



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **315927**

(13) B1

(51) Int Cl⁷

A 61 K 31/215

Patentstyret

(21) Søknadsnr	19973516	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	1996.01.25, PCT/US96/01053
(22) Inng. dag	1997.07.30	(85) Videreføringsdag	1997.07.30
(24) Løpedag	1996.01.25	(30) Prioritet	1995.01.31, US, 381542
(41) Alm. tilgj.	1997.08.07		1995.06.07, US, 480194
(45) Meddelt dato	2003.11.17		

(71) Patenthaver	Sepracor Inc, 111 Locke Drive, Marlborough, MA 01752, US
(72) Oppfinner	Gunnar Aberg, Westborough, MA 01581, US John R McCullough, Worcester, MA 01581, US Yue Fang, Shrewsbury, MA 01545, US
(74) Fullmektig	Zacco Norway AS, 0106 Oslo

(54) Benevnelse **Anvendelse av (S)-oksybutynin og (S)-desetyloksybutynin for fremstilling av et medikament for behandling av urininkontinens samt farmasøytisk sammensetning inneholdende samme**

(56) Anførte publikasjoner Hughes K.M. et al.: "Measurement of oxybutynin and its N-desethyl metabolite in plasma, and its application to pharmacokinetic studies in young, elderly and frail elderly volunteers", Xenobiot. 22(7):859-69 (1992)
Kachur J.F. et al.: "R and S Enantiomers of Oxybutynin: Pharmacological Effects in Guinea Pig Bladder and Intestine", J Pharm Exper. Ther. 247(3):867-72 (1988)

(57) Sammendrag

Det blir beskrevet en fremgangsmåte for behandling av urininkontinens under unngåelse av ledsagende tendens til negative effekter assosiert med racemisk oksybutynin. Fremgangsmåten omfatter administrering av en terapeutisk effektiv mengde (S)-desetyloksybutynin, (S)-desetyloksybutyffin eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, hovedsakelig fri for den korresponderende R-enantiomeren. Farmasøytiske sammensetninger i form av tabletter og transdermale anordninger omfattende (S)-oksybutynin eller (S)-desetyloksybutynin og en akseptabel bærer er også beskrevet, således er syntesen av desetyloksybutynin.

Foreliggende oppfinnelse angår anvendelse av optisk ren (S)-oksybutynin og (S)-desetyloksybutynin (S-DEO) for fremstilling av et medikament for behandling av urininkontinens og farmasøytiske sammensetninger inneholdende optisk ren (S)-oksybutynin eller S-DEO.

5

Racemisk oksybutynin er benyttet terapeutisk i behandling av intestinal hypermotilitet og i behandling av urinkontinens som skyldes detrusor instabilitet. Racemisk oksybutynin har en direkte antispasmodisk effekt på glatte muskler og hemmer virkningen av acetylcholin på glatte muskler. Den har kun en femtedel av den anti-cholinerge aktiviteten til atropin på kanin detrusor-muskelen, men fire til ti ganger den antispasmodiske aktivitet. Den er meget selektiv for muscarinreseptoren i nærvær av nikotinreseptorer og som et resultat blir ingen blokkerende effekt observert på skjelett neuromuskulære forbindelsespunkter eller autonom ganglia.

15 Racemisk oksybutynin relaxerer blærens glatte muskler og hos pasienter med tilstander kjennetegnet ved ufrivillige blærekontraksjoner, har systemetriske studier demonstrert at racemisk oksybutynin øker vesicle-kapasiteten, reduserer frekvensen av frivillige kontraksjoner i detrusor-muskelen, og forsinker den initielle urineringsstrangen. Det er derfor nyttig i behandling og forhindring av både inkontinens og hyppig frivillig
20 urinerings. Effektiviteten av racemisk oksybutynin i blæren har blitt tilskrevet en kombinasjon av antimuscarin, direkte spasmolytisk og lokal anestetisk effekt på detrusors glatte muskler. På grunn av den antimuscarine effekt til det racemiske medikamentet, er xerostomia (tørr munn) og mydriasis (dilaterte pupiller), som omfatter muscarin cholinerge reseptorer, meget vanlige bieffekter. Faktisk har minst en forsker
25 referert til de "uunngåelige symptomene på mydriasis, xerostomia, tachycardia, osv.", som følger administrasjon av racemisk oksybutynin [Lish et al. Arch. Int. Pharmacodyn. 156, 467-488 (1965), 481]. Den høye hyppigheten av anticholinerge bieffekter (40-80 %) resulterer ofte i doseringsreduksjon eller avbrytelse av terapien.

30 Farmakologiske studier av de individuelle enantiomerene har antydnet at R-enantiomerene er den mest effektive enantiomeren. Noronha-Blob et al. [J. Pharmacol. Exp. Ther. 256, 562-567 (1991)] konkluderte med at den cholinerge antagonisme av racemisk oksybutynin (målt in vitro ved dets affinitet for M₁, M₂ og M₃ reseptor-subtyper, og in vivo for diverse fysiologiske responser) kan bli tilskrevet hovedsakelig
35 aktiviteten av R-enantiomeren. For alle responser fant de at rekkefølgen sortert etter kraft av racemisk oksybutynin og dets enantiomerer, var den samme, nemlig (R)-oksybutynin hadde en aktivitet som var større eller lik racemisk oksybutynin, som også var

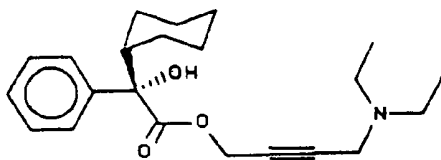
mye større enn (S)-oksybutynin, hvor (S)-oksybutynin er 1 - 2 størrelsesordener mindre kraftig enn (R)-oksybutynin.

Det er nå uventet funnet at hovedsakelig ren S-enantiomer av oksybutynin og dets
5 desetyl-metabolitter gir en overlegen terapi for behandling av urininkontinens.

Optisk ren (S)-oksybutynin (S-OXY) og (S)-desetyloksybutynin (S-DEO) gir denne behandlingen med betydelig reduksjon av negative effekter som primært skyldes anti-cholinerg aktivitet og som er forbundet med administrasjonen av racemisk oksybutynin.

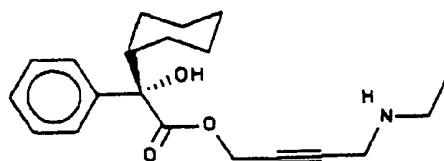
10 Disse omfatter, men er ikke begrenset til, xerostomia, mydriasis, søvnighet, kvalme, forstoppelse, hjertebank og tachycardia. Lettingen av kardiovaskulære bieffekter hos racemisk oksybutynin, slik som tachycardia og hjertebank, ved administrasjoner av (S)-oksybutynin eller S-DEO, er av spesiell terapeutisk verdi.

