



УКРАЇНА

(19) UA (11) 87862 (13) C2

(51) МПК (2009)

C07D 401/12 (2006.01)

C07D 417/12 (2006.01)

C07D 413/12 (2006.01)

A61K 31/445

A61P 25/28 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ПОХІДНІ 4-БЕНЗИЛІДЕНПІПЕРИДИНУ

1

2

(21) a200702171

(22) 21.07.2005

(24) 25.08.2009

(86) РСТ/HU2005/000077, 21.07.2005

(31) P0401522

(32) 29.07.2004

(33) HU

(46) 25.08.2009, Бюл.№ 16, 2009 р.

(72) БОРЗА ІШТВАН, HU/HU, ХОРВАТ ЧІЛЛА, HU/HU, ФАРКАШ ШАНДОР, HU, ДЬЕРТЬЯН ІШТВАН, HU, НАДЬ ЙОЖЕФ, HU/HU, КОЛОК ШАНДОР, HU/HU, ГАЛГОЦИ КОРНЕЛЬ, HU/HU, ШАГІ КАТАЛІН, HU/HU

(73) РІХТЕР ГЕДЕОН ВЕДЬЄСЕТІ ДЬЯР РТ., HU

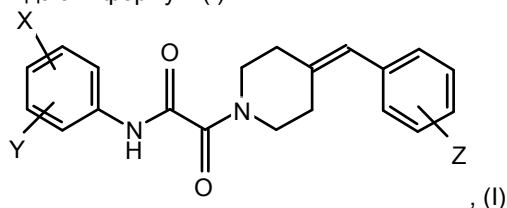
(56) a200702172, C2, 21.07.2005

WO 03/010159 A (RICHTER GEDEON VEGYESZETI GYAR RT; DOMANY, GYORGY; HORVATH, CSILLA; F), 06.02.2003

EP 0824098 A (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG) 18.02.1998

UA 77684, 15.01.2007

(57) 1. Похідні 4-бензиліденпіперидину, що відповідають формулі (I)



в якій значення

X і Y незалежно відповідають водню або атому галогену, гідрокси, ціано, нітро, аміно, C₁-C₄ алкіламіно, факультативно заміщеній атомом галогену або атомами галогену, ариламіно, факультативно заміщеній атомом галогену або атомами галогену, аралкіламіно, факультативно заміщеній атомом галогену або атомами галогену, C₁-C₄ алкілсульфонамідо, факультативно заміщеній атомом галогену або атомами галогену, C₁-C₄ алканойламідо, факультативно заміщеній атомом галогену або атомами галогену, арилсульфонамідо, C₁-C₄ алкілсульфонілокси, карбоксильній, трифторметиль-

ній, трифторметокси, C₁-C₄ алкіл-SO₂-NH-CH₂-, NH₂-(CH₂)₁₋₄ -SO₂-NH-, NH₂-(CH₂)₁₋₄-(CO)-NH-, сульфамойльний [NH₂-SO₂-], формільний [-CHO], амінометильний [-CH₂-NH₂], гідроксиметильний, C₁-C₄ алкільний, C₁-C₄ алкоксиметильний, галогенметильний, тетразолільний групі, або C₁-C₄ алкокси, C₁-C₄ алкоксикарбонільний, C₁-C₆ алканойлокси, фенільний або C₁-C₄ алкоксигрупам, факультативно заміщеним аміногрупою, або

сусідні X і Y групи разом з одним або більше ідентичними або відмінними додатковими гетероатомами і -CH= та/або -CH₂-групами можуть сформувати факультативно заміщене 4-7-членне гомо- або гетероциклічне кільце, переважно морфолінове, пірольне, піролідинове, оксо- або тіоксопіролідинове, піразолове, піразолідинове, імідазолільне, імідазолідинове, оксо- або тіоксоімідазолільне або імідазолідинове, 1,4-оксазинове, оксазолільне, оксазолідинове, оксо- або тіоксооксазолідинове, оксо- або тіоксотіазолідинове або 3-оксо-1,4-оксазинове кільце,

Z відповідає водню або атому галогену, нітро, аміно, C₁-C₄ алкільний, C₁-C₄ алкокси, ціано, трифторметильний, трифторметоксигрупі, а також їхні оптичні ізомери, рацемічні сполуки та солі.

2. Сполука за п. 1, вибрана з групи похідних 4-бензиліденпіперидину:

2-(4-бензиліденпіперидин-1-іл)-2-оксо-N-(2-оксо-2,3-дигідробензооксазол-6-іл)-ацетамід,

2-(4-бензиліденпіперидин-1-іл)-2-оксо-N-(2-оксо-2,3-дигідробензотіазол-6-іл)-ацетамід,

2-[4-(4-хлорбензиліден)-піперидин-1-іл]-2-оксо-N-(2-оксо-2,3-дигідробензооксазол-6-іл)-ацетамід,

2-[4-(4-хлорбензиліден)-піперидин-1-іл]-2-оксо-N-(2-оксо-2,3-дигідробензоімідазол-5-іл)-ацетамід,

2-[4-(4-хлорбензиліден)-піперидин-1-іл]-2-оксо-N-(2-оксо-2,3-дигідробензотіазол-6-іл)-ацетамід,

2-[4-(4-метилбензиліден)-піперидин-1-іл]-2-оксо-N-(2-оксо-2,3-дигідробензоімідазол-5-іл)-ацетамід,

