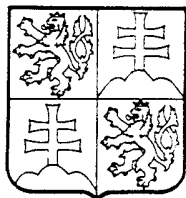


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

Kulčovní

JK

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(22) 03.01.91

(32) 03.01.90

(31) 90/92952

(33) IS

(40) 13.08.91

(21) 00006-91..N

(13) A3

5(51) C-47-D 13745

007C 13/45

(71) TEVA PHARMACEUTICAL INDUSTRIES LTD., Jerusalem, IS
TECHNION RESEARCH AND DEVELOPMENT FOUNDATION LTD., Haifa, IS

(72) Youdim Moussa B. H., Haifa, IS; Finberg John P. M., Tivon, IS; Levy Ruth, Tel-Aviv, IS; Sterling Jeffrey, Jerusalem, IS; Lerner David, Jerusalem, IS; Berger-Paskin Tirtsah, St. Raanana, IS; Yellin Haim, St. Ramat-Gan, IS;

(54) R-Enantiomery N-propargyl-1-aminoindanových
sloučenin, způsob jejich přípravy a farmaceutické
přípravky, které je obsahují

(57) R(+)-N-Propargyl-1-aminoindan, jeho příprava a
použití a farmaceutické přípravy, které jej ob-
sahují. Nové sloučeniny jsou vhodné pro léčení
lidí trpících Parkinsonovou chorobou, poruchami
paměti, demencí Alzheimerova typu (DAT), depre-
sí a hyperaktivním syndromem.

Předložený vynález se týká oblasti selektivních irreverzibilních inhibitorů enzymu monoaminoxidázy (dále MAO) a týká se R(+) enantiomeru N-propargyl-1-aminoindanu (dále PAI), který je selektivním irreverzibilním inhibítozem B-formy enzymu monoaminoxidázy (dále MAO-B). Vynález se také týká farmaceutických přípravků, obsahujících R(+) PAI, který je zvláště vhodný pro léčení Parkinsonovy choroby, poruch paměti a demence Alzheimerova typu (DAT), deprese a hyperaktivního syndromu u dětí.

Parkinsonova choroba se obecně pokládá za následek degradace presynaptických dopamingerních neuronů v mozku s následnými sníženími množství neurotransmitéru dopaminu, který se uvolňuje. Nedostatečné uvolňování dopaminu proto vede k nástupu poruch samovolné svalové kontroly symptomatických pro Parkinsonovu chorobu.

Různé postupy pro léčení Parkinsonovy choroby byly vyvinuty a v širokém rozsahu se běžně používají, např. podávání L-Dopy spolu s inhibítozem dekarboxylázy jako je L-carbidopa nebo benzerazid. Inhibitor dekarboxylázy chrání molekulu L-Dopy před periferní dekarboxylací a tak zajišťuje příjem L-Dopy zbývajícími dopaminergními neurony mozkovým striatem. Zde se L-Dopa převede na dopamin, což má za následek zvýšení hladiny dopaminu v těchto neuronech. Následkem fyziologických impulzů těchto neuronů je proto schopnost uvolnění většího množství dopaminu, které se blí-

ží normálním požadovaným hodnotám. Toto léčení proto mírní symptomy této choroby a přispívá k dobrému stavu pacientů.

Nicméně léčení L-Dopou má své nevýhody, hlavní z nich je, že účinnost léčení je optimální pouze v několika prvních letech po zahájení léčby. Po této úvodní periodě klinická odezva mizí a je doprovázena nežádoucími vedlejšími účinky, které zahrnují diskinezu, výpadek účinnosti přes den ("efekt on-off") a psychiatrické symptomy, jako jsou stavy zmatenosti, paranoia a halucinace. Tento výpadek účinku při léčbě L-Dopou se přičítá mnoha faktorům, zahrnujícím přirozenou progresi choroby, změnu dopaminových receptorů v důsledku zvýšení produkce dopaminu nebo zvýšené hladiny metabolitů dopaminu a farmakokinetické problémy spojené s absorpcí L-Dopy (souhrn uvádí Youdim a spol., Progress in Medicinal Chemistry, sv.21, kapitola 4, str. 138 - 167 (1984), vyd. Ellis and West, Elsevier, Amsterdam).

Aby se překonaly nevýhody léčení L-Dopou, byly navrženy různé léčebné postupy, ve kterých je L-Dopa kombinována s inhibitory MAO s cílem metabolického rozrušení nově vzniklého dopaminu (viz např. patent US 4826875).

MAO existuje ve dvou formách známých jako MAO-A a MAO-B, které jsou selektivní pro různé substráty a inhibitory. Např. MAO-B metabolizuje účinněji substráty jako je 2-fenylethylamin a je selektivně a irreverzibilně inhibován (-)-deprenylem (jak je popsáno níže).

Je třeba uvést, že však kombinace L-Dopy s inhibitory jak MAO-A tak MAO-B vede k nežádoucím vedlejším účinkům, týkajících se zvýšení hladiny katecholaminu přes neuraxon. Dále je kompletní inhibice MAO také nežádoucí, protože potencuje účinek symptomimetických aminů jako je tyramin, což vede k tzv. "sýrovému efektu" ("cheese-effect"). Souhrn viz Youdim a spol., Handbook of Experimental Pharmacology, sv.90, kap.3 (1988), vyd. Trendelenburg and Weiner, Springer-Verlag). Jelikož MAO-B se ukázala být predominantní formou MAO v mozku, považují se selektivní inhibitory této formy za možný způsob dosažení snížení rozrušení dopaminu na jedné straně a společně s minimalizací systemických účinků celkové inhibice MAO na straně druhé.

Jedním z těchto selektivních inhibitorů MAO-B je (-)-deprenyl, který byl v širokém rozsahu studován a byl použit jako inhibitor MAO-B k doplnění léčby L-Dopu. Toto léčení (-)-deprenylem je obecně výhodné, jelikož nepůsobí "sýrový efekt" při dávkách působících téměř kompletní inhibici MAO-B (Elsworth a spol., Psychopharmacology, 57, 33 (1978). Dále přídavek (-)-deprenylu ke kombinaci L-Dopy a inhibitoru dekarboxylázy pacientům s Parkinsonovou chorobou vede ke zlepšení akinézy a celkové funkční kapacity rovněž jako k eliminaci výpadků typu "on-off" (viz Birkmayer and Riederer v "Parkinson's Disease" str. 138-149, Springer-Verlag (1983)).

Tak tedy (-)-deprenyl zvyšuje a prolouguje účinek L-Dopy a umožňuje snížení dávek L-Dopy, čímž jsou omezeny nežádoucí vedlejší účinky léčení L-Dopou.

Nicméně (-)-deprenyl není bez svých vlastních nežádoucích účinků, které zahrnují aktivaci preexistujících žaludečních vředů a občasné hypertenzivní příhody. Dále (-)-deprenyl je derivátem amfetaminu a je metabolizován za tvorby amfetaminu a methamfetaminů, které mohou vést k nežádoucím vedlejším účinkům spojených s těmito látkami jako je např. zvýšená srdeční frekvence (Simpson, Biochemical Pharmacology, 27, 1591 (1978); Finberg a spol., v "Monoamine Oxidase Inhibitors - the State of the Art", str.31-43, vyd. Youdim a Paykel, (1981) Wiley).

Další sloučeniny, které jsou selektivními irreverzibilními inhibitory MAO-B, které jsou prosté nežádoucích vedlejších účinků spojených s (-)-deprenylem, již byly popsány. Jednou takovou sloučeninou je N-propargyl-1-aminoindan.HCl (racemický PAI.HCl) popsáný v patentech GB 1003686 a GB 1037014 a US 3513244. Je to účinný selektivní irreverzibilní inhibitor MAO-B, který není metabolizován na amfetaminy a nevzniká při něm zvýšení nežádoucích sympatomimetických účinků.

Ve srovnávacích testech na zvířatech se prokázalo, že racemický PAI má značné výhody ve srovnání s (-)-deprenylem, např. racemický PAI nevyvolává žádnou významnou ta-

chykardii, nepůsobí zvýšení krevního tlaku (účinky vyvolané dávkami 5 mg/kg (-)-deprenylu), nevyvolává kontrakce vláček ani zvýšení srdeční frekvence v dávkách až do 5 mg/kg (účinky působené (-)-deprenylem v dávkách nad 0,5 mg/kg), dále racemický PAI.HCl nepotencuje kardiovaskulární účinky tyraminu (Finberg a spol. v "Enzymes and Neurotransmitters in Mental Disease", str. 205-219 (1980), vyd. Usdin a spol., pub. John Wiley and sons, NY; Finberg a spol (1981) v "Monoamine Oxidase Inhibitors - The State of the Art", ibid; Finberg a Youdim, British Journal Pharmacol., 85 451 (1985)).

Jedním cílem předloženého vynálezu je separovat racemické sloučeniny PAI a vyrobit enantiomer s inhibiční aktivitou MAO-B.

Jelikož deprenyl má podobnou strukturu jako PAI a je známo, že (-)-enantiomer deprenylu tj. (-)-deprenyl, je značně farmaceuticky aktivnější než (+)-enantiomer, odborníci předpokládali, že pouze (-)-enantiomer PAI by mohl být účinným inhibitorem MAO-B.

Avšak na rozdíl od těchto předpokladů bylo po rozštěpení obou enantiomerů zjištěno, v souladu s tímto vynálezem, že účinným inhibitorem MAO-B byl (+)-PAI enantiomer, zatímco (-)-enantiomer vykázal extrémně nízkou inhibiční účinnost MAO-B. Dále (+)-PAI enantiomer měl také překvapivě vyšší stupeň selektivity pro inhibici MAO-B než odpovídající racemická forma a může tak mít méně nežádoucích vedlejších účinků při léčení indikované choroby. Tato

zjištění jsou založena jak na in vitro tak in vivo experimentech a detailněji jsou prezentována dále.

Následně bylo zjištěno, že (+)-PAI má absolutní konfiguraci R. To bylo také překvapující vzhledem k očekávané strukturální analogii s deprenylem a amfetaniny.

Vysoký stupeň stereoselektivity farmakologické účinnosti mezi R(+).PAI a S(-)-enantiomerem je také pozoruhodný. Sloučenina R(+)-PAI je téměř o čtyři řády aktivnější než S(-)-enantiomer při inhibici MAO-B. Tento poměr je významně vyšší než byl pozorován mezi dvěma enantiomery deprenylu (Knoll a Magyar, Adv.Biochem.Physchopharmacol., 5, 393 (1972); Magyar a spol., Acta Physiol.Acad.Sci.Hung., 32, 377 (1967)). Dále v některých fyziologických testech se o (+)-deprenylu uvádí, že má stejnou nebo dokonce vyšší účinnost než (-)-enantiomer (Tökes a spol., Pol.J.Pharmacol.Pharm.40, 653 (1988)).

N-Methyl-N-propargylaminoindan (MPAI) je účinnější inhibitor MAO, ale s nižší selektivitou pro MAO-B oproti MAO-A (Tipton a spol., Biochem.Pharmacol., 31, 1250 (1982)). Překvapivě v tomto případě autoři vynálezu zjistili, že jsou pouze malé rozdíly v relativních účinnostech dvou enantiomerů, což dále zdůrazňuje pozoruhodnost případu R(+)-PAI (viz tabulka I).

Dalším cílem předloženého vynálezu je poskytnout po-

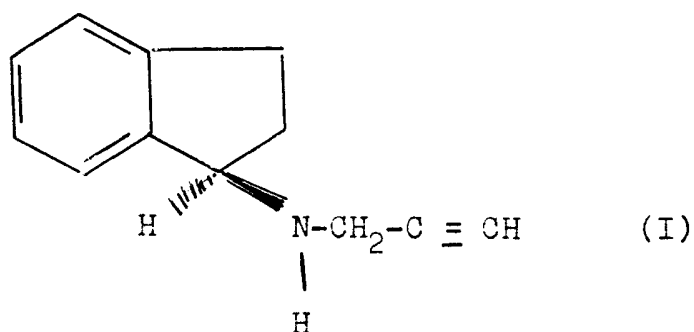
prvé použití farmaceuticky účinného PAI-enantiomeru samotného (bez L-Dopy) pro léčení Parkinsonovy choroby, demence a deprese (viz Youdim a spol v Handbook of Experimental Pharmacology, sv. 90/I, (1988), kap.3, vyd. Trendelenberg and Wiener).

Ještě dalším cílem vynálezu je poskytnout použití farmaceuticky účinného PAI-enantiomeru pro předléčbu samotného nebo spolu se synergistickými látkami, pro Parkinsonovu chorobu tak, aby se oddělila léčba L-Dopou a s ní spojené nežádoucí vedlejší účinky. Tento přístup byl studován s ohledem na (-)-deprenyl, který se ukázal být účinný podávaný samotný v ranných stádiích parkinsonismu a může mít také u těchto pacientů synergistický účinek při společném podání s alfa-tokoferolem (derivátem vitaminu A), (The Parkinson's Study Group, New England J. Med., 321 (20), 1364-1371 (1989)).

Kromě své vhodnosti při léčení Parkinsonovy choroby se (-)-deprenyl také ukázal být velmi vhodný pro léčení pacientů trpících demencí Alzheimerova typu (DAT) (Tariot a spol., Psychopharmacology, 91, 489-495, 1987) a při léčení deprese (Mandelewicz a Youdim, Brit.J.Psychiat.142, 508-511, 1983). Z toho vyplynulo použití R(+)-PAI sloučeniny, u které se prokázala účinnost, při obnovení paměti, možnosti léčení poruch paměti a zvláště vhodné použití pro

léčbu Alzheimerovy choroby a pro léčbu hyperaktivního syndromu u dětí.

Předložený vynález tak poskytuje novou sloučeninu R(+)-enantiomer N-propargyl-1-aminoindanu /R(+)-PAI)/ vzorce I



a její farmaceuticky přijatelné adiční sole s kyselinami. Předložený vynález se také týká přípravy R(+)-PAI, farmaceutických přípravků, obsahujících sloučeninu R(+)-PAI spolu s vhodnými nosiči a použití R(+)-PAI pro léčení lidských pacientů trpících Parkinsonovou chorobou, poruchami paměti, demencí Alzheimerova typu a hyperaktivním syndromem.

R(+)-PAI může být získán optickým rozštěpením racemické směsi R a S-enantiomeru PAI. Toto rozštěpení může být provedeno jakoukoliv běžnou metodou pro rozštěpení, která je dobře známa odborníkům, jako jsou metody popsané v "Enantiomers, Racemates and Resolutions" J. Jacquesem,

A.Colletem a S.Wilenem, Pub. John Wiley and Sons, NY, 1981. Například resoluce může být provedena preparativní chromatografií na chirální koloně. Jiným příkladem vhodného způsobu optického štěpení je příprava diastereomerních solí s opticky aktivními kyselinami jako je kyselina vinná, jablečná, mandlová nebo N-acetylderiváty aminokyselin jako je N-acetylleucin, s následující rekrystalizací pro izolaci diastereomerní sole požadovaného R-enantiomeru.

Racemické směs R a S enantiomerů může být připravena např. jak je popsáno v GB patentech 1003676 a GB 1037014. Racemické směs PAI může být také připravena reakcí 1-chlorindanu nebo 1-bromindanu s propargylaminem. Alternativně může být racemát připraven reakcí propargylaminu s 1-indanolem za vzniku odpovídajícího iminu s následující redukcí dvojné vazby uhlík-dusík v iminu vhodným činidlem, jako je borohydrid sodný.

V souladu s předloženým vynálezem může být R enantiomer PAI také připraven přímo z opticky aktivního R-enantiomeru 1-aminoindanu reakcí s propargylbromidem nebo propargylchloridem za přítomnosti organické nebo anorganické báze a popřípadě za přítomnosti vhodného rozpouštědla.

Vhodnými organickými nebo anorganickými bázemi pro použití ve výše uvedené reakci jsou např. triethylamin, pyridin, uhličitany nebo hydrogenuhličitany alkalických kovů atd. Jestliže se reakce provádí za přítomnosti rozpouš-

šťědla, může být toto zvoleno ze skupiny zahrnující např. toluen, methylenchlorid a acetonitril. Výhodná metoda přípravy výše uvedených sloučenin zahrnuje reakci mezi R-1-aminoindanem a propargylchloridem za použití hydrogenuhličitanu draselného jako báze a acetonitrilu jako rozpouštědla.