15 De aktive forbindelsene i disse sammensetninger er optiske isomerer av oksybutynin og desetyloksybutynin. Fremstillingen av racemisk oksybutynin er beskrevet i britisk patent-spesifikasjon 940 540. Kjemisk er de aktive forbindelsene (1) S-enantiomeren av 4-(dietylamino)-2-butynyl α -cykloheksyl- α -hydroksybenzenacetat også kjent som 4-(dietylamino)-2-butynyl-fenylcykloheksylglykolat, og heretter referert til som
20 oksybutynin; og (2) S-enantiomeren av 4-(etylamino)-2-butynyl- α -cykloheksyl- α -hydroksybenzenacetat, og heretter referert til som desetyloksybutynin. Det generiske navnet til hydrokloridsaltet av racemisk oksybutynin gitt av USAN-Council er oksybutynin-klorid; det er solgt under handelsnavnet "Ditropan". Isomeren av oksybutynin som har S-absolutt stereokjemi (reg.nr. 119618-22-2) er dekstrorotatorisk
25 og er vist i formel I:



I

S-enantiomeren av desetyloksybutynin er vist i formel II:



II

Syntesen av (S)-oksybutynin er blitt beskrevet Kachur et al. J. Pharmacol. Exp. Ther. 247, 867-872 (1988)], men (S)-oksybutyninet selv er ikke for tiden kommersielt tilgjengelig. Alle de kliniske resultater som har blitt rapportert er blitt oppnådd med racemiske blandinger, selv om farmakologien til de individuelle enantiomerer har blitt beskrevet i marsvin og rotter [se Kachur et al. J. Pharmacol. Exp. Ther. 247, 867-872 (1988) og Noronha-Blob et al. J. Pharmacol. Exp. Ther. 256, 562-567 (1991)]. (S)-desetyloksybutynin har ikke tidligere blitt beskrevet; dets syntese blir utført ifølge fremgangsmåten beskrevet nedenfor.

Ifølge et aspekt angår oppfinnelsen anvendelse av en forbindelse valgt blant gruppene omfattende (S)-oksybutynin, (S)-desetyloksybutynin og farmasøytisk akseptable salter derav, hvor forbindelsen inneholder minst 90 vekt-% (S)-oksybutynin eller (S)-desetyloksybutynin, og 10 vekt-% eller mindre av (R)-oksybutynin eller (R)-desetyloksybutynin, for fremstilling av et medikament for behandling av urininkontinens.

I en mer foretrukket utførelsesform inneholder sammensetningene minst 99 vekt-% av S-enantiomeren og 1 % eller mindre av R-enantiomeren. Det hovedsakelig optisk rene (S)-oksybutynin eller (S)-desetyloksybutynin kan bli administrert parentalt, rektalt, intravesikalt, transdermalt, oralt eller ved aerosol, oralt eller transdermalt, er foretrukket, i en mengde på omkring 1 mg til omtrent 100 mg/dag.

Ifølge et annet aspekt angår foreliggende oppfinnelse en farmasøytisk enhets-doseringsform i form av en tablett eller kapsel, kjennetegnet ved at den omfatter en terapeutisk effektiv mengde av en forbindelse valgt blant gruppen (S)-oksybutynin og (S)-desetyloksybutynin eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, hvor forbindelsen

inneholder minst 90 vekt-%, fortrinnsvis minst 99 vekt-%, (S)-oksybutynin eller (S)-desetyloksybutynin og 10 vekt-% eller mindre, fortrinnsvis 1 vekt-% eller mindre, (R)-oksybutynin eller (R)-desetyloksybutynin og en farmasøytisk akseptabel bærer.

- 5 Tabletten eller kapselen inneholder fortrinnsvis fra 0,5 til 25 mg (S)-oksybutynin eller (S)-desetyloksybutynin, og blir fremstilt ved konvensjonelle fremgangsmåter som er velkjente i teknikken.

- 10 Oppfinnelsen angår også en doseringsform i form av en transdermal anordning. Den transdermale administrasjonen blir forbedret ved innlemmelse av en permabilitetsøker i den transdermale leveringsanordning, f.eks. som beskrevet i PCT-søknad WO 92/20377.

- 15 S-enantiomeren av oksybutynin og DEO kan bli oppnådd ved oppløsning av den intermediate mandelsyren fulgt av esterifisering. Esterifiseringen kan bli utført som beskrevet av Kachur et al. (tidligere sitert) for OXY eller ved den forbedrede metoden angitt i skjema A nedenfor for S-DEO.

