



УКРАЇНА

(19) UA (11) 92503 (13) C2

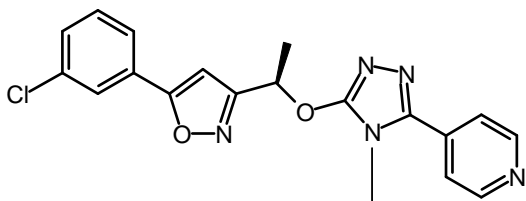
(51) МПК (2009)
C07D 413/14 (2006.01)
A61K 31/00
A61P 1/04 (2006.01)
A61P 25/00МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОЛУКИ 5-(ФЕНІЛІЗОКСАЗОЛІЛЕТОКСИ)-ТРИАЗОЛ-3-ІЛ-ЗАМІЩЕНОГО ПІРИДИНУ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ НЕВРОЛОГІЧНИХ, ПСИХІАТРИЧНИХ ЧИ БОЛЬОВИХ РОЗЛАДІВ

1

2

(21) a200802884
(22) 20.09.2006
(24) 10.11.2010
(86) PCT/US2006/036423, 20.09.2006
(31) 60/721,527
(32) 29.09.2005
(33) US
(46) 10.11.2010, Бюл.№ 21, 2010 р.
(72) МІНІДІС АЛЕКСАНДЕР, SE, ВЕНСБО ДАВІД, SE, СЛАССІ АБДЕЛЬМАЛІК, СА, АЙЗААК МЕТВІН, СА, ЕРІКССОН КАРОЛІНЕ, SE, ПРОФІР ВЕРОНІКА, SE, БЕРГСТРОМ ПЕР-ОЛУВ, SE, ЕДВАРДЗ ЛУІЗ, СА, АРОРА ДЖАЛАЙ, СА, СІНЬ ТАО, СА
(73) АСТРАЗЕНЕКА АБ, SE
(56) WO 2005077345 A
WO 2005077368 A2
WO 02068417 A2
WO 2005060971 A
US 2005272779 A1
(57) 1. Сполука формули II



(II)
а також її фармацевтично прийнятні солі, гідрати та/або ізоформи.
2. Сполука за п. 1 у кристалічній формі.
3. Гідрохлорид сполуки за будь-яким з пп. 1, 2.
4. Сульфат сполуки за будь-яким з пп. 1, 2.
5. Сіль, вибрана з :
4-(5-((1R)-1-[5-(3-хлорфеніл)ізоксазол-3-іл]етокси)-4-метил-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)піридин гідрохлориду та
4-(5-((1R)-1-[5-(3-хлорфеніл)ізоксазол-3-іл]етокси)-4-метил-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)піридин сульфату.
6. Сполука за будь-яким з пп. 1-5 для застосування у терапії.

7. Фармацевтична композиція, яка містить як активний інгредієнт сполуку за будь-яким з пп. 1-5 разом із фармакологічно та фармацевтично прийнятним носієм.
8. Застосування сполуки за будь-яким з пп. 1-5 або її фармацевтично прийнятної солі, або оптичного ізомеру для виробництва медикаменту для лікування опосередкованого рецептором mGluR5 розладу.
9. Застосування за п. 8, де вказаним розладом є неврологічний розлад.
10. Застосування за п. 8, де вказаним розладом є психіатричний розлад.
11. Застосування за п. 8, де вказаним розладом є шлунково-кишковий розлад.
12. Застосування за п. 8, де вказаним розладом є будь-яка з хвороб: шлунково-стравохідний рефлюкс, хвороба подразненого кишечника, функціональна диспепсія, кашель, ожиріння, сенільна деменція при хворобі Альцгеймера, індукована СНІД деменція, хвороба Паркінсона, бічний аміотрофічний склероз, хорея Хантингтона, мігрень, епілепсія, шизофренія, депресія, тривожність, гостра тривожність, obsесивно-компульсивний розлад, офтальмологічні розлади, як-то ретинопатії, діабетичні ретинопатії, глаукома, слухові невропатичні розлади, як-то дзвін у вухах, індуковані хемотерапією невропатії, постгерпетична невралгія та тригемінальна невралгія, толерантність, залежність, згубні звички та розлади жадання, нейророзвивальні розлади, охоплюючи уроджений стан з розумовою субнормальністю, аутизм, уроджене слабумство, шизофренія та синдром Дауна, біль, пов'язаний з мігренню, біль при запаленні, невропатичні больові розлади, як-то діабетичні невропатії, артрит та ревматоїдні хвороби, біль унизу спини, післяопераційний біль, біль, асоційований з різними станами, охоплюючи стенокардію, ниркову колику або колику жовчного міхура, менструація, мігрень та подагра; інсульт, травма голови, анемія та ішемічні пошкодження, гіпоглікемія, серцево-судинні хвороби та епілепсія.

(13) C2

(11) 92503

(19) UA

Заявлений винахід стосується нових сполук, їх застосування у терапії та фармацевтичних композицій, які містять вказані нові сполуки.

Глутамат є головним збуджувальним нейротрансмітером у центральній нервовій системі ссавців (ЦНС). Глутамат діє на центральні нейрони приєднанням до рецепторів клітинної поверхні та таким чином їх активуванням. Ці рецептори поділені на два головні класи, іонотропічні та метаботропічні рецептори глутамату, на основі структурних особливостей рецепторних білків, засобів, котрими рецептори переносять сигнали у клітину, та фармакологічного профілю.

Метаботропічні рецептори глутамату (mGluR) є сполученими з G-білком рецепторами, що активують різноманітність внутрішньоклітинних вторинних меседжерних систем після приєднання глутамату. Активування mGluR у непошкоджених нейронах ссавців дає одну або більше з наступних реакцій: активування фосфоліпази C; збільшення гідролізу фосфоінзитид (PI); вивільнення внутрішньоклітинного кальцію; активування фосфоліпази D; активування або інгібування аденіл-циклази; збільшення або зниження утворення циклічного аденозин-монофосфату (цАМФ); активування гуаніліл-циклази; збільшення утворення циклічного гуанозин монофосфату (цГМФ); активування фосфоліпази A2; збільшення вивільнення арахідонової кислоти; та збільшення або зниження керованого потенціалом та лігандами іонних каналів. Schoepp et al, Trends Pharmacol Set 14:13 (1993), Schoepp, Neurochem. Int. 24:439 (1994), Pin et al, Neuropharmacology 34:1 (1995), Bordi та Ugolini, Prog. Neurobiol 59:55 (1999).

Молекулярним клонуванням ідентифіковано вісім відмінних підтипів mGluR, названих mGluR1 - mGluR8. Nakanishi, Neuron 13:1031 (1994), Pin et al, Neuropharmacology 34:1 (1995), PCMJ2006/036423 Knopfel et al, J. Med. Chem. 38:1417 (1995). Наступна відмінність рецепторів відбувається внаслідок експресії альтернативно сплайсованих форм деяких підтипів mGluR. Pin et al, PNAS 89:10331 (1992), Minakami et al, BBRC 199:7136 (1994), Joly et al, J. Neurosci 15:3970 (1995).

Підтипи метаботропічних рецепторів глутамату можуть бути поділені далі на три групи, Групу I, Групу II, та Групу III mGluR, на основі гомології амінокислотної послідовності, вторинних меседжерних систем, застосовуваних рецепторами, та їх фармакологічних характеристик. Група I mGluR містить mGluR1, mGluR5 та їх альтернативно сплайсовані варіанти. Приєднання агоністів до цих рецепторів призводить до активування фосфоліпази C та наступної мобілізації внутрішньоклітинного кальцію.

Неврологічні, психіатричні та больові розлади

Спроби пояснення фізіологічної ролі групи I mGluR підказують, що активування цих рецепторів дає неврональне збудження. Різні дослідження продемонстрували, що група I агоністів mGluR може давати постсинаптичне збудження при дії на нейрони у гіпокампі, корі головного мозку, мозочку,

та таламусі, а також інших регіонах центральної нервової системи. Дані вказують, що це збудження спрямоване на активування постсинаптичного mGluR, але цим також підказано, що відбувається активування пресинаптичного mGluR, призводячи до збільшеного вивільнення нейротрансмітерів. Baskys, Trends Pharmacol Set 15:92 (1992), Schoepp, Neurochem. Int. 24:439 (1994), Pin et al., Neuropharmacology 34:1(1995), Watkins et al, Trends Pharmacol Sci. 15:33 (1994).

