(19) DANMARK

Patentdirektoratet
TAASTRUP

(12) **FREMLÆGGELSESSKRIFT** (11) **164661 B**

(21) Patentansøgning nr.: **2180/83** (51) Int.Cl.5 **C 07 C 229/30**

(22) Indleveringsdag: **16 maj 1983**

(41) Alm. tilgængelig: **18 nov 1983**

(44) Fremlagt: **27 jul 1992**

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: **17 maj 1982 GB 8214290**

(71) Ansøger: ***MERRELL TORAUDE ET COMPAGNIE; 16 Rue d'Ankara; 67084 Strasbourg, FR**

(72) Opfinder: **Patrick Jacques *Casara; FR**

(74) Fuldmægtig: **Budde, Schou & Co. A/S**

(54) Analogifremgangsmåde til fremstilling af aminoalkadien-derivater

(56) Fremdragne publikationer

US pat. nr. 3960927, 3959356

(57) Sammendrag:

2180-83

(R,S)- og (S)-4-amino-hepta-5,6-diensyre, der fremstilles på i og for sig kendt måde, er virksomme som inhibitorer for gamma-aminosmørsyre-transaminase (GABA-T) og er derfor anvendelige til behandling af sygdomme, der er knyttet til lave gamma-aminosmørsyre-niveauer i centralnervesystemet.

DK 164661 B

Den foreliggende opfindelse angår en analogifremgangsmåde til fremstilling af hidtil ukendte, farmaceutisk anvendelige aminoalkadien-derivater (R,S)-4-amino-hepta-5,6-diensyre, (S)-4-amino-hepta-5,6-diensyre eller farmaceutisk acceptable salte deraf, der er in vivo-inhibitorer for gamma-aminosmørsyre-transaminase (GABA-T).

Bio-omdannelsen af gamma-aminosmørsyre (GABA) til ravsyre-semialdehyd, som katalyseres af enzymet GABA-transaminase (GABA-T), er den primære reaktion, som er ansvarlig for katabolismen af GABA, en inhibitorisk neurotransmitter i centralnervesystemet. Det er kendt, at lave niveauer af endogent GABA er knyttet til anfalds-forstyrrelser (såsom de, der er involveret i epilepsi, alkoholabstinens eller barbituratabstinens), forstyrrelser, der involverer ufrivillige bevægelser (såsom de, der forårsages af ekstrapyramidale virkninger af lægemidler, f.eks. tardiv dyskinesi), visse psykiatriske forstyrrelser (såsom skizofreni og depression) og muskel-spasticitet. Blokering af omdannelsen af GABA til ravsyresemialdehyd, f.eks. ved irreversibel inhibering af GABA-T, kan forhøje GABA-niveauerne i centralnervesystemet (CNS) og udgør således en metode til behandling af forstyrrelser i centralnervesystemet, der er knyttet til lave GABA-niveauer.

Visse forbindelser er kendte for at være irreversible inhibitorer for GABA-T og derved forhøje hjerne-niveauerne af GABA. Eksempler er 4-aminohex-5-ensyre ("Vinyl-GABA") og 4-aminohex-5-ynsyre ("acetylenisk GABA"), jf. US-patentskrift nr. 3.960.927 og nr. 3.959.356; Lippert et al., Eur. J. Biochem., 74, 441 (1977); Lippert et al., Brain Research Bulletin, 5, Suppl. 2, 375 (1980); Jung et al., Journal of Neurochemistry, 28 717 (1977); Palfreyman et al., GABA-Neurotransmitter, Alfred Benzon Symposium 12; Larsen et al., Editors, Munksgaard, Copenhagen, 1979, side 432-446; Jung et al., Biochemical and Biophysical Research Communications, 67, 301 (1975); og Palfreyman et al., Biochemical Pharmacology, 30, 817 (1981). Et yderligere eksempel er 1-acetylen-1,4-butandiamin ("acetylenisk putrescin"), jf. US-patentskrift nr. 4.139.563.

Det har nu overraskende vist sig, at (S)-4-aminohepta-5,6-diensyre og (R,S)-4-aminohepta-5,6-diensyre, som adskiller sig fra det ovennævnte kendte "vinyl-GABA" og "acetylenisk GABA" ved at indeholde en allenylgruppe i stedet for en vinyl - hhv. ethynylgruppe, er betydelig mere virksomme inhibitorer end de nævnte kendte forbindelser.

Opfindelsen angår således en analogifremgangsmåde til fremstilling af (S)-4-aminohepta-5,6-diensyre, (R,S)-4--amino-hepta-5,6-diensyre eller farmaceutisk acceptable salte deraf, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved det i krav 1's kendetegnende del angivne.

Navnene "(S)-allenyl-GABA" og "(R,S)-allenyl-GABA", der anvendes i den foreliggende beskrivelse, refererer til hhv. (S)-4-amino-hepta-5,6-diensyre og (R'S)-4-amino-hepta--5,6-diensyre.