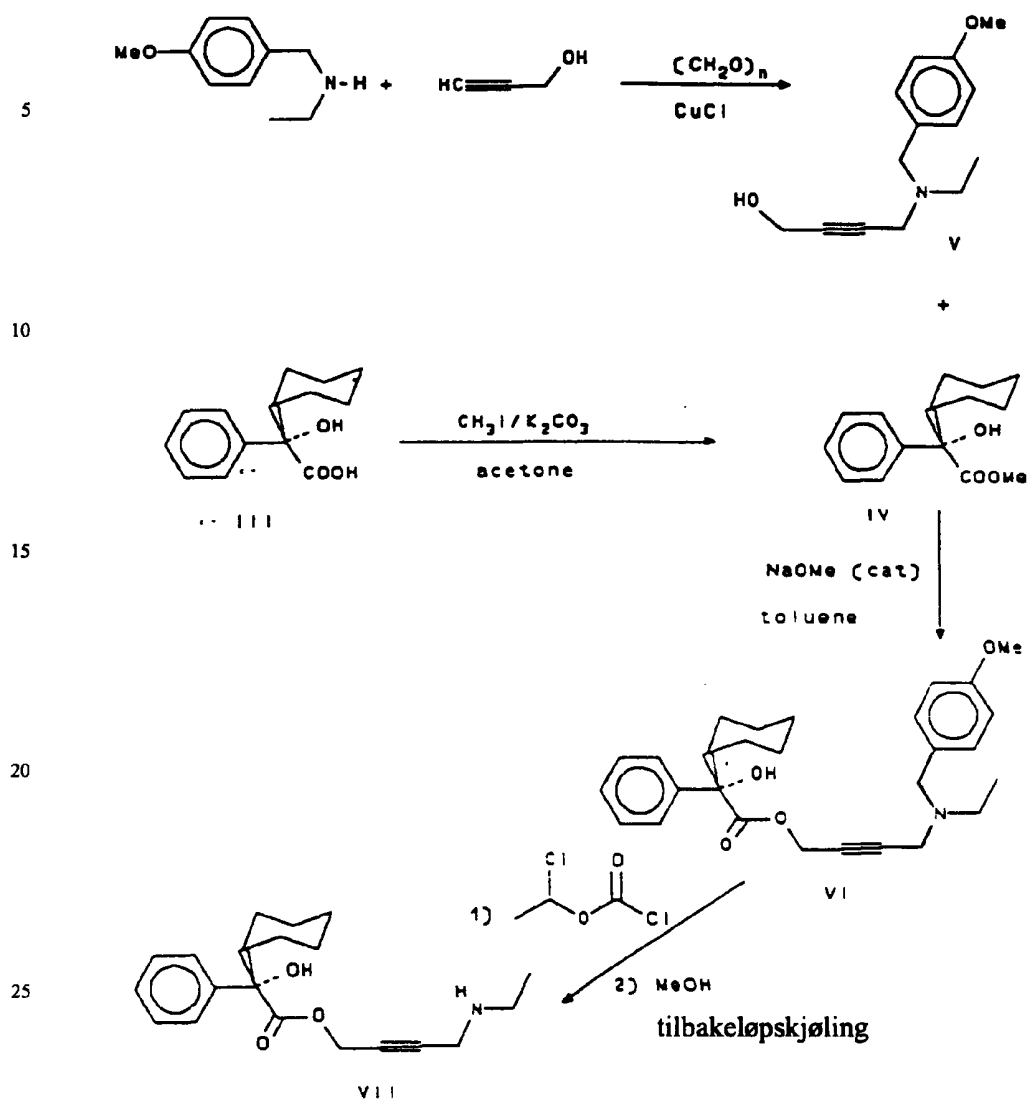
20

25

30

35

Skjema A



- De grafiske representasjoner av racemiske, ambiscalemiske og scalemiske eller enantiomert rene forbindelser benyttet heri er tatt fra Mæhr J. Chem. Ed. 62, 114-120 (1985). Heltrukne og stiplede kiler (slik som vist i formel I) ble anvendt for å angi den absolutte konfigurasjon av et chiralt element; kile-konturer og prikkede eller brutte linjer (slik som vist i formel III) angir enantiomert rene forbindelser av ubestemmelig absolutt konfigurasjon.

Totalprosessen for DEO omfatter:

(a) reaksjon av N-etyl-4-metoksybenzenmetanaminer med 2-propyn-1-ol og paraformaldehyd i et inert oppløsningsmiddel i nærvær av kobber(I)-klorid for å gi 4-[N-etyl-(4-metoksyfenyl)metylamino]-2-butyn-1-ol (V);

(b) reagere en enkel enantiomer av metyl- α -cykloheksyl- α -hydroksybenzeenacetat (IV) med 4-[N-etyl-(4-metoksyfenyl)metylamino]-2-butyn-1-ol (V) i nærvær av en katalytisk mengde natriummetoksyd i toluen for å gi en enkel enantiomer av 4-[N-etyl-(4-metoksyfenyl)metylamino]-2-butynyl- α -cykloheksyl- α -hydroksybenzeenacetat (VI);
og

(c) reagere 4-[N-etyl-(4-metoksyfenyl)metylamino]-2-butynyl- α -cykloheksyl- α -hydroksybenzeenacetat (VI) i rekkefølge med α -kloretylkarbonkloridat i dikloretan fulgt av metanol for å gi en enkel enantiomer av DEO (VII).

Proessen er klart anvendelig også for fremstilling av racemisk DEO fra racemisk metyl- α -cykloheksyl- α -hydroksybenzeenacetat. Paraformaldehyd ble benyttet som en passende kilde for formaldehyd, men den kan bli erstattet av en hvilken som helst kilde for formaldehyd, som kjent i teknikken. Tilsvarende blir α -kloretylkarbonkloridat benyttet for dealkyleringen, men andre karbonkloridater (f.eks. vinyl) kan også bli benyttet.

Alternativt kan S-enantiomerene av OXY og DEO bli oppnådd ved oppløsning av racemisk oksybutynin eller DEO ved anvendelse av konvensjonelle midler slik som fraksjonell krystallisering av diastereomere salter med chiralsyrer. Andre standard-metoder for oppløsning kjent for fagmannen omfatter, men er ikke begrenset til, enkel krystallisering og kromatografi på chirale substrater, kan også bli benyttet.

Størrelsen av en profylaktisk eller terapeutisk dose av (S)-oksybutynin eller S-DEO i den akutte eller kroniske behandlingen av en sykdom vil variere med alvoret og naturen til tilstanden som skal behandles og administrasjonsveien. Dosen og kanskje dose-frekvensen vil også variere ifølge alder, kroppsvekt og respons, til den individuelle pasient. Generelt er den totale daglige dose i området for (S)-oksybutynin eller S-DEO for tilstander beskrevet heri, fra omkring 1 mg til omkring 100 mg i en enkel eller i oppdelte doser, fortrinnsvis i oppdelte doser. I behandling av pasienten skal terapien bli initiert med en lavere dose, kanskje omkring 0.25 mg til omkring 25 mg, og øket til omkring 100 mg avhengig av pasientens totale respons. Det er videre anbefalt at pasienter over 65 år og de som har svekket renal eller hepatisk funksjon, initielt mottar lave doser, og at de kan bli titrert basert på individuell respons og blodnivået. Det kan være nødvendig å benytte doseringer utenfor disse områdene i noen tilfeller, slik det vil

være tydelig for fagmannen. Videre må det noteres at klinikeren eller den behandlende lege vil vite hvordan og når å avbryte, justere eller terminere terapi i samsvar med den individuelle pasientrespons. Uttrykkene "terapeutisk effektive mengder" og "en mengde tilstrekkelig for å behandle inkontinens, men utilstrekkelig for å gi negative effekter", er
5 omfattet i de ovenfor beskrevne doseringsmengdene og dosefrekvensskisser.

En hvilken som helst passende vei for administrasjon kan bli benyttet for å gi pasienten en effektiv dosering av (S)-oksybutynin eller S-DEO. For eksempel kan oral, rektal, parenteral (subkutan, intramuskulær, intravenøs), transdermal, aerosol og lignende
10 former for administrering bli benyttet. I tillegg kan medikamentet bli administrert direkte inn i blæren gjennom urethra som beskrevet for racemisk oksybutynin av Massad et al. [*J. Urol.* 148, 595-597 (1992)]. Doseringsformer omfatter tabletter, trosjeer, dispersjoner, suspensjoner, oppløsninger, kapsler, transdermale leverings-systemer og lignende.

15 De farmasøytiske sammensetninger ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter (S)-oksybutynin eller S-DEO som aktiv ingrediens, eller farmasøytisk akseptable salter derav, og kan også inneholde en farmasøytisk akseptabel bærer og eventuelt andre terapeutiske ingredienser.