Метаботропічні рецептори глутамату приймають участь у ряді нормальних процесів у центральній нервовій системі ссавців. Активування mGluR, як показано, є необхідним для індукування гіпокамальної довготермінової потенціації та мозочкової довготермінової депресії. Bashir et al., Nature 363:347 (1993), Bortolotto et al, Nature 368:740 (1994), Alba et al, Cell 79:365 (1994), Aiba et al., Cell 79:377 (1994). Також продемонстровано роль стосовно активування mGluR у ноцицепції та анальгезії, Meller et al. Neuroreport 4: 879 (1993), Bordi та Ugolini, Brain Res. 871:223 (1999). На додаток, активування mGluR, як підказано, грає модуляторну роль у різноманітності інших нормальних процесів, у тому числі синаптичної трансмісії, неврональному розвитку, апоптичної неврональної загибелі, синаптичної пластичності, просторового навчання, нюхової пам'яті, центрального контролю серцевої активності, пробудження, моторного контролю та контролю вестибулоокулярного рефлексу. Nakanishi, Neuron 13:1031 (1994), Pin et al, Neuropharmacology 34:1, Knopfel et al, J. Med. Chem. 35:1417(1995).

Далі, група I метаботропічних рецепторів глутамату та зокрема mGluR5, як підказано, грає ролі у різноманітності патофізіологічних процесів та розладів, що вражають центральну нервову систему. Це охоплює напад, травми голови, анемію та ішемічні пошкодження, гіпоглікемію, епілепсію, нейродегенеративні розлади, як-то хвороба Альцгеймера та біль. Schoepp et al, Trends Pharmacol Sci 14:3 (1993), Cunningham et al., Life Sci. 54:135 (1994), Hollman et al, Ann. Rev. Neurosci. 17:31 (1994), Vin et al, Neuropharmacology 34:1 (1995), Knopfel et al, J. Med. Chem. 35:1417 (1995), Spooren et al., Trends Pharmacol. Sci. 22:331 (2001), Gasparini et al. Curr. Opin. Pharmacol. 2:43 (2002), Neugebauer Pain 98:1 (2002). Багато з патологій у цих станах, можна вважати, відбувається внаслідок надлишкового індукованого глутаматом збудження нейронів центральної нервової системи. Оскільки група I mGluR показує збільшення опосередкованого глутаматом невронального збудження шляхом постсинаптичних механізмів та посиленого пресинаптичного вивільнення глутамату, їх активування ймовірно сприяє патології. Відповідно, селективні антагоністи групи I рецепторів mGluR могли б бути терапевтично корисними, особливо як нейропротективні засоби, анальгетики або антиконвульсанти.

Нещодавніми успіхами стосовно пояснення нейрофізіологічної ролі метаботропічних рецепторів глутамату загалом та групи I зокрема встанов-

лено, що ці рецептори є перспективними цілями для ліків у терапії гострих та хронічних неврологічних та психіатричних розладів та хронічних та гострих больових розладів.

Шлунково-кишкові розлади

Нижчий стравохідний сфінктер (LES) є схильним до переміжного розслаблення. Як наслідок, рідина зі шлунку може потрапляти у стравохід оскільки механічний бар'єр є тимчасово втраченим у цей час, це далі позначено як "рефлюкс".

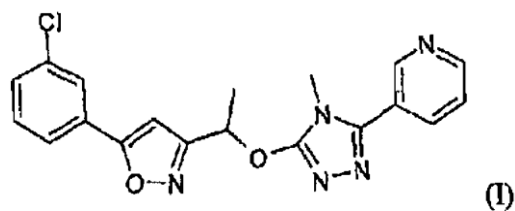
Хвороба шлунково-стравохідний рефлюкс (GERD) є найпоширенішою хворобою верхнього шлунково-кишкового тракту. Сучасні цілі фармако-терапії полягають у зменшенні секреції шлункової кислоти або нейтралізуванні кислоти у стравоході. Головним механізмом рефлюксу вважають гіпотонічність нижчого стравохідного сфінктера. Однак, наприклад, Holloway & Dent (1990) *Gastroenterol Clin. N. Amer.* 19, pp. 517-535, показано, що більшість випадків рефлюксу відбуваються при тимчасовій релаксації нижчого стравохідного сфінктера (TLESR), тобто релаксація не ініціюється ковтками. Також показано, що секреція шлункової кислоти звичайно є нормальною у пацієнтів з GERD.

Нові сполуки згідно із заявленим винаходом, як припускають, будуть корисними для інгібування тимчасової релаксації нижчого стравохідного сфінктера (TLESR) та таким чином для лікування розладу шлунково-стравохідний рефлюкс (GERD).

Внаслідок їх фізіологічного та патофізіологічного значення, існує потреба у нових потужних агоністах та антагоністах mGluR, що виявляють високу селективність стосовно підтипів mGluR, особливо підтипу групи I рецепторів, найбільш особливо mGluR5

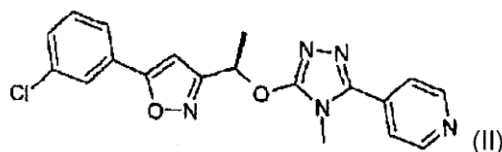
Об'єктом заявленого винаходу є отримання сполук, що виявляють активність стосовно метаболічних рецепторів глутамату (mGluR), особливо рецептору mGluR5.

Одне втілення заявленого винаходу стосується сполуки формули I:

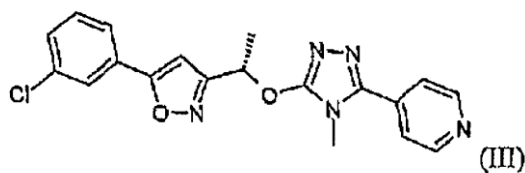


а також її фармацевтично прийнятних солей, гідратів, ізоформ та/або енантіомерів. В одному втіленні сполук формули I є R-енантіомер. У ще одному втіленні сполук формули I є S'-енантіомер.

Наступне втілення заявленого винаходу стосується сполуки формули II:



а також її фармацевтично прийнятних солей, гідратів та/або ізоформ. Ще одне втілення заявленого винаходу стосується сполуки формули III:



а також її фармацевтично прийнятних солей, гідратів та/або ізоформ.

Ще одним втіленням є фармацевтична композиція, яка містить як активний інгредієнт терапевтично ефективну кількість сполуки формул I-III, в асоціації з одним або більше фармацевтично прийнятними розріджувачами, наповнювачами та/або інертними носіями.

Інші втілення, які описано більше детально нижче, стосуються сполук формул I-III для застосування у терапії, у лікуванні опосередкованих mGluR5 розладів, у виробництві медикаменту для лікування опосередкованих mGluR5 розладів.

Наступні втілення стосуються способу лікування опосередкованих mGluR5 розладів, який полягає у призначенні ссавцю терапевтично ефективної кількості сполуки формул I-III.

У ще одному втіленні запропоновано спосіб інгібування активування рецепторів mGluR5, який полягає в обробці клітин, що містять вказаний рецептор, ефективною кількістю сполуки формул I-III.

Сполуки заявленого винаходу є корисними у терапії, зокрема для лікування неврологічних, психіатричних, больових, та шлунково-кишкових розладів.

Треба також розуміти спеціалістам, що деякі сполуки заявленого винаходу можуть існувати у сольватованій, наприклад, гідратованій, а також несольватованій формах. Треба також розуміти, що заявлений винахід стосується усіх таких сольватованих форм сполук формули I-III.

У рамках винаходу є також солі сполук формули I-III. Загалом, фармацевтично прийнятні солі сполук заявленого винаходу отримують, застосовуючи стандартні операції, добре відомі у рівні техніки, наприклад, реакцією достатньо основної сполуки, наприклад, алкіл аміну, з придатною кислотою, наприклад, HCl або оцтовою кислотою, отримуючи сіль із фізіологічно прийнятним аніоном. Також можливо створити відповідні солі лужного металу (як-то натрій, калій, або літій) або лужно-земельного металу (як-то кальцій), обробкою сполуки заявленого винаходу, що має відповідно кислотний протон, як-то карбонова кислота або фенол, одним еквівалентом гідроксиду або алкоксиду лужного металу або лужно-земельного металу (як-то етоксид або метоксид), або відповідно основного органічного амін (як-то холін або меглумін) у водному середовищі, а потім звичайними способами очистки. На додаток, солі четвертинного амонію можуть бути отриманими додаванням алкілувальних засобів, наприклад, до нейтральних амінів.

В одному втіленні заявленого винаходу, сполуку формули I-III можна перетворити у фармацевтично прийнятну сіль або сольват, особливо, кислотно-адитивну сіль, як-то гідрохлорид, гідробромід, фосфат, ацетат, фумарат, малеат, тартрат, цитрат, метансульфонат чи п-

толуолсульфонат.

У наступних втіленнях заявленого винаходу, сполуку формули I-III можна перетворити у фармацевтично прийнятну сіль або сольват сульфанової кислоти, 1,2-етандисульфанової кислоти (як 1:1 та 2:1), етансульфонової кислоти, нітратної кислоти, 2-мезитилсульфонової кислоти, 1,5-нафталіндисульфанової кислоти (як 1:1 та 2:1) чи п-ксилолсульфонової кислоти.

