

(19) DANMARK



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT

(11) 161887 B

(21) Patentansøgning nr.: 5027/81

(51) Int.Cl.⁵ C 07 C 217/48

(22) Indleveringsdag: 13 nov 1981

(41) Alm. tilgængelig: 15 maj 1982

(44) Fremlagt: 26 aug 1991

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 14 nov 1980 US 206498

(71) Ansøger: ELI *LILLY AND COMPANY; 307 East McCarty Street; Indianapolis; Indiana 46206, US

(72) Opfinder: Bennie Joe *Foster; US, Edward Ralph *Lavagnino; US

(74) Fuldmægtig: Hofman-Bang & Boutard A/S

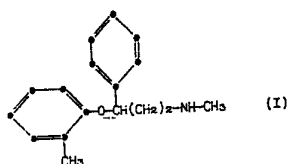
(54) Analogifremgangsmåde til fremstilling af en R-isomer af en 3-aryloxy-3-phenylpropylamin og farmaceutisk acceptabelt salt heraf

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

5027-81

(-)-Enantiomeren af forbindelsen med formlen



fremstilles ved, at man omdanner den racemiske form af forbindelsen I til en blanding af (+)(-)-saltet ved hjælp af en (+)-syre, skiller saltene fra hinanden ved fraktioneret krystallisation og omsætter (+)(-)-saltet med en stærk base til frigivelse af (-)-basen med formel I. Denne kan, om ønsket, omdannes til et farmaceutisk acceptabelt salt.
Forbindelsen I og dens farmaceutisk acceptable salte er effektive antidepressive midler.

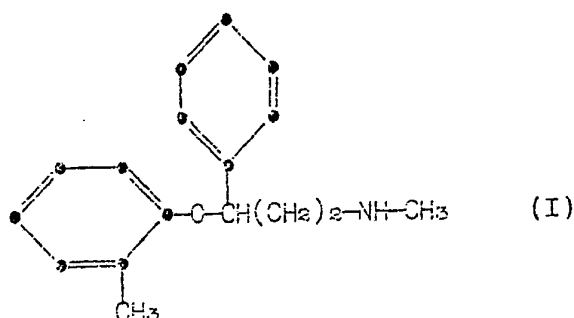
DK 161887 B

Opfindelsen angår en analogifremgangsmåde til fremstilling af en hidtil ukendt R-isomer af en 3-aryloxy-3-phenylpropylamin og farmaceutisk acceptable salte heraf, hvilken isomer har vist sig at være specielt effektiv som antidepressivt middel.

I USA patentskrift nr. 4 018 895 anføres det, at 3-aryloxy-3-phenylpropylaminer udviser antidepressive egenskaber. Faktisk omtales den racemiske form af forbindelserne ifølge opfindelsen i det ovennævnte USA patentskrift. I Biochem Pharm, 25, 1979 - 183 (1976) diskuteres aktiviteten af et andet racemat fra det ovennævnte USA patentskrift, nærmere bestemt N-methyl-3-(2-methoxyphenoxy)-3-phenylpropylamin, hydrochlorid. Som det måtte forventes, har (-)- og (+)-enantiomerene af denne forbindelse samme virkning.

Det har imidlertid overraskende vist sig, at (-)-enantiomeren af N-methyl-3-(2-methylphenoxy)-3-phenylpropylamin er væsentligt mere aktiv end (+)-enantiomer, og den udviser endvidere en mindre grad af anticholinerge bivirkninger.

Således er den ifølge opfindelsen fremstillede (-)-enantiomer af forbindelsen med formlen



og dennes farmaceutisk acceptable salte særdeles effektive antidepressive midler.

Det har nu vist sig, at (-)-enantiomeren med form-
len I udviser absolut R-stereokemi.

5 Betegnelsen "farmaceutisk acceptable salte" omfatter
sådanne syreadditionssalte, som ikke er toxiske eller
på anden måde er farmakologisk uacceptable. Sådanne
salte omfatter eksempelvis hydrochlorid, nitrat, phosphat,
sulfat, hydrobromid, pyrosulfat, sulfit, metaphosphat,
acetat, propionat, caprylat, formiat, phthalat, citrat
og lactat.

10 Man foretrækker almindeligvis at anvende forbindelsen
med formlen I på saltform, idet man specielt fore-
trækker hydrochloridet.

15 der, idet man eksempelvis kan opløse basen i ether og
tilsætte en tilnærmelsesvis ækvivalent mængde af en
passende syre.

20 Den omhandlede forbindelse kan fremstilles ved at re-
solvere det tilsvarende racemat, der eksempelvis er
fremstillet som beskrevet i USA patentskrift nr.
4 018 895.

25 Med den foreliggende opfindelse tilvejebringes således
en fremgangsmåde til fremstilling af (-)-enantiomeren af
forbindelsen med den i kravets indledning anførte for-
mel I eller et farmaceutisk acceptabelt salt deraf, og
fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved
det i kravets kendetegnende del anførte.

30 Ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen anvendes L(+)-
mandelsyre. De foretrukne stærke baser er hydroxider af
metaller fra gruppe IA, såsom natrium- eller kalium-

hydroxid eller ammoniumhydroxid.

