



SCHWEIZERISCHE Eidgenossenschaft  
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

① CH 649 562 A5

⑤ Int. Cl.<sup>4</sup>: C 07 K 7/12  
A 61 K 37/02

**Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein**

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑫ **PATENTSCHRIFT** A5

⑲ Gesuchsnummer: 6973/81

⑦③ Inhaber:  
G. D. Searle & Co., Skokie/IL (US)

⑳ Anmeldungsdatum: 02.11.1981

③① Priorität(en): 03.11.1980 US 202920

⑦② Erfinder:  
Jones, David Ackley, Evanston/IL (US)

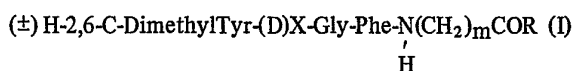
②④ Patent erteilt: 31.05.1985

④⑤ Patentschrift  
veröffentlicht: 31.05.1985

⑦④ Vertreter:  
Dietlin, Mohnhaupt & Cie, Genève

⑤④ **Derivate des Methionin-enzephalins.**

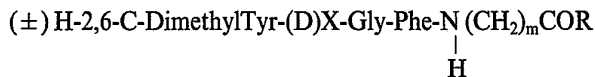
⑤⑦ Die Enzephalinderivate entsprechen der Formel



worin X für Methionin, Alanin oder Norleucin, m für 3 oder 5, R für Hydroxyl, -O-Niederalkyl oder -NR<sub>2</sub>R<sub>3</sub> mit R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> = H oder Niederalkyl stehen, wobei R<sub>2</sub> und R<sub>3</sub> gleich oder unterschiedlich sind. (±) bezieht sich auf dargestellte Verbindungen, deren Spiegelbild und die racemischen Gemische. Die pharmazeutisch zulässigen Salze sind ebenfalls eingeschlossen. Die Verbindungen sind als Analgetika wertvoll. Man erhält sie z.B. durch Peptidaufbau aus den Aminosäuren, die dem Derivat der Formel I zugrundeliegen, oder aus entsprechenden Oligopeptiden.

## PATENTANSPRÜCHE

## 1. Enzephalinderivate der Formel



worin bedeuten:

X Methionin, Alanin oder Norleucin,  
m 3 oder 5,

R Hydroxyl, -O-Niederalkyl oder  $-\text{NR}_2\text{R}_3$ , worin  $\text{R}_2$  und  $\text{R}_3$  gleich oder unterschiedlich sind und für Wasserstoff oder Niederalkyl stehen, und

( $\pm$ ) eine dargestellte Verbindung, ihr Spiegelbild oder ihr racemisches Gemisch,  
und deren pharmazeutisch zulässige Salze.

2. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass m 3 ist.

3. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass m für 3 und R für Hydroxyl stehen.

4. Verbindung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass R -O-Niederalkyl bedeutet.

5. Als Verbindung nach Anspruch 4, (DL)-2,6-C-Dimethyltyrosyl-(D)methionyl-glycyl-phenylalanyl- $\gamma$ -aminobuttersäuremethylester oder ein pharmazeutisch zulässiges Salz dieser Verbindung.

6. Verbindung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass R für  $-\text{NR}_2\text{R}_3$  steht.

7. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass m 5 bedeutet.

8. Verbindung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass R für Hydroxyl steht.

9. Verbindung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass R für  $-\text{NR}_2\text{R}_3$  steht.

10. Verbindung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass R -O-Niederalkyl bedeutet.

11. Als Verbindung nach Anspruch 10, (DL)-2,6-Dimethyltyrosyl-(D)methionyl-glycyl-phenylalanyl- $\epsilon$ -aminocaproinsäuremethylester oder ein pharmazeutisch zulässiges Salz dieser Verbindung.

12. Pharmazeutische Formulierung, gekennzeichnet durch eine therapeutisch wirksame Menge an mindestens einer Verbindung nach Anspruch 1, und einen pharmazeutisch zulässigen Träger oder Verdünner.