Фармацевтична композиція

Сполуки заявленого винаходу можна формувати у звичайні фармацевтичні композиції, які містять сполуку формули I-III, або її фармацевтично прийнятну сіль або сольват, в асоціації з фармацевтично прийнятним носієм або наповнювачем. Фармацевтично прийнятні носії можуть бути твердими або рідкими. Тверді форми препаратів охоплюють, але без обмеження, порошки, таблетки, дисперсивні гранули, капсули, облатки та супозиторії.

Твердим носієм може бути одна або більше речовин, котрі можуть також діяти як розріджувачі, смакові засоби, солюбілізатори, змашувальні засоби, суспендувальні засоби, зв'язуючі, або засоби розкладання таблеток. Твердим носієм може також бути інкапсулювальний матеріал.

У порошках носії є мілко подрібненим твердим матеріалом, котрий є у суміші з мілко подрібненою сполукою винаходу, або активним компонентом. У таблетках активний компонент є змішаним з носієм, що має необхідні з'єднувальні властивості у придатній пропорції та це спресовують до бажаної форми та розміру.

Для отримання композицій супозиторію, низькоплавкий віск, як-то суміш гліцеридів жирних кислот та масла какао, спершу плавлять та активний інгредієнт диспергують в цьому, наприклад, перемішуванням. Розплавлену гомогенну суміш тоді виливають у форми потрібного розміру та надають змоги охолонути та затверднути.

Придатні носії охоплюють, але без обмеження, магній карбонат, магній стеарат, тальк, лактозу, цукор, пектин, декстрин, крохмаль, трагакант, метилцелюлозу, натрій карбоксиметилцелюлозу, низькоплавкий віск, масло какао, тощо.

Термін композиція також охоплює композицію активного компоненту з інкапсулювальним матеріалом як носієм, що забезпечує капсулу, у котрій активний компонент (з іншими носіями або без них) є оточеним носієм, котрий є таким чином в асоціації з ним. Подібним чином уводять облатки.

Таблетки, порошки, облатки та капсули можуть бути застосовуваними як тверді дозовані форми, придатні для перорального застосування.

Рідкі форми композицій охоплюють розчини, суспензії, та емульсії. Наприклад, стерильні водні або водно-пропіленгліколеві розчини активних сполук можуть бути рідкими препаратами, придатними для парентерального застосування. Рідкі композиції можуть також бути сформованими у водно-поліетиленгліколевому розчині.

Водні розчини для перорального застосування можуть бути отриманими розчиненням активного компоненту у воді та додаванням придатних барвників, смакових засобів, стабілізаторів та загусників, за потребою. Водні суспензії для перорального

застосування можна зробити диспергуванням мілко подрібненого активного компоненту у воді разом з в'язким матеріалом, як-то природні синтетичні камеді, смоли, метилцелюлоза, натрій карбоксиметилцелюлоза, та інші суспендувальні засоби, відомі у рівні техніки фармацевтичних композицій. Типові композиції для перорального застосування можуть містити один або більше барвників, підсолоджувачів, смакових засобів та/або консервантів.

Залежно від режиму застосування, фармацевтична композиція повинна містити приблизно від 0,05 мас.% (мас.%) до 99 мас.%, або приблизно від 0,10 мас.% до 50 мас.%, сполуки винаходу, усі проценти за масою є на основі загальної маси композиції.

Терапевтично ефективна кількість для практики заявленого винаходу може бути визначеною спеціалістом, застосовуючи відомі критерії, охоплюючи вік, масу та реакцію індивідуального пацієнта, та інтерпретованою у контексті хвороби, яку лікують або попереджують.

Медичне застосування

Сполуки згідно із заявленим винаходом є корисними у лікуванні станів, асоційованих із збуджувальним активуванням mGluR5 та для інгібування невронального пошкодження, викликаного збуджувальним активуванням mGluR5. Сполуки можуть бути застосовуваними для виклику інгібувальної дії mGluR5 у ссавців, у тому числі людини.

Група I рецепторів mGluR, охоплюючи mGluR5, є сильно експресованими у центральній та периферійній нервовій системі та в інших тканинах. Таким чином, очікують, що сполуки винаходу є добре придатними для лікування опосередкованих mGluR5 розладів, як-то гострі та хронічні неврологічні та психіатричні розлади, шлунково-кишкові розлади, та хронічні та гострі больові розлади.

Винахід стосується сполуки формули I-III, яку визначено вище, для застосування у терапії.

Винахід стосується сполуки формули I-III, яку визначено вище, для застосування у лікуванні опосередкованих mGluR5 розладів.

Винахід стосується сполуки формули I-III, яку визначено вище, для застосування у лікуванні сенильної деменції хвороби Альцгеймера, індукованої СНІД деменції, хвороби Паркінсона, бічного аміотрофічного склерозу, хореї Хантингтона, мігрені, епілепсії, шизофренії, депресії, тривожності, гострої тривожності, офтальмологічних розладів, як-то ретинопатій, діабетичних ретинопатій, глаукоми, слухових невропатичних розладів, як-то дзвону у вухах, індукованих хемотерапією невропатій, постгерпетичної невралгії та тригемінальної невралгії, толерантності, згубних звичок, уродженого стану з розумовою субнормальністю, аутизму, уродженого слабоумства, шизофренії та синдрому Дауна.

Винахід стосується сполуки формул I-III, яку визначено вище, для застосування у лікуванні болю, пов'язаного з мігренню, запального болю, невропатичних больових розладів, як-то діабетичні невропатії, артрит та ревматоїдні хвороби, болю унизу спини, післяоперативного болю та болю, асоційованого з різними станами, охоплюючи рак,

стенокардію, ниркову коліку або коліку жовчного міхура, менструацію, мігрень та подагру.

Винахід стосується сполуки формули I-III, яку визначено вище, для застосування у лікуванні інсульту, травми голови, аноксичного та ішемічного пошкодження, гіпоглікемії, серцево-судинних хвороб та епілепсії.

Заявлений винахід стосується також застосування сполуки формули I-III, яку визначено вище, у виробництві медикаменту для лікування опосередкованих групи I рецепторів mGluR5 розладів та будь-якого розладу з перерахованих вище.

Одне втілення винаходу стосується застосування сполуки формул I-III у лікуванні шлунково-кишкових розладів.

Ще одне втілення винаходу стосується застосування сполуки формули I-III для виробництва медикаменту для інгібування тимчасової релаксації нижчого стравохідного сфінктера, для лікування GERD, для попередження шлунково-стравохідного рефлюксу, для лікування регургітації, для лікування астми, для лікування ларингіту, для лікування хвороби легень, для терапії затримки росту, для лікування хвороби подразненого кишечника (IBS) та для лікування функціональної диспепсії (FD).

Вираз "TLESR", тимчасова релаксація нижчого стравохідного сфінктера, визначено тут згідно із Mittal, R.K., Holloway, R.H., Penagini, R., Blackshaw, L.A., Dent, J., 1995; Transient lower esophageal sphincter relaxation. *Gastroenterology* 109, pp. 601-610.

Вираз "рефлюкс" визначено тут як здатність рідини зі шлунку потрапляти у стравохід, оскільки механічний бар'єр є тимчасово втраченим у цей час.

Вираз "GERD", хвороба шлунково-стравохідний рефлюкс, визначено тут згідно з van Heerwarden, M.A., Smout A.J.P.M., 2000; Diagnosis of reflux disease. *Bailliere's Clin. Gastroenterol.* 14, pp. 759-774.

Наступне втілення винаходу стосується застосування сполуки формул I-III для виробництва медикаменту для лікування кашлю. В одному втіленні кашель, що треба лікувати, є хронічним кашлем. У наступному втіленні кашель, що треба лікувати, є гострим кашлем. Термін хронічний кашель визначають згідно із Kardos P et al (The German Respiratory Society's Guideline for the Diagnosis and Treatment of Patients with Acute and Chronic Cough *Medizinische Klinik* 2004;99(8):468-75) як кашель, що продовжується довше, ніж 8 тижнів. Однак, хронічний кашель може також бути визначеним як кашель, що продовжується довше,

ніж 3 тижні або як кашель, що продовжується довше, ніж 2 місяці. Термін "гострий кашель" є також визначеним згідно з вищенаведеним посиланням як кашель, що продовжується менше, ніж 8 тижнів.

Сполуки формули I-III вище є корисними для лікування або попередження ожиріння або надлишкової ваги, (наприклад, стимулювання втрати ваги та підтримання втрати ваги), попередження або скасування збільшення ваги (наприклад, пригнічення індукованої лікуванням або викликаного відмовою від паління), для модуляції апетиту та/або насичення, розлади споживання їжі (наприклад, ожерливість, втрата апетиту, булімія та нав'язлива схильність) та жадання (до ліків, тютюну, алкоголю, будь-якого харчовального макроеlementу, що стимулює апетит або неістотних харчових продуктів).

