



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **108233** (13) **C2**
(51) МПК (2015.01)

C07D 405/12 (2006.01)
A61K 31/496 (2006.01)
A61P 25/16 (2006.01)
A61P 25/22 (2006.01)
A61P 25/24 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 25/30 (2006.01)
A61P 29/00
A61P 35/00
A61P 37/06 (2006.01)
A61P 19/10 (2006.01)
A61P 9/12 (2006.01)
A61P 15/00
A61P 3/00
A61P 3/10 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2012 13737	(72) Винахідник(и):	Кейт Джон М. (US), Лю Цзин (US)
(22) Дата подання заявки:	02.05.2011	(73) Власник(и):	ЯНССЕН ФАРМАЦЕВТИКА НВ, Turnhoutseweg 30, B-2340 Beerse, Belgium (BE)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	10.04.2015	(74) Представник:	Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр. №115
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	61/330,522	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	WO 2006/074025 A1; 13.07.2006
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	03.05.2010		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US		
(41) Публікація відомостей про заявку:	11.03.2013, Бюл.№ 5		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	10.04.2015, Бюл.№ 7		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/US2011/034755, 02.05.2011		

(54) МОДУЛЯТОРИ АКТИВНОСТІ ГІДРОЛАЗИ АМІДІВ ЖИРНИХ КИСЛОТ

(57) Реферат:

У цьому документі описаний (4-хлорпіридин-3-іл)амід 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)піперазин-1-карбонової кислоти, який використовується як модулятор активності FAAH. (4-Хлорпіридин-3-іл)амід 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)піперазин-1-карбонової

UA 108233 C2

кислоти можуть застосовувати в складі фармацевтичних композицій та способах, що застосовуються для лікування хворобливих станів, розладів і патологічних станів, опосередкованих активністю гідролази амідів жирних кислот (FAAH), таких як тривога, біль, запальний процес, розлади сну, розлади харчової поведінки, порушення енергетичного обміну і рухові порушення (наприклад, розсіяний склероз).

Також в цьому документі описаний спосіб синтезу (4-хлорпіридин-3-іл)аміду 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)піперазин-1-карбонової кислоти.

Перехресні посилання на споріднені заявки

Дана заявка вимагає пріоритет по попередній заявці на патент США з серійним номером 61/330522, поданий 03 травня 2010 р.

Галузь техніки, до якої належить винахід

5 Даний винахід стосується сполуки (4-хлорпіридин-3-іл)-амід 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)-піперазин-1-карбонової кислоти, фармацевтичних композицій, що містять дану сполуку, способів синтезу даної сполуки, а також способів застосування даної сполуки для лікування хворобливих станів, розладів і патологічних станів, опосередкованих активністю гідролази амідів жирних кислот (FAAH).

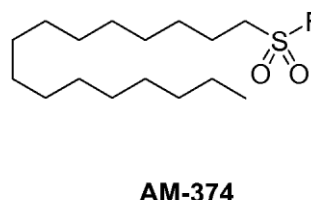
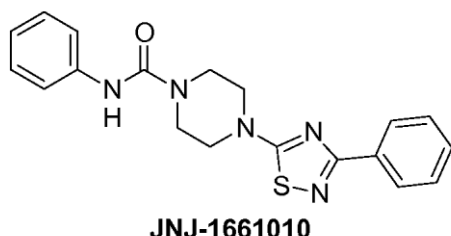
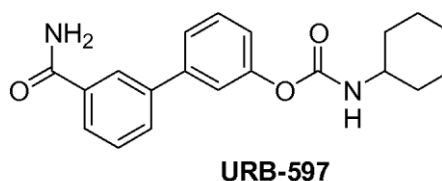
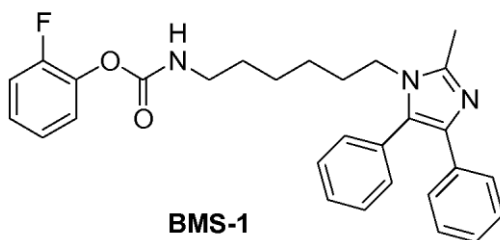
10 Передумови створення винаходу

Протягом багатьох віків конопль вважалися цілющою рослиною. Основним біологічно активним компонентом конопель є δ^9 -тетрагідроканабінол (ТГК). Відкриття ТГК в кінцевому результаті привело до виявлення двох ендогенних канабіноїдних рецепторів, відповідальних за його фармакологічну дію, а саме рецептори CB₁ і CB₂ (Goya et al., Exp. Opin. Ther. Patents, 2000 р., 10, 1529). Це відкриття дозволило не тільки знайти місце прикладання дії ТГК, але і стало причиною проведення досліджень ендогенних агоністів в даних рецепторах, або «ендоканабіноїдах». Першим знайденим ендоканабіноїдом був амід жирної кислоти - етаноламід арахідонової кислоти, або анандамід (AEA). AEA активує велику кількість фармакологічних ефектів екзогенних канабіноїдів (Piomelli et al., Nat. Rev. Neurosci., 2003 р., 4(11), 873).

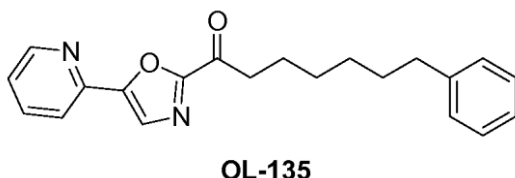
20 Катаболізм AEA головним чином відносять на рахунок інтегрального мембранного білка - гідролази амідів жирних кислот (FAAH), яка гідролізує AEA до арахідонової кислоти і етаноламіну. FAAH була охарактеризована в 1996 році Краваттом і співавторами (Cravatt et al., Nature, 1996 р., 384, 83). Згодом було встановлено, що FAAH додатково відповідає за катаболізм великого числа важливих ліпідних сигнальних молекул - амідів жирних кислот, що включають: інший основний ендоканабіноїд 2-арахідоноїлгліцерин (2-AG) (Devane et al., Science, 1992 р., 258, 1946-1949); снодійну речовину олеамід (Cravatt et al., Science, 1995 р., 268, 1506); пригнічувальну апетит речовину N-олеоїлетаноламід (OEA) (Rodriguez de Fonesca, Nature, 2001 р., 414, 209); і протизапальну речовину пальмітоїлетаноламід (PEA) (Lambert et al., Curr. Med. Chem., 2002 р., 9(6), 663).

Інгібітори FAAH з невеликими молекулами повинні підвищувати концентрації цих ендогенних сигнальних ліпідів і таким чином забезпечувати пов'язані з ними сприятливі фармакологічні ефекти. Було представлено декілька доповідей по ефектах різних інгібіторів FAAH в доклінічних моделях.

35 Зокрема, в доповідях було представлено, що два інгібітори FAAH на основі карбамату мають аналгетичні властивості при використанні в експериментальних моделях на тваринах. Було представлено, що BMS-1 (див. WO 02/087569), структура якого показана нижче, чинить на щурів аналгетичну дію в моделі нейропатичного болю, оснований на лігуванні спінального нерва по Чангу, і тесті Харгрейвса на гостру теплову ноцицепцію. Було представлено, що URB-597 має ефективність в моделі тривоги у щурів при проведенні досліджень на циркулярному і хрестоподібному лабіринтах, а також чинить аналгетичну дію на щурів в тестах з гарячою пластиною і формаліном (Kathuria et al., Nat. Med., 2003 р., 9(1), 76). Похідне сечовини, феніламід 4-(3-феніл-[1,2,4]тіадіазол-5-іл)-піперазин-1-карбонової кислоти, виявилось ефективним в обох моделях - нейропатичного болю, оснований на лігуванні спінального нерва по Чангу, і моделі гострого болю від опікової травми, оснований на легкій термічній травмі (Karbarz et al., Anesth Analg., 2009 р., 108(1), 316-329). Також були представлені і інші могутні інгібітори ферменту FAAH на основі сечовини (WO 06/074025). Було представлено, що сульфонілфторид AM374 значно знижує спастичність при хронічному звичному експериментальному аутоімунному енцефаломієліті (CREAE) у мишей в моделі розсіяного склерозу на тваринах (Baker et al., FASEB J., 2001 р., 15(2), 300).



Крім того, було представлено, що оксазолопіридинкетон OL-135 є потужним інгібітором FAAH і має анальгетичну дію в обох тестах на теплову ноцицепцію у щурів - з гарячою пластиною і зануренням хвоста (WO 04/033652).



5

Результати досліджень по впливу деяких екзогенних канабіноїдів дозволили встановити, що інгібітор FAAH можна використовувати для лікування різних патологічних станів, захворювань, розладів або симптомів. Вони включають в себе біль, нудоту/блювання, анорексію, спастичність, рухові порушення, епілепсію і глаукому. До даного моменту затверджені терапевтичні способи застосування канабіноїдів включають в себе полегшення викликаного хіміотерапією нудоти і блювання у хворих на рак і підвищення апетиту у хворих на ВІЛ/СНІД, які страждають на анорексію внаслідок синдрому виснаження. У деяких країнах для даного свідчення в продажу доступні два продукти, а саме дронабінол (Marinol®) і набілон.

10

Крім затвердженого свідчення, галуззю, яка привернула велику увагу можливостями застосування канабіноїдів, є аналгезія, тобто лікування болю. П'ять маломасштабних рандомізованих досліджень в контрольованих умовах показали, що ТГК перевершує плацебо, забезпечуючи залежну від дози аналгезію (Robson et al., Br. J. Psychiatry, 2001 p., 178, 107-115). Відомо, що Atlantic Pharmaceuticals займається розробкою синтетичного канабіноїду СТ-3, 1,1-диметилгептил-похідним карбоксильного метаболіту тетрагідроканабінолу, як перорально активного анальгетика і протизапальної речовини. Стало відомо, що в Німеччині в травні 2002 р. була почата експериментальна фаза II дослідження СТ-3 як препарату для лікування хронічного нейропатичного болю.

15

20

Ряд осіб, які страждають на захворювання, пов'язані з порушенням опорно-рухових функцій, такими як розсіяний склероз, заявили про сприятливий вплив конопель як на пов'язаний з хворобою біль, так і на спастичність, що підтверджується маломасштабними контрольованими дослідженнями (Croxford et al., J. Neuroimmunol, 2008 p., 193, 120-9; Svendsen, Br. Med. J., 2004 p., 329, 253). Аналогічним чином, пацієнти з пошкодженням спинного мозку, наприклад, параплегією, повідомили, що після куріння марихуани хворобливі спазми полегшуються. Звіт, в якому представлені відомості про те, що канабіноїди регулюють м'язові спазми і тремор в моделі CREAE розсіяного склерозу, продемонстрував, що дані ефекти опосередковані рецепторами CB₁ і CB₂ (Baker, Nature, 2000 p., 404, 84-87). У рамках фази 3 клінічних випробувань на хворих на розсіяний склероз і хворих з пошкодженням спинного мозку використовували суміш тетрагідроканабінолу/канабідіолу (ТГК/CBD) з низьким коефіцієнтом співвідношення компонентів. Стало відомо, що миші, нокаутовані по гену FAAH, незмінно досягають кращих клінічних показників, ніж миші дикого типу з контрольної групи, але це поліпшення не є результатом протизапальної дії, а, швидше, може відображати деякий нейропротекторний ефект або ефект стимулювання ремієлінізації, що розвивається внаслідок дефіциту даного ферменту (Webb et al, Neurosci Lett., 2008 p., тому 439, 106-110).