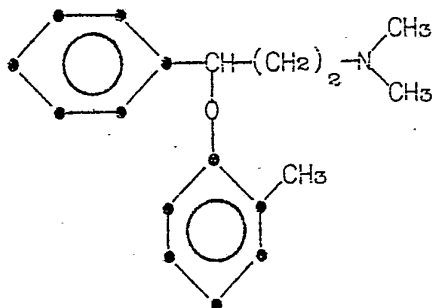
Resolutionen bør gennemføres i et inert organisk opløsningsmiddel, fortrinsvis i et ikke-polært eller moderat polært opløsningsmiddel, således som det vil
5 blive nærmere uddybet i det følgende. Det foretrækkes, at resolutionen gennemføres ved, at man først opløser racematet med formlen I i et opløsningsmiddel, såsom en ether, f. eks. tetrahydrofuran, dioxan, dimethoxyethan eller diethylether, en alkohol, f. eks. cyclohexanol, ethanol eller butanol, en alkan, f. eks. pentan, hexan eller octan, en ester såsom ethylacetat, methylacetat, ethylbutyrat eller methylbenzoat, en
10 halogenalkan såsom dichlormethan, chloroform eller 1,2-dibromethan eller et aromatisk carbonhydrid, f. eks. benzen, toluen, ethylbenzen eller xylen. Det foretrækkes, at man anvender ethere som opløsningsmidler, i særdeleshed diethylether. Til opløsningen af racematet sættes en opløsning eller suspension af den optisk aktive syre i et passende organisk opløsningsmiddel eller
15 suspensionsmedium såsom benzen, toluen eller xylen, fortrinsvis toluen. Reaktionsblandingen omrøres derefter ved en temperatur i området fra omkring 0 °C til 100 °C, fortrinsvis 0 til 50 °C, idet man specielt foretrækker omgivelsestemperaturen, og herved bundfælder det ønskede salt. Det rå salt underkastes fortrinsvis en delvis
20 rensning ved omkrystallisation.

Det foretrækkes, at det rå produkt opløses i en blanding af dichlormethan og ethylacetat, hvorefter det udfældes ved afdestillation af dichlormethanen indtil krystaldannelse, hvorpå der tilsættes diethylether
30 til fuldstændig krystallisation. Derefter opløser man mandelsyresaltet i vand og omdanner det til den fri base ved at gøre det basisk. Man foretrækker at isolere produktet ved at ekstrahere det fra den vandige opløs-

ning, f. eks. ved hjælp af en ether, og danne det ønskede salt, hvis man ønsker et sådant, i etheropløsningen.

Den foretrukne mængde (+)-mandelsyre er et halvt mol pr. mol racemat, men mængder på mellem ca. et halvt mol og ca. 1 mol kan anvendes. Anvendelse af syremængder på over 1 mol er økonomisk ufordelagtigt.

Den foretrukne fremgangsmåde til fremstilling af racematet med formlen I omfatter en demethylering af det tilsvarende dimethylamino-derivat med formlen



hvilken fremgangsmåde ligeledes er beskrevet i USA patentskrift nr. 4 018 895. Det vil være velkendt for fagmanden, at der findes et stort antal metoder, ved hvilke denne demethylering kan gennemføres. Imidlertid har det vist sig, at denne demethylering med fordel kan gennemføres ved at erstatte en af N-methylgrupperne med en phenoxyformylgruppe ved omsætning med phenylchlorformiat og derefter fjerne denne gruppe ved hydrolyse med en vandig base såsom natriumhydroxid. Denne demethyleringsreaktion kan gennemføres ved temperaturer på mellem 50 og 150 °C.

De efterfølgende præparationer og eksempler demonstrerer yderligere fremstillingen af de omhandlede forbindelser med formlen I.

Præparation 1Methyl-[3-(2-methylphenoxy)-3-phenylpropyl]-carbamid-
syrephenylester

En opløsning af 192 g (0,741 M) N,N-dimethyl- γ -
5 (2-methylphenoxy)benzenpropanamin i 500 ml toluen blev op-
varmet under tilbagesvaling, hvorefter der dråbevis i
løbet af 45 minutter blev tilsat 123 g (0,785 M)
phenylchlorformiat. Tilsætningshastigheden af phenyl-
chlorformiat blev indstillet således, at man opnåede
10 en regelmæssig tilbagesvalingshastighed, samtidig med,
at skumningen af reaktionsopløsningen som følge af dan-
nelse af methylenchlorid blev begrænset. Efter fuld-
stændig tilsætning af phenylchlorformiat blev reaktions-
blandingen opvarmet under tilbagesvaling i 1 time, hvor-
15 efter den blev omrørt ved omgivelsestemperatur i 16
timer.

Derefter blev reaktionsblandingen fortyndet med methylen-
chlorid (1 liter), og den organiske fase blev vasket med
20 en 10% natriumhydroxidopløsning, med en mættet natrium-
chloridopløsning, med 1 N saltsyre og endelig med en mæt-
tet natriumchloridopløsning. Den oprindelige basiske
vandige fase blev genekstraheret med methylenchlorid
og derefter vasket med 1 N saltsyre og derefter med
en mættet natriumchloridopløsning.

25 De kombinerede organiske ekstrakter blev tørret ved
omrøring over vandfrit natriumsulfat, hvorefter de
blev koncentreret i vakuum. Titelforbindelsen blev
krystalliseret ved triturering med hexan og derefter
omkrystalliseret ved opløsning af krystallerne i diethyl-
30 ether (begrænset opløselighed) og methylenchlorid (høj
opløselighed), hvorefter man tilsatte hexan under sam-
tidig afdestillering af de mere flygtige opløsnings-

midler, hvorved volumenet koncentreredes til omkring 1 liter.

Det racemiske produkt blev opsamlet og tørret, og det havde en vægt på 228 g (85% udbytte) og et smeltepunkt på 72 - 76 °C.