Винахід також стосується способу лікування опосередкованих mGluR5 розладів та будь-якого розладу з перерахованих вище, у пацієнта, який потерпає від вказаного стану, або при ризику його виникнення, котрий полягає у застосуванні до пацієнта ефективної кількості сполуки формули I-III, яку визначено вище.

Доза, необхідна для терапевтичного або профілактичного лікування конкретного розладу повинна неодмінно варіювати залежно від лікованого хазяїна, шляху застосування та від суворості хвороби, яку лікують.

У контексті наданого опису, термін "терапія" та "лікування" охоплює попередження або профілактику, якщо конкретно не вказано інше. Терміни "терапевтичний" та "терапевтично" слід розуміти відповідно.

У наданому описі, якщо не вказано інше, термін "антагоніст" та "інгібітор" означають сполуку, що будь-яким чином, частково або повністю, блокує шлях передачі, даючи реакцію на ліганд.

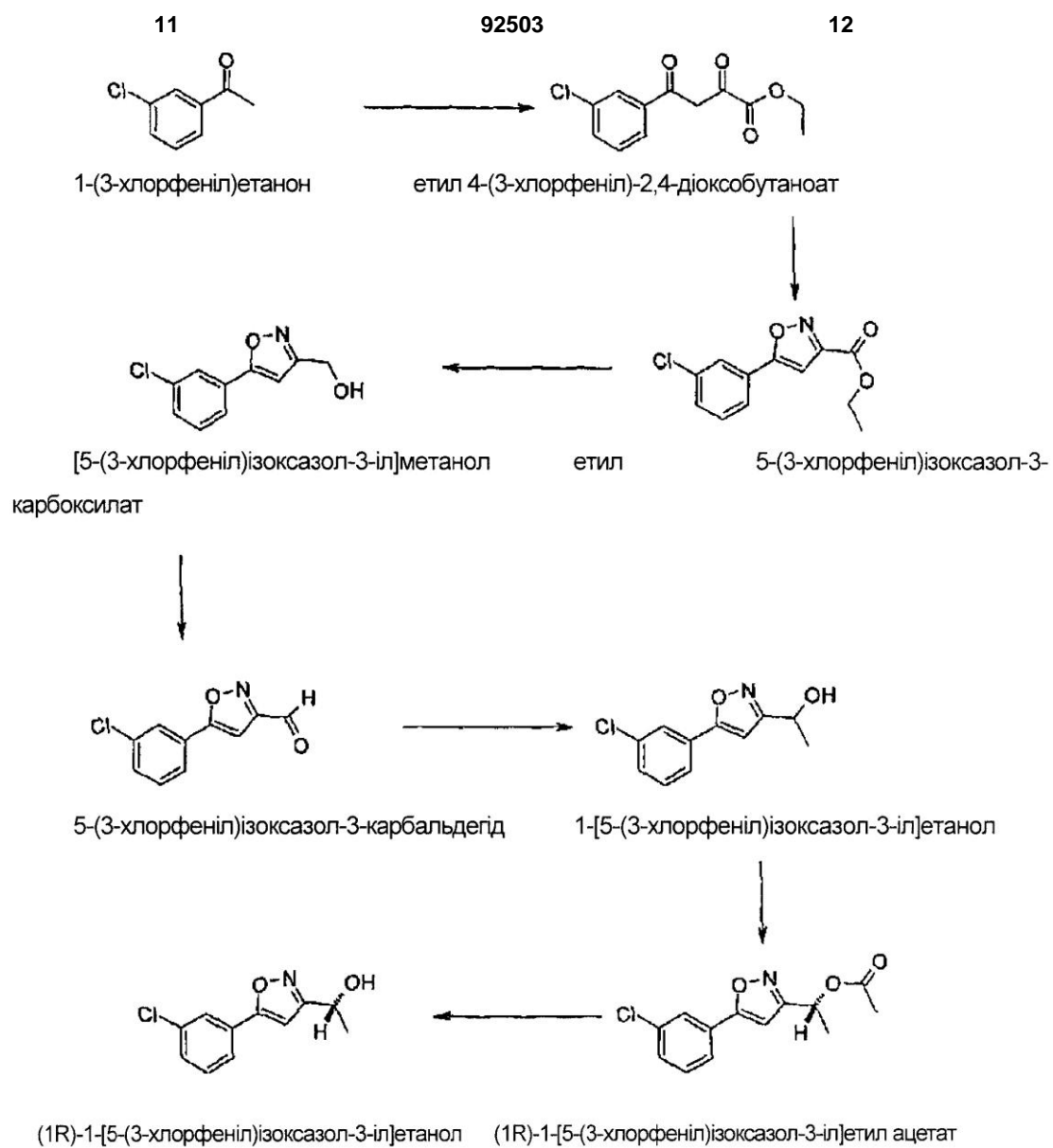
Термін "розлад", якщо не вказано інше, означає будь-який стан та хворобу, асоційовані з активністю метаболічного рецептору глутамату.

Немедичне застосування

На додаток до їх застосування у терапії сполуки формули I-III, а також солі та гідрати таких сполук, є корисними як фармакологічні засоби у розробці та стандартизації *in vitro* та *in vivo* тест-систем для оцінки дії пов'язаної з інгібіторами mGluR активності у лабораторних тварин, як-то коти, собаки, кролі, мавпи, щури та миші, як частини дослідження нових терапевтичних засобів.

Способи отримання

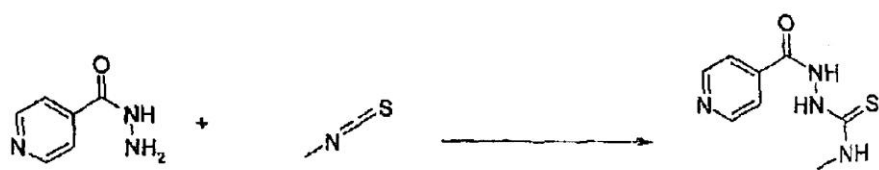
Синтез інтермедіатів



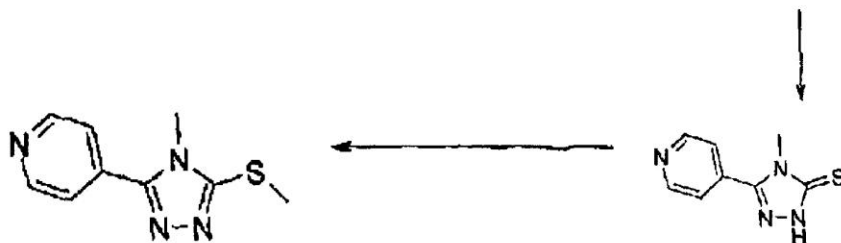
13

92503

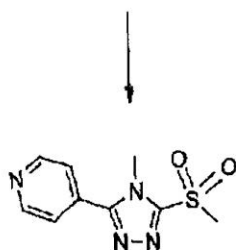
14



ізонікотиногідрозид (метиліміно)(тіоксо)метан 2-ізонікотинойл-N-метилгідразинкарботіоамід



4-[4-метил-5-(метилтіо)-4Н-1,2,4-триазол-3-іл]піридин 4-метил-5-піридин-4-іл-2,4-дигідро-3Н,1,2,4-триазол-3-тіон



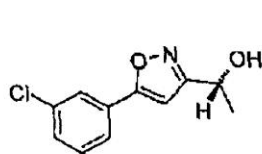
4-[4-метил-5-(метилсульфоніл)-4Н-1,2,4-триазол-3-іл]піридин



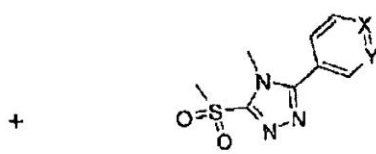
нікотиногідрозид

3-[4-метил-5-(метилсульфоніл)-4Н-1,2,4-триазол-3-іл]піридин

Синтез кінцевих сполук



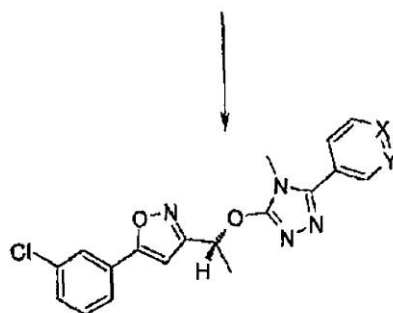
(1R)-1-[5-(3-хлорфеніл)ізоксазол-3-іл]етанол