Illustrerende eksempler på farmaceutisk acceptable salte af de her omhandlede forbindelser omfatter ugiftige syreadditionssalte dannet med uorganiske syrer, såsom saltsyre, hydrogenbromidsyre, svovlsyre og phosphorsyre, eller med organiske syrer, såsom organiske carboxylsyrer, f.eks. salicylsyre, maleinsyre, malonsyre, vinsyre, citronsyre og ascorbinsyre, og organiske sulfonsyrer, f.eks. methansulfonsyre, og ugiftige salte dannet med uorganiske eller organiske baser, såsom hydroxider af alkalimetaller, f.eks. natrium, kalium og lithium, jordalkalimetaller, f.eks. calcium og magnesium, letmetaller fra gruppe III A, f.eks. aluminium, organiske aminer, såsom primære, sekundære eller tertiære aminer, f.eks. cyclohexylamin, ethylamin, methylamino-ethanolamin og piperidin. Saltene fremstilles på gængs måde.

(S)-Allenyl-GABA og (R'S)-allenyl-GABA fremkalder in vivo en irreversibel inhibering af GABA-T kan forhøje GABA--niveauerne væsentligt i CNS ved oral eller parenteral indgivelse til varmblodede dyr. Derfor er (S)-allenyl-GABA og (R,S)-allenyl-GABA anvendelige til behandling af forstyrrelser hos varmblodede dyr, der er forbundet med lave niveauer af GABA i CNS. Især er forbindelserne anvendelige som anti-konvulsive midler til behandling af anfald involveret i

epilepsi. Den anti-konvulsive virkning kan påvises ved standard-forsøgsmetoder hos laboratoriedyr med eksperimentelt fremkaldte anfald. For eksempel kan (S)-allenyl-GABA og (R,S)-allenyl-GABA beskytte mus mod kloniske anfald fremkaldt af bicucullin, når de behandles ved proceduren ifølge W. Buckett (Br. J. Pharm., 68, 177 (1980) og Journal of Pharmacological Methods, 5, 35 (1981)). Forbindelserne kan også beskytte mus og rotter mod anfald fremkaldt af metrazol (kloniske og toniske), maksimalt elektrochok (toniske) og/eller 3-mercaptopropionsyre (kloniske og toniske).

Ud over de anti-konvulsive anvendelser er (S)-allenyl-GABA og (R,S)-allenyl-GABA anvendelige til behandling af CNS-forstyrrelser, der involverer ufrivillige bevægelser, især tardiv dyskinesi, til behandling af psykiatriske forstyrrelser, f.eks. skizofreni eller depression, og/eller til behandling af muskelspasticitet. Desuden kan forbindelserne fremkalde hypotermi, muskelrelaksation, anoreksi, sedation og/eller analgesi, når de indgives systemisk.

Doseringen af (S)-allenyl-GABA og (R,S)-allenyl--GABA hos varmblodede dyr vil afhænge af arten, der behandles, den særlige forbindelse, der anvendes, sværhedsgraden af tilstanden, der behandles, og indgivelsesmåden. I almindelighed kan en effektiv dosering, der er i stand til at give en fysiologisk nyttig forhøjelse af GABA-niveauerne i CNS, opnås hos varmblodede dyr ved en dosis på fra ca. 1 til ca. 500 mg/kg (legemsvægt) pr. dag indgivet oralt eller parenteralt. Til større dyr (ca. 70 kg) kan der anvendes en dosering på ca. 5 til ca. 100 mg/kg pr. dag. Behandlingen bør påbegyndes med lavere doser, idet doseringen derefter forhøjes i meget små trin, indtil den ønskede virkning opnås.

Den GABA-T-inhiberende virkning af forbindelserne kan påvises hos laboratoriedyr in vivo ved metoderne ifølge M. Jung et al., J. Neurochem., 28, 717 (1977). Hos mennesker kan GABA-T-inhibering måles efter systemisk lægemiddelindgivelse ved bestemmelse af forhøjede GABA-, homocarnosin- og beta-alanin-niveauer i cerebrospinalvæsken (CSF),

da der er en kendt korrelation mellem GABA-, homocarnosin- og beta-alanin-niveauerne i hjernen og i CSF.

Biologisk afprøvning af (R)-allenyl-GABA, enantiomeren af (S)-allenyl-GABA, har vist, at (R)-allenyl-GABA ikke er en irreversibel inhibitor for GABA-T. Det vil forstås, at til inhibering af GABA-T og til forhøjelse af hjerne-GABA-niveauerne som ovenfor beskrevet, kan (S)-allenyl--GABA enten anvendes i det væsentlige frit for (R)-allenyl--GABA eller i fysisk blanding med (R)-allenyl-GABA, såsom racematet, dvs. (R,S)-allenyl-GABA.