2-[4-(4-метилбензиліден)-піперидин-1-іл]-2-оксо-N-(2-оксо-2,3-дигідробензотіазол-6-іл)-ацетамід,

(13) C2

(11) 87862

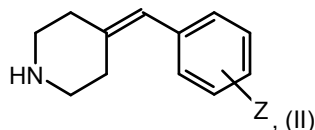
(19) UA

2-[4-(4-метилбензиліден)-піперидин-1-іл]-2-оксо-N-(2-оксо-2,3-дигідробензотіазол-6-іл)-ацетамід,
 2-[4-(4-метоксибензиліден)-піперидин-1-іл]-2-оксо-N-(2-оксо-2,3-дигідробензоімідазол-5-іл)-ацетамід,
 2-[4-(4-метоксибензиліден)-піперидин-1-іл]-2-оксо-N-(2-оксо-2,3-дигідробензотіазол-6-іл)-ацетамід,
 N-(4-метансульфоніламінофеніл)-2-[4-(4-метоксибензиліден)-піперидин-1-іл]-2-оксоацетамід,
 2-[4-(4-фторбензиліден)-піперидин-1-іл]-2-оксо-N-(2-оксо-2,3-дигідробензооксазол-6-іл)-ацетамід та їх оптичні ізомери, рацемічні сполуки і солі.

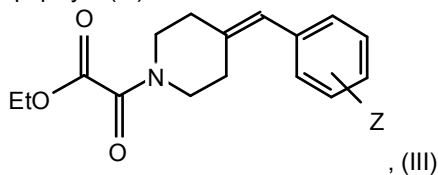
3. Фармацевтична композиція, яка містить ефективну кількість похідної 4-бензиліденпіперидину, що відповідає формулі (I), в якій значення X, Y, Z визначені у п. 1, або її солі як активну речовину і допоміжні речовини, які широко застосовують у фармацевтичній практиці, такі як носії, формоутворювальні речовини, розчинники, стабілізатори, змочувальні або емульгуювальні агенти, речовини, що впливають на рН та осмотичний тиск, духмяні або ароматизувальні речовини, а також добавки, що активують композицію, і добавки, що доставляють композицію.

4. Спосіб одержання похідних 4-бензиліденпіперидину, що відповідають формулі (I), в якій значення X, Y, Z визначені у п. 1, в якому здійснюють:

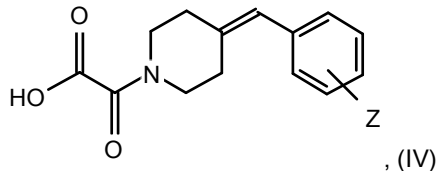
реакцію вторинного аміну, що відповідає формулі (II)



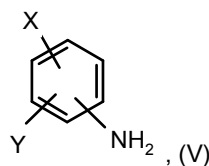
де Z має те саме значення, яке визначене у разі формули (I), з етилосалілхлоридом у відповідному придатному розчиннику у присутності основи, омилення складноєфірної сполуки, що відповідає формулі (III)



де Z має те саме значення, яке визначене у разі формули (I), під дією лужного гідроокису та реакцію одержаної оксаламідної кислоти, що відповідає формулі (IV)



в якій Z має те саме значення, яке визначене у разі формули (I), або її хімічно активної похідної з аніліном, що відповідає формулі (V)



в якій значення X і Y відповідають тим значенням, які були визначені раніше у разі формули (I), у дихлорметані,

з подальшою за необхідністю трансформацією одержаних похідних 4-бензиліденпіперидину, що відповідають формулі (I), в яких значення X, Y, Z відповідають тим значенням, які були визначені у п. 1, на інші сполуки, що відповідають формулі (I), шляхом введення нових замісних груп та/або модифікації або видалення груп, присутніх спочатку, та/або шляхом утворення солі, та/або виділення сполук, що відповідають формулі (I), зі складу солей із застосуванням відомих методів.

5. Спосіб за п. 4, в якому здійснюють реакцію активної похідної карбонової кислоти, що відповідає формулі (IV), в якій Z має те саме значення, яке визначене у п. 1, з аніліном, що відповідає формулі (V), в якій значення X і Y відповідають тим значенням, які були визначені у п. 1, у присутності основи.

6. Спосіб за п. 4, в якому здійснюють реакцію карбонової кислоти, що відповідає формулі (IV), в якій Z має те саме значення, яке визначене у п. 1, з аніліном, що відповідає формулі (V), в якій значення X і Y відповідають тим значенням, які були визначені у п. 1, у присутності триетиламіну і О-бензотриазол-1-іл-N,N,N',N'-тетраметилуроніумгексафторфосфату (НВТУ) в диметилформаміді.

7. Спосіб одержання фармацевтичної композиції, що має ефект NR2B селективного антагоніста рецептора NMDA, в якому здійснюють змішування похідних 4-бензиліденпіперидину, що відповідають формулі (I), в якій значення X, Y, Z визначені у п. 1, їхніх оптичних ізомерів, рацемічних сполук або їхніх фармацевтично прийнятних солей як активних речовин і допоміжних речовин, які широко застосовують у фармацевтичній практиці, таких як носії, формоутворювальні речовини, розчинники, стабілізатори, змочувальні або емульгуювальні агенти, речовин, що впливають на рН і осмотичний тиск, духмяні або ароматизувальні речовини, а також добавки, що активують композицію, і добавки, що доставляють композицію.