20 Uttrykkene "farmasøytisk akseptable salter" eller "et farmasøytisk akseptabelt salt derav" refererer til salter fremstilt fra farmasøytisk akseptable ikke toksiske salter. Passende farmasøytisk akseptable syreaddisjonssalter for forbindelsen ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter acetat, benzensulfonat (bensylat), bensoat, kamfer-sulfonat, citrat, etansulfonat, fumarat, gluconat, glutamat, hydrobromat, hydroklorat,
25 glukonat, glutamat, hydrobromat, hydroklorat, isetionat, laktat, maleat, malat, mandelat, metansulfonat, mucat, nitrat, pamoat, pantotenat, fosforat, succinat, sulfat, og lignende. Hydrokloridet har spesiell anvendelse, og det er faktisk det saltet som er benyttet i studiene vist nedenfor.

30 Sammensetningene ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter suspensjoner, oppløsninger, eliksirer eller faste doseringsformer. Bærere slik som stivelser, sukkere og mikrokrySTALLinsk cellulose, fortynnere, granuleringsmidler, smøremidler, binde-midler, disintegreringsmidler o.l. passer for orale faste preparater (som pulvere, kapsler
35 og tabletter), og faste orale preparater er foretrukket over orale flytende preparater.

På grunn av deres enkle administrasjon representerer tabletter og kapsler en av mer fordelaktige orale doseringsenhets-former, i hvilket tilfelle faste farmasøytiske bærere blir benyttet. Hvis ønskelig kan tabletter bli belagt ved standard vandige eller ikke-vandige teknikker.

5

I tillegg til vanlige doseringsformer angitt ovenfor kan forbindelsene ifølge oppfinnelsen også bli administrert ved midler for kontrollert frigivning og leverings-anordninger som de som beskrives i US patenter nr. 3 845 770, 3 916 899, 3 536 809, 3 598 123, og 4 008 719, og PCT-søknad WO 92/20377, hvis beskrivelser herved er innlemmet som referanser.

10

Farmasøytiske sammensetninger ifølge foreliggende oppfinnelse for oral administrasjon kan være tilstede som diskrete enhets-doseringsformer slik som kapsler, kasjeer eller tabletter, hver inneholdende forhåndsbestemte mengder av aktiv ingrediens, som et
15 pulver, et korn eller som en oppløsning eller suspensjon i en vandig væske, ikke-vandig væske, en olje-i-vann-emulsjon eller en vann-i-olje flytende emulsjon. Slike sammensetninger kan bli fremstilt ved en hvilken som helst fremgangsmåte innen farmasi, men alle fremgangsmåter omfatter trinnet med å bringe det aktive middel sammen med bæreren som omfatter en eller flere nødvendige ingredienser. Generelt blir sammen-
20 setningene fremstilt ved enhetlig og grundig sammenblanding av aktive ingredienser med flytende bærere eller findelte faste bærere, eller begge deler, og så, hvis nødvendig, formgivning av produktet til den ønskede form, slik det er kjent for den racemiske blandingen.

20

For eksempel kan en tablett bli fremstilt ved pressing eller støping, eventuelt med en eller flere ytterligere ingredienser. Sammenpressede tabletter kan bli fremstilt ved sammenpressing i en passende maskin av den aktive ingrediensen i en frittflytende form slik som pulver eller korn, eventuelt blandet med bindemiddel, smøremiddel, inert fortynner, overflateaktivt middel eller dispergeringsmiddel. Støpte tabletter kan bli
30 fremstilt ved støping i en passende maskin, en blanding av den pulveriserte forbindelse fuktet med en inert flytende fortynner. Alle de foregående teknikker er velkjent for fagmannen innen farmasi. Hver tablett kan inneholde fra omkring 0.5 til omkring 25 mg aktiv ingrediens.

30

EKSEMPLER

Eksempel 1

ORAL ENHETS-DOSERINGSFORMULERING

5

Tabletter:

Ingredienser	<u>per tablett</u>	<u>per porsjon på 10 000 tabletter</u>
(S)-oksybutynin eller		
(S)-desetyloksybutynin	5 mg	50 g
Mikrokrystallinsk cellulose	30 mg	300 g
Laktose	70 mg	700 g
Kalsiumstearat	2 mg	20 g
FD&C Blue #1 Lake	0.03 mg	300 mg

10 (S)-oksybutyninet eller desetyloksybutyninet ble blandet med laktose og cellulose inntil en enhetlig blanding ble dannet. Laken ble tilsatt og ytterligere blandet. Til sist ble kalsiumstearatet blandet inn og den resulterende blandingen ble presset til tabletter ved anvendelse av en 7 mm grunn, konkav kjørner. Tabletter på andrestyrker kan bli fremstilt ved å endre forholdet av aktiv ingrediens til hjelpestoffene eller den endelige vekten til tablett.

15

Den overraskende anvendeligheten til S-enantiomeren av både OXY og DEO har blitt bekreftet ved de følgende studier.

ENANTIOMERER AV OXYBUTYNIN

20

Binding av (R)- og (S)oxybutynin til humane M₁, M₂, M₃ og M₄ muscarin-reseptor-subtyper

MATERIALER OG METODER

25

Eksperimentene ble utført på membraner fremstilt fra SF9-celler infisert med baculovirus for å uttrykke de humane rekombinante M₁, M₂, M₃ og M₄ muscarin reseptor-subtypene.

30

Bindingsanalyse

Tabell 1

Reseptor	Radioligand	Konsentrasjon	Ikke-spesifik	Inkubasjon	Referanseforbindelse
M ₁ H	[³ H]pirenzepin	2nM	atropin (1 µM)	60 min. 27°C	pirenzepin
M ₂ H	[³ H]AF-DX 384	2nM	atropin (1 µM)	60 min. 27°C	metroktram- in
M ₃ H	[³ H]4-DAMP	0.8 nM	atropin (1 µM)	60 min. 27°C	5-DAMP
M ₄ H	[³ H]4-DAMP	0.3 nM	atropin (1 µM)	60 min. 27°C	4-DAMP

5

Etter inkubering ble analysene hurtig filtrert under vakuum gjennom GF/B-glassfiberfilter (Whatman) og vasket med iskald buffer ved anvendelse av en Brandel Cell Harvester. Bundet radioaktivitet ble bestemt med en væske-scintillasjonsteller (LS 6000, Beckman) ved anvendelse av en væske-scintillasjonsblanding (Formula 99, DuPont NEN).

10

Eksperiment-protokoll

Forbindelsene ble testet på hver reseptor ved 10 konsentrasjoner i duplikat for å oppnå konkurransekurver. I hvert eksperiment ble referanseforbindelsen for reseptoren under undersøkelse samtidig testet ved 8 konsentrasjoner i duplikat for å gi en konkurransekurve for å validere eksperimentet.

