

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT

(11) 163501 B

Patentdirektoratet

TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 2129/85

(51) Int.Cl.5

C 07 D 207/27

(22) Indleveringsdag: 14 maj 1985

(41) Alm. tilgængelig: 16 nov 1985

(44) Fremlagt: 09 mar 1992

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 15 maj 1984 GB 8412357

(71) Ansøger: *UCB S.A.; Avenue Louise, 326; Bruxelles, BE

(72) Opfinder: Jean *Gobert; BE, Jean-Pierre *Geerts; BE, Guy *Bodson; BE

(74) Fuldmægtig: Internationalt Patent-Bureau

(54) (S)-alfa-Ethyl-2-oxo-1-pyrrolidinacetamid, fremgangsmåder til dets fremstilling samt farmaceutisk præparat indeholdende denne forbindelse

(56) Fremdragne publikationer

GB pat. nr. 1309692

(57) Sammendrag

2129-85

(S)- α -Ethyl-2-oxo-1-pyrrolidinacetamid, dets fremstilling og farmaceutiske kompositioner indeholdende forbindelsen. Forbindelsen kan fremstilles enten ved at omsætte (S)- α -ethyl-2-oxo-1-pyrrolidineddikesyre successivt med et alkylhalogenformiat og med ammoniak, eller ved at ringslutte et (S)-2-amino-butanamid med formelen $X-CH_2CH_2-Y-NHCH(C_2H_5)CONH_2$, hvor Y er $-CH_2-$, når X er $ZOOC-$, og Y er $-CO-$, når X er $HalCH_2-$, hvor Z er (C_1-C_4) alkyl, og Hal er et halogenatom.

Denne venstredrejende enantiomere har vist sig at have en betydeligt højere beskyttende aktivitet over for hypoxi og ischaemi end det tilsvarende racemat.

DK 163501 B

Den foreliggende opfindelse angår den hidtil ukendte forbindelse (S)- α -ethyl-2-oxo-1-pyrrolidinacetamid samt fremgangsmåder til dens fremstilling. Endvidere angår opfindelsen farmaceutiske præparater indeholdende denne forbindelse.

5 Britisk patentskrift 1.309.692 beskriver forbindelsen α -ethyl-2-oxo-1-pyrrolidinacetamid (smp.122°C) og angiver, at forbindelser af denne type kan anvendes til terapeutiske formål, for eksempel til behandling af kine-

10 Endvidere nævnes, at disse forbindelser kan anvendes på området med hukommelsesforstyrrelser under normale eller patologiske tilstande.

Det er også kendt, at α -ethyl-2-oxo-1-pyrrolidinacetamid har en beskyttende aktivitet over for angreb på
15 centralnervesystemet forårsaget af hypoxi, cerebral ischaemi, osv., (Pharmazie, 37/11, (1982), 753-765).

Fortsat forskning på dette område har nu ført til fremstilling og isolering af det venstredrejende α -ethyl-2-oxo-1-pyrrolidinacetamid, og det har vist sig, at den-
20 ne forbindelse afviger på helt uforudsigelig måde fra den kendte racemiske form ved

- (1) at have en 10 gange højere beskyttende aktivitet over over for hypoxi (anti-hypoxi), og
- (2) at have en 4 gange højere beskyttende aktivitet over
25 for ischaemi (anti-ischaemi).

Som et resultat af denne uventede kombination af egenskaber er den venstredrejende enantiomere af α -ethyl-2-oxo-1-pyrrolidinacetamid bedre egnet til behandling af angreb på centralnervesystemet af hypoxisk og ischaemisk
30 type. Det hypoxiske fænomens vigtige rolle ved visse patologiske tilstande i centralnervesystemet lader formode, at denne forbindelse har en terapeutisk effekt ved behandlingen af følgerne af cerebrale vasculære tilfælde og af følgesygdomme i forbindelse med ældningsprocessen
35 eller af kredsløbsmangler i centralnervesystemet som følge af cerebral-ischaemiske eller hypoxiske tilstande,

der forekommer for eksempel under fødsel. Forbindelsen kan også anvendes ved sygdomme af hypoxisk type i andre organer eller væv, såsom hjerte og nyre.

Den foreliggende opfindelse angår følgelig den
5 venstredrejende enantiomere af α -ethyl-2-oxo-1-pyrrolidinacetamid, der har den absolutte S-konfiguration, hvilken forbindelse er i det væsentlige fri for den højredrejende enantiomere, der har den absolutte R-konfiguration.

