



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 87146

(13) C2

(51) МПК (2009)

C07D 295/155 (2006.01)

A61K 31/495

A61P 25/04 (2006.01)

A61P 25/22 (2006.01)

A61P 25/24 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ПОХІДНІ ДІАРИЛМЕТИЛПІПЕРАЗИНУ, СПОСІБ ЇХ ОДЕРЖАННЯ ТА ФАРМАЦЕВТИЧНА КОМПОЗИЦІЯ НА ЇХ ОСНОВІ

1

2

(21) a200700154

(22) 27.07.2005

(24) 25.06.2009

(86) PCT/SE2005/001186, 27.07.2005

(31) 0401968-3

(32) 02.08.2004

(33) SE

(31) 60/602,363

(32) 18.08.2004

(33) US

(46) 25.06.2009, Бюл.№ 12, 2009 р.

(72) БРАУН ВІЛЬЯМ, СА, ГРІФФІН ЕНДРЮ, СА,  
ГУДЗІК ТОМАС, US, МАСЯГ' КАРЛА, US, СМАГІН  
ГЕННАДІЙ, US, ВОЛПОУЛ КРІСТОФЕР, СА

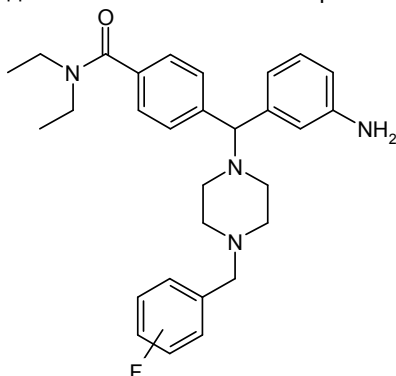
(73) АСТРАЗЕНЕКА АБ, SE

(56) WO 02094794 A1, 28.11.2002

WO 02094786 A1, 28.11.2002

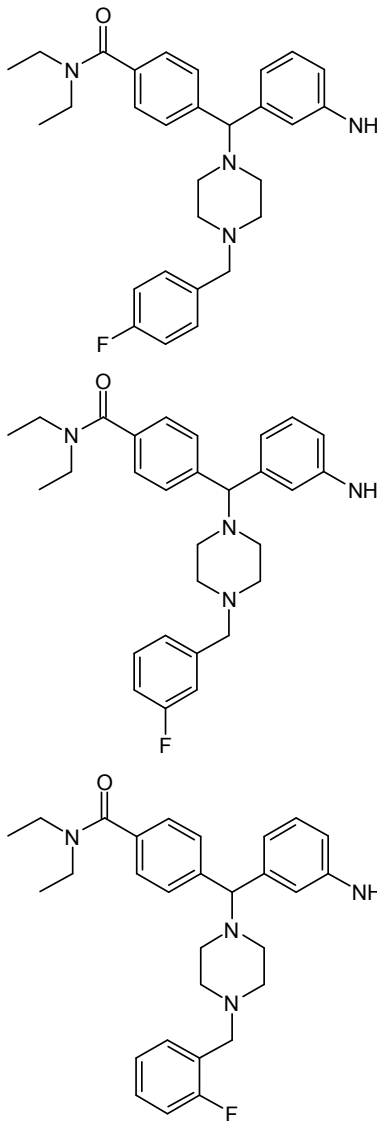
WO 03094853 A2, 20.11.2003

(57) 1. Сполука формули I, її фармацевтично прийнятні солі, сольвати, проліки, діастереомери, один або більше її енантіомерів і їх суміші:



(I)

2. Сполука за п. 1, яка відрізняється тим, що вибрана з:



(13) C2

(11) 87146

(19) UA

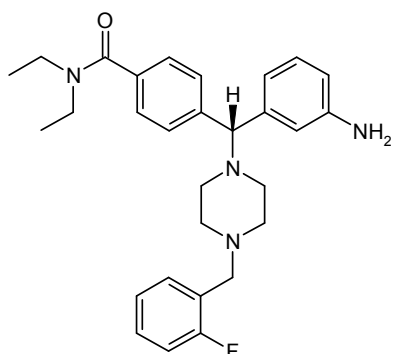
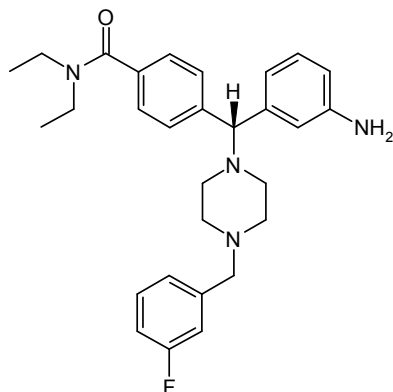
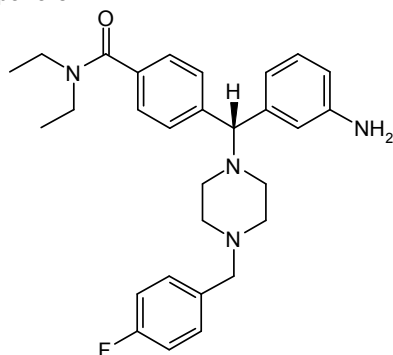
3

87146

4

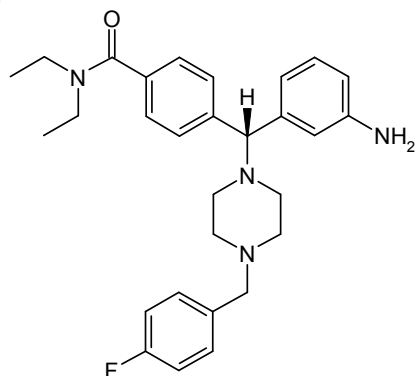
їх фармацевтично прийнятних солей, одного або більше ізолюваних енантіомерів і їх сумішей.

3. Сполука за п. 1, яка **відрізняється** тим, що вибрана з:



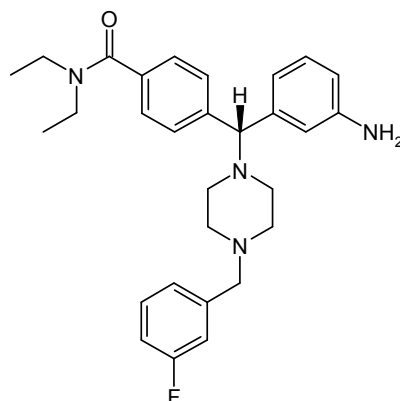
і її фармацевтично прийнятних солей.

4. Сполука за п. 1, яка **відрізняється** тим, що вибрана з:



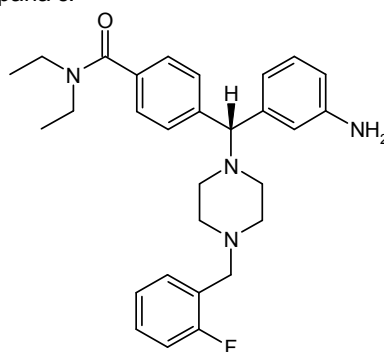
і її фармацевтично прийнятних солей.

5. Сполука за п. 1, яка **відрізняється** тим, що вибрана з:



і її фармацевтично прийнятних солей.

6. Сполука за п. 1, яка **відрізняється** тим, що вибрана з:



і її фармацевтично прийнятних солей.

7. Сполука за будь-яким з пп. 1-6, призначена для застосування як медикаменту.

8. Застосування сполуки за будь-яким з пп. 1-6 у виготовленні медикаменту для терапії болю, страхів або депресії.

9. Фармацевтична композиція, яка містить сполуку за будь-яким з пп. 1-6 і фармацевтично прийнятний носій.

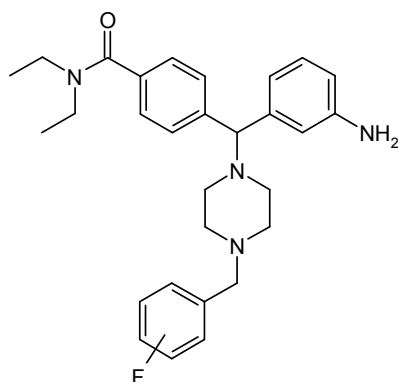
10. Спосіб втамування болю у теплокровної тварини, в якому вводять зазначеній тварині, що потребує такої терапії, терапевтично ефективну кількість сполуки за будь-яким з пп. 1-6.

11. Спосіб лікування тривоги у теплокровної тварини, в якому вводять зазначеній тварині, що потребує такої терапії, терапевтично ефективну кількість сполуки за будь-яким з пп. 1-6.

12. Спосіб лікування депресії у теплокровної тварини, в якому вводять зазначеній тварині, що потребує такої терапії, терапевтично ефективну кількість сполуки за будь-яким з пп. 1-6.

13. Спосіб лікування хвороби Паркінсона у теплокровної тварини, в якому вводять зазначеній тварині, що потребує такої терапії, терапевтично ефективну кількість сполуки за будь-яким з пп. 1-6.

14. Спосіб одержання сполуки формули I



(I)

в якому здійснюють:

- введення N,N-діетил-4-[(3-нітрофеніл)(1-піперазиніл)метил]бензаміду у реакцію з R-CH<sub>2</sub>X або R-CHO з отриманням проміжної сполуки;
  - відновлення зазначеної проміжної сполуки відповідним відновлювачем,
- де

R вибрана з 2-флуорфенілу, 3-флуорфенілу і 4-флуорфенілу; а

X вибрана з Cl, I, Br, -OTs (тозил) і -OMs (мезилат).

15. Спосіб за п. 14, який відрізняється тим, що зазначений відновлювач може бути вибраний з гідрогену, цинку і заліза.

16. Сполука, вибрана з енантімерно чистого 4-[(S)-(3-амінофеніл)[4-(4-флуорбензил)піперазин-1-іл]метил]-N,N-діетилбензаміду,

енантімерно чистого 4-[(R)-(3-амінофеніл)[4-(4-флуорбензил)піперазин-1-іл]метил]-N,N-діетилбензаміду,

енантімерно чистого 4-[(R)-(3-амінофеніл)[4-[(2-флуорфеніл)метил]-1-піперазиніл]метил]-N,N-діетилбензаміду,

енантімерно чистого 4-[(R)-(3-амінофеніл)[4-[(3-флуорфеніл)метил]-1-піперазиніл]метил]-N,N-діетилбензаміду

і їх фармацевтично прийнятних солей.

Ця заявка пов'язана з попередньою заявкою США 60/602 363 від 18/08/2004, включеною посиланням і має пріоритет згідно з 35 U.S.C., § 119(a)-(d), для шведської заявки No. 0401968-3 від 2/08/2004.

Винахід стосується нових сполук, способу їх приготування, їх застосування і фармацевтичних композицій, що містять ці сполуки, а також їх використання у терапії, зокрема, для лікування болю, страхів і функціональних шлунково-кишкових розладів.

Було встановлено, що дельта("δ")-рецептор грає роль у багатьох тілесних функціях, наприклад, систем кровообігу і больових систем. Тому ліганди для δ-рецептора можуть знайти потенційне застосування як анагетиків і/або антигіпертонічні агенти. Було показано, що ліганди для δ-рецептора виявляють імуномодуляторну активність.