15

Analyse og angivelse av resultater

Den spesifikke radioligande binding til hver reseptor ble definert som forskjellen mellom total binding og ikke-spesifik binding bestemt i nærvær av et overskudd av ikke-merket ligand. IC₅₀-verdier (konsentrasjoner nødvendig for å hemme 50 % spesifikk binding) ble bestemt ved ikke-lineær regresjonsanalyse av konkurransekurvene. Disse parametrene ble oppnådd ved kurvetilpassing ved hjelp av "Sigmaplot" programvare. IC₅₀ for R- og S-OXY er gitt i tabell 2.

25

Tabell 2

Binding av R-oksybutynin og S-oksybutynin til humane muscarin subtyper M₁ - M₄

Reseptor	R-OXY IC ₅₀ (nM)	S-OXY IC ₅₀ (nM)	Referanseforbindelse IC ₅₀ (nM)
M ₁	0.99	47.6	pirenzepin 11.9
M ₂	9.9	178	metoktramin 14.6
M ₃	1.8	149	4-DAMP 1.6
M ₄	1.2	100	4-DAMP 0.87

- 5 Disse resultatene indikerer at S-OXY har lavere affinitet for muscarin-reseptor-subtyper enn R-OXY.

Binding av (R)- og (S)-oksybutynin til kalsium-kanaler

10 MATERIALER OG METODER

Bindingsanalyse

Bindingsanalyser ble utført ved anvendelse av de følgende fremgangsmåter:

15 Tabell 3

Reseptorer	Membraner	Referanseforbindelser	Referanser
Ca-kanal (T + L, diltiazem-sete)	cerebral cortex fra rotte	diltiazem	Schoemaker og Langer (1985)
Ca-kanal (T + L, verapamil-sete)	cerebral cortex fra rotte	D600	Reynolds et al (1986)

De eksperimentelle betingelsene var:

Tabell 4

Reseptorer	Ligander	Konsentrasjoner	Ikke-spesifik	Inkubering
Ca-kanal (T + L, diltiazem-sete)	[³ H] diltiazem	5nM	diltiazem (10 µM)	120 min. 25°C
Ca-kanal (T + L, verapamil-sete)	[³ H]D 888	0.5 nM	D600 (10 µM)	60 min. 22°C

Etter inkubering ble analysen hurtig filtrert under vakuum gjennom GF/B eller GF/C glassfiberfilter (Whatman) og vasket med iskald buffer under anvendelse av en Brandel Cell Harvester. Bundet radioaktivitet ble bestemt med en væske-scintillasjonsteller (LS6000, Beckman) ved anvendelse av en væske-scintillasjonsblanding (Formula 989, DuPont NEN).

Eksperimentellprotokoll

Forbindelsene ble testet i duplikat på hver reseptor i en konsentrasjon på 10^{-5} M. I hvert eksperiment ble referanseforbindelsen for reseptoren under undersøkelse samtidig testet ved 8 konsentrasjoner i duplikt for å oppnå en konkurransekurve for å validere eksperimentet.

Analyse og angivelse av resultater

Den spesifikke radioligand-binding for hver reseptor ble definert som forskjellen mellom total binding og ikke-spesifik binding bestemt i nærvær av overskuddet av det ikke-merkede ligand. Gjennomsnittlige verdier, uttrykt som en prosent av inhiberingen av spesifikk binding, er angitt i tabell 5. IC_{50} -verdier (konsentrasjoner nødvendig for å hemme 50 % av spesifikk binding) ble bestemt ved ikke-lineær regresjonsanalyse av deres konkurransekurver. Disse parametrene ble oppnådd ved kurvetilpassing ved anvendelse av "Sigmaplot" programvare.

Tabell 5

Binding av R-oksybutynin og S-oksybutynin til kalsiumkanaler
(Hemming (i %) av diltiazem og verapamil-binding til kalsiumkanal-reseptorer).

Reseptor	R-OXY (10^{-5} M)	S-OXY (10^{-5} M)	Referanseforbindelse IC_{50} (nM)
Kalsium (diltiazem)	86	59	diltiazem 55.8
Kalsium (verapamil)	86	68	D600 36.4

Disse resultater indikerer at S-OXY har blokkerende aktivitet for kalsiuminnstrømning tilsvarende til R-OXY.

ENANTIOMERER AV DESETYLOKSYBUTYNIN

Hovedmetabolitten av racemisk oksybutynin er RS-desetyl-oksybutynin (DEO). R og S-enantiomeren av DEO har ikke blitt beskrevet og de antispasmodiske og kalsium-innstrømmende blokkeringsaktiviteter til de individuelle enantiomerene, R- og S-DEO, var før foreliggende studier ukjente. Disse enantiomerene ble syntetisert og deres antimuscarine, spasmolytiske og kalsiuminnstrømmingsblokkerende effekter i modeller for reseptorbinding og blærefunksjon ble studert. Det er funnet at hver enantiomer av metabolitten opprettholder den relative farmakologiske profil til dets "opphav" oksybutynin-enantiomer.

Binding av muscarine reseptor-subtyper

Prosent hemming av spesifikk radioligand binding induisert ved tre konsentrasjoner av hver forbindelse (R-, S- og RS-DEO) ble testet på klonede humane muscarin-reseptor-subtyper (M1-M4), som beskrevet ovenfor, for enantiomerene av oksybutynin. Tabellene nedenfor (tabell 6 og 7) gir prosent hemming for hver subtype. I tillegg ble IC₅₀-verdiene bestemt for M₁ og M₂ humane reseptor-subtyper og er angitt i tabell 6.

Tabell 6

	M _{1H}				M _{2H}			
	10 ⁻⁹ M	10 ⁻⁷ M	10 ⁻⁵ M	IC ₅₀ (nM)	10 ⁻⁹ M	10 ⁻⁷ M	10 ⁻⁵ M	IC ₅₀ (nM)
R-DEO	63	100	100	1.2	21	97	102	14.7
S-DEO	--	82	101	25.4	--	36	101	177
RS-DEO	43	100	100	1.8	--	94	99	7.0

20

Tabell 7

	M _{3H}			M _{4H}		
	10 ⁻⁹ M	10 ⁻⁷ M	10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁹ M	10 ⁻⁷ M	10 ⁻⁵ M
R-DEO	58	100	100	58	100	99
S-DEO	--	63	99	--	43	99
RS-DEO	36	99	101	34	99	95

Disse resultater indikerer at S-DEO har lavere affinitet for muscarin reseptor-subtyper enn både R- og racemisk DEO.

