

(19) DANMARK



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 160805 B

(21) Patentansøgning nr.: 2134/84

(22) Indleveringsdag: 27 apr 1984

(41) Alm. tilgængelig: 30 okt 1984

(44) Fremlagt: 22 apr 1991

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 29 apr 1983 GB 8311804

(51) Int.Cl.⁵ A 61 K 31/22
// (A 61 K 31/22,
A 61 K 31:195)

(71) Ansøger: *Merrell Dow Pharmaceuticals Inc.; 2110 East Galbraith Road; Cincinnati; Ohio 45215, US

(72) Opfinder: Nikolaus *Seiler; FR, Shakir *Sarhan; FR

(74) Fuldmægtig: Ingeniørfirmaet Budde, Schou & Co.

(54) Farmaceutisk middel til bekæmpelse af anfald af sygdomme, der involverer kramper

(56) Fremdragne publikationer

FR off. g. skrift nr. 2437834

US pat. nr. 3960927

(57) Sammendrag:

2134-84

Glycin, sarcosin eller N,N-dimethylglycin eller en C₁-C₈-alkylester deraf eller et farmaceutisk acceptabelt salt heraf udviser sammen med gamma-vinyl-GABA en synergistisk virkning ved behandling af sygdomme, der involverer anfald af kramper, især epilepsi. Et middel indeholdende disse komponenter, eventuelt kombineret med et bærestof eller strækemiddel herfor, anvises til behandling af patienter med denne tilstand.

Opfindelsen angår et farmaceutisk middel til bekæmpelse af anfald af sygdomme, der involverer kramper, hos patienter med behov derfor.

Gamma-aminosmørsyre (GABA) er en afgørende inhibitorisk neurotransmitter for centralnervesystemet (CNS). Forskellige teorier har været fremført, som inddrager mangler ved GABA-medieret neuronal inhibition som en bidragende faktor ved det sygdomsbillede (pathogenese), som slagtilfælde og lignende sygelige tilstande såsom epilepsi indebærer. Hos laboratoriedyr fører en nedgang i centralnervesystemets gamma-aminosmørsyre-aktivitet (CNS GABA-ergisk aktivitet) til kramper, medens en forøgelse i CNS GABA-koncentrationerne beskytter mod anfald (jfr. B. Meldrum, Lancet 1978 II, side 304-306, og L. Spero, Lancet 1982, side 1319-1322). Den virkningsmekanisme, som mange midler mod slagtilfælde udviser, kan forklares ved, at de fremkalder virkninger, der til sidst resulterer i forøget GABA-ergisk funktion (jfr. L. Spero ovenfor, P. Schechter m.fl., i Enzyme-activated Irreversible Inhibitors, N. Seiler, M. Jung og J. Koch-Weser, udgivet på forlaget Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, New York og Oxford 1978, side 148-162, S. Sarhan m.fl., J. Neurosci. Res., 4, side 399-421 (1979), K. Gale m.fl., Science, 208, side 288-291 (1980) og N. Seiler m.fl., i Neurochemistry and Clinical Neurology, L. Battistin, G. Hashim og A. Lajtha udgivet på forlaget Alan R. Liss, New York, 1980, side 425-439).

GABA og dens forstadier (precursors) vil kun vanskelig krydse hjernens blodbarriere. Imidlertid har en teori til forøgelse af GABA-koncentrationerne i CNS gået ud på at blokere dens omsætning i stofskiftet (katabolismen). Det er således kendt, at gamma-vinyl-GABA (dvs. 4-amino-hex-5-ensyre), der herefter skal betegnes GVG, er en selektiv, enzymaktiveret, irreversibel inhibitor for GABA-transaminase (GABA-T) (jfr. således B. Metcalf, Biochem. Pharmacol., 28, side 1705-1712 (1979) og B. Lippert

m.fl., Eur. J. Biochem., 74, side 441 (1977)), som er det enzym, der er ansvarligt for GABA-katabolisme. Indgivelse af GVG til laboratoriedyr frembringer dosisrelaterede forøgelse af GABA-koncentrationerne i hjernen (jfr. således

5 M. Jung m.fl., J. Neurochem., 29, side 797-802 (1977), P. Schechter m.fl., Europ. J. Pharmacol., 45, side 319-328 (1977), og M. Jung i Enzyme-activated Irreversible Inhibitors, N. Seiler, M. Jung, og J. Koch-Weser udgivet på forlaget Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford (1978), side 135-148) og i cisternerocerotobrospinalvæske (CSF) (jfr. således P. Böhlen m.fl., Brain Res., 167, side 297-305 (1979)). Hos mennesker frembringer behandling med oralt indgivet GVG forøgelse i GABA-koncentrationerne i CSF opnået via lumbalpunktur

10 (jfr. således J. Grove m.fl., Life Sci., 28, side 2431-2439 (1981)). Endvidere udviser GVG antikrampeaktivitet overfor flere forskellige antianfaldsmodeller hos dyr (jfr. således P. Schechter m.fl., i GABA-Biochemistry and CNS-Functions, P. Mandel og F. DeFeudis, udgivet på forlaget

20 Plenum, New York, (1979) side 43-57, M. Palfreyman m.fl., Biochem. Pharmacol., 8, side 817-824 (1981), P. Schechter m.fl. i Enzyme-activated Irreversible Inhibitors, N. Seiler, M. Jung and J. Koch-Weser, udgivet på forlaget Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, New York,

25 Oxford, (1978) side 148-162 og B. Meldrum, Clin. Neuropharmacol, side 293-316 (1982)). I øvrigt har kliniske undersøgelser hos mennesker demonstreret, at daglige doser på 1-4 g GVG i opdelte enkeltdoser (sædvanligvis indgivet to gange dagligt), der indgives til epileptiske patienter,

30 som er blevet modstandsdygtige overfor konventionelle anti-anfaldsmedikamenter, frembringer en nedgang i anfaldenes hyppighed og alvorlighed.