Det antages, at (S)-allenisk GABA og (R,S)-allenisk GABA er "substrat-inducerede irreversible inhibitorer" for GABA-T. Sådanne inhibitorer er også kendt som "enzym-aktiverede irreversible inhibitorer", "selvmords-enzym-inhibitorer", "K_{cat}-inhibitorer" eller "mekanisme-baserede inhibitorer". For at en forbindelse skal være en substrat-induceret irreversibel enzyminhibitor, skal forbindelsen være et substrat for det pågældende enzym, og forbindelsen skal indeholde en latent reaktionsdygtig gruppe, der kan frigøres som resultat af den normale katalytiske virkning af enzymet. Frigørelsen af den latent reaktionsdygtige gruppe ved indvirkning af enzymet skaber en reaktionsdygtig funktion, der alkylerer en nukleofil rest, som er til stede ved enzymets aktive sæde. Der dannes således en covalent binding mellem inhibitoren og enzymet ved det aktive sæde, hvilket medfører irreversibel inaktivering af enzymet. Sådanne inhibitorer er yderst specifikke, da inhibitoren skal være et substrat for det pågældende enzym, og da der kræves bio-omdannelse af inhibitoren ved hjælp af enzymet, før enzymet inaktiveres. Selv om det antages, at (S)-allenyl-GABA og (R,S)-allenyl-GABA i almindelighed udøver deres virkning ved hjælp af en substrat-indiceret mekanisme, kan der forekomme inhibering ved andre mekanismer, såsom ved kompetitiv inhibering.

(S)-Allenyl-GABA og (R,S)-allenyl-GABA kan indgives på forskellige måder til opnåelse af den ønskede virkning. Forbindelserne kan indgives alene eller i kombination med farmaceutisk acceptable bærestoffer eller fortyndingsmidler, idet andelen og naturen af disse bestemmes af opløseligheden

og de kemiske egenskaber af den valgte forbindelse, den valgte indgivelsesvej og sædvanlig farmaceutisk praksis. Forbindelserne kan indgives oralt i faste dosisformer, f.eks. kapsler, tabletter eller pulvere, eller i flydende former, f.eks. opløsninger eller suspensioner. Forbindelserne kan også injiceres parenteralt i form af sterile opløsninger eller suspensioner. Faste orale indgivelsesformer kan indeholde gængse ekcipienser, f.eks. lactose, saccharose, magnesiumstearat, harpikser og lignende materialer. Flydende orale indgivelsesformer kan indeholde forskellige smagsstoffer, farvestoffer, konserveringsmidler, stabilisatorer, suspenderings- eller solubiliseringsmidler. Parenterale præparater er sterile, vandige eller ikke-vandige opløsninger eller suspensioner, der kan indeholde forskellige konserveringsmidler, stabilisatorer, puffere, solubiliserings- eller suspenderingsmidler. Om ønsket kan der tilsættes additiver, såsom saltopløsning eller glucose, for at gøre opløsningerne isotoniske.

Den indgivne mængde af her omhandlet forbindelse vil variere og kan være enhver effektiv mængde. Enhedsdoser af disse forbindelser kan f.eks. indeholde fra ca. 100 til 500 mg af forbindelserne og kan indgives en eller flere gange dagligt, f.eks. fra 1 til 4 gange dagligt.

Som anvendt i den foreliggende beskrivelse skal der ved betegnelsen patient forstås varmblodede dyr, såsom mennesker og andre pattedyr, f.eks. katte, hunde, rotter, mus, marsvin, får, heste og kreaturer.

Udtrykket "enhedsdosisform" anvendes i den foreliggende beskrivelse om en enkelt eller flerdobbelt dosisform indeholdende en vis mængde af den aktive bestanddel i blanding med eller på anden måde sammen med fortyndingsmidlet eller bærestoffet, idet den nævnte mængde er af en sådan størrelse, at der normalt kræves en eller flere forudbestemte enheder til en enkelt terapeutisk indgivelse. Når der er tale om flerdobbelte dosisformer, såsom væsker eller tabletter med delekærv, vil den nævnte forudbestemte enhed være en brøkdel, såsom 5 ml (en teskefuld) af en væske eller halv-

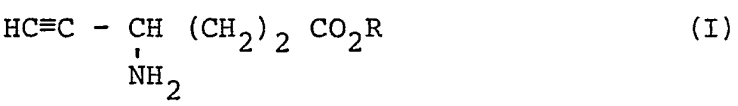
delen eller fjerdedelen af en tablet med delekærv, af den flerdobbelte dosisform.