На сьогоднішній день ідентифіковано щонайменше три різні популяції опіоїдних рецепторів (μ, δ і κ), і всі три були знайдені у центральній і периферійній нервових системах багатьох видів, включаючи людину. У багатьох тваринних моделях спостерігали анагезію при активуванні одного або більше цих рецепторів.

За небагатьма винятками, наявні селективні опіоїдні δ-ліганди є пептидними за природою і є непридатними для введення пацієнту системними шляхами. Одним з прикладів не-пептидного δ-агоніста є SNC80 [Bilsky E.J. et al., *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 273(1), pp. 359-366 (1995)].

Були ідентифіковані численні δ-агоністичні сполуки, але вони мають багато вад, зокрема, погану фармакокінетику і не діють як анагетика при введенні системними шляхами. Крім того, було підтверджено, що багатьом з цих δ-агоністичних

сполук властива значна конвульсивна дія при системному введенні.

Деякі δ-агоністи були описані у публікації PCT WO02/094794.

Проте існує потреба у поліпшених δ-агоністах.

Ми несподівано виявили, що деякі сполуки мають одну або більше поліпшених якостей, тобто поліпшені δ-агоністичну активність, активність *in vivo*, фармакокінетику, біозасвоюваність, стабільність *in vitro* і *in vivo*, здатність проникати у мозок і/або нижчу токсичність.

Якщо не визначено інше, номенклатура у цьому описі взагалі відповідає прикладам і вимогам документа *Nomenclature of Organic Chemistry*, Sections A, B, C, D, E, F, H, Pergamon Press, Oxford, 1979, включеному у цей опис посиланням стосовно правил для типових назв хімічних структур; як варіант, назва сполуки може бути утворена з використанням програми хімічних найменувань ACD/ChemSketch, Version 5.09/September 2001, Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, Canada.

"Енантімерно чистий" стосується сполуки, яка містить щонайменше 75% даного енантіомеру від повної кількості двох можливих енантіомерів. Зокрема, "енантімерно чистий" стосується сполуки, яка містить щонайменше 90% даного енантіомеру від повної кількості двох можливих енантіомерів. У деяких втіленнях, "енантімерно чистий" стосується сполуки, яка містить щонайменше 96% даного енантіомеру від повної кількості двох можливих енантіомерів.

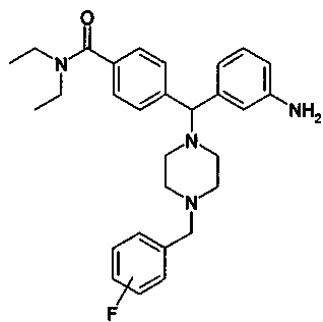
"Теплокровні тварини" включають людину.

Згідно з одним з аспектів, винахід стосується сполук формули I, їх фармацевтично прийнятних солей, сольватів, проліків, діастереомерів, одного або більше енантіомерів і їх сумішей:

7

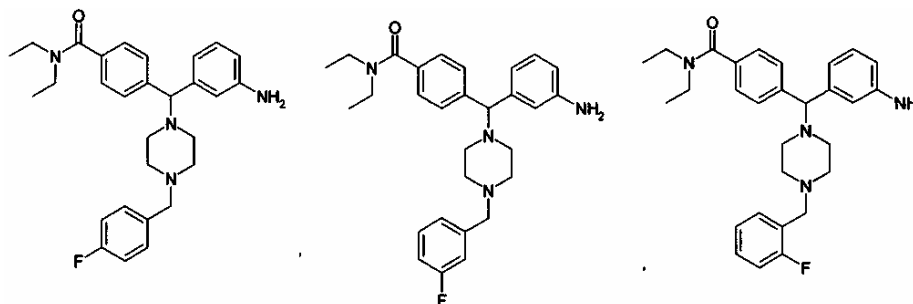
87146

8

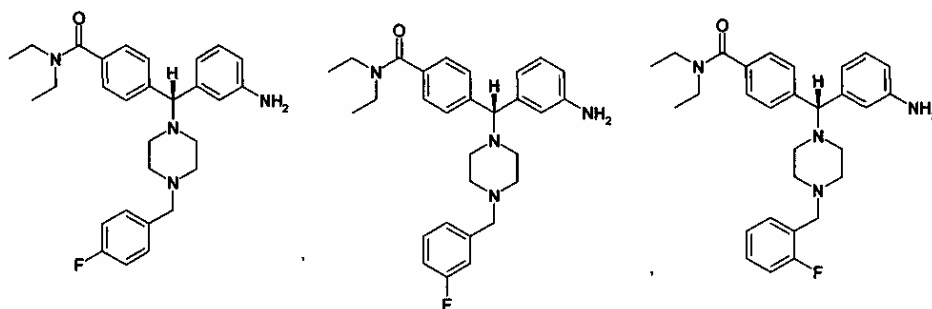


I

В одному з втілень сполука винаходу може бути вибрана з:

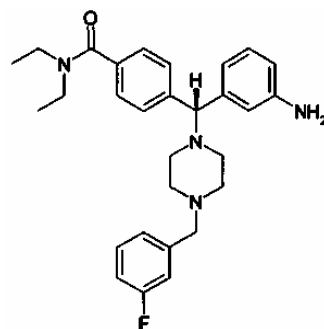
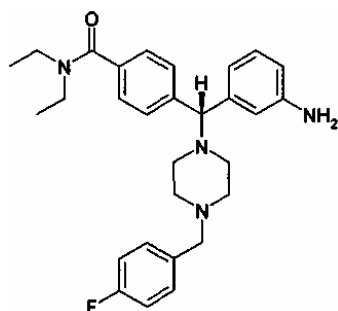


їх фармацевтично прийнятних солей, одного або більше ізольованих енантіомерів і їх сумішей. В іншому втіленні сполука винаходу може бути вибрана з:



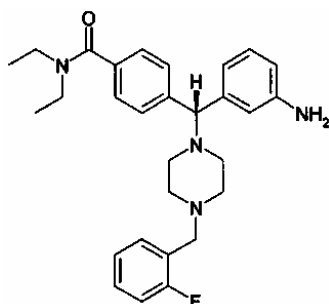
і їх фармацевтично прийнятних солей.

У ще одному втіленні сполука винаходу може бути вибрана з:



і її фармацевтично прийнятних солей. В іншому втіленні сполука винаходу може бути вибрана з:

і її фармацевтично прийнятних солей. У подальшому втіленні сполука винаходу може бути вибрана з:



і її фармацевтично прийнятних солей.

В іншому втіленні сполука винаходу може бути вибрана з групи, яку складають 4-(S)-(3-амінофеніл)[4-(4-флуорбензил)піперазин-1-іл]метил-N,N-діетилбензамід; 4-((R)-(3-амінофеніл)[4-(4-флуорбензил)піперазин-1-іл]метил)-N,N-діетилбензамід; 4-((R)-(3-амінофеніл)[4-((2-флуорфеніл)метил)-1-піперазиніл]метил)-N,N-діетилбензамід; 4-((R)-(3-амінофеніл)[4-((3-флуорфеніл)метил)-1-піперазиніл]метил)-N,N-діетилбензамід і їх фармацевтично прийнятні солі.

У ще одному втіленні сполук винаходу може бути вибрана з групи, яку складають енантіомерно чистий 4-((S)-(3-амінофеніл)[4-(4-флуорбензил)піперазин-1-іл]метил)-N,N-діетилбензамід; енантіомерно чистий 4-((R)-(3-амінофеніл)[4-(4-флуорбензил)піперазин-1-іл]метил)-N,N-діетилбензамід; енантіомерно чистий 4-((R)-(3-амінофеніл)[4-((2-флуорфеніл)метил)-1-піперазиніл]метил)-N,N-діетилбензамід; енантіомерно чистий 4-((R)-(3-амінофеніл)[4-((3-флуорфеніл)метил)-1-піперазиніл]метил)-N,N-діетилбензамід і їх фармацевтично прийнятні солі.

Зрозуміло, що, коли сполуки винаходу мають один або більше хіральних центрів, ці сполуки можуть існувати і бути ізольовані як енантіомерні або діастереомерні форми або як рацемічні суміші. Винахід включає будь-який можливий енантіомер, діастереомери, рацемати або їх суміші від сполук формули I. Оптично активні форми сполуки винаходу можуть бути приготовлені, наприклад, хоральним хроматографічним розділенням рацемату, синтезом з оптично активних вихідних матеріалів або асиметричним синтезом, базованим на описаних далі процедурах.

Зрозуміло також, що деякі сполуки винаходу можуть існувати у сольватованій, наприклад, гідратованій, а також несольватованій формах. Винахід включає всі такі сольватовані форми сполуки формули I.

В об'єм винаходу входять також солі сполуки формули I. Взагалі фармацевтично прийнятні солі сполук винаходу можуть бути отримані з застосуванням стандартних процедур, наприклад, реакцією достатньо основної сполуки, наприклад, алкіл аміну, з придатною для цього кислотою, наприклад, HCl або оцтовою, отримуючи фізіологічно прийнятний аніон. Можна також отримати сіль відповідного лужного металу (наприклад, натрію, калію або літію) або лужно-земельного металу (наприклад, кальцію) обробкою сполуки винаходу, що має відповідний кислотний протон, наприклад,

карбонової кислоти або фенолу, одним еквівалентом гідроксиду або алкоксиду лужного або лужно-земельного металу (наприклад, етоксиду або метоксиду), або належним основним органічним аміном (наприклад, холіном або меглуміном) у водному середовищі, з подальшим звичайним очищенням.

В одному з втілень сполука формули I може бути перетворена у її фармацевтично прийнятну сіль або сольват, зокрема, у кислото-адитивну сіль, наприклад, гідрохлорид, гідробромід, фосфат, ацетат, fumarat, maleat, тритрат, цитрат, метансульфонат або p-толуолсульфонат.

Нові сполуки винаходу можуть бути використані у терапії, зокрема, для лікування різних болювих станів, наприклад, хронічного болю, нейропатичного болю, гострого болю, ракового болю, болю, викликаного ревматоїдним артритом, мігренню, вісцерального болю тощо. Цей перелік не є вичерпним.

Сполуки винаходу можуть бути використані для лікування діареї, депресії, страхів і/або стресових розладів, наприклад, посттравматичного стресу, панічного розладу, загально тривожного розладу, соціальної фобії і obsesивно-компульсивного розладу, нетримання сечі, передчасної еякуляції, різних ментальних захворювань, кашлю, легеневого набряку, різних шлунково-кишкових розладів, наприклад, констипації, функціональних шлунково-кишкових розладів, наприклад, синдрому подразнення кишечника і функціональної диспепсії, хвороби Паркінсона і інших моторних розладів, травматичних пошкоджень мозку, інсульту, для кардіозахисту після інфаркту міокарду, травм спини і залежностей, включаючи залежності від спирту, нікотину, опію, і інших зловживань і розладів симпатичної нервової системи, наприклад, гіпертонії.