25

30

35

Були представлені звіти про проведення маломасштабних клінічних досліджень в контрольованих умовах в інших потенційних комерційних галузях застосування канабіноїдів. Стало відомо, що випробування на добровольцях підтвердили, що при пероральному прийомі, ін'єкціях і курінні канабіноїдів вони надають дозозалежне зниження внутрішньоочного тиску (ВОТ), таким чином послабляючи симптоми глаукоми. Офтальмологи прописували марихуану пацієнтам, які страждають на глаукому, у яких інші лікарські засоби для регулювання внутрішньоочного тиску були неефективними (Robson et al., 2001 p., див. вище).

Інгібування FAAH за допомогою інгібітору з невеликими молекулами може мати перевагу перед лікуванням агоністом CB₁ прямої дії. Введення екзогенних агоністів CB₁ може викликати ряд реакцій, включаючи знижену ноцицепцію, катаlepsію, гіпотермію і посилену харчову поведінку. Зокрема, ці чотири реакції називають «канабіноїдною тетрадою». Експерименти з мишами, нокаутіваними по гену FAAH (FAAH^{-/-}), продемонстрували зниження реакції при тестуванні ноцицепції, але не показали катаlepsію, гіпотермію або посилену харчову поведінку (Cravatt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001 p., 98(16), 9371). Голодування спричиняло підвищення концентрації AEA в лімбічній частці переднього мозку щурів, але не в інших ділянках головного мозку, що свідчить про те, що стимулювання біосинтезу AEA може бути анатомічно обмежене спрямованими шляхами провідності ЦНС (Kirkham et al., Br. J. Pharmacol., 2002 p., 136, 550). Той факт, що зростання концентрації AEA спостерігається в мозку, а не носить системний характер, дозволяє передбачити, що інгібування FAAH невеликою молекулою може посилити дію AEA і інших амідів жирних кислот в тканинних областях, де відбувається синтез і виділення даних сигнальних молекул при даному патофізіологічному стані (Piomelli et al., 2003 p., див. вище).

Крім ефектів інгібітору FAAH відносно AEA і інших ендоканабіноїдів, інгібітори катаболізму FAAH інших ліпідних медіаторів можуть бути використані при деякому іншому свідченні під час лікування. Наприклад, PEA продемонстрував біологічні ефекти в моделях запалення (Holt et al., Br. J. Pharmacol., 2005 p., 146, 467-476), імуносупресії, анальгезії і нейропротекції на тваринах (Ueda et al., J. Biol. Chem., 2001 p., 276(38), 35552). Олеамід, інший субстрат FAAH, індукуює сон (Boger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000 p., 97(10), 5044; Mendelson et al., Neuropsychopharmacology, 2001 p., 25, S36). Також було зазначено, що інгібування FAAH впливає на когнітивну функцію (Varvel et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 2006 p., 317(1), 251-257) і депресію (Gobbi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2005 p., 102(51), 18620-18625).

Останні дані підтверджують два додаткових свідчення для застосування FAAH, що свідчить про те, що рецептори, які активуються субстратом FAAH, відіграють велику роль в енергетичному обміні, а також в гомеостазі кісткової тканини (Overton et al., Br. J. Pharmacol., 2008 p., 153, доп. 1, S76-81; і Plutzky et al., Diab. Vasc. Dis. Res., 2007 p., 4, доп. 3, S12-4). Було продемонстровано, що один з раніше вказаних ліпідних сигнальних амідів жирних кислот - ОЕА, який катаболізує FAAH, є одним з найактивніших агоністів рецептора GPCR 119 (GPR119), для якого недавно ідентифікували ліганди (що також називається рецептором глюкозозалежного інсулінотропного пептиду). Даний рецептор знаходиться переважно в підшлунковій залозі людини. Його активація поліпшує гомеостаз глюкози за допомогою глюкозозалежного вивільнення інсуліну бета-клітками підшлункової залози. Агоністи GPR119 можуть пригнічувати коливання рівня глюкози при її прийомі під час орального глюкозотолерантного тесту, а ОЕА продемонстрував незалежне регулювання споживання їжі і підвищення маси тіла при введенні гризунам, що свідчить про можливу перевагу його використання при порушеннях енергетичного обміну, таких як інсулінорезистентність і діабет. Субстрат FAAH PEA є агоністом PPAR (α -рецептора, що активується проліфератором пероксисом). Дані, отримані в процесі вивчення маркерів-імітаторів під час досліджень організму людини з використанням фенофібрату як агоніста PPAR α , підтверджують припущення про те, що агонізм PPAR α має потенціал викликати координований відгук PPAR α . Він дозволяє поліпшувати стан при дисліпідемії, пригнічувати запалення і обмежувати розвиток атеросклерозу у пацієнтів з метаболічним синдромом або діабетом типу 2. Анандамід є агоністом рецептора PPAR γ . Лікування анандамідом індукуює диференціацію клітин 3T3-L1 в адипоцити, а також накопичення крапель тригліцеридів і вироблення адипонектину (Bouaboula et al., E. J. Pharmacol., 2005 p., 517, 174-181). Лікування низькими дозами канабіноїдів показало зниження ступеня розвитку атеросклерозу у мишей - це додатково дозволяє передбачити терапевтичний ефект інгібування FAAH при дисліпідемії, стеатозі печінки, стеатогепатиті, ожирінні і метаболічному синдромі (Steffens et al., Nature, 2005 p., 434, 782-6).

Одним з найпоширеніших дегенеративних захворювань є остеопороз. Він характеризується зниженою мінеральною щільністю кісткової тканини (МЩКТ) і підвищеним ризиком переломів кісток. У мишей, що не мають рецептора CB₂, спостерігається виражена прискорена втрата

трабекулярної і збільшення об'єму кортикальної кісткової тканини, що залежить від віку. Селективний CB_2 -агоніст підвищує кількість і активність остеобластів в ендокортикальній зоні, а також гальмує остеокластогенез в трабекулярній кістковій тканині і знижує втрату кісткової маси, викликаного овариєктомією (Ofek et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2006 p., 103, 696-701). МЩКТ значною мірою зумовлена генетичними факторами, хоча генетичні фактори, що впливають на патогенез остеопорозу у людей, здебільшого невідомі. Про зв'язок генетичних факторів з МЩКТ у людей свідчать результати генетичних досліджень, в яких був виявлений значний взаємозв'язок окремого поліморфізму і гаплотипів, що охоплює ген CNR2 людської хромосоми 1p36, що демонструє роль периферичного рецептора CB_2 в етіології остеопорозу (Karsak et al., Hum. Mol. Genet, 2005 p., 14, 3389-96).

Таким чином, інгібітори FAAH з невеликими молекулами повинні бути корисними в лікуванні болів різної етіології, тривоги, розсіяного склерозу і інших рухових порушень, нудоти/блювання, розладів харчової поведінки, епілепсії, глаукоми, запального процесу, імуносупресії, нейропротекції, депресії, корекції когнітивної діяльності і порушень сну. Також вони можуть мати менше побічних ефектів в порівнянні з екзогенними канабіноїдами.

У різних публікаціях повідомляється про ряд гетероарил-заміщених похідних сечовини. Деякі сполуки піперазинілу і піперидинілу як модулятори активності FAAH описані в міжнародній заявці на патент № WO 2006/074025, міжнародній заявці на патент № PCT/US2009/065757, міжнародній заявці на патент № PCT/US2009/065752, заявці на патент США № US 2009/0062294 і попередній заявці на патент США № 61/263477. Деякі похідні піперазин-1-карбоксаміду і піперидин-1-карбоксаміду описані в міжнародній заявці на патент № WO 2008/023720. Деякі арилоксобутилпіперидини, арилоксобутилпіролідини і арилоксобутилпіперазини описані в міжнародній заявці на патент № WO 2001/005763. Інформація про деяку похідну піперидину представлена в міжнародній заявці на патент № WO 99/50247. Інформація про деяку похідну піперазину представлена в міжнародній заявці на патент № WO 99/42107. Деякі N-аралкілпіперазини описані в міжнародній заявці на патент № WO 98/37077. Деякі арил-заміщені гетероциклічні похідні сечовини описані в попередній заявці на патент США № 61/184606. Проте існує потреба в ефективних модуляторах активності FAAH з відповідними фармацевтичними властивостями.

Особливості і переваги даного винаходу очевидні фахівцям в даній галузі. На основі змісту цього документа, включаючи короткий опис винаходу, докладний опис винаходу, передумови створення винаходу, приклади і формулу винаходу, фахівець в даній галузі зможе внести модифікації і зміну в різні умови і способи застосування, описані в цьому документі. Публікації, вказані в цьому документі, повністю включені в цей документ шляхом посилання.

Короткий опис винаходу

У цьому документі описаний (4-хлорпіридин-3-іл)-амід 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)-піперазин-1-карбонової кислоти і його фармацевтично прийнятні солі, у яких була виявлена FAAH-модулююча активність. Даний винахід стосується загального і переважного варіантів здійснення, що визначаються, відповідно, незалежними і залежними пунктами формули винаходу, які прикладені до цього документа і включені в нього шляхом посилання.

У даному винаході вказані експериментальні дані, які демонструють, що хімічні структурні елементи даного винаходу показують вищі значення IC_{50} для інгібування ферменту CYP2D6 відносно порівнювані сполуки. Крім того, в тесті первинного спостереження (тест Ірвіна) на щурах (4-хлорпіридин-3-іл)-амід 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)-піперазин-1-карбонової кислоти продемонстрував переваги у вигляді поліпшених характеристик і знижених побічних ефектів на фізіологічні функції при введенні сполуки відносно порівнювані сполуки.

Інгібуюча активність (4-хлорпіридин-3-іл)-аміду 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)-піперазин-1-карбонової кислоти IC_{50} при інгібуванні ферменту CYP2D6 поліпшена в порівнянні з раніше описаною сполукою піперазинілсечовини, піридин-3-іламідом 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)-піперазин-1-карбонової кислоти (див. заявку PCT № WO 2006/074025, приклад 150), яка в цьому документі використовується як порівнювана сполука. (4-Хлорпіридин-3-іл)-амід 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)-піперазин-1-карбонової кислоти продемонстрував значення IC_{50} , яке в 7,5-5,5 разів перевищує значення для порівнювані сполуки, при використанні як субстрату буфуралолу або декстрометорфану відповідно.

Більше того, в тесті первинного спостереження (тест Ірвіна) на щурах хімічні структурні елементи даного винаходу показують наявність непередбачених властивостей відносно порівнювані сполуки. Зокрема, сполука піридин-3-іламід 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)-піперазин-1-карбонової кислоти, що порівнюється, підвищила реактивність на дотик у всіх піддослідних щурів при дозуванні 10 мг/кг, тоді як (4-хлорпіридин-3-іл)-амід 4-(2,2-

дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)-піперазин-1-карбонової кислоти в тому ж дозуванні стимулював реактивність тільки у одного з чотирьох піддослідних щурів. Порівнювана сполука, викликала седативний ефект через 15-120 хвилин і аномальну ходу (похитування) через 15 хвилин після введення у всіх піддослідних щурів при дозуванні 60 мг/кг, тоді як подібних ефектів при введенні (4-хлорпіридин-3-іл)-аміду 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)-піперазин-1-карбонової кислоти у піддослідних щурів не спостерігали. Також, згідно з результатами спостережень, при дозуванні 60 мг/кг порівнювані сполуки, спричиняло зниження м'язового тону у всіх щурів через 60-120 хвилин після введення, тоді як (4-хлорпіридин-3-іл)-амід 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)-піперазин-1-карбонової кислоти підвищував тонус черевних м'язів тільки у одного з чотирьох піддослідних щурів. І, нарешті, при дозуванні 60 мг/кг порівнювані сполуки, викликало гіпотермію у піддослідних щурів через 15-60 хвилин і через 180 хвилин, тоді як даний ефект не спостерігали у щурів, яким вводили сполуку, що становить предмет даного винаходу.