13. Pharmazeutische Formulierung nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Verbindung nach Anspruch 5 enthält.

14. Pharmazeutische Formulierung nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Verbindung nach Anspruch 11 enthält.

Die vorliegende Erfindung betrifft neue Derivate des Methionin-enzephalins, nämlich 2,6-C-Dimethyl-tyrosyl-D-methionyl-glycyl-phenylalanyl- $\gamma$ -aminobuttersäure und deren Derivate, 2,6-C-Dimethyltyrosyl-D-methionyl-glycyl-phenylalanyl-capronsäure und deren Derivate sowie deren pharmazeutisch zulässige Salze. Die Verbindungen sind wertvolle Analgetika.

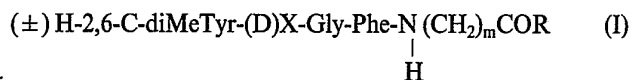
Im Jahre 1975 wurde Methionin-enzephalin, ein Pentapeptid, durch Hughes u. a. in Nature 258, 577 (1975) beschrieben. Dieses Peptid findet sich an vielen Stellen im Gehirn, wo es anscheinend als Neuroüberträger oder Neuromodulator in einem zentralen Schmerzunterdrückungssystem wirkt. Das natürliche Peptid bindet sich stereospezifisch an Rezeptorstellen für teilweise gereinigtes Gehirnopiat; siehe beispielsweise

Bradbury u. s., Nature 260, 793 (1976). Das natürliche Peptid ist ebenfalls in biologischen Untersuchungen auf Opiataktivität stark wirksam, zeigt jedoch nur schwache, flüchtige analgetische Wirksamkeit, wenn man es unmittelbar in das Gehirn von Ratten einspritzt, siehe beispielsweise Belluzi u. a., Nature 260, 625 (1976).

Um nun den Mangel an Aktivität in vivo zu überwinden, haben verschiedene Forscher bereits zahlreiche Änderungen in der Struktur des Methioninenzephalins vorgenommen, beispielsweise Substitution des Glycins in der 2-Stellung durch eine D-Aminosäure, N-Methylierung des 1-Tyrosins, Substitution des 4-Phenylalanins durch beispielsweise Methyl oder Halogen, Modifizierung der C-Endstelle usw. mit dem Zweck, Enzephalinderivate zu erzeugen, die andere Eigenschaften und Aktivitäten aufweisen.

Die vorliegende Erfindung schafft nun neue Enzephalinderivate sowie deren pharmazeutisch zulässige Salze, welche fast die Stärke von Morphin als analgetischem Medikament besitzen, und zwar sowohl oral als auch parenteral geben.

Die Enzephalinderivate der vorliegenden Erfindung entsprechen der Formel



worin bedeuten:

Me Methyl,  
X Methionin, Alanin oder Norleucin,  
m 3 oder 5,

R Hydroxyl, -O-Niederalkyl oder  $-\text{NR}_2\text{R}_3$ , worin  $\text{R}_2$  und  $\text{R}_3$  gleich oder unterschiedlich sind und für Wasserstoff oder Niederalkyl stehen, und

( $\pm$ ) eine dargestellte Verbindung, ihr Spiegelbild oder ihr racemisches Gemisch.

In den erfindungsgemässen Verbindungen sind auch sämtliche pharmazeutisch zulässigen Salze eingeschlossen.

In der obigen Formel steht «C-diMe» für die doppelte Substitution durch Methyl am aromatischen Ring des Tyrosins. Die bisher bekannten Substitutionen am Tyrosin sind solche am N-Atom gewesen, und es wurde nun gefunden, dass die Substitution am Kohlenstoff unerwarteterweise die Wirksamkeit der Verbindungen erhöht.

Alle Aminosäurereste, welche in diesem Dokument vorkommen, befinden sich in der natürlichen (L-)-Konfiguration, wenn es nicht anders angegeben ist, mit der Ausnahme von Glycin, welches kein Asymmetriezentrum aufweist, und es wurden die üblichen Abkürzungen für die Aminosäurereste verwendet.