Сполуки винаходу можуть бути використані як імунomodulators, зокрема, для аутоімунних хвороб, наприклад, артриту, для трансплантації шкіри і органів і для подібних хірургічних потреб, для хвороб колагену, різних алергій, для використання як антипухлинних і антивірусних агентів.

Сполуки винаходу можуть бути використані при хворобливих станах, в яких має місце дегенерація або дисфункція опіюїдних рецепторів або в яких існує зв'язок з цими явищами. Це може потребувати використання ізотопічно мічених версій сполук винаходу у діагностиці і при застосуванні зображень, наприклад, у позитронно-емісійній томографії.

Сполуки винаходу можуть бути використані як анагетика при застосуванні загальної анестезії і нагляді під анестезією. Для отримання балансу результатів, необхідних для підтримання анестетичного стану (наприклад, амнезії, анагезії, м'язової релаксації і заспокоєння) часто використовують комбінації агентів з різними властивостями. Такі комбінації включають інгаляційні анагетика, гіпнотика, транквілізатори, нейром'язові блокери і опіюїди.

В об'єм винаходу входить застосування будь-якої сполуки формули I для виготовлення медикаменту.

Крім того, в об'єм винаходу входить застосування будь-якої сполуки винаходу для виготовлення медикаменту, призначеного для терапії болю, включаючи, але без обмеження, гострий біль, хронічний біль, невропатичний біль, біль у спині, раковий біль і вісцеральний біль.

Також в об'єм винаходу входить застосування сполуки винаходу для виготовлення медикаменту, призначеного для терапії страхів, включаючи, але без обмеження, соціальну фобію, загальний тривожний розлад, гостру тривожність.

Крім того, в об'єм винаходу входить застосування будь-якої сполуки винаходу для виготовлення медикаменту, призначеного для терапії депресії.

Також в об'єм винаходу входить застосування будь-якої сполуки винаходу для виготовлення медикаменту, призначеного для терапії хвороби Паркінсона.

Крім того, в об'єм винаходу входить застосування будь-якої сполуки винаходу для виготовлення медикаменту, призначеного для лікування будь-якого з розглянутих вище станів.

Одним з аспектів винаходу є спосіб лікування суб'єкту, що страждає від будь-якого з зазначених вище станів, згідно з яким ефективну кількість сполуки винаходу вводять пацієнту, що потребує такого лікування.

Отже, винахід включає сполуку формули I або її фармацевтично прийнятну сіль або сольват, визначені вище, для використання у терапії.

Тут термін "терапія" включає "профілактику", якщо спеціально не зазначено інше. Термін "терапевтичний" і "терапевтично" слід інтерпретувати відповідно. Термін "терапія" включає введення пацієнту ефективної кількості сполуки винаходу для полегшення вже існуючого хворобливого стану, гострого або хронічного, або рекурентного стану. Це визначення також включає профілактичні терапії для відвернення рекурентних станів і подовження терапії для хронічних розладів.

При використанні для терапії у теплокровних тварин, наприклад, людини, сполуку винаходу можна вводити у формі звичайної фармацевтичної композиції будь-яким шляхом, включаючи пероральне, внутрішньом'язове, підшкірне, локальне, внутрішньоносове, внутрішньочеревне, інтраторакальне, внутрішньовенне, епідуральне, інтратекальне, інтрацеребровентрикулярне введення і введення ін'єкцією у суглоби.

В одному з втілень винаходу шлях введення пацієнту може бути пероральним, внутрішньовенним або внутрішньом'язовим.

Дози залежать від способу введення пацієнту, важкості хвороби, віку і ваги пацієнта і інших факторів, які звичайно бере до уваги лікар, коли визначає режим лікування і дози для конкретного пацієнта.

Отже, винахід включає фармацевтичну композицію, що містить сполуку винаходу, її сольвати або її фармацевтично прийнятну сіль, разом з фармацевтично прийнятним носієм.

Зокрема, винахід включає фармацевтичну композицію, що містить сполуку винаходу, її сольвати або її фармацевтично прийнятну сіль, разом

з фармацевтично прийнятним носієм, для використання у терапії болю і страхів.

Крім того, винахід включає фармацевтичну композицію, що містить сполуку винаходу, її сольвати або її фармацевтично прийнятну сіль, разом з фармацевтично прийнятним носієм для використання при будь-яких описаних вище станах.

Для приготування фармацевтичної композиції з сполуками винаходу можуть бути використані тверді або рідкі фармацевтично прийнятні носії. Тверді препарати включають порошки, таблетки, дисперсні гранули, капсули, каше і супозиторії.

Твердими носіями можуть бути одна або більше речовин, які можуть бути також розріджувачами, смаковими агентами, сольобілізаторами, змашувачами, суспендує ми або зв'язуючими агентами або дезінтеграторами таблетки; вони можуть бути також інкапсуляторами.

У порошках носій є подрібненою твердою речовиною у суміші з подрібненою сполукою винаходу або активним компонентом. У таблетках активний компонент змішаний з носієм, який має необхідні зв'язувальні якості, у потрібній пропорції і сформований у бажані форму і розмір.

Для приготування супозиторної композиції розплавляють легкоплавкий віск, наприклад, суміш гліцеридів жирних кислот і масла какао і диспергують активний інгредієнт з перемішуванням. Розплавлену гомогенну суміш вливають у форми бажаного розміру і залишають для отвердіння.

Придатними носіями є карбонат магнію, стеарат магнію, тальк, лактоза, цукор, пектин, декстрин, крохмаль, трагакант, метилцелюлоза, натрій-карбоксиметилцелюлоза, легкоплавкий віск, масло какао тощо.

Термін "композиція" також включає рецептури активного компонента з інкапсулюючим матеріалом як носієм з утворенням капсул, в яких активний компонент (з іншими носіями або без них) замкнений у носії. Подібні операції проводять з каше.

Таблетки, порошки, каше і капсули можна використовувати як тверді дозовані форми для перорального введення пацієнту.

Рідкі композиції включають розчини, суспензії і емульсії. Прикладом можуть бути водні або водно-пропіленгліколеві розчини активних сполук для парентерального введення пацієнту. Рідкими композиціями також можуть бути водні розчини рецептури у водному поліетиленгліколевому розчині.

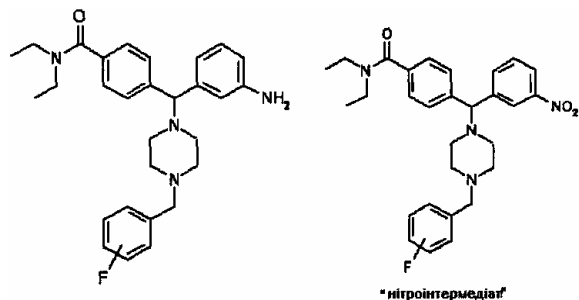
Водні розчини для перорального введення можуть бути приготовлені розчиненням активного компонента у воді з додаванням за бажанням додатних для цього забарвлювачів, смакових агентів, стабілізаторів і загущувачів. Водні суспензії для перорального застосування можуть бути приготовлені диспергування тонко подрібненого активного компонента у воді разом з в'язким матеріалом, наприклад, природною або синтетичною кумою, смолою, метилцелюлозою, натрій-карбоксиметилцелюлозою і іншими відомими у галузі суспендує ми агентами.

Залежно від способу введення пацієнту фармацевтична композиція, бажано, містить від 0,05% до 99%, більше бажано, від 0,10 до 50% (за масою), сполуки винаходу від повного складу композиції.

Терапевтично ефективна кількість сполуки винаходу може бути визначена фахівцем згідно з відомими критеріями, включаючи вік, вагу і реакцію конкретного пацієнта, і згідно з протіканням хвороби, що підлягає лікуванню або відверненню.

Згідно з ще одним аспектом, винахід включає спосіб приготування сполук винаходу.

В одному з втілень винахід включає процес приготування сполуки формули I, який включає:



- введення N,N-діетил-4-[(3-нітрофеніл)(1-піперазиніл)метил]бензаміду у реакцію з R-CH<sub>2</sub>X або R-CHO з утворенням проміжної нітросполуки;
  - відновлення зазначеної проміжної сполуки придатним відновлювачем,
- де

R вибрана з 2-флуорфенілу, 3-флуорфенілу і 4-флуорфенілу; і

X вибрана з Cl, I, Br, -OTs (тозил) і -OMs (мезитат).

В одному з втілень зазначений відновлювач може бути вибраний з гідрогену, цинку і заліза.

В іншому втіленні зазначений N,N-діетил-4-[(3-нітрофеніл)(1-піперазиніл)метил]бензамід може бути вибраний з N,N-діетил-4-[(S)-(3-нітрофеніл)(1-піперазиніл)метил]бензаміду і N,N-діетил-4-[(R)-(3-нітрофеніл)(1-піперазиніл)метил]бензаміду.

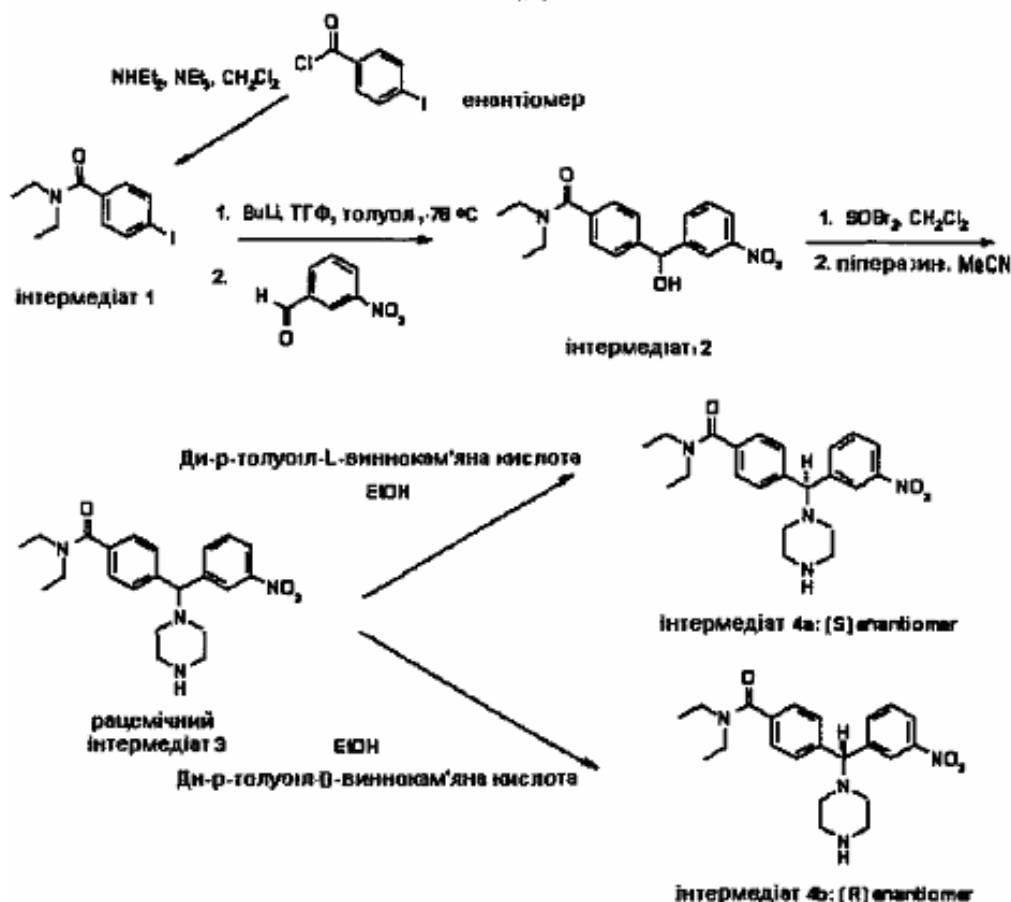
У ще одному втіленні, R може бути 2-флуорфенілом, а сполука формули I може бути 4-[(3-амінофеніл)[4-[(2-флуорфеніл)метил]-1-піперазиніл]метил]-N,N-діетилбензамідом.