У одному загальному аспекті даний винахід стосується сполуки (4-хлорпіридин-3-іл)-амід 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)-піперазин-1-карбонової кислоти. У конкретному варіанті здійснення сполука являє собою хлористоводневу сіль (4-хлорпіридин-3-іл)-аміду 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)-піперазин-1-карбонової кислоти.

Даний винахід також стосується фармацевтично прийнятних солей (4-хлорпіридин-3-іл)-аміду 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)-піперазин-1-карбонової кислоти, фармацевтично прийнятних проліків (4-хлорпіридин-3-іл)-аміду 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)-піперазин-1-карбонової кислоти і фармацевтично прийнятних метаболітів (4-хлорпіридин-3-іл)-аміду 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)-піперазин-1-карбонової кислоти.

У додатковому загальному аспекті даний винахід стосується фармацевтичних композицій, кожна з яких включає: (а) терапевтично ефективну кількість щонайменше однієї з наступних сполук: (4-хлорпіридин-3-іл)-амід 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)-піперазин-1-карбонової кислоти, фармацевтично прийнятні солі (4-хлорпіридин-3-іл)-аміду 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)-піперазин-1-карбонової кислоти, фармацевтично прийнятні проліки (4-хлорпіридин-3-іл)-аміду 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)-піперазин-1-карбонової кислоти і фармацевтично прийнятні метаболіти (4-хлорпіридин-3-іл)-аміду 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)-піперазин-1-карбонової кислоти; і (b) фармацевтично прийнятний ексципієнт.

У іншому аспекті варіанти здійснення даного винаходу можуть бути використані як модулятори активності FAAH. Таким чином, даний винахід стосується способу модуляції активності FAAH, що включає вплив на FAAH терапевтично ефективної кількості щонайменше однієї з наступних сполук: (4-хлорпіридин-3-іл)-амід 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)-піперазин-1-карбонової кислоти, фармацевтично прийнятні солі (4-хлорпіридин-3-іл)-аміду 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)-піперазин-1-карбонової кислоти, фармацевтично прийнятні проліки (4-хлорпіридин-3-іл)-аміду 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)-піперазин-1-карбонової кислоти і фармацевтично активні метаболіти (4-хлорпіридин-3-іл)-аміду 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)-піперазин-1-карбонової кислоти.

У іншому загальному аспекті даний винахід стосується способу лікування суб'єкта, у якого продіагностовано або є захворювання, розлад або медичний стан, опосередкованою активністю гідролази амідів жирних кислот (FAAH), що включає введення суб'єкту, який потребує такого лікування, ефективної кількості щонайменше однієї речовини, вибраної з (4-хлорпіридин-3-іл)-аміду 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)-піперазин-1-карбонової кислоти і його фармацевтично прийнятних солей, фармацевтично активних проліків і фармацевтично активних метаболітів. У переважних варіантах здійснення способу, що має ознаки винаходу, захворювання, розлад або медичний стан вибраний з наступного списку: тривога, депресія, біль, порушення сну, розлад харчової поведінки, запальний процес, розсіяний склероз і інші рухові порушення, синдром виснаження при ВІЛ-інфекції, закриті травми черепа, інсульт, порушення здібності до навчання і порушення пам'яті, хвороба Альцгеймера, епілепсія, синдром Туретта, хвороба Німанна-Піка, хвороба Паркінсона, хорея Хантінгтона, неврит зорового нерва, аутоімунний увеїт, симптоми наркотичної або алкогольної абстиненції, нудота, блювання, сексуальна дисфункція, тривога, посттравматичні стресові розлади, спазм судин головного мозку, глаукома, синдром подразненого кишечника, запальне захворювання кишечника, імуносупресія, шкірний свербіж, гастроезофагеальна рефлюксна хвороба, паралітична непрохідність кишечника, секреторна діарея, виразкова хвороба шлунка, ревматоїдний артрит, небажана вагітність, гіпертензія, рак, гепатит, алергія дихальних шляхів,

аутоімунний діабет, хронічний прурит, нейрозапалення, діабет, метаболічний синдром, остеопороз, дисліпідемія, стеатоз печінки і стеатогепатит.

У іншому загальному аспекті даний винахід стосується способу синтезу (4-хлорпіридин-3-іл)-аміду 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)-піперазин-1-карбонової кислоти з використанням 2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-карбальдегіда і піперазину в одностадійній реакції гідрогенізації.

Додаткові варіанти здійснення, характеристики і переваги винаходу будуть очевидні з наступного докладного опису і практичного здійснення винаходу.

Докладний опис винаходу і його переважних варіантів здійснення

Даний винахід може бути більш повно оцінений з нижченаведеного опису, що включає визначення термінів і заключні приклади. Скорочено публікації, що цитуються, включені в дана опис шляхом посилання.

Терміни «що включає», «що містить», «що складається з» використовуються в цьому документі в їх відкритому, необмеженому значенні.

Структурна формула, приведена в цьому документі, також представляє як немічена, так і мічені ізотопами форми відповідних сполук. Мічені ізотопами сполука мають структури, що відповідають представленим в даній заявці формулам, за винятком того, що один або більше атомів в них замінені атомом, що має певну атомну масу або масове число. Приклади ізоотопів, які можуть бути впроваджені в сполуки, що становлять предмет даного винаходу, включають в себе ізотопи водню, вуглецю, азоту, кисню або фтору, такі як ^2H , ^3H , ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}O , ^{17}O і ^{18}F відповідно. Такі мічені ізотопами сполука можна використовувати в дослідженнях метаболізму (переважно з ^{14}C), дослідженнях кінетики реакцій (наприклад, з ^2H або ^3H), методиках виявлення або візуалізації (таких як позитронно-емісійна томографія (ПЕТ) або однофотонна емісійна комп'ютерна томографія (ОФЕКТ)), включаючи кількісні аналізи розподілу лікарського засобу або тканини-субстрату, або в радіаційній терапії пацієнтів. Зокрема, сполука, мічена ^{18}F або ^{11}C , може бути переважною для досліджень способами ПЕТ або ОФЕКТ. Крім того, заміщення важкими ізотопами, такими як дейтерій (тобто ^2H), може дати деякі лікувальні переваги внаслідок більшої метаболічної стабільності сполук, наприклад, більшого періоду напіввиведення in vivo або зниженого необхідного дозування. Сполуки даного винаходу, мічені ізотопами, і їх проліки можуть бути по суті приготовані шляхом проведення процедур згідно зі схемами або прикладами і способами приготування, описаними нижче, шляхом заміни реагенту, що не містить ізотопно-мічених атомів, на доступний реагент з ізотопно-міченими атомами.

У одному загальному варіанті здійснення даний винахід стосується (4-хлорпіридин-3-іл)-аміду 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)-піперазин-1-карбонової кислоти, а також до фармацевтично прийнятних солей, фармацевтично прийнятних проліків і фармацевтично активних метаболітів даної сполуки. У іншому загальному варіанті здійснення даний винахід стосується фармацевтичних композицій, кожна з яких містить терапевтично ефективну кількість FAAN-модулюючої речовини, вибраної з (4-хлорпіридин-3-іл)-аміду 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)-піперазин-1-карбонової кислоти, фармацевтично прийнятних солей, фармацевтично прийнятних проліків і фармацевтично активних метаболітів даної сполуки.

Даний винахід також стосується фармацевтично прийнятних солей (4-хлорпіридин-3-іл)-аміду 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)-піперазин-1-карбонової кислоти. Термін «фармацевтично прийнятна сіль» означає сіль вільної кислоти або основи сполуки (4-хлорпіридин-3-іл)-амід 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)-піперазин-1-карбонової кислоти, яка є не токсичною, біологічно переносимою або іншим чином біологічно допустимою для введення суб'єкту. Див. по суті публікацію G.S. Paulekuhn, et al., Trends in Active Pharmaceutical Ingredient Salt Selection based on Analysis of the Orange Book Database, J. Med. Chem., 2007 p., 50:6665-72, S.M. Berge, et al., Pharmaceutical Salts, J Pharm Sci., 1977 p., 66:1-19, і Handbook of Pharmaceutical Salts, Properties, Selection, and Use, під ред. Stahl і Wermuth, Wiley-VCH and VHCA, м. Цюрих, 2002 р. Переважними є фармацевтично прийнятні солі, які мають фармакологічну ефективність, не мають надмірної токсичності і при контакті з тканинами пацієнта не спричиняють подразнення або алергічних реакцій. Приклади фармацевтично прийнятних солей включають в себе сульфати, піросульфати, бісульфати, сульфіти, бісульфіти, фосфати, моногідрофосфати, дигідрофосфати, метафосфати, пірофосфати, хлориди, броміди, йодиди, ацетати, пропіонати, деканоати, каприлати, акрилати, форміати, ізобутирати, капроати, гептаноати, пропіолати, оксалати, малонати, сукцинати, суберати, себакати, фумарати, малеати, бутин-1,4-діоати, гексин-1,6-діоати, бензоати, хлорбензоати, метилбензоати, динітробензоати, гідроксибензоати, метоксибензоати, фталати, сульфонати, ксиленсульфонати, фенілацетати, фенілпропіонати, фенілбутирати, цитрати, лактати, γ-

гідроксибутирати, гліколяти, тартрати, метансульфонати, пропансульфонати, нафталін-1-сульфонати, нафталін-2-сульфонати і манделати.

У деяких варіантах здійснення сполука (4-хлорпіридин-3-іл)-амід 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)-піперазин-1-карбонової кислоти являє собою хлористоводневу сіль.

Сполука (4-хлорпіридин-3-іл)-амід 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)-піперазин-1-карбонової кислоти може в достатній кількості містити основну групу і, відповідно, може вступати в реакцію з рядом неорганічних і органічних кислот з утворенням фармацевтично прийнятної солі.

Сполука, що становить предмет даного винаходу, містить щонайменше одну азотисту основу. Таким чином, необхідну фармацевтично прийнятну сіль можна отримати будь-яким прийнятним способом, доступним в даній галузі, наприклад, шляхом обробки вільної основи неорганічною кислотою, такою як соляна кислота, бромистоводнева кислота, сірчана кислота, сульфамінова кислота, азотна кислота, борна кислота, фосфорна кислота і т. п.; або органічною кислотою, такою як оцтова кислота, фенілоцтова кислота, пропіонова кислота, стеаринова кислота, молочна кислота, аскорбінова кислота, малеїнова кислота, гідроксималеїнова кислота, ізетіонова кислота, янтарна кислота, валеріанова кислота, фумарова кислота, маленова кислота, піровиноградна кислота, щавлева кислота, гліколева кислота, саліцилова кислота, олеїнова кислота, пальмітинова кислота, лауринова кислота, піранозидилова кислота, така як глюкуронова кислота або галактуринова кислота, альфа-гідроксикислота, така як мигдалева кислота, лимонна кислота або винна кислота; амінокислотою, такою як аспарагінова кислота або глутамінова кислота; ароматичною кислотою, такою як бензойна кислота, 2-ацетоксибензойна кислота, нафтойна кислота або корична кислота; сульфоновою кислотою, такою як лаурилсульфонова кислота, п-толуолсульфонова кислота, метансульфонова кислота або етансульфонова кислота; або будь-якою іншою кислотою або сумішшю кислот, що вважається еквівалентом або допустимим замісником з точки зору звичайного фахівця в даній галузі.

Даний винахід також стосується фармацевтично прийнятних проліків (4-хлорпіридин-3-іл)-аміду 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)-піперазин-1-карбонової кислоти. Термін «проліки» означає попередник певної сполуки, що після призначення суб'єкту дає сполуку *in vivo* шляхом використання хімічного або фізіологічного процесу, такого як сольволиз або ферментативне розщеплення, або при фізіологічних умовах (наприклад, проліки, приведені до певного фізіологічного значення pH, перетворюється в сполуку прикладу 1). «Фармацевтично прийнятні проліки» означають проліки, які є нетоксичними, біологічно переносимими і іншим чином біологічно допустимими для введення суб'єкту. Типові процедури відбору і приготування відповідних похідних пролікарських форм описані, наприклад, в роботі Design of Prodrugs, під ред. H. Bundgaard, Elsevier, 1985 p.