Præparation 2

N-Methyl-3-(2-methylphenoxy)-3-phenylpropylamin, hydrochlorid

10 Til en opløsning af 210 g (0,54 M) methyl-[3-(2-methylphenoxy)-3-phenylpropyl]-carbamidsyrephenylester i 890 ml propylenglycol sættes på en gang en opløsning af 214 g (5,35 M) natriumhydroxid i 890 ml vand. Den resulterende opløsning blev omrørt og opvarmet under tilbagesvaling i 20 timer (ved en reaktionstemperatur på omkring 110 °C).

15 Derefter blev opløsningen afkølet til 25 °C, der tilsattes 2500 ml vand, og opløsningen blev ekstraheret med toluen (3 x 400 ml). De kombinerede toluenekstrakter blev tørret over vandfrit magnesiumsulfat og koncentreret i vakuum til en gummi.

20 Det gummiagtige koncentrat blev opløst i 1 liter toluen, og den resulterende opløsning blev behandlet med gasformigt hydrogenchlorid, indtil den reagerede surt. Opløsningens surhedsgrad blev kontrolleret ved at udtage en prøve, tilsætte vand og måle pH-værdien af den vandige fase.

25

Der konstateredes ikke noget bundfald af titelforbindingen, og man koncentrerede derfor toluenopløsningen

til tørhed i vakuum. Den viskose inddampningsrest blev tritureret med ether, indtil den var krystallinsk, hvorefter den blev opsamlet og vasket med ether. Titelforbindelsen blev omkrystalliseret fra methylenchlorid og ethylacetat ved bortdestillation af methylenchloridet. Det opnåede produkt vejede 135 g (85% udbytte), og smeltepunktet var 132 - 135 °C. Tyndtlagschromatografi på en plade med silicagel og ved anvendelse af chloroform, methanol og koncentreret ammoniumhydroxid (50:1:0,0) viste en enkelt plet.

Analyse beregnet for $C_{17}H_{22}NOCl$: C 69,77, H 7,60, N 4,80
Fundet: C 69,68, H 7,34, N 4,64.

EKSEMPEL 1

(-)-N-Methyl-3-(2-methylphenoxy)-3-phenylpropylamin,
hydrochlorid

En opløsning af 469 g racemisk N-methyl-3-(2-methylphenoxy)-3-phenylpropylamin, hydrochlorid i 1500 ml vand blev gjort basisk med natriumcarbonat, hvorefter den blev ekstraheret 2 gange med 1 liter diethylether. Etherekstrakterne blev kombineret, vasket med vand og tørret over vandfrit magnesiumsulfat. Til den tørre opløsning sættes 122 g L(+)-mandelsyre i 2 liter toluen, og blandingen blev omrørt ved omgivelsestemperatur i 112 timer. Derefter blev blandingen filtreret og de faste stoffer blev vasket med diethylether til opnåelse af 167 g af mandelsyresaltet af (-)-N-methyl-3-(2-methylphenoxy)-3-phenylpropylamin. Produktet blev omkrystalliseret fra 2 liter af en blanding (1:1 efter volumen) af dichlormethan og ethylacetat, idet man bortkogte dichlormethanen, indtil udfældningen begyndte, hvorefter man fortyndede blandingen med 1 liter diethylether. Det resulterende rensede mellemprodukt

vejede 148 g.

748 g af mandelsyresaltet, fremstillet ved gentagne præparationer som illustreret ovenfor, blev opløst i 1 liter methanol, og opløsningen blev fortyndet med 1 liter vand, der havde omgivelsestemperatur. Den resulterende opslæmning blev gjort basisk med en natriumcarbonatopløsning, hvorefter den blev ekstraheret med 2 x 500 ml diethylether og derefter med 2 x 1 liter ethylacetat. De organiske faser blev kombineret, og blandingen blev vasket med mættet vandig natriumchlorid og derefter tørret over natriumsulfat og magnesiumsulfat. Derpå blæstes gasformig hydrogenchlorid igennem opløsningen til udfældning af det ønskede produkt i form af et hydrochloridsalt. Det faste stof blev opsamlet ved filtrering og tørret til opnåelse af 510 g (-)-N-methyl-3-(2-methylphenoxy)-3-phenylpropylamin, hydrochlorid. Produktet blev rensat ved opløsning i 200 ml dichlormethan efterfulgt af en tørring over magnesiumsulfat. Den tørre opløsning blev filtreret og derefter fortyndet med ethylacetat. Blandingen blev opvarmet med henblik på at bortkoge dichlormethanen, og produktet, som herved udkrystalliserede, blev isoleret ved filtrering. Mængden af produktet var 486 g, og det havde et smeltepunkt på 166 - 168 °C. Den optiske rotation, målt som en opløsning (10 mg/ml) i methanol, var $\alpha_D^{25} = -38,1^\circ$, $\alpha_{365}^{25} = -177,26^\circ$.

