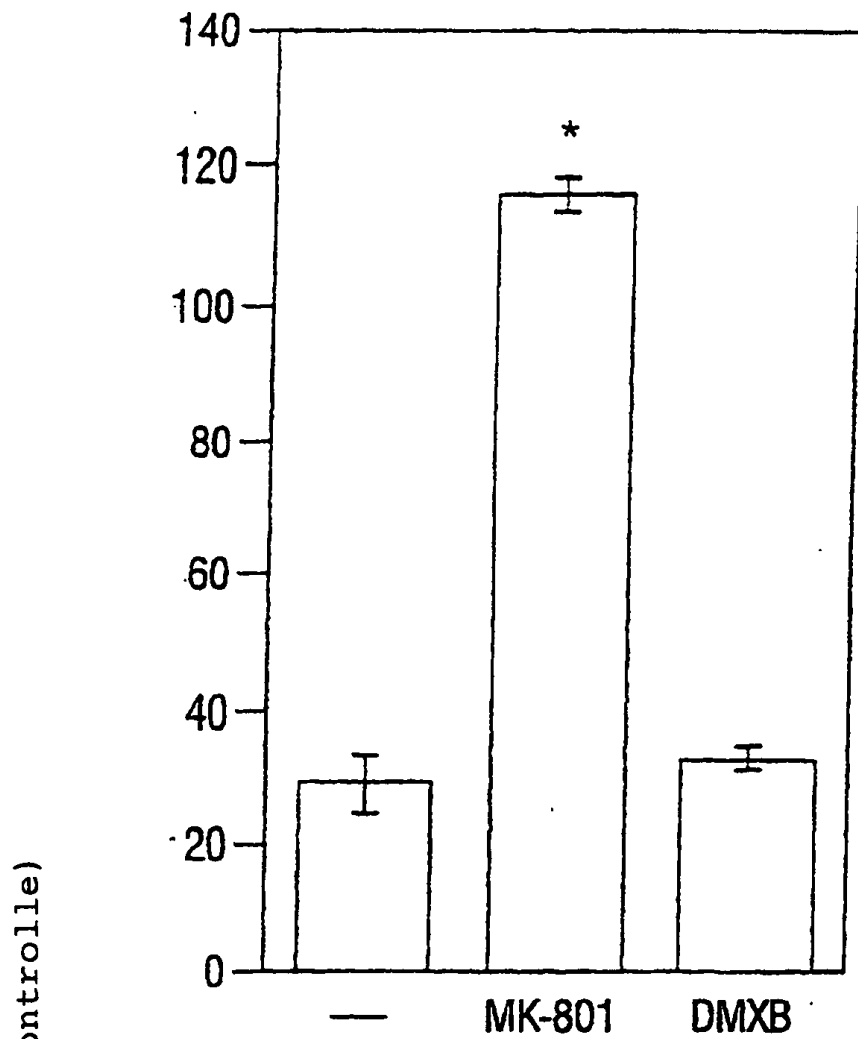


FIG. 6F

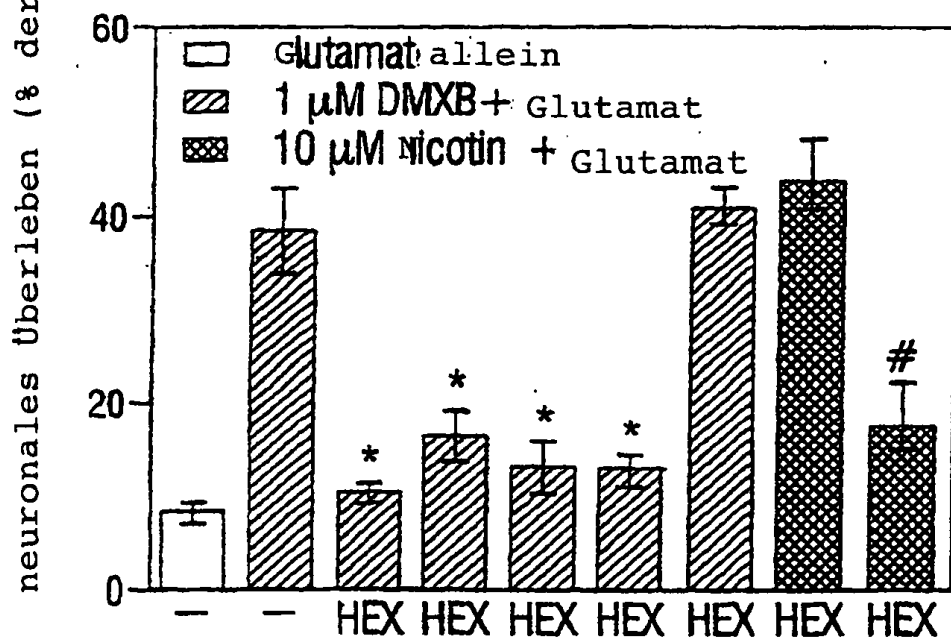


FIG. 7