25

Binding til kalsiumkanaler

Prosent hemming av spesifikk radioligand-binding induisert av hver forbindelse (R-, S- og RS-DEO) ble testet ved diltiazem og verapamil-setene av L-type kalsiumkanal.

Resultatene er vist i tabell 8.

Tabell 8

Reseptor	R-DEO $10^{-5}M$	S-DEO $10^{-5}M$	RS-DEO $10^{-5}M$
Kalsium (diltiazem)	86	72	88
Kalsium (verapamil)	96	76	89

Disse resultater indikerer at S-DEO har kalsium-innstrømningsblokkerende aktivitet tilsvarende den til R- og racemisk DEO.

Funksjonelle karakteristikk av antimuscarinsk/antispasmodisk aktivitet

Effekten av R-, S- og RS-oksybutynin (OXY) og til R-, S- og RS-DEO ble studert i en in vitro modell av blærefunksjonen. Som beskrevet nedenfor ble isolerte striper av marsvin-blære glattmuskel montert i et vevsbad og kontraktet enten med den muscarine agonists karbachol eller med økende konsentrasjoner av ekstern kalium.

MATERIALER OG METODER

Blærestriper. Eksperimenter ble utført ved anvendelse av metoder tilsvarende de som er beskrevet av Kachur et al, 1988, og Noronha-Blob og Kachur, 1991. Vevstriper (omkring 10 mm lange og 1.5 mm brede) ble fjernet fra urinblæren til hankjønnets Hartley marsvin med vekt på 400-600 g. (Elm Hill Breeding Laboratories, Chelmsford, MA). Vevene ble suspendert i en oksygenert buffer med den følgende sammensetning, i mM: NaCl, 133; KCl, 4.7; $CaCl_2$, 2.5; $MgSO_4$, 0.6; NaH_2PO_4 , 1.3; $NaHCO_3$, 16.3; og glukose, 7.7. De ble holdt ved $37.5^\circ C$. Kontraksjoner ble målt med en isometrisk transduser (modell FT-10) og en blekk-skrivepolygraf (model 7) (Astro-Med, Inc., Grass Instrument Div., West Warwick, RI). En hvilespenning på 0.5 g ble holdt på alle vevene ved alle tider.

I hvert eksperiment ble opp til syv striper fjernet fra en enkel blære, suspendert i individuelle vevskammere og ekvilibrert med badsoppløsningen i 1 time før fortsettelse av eksperimentet.

Karbakol-induserte kontraksjoner. En serie eksperimenter fokuserte på den anti-cholinerge virkningen av oksybutynin. I disse eksperimenter ble, for å sikre levedyktigheten til hvert vev og for å tjene som referanseramme, kontraksjonene til hver vevsstripe registrert initielt som respons på eksponering for vevsmedium i hvilket NaCl var erstattet med KCl for å gi en konsentrasjon på 137.7 mM KCl i mediet. Dette ble fulgt av returnering til standard medium og så, ved eksponering for progressivt økende konsentrasjoner av karbakol med separate eksponeringer til hver konsentrasjon kun inntil toppresponsen hadde blitt registrert. Så ble en stripe etterlatt ubehandlet og/eller en stripe eksponert for 17 mM etanol for å tjene som kontrollvev, de gjenværende striper ble hver eksponert i 1 time for en konsentrasjon av en antagonist. Etanol-kontrollene ble benyttet når, på grunn av dårlig oppløselighet, stamopløsninger av testforbindelsene måtte bli preparert i etanol, som resultat av hvilket vevsbadene oppnådde en effektiv konsentrasjon på 17 mM etanol. Til sist ble responsen for økende konsentrasjon av karbakol fulgt av eksponering til 137.7 mM KCl, registrert en andre gang.

Kalium-induserte kontraksjoner. En andre serie eksperimenter fokusert på den spasmolytiske virkningen til de studerte stoffene. Kontraksjoner ble registrert som respons på sekvensielle økninger av konsentrasjoner av kalium i mediet.

20

Dataanalyse. For å bestemme om antagonistene reduserer toppresponsen overfor agonister, ble topptensjonen utviklet ved hver stripe i løpet av det andre settet bestemmelser uttrykt som en prosent av topptensjon utviklet under den første konsentrasjonseffekt-bestemmelsen. Så ble for hver antagonist de resulterende data analysert for behandlingsrelaterte forskjeller ved en-veis varians-analyse (ANOVA). Da kun en konsentrasjon av antagonist ble studert i hver blærestripe, ble prosedyren til Arunlakshana og Schild (1959) benyttet i modifisert form for å estimere pA_2 og hellingen av Schild-regresjonen. Først ble konsentrasjonene av agonist som gir halv maksimal respons (EC_{50}) estimert for hver stripe, fra det andre settet av konsentrasjonseffekt-data. EC_{50} ble oppnådd fra lineær regresjonsanalyse-tilpasning til logaritmen av konsentrasjonen av medikament, og responsen som understøtter det maksimale responsnivå. For hver medikamentbehandlet stripe ble et "konsentrasjons-forhold" (CR) beregnet som forholdet av EC_{50} i det behandlede vevet, dividert med EC_{50} til det ikke-behandlede vevet. For hvert eksperiment ble to eller flere striper eksponert for det samme kjemikaliyet, men ved forskjellige konsentrasjoner, logaritmen til dette forholdet minus 1 (dvs. logaritme (CR-1)) ble plottet mot logaritmen av konsentrasjonen av antagonist, til hvilke stripen hadde blitt eksponert for å produsere "Schild-plot". En

35

regresjonsanalyse vedrørende log (CR-1) til logaritmen til konsentrasjonen av antagonist, ble benyttet for å estimere pA2 og hellingen til regresjonslinjen. Til sist ble eksperimentene gruppert kjemisk og gjennomsnittet $\pm$ S.E. til pA2 og hellingen ble beregnet. 95 % sikkerhetsgrenser (CL) for hellingen ble estimert fra dets S.E. ved anvendelse av standardmetoder. For eksperimenter i hvilke kun en stripe var eksponert for et gitt kjemikalium, ble en pKD beregnet som (konsentrasjon av antagonist)/(CR-1) og den negative logaritmen til KD ble så slått sammen med pA2-verdiene for å gi et ekspandert sett pA2-verdier.

Resultater

Effektene av racemisk oksybutynin og DEO og deres respektive enantiomerer på karbakol-indusert kontraksjon er oppsummert i tabell 9 nedenfor. Verdier gitt som sum av Schild-analyser som gir pA2-verdier (gjennomsnitt $\pm$ SE) og helling (gjennomsnitt $\pm$ SE).