(S)- α -Ethyl-2-oxo-1-pyrrolidinacetamid ifølge den
10 foreliggende opfindelse kan ikke vindes direkte ud fra den racemiske form ved adskillelse af de to enantiomere. Det kan fremstilles ved en af følgende fremgangsmåder:
(a) Omsætning af (S)- α -ethyl-2-oxo-1-pyrrolidineddikesyre successivt med (1) et alkylhalogenformiat med form-
15 len HalCOOZ , hvor Hal er et halogenatom, og Z er en (C_1 - C_4)alkylgruppe, og med (2) ammoniak. Alkylhalogenformiatet er fortrinsvis ethylchlorformiat.

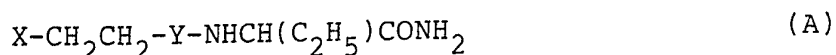
Denne omsætning gennemføres i almindelighed i di-
chlormethan ved en temperatur mellem -10° og -60°C .

20 (S)- α -Ethyl-2-oxo-1-pyrrolidineddikesyren, der anvendes ved denne reaktion, kan vindes ud fra den racemiske ($\pm$)- α -ethyl-2-oxo-1-pyrrolidineddikesyre ved kemisk opdeling ifølge i og for sig kendte metoder, for eksempel ved at danne et salt af denne syre med en optisk ak-
25 tiv base og isolere saltet dannet med (S)- α -ethyl-2-oxo-pyrrolidineddikesyre ved successive krystallisationer i et egnet opløsningsmiddel (for eksempel benzen).

Som eksempler på optisk aktive baser, der kan anvendes til denne opdeling, kan nævnes alkaloider, såsom
30 brucin, quinin, strychnin, quinidin og cinchonidin, og aminer, såsom α -methyl-benzylamin og dehydroabietylamin (jfr. S.H.Wilen et al., Tetrahedron, 33, (1977), 2725-2736). Særligt gunstige resultater er opnået ved anvendelse af α -methyl-benzylamin og dehydroabietylamin.

35 Den racemiske ($\pm$)- α -ethyl-2-oxo-1-pyrrolidineddikesyre, der anvendes som udgangsmateriale, kan vindes ved at forsøbe de tilsvarende alkylestre, hvis syntese er beskrevet i britisk patentskrift 1.309.692.

- (b) Ringslutning af et (S)-2-amino-butanamid med formelen:



hvor:

- 5 X er en gruppe ZOOC- eller HalCH₂-, hvor Z er en (C₁-C₄)alkylgruppe, og Hal er et halogenatom, fortrinsvis chlor eller brom, og
- Y er en gruppe -CH₂- eller -CO-,
- med den betingelse, at Y er en gruppe -CH₂-, når X er en
- 10 gruppe ZOOC-, og Y er en gruppe -CO-, når X er en gruppe HalCH₂- i et indifferent opløsningsmiddel og i nærværelse af et basisk stof.

Ringslutningen af (S)-2-amino-butanamidet med formelen A gennemføres i et indifferent opløsningsmiddel, såsom toluen eller dichlormethan, ved en temperatur på fra 0°C til opløsningsmidlets kogepunkt. Denne ringslutning gennemføres med fordel i nærværelse af et basisk stof som katalysator. Denne katalysator er fortrinsvis 2-hydroxypyridin, når forbindelsen med formlen A er en ester

20 (X = ZOOC-), og tetrabutylammombromid, når forbindelsen med formlen A er et halogenid (X = HalCH₂-).

Når X er en gruppe ZOOC-, og Y er en gruppe -CH₂-, er forbindelsen med formlen A et alkyl-(S)-4-[[1-(aminocarbonyl)propyl]amino]-butyrat med formlen ZOOCCH₂CH₂CH₂

25 NHCH(C₂H₅)CONH₂, hvor Z har den ovennævnte betydning. Sidstnævnte kan fremstilles ved at kondensere (S)-2-amino-butanamid med et alkyl-4-halogenbutyrat med formlen ZOOCCH₂CH₂CH₂Hal, hvor Z har ovennævnte betydning, og Hal er et halogenatom.

- 30 Når X er en gruppe HalCH₂-, og Y er en gruppe -CO-, er forbindelsen med formlen A (S)-N-[1-(aminocarbonyl)propyl]-4-halogenbutanamid med formlen HalCH₂CH₂CH₂CONHCH(C₂H₅)CONH₂, hvor Hal har ovennævnte betydning. Denne sidstnævnte forbindelse kan fremstilles ved at kondensere
- 35 (S)-2-amino-butanamid med et 4-halogenbutyrylhalogenid med formlen HalCH₂CH₂CH₂COHal, hvor Hal er et halogenatom.