Приклади проліків включають в себе сполуки, що мають амінокислотний залишок або поліпептидний ланцюг, що складається з двох або більше (наприклад, двох, трьох або чотирьох) амінокислотних залишків, ковалентно з'єднаних через амідний або ефірний зв'язок з вільною аміногрупою (4-хлорпіридин-3-іл)-аміду 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)-піперазин-1-карбонової кислоти. Приклади амінокислотних залишків включають в себе двадцять існуючих в природі амінокислот, які звичайно позначаються трьома буквами, а також 4-гідроксипролін, гідроксилізин, демозин, ізодемозин, 3-метилгістидин, норвалін, бета-аланін, гамма-аміномасляна кислота, цитрулін гомоцистеїн, гомосерин, орнітин і метіонінсульфон. Додаткові типи проліків можуть бути виготовлені, наприклад, шляхом отримання похідних вільних амінів у вигляді амідів, сульфонамідів або фосфонамідів.

Даний винахід також стосується фармацевтично активних метаболітів (4-хлорпіридин-3-іл)-аміду 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)-піперазин-1-карбонової кислоти. Термін «фармацевтично активний метаболіт» означає фармакологічно активний продукт метаболізму (4-хлорпіридин-3-іл)-аміду 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)-піперазин-1-карбонової кислоти або його солі в організмі. Проліки і активні метаболіти сполука можуть бути визначені звичайними способами, відомими або доступними фахівцям в даній галузі. Див., наприклад, Bertolini et al., J. Med. Chem. 1997 p., 40, 2011-2016; Shan et al., J. Pharm. Sci. 1997 p., 86 (7), 765-767; Bagshawe, Drug Dev. Res. 1995 p., 34, 220-230; Bodor, Adv. Drug Res. 1984 m., 13, 224-331; Bundgaard, Design of Prodrugs (Elsevier Press, 1985 p.); і Larsen, Design and Application of Prodrugs, Drug Design and Development (під ред. Krogsgaard-Larsen et al., Harwood Academic Publishers, 1991 p.).

Сполука (4-хлорпіридин-3-іл)-амід 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)-піперазин-1-карбонової кислоти, а також її фармацевтично прийнятні солі, фармацевтично прийнятні

проліки і фармацевтично активні метаболіти (що в сукупності називаються «активними речовинами»), що становлять предмет даного винаходу, в способах, які складають предмет даного винаходу, використовують як інгібітори FAAH. Термін «інгібітори» означає сполуки, які знижують, попереджають, деактивують експресію, десенсибілізують або виконують

5 понижувальну регуляцію активності FAAH. Активні речовини можна застосовувати в способах, що мають ознаки винаходу, для лікування медичних станів, захворювань або розладів, опосередкованих інгібуванням або модуляцією FAAH, описаних в цьому документі. Таким чином, активні речовини відповідно до даного винаходу можна використовувати як анальгетики, антидепресанти, коректори порушення когнітивних функцій, нейропротектори, седативні,

10 стимулюючі/пригнічувальні апетит речовини або контрацептиви.

Приклади патологічних станів, захворювань і розладів, опосередкованих активністю FAAH, включають в себе тривогу, депресію, біль, порушення сну, розлади харчової поведінки, запальний процес, розсіяний склероз і інші рухові порушення, синдром виснаження при ВІЛ-інфекції, закриті травми черепа, інсульт, порушення здібності до навчання і порушення пам'яті,

15 хворобу Альцгеймера, епілепсію, синдром Туретта, епілепсію, хворобу Німанна-Піка, хворобу Паркінсона, хорею Хантінгтона, неврит зорового нерва, аутоімунний увеїт, симптоми наркотичної або алкогольної абстиненції, нудоти, блювання, сексуальну дисфункцію, посттравматичний стресовий розлад, спазм судин головного мозку, діабет, метаболічний синдром, остеоартрит і остеопороз.

Таким чином, активні речовини можна застосовувати для лікування суб'єктів, що мають такий діагноз або захворювання, розлад або патологічний стан. Термін «лікувати» або «лікування», що використовується в цьому документі, стосується введення речовини або композиції, що становить предмет даного винаходу, суб'єкту для отримання бажаного терапевтичного ефекту шляхом інгібування активності FAAH. Лікування включає в себе зупинку

25 розвитку, поліпшення, полегшення, сповільнення розвитку, зниження тяжкості, зменшення частоти вияву або запобігання захворюванню, розладу, патологічному стану або одного або більше симптомів такого захворювання, розладу або патологічного стану, опосередкованого модуляцією активності FAAH. Термін «суб'єкт» стосується ссавця пацієнта, що потребує такого лікування, наприклад, людини. «Модулятори» включають в себе одночасно і інгібітори, і активатори, при цьому термін «інгібітори» стосується сполук, які знижують, блокують, деактивують, десенсибілізують або знижують рівень експресії або активності FAAH, а «активатори» являють собою сполуки, які збільшують, активують, полегшують, сенсифікують або підвищують рівень експресії або активності FAAH.

30

Відповідно, даний винахід стосується способів застосування описаних в цьому документі активних речовин для лікування суб'єктів, що мають діагноз або захворювання, розлад або патологічний стан, опосередкований активністю FAAH, наприклад, тривогу, біль, порушення сну, розлади харчової поведінки, запальний процес, рухові порушення (наприклад, розсіяний склероз), глюкозний і ліпідний метаболізм (наприклад, діабет), а також гомеостаз кісткової

35 тканини (наприклад, остеопороз).

Симптоми або хворобливі стани повинні бути включені в поняття «медичні стани, розлади або захворювання». Наприклад, біль може бути пов'язаний з різними захворюваннями, розладами або патологічними станами і може мати різну етіологію. Типові види болю, які можна лікувати FAAH-модуючою речовиною (а в одному прикладі, приведені в цьому документі, - FAAH-інгібуючою речовиною) відповідно до принципів даного винаходу, включають в себе

45 раковий біль, післяопераційний біль, біль в ШКТ, біль при пошкодженні спинного мозку, вісцеральну гіперальгезію, таламічний біль, головний біль (включаючи головний біль при стресі і мігрені), поперековий біль, біль в шиї, м'язово-скелетний біль, периферичний нейропатичний біль, центральний нейропатичний біль, біль, пов'язаний з нейродегенеративними захворюваннями, і менструальний біль. Синдром виснаження при ВІЛ-інфекції включає в себе

50 супутні симптоми, такі як втрата апетиту і нудота. Хвороба Паркінсона включає в себе, наприклад, дискінезію, викликану терапією леводопою. Лікування розсіяного склерозу може включати в себе лікування симптомів, таких як спастичність, нейрогенний біль, центральний біль або дисфункція сечового міхура. Симптоми наркотичної абстиненції можуть бути викликані, наприклад, залежністю від опіатів або нікотину. Нудота або блювання можуть бути викликані хіміотерапією, післяопераційним станом або прийомом опіоїдних препаратів. Лікування сексуальної дисфункції може включати в себе підвищення прагнення або затримку еякуляції. Лікування рака може включати в себе лікування гліоми. Порушення сну включають в себе, наприклад, синдром апное у сні, безсоння і порушення, що вимагає лікування речовиною, яка має седативну або наркоподібну дію. Розлади харчової поведінки включають в себе, наприклад,

55 анорексію або втрату апетиту, пов'язану з таким захворюванням, як рак або ВІЛ-інфекція/СНІД.

60

У способах лікування відповідно до даного винаходу суб'єкту, у якого продіагностовано або є захворювання, розлад або патологічний стан, вводять ефективну кількість щонайменше однієї активної речовини відповідно до даного винаходу. Термін «терапевтично ефективна кількість» або «ефективна кількість» означає кількість або дозу ФААН-модулюючої речовини, по суті достатню для вияву необхідного терапевтичного ефекту у пацієнтів, потребуючих лікування захворювання, розладу або патологічного стану, опосередкованого активністю ФААН. Ефективні кількості або дозування активних речовин, що становлять предмет даного винаходу, можуть бути визначені стандартними способами, наприклад, моделюванням, дослідженнями з підвищенням дози або клінічними випробуваннями з урахуванням стандартних факторів, таких як спосіб або шлях введення або доставки лікарського засобу, фармакокінетика речовини, ступінь тяжкості і характер течії захворювання, розладу або патологічного стану, попередній або поточний курс лікування суб'єкта, стан здоров'я і реакція суб'єкта на лікарські засоби, а також думка лікуючого лікаря. Зразкова доза може знаходитися в діапазоні від приблизно 0,0001 до приблизно 200 мг активної речовини на кг ваги тіла суб'єкта на добу, переважно від приблизно 0,001 до 100 мг/кг/доб. або від приблизно 0,01 до 35 мг/кг/доб., або від приблизно 0,1 до 10 мг/кг/доб. в однократному дозуванні або при дробовому введенні (наприклад, два, три або чотири рази на добу). Для людини з масою тіла 70 кг типовий інтервал допустимого дозування складає від приблизно 0,05 до приблизно 7 г/сут. або від приблизно 0,2 до приблизно 5 г/доб. Після полегшення симптомів захворювання, розладу або патологічного стану суб'єкта дозування може бути скоректована для підтримуючого лікування. Наприклад, дозування, частота введення або обидва аспекти відразу можуть бути знижені залежно від симптомів до рівня, при якому підтримується бажаний терапевтичний ефект від прийому препарату. Зрозуміло, якщо вияви симптомів знижені до прийнятного рівня, лікування можна припинити. Однак при наявності рецидивів симптомів пацієнту може бути потрібне довготривале періодичне лікування.

Крім того, активні речовини, що становлять предмет даного винаходу, можна застосовувати в комбінації з додатковими активними компонентами для лікування перерахованих вище станів. Додаткові активні компоненти можна застосовувати окремо у вигляді речовин, що призначаються для прийому спільно з активною речовиною (4-хлорпіридин-3-іл)-амід 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)-піперазин-1-карбонової кислоти, або можуть входити до складу такої речовини в фармацевтичній композиції, що становить предмет даного винаходу. У одному прикладі здійснення додаткові активні компоненти являють собою компоненти, у яких відома або виявлена ефективність лікування патологічних станів, розладів або захворювань, опосередкованих активністю ФААН, такі як інший модулятор ФААН або сполука з активністю відносно іншої мішені, пов'язаної з конкретним патологічним станом, розладом або захворюванням. Таку комбінацію можна використовувати для підвищення ефективності (наприклад, шляхом включення в комбінацію сполуки, що посилює дію або ефективність активної речовини відповідно до принципів даного винаходу), зниження одного або більше побічних ефектів або необхідної дози активної речовини відповідно до принципів даного винаходу. У одному типовому варіанті здійснення композиція відповідно до принципів даного винаходу може містити один або більше додаткових активних компонентів, вибраних з опіоїдів, нестероїдних протизапальних лікарських засобів (НПЗЗ) (наприклад, ібупрофену, інгібіторів циклооксигенази-2 (ЦОГ-2) і напроксен), габапентину, прегабаліну, трамадолу, ацетамінофену і аспірину.

Активні речовини, що становлять предмет даного винаходу, використовують самостійно або в комбінації з одним або більше додатковими активними компонентами для приготування фармацевтичних композицій, що становлять предмет даного винаходу. Фармацевтична композиція, що становить предмет даного винаходу, включає: (а) ефективну кількість щонайменше однієї активної речовини відповідно до принципів даного винаходу; і (b) фармацевтично прийнятний ексципієнт.