Farmaceutiske præparater, som er den form, i hvilken de her omhandlede aktive forbindelser normalt vil blive anvendt, fremstilles på i og for sig velkendt måde og omfatter sædvanligvis mindst én her omhandlet aktiv forbindelse i blanding med eller på anden måde sammen med et farmaceutisk acceptabelt bærestof eller fortyndingsmiddel derfor. Til fremstilling af disse præparater blandes den aktive bestanddel sædvanligvis med en bærer eller fortyndes med et fortyndingsmiddel eller indesluttes eller indkapsles i en kapsel, pose, oblatkapsel, papir eller en anden beholder. Bærestoffet eller fortyndingsmidlet kan være et fast, halvfast eller flydende materiale, der tjener som bærestof, ekcipiens eller medium for den aktive bestanddel. Egnede fortyndingsmidler eller bærestoffer er i sig selv velkendte.

De farmaceutiske præparater kan være tilpasset til enteral eller parenteral anvendelse og kan indgives til patienten i form af tabletter, kapsler, suppositorier, opløsninger, suspensioner eller lignende.

I udførelseseksemplerne nedenfor beskrives illustrerende eksempler på egnede farmaceutiske præparater.

(S)-Allenisk GABA og (R,S)-allenisk GABA kan fremstilles ud fra et amino-beskyttet derivat af den tilsvarende (S)- eller (R,S)-form af aminoalkyn-forbindelsen med formlen I



(I)

hvori R betyder C_{1-4}-alkyl, ved omdannelse på i og for sig kendt måde af ethynylgruppen til en allenylgruppe, påfølgende frigørelse af aminogruppen og omdannelse af esterfunktionen til en carboxylgruppe.

Forbindelserne med formlen I er kendte, jf. f.eks. US-patentskrift nr. 3.959.356 og nr. 4.139.563, eller kan fremstilles analogt med kendte metoder.

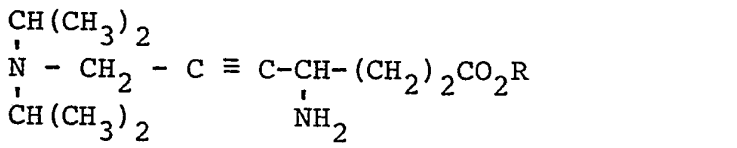
Den aminobeskyttende gruppe vil blive valgt under hensyntagen til naturen af den pågældende omsætning og den lethed, hvormed den kan fjernes til frigørelse af aminogruppen. Beskyttelsesgruppen kan vælges blandt f.eks. acyl, f.eks. lavere alkanoyl, f.eks. acetyl, propionyl, trifluoracetyl og lign., aroyl, f.eks. benzoyl, toluyl og lign., lavere alkoxycarbonyl, f.eks. methoxycarbonyl, ethoxycarbonyl, tert.butoxycarbonyl (BOC) og lign., carbobenzoxy, benzensulfonyl og tosyl. Begge amino-hydrogenatomer kan substitueres med en enkelt beskyttelsesgruppe, som f.eks. phthalyl. Den i øjeblikket foretrukne beskyttelsesgruppe er tert.butoxycarbonyl (BOC). Beskyttelsesgrupperne indføres på i og for sig kendt måde, f.eks. ved omsætning af aminen med lavere alkanoyl- eller aroylchlorid, anhydrid eller sulfonylchlorid. Til indføring af BOC-gruppen kan forbindelsen med formlen I behandles med tert.butoxycarbonyloxyimino-2-phenyl--acetonitril (BOC-ON), di-tert.butyldicarbonat ($(BOC)_2O$) eller tert.butoxycarbonylchlorid.

Fjernelsen af beskyttelsesgruppen efter afslutning af den ønskede omsætning kan gennemføres på en måde, der er i og for sig kendt for den pågældende beskyttelsesgruppe. Sædvanligvis vil fjernelsen ske ved hydrolytisk spaltning under anvendelse af en stærk organisk eller uorganisk syre, f.eks. trifluoreddikesyre, saltsyre og lignende syrer, eller ved hjælp af hydrogenchloridgas under vandfri betingelser. De anvendte opløsningsmidler vil blive valgt afhængigt af betingelserne ved fjernelsen af beskyttelsesgruppen. For eksempel kan der anvendes ethere, såsom diethylether, til spaltning under anvendelse af hydrogenchloridgas.

Omdannelsen af ethynylgruppen til den ønskede allenylgruppe kan gennemføres ved den generelle metode beskrevet af P. Crabbé et al., J.C.S. Chem. Comm. 1979, 859-860, og H. Fillion et al., Tet. Letters 1980, 929-930, for alle-

nisk alkohol. Ved denne metode opvarmes det aminobeskyttede derivat af en forbindelse med formlen I med formaldehyd og en sekundær amin med et hydrogenatom ved α-carbonatomet i et organisk opløsningsmiddel og i nærværelse af et uorganisk salt. Opvarmningen sker fortrinsvis under tilbagesvalingsbetingelser. Den foretrukne amin er diisopropylamin, og det foretrukne uorganiske salt er et kobbersalt, især cuprobromid eller cuprichlorid. Egnede opløsningsmidler omfatter dioxan, tetrahydrofuran, 1,2-dimethoxyethan, benzen, acetonitril og/eller toluen.