В іншому втіленні R може бути 3-флуорфенілом, а сполука формули I може бути 4-[(3-амінофеніл)[4-[(3-флуорфеніл)метил]-1-піперазиніл]метил]-N,N-діетилбензамідом.

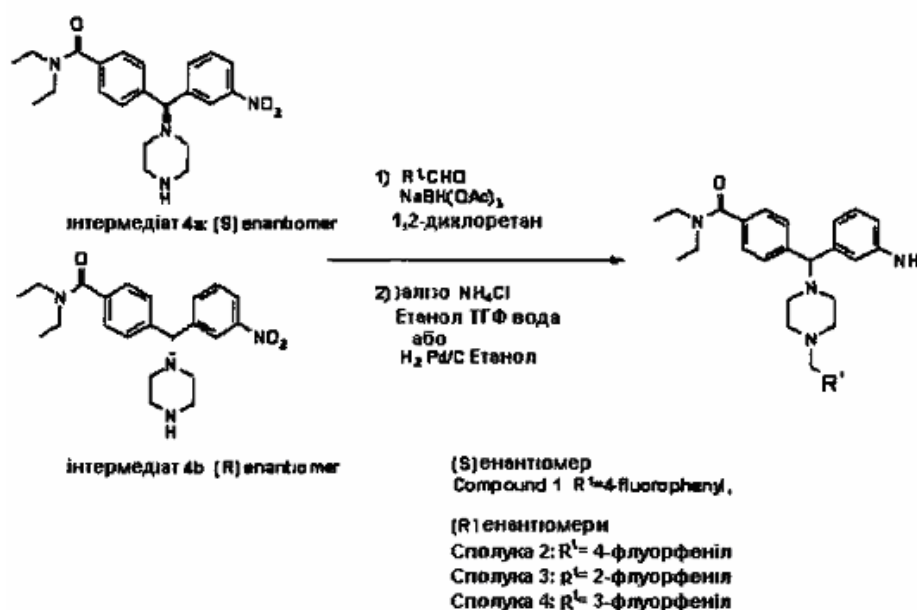
У подальшому втіленні R може бути 4-флуорфенілом, а сполука формули I може бути 4-[(3-амінофеніл)[4-[(4-флуорфеніл)метил]-1-піперазиніл]метил]-N,N-діетилбензамідом.

Зокрема, сполуки винаходу і інтермедіати, що використовуються для їх приготування, можна приготувати за процедурою синтезу, визначеною Схемами 1 і 2.

Схема 1



## Схема 2



## Біологічне оцінювання і властивості

Була виявлена активність сполук винаходу до  $\delta$ -рецепторів у теплокровних тварин, включаючи людину. Зокрема, було виявлено, що сполуки винаходу є ефективними лігандами  $\delta$ -рецептора. Аналізи *in vitro*, *infra*, підтвердили цю активність, особливо ефективність і потужність агоністів, показану в аналізі функцій мозку щура і/або функціональним аналізом  $\delta$ -рецептора людини (низька). Це може бути віднесено до активності *in vivo* і може не бути лінійно корельовано з зв'язувальною спорідненістю. У цих аналізах *in vitro* сполуку випробували на активність до  $\delta$ -рецепторів і визначали  $\text{IC}_{50}$  для оцінювання селективної активності певної сполуки до  $\delta$ -рецепторів. У даному випадку  $\text{IC}_{50}$  є концентрацією сполуки, при якій спостерігається 50%-е видалення ліганду радіоактивного  $\delta$ -рецептора. У подібних аналізах були виміряні активності сполук до  $\kappa$ - і  $\mu$ -рецепторів.

Моделі *in vitro*

## Клітинна культура

Клітини 293S людини, що експресують клоновані людські  $\kappa$ -,  $\delta$ - і  $\mu$ -рецептори і стійкі до неомицину у вирощуванні у суспензії при 37°C і 5%  $\text{CO}_2$  у шейкерних колбах з вільним від кальцію DMEM10% FBS, 5% BCS, 0,1% Pluronic F-68 і 600мг/мл генетицину.

Мозки щура були зважені і промиті льодяним PBS (з 2,5мМ EDTA, pH 7,4). Мозки гомогенізували полі треном протягом 30сек. (щур) у льодяному лізисному буфері (50мМ Tris, pH 7,0, 2,5мМ EDTA, з фенілметилсульфонілфлуоридом (PMSF), доданим перед використанням, до 0,5мМ з 0,5М материнського запасу у ДМСО/етанолі).

## Приготування мембрани

Клітини гранулювали і ресуспендували у лізисному буфері (50мМ Tris, pH 7,0, 2,5мМ EDTA, з PMSF, доданим перед використанням, до 0,1мМ з 0,1М материнського запасу в етанолі), інкубували на льоду протягом 15хвил., потім гомогенізували полі треном протягом 30сек. Суспензію

центрифугували при 1000g (max) 10хвил. при 4°C. Надосадову рідину зберігали на льоду і гранули ресуспендували, як раніше. Надосадові рідини з обох центрифугувань об'єднували центрифугували при 46000g (max) 30хвил. Гранули ресуспендували у холодному Tris-буфері (50мМ Tris/Cl, pH 7,0) і центрифугували. Отримані гранули ресуспендували у мембранному буфері (50мМ Tris, 0,32М сахароза, pH 7,0). Аліквоти (1мл) у поліпропіленових пробірках заморожували у сухому льоді/етанолі і зберігали при -70°C до подальшого використання. Концентрації протеїну визначали модифікованим аналізом Лоурі (Lowry) з додецилсульфатом натрію.

## Аналізи на зв'язування

Мембрани розморожували при 37°C і зберігали на льоду, пропускали тричі через 25-каліброву голку і розбавляли зв'язувальним буфером (50мМ Tris, 3мМ  $\text{MgCl}_2$ , 1мг/мл BSA (Sigma A-7888), pH 7,4), зберігали при 4°C після фільтрування через фільтр 0,22м і додавали свіжим 5мг/мл апротоніну, 10мкМ бестатину, 10мкМ дипротину А, якщо мембрани були отримані з тканин (щура, миші, мавпи, без DTT). Аліквоти по 100мкл додавали до охолоджених льодом поліпропіленових пробірок 12x75мм з 100мкл відповідного радіоліганду і 100мк випробуваної сполуки при різних концентраціях. Повне (TB) і неспецифічне (NS) зв'язування визначали у присутності і відсутності 10мкМ налоксону. Пробірки струшували і інкубували при 25°C протягом 60-75хвил., після чого швидко вакуум-фільтрували і промивали приблизно 12мл/пробірка промивним буфером (50мМ Tris, pH 7,0, 3мМ  $\text{MgCl}_2$ ) через фільтри GF/B (Whatman), просочуючи протягом щонайменше 2год. у 0,1%-му поліетиленаїміні. Радіоактивність (dpm) на фільтрах виміряли бета-лічильником після просочування фільтрів протягом щонайменше 12год. у мініколбах з 6-7мл сцинтиляційної рідини. Аналіз проводили у 96-коміркових глибоких планшетах з фільтруванням через 96-коміркові уніфільтри, про-



сочені PEI, які промивали тричі 1мл промивного буфера і сушили у печі при 55°C 2год. Відлік на фільтрі проводили лічильником TopCount (Packard) після додання 50мкл сцинтиляційної рідини MS-20 на комірку.  $IC_{50}$  сполук оцінювали на 10-точкових кривих видалення для  $\delta$  і 5-точкових кривих для  $\mu$  і  $\kappa$ . Аналіз проводили в об'ємі 300мкл з належною кількістю протеїну мембрани (2мкг, 35мкг і 1мкг для  $\delta$ ,  $\mu$  і  $\kappa$ , відповідно) і 50000-80000 dpm/комірка належного індикатора (125I-Deltorphin II, 125I-FK33824 і 125I-DPDYN для  $\delta$ ,  $\mu$  і  $\kappa$ , відповідно). Повне і неспецифічне зв'язування визначали у присутності і відсутності 10мкМ налоксону.

#### Функціональні аналізи

Агоністичну активність сполук вимірюють, визначаючи рівень, з яким рецепторний комплекс сполук зв'язує GTP з G-апрієїнами, до яких приєднані рецептори. В аналізі на зв'язування GTP,  $GTP[\gamma]^{35}S$  з'єднували з випробуваними сполуками і мембранами з клітин HEK-293S, що експресують клоновані опіоїдні рецептори людини або з гомогенізованого мозку щура або миші. Агоністи стимулюють зв'язування  $GTP[\gamma]^{35}S$  у цих мембранах. Значення  $E_{K50}$  і  $E_{max}$  сполук визначали з кривих залежності від дози. Зсувом праворуч цих кривих  $\delta$ -антагоністом налтриндолом перевіряли, чи опосередковується агоністична активність  $\delta$ -рецепторами. У функціональному аналізі  $\delta$ -рецептора людини,  $E_{K50}$  (низьку) виміряли, коли ці  $\delta$ -рецептора людини експресувались на низьких рівнях порівняно експресуванням при високих  $E_{K50}$ . Значення  $E_{max}$  визначали відносно стандартного  $\delta$ -агоніста SNC80, тобто більше 100% є сполуками з вищою ефективністю, ніж SNC80.

Процедура для GTP мозку щура

Мембрани мозку щура розморожували при 37°C, пропускали тричі через голку калібру 25 з тупим кінцем і розбавляли зв'язувальним  $GTP\gamma S$  (50мМ Hepes, 20мМ NaOH, 100мМ NaCl, 1мМ EDTA, 5мМ  $MgCl_2$ , pH 7,4, з доданням свіжих: 1мМ DTT, 0,1% BSA). Мембрани розбавляли доданням 120мкМ GDP.  $E_{K50}$  і  $E_{max}$  сполук оцінювали з 10-точкових кривих залежності від дози в об'ємі 300мкл з належною кількістю протеїну мембрани (20мкг/комірка) і 100000-130000dpm  $GTP\gamma^{35}S$  на комірку (0,11-0,14нМ). Базове і максимально стимульоване зв'язування визначали у присутності і відсутності 3мкМ SNC80. Аналіз проводили на клітинах HEK 293S, що стабільно експресували клоновані  $\delta$ -рецептори у трохи різних буферах (50мМ Hepes, 20мМ NaOH, 200мМ NaCl, 1мМ EDTA, 5мМ  $MgCl_2$ , pH 7,4, з доданням свіжих: 0,5% BSA, без DTT) і з GDP з кінцевою концентрацією 3мкМ.