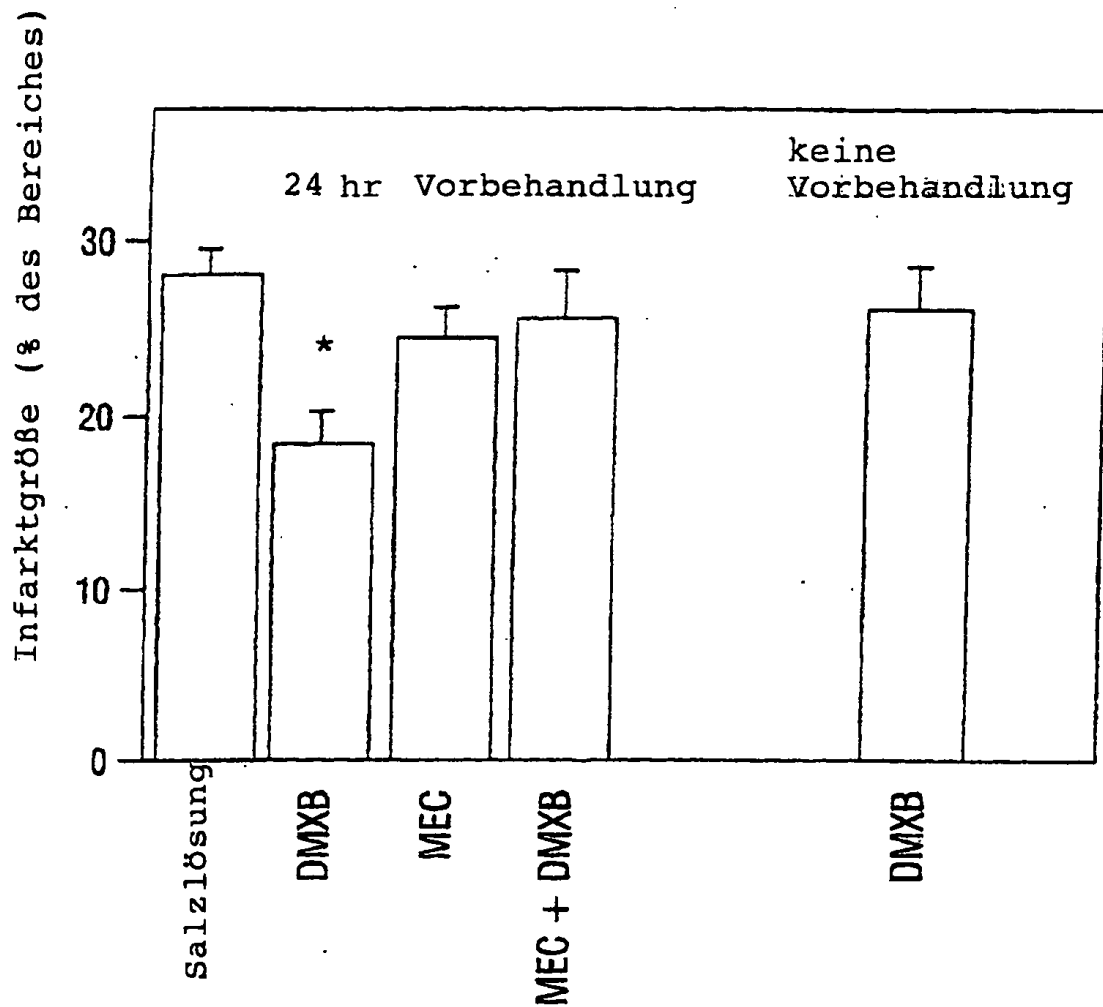
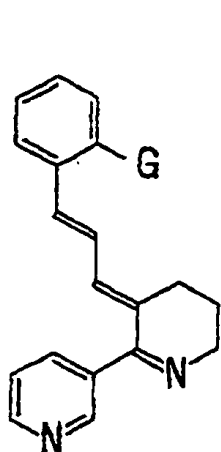
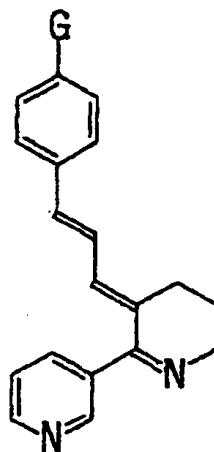