8. Спосіб лікування та полегшення симптомів захворювань ссавців, у тому числі людини, таких як травматичні пошкодження мозку або спинного мозку, нервові пошкодження, пов'язані з вірусом імунодефіциту людини, бічний аміотрофічний склероз (хвороба Шарко), толерантність та/або залежність до лікування болів із застосуванням синтетичних наркотичних препаратів (опіоїдів), абстинентні синдроми з причини вживання, наприклад, алкоголю, синтетичних наркотичних препаратів (опіоїдів) або кокаїну, ішемічних розладів ЦНС, таких як, наприклад, хвороба Альцгеймера, хвороба Паркінсона, хвороба Хантингтона, болів і хронічних больових станів, таких як, наприклад, невропатичний біль, або біль, пов'язаний з раковим захворюван-

ням, епілепсія, тривога, депресія, мігрень, психоз, м'язові спазми, слабоумство різного походження, гіпоглікемія, дегенеративні розлади сітківки, глаукома, астма, дзвін у вухах, втрата слуху, викликана застосуванням аміноглікозидних антибіотиків, який **відрізняється** введенням ссавцям, що потребують лікування, ефективної кількості похідної 4-бензиліденпіперидину, що відповідає формулі (I), в якій значення X, Y, Z визначені у п. 1, її оптичних ізомерів, рацемічних сполук або її фармацевтично прийнятних солей як самих по собі, так і у комбінації з носіями, наповнювачами і тому подібним, які традиційно застосовують у фармацевтичній практиці.

9. Застосування похідної 4-бензиліденпіперидину, що відповідає формулі (I), в якій значення X, Y, Z визначені у п. 1, її оптичних ізомерів, рацемічних сполук або її фармацевтично прийнятних солей для виробництва фармацевтичних композицій, призначених для лікування та пом'якшення симп-

томів захворювань ссавців, у тому числі людини, таких як травматичні пошкодження мозку або спинного мозку, нервові пошкодження, пов'язані з вірусом імунodefіциту людини, бічний аміотрофічний склероз (хвороба Шарко), толерантність та/або залежність до лікування болів із застосуванням синтетичних наркотичних препаратів (опіоїдів), абстинентні синдроми з причини вживання, наприклад, алкоголю, синтетичних наркотичних препаратів (опіоїдів) або кокаїну, ішемічних розладів ЦНС, таких як, наприклад, хвороба Альцгеймера, хвороба Паркінсона, хвороба Хантингтона, болів і хронічних больових станів, таких як, наприклад, невропатичний біль, або біль, пов'язаний з раковим захворюванням, епілепсія, тривога, депресія, мігрень, психоз, м'язові спазми, слабоумство різного походження, гіпоглікемія, дегенеративні розлади сітківки, глаукома, астма, дзвін у вухах, втрата слуху, викликана застосуванням аміноглікозидних антибіотиків.

Цей винахід стосується нових похідних 4-бензиліден-піперидину, що є NR2B селективними антагоністами рецептора NMDA з *поліпшеним* in vivo профілем або являють собою проміжні сполуки для виготовлення останніх.

Рецептори N-метил-D-аспарганової кислоти (NMDA) являють собою катіонні канали, керовані лігандами, широко представлені у центральній нервовій системі. Рецептори NMDA залучені до росту, розвитку та адаптаційних змін нейронів. Надактивація рецепторів NMDA глутаміною кислотою, їх природним лігандом, може призводити до кальцієвого перевантаження клітин. Це запускає каскад внутрішньоклітинних процесів, що змінюють функціонування клітин і, в кінцевому рахунку, можуть призвести до загибелі нейронів. Антагоністи рецепторів NMDA можуть бути використані для лікування безлічі розладів, що супроводжуються надлишковим вивільненням глутамінової кислоти, або надактивацією рецепторів NMDA з будь-якої іншої причини [Curr Opin Investig Drugs. 2003 4: 826-32].

Рецептори NMDA являють собою гетеромірні комплекси, що складаються з принаймні однієї субодиниці NR1 та однієї або більше з чотирьох субодиниць NR2 (NR2A - D). Як просторовий розподіл у центральній нервовій системі (ЦНС), так і фармакологічна чутливість рецепторів NMDA, що мають у своєму складі різні NR2 субодиниці, є різними. У зв'язку з цим, особливо цікавою є NR2B субодиниця внаслідок її обмеженого розподілу (найвищі щільності у передньому мозку та драглистій речовині спинного мозку) [Neuropharmacology, 38, 611-623 (1999)]. Сполуки, селективні для цього підтипу, є доступними, і їх ефективність була показана на тваринних моделях інсульту [Stroke, 28, 2244-2251 (1997)], травматичних пошкоджень мозку [Brain Res., 792, 291-298 (1998)], хвороби Паркінсона [Exp. Neurol., 163, 239-243 (2000)], невропатичного та запального болю [Neuropharmacology, 38, 611-623 (1999)].