Reaktionen mellem (S)-2-amino-butanamidet på den ene side og alkyl-4-halogenbutyratet eller 4-halogenbutyrylhalogenidet på den anden side gennemføres i almindelighed i et indifferent opløsningsmiddel, såsom benzen, 5 toluen, dichlormethan eller acetonitril, ved en temperatur på fra -5 til $+100^{\circ}\text{C}$ og i nærværelse af en syreacceptor, såsom en tertiær organisk base (for eksempel triethylamin) eller en uorganisk base (for eksempel kaliumcarbonat eller hydroxid eller natriumcarbonat eller -hydroxid).

Når X repræsenterer en gruppe HalCH_2- , og Y er en gruppe $-\text{CO}-$, er det ikke absolut nødvendigt at isolere forbindelsen med formlen A vundet ud fra de ovennævnte udgangsmaterialer. Forbindelsen med formlen A, vundet in 15 situ, kan ringsluttet direkte til (S)- α -ethyl-2-oxo-1-pyrrolidinacetamidet ifølge opfindelsen (se eksempel 4 nedenfor).

(S)-2-Amino-butanamidet, der anvendes som udgangsmateriale, kan vindes ud fra (S)-2-amino-smørsyre ved am- 20 monolyse af den tilsvarende methylester ved metoden beskrevet af K.Folkers et al., J.Med.Chem. 14, (6), (1971), 484-487.

Opfindelsen beskrives nærmere gennem følgende eksempler.

25 I disse eksempler blev den optiske renhed af forbindelserne verificeret ved kalorimetrisk bestemmelse af differential-enthalpierne (C.Fouquey og J.Jacques, Tetrahedron, 23, (1967), 4009-4019).

Eksempel 1

30a) Fremstilling af (R)- α -methyl-benzylamin-saltet af (S)- α -ethyl-2-oxo-1-pyrrolidineddikesyre.

8,7 kg (50,8 mol) Racemisk ($\pm$)- α -ethyl-2-oxo-1-pyrrolidin-eddikesyre blev suspenderet i 21,5 liter vandfrit benzen i en 50 liters reaktor. Til denne suspension 35 blev der gradvis sat en opløsning indeholdende 3,08 (25,45 mol) (R)-(+)- α -methyl-benzylamin og 2,575 kg (25,49 mol) triethylamin i 2,4 liter vandfrit benzen.

Denne blanding blev derefter opvarmet til tilbagesvalings-temperatur indtil fuldstændig opløsning. Den blev derefter afkølet og henstillet til krystallisation i nogle få timer. Herved vandtes 5,73 kg (R)- α -methyl-benzylaminsalt af (S)- α -ethyl-2-oxo-1-pyrrolidineddikesyre.
Smp.: 148-151°. Udbytte: 77,1%.

Dette salt kunne renses ved opvarmning under tilbagesvaling i 48,3 liter benzen i 4 timer. Blandingen blev afkølet og filtreret, hvorved vandtes 5,040 kg af det ønskede salt.
Smp.: 152-153,5°C. Udbytte: 67,85%.

b) Fremstilling af (S)- α -ethyl-2-oxo-1-pyrrolidineddikesyre.

5,04 kg af det under a) vundne salt blev opløst i 9 liter vand. Der blev langsomt tilsat 710 g af en 30% natriumhydroxidopløsning, således at opløsningens pH-værdi nåede 12,6, og temperaturen ikke oversteg 25°C. Opløsningen blev omrørt i yderligere 20 minutter, og den frigjorte α -methyl-benzylamin blev ekstraheret gentagne gange med et totalt volumen på 18 liter benzen.

Den vandige fase blev syrnet til pH 1,1 ved tilsætning af 3,2 liter 6N saltsyre. Den dannede bundfald blev frafiltreret, vasket med vand og tørret.

Filtratet blev ekstraheret gentagne gange med et totalt volumen på 50 liter dichlormethan. Den organiske fase blev tørret over natriumsulfat, filtreret og indampet til tørhed ved reduceret tryk.

Den efter inddampning vundne inddampningsrest og det tidligere isolerede bundfald blev sammen opløst i 14 liter varm dichlormethan. Dichlormethanet blev destilleret og ved destillationshastigheden erstattet med 14 liter toluen, hvorfra produktet krystalliserede.

Blandingen blev afkølet til stuetemperatur, og krystallerne blev frafiltreret, hvorved vandtes 2,78 kg (S)- α -ethyl-2-oxo-1-pyrrolidineddikesyre.
Smp.: 125,9°C. $[\alpha]_D^{20} = -26,4^\circ$ (c = 1, acetone).
Udbytte: 94,5%.

c) Fremstilling af (S)- α -ethyl-2-oxo-1-pyrrolidinacetamid.

