



Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 6260/86

(51) Int.Cl.5

A 61 K 31/46

(22) Indleveringsdag: 23 dec 1986

(41) Alm. tilgængelig: 28 jun 1987

(45) Patentets meddelelse bkg. den: 11 jul 1994

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 27 dec 1985 DE 3546165

(73) Patenthaver: *MADAUS AG; Ostmerheimer str. 198; 5000 Köln 91, DE

(72) Opfinder: Wolf *Grimminger; DE, Karl Peter *Odenthal; DE

(74) Fuldmægtig: Dansk Patent Kontor A/S

(54) Anvendelse af azoniaspironortropanolestere til fremstilling af et præparat til behandling af astma og bronchospasmer

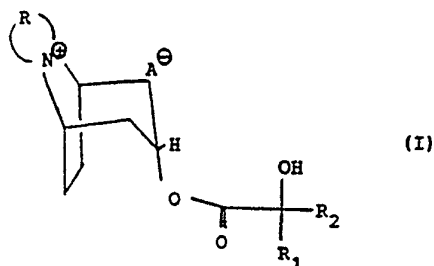
(56) Fremdragne publikationer

Andre publikationer: Helwig, B., Moderne Arzneimittel, s. 722 (1980)

(57) Sammendrag:

6260-86

Azoniaspironortropanolestere med formelen



hvor R er en eventuelt substitueret alkylen-, alkenylen- eller azaalkylengruppe, en oxaalkylengruppe, en epoxyalkylengruppe, en eventuelt substitueret o-phenylen-, peri-naphthylen- eller 2,3-quinoxalinengruppe, R og R₂ uafhængigt af hinanden er et hydrogen- eller halogenatom eller en alkyl-, alkoxy-, alkoyl-, cyclohexyl-, phenyl-, alkylphenyl-, alkoxyphenyl-, halogenphenyl-, thienyl- eller furylgruppe, og A[⊖] er anionen af en mono- til tribasisk mineralsyre, anvendes som astmaterapeutika og broncholytika.

Ved anvendelsen af forbindelserne I opnås en parasympatolytisk virkning uden samtidige, systemiske virkninger.

Opfindelsen angår anvendelsen af azoniaspironortropanolestere til fremstilling af et præparat til behandling af astma og bronchospasmer.

- 5 Der er bl.a. tre væsentlige metoder til behandling af astmatisk betingede og bronchiale lidelser: cortison eller corticosteroider, sympathomimetika og parasympatholytika. Det er kendt, at corticosteroider indebærer alvorlige bivirkninger, f.eks. modtagelighed over for infektioner.
- 10 Sympathomimetika har også alvorlige symptomatiske bivirkninger, som f.eks. takykardi. Parasympatholytika giver i mange tilfælde et godt behandlingsresultat, især ved lokal anvendelse, uden at der optræder bivirkninger, eller bivirkningerne er kun af mindre omfang, men disse terapeutiske resultater er på grund af sygdomsbilledernes forskellige påvirkelighed uensartede og usikre. Angående teknikkens stade se litteraturstederne J.F. Keighley, (1966), Jatrogenic asthma associated with adrenergic aerosols, Ann. intern. Med. 65, 985 og F.E. Speizer et al., (1968), Observations on recent increase in mortality from asthma, Br. med. J. 1, 335.
- 20

Det er tillige kendt, at enkelte azoniaspironortropanderivater har spasmolytiske egenskaber, se f.eks. DE-patentskrift nr. 1.194.422 eller Arzneimittelforschung 17, s. 714-719 (1967). Disse forbindelser er dog hidtil kun anvendt i urogenitalområdet. Fra B. Helwig, Moderne Arzneimittel, s. 722 (1980) er det endvidere kendt at anvende 3 α -benziloyloxy-(nortropan-8-spiro-1'-pyrrolidinium)-chlorid (trospiumchlorid) mod spasmer og kolik i f.eks.

25

30 den glatte muskulatur i mavetarmkanalen og urinvejssystemet.

Det er derfor nødvendigt, at tilvejebringe et nyt astmateapeutikum og broncholytikum, der giver en pålidelig virkning, med parasympatholytisk virkningsprofil uden samtidig systemisk virkning, dvs. uden påvirkning af kredsløbs-

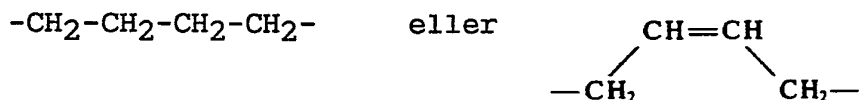
35

reguleringen.