Der Rest des Dimethyltyrosins kann in der Konfiguration L, D oder DL vorliegen. Der Ausdruck «Niederalkyl» bezieht sich auf geradkettige oder verzweigte Alkylreste mit 1 bis 6 C-Atomen, beispielsweise Methyl, Äthyl, n-Propyl, Isopropyl, n-Butyl, tert. Butyl, n-Hexyl usw.

Pharmazeutisch zulässige Salze beziehen sich in diesem Zusammenhang auf die nicht-toxischen Säureadditionssalze, die man im allgemeinen entweder in situ oder durch Umsetzen einer erfindungsgemässen Verbindung mit der gewünschten organischen oder anorganischen Säure nach bekannten Standardmethoden erhalten kann. Die in Formel I gezeigte freie Carboxylgruppe kann ebenfalls mit Basen Salze bilden. Beispiele für solche Salze sind das Chlorhydrat, Bromhydrat, Sulfat, Bisulfat, Acetat, Oxalat, Valeriat, Oleat, Laurat, Borat, Benzoat, Lactat, Phosphat, Tosylat, Citrat, Maleat, Fumarat, Succinat, Tartrat, Napsylat usw.

Die analgetische Wirksamkeit der erfindungsgemässen Verbindungen wurde nach der Heizplattenmethode und dem

Krümmungstest PBQ an Mäusen festgestellt, und die analgetische Aktivität repräsentativer Verbindungen wurde mit derjenigen des Morphins verglichen. Es wurde die allgemeine Überlegenheit der erfindungsgemässen Verbindungen bewiesen.

Die erfindungsgemässen Verbindungen können entweder oral oder parenteral verabreicht werden, um Schmerzen von Säugetieren und Menschen zu lindern oder zu beseitigen. Orale Dosierungen liegen insbesondere zwischen 0,5 und 5 mg/kg Körpergewicht und bei parenteraler Verabreichung zwischen 0,05 und 3 mg/kg Körpergewicht und Tag, und man verabreicht vorzugsweise in Form geteilter Dosierungen, beispielsweise alle 4 bis 6 Stunden je nach Bedarf an Schmerzlinde-  
10

Die folgenden Beispiele sollen die Erfindung weiter erläutern. Die Präparate veranschaulichen die Herstellung von Zwischenprodukten.

#### Präparat 1

Herstellung von tert. Butyloxycarbonyl-phenylalanyl- $\epsilon$ -aminocaprinsäuremethylester.

Zu einer kalten Lösung von 2,65 g (10,0 mmol) tert. Butyloxycarbonyl (Boc)-phenylalanin und 2,00 g (11,0 mmol) Caprinsäuremethylester-Chlorhydrat in 25 ml Methylenchlorid gab man 1,25 ml (11,2 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid und 1,25 ml (1,10 mmol) N-Methylmorpholin. Man rührte das Reaktionsgemisch 30 Minuten bei Zimmertemperatur und kühlte dann mehrere Tage lang.

Der bei der Umsetzung gebildete Dicyclohexylharnstoff wurde abfiltriert und das Filtrat mehrmals mit Wasser gewaschen, dann über wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet und schliesslich filtriert und eingedampft. Das erhaltene Öl verfestigte sich bald und ergab das Produkt in quantitativer Ausbeute. Bei der Dünnschichtchromatographie (Chloroform: Methanol: Essigsäure: Wasser = 83:15:1:1 in Volumenanteilen) ergab sich ein  $R_f$ -Wert von 0,85. Die Struktur wurde durch NMR-Spektrographie bestätigt.