Термін «фармацевтично прийнятний ексципієнт» означає нетоксичну біологічно переносиму і по інших параметрах біологічно допустиму для введення суб'єкту речовину, таку як інертна речовина, що додається в фармакологічну композицію або іншим чином використовується як засіб доставки, носія або розріджувача для полегшення введення речовини і сумісна з ним. Деякі фармацевтично прийнятні ексципієнти представлені в довіднику Handbook of Pharmaceutical Excipients, 6-е вид., Pharmaceutical Press, 2009 р. Приклади ексципієнтів включають в себе карбонат кальцію, фосфат кальцію, різні цукри і типи крохмалю, похідні целюлози, желатин, рослинні олії і поліетиленгліколи.

Форми доставки фармацевтичних композицій, що містять одну або більше одиниць дозування активних речовин, можуть бути приготовані з використанням відповідних

фармацевтичних ексципієнтів і способів приготування, відомих в цей час або доступних фахівцям в даній галузі в майбутньому. Композиції можуть бути введені із застосуванням способів, що мають ознаки винаходу, будь-яким допустимим шляхом, наприклад, перорально, парентерально, ректально, топічним способом, шляхом нанесення на око або шляхом інгаляції.

5 Препарат може мати форму таблеток, капсул, саше, драже, порошоків, гранул, пастилок, порошоків для відновлення, рідких препаратів або супозиторіїв. Переважно композиції приготовані для внутрішньовенного вливання, топічного застосування або перорального введення.

10 Для перорального введення активні речовини, що становлять предмет даного винаходу, можуть бути приготовані в формі таблеток або капсул, а також в формі розчину, емульсії або суспензій. Для отримання пероральних композицій активні речовини можуть бути приготовані для отримання дозування, наприклад, від приблизно 5 мг до 5 г на добу або від приблизно 50 мг до 5 г на добу, у вигляді одиничних або розділених доз. Наприклад, загальну добову дозу приблизно від 5 мг до 5 г на добу можна вводити один, два, три або чотири рази на добу.

15 Таблетки для перорального введення можуть включати в себе активний(і) компонент(и), змішаний(і) з сумісними фармацевтично прийнятними ексципієнтами, такими як розріджувачі, речовини для поліпшення розпаду таблеток, зв'язувальні речовини, мастильні речовини, підсолоджувачі, смакові добавки, барвники і консерванти. Прийнятні інертні наповнювачі включають в себе карбонати натрію і кальцію, фосфати натрію і кальцію, лактозу, крохмаль, цукор, глюкозу, метилцелюлозу, стеарат магнію, манітол, сорбітол і т. п. Приклади рідких ексципієнтів для перорального введення включають в себе етанол, гліцерин, воду і т. п. Приклади речовин для поліпшення розпаду таблеток являють собою крохмаль, полівінілпіролідон (ПВП), натрію крохмаль гліколят, мікрокристалічну целюлозу і альгінову кислоту. Зв'язувальні речовини можуть включати в себе крохмаль і желатин. Мастильною речовиною, при її наявності, може бути стеарат магнію, стеаринова кислота або тальк. При необхідності таблетки можуть бути покриті таким матеріалом, як гліцерилмоностеарат або гліцерилдистеарат для сповільнення всмоктування в шлунково-кишковому тракті, або можуть мати ентérosолюбільну оболонку.

30 Капсули для перорального застосування можуть бути твердими і м'якими желатиновими. Для приготування твердих желатинових капсул активні компоненти можуть бути змішані з твердим, напівтвердим або рідким розріджувачем. М'які желатинові капсули можуть бути приготовані шляхом змішування активного компонента з водою, олією, такою як арахісова або оливкова олія, вазеліновим маслом, сумішшю моно- і диігліцеридів коротколанцюжкових жирних кислот, поліетиленгліколем 400 або пропіленгліколем.

35 Рідини для перорального введення можуть бути представлені в формі суспензій, розчинів, емульсій або сиропів, або вони можуть бути ліофілізовані і постачатися в сухому вигляді для відновлення водою або іншим прийнятним носієм перед використанням. Такі рідкі композиції необов'язково можуть містити: фармацевтично прийнятні ексципієнти, наприклад, суспендуючі речовини (наприклад, сорбіт, метилцелюлозу, альгінат натрію, желатин, гідроксипропілцелюлозу, карбоксиметилцелюлозу, гель алюмінію стеарату і т. п.); неводні носії, наприклад, олія (наприклад, мигдалева олія або фракціонована кокосова олія), поліпропіленгліколь, етиловий спирт або воду; консерванти (наприклад, метил- або пропіл-п-гідроксибензоат або сорбінову кислоту); змочувальні речовини, наприклад, лецитин; і ароматизатори або барвники, за необхідності.

45 Активні речовини, що становлять предмет даного винаходу, можна також вводити пацієнту не пероральними шляхами. Наприклад, композиції можуть бути приготовані у вигляді супозиторіїв для ректального застосування. У випадку композицій для парентерального введення, включаючи внутрішньовенне, внутрішньом'язове, внутрішньоочеревинне або підшкірне введення речовини, що становить предмет даного винаходу, можуть бути приготовані в формі стерильних водних розчинів або суспензій з додаванням відповідних розчинів до отримання необхідних значень рН і ізотонічності, або у вигляді парентерально прийнятного масла. Відповідні рідкі носії включають в себе розчин Рінгера і ізотонічний розчин хлориду натрію. Подібні лікарські форми можуть бути приготовані в однократній формі, такий як ампула або одноразовий пристрій для ін'єкцій, в багатодозовій формі, такий як флакони, з яких може бути відібрана необхідна кількість препарату, або в твердій формі або в формі первинного концентрату, який може бути використаний для приготування складу для ін'єкцій. Типові дози для інфузії знаходяться в діапазоні від приблизно 1 до 1000 мкг/кг/хв речовини у вигляді суміші з фармацевтичним носієм протягом проміжку часу від декількох хвилин до декількох днів.

60 Для топічного застосування речовини можуть бути змішані з фармацевтичним носієм в концентрації від приблизно 0,1% до приблизно 10% лікарських засоби в носії. Інший спосіб

введення речовин, що становлять предмет даного винаходу, може використовувати пластри для трансдермальної доставки препарату.

Альтернативно в способах, що становлять предмет даного винаходу, активні речовини можуть бути введені шляхом інгаляції, через ніс або рот, наприклад, у вигляді спрею, що містить також відповідний носій.

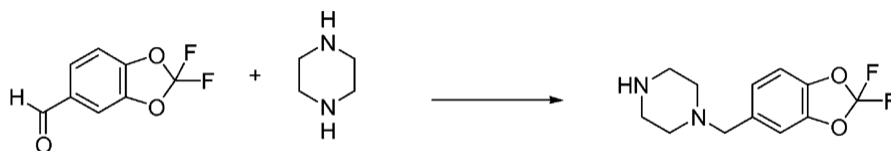
Приклади активних речовин, які можна застосовувати в способах, що становлять предмет даного винаходу, будуть описані з посиланням на приведені нижче типові схеми синтезу для загального отримання і конкретні приклади, що йдуть за ними.

Описані вище сполуки можуть бути виготовлені згідно з процесами, прийнятими в даній галузі і (або) описаними в нижченаведених схемах і прикладах. Реакції по деяких схемах можуть протікати з використанням захисту або без нього, залежно від ситуації. Для цих цілей можна використати відповідні захисні групи, наприклад, описані в публікаціях *Protective Groups in Organic Chemistry* під ред. J.F.W. McOmie, Plenum Press, 1973 p.; і T.W. Greene і P.G.M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3-е вид., John Wiley & Sons, 1999 p. Введені захисні групи можуть бути згодом видалені на будь-якій зручній для цього стадії відомими фахівцям способами. Альтернативно може бути необхідно ввести замість бажаного замісника відповідну групу, яка може бути проведена через схему реакції і потім замінена при необхідності на бажаний замісник. Такі сполуки, попередники сполук або проліки також входять в об'єм даного винаходу.

Для ілюстрації даного винаходу приведені наступні приклади. Приведені приклади не обмежують даний винахід. Вони призначені тільки для пропозиції способу практичного здійснення даного винаходу. Фахівці в даній галузі можуть знайти і інші способи здійснення даного винаходу, очевидні для них. Однак ці способи будуть вважатися такими, що підпадають під дію даного винаходу.

Нижче буде описаний синтез (4-хлорпіридин-3-іл)-аміду 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)-піперазин-1-карбонової кислоти з посиланням на типові схеми синтезу і конкретні процедури приготування. Як буде очевидно фахівцям в даній галузі, для отримання різних сполук, описаних в цьому документі, вихідні матеріали можуть бути вибрані відповідним чином так, щоб бажані замісники можна було провести через схему реакції з або без захисту, залежно від ситуації, і отримати бажаний продукт. Альтернативно може бути необхідно або бажано ввести замість бажаного замісника відповідну групу, яку можна провести через схему реакції і потім замінити при необхідності на необхідний замісник.

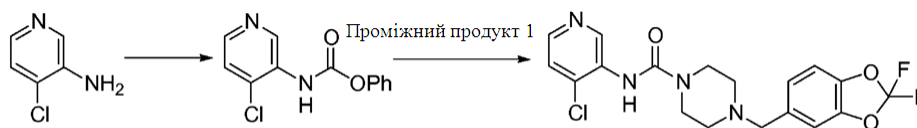
СХЕМА А



Проміжний продукт 1

Для схеми А проміжний продукт 1 отримали шляхом взаємодії 2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-карбальдегіду з піперазином в умовах гідрогенізації. Реакцію можна проводити з використанням $\text{Pd}(\text{OH})_2$, Pt або Pd як каталізатор, розчиненим в таких розчинниках, як MeOH, EtOH або AcOH. Реакція може протікати при температурі від 20 до 80°C. Прийнятний тиск H_2 може варіюватися від 0,1 до 6 МПа (від 1 до 60 бар). Співвідношення 2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-карбальдегіду і піперазину, як правило, - один до шести еквівалентів. Реакцію можна проводити в пристрої гідрогенізації періодичної або безперервної дії.

СХЕМА В



Проміжний продукт 2

Для схеми В (4-хлорпіридин-3-іл)-амід 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)-піперазин-1-карбонової кислоти отримали з 3-аміно-4-хлорпіридину і проміжного продукту 1. 3-Аміно-4-хлорпіридин обробили фенолхлорформіатом і піридином в середовищі розчинника, такого як толуол, з отриманням сполуки проміжного продукту 2. Проміжний продукт 2 взаємодіяв безпосередньо з проміжним продуктом 1 з отриманням (4-хлорпіридин-3-іл)-аміду 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)-піперазин-1-карбонової кислоти.

Хімія

При отриманні (4-хлорпіридин-3-іл)-аміду 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)-піперазин-1-карбонової кислоти і в порівняльному прикладі нижче використовували наступні загальні експериментальні і аналітичні способи.

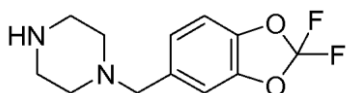
5 Якщо не вказано інше, реакційні суміші перемішували в азотній атмосфері. У випадках коли розчини або суміші є концентрованими, їх, як правило, концентрували в ротаційному випарнику при зниженому тиску.

Якщо не вказано інше, мас-спектри отримували на аналізаторі Agilent серії 1100 MSD при електророзпилювальній іонізації (EPI) в позитивному режимі.

10 ЯМР-спектри отримували на спектрометрі Bruker моделі DPX400 (400 МГц), DPX500 (500 МГц) або DRX600 (600 МГц). Формат даних ^1H ЯМР представлений нижчим: хімічний зсув в м. ч. у бік слабого поля відносно сигналу резонансу еталонного сполука тетраметилсилану (мультиплетність, константа взаємодії J в Гц, інтеграція).