Opfindelsens formål er at forbedre behandlingen af astmalidelser og lidelser i bronchialområdet. Dette opnås ved anvendelsen af azoniaspironortropanolestere med den almene formel



hvor R er en gruppe med formelen



10 og $\text{A}^\ominus$ betyder anionen af en mono- til tribasisk mineral-syre til fremstilling af et præparat til behandling af astma og bronchospasmer.

Anionen $\text{A}^\ominus$ er især en halogenidion, såsom chlorid, bromid eller iodid, fosfat, sulfat eller nitrat.

15 Azoniaspironortropanolestrene kan fremstilles ved, at man

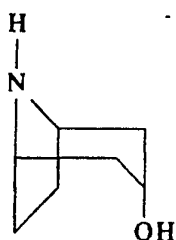
A) demetylerer tropin med formelen



enten ved omsætning med en C_{1-3} -chloralkan, som indeholder mindst én CCl_3 -gruppe, i nærværelse af et oxidationsmiddel

i basisk vandig opløsning, eller ved omsætning med en
chlormyresyreester i et indifferent opløsningsmiddel i
nærværelse af et syrebindende middel til 8-alkoxy-car-
5 bonylnortropin, som hydrolyseres i vandig opløsning med
en base,

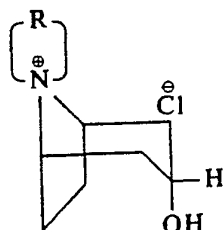
B) omsætter det således fremstillede nortropin med formlen



(III)

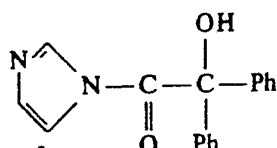
i en til flere dage ved stuetemperatur i et dipolært
10 aprotisk opløsningsmiddel med enten 1,4-dichlorbutan eller
cis-1,4-dichlorbuten-2 i nærværelse af en sekundær eller
tertiær amin, og

C) forestrer den således fremstillede forbindelse med den
almene formel



(IV)

hvor R har den ovenfor anførte betydning, i et vandfrit,
dipolært aprotisk opløsningsmiddel med et imidazolid med
formlen



(V)

20 Fremstillingen af azoniaspironortropanolestrene, der an-
vendes ifølge opfindelsen, er udførligt beskrevet i be-
skrivelsen til DK-patentansøgning nr. 6259/86.

Eksempler på forbindelserne, der anvendes ifølge opfindelsen, er:

1. Trospiumchlorid [(3 α -benziloyloxy-nortropan-8-spiro-1'-pyrrolidinium)-chlorid]

kp. 258-263°C (sønderdeling) feltdesorptionsmassespektroskopi (FD-MS): m/e = 392 (molekylkation)

IR (KBr): ν = 3150, 1735, 1498, 1452, 747 cm⁻¹.

2. Dehydrotrospiumchlorid[(3 α -benziloyloxy-nortropan-8-spiro-1'-3'-pyrrolinium)-chlorid]

kp: 267°C, FD-MS: m/e = 390 (molekylkation)

IR (KBr): ν = 1722, 1595, 1490, 1445, 741 cm⁻¹.

Applikationsmåder, f.eks. inhalation, oral og i.v., applikationsformer, f.eks. aerosol og opløsning.

15 Galeniske eksempler

1. Inhalationsopløsning

Sammensætning

Trospiumchlorid	0,100	g
Citronsyre-1-hydrat	0,470	g
20 tri-Natriumcitrat-2-hydrat	0,530	g
Natriumchlorid	0,645	g
Vand til injektionsformål	100,0	ml

Fremstilling

- 25 Stofferne opløses efter hinanden i vand. Derefter sterilfiltreres blandingen, og den fyldes i en lysbeskyttet beholder. Opløsningens pH-værdi er ca. 4,2.

2. Dosisaerosol

Sammensætning

	Trospiumchlorid	0,030	g
5	Trichlorfluormethan/ dichlordifluormethan	ad 15,0	ml

Fremstilling

Trospiumchloridet, der er formalet til en kornstørrelse under 5 μm suspenderes homogent i den afkølede, flydende
10 drivgas, og blandingen fyldes ved ca. 45 til 50°C i sæd-
vanlige aerosolbeholdere. Ventilen er indrettet således,
at der afgives 0,1 mg trospiumchlorid pr. pust.