Uvedená reakce 1-aminoindanu obecně vede ke směsi nezreagovaného primárního aminu, požadovaného sekundárního aminu a terciárního aminu N,N-bispropargylaminového produktu. Požadovaný sekundární amin, t.j. N-propargyl-1-aminoindan, může být z této směsi oddělen jakoukoliv obvyklou separační metodou jako je chromatografie, destilace, selektivní extrakce atd..

Výchozí R-1-aminoindan může být připraven způsoby známými z literatury, např. jak uvádí Lawson a Rao, Biochemistry (1980) 19, 2133 a zde citované odkazy, a evropský patent č. 235590.

R-1-Aminoindan také může být připraven optickým rozštěpením racemické směsi R a S enantiomerů, např. tvorbou diastereomerních solí s opticky aktivními kyselinami, nebo jinou známou metodou, jako je metoda uvedená ve výše citované publikaci "Enantiomers, Racemates and Resolutions" od J. Jacquese a spol., Pub. John Wiley and Sons, NY, 1981. Alternativně výchozí R-1-aminoindan může být připraven reakcí 1-indanonu s opticky aktivním aminem s následující redukcí dvojné vazby uhlík-dusík ve výsledném iminu hydrogenací nad

vhodným katalyzátorem jako je palladium na uhlí, oxid platičitý, Raney-nikl a podobně. Výhodnými opticky aktivními aminy jsou například jeden z antipodů fenethylaminu nebo ester aminokyseliny jako je valin nebo fenylalanin. Benzylková N-C vazba může být následně rozštěpena hydrogenací za mírných podmínek.

Dalšími metodami pro přípravu R-1-aminoindanu jsou hydrogenace, jak je popsána výše, indan-1-onoximatherů, u kterých alkylová část etheru obsahuje opticky čisté chirální centrum. Alternativně, nechirální deriváty indan-1-onu obsahující dvojnou vazbu uhlík-dusík, jako je imin nebo oxim, mohou být redukovány chirálním redukčním činidlem, např. komplexem lithiualuminiumhydridu a efedrinu.

Pro přípravu farmaceuticky přijatelných adičních solí sloučeniny R(+)-PAI se volné báze nechá reagovat s požadovanými kyselinami za přítomnosti vhodného rozpouštědla obvyklými metodami. Podobně adiční soli s kyselinami mohou být převedeny na volné báze známými metodami.

V souladu s předloženým vynálezem může být sloučenina R(+)-PAI připravena jako farmaceutické kompozice zejména vhodné pro léčení Parkinsonovy choroby, demence Alzheimerova typu (DAT) nebo deprese. Takové přípravky mohou obsahovat sloučeninu R(+)-PAI nebo farmaceuticky přijatelné adiční sole s kyselinami těchto sloučenin, spolu s farmaceuticky přijatelnými nosiči a/nebo přísadami. Například tyto

přípravky mohou být připraveny jako léčiva, které mohou být podávána orálně, parenterálně, rektálně nebo transdermálně. Vhodné formy pro orální podání zahrnují tablety, lisované nebo potažené pilulky, dražé, sáčky, tvrdé nebo měkké želatinové kapsle, sublinguální tablety, sirupy a suspenze; pro parenterální podání vynález poskytuje ampule nebo lahvičky obsahující vodný nebo nevodný roztok nebo emulze; pro rektální podání jsou určeny čípky s hydrofilními nebo hydrofobními vehikuly; a pro topickou aplikaci jsou to masti a transdermální přenos je uskutečněn vhodným transportním přenosem známým v oboru.

Výše uvedené přípravky mohou být použity samotné pro léčení Parkinsonovy choroby, Alzheimerovy choroby nebo deprese, nebo alternativně, v případě Parkinsonovy choroby mohou být použity jako přídavek k obvyklé léčbě L-Dopou.

Výhodné dávky účinné složky, tj. R-PAI sloučenin, ve výše uvedených přípravcích jsou v následujících rozmezích: pro orální nebo čípkové přípravky 2 až 20 mg na dávkovou jednotku na den, a výhodně 5 až 10 mg na dávkovou jednotku na den; pro injekční přípravky 1 až 10 mg/ml dávkové jednotky na den a výhodněji 2 až 5 mg/ml na dávkovou jednotku na den.

Popis obrázků:

Obr.1. představuje grafické znázornění výsledků podle příkladu 19.

Obr.2 představuje grafické znázornění výsledků podle příkladu 19.

Obr.3 představuje grafické znázornění výsledků podle příkladu 19.

Obr.4 představuje grafické znázornění výsledků podle příkladu 20.

Obr.5 představuje grafické znázornění výsledků podle příkladu 20.

Obr.6 představuje grafické znázornění výsledků podle příkladu 20.

Obr.7 představuje grafické znázornění výsledků podle příkladu 20.

Obr.8. představuje grafické znázornění výsledků podle příkladu 20.

Obr.9 představuje grafické znázornění výsledků podle příkladu 20.

Obr.10 představuje grafické znázornění výsledků podle příkladu 20.

Obr.11 představuje grafické znázornění výsledků podle příkladu 20.

Obr.12 představuje grafické znázornění výsledků podle příkladu 21.

Obr.13 představuje grafické znázornění výsledků podle příkladu 21.

Obr.14 představuje grafické znázornění výsledků podle příkladu 21.

Obr.15 představuje grafické znázornění výsledků podle příkladu 21.

Obr.16 představuje grafické znázornění výsledků podle příkladu 22.

Vynález je blíže detailněji popsán v následujících příkladech, tabulkách a obrázcích, které jej však nijak neomezuují.

Příklad 1

Racemický hydrochlorid N-propargyl-1-aminoindanu

Racemický 1-aminoindan (10,0 g) a 10,4 g uhličitanu draselného se přidá ke 75 ml acetonitrilu. Výsledná směs se zahřívá na 60 °C a po kapkách se přidá 4,5 g propargylchloridu.

Směs se míchá při 60 °C po 16 hodin, pak se nejtěkavější látky odstraní destilací ve vakuu. Zbytek se rozdělí mezi 10% vodný hydroxid sodný a methylenchlorid.

Organická fáze se suší a rozpouštědlo se odstraní destilací. Zbytek se podrobí rychlé chromatografii na silikagelu s elucí 40% ethylacetem/60 % hexanem. Frakce, obsahující titulní sloučeninu jako volnou bázi se spojí a eluční činidlo se nahradí etherem. Etherový roztok se zpracuje s plynným chlorovodíkem, vytvořená sraženina se izoluje odsáním a rekrystalizuje z isopropanolu, získá se 7,3 g titulní

sloučeniny, t.t. 182 až 184 °C.

Chromatografické a spektroskopické hodnoty jsou v souladu s literaturou (US 3513244) a autentickým vzorkem. NMR (δ , CDCl_3): 2,45 (2H, m), 2,60 (1H, t), 2,90 (1H, m), 3,45 (1H, m), 3,70 (2H, d), 4,95 (1H, t), 7,5 (4H, m) ppm.

Příklad 2

Hydrochlorid S-(-)-N-propargyl-1-aminoindanu

Titulní sloučenina ve formě volné báze se izoluje optickým rozštěpením racemické směsi volné báze z příkladu 1 na preparativní HPLC koloně Chiracelu OJ (celuloza tris/p-methylbenzoát/) elucí 10 % isopropanolu/90 % hexanu a shromážděním prvního eluovaného hlavního píku. Výsledný olej se převede na titulní sloučeninu (hydrochlorid) zpracováním s 10% diethyletherového roztoku oleje plyným chlorovodíkem a odsátím výsledné sraženiny.

$[\alpha]_D^{20}$ -29,2° (1%, ethanol), t.t. 182 až 184 °C. Další chromatografické a spektroskopické údaje jsou identické s hydrochloridovou solí z příkladu 1.

Příklad 3

Hydrochlorid R-(+)-N-propargyl-1-aminoindanu

Titulní sloučenina se připraví stejně jako ve výše uvedeném příkladu 2 s tím rozdílem, že se oddělí druhý eluovaný pík z preparativní HPLC: $[\alpha]_D^{20}$ + 29,1° (0,8%, etha-

nol), t.t. 179 až 181 °C. Další chromatografické a spektroskopické údaje jsou identické s hydrochloridovou solí z příkladu 1.

Příklad 4

Hydrochlorid R-(+)-N-propargyl-1-aminoindanu

R-(-)-1-Aminoindan (12,4 g) a 12,9 g uhličitanu draselného se přidá k 95 ml acetonitrilu. Výsledná suspenze se zahřívá na 60 °C a přikape se 5,6 g propargylchloridu. Směs se míchá při 60 °C po dobu 16 hodin, odstraní se nejtěkavější látky ve vakuu. Zbytek se rozdělí mezi 10% vodný hydroxid sodný a methylenchlorid.

Organická fáze se suší a rozpouštědlo se odstraní ve vakuu, zbytek se chromatografuje rychlou chromatografií na silikagelu za eluce směsí 40 % ethylacetátu/60 % hexanu. Frakce, obsahující volnou bázi titulní sloučeniny se spojí a rozpouštědlo se nahradí etherem. Etherový roztok se zpracuje s plynným chlorovodíkem a výsledná sraženina se izoluje odsátím a rekrystalizuje z isopropanolu. Získá se 6,8 g titulní sloučeniny, t.t. 183 až 185 °C / α /_D +30,90° (2%, ethanol). Spektrální vlastnosti jsou shodné s vlastnostmi uvedenými pro sloučeninu z příkladu 1.

Příklad 5

Hydrochlorid S-(-)-N-propargyl-1-aminoindanu

Titulní sloučenina se připraví metodou podle příkladu 4 s tím rozdílem, že se jako výchozí látka použije S-(+)-1-aminoindan. Produkt vykazuje $[\alpha]_D -30,3^\circ$ (2%, ethanol), t.t. 183 až 185 °C. Spektrální vlastnosti jsou identické s vlastnostmi uvedenými pro sloučeninu z příkladu 1.

Příklad 6

Di (R-(+)-N-propargyl-1-aminoindan)L-tartrát

K roztoku L-vinné kyseliny (4,4 g) ve 48 ml vroucího methanolu se přidá roztok R-(+)-N-propargyl-1-aminoindanové volné báze (5,0 g) v methanolu (48 ml). Roztok se zahřívá na teplotu zpětného toku a během 20 min se přidá 284 ml terc.butylmethyletheru. Směs se zahřívá dalších 30 minut, ochladí a výsledná sraženina se odsaje, získá se tak 6,7 g titulní sloučeniny, t.t. 175 až 177 °C.

$[\alpha]_D (1,5, H_2O) = +34,3$; elementární analýza pro $C_{28}H_{32}O_6N_2$ vypočteno: 68,26 % C, 6,56 % H, 5,69 % N, nalezeno 68,76 % C, 6,57 % H, 5,61 % N.

Příklad 7

Hydrochlorid R-(+)-N-methyl-N-propargyl-1-aminoindanu

Volná báze R-(+)-N-propargyl-1-aminoindanu z příkladu 4 (1,2 g), uhličitanu draselného (0,97 g) a methyljodidu

(1 g) se přidá k 15 ml acetonu a výsledná suspenze se zahřívá na teplotu zpětného toku pod atmosférou dusíku po 8 hodin. Pak se těkavé látky odstraní za sníženého tlaku a zbytek se rozdělí mezi 10 % vodný hydroxid sodný (30 ml) a methylenchlorid (30 ml). Organická fáze se suší a rozpouštědlo se odstraní ve vakuu. Zbytek se zpracuje rychlou chromatografií na silikagelu s elucí směsí 40% ethylacetátu/60 % hexanu. Frakce, obsahující titulní sloučeninu ve formě volné báze se spojí a rozpouštědlo se nahradí diethyletherem, Etherový roztok se zpracuje s plynným chlorovodíkem, těkavé podíly se odstraní ve vakuu a zbytek se rekrystalizuje z isopropanolu, získá se 400 mg titulní sloučeniny ve formě bílé krystalické pevné látky, t.t. 134 až 136 °C, $[\alpha]_D^{25} +31,40$ (ethanol). NMR (δ_{CDCl_3}): 2,55 (2H, m), 2,7 (1H, šir.s), 2,8 (3H, s), 3,0 (1H, m), 3,4 (1H, m), 3,9 (2H, šir.s), 5,05 (1H, m), 7,7 (4H, m) ppm.

Příklad 8

Hydrochlorid S-(-)-N-methyl-N-propargyl-1-aminoindanu

Titulní sloučenina se připraví jako v příkladu 7 výše s tím rozdílem, že se jako výchozí látka použije S-(-)-N-propargyl-1-aminoindan (volná báze) z příkladu 5. Všechny fyzikální a spektrální vlastnosti titulní sloučeniny jsou shodné s těmito vlastnostmi z příkladu 7 s výjimkou $[\alpha]_D^{25} -34,9^{\circ}$ (ethanol).

Příklad 9

Složení tablet

Hydrochlorid R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu	5,0 mg
předželatinovaný škrob	47,0 mg
laktoza nesusšená	66,0 mg
mikrokrystalická celuloza	20,0 mg
škrobový glykolát sodný	3,0 mg
talek	1,5 mg
stearát hořečnatý	0,7 mg

Pro granulaci se přidá potřebné množství předčištěné vody.

Příklad 10

Složení tablet

Hydrochlorid R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu	1,0 mg
laktoza nesusšená	50,0 mg
předželatinovaný škrob	36,9 mg
mikrokrystalická celuloza	14,0 mg
škrobový glykolát sodný	2,2 mg
talek	1,0 mg
stearát hořečnatý	0,5 mg

Pro granulaci se přidá potřebné množství předčištěné vody.

Příklad 11

Složení kapslí

Hydrochlorid R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu	5,0 mg
předželatinovaný škrob	10,0 mg

škrob	44,0 mg
mikrokrystalická celuloza	25,0 mg
ethylceluloza	1,0 mg
talek	1,5 mg

Pro granulaci se přidá potřebné množství předčištěné vody.

Příklad 12

Složení injekcí

Hydrochlorid R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu 5,0 mg

bezvodá dextroza 44,0 mg

HCl do pH 5

Přidá se čištěná voda v množství potřebném pro 1 ml.

Příklad 13

Složení injekcí

Hydrochlorid R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu 1,0 mg

chlorid sodný 8,9 mg

HCl do pH 5

Přidá se čištěná voda do 1 ml.

Příklad 14

Složení injekcí

Hydrochlorid R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu 2,0 mg

chlorid sodný 8,9 mg

HCl do pH 5

Přidá se čištěná voda podle potřeby do 1 ml.

Příklad 15

Složení sirupu

Hydrochlorid R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu	5,0 mg
sacharoza	2250,0 mg
sodná sůl sacharinu	5,0 mg
methylnparaben	6,0 mg
propylparaben	1,0 mg
chuťové přísady	20,0 mg
glycerin USP	500 mg
alkohol 95% USP	200 mg

Přidá se čištěná voda v množství potřebném do 5,0 ml.

Příklad 16

Suhlinguální tablety

Hydrochlorid R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu	2,5 mg
mikrokrystalická celuloza	20,0 mg
nesušená laktoza	5,0 mg
předželatinovaný škrob	3,0 mg
povidone	0,3 mg
barvicí přísada	q.s.
ochucovadla	q.s.
sladidla	q.s.
talek	0,3 mg

Směs přísad a aktivní látky se granuluje s ethanolovým roztokem Povidonu. Po sušení a odvážení se smísí s tal-
kem a lisuje.

Příklad 17

PAI sublinguální tablety

Hydrochlorid R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu	5,0 mg
mikrokrystalická celuloza	15,0 mg
předželatinovaný škrob	12,0 mg
ethylceluloza	0,3 mg
talek	0,3 mg

Podle potřeby granulace se přidá čištěná voda.