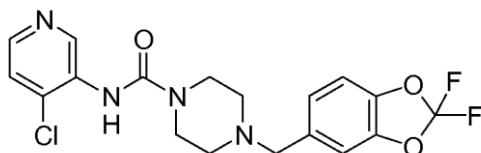
15 Хімічні назви були складені за допомогою ChemDraw Ultra 6.0.2 (CambridgeSoft Corp., м. Кембридж, штат Массачусетс) або ACD/Name версії 9 (Advanced Chemistry Development, м. Торонто, провінція Онтаріо, Канада).

Проміжний продукт 1: 1-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)-піперазин



20 У колбу Ерленмейєра ємністю 2 л вміщували піперазин (185,1 г, 2,15 моль), 2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-карбальдегід (100,0 г, 0,537 моль) і метанол (1,08 л). Розчин перемішували при кімнатній температурі протягом 18 годин, потім двічі пропускали через H-Cube Midi™ (ThalesNano, м. Будапешт, Угорщина) з новим картриджем MidiCart 20% Pd(OH)₂/C при наступних параметрах: 70°C, тиск 1 атм, швидкість потоку 6 мл/хв, надлишок H₂ 10%. Згідно з аналізом ВЕРХ, вихідний реагент альдегід був на >90% витрачений після першого проходу і
25 повністю витрачений після другого проходу. Метанол випаровували, додавали толуол (1,20 л) і перемішували суміш при кімнатній температурі протягом 18 годин. Отриману білу суспензію фільтрували, а тверду речовину промивали толуолом (200 мл). Об'єднаний фільтрат промивали водою (2 рази по 300 мл), висушували над Na₂SO₄, фільтрували і концентрували з отриманням продукту у вигляді безбарвного масла. Масло розчиняли в гептані (100 мл) і
30 витримували продукт при кімнатній температурі для кристалізації. Під час подальших експериментів по синтезу для прискорення процесу кристалізації вносили затравкові кристали. Суспензію охолоджували до 0°C, фільтрували, і тверду речовину висушували у вакуумній печі при 50°C протягом 24 годин з отриманням сполуки у вигляді твердої речовини білого кольору, що заявляється (108,0 г, 78%). Гептановий фільтрат концентрували до об'єму приблизно 20 мл,
35 після чого вносили затравкові кристали продукту. Потім розчин перемішували протягом ночі. Після фільтрації і висушування (6,7 г, 5%) отримали другу партію сполуки у вигляді твердої речовини білого кольору, що заявляється. Об'єднаний вихід склав (115 г, 83%). МС (EPI⁺): розраховано для C₁₂H₁₄F₂N₂O₂ m/z 256,1, набуто значення: 256,9 (M+H)⁺. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ : 7,11 (д, J=0,9 Гц, 1H), 6,99 (дд, J=9,0, 0,9 Гц, 1H), 6,95 (д, J=9,0 Гц, 1H), 3,45 (с, 2H), 2,92-2,83 (м, 4H), 2,39 (с, 4H); ^{13}C ЯМР (101 МГц, CDCl₃) δ : 143,89, 142,72, 134,68, 131,65 (т, JC-F=255,3), 123,88, 110,13, 108,82, 63,10, 54,38, 46,07.

Приклад 1: (4-хлорпіридин-3-іл)-амід 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)-піперазин-1-карбонової кислоти



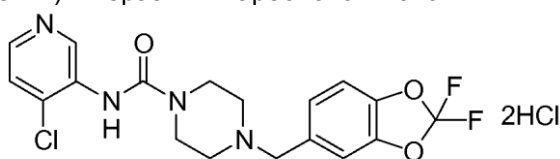
45 У тригорлу колбу Мортон ємністю 2 л, забезпечену механічною мішалкою, термпарою і краплинною лійкою, в атмосфері азоту вміщували 3-аміно-4-хлорпіридин (35,0 г, 272 ммоль) і толуол (740 мл). Розчин коричневого кольору охолоджували до 2°C. Однією порцією додавали піридин (25,3 мл, 310 ммоль), після чого протягом 30 хвилин по краплях додавали фенілхлорформіат (32,6 мл, 259 ммоль). Максимальна температура вмісту колби досягала 5°C.
50 Після перемішування реакційної суміші при 2-5°C протягом 7 годин отримали густу суспензію жовтого кольору. Протягом 3 хвилин додавали охолоджений розчин K₂CO₃ (53,6 г, 388 ммоль) у воді (216 мл), при цьому максимальна температура вмісту колби досягала 6°C. Потім протягом 1 хвилини додавали 1-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)-піперазин (66,3 г, 259 ммоль) у

вигляді твердої речовини. Суміші давали повільно нагрітися до кімнатної температури і перемішували протягом 15 годин. Додавали воду (200 мл), відділяли шар толуолу і екстрагували водним розчином HCl (1,8 М, 600 мл). Водний екстракт промивали толуолом (2 рази по 300 мл). У водний шар додавали MeOH (500 мл) і охолоджували розчин до 5°C. Рівень рН доводили до 8-9 шляхом додавання розчину NaOH (50% вага., приблизно 50 мл). Швидкість додавання розчину регулювали таким чином, щоб температура вмісту колби не перевищувала 17°C. Отриману суспензію перемішували при температурі 5°C протягом 2 годин. Продукт збирали фільтруванням і промивали MeOH/H₂O (1:1, 70 мл). Тверду речовину висушували у вакуумній печі при 50°C протягом 24 годин з отриманням сполука у вигляді твердої речовини жовтого/зеленого кольору, що заявляється (73 г, 69%).

У тригорлу колбу Мортонна ємністю 1 л, оснащену магнітною мішалкою, термopарою і зворотним конденсатором, вміщували неочищений (4-хлорпіридин-3-іл)-амід 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)-піперазин-1-карбонової кислоти (98 г, 239 ммоль) і ізопропілацетат (318 мл). Суспензію нагрівали до 65°C, обробляли активованим вугіллям (10,0 г) і перемішували при 65°C протягом 1 години. Потім суміш нагрівали до 80°C і швидко профільтрували через тонкий целітовий фільтр. Фільтрат повільно охолоджували до кімнатної температури, після чого вміщували в крижану баню на 30 хвилин. Тверду речовину збирали фільтруванням, промивали холодним iPrOAc (10 мл) і висушували з отриманням (4-хлорпіридин-3-іл)-аміду 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)-піперазин-1-карбонової кислоти у вигляді твердої речовини жовтого кольору (72 г, 73%).

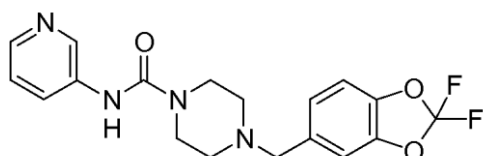
У тригорлу колбу Мортонна ємністю 2 л, оснащену механічною мішалкою, термopарою і зворотним конденсатором, вміщували сирий продукт (4-хлорпіридин-3-іл)-амід 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)-піперазин-1-карбонової кислоти (191 г, 465 ммоль) і ізопропілацетат (705 мл). Суспензію нагрівали до 65°C, обробляли активованим вугіллям (11,2 г) і перемішували при 65°C протягом 1 години. Потім суміш нагрівали до 75°C і швидко профільтрували. Фільтрат повільно охолоджували до кімнатної температури протягом ночі, після чого вміщували в крижану баню на 30 хвилин. Тверду речовину збирали фільтруванням, промивали холодним iPrOAc (40 мл) і висушували у вакуумній печі при 50°C протягом 72 годин. Отримали (4-хлорпіридин-3-іл)-амід 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)-піперазин-1-карбонової кислоти у вигляді твердої речовини жовтуватого кольору (161 г, 84%). МС (ЕРІ⁺): розраховано для C₁₈H₁₇ClF₂N₄O₃: m/z 410,1, набуте значення: 411,1 (M+H)⁺. Аналітичний розрахунок для C₁₈H₁₇ClF₂N₄O₃: C, 52,63; H, 4,17; N, 13,64. Отримане значення: C, 52,73; H, 4,15; N, 13,62; ¹H ЯМР (600 МГц, CDCl₃) δ: 9,36 (с, 1H), 8,19 (д, J=5,2 Гц, 1H), 7,29 (дд, J=5,3, 0,3 Гц, 1H), 7,13 (д, J=0,9 Гц, 1H), 7,02-6,98 (м, 2H), 6,84 (с, 1H), 3,58-3,54 (м, 4H), 3,53 (с, 2H), 2,54-2,48 (м, 4H); ¹³C ЯМР (151 МГц, CDCl₃) δ: 153,49, 144,02, 143,88, 143,28, 142,98, 134,05, 133,09, 131,66 (т, JC-F=254,6 Гц), 131,55, 123,89, 123,53, 110,03, 109,02, 62,28, 52,47, 44,23.

Приклад 1A: біс-гідрохлорид (4-хлорпіридин-3-іл)-аміду 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)-піперазин-1-карбонової кислоти



Розчин, що складається з (4-хлорпіридин-3-іл)-аміду 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)-піперазин-1-карбонової кислоти (5,0 г, 12 ммоль) і етанолу (200 мл), обробляли насиченим водним розчином HCl (3,0 мл, 3 екв.). Розчинник видаляли у вакуумі, додавали етанол (100 мл), охолоджували суспензію до 0°C і профільтрували. Отриману тверду речовину білого кольору промивали холодним етанолом (25 мл) і висушували у вакуумі з отриманням біс-гідрохлориду (4-хлорпіридин-3-іл)-аміду 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)-піперазин-1-карбонової кислоти (4,25 г, 72%). ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO) δ 11,61 (уш. с., 1H), 8,98 (с, 1H), 8,65 (с, 1H), 8,37 (д, J=5,4 Гц, 1H), 7,78 (д, J=1,4 Гц, 1H), 7,69 (д, J=5,4 Гц, 1H), 7,52 (д, J=8,3 Гц, 1H), 7,46 (дд, J=8,3, 1,5 Гц, 1H), 4,39 (с, 2H), 4,28-4,12 (м, 2H), 3,49-3,26 (м, 4H), 3,03 (с, 2H).

Порівнювана сполука: піридин-3-іламід 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)-піперазин-1-карбонової кислоти.



Феніловий ефір піридин-3-ілкарбамінової кислоти. До розчину, що складається з піридин-3-іламіну (9,49 г, 101 ммоль) і піридину (8,77 г, 111 ммоль) в CH_3CN (80 мл), при 0°C по краплях додавали фенілхлорформіат (15,8 г, 101 ммоль). Реакційній суміші давали нагрітись до кімнатної температури і перемішували її протягом 2 годин. Реакцію гасили додаванням H_2O (200

мл). Отриманий осад фільтрували і висушували у вакуумі для отримання сполуки у вигляді твердої речовини жовтувато-коричневого кольору, що заявляється (17,34 г, 80%). МС (ESI^+): розраховано для $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$ m/z 214,07, набуто значення: 215,3 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$. ^1H ЯМР (500 МГц, d_6 -ДМСО): 10,46 (с, 1H), 8,69 (д, $J=2,4$ Гц, 1H), 8,27 (дд, $J=4,7$, 1,4 Гц, 1H), 7,93 (д, $J=8,4$ Гц, 1H), 7,47-7,41 (м, 2H), 7,37 (дд, $J=8,4$, 4,7 Гц, 1H), 7,31-7,22 (м, 3H).