#### Präparat 2

Herstellung von tert. Butyloxycarbonyl-phenylalanyl- $\gamma$ -aminobuttersäuremethylester

Die Titelverbindung wurde auf die gleiche Weise wie im Präparat 1 hergestellt, in diesem Falle aus 2,65 g Boc-Phe, 1,69 g (11,0 mmol)  $\gamma$ -Aminobuttersäuremethylester-chlorhydrat, 1,25 ml N-Methylmorpholin und 2,27 g (11,0 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid in 25 ml Methylenchlorid. Die Reaktionsdauer betrug 24 Stunden. Man erhielt in quantitativer Ausbeute das Produkt ( $R_f$ -Wert von 0,84 bei der Dünnschichtchromatographie im genannten Lösungsmittelsystem).

#### Präparat 3

Herstellung von Phenylalanyl- $\epsilon$ -aminocaprinsäuremethylester-chlorhydrat

Man löste 10,0 mmol tert. Butyloxycarbonylphenylalanyl- $\epsilon$ -aminobuttersäuremethylester in 37 ml Eisessig und behandelte mit 18 ml 5,6 N-Chlorwasserstoff in Dioxan bei Zimmertemperatur 20 Minuten lang. Die Lösungsmittel wurden abgedampft und zum Rückstand wasserfreier Äther gegeben, wobei eine Fällung entstand. Die kalte Fällung wurde abfiltriert und mit Äther gewaschen und dann im Vakuum bei 65 °C 3 Stunden lang getrocknet. Man erhielt in 84,8%iger Ausbeute 2,79 g am obigen Produkt.

#### Präparat 4

Herstellung von Phenylalanyl- $\gamma$ -aminobuttersäuremethylester-chlorhydrat

Die Arbeitsweise des Präparats 3 wurde wiederholt, und

unter Einsatz entsprechender Mengen an Materialien erhielt man in 98,4%iger Ausbeute 2,85 g an Produkt.

#### Präparat 5

Herstellung von Boc-glycyl-phenylalanyl- $\epsilon$ -aminocaprinsäuremethylester

Zu 2,45 g (7,45 mmol) des Dipeptids aus Präparat 2 und 2,04 g (8,57 mmol, 15% Überschuss) an Boc-gly-2,4,5-trichlorphenylester (OCP) in 15 ml Dimethylformamid wurden 0,85 ml (7,65 mmol) N-Methylmorpholin gegeben und das Reaktionsgemisch bei Zimmertemperatur 48 Stunden lang stehen gelassen. Zugabe von 175 ml kaltem, 5%igem Kaliumbisulfat ergab eine gummiartige Fällung, die mit 3 × 50 ml Äthylacetat extrahiert wurde. Die vereinigten organischen Schichten wurden mit Wasser und dann mit Kochsalzlösung gewaschen und über wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Abfiltrieren und Eindampfen erhielt man ein Öl.

Dieses Produkt wurde durch Niederdruck-Flüssigkeitschromatographie gereinigt, wobei Kieselsäuregel verwendet wurde und mit einem linearen Gradienten zwischen 100% Chloroform und 100% Äthylacetat eluiert wurde. Das Gewicht an erhaltenem öligem Produkten betrug 3,17 g (94,6% Ausbeute). Die Dünnschichtchromatographie unter Verwendung einer Mischung aus gleichen Volumina Äthylacetat und Chloroform ergab einen  $R_f$ -Wert von 0,09.

#### Präparat 6

Herstellung von Boc-glycyl-phenylalanyl- $\gamma$ -aminobuttersäuremethylester

Die Titelverbindung wurde aus 2,55 g (8,49 mmol) des Dipeptids gemäss Präparat 4, 3,47 g (9,77 mmol, 15% Überschuss) Boc-Gly-OCP und 1,1 ml (9,9 mmol) N-Methylmorpholin in 17 ml Dimethylformamid nach der Arbeitsweise des Präparats 5 erhalten. Nach einer Aufarbeitung wie in Präparat 5 wurde das Erzeugnis durch Niederdruck-Flüssigkeitschromatographie unter Verwendung eines Lösungsmittelgradienten zwischen 95% Chloroform/5% Skellysolve B bis zu 100% Äthylacetat an einer Kieselsäure von 25 × 100 mm gereinigt, und man erhielt 2,52 g (70,4% Ausbeute) an Produkt. Die Dünnschichtchromatographie (Chloroform: Methanol: Essigsäure: Wasser = 83:15:1:1, Volumenanteile) ergab einen  $R_f$ -Wert von 0,74; diese Chromatographie mit Chloroform/Äthylacetat im Volumenverhältnis 1:1 lieferte einen  $R_f$ -Wert von 0,06.