Med henblik på bekræftelse af virkningen af de aktive
stoffer anvendt ifølge opfindelsen foretages inhalations-
15 provokationer med en aerosol med cholinerg virkning til
vågne marsvin.

Ved forsøget antagiserede $3 \times 10^{-1} \text{ mol kg}^{-1}$ aktivt stof
i 15 minutter efter intraperitoneal applikation astmatoid
åndedrætsbevær fremkaldt med acetyl- β -methylcholinchlorid-
20 aerosol. Den terapeutiske effekt af de aktive stoffer an-
vendt ifølge opfindelsen er klart kraftigere end de ækvi-
molære doser af referencestoffer, såsom atropin og iso-
prenalin.

Metode25 Dyremateriale

dyreart:	marsvin
dyrestamme:	Pirbright white
leverandør:	Lippische Versuchstier- zucht Hagemann GmbH & Co., 4923 Extertal 1
30 køn:	hanner

kropsvægt: ca. 500-700 g
 tilvænningsstid: > 8 dage

Dyrehold

5 stalde: massiv bygning, konventionelt dyrehold

rumtemperatur: $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$

luftfugtighed: 50-60% relativ fugtighed

rumbelysning: kunstig 12 timers rytme

10 bure: makrolonunderdel og afdekning med trådgitter med foder- og vandbeholder

strøelse: bedding

"ssniff"[®] fra ssniff-

15 Versuchstierdiäten GmbH, 4770 Soest

foder: "Altromin"[®]-MS-Altrogge Spezialfutterwerk, Lage/Lippe "ssniff"[®]-MS-

20 diæt og hø

drikkevand: ledningsvand ad libitum

Forbindelser, dosering applikationsmetode

Forsøgsforbindelse:

25 kendetegn: trospiumchlorid MP 194 (molekylvægt = 428)

charge: 9045

dosis: $3 \times 10^{-7} \text{ mol ml}^{-1} \text{ kg}^{-1}$

applikationsmetode: intraperitonealt

kendetegn: dehydrotrospiumchlorid

30 WG 71 (molekylvægt = 426)

charge: 840720

dosis: $3 \times 10^{-7} \text{ mol ml}^{-1} \text{ kg}^{-1}$

applikationsmetode: intraperitonealt

Referencestof	
kendetegn:	atropin-HCl (Serva, molekylvægt = 325,8)
5 dosis:	$3 \times 10^{-7} \text{ mol}^{-1} \text{ kg}^{-1}$
applikationsmetode:	intraperitonealt
kendetegn:	isoprenalin (Fluka, molekylvægt = 247,72)
dosis:	$3 \times 10^{-7} \text{ mol ml}^{-1} \text{ kg}^{-1}$
10 applikationsmetode:	intraperitonealt
Kontrolstof	
kendetegn:	fysiologisk natrium-chloridopløsning
dosis:	1 ml kg^{-1}
15 applikationsmetode:	intraperitonealt
Andre stoffer	
kendetegn:	acetyl- β -methylcholin-chlorid (Sigma, molekylvægt = 195,7)
20 koncentrationer:	0,0316 g x 100 ml ⁻¹ redist. vand
	0,0562 g x 100 ml ⁻¹ - -
	0,1 g x 100 ml ⁻¹ - -
	0,178 g x 100 ml ⁻¹ - -
	0,316 g x 100 ml ⁻¹ - -
25	0,562 g x 100 ml ⁻¹ - -
applikationsmåde:	0,5 ml min. ⁻¹ pr. inhalation
<u>Gruppering</u>	
fordeling i grupperne:	tilfældig
antal dyr pr. gruppe:	10
30 gruppeinddeling:	om muligt bruges på en dag forsøgs- og kontrolgruppens dyr i forsøget.

Forsøgets gennemførelse

De marsvin, der er udset til et forsøg, udsættes efter en tilvæningsperiode på mindst 8 dage to gange for en aerosol indeholdende 0,1% acetyl- β -methylcholinchloridopløsning, da dyrene erfaringsmæssigt ved de første to inhalationsprovokationer reagerer med tydelige vejrtrækningsforstyrrelser i forhold til de efterfølgende (adaptation). Såfremt der ved de to inhalationsfaser påvises en manglende følsomhed (åndedrætsforstyrrelsesfejl) over for expositionen, udelukkes disse dyr fra det egentlige forsøg.