FIG. 8B



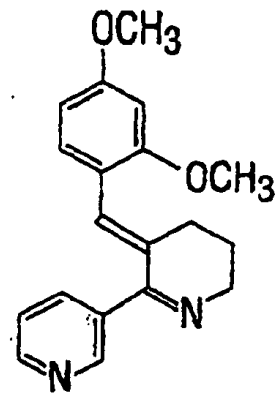
CA, G = H  
2MeOCA, G = CH<sub>3</sub>O

FIG. 9A



4MeOCA, G = CH<sub>3</sub>O  
DMAC, G = N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>

FIG. 9B



GTS-21

FIG. 9C

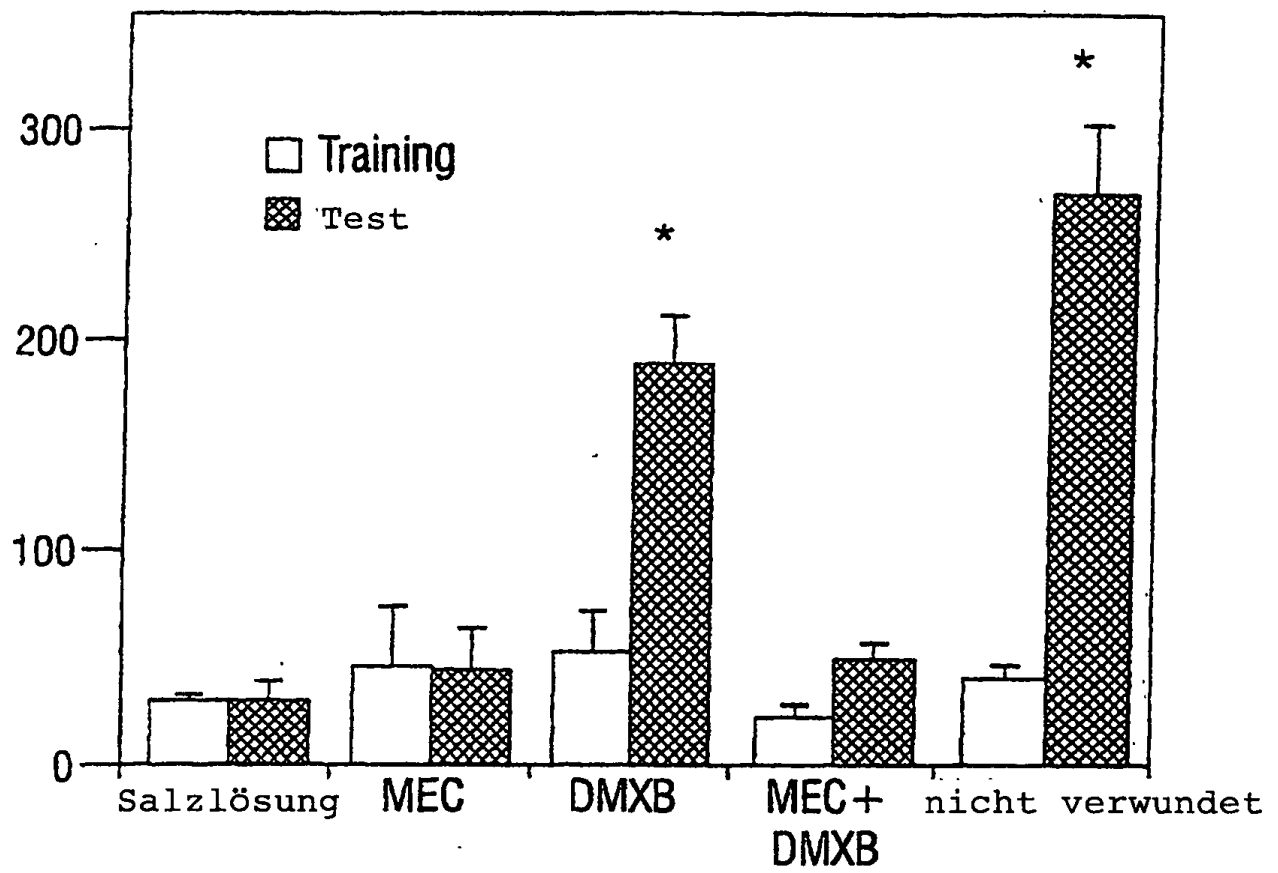


FIG. 10