#### Präparat 7

Herstellung von Glycyl-phenylalanyl- $\epsilon$ -aminocaprinsäuremethylester-chlorhydrat

Die Verbindung des Präparats 5 (3,17 g, 7,05 mmol) wurde in 26 ml Eisessig gelöst und bei Zimmertemperatur mit 13 ml 5,7 N-Chlorwasserstoff in Dioxan 25 Minuten lang behandelt. Die Lösungsmittel wurden dann abgedampft und der erhaltene kristalline Feststoff zunächst mit Äther gewaschen und dann im Vakuum bei 60 °C 2 1/2 Stunden lang getrocknet. Man erhielt in 98,6%iger Ausbeute 2,68 g der Titelverbindung. Die Dünnschichtchromatographie in Chloroform: Methanol: Essigsäure: Wasser = 83:15:1:1, Volumenanteile, ergab einen Fleck bei  $R_f$  = 0,09.

#### Präparat 8

Herstellung von Glycyl-phenylalanyl- $\gamma$ -aminobuttersäuremethylester-chlorhydrat

Das Boc-Peptid des Präparats 6 (2,52 g, 5,99 mmol) wurde in 22 ml Eisessig gelöst und nach der Arbeitsweise des Präparats 7 mit 10,7 5,6 N-Chlorwasserstoff in Dioxan behandelt. Nach Aufarbeitung und Trocknen im Vakuum bei 55 °C 3 Stunden lang, erhielt man in 98,6%iger Ausbeute 2,14 g an Produkt. Gemäss Elementaranalyse war dieses ein

Viertelhydrat. Dünnschichtchromatographie (Methanol/Essigsäure/Wasser/Chloroform im Volumenverhältnis 15:1:1:83) ergab einen  $R_f$ -Wert von 0,07 (homogen).

#### Präparat 9

Herstellung von Boc-(DL)-2,6-C-Dimethyltyrosyl-(D)-methionyl-glycyl-phenylalanyl- $\gamma$ -aminobuttersäuremethylester

Eine Lösung von 1,37 g (3,05 mmol) (DL)-Boc-2,6-C-Dimethyltyrosyl-(D)-methionin in 18,5 ml Dimethylformamid und 0,72 ml (6,48 mmol) N-Methylmorpholin wurde auf  $-60^\circ\text{C}$  abgekühlt und dazu auf einmal 0,42 ml (3,20 mmol, 5%iger Überschuss) Chlorameisensäureisobutylester zugegeben. Die Lösung wurde 10 Minuten gerührt, wobei die Temperatur auf  $-50^\circ\text{C}$  stieg, und danach wurden 1,21 g (3,35 mmol) des Tripeptidchlorhydrats des Präparats 8 in 9 ml Dimethylformamid im Verlauf von 20 Minuten zugegeben, wobei die Temperatur  $-20^\circ\text{C}$  und darunter getrug. Dann wurde das Reaktionsgemisch noch 30 Minuten lang bei etwa  $-10^\circ\text{C}$  gerührt und schliesslich auf Zimmertemperatur kommen gelassen. Bei dieser Temperatur liess man 20 Stunden lang stehen.

Das Reaktionsgemisch wurde dann zu 300 ml kaltem, 5%igem Kaliumbisulfat gegeben, wobei eine weisse Fällung sich bildete, die man abfiltrierte, mit Wasser wusch und trocknete. Man erhielt in 86,8%iger Ausbeute 1,97 g Produkt. Die Dünnschichtchromatographie im System Chloroform/Methanol/Essigsäure/Wasser im Volumenverhältnis 83:15:1:1 ergab zwei Flecken gleicher Intensität (Diastereomere) bei  $R_f$  0,70 und 0,76.