EKSEMPEL 2

(-)-N-methyl-3-(2-methylphenoxy)-3-phenylpropylamin,
hydrochlorid

800 g racemisk N-methyl-3-(2-methylphenoxy)-3-phenylpropylamin, hydrochlorid, blev opløst i 2 liter vand og blev gjort basisk med natriumcarbonat. Opløsningen

blev ekstraheret 2 gange med 2 liter diethylether,
og etheropløsningen blev tørret over vandfrit magnesium-
sulfat. Til opløsningen sættes en suspension af 209 g
L(+)-mandelsyre i 200 ml xylen, og blandingen blev om-
5 rørt ved omgivelsestemperatur i 22 timer. Det faste
stof blev derefter opsamlet og tørret til opnåelse af
372 g urent (-)-mandelsyresalt med smeltepunkt 126 -
128 °C. Det urene salt blev opløst i 4 liter af en blan-
ding af dichlormethan og ethylacetat (1:1 efter vo-
lumen), og blandingen blev kogt forsigtigt, indtil
10 bundfældningen begyndte. Derefter tilsattes 1,5 liter
diethylether, og blandingen afkøledes og filtreredes til
opnåelse af 359 g af (-)-mandelsyresaltet med smelte-
punkt 128 - 129 °C. Produktet blev på ny omkrystalli-
seret fra det samme opløsningsmiddelsystem, hvilket gav
326 g meget rent mandelsyresalt med smeltepunkt 128 -
15 129 °C.

Det oven for fremstillede rensede salt blev opløst i
2 liter vand, og opløsningen blev gjort basisk med
natriumcarbonat. Den basiske opløsning blev eks-
traheret 2 gange med 1 liter diethylether, og de or-
ganiske faser blev kombineret og tørret over vandfrit
20 natriumsulfat. Derefter blæstes gasformig hydrogenchlo-
rid igennem opløsningen under omrøring, indtil opløs-
ningen udviste sur reaktion på pH-papir. Derefter ud-
fældede hydrochloridsaltet, og dette blev opsamlet og
omkrystalliseret ved, at man opløste det i 500 ml di-
chlormethan, tilsatte 1,5 liter ethylacetat og kogte
25 blandingen forsigtigt, indtil udfældningen begyndte.
På dette tidspunkt tilsattes 1 liter diethylether. Blan-
dingen blev derefter afkølet og filtreret, og de faste
stoffer blev tørret til opnåelse af 209 g (-)-N-methyl-
phenoxy)-3-phenylpropylamin, hydrochlorid, smk. 165 -
30 168 °C. Produktet blev omkrystalliseret fra det samme
opløsningsmiddelsystem, hvilket gav 180 g meget rent

(-)-N-methyl-3-(2-methylphenoxy)-3-phenylpropylamin, hydrochlorid, smp. 165 - 167 °C. Den optiske rotation, målt som en opløsning (10 mg/ml) i methanol, var $\alpha_D^{25} = -37,6^\circ$, $\alpha_{365}^{25} = -181,3^\circ$.

5 EKSEMPEL 3

(-)-N-methyl-3-(2-methylphenoxy)-3-phenylpropylamin,
hydrochlorid

3,05 g racemisk N-methyl-3-(2-methylphenoxy)-3-phenylpropylamin, hydrochlorid, blev opløst i 50 ml vand og blev gjort basisk med natriumbicarbonat. Opløsningen blev ekstraheret med 3 x 50 ml diethylether, og de kombinerede organiske faser blev vasket 2 gange med 20 ml vand. Opløsningen blev tørret over magnesiumsulfat og koncentreret under vakuum til et fast stof.

Inddampningsresten blev opløst i 100 ml benzen, og der tilsattes 1,5 g L(+)-mandelsyre. Opløsningen blev igen omrørt i 64 timer ved 23 °C, og den blev derefter koncentreret under vakuum til et fast stof, hvortil der sattes 100 ml xylén, som opløste indampningsresten.

Opløsningen fik lov at henstå, indtil et bundfald udskiltes. det faste stof blev opsamlet ved filtrering og omkrystalliseret fra 20 ml xylén. Derefter blev produktet suspenderet i vand og gjort basisk med ammoniumhydroxid til opnåelse af den fri base, som blev ekstraheret med 2 x 20 ml diethylether. De organiske faser blev vasket med 2 x 50 ml vand, tørret over magnesiumsulfat og behandlet med gasformigt hydrogenchlorid til fremstilling af hydrochloridet, som udfældede spontant og blev filtreret fra opløsningen. Produktet blev omkrystalliseret fra 10 ml dichlormethan og 30 ml ethylacetat ved tilsætning af 50 ml diethylether. Der opnåedes 90 mg af det ønskede produkt med smeltepunkt 156 - 157 °C. Den optiske rotation, målt som beskrevet ovenfor, var

$$\alpha_D^{25} = -29,3^\circ, \alpha_{365}^{25} = -146,2^\circ.$$

Testprocedurer såvel in vivo som in vitro har været anvendt til at bestemme effektiviteten og sikkerheden af den ifølge opfindelsen fremstillede forbindelse (afprøvet som hydrochloridsalt). Det vil forstås, at der er udviklet en gruppe af biokemiske forsøg, som anvendes til at forudsige antidepressive virkninger. Der kan i denne forbindelse henvises til 2 artikler, nemlig Adolphe et al., The Neuropharmacology of Depression, Diseases of the Nervous System, 841 - 846 (1977) og Spencer, Review of the Pharmacology of Existing Antidepressants, Br. J. Clin. Pharmac. 4, 575 - 685 (1977). Disse artikler forklarer tydeligt mekanismen ved depression, som optræder, når nervesystemet bliver ude af stand til at overføre impulser imellem neuroner i passende antal og med passende hastigheder. En af de væsentligste årsager til depression har vist sig at være en tilstand, hvori der er en utilstrækkelig mængde monoaminer til stede i centralnervesystemet. De mest betydningsfulde af disse aminer er norepinephrin, serotonin og 3,4-dihydroxyphenylethylamin (dopamin). En klasse af medikamenter, som benævnes monoamin-optagelses-inhibitorer, har vist sig at være virksomme til forbedring af denne tilstand, tilsyneladende ved at inhibere den genoptagelse af aminerne, som foretages af synapserne, der er de nerve-terminaler, hvorfra aminerne blev frigivet.