Příklad 18

Složení tablet

Hydrochlorid R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu	5,0 mg
levodopa	100,0 mg
Carbidopa	25,0 mg
předželatinovaný škrob	24,0 mg
škrob	40,0 mg
mikrokrystalická celuloza	49,5 mg
barva D&C Yellow č.10	0,5 mg
barva D&C Yellow č.6	0,02 mg

Alkohol USP se přidá podle potřeb granulace.

Následující příklady a připojené tabulky a obrázky se vztahují k biologickým pokusům provedeným v souladu s tímto vynálezem.

Příklad 19

Inhibice aktivity MAO in vitro

Experimentální protokol:

Zdrojem MAO enzymu byl homogenát mozku krys v 0,3M sacharoze, který byl odstředován při 600 g po dobu 15 minut. Supernatant byl zředěn zhruba v 0,05M fosfátovém pufru a předinkubován se seroivými ředěními sloučenin obecného vzorce I: R(+)-PAI, S(-)-PAI a racemický-PAI (kde A znamená vodík) po 20 minut při 37 °C. Pak se přidají ¹⁴C-značené substráty (2-fenylethylamin, dále PEA, 5-hydroxytryptamin, dále 5-HT) a v inkubaci se pokračuje dalších 20 min (PEA) nebo 30-45 min (5-HT). Použité koncentrace substrátu byly 50 μ M (PEA) a 1 mM (5-HT). V případě PEA byla koncentrace enzymu volena tak, že se během reakce nematabolizuje více než 10 % substrátu. Reakce se pak ukončí přidáním tranylcyprominu (do konečné koncentrace 1 mM) a inkubát se zfiltruje přes malý sloupec Amberlitu CG-50, pufovaného na pH 6,3. Sloupec se promyje 1,5 ml vody, eluáty se spojí a obsah radioaktivity se stanoví kapalinovou scintilační spektrometrií. Protože je aminový substrát zcela zachycen na sloupci, dokládá radioaktivita v eluátu produkci

neutrálních a kyselých metabolitů vytvořených následkem MAO aktivity. Aktivita MAO ve vzorku byla vyjádřena jako procenta aktivity kontroly za nepřítomnosti inhibitorů, po odečtení příslušných hodnot slepých pokusů. Aktivita stanovená za použití PEA jako substrátu je označena jako MAO-B a za použití 5-HT jako MAO-A.

Výsledky:

Inhibiční aktivity R(+)-PAI, S(-)-PAI a racemickýh PAI sloučenin vzorce I byly odděleně zkoušeny in vitro a výsledky typických pokusů jsou uvedeny na obr. 1 a 2. Pokus byl opakován třikrát. Koncentrace inhibitoru, vykazující 50% inhibici substrátového metabolismu (IC-50) byla vypočtena z inhibičních křivek jak je uvedeno v tabulce 1. Z těchto údajů je zřejmé, že:

- a) R(+)-PAI je dvakrát aktivnější než racemát pro inhibici MAO-B,
- b) R(+)-PAI je 29krát aktivnější pro inhibici MAO-B než MAO-A,
- c) S(-)-PAI má pouze 1/6800 aktivity R(+)-PAI pro inhibici MAO-B a vykazuje malou nebo žádnou selektivitu mezi MAO-B a MAO-A.

Tabulka 1

IC-50 (nM) hodnoty pro inhibici MAO-A a MAO-B racemickým PAI a jeho R(+) a S(-) enantiomery v homogenátu krysích mozků in vitro

IC-50 (nM)						
MAO-A			MAO-B			
Slouče-						
nina:	S(-)PAI	R(+)PAI	Rac	S(-)PAI	R(+)PAI	Rac
	26000	73	140	17000	2,5	5

Výsledky stejného pokusu za použití R(+) a S(-)-MPAI (N-methyl-N-propargyl-1-aminoindan) jsou uvedeny v tabulce 1A. Každý z enantiomerů MPAI je méně selektivní mezi inhibicí MAO-B a MAO-A než R(+)PAI. Dále je R(+) pouze pětkrát aktivnější než S(-)MPAI při MAOBB inhibici, na rozdíl od R(+)PAI, který je asi 7000krát aktivnější než S(-)PAI v tomto pokuse.

Tabulka 1A

IC-50 (nM) hodnoty pro inhibici MAO-A a MAO-B R(+) a S(-) enantiomery MPAI v homogenátu krysích mozků in vitro

IC-50 (nM)				
MAO-A			MAO-B	
Slouče-				
nina:	S(-)MPAI	R(+)MPAI	S(-)MPAI	R(+)MPAI
	70	3	50	10

Stejně pokusy byly také provedeny s lidskou cerebrální kůrovou tkání, získanou 6 hodin po úmrtí a zpracovanou výše popsaným způsobem. Výsledky těchto pokusů jsou uvedeny na obr.3 (kde R(+)-PAI, S(-)-PAI a racemické PAI sloučeniny jsou ekvivalentní vzorci I).

Příklad 20

Inhibice MAO aktivity in vivo: akutní léčení

Experimentální protokol:

Krasy (samci Sprague-Dawley) o hmotnosti 250 ± 20 g byly ošetřeny jedním z enantiomerů nebo racemickou formou PAI intraperitoneální injekcí (ip) nebo orální sondou (po) a dekapitovány 1 nebo 2 hodiny po podání. Pro každou hodnotu dávky inhibitoru byly použity skupiny tří krys a MAO aktivita byla stanovena v mozku a játrech za použití obecné techniky popsané dříve. Množství proteinu v každé inkubaci bylo stanoveno za použití Folin-Lowryho metody a aktivita enzymu byla vypočtena jako nmol substrátu metabolizovaného za hodinu inkubace na každý mg proteinu. Aktivita MAO v živočišných tkáních živočichů ošetřených inhibitory byla vyjádřena jako procenta enzymové aktivity ve skupině kontrolních zvířat, kterým bylo podáno vehikulum (voda pro orální podání, 0,9% salinický roztok pro ip.injekce) a usmrceným výše uvedeným způsobem.

Výsledky:

Žádná z použitých dávek použitá s inhibitorovými léčivými nevykazuje zřejmé změny chování. Výsledky jsou znázorněny na obr. 4 až 11. ip podání sloučeniny R(+)-PAI dosahuje 90% inhibici mozkové MAO-B aktivity při dávce 0,5 mg/kg. Stejná dávka dosahuje pouze 20% inhibice MAO-A aktivity. Při orálním podání stejná dávka R(+)-PAI dosahuje 80% inhibice MAO-B s nedetegovatelnou inhibicí MAO-A.

V podstatě stejné výsledky byly dosaženy pro inhibici jaterního MAO jako pro mozkový MAO. Dávky dosahující 50% inhibici MAO-A a MAO-B (IC-50) byly vypočteny z inhibičních křivek a jsou uvedeny v tabulce 2. Z těchto údajů je zřejmé, že:

- a) inhibiční aktivita MAO sloučenin R(+)-PAI je zachována in vivo u krys,
- b) selektivita inhibice MAO-B vzhledem k MAO-A pro R(+)-PAI in vivo je zachována,
- c) mnohem větší aktivita (+)-je vzhledem k (-)-enantiomeru zachována in vivo,
- d) sloučeniny jsou účinněji absorbovány po orálním podání a
- e) sloučeniny účinněji procházejí bariérou krev-mozek a účinněji inhibují mozkový MAO. Skutečnost, že R(+)-PAI je asi dvakrát aktivnější než racemická sloučenina pro inhibici MAO-B je odrazem extrémně nízké aktivity S(-)-PAI pro inhibici MAO-B.

Tabulka 2

IC-50 hodnoty (mg/kg) pro inhibici MAO-A a MAO-B pomocí R(+)-PAI, S(-)-PAI nebo racemického PAI, u krys s následujícím intraperitoneálním (IP) injekčním nebo orálním (PO) podáním

IC-50 (mg/kg)						
MAO-A			MAO-B			
Slouče-						
nina:	S(-)PAI	R(+)-PAI	Rac	S(-)PAI	R(+)-PAI	Rac
IP mozek	>10	1,2	2,5	>10	0,07	0,22
IP játra	>10	5	5	>10	0,06	0,11
PO mozek	>10	>5	>5	>10	0,17	0,29
PO játra	>10	>5	>5	>10	0,05	0,09

Příklad 21

Inhibice MAO aktivity in vivo: chronické léčení

Experimentální protokol:

Krysy (specifikace jako v příkladu 20: 4 zvířata pro jednu hodnotu dávky) se ošetří sloučeninou R(+)-PAI nebo racemickou formou při třech hladinách dávky (0,05, 0,1 a 0,5 mg/kg) orálním podáním, jedna dávka denně po 21 dní a pak se dekapitují 2 hodiny po poslední dávce. Aktivita MAO

typů A a B byla stanovena v mozku a játrech postupem popsaným v příkladu 20.

Výsledky:

Dávka 0,1 mg/kg denně sloučeniny R(+)-PAI poskytuje dobrý stupeň selektivní inhibice s více než 80% inhibicí mozkového MAO-B a 20% nebo nižší inhibicí mozkového MAO-A. Při vyšší dávce 0,5 mg/kg denně je MAO-A stále inhibován méně než 50 % (obr.12 a 13). Jaterní MAO vykazuje stejný stupeň selektivní inhibice (obr.14 a 15). Sloučenina R(+)-PAI je vždy účinnější než racemická forma inhibitoru, s faktorem asi dvojnásobným. V případě mozkového MAO, má R(+)-PAI lepší stupeň selektivity pro inhibici MAO-B než racemická forma.

Tyto výsledky ukazují, že selektivita MAO-B inhibice může být udržována následujícím chronickým léčením pomocí uvedených sloučenin. Jako u jiných irreverzibilních inhibitorů je stupeň inhibice enzymu vyšší při chronickém ošetřování než při jednotlivé dávce léčiva. Sloučenina R(+)-PAI vykazuje lepší stupeň selektivity inhibice mozkového MAO než racemická sloučenina.

Příklad 22

Irreverzibilní charakter MAO inhibice

Experimentální protokol:

Jednotlivá dávka sloučenina R(+)-PAI (1 mg/kg) byla

podána ip injekcí skupinám 4 krys a zvířata byla usmrcena o 2, 6, 18, 24, 48 a 72 hodin později. Aktivita MAO-B byla stanovena v celé mozkové tkáni jak ke popsáno výše. Výsledky:

Výsledky jsou znázorněny na obr.16. Maximální inhibice MAO-B byla dosažena 6 hodin po injekci. MAO aktivita byla navrácena na 30 % aktivity kontroly po 72 hodinách po injekci. Tento pokus dokládá irreverzibilní charakter MAO inhibice sloučeniny R(+)-PAI.

Příklad 23

Zesílení vlivu tyraminu na tlak u krys při vědomí

Experimentální protokol:

Krysy byly anestetizovány směsí pentobarbitalu (30 mg/kg) a chloralhydrátu (120 mg/kg) intraperitoneální injekcí. Levá karotida a jugulární žíla byly kanylovány jemnou polythenovou trubičkou (arterie) nebo jemnou trubičkou ze silikonového kaučuku připojenou k polyethylenové trubičce (žíla), jejich vzdálenější konec byl zaveden pod kůži ~~do~~ krkem. Trubičky byly naplněny heparinizovaným solným roztokem a uzavřeny zátkou z jemné oceli. Zvířata byla ošetřena 20 mg chloramfenikolu intramuskulární injekcí a ponechána přes noc v klidu po operaci. Další den byly krysy umístěny do vysokostěnného kontejneru umožňujícího volný pohyb. Arteriální katetr byl spojen s tlakovým

snímačem 100 cm dlouhou, solným roztokem naplněnou polyethylenovou trubičkou jemné světlosti a žilní katetr byl připojen k 1 ml stříkačce trubičkou stejné délky, která spolu se stříkačkou, obsahuje roztok hydrochloridu tyraminu v solném roztoku (1 mg/ml).

Následuje rovnovážná perioda 30 až 40 minut, podá se injekce tyraminu (50 nebo 100 μ g) a zaznamenává se krevní tlak. Mezi injekcemi se udržuje interval alespoň 15 minut po návratu krevního tlaku na kontrolní hodnotu.

Kontrolní tlakové odezvy byly stanoveny a pak bylo jedno léčivo injektováno intraperitoneálně a tyraminová odezva byla opakována za další 4 hodiny. Byla vyhodnocena plocha pod křivkou tlakové odezvy a poměr této plochy po ošetření k ploše stanovené před ošetřením byl stanoven za použití průměru ze 3 až 4 hodnot získaných v kontrolní periodě a 1 až 3 hodiny po injekci sloučenin.

Výsledky:

Výsledky jsou uvedeny v tabulce 3. Sloučenina R(+)-PAI při dávce 1 mg/kg (která působí 40 až 50% inhibicí MAO-A v mozku a játrech a úplnou inhibicí MAO-B v těchto tkáních) nevyvolává výrazné zesílení tyraminové tlakové odezvy. Při vyšší dávce R(+)-PAI 5 mg/kg (která vyvolává extenzivnější inhibici MAO-A v mozku a periférii), výrazně zvyšuje odezvu tlaku na tyramin, která byla do jisté míry stejná s odezvou vyvolanou stejnou dávkou deprenylu a menší

než odezva vyvolaná clorgylinem (při dávce, která inhibuje jaterní MAO-A aktivitu nad 85 %).

Tabulka 3

Zvýšení vlivu tyraminu na tlak u živých krys působením MAO inhibitorů

<u>Inhibitor</u>	<u>dávka</u> (mg/kg)	<u>počet krys</u> (n)	<u>poměr plochy pod</u> <u>křivkou odezvy</u> <u>tlaku; po/před</u>	<u>SEM</u>
solný roztok		12	1,25	0,28
Clorgyline	2	6	10,39	2,13
(-)deprenyl	1	2	1,15	
(-)deprenyl	5	3	2,36	0,16
R(+)-PAI	1	3	1,38	0,7
R(+)-PAI	5	3	3,49	0,98

Z tohoto pokusu vyplývá, že R(+)-PAI nevyvolává zvýšení účinku tyraminu na tlak v dávce, která je účinná pro inhibici MAO-B.

Příklad 24

Potlačení MPTP-indukované dopaminergní toxicity R(+)-PAI

1-Methyl-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) je neurotoxinem proto, že poškozuje nigrostriální dopaminerg-

ní neurony u některých druhů savců, zahrnujících myši a působí parkinsonický syndrom u lidí a primátů. Rozhodující počáteční krok v mechanismu jeho neurotoxicity vyvolává konverze MPTP na jeho toxický metabolit 1-methyl-4-fenylpyridiniumový ion (MPP⁺). Tato reakce je katalyzována enzymem MAO-B a pravděpodobně probíhá mimo dopaminergních neuronů, zejména v gliu. Je známo, že MPTP je substrátem a irreverzibilním inhibitorem MAO-B. Předchozí ošetření pokusných zvířat MAO-B inhibitory jako je deprenyl nebo pargylin chrání před MPTP-vyvolaným ohrožením nigrostriálních neuronů, protože je blokována oxidační konverze MPTP na MPP⁺. Jedna z hlavních obecných hypotéz předpokládá, že progresivní nigrostriální degenerace v parkinsonismu může být vyvolána expozicí MPTP-podobných neurotoxinů, odvozených z životního prostředí. V takovém případě je další silnou indikací k zahájení udržující léčby MAO-B inhibitorem již ve velmi časných stadiích Parkinsonovy choroby, kdy je naděje, že bude neutralizovat škodlivé účinky těchto dosud ještě domnělých toxinů podobných MPTP a tím zamezit nebo zpomalit progresi choroby. O úspěšném použití MAO-B inhibitoru jako léčiva se předpokládá, že je působeno jeho schopností blokovat MPTP-indukované poškození nigrostriálních dopaminergních neuronů in vivo. Proto byly testovány (-) a (+) enantiomery PAI na jejich účinnost při zabránění nebo omezení MPTP-indukovaných

striatálních dopaminových deplecí u myší.