Піридин-3-іламід 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)-піперазин-1-карбонової кислоти. До розчину фенілового ефіру піридин-3-ілкарбамінової кислоти (9,08 г, 42,4 ммоль) в ДМСО (84 мл) додали 1-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)-піперазин (11,4 г, 44,5 ммоль). Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 16 годин, а потім обробляли водою (130 мл). Отриману тверду речовину відділяли фільтрацією, промивали водою (4 рази по 50 мл)

і висушували у вакуумі. Тверда речовина перекристалізовували ($\text{EtOH-H}_2\text{O}$) з отриманням піридин-3-іламіду 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)-піперазин-1-карбонової кислоти (13,4 г, 84%). МС (ESI^+): розраховано для $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{F}_2\text{N}_4\text{O}_3$ m/z 376,13, набуто значення: 377,1 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$. ^1H ЯМР (CDCl_3): 8,46 (д, $J=2,5$ Гц, 1H), 8,23-8,21 (м, 1H), 7,99-7,96 (м, 1H), 7,22-7,19 (м, 2H), 7,11 (с, 1H), 6,99-6,98 (м, 2H), 3,54-3,52 (м, 4H), 3,49 (с, 2H), 2,46-2,44 (м, 4H).

Біологічне тестування:

Спосіб аналізу 1

А. Трансфекція клітин людської FAAN

Чашку Петрі діаметром 10 см з конфлюентним моношаром клітин SK-N-MC розділяли за 2 дні до трансфекції. У стерильних умовах середовище видаляли, а клітини відділяли від чашки шляхом додавання трипсину. Потім одну п'яту частину клітин вміщували в нову чашку діаметром 10 см. Клітини вирощували в інкубаторі при 37°C в атмосфері 5% CO_2 в середовищі Ігла MEM з додаванням 10% ембріональної бичачої сироватки. Через 2 дні клітини були конфлюентними приблизно на 80%. Дані клітини відділяли від чашки за допомогою трипсину і осаджували центрифугуванням на клінічній центрифугі. Осад повторно суспендували в 400 мкл повного середовища і переносили в електропораційну кювету з відстанню між електродами, що дорівнює 0,4 см. До клітин додавали надспірально кДНК FAAN людини (1 мкг) і перемішували. Для електропорації встановлювали напругу 0,25 кВ і ємність 960 мкФ. Після електропорації клітини розводили в повному середовищі (10 мл) і висівали на чотири чашки діаметром 10 см. Внаслідок мінливості ефективності електропорації були висіяні чотири концентрації клітин. Були використані відношення 1:20, 1:10 і 1:5, а решту клітин додавали в четверту чашку. Клітинам давали відновитися протягом 24 годин перед додаванням селекційного середовища (повне середовище з 600 мкг/мл G418). Через 10 днів чашки аналізували на виживання колоній клітин. Використовували чашки з добре ізольованими колоніями. Клітини з окремих колоній виділили і протестували. Клоні, що показали найбільшу активність FAAN, виміряли шляхом гідролізу анандаміду, використовували для додаткових досліджень.

В. Аналіз FAAN

Заморожені згустки клітин T84 або трансфіковані клітини SK-N-MC (вміст чашок для культивування розміром 1×15 см) гомогенізували в 50 мл буферного розчину для аналізу FAAN (125 мМ буфера Tris, 1 мМ EDTA, 0,2% гліцерину, 0,02% Triton X-100, 0,4 мМ Hepes, pH 9). Суміш для аналізу складалася з 50 мкл клітинного гомогенату, 10 мкл тестованої сполуки і 40 мкл анандаміду [$1\text{-}^3\text{H}$ -етаноламін] (^3H -AEA, Perkin-Elmer, 10,3 С/ммоль), який вводили останнім до досягнення кінцевої концентрації мітки 80 нМ. Реакційну суміш інкубували при кімнатній температурі протягом 1 години. Під час інкубації 96-ямкові фільтруючі планшети Multiscreen (номер по каталогу MAFCNOB50; Millipore, м. Бедфорд, штат Массачусетс, США) наповнювали 25 мкл активованого деревного вугілля (колонковий завантажувач Multiscreen, номер по каталогу MACLO9625, Millipore) і однократно промивали 100 мкл MeOH. Також під час інкубації 96-ямкові планшети DYNEX MicroLite (номер по каталогу NL510410) заповнювали 100 мкл MicroScint40 (номер по каталогу 6013641, Packard Bioscience, м. Меріден штат Коннектикут, США). Через 1 годину інкубування 60 мкл реакційної суміші переносили в планшети з деревним вугіллям, які потім вміщували зверху на планшети DYNEX за допомогою рамок Centrifuge Alignment Frame (номер по каталогу MACF09604, Millipore). Незв'язаний мічений етаноламін центрифугували в нижній планшет (5 хвилин при 2000 об/хв) попередньо заповнений сцинтиляційною рідиною, як описано вище. Планшети герметично закривали і залишали на 1 годину при кімнатній температурі перед вимірюванням лічильником Hewlett Packard TopCount.

Спосіб аналізу 2

А. Трансфекція клітин FAАН щура

Чашку Петрі діаметром 10 см з конфлюентним моношаром клітин SK-N-MC розділяли за 2 дні до трансфекції. У стерильних умовах середовище видаляли, а клітини відділяли від чашки шляхом додавання трипсину. Потім одну п'яту частину клітин вміщували в нову чашку діаметром 10 см. Клітини вирощували в інкубаторі при 37°C в атмосфері 5% CO₂ в середовищі Ігла MEM з додаванням 10% ембріональної бичачої сироватки. Через 2 дні клітини були конфлюентними приблизно на 80%. Дані клітини відділяли від чашки за допомогою трипсину і осаджували центрифугуванням на клінічній центрифугі. Осад повторно суспендували в 400 мкл повного середовища і переносили в електропораційну кювету з відстанню між електродами, що дорівнює 0,4 см. До клітин додавали надспірально кДНК FAАН щура (1 мкг) і перемішували. Для електропорації встановлювали напругу 0,25 кВ і ємність 960 мкФ. Після електропорації клітини розводили в повному середовищі (10 мл) і висівали на чотири чашки діаметром 10 см. Внаслідок мінливості ефективності електропорації були висіяні чотири концентрації клітин. Були використані відношення 1:20, 1:10 і 1:5, а решту клітини додавали в четверту чашку. Клітинам давали відновитися протягом 24 годин перед додаванням селекційного середовища (повне середовище з 600 мкг/мл G418). Через 10 днів чашки аналізували на виживання колоній клітин. Використовували чашки з добре ізольованими колоніями. Клітини з окремих колоній виділили і протестували. Клоні, що показали найбільшу активність FAАН, виміряли шляхом гідролізу анандаміду, використовували для додаткових досліджень.

В. Аналіз FAАН

Трансфіковані клітини SK-N-MC (вміст чашок для культивування розміром 1×15 см) гомогенізували в 50 мл буферного розчину для аналізу FAАН (125 мМ буфера Тріс, 1 мМ ЕДТА, 0,2% гліцерину, 0,02% Triton X-100, 0,4 мМ Hepes, pH 9). Суміш для аналізу складалася з 50 мкл клітинного гомогенату, 10 мкл тестованої сполуки і 40 мкл анандаміду [1-³H-етаноламін] (³H-AEA, Perkin-Elmer, 10,3 С/ммоль), який вводили останнім до досягнення кінцевої концентрації мітки 80 нМ. Реакційну суміш інкубували при кімнатній температурі протягом 1 години. Під час інкубації 96-ямкові фільтруючі планшети Multiscreen (номер по каталогу MAFCNOB50; Millipore, м. Бедфорд, штат Массачусетс, США) наповнювали 25 мкл активованого деревного вугілля (колонковий завантажувач Multiscreen, номер по каталогу MACL09625, Millipore) і однократно промивали 100 мкл MeOH. Також під час інкубації 96-ямкові планшети DYNEX MicroLite (номер по каталогу NL510410) заповнювали 100 мкл MicroScint40 (номер по каталогу 6013641, Packard Bioscience, м. Меріден штат Коннектикут, США). Через 1 годину інкубування 60 мкл реакційної суміші переносили в планшети з деревним вугіллям, які потім вміщували зверху на планшети DYNEX за допомогою рамок Centrifuge Alignment Frame (номер по каталогу MACF09604, Millipore). Незв'язаний мічений етаноламін центрифугували в нижній планшет (5 хвилин при 2000 об/хв) попередньо заповнений сцинтиляційною рідиною, як описано вище. Планшети герметично закривали і залишали на 1 годину при кімнатній температурі перед вимірюванням лічильником Hewlett Packard TopCount.

Результати вимірювань для протестованих в даних аналізах сполук представлені в таблиці 1 у вигляді середніх показників. Сполуки аналізували або в формі вільної основи, або в формі хлористоводневої солі. Сполуку, що порівнюється, піридин-3-іламід 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)-піперазин-1-карбонової кислоти синтезували відповідно до процедури, описаної в заявці на патент PCT № WO 2006/074025, приклад 150.

Таблиця 1

Сполука	Аналіз 1 IC ₅₀ (нМ)	Аналіз 2 IC ₅₀ (нМ)
Приклад 1	75	320
Порівнювана сполука	340	450

Аналіз взаємодій лікарських засобів

Потенціал (4-хлорпіридин-3-іл)-аміду 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)-піперазин-1-карбонової кислоти і порівнювані сполуки, піридин-3-іламід 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)-піперазин-1-карбонової кислоти, відносно інгібування ізоферментів цитохрому P450 людини (CYP) досліджували шляхом інкубації сполуки в різних концентраціях з мікросомами печінки людини і конкретними субстратами зразків CYP (табл. 2). Інгібування CYP може впливати на профіль безпеки лікарського засобу, втручаючись в метаболізм молекул інших лікарських засобів.

Даний аналіз готували і виконували з використанням автоматизованої лабораторної станції Biomek FXr для роботи з рідинами (Beckman Coulter Corp., м. Фуллертон, штат Каліфорнія),

об'єднаної з шейкером-інкубатором Cytomat із заданою температурою 37°C (Thermo Electron Corp., м. Беллефонте, штат Пенсільванія). Для аналізу використали партію людських міросом печінки від 50 донорів, об'єднану і охарактеризовану компанією BD Gentest (№ по каталогу 457111, партія 01220, 20 мг/мл в 250 мМ сахарози). Кожен субстрат інкубували з концентрацією білка 0,1, 0,15 або 0,2 мг/мл при загальному об'ємі середовища для інкубації, що дорівнює 0,16 мл. Інкубувати готували в 100 мМ калій-фосфатному буфері (pH 7,4) з додаванням 5 мМ хлориду магнію і 1 мМ ЕДТА. Як позитивний контроль використовували хінідин, інгібітор CYP2D6. Хінідин готували у вигляді робочого розчину в органічному розчиннику (переважно метанолі з додаванням ДМСО і ацетонітрилу як допоміжні розчинники) і вводили в суспензію міросом для отримання бажаної концентрації. Після цього розчин послідовно розводили додатковими порціями суспензії міросом для отримання восьми рівнів концентрації. Кінцевий вміст органічних речовин складав менше ніж 0,07%. Базовий розчин тестованої сполуки готували з концентрацією 50 мМ або, по можливості, вище у відповідному органічному розчиннику (ДМСО, метанол або ацетонітрил), залежно від меж розчинності. Базовий розчин послідовно розбавляли метанолом і потім вводили в суспензію міросом для отримання кінцевих концентрацій інкубації 0, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30 і 100 мкМ для порівнюваних сполук, і 0, 0,06, 0,18, 0,6, 1,8, 6, 18 і 60 мкМ для (4-хлорпіридин-3-іл)-аміду 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)-піперазин-1-карбонової кислоти. Кінцевий вміст органічних речовин становив 0,2%. Інкубації для кожного субстрату зразка проводили в трьох повторностях.