Forbindelsen med formlen I tilhører klassen af monoamin-optagelses-inhibitorer, hvilket også gælder for det racemat, hvorfra forbindelsen isoleres, ifølge USA patentskrift nr. 4 018 895. De i det følgende beskrevne forsøg viser den bemærkelsesværdige effektivitet af forbindelsen med formlen I som monoamin-optagelses-inhibitor sammenlignet med racematet, hvorfra den er isoleret, og den tilsvarende (+)-enan-

tiomer.

Inhiberingen af monoamin-optagelsen blev målt ved den oven for beskrevne metode in vitro udviklet af Wong og Bymaster. Ved denne metode anvendes hanrotter af stammen Sprague-Dawley, som vejede 110 til 150 g. Rotterne blev dræbt ved halshugning, og hele hjerner blev udtaget og dissekeret. Rå præparater af synaptosomer blev fremstillet fra 10% homogenater af specifikke områder af hjernen i 0,32 M saccharose og 10 mM glucose ved differential centrifugering, svarende til metoden beskrevet af Gray og Whittaker, J. Anat. 96, 79 (1962).

Synaptosomernes optagelse af [^3H]monoaminer blev bestemt på følgende måde: En portion af et synaptosom-præparat ækvivalent med 1 mg protein blev inkuberet ved 37 °C i 5 minutter i 1 eller 3 ml Krebs bicarbonatmedium indeholdende yderligere 10 mM glucose, 0,1 mM iproniazid, 1 mM ascorbinsyre, 0,17 mM ethylendiamintetraeddikesyre og [^3H]monoamin i en specificeret koncentration. Inkuberingsblandingerne blev øjeblikkeligt fortyndet med 2 ml isafkølet Krebs bicarbonatpuffer indeholdende 1 mM ikke-radioaktiv monoamin. Synaptosomerne blev opsamlet ved centrifugering og ved hjælp af 5 ml kold puffer overført til hætteflasker indeholdende 10 ml scintillationsvæske. Radioaktiviteten blev målt med et væske-scintillationsspektrometer, og mængden af [^3H]monoamin, som var akkumuleret af synaptosomerne ved 4 °C, repræsenterede baggrundstællingen og blev trukket fra de resultater, der opnåedes for hver prøve.

Synaptosomer isoleret fra hypothalamus viste sig at akkumulere [^3H]norepinephrin ved $3,9 \times 10^{-12}$ mol/mg protein, når forsøgets gennemførtes uden tilstedeværelse af medikamenter i kontroleksperimenterne. En tilsætning af forbindelsen med formlen I til synaptosompræparatet

reducerede optagelsen af monoamin, således som det fremgår af den følgende tabel:

<u>Koncentration</u>	<u>Optagelse</u>
$1 \times 10^{-9} \text{ M}$	$3,1 \times 10^{-12} \text{ mol/mg protein}$
2	2,2
3	3,1
10	1,4
30	1,0
50	0,9
100	0,8

5 De oven for angivne data blev indført på en logaritmisk skala med henblik på at bestemme den koncentration af forbindelsen, som inhiberede halvdelen af optagelsesaktiviteten. Denne værdi (IC_{50} -værdien) var $4 \times 10^{-9} \text{ M}$.

10 Den samme test blev udført på (+)-enantiomeren af forbindelsen med formlen I samt på den racemiske blanding. IC_{50} -værdien for (+)-enantiomeren var $40 \times 10^{-9} \text{ M}$, og værdien for den racemiske blanding var $9 \times 10^{-9} \text{ M}$. Styrken af forbindelsen med formlen I med hensyn til inhibering af optagelsen af norepinphrin er således omkring 10 gange så stor som styrken af den tilsvarende (+)-enantiomer.

15 Virkningen af forbindelsen med formlen I på optagelsen af [^3H]serotonin og [^3H]dopamin blev ligeledes bestemt ved den samme testmetode, idet man anvendte synaptosomer isoleret fra corpus striatum til bestemmelsen af dopaminoptagelsen og synaptosomer fra hjernebarken til bestemmelsen af serotoninoptagelsen. Det viste sig, at

20 forbindelsen med formlen I inhiberer optagelsen af norepinphrin væsentligt mere effektivt end den inhiberer optagelsen af de to andre monoaminer. IC_{50} -værdierne for

optagelsen af dopamin og serotonin var henholdsvis 4 og 1 $\times 10^{-6}$ M.

5 Forbindelsen med formelen I er således selektiv i sin virkning, eftersom den inhiberer optagelsen af norepinphrin væsentligt mere effektivt end den inhiberer optagelsen af andre monoaminer. Mange effektive antidepressive midler inhiberer ligeledes optagelsen af norepinphrin mest effektivt.

10 Forbindelsen med formelen I har ligeledes været afprøvet på levende dyr med henblik på at bestemme dens evne til at inhibere optagelsen af norepinphrin. Forsøgsdyrene var hanrotter af stammen Sprague-Dawley, der vejede 110 til 150 g. Rotterne blev behandlet i grupper på 5 med testforbindelsen i de angivne doser og med de angivne hyppigheder, hvorefter de blev dræbt ved halshugning. Hypothalamus blev udtaget fra hver hjerne og homogeniseret i et medium som beskrevet i den oven for anførte test in vitro. Man anvendte prøver af homogenatet indeholdende 1 mg protein, og inkubationstiderne, mediet og temperaturen svarede til det ovenfor beskrevne.