#### Аналіз даних

Специфічне зв'язування обчислювали як TV-NS, і у присутності різних випробуваних сполук репрезентували як % від контрольного специфічного зв'язування. Значення  $IC_{50}$  і коефіцієнт Гілла (Hill) ( $n_H$ ) для лігандів у видаленні специфічно зв'язаних лігандів обчислювали з логарифмічної кривою або програмою, наприклад, Ligand GraphPad Prism, SigmaPlot або ReceptorFit. Значення  $K_i$  обчислювали з рівняння Чена-Пруссоффа. Середнє±стандартне відхилення для  $IC_{50}$ ,  $K_i$  і  $n_H$  були визначені для лігандів з щонайменше трьох кривих видалення.

Таблиця містить біологічні дані деяких сполук винаходу, досліджених описаними аналізами.

Таблиця

Структура	$IC_{50}nd$	$IC_{50}nk$	$IC_{50}hm$	$E_{K50}h$ (нмоль)	$E_{K50}h$ (нмоль) $E_{max}$	$E_{K50}h$ (нмоль) $E_{max}$	$E_{K50}h$ (нмоль) $E_{max}$	$E_{K50}hb$	$E_{K50}hb$ $E_{max}$
	0,587	5524	715	20,63	95,3	4,18	103,8	22,82	130,3
	8,80	>10000	3316	-	-	100,3	89,09	465,9	66,32
	0,717	7258	2262	48,10	89,96	-	-	-	-
	1,08	5787	2736	77,42	84,44	-	-	-	-

Експерименти з насиченням рецептора

Значення  $K_d$  радіолігандів визначають аналізом на зв'язування на клітинних мембранах з відповідними радіолігандими при концентраціях  $(0,2-5)K_d$  (до 10 при наявності достатньої кількості лігандів). Специфічне зв'язування радіоліганду репрезентують як пкмоль/мг протеїну мембрани. Значення  $K_d$  і  $B_{max}$  з окремих експериментів були отримані нелінійним співставленням специфічно зв'язаних (B) з нМ вільних радіолігандів (F) згідно з односторонньою моделлю.

Визначення механо-алодинії тестом Фон Фрея (Фон Фрей)

Тестування проводили між 08:00 і 16:00 год. методом, описаним у [Chaplan et al. (1994)]. Щурів розміщували у плексигласових клітках з сітчастою підлогою, яка дозволяє доступ до лап, і залишали звикати на 10-15 хвил. Зоною тесту була середня частина підошви задньої лапи, з униканням чутливих подушечок лапи. До лапи торкались декількома з серії 8 волосків фон Фрея, які мають жорсткість, що зростає логарифмічно (0,41, 0,69, 1,20, 2,04, 3,63, 5,50, 8,51, і 15,14г; Stoelting, III, USA). Волосок фон Фрея притискають кінчиком знизу через сітку перпендикулярно до підошви лапи з силою, достатньою для легкого згинання волоска, протягом приблизно 6-8 хвил. Позитивною реакцією вважається різке відсмикування лапи. Відсмикування негайно після прибирання волоска також вважається позитивною реакцією. Переміщення вважається невизначеною реакцією, і у таких випадках стимулювання повторюють.

Протокол тесту

\*\*\*Тварин тестували через день після операції для груп, що отримали FCA. 50%-й поріг відсмикування визначали методом "вище-нижче" Диксона (Dixon, 1980). Тест починали з волоска жорсткістю 2,04г і стимулювання проводили згідно з послідовністю, зростаючою або убутковою. Якщо реакції відсмикування не було, застосовували більш сильний стимул, якщо реакція була застосовували слабший. Обчислення порогу цим методом потребує 6 реакцій поблизу 50%-го порогу, і відлік цих 6 реакцій починали з появи першої зміни реакції, наприклад, при перетинання першого порогу. У випадках потрапляння порогу за межі стимулів, призначаються значення 15,14 (нормальна чутливість) або 0,41 (максимальна алодинія), відповідно. Отриману сукупність позитивних і негативних реакцій табулювали, позначаючи: X - відсутність відсмикування; O - відсмикування, і 50%-й поріг відсмикування визначали інтерполяцією за формулою

$$50\text{-й поріг } (r) = 10^{(Xf + k\delta)} / 10000,$$

де Xf - значення жорсткості останнього волоска фон Фрея (у логарифмічних одиницях); k - табличне значення [з Chaplan et al. (1994)] для сукупності позитивних/негативних реакцій;  $\delta$  - середня різниця між стимулами (у логарифмічних одиницях). Тут  $\delta = 0,224$ .

Поріг фон Фрей перераховують у % від максимального можливого ефекту (% MPE) згідно з [Chaplan et al., 1994], за формулою

% MPE = (поріг (r) при введенні ліків - поріг (r) алодинії  $\times 100$ ) / контрольний поріг (r) - поріг (r) алодинії.

Введення пацієнту випробуваної сполуки

Щури отримували (ін'єкцією підшкірно, внутрішньочеревно або внутрішньовенно, або перорально) випробувану сполуку перед тестом фон Фрея з інтервалом між цими діями, залежним від випробуваної сполуки.

Тест на контракцію

Внутрішньочеревне введення оцтової кислоти викликає абдомінальні контракції у мишей, тіла яких при цьому зазнають характерного розтягання. Якщо введення аналгетика знижує частоту таких проявів, він вважається перспективним.

Повний і типовий контракційний рефлекс реєструють, коли: тварина не рухається, нижня частина спини трохи опускається, спостерігається підшвиднений аспект обох лап. Згідно з цим аналізом, сполуки винаходу показали значне зниження контракційної реакції після перорального введення 1-100 мкмоль/кг.

(i) Приготування розчинів

Оцтова кислота (AcOH): 120 мкл оцтової кислоти додають до 19,88 мл дистильованої води для отримання 20 мл з кінцевою концентрацією 0,6% AcOH, після чого розчин перемішують і готують для ін'єкції.

Сполука (ліки): кожну сполуку приготують і розчиняють у найпридатнішому носі за стандартними процедурами.

(ii) Введення розчину пацієнту

Сполуку (ліки) вводять перорально, внутрішньочеревно, підшкірно або внутрішньовенно дозою 10 мл/кг (відповідно до середньої ваги миші) за 20, 30 або 40 хвил. (залежно від класу сполуки і її характеристик) перед тестом. Коли сполуку вводять центрально: інтравентрикулярно або інтратекально, доза становить 5 мкл.

AcOH вводять внутрішньочеревно у двох місцях дозою 10 мл/кг (відповідно до середньої ваги миші) безпосередньо перед тестом.

(iii) Тест

Тварину (мишу) спостерігають протягом 20 хвил. і відзначають кількість контракційних реакцій до кінця експерименту. Мишей тримають в окремих клітках з контактною підлогою. Звичайно спостерігають 4 миші: одну контрольну і трьох, що отримали ліки.

Для ознак тривожності і подібних ознак ефективність визначали конкурентним тестом Геллера-Зайфтера (Geller-Seifter) для щурів.

Для ознак шлунково-кишкового розладу ефективність може бути визначена в аналізі, описаному [Coutinho SV et al, у American Journal of Physiology - Gastrointestinal & Liver Physiology. 282(2):G307-16, 2002 Feb], для щурів.

Додаткові протоколи тестів in vivo

Суб'єкти і утримання

Незаражені самці щура Sprague Dawley (175-200 г) утримувались у групах по 5 з контролем температури (22°C, вологість 40-70%, 12-годинна зміна світло/темрява). Експерименти проводили у світловій фазі циклу. Тварини отримували їжу і воду досхочу, і їх вбивали негайно після отримання даних.

Зразок

Тест сполуки (ліків) проводили на групах щурів, що не отримували ніяких ліків, і на групах, які отримували E. coli-ліпосахарид (LPS). Чотири групи отримували ін'єкцію LPS, однієї з чотирьох груп вводили носій, а іншим - ліки з носієм. Другий набір експериментів проводили на п'яти групах щурів; всі вони не отримували LPS. Незаражена група не приймала ніяких сполук (ліків) або носія; інші чотири групи отримували носій з ліками або без них. Ці експерименти проводили для визначення анксиолітичної або заспокоюючої дії ліків, тобто внеску у зниження USV.

#### Введення LPS пацієнту

Щурів витримували в експериментальній лабораторії 15-20хв. перед лікуванням. Запалення викликали введенням LPS (ендотоксин грам-негативного серотипу бактерії E. coli, 0111 :B4, Sigma). LPS (2,4мг) вводили ін'єкцією інтрацеребро-інтравентрикулярно в об'ємі 10мл, використовуючи стандартні стереотаксичні хірургічні процедури під ізофлурановою анестезією. Шкіру між вухами зсували роstralно і робили повздовжній надріз довжиною приблизно 1см для оголення поверхні черепа. Місце пункції визначали за координатами: 0,8мм за тем'ям, 1,5мм ліворуч до ламбди (сагітальний шов) і 5мм нижче поверхні черепа (вертикально) у бічному шлуночку. LPS вводили стерильною голкою з нержавіючої сталі (26-G 3/8) довжиною 5мм, приєднаною до шприца 100мл Гамільтона поліетиленовою трубкою (PE20; 10-15см). 4-міліметровий стопер, зроблений з відрізка голки (20-G), закріплювали силіконовим клеєм на голці 26-G для забезпечення бажаної глибини 5мм.

Після ін'єкції LPS голку залишали ще на 10сек. для забезпечення дифузії сполуки, потім видаляли, надріз закривали, щура повертали у його клітку давали йому відпочити протягом щонайменше 3,5год. перед тестом.

Експериментальна стимуляція вдуванням повітря

Щурів залишали у лабораторії після ін'єкції LPS і сполуки (ліків). На час тесту щурів видаляли і розміщували поза лабораторією. Щурів по одному приносили у лабораторію і розміщували у прозорій коробці (9×9×18см), яку потім переносили у звукоізолюючу вентильовану камеру (62×35×46см, BRS/LVE, Div. Tech-Serv Inc). Повітря вдували через вихідну повітряну форсунку діаметром 0,32см під контролем системи AirStim (San Diego Instruments), здатної вдувати повітря порціями тривалістю 0,2сек. з постійною інтенсивністю і частотою 1 вдування за 10сек. Виконували максимум 10 вдувань або до початку вокалізації. Реєстрацію починали з першим вдуванням.

#### Експерименти з записом ультразвуків

Вокалізації записували протягом 10хв. мікрофонами (G.R.A.S., Sound and Vibrations, Vedbaek, Denmark), встановленими у кожній камері і контрольованими програмою (LMS CADA-X 3,5B, Data Acquisition Monitor, Troy, Michigan). Були записані частоти від 0 до 32000Гц, записи зберігали і аналізували тією ж програмою (LMS CADA-X 3,5B, Time Data Processing Monitor і UPA (User Programming and Analysis)).