Omdannelsen antages at ske via det tilsvarende aminobeskyttede derivat af den sekundære aminopropynylforbindelse, især diisopropylamino-propynylforbindelsen med formlen II



(II)

hvori R har den samme betydning som i formel I.

(S)-Allenyl-GABA kan også fremstilles på i og for sig kendt måde, f.eks. ved adskillelse af (R,S)-allenisk GABA under anvendelse af en chiral syre, såsom (+)- eller (-)-binaphthylphosphorsyresalt ved metoden beskrevet af R. Viterbo et al. i Tetrahedron Letters 48, 4617-4620 (1971), og i US-patentskrift nr. 3.848.030 eller (+)-campher-10-sulfonsyre.

(S)-4-Amino-hex-5-yn-syre kan fremstilles på i og for sig kendt måde ved adskillelse af (R,S)-4-amino-hex-5-yn-syre under anvendelse af f.eks. en chiral syre, fortrinsvis (+)- eller (-)-binaphthylphosphorsyre ved metoden ifølge Viterbo (se ovenfor). Anvendelsen af (+)-binaphthylphosphorsyre er foretrukket.

Forbindelserne, der er fremstillet ved de ovennævnte metoder, kan enten isoleres i fri form eller som salte, sædvanligvis syreadditionssalte.

Syreadditionssaltene er fortrinsvis farmaceutisk acceptable, ugiftige additionssalte med egnede syrer, såsom de, der er nævnt tidligere i den foreliggende beskrivelse. Ud over farmaceutisk acceptable syreadditionssalte er andre syreadditionssalte, f.eks. salte med picrinsyre eller oxalsyre anvendelige. De kan f.eks. anvendes som mellemstadier ved rensning af de her omhandlede forbindelser eller ved fremstilling af andre farmaceutisk acceptable syreadditionssalte eller er anvendelige til identifikation eller karakterisering af baserne.

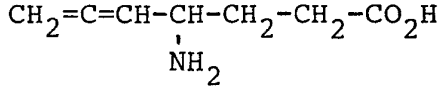
Et fremstillet syreadditionssalt kan omdannes til den frie forbindelse ifølge kendte metoder, f.eks. ved behandling med et alkalimetal- eller jordalkalimetalhydroxid eller -alkoxid, med et alkalimetal- eller jordalkalimetalcarbonat eller -hydrogencarbonat, med trialkylamin eller med en anionbytterharpiks.

Et fremstillet syreadditionssalte kan også omdannes til et andet syreadditionssalt ifølge kendte metoder. For eksempel kan et salt med en uorganisk syre behandles med et metalsalt, f.eks. et natrium-, barium- eller sølvsalt, af en syre i et egnet fortyndingsmiddel, hvori det dannede uorganiske salt er uopløseligt og således fjernes fra reaktionsmediet. Et syreadditionssalt kan også omdannes til et andet syreadditionssalt ved behandling med et anionbytterpræparat.

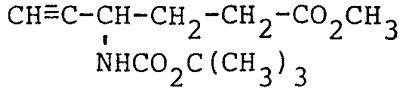
Opfindelsen illustreres ved de følgende eksempler.

Eksempel 1

(R,S)-4-Amino-hepta-5,6-diensyre

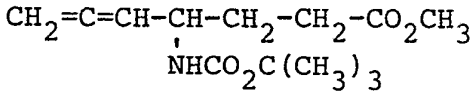


A) Fremstilling af (R,S)-methyl-4-(N-tert.butoxycarbonylamino)-hex-5-ynat.



En opløsning af 12,7 g (0,1 mol) (R,S)-4-amino-hex--5-yn-syre (fremstillet som beskrevet i US-patentskrift nr. 3.959.356) i tør methanol mættes med tør hydrogenchloridgas og henstilles natten over ved stuetemperatur. Opløsningen inddampes under formindsket tryk, hvorved det rå (R,S)-methyl--4-amino-hex-5-ynat-hydrochlorid fås som remanens. Denne remanens suspenderes i en opløsning af 60 g (0,1 mol) ditert.-butyldicarbonat i 100 ml chloroform. Suspensionen afkøles til 0°C, og der tilsættes dråbevis 14 ml (0,1 mol) triethylamin. Den fremkomne klare opløsning opvarmes i 2 timer under tilbagesvaling, koncentreres under formindsket tryk, fortyndes med 200 ml diethylether og vaskes med 5 x 50 ml vand. Det organiske lag tørres over magnesiumsulfat og koncentreres, hvorved der fås 20 g (80%) af den rå titelforbindelse. Råproduktet renses ved krystallisation i diethylether/pentan.