25 Når forbindelsen med formelen I blev indgivet intraperitonealt 1 time før aflivningen i mængder på 1, 3 og 10 mg/kg, viste det sig, at optagelsen af [^{3} H] norepinphrin blev reduceret med henholdsvis 35, 58 og 68% i forhold til kontrolværdien. ED_{50} -værdien beregnedes til 2,1 mg/kg, idet man udregnede gennemsnittet af 3 uafhængige bestemmelse. ED_{50} -værdierne blev også bestemt for (+)-enantiomeren og racematet og viste sig at være henholdsvis 6,3 og 3,4 mg/kg.

30 De opnåede data blev også udtrykt på en anden måde, idet man grafisk optegnede forbindelsens blodniveau

imod hastigheden af [^3H]norepinephrin-optagelsen.

Denne grafiske fremstilling viste, at ED_{50} -koncentratio-
nen i blodplasma var omkring 14×10^{-9} g/ml for forbin-
delsen med formen I. ED_{50} -værdien for (+)-en-
5 antiomeren var på samme basis 110×10^{-9} g/ml, med
andre ord næsten 8 gange så høj.

Varigheden af inhiberingen af norepinephrin-optagelsen,
som skyldes forbindelsen med formen I, blev obser-
veret ved at aflive dyr, som modtog 10 mg/kg af for-
10 bindelsen, på tidspunkter op til 4 timer efter indgi-
velsen af forbindelsen. Det viste sig, at den maksimale
inhibering af norepinephrin-optagelsen i dette eksperim-
ment var mere end 80%, og at inhiberingen forblev til-
nærmelsesvis konstant i 2 timer. 4 timer efter indgi-
15 velsen var inhiberingen omkring 65%. I modsætning her-
til gav (+)-enantimeren en maksimal inhibering 70%,
og denne inhibering var faldet til henholdsvis 50 og
35% i den anden og den fjerde time.

Det neurotoxiske middel 6-hydroxydopamin har den egen-
20 skab, at det ødelægger de norepinephrinerge terminaler
i det centrale og perifere nervesystem. Det viste sig,
at 3 dage efter, at en hanrotte af stammen Sprague-
Dawley var blevet injiceret intraventriculært med 6-hy-
droxydopamin, faldt den optagelse af norepinephrin, som
25 skyldes synaptomer af hypothalamo, fra en hastighed på
 $5,6 \times 10^{-12}$ til en hastighed på $2,2 \times 10^{-12}$ mol/mg protein.
Når forbindelsen med formen I blev indgivet intra-
peritonealt inden injiceringen med 6-hydroxydopamin,
blev hastighederne af norepinephrin-optagelsen ikke re-
30 duceret så kraftigt. Doser på 1, 3 og 6 mg/kg reducerede
inhiberingen af optagelsen med henholdsvis 15, 43 og 70%.
 ED_{50} -værdien blev beregnet til 4 mg/kg. ED_{50} -værdien af
(+)-enantimeren blev vurderet på samme måde og viste
sig at være omkring 22 mg/kg.

Forbindelsen med formelen I er evalueret i et test-system in vitro med henblik på at bestemme dens anticholinerge virkning.

5 På basis af resultaterne af denne undersøgelse er den anticholinergiske virkning af forbindelsen med formelen I væsentligt mindre end virkningen af den tilsvarende (+)-enantiomer eller af racematet. Den anticholinerge virkning er en skadelig bivirkning, som kendetegner mange medikamenter. Forsøgene blev udført
10 på strimler (2 mm x 30 mm) af friske luftrør fra marssvin. Strimlerne blev suspenderet i organbade (10 ml) indeholdende en fysiologisk saltopløsning ved 37,5 °C og beluftet med en blanding af 5% carbondioxid og 95% oxygen. Luftrørsstrimlerne blev fastknyttet til isometriske transducere forbundet til et automatisk registreringsudstyr, og de fik lov at ækvilibrere under
15 en belastning på 2 g i mindst 2 timer, inden medikamentet blev tilsat. Dosis-responskurver blev opnået ved at sætte stigende koncentrationer af medikamentet til badet, idet koncentrationerne hver gang forøgedes ca.
20 3 gange. Koncentrationen af medikamentet forøgedes først, når den foregående koncentration havde produceret sit maksimale respons og forblev konstant. De konsekutive dosis-responskurver for et givet væv var i alle tilfælde adskilt med 1 time, hvorunder man foretog en udvaskning med frisk fysiologisk saltopløsning for at sikre en maksimal udvaskning af medika-
25 mentet.

Dissociationskonstanterne blev bestemt ved anvendelse af acetylcholin som agonist. Ved denne metode bestemte man de koncentrationsforhold for acetylcholin, som gav lige stor respons i nærværelse og i fravær af forbindel-
30 sen med formelen I, ved forskellige koncentrationer af forbindelsen. Man afsatte logaritmen af (dosisfor-

holdet - 1) imod den negative logaritme af den molære koncentration af forbindelsen, og herved opnåedes en ret linie, hvis hældning i alle tilfælde var tæt på den teoretiske enhedsværdi. Beregningsmetoden er udførligt diskuteret af Arunlakshana og Schild, Some Quantitative Uses of Drug Antagonists, Brit. J. Pharmacol. 14, 48 - 58 (1959).