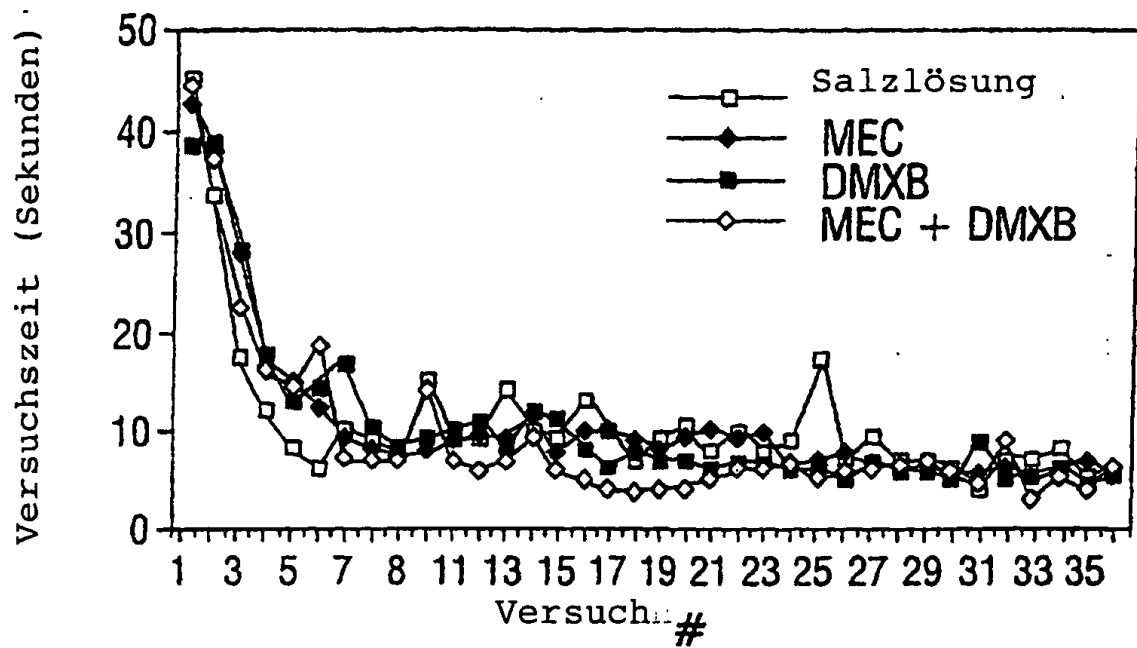


FIG. 11A

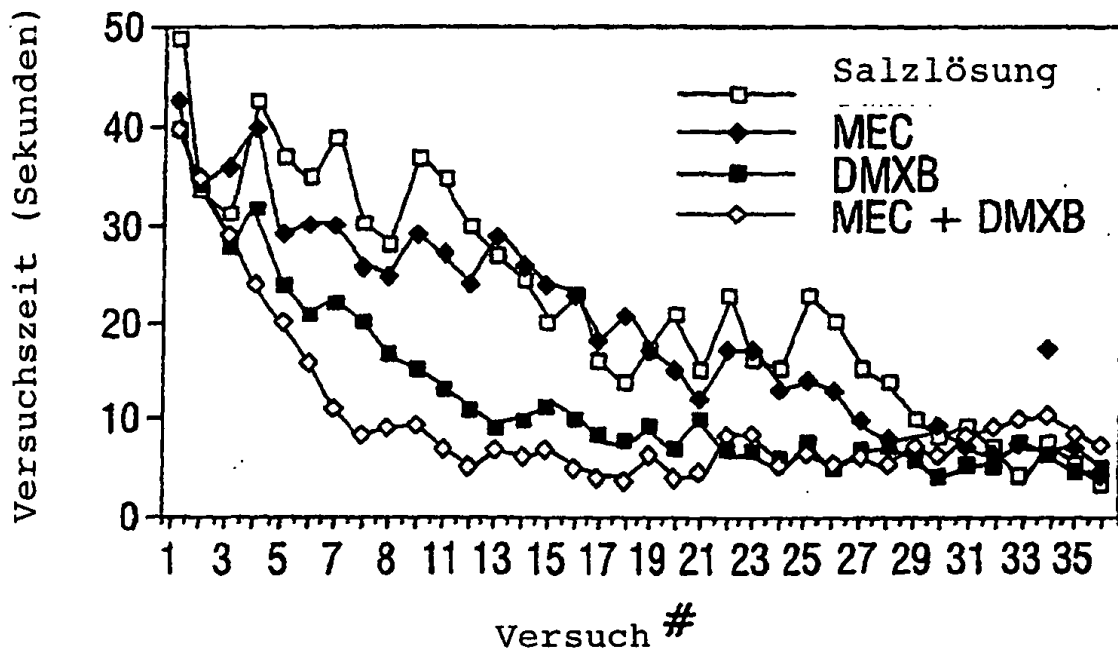
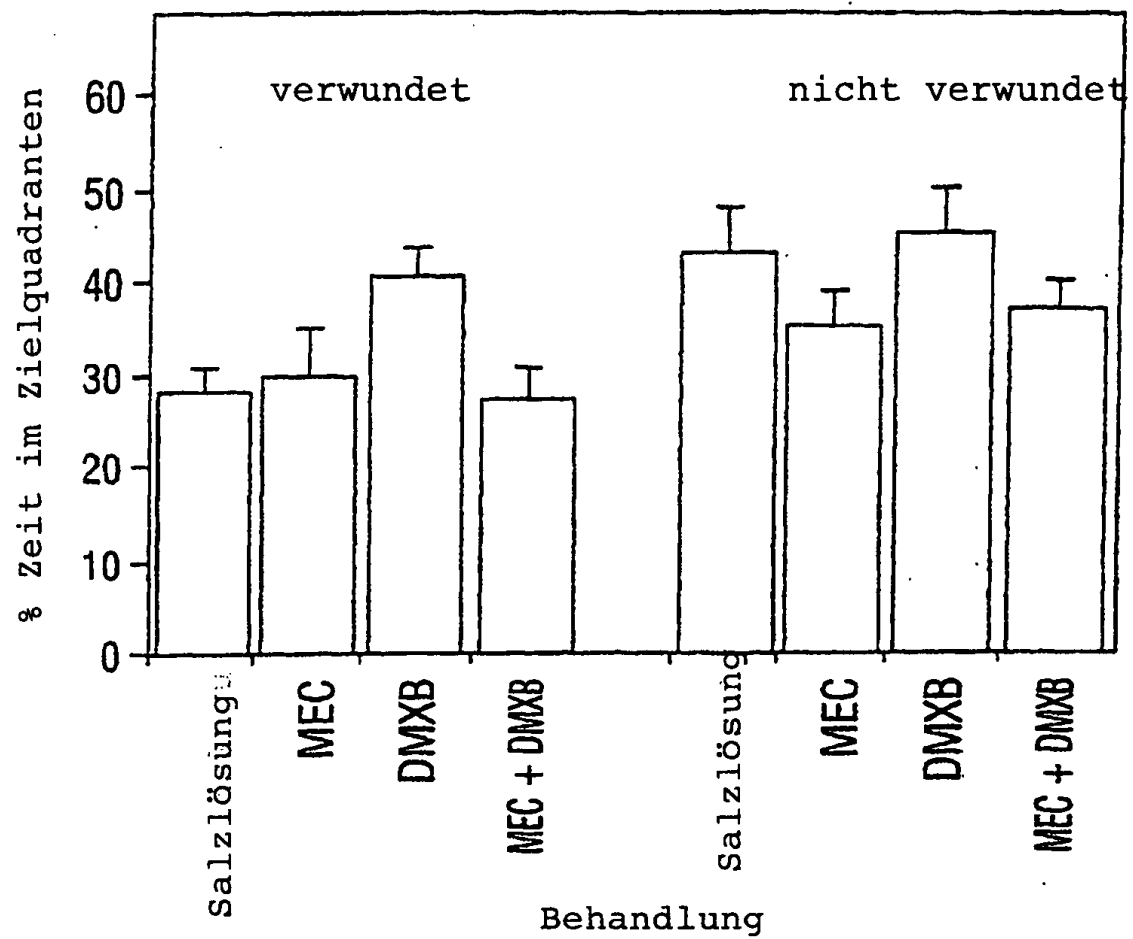