#### Präparat 10

Herstellung von Boc-(DL)-2,6-C-Dimethyltyrosyl-(D)-methionyl-glycyl-phenylalanyl- $\epsilon$ -aminocaprinsäuremethylester

Die Titelverbindung erhielt man aus 1,29 g (3,35 mmol) des Tripeptid-chlorhydrates des Präparats 7 und dem gleichen Überschuss an Boc-(DL)-2,6-C-Dimethyltyrosyl-(D)-methionin, N-Methylmorpholin und Chlorameisensäureisobutylester sowie Lösungsmittel. Dabei folgte man in Einzelheiten der Arbeitsweise des Präparats 9. Nach Aufarbeitung gemäss jenem Präparat erhielt man 2,19 g an Produkt in 93,2%iger Ausbeute. Die Dünnschichtchromatographie im Lösungsmittelsystem des Präparats 9 ergab zwei Flecken gleicher Intensität bei  $R_f$  0,64 und 0,72.

#### Beispiel 1

Herstellung von (DL)2,6-C-Dimethyltyrosyl-(D)-methionyl-glycyl-phenylalanyl- $\gamma$ -aminobuttersäuremethylesterchlorhydrat.

Das geschützte Peptid des Präparats 9 (1,97 g, 2,65 mmol) wurde 20 Minuten lang bei Zimmertemperatur in 10 ml Eisessig und 5 ml 5 N-Chlorwasserstoff in Dioxan behandelt, und die Lösungsmittel wurden dann abgedampft. Nach Zugabe von Äther und Verreiben damit erhielt man ein Pulver, welches abfiltriert, mit Äther gewaschen und im Vakuum bei  $60^\circ\text{C}$   $3\frac{1}{2}$  Stunden lang getrocknet wurde. Man erhielt in 96,8%iger Ausbeute 1,81 g an Produkt als Chlorhydrat mit  $1\frac{1}{2}$  Mol Wasser, Molekulargewicht 707,28;  $[\alpha]_D^{25} = +5,0^\circ\text{C}$  (c 1,0 in Methanol). Die Elementaranalyse und die NMR-Spektroskopie bestätigen die Struktur.

#### Beispiel 2

Herstellung von (DL)-2,6-Dimethyltyrosyl-(D)-methionyl-glycyl-phenylalanyl- $\epsilon$ -aminocaprinsäuremethylesterchlorhydrat.

2,19 g (2,84 mmol) des geschützten Pentapeptids des Prä-

parats 10 wurden wie oben beschrieben mit Chlorwasserstoff in Dioxan behandelt, und man erhielt nach  $2\frac{1}{2}$ stündigem Trocknen im Vakuum bei  $60^\circ\text{C}$  1,89 g (91,9%) an Produkt als Chlorhydrat mit  $1\frac{1}{2}$  Mol Wasser,  $[\alpha]_D^{25} = +3,0^\circ$  (c 0,1 in Methanol). Die Struktur wurde durch Elementaranalyse und NMR-Spektroskopie bestätigt.

Dem Fachmann ist klar, dass die Säuren, Amide und die nicht genannten Niederalkylester der erfindungsgemässen Verbindungen durch Auswahl der entsprechenden Ausgangsprodukte leicht erhalten werden können.

Repräsentative Verbindungen der vorliegenden Erfindung sind die folgenden, auf die jedoch die Erfindung nicht beschränkt ist:

(DL)-2,6-C-Dimethyltyrosyl-(D)-methionyl-glycyl-phenylalanyl- $\epsilon$ -aminocaprinsäure;

(DL)-2,6-C-Dimethyltyrosyl-(D)-methionyl-glycyl-phenylalanyl- $\gamma$ -aminobuttersäure;

(DL)-2,6-C-Dimethyltyrosyl-(D)-methionyl-glycyl-phenylalanyl- $\epsilon$ -aminocaprinsäure-isopropylester-bromhydrat;

(DL)-2,6-C-Dimethyltyrosyl-(D)-methionyl-glycyl-phenylalanyl-N-methyl- $\epsilon$ -aminocapronamid usw.