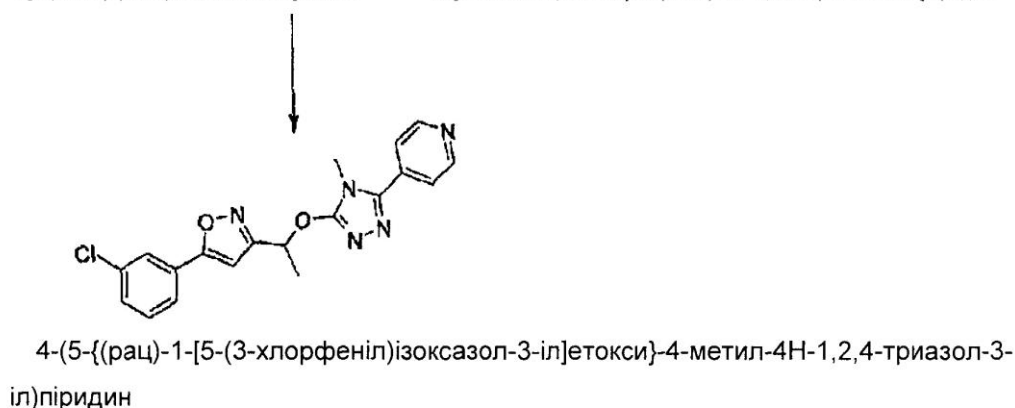
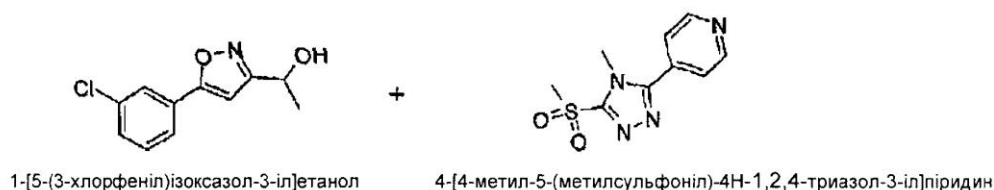
X=N, Y=C: 4-[4-метил-5-(метилсульфоніл)-4Н-

1,2,4-триазол-3-іл]піридин

X=C, Y=N: 3-[4-метил-5-(метилсульфоніл)-4Н-1,2,4-триазол-3-іл]піридин



X=N, Y=C: 4-(5-((1R)-1-[5-(3-хлорфеніл)ізоксазол-3-іл]етокси)-4-метил-4Н-1,2,4-тіазол-3-іл)піридин
 X=C, Y=N: 3-(5-((1R)-1-[5-(3-хлорфеніл)ізоксазол-3-іл]етокси)-4-метил-4Н-1,2,4-тіазол-3-іл)піридин



Хроматографічне розділення →
 4-(5-((1R)-1-[5-(3-хлорфеніл)ізоксазол-3-іл]етокси)-4-метил-4Н-1,2,4-тіазол-3-іл)піридин та

4-(5-((1S)-1-[5-(3-хлорфеніл)ізоксазол-3-іл]етокси)-4-метил-4Н-1,2,4-тіазол-3-іл)піридин
 Загальні способи

Усі вихідні матеріали є комерційно доступними або описаними у літературі. ^1H та ^{13}C ЯМР спектри реєстрували на спектрометрах Bruker 300, Bruker DPX400 або Varian +400 при 300, 400 та 400 МГц для ^1H ЯМР відповідно, застосовуючи TMS або сигнал залишкового розчинника як внутрішній стандарт, у дейтерованому хлороформі як розчиннику, якщо не вказано інше. Усі хімічні зсуви представлені як мн $^{-1}$ на дельта-шкалі, та розщеплення сигналів як s: синглет, br s: широкий синглет, d: дублет, t: триплет, q: кuartет, m: мультиплет).

Аналітичні поточні розділення рідинною хроматографією а потім визначення мас-спектрів, реєстрували на Waters PX-MC, що складався з одиничного квадрупольного мас-спектрометра Alliance 2795 (PX) та ZQ. Мас-спектрометр було оснащено джерелом електророзпилення іонів у позитивному та/або негативному іонному режимі. Потенціал електророзпилення іонів був $\pm 3\text{кВ}$ та

мас-спектрометр було скановано від m/z 100 до 700 при часі сканування 0,8с. Для колонки X-Terra MS, Waters, C8,2,1x50мм, 3,5мкм, було застосовано лінійний градієнт від 5% до 100% ацетонітрилу у 10мМ амоній ацетаті (водн.), або у 0,1% ТФОК (водн.). Оптичне обертання було виміряно поляриметром Perkin Elmer 241, застосовуючи комірку 10см при 23°C при 589нм.

Скорочення.

ДМФ диметилформамід

EtOAc етилацетат

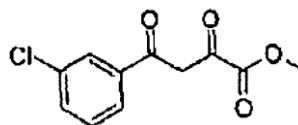
Novozyme 435® товарний знак для прищепленої до полімеру ліпази Candida antarctica

Приклади

Синтез Інтермедіатів

Приклад 1

Етил 4-(3-хлорфеніл)-2,4-діоксобутаноат

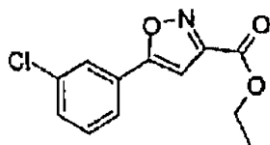


Натрій етоксид (117,8г, 1,73моль) було додано порціями до розчину 3-хлорацетофенону (178,5г, 1,15моль) та діетилоксалату (188мл, 1,39моль) в етанолі (3л) при 0°C Суміш перемішували при кім-

натній температурі протягом 1 години та тоді гріли при 70°C протягом 2 годин. Після охолодження, суміш було підкислено 3М гідрохлоридною кислотою (pH~3). Розчинник було відігнано та до суміші було додано EtOAc. Органічний шар було промито водою та насиченим розсолем. Розчинник було відігнано, отримуючи сирий заголовний продукт, котрий було застосовувано безпосередньо на наступному етапі. МС ($M^+ - 1$) = 253.

Приклад 2

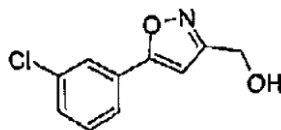
Етил 5-(3-хлорфеніл)ізоксазол-3-карбоксилат



Розчин сирого етил 4-(3-хлорфеніл)-2,4-діоксобутаноату (макс 294г, 1,16моль) та гідроксид амонію гідрохлориду (120,4г, 1,73моль) в етанолі (4л) гріли при 80°C протягом 4 годин. Після охолодження (протягом ночі) приблизно до 5-10°C, суміш було профільтровано, промито холодним етанолом та висушено у вакуумі, отримуючи заголовну сполуку (214,5г, 74%). ^1H ЯМР: 7,82 (s, 1H), 7,72 (m, 1H), 7,47 (m, 2H), 4,03 (s, 3H), МС ($M^+ + 1$) = 252.

Приклад 3

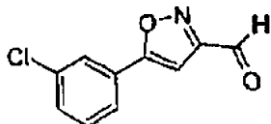
[5-(3-хлорфеніл)ізоксазол-3-іл]метанол



Натрій борогідрид (96,7г, 2,6моль) було повільно додано до розчину етил 5-(3-хлорфеніл)ізоксазол-3-карбоксилату (214,5г, 0,85моль) у метанолі (2,5л) при 0°C. Реакційну суміш гріли при 50°C протягом 2 годин та її було погашено EtOAc при кімнатній температурі. Більшість розчиннику було відігнано та до сирого залишку було додано EtOAc. Органічний шар було промито водою, насиченим розсолем та концентровано, отримуючи заголовну сполуку, котру було застосовувано безпосередньо на наступному етапі. МС ($M^+ + 1$) = 210.

Приклад 4

5-(3-хлорфеніл)ізоксазол-3-карбальдегід

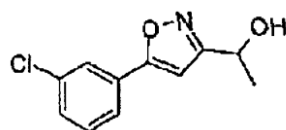


[5-(3-хлорфеніл)ізоксазол-3-іл]метанол (178,6г, 852ммоль) у дихлорметані (2л) було краплями додано до піридиній хлорхромату (400г, 1,86моль) у дихлорметані (2л). Утворену густу суспензію перемішували протягом ночі при кімнатній температурі. Густу суспензію було профільтровано через броунмілерит та фільтрат було відігнано. До залишкового розчину було додано EtOAc. Органічний шар було промито водою, насиченим розсолем та концентровано, отримуючи сирі заголовну сполуку, котру було застосовувано безпосередньо на наступному етапі. ^1H ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$): 10,13 (s,

1H), 8,08 (br s, 1H), 7,95 (m, 1H), 7,61 (m, 3H). МС ($M^+ + 1$) = 208.