B) Fremstilling af (R,S)-methyl-4-(N-tert.butoxycarbonyl-amino)-hepta-5,6-dienat.



En opløsning af 4,8 g (0,02 mol) råt (R,S)-methyl--4-(N-tert.butoxycarbonylamino)-hex-5-ynat fremstillet som i trin A), 2,7 ml 37%'s vandig formaldehydopløsning (0,036 mol), 3,2 ml (0,025 mol) diisopropylamin og 1 g (0,006 mol) cuprobromid i 50 ml dioxan opvarmes under tilbagesvaling i 2 timer. 50 ml 1N vandig eddikesyre sættes til opløsningen, og den ekstraheres med diethylether. Det organiske lag tørres over magnesiumsulfat og koncentreres under formindsket tryk. Remanensen renses ved søjlechromatografi på silicagel under anvendelse af diethylether/petroleumsether (50:50) som elueringsmiddel, hvorved der fås 2,2 g af titelforbindelsen.

C) Fremstilling af (R,S)-4-amino-hepta-5,6-diensyre-hydrochlorid.

En opløsning af 1,275 g (0,005 mol) (R,S)-methyl--4-(N-tert.butoxycarbonylamino)-hepta-5,6-dienat fremstillet som i trin B) og 0,12 g (0,005 mol) lithiumhydroxid i 10 ml dimethoxyethan og 3 ml vand henstilles ved stuetemperatur i 3 timer. Opløsningen fortyndes med diethylether og vand, og det vandige lag gøres surt med 0,01N vandig saltsyre, mættes med natriumchlorid og ekstraheres med diethylether. Det fremkomne organiske lag tørres over magnesiumsulfat og koncentreres under formindsket tryk, og remanensen omkrystalliseres fra ether/pentan, hvorved der fås 1,1 g (R,S)-4-(N--tert.butoxycarbonylamino)-hepta-5,6-diensyre. Denne syre sættes til en mættet opløsning af tørt hydrogenchlorid i 20 ml tør diethylether og henstilles natten over ved stuetemperatur. Hydrochloridet dannes direkte som krystaller, der frafiltreres, vaskes med diethylether og tørres, hvorved den rene titelforbindelse fås i næsten kvantitativt udbytte (0,7 g, smp. 112°C).

D) Fremstilling af (R,S)-4-amino-hepta-5,6-diensyre.

(R,S)-4-Amino-hepta-5,6-diensyre-hydrochlorid fremstillet som i trin C ovenfor neutraliseres med 1 ækvivalent triethylamin i ethanol. Efter koncentrering under formindsket tryk optages remanensen med chloroform. Det uopløselige materiale omkrystalliseres fra ethanol/vand.

Eksempel 2

(S)-4-Amino-hepta-5,6-diensyre

Der gås frem som beskrevet i eksempel 1, men gås ud fra (S)-4-amino-hex-5-ynsyre, hvorved der fås (S)-4-amino-hepta-5,6-diensyre (smp. 170°C, $[\alpha]_D$ = +44°, c = 0,25 i vand) via mellemproduktet (S)-4-(N-tert.butoxycarbonylamino)-hepta-5,6-diensyre (smp. 79°C, $[\alpha]_D$ = -61,2°, c = 0,25 i chloroform).

På lignende måde fremstilles R-isomeren (smp. 169°C, $[\alpha]_D$ = -38°, c = 0,25 i vand) ud fra (R)-4-amino-hex-5--ynsyre via mellemproduktet (R)-4-(N-tert.butoxycarbonylamino)-hepta-5,6-diensyre (smp. 69°C, $[\alpha]_D$ = +68,80°, c = 0,25 i chloroform).

Ved biokemiske forsøg viser (S)(+)-isomeren sig at være en irreversibel inhibitor for GABA-T. (R)(-)-isomeren er ikke aktiv.

Eksempel 3

Evnen af (S)-allenyl-GABA og (R,S)-allenyl-GABA til at inhibere GABA-T-enzym og til at forhøje GABA-niveauerne i hjernen kan demonstreres ved følgende forsøgsprocedurer med mus.

Albino-CD1-mus af hankøn med en vægt på ca. 34 g hver ved forsøgets begyndelse modtager en intraperitoneal injektion af den undersøgte forbindelse i vandig opløsning dagligt i 7 på hinanden følgende dage. Halvdelen af dyrene aflives ved dekapitation 24 timer efter den sidste dosis af den undersøgte forbindelse. Resten af dyrene observeres i op til 12 dage for toksicitet (som viser sig ved vægttab og dødsfald). Kontroldyrene modtager kun injektion af bærestoffet.