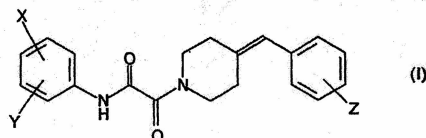
Крім того, селективні антагоністи NR2B підтипу рецепторів NMDA можуть забезпечувати терапевтичну перевагу порівняно з неселективними антагоністами рецепторів NMDA. Неселективні антагоністи рецепторів NMDA, що діють за типом блокатора каналу, фенциклідин і кетамін, індують психодислептичні ефекти, галюцинації, дисфорію, кататонію та амнезію у людини. Ці серйозні несприятливі ефекти ускладнюють їх клінічне використання як потенційно можливого препарату. Сполуки, що належать до цього класу, також обумовлюють аномальну поведінку у тварин, наприклад, збуджують рухову активність, індують амнезію та погіршують координацію рухів. Серйозність (важкість) цих ефектів у тварин розглядають як предиктивну відносно серйозності клінічних побічних ефектів. Припускають, що NR2B підтип селективні антагоністи позбавлені більшої частини цих побічних ефектів. За підсумками експериментів із вивчення поведінки тварин повідомляли про те, що деякі NR2B селективні сполуки [Ro 63-1908 in J. Pharmacol. Exp. Ther., 302 (2002) 940-948 и Ro 25-6981 in Behav. Pharmacol., 14 (2003) 477-487] збільшують рухову активність, в той час як такий ефект не спостерігали у разі CP-101,606, іншого NR2B селективного антагоніста, і Ro 256981 з іншої групи [Neuropharmacology, 38, 611-623 (1999)]. Відсутність ефекту стимулювання рухової активності у разі CP-101,606 аж до рівня 56 мг/кг підшкірно та 100 мг/кг внутрішньочеревинно була також підтверджена іншими даними [Soc. Neurosc. Abstr. 21, 439.9. 1995.]. Таким чином, згідно з нашими кращими даними, CP-101,606 є єдиним NR2B селективним антагоністом, який, згідно з однаковими повідомленнями, не має ефекту стимулювання рухової активності. Оскільки CP-101,606 має невисоку ефективність при пероральному прийманні, і, згідно з опублікованими даними, був досліджений лише за допомогою внутрішньовенного способу введення людині, крім того, він має поліморф CYP2D6 опосередкований метаболізм.

лізм [Drug Metabolism and Disposition 31: 76-87], зберігається велика потреба у нових NR2B антагоністах, що мають низьку важкість побічних ефектів (високий терапевтичний індекс), гарну ефективність у разі перорального прийняття (біодоступність) і гарну здатність перспективного удосконалення у терапевтичних цілях, особливо з метою перорального застосування.

Насичені аналоги сполук, що є предметом цього винаходу, описані у WO 2003010159 як NR2B підтип селективні антагоністи NMDA. Однак, інші структурно близькі аналоги похідних 4-бензиліден-піперидину, що відповідають формулі (I), в літературі невідомі.

Було виявлено, що нові похідні 4-бензиліден-піперидину, що відповідають формулі (I), які є предметом цього винаходу, являють собою функціонально активні антагоністи NMDA, селективні для рецепторів, що містять субодиницю NR2B. Автори також виявили, що бензиліден-піперидини мають анальгетичні властивості *in vivo*, подібні до тих, що їх мають їхні насичені бензил-піперидинові аналоги. Дивним є таке: в той час, як останні обумовлюють підвищення рухової активності на рівні, що відповідає або трохи перевищує їхню максимально ефективну анальгетичну дозу, сполуки, що є предметом цього винаходу, не мають ефекту підвищення рухової активності до рівня, що сягає 40-60-кратного перевищення їхньої анальгетичної дози. Ця властивість може забезпечити терапевтичну перевагу перед NR2B селективними антагоністами NMDA, що мають більш низький терапевтичний індекс. Докладний опис винаходу

Таким чином, цей винахід стосується, у першу чергу, нових похідних 4-бензиліден-піперидину, що відповідають формулі (I)



- в якій значення

X і Y незалежно відповідають водню або атому галогену, гідрокси, ціано, нітро, аміно, C₁-C₄ алкіламіно, факультативно заміщеній атомом галогену або атомами галогену, ариламіно, факультативно заміщеній атомом галогену або атомами галогену, аралкіламіно, факультативно заміщеній атомом галогену або атомами галогену, C₁-C₄ алкілсульфонамідо, факультативно заміщеній атомом галогену або атомами галогену, C₁-C₄ алканойламідо, факультативно заміщеній атомом галогену або атомами галогену, арилсульфонамідо, C₁-C₄ алкілсульфонілокси, карбоксильній, трифторметильній, трифторметокси, C₁-C₄ алкіл-SO₂-NH-CH₂-, NH₂-(CH₂)_{1,4}-SO₂-NH-, NH₂-(CH₂)_{1,4}-(CO)-NH-, сульфамойльній [NH₂-SO₂-], формільній [-CHO], амінометильній [-CH₂-NH₂], гідроксиметильній, C₁-C₄ алкільній, C₁-C₄ алкоксиметильній, галогенметильній, тетразолільній групі, або C₁-C₄ алкокси, C₁-C₄ алкоксикарбонільній, C₁-C₆ алканойлокси, фенільній або C₁-C₄ алкокси групам, факультативно заміщеним аміно групою, або сусідні X і Y групи разом з одним або більше ідентичним або відмін-

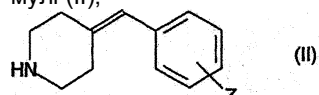
ним додатковим гетероатомом і -CH= та/або -CH₂- групами можуть сформувати факультативно заміщене 4-7 членне гомо- або гетероциклічне кільце, переважно морфолінове, пірольоне, піролідінове, оксо- або тіоксо-піролідінове, піразолове, піразолідинове, імідазольне, імідазолідинове, оксо- або тіоксо-імідазольне або імідазолідинове, 1,4-оксазинове, оксазольне, оксазолідинове, оксо- або тіоксо-оксазолідинове, оксо- або тіоксо-тіазолідинове або 3-оксо-1,4-оксазинове кільце, Z відповідає водню або атому галогену, нітро, аміно, C₁-C₄ алкільній, C₁-C₄ алкокси, ціано, трифторметильній, трифторметокси групі, а також їх оптичних ізомерів, рацемічних сполук і солей.