#### Сполуки (Ліки)

В усіх сполуках (ліки) було встановлено pH від 6,5 до 7,5 і їх вводили у кількості 4мл/кг. Після введення сполуки (ліків) тварин повертали у їх клітку до початку тестів.

#### Аналіз

Записи були піддані ряду статистичних аналізів і аналізів Фур'є для фільтрування (від 20 до 24кГц) і обчислення бажаних параметрів. Дані були репрезентовані як середнє ± стандартне відхилення. Статистичну значущість оцінювали Т-тестом для порівняння між незараженими щурами і щурами, що отримали LPS, і однонапрямним тестом ANOVA і потім тестом (post-hoc) Данета (Dunnett) множинного порівняння на ефективність ліків. Різниця між групами вважається значущою з мінімальним значенням  $p \leq 0,05$ . Експерименти повторювали мінімум двічі.

Визначення термічної гіпералгезії з використанням підошвенного тесту Харгривза (Hargreaves)

#### Введення пацієнту FCA або карагену

Повний ад'ювант Фройнда (Freund) (FCA): SIGMA кат. # F 5881, Mycobacterium tuberculosis (H37Ra, ATCC 25177), 1мг/мл, вбитий теплом сушений, 0,85мл парафіну, 0,15мл манідмоноолеату або караген типу Lambda, IV(Cg): SIGMA кат. # C-3889, (Желатин рослинний; Ірландський мох), (1,0% розчин у NaCl).

Ін'єкції робили шприцем Гамільтона (Hamilton) стерильною голкою 26G5/8". Щура розміщували у камері для анестезії ізофлураном. Після досягнення бажаного результату щура видаляли і укладали у черевне горизонтальне положення (грудинне). Задню лапу ухоплювали і підшкірно вводили голку, між подушечками пальців 2 і 3 щоб досягти середини лапи (метатарсальної зони). Повільно у лапу вводили 100мкл FCA або 100мкл розчину карагену і трохи стискали протягом 3-4сек. після видалення голки.

Якщо тварина прокидалась під час цієї процедури, її повертали в інгаляційну камеру до досягнення бажаного результату.

Після цієї підпідошвенної ін'єкції, тварин залишали прокинутись у їх клітках під наглядом.

При введенні FCA щура залишали на 48год., а при введенні карагену - на 3год. для розвитку запального процесу. Вранці щурів переносили до лабораторії (у клітках) і залишали щонайменше на 30хв. для звикання.

#### Місце тесту

Теплове стимулювання прикладали до центру поверхні підошви, між подушечками. Місце тесту має контактувати з склом, без сечі або фекалій між ними, для забезпечення нормальної теплопередачі від скла до шкіри.

Підошвенний апарат складається з коробки з скляною кришкою/платформою, температуру скляної поверхні підтримують на рівні 30°C за допомогою механізму внутрішнього зворотного зв'язку. Під цією скляною платформою на рухомому кронштейні була встановлена лампа, а під нею дзеркало для спрямовування світла під лапи щура через отвір діаметром приблизно 2мм. Після вмикання світла автоматичні датчики вимикають світло при прибиранні лапи; якщо щур прибирає лапу, світло вимикається через 20,48сек. для уникнення травмування лапи. Експериментатор може також

вимкнути світло у будь-який момент. Таймер реєструє час, коли світло є включеним.

Флюксметр виміряє світловий потік (флюкс/см<sup>2</sup>), який має становити приблизно 97-98; потік можна коригувати, але не під час експерименту.

Часові співвідношення

Експеримент можна проводити через різні проміжки часу після викликання запалення. Гіпералгезію виміряють через 48 год. після ін'єкції FCA або 3 год. після ін'єкції карагену.

Процедура тесту

Незаражені щури: Для отримання кривої залежності реакції від дози одну групу з 7 щурів використовували як контрольну; їх анестезували разом з іншими 28 щурами, але не вводили нічого ін'єкцією. Тестування цієї групи можна проводити до або негайно після експерименту, спричиняючи мінімальний стрес. Щурів розміщували в індивідуальних плексигласових коробках (14×21×9 см) на підшвенному пристрої; їх залишали на 30 хвил. для звикання, світло розміщували під місцем тесту і вмикали, латентність прибирання лапи реєстрували. Через 5-8 хвил. (щоб дозволити температурі шкіри нормалізуватись) проводили друге вимірювання і щурів повертали до їх кліток.

Основні дані: іншим 28 щурам (розділеним 4 групи) ін'єкцією вводили FCA (або караген) розміщували в індивідуальних коробках на машині і залишали звикати на 30 хвил. Експериментатор має визначити рівень запалення лапи і знебарвлення. Джерело тепла розміщували під місцем тесту і реєстрували латентність прибирання лапи двома вимірюваннями. Наявність гіпералгезії встановлюють, порівнюючи основні дані з даними для незаражених щурів.

Тести після введення ліків: після встановлення гіпералгезії, щурам ін'єкцією вводили випробувані сполуки. Кожну сполуку приготували і розчиняли у найбільш придатному носії згідно з стандартними процедурами. Спосіб введення, дози, об'єм і час тесту після ін'єкції є специфічними для цієї сполуки (або класу сполук). Після введення сполук через 20-30 хвил. після ін'єкції, щурів розміщували у підшвенному апараті і залишали до появи дії ліків. Через 60 хвил. або більше після ін'єкції, щурів переносили до їх кліток разом з сусідами по клітці. Щурів завжди повертали у їх первісні клітки разом з сусідами для мінімізації стресу і відновлення соціальної структури у групі. Через 30 хвил. щурів розміщували на підшвенній машині, залишали на 30 хвилю звикнути і проводили тести, як це було описано вище, виконуючи два вимірювання.

Критерії для тесту

Тварини мають бути спокійними але уважними, у правильному положенні, без сечі або екскрементів між лапами і склом машини. Тест не проводять, якщо:

- тварина рухається, нюхає, чистить себе і знайомиться з довкіллям,
- тварина спить,
- тварина виявляє явні ознаки стресу (напружена нерухомість, вокалізації, вуха у положенні лежачи), якщо вони не є можливим побічним результатом дії сполуки і їх не можна уникнути.

- тварина знаходиться у такому положенні, що лапа не контактує безпосередньо з склом (лапа лежить на хвості);

- лапа тварини з'являється синіє в результаті поганої ін'єкції; у такому тварину усувають повністю (з початку).

При наявності сечі або екскрементів тварину видаляють, поверхню скла чисто витирають і тварину повертають. Якщо тварина спить або виявляє напружену нерухомість, експериментатор може обережно пересунути коробку або зробити рухи рукою перед коробкою, щоб привернути увагу. Тварини мають знаходитись під уважним наглядом протягом тесту.

Повторні тести

Якщо на будь-якій стадії експерименту експериментатор не має впевненості у тому, що прибирання лапи є реакцією на нагрівання, тварина може бути піддана повторному тесту через 5-8 хвил. Це може бути викликано несподіваним рухом тварин або сечовиділенням, або дефекацією під час стимулювання.

Прийнятні реакції

Реакцію на нагрівання можна вважати:

- прибирання лапи з скла (часто з подальшим облизуванням лапи),
- бічні рухи тіла (у бік від стимульованої лапи),
- прибирання пальців з скла,
- прибирання з скла центральної частини підошви запаленої лапи.

Аналіз

Дані були репрезентовані як середнє±стандартне відхилення. Статистичну значущість оцінювали Т-тестом для порівняння між контрольними і запаленими щурами, і однонапрямним тестом ANOVA і потім тестом (post-hoc) Данета (Dunnett) множинного порівняння на ефективність ліків. Різниця між групами вважається значущою мінімальним значенням  $p \leq 0,05$ . Експерименти повторювали мінімум двічі.

Метаболічні і фармакокінетичні властивості

Було несподівано виявлено, що метаболічні і фармакокінетичні властивості сполук поліпшуються внаслідок заміщення флуором нижнього бензилу бензилпіперазинільного компонента формули I. В одному з втілень було виявлено, що деякі реактивні метаболіти знижуються за рівнем або видаляються з сполук винаходу. В іншому втіленні деякі сполуки винаходу показали поліпшену біозасвоюваність, що може бути результатом їх слабкої спорідненості з 2D6- і 3A4-цитохромом P450. Наведені далі дані підтверджують ці властивості сполук.

Мікросомні інкубації

Сполуку винаходу (початкова концентрація 10 мкМ) інкубували індивідуально з мікросомами печінки щура (0,5 мг/мл протеїну) у буфері з 0,1 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 7,4) і 5 мМ  $\text{MgCl}_2$  і 5 мМ захоплюючого реагента (глутатіон(GSH), N-ацетилцистеїн (NAC), або  $\text{CH}_3\text{ONH}_2$ ) протягом 60 хвил. при 37°C. Реакції були ініційовані доданням NADPH (1 мМ) і їх припиняли доданням такого ж об'єму підкислювача (0,1% мурашина кислота в ацетонітрилі).

Інкубації гепатоцитів

Сполуку винаходу (початкова концентрація 10 мкМ) інкубували індивідуально з свіжими гепа-

тоцитами щура (Sprague Dawley) і кріозбереженого собаки (Beagle) ( $1 \times 10^6$  клітин/мл) при pH 7,4 і 37°C протягом 1 год. Гепатоцитна інкубаційна суміш містила середовище E Вільямса з 25мМ НЕРЕР, 1%-м розчином ITS-G (Life Technologies, Cat. No 41400-045), 10мМ НЕРЕР (pH 7,4), і 2мМ L-глутаміну. Інкубації припиняли додаванням такого ж об'єму підкислювана (0,1% мурашина кислота в ацетонітрилі).

#### Аналіз РХ-МС

Після осадження протеїну над осадові рідини зразків були аналізовані на метаболіти повносканувальними РХ-МС. Були отримані дані про молекулярну масу кожного метаболіту. Були аналізовані фрагментаційні картини від додаткових вимірювань РХ-МС/МС для визначення структур первісних метаболітів.

#### Інструменти:

ВЕРХ HP 1100 ВЕРХ System (Hewlett Packard, D-76337 Waldbronn, Germany)  
MC LCQ (Finnigan Corporation, 355 River Oaks Parkway, San Jose, CA)

Умови мас-спектрографії (МС: LCQ):

Напруга джерела	4,5кВ
Темп, капілярів	180°C
Потік газу	80
Допоміжний потік газу	5
Тип джерела	EPI
Режим іонізації	Позитивний

Умови ВЕРХ:

Колонка	Phenomenex Synergi MAX-RP, 4μ, 2,0×150мм (Phenomenex, Torrance, CA)
---------	---

Мобільна фаза	A=0,1% мурашина кислота у воді, B=ACN
---------------	---------------------------------------

Потік	0,2мл/хвил.
-------	-------------

Температура	45°C
-------------	------

Виявлення	Мас-спектрометр LCQ
-----------	---------------------

Метод градієнта:

Час	A	B
0	90	10
30	40	60
30,1	10	90
33	10	90
33,1	90	10
40	90	10

#### Результати тестів

Первісними спостереженими шляхами біотрансформації сполук були N-деетилування, N-деаалкілування і гідроксилування. Для сполук винаходу з заміщеним флуором бензилпиперазинільним компонентом продуктів приєднання глутатіону на бензолі в інкубатах гепатоцитів щура не було виявлено, але деякі продукти приєднання глутатіону на бензолі були виявлені у цих інкубатах для подібних сполук без заміщеного флуором бензильного кільця.