Hjernerne fjernes fra de døde mus og deles i to dele ved sagittalt snit. Den ene halvdel anvendes til måling af GABA-T-aktivitet, medens den anden halvdel anvendes til måling af GABA-indhold. GABA-T-aktiviteten måles ved anvendelse af kendte metoder som beskrevet af M. Jung et al., J. Neurochem. 28, 717 (1977), og 29, 797 (1977). GABA-indholdet måles på perchlorsyre- eller trichloreddikesyreekstrakter, idet der anvendes en aminosyreanalysator udstyret med en fluorescensdetektor.

Ved undersøgelse som ovenfor beskrevet giver (R,S)--allenyl-GABA resultaterne, der er anført i tabel I nedenfor.

Tabel I

Forbindelse	Daglig dosis (mg/kg)	GABA-T--aktivitet+	GABA--niveau++
(R,S)-Allenyl-GABA	50*	55	130
(R,S)-Allenyl-GABA	100*	74	180

*) Ingen klare tegn på toksicitet, intet vægttab og ingen klare adfærdsmæssige forandringer ved doser af allenyl--GABA på 50 og 100 mg/kg/dag.

+) Beregnet som procent inhibering.

++) Beregnet som procent af kontrol.

Eksempel 4

A. Der gås frem som beskrevet i eksempel 3, idet der anvendes en enkelt intraperitoneal dosis af den undersøgte forbindelse, og musene aflives 6 timer efter den intraperitoneale injektion. Resultaterne for (S)-allenyl-GABA ("S") og (R,S)-allenyl-GABA ("R,s") er anført i tabel II nedenfor.

Tabel II

Forbindelse	mM/kg	Dosis (mg/kg)	GABA-T--aktivitet+	GABA--niveau++
(R,S)	1,55	273,5	76	470
	3,10	547,2	89	530
	6,2	1094,3	96	770
(S)	0,77	135,9	79	540
	1,55	273,5	92	670
	3,10	547,2	96	730

+) Beregnet som procent inhibering.

++) Beregnet som procent af kontrol.

Resultaterne i tabel II viser, at (S)-allenyl-GABA er dobbelt så virksomt som (R,S)-allenyl-GABA til forhøjelse af GABA-niveauer.

B. Der gås frem som under A, idet der både anvendes orale og intraperitoneale doser af (R,S)-allenyl-GABA. Resultaterne er anført i tabel III nedenfor.

Tabel III

Indgivelses-måde	Dosis mM/kg	Dosis (mg/kg)	GABA-T--aktivitet+	GABA -niveau++
i.p.	0,77	135,9	64	310
	1,94	342,4	84	490
	3,87	683,1	88	600
oral	0,77	135,9	69	330
	1,94	342,4	81	434
	3,87	683,1	86	530

+) Beregnet som procent inhibering.
++) Beregnet som procent af kontrol.

Resultaterne i tabel III viser, at inden for mindre forskelle, der skyldes biologiske variationer, er (R,S)--allenyl-GABA og (S)-allenyl-GABA lige virksomme ved oral og intraperitoneal indgivelse.

Eksempel 5

A. Giftigheden af (S)-allenyl-GABA og (R,S)-allenyl--GABA bestemmes efter intraperitoneal indgivelse til hanmus. Musene observeres i op til 8 dage efter injektionen. Forbindelsernes giftighed (anført som antallet af døde dyr pr. gruppe) er anført nedenfor.

Forbindelse	Dosis (mg/kg)	Antal døde dyr Dag 1	2	3	4	8
(R,S)-allenyl-GABA	500	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	750	3/5	3/5	3/5	3/5	3/5
	1000	2/5	4/5	5/5	-	-
	1500	5/5	-	-	-	-
(S)-allenyl-GABA	250	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	375	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	500	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	750	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

Resultaterne viser, at (S)-allenyl-GABA er ugiftigt efter intraperitoneal indgivelse af meget store doser svarende til maksimale biologiske effekter. (R,S)-Allenyl-GABA er imidlertid giftigt i doser, der er omkring 4-5 gange højere end den laveste biokemisk effektive dosis.

B. Giftigheden af (S)-allenyl-GABA ("S") og (R,S)-allenyl-GABA ("R,S") bestemmes som under A ovenfor efter både oral og intraperitoneal indgivelse. Giftigheden af forbindelserne på den 4. dag efter injektionen (anført som antallet af døde dyr pr. gruppe) er anført nedenfor.

Forbindelse	Indgivelsesmåde	Dosis (mg/kg)	Antal døde dyr Dag 4
(R,S)	i.p.	500	0/5
		750	3/5
		1000	5/5
		1500	5/5
(R,S)	oral	500	0/5
		750	0/5
		1000	0/5
		1500	0/5
(S)	oral	500	0/5
		750	1/5

Resultaterne viser, at (R,S)-allenyl-GABA ikke udviser toksicitet ved oral indgivelse op til en dosis på 1500 mg/kg. Resultaterne viser også, at (S)-allenyl-GABA er ugiftigt ved oral indgivelse.