Med henblik på aerosolprovokation anbringes marsvinene enkeltvis i et inhalationskammer (s. 3.6.), i hvilket 0,5 ml opløsning pr. minut forstøves som dråbeaerosol ved hjælp af en specialdyse (fabrikat Rhema, Hofheim). Afhængigt af koncentrationen af det aktive stof samt af en eventuelt gennemført forbehandling fører aerosolexpositionen til en mere eller mindre fremtrædende dyspnø, til hosteanfald og til slut til asfyksi og bevidstløshed i tilslutning til tonisk-kloniske kramper af varierende styrke. Med et stopur, fabrikat Hanhart, registreres tiden fra inhalationens begyndelse til den asfyksiske tilstand begynder. Dyrene fjernes omgående fra inhalationskammeret, og de kommer sig i reglen i løbet af kort tid, dvs. at de igen kommer til bevidsthed, og at åndedrættet normaliseres. Såfremt der i løbet af 180 sekunder ikke indtræder dyspnø, stoppes inhalationen.

Med henblik på afprøvning af forsøgsforbindelsernes eller referencestoffernes beskyttende virkning, forbehandles dyrene i forsøget med disse stoffer 15 minutter før inhalationen påbegyndes i overensstemmelse med deres kropsvægt. Kontrol dyr behandles med isotonisk natriumchloridopløsning. Dyrene udsættes for acetyl- β -methylcholin-chlorid-aerosolkoncentrationer, der er logaritmisk

trindelte. Hver forsøgsdag afprøves en aerosolkoncentration; afstanden mellem de enkelte aerosolprovokationer er mindst 1 uge.

5 Analyser og apparatur

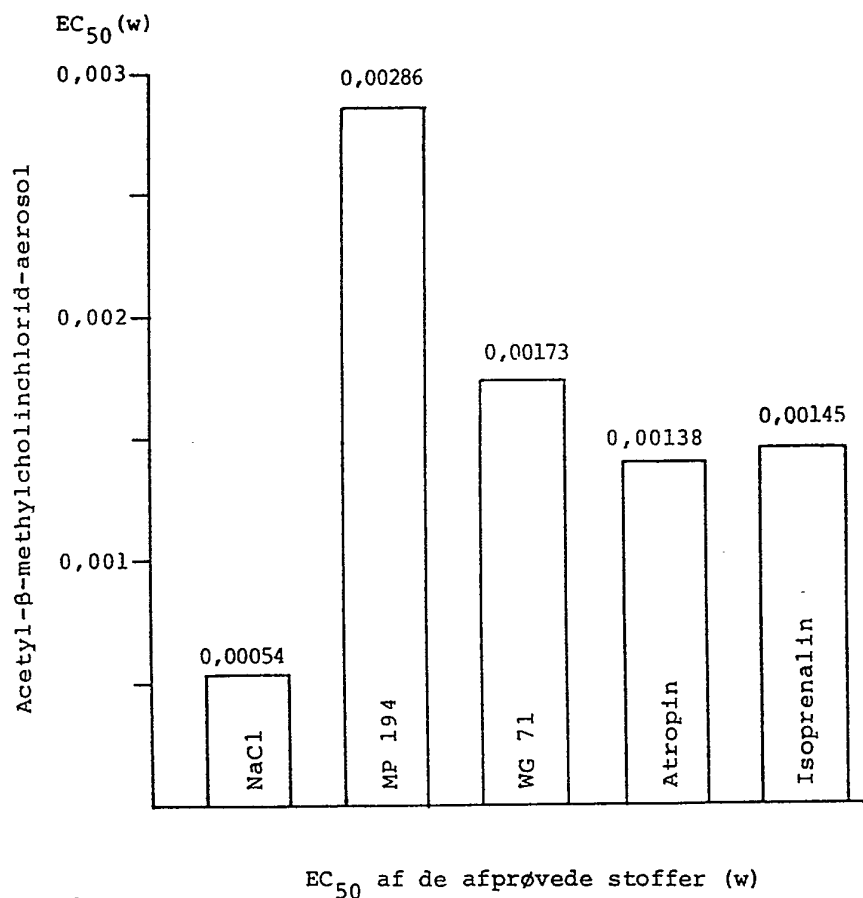
Inhalationskammeret er en plexiglasbeholder, der specielt udformet til dette formål, og hvis låg ved hjælp af en gummipakning og lukkemekanisme kan lukkes lufttæt. Kammerets indvendige mål er 285 x 190 x 180 mm, hvilket
10 svarer til et rumfang på ca. 9,75 l. Specialdysen (best. nr. 504104, Rhema, Hofheim) er sat fast i et hulrum i låget og sikrer en ensartet fordeling i kammerets rumfang med aerosolen. Provokationsopløsningen tilføres dysen med en infusionspumpe (Braun, Melsungen) (0,5 ml/min) og brin-
15 ges til tågedannelse med et overtryk på 180 ka med en tilsluttet trykgasflaske (syntetisk luft, KW-fri). Aerosolprovokationen gennemføres af sikkerhedsgrunde under udsugning.