Die vorliegende Erfindung umfasst weiterhin in ihrem Geltungsbereich pharmazeutische Zusammensetzungen und Formulierungen, welche als Wirkstoffkomponente mindestens eine der Verbindungen gemäss Formel I zusammen mit einem pharmazeutischen Träger oder Verdünner enthalten. Die erfindungsgemässen Verbindungen können in diesen Zubereitungen oral, parenteral, nasal, vaginal, rectal oder sublingual verabreicht werden, und die Zubereitungen können als zweckmässige Dosierungen formuliert werden, die sich jeder Verabreichungsart anpassen können.

Feste Dosierungsformen für orale Verabreichung sind Kapseln, Tabletten, Pillen, Pulver, Granulate usw. In solchen festen Dosierungsformen können die Wirkstoffverbindungen zusammen mit mindestens einem inerten Verdünner wie Saccharose, Lactose oder Stärke vorliegen. Solche Dosierungsformen können ebenfalls zusätzliche Substanzen aufweisen, wie es allgemein durchgeführt wird, beispielsweise Schmiermittel wie Magnesiumstearat. Im Falle von Kapseln, Tabletten und Pillen können die Dosierungsformen weiterhin Puffer enthalten. Tabletten und Pillen können zusätzlich mit äusseren Beschichtungen versehen sein.

Flüssige Dosierungsformen für orale Verabreichung sind beispielsweise pharmazeutisch zulässige Emulsionen, Lösungen, Suspensionen, Sirupe und Elixiere, welche die allgemein üblichen flüssigen inerten Verdünner enthalten wie Wasser. Ausserdem können die Zubereitungen neben den inerten Verdünnungsmitteln andere Zusatzstoffe enthalten, wie Netzmittel, Emulgatoren und Suspendiermittel sowie Süsstoffe und Aromastoffe.

Erfindungsgemässe Zubereitungen zur parenteralen Verabreichung sind insbesondere sterile wässrige oder nichtwässrige Lösungen, Suspensionen oder Emulsionen. Beispiele für nichtwässrige Lösungsmittel oder Trägerstoffe sind Propylen-glycol, Pflanzenöle wie Olivenöl und injizierbare organische Ester wie Äthyloleat. Solche Dosierungsformen können weiterhin Zusätze wie Konservierungsmittel, Netzmittel, Emulgiermittel und Dispergierhilfen enthalten. Sie können beispielsweise durch Filtern über bakterienzurückhaltende Filter oder durch Zusatz von Sterilisierungsmitteln in die Zubereitungen sterilisiert werden. Sie können ebenfalls in Form von sterilen festen Zubereitungen hergestellt werden, die man dann in sterilem Wasser oder anderen sterilen Flüssigkeiten unmittelbar vor der Verwendung auflöst.

Die Dosierung der Wirkstoffe in den erfindungsgemässen Formulierungen kann sehr unterschiedlich sein; es ist jedoch erforderlich, dass die Menge an Wirkstoff derart ist, dass eine

geeignete Dosierungsform erhalten wird. Die gewählte Dosierung hängt vom gewünschten therapeutischen Effekt, vom Verabreichungsweg und der Dauer der Behandlung ab. Im allgemeinen werden Dosierungen zwischen 0,5 und 5 mg pro kg Körpergewicht und Tag an Säugetieren und Menschen verabreicht, um die gewünschte Schmerzlinderung zu erzielen.

## UNTERSUCHUNGSMETHODEN

### 1. Heizplattenmethode

Der benutzte Test war eine Abänderung der von Eddy und Leimback beschriebenen Methode.