Eksempel 6

Evnen af (R,S)-allenyl-GABA til at beskytte mus mod anfald og død fremkaldt af mercaptopropionsyre demonstreres på følgende måde:

Mus modtager en enkelt intraperitoneal injektion af den undersøgte forbindelse. Seks timer senere modtager dyrene mercaptopropionsyre i en dosis på 53 mg/kg intraperitonealt. Dyrene observeres for forekomst af kloniske toksiske anfald og død. Resultaterne af forsøget er anført nedenfor.

Dosis (mmol/kg)	Antal døde dyr	Antal dyr med anfald
0	3/5	5/5
0,39	3/5	5/5
0,77	2/5	5/5
1,9	0/5	3/5
3,9	0/5	3/5

Selv om (R,S)-allenyl-GABA ikke beskytter fuldstændig mod anfald ved dette forsøg, nedsættes antallet af døde dyr væsentligt.

Eksempel 7

En illustrerende sammensætning til hårde gelatinekapsler er følgende:

a) (S)- eller (R,S)-allenyl-GABA	200 mg
b) talkum	35 mg

Formuleringen fremstilles ved at føre de tørre pulvere af a) og b) gennem en finmasket sigte og blande dem godt. Pulveret fyldes derefter i hårde gelatinekapsler i en nettomængde på 235 mg pr. kapsel.

Eksempel 8

En illustrerende sammensætning til tabletter er følgende:

a) (S)- eller (R,S)-allenyl-GABA	100 mg
b) hvedestivelse	15 mg
c) lactose	33,5 mg
d) magnesiumstearat	1,5 mg

En portion af hvedestivelsen anvendes til fremstilling af et granulat, som sammen med resten af hvedestivelsen og lactosen granuleres, tørres, sigtes og blandes med den aktive forbindelse a) og magnesiumstearat. Blandingen komprimeres til tabletter med en vægt på 150 mg hver.

Eksempel 9

En illustrerende sammensætning til parenteral injektion er følgende, hvori mængderne er på vægt/volumen-basis:

	Mængde
a) (S)- eller (R,S)-allenyl-GABA	100,0 mg
b) natriumchlorid	q.s.
c) vand til injektion op til	20 ml

Præparatet fremstilles ved opløsning i vand til injektionsbrug af den aktive bestanddel a) og tilstrækkeligt natriumchlorid til at gøre opløsningen isotonisk. Præparatet kan anbringes i en enkelt ampul indeholdende 100 mg af den aktive bestanddel til flerdobbelt dosering eller i 20 ampuller, som hver indeholder 5 mg af den aktive bestanddel, til en enkelt dosering.

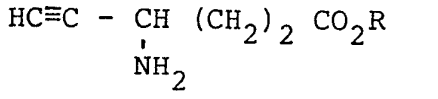
Eksempel 10

	mg/suppositorie
(S)- eller (R,S)-allenyl-GABA	200
kakaosmør	800

Medikamentet pulveriseres og passeres gennem en B.S. Nr. 100-sigte og udrives med smeltet kakaosmør ved 45°C til dannelse af en glat suspension. Blandingen omrøres godt og udhældes i forme med en nominel kapacitet på 1 g hver til dannelse af suppositorier.

Patentkrav

1. Analogifremgangsmåde til fremstilling af (R,S)--4-amino-hepta-5,6-diensyre, (S)-4-amino-hepta-5,6-diensyre eller farmaceutisk acceptable salte deraf, kendetegnet ved, at ethynylgruppen i et aminobeskyttet derivat af en (S)- eller (R,S)-aminoalkyn-forbindelse med den almene formel I



(I)

hvori R betyder C_{1-4}-alkyl, på i og for sig kendt måde omdannes til en allenylgruppe, hvorefter aminogruppen frigøres, og esterfunktionen omdannes til en carboxylgruppe.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, kendetegnet ved, at omdannelsen af ethynylgruppen gennemføres ved opvarmning af det amino-beskyttede derivat med formaldehyd og en sekundær amin med et hydrogenatom ved α-carbonatomet i et organisk opløsningsmiddel og i nærværelse af et uorganisk salt.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 2, kendetegnet ved, at den sekundære amin er diisopropylamin, og det uorganiske salt er et kobbersalt.

4. Fremgangsmåde ifølge ethvert af kravene 1-3, kendetegnet ved, at reaktanten med formlen I er (S)-isomeren, og produktet er (S)-4-amino-hepta-5,6-diensyre eller et salt deraf.

5. Fremgangsmåde ifølge ethvert af kravene 1-3, kendetegnet ved, at reaktanten med formlen I er (R,S)-racematet, og den fremkomne (R,S)-4-amino-hepta-5,6--diensyre eller et salt deraf adskilles optisk til dannelse af (S)-isomeren.