Bedømmelse

- 20 For hver af de afprøvede stoffer (forsøgsforbindelse, referencestof og kontrolstof) registreres ved de respektive undersøgte koncentrationer af aktivt stof den procentvis andel af dyrene, der har reageret med dyspnø, med henblik på beregning af EC₅₀.
- 25 EC₅₀-Værdien samt det tilhørende konfidensinterval (p > 95%) bestemmes af probitregressionslinien af procentværdierne, se ovenfor, der er forsynet med vægtkoefficienter, efter tilpasning til en ret linie ved Maximum-Likelihood-metoden (10 iterationer). Endvidere afprøves
30 tilpasningen til en ret linie til de observerede data ved hjælp af chikvadrattest. Ved beregningen anvendtes et handelsgængs regneprogram (Olivetti).

Resultater

Forsøgsforbindelserne, trospiumchlorid og dehydro-
trospiumchlorid, har efter intraperitoneal applikation en
5 udpræget broncholytisk effekt ved de cholinerg inducerede
bronchialkramper hos vågne marsvin. Den gennemsnitlige
effektive koncentration (EC_{50}) af acetyl- β -methylcholin-
chlorid i opløsningen, der bringes på aerosolform, er ved
kontroldyrene $w = 0,00054$ (se tabel 1). Efter forbehand-
10 ling med trospiumchlorid (MP 194) eller dehydrotrospium-
chlorid (WG 71) er den tilsvarende EC_{50} henholdsvis $w =$
 $0,00286$ og $w = 0,00173$ (se tabel 2 og 3). For atropin og
isoprenalin opnås gennemsnitlige effektive koncentrationer
af provokationsstofferne på henholdsvis $w = 0,00138$ og $w =$
15 $0,00145$ (se tabel 4 og 5). De opnåede EC_{50} -værdier fremgår
af nedenstående diagram.



Tabel 1 Kontrolstof: NaCl ($w = 0,009$)

Applikationsmetode: intraperitonealt

Dosis: 1 ml kg^{-1} Aktivt stof: Acetyl- β -methylencholinchlorid

Applikationsmetode: inhalation (aerosol)

Koncentration: se nedenfor

Forsøgsdato	Koncentration af aktivt stof	Antal dyr testet reageret	Probitanalyse lagttaget	Reaktion % beregnet
19.04.85	0,000316	10	20,00	22,79
27.03.85	0,000562	10	50,00	52,35
26.04.85	0,000750	10	70,00	67,81
03.04.85	0,001000	10	90,00	80,64
03.05.85	0,001780	10	90,00	95,26

11

Linearitetstest: $\chi^2 = 1,2629$ ($FG = 3$)Der kan antages at være linearitet ($\alpha \geq 0,05$)Resultatet af probitanalysenGennemsnitlig effektiv koncentration af det aktive stof EC_{50} : $w = 0,00539$ Konfidensinterval ($p = 0,95$): 0,000339-0,000855

Tabel 2: Forsøgsforbindelse: Erosplumchlorid
 Applikationsmetode: intraperitonealt
 Dosis: 3×10^{-7} mol ml⁻¹ kg⁻¹
 Aktivt stof: acetyl- β -methylcholinchlorid
 Applikationsmetode: inhalation (aerosol)
 Koncentration: se nedenfor

Forsøgsdato	Koncentration af aktivt stof	Antal dyr testet	dyr reageret	Probitanalyse iagttaget	Reaktion % beregnet
27.03.85	0,000562	10	0	2,50*	5,46
03.04.85	0,001000	10	1	10,00	15,03
03.05.85	0,001780	10	5	50,00	32,00
19.04.85	0,003160	10	5	50,00	53,87
26.04.85	0,005620	10	7	70,00	74,66

Linearitetstest: $X^2 = 2,0313$ (FG = 3)

Der kan antages at være linearitet ($\alpha \geq 0,05$)