#### Методи мікродіалізу in vivo

##### Процедура

Щурів рандомізовано розділили на 8 груп: спокійні з носієм, з носієм під стресом, спокійні з ліками, з ліками під стресом. У мозок за 2 год. перед експериментом були імплантовані діалізні зогди (CMA/12, мембрана 4мм для mPFC) і заливались штучною CSF (aCSF, CMA Microdialysis AB) потоком 1,1мл/хвил. протягом 2 год. для стабілізації

лінії відліку. Для визначення лінії відліку були відібрані три 20-хвилинні зразки, тваринам ін'єкцією внутрішньочеревно вводили носій або сполуки і зразки збирали протягом 5 год. Програму парадигми стресу починали через 20хвил. після введення сполук. Зразки негайно уприскували у систему ВЕРХ для аналізу на концентрації моно аміну. Концентрації нейротрансмітерів у 3 зразках, взятих перед введенням пацієнту сполук/носія усереднювали і використовували як еталон (100%). Концентрації нейротрансмітерів у подальших мікродіалізатах репрезентували як %% від еталону.

#### Процедура стресу

Для цих процедур були використані стандартні бокси пасивного уникнення, обладнані засобами світла, тону і електричних ударів (Med Associates, Inc). Бокси розміщували у звукопідсилюючих камерах. Стресову парадигму проводили протягом 1 дня. Тварин акліматизували у камерах протягом 2 год., потім протягом 6хвил. піддавали у послідовності дії світла, електричному удару на лапах (0,5сек. 1,5мА, 10 ударів). "Спокійну" групу у камерах піддавали дії світла але без електричних ударів. Через 40хвил. тварин повторно піддавали дії світла, без електричних ударів.

#### Введення ліків

Всі сполуки розчиняли у стерильній дистильованій воді (носії) і вводили внутрішньочеревно за 20хвил. до процедури стресу.

ВЕРХ і електрохімічне виявлення.

Система ВЕРХ складається з насоса 5041, детектора Model 5200A Coulchem II, колонки MD-150 3×150мм, амперметричної комірки model 5041 (всі від EPA Inc) і іжектора (від BAS Inc). Мобільна фаза: 75мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25мМ EDTA, 1,7мМ 1-октансульфонова кислота, 100мкл триетиламіну, 10%-й ацетонітрил, pH 3,0. Потенціал - +0,65В, потік з витратою 0,3мл/хвил. Дані отримують базованою на ПК прийомно-аналітичною системою (комп'ютер 501 і програмне забезпечення A/D, EPA, Inc) з інтегрованим графічним програмним забезпеченням для подальшого аналізу.

Групи з 6-8 щурів з інтрацеребральними мікродіалізними зондами у медіальній префронтальній корі (де нейрохімічний сигнал є найсильнішим) піддавали кондиціюванню, описаному вище, і спостерігали підвищення норепіферину і допаміну у тварин, що отримували носій. Деякі сполуки стійко блокували підвищення норепіферину і допаміну.

#### Геллер-Зіфтер - метод моделі тривожності

У тесті на конфліктність голодних тварин навчали натискати важіль для отримання їжі у стандартній оперантній камері у двох режимах. Згідно з першим (не подавлений компонент) їжу дають у середньому після 17 натискань важеля (програма підсилення VR17). Згідно з другим режимом (подавлений компонент), яка супроводжується світловим спалахом в оперантній камері, їжу також дають у середньому після 17 натискань важеля, але супроводжують електричним ударом на підлозі камери згідно з окремою процедурою VR17. Денні сеанси включають 5 почергових виконань компонентів кожного типу: подавлені (3хвил.) і не подавлені (3хвил.). Кількість натискань важеля у подавленому компоненті була нижчою порівняно з

не подавленим компонентом. Антитривожні агенти, наприклад, діазепам, підвищували кількість натискань у подавленому компоненті, але не впливали на кількість натискань у не подавленому компоненті. Деякі сполуки винаходу мали анксіолітичний профіль.

Далі наведено приклади приготування, очищення, аналізу і біологічних тестів, які ілюструють винахід, не обмежуючи його об'єму.

Інтермедіат 1: 4-йодо-N,N-діетилбензамід

До суміші 4-йодобензоїлхлориду (75г) у 500мл  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  додають суміш  $\text{Et}_3\text{N}$  (50мл) і  $\text{Et}_2\text{NH}$  (100мл) при 0°C. Отриману реакційну суміш гріють при кімнатній температурі 1год. і потім промивають насиченим хлоридом амонію. Органічні екстракти сушать ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), фільтрують і концентрують. Залишок рекристалізують з гарячих гексанів і отримують 80г інтермедіату 1.

Інтермедіат 2: 4-[(гідрокси(3-нітрофеніл)метил)-N,N-діетилбензамід

N,N-діетил-4-йодобензамід (5,0г, 16ммоль) розчиняють у ТГФ (150мл) і охолоджують до -78°C під нітрогеном. Краплями протягом 10хвил. при - (65-78)°C додають n-BuLi (15мл, 1,07М розчин у гексані, 16ммоль). Розчин канюлюють у 3-нітробензальдегід (2,4г, 16ммоль) у толуолі/ТГФ (прибл. 1:1, 100мл) при -78°C. Через 30хвил. додають  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (водн.). Після концентрування in vacuo, екстрагування  $\text{EtOAc}$ /водою, сушіння ( $\text{MgSO}_4$ ) і випарювання органічної фази, залишок очищають хроматографією на кремнеземі (0-75%  $\text{EtOAc}$ /гептан) і отримують інтермедіат 2 (2,6г, 50%),  $^1\text{H}$  ЯМР (400МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{H}}$  1,0-1,3 (m, 6H), 3,2 (m, 2H), 3,5 (m, 2H), 5,90 (s, 1H), 7,30-7,40 (m, 4H), 7,50 (m, 1H), 7,70 (d, J=8Гц, 1H), 8,12 (m, 1H), 8,28 (m, 1H).

Інтермедіат 3: N,N-діетил-4-[(3-нітрофеніл)(1-піперазиніл)метил]бензамід

До розчину спиртового інтермедіату 2 (10,01г, 30,5ммоль) у ДХМ (200мл) додають тіонілбромід (2,58мл, 33,6ммоль). Через 1год. при кімнатній температурі реакцію промивають насиченим водним бікарбонатом натрію (100мл) і органічний шар відділяють. Водний шар промивають ДХМ (3×100мл) і об'єднані органічні екстракти сушать ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), фільтрують і концентрують.

Сирий бензилбромід розчиняють в ацетонітрилі (350мл) і додають піперазин (10,5г, 122ммоль). Після нагрівання протягом 1год. при 65°C реакцію промивають насиченим хлоридом амонію/етилацетатом і органічний шар відділяють. Водний шар екстрагують етилацетатом (3×100мл) і об'єднані органічні екстракти сушать ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), фільтрують і концентрують, отримуючи рацемічний інтермедіат 3.

Інтермедіат 4b: N,N-діетил-4-[(R)-(3-нітрофеніл)(1-піперазиніл)метил]бензамід

Рацемічний інтермедіат 3 розчиняють в етанолі (150мл) і додають ди-p-толуїл-D-виннокам'яну кислоту (11,79г, 1екв.). Продукт осаджується протягом 12год. Тверду речовину збирають фільтруванням і розчиняють в етанолі під зворотним холодильником до розчинення всієї твердої речовини (прибл. 1200мл етанолу). Після охолодження тверду речовину збирають фільтруванням і рекристалізують двічі, потім збирають

фільтруванням, обробляють водним гідроксидом натрію (2М) і екстрагують етилацетатом. Органічні екстракти сушать ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), фільтрують і концентрують, отримуючи 1,986г інтермедіату 4b.  $^1\text{H}$  ЯМР (400МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{H}}$  1,11 (br s, 3H), 1,25 (br s, 3H), 2,37 (br s, 4H), 2,91 (t, J=5Гц, 4H), 3,23 (br s, 2H), 3,52 (br s, 2H), 4,38 (s, 1H), 7,31-7,33 (m, 2H), 7,41-7,43 (m, 2H), 7,47 (t, J=8Гц, 1H), 7,75-7,79 (m, 1H), 8,06-8,09 (m, 1H), 8,30-8,32 (m, 1H).

Хіральну чистоту визначають ВЕРХ при таких умовах:

Колонка Chiralpack AD (Daicel Chemical Industries)

Низький потік - 1мл/хвил.

Час - 30хвил. при 25°C

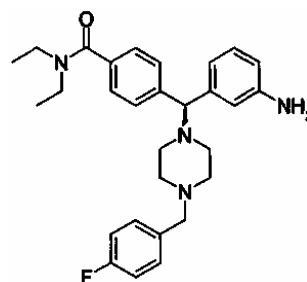
Ізократний 15%-й етанол (з 0,1% за об'ємом) діетиламіну), 85%-і гексани (з 0,1% (за об'ємом) діетиламіну)

Час ретенції молекули - 20хвил.

Інтермедіат 4a: N,N-діетил-4-[(S)-(3-нітрофеніл)(1-піперазиніл)метил]бензамід

(S)-енантіомерний інтермедіат 4a можна отримати процедурою розчинення з ди-p-толуїл-1-виннокам'яною кислотою.

Сполука 1: 4-[(S)-(3-амінофеніл)[4-(4-флуорбензил)піперазин-1-іл]метил]-N,N-діетилбензамід

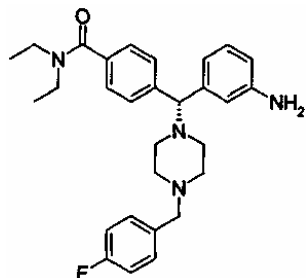


До розчину Інтермедіату 4a (467мг) у 1,2-дихлоретані (13мл) додають 4-флуорбензальдегід (252мкл; 2екв.) і триацетоксидборгидрид натрію (498мг; 2екв.). Реакцію перемішують при кімнатній температурі під нітрогеном 18год. і концентрують. Додають насичений бікарбонат натрію і водний розчин екстрагують трьома порціями ДХМ і об'єднану органіку сушать над безводним сульфатом натрію, фільтрують і концентрують. Сполуку розчиняють у суміші етанолу, ТГФ, води і насиченого хлориду амонію (4мл; відношення 4:2:1:1 за об'ємом). Додають наночастки заліза (тричі на кінчику спатули) і розчин нагрівають при 150°C протягом 10хвил. у мікрохвильовій печі. Отриману суміш охолоджують, фільтрують через броунмілерит і концентрують. Залишок очищають флеш-хроматографією на силікагелі, з елюентом з градієнтом від 1% до 5% MeOH у ДХМ. Отриманий продукт розчиняють у ДХМ з 1,2мл 1М HCl в етері. Розчинник видаляють і продукт ізолюють як гідрохлоридну сіль, отримуючи Сполуку 1 (164мг, 30% вихід) як безбарвну тверду речовину. Чистота (ВЕРХ) вище 99%; Оптична чистота (хіральна ВЕРХ) вище 99%;  $^1\text{H}$  ЯМР (400МГц,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) 1,08 (t, J=6,5Гц, 3H), 1,21 (t, J=6,5Гц, 3H), 3,20-3,26 (m, 4H), 3,51-3,54 (m, 6H), 4,43 (s, 2H), 7,19-7,23 (m, 2H), 7,34 (d, J=8,0Гц, 1H), 7,40 (d, J=8,0Гц, 2H),

29

7,54-7,63 (m, 3H), 7,70-7,82 (m, 4H). Отримано: C, 54,63; H, 6,49; N, 8,68.  $C_{29}H_{36}N_4O \times 4,1HCl \times 0,8H_2O \times 0,1C_4H_{10}O$  має C, 57,67; H, 6,51; N, 8,67%.