FIG. 11B



Behandlung

FIG. 12



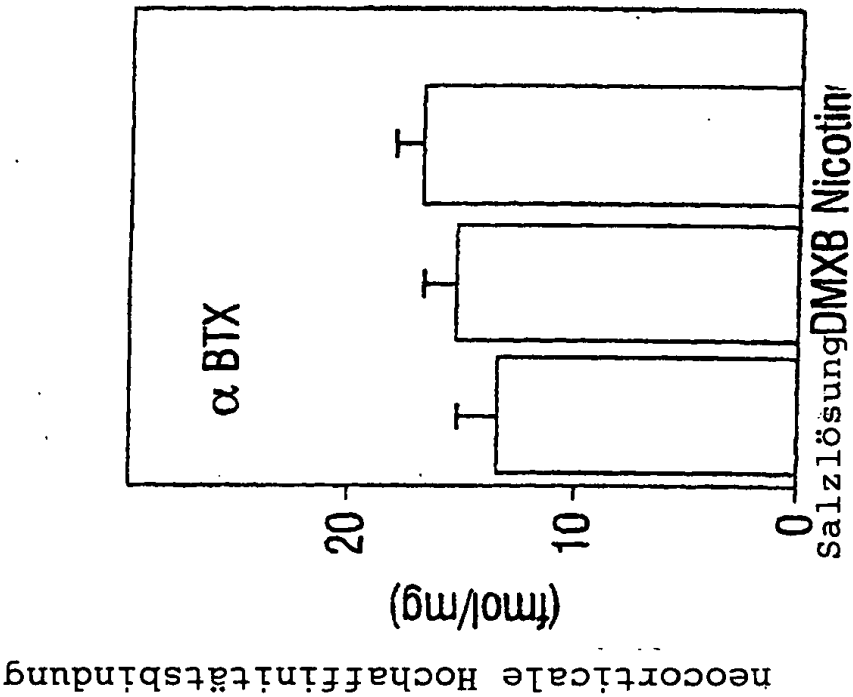


FIG. 13B