I US patentskrift nr. 3.960.927 er det angivet, at GVG kan indgives i kombination med en farmaceutisk bærer

35 til et bredt område af anvendelser, bl.a. ved behandling af slagtilfælde eller krampetilstande, der er forbundet med

epilepsi. Patentskriftet indeholder imidlertid hverken resultater af dyreforsøg eller kliniske afprøvningseksempler. Desuden har det dosisområde på 25-200 mg pr. kg, som angives for de beskrevne forbindelser med formlen II, og som anføres at være effektivt til behandling af slagtilfælde og kramper, vist sig at være meget unøjagtigt, i det mindste ved indgivelse af GVG i doser på op til 100 mg pr. kg til behandling af de nævnte lidelser. Dette fremgår tydeligt af forsøgsresultaterne i den i det følgende viste tabel 1, hvor doser på 50 og endog 100 mg GVG pr. kg alene stadig er utilstrækkeligt virksomme, jfr. det følgende under overskriften "a) Anfald fremkaldt med mercaptopropionsyre...", ved behandling af lidelserne. I US skriftet beskrives der ingen kombination af de beskrevne lægemidler med noget glycin- eller sarcosin-derivat.

I FR offentliggørelsesskrift nr. 2.437.834 angives det, at glycin kan indgives til oral behandling af cerebral dysfunktion sammen med en bærer i en dosis på fra 20 til 200 mg pr. kg. De i den følgende tabel 1 viste resultater viser imidlertid igen, at selv ved højere doser er glycin indtaget alene relativt indifferent ved behandling af slagtilfælde eller kramper. I FR skriftet omtales der ingen kombination af glycin med GVG.

Det har nu ifølge opfindelsen vist sig, at der kan tilvejebringes et farmaceutisk middel af den omhandlede art, hvilket middel gennem et indhold af gamma-vinyl GABA kombineret med glycin eller et nærmere defineret glycin-derivat udøver en på baggrund af det kendte overraskende og fordelagtig synergistisk effekt ved behandling af de allerede omtalte lidelser.

Det farmaceutiske middel ifølge opfindelsen er således ejendommeligt ved, at det omfatter

- a) en effektiv mængde gamma-vinyl GABA eller et farmaceutisk acceptabelt salt deraf og
- b) en effektiv mængde glycin, sarcosin (N-methylglycin) eller N,N-dimethylglycin eller en C₁-C₈-alkylester

deraf eller et farmaceutisk acceptabelt salt deraf og eventuelt

- c) en farmaceutisk acceptabel bærer eller fortyndingsmiddel.

5 Således som her anvendt indbefatter udtrykket "anfald" både krampeanfald og anfald, hvortil der ikke er knyttet deciderede kramper, hvilket f.eks. kan være tilfældet med epilepsi, traumatiske tilstande, medikamentafvænnning (f.eks. alkoholafvænnning, barbituratafvænnning og benzodiazepinafvænning), stivkrampe (tetanus), stofskiftesygdomme, forhøjet legemstemperatur, indførelse af nye medikamenter (theophyllin) og porphyri. Behandlingen af anfald knyttet til epilepsi er dog hovedsigtet med midlet ifølge opfindelsen. Ved udtrykket "bekæmpelse" forstås den mekanisme, at man ved midlets indgivelse sænker anfaldenes alvorlighed og/eller hyppighed (frekvens).

20 Udtrykket C₁-C₈-alkyl skal forstås som ligekædede eller forgrenede alkyldele indeholdende fra 1-8 carbonatomer, f.eks. methyl, ethyl, propyl, isopropyl, butyl, isobutyl, pentyl, hexyl eller octyl. Foretrukne alkylgrupper er sådanne med 1-4 carbonatomer, især methyl eller ethyl. C₁-C₈-alkylestere af glycin, sarcosin eller N,N-dimethylglycin er enten kendte forbindelser eller kan fremstilles ved konventionelle metoder.

25 Illustrative eksempler på sådanne farmaceutisk acceptable salte indbefatter f.eks. følgende:

- a) ugiftige syreadditionssalte, som dannes med uorganiske syrer såsom saltsyre, brombrintesyre, svovlsyre og phosphorsyre, eller med organiske syrer såsom organiske carboxylsyrer, f.eks. salicylsyre, maleinsyre, malonsyre, vinsyre, citronsyre og ascorbinsyre samt organiske sulfonsyrer, f.eks. methansulfonsyre, og
- 30 b) ugiftige salte, som dannes med uorganiske eller organiske baser såsom hydroxider af alkalimetaller, f.eks. natrium, kalium og lithium, jordalkalimetaller, f.eks. calcium og
- 35 magnesium, letmetaller tilhørende det periodiske systems

hovedgruppe III, f.eks. aluminium, organiske aminer såsom primære, sekundære eller tertiære aminer, f.eks. cyclohexylamin, ethylamin, methylamino-ethanolamin og piperidin.

5 Saltene fremstilles ved konventionelle metoder.

Således som anvendt i den foreliggende beskrivelse med krav betegner "gamma-vinyl GABA" (GVG) S-gamma-vinyl-GABA (S-GVG) eller blandinger af S-gamma-vinyl-GABA med R-gamma-vinyl-GABA såsom racematet, (R,S)-gamma-vinyl-GABA
10 (R,S-GVG). R-GVG inhiberer ikke GABA-T irreversibelt. Således er R-GVG i en form, der er helt fri for S-GVG, ikke anvendelig til de her beskrevne formål. Med mindre andet er anført, er de her udtrykkeligt anførte doseringer forskellige steder i beskrivelsen anvendelige for R,S-GVG.
15 Som det vil være indlysende for fagfolk, kan doseringer, der er anvendelige for S-GVG, sænkes til ca. det halve af de doseringer, der er anvendelige for R,S-GVG.