Крім того, об'єктами цього винаходу є фармацевтичні композиції, які мають у своєму складі як активні компоненти нові похідні 4-бензиліден-піперидину, що відповідають формулі (I), або їх оптичні ізомери, рацемічні сполуки, або їх солі.

Наступними об'єктами цього винаходу є способи виробництва нових похідних 4-бензиліден-піперидину, що відповідають формулі (I), та фармацевтичного виготовлення медикаментів, що мають у своєму складі ці сполуки, рівно як і способи лікування із застосуванням цих сполук, що вміщує в себе введення препаратів в організм ссавця, у тому числі людини, що потребує лікування, ефективної кількості нових похідних бензиліден-піперидину, що відповідають формулі (I), які є об'єктом цього винаходу, як самих по собі, так і у складі медикаменту.

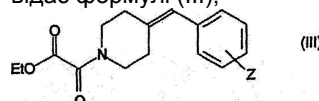
Згідно з цим винаходом, сполуки - аміді карбонових кислот, що відповідають формулі (I), можуть бути приготовані викладеним далі способом.

Для виробництва сполуки, що відповідає формулі (I), де X, Y і Z є такими, що визначені згідно з формулою (I), вторинний амін, що відповідає формулі (II),



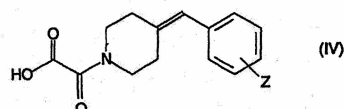
де Z має те саме значення, що визначене у разі формули (I), вступає у реакцію з етилоксалілхлоридом у відповідному підходящому розчиннику у присутності основи,

одержана складно-ефірна сполука, що відповідає формулі (III),

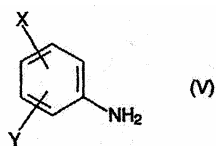


де Z має те саме значення, що визначене у разі формули (I), піддають омиленню під дією лужного гідроксиду і

одержана оксаламідна кислота, що відповідає формулі (IV),



в якій Z має те саме значення, що визначене у разі формули (I), або її хімічно активна похідна, вступає у реакцію з аніліном, що відповідає формулі (V),



в якій значення X і Y відповідають тим самим значенням, що були визначені раніше у разі формули (I),

після чого одержані похідні 4-бензиліденпіперидину, що відповідають формулі (I), в яких значення X, Y, Z відповідають тим значенням, що були визначені у разі формули (I), трансформуються у інші сполуки, що відповідають формулі (I), шляхом введення нових замісних груп, та/або модифікації, або видалення груп, присутніх спочатку, та/або шляхом утворення солі, та/або виділення сполуки зі складу солей, та/або розкладу одержаних рацемічних сполук із використанням оптично активних кислот або основ із застосуванням відомих методів.

Реакція карбонової кислоти, що відповідає формулі (II), та аніліну, що відповідає формулі (V), тобто формування амідного зв'язку, здійснюють краще шляхом утворення активної похідної з карбонової кислоти, що відповідає формулі (II), яка і реагує з аніліном, що відповідає формулі (V), краще у присутності основи.

Перетворення карбонової кислоти на хімічно активну похідну відбувається *in situ* у процесі формування амідного зв'язку в розчиннику (наприклад, диметилформаміді, ацетонітрилі, хлорованих вуглеводнях або вуглеводнях). Хімічно активні похідні можуть являти собою хлориди кислот (одержані, наприклад, з карбонової кислоти і тіонілхлориду), змішані ангідриди (одержані, наприклад, з карбонової кислоти та ізобутилхлороформату в присутності основи, такої як, наприклад, тріетиламін), хімічно активні складні ефіри (одержані, наприклад, з карбонової кислоти та гідроксибензотріазолу і дициклогексилкарбодіміду або О-бензотріазол-1-іл-N,N,N',N'-

тетраметилуроніумгексафторфосфату (HBTU) в присутності основи, такої як, наприклад, тріетиламін). Хімічно активні похідні утворюються у діапазоні температур від кімнатної температури до 0°C. Необхідний час реакції складає 6-20 годин. Реакційну суміш очищують із застосуванням колонкової хроматографії із використанням Kieselgel 60 (Merck) як адсорбенту та відповідного елюенту. Підходящі фракції концентрують з метою одержання чистого продукту. Якість і кількість продукту визначають із використанням методу вискоєфективної рідинної хроматографії, суміщеної з мас селекцією (HPLC-MS метод).

Аніліни, що відповідають формулі (V), є як комерційно доступними, так і можуть бути синтезовані із застосуванням різних відомих методів. Способи синтезу деяких комерційно недоступних анілінів, що відповідають формулі (V), та карбонових кислот, що відповідають формулі (IV), описані у розділі Приклади.