Tabell 9

Antagonist	Antall eksperimenter	pA2	Helling
R-OXY	4	8.80 $\pm$ 0.27	1.28 $\pm$ 0.26
S-OXY	4	7.09 $\pm$ 0.13	1.13 $\pm$ 0.17
RS-OXY	5	8.81 $\pm$ 0.29	1.34 $\pm$ 0.15
R-DEO	4	9.04 $\pm$ 0.32	1.16 $\pm$ 0.11
S-DEO	4	7.31 $\pm$ 0.35	0.87 $\pm$ 0.11
RS-DEO	4	8.55 $\pm$ 0.32	1.35 $\pm$ 0.25

Disse resultater indikerer at både S-OXY og S-DEO er mindre kraftige antagonister for blære-muscarin-reseptorer enn R- og racemisk OXY og R- og racemisk DEO.

Effekten av racemisk oksybutynin og dets enantiomerer på kalium-induserte kontraksjon er oppsummert i tabell 10 nedenfor. (Verdier er gitt i størrelsesorden kontraksjon induisert av 137.7 mM K⁺-buffer etter 60 min. eksponering fra forbindelser, dividert med størrelsen av kontraksjon induisert før eksponering fra medikamentet).

Tabell 10

Antagonist	Gjennomsnitt % behandling $\pm$ SE (n=3)
R-OXY	32 $\pm$ 8*
S-OXY	26 $\pm$ 9*
RS-DEO	20 $\pm$ 1*
R-DEO	36 $\pm$ 5*
S-DEO	42 $\pm$ 5*
RS-DEO	47 $\pm$ 8*

* Signifikant forskjell fra tilsvarende data for ikkebehandlet vev ($p < 0.01$).

Disse resultater indikerer at oksybutynin og dets enantiomerer og desetyloksybutynin og dets enantiomerer er like kraftige som plasmolytica for blærens glatte muskler.

KONKLUSJON

Mens det er velkjent at normal tømning av blæren er mediert gjennom cholinerge mekanismer, synes blæreustabiliteten som blir sett hos pasienter som lider av inkontinens å være relatert til ikke-cholinerge kontraksjoner i blæren. Andersen et al. [Neurourol Urodyn 5, 579-586 (1986)] har vist i dyr at den atropin-resistente detrusormuskelen er meget følsom for kalsium-antagonister.

Studiene av reseptor-bindings-affiniteter av (R)- og (S)-oksybutynin til reseptor-setene for kalsiumkanalblokkerne diltiazem og verapamil, beskrevet ovenfor, tillater en å konkludere med at S-oksybutynin og (S)-desetyloksybutynin har terapeutiske effekter på ufrivillig vannlating, mens, i motsetning til R-isomerene og racematene, har meget liten effekt på normale tømmingsmekanismer. Begge viser også signifikant reduserte anti-cholinerge bieffekter sammenlignet med de tilsvarende R-isomerene og med racematene. Unngåelsen av kardiovaskulære bieffekter som opptrer fra den anticholinerge virkningen av racemisk oksybutynin, skal spesielt noteres. Det konkluderes således med at S-oksybutynin og S-desetyloksybutynin er effektive medikamenter for behandling av urin inkontinens i mennesker med meget reduserte bieffekter i forhold til racemater eller rene R-enantiomerer.

Metyl (R)- α -cykloheksyl- α -hydroksybenzenacetat (IV)

Til en blanding av (R)- α -cykloheksyl- α -hydroksybenzeneddiksyre (III) (12.2 g, 52.1 mmol) og K_2CO_3 (10.8 g, 78.1 mmol) i 100 ml aceton ble tilsatt dråpevis metyljodid (MeI) (13.0 ml, 208 mmol) dråpevis ved 0°C i isbad. Etter tilsetning (ca. 1 time) av

5 MeI ble reaksjonsblandingen omrørt ved romtemperatur over natten. Blandingen ble filtrert gjennom en pute celitt og rensert med aceton to ganger. Filtratet ble konsentrert for å gi en hvit oppslemming som ble fortynnet med vann og ekstrahert med heptan. De sammenslåtte ekstraktene ble vasket med vann, saltvann, tørket og konsentrert for å gi

10 produktet (R)-IV (11.9 g, 92% utbytte) som et hvitt faststoff.

Metyl (S)- α -cykloheksyl- α -hydroksybenzenacetat (IV):

Ved å følge samme prosedyre som ovenfor ble (S)-IV (11.2 g, 100% utbytte) oppnådd som et hvitt faststoff fra (S)-III (10.6 g, 45.3 mmol).

4-[N-etyl-(4-metoksyfenyl)metylamino]-2-butynyl-(R)- α -cykloheksyl- α -hydroksybenzenacetat (VI):

Til en oppløsning av (R)-IV (11.9 g, 47.7 mmol) og 4-[N-etyl-(4-metoksyfenyl)metylamino]-2-butyn-1-ol (V) (9.30 g, 39.9 mmol) i 120 ml toluen ble det tilsatt NaOMe (0.222 g, 4.11 mmol). Reaksjonsblandingen ble omrørt ved

20 tilbaketløpskjøling i 5 timer og totalt 6 ml oppløsningsmiddel ble fjernet med Dean-Stark-apparat. Reaksjonsblandingen ble avkjølt til romtemperatur, fortynnet med etylacetat, vasket med vann, saltvann, tørket og konsentrert. Resten ble kromatografert på silikagel (eluering med 1 %, 2.5 % og så 5 % MeOH i CH_2Cl_2) for å gi produktet (R)-VI (14.1 g, 79 % utbytte) som en olje.

4-[N-etyl-(4-metoksyfenyl)metylamino]-2-butynyl-(S)- α -cykloheksyl- α -hydroksybenzenacetat (VI):

Ved at man følger samme prosedyre som ovenfor ble (S)-VI (4.24 g, 58 % utbytte) oppnådd som en olje fra (S)-IV (4.07 g, 16.4 mmol) og V (4.24 g, 18.2 mmol).

Racemisk 4-[N-etyl-(4-metoksyfenyl)metylamino]-2-butynyl-(S)- α -cykloheksyl- α -hydroksybenzenacetat:

Ved å følge samme prosedyre som ovenfor, ble den racemiske forløper for DEO (2.05 g, 43 % utbytte) oppnådd som en olje fra racemisk IV (2.98 g, 12.0 mmol) og V (2.48 g,

35 10.6 mmol).