Experimentální protokol:

Samci C57 černých myší (20 až 25 g hmotnosti byli injektováni MPTP-HCl (30 mg/kg, rozpuštěno v destilované vodě, s.c.) nebo samotným vehikulem nebo jednu hodinu před ošetřením (-) nebo (+) isomery PAI (2,5 mg/kg, i.p.) nebo deprenylem (5 mg/kg, i.p.) a dekapitovány o pět dní později. Mozky byly vyjmuty a těleso striata bylo vypitváno na ledem chlazenou skleněnou desku a zmrazeno suchým ledem. Striatální tkáně byly homogenizovány v 0,1M kyselině chloristé a deproteinizované podíly obsahující dihydroxybenzylamin jako vnitřní standard byly analyzovány na dopamin a jeho hlavní metabolit 3,4-dihydroxy-fenyloctovou kyselinu (DOPAC) za použití HPLC s elektrochemickou detekcí.

Výsledky:

Tabulka 4 ukazuje výsledky z tohoto pokusu. Ošetření s MPTP samotným poskytuje značné dopaminové (DA) a DOPAC deplece. Ošetření (-) a (+) enantiomery PAI nebo s (-)deprenylem neovlivňuje striatální DA koncentrace. Předchozí ošetření (-) isomerem PAI neovlivňuje MPTP-indukované DA a DOPAC hladiny ve striatu. (+)-Isomer PAI podaný před MPTP, kompletně zamezil redukci striatální DA a DOPAC hladiny produkované toxinem. V dávce 2,5 mg/kg byl stejně účinný jako (-)-deprehyl (5 mg/kg) pokud se jedná o ochranný účinek.

Tabulka 4

Vliv předcházejícího ošetření (-) a (+) enantiomery MAO-B inhibitoru PAI na deplece striatální DA a DOPAC vyvolané MPTP u myši in vivo

	DA	DOPAC
	<u>(ng/mg proteinu)</u>	
kontrola	162,8±7,2	8,4±0,5
(-)-PAI	174,0±4,8	7,5±0,2
(-)-PAI + MPTP	53,4±6,9	7,0±0,6
(+)-PAI	185,0±6,9	3,3±0,3
(+)-PAI + MPTP	177,8±14,4	6,0±0,3
(-)deprenyl	170,6±7,1	5,6±0,3
(-)deprenyl+MPTP	197,0±8,0	6,4±0,5
MPTP	53,1±6,2	3,2±0,3

Výše uvedené hodnoty DA a DOPAC jsou vyjádřeny jako hodnota průměru±S.E.M, a počet krys n= 7 - 11 v každé skupině.

Z těchto výsledků je zřejmé, že R(+)-PAI je vynikající MAO-B inhibitor in vivo a je zvláště účinný při léčení Parkinsonovy choroby.

I když byl vynález popsán výše uvedenými příklady a souvisejícími tabulkami a obrázky, není jimi omezen. Jsou možné různé modifikace a aplikace vynálezu, například slou-

čeniny obecného vzorce I mohou být kombinovány synergickým způsobem s α -tokoferolem (derivát vitamínu E) pro léčení Parkinsonovy choroby.

Příklad 25

Vliv PAI enantiomerů na amfetaminem indukované chování senescentních krys

O amfetaminu je známo, že indukuje stereotypní chování (Sulser F. a Sanders-Bush, E. Ann. Rev. Pharmacol. 11:209-230 (1971)) mobilizací endogenního dopaminu. Amfetamin není metabolizován MAO-B. Inhibice MAO-B účinným inhibitorem a podání amfetaminu vyvolává uvolnění dopaminu, který nebude procházet degradací inhibovaným MAO-B. Je tak očekáváno zvýšení synaptického dopaminu po podání amfetaminu a účinného MAO-B inhibitoru, které vede ke zvýšení ve stereotypním chování- potenciace amfetaminového účinku. Rozsah tohoto chování je hodnocen podle počtu laterálních pohybů hlavy během 1 minuty.

Experimentální protokol:

Testovaná sloučenina byla podána v dávce 0,5 mg/kg/den v pitné vodě, 24 hodin před vyvoláním hypoxie (92 % dusíku + 8 % kyslíku za 6 hodin) Dále se injektuje amfetamin s.c. v dávce 0,5 mg/kg o 45 min později, počítají se laterální pohyby hlavy.

Výsledky:

Výsledky těchto pokusů jsou uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5

Vliv PAI isomerů na amfetaminem indukované stereotypní chování senescentních kryš (kontrolované a s vyvolanou hypoxií)

Skupina	ošetření	stereotypní chování kryš
kontrola (6)	-	87 $\pm$ 10
kontrola (5)	(+)PAI	126 $\pm$ 16-
kontrola (4)	(-)PAI	94 $\pm$ 18
vyvolaná hypoxie (5)	-	93 $\pm$ 12
vyvolaná hypoxie (6)	(+)PAI	143 $\pm$ 6-

Čísla v závorkách znamenají počet testovaných zvířat
 $P < 0,001$ vzhledem k neošetřené skupině s hypoxií nebo
 neošetřené skupině kontrolní

Výsledky v tabulce 5 ukazují, že (+) vyvolává výrazné zvýšení amfetaminem indukovaného stereotypního chování u kryš s vyvolanou hypoxií i u kontrolních zvířat. (-)PAI byl z tohoto hlediska zcela neúčinný. Tyto výsledky chování in vivo potvrzují předcházející biochemické zjištění, že (+)PAI je účinným inhibitorem MAO-B v mozku, zatímco (-) je z tohoto hlediska neúčinný.

Příklad 26

Vliv R(+)-PAI na zlepšení nebo obnovení paměti

Nově narozená krysí mláďata byla podrobena popsanému pokusu s anoxií a pak jim bylo umožněno pokračování vývoje normálním způsobem, přičemž se vyvinuly dlouhodobé poruchy paměti (Speiser a spol., Behav. Brain. Res. 30:89-94, 1988). Tato porucha paměti je vyjádřena jako zhoršení průběhu pasivního testu s překážkami.

Vliv R(+)-PAI a S(-)-PAI na zlepšení nebo obnovení paměti byl hodnocen pomocí pasivního testu s překážkami. Jestliže je léčivo účinné zvyšuje latentní odezvu na vstup do tmavého prostoru nebo prostoru, kde mohou testované krysy tak jako dříve, dostat elektrický šok. Latence maximální odezvy je 300 sekund.

Experimentální protokol:

Mladé krysy byly podrobeny post-natální anoxii jak je popsána v příkladu 27. R(+)-PAI nebo S(-)-PAI byly podány podle jednoho z následujících protokolů:

Protokol A - Kojícím matkám byla podána dávka buď jednoho nebo druhého isomeru 1 až 1,5 mg/kg/den v pitné vodě až do odstavení po 21 dnech. Pak bylo odstavené potomstvo přímo dávkováno stejnou dávkou po dobu 20 dnů. Ošetření bylo ukončeno 40 den a test byl proveden 60 den, tj. 20 dní po poslední dávce léčiva.

Protokol B - Dávka podávaná kojícím matkám byla snížena na 0,5 mg/kg/den až do odstavení 21.den a přímo pak podávána mláďatům krys až do 60.dne, kdy byl proveden test.

Pasivní test s překážkami

Zařízení obsahuje světlou komůrku s připojenou tmavou komůrkou a posuvná dvířka, oddělující tyto komůrky. Při tréninku byly krysy umístěny do osvětlené komůrky na dobu 30 sekund a pak byla dvířka otevřena. Krysy pak přesídlily do tmavé komůrky se zpožděním, které bylo zaznamenáno. Po vstupu krys do tmavého prostoru byla dvířka uzavřena a krysy dostaly šok do packy po dobu 3 s 0,3 mA.

Retence (paměť) po 48 hodinách byla stanovena opakováním testu a zaznamenáním zpoždění přechodu ze světlé do tmavé komůrky maximální odezvě 300 s.

Výsledky:

Výsledky těchto pokusů jsou uvedeny v tabulce 6.

Tabulka 6

Vliv PAI isomerů na pasivní odezvu překonání překážek u mladých krys (stáří 60 dnů)

Protokol A

Skupina	ošetření	před <u>elektrošokem</u>	po <u>elektrošoku</u>
kontrola	-	49±13	201±111
kontrola	(+)PAI	49±19	220±100(+9%) ^x
kontrola	(-)PAI	48±13	192±116
vyvolaná anoxie	-	45±11	183±109
vyvolaná anoxie	(+)PAI	49±10	239±99(+19%) ^x
vyvolaná anoxie	(-)PAI	55±27	179±123

Protokol B

Skupina	ošetření	před <u>elektrošokem</u>	po <u>elektrošoku</u>
kontrola	-	53±20	104±101
kontrola	(+)PAI	48±11	128±119(+23%) ^x
vyvolaná anoxie	-	45±8	119±105
vyvolaná anoxie	(+)PAI	52±12	137±126(+15%) ^x
vyvolaná anoxie	(-)PAI	48±19	112±112

- Obrázky představují zpoždění v sekundách před vstupem do tmavé komůrky, kde testované krysy již měly první zkušenost s elektrošokem.

x Uvedená procenta zvýšení jsou vztažena na skupinu krys s anoxií nebo kontrolní skupinu.

Experimentální výsledky ukazují, že (+)PAI ne (-)PAI je účinný pro zlepšení paměti krys s anoxií a kontrolních krys. Léčiva v tomto testu aktivní je možno pokládat za účinná pro léčení různých poruch paměti, demence a zejména senilní demence Alzheimerova typu.

Příklad 27

Vliv R(+)PAI na anoxií indukovaný hyperaktivní syndrom mladých krys

Krysy byly vystaveny postnatální anoxii a pak ponechány vývoji za normálních podmínek, který ukázal zvýšenou motorickou aktivitu v otevřeném prostoru ve stáří 10 až 42 dní (Hertshkowitz a spol., Dev.Brain Res.7:145-155(1983)).

Vliv R(+)PAI a R(-)PAI na tento hyperaktivní syndrom byl sledován.

Experimentální protokol:

Anoxie byla vyvolána u krysích mláďat první postnatální den. Byly umístěny do skleněné komůrky a působeno na

ně 100% dusíkem po dobu 25 minut. Pak byly krysy resuscitovány občasnou masáží jemně aplikovanou na hrudník a pak navraceny příslušným matkám. Kontrolní krysy byly ošetřeny stejně s tím, že byl použit místo dusíku vzduch.

Kojícím matkám byl podán R(+)PAI nebo S(-)PAI (0,5 mg/kg/den) v pitné vodě, tak aby došlo k převodu mlékem kojeným mláďatům.

Lokomoce byla měřena v šesti plně komputerizovaných klecích (28 x 28 cm) zaznamenáváním počtu přechodů za danou dobu. Přerušování mřížky infračervených paprsků ve 4cm intervalech iniciuje elektrické impulzy přenášené do počítače. Záznamy motorické aktivity byly provedeny ve stáří 15 a 20 dnů po dobu 15 minut.

Výsledky:

Experimentální výsledky jsou uvedeny v tabulce 7.

Tabulka 7

Vliv jednotlivých isomerů na anoxií vyvolaný hyperaktivní syndrom

Skupina	ošetření	krysy staré	krysy staré
		15 dnů	20 dnů
kontrola	-	414 $\pm$ 92(11)	808 $\pm$ 212(12)
kontrola	(+)PAI	254 $\pm$ 149(11)c	719 $\pm$ 110(13)
vyvolaná anoxie	-	482 $\pm$ 119(7)	858 $\pm$ 96(9)
vyvolaná anoxie	(+)PAI	276 $\pm$ 186(15)a	737 $\pm$ 150(16)c
vyvolaná anoxie	(-)PAI	334 $\pm$ 196(5)	778 $\pm$ 232(6)

Čísla v závorkách znamenají počet testovaných zvířat.

-Obrázky představují počet přerušení mřížky infračervených paprsků v klínce pro měření aktivity během doby 15 minut.

a $P < 0,001$ ve srovnání s neošetřenou skupinou s anoxií

b $P < 0,05$ ve srovnání s neošetřenou skupinou s anoxií

c $P < 0,05$ ve srovnání s kontrolní skupinou.

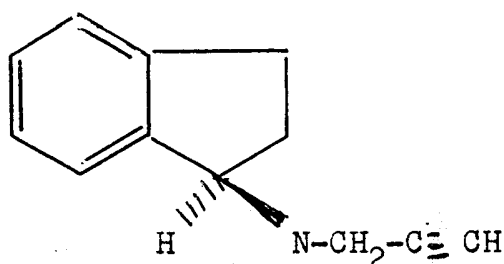
Tyto výsledky ukazují, že chronické orální ošetření R(+)PAI v dávce 0,5 mg/kg podávané kojícím matkám a mléčnou potravou tak kojeným mláďatům výrazně zlepšuje hyperaktivní syndrom. Z toho vyplývá, že R(+)PAI je potenciálním účinným léčivem pro léčení hyperaktivního syndromu u dětí.

P A T E N T O V E N Ā R O K Y

16 1 80

6 8 8 0 0 0

1. R(+)-N-Propargyl-1-aminoindan vzorce I



nebo jeho farmaceuticky přijatelné adiční soli s kyselinami.

2. Použití R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu pro léčení lidí trpících Parkinsonovou chorobou, poruchami paměti, demencí Alzheimerova typu (DAT) depresí a hyperaktivním syndromem.

3. Použití R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu pro výrobu farmaceutických přípravků pro léčení lidí trpících Parkinsonovou chorobou, poruchami paměti, demencí Alzheimerova typu (DAT), depresí a hyperaktivním syndromem.

4. Farmaceutický přípravek pro léčení lidí trpících Parkinsonovou chorobou, poruchami paměti, demencí Alzheimerova typu (DAT), depresí a hyperaktivním syndromem u dětí, vyznačující se tím, že obsahuje jako aktivní složku R(+)-N-propargyl-1-aminoindan podle bodu 1.
5. Farmaceutický přípravek podle bodu 4, vyznačující se tím, že je ve formě vhodné pro orální podání.
6. Farmaceutický přípravek podle bodu 4, vyznačující se tím, že je ve formě injektovatelného roztoku nebo emulze.
7. Farmaceutický přípravek podle bodu 4, vyznačující se tím, že je ve formě čípků pro rektální podání.
8. Farmaceutický přípravek podle bodu 4, vyznačující se tím, že je ve formě vhodné pro transdermální podání.
9. Farmaceutický přípravek podle bodu 5 nebo 7, vyznačující se tím, že dávková jednotka obsahuje 2 až 20 mg účinné složky.
10. Farmaceutický přípravek podle bodu 9, vyznačující se tím, že obsahuje 5 až 10 mg aktivní složky v dávkové jednotce.

11. Farmaceutický přípravek podle bodu 6, vyznačující se tím, že dávková jednotka této formy obsahuje 1 až 10 mg/ml účinné složky.

12. Farmaceutický přípravek podle bodu 11, vyznačující se tím, že obsahuje 2 až 5 mg/ml účinné složky na dávkovou jednotku.

13. Farmaceutický přípravek pro orální podání ve formě tablet nebo kapslí vyznačující se tím, že obsahuje R(+)-N-propargyl-1-aminoindan, Levadopu a inhibitor dekarboxylázy.

14. Přípravek podle bodu 13, vyznačující se tím, že obsahuje R(+)-N-propargyl-1-aminoindan, 50 až 250 mg Levadopy a 10 až 25 mg L-Carbidopy.

15. Přípravek podle bodu 13, vyznačující se tím, že obsahuje 2 až 10 mg R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu, 50 až 200 mg Levadopy a 12,5 až 50 mg henserazidu.

16. Způsob přípravy R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu a jeho adičních solí s kyselinami, vyznačující se tím, že se nechá reagovat 1-aminoindan s propargylbromidem nebo propar-

gylchloridem za přítomnosti organické nebo anorganické báze, popřípadě za přítomnosti vhodného rozpouštědla a izoluje se R(+)-enantiomer N-propargyl-1-aminoindanu chromatografií, destilací, selektivní extrakcí a je-li to žádoucí, převede se volná báze takto připravená, na své adiční soli s kyselinami.