Virkningen af indgivelsen af GVG i kombination med glycin, sarcosin eller N,N-dimethylglycin eller en alkylester
20 eller et salt deraf til bekæmpelse af anfald har som nævnt vist sig at være synergistisk, idet indgivelse af kombinationen giver større virkning til bekæmpelse af anfald end den, der er mulig med indgivelse af de individuelle forbindelser. Den synergistiske virkning for glycin, sarcosin
25 eller N,N-dimethylglycin eller en ester eller et salt deraf sammen med indgivelse af GVG ved behandlingen af anfald tillader, at man indgiver GVG i dosisniveauer, der generelt er væsentligt lavere end dem, der kræves ved indgivelse af GVG alene. Iøvrigt bliver indgivelsen af glycin, sarcosin
30 eller N,N-dimethylglycin eller en ester eller et salt deraf i kombination med GVG en større forekomst af vellykket bekæmpelse af anfald end den, der kan opnås med GVG alene ved det samme doseringsniveau.

Hensigtsmæssige doseringer af GVG, glycin, sarcosin eller N,N-dimethylglycin eller en ester eller et salt
35 deraf vil være en hvilken som helst mængde, som er effek-

0 tiv til at sænke alvorligheden og/eller frekvensen af anfald hos en patient, som lider heraf. Den effektive dosis vil variere af patientens almene tilstand og anfaldets specifikke art, alvorlighed og/eller frekvens.

5 I almindelighed kan den effektive dosis, når man benytter en kombinationsterapi til bekæmpelse af anfald, ved indgivelse af GVG, sænkes med en faktor på 2-5. Således vil den effektive dosis GVG, såsom ved behandlingen af epileptiske anfald, ligge i intervallet fra ca. 0,2 til ca. 2 g pr. dag, der fortrinsvis indgives oralt i opdelte doser.

10 I almindelighed vil den effektive dosering af glycin, sarcosin eller N,N-dimethylglycin eller en ester eller et salt deraf ligge i størrelsesordenen fra ca. 2 til ca. 12 g pr. dag, fortrinsvis indgivet oralt i opdelte doser. Et foretrukket doseringsinterval er fra 3 til 4 g pr. dag. Da glycin er ugiftigt, er der ikke nogen øvre grænse for den daglige effektive dosis heraf udover den grænse, der må sættes ud fra praktiske overvejelser.

15 Det vil forstås, at glycin, sarcosin eller N,N-dimethylglycin eller en ester eller et salt deraf kan indgives i kombination med GVG på flere forskellige måder. Fortrinsvis kan glycin, sarcosin eller N,N-dimethylglycin eller en ester eller et salt deraf indgives samtidig med GVG. Imidlertid kan glycin, sarcosin eller N,N-dimethylglycin eller en ester eller et salt deraf også indgives før indgivelsestidspunktet for GVG eller ind imellem de tidspunkter, hvor GVG indgives.

20 Til behandlingen af epileptiske anfald gives GVG fortrinsvis i opdelte doser 2 gange dagligt. Imidlertid kan GVG også indgives én gang dagligt eller endog én gang hver anden dag, hvilket afhænger af den særlige patient.

25 Det vil også forstås, at ved behandlingsmetoden med midlet ifølge opfindelsen kan man anvende denne på patienter, der modtager andre medikamenter til bekæmpelse af anfald, når anfaldene ikke kan reguleres fuldstændigt ved hjælp af en sådan medikamentbehandling; naturligvis

35

0 forudsat at der ikke består nogen skadelig indbyrdes reaktion mellem de pågældende medikamenter.

De her beskrevne aktive forbindelser til kombinationsterapi mod anfald kan indgives på forskellige måder for at opnå den ønskede virkning. De aktive forbindelser
5 kan indgives særskilt eller i indbyrdes blandinger. Fortrinsvis indgives de aktive forbindelser sammen med farmaceutisk acceptable bærere eller fortyndingsstoffer, idet andelen og arten heraf bestemmes af forbindelsernes opløselighed og kemiske egenskaber iøvrigt, den valgte indgivesvej og standardfarmaceutisk praksis. De aktive forbindelser kan indgives enten særskilt eller i blandinger,
10 oralt i faste doseringsformer, f.eks. kapsler, tabletter, pulvere, eller i flydende former, f.eks. opløsninger eller suspensioner. De aktive forbindelser kan også indsprøjtes parenteralt i form af sterile opløsninger eller suspensioner. Faste orale former kan indeholde konventionelle strækkemidler, f.eks. lactose, saccharose, magnesiumstearat, harpikser og lignende materialer. Flydende orale former kan indeholde forskellige smags- og aromastoffer, farvestoffer, konserveringsmidler, stabilisatorer,
20 opløseliggørende eller suspenderende midler. Parenterale præparater er sterile vandige opløsninger eller suspensioner, der kan indeholde forskellige konserverende, stabiliserende, puffrende, opløseliggørende eller suspenderende midler. Om ønsket kan tilsætningsstoffer såsom saltvand eller glucoseopløsning tilføjes for at gøre opløsningerne isotoniske. Doseringsformer med vedvarende eller forlænget frigivelse kan også benyttes.

Udtrykket "enhedsdosisform" således som her anvendt
30 skal forstås som en enkelt eller en flerdobbelt dosisform indeholdende en mængde af den aktive bestanddel i blanding med eller på anden måde knyttet til fortyndingsmidlet eller bæreren, idet denne mængde er en sådan, at én eller flere forudbestemte enheder normalt behøves til opnåelse
35 af en enkelt terapeutisk indgift. I tilfælde af multiple dosisformer såsom væsker eller tabletter forsynet med dele-

kærv vil denne forudbestemte enhed kun udgør en brøkdel såsom 5 ml (en teske) af væskemængden eller en halv eller en kvart kærvdelt tablet, dvs. kun en andel af multipel-dosisformen.