Ud fra de grafiske afbildninger blev den negative logaritme af dissociationskonstanten for forbindelsen ifølge opfindelsen bestemt til at være 5,26, og de tilsvarende værdier for (+)-enantiomeren og racematet bestemtes til henholdsvis 6,04 og 5,72. Dette svarer til, at den anticholinerge virkning af forbindelsen med formlen I kun er en 1/6 af aktiviteten af (+)-enantiomeren og kun 1/3 af aktiviteten af racematet. Sandsynligheden for anticholinerge bivirkninger hidrørende fra forbindelsen med formlen I er således meget mindre end tilfældet er med den tilsvarende (+)-enantiomer eller det tilsvarende racemat.

Til vurdering af antidepressivt virkende midler kan man anvende en hypotermi-antagonisme-test med apomorphin, eftersom det har vist sig, at antidepressive midler modvirker den reduktion i legemstemperatur, som fremkaldes af apomorphin. Denne test udføres på følgende måde: Man injicerede mus med en dosis apomorphin, som reducerede legemstemperaturen (målt rektalt) med omkring 4 °C. Forbindelsen med formlen I blev injiceret intraperitonealt 30 minutter inden injektionen med apomorphin, og legemstemperaturen blev målt 30 minutter efter injektionen med apomorphin. Forbindelsen med formlen I gav en antagonisme på 50% af hypotermien ved indgivelse af en dosis på 0,16 mg/kg. Forbindelsen var således væsentligt mere aktiv end den tilsvarende (+)-enantiomer, som først gav en antagonisme på 50% ved en dosering på 2,26 mg/kg.

En lignende test gennemførtes ved at indgive apomorfinen intraperitonealt, mens forbindelsen med formelen I blev indgivet oralt. Det viste sig, at den højeste antagonisme, som kunne frembringes af forbindelsen med
5 formlen I i en dosis på 1 mg/kg, var 35%. Den tilsvarende (+)-enantiomer gav en antagonisme på 50%, men først ved et dosisniveau på 3 mg/kg.

En anden test, som forbindelsen blev underkastet, var beregnet på at bestemme de elektrofysiologiske virkninger i det ledende væv i hundehjerter, hvilket væv undertiden benævnes Purkinje's fibre. Det viste sig, at forbindelsen med formelen I begrænsede stigningshastigheden og varigheden af aktionspotentialet ved en koncentration på 8×10^{-6} M, hvorimod (+)-enantiomeren først var effektiv ved en koncentration på 37×10^{-6} M. Racematet udviste først en lignende effektivitet ved en koncentration på 18×10^{-6} M.
10
15

Man har undersøgt den akutte toxicitet ved at injicere forbindelsen med formelen I i store doser i mus. Det viste sig, at der ikke indtraf nogen dødsfald ved doser på under 90 mg/kg, hverken med forbindelsen ifølge opfindelsen eller med dennes (+)-enantiomer. I lavere doser frembragte forbindelsen tydelige indvirkninger på centralnervesystemet, hvilke indvirkninger forsvandt hurtigt, nærmere bestemt i løbet af 40 til 60 minutter. De virkninger, som frembragtes af tilsvarende doser af (+)-enantiomeren, var lignende, men de varede væsentligt længere. F. eks. var de mus, som blev behandlet med (+)-enantiomeren i en dosis på 60 mg/kg, stadig i stimuleret tilstand 5 timer efter indgivelsen.
20
25
30

Forbindelsen med formelen I anvendes som antidepressivt middel ved en metode, som består i at indgive en patient, der lider af depression, en effektiv dosis

af forbindelsen. Effektive antidepressivt virkende doser forefindes i området fra omkring 0,1 til omkring 25 mg/kg svarende til mellem ca. 6 mg og ca. 1500 mg pr. dag som en total dosering for et menneske. Det foretrukne dosisområde ligger på mellem ca. 0,5 og ca. 5 mg/kg eller fra omkring 30 til omkring 300 mg pr. dag for et menneske. Forbindelsen kan indgives to eller flere gange pr. dag ved at opdele doseringen på passende vis til hver indgivelse, eller forbindelsen kan indgives på en gang. Indgivelsesvejen for forbindelsen er ikke kritisk. Det har vist sig, at forbindelsen absorberes oralt, og man foretrækker således almindeligvis oral indgivelse på grund af bekvemmeligheden af denne indgivelsesform. Imidlertid kan man også effektivt indgive forbindelsen subcutant, ved injektion eller i særlige tilfælde ad andre indgiveslesveje, f. eks. i form af tabletter til anbringelse under tungen eller form af suppositorier.

Farmaceutiske midler, hvormed man kan indgive forbindelsen, kan formuleres ved metoder, der er velkendte inden for den farmaceutiske kemi. Når man ønsker at anvende oral indgivelse, er det almindeligvis mest bekvemt og økonomisk at fremstille et tablet eller en kapsel indeholdende forbindelsen. Kapsler indeholdende forbindelsen fremstilles på sædvanlig måde, idet man simpelt hen fortynder forbindelsen med et farmaceutisk acceptabelt bærestof og fylder den ønskede mængde på en kapsel af passende størrelse.

Som det vil være velkendt for farmaceuter, er tabletter noget vanskeligere at fremstille, men de kan dog fremstilles ved såvel direkte kompression som ved granuleringskompression. Som de efterfølgende eksempler illustrerer, kan man anvende de sædvanlige typer af fortyndingsmidler, excipienser, smøremidler og binde- midler ved fremstillingen af tabletter indeholdende

forbindelsen fremstillet ifølge opfindelsen.

5 Når man skal fremstille flydende doseringsformer, er det naturligvis en fordel, at forbindelsen foreligger i form af et vandopløseligt salt. Sådanne salte kan være opløst i vand til injektionsbrug, eller de kan være opløst i vand, der er tilsat passende smagsstoffer og blandet med farmaceutisk acceptable konserveringsmidler, således at forbindelsen kan indgives oralt som en eliksir.