У інкубаційні посудини переносили контрольний інгібітор (хінідин) і маркерний субстрат (декстрометорфан або буфуралол) (аліквоти по 60 мкл). Після передінкубаційного періоду при 37°C ініціювали реакції шляхом додавання 40 мкл аліквоти регенеруючої системи NADPH (BD Gentest). Аліквота 40 мкл (розбавлена в співвідношенні 6:19 інкубаційним буфером) дала кінцеві концентрації 1,3 мМ NADP⁺, 3,3 мМ глюкозо-6-фосфати і 0,4 од./мл глюкозо-6-фосфатдегідрогенази. Період інкубації становив 12 хвилин як для декстрометорфану, так і для буфуралолу. Реакції переривали шляхом безпосереднього додавання ацетонітрилу (160 мкл) в інкубаційну суміш. Після цього суміш переносили в планшет-колектор, що містить додаткову кількість ацетонітрилу (400 мкл).

Реакційні суміші для інкубації з рівними концентраціями тестованої сполуки або контрольного інгібітору об'єднували і переносили в фільтруючий планшет для осадження білка Phenomenex Strata™ Impact, що містить ацетонітрил і внутрішні стандарти (100 мкл суміші наступних дейтерованих сполук з діапазоном концентрацій від 0,5 до 2,8 мкМ: гідроксибуфуралол-d₉, дексторфан-d₃). Отриманий фільтрат випарили до сухого стану під струмом азоту, а потім повторно розчинили в 250 мкл рухомої фази (1:1 метанол:вода із вмістом 0,1% оцтової кислоти). Зразки і стандарти аналізували на потрійному квадрупольному мас-спектрометрі Sciex API4000. Обробку даних проводили за допомогою програмного забезпечення Analyst 1.4.1 (Applied Biosystems/MDS Sciex). Під час аналізу IC₅₀ відношення площ хроматографічних піків метаболітів і внутрішніх стандартів переносили в програму SigmaPlot (версія 8.0) і будували графік з використанням напівлогарифмічної шкали (залежність процента залишкової активності від концентрації інгібітору) для визначення значення IC₅₀.

(4-Хлорпіридин-3-іл)-амід 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)-піперазин-1-карбонової кислоти інгібував активність CYP2D6 при IC₅₀=24 мкМ при використанні буфуралолу як тестового субстрату і 11 мкМ при використанні декстрометорфану як тестового субстрату. (4-Хлорпіридин-3-іл)-амід 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)-піперазин-1-карбонової кислоти продемонстрував перевагу перед порівнюваною сполукою, якою інгібували активність CYP2D6 при значенні IC₅₀=3,2 мкМ при використанні буфуралолу і 2,0 мкМ при використанні декстрометорфану як тестових субстратів. Ці результати підтверджують зниження потенційного ризику міжлікарських взаємодій для (4-хлорпіридин-3-іл)-аміду 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)-піперазин-1-карбонової кислоти відносно порівнюваних сполук.

Таблиця 2

Сполука	2D6 Буфуралол (мкМ)	2D6 Декстрометорфан (мкМ)
Приклад 1	24	11
Порівнювана сполука	3,2	2,0

Тест первинного спостереження (тест Ірвіна) на щурах
Гідрохлорид (4-хлорпіридин-3-іл)-аміду 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)-піперазин-1-карбонової кислоти і хлористоводневу сіль порівнюваних сполук, досліджували при

пероральному введенні в тесті первинного спостереження (тест Ірвіна) на щурах для оцінки загального впливу цих сполук на поведінку і фізіологічні функції. Спосіб, яким визначали першу токсичну дозу, активний діапазон доз і основний вплив тестованої речовини на поведінку і фізіологічну функцію, був описаний в публікації Irwin et al., Psychopharmacologia, 1968 p., 13, 222-257. Щурам вводили тестовану речовину і спостерігали за ними при одночасному порівнянні з контрольною групою, якою був введений носій (несліпе дослідження). Одночасно спостерігали за всіма тваринами в групі. Зміни поведінки, фізіологічні симптоми і симптоми нейротоксичності, ректальну температуру і діаметр зіниці реєстрували відповідно до стандартної сітки спостереження, похідною від сітки, яку використав Ірвін. Сітка включає наступні пункти: смертність, судоми, тремор, хвіст Штрауба, зміна активності, стрибки, аномальна хода (похитування, ходіння навшпиньки), порушення рухової координації, зміна тону черевних м'язів, втрата захоплення, акінезія, заціпеніння, порушення скорочення м'язів, втрата рівноваги, ходіння на передніх лапах, корчі, пілоерекція, стереотипії (фиркання, жування, рух головою), сіпання головою, дряпання, зміна дихання, агресивність, зміна реакції при страху/переляку, зміна реактивності на дотик, птоз, екзофтальм, порушення настановного рефлексу, порушення рогівкового рефлексу, аналгезія, дефекація/діарея, слиновідділення, слюзовідділення, ректальна температура (гіпотермія/гіпертермія) і діаметр зіниці (міоз/мідріаз). Тестовані речовини оцінювали в 2 дозуванні (10 і 60 мг/кг), які вводили перорально безпосередньо до початку тесту і порівнювали з реакцією на носій в контрольній групі. Спостереження проводили через 15, 30, 60, 120 і 180 хвилин після введення тестованих речовин/носіїв, а також через 24 години.

Таблиця 3

Приклад 1 (мг/кг перорально)		Хлористоводнева сіль порівнювані сполуки (мг/кг перорально)	
10	60	10	60
Підвищення реактивності на дотик: (1/4) через 180 хв	Седативний ефект: (0/4) Аномальна хода: (0/4) Гіпотермія: (0/4) Підвищення тону черевних м'язів: (1/4) через 60 хв Підвищення реактивності на дотик: (1/4) через 60 хв (1/4) через 180 хв	Підвищення реактивності на дотик (3/3) через 15 хв	Седативний ефект: (3/3) через 15-120 хв Аномальна хода (похитування): (3/3) через 15 хв Гіпотермія: незначний вияв через 15-60 хв і через 180 хв Зниження м'язового тону: (1/3) через 30 хв (3/3) через 60-120 хв Підвищення реактивності на дотик: (0/3) через 60-180 хв

У тесті Ірвіна гідрохлорид (4-хлорпіридин-3-іл)-аміду 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)-піперазин-1-карбонової кислоти надав слабку скороминущу збудливу дію тільки на одного щура в діапазоні дози від 10 до 60 мг/кг (табл. 3). При дозі 10 мг/кг гідрохлорид (4-хлорпіридин-3-іл)-аміду 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)-піперазин-1-карбонової кислоти спричинив підвищення реактивності на дотик у 1 з 4 щурів через 180 хвилин. При дозі 60 мг/кг гідрохлорид (4-хлорпіридин-3-іл)-аміду 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)-піперазин-1-карбонової кислоти спричинив підвищення тону черевних м'язів у 1 з 4 щурів через 60 хвилин і підвищення реактивності на дотик у 1 з 4 щурів через 60 і 180 хвилин. Крім скороминущого епізодичного підвищення тону черевних м'язів при дозуванні 60 мг/кг, ніяких інших ефектів протягом 24 годин після введення не спостерігали.

У тесті Ірвіна гідрохлорид (4-хлорпіридин-3-іл)-аміду 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)-піперазин-1-карбонової кислоти продемонстрував переваги в порівнянні з хлористоводневою сіллю порівнювані сполуки, при обох дозах. У той час як гідрохлорид (4-хлорпіридин-3-іл)-аміду 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)-піперазин-1-карбонової кислоти спричиняв підвищення реактивності на дотик тільки у 1 з 4 щурів при дозі 10 мг/кг, хлористоводнева сіль порівнювані сполуки, спричиняла підвищення реактивності на дотик у всіх

3 щурів. При дозі 60 мг/кг хлористоводнева сіль порівнювана сполука, надавала седативний ефект через 15-120 хвилин і викликала аномальну ходу (похитування) через 15 хвилин у всіх 3 щурів. Вона спричиняла зниження м'язового тону у 1 щура через 30 хвилин і у всіх 3 щурів через 60-120 хвилин. Вона також викликала гіпотермію через 15-60 хвилин і через 180 хвилин.

5 Дані результати свідчать про наявність седативного (пригнічувального) ефекту (седація, ознаки гальмування рухових функцій і гіпотермія) у хлористоводневій солі порівнювані сполуки, при пероральній дозі 60 мг/кг, якої не спостерігали у гідрохлориду (4-хлорпіридин-3-іл)-аміду 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)-піперазин-1-карбонової кислоти.

10 ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Сполука, яка являє собою (4-хлорпіридин-3-іл)амід 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)піперазин-1-карбонової кислоти або його фармацевтично прийнятну сіль.

2. Фармацевтично прийнятна сіль за п. 1, де вказана сіль являє собою хлористоводневу сіль (4-хлорпіридин-3-іл)аміду 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)піперазин-1-карбонової кислоти.

3. Фармацевтично прийнятна сіль за п. 2, де вказана хлористоводнева сіль являє собою бісгідрохлорид.

4. Спосіб модуляції активності FAAH, за яким FAAH піддають впливу терапевтично ефективної кількості щонайменше одного з (4-хлорпіридин-3-іл)аміду 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)піперазин-1-карбонової кислоти або його фармацевтично прийнятної солі.

5. Фармацевтична композиція, що містить:

(а) терапевтично ефективну кількість (4-хлорпіридин-3-іл)аміду 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)піперазин-1-карбонової кислоти або його фармацевтично прийнятної солі; і

(б) фармацевтично прийнятний ексципієнт.

6. Спосіб лікування суб'єкта, у якого діагностовано або який страждає на захворювання, розлад або медичний стан, опосередкований активністю FAAH, за яким суб'єкту, який потребує такого лікування, вводять терапевтично ефективну кількість сполуки, як вказано в п. 5.

7. Спосіб за п. 6, де захворювання, розлад або медичний стан вибирають з групи, що складається з: тривоги, депресії, болю, порушення сну, розладу харчової поведінки, запального процесу, рухових порушень, синдрому виснаження при ВІЛ-інфекції, закритої травми черепа, інсульту, порушення здібності до навчання і порушення пам'яті, хвороби Альцгеймера, епілепсії, синдрому Туретта, хвороби Німанна-Піка, хвороби Паркінсона, хореї Хантінгтона, неврити зорового нерва, аутоімунного увеїту, наркотичної абстиненції, нудоти, блювання, сексуальної дисфункції, посттравматичного стресового розладу, спазму судин головного мозку, глаукоми, синдрому подразненого кишечника, запального захворювання кишечника, імуносупресії, гастроєзофагеальної рефлюксної хвороби, паралітичної непрохідності кишечника, секреторної діареї, виразкової хвороби шлунка, ревматоїдного артрити, небажаної вагітності, гіпертензії, раку, гепатиту, алергії дихальних шляхів, аутоімунного діабету, хронічного пруриту, нейрозапалення, діабету, метаболічного синдрому і остеопорозу.

8. Спосіб за п. 6, де захворювання, розлад або медичний стан являє собою біль або запалення.

9. Спосіб за п. 6, де захворювання, розлад або медичний стан являє собою тривогу, розлад сну, розлад харчової поведінки або порушення руху.

10. Спосіб за п. 6, де захворювання, розлад або медичний стан являє собою розсіяний склероз.

11. Спосіб за п. 6, де захворювання, розлад або медичний стан являє собою енергетичний обмін або гомеостаз кісткової тканини.

12. Спосіб синтезу (4-хлорпіридин-3-іл)аміду 4-(2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-ілметил)піперазин-1-карбонової кислоти, який проводять за одностадійною реакцією гідрогенізації з використанням 2,2-дифторбензо[1,3]діоксол-5-карбальдегіду і піперазину.

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601