5 De her omhandlede farmaceutiske midler fremstilles på i og for sig velkendt måde indenfor den farmaceutiske teknik og vil omfatte:

- a) en effektiv mængde GVG eller et farmaceutisk acceptabelt salt deraf og
- 10 b) en effektiv mængde glycin, sarcosin eller N,N-dimethylglycin eller en C₁-C₈-alkylester deraf eller et farmaceutisk acceptabelt salt deraf, enten alene eller i-blandet eller på anden måde knyttet til en farmaceutisk acceptabel bærer eller et fortyndingsmiddel herfor. En
- 15 bærer eller et fortyndingsmiddel kan være fast, halvfast eller et flydende materiale, der tjener som bæremedium, strækkemiddel eller opslæmningsmiddel for den aktive bestanddel. Hensigtsmæssige fortyndingsmidler eller bærere er velkendte som sådanne. De farmaceutiske
- 20 præparater kan tilpasses til oral eller parenteralt anvendelse og kan indgives til patienten i form af tabletter, kapsler, suppositorier, opløsninger eller suspensioner. Doseringsformer med forlænget eller forsinket frigivelse af glycin, sarcosin eller N,N-dimethylglycin
- 25 eller et salt eller en ester deraf kan også anvendes.

Forholdet mellem GVG og glycin, sarcosin eller N,N-dimethylglycin eller en ester eller et salt deraf ligger i intervallet fra 1:1 til 1:60. Fortrinsvis ligger det i intervallet fra 1:3 til 1:10.

- 30 Mængden af aktiv forbindelse, som er til stede i de farmaceutiske sammensætninger, vil variere og kan være en hvilken som helst effektiv mængde. Enhedsdoser af disse forbindelser kan f.eks. indeholde fra ca. 50 mg til ca. 100 mg GVG og fra ca. 250 mg til ca. 500 mg glycin, sarcosin
- 35 eller N,N-dimethylglycin eller en ester eller et salt deraf og kan f.eks. indgives én eller flere gange dagligt alt efter behov.

Midlet ifølge opfindelsen kan omfatte en pakning, der indeholder en mængde farmaceutisk acceptable orale doseringsformer af GVG eller et farmaceutisk acceptabelt salt deraf og i en herfra særskilt form en mængde farmaceutisk acceptable orale doseringsformer af glycin, sarcosin eller N,N-dimethylglycin eller en C₁-C₈-alkylester deraf eller et farmaceutisk acceptabelt salt heraf. Doseringsformerne kan være en tablet, en kapsel, et pulver eller en væske, som er velegnede til oral indgift. Anvendelse af ovennævnte pakning letter indgiften af særskilte doseringer af GVG og glycin, sarcosin eller N,N-dimethylglycin. Selv om medikamenterne gives patienten særskilt, er det klart, at glycin, sarcosin eller N,N-dimethylglycin kan indgives enten før indgivelses-tidspunktet for GVG eller til samme tid, som GVG indgives. Glycin, sarcosin eller N,N-dimethylglycin kan også indgives mellem de tidspunkter, hvor GVG gives. Samtidig indgift af medikamenterne foretrækkes.

De synergistiske virkninger i retning af bekæmpelse af anfald, som opnås med GVG kombineret med glycin, sarcosin, N,N-dimethylglycin eller en alkylester deraf, kan demonstreres hos mus, der viser anfald fremkaldt ved indgiften af 3-mercaptopropionsyre (MPA). Det forholder sig nemlig således, at MPA er en konkurrerende inhibitor for glutamatdecarboxylase, og dens virkninger ved fremkaldelse af anfald antages at vækkes i kraft af dens specifikke forringelse af GABA-systemet (jfr. således B. Meldrum, i Int. Rev. Neurobiol, 17, side 1-36 (1975)). Den anvendte procedure og de opnåede resultater ved afprøvningen af GVG kombineret med glycin, glycinethylester, N,N-dimethylglycin og sarcosin overfor MPA-fremkaldte anfald hos mus er beskrevet nedenfor i eksempel 1-3, tabel 1, 1a, 2, 3 og 3a.

De virkninger til bekæmpelse af anfald, som GVG og glycin udviser, er også undersøgt hos andre modeller af museanfald, specifikt anfald fremkaldt med (+)-bicucullin, med metrazol, med picrotoxinin og med stryknin. De anvend-

0 te procedure og de opnåede resultater ved disse yderligere
afprøvninger er anført nedenfor i eksempel 4 (anfald frem-
kaldt med bicucullin), eksempel 5 (fremkaldt med metrazol),
eksempel 6 (anfald fremkaldt med picrotoxinin) og eksem-
5 pel 7 (anfald fremkaldt med stryknin).

Betydningen af dyremodelforsøg ved fremkaldelse
og modvirkning af sådanne anfald således som beskrevet i
eksempel 1-7 skal herefter gennemgås nedenfor:

10 a) Anfald fremkaldt med mercaptopropionsyre (tabel 1, 1a,
2, 3 og 3a):

Ud fra de i nedenstående tabel 1 anførte data kan
det ses, at en dosis på 200 mg/kg (i.p.) af GVG beskytter
60% af dyrene mod anfald fremkaldt med 40 mg/kg (i.p.)
15 MPA, dvs. at GVG's ED₅₀ er mellem 150 og 200 mg/kg. Men
selv ved denne dosis iagttages toniske udretninger af
baglemmerne hos 1 ud af 10 dyr. GVG (300 mg/kg i.p.) be-
skytter 90% af dyrene mod anfald fremkaldt med MPA. Højere
doser forøger ikke virkningerne mod anfald yderligere.
20 Tværtimod viser det sig, at såfremt GVG-doserne hæves o-
ver 750 mg/kg, formindskes beskyttelsen mod anfald frem-
kaldt med MPA tydeligt (jfr. således N. Seiler m.fl. i
Neurochemistry and Clinical Neurology, L. Battistin, G.
Hashim og A. Lajtha udgivet på forlaget Alan Lin, New
York (1980) side 425-439). Således som det ses i tabel 1
25 beskytter en subcutan (s.c.) dosis glycin på så meget som
2,2 g/kg kun 40% af dyrene, og en subcutan dosis på 750
mg/kg (s.c.) glycin beskytter kun 20% af dyrene. Men når
1,5 g glycin indgives subcutant fire timer efter indgift
30 af 50 mg/kg GVG (dvs. en tydeligt ineffektiv dosis af GVG
som sådan), kan der opnås fuldstændig beskyttelse mod an-
fald fremkaldt med MPA.