Resultat af probitanalysen

Gennemsnitlig effektiv koncentration af det aktive stof EC₅₀: w = 0,00286

Konfidensinterval (p = 0,95): 0,00147-0,00557

Tabel 3: Forsøgsforbindelse: dehydrotrospiumchlorid
 Applikationsmetode: intraperitonealt
 Dosis: 3×10^{-7} mol ml⁻¹ kg⁻¹
 Aktivt stof: acetyl- β -methylcholinchlorid
 Applikationsmetode: inhalation (aerosol)
 Koncentration: se nedenfor

Forsøgsdato	Koncentration af aktivt stof	Antal dyr testet reageret	Probitanalyse lagttaget	Reaktion % beregnet
10.05.85	0,001000	10	3	30,00
03.05.85	0,001780	9	6	66,67
19.04.85	0,003160	10	6	60,00
26.04.85	0,005620	10	7	70,00

13

Linearitetstest: $\chi^2 = 1,3234$ (FG = 2)

Der kan antages at være linearitet ($\alpha \geq 0,05$)

Resultatet af probitanalysen

Gennemsnitlig effektiv koncentration af det aktive stof EC₅₀: w = 0,00173

Konfidensinterval (p = 0,95): 0,00031-0,00972

Tabel 4: Referencestof: atropinchlorid
 Applikationsmetode: intraperitonealt
 Dosis: 3×10^{-7} mol ml⁻¹ kg⁻¹
 Aktivt stof: acetyl- β -methylcholinchlorid
 Applikationsmetode: inhalation (aerosol)
 Koncentration: se nedenfor

Forsøgsdato	Koncentration af aktivt stof	Antal dyr testet reageret	Probitanalyse lagttaget	Reaktion & beregnet
27.03.85	0,000562	10	3	30,00
03.04.85	0,001000	10	6	60,00
03.04.85	0,001780	9	5	55,56
19.04.85	0,003160	10	5	50,00
26.04.85	0,005620	10	7	70,00

Lineraitetstest: $\chi^2 = 1,6245$ (FG = 3)

Der kan antages at være linearitet ($\alpha \geq 0,05$)

Resultatet af probitanalysen

Gennemsnitlig effektiv koncentration af det aktive stof EC₅₀: w = 0,00138

Konfidensinterval (p = 0,95): 0,000022-0,00888

Tabel 5: Referencestof: isoprenalin

Applikationsmetode: intraperitonealt

Dosis: 3×10^{-7} mol ml⁻¹ kg⁻¹Aktivt stof: acetyl- β -methylcholinchlorid

Applikationsmetode: inhalation (aerosol)

Koncentration: se nedenfor

Forsøgsdato	Koncentration af aktivt stof	Antal dyr testet reageret	Probitanalyse iagttaget	Reaktion % beregnet
10.05.85	0,001000	9	3	33,33
03.05.85	0,001780	8	5	62,50
19.04.85	0,003160	9	7	77,78
26.04.85	0,005620	9	8	88,89
				36,21
				57,88
				77,28
				90,30

Linearitetstest: $\chi^2 = 0,1240$ (FG 2)Der kan antages at være linearitet ($\alpha \geq 0,05$)Resultat af probitanalysenGennemsnitlig effektiv koncentration af det aktive stof EC₅₀: $w = 0,00145$ Konfidensinterval ($p = 0,95$): 0,00050-0,00426

Bedømmelse

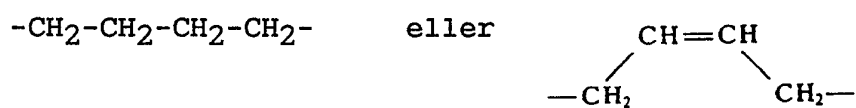
Forsøgsforbindelserne, trospium- og dehydrotrospiumchlorid er 15 minutter efter intraperitoneal applikation af sammenlignelig styrke eller overlegen (se fig. 1) over for det klassiske parasympathilytikum atropin og β -sympatbikomimetikumet isoprenalin hvad angår deres broncholytiske virkning. Ved beregningen af de respektive gennemsnitlige effektive koncentrationer af acetyl- β -methylcholinchlorid, som er nødvendig til udløsning af dyspnø, fremgår det, at forsøgsforbindelserne har en udpræget effekt, især trospiumchlorid, i sammenligning med referencestofferne.

P A T E N T K R A V

1. Anvendelse af azoniaspironortropanolestere med den almene formel



hvor R er en gruppe med formen



og A^Θ betyder anionen af en mono- til tribasisk mineral-
syre, til fremstilling af et præparat til behandling af
10 astma og bronchospasmer.