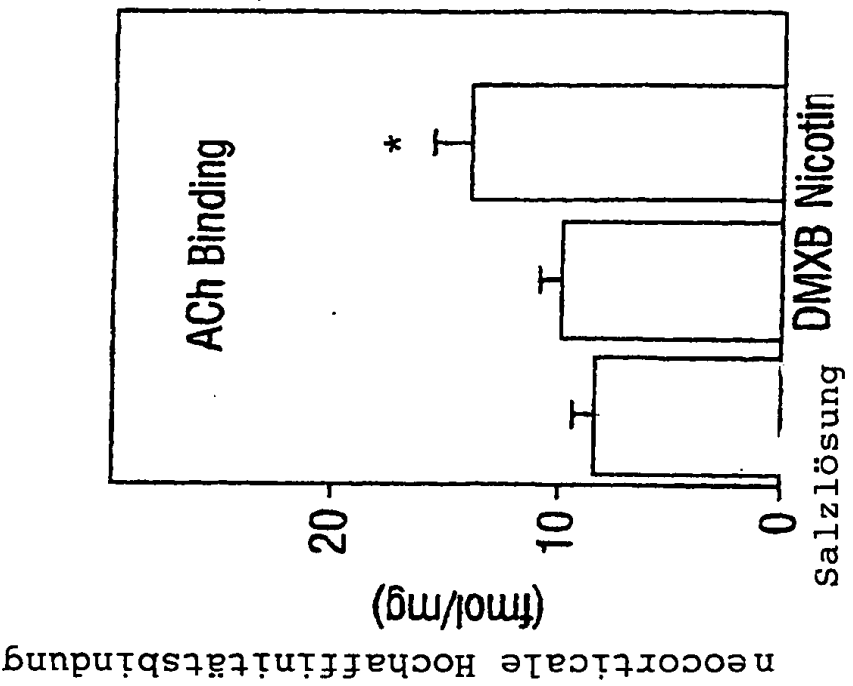
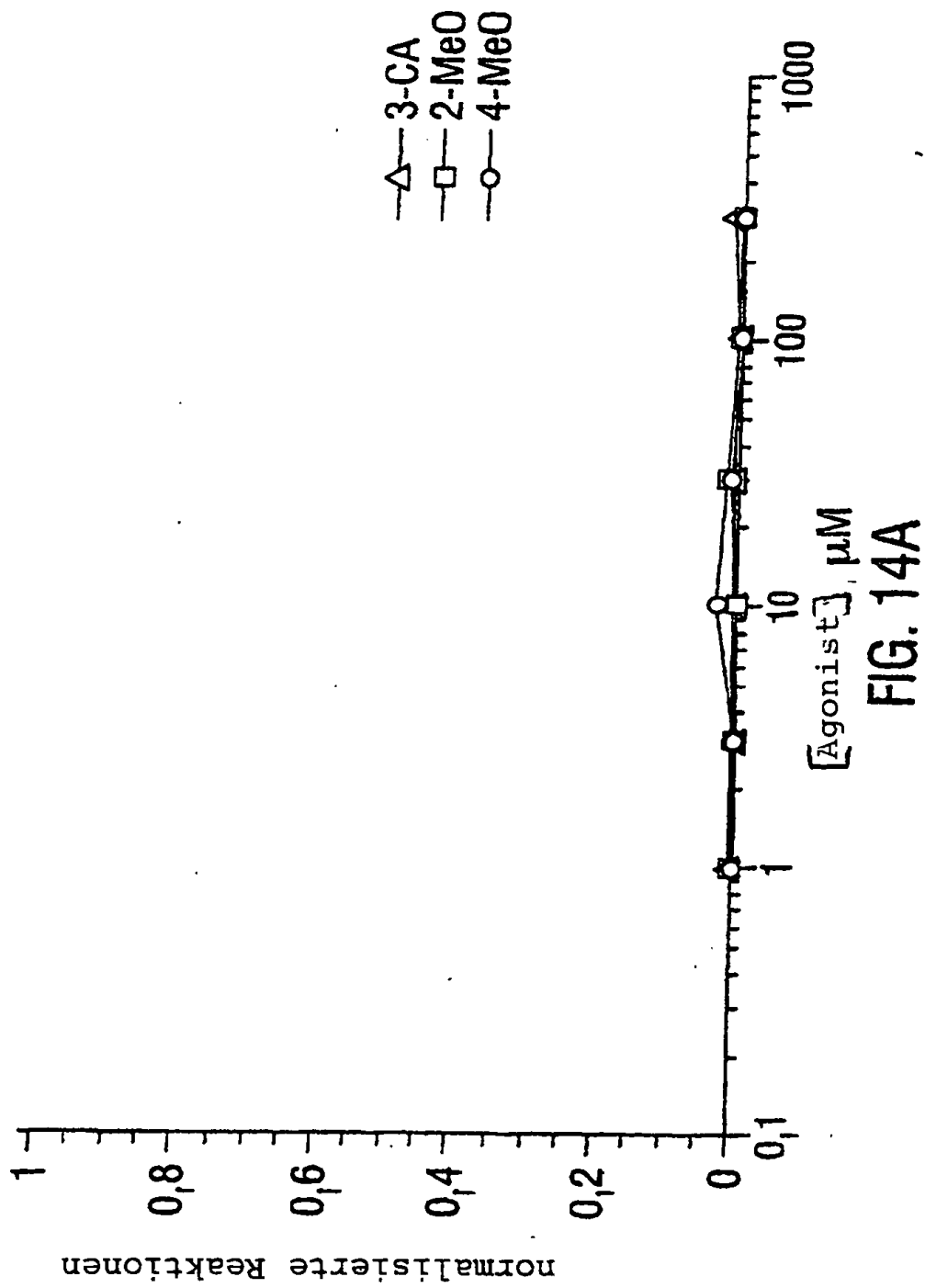