17. Způsob přípravy R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu a jeho adičních solí s kyselinami, vyznačující se tím, že se nechá reagovat racemický 1-aminoindan s propargylbromidem nebo propargylchloridem za přítomnosti organické nebo anorganické báze popřípadě za přítomnosti vhodného rozpouštědla a izoluje se R(+)-enantiomer N-propargyl-1-aminoindanu chromatografií, destilací, selektivní extrakcí a je-li to žádoucí, převede se takto získaná volná báze na své adiční sole s kyselinami.

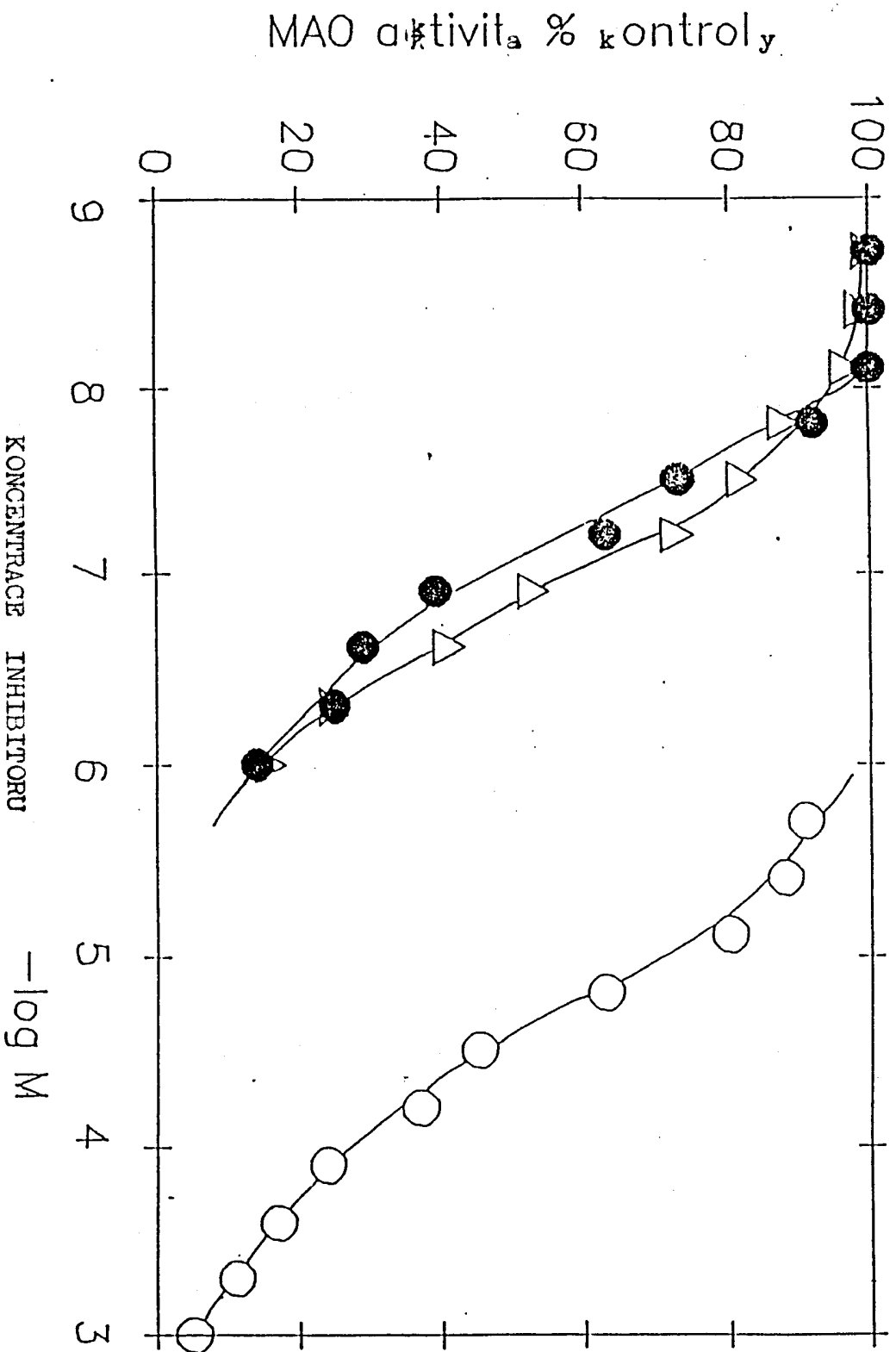
18. Způsob podle bodu 17, vyznačující se tím, že zahrnuje reakci volné báze s opticky aktivní kyselinou za vzniku dvou diastereomerních solí, oddělení požadované soli R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu známými postupy a je-li to žádoucí, regeneruje se volná báze.

19. . Způsob podle bodu 18, vyznačující se tím, že oddělení soli R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu se provede frakční krystalizací.

Zastupuje:

MP-1620-90-Če

IN VITRO INHIBIČNÍ AKTIVITA ; MAO-A



● = R(+)-PAI
○ = S(-)-PAI
Δ = Rac

03.1.91

000339

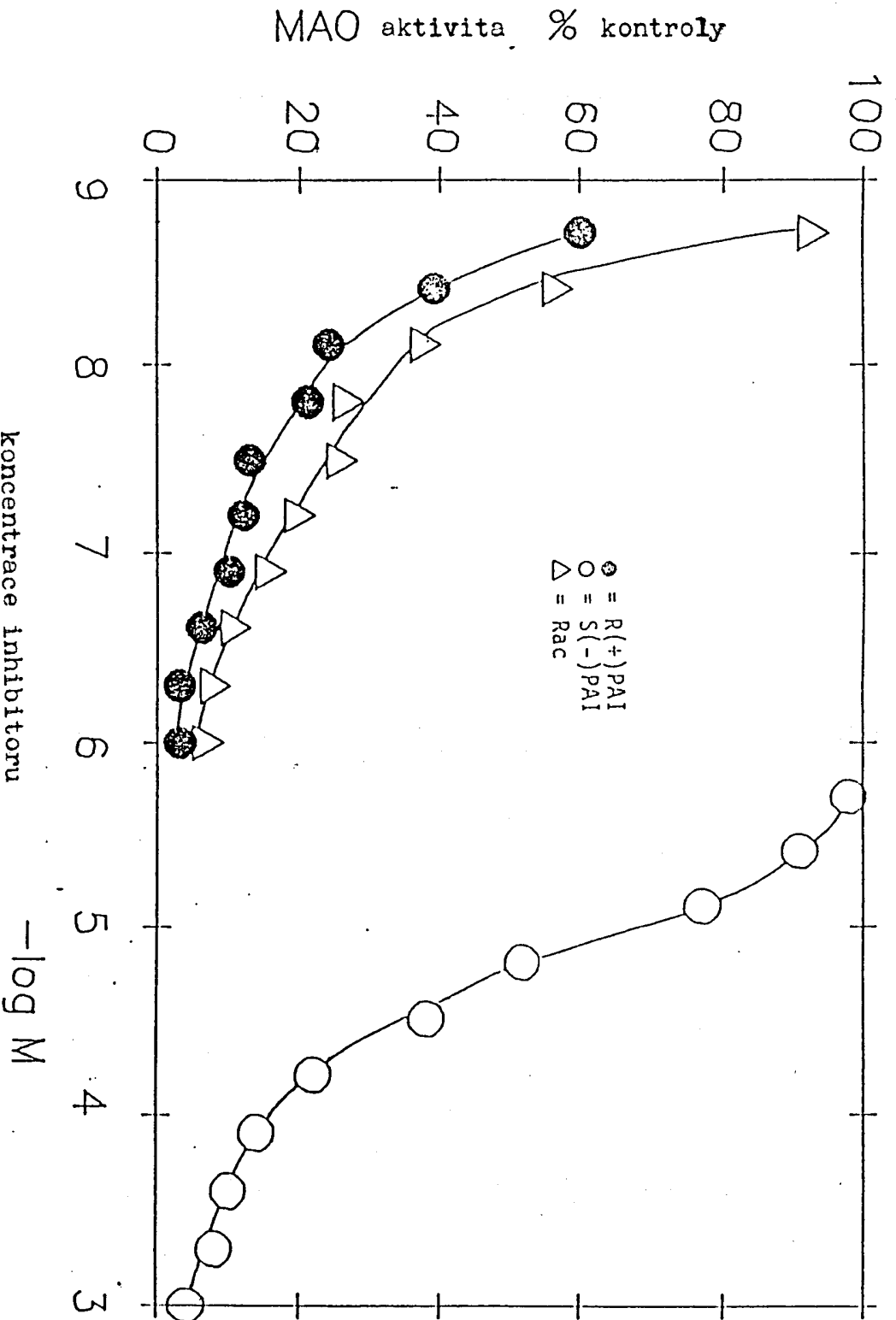
Gen

Obř.2

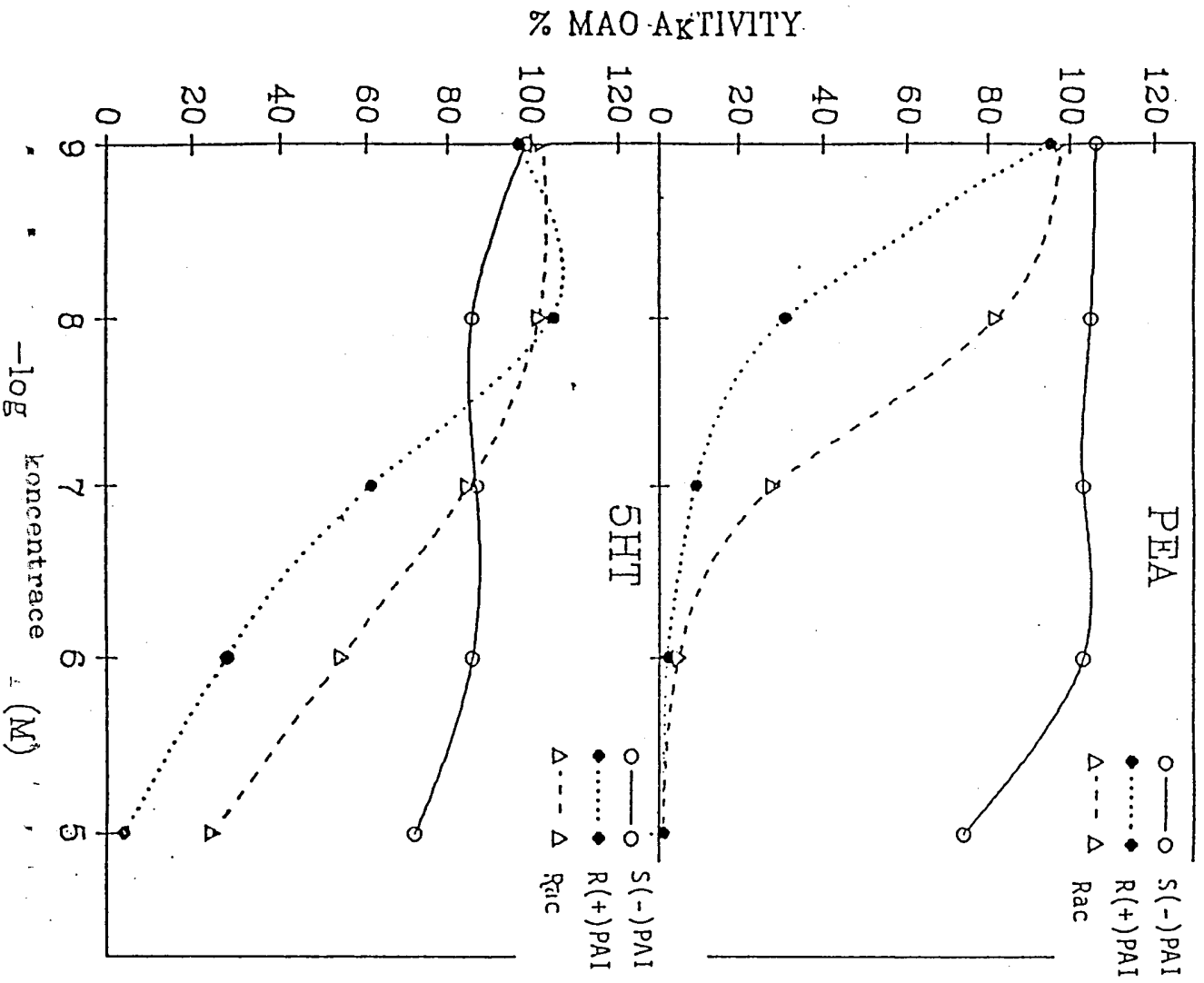
900339

03.1.91

IN VITRO inhibiční aktivita ; MAO-B



CORTEK LIDSKY



000339

03.1.91

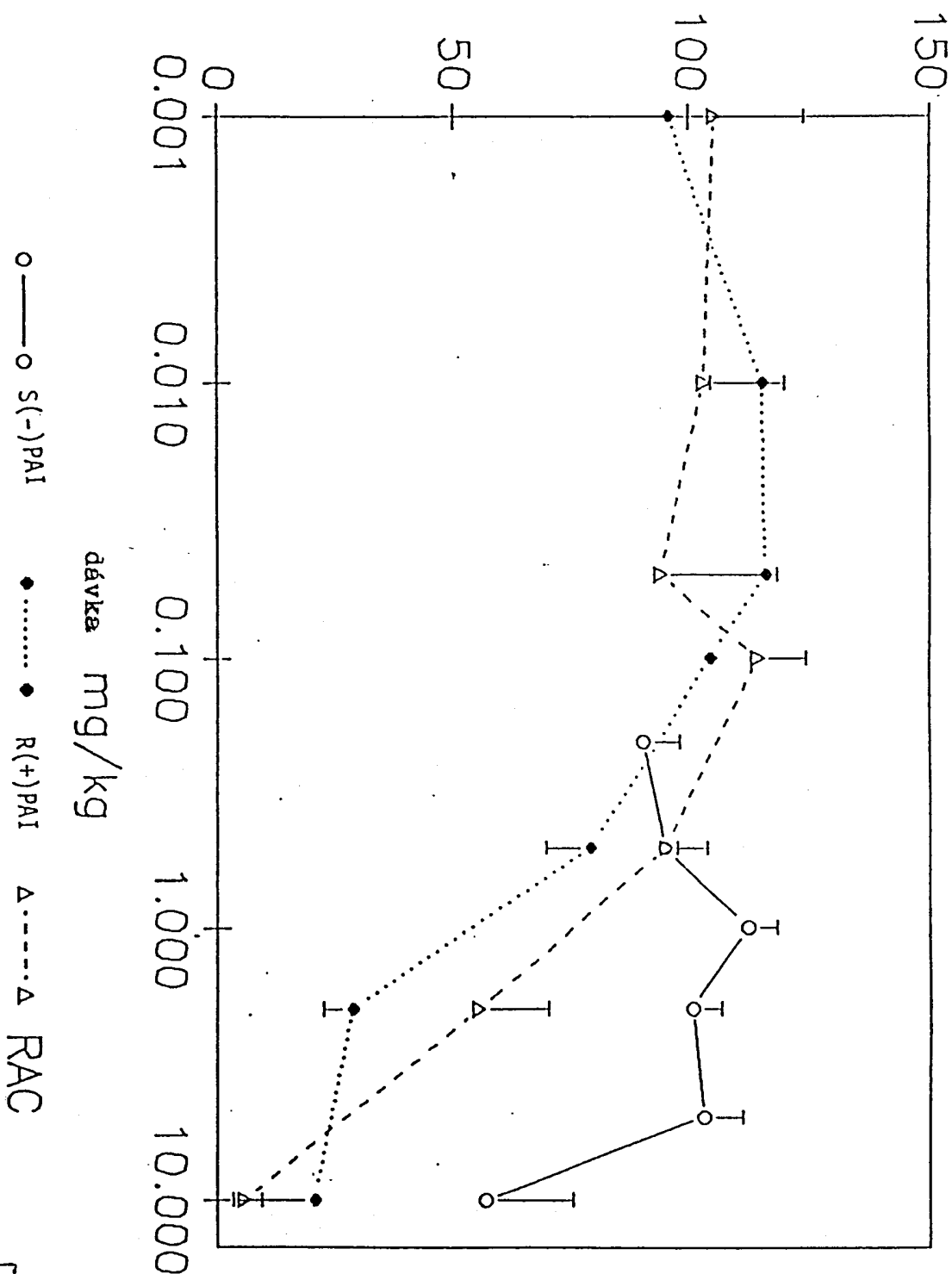
Levin

Obř. 4

MAO AKTIVITA % KONTROLY

MAO activity % control

Akutní inhibice MAO-A in vivo; IP/mozek



○—○ S(-)PAI

●·····● R(+)-PAI

△-----△ RAC

dávka mg/kg

031191

000339

lemon

Obr. 5

Akutní inhibice

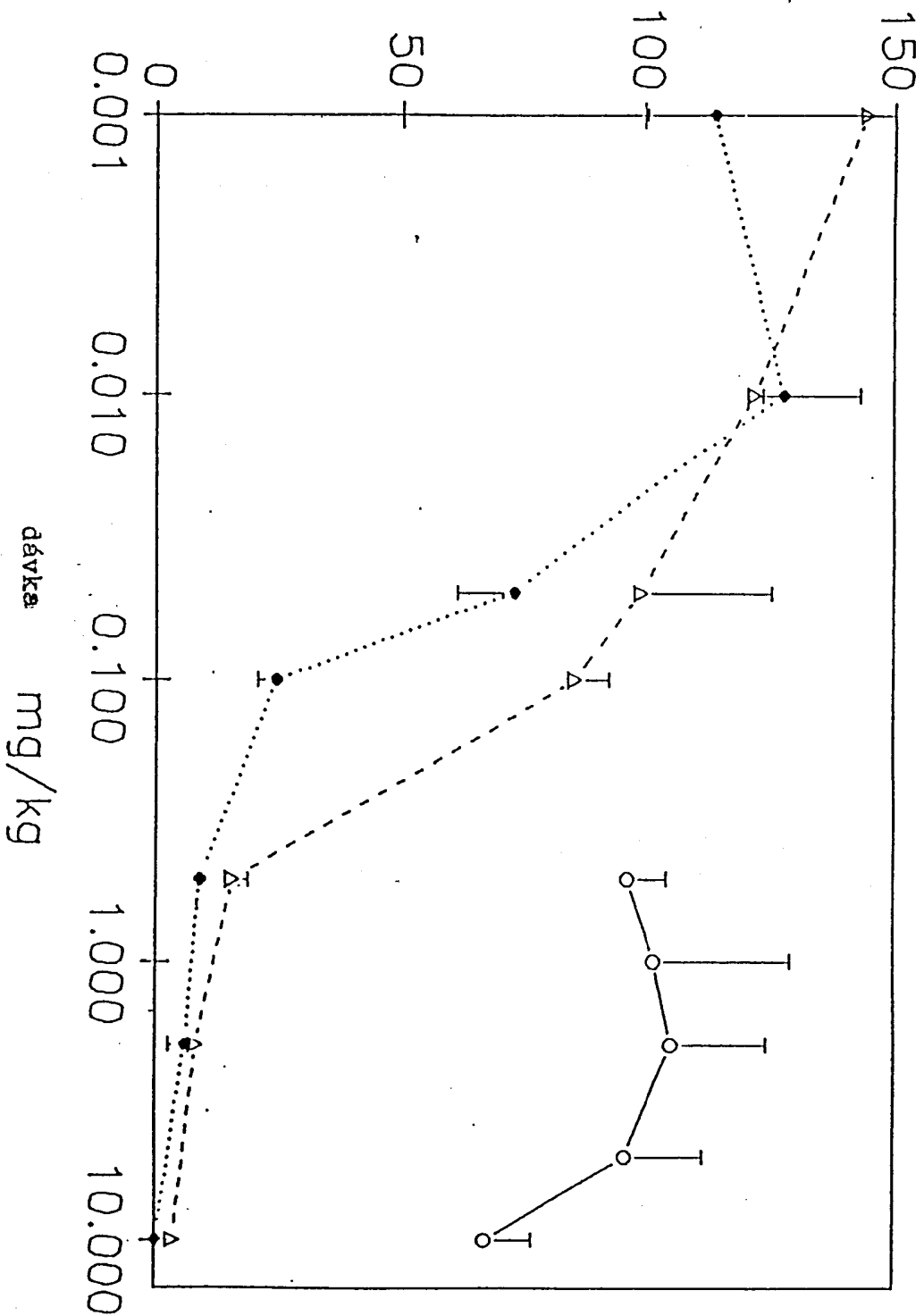
MAO-B in vivo

, IP / mozek

000339

03.1.91

MAO aktivita % kontroly



○ — ○ S(-)PAI

● ● R(+)-PAI

△ - - - - △ RAC

dávka mg/kg

born

Obř. 6

Akutní inhbyce

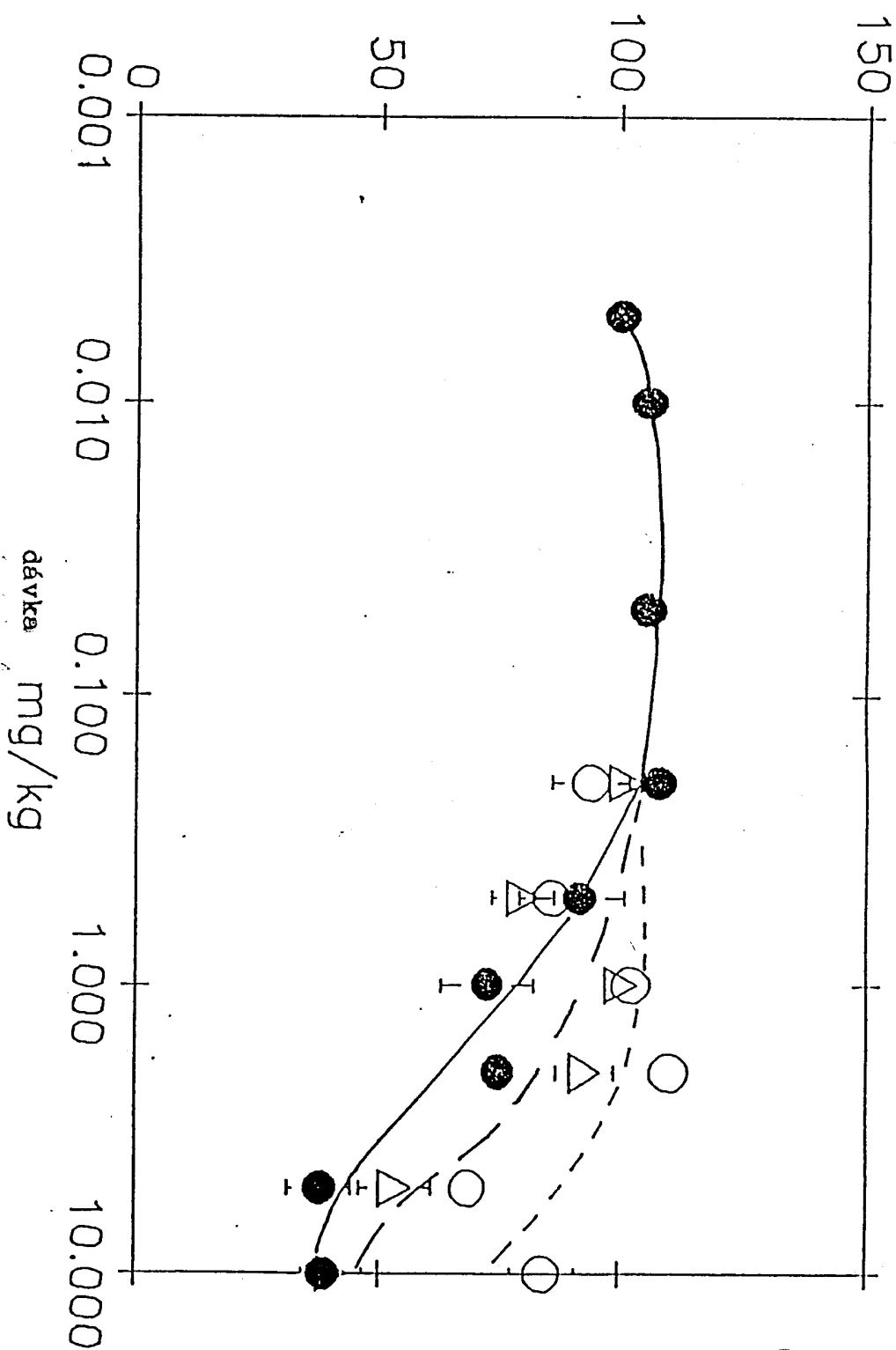
IN VIVO MAO-A

; IP / játra

0 0 0 3 3 9

0 3 1 9 1

MAO aktivita % kontroly



dávka mg/kg

GERM

Obr.