Як було сказано, нові похідні 4-бензиліденпіперидину, що відповідають формулі (I), які є об'єктом цього винаходу, являють собою вискоєфективні та високоселективні антагоністи рецепторів

NMDA, і, більше того, більша частина сполук являє собою селективні антагоністи NR2B підтипу рецепторів NMDA. Для визначення ефективності сполук як NR2B селективних антагоністів NMDA, ми використовували культивовані нейрони кори головного мозку, що експресують переважно рецептори NMDA, які містять субодиницю NR2B. Для підтвердження їхньої селективності використовували клітини HEK-293, трансфектовані комбінацією NR1/NR2A субодиниць. Для вимірювання анальгетичної ефективності *in vivo* та відповідальності за побічні ефекти сильних NR2B селективних антагоністів, автори використовували мишаче формалінове випробування і випробування на рухову активність, відповідно.

Експериментальні протоколи

Експресія рекомбінантних рецепторів NMDA

Для підтвердження NR2B селективності сполук, що означає дослідження їхньої дії на NR2A-вмісні рецептори NMDA, автори випробували найсильніші з них на клітинних лініях, що стійко експресують рекомбінантні рецептори NMDA з композиціями NR1/NR2A субодиниць. кДНК людських NR1 і NR2A субодиниць, субклоновані на індукційно експресійні вектори ссавців, були інтродуковані у HEK 293 клітини, які не містять рецептори NMDA, із використанням катіонного опосередкованого ліпідами методу трансфекції [Biotechniques, 22, 982-987. (1997); Neurochemistry International, 43, 19-29. (2003)]. Стійкість до неоміцину і пігрозину використовували для відбирання клонів, що містять обидва вектори, і, на основі клонів, були одержані моноклональні клітинні лінії, що забезпечують найбільшу відповідь на взаємодію з NMDA. Сполуки випробували на їхню інгібіторну активність відносно NMDA, викликану внутрішньоклітинним кальцієм, яка виражалась у збільшенні сигналу при флуоресцентних вимірюваннях вмісту кальцію. Дослідження проводили через 48-72 годин після додавання індукційного агента. Кетамін (500 мкМ) також був присутній у перебігу індукції з метою не допущення цитотоксичності.

Визначення активності антагоніста NMDA *in vitro* шляхом вимірювання внутрішньоклітинної концентрації кальцію в культурі коркових клітин пацієнта із використанням скандувального Флуориметра для читання планшетів

Вимірювання внутрішньоклітинної концентрації кальцію були здійснені із використанням культур первинних клітин нової кори головного мозку, одержаних з 17 денних ембріонів пацюків Charles River (докладний опис одержання культури клітин кори головного мозку дивись у Johnson, M.I.; Bunge, R.P. (1992): Культура клітин первинних периферійних і центральних нейронів і нейроглії. В: Protocols for Neural Cell Culture, eds: Fedoroff, S.; Richardson A., The Humana Press Inc., 51-75.) Після виділення клітини були розсіяні на стандартні 96-лункові мікропланшети, після чого культури інкубували в атмосфері 95% повітря, 5% CO₂ при 37°C до проведення вимірювань концентрації кальцію.

Культури клітин використовували для вимірювання внутрішньоклітинної концентрації кальцію через 3-7 днів *in vitro*. Вважають, що на цій стадії клітини *in vitro* експресують переважно NR2B-

вміснї рецептори NMDA [Мої. Pharmacol. 45, 846-853. (1994)]. Перед вимірюваннями у клітини вводили флуоресцентний Ca^{2+} -чутливий барвник, Fluo-4/AM (2мкМ). Для зупинення введення барвника у клітини їх двічі промивали розчином, який використовували у перебігу вимірювань (140 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 2 мМ CaCl_2 , 5 мМ HEPES, 5 мМ HEPES-Na, 20 мМ глюкози, 10 мкМ гліцину, pH=7,4). Після промивання до культур клітин додавали випробувані сполуки, розчинені у вказаному вище розчині (90 мкл/лунка). Вимірювання внутрішньоклітинної концентрації кальцію проводили із використанням сканувального флуориметра для читання планшетів: збільшення Fluo-4-флуоресценції, що відповідало збільшенню внутрішньоклітинної концентрації кальцію, індукувалося шляхом введення 40 мкМ NMDA. Інгібіторну активність випробуваних сполук визначали шляхом вимірювання зниження росту концентрації кальцію у присутності різних концентрацій цих

сполук.

Криві залежності доза - ефект і значення IC_{50} визначали із застосуванням даних, одержаний принаймні у трьох незалежних експериментах. Інгібіторна активність сполуки в одній концентраційній точці виражалась як процент інгібування (ослаблення) відповіді NMDA. Як результати були одержані сигмоподібні криві концентрація - інгібування, після чого значення IC_{50} визначали як концентрація сполуки, яка забезпечує інгібування, що дорівнює половині максимального інгібування, забезпеченого цією сполукою.

В таблиці 1 наведені активності більшості ефективних сполук, що є об'єктом цього винаходу, як антагоністів NR2B, визначених у цьому експерименті. В таблиці 2 наведені результати для декількох відомих NR2B специфічних антагоністів і неспецифічного антагоніста рецептора NMDA МК-801.

Таблиця 1

Активність сполук як антагоністів NMDA, виміряна із застосуванням флуориметричного методу із використанням клітин кори головного мозку (NR2B активність) або із використанням трансформованих клітин HEK293 (NR2A активність)

Сполука згідно з Таблицею 5	Клітини кори головного мозку пацюка (NR2B)	Клітини HEK293 (NR2A)
	Наближене значення IC_{50}	Інгібування у кількості 15 мкМ
3	++	-
5	+++	Н.Е.
6	++	-
7	+	-
10	++	-
11	+++	-
12	+++	-
13	++	-
14	++	-
15	+++	-
16	++	-
17	+	-
20	++	-
22	+++	Н.Е.
23	++	-
25	+++	-
26	++	-
27	++	-
30	++	-
32	+++	Н.Е.
33	++	-
35	+++	-
40	+++	Н.Е.
41	+++	Н.Е.
42	+	-
1	+++	Н.Е.