34,2 g (0,2 mol) (S)- α -Ethyl-2-oxo-1-pyrrolidineddikesyre blev suspenderet i 225 ml dichlormethan afkølet til -30°C . 24,3 g (0,24 mol) Triethylamin blev tilsat dråbevis i løbet af 15 minutter. Reaktionsblandingen blev derefter afkølet til -40°C , og 24,3 g (0,224 mol) ethylchlorformiat blev tilsat i løbet af 12 minutter. Derefter blev en strøm af ammoniak ledt gennem blandingen i 4 1/2 time. Reaktionsblandingen fik derefter lov at genantage stuetemperatur, og de dannede ammoniumsalte blev frafiltreret og vasket med dichlormethan. Opløsningsmidlet blev afdestilleret ved reduceret tryk. Den faste inddampningsrest blev dispergeret i 55 ml toluen, og dispersionen blev omrørt i 30 minutter og derefter filtreret. Produktet blev omkrystalliseret af 280 ml ethylacetat i nærværelse af 9 g 0,4 nm molekularsigte i pulverform.

24,6 g (S)- α -Ethyl-2-oxo-1-pyrrolidinacetamid vandtes.

Smp.: $115-118^{\circ}\text{C}$. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -89,7^{\circ}$ ($c=1$, acetone).

Udbytte: 72,3%.

Analyse for $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$ i %:

Beregnet: C: 56,45 H: 8,29 N: 16,46

Fundet: 56,71 8,22 16,48

Den ved denne syntese anvendte racemiske ($\pm$)- α -ethyl-2-oxo-1-pyrrolidineddikesyre var fremstillet på den nedenfor beskrevne måde.

En opløsning indeholdende 788 g (19,7 mol) natriumhydroxid i 4,35 liter vand indførtes i løbet af 2 timer i en 20 liters beholder indeholdende 3,65 kg (18,34 mol) ethyl-($\pm$)- α -ethyl-2-oxo-1-pyrrolidinacetat ved en temperatur ikke overstigende 60°C . Efter endt tilsætning blev blandingens temperatur hævet til 80°C , og den dannede alkohol blev afdestilleret, indtil reaktionsblandingsens temperatur nåede 100°C .

Reaktionsblandingen blev derefter afkølet til 0°C, og 1,66 liter (19,8 mol) 12N saltsyre blev tilsat i løbet af 2 1/2 time. Det dannede bundfald blev frafiltreret, vasket med 2 liter toluen og omkrystalliseret af isopropylalkohol. Herved vandtes 2,447 kg racemisk (+)-α-ethyl-2-oxo-1-pyrrolidineddikesyre, smp. 155-156°C.

Udbytte: 78%.

Analyse for C₈H₁₃NO₃ i %:

	Beregnet:	C: 56,12	H: 7,65	N: 8,18
10	Fundet:	55,82	8,10	7,97

Eksempel 2

(a) Fremstilling af ethyl-(S)-4-[[1-(aminocarbonyl)propyl]amino]-butyrat.

143,6 ml (1,035 mol) Triethylamin blev sat til en suspension af 47,75 g (0,345 mol) (S)-2-amino-butanamidhydrochlorid ($[\alpha]_D^{25} = +26,1^\circ$, c=1, methanol) i 400 ml toluen. Blandingen blev opvarmet til 80°C, og 67,2 g (0,345 mol) ethyl-4-brombutyrat blev indført dråbevis.

20 Reaktionsblandingen holdtes ved 80°C i 10 timer og blev derefter filtreret varmt for at fjerne triethylaminsaltene. Filtratet blev derefter inddampet ved reduceret tryk, og der vandtes 59 g af en olieagtig rest bestående hovedsageligt af monoalkyleringsproduktet, men også en lille mængde dialkyleret derivat.

Det i rå tilstand vundne produkt anvendtes som sådant uden yderligere rensning ved fremstillingen af (S)-α-ethyl-2-oxo-1-pyrrolidinacetamid ved ringslutning.

b) Fremstilling af (S)-α-ethyl-2-oxo-1-pyrrolidinacetamid.

54 g Råprodukt vundet under a) ovenfor blev opløst i 125 ml toluen i nærværelse af 2 g 2-hydroxypyridin. Blandingen blev opvarmet ved 110°C i 12 timer.

Det uopløselige materiale blev frafiltreret varmt, og filtratet blev derefter inddampet ved reduceret tryk.

Inddampningsresten blev rensset ved chromatografi

på en søjle af 1,1 kg silica (søjlediameter: 5 cm, elueringsmiddel: en blanding af ethylacetat, methanol og koncentreret ammoniakopløsning i et volumenforhold på 85:12:3).

- 5 Det isolerede produkt blev omkrystalliseret af 50 ml ethylacetat, hvorved vandtes 17,5 g (S)- α -ethyl-2-oxo-1-pyrrolidinacetamid.