Glycins antikrampevirkning er kortvarig. Der op-
nås maksimal beskyttelse ca. én time efter indgiften her-
af. To timer efter glycinindgift kan der ikke konstateres
35 signifikant virkning mod anfald, hvilket er vist i tabel
1a. Dataene i tabel 1a er opnået efter indgift af glycin

0 med mavesonde. En sammenligning af de i tabel 1 viste data med de i tabel 1a viste data demonstrerer endvidere, at indgivelsesmåden for glycin kun har ringe virkning på dens antikonvulsive aktivitet.

5 De i tabellerne 2, 3 og 3a angivne data demonstrerer, at glycinethylester, N,N-dimethylglycin og sarcosin har en kraftig forøgende virkning på GVG af lignende art som glycin; men glycinethylester og sarcosin virker længere end glycin ved en iøvrigt ækvivalent dosis.

10 b) Anfald fremkaldt med bicucullin (tabel 4):

I et tidligere arbejde har GVG injiceret intra-peritonealt vist sig ineffektivt mod anfald fremkaldt ved hjælp af indgift af 3 mg/kg bicucullin (s.c.) (jfr. således P. Schechter m.fl. i Enzyme-activated Irreversible Inhibitors, N. Seiler, M. Jung og J. Koch-Weser udgivet på forlaget Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford (1978) side 148-162). Anfald fremkaldt ved intravenøs indgift (i.v.) af 0,55 mg/kg bicucullin kan modvirkes (antagoniseres) ved hjælp af GVG (jfr. således W. Buckett, J. Pharmacol. Meth., 5, 35, 41 (1981)) ved et ED₅₀ på 54 mg/kg. Et senere, men ikke-publiceret arbejde antyder, at ED₅₀ er ca. 220 mg/kg.

25 De i tabel 4 viste forsøg er udført under anvendelse af injektioner på 1,8 mg/kg bicucullin. De i tabel 4 viste data godtgør, at med 200 mg/kg GVG alene kan der opnås en signifikant beskyttelsesvirkning, og denne kan forbedres yderligere ved indgift af glycin. Imidlertid synes bicucullinprøven som helhed ikke at være tilstrækkelig godt reproducerbar, hvilket sandsynligvis skyldes en meget stejl dosisresponskurve.

30 c) Anfald fremkaldt med metrazol (tabel 5):

Ifølge ikke-publicerede data kan intravenøse doser på 30 og 40 mg/kg metrazol modvirkes (antagoniseres) ved hjælp af GVG (med hhv. ED₅₀ = 40 og ED₅₀ = 52 mg/kg); men GVG er ineffektivt overfor en indgift på 60 mg/kg af det krampefremkaldende stof.

0 Ved de i tabel 5 nedenfor anførte forsøg fremkal-
des kramper ved hjælp af interperitoneal injektion af
75 mg/kg metrazol. Under disse betingelser viser alle dyr
i almindelighed stødvide kramper (klonisk konvulsion).
Tidsrummet mellem metrazolindgift og anfaldenes indtræden
5 er ca. 70 sekunder. En interperitoneal dosis på 750 mg/kg
GVG indgivet 5 timer før metrazolindgift tilvejebringer
ingen beskyttelse mod anfald fremkaldt med metrazol, og
indgift af glycin alene er også ineffektiv, hvilket alle-
rede tidligere er demonstreret. Hvis derimod glycin ind-
10 gives efter GVG, falder antallet af dyr i krampe med sti-
gende doser af glycin, og tidsrummet til anfaldets ind-
træden forlænges.

15 d) Anfald fremkaldt med picrotoxinin (tabel 6):

Anfald fremkaldt med indgift af picrotoxinin kan
ikke påvirkes signifikant ved forudgående behandling med
hvh. enten GVG eller glycin eller med en kombination af
de to forbindelser.

20 e) Anfald fremkaldt med stryknin (tabel 7):

GVG indgivet i en dosis på 750 mg/kg forhindrer
ikke anfald fremkaldt med stryknin, og tidsrummet, der
hengår mellem det krampefremkaldende middels indgift og
indtræden af tonisk udretning af baglemmerne, forlænges
25 heller ikke signifikant. En stor dosis glycin (2,2 g/kg)
forlænger imidlertid tidsrummet mellem indgift af krampe-
fremkaldende middel og den første anfaldsepisodes indtræ-
den, og dette tidsrum forøges yderligere ved behandling
med GVG og glycin.

30 Det vil forstås, at glycin, sarcosin eller N,N-
-dimethylglycin eller en C₁-C₈-alkylester eller et farma-
ceutisk acceptabelt salt deraf vil frembringe en syner-
gistisk virkning på andre GABA-T-inhibitorer end GVG til
bekæmpelse af anfald. Således kan i almindelighed en hvil-
35 ken som helst GABA-T-inhibitor kombineres med glycin,
sarcosin eller N,N-dimethylglycin eller en ester eller

0 et salt deraf til effektiv bekæmpelse af sygdomme, der
er prægede af krampeanfald. I særdeleshed kan følgende
GABA-T-inhibitorer udover GVG anvendes: (S)- eller (R,S)-
-4-amino-hepta-5,6-diensyre, gamma-acetylenisk GABA,
aminooxyeddikesyre, ethanolamin-O-sulfat, gabaculin og
5 isogabaculin. (S)- eller (R,S)-4-amino-hepta-5,6-diensyre
er beskrevet i GB patentansøgning nr. 82/14290. Gamma-
-acetylenisk GABA, aminooxyeddikesyre, ethanolamin-O-sul-
fat, gabaculin og isogabaculin er kendte forbindelser (se
f.eks. M. Palfreyman m.fl. Biochem. Pharmacol, 30, 817
10 (1981)).