FIG. 13A



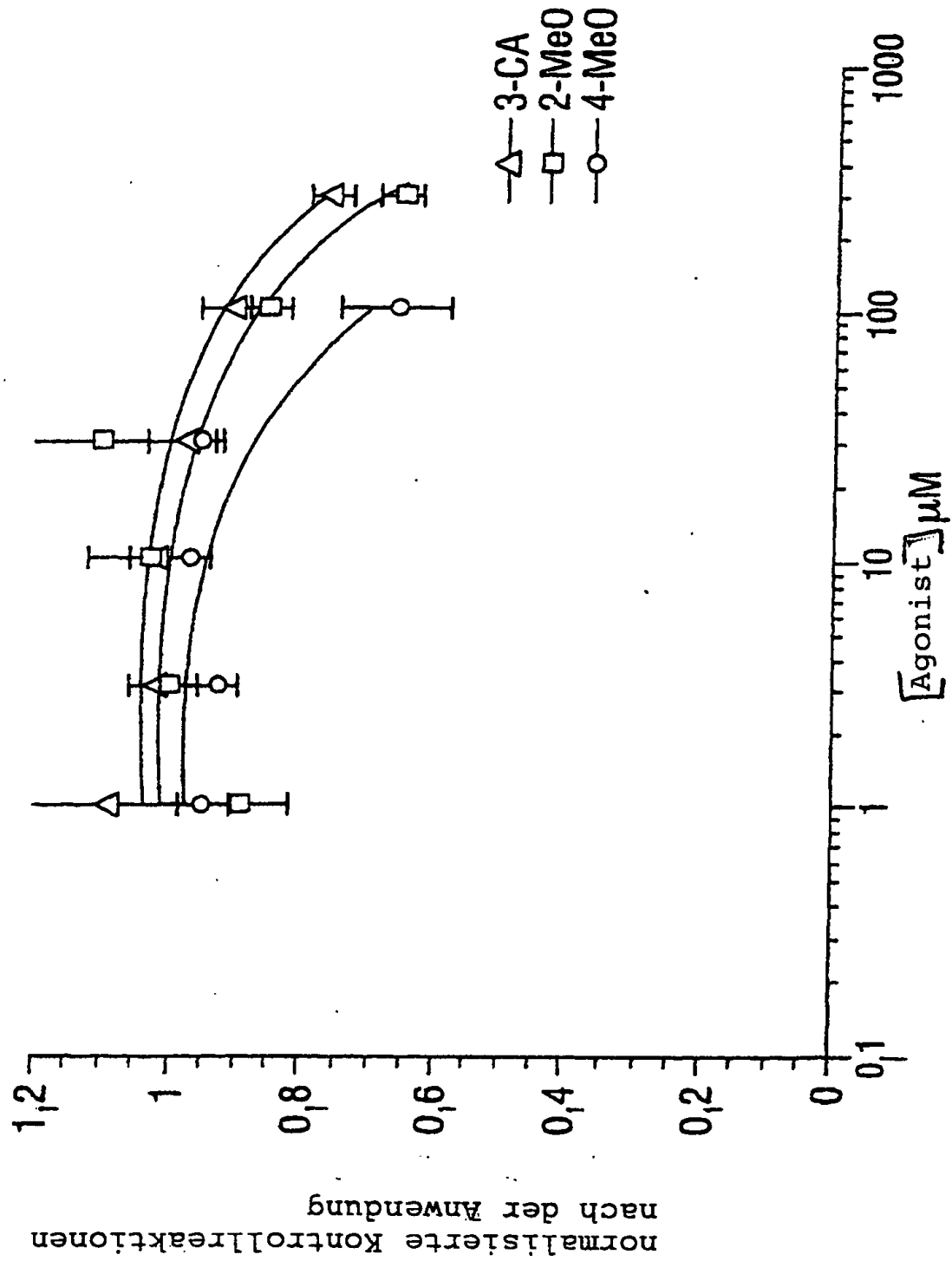


FIG. 14B

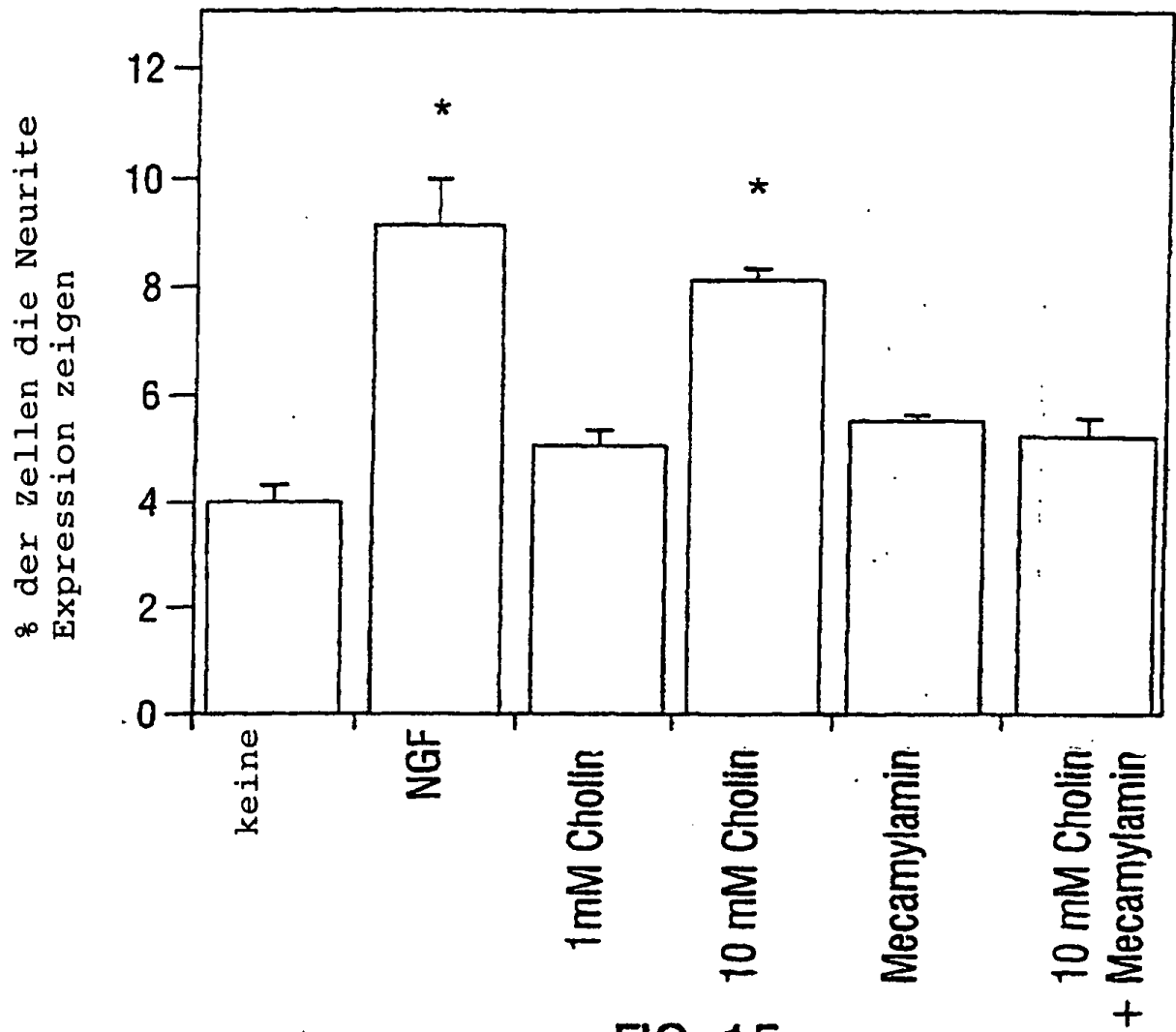


FIG. 15