+: IC_{50} між 500 і 1000 нМ

++: IC_{50} між 50 і 500 нМ

+++ : IC_{50} менше 50 нМ

-: Не визначали

Н.Е.: не ефективна, тобто інгібування менше 30%

Таблиця 2

Активність сполук як антагоністів NMDA, виміряна із застосуванням флуориметричного методу із використанням клітин кори головного мозку (NR2B активність) або із використанням трансформованих клітин HEK293 (NR2A активність)

Код відповідної сполуки	Клітини кори головного мозку пацюка		NR1-3/NR2A	
	IC ₅₀ [нМ]	номер	% інгібування у кількості 10 мкМ	номер
CI-1041	6,6	4	21,0	1
Co-101244	23	3	-8,7	1
EMD 95885	35	1	0,1	1
CP-101,606	41	3	2,5	1
Ro 25.6981	159	4	1,0	1
Еритро-іфенпродил	483	5	-2,7	1
МК-801	37	3	IC ₅₀ =386 нМ	2

Відповідні сполуки є такими:

CI-1041: 6-[2-[4-(4-фторбензил)-піперидин-1-іл]-етансульфініл]-3Н-бензооксазол-2-он

Co-101244: 1-[2-(4-гідроксифенокс)етил]-4-гідрокси-4-(4-метилбензил)піперидин

EMD 95885: 6-[3-(4-фторбензил)піперидин-1-іл]пропіоніл]-2,3-дигідро-бензоксазол-2-он

CP-101,606: (18,23)-1-(4-гідроксифеніл)-2-(4-гідрокси-4-феніл)піперидин-1-іл]-1-пропанол

Ro 256981: R-(R*,S*)-1-(4-гідроксифеніл)-2-метил-3-[4-(фенілметил)піперидин-1-іл]-1-пропанол.

Іфенпродил: еритро-2-(4-бензил)піперидино)-1-(4-гідроксифеніл)-1-пропанол МК-801: (+)-5-Метил-10,11-дигідро-5Н-добензо[а,с]циклопентен-5,10-імін

Мишаче формалінове випробування для вимірювання *in vivo* ефективності

Відомо, що ін'єкція розведеного формаліну у задню лапу пацюка або миші обумовлює появу та розвиток двофазної поведінки, пов'язаної з болем, інтенсивність якої вимірюють як час, витрачений на зализування/кусання пораненої лапи. Другу фазу, як правило, визначають як пов'язані з болем події, детектовані у 15-60 хвилинному інтервалі після ін'єкції формаліну, максимальну інтенсивність яких спостерігають у часовій точці близько 30 хвилин. Відомо, що рецептори NMDA залучені до другої фази відповіді на ін'єкцію формаліну, і ця поведінкова відповідь є чутливою до блокування рецепторів NMDA [Dickenson, A. and Besson J.-M. (Editors): Chapter 1, pp. 6-7: Animal models of Analgesia; and Chapter 8, pp. 180-183: Mechanism of Central Hypersensitivity: Excitatory Amino Acid Mechanisms and Their Control - In Pharmacology of Pain. Springer-Verlag (Berlin) 1997.] Таким чином, автори використовували другу фазу формалінового випробування для визначення ефективності сполук *in vivo*. Вважають, що інгібування другої фази відповіді відображає анальгетичний ефект проти тривалого хімічно-індукованого болю [Hunkler, S., et al.: Formalin Test in Mice, a Useful Technique for Evaluating Mild Analgesics, Journal of Neuroscience Methods, 14 (1985) 69-76.]

Використовували самців мишей лінії NMRI (20 - 25 г). Тварини не одержували будь-якої твердої

їжі впродовж приблизно 16 годин перед експериментом, але мали вільний доступ до 20% розчину глюкози. Далі тварини одержували 1 годинний період акліматизації (звикання) у скляному циліндрі (сс. 15 см у діаметрі), потім їх клали у такий самий циліндр з розташованим ззаду дзеркалом для полегшення спостереження. Випробувані сполуки суспендували у 5% tween-80 (10 мл на кг маси тіла) і вводили перорально шляхом годування за 15 хвилин до ін'єкції формаліну (20 мкл 1% формаліну у 0,9% розчині хлориду натрію у воді (фізіологічному розчині) вводили у вигляді підшкірної ін'єкції у дорзальну поверхню правої задньої лапи). Час, витрачений на зализування та кусання пораненої лапи, при проведенні вимірювань, складав від 20 до 25 хвилин після ін'єкції формаліну. Для визначення величини ED₅₀ різні дози (принаймні п'ять різних доз) випробуваних сполук давали групам по 5 мишей, і результати виражали як проценти зменшення часу, витраченого на зализування, порівняно з контрольною групою, якій давали лише розріджувач, за якою спостерігали у той самий день. Величини ED₅₀ (тобто дози, що викликають зменшення на 50 %) рахували із застосуванням методу підбору сигмоїдальної кривої за Больцманом (Boltzman's sigmoidal curve fitting).