For såvidt som GABA-T-inhibitorer er indirekte
GABA-antagonister, er det klart, at direkte virkende GABA-
-antagonister, f.eks. forbindelser der aktiverer GABA-
-receptorer direkte, således at deres antikonvulsive virk-
15 ninger vækkes, også kan få deres antikonvulsive virkninger
forøget ved indgiften i kombination med glycin, sarcosin
eller N,N-dimethylglycin eller en ester eller et salt der-
af.

Den synergistiske virkning af glycin, sarcosin
20 eller N,N-dimethylglycin eller en ester eller et salt der-
af på en GABA-T-inhibitor eller en direkte virkende GABA-
-antagonist ved behandlingen af anfald tillader GABA-T-
-inhibitorerne eller de direkte virkende GABA-antagonis-
ter at indgives i almindelighed ved dosisniveauer, som er
25 signifikant lavere end dem, der kræves med GABA-T-inhibi-
toren eller den direkte virkende GABA-antagonistdosis. I
øvrigt tilvejebringer indgivelsen af glycin, sarcosin el-
ler N,N-dimethylglycin eller en ester eller et salt deraf
i kombination med en GABA-T-inhibitor eller en direkte
30 virkende GABA-antagonist en større eller hyppigere fore-
komst af bekæmpelse af anfald end den, der kan opnås ved
anvendelse enten af en GABA-T-inhibitor eller en direkte
virkende antagonist alene ved det samme doseringsniveau.
Hensigtsmæssige doseringer af GABA-T-inhibitoren eller den
35 direkte virkende GABA-antagonist og hhv. glycin, sarcosin
eller N,N-dimethylglycin eller en ester eller et salt der-

0 af vil være en hvilken som helst mængde, der er effektiv
til at sænke anfaldenes alvorlighed og/eller frekvens hos
den pågældende angrebne patient.

Følgende eksempler tjener til at beskrive afprøv-
ningen af GVG kombineret med glycin, glycinethylester,
5 N,N-dimethylglycin eller sarcosin for forbindelsernes evne
til at antagonisere eller inhibere anfald fremkaldt ved
hjælp af MPA (hhv. eksempel 1, 2, 3 og 3a), (+)-bicucullin
(eksempel 4), metrazol (eksempel 5), picrotoxinin (eksem-
pel 6) og stryknin (eksempel 7).

10 Efter interperitoneale (i.p.) doser af GVG på mel-
lem 100 mg/kg og 1500 mg/kg når GABA i musehjerner dosis-
afhængige niveauer indenfor 5 timer, som opretholdes i
det mindste de følgende 19 timer. Beskyttelse med GVG mod
kemisk fremkaldte angreb afprøves derfor altid 5 timer
15 efter dettes indgift.

Ved alle forsøgene er anvendt hanmus af stammen
CD1 (Charles River fra Saint-Aubin-les-Elbeuf i Frankrig),
der vejer 40 g \pm 4 g. Disse mus holdes i grupper på 10 i
standardplastbure ved en temperatur på 22°C og en rela-
20 tiv fugtighed på 60-65%, idet musene udsættes for 12 ti-
mers lys og 12 timers mørke og har adgang til standard-
føde og vand ad libitum.

Før musene anvendes til forsøg med anfald, tilpas-
ses de til deres omgivelser i mindst 6 dage. Anfald frem-
25 kaldes mellem 2 og 5 om eftermiddagen, og medikamenterne
indgives til de anførte tidspunkter i teksten og tabeller-
ne.

I alle anfaldsmodellerne er anvendt grupper på 10
mus til hver behandling eller dosis.

30

Eksempel 1

A. Virkning af behandling med (R,S)-vinyl-GABA (GVG) og glycin på anfald fremkaldt med 3-mercaptopropionsyre

Musene modtager en interperitoneal injektion med
35 GVG. 4 timer senere injiceres glycin subcutant (i en dosis

0

på 7,51 mg/0,1 ml destilleret vand). Én time efter indgif-
ten af glycin injiceres 40 mg/kg 3-mercaptopropionsyre
interperitonealt for at fremkalde anfald. Antallet af
myokloniske og myotoniske anfald registreres i løbet af
5 det efterfølgende 30 minutters tidsrum. Resultaterne er
anført nedenfor i tabel 1:

10

15

20

25

30

35

0

Tabel 1

	<u>Behandling (mg/kg)</u>		<u>N1</u>	<u>N2</u>	<u>N3</u>	<u>N4</u>	<u>Procentdel af dyrene,</u> <u>der har anfald</u>	
	<u>GVG</u>	<u>glycin</u>						
5	0	0	10	3	23	2	100	(a)
	50	0	10	4	23	2	100	(b)
	100	0	8	2	11	0	80	(c)
	125	0	6	4	13	3	60	
	150	0	6	1	8	1	60	
10	200	0	4	1	6	1	40	(c)
	250	0	4	1	5	0	40	
	300	0	1	0	1	0	10	
	0	750	8	2	10	0	80	(b)
15	0	2250	6	1	8	1	60	
	25	1500	4	0	4	0	40	
	25	2250	5	0	6	0	50	
	50	750	5	0	5	0	50	(c)
	50	1500	0	0	0	0	0	
20	50	2250	0	0	0	0	0	
	100	750	1	0	1	0	10	(b)
	200	750	0	0	0	0	0	(b)

N1 = Antal dyr med kloniske kramper

25 N2 = Antal dyr med tonisk udretning af baglemmer

N3 = Totalt antal anfaldsepisoder.

N4 = Døde dyr ved afslutning af observationsperiode på 30 min.