Smp.: 117°C. $[\alpha]_D^{25}$: -90,0° (c=1, acetone).

Udbytte: 41%.

10 Eksempel 3

- a) Fremstilling af (S)-N-[1-(aminocarbonyl)propyl]-4-chlorbutanamid.

345,6 g (2,5 mol) Formalet kaliumcarbonat blev blandet med 138,5 g (1 mol) (S)-2-amino-butanamid-hydrochlorid i 2,5 liter acetonitril. Reaktionsblandingen blev afkølet til 0°C, og en opløsning af 129,2 g (1,2 mol) 4-chlorbutyrylchlorid i 500 ml acetonitril indførtes dråbevis. Efter tilsætningen fik reaktionsblandingen lov at genantage stuetemperatur, det uopløselige materiale blev
15 frafiltreret, og filtratet blev inddampet ved reduceret tryk. Den rå inddampningsrest blev omrørt i 1,2 liter vandfri ether i 30 minutter ved en temperatur mellem 5 og 10°C. Bundfaldet blev frafiltreret, vasket to gange med 225 ml ether og tørret i vakuum, hvorved vandtes
20 162,7 g (S)-N-[1-(aminocarbonyl)propyl]-4-chlorbutanamid. Smp.: 118-123°C. $[\alpha]_D^{25}$: -18° (c=1, methanol). Udbytte: 78,7%.

Det således vundne råprodukt var meget velegnet til det følgende ringslutningstrin. Det kunne imidlertid
30 renses ved omrøring i 1 time i vandfrit ethylacetat. Smp.: 120-122°C. $[\alpha]_D^{25}$: -22,2° (c=1, methanol).

- b) Fremstilling af (S)- α -ethyl-2-oxo-1-pyrrolidinacetamid.

6,2 g (0,03 mol) (S)-N-[1-(Aminocarbonyl)propyl]-
35 4-chlorbutanamid og 0,484 g (0,0015 mol) tetrabutylammoniumbromid blev blandet i 45 ml dichlormethan ved 0°C under en nitrogenatmosfære. 2,02 g (0,036 mol) Kaliumhydroxidpulver blev tilsat i løbet af 30 minutter ved en

sådan hastighed, at temperaturen af reaktionsblandingen ikke oversteg $+2^{\circ}\text{C}$. Blandingen blev derefter omrørt i 1 time, hvorefter yderligere 0,1 g (0,0018 mol) formalet kaliumhydroxid blev tilsat, og omrøring blev fortsat i 5 30 minutter ved 0°C . Blandingen fik lov at genantage stuetemperatur. Det uopløselige materiale blev frafiltreret, og filtratet blev koncentreret ved reduceret tryk. Den vundne indampningsrest blev omkrystalliseret af 40 ml ethylacetat i nærværelse af 1,9 g 0,4 nm molekularsigte. 10 Sidstnævnte blev frafiltreret varmt, hvorved vandtes 3,10 g (S)- α -ethyl-2-oxo-1-pyrrolidinacetamid.
 Smp.: $116,7^{\circ}\text{C}$. $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$: $-90,1^{\circ}$ ($c=1$, acetone).
 Udbytte: 60,7%.

Eksempel 4

15 Fremstilling af (S)- α -ethyl-2-oxo-1-pyrrolidinacetamid.

Dette eksempel illustrerer en variant af fremgangsmåden i Eksempel 3, hvor det in situ vundne intermediære 4-chlorbutanamid ikke blev isoleret. 84 g vandfrit natriumsulfat blev sat til en suspension af 69,25 g (0,5 mol) 20 (S)-2-amino-butanamid-hydrochlorid i 600 ml dichlormethan ved stuetemperatur. Blandingen blev afkølet til 0°C , og 115 g formalet kaliumhydroxid blev tilsat efterfulgt af 18,1 g (0,025 mol) tetrabutylammoniumbromid opløst i 100 ml dichlormethan. En opløsning af 77,5 g 4-chlorbutyrylchlorid i 100 ml dichlormethan blev tilsat dråbevis ved 0°C 25 under kraftig omrøring. Efter 5 timers reaktion blev yderligere 29 g formalet kaliumhydroxid tilsat. To timer senere blev reaktionsblandingen filtreret over Hyflo-cel, og filtratet blev indampet ved reduceret tryk. Indampningsresten (93,5 g) blev dispergeret i 130 ml varm toluen i 45 minutter. Den resulterende blanding blev filtreret, og filtratet blev indampet ved reduceret tryk. Indampningsresten (71,3 g) blev opløst varmt i 380 ml ethylacetat, hvortil der blev sat 23 g 0,4 nm molekularsigte 35 i pulverform. Denne blanding blev opvarmet til tilbagesvalingstemperatur og filtreret varmt.