Zwei Gruppen von 14 Mäusen wurden etwa 1/2 Stunde von der Untersuchung in den Versuchsraum gebracht. Die Mäuse setzte man einzeln unter einen Glaszylinder von 600 ml auf eine warme Platte (Pyro-magnistir, Lab-Line Instruments, Inc., Melrose Park, IL) deren Temperatur mit einem Proportional-Temperaturregler YSI-72 (Yellow Springs Instruments Co., Yellow Springs, Ohio) auf  $55 \pm 0,5$  °C gehalten wurde. Die Reaktionszeit jeder Maus bis zum Lecken eines Fusses oder Ausführung eines Sprunges wurde dreimal in Abständen von 20 Minuten gemessen (Lab-chron timer, Lab-Line Instruments Inc., Melrose Park, IL). Mäuse, die nicht innerhalb 15 Sekunden ansprachen, wurden nicht weiter untersucht. Nun verabreichte man 10 Mäusen eine Dosis der Untersuchungsverbindung und weiteren 10 Mäusen eine 0,9%ige Salzlösung intravenös, 20 Minuten nach der letzten Messung. Die Tiere wurden wie vorher und dann 10, 30 und 60 Minuten nach Injection untersucht. Mäuse, die nicht innerhalb 30 Sekunden Reaktion zeigten, wurden von der warmen Platte weggenommen und mit einer Reaktionszeit von 30 Sekunden bewertet. Analgetische Wirksamkeit wurde als erwiesen betrachtet, wenn die Reaktionszeit einer Maus nach Verabreichung der Verbindung grösser als diejenige der Kontrollgruppe + 2 Standardabweichungen betrug. Die Anzahl

von Tieren, die eine Wirkung auf Analgetika zeigten, wurde mit dem gleichen Wert der Kontrollgruppe über den Wahrscheinlichkeitstest nach Fisher verglichen. Die Werte von ED50 wurden nach der Log-probit-Analyse unter Verwendung der Prozentzahl von Mäusen mit analgetischer Reaktion in jeder Gruppe minus dem gleichen, kombinierten Wert der Kontrollprobe berechnet.

### 2. PBQ-Krümmungstest

10 Gruppen von mindestens 10 männlichen Mäusen der Rasse CD-1 (Charles River) von je 18–25 g wurden über Nacht nicht gefüttert und dann intragastrisch mit dem Träger vorbehandelt, nämlich 1–2 Tropfen eines Gemisches aus gleichen Teilen Propylenglycol und Tween 80 pro 10 ml 0,9%iger Kochsalzlösung. Es wurden 10 ml/kg dieser Lösung oder einer Lösung der Untersuchungsverbindung, welche auch als homogenisierte Suspension eingesetzt werden kann, eingespritzt. 30 Minuten später wurde PBQ-intraperitoneal als 0,025%ige Lösung in 5%igem Äthanol verabreicht. 5 Minuten nach der PBQ-Zugabe wurde jede Maus einzeln in ein Becherglas gebracht und die Anzahl der Krümmungen während der nächsten 10 Minuten gezählt. Eine Krümmung ist definiert als eine Kombination oder Aufeinanderfolge von Krümmung des Rückens zu einem Bogen, Drehung des Beckens und Streckung der Hinterbeine (1). Zur Erzielung höchster Empfindlichkeit wurde eine analgetische Wirkung als gesichert angesehen, wenn die Frequenz der Krümmung 50% oder weniger als die mittlere Frequenz (2) der Kontrollgruppe war. Schätzungen der ED50-Werte und der Anstieg der Kurve bezüglich Ansprechen auf die Dosis wurden von den ausgeglichenen Daten nach der logistischen Methode von Berkson (3) berechnet. Die ED50-Werte sind definiert als die Dosis, welche ein Krümmen um 50% oder mehr erzeugt, bezogen auf das Mittel der Kontrollgruppe, und zwar bei 50% der untersuchten Tiere.