(a) Gennemsnitsværdier for fire forsøg

(b) " " to "

30 (c) " " tre "

B. Tidsafhængigheden for exogent indgivet glycins virkning mod anfald.

35 Mus modtager en interperitoneal injektion med GVG.
4 timer senere indgives opløsninger af glycin i postevand ved hjælp af mavesonde. Anfald fremkaldes til det rette

0

tidspunkt ved interperitoneale injektioner af 3-mercaptopropionsyre (40 mg/kg i 0,40 mg/0,1 ml fysiologisk saltvand). Antallet af myokloniske og myotoniske anfald registreres til det anførte tidspunkt efter injektion af

5 3-mercaptopropionsyre. Resultaterne er anført nedenfor i tabel la:

Tabel la

10	Behandling		Tid efter glycin indgift (min)	N1	N2	N3	N4	Procentdel af dyr med anfald
	(mg/kg)							
	GVG	glycin						
	0	0	-	10	1	16	0	100
	50	0	-	9	1	11	1	90
15	50	750	30	7	1	7	1	70
	50	750	60	6	0	6	0	60
	50	750	120	8	1	9	1	80
	50	750	240	10	2	13	1	100
	50	1500	15	7	0	7	0	70
20	50	1500	30	4	1	4	0	40

N1 = Antal dyr med kloniske anfald

N2 = Antal dyr med tonisk udretning af baglemmer

N3 = Totalt antal anfaldsepisoder

25 N4 = Døde dyr ved slutningen af observation på 30 min.

Eksempel 2

Virksomheden af behandling med (R,S)-vinyl-GABA (GVG) og glycinethylester på anfald fremkaldt med 3-mercaptopropionsyre

30 Mus modtager en interperitoneal injektion med GVG. Efter hhv. 1, 2, 3 og 4 timer modtager dyrene en subcutan injektion med glycinethylester som hydrochloridet. 4 timer efter GVG-behandlingen fremkaldes anfald ved hjælp af en interperitoneal injektion med 3-mercaptopropionsyre (40

35 mg/kg i 0,4 mg/0,1 ml fysiologisk saltvandsopløsning). Antallet af myotoniske og myokloniske anfald registreres i

0

løbet af den efterfølgende 30 minutters periode. Resultaterne er anført nedenfor i tabel 2:

Tabel 2

5

<u>Behandling</u> (mg/kg)		<u>Tid efter</u> <u>glycin</u> <u>indgift</u> <u>(tim)</u>	<u>N1</u>	<u>N2</u>	<u>N3</u>	<u>N4</u>	<u>Procentdel af</u> <u>dyr med anfald</u>	
<u>GVG</u>	<u>glycin</u> <u>ethylester</u> *							
0	0	-	10	3	17	2	100	
0	1030	1	7	3	14	2	70	
100	0	-	8	2	11	0	80	
100	1030	1	3	1	5	1	30	
15	100	1030	2	3	0	3	0	30
100	1030	3	7	2	10	0	70	
100	1030	4	8	0	10	0	80	

-
- N1 = Antal dyr med kloniske anfald
 N2 = Antal dyr med tonisk udretning af baglemmer
 N3 = Totalt antal anfaldsepisoder
 N4 = Døde dyr ved slutningen af observation på 30 min.
 * Indgivet som hydrochloridsaltet

25

Eksempel 3

Virksomheden af behandling med (R,S)-vinyl GABA (GVG) og N,N-dimethylglycin (DMGly) eller sarcosin på anfald fremkaldt ved indgivelse af 3-mercaptopropionsyre

En gruppe mus modtager en subcutan injektion med enten DMGly eller sarcosin som hydrochloridet. En time senere fremkaldes anfald ved hjælp af en interperitoneal injektion med 3-mercaptopropionsyre (40 mg/kg i 0,4 mg/-0,1 ml fysiologisk saltvandsopløsning). To grupper mus modtager en interperitoneal injektion med GVG. Hhv. 2, 3 eller 4 timer efter GVG-behandling modtager dyrene en subcutan injektion med DMGly eller sarcosin som hydrochloridet.

35

0

5 timer efter injektion med GVG (1 time eller 2 timer efter DMGly eller sarcosinindgift) fremkaldes anfald således som ovenfor omtalt. Antallet af myokloniske og myotoniske anfald registreres i løbet af den efterfølgende 30 minutters periode. Resultaterne med DMGly er anført nedenfor i tabel 3:

5

Tabel 3

Behandling (mg/kg)	Tid efter DMGly indgift (tim)	N1	N2	N3	N3	Procentdel af dyr med anfald
0 0	0	10	3	17	2	100
0 1030	1	8	3	17	0	80
100 1030	1	6	4	14	0	60
100 1030	2	8	5	26	2	80
100 0	-	8	2	11	0	80

15

N1 = Antal dyr med kloniske anfald

20

N2 = Antal dyr med tonisk udretning af baglemmer

N3 = Totalt antal anfaldsepisoder

N4 = Døde dyr ved slutningen af observation på 30 min.

* Indgivet som hydrochloridsaltet

Resultaterne med sarcosin er anført nedenfor i tabel 3a.

25

Tabel 3a

Behandling (mg/kg)	Tid efter sarcosin indgift (tim)	N1	N2	N3	N4	Procentdel af dyr med anfald
0 0	-	10	3	17	2	100
0 890	1	10	2	15	0	100
100 890	1	4	1	5	0	40
100 890	2	6	3	9	0	60
100 890	3	10	7	11	2	100

35

0

N1 = Antal dyr med kloniske anfald

N2 = Antal dyr med tonisk udretning af baglemmer

N3 = Totalt antal anfaldsepisoder

N4 = Døde dyr ved slutningen af observation på 30 min.

5

* Indgivet som hydrochloridsaltet.