Efter afkøling af filtratet krystalliserede det ønskede produkt, hvorved vandtes 63 g (S)- α -ethyl-2-oxo-1-pyrrolidinacetamid.

Smp.: 117°C. $[\alpha]_D^{25}$: -91,3° (c=1, acetone).

5 Udbytte: 74,1%.

Farmakologiske teste

Racemisk α -ethyl-2-oxo-1-pyrrolidinacetamid (Forbindelse C) og (S)- α -ethyl-2-oxo-1-pyrrolidinacetamid (Forbindelse B) ifølge opfindelsen blev underkastet farmakologisk teste.

I. Beskyttelse mod hypoxi (mus)

a. Princip (C.Giurgea og F.Mouravieff-Lesuisse, Proc.Xth Intern. Congr. of the Coll.Intern. Neuro-Psych. -Pergamon Press, Oxford og New York, 1978, side 1623-1631).

Princippet for denne test ligger i måling af mulighederne for overlevelse af den organisme, der udsættes for en atmosfære, hvori oxygenniveauet progressivt ned sættes. Som følge af nervesystemets særlige sensibilitet over for denne angrebstype kan resultaterne opnået ved denne test fortolkes som et mål for centralnervesystemets modstand. Forbindelser, der forøger dyrenes modstand mod denne stresspåvirkning, er egnede til behandling og forebyggelse af angreb af hypoxisk type på centralnervesystemet.

b. Metode

Apparatet består af et lufttæt transparent bur 37 cm højt, 39 cm dybt og 97 cm bredt. Dette 140 liters bur er udstyret med 60 transparente afdelinger hver på 6 x 10 x 10cm, hvilket gør det muligt separat at huse 60 mus.

En ventilator sikrer cirkulation af atmosfæren mellem afdelingerne gennem et gittergulv. Buret er udstyret med en anordning til indføring af nitrogen ved konstant strømningshastighed, og med en åbning, der kommunikerer med den omgivende atmosfære. Hanmus (NMRI stamme) med en vægt på 20 til 22 g holdes fastende fra dagen

før testen. Forsøget gennemføres på den følgende dag, samtidigt på 3 grupper på 20 mus, idet en kontrolgruppe får vand (25 ml/kg) oralt, og de to andre grupper hver oralt får en forsøgsforbindelse.

- 5 25 Minutter efter indgift fordeles dyrene tilfældigt i afdelingerne, således at ingen fra de tre grupper er koncentreret i et foretrukket område af buret.

- 10 30 Minutter efter indgift lukkes buret, og nitrogen tilføres dertil med en konstant strømningshastighed (7,75 liter teknisk nitrogen pr. minut) i ca. 37 minutter, på hvilket tidspunkt atmosfæren indeholder 3,7% oxygen.

- 15 Buret efterlades lukket, indtil det kritiske øjeblik, hvor højst 3 overlevende observeres blandt de 20 kontroldyr. På dette tidspunkt åbnes buret, og atmosfærisk luft får adgang dertil. Nogle få øjeblikke senere tælles de overlevende i hver gruppe af dyr.

- 20 For hver forsøgsforbindelsesdosis gentages forsøgene én eller to gange, og resultaterne samles, således at der opnås et minimum på 40 (eller 60) behandlede dyr pr. dosis og 40 (eller 60) tilsvarende kontroldyr. For hver testet forbindelsesdosis bliver antallet af overlevende dyr blandt de med forbindelsen behandlede sammenlignet med antallet af overlevende dyr blandt kontroldyrene. Forskellen mellem disse antal udtrykker forbindelsens beskyttende aktivitet over for hypoxi forårsaget af oxygenmangel. Den statistiske betydning (P) af denne forskel vurderes ved Fischer-Yates-testen.

c. Resultater

- 30 Nedenstående Tabel I viser de resultater, der blev opnået med stigende doser af forbindelserne C og B.

Tabel I

Forsøgs- <u>forbindelse</u>		Oral dosis <u>i mmol/kg</u>	Antal overlevende <u> dyr </u>		<u>P</u>
			<u>kontrol</u>	<u>behandlet</u>	.
5	C	0,032	12/60	16/60	NS
		0,1	8/60	7/60	NS
		0,16	12/60	12/60	NS
		0,32	10/60	30/60	<0,001
10	B	0,016	5/40	11/40	NS
		0,032	8/40	17/40	<0,6
		0,1	6/40	19/40	<0,005
		0,16	6/40	19/40	<0,005
		0,32	5/40	17/40	<0,01

NS=statistisk uden betydning.