Приклад 5

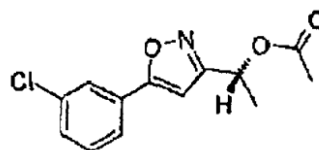
1-[5-(3-хлорфеніл)ізоксазол-3-іл]етанол



MeMgBr (3М у ТГФ, 313мл, 937,2ммоль) було додано краплями при 0°C до 5-(3-хлорфеніл)ізоксазол-3-карбальдегіду (177г, 252ммоль) у ТГФ (3л). Суміші було надано змоги досягти кімнатної температури, її перемішували при цій температурі протягом 3 годин та тоді її було погашено водним амоній хлоридом при 0°C та розчинник було відігнано. До залишку було додано EtOAc та профільтровано через шар броунмілериту. Органічний шар було промито водою, насиченим розсолем та концентровано. Сирий продукт було очищено флеш-колонковою хроматографією на силікагелі, застосовуючи гептан/EtOAc = 80:20, отримуючи заголовну сполуку (70г, 37%) як біло-жовтий твердий матеріал. ^1H ЯМР: 7,73 (m, 1H), 7,63 (m, 1H), 7,38 (m, 2H), 6,57 (s, 1H), 5,07 (q, 1H), 2,44 (s, 1H), 1,59 (d, 3H).

Приклад 6

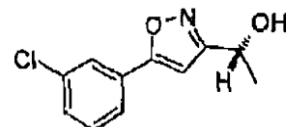
(1R)-1-[5-(3-хлорфеніл)ізоксазол-3-іл]етилацетат



1-[5-(3-хлорфеніл)ізоксазол-3-іл]етанол (106,5г, 476ммоль) та Novozyme 435® (13г) переносять під Ag у сухий толуол (1,5л). Після додавання вінілацетату (66мл, 716 ммоль) реакція перебігала при кімнатній температурі протягом ночі, а потім проводили фільтрування через броунмілерит та промивання Д ХМ. Розчинник було випарено у вакуумі та сирий продукт було піддано колонковій хроматографії на силікагелі, застосовуючи суміш дихлорметан/метанол 20:1, отримуючи заголовну сполуку (50г, 47%). ^1H ЯМР: 7,76 (m, 1H), 7,65 (m, 1H), 7,41 (m, 2H), 6,54 (s, 1H), 6,07 (q, 1H), 2,13 (s, 3H), 1,66 (d, 3H). РХ-МС ($M^+ + 1$) = 266.

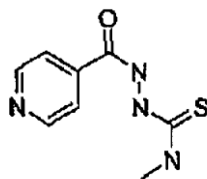
Приклад 7

(1R)-1-[5-(3-хлорфеніл)ізоксазол-3-іл]етанол



(1R)-1-[5-(3-хлорфеніл)ізоксазол-3-іл]етилацетат (56г, 211ммоль) та літій гідроксид моногідрат (10,6г, 253ммоль) були змішаними з ТГФ/Вода (7/5, 1,2л) та це перемішували при кімнатній температурі протягом ночі. Зменшення об'єму суміші у вакуумі до приблизно 1/2, а потім розведення розсолем, екстракція етером та тоді сушка магній сульфатом та у вакуумі концентрація дали сирий продукт. Сирий продукт було очищено флеш-колонковою хроматографією на силікагелі, застосовуючи гептан/EtOAc - 70:30, отримуючи

заголовну сполуку (40г, 85%). ^1H ЯМР: 7,73 (m, 1H), 7,63 (m, 1H), 7,38 (m, 2H), 6,57 (s, 1H), 5,07 (q, 1H), 2,44 (s, 1H), 1,59 (d, 3H).



Приклад 8

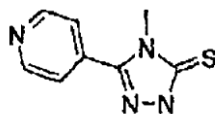
2-Ізонікотиноїл-JV-метилгідразинкарботіоамід

До обережно нагрітої (35°C) суспензії ізонікотиногідразиду (435г) в ізопропіловому спирті (6,0л) при механічному перемішуванні було додано (метиліміно)(тіоксо)метан (230г) кількома невеликими порціями. Після повного додавання реакційну суміш гріли (70°C) протягом 6 годин з додатковим додаванням ізопропілового спирту (600мл) після 30 хвилин.

Після охолодження (льодяна баня) реакційної суміші до 17°C, отриманий осад було відфільтровано та промито ізопропіловим спиртом (1,0л). Цей твердий матеріал було тоді висушено на повітрі протягом ночі, отримуючи 615г заголовної сполуки як білий порошок.

Приклад 9

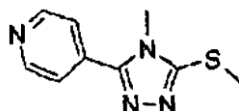
4-Метил-5-піридин-4-іл-2,4-дигідро-3Н-1,2,4-триазол-3-тіон



До суспензії 2-ізонікотиноїл-N-метилгідразинкарботіоамід (610г) у воді (5,0л) при механічному перемішуванні було додано натрій гідрокарбонат (390г) при кімнатній температурі. Реакційну суміш далі повільно гріли до 70°C протягом 2 годин, та тримали при цій температурі протягом ще 3,5 годин перед охолодженням (льодяна баня) до 17°C, а потім доводили рН до 3 повільним додаванням (протягом 90 хвилин) концентрованої гідрохлоридної кислоти (приблизно 470мл). Наступне фільтрування реакційної суміші, а потім промивання зібраного твердого матеріалу розведеною гідрохлоридною кислотою (0,1Н, 2х1,0л), дали вологий шар на фільтрі, який було висушено при 100мбар під обережним струмом повітря протягом 1,5 доби, отримуючи 544г заголовної сполуки.

Приклад 10

4-[4-Метил-5-(метилтіо)-4Н-1,2,4-триазол-3-іл]піридин

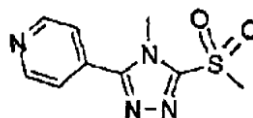


До суспензії 4-метил-5-піридин-4-іл-2,4-дигідро-3Н-1,2,4-триазол-3-тіону (267г) та метилйодиду (197,7г) при механічному перемішуванні та охолодженні (9°C) в ацетоні (2,6л), було додано розчин натрій гідроксиду (54г у 600мл води) при такій швидкості (приблизно 20мл/хвилину), щоб

тримати температуру між 10 та 15°C. Ще одну порцію води (50мл) було тоді додано та температурі було надано змоги досягти 21-24°C. Після ще 2 годин ацетон було відігнано з реакційної суміші у вакуумі (водяну баню тримали при 30°C). Ще одну порцію води (750мл) було тоді додано перед охолодженням (17 до 18°C) та збиранням утвореного осаду фільтруванням. Цей твердий матеріал було тоді промито водою (2х1л) перед сушкою при 100мбар під обережним струмом повітря протягом 3 діб, отримуючи 235г заголовної сполуки як білий порошок. ^1H ЯМР (DMSO- d_6): 2,7 (s, 3H), 3,6 (s, 3H), 7,7 (m, 2H), 8,8 (d, 2H).

Приклад 11

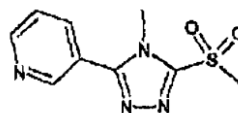
4-[4-Метил-5-(метилсульфоніл)-4Н-1,2,4-триазол-3-іл]піридин



При механічному перемішуванні до розчину 4-[4-метил-5-(метилтіо)-4Н-1,2,4-триазол-3-іл]піридину (228г) з попереднього етапу у суміші води (1,15л) та оцтової кислоти (1,15л), було додано порціями при охолодженні калій перманганат (234г), при такій швидкості, щоб тримати температуру 12-17°C (приблизно 45 хвилин). Реакційну суміш тоді перемішували при кімнатній температурі протягом 4 годин перед охолодженням на льодяній бані протягом додавання розчину натрій гідроксиду (5Н) протягом 2,5 годин до рН приблизно до 10. Dicalite® (100г) та хлороформ (1,6л) було тоді додано до реакційної суміші перед фільтруванням. Органічну фазу було відділено від фільтрату та водну фазу було екстраговано хлороформом (2х1л). Шар на фільтрі було екстраговано двічі хлороформом (2х1,5л). Комбіновані органічні фази були висушеними магній сульфатом, профільтрованими та концентрованими у вакуумі отримуючи 158г заголовної сполуки як білий порошок. Ще одну партію (78г, білий порошок) було отримано екстракцією шару на фільтрі хлороформом (2х2л) та концентрацією цього розчину у вакуумі. ^1H ЯМР (DMSO- d_6): 3,6 (s, 3H), 3,9 (s, 3H), 7,8 (s, 2H), 8,8 (s, 2H).

Приклад 12

3-[4-метил-5-(метилсульфоніл)-4Н-1,2,4-триазол-3-іл]піридин



Заголовну сполуку було отримано аналогічно 4-[4-метил-5-(метилсульфоніл)-4Н-1,2,4-триазол-3-іл]піридину, як описано тут, за відповідною послідовністю з відповідних етапів, виходячи від нікотиногідразиду замість ізонікотиногідразиду. ^1H ЯМР: 3,59 (s, 3H), 3,99 (s, 3H), 7,52 (m, 1H), 8,02 (dt, 1H), 8,83 (dd, 1H), 8,91 (m, 1H).