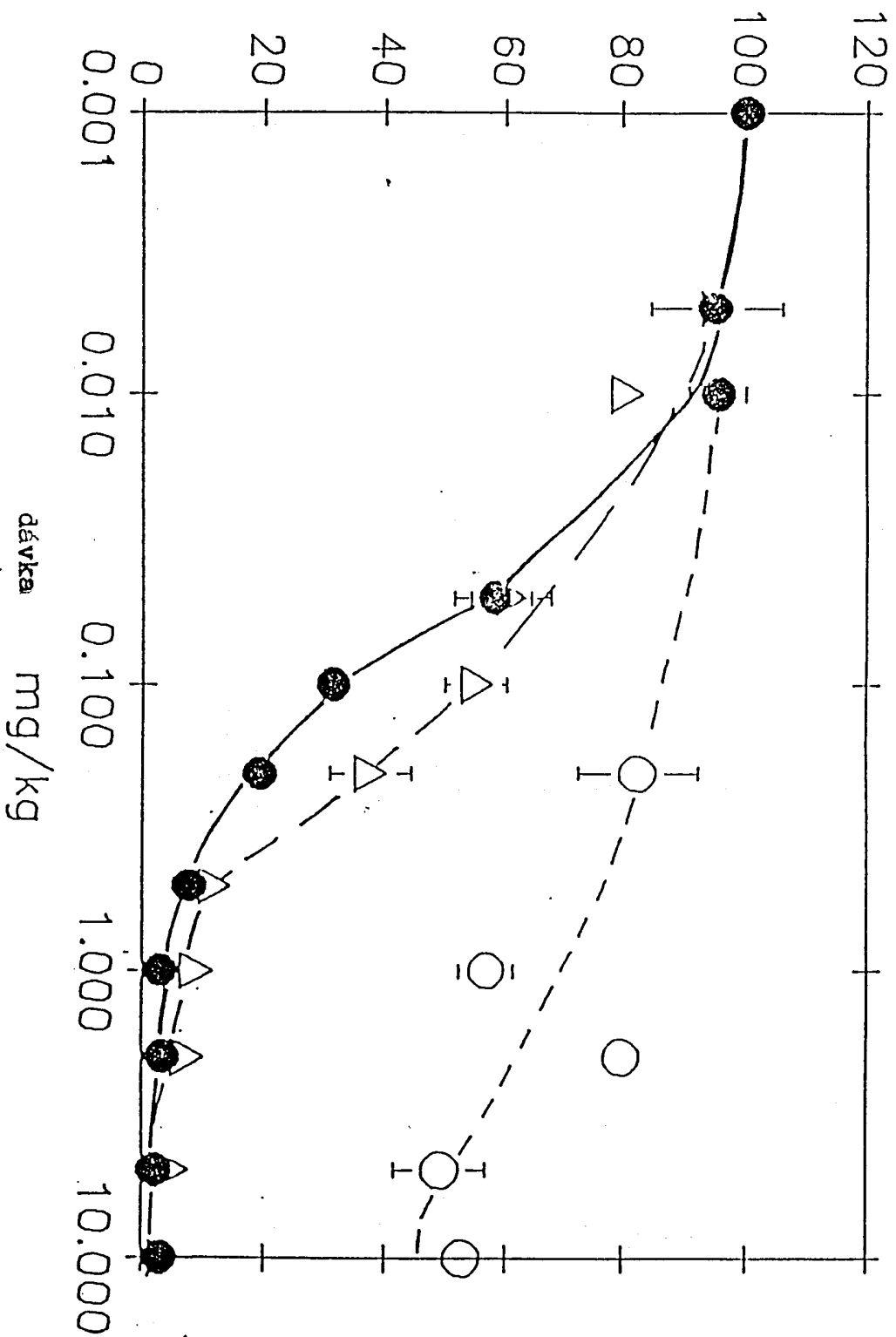
7

Akutní inhibice

IN VIVO MAO-B

; IP / játra

MAO aktivita % kontroly

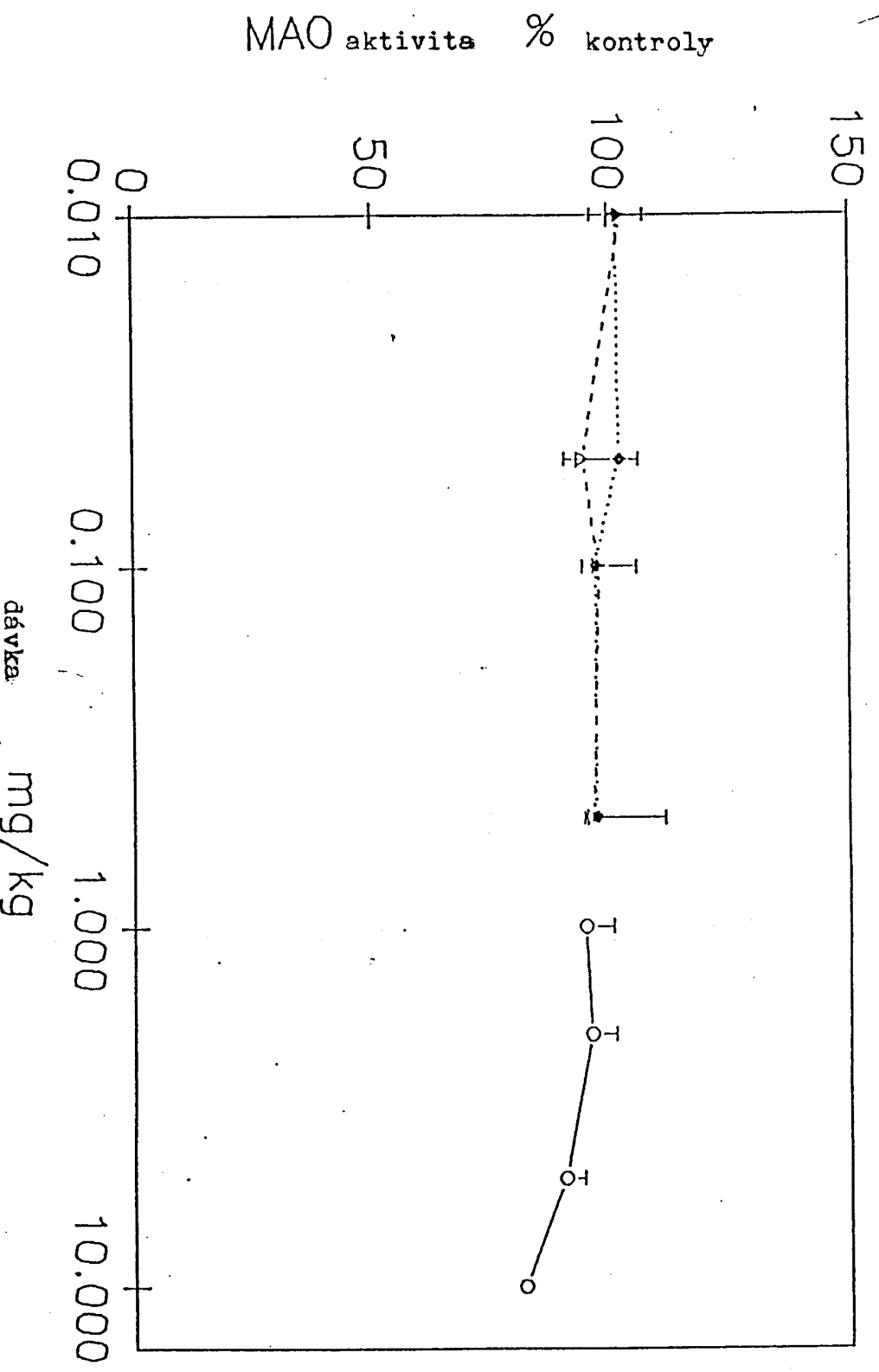


0.3 1.9 1

0.0 0.3 3 9

Seznam

Akutni inhibice IN VIVO MAO-A ; PER OS / mozek

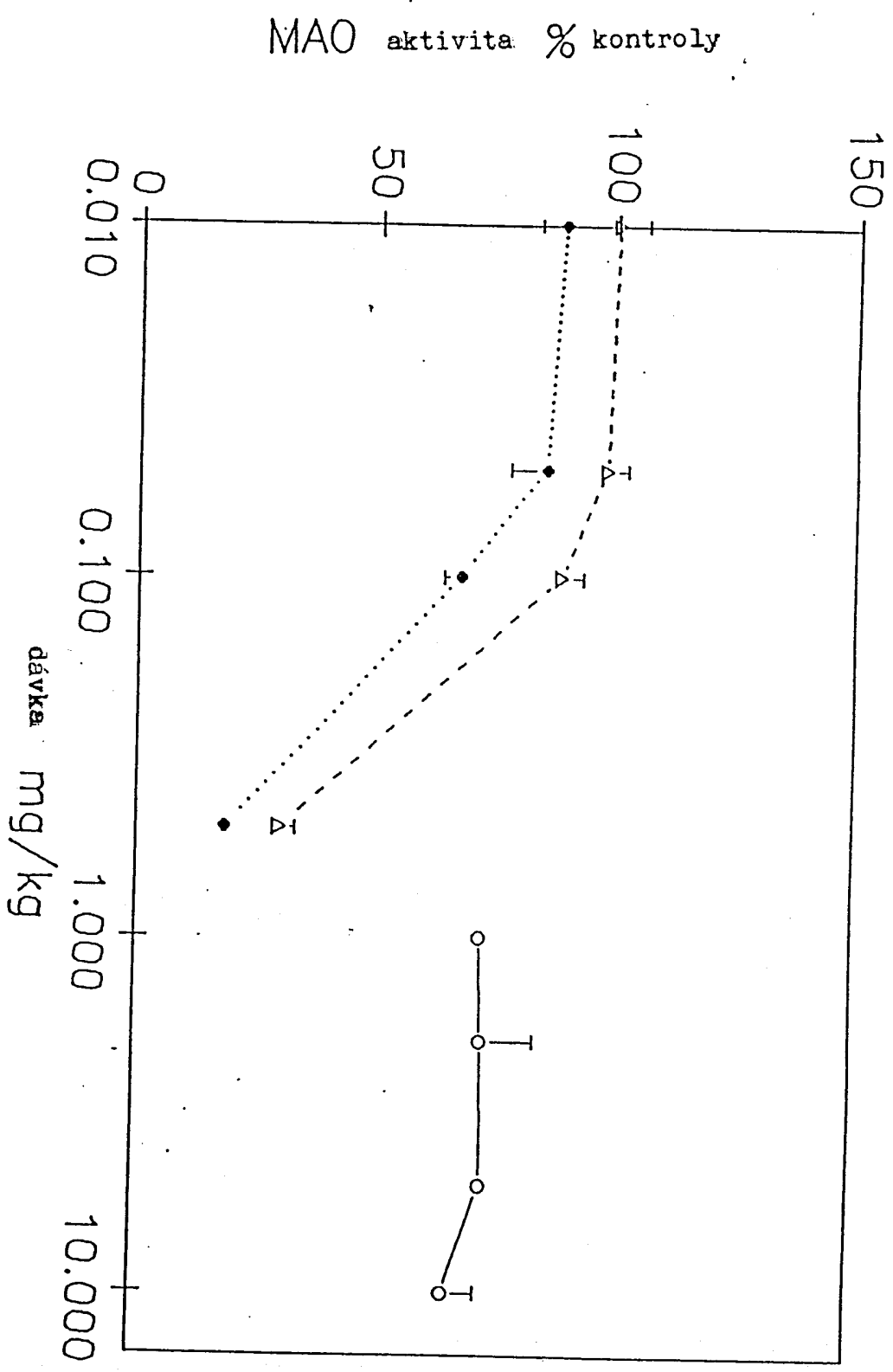


0 0 0 3 3 9
0 3 1 9 1

Genma

Obř. 9

Akutní inhibice IN VIVO MAO-B ; PER OS / mozek



○—○ S(-)PAI ●.....● R(+)-PAI Δ-----Δ RAC

Sam

000339
03.1.91

Obr.