Eksempel 4

Virkingen af behandling med (R,S)-vinyl GABA (GVG) og glycin på anfald fremkaldt med bicucullin

10

Mus gives en interperitoneal injektion med GVG. 4 timer senere injiceres glycininterperitonealt. Én time efter indgivelsen af glycin fremkaldes anfald ved hjælp af en subcutan injektion af bicucullin (1,8 mg/kg i 0,018 mg/-0,1 ml fysiologisk saltvandsopløsning). Antallet af kloniske og myotoniske anfald registreres i løbet af den efterfølgende 30 minutters periode. Resultaterne er anført nedenfor i tabel 4:

15

Tabel 4

20

<u>Behandling (mg/kg)</u>		<u>N1</u>	<u>N2</u>	<u>N3</u>	<u>N4</u>	<u>Procentdel af dyr med anfald</u>
<u>GVG</u>	<u>glycin</u>					
0	0	8	6	17	6	80
200	0	2	2	4	2	20
200	750	2	0	2	0	20

25

N1 = Antal dyr med kloniske anfald

N2 = Antal dyr med tonisk udretning af baglemmer

N3 = Totalt antal anfaldsepisoder

30

N4 = Døde dyr ved slutningen af observation på 30 min.

35

0

Eksempel 5

Virksomheden af behandling med (R,S)-vinyl GABA (GVG) og glycin på anfald fremkaldt ved indgivelse af metrazol

Mus modtager en interperitoneal injektion GVG.

5 4 timer senere injiceres glycin subcutant. Én time efter indgiften af glycin fremkaldes anfald ved hjælp af interperitoneal injektion med metrazol (75 mg/kg, 0,75 mg/- 0,1 ml fysiologisk saltvandsopløsning). Tidsrummet mellem metrazolindgift og indtræden af kloniske anfald registre-

10 res. De dyr, som ikke har nogen anfald indenfor 5 minutter, anses for at være anfaldsfrie. Resultaterne er vist nedenfor i tabel 5:

Tabel 5

15

<u>Behandling (mg/kg)</u>		<u>Tid mellem metrazolindgift og indtræden af kloniske anfald (sek.)*</u>	<u>Procentdel af dyr med anfald</u>
<u>GVG</u>	<u>glycin</u>		
0	0	69 (47-115)	100
20	750	57 (48-101)	100
	1500	88 (47-115)	100
	2250	125 (40-279)	100
750	0	188 (110-738)	100
750	750	184 (130-300)	90
25	1500	162 (138->300)	80
750	2250	262 (128->300)	60

* Gennemsnitinterval i ().

30

Eksempel 6

Virksomheden af behandling med (R,S)-vinyl GABA (GVG) og glycin på anfald fremkaldt med picrotoxinin

Mus modtager en interperitoneal injektion med GVG.

35 4 timer senere injiceres glycin interperitonealt. Én time efter indgift af glycin fremkaldes anfald ved hjælp af subcutan injektion med picrotoxinin (5 mg/kg, 0,05 mg/-

0

0,1 ml fysiologisk saltvandsopløsning). Antallet af kloniske og toniske anfaldsepisoder registreres i løbet af den efterfølgende 30 minutters periode. Resultaterne er anført nedenfor i tabel 6:

5

Tabel 6

<u>Behandling (mg/kg)</u>		<u>N1</u>	<u>N2</u>	<u>N3</u>	<u>N4</u>	<u>Procentdel af dyr med anfald</u>	
<u>GVG</u>	<u>glycin</u>						
10	0	0	10	10	31	10	10
	200	0	10	10	45	10	10
	200	750	10	10	45	10	10
	750	0	10	10	47	10	10
	750	750	10	8	37	8	10

15

N1 = Antal dyr med kloniske anfald

N2 = Antal dyr med tonisk udretning af baglemmer

N3 = Totalt antal anfaldsepisoder

N4 = Døde dyr ved slutningen af observation på 30 min.

20

Eksempel 7

Virkingen af behandling med (R,S)-vinyl GABA og glycin på kramper fremkaldt med stryknin

Mus modtager en interperitoneal injektion med GVG. 4 timer senere injiceres glycin subcutant. Én time efter indgift af glycin fremkaldes anfald ved hjælp af interperitoneal injektion med stryknin (base, 2 mg/kg, 0,02 mg/0,1 ml fysiologisk saltvandsopløsning). Tidsrummet mellem strykninindgift og indtræden af tonisk udstrækning af baglemmerne bestemmes. Resultaterne er anført nedenfor i tabel 7:

30

35

0

Tabel 7

<u>Behandling (mg/kg)</u>		<u>Tid mellem stryknin indgift og indtræden af tonisk anfald (sek.)</u>	<u>Procentdel af dyr med anfald</u>
5	<u>GVG</u> <u>glycin</u>		
	0 0	158 \pm 23*	100
	0 750	178 \pm 39*	100
	0 2250	224 \pm 45*	100
	750 0	189 \pm 15*	100
10	750 2250	272 \pm 61*	

* Gennemsnitsværdier \pm standardafvigelse (N=0)

15

20

25

30

35

0

P A T E N T K R A V .

1. Farmaceutisk middel til bekæmpelse af anfald af sygdomme, der involverer kramper, hos patienter med behov herfor, k e n d e t e g n e t ved, at det omfatter

5

a) en effektiv mængde gamma-vinyl GABA eller et farmaceutisk acceptabelt salt deraf,

b) en effektiv mængde glycin, sarcosin eller N,N-dimethylglycin eller en C₁-C₈-alkylester deraf eller et farmaceutisk acceptabelt salt deraf og eventuelt

10

c) en farmaceutisk acceptabel bærer eller fortyndingsmiddel.

2. Middel ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at det indeholder en effektiv mængde glycin eller en C₁-C₈-alkylester deraf eller et farmaceutisk acceptabelt salt deraf.

15

3. Middel ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at det indeholder en effektiv mængde sarcosin eller en C₁-C₈-alkylester deraf eller et farmaceutisk acceptabelt salt deraf.

20

4. Middel ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at det indeholder en effektiv mængde N,N-dimethylglycin eller en C₁-C₈-alkylester deraf eller et farmaceutisk acceptabelt salt deraf.

25

5. Middel ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at gamma-vinyl GABA'et foreligger i form af (S)-isomeren praktisk talt fri for (R)-isomeren.

30

35