Синтез кінцевих сполук

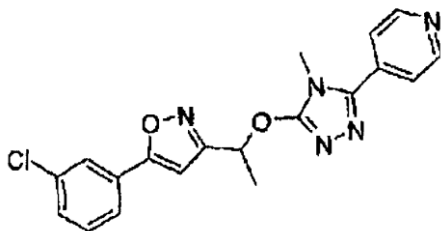
Приклад 13

3-(5-((1R)-[5-(3-хлорфеніл)ізоксазол-3-іл]стокси)-4-метил-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)піридин (1R)-1-[5-(3-хлорфеніл)ізоксазол-3-іл]етанол

(5,40г, 24,1ммоль) було розчинено у ДМФ (45мл). До цього були додані 3-[4-метил-5-(метилсульфоніл)-4Н-1,2,4-триазол-3-іл]піридин (5,75г, 24,1ммоль) та цезій карбонат (10,1г, 31,4ммоль). Після перемішування протягом ночі при 60°C, було додано воду. Суміш було екстраговано дихлорметаном, а потім органічний шар концентровано у вакуумі, отримуючи сирий матеріал, котрий було очищено колонковою хроматографією на силікагелі, застосовуючи дихлорметан/метанол = 98/2, отримуючи заголовну сполуку (7,10г, 77%). ¹H ЯМР: 8,90 (d, 1H), 8,72 (m, 1H), 8,04 (dt, 1H), 7,76 (bs, 1H), 7,66 (m, 1H), 7,45 (m, 1H), 7,40 (m, 2H), 6,73 (s, 1H), 6,35 (q, 1H), 3,57 (s, 3H), 1,93 (d, 3H). ¹H ЯМР (DMSO-d₆): 8,90 (d, 1H), 8,71 (dd, 1H), 8,13 (dt, 1H), 7,99 (s, 1H), 7,86 (m, 1H), 7,58 (m, 3H), 7,40 (s, 1H), 6,19 (q, 1H), 3,54 (s, 3H), 1,81 (d, 3H). РХ-МС (M++1) = 382. [α]_D^{RT} (2,92г/л, CDCl₃) = -46,575°

Приклад 14

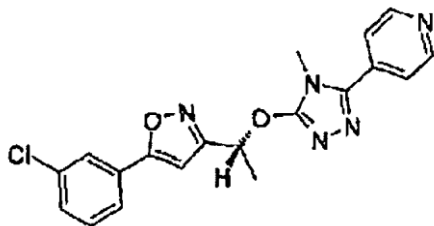
4-(5-((1R)-1-[5-(3-хлорфеніл)ізоксазол-3-іл]етокси)-4-метил-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)піридин



1-[5-(3-хлорфеніл)ізоксазол-3-іл]етанол (63,4мг, 0,28ммоль), ДМФ та натрій гідрід (60% дисперсія в оливі, 15,1мг, 0,38ммоль) були змішаними під інертною атмосферою та це перемішували при кімнатній температурі протягом 1 години, а потім додавали 4-[4-метил-5-(метилсульфоніл)-4Н-1,2,4-триазол-3-іл]піридин (45мг, 0,19ммоль). Після перемішування при 80°C протягом 24h, суміш було охолоджено до кімнатної температури, розведено EtOAc та промито водою та розсоллом. Органічну фазу було висушено натрій сульфатом, профільровано та концентровано у вакуумі. Сирий залишок було очищено колонковою хроматографією на силікагелі, застосовуючи 5% метанол у EtOAc для виділення заголовної сполуки (11,7мг). ¹H-ЯМР: 8,81 (bs, 2H), 7,77 (s, 1H), 7,67 (m, 3H), 7,42 (m, 2H), 6,73 (s, 1H), 6,36 (q, 1H), 3,62 (s, 3H), 1,94 (d, 3H).

Приклад 15

4-(5-((1,2)-1-[5-(3-хлорфеніл)ізоксазол-3-іл]етокси)-4-метил-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)піридин



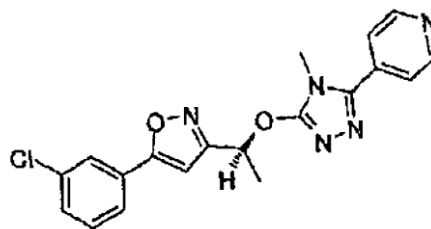
Спосіб 1: Розділенням препаративною хіральною ВЕРХ 4-(5-((1R)-1-[5-(3-хлорфеніл)ізоксазол-3-іл]етокси)-4-метил-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)піридин на колонці chiralpak AD з ізопропанолом як елюент, отримуючи заголовну сполук як енантіомер,

що елюється першим.

Спосіб 2: Заголовну сполуку було отримано аналогічно 3-(5-((1R)-1-[5-(3-хлорфеніл)ізоксазол-3-іл]етокси)-4-метил-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)піридину сполученням (1R)-4-[5-(3-хлорфеніл)ізоксазол-3-іл]етанолу з 4-[4-метил-5-(метилсульфоніл)-4Н-1,2,4-триазол-3-іл]піридином, застосовуючи цезій карбонат у ДМФ. ¹H ЯМР (DMSO-d₆): 8,73 (m, 2H), 7,97 (br. s, 1H), 7,85 (m, 1H), 7,74 (m, 2H), 7,58 (m, 2H), 7,39 (s, 1H), 6,20 (q, 1H), 3,60 (s, 3H), 1,81 (d, 3H). [α]_D^{RT} (5,827г/л, CDCl₃) = -48,567°

Приклад 16

4-(5-((1S)-1-[5-(3-хлорфеніл)ізоксазол-3-іл]етокси)-4-метил-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)піридин



Заголовну сполуку було виділено як ту, що елюється другим енантіомером у розділенні препаративною хіральною ВЕРХ, як описано у прикладі 4-(5-((1R)-1-[5-(3-хлорфеніл)ізоксазол-3-іл]етокси)-4-метил-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)піридину (спосіб 1). ¹H-ЯМР: 8,81 (bs, 2H), 7,77 (s, 1H), 7,67 (m, 3H), 7,42 (m, 2H), 6,73 (s, 1H), 6,36 (q, 1H), 3,62 (s, 3H), 1,94 (d, 3H).

Приклад 17

4-(5-((1R)-1-[5-(3-хлорфеніл)ізоксазол-3-іл]етокси)-4-метил-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)піридин гідрохлорид

Заголовну сіль було отримано додаванням 10мкл 32% водного розчину HCl двома порціями до прозорого розчину 35мг вільної основи 4-(5-((1R)-1-[5-(3-хлорфеніл)ізоксазол-3-іл]етокси)-4-метил-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)піридину у 500мкл етанолу при 50°C. Густу суспензію було охолоджено до 10°C та її тримали протягом ночі з перемішуванням перед тим, як сіль було відфільтровано, промито 500мкл етанолу та висушено при кімнатній температурі під вакуумом.

Сіль була кристалічною, мала чітку температуру плавлення та мала збільшене поглинання вологи при 90-95% відносної вологості.

Заголовну сіль було вироблено подібним шляхом в етанолі, 2-пропанолі та етилацетаті та також у масштабі 1г в етанолі. Усі партії, продукували ту ж кристалічну модифікацію, хоча вміст аморфного матеріалу був трохи вищим у деяких партіях. Точка плавлення була від 150°C до 160°C.

Сіль, вироблену у масштабі 1г з етанолу далі досліджували на її власну розчинність та порівнювали з вільною основою 4-(5-((1R)-1-[5-(3-хлорфеніл)ізоксазол-3-іл]етокси)-4-метил-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)піридину. Сіль мала у 1000 разів вищу власну розчинність порівняно з вільною основою. Розчинність основи та солі були вимірними низькооб'ємним способом обертового диску. Диски були спресованими з чистої сполуки та їх центральню монтували у тримач диску із відкритою площею 0,07см². Тримач диску обертало при

500об/хвил зануреним у 50мл фосфатного буферу USP з рН 6,8 при 37°C. Сполуку було проаналізовано УФ-спектрофотометром із проточною кюветою та перистальтичним насосом з безперервною циркуляцією.

Приклад 18

4-(5-((1R)-1-[5-(3-хлорфеніл)ізоксазол-3-іл]етокси)-4-метил-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)піридин сульфат

Маслянисту сіль було вироблено випарюванням прозорого розчину, отриманого змішуванням 500мкл води із 33мг вільної основи 4-(5-((1R)-1-[5-(3-хлорфеніл)ізоксазол-3-іл]етокси)-4-метил-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)піридину, 500мкл метанолу та 7мкл 98% сульфатної кислоти. Заголовну сіль було вироблено перекристалізацією маслянистої солі у 500мкл етанолу.

Заголовна сіль була кристалічною з суттєвим вмістом аморфного матеріалу, вона не мала чіткої точки плавлення та переходила в рідкий стан при 60-70% відносної вологості.