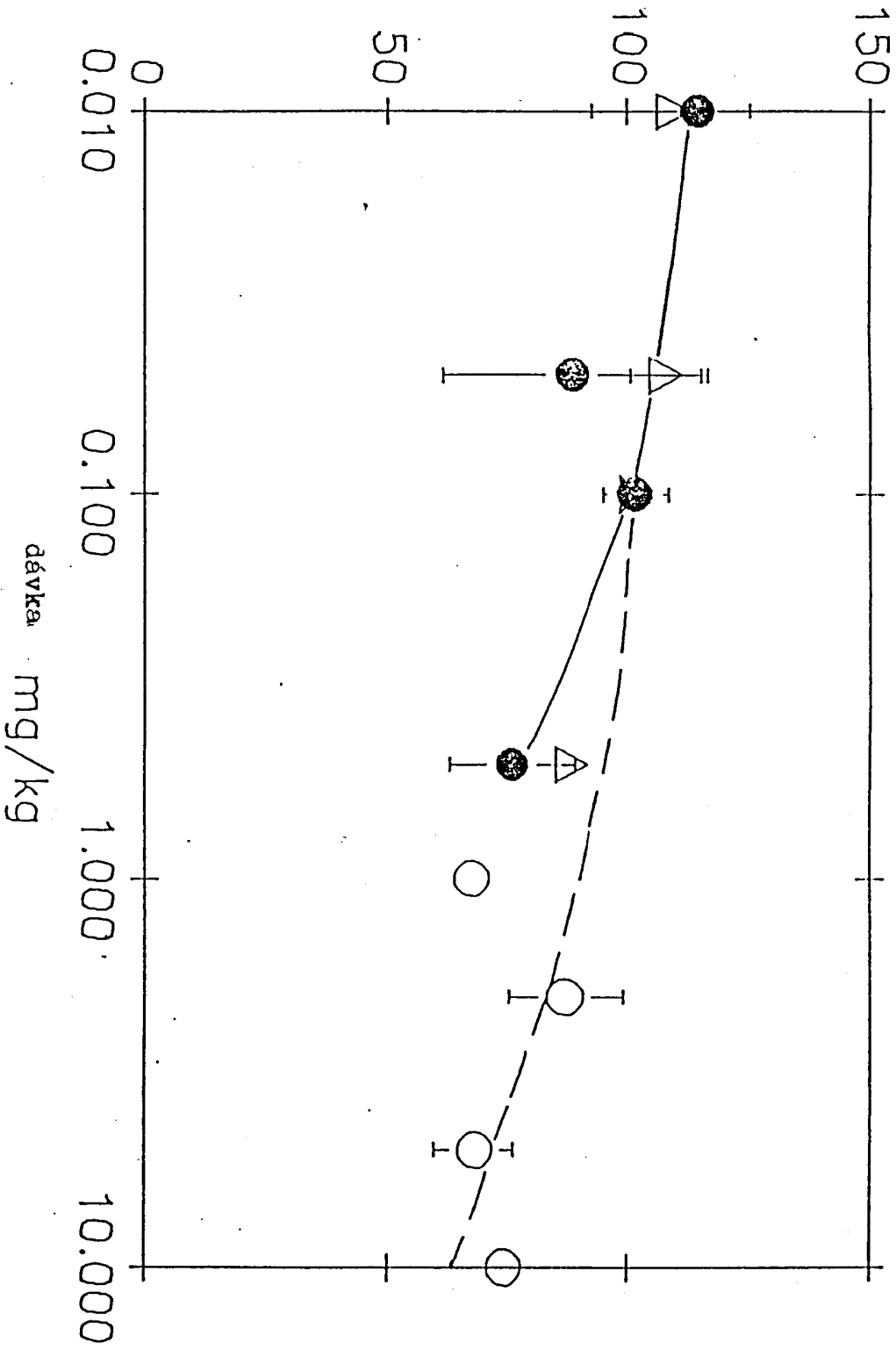
10

Akutní inhibice

MAO-A

; PER OS / játra

MAO aktivita % kontroly



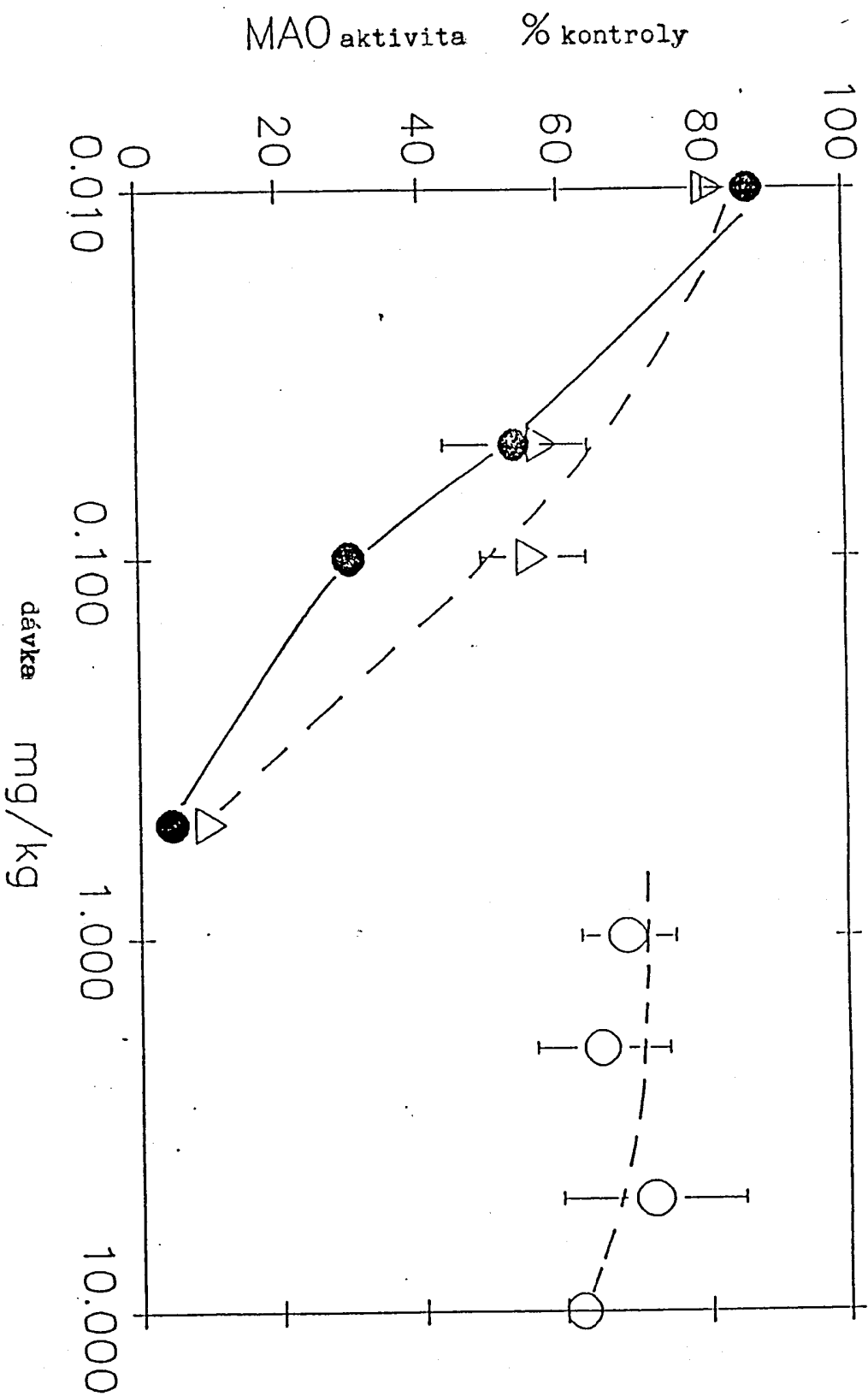
0000339

03.1.97

CEMA

Obr. 11 Akutní inhibice IN VIVO MAO-B

; PER OS / játra



000339

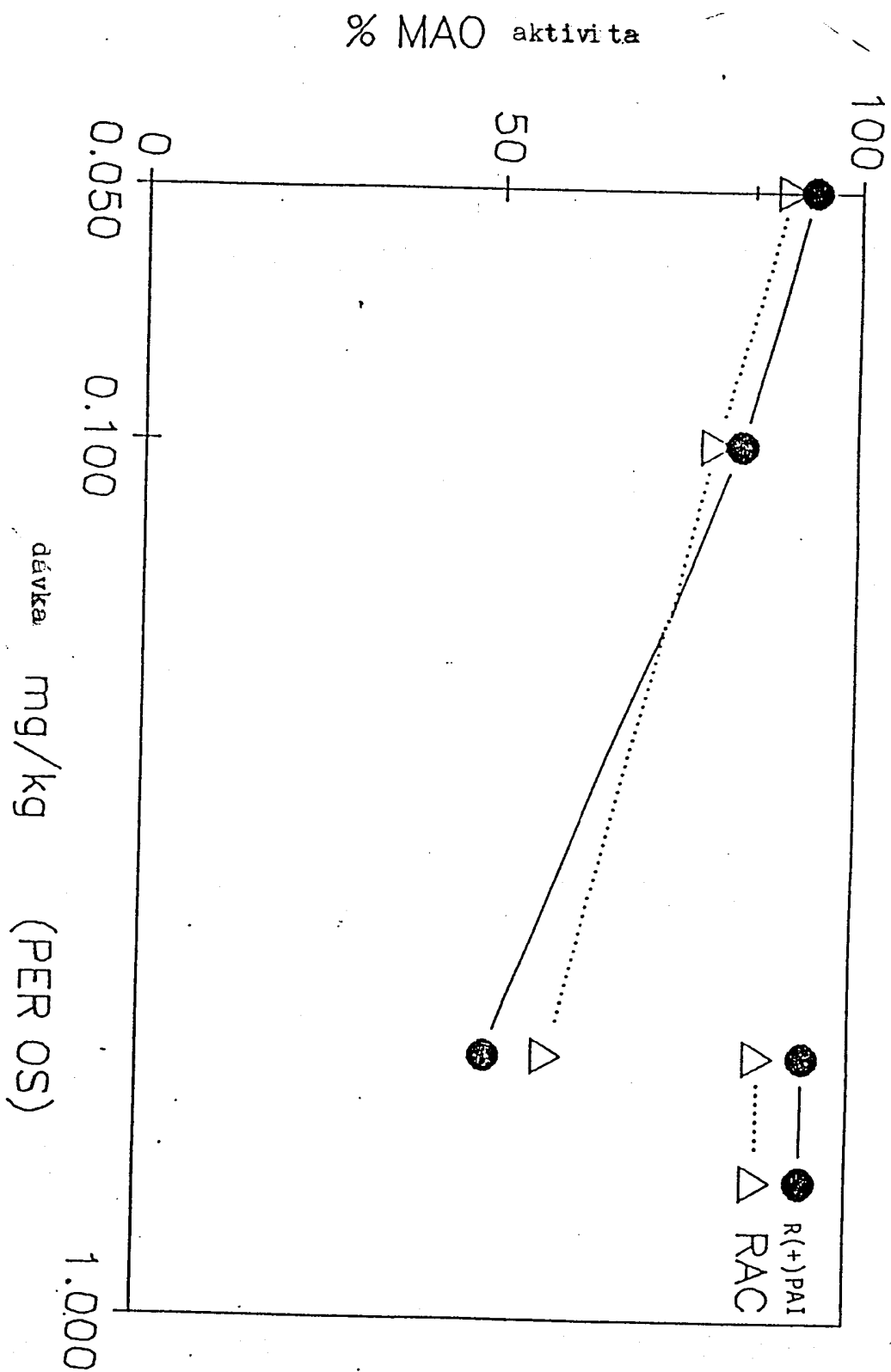
03.1.91

Benin

Obř. 12

Chronická

IN VIVO MAO A inhibice v mozku



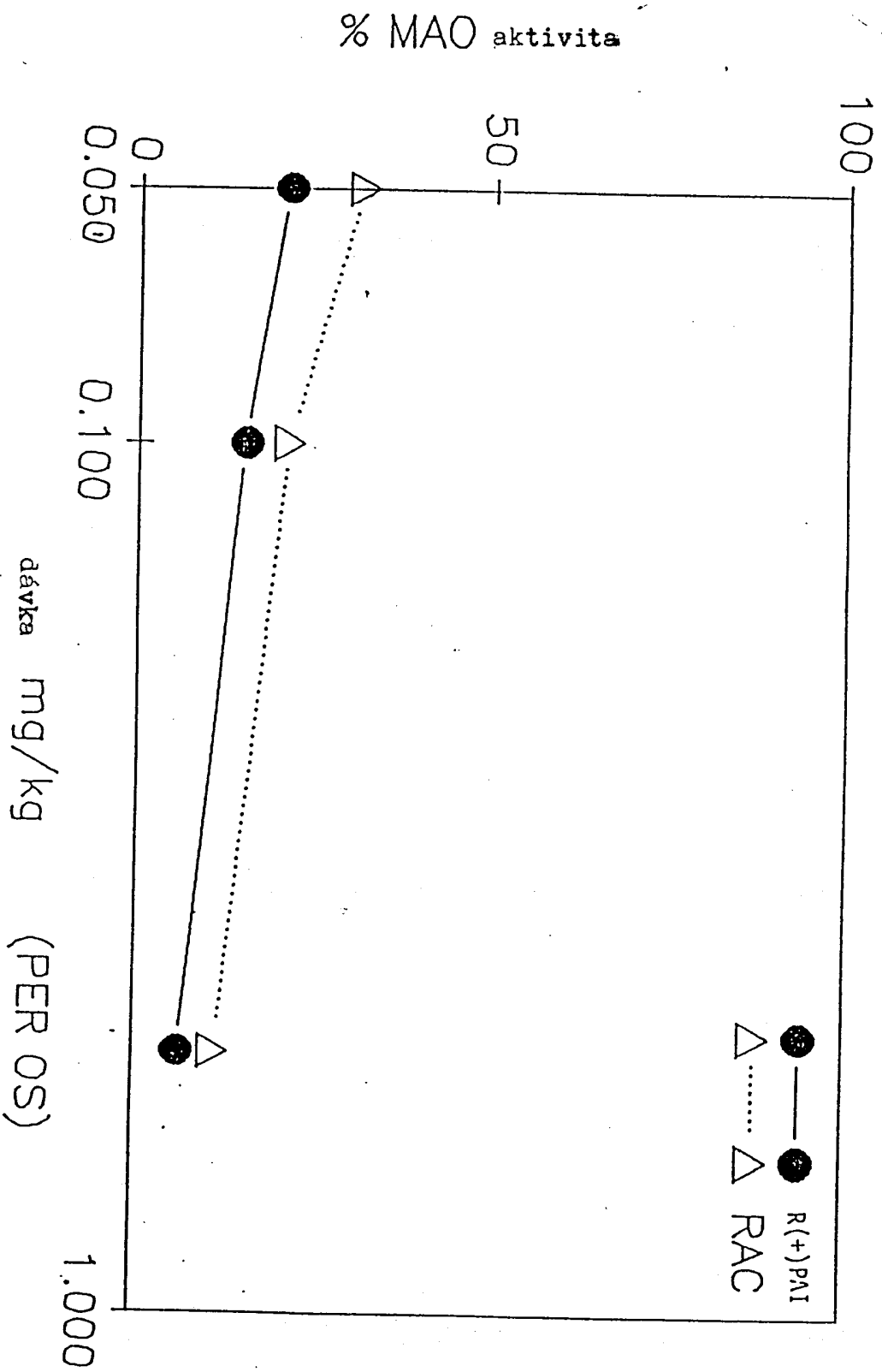
000339

03.1.91

celm.

Obr. - 13

Chronická IN VIVO MAO B inhibice v mozku



000339

03.1.91

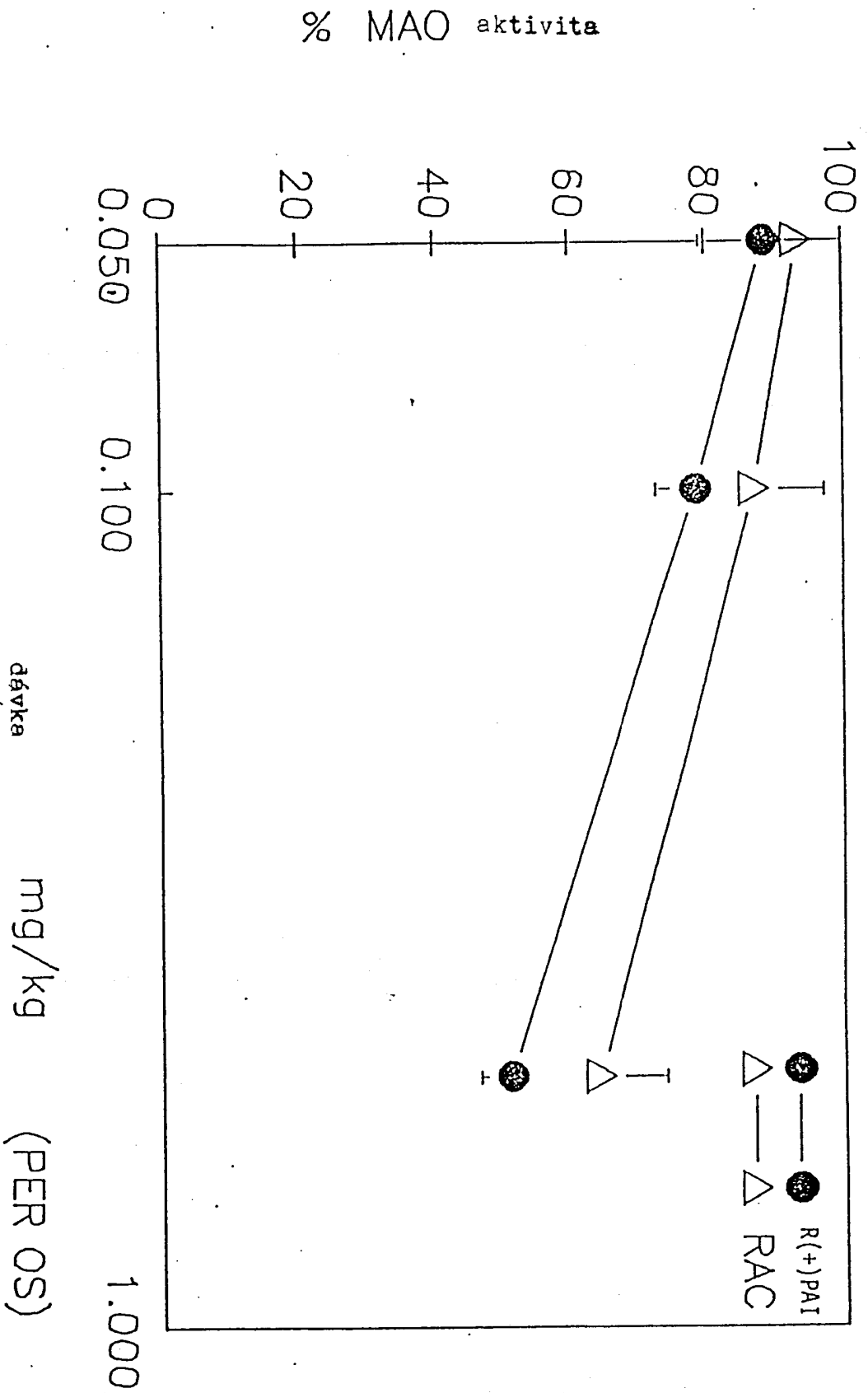
62211

Obr.

14

Chronická

IN VIVO MAO-A inhibice v játrech



000339

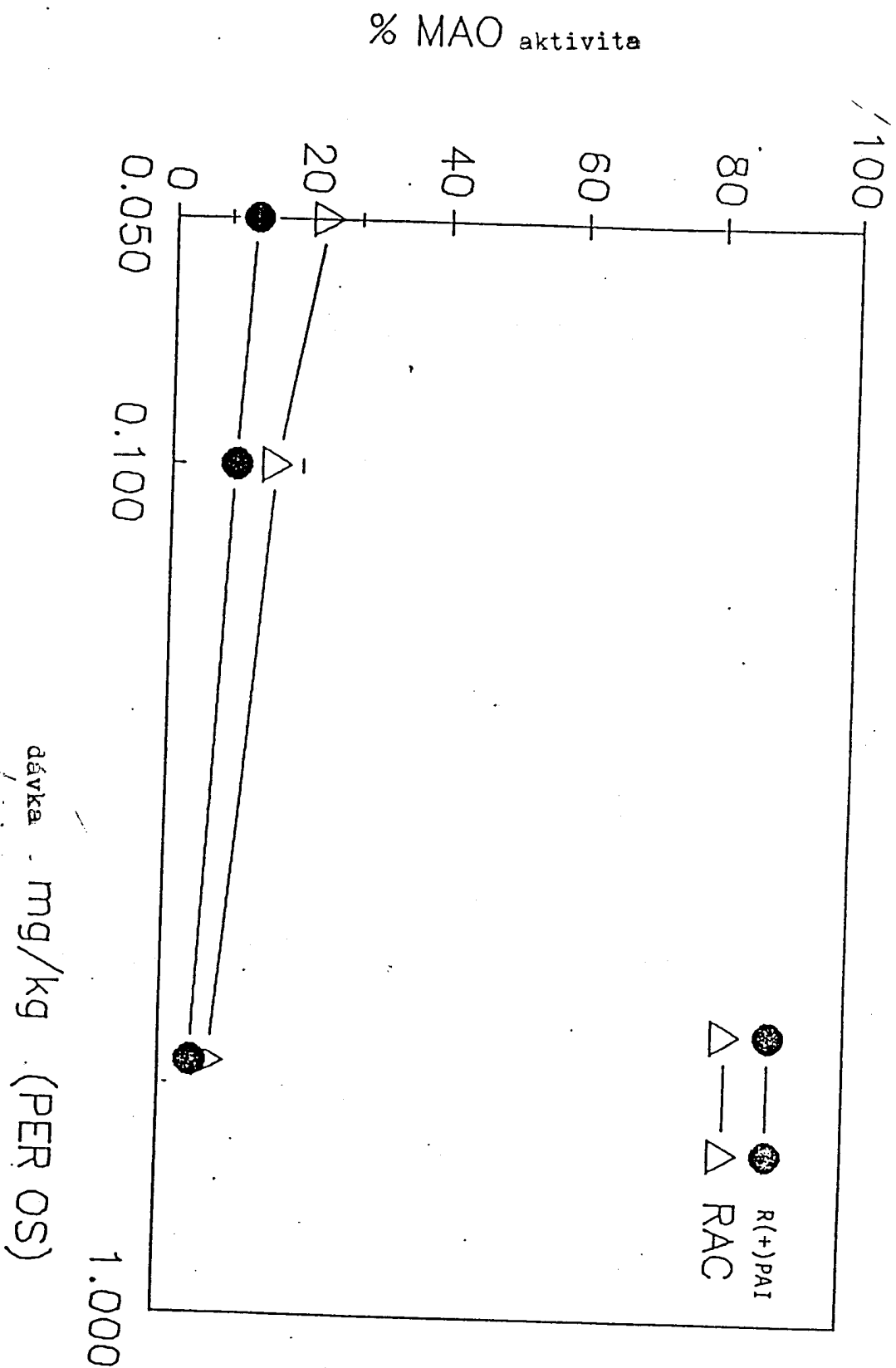
03.1.91

—
GMA

obr. 15

Chronická

IN VIVO MAO B inhibice v játrech



0 0 0 3 3 9

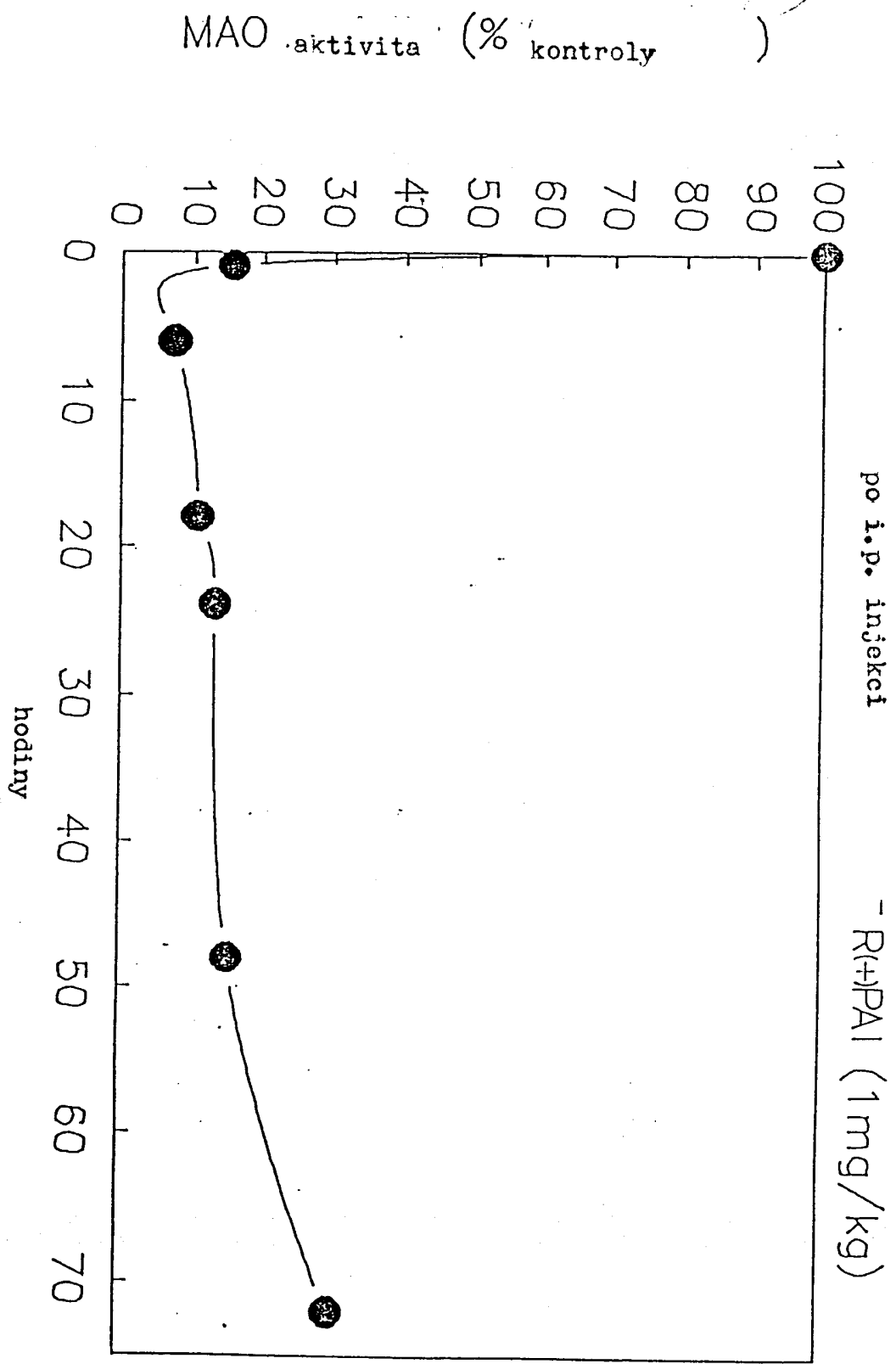
0 3 1 9 1

(see)

Obr. 16 MAO-B aktivita v kryšim mozku v rŕznŕ dobŕ

0 0 0 3 3 9

0 3 1 9 1



600