Сполука 2: 4-[(R)-(3-амінофеніл)[4-(4-флуорбензил)піперазин-1-іл]метил]-N,N-діетилбензамід

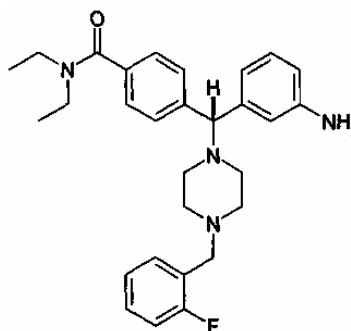


До розчину Інтермедиату 4b (5,790г, 14,6ммоль) у 1,2-дихлоретані (60мл) додають 4-флуорбензальдегід (2,04мл, 19,0ммоль) і триацетоксиборгідрид натрію (4,02г, 19,0ммоль). Через 20год. при кімнатній температурі реакцію гасять водним бікарбонатом натрію і органічний шар розділяють. Водний шар екстрагують ДХМ (3×100мл) і об'єднані органічні екстракти сушать ( $Na_2SO_4$ ), фільтрують і концентрують. Залишок очищають флеш-хроматографією з елюентом 30% до 50% ацетону у гексанах, отримуючи безбарвну піну (5,285г, 71%), тобто нітроінтермедіат (5,285г, 10,4ммоль), який розчиняють у суміші етанолу, ТГФ, воді і водного насиченого хлориду (4:2:1:1, за об'ємом) (100мл) і додають гранули заліза (0,63мг, 11,5ммоль). Реакцію нагрівають під зворотним холодильником і періодично додають гранули заліза. Через 24год. (90°C) реакцію охолоджують до кімнатної температури і фільтрують через броунмілерит і концентрують. До залишку додають водний бікарбонат натрію і ДХМ. Органічний шар відділяють і водний шар екстрагують ДХМ (3×100мл) і об'єднані органічні екстракти сушать ( $Na_2SO_4$ ), фільтрують і концентрують. Продукт очищають на силікагелі з елюентом від 1% до 5% метанолу у ДХМ, отримуючи Сполуку 2 (3,505г) як біложовту піну. Нечистий матеріал додатково отримують флеш-хроматографією і очищають другою флеш-хроматографією з елюентом 100% етилацетат до 5% метанолу в етилацетаті, отримуючи ще 0,949г Сполуки 2. Отримано об'єднаного матеріалу 4,454г (вихід 90%). Чистота (ВЕРХ) вище 99%; оптична чистота (хіральна ВЕРХ) вище 99%;  $^1H$  ЯМР (400МГц,  $CD_3OD$ ), 1,08 (t, J=6,5Гц, 3H), 1,21 (t, J=6,5Гц, 3H), 3,20-3,26 (m, 4H), 3,51-3,54 (m, 6H), 4,43 (s, 2H), 7,19-7,23 (m, 2H), 7,34 (d, J=8,0Гц, 1H), 7,40 (d, J=8,0Гц, 2H), 7,54-7,63 (m, 3H), 7,70-7,82 (m, 4H). Отримано: C, 54,00; H, 6,34; N, 8,47.  $C_{29}H_{35}FN_4O \times 4,7HCl \times 0,2C_4H_{10}O \times 0,1H_2O$  має C, 54,02; H, 6,37; N, 8,46%.

87146

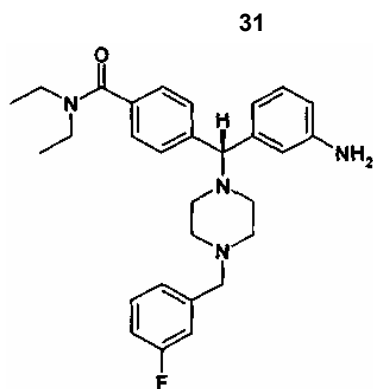
30

Сполука 3: 4-[(R)-(3-амінофеніл)[4-[(2-флуорфеніл)метил]-1-піперазиніл]метил]-N,N-діетилбензамід



До розчину Інтермедиату 4b (298мг, 0,752ммоль) у 1,2-дихлоретані (8,5мл) додають 2-флуорбензальдегід (160мг, 1,503ммоль, 2екв.) і триацетоксиборгідрид натрію (319мг, 1,503ммоль, 2екв.). Реакцію перемішують при кімнатній температурі під нітрогеном протягом 18год. і концентрують. Додають насичений бікарбонат натрію і водний розчин екстрагують трьома порціями ДХМ і об'єднану органіку сушать над безводним сульфатом натрію, фільтрують і концентрують. Сполуку розчиняють у суміші етанолу, ТГФ, води і насиченого хлориду амонію (3мл; відношення 4:2:1:1, за об'ємом). Додають наночастки заліза (тричі на кінчику спатули) і розчин нагрівають при 150°C 10хвил. у мікрохвильовій печі. Отриману суміш охолоджують, фільтрують через броунмілерит і концентрують. Сирий продукт розчиняють у  $CH_2Cl_2$  і промивають водою. Органічний шар відділяють і водний, шар екстрагують ДХМ. Об'єднані органічні екстракти сушать ( $Na_2SO_4$ ), фільтрують і концентрують. Продукт очищають зворотно-фазовою ВЕРХ (градієнт 5-50%  $CH_3CN$  у  $H_2O$  з 0,1% ТФК), отримуючи Сполуку 3 (0,28г, 46%) як сіль ТФК, яку ліофілізують з  $CH_3CN/H_2O$ , отримуючи біложовтий порошок.  $^1H$  ЯМР (400МГц,  $CD_3OD$ ) 1,08 (t, J=6,6Гц, 3H), 1,22 (t, J=6,6Гц, 3H), 2,39 (br s, 2H), 3,02 (br s, 2H), 3,18-3,38 (m, 4H), 3,43 (br s, 2H), 3,52 (q, J=6,8Гц, 2H), 4,43 (s, 2H), 4,53 (s, 1H), 7,09 (dt, J=2,3, 6,8Гц, 1H), 7,24-7,30 (m, 1H), 7,30-7,41 (m, 6H), 7,52-7,60 (m, 4H). Обчислення для  $C_{29}H_{35}FN_4O \times 2,8ТФК \times 0,4H_2O$ : C, 51,88; H, 4,86; N, 6,99. Отримано: C, 51,89; H, 4,89; N, 6,97%. МС (обчисл.): 475,3 (МН+), МС. (отримано): 475,2 (МН+). ВЕРХ: k': 2,35; чистота: вище 99% (215нм), вище 99% (254нм), вище 99% (280нм). Умови ВЕРХ: Zorbax C-18, градієнт 10-95% В, потік 1мл/хвил., 25°C, А: 0,1% ТФА в  $H_2O$ , В: 0,1% ТФК у MeCN. Ротація:  $[\alpha]_D^{16} = -8,91$  (c=1,179, MeOH).

Сполука 4: 4-[(R)-(3-амінофеніл)[4-[(3-флуорфеніл)метил]-1-піперазиніл]метил]-N,N-діетилбензамід



До розчину Інтермедіату 4b (281мг, 0,709ммоль) у 1,2-дихлоретані (8мл) додають 3-флуорбензальдегід (180мг, 1,417ммоль, 2екв.) і триацетоксиборгідрид натрію (300мг, 1,417ммоль, 2екв.). Реакцію перемішують при кімнатній температурі під нітрогеном 18год. і концентрують. Додають насичений бікарбонат натрію і водний, розчин екстрагують трьома порціями ДХМ і об'єднану органіку сушать над безводним сульфатом натрію, фільтрують і концентрують. Продукт розчиняють у суміші етанолу, ТГФ, води і насиченого хлориду амонію (3мл; відношення 4:2:1:1 за об'ємом). Додають наночастки заліза (тричі на кінчику спатули)

**87146**

**32**

і розчин нагрівають при 150°C 10хвил. у мікрохвильовій печі. Отриману суміш охолоджують, фільтрують через броунмілерит і концентрують. Отриманий продукт розчиняють у CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> і промивають водою. Органічний шар відділяють і водний шар екстрагують ДХМ. Об'єднані органічні екстракти сушать (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), фільтрують і концентрують. Продукт очищають зворотно-фазовою ВЕРХ (градієнт 5-50% CH<sub>3</sub>CN у H<sub>2</sub>O з 0,1% ТФК), отримуючи Сполуку 4 (0,375г, 65%) як сіль ТФК, яку ліофілізують з CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O, отримуючи біложовтий порошок. <sup>1</sup>H ЯМР (400МГц, CD<sub>3</sub>OD) 1,08 (t, J=6,4Гц, 3H), 1,21 (t, J=6,8Гц, 3H), 2,38 (br s, 2H), 3,00 (br s, 2H), 3,16-3,28 (m, 4H), 3,40 (br s, 2H), 3,51 (q, J=6,8Гц, 2H), 4,37 (s, 2H), 4,56 (s, 1H), 7,18 (ddd, J=1,2, 2,3, 7,8Гц, 1H), 7,24 (ddd, J=1,0, 2,7, 8,8Гц, 1H), 7,28-7,38 (m, 4H), 7,55 (d, J=8,2Гц, 2H). Обчислено для C<sub>29</sub>H<sub>35</sub>FN<sub>4</sub>O×2,7ТФК×1,1H<sub>2</sub>O: C, 51,50; H, 5,01; N, 6,98. Отримано: C, 51,52; H, 5,01; N, 6,87%. МС (обчисл): 475,3 (МН<sup>+</sup>), М.С. (отримано): 475,2 (МН<sup>+</sup>). ВЕРХ: k': 2,43; Чистота: вище 99% (215нм), вище 99% (254нм), вище 99% (280нм). Умови ВЕРХ: Zorbax C-18, градієнт 10-95% В, потік 1мл/хвил., 25°C, А: 0,1% ТФК у H<sub>2</sub>O, В: 0,1% ТФК у MeCN. Ротація: [α]<sup>18</sup><sub>D</sub>=-8,94 (c=1,04, MeOH).