Заголовну сіль було знов вироблено додаванням трьох порцій 5мкл концентрованої сульфатної кислоти (98%) протягом 1,5 годин до прозорого розчину 66-68мг вільної основи 4-(5-((1R)-1-[5-(3-хлорфеніл)ізоксазол-3-іл]етокси)-4-метил-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)піридину у 1мл 2-пропанолу або 1мл етанолу при 68°C. Сіль, вироблена з етанолу, мала точку плавлення 128°C хоча і переходила в рідкий стан при 70-80% відносної вологості.

Біологічна оцінка

Функціональна оцінка антагонізму mGluR5 у лініях клітин, що експресують mGluR5D

Властивості сполук винаходу можна аналізувати, застосовуючи стандартні аналізи на фармакологічну активність. Приклади аналізів рецептору глутамату добре відомі у рівні техніки як описано, наприклад, у Aramori et al, Neuron 8:757 (1992), Tanabe et al., Neuron 8:169 (1992), Miller et al, J. Neuroscience 15: 6103 (1995), Balazs, et al, J. Neurochemistry 69:151 (1997). Методологію, описану у цих публікаціях уведено тут як посилання. Сполуки винаходу можуть бути дослідженими аналізом (FLIPR), що вимірює мобілізацію внутрішньоклітинного кальцію, $[Ca^{2+}]_i$ у клітинах, що експресують mGluR5, або ще одним аналізом (IP₃), що вимірює перетворення інозитол-фосфату.

FLIPR-Аналіз

αКлітини, що експресують mGluR5d людини, які описано у WO97/05252 засівають при густині 100000 клітини на лунку на покритих колагеном 96-коміркових планшетах з прозорим дном з чорними стінками та експерименти проводять через 24 години після засівання. Усі аналізи проводять у буфері, що містить 127мМ NaCl, 5мМ KCl, 2мМ MgCl₂, 0,7мМ NaH₂PO₄, 2мМ CaCl₂, 0,422мг/мл NaHCO₃, 2,4мг/мл ГЕПЕС, 1,8мг/мл глюкози та 1мг/мл фракції IV альбуміну коров'ячої сироватки (рН 7,4). Культури клітин у 96-лункові планшети завантажують протягом 60 хвилин у вищезгаданому буфері, що містить 4мкМ ацетоксиметилового естеру флуоресцентного кальцієвого індикатора fluo-3 (Molecular Probes, Eugene, Oregon) у 0,01% плюронову кислоту (патентований, неіоногенний поліоловий сурфактант - CAS Number 9003-11-6). Після завантаження fluo-3 буфер видаляють та

заміняють свіжим буфером для аналізу. FLIPR-експерименти проводять, застосовуючи лазерну установку 0,800W та частоту зйомки камерою 0,4 с CCD з довжиною хвилі збудження та емісії 488нм та 562нм, відповідно. Кожний експеримент ініціюють 160мкл буферу у кожній лунці планшету для клітин. Додавання 40мкл з планшету антагоністу супроводжували додаванням 50мкл з планшету агоністу. Інтервал 90с відділяє додавання антагоністу та агоністу. Флуоресцентний сигнал є реєструють 50 разів при інтервалах 1с, а потім 3 при інтервалах 5с негайно після кожного з двох додавань. Реакції вимірюють як різницю між висотою піку реакції на агоніст, мінус фонову флуоресценцію. Визначення IC₅₀ роблять, застосовуючи програму підгонки методом найменших квадратів.

IP₃-Аналіз

Додатковий функціональний аналіз mGluR5d є описаним у WO97/05252 та має основою перетворення фосфатидилінозитулу. Активування рецептору стимулює активність фосфоліпази C та призводить до збільшеного утворення інозитол 1,4,5-трифосфату (IP₃).

GHEK, що стабільно експресують mGluR5d людини засівають на 24-лункові покриті полі-L-лізином планшети при 40х10⁴ клітин/комірку у середовищі, що містить 1мкКі/комірку [³H]інозитол. Клітини були інкубованими протягом ночі (16 годин), тоді промитими три рази та інкубованими протягом 1 години при 37°C у буферованому ГЕПЕС фізіологічному розчині (146мМ NaCl, 4,2мМ KCl, 0,5мМ MgCl₂, 0,1% глюкози, 20мМ ГЕПЕС, рН 7,4), доповненому 1 одиниці/мл глутамат-піруват-трансамінази та 2мМ піруват. Клітини промивають раз у буферованому ГЕПЕС фізіологічному розчині та преінкубують протягом 10 хвилин у буферованому ГЕПЕС фізіологічному розчині, що містить 10мМ LiCl. Сполуки інкубують у подвоєнні при 37°C протягом 15 хвилин, тоді додають глутамат (80мкМ) або DHPG (30мкМ) та інкубують протягом додаткових 30 хвилин. Реакцію зупиняють додаванням 0,5мл перхлоратної кислоти (5%) на льоді з інкубацією при 4°C протягом принаймні 30 хвилин. Зразки збирають у 15мл поліпропіленові туби та інозитол-фосфат відділяють, застосовуючи колонки з іонообмінною смолою (Dowex AG1-X8 форміат, 200-400меш, BIORAD). Розділення інозитол-фосфатів було проведено елюванням спершу гліцерофосфатидил-інозитулу 8мл 30мМ амоній форміату. Далі, загальні інозитол-фосфати елюють 8мл 700мМ амоній форміату /100мМ мурашиної кислоти та збирають у сцинтиляційні склянки. Цей елюат тоді змішують із 8мл сцинтилянту та уведення [³H]інозитулу визначають підрахунком сцинтиляції. Число імпульсів за хвилину від подвоєних зразків наносять на графік та IC₅₀ визначення роблять, застосовуючи програму підгонки методом найменших квадратів.

Скорочення

BSA Альбумін коров'ячої сироватки
CCD прилад із зарядовим зв'язком
CRC Крива концентрація-реакція
DHPG 3,5-дигідроксифенілгліцин
FLIPR планшетний зчитувач флуориметричного відображення

GLAST транспортер глутамату/аспартату

ГЕПЕС 4-(2-гідроксіетил)-1-
піперазинетансульфонова кислота (буфер)

IP₃ інозитол-трифосфат

Загалом, сполуки були активними у вищеведеному аналізі з величинами IK_{50} менше, ніж 10000нМ. Згідно з одним аспектом винаходу, величина IK_{50} є менше, ніж 1мкМ. У наступному аспекті винаходу, величина IK_{50} є менше, ніж 100нМ.

Скринінг активності сполуки проти TLESR

Застосовують дорослих мисливських собак лабрадорів обох статей, привчених знаходитися у пов'язці Павлова. Езофаготомію слизова-шкіра створюють та собакам надають змоги повністю відновитися перед тим, як проводять будь-які експерименти.

Вимірювання рухомості

Після голоднечі протягом приблизно 17 годин з вільним доступом до води, багатоканальний комплект рукав/отвір (Dentsleeve, Adelaide, South Australia) вводять через езофагостомію для вимірювання шлункового, нижчого стравохідного сфінктеру (LES) та стравохідного тиску. Комплект обприскують водою, застосовуючи низькоподатливий манометричний перфузійний насос (Dentsleeve, Adelaide, South Australia). Обприскану повітрям тубу вводять у пероральному напрямі для вимірювання ковтків, та сурм'яним електродом вимірюють рН, 3см вище LES. Усі сигнали підсилюють та зберігають на персональному комп'ютері при 10Гц.

При базовому вимірюванні без голоднечі отримано моторну активність шлункової/LES фази III, плацебо (0,9% NaCl) або тест-сполук застосовують внутрішньовенно 0,5мл/кг у вену передньої лапи. Десять хвилин внутрішньовенного застосування, харчувальну суміш (10% пептон, 5% D-глюкози, 5% Intralipid, pH 3,0) вводять у шлунок через центральний просвіт комплекту при 100мл/хвилин до кінцевого об'єму 30мл/кг. Інфузію харчувальної суміші супроводжують інфузією повітря при швидкості 500мл/хвил, доки не отримують внутрішньошлунковий тиск 10 ± 1 мм Hg. Тиск тоді тримають на цьому рівні протягом експерименту, застосовуючи інфузійний насос для наступної інфузії повітря або для відсосу повітря зі шлунку. Час експерименту від початку введення харчування до кінця вдудання повітря 45 хвилин. Операцію затверджено як достовірний засіб ініціювання TLESR.

TLESR визначають як зниження тиску нижчого стравохідного сфінктера (з посиленням на внутрішньошлунковий тиск) при швидкості менше 1мм Нд/с. Релаксації не повинен передувати глотковий сигнал менше 2с перед її початком, у цьому випадку релаксацію класифікують як індуковану ковтками. Різниця тисків між LES та шлунком не повинна бути менше, ніж 2мм Hg, та тривалість повної релаксації довше, ніж 1с.