15 d. Konklusioner

Ved denne test forøger den venstredrejende enantiomere ifølge opfindelsen (forbindelse B) overlevelsen af de oxygen-berøvede dyr, når den indgives i doser på fra 0,032 mmol/kg og højere. Racematet (forbindelse C) udøver først en tilsvarende aktivitet fra 0,32 mmol/kg og højere (1ste effektive dosis). Den venstredrejende enantiomere ifølge opfindelsen er således 10 gange mere aktiv end det tilsvarende racemat.

II. Beskyttelse mod cerebral ischaemi (rotter)

25 a. Princip (C.Giurgea og F.Mouravieff-Lesuisse, se ovenfor under Ia.).

Elektroencephalografiske kontrolforsøg har vist, at ligatur af de 2 carotis communis hos rotte fremkalder en sand cerebral ischaemi:encephalogramkurven udflader og bliver endog isoelektrisk (elektrisk stilhed).

b. Metode

Wistar-hanrotter med en vægt på mellem 250 og 350 g anæsteseres med pentobarbital indgivet intraperitonealt i en dosis på 50 mg/kg (0,5 ml/100 g).

35 Umiddelbart efter anæstæsien får dyrene intraperitonealt en mængde på 0,5 ml/100 g enten af forsøgsforbindelsen opløst i en isotonisk natriumchloridopløsning (be-

handlede dyr) eller kun af en isotonisk natriumchlorid-opløsning eller placebo (kontroldyr). Ca. 20 minutter senere bliver de 2 carotis communis frilagt og ca. 10 minutter senere ombundet samtidigt. Denne operation foregår
5 samtidigt på kontroldyrene og på de handlede dyr.

En time efter indgift af forsøgsforbindelsen eller af placebo bliver der igen intraperitonealt indgivet den samme dosis enten af forsøgsforbindelsen (på handlede dyr) eller placebo (på overlevende kontroldyr).

10 5 Timer efter den første indgift bliver der tredje gang indgivet den samme dosis af enten forsøgsforbindelsen (på overlevende handlede dyr) eller placebo (på overlevende kontroldyr).

24 Timer efter den første indgift bliver ligaturens effektivitet hos alle dyr, under pentobarbitalanæstesi, verificeret ved gennemskæring af carotiderne nedstrøms for ligaturen. Antallet af overlevende dyr registreres både blandt de handlede dyr og kontroldyrene. For hver forsøgsforbindelsesdosis bliver antallet af overlevende dyr blandt de med forbindelsen handlede sammenlignet med antallet af overlevende dyr blandt kontroldyrene. Forskellen udtrykker forbindelsens beskyttende aktivitet over for dødelighed induceret ved den samtidige ligatur af de 2 carotider. Den statistiske betydning (P)
20 af denne forskel vurderes ved Brandt-Snedecor-testen.
25

c. Resultater

Nedenstående Tabel II viser resultaterne opnået med stigende doser af forbindelser C og B.

Tabel II

30	Forsøgs- <u>forbindelse</u>	Intraperitoneal <u>dosis i mmol/kg</u>	Antal overlevende		P
			<u>dyr</u>		
			<u>kontrol</u>	<u>behandlet</u>	
35	C	0,32	6/29	8/29	NS
		0,64	11/30	21/30	0,01
	B	0,1	9/29	14/29	NS
		0,16	6/29	14/30	0,05
		0,32	8/30	19/29	0,01

NS = ikke-signifikant forskel.

d. Konklusioner

Tabel II viser, at racematet (forbindelse C) først er aktiv fra en dosis på 0,64 mmol/kg og højere. I modsætning hertil beskytter den venstredrejende enantiomere ifølge opfindelsen (forbindelse B) dyrene fra 0,16 mmol/kg og højere mod den af den samtidige ligatur af de to carotider inducerede dødelighed og viser sig således 4 gange mere aktiv end racematet.

III. Toxicitet

Tabel III nedenfor viser for forbindelserne C og B LD₅₀ i mg/kg bestemt på hanmus og hanrotter efter intravenøs indgift:

Tabel III

Forsøgsforbindelse	LD ₅₀ i mg/kg	
	<u>mus</u>	<u>rotte</u>
C	1790	1500
B	1081	1038

Som det fremgår af denne tabel har den venstredrejende enantiomere ifølge opfindelsen (forbindelse B), ligesom racematet (forbindelse C), en meget lav toxicitet, og den toxiske dosis ligger betydeligt over den aktive dosis.

Opfindelsen angår endvidere et farmaceutisk præparat, der er ejendommeligt ved, at det indeholder en terapeutisk effektiv mængde af (S)- α -ethyl-2-oxo-1-pyrrolidinacetamid og et farmaceutisk acceptabelt fast eller flydende fortyndingsmiddel eller bærestof, og at det i det væsentlige er fri for indhold af (R)- α -ethyl-2-oxo-1-pyrrolidinacetamid.