4-(etyl-amino)-2-butynyl-(R)- α -cykloheksyl- α -hydroksybenzenacetat-hydroklorid-salt (VII)-HCl:

En oppløsning av (R)-VI (14.0 g, 31.2 mmol) og α -kloretyl-karbonkloridat (4.0 ml, 37.4 mmol) i 1,2-dikloretan ble omrørt under tilbakeløpskjøling i 1 time. Etter
5 avkjøling ble reaksjonsblandingen konsentrert og 200 ml MeOH tilsatt til resten. Reaksjonsblandingen ble så omrørt ved tilbakeløpskjøling i 20 min. og avkjølt til romtemperatur. Blandingen ble konsentrert og resten ble kromatografert på silikagel (eluert med 1 % og så 50 % MeOH i CH_2Cl_2) og så tritureert med eter for å gi produktet (R)-VII-HCl (8.93 g, 87 % utbytte) som et brunt faststoff. Dette brune faststoffet ble
10 ytterligere renset ved rekrystallisering fra EtOH/Et₂O og ved sekvensiell behandling med 10 % vandig K_2CO_3 og EtOAc, aktivt karbon og en oppløsning av 1N HCl i eter for å gi (R)-DEO-HCl (6.44 g) som et nær hvitt faststoff.

4-(etyl-amino)-2-butynyl-(S)- α -cykloheksyl- α -hydroksybenzenacetat-hydroklorid-salt (VII)-HCl:

15 Ved å følge den samme prosedyren som ovenfor ble (S)-DEO-HCl (5.27 g, 57 % utbytte) oppnådd som et nær hvitt faststoff fra (S)-VI (11.4 g, 25.4 mmol).

Racemisk 4-(etyl-amino)-2-butynyl- α -cykloheksyl- α -hydroksybenzenacetat-hydrokloridsalt:

20 Ved å følge den samme prosedyren som ovenfor ble (+)-DEO-HCl (0.63 g) oppnådd som et nær hvitt faststoff fra (+)-forløperen (2.28 g, 5.08 mmol).

S-oksybutynin kan også bli fremstilt den samme vei ved å benytte 4-(dietyl-amino)-2-butyn-1-ol i stedet for det beskyttede mellomproduktet V.
25

4-[N-etyl-4-(metoksyfenyl)metyl-amino]-2-butyn-1-ol (V) benyttet som et mellomprodukt ble syntetisert som følger:

N-etyl-4-metoksybenzenmetanamin:

30 Til en blanding av anisaldehyd (15.6 g, 115 mmol) og etylamin (2.0 M i THF, 87 ml, 174 mmol) i 1,2-dikloretan (450 ml) ble tilsatt iseddik (10.0 ml, 174 mmol) under nitrogenatmosfære. Reaksjonsblandingen ble omrørt ved romtemperatur i 30 min. og så avkjølt til 0°C med isbad. $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (36.9 g, 174 mmol) ble tilsatt porsjonsvis og
35 reaksjonsblandingen ble omrørt ved romtemperatur over natten. Blandingen ble konsentrert og resten ble fortynnet med en basisk oppløsning (10 g NaOH i 100 ml vann) for å gjøre oppløsningen svakt basisk. Dette vandige laget ble ekstrahert med

eter. De sammenslåtte ekstraktene ble vasket med vann, saltvann, tørket og konsentrert. Resten ble kromatografert på silikagel (eluert med 5 % MeOH i CH₂Cl₂ og så 50 % MeOH i CH₂Cl₂ inneholdende 4 % Et₃N) for å gi produktet (11.2 g, 59 % utbytte) som en olje.

5

N-[N-etyl-(4-metoksyfenyl)metylamino]-2-butyn-1-ol (V):

En blanding av N-etyl-4-metoksybenzenmetanamin (13.3 g, 80.6 mmol), paraformaldehyd (3.63 g) propargylalkohol (6.33 g, 113 mmol) og CuCl (0.311 g) i 350 ml 1,4-dioksan ble omrørt ved tilbakeløpskjøling i 30 min. Reaksjonsblandingen ble avkjølt til romtemperatur og konsentrert. Resten ble fortynnet med 200 ml 50 % NH₄OH og ekstrahert med EtOAc. De sammenslåtte ekstraktene ble vasket med vann, saltvann, tørket og konsentrert. Resten ble kromatografert på silikagel (eluering med 2.5 % MeOH i CH₂Cl₂ og så 5 % MeOH i CH₂Cl₂) for å gi produktet V (15.1 g, 81 % utbytte) som en olje.

15

P a t e n t k r a v

1.

Anvendelse av en forbindelse valgt blant gruppene omfattende (S)-oksybutynin, (S)-desetyloksybutynin og farmasøytisk akseptable salter derav, hvor forbindelsen
5 inneholder minst 90 vekt-% (S)-oksybutynin eller (S)-desetyloksybutynin, og 10 vekt-% eller mindre av (R)-oksybutynin eller (R)-desetyloksybutynin, for fremstilling av et medikament for behandling av urininkontinens.

10 2.

Anvendelse ifølge krav 1, hvor forbindelsen inneholder minst 99 vekt-% (S)-oksybutynin eller (S)-desetyloksybutynin og 1 vekt-% eller mindre (R)-oksybutynin eller (R)-desetyloksybutynin, for fremstilling av et medikament for behandling av
urininkontinens.

15

3.

Anvendelse ifølge krav 1 eller 2 for fremstilling av et medikament for administrering ved inhalering eller for administrasjon parenteralt, transdermalt, rektalt eller oralt.

20 4.

Farmasøytisk enhets-doseringsform i form av en tablett eller kapsel, k a r -
a k t e r i s e r t v e d at den omfatter en terapeutisk effektiv mengde
av en forbindelse valgt blant gruppen (S)-oksybutynin og (S)-desetyloksybutynin eller et
farmasøytisk akseptabelt salt derav, hvor forbindelsen inneholder minst 90 vekt-%,
25 fortrinnsvis minst 99 vekt-%, (S)-oksybutynin eller (S)-desetyloksybutynin og 10 vekt-% eller mindre, fortrinnsvis 1 vekt-% eller mindre, (R)-oksybutynin eller (R)-desetyloksybutynin og en farmasøytisk akseptabel bærer.

5.

30 Farmasøytisk enhets-doseringsform ifølge krav 4, k a r a k t e r i -
s e r t v e d at den omfatter 0.5 til 100 mg (S)-oksybutynin eller (S)-desetyloksybutynin.

6.

35 Farmasøytisk doseringsform i form av en transdermal leveringsanordning,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter en terapeutisk effektiv
mengde av en forbindelse valgt blant gruppen (S)-oksybutynin og (S)-

desetyloksybutynin eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, hvor forbindelsen inneholder minst 90 vekt-%, fortrinnsvis minst 99 vekt-%, (S)-oksybutynin eller (S)-desetyloksybutynin og 10 vekt-% eller mindre, fortrinnsvis 1 vekt-% eller mindre, (R)-oksybutynin eller (R)-desetyloksybutynin og en farmasøytisk akseptabel bærer. hvor
5 den farmasøytisk akseptable bærer eventuelt omfatter en permeabilitetsøker.