10 Man foretrækker at formulere forbindelsen til oral indgivelse, og blandt sådanne formuleringer foretrækker man tabletter og kapsler. Formuleringer, der afgiver mellem ca. 5 og ca. 500 mg pr. dosisenhed, er specielt nyttige. Man foretrækker dosisenheder, der afgiver mellem ca. 10 og ca. 100 mg.

15 I det følgende er anført eksempler på typiske formuleringer i samtlige tilfælde foreligger forbindelsen som hydrochloridsalt.

Kapsler

Til 5 mg pr. kapsel

Aktiv forbindelse	5 mg
Pregelatineret stivelse NF	295 mg

Forbindelsen og stivelsen blandes grundigt og fyldes på hårde gelatine kapsler.

til 25 mg pr. kapsel

Aktiv forbindelse	25 mg
Mikrokrystallinsk cellulose NF	123,4 mg
Pregelatineret stivelse NF	36,1 mg
Siliconevæske	1,9 mg

Siliconevæsken blandes grundigt med en del af excipien-
serne. Forbindelsen og resten af excipien-
serne tilsæt-
tes, og samtlige ingredienser blandes herefter grundigt.
Blandingen fyldes på hårde gelatinekapsler.

Til 50 mg pr. kapsel

Aktiv forbindelse	50 mg
Pregelatineret stivelse NF	168,4 mg
Stivelse NF	82,9 mg
Siliconevæske	1,6 mg

Fremstillingen forløber på samme måde som for 25 mg kap-
slerne.

Til 500 mg pr. kapsel

Aktiv forbindelse	500 mg
Pregelatineret stivelse NF	400 mg

Forbindelsen og stivelsen blandes grundigt og fyldes
på hårde gelatinekapsler.

Tabletter

Aktiv forbindelse	10 mg
Mikrokrystallinsk cellulose NF	233,7 mg
Stivelse NF	45,0 mg
Stearinsyre NF	6,0 mg
Magnesiumstearat NF	3,0 mg
Kolloidt siliciumdioxid NF	0,9 mg

Forbindelsen og de andre ingredienser blandes grundigt
og presses til tabletter.

Forbindelsen og de andre ingredienser blandes grundigt og presses til tabletter.

Små kugler - til 25 mg pr. tablet

Aktiv forbindelse	25 mg
Mikrokrystallinsk cellulose NF	249,7 mg
Lactose USP	25,0 mg
Pregelatineret stivelse NF	10,0 mg
Stearinsyre NF	8,0 mg
Magnesiumstearat NF	3,3 mg
Kolloidt siliciumdioxid NF	2,4 mg

5 Den aktive forbindelse, lactose, den pregelatinerede stivelse, 30% af den mikrokrystallinske cellulose, 80% af
10 stearinsyren og 50% af det kolloide siliciumdioxid blandes grundigt og presses til små kugler. Disse kugler sigtes til dannelse af granula, som sammen med magnesiumstearatet og den resterende mikrokrystallinske cellulose, stearinsyren og det kolloide siliciumdioxid blandes grundigt og presses til tabletter.

Fugtig granulering - til 50 mg pr. tablet:

Aktiv forbindelse	50 mg
Dibasisk calciumphosphat USP	112,9 mg
Lactose USP	105,0 mg
Mikrokrystallinsk cellulose NF	60,0 mg
Stivelse NF	9,0 mg
Stearinsyre NF	4,5 mg
Magnesiumstearat NF	1,5 mg

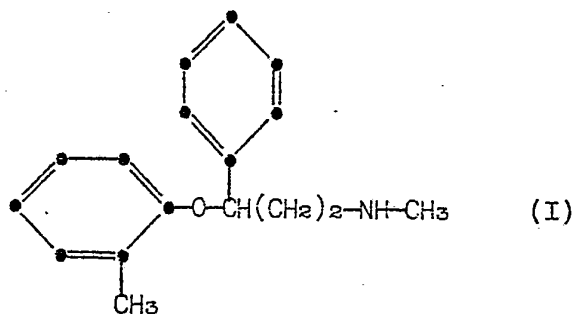
Den aktive forbindelse blandes grundigt med det dibasiske calciumphosphat og lactosen, hvorefter blandingen omdannes en fugtig masse ved hjælp af en blanding (1:1)

af denatureret alkohol og rensed vand. Den fugtige
masse filtreres og tørres, og den tørre masse sigtes
til dannelse af et granulat. Dette granulat blandes
grundigt med den mikrokrySTALLINSKE cellulose, sti-
5 velsen, stearinsyren og magnesiumstearatet, hvorefter
blandingen presses til tabletter.

P a t e n t k r a v:

5 Analogifremgangsmåde til fremstilling af (-)-enan-
tiomeren af forbindelsen med formlen

10



15

eller et farmaceutisk acceptabelt salt deraf, k e n -
d e t e g n e t ved, at man

20

(a) omsætter den racemiske form af forbindelsen med
formel I med en L(+)-mandelsyre til dannelsen af en
blanding af (+)(-)- og (+)(+)-mandelsyresaltene,

25

(b) skiller (+)(-)-mandelsyresaltet fra (+)(+)-mandel-
syresaltet ved fraktioneret krystallisation,

(c) omsætter det herved opnåede (+)(-)-mandelsyresalt
med en stærk base til frigivelse af (-)-basen med for-
mel I, og

30

(d) om ønsket omdanner den således opnåede frie base
til et farmaceutisk acceptabelt salt deraf.

35