Forbindelsen ifølge opfindelsen kan indgives enten oralt i form af faste eller flydende præparater, for eksempel i form af tabletter, piller, dragées, gelatinekapsler, opløsninger eller sirupper, eller parenteralt i form af injicerbare opløsninger eller suspensioner. Farmaceutiske former såsom opløsninger eller tabletter, fremstilles ved konventionelle farmaceutiske fremgangsmåder. Forbindelsen ifølge opfindelsen kan blandes med en fast eller flydende ikke-toxisk, farmaceutisk acceptabel bærer og eventuelt med et dispergeringsmiddel, et stabiliserings-

middel og, om nødvendigt, farvningsmidler og sødemidler.

De faste og flydende farmaceutiske bærere, der anvendes i disse præparater, er ligeledes velkendte.

Faste farmaceutiske excipienser til fremstilling af tabletter eller kapsler omfatter for eksempel stivelse, talkum, calciumcarbonat, lactose, sucrose og magnesiumstearat.

Procentmængden af aktivt produkt i de farmaceutiske præparater kan variere inden for meget vide grænser alt efter anvendelsesmåden og patientens tilstand. Den humane posologi kan variere mellem 250 mg og 3 g pr. dag.

Nedenfor er anført et eksempel på et præparat indeholdende forbindelsen ifølge opfindelsen, dvs. en 100 mg gelatinekapsel til oral anvendelse:

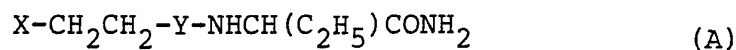
Forbindelse B	100 mg
Avicel [®] (mikrokrystallinsk cellulose)	217 mg
Mg-stearat	5 mg

20 P A T E N T K R A V

1. (S)- α -Ethyl-2-oxo-1-pyrrolidinacetamid.

2. Fremgangsmåde til fremstilling af (S)- α -ethyl-2-oxo-1-pyrrolidinacetamid, k e n d e t e g n e t ved, at (S)- α -ethyl-2-oxo-1-pyrrolidineddekesyre omsættes succes-
25 sivt med (1) et alkylhalogenformiat med formlen HalCOOZ , hvor Hal er et halogenatom, og Z er en $(\text{C}_1\text{-C}_4)$ alkylgruppe, og med (2) ammoniak.

3. Fremgangsmåde til fremstilling af (S)- α -ethyl-2-oxo-1-pyrrolidinacetamid, k e n d e t e g n e t ved, at
30 et (S)-2-amino-butanamid med formlen:



hvor:

X er en gruppe ZOOC- eller $\text{HalCH}_2\text{-}$, hvor Z er en $(\text{C}_1\text{-C}_4)$ alkylgruppe, og Hal er et halogenatom, og
35 Y er en gruppe $\text{-CH}_2\text{-}$ eller -CO- , med den betingelse, at Y er en gruppe $\text{-CH}_2\text{-}$, når X er en gruppe ZOOC- , og Y er en gruppe -CO- , når X er en gruppe $\text{HalCH}_2\text{-}$,

ringsluttet i et indifferent opløsningsmiddel og i nærværelse af et basisk stof.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 3, kendet efter net ved, at forbindelsen med formlen A er et alkyl-(S)-4-[[1-(aminocarbonyl)propyl]amino]-butyrat med formlen $\text{ZOOCCCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}(\text{C}_2\text{H}_5)\text{CONH}_2$ og er vundet ved kondensation af (S)-2-amino-butanamid med et alkyl-4-halogenbutyrat med formlen $\text{ZOOCCCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Hal}$, hvor Z er som defineret i krav 3, og Hal er et halogenatom.

10 5. Fremgangsmåde ifølge krav 3, kendet efter net ved, at forbindelsen med formlen A er et (S)-N-[1-(aminocarbonyl)propyl]-4-halogenbutanamid med formlen $\text{HalCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONHCH}(\text{C}_2\text{H}_5)\text{CONH}_2$ og er vundet ved kondensation af (S)-2-amino-butanamid med et 4-halogenbutyrylhalogenid med formlen $\text{HalCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COHal}$, hvor Hal er et halogenatom.

20 6. Farmaceutisk præparat, kendet efter net ved, at det indeholder en terapeutisk effektiv mængde af (S)- α -ethyl-2-oxo-1-pyrrolidinacetamid og et farmaceutisk acceptabelt fast eller flydende fortyndingsmiddel eller bærestof, og at det i det væsentlige er fri for indhold af (R)- α -ethyl-2-oxo-1-pyrrolidinacetamid.