Вимірювання мимовільної рухової активності у мишей В експериментах використовували самців мишей лінії NMRI, які важать 20-22 г.

Мимовільну рухову активність вимірювали із використанням чотириканального контролера активності. Установка, яка складається з чотирьох акрилових клітин (43см x 43см x 32см), обладнана 2x16 парами фотоелементів вздовж усієї нижньої осі клітки. Додатковий набір фотоелементів (16 пар) клали вздовж двох протилежних боків клітки на висоті 10 см з метою фіксування відповіді у вигляді піднімання на задні лапи.

Експериментальні групи складалися з 10 тварин. Через тридцять хвилин після перорального прийняття випробуваної сполуки або розчинника (tween-80) тварин клали індивідуально в одну з чотирьох кліток на одну годину. Горизонтальні та вертикальні пересування визначали як число переривань променя всередині 15 хвилинних інтер-

валів впродовж однієї години.

Для кожної групи рахували середні \pm стандартна помилка дані горизонтальної та вертикальної рухової активності, після чого були визначені відхилення від контрольної (що одержувала розчинник) групи, виражені у процентах. Вважали, що сполука викликає стимуляцію рухової активності, коли її ефект перевищує 50% збільшення кількості переривань променя. Відповідно, дози, визначені як такі, що не мають стимулюючого ефекту (LMA-free), викликали менше, ніж 50% збільшення.

Таблиця 3 ілюструє результати, одержані для

деяких вибраних сполук, що є об'єктом цього винаходу (верхня таблиця), і для їхніх близьких бензил-піперидинових аналогів (нижня таблиця) у перебігу анальгетичного випробування і випробування на рухову активність. [A=2-(4-бензилпіперидин-1-іл)-2-оксо-N-(2-оксо-2,3-дигідро-бензоксазол-6-іл)-ацетамід і B = 2-[4-[4-метилбензил)-піперидин-1-іл]-2-оксо-N-(2-оксо-2,3-дигідро-1H-індол-5-іл)-ацетамід]. Таким чином, пари 1 - A і 24 - B відрізняються лише наявністю подвійного зв'язку замість одинарного.

Таблиця 3

Характеризування двох типів антагоністів NR2B у перебігу формалінового випробування і випробування на рухову активність (LMA test). Обчислення терапевтичних індексів (TI)

Бензил іден-піперидини				
	Формалін	LMA		TI
Сполука згідно з Таблицею 5	ED ₅₀ мг/кг	Доза мг/кг	% збільшення	LMA _{free} /ED ₅₀
1	1,3	60	35*	46
		120	69	
24	0,94	60	13*	>64

Бензил-піперидини				
	Формалін	LMA		TI
Відповідна речовина	ED ₅₀ мг/кг	Доза мг/кг	% збільшення	LMA _{free} /ED ₅₀
A	0,85	1	34*	<1,2
		3	62	
B	0,48	3,75	72	<8
		7,5	141	

* Менше ніж 50% вважають як відсутність побічних ефектів

В таблиці 4 наведені дані анальгетичного випробування і випробування на рухову активність для неселективного антагоніста рецептора NMDA

MK-801 і NR2B селективних антагоністів CI-1041 (Soc Neurosci Abst 2000, 26(Part 2): Abst 527.4.), CP-101,606 і Ro-256981.

Таблиця 4

Характеризування відповідних сполук антагоністів NMDA у перебігу формалінового випробування та випробування на рухову активність (випробування LMA). Обчислення терапевтичних індексів (TI)

Відповідні сполуки				
	Формалін	LMA		TI
Код відповідної сполуки	ED ₅₀ мг/кг	Доза мг/кг	% збільшення	LMA _{free} /ED ₅₀
MK-801	0,15	0,1	114	<1
		0,3	217	
CI-1041	2,4	10	137	<4
Ro 25-6981	>20*			
CP-101,606	>20*			

* CP-101,606 і Ro-256981 призвели до лише 38% і 12% послаблення формалінової відповіді, відповідно, у кількості 20 мг/кг.

Можна бачити, що неселективний антагоніст рецептора NMDA, MK-801, призводить до збільшення рухової активності у фармакологічно активному діапазоні дозувань. Цей LMA стимулюючий ефект є вкрай важким побічним ефектом. Певні NR2B селективні антагоністи такі, як відповідна

сполука CI-1041, або бензил-перидинової сполуки [A=2-(4-бензил-піперидин-1-іл)-2-оксо-N-(2-оксо-2,3-дигідро-бензоксазол-6-іл)-ацетамід і B=2-[4-[4-метил-бензил)-піперидин-1-іл]-2-оксо-N-(2-оксо-2,3-дигідро-1H-індол-5-іл)-ацетамід], описані у заявці WO 2003010159, також показують не-

лику різницю у дозах, що забезпечують знеболювання (анальгетичний ефект), і дозах, що стимулюють рухову активність. Дивним є те, що бензиліден-піперидинові аналоги цих сполук, тобто сполуки, що є предметом цього винаходу, не викликають підвищеної активності аж до дуже високих доз (таблиця 3). В той час як терапевтичні індекси (TI) випробуваних бензил-піперидинів з високою *in vivo* ефективністю перебувають в межах від 1 до 8, терапевтичні індекси (TI) їхніх бензиліден-піперидинових аналогів перебувають у значно більш високій ділянці, між 46 і 64, або навіть вище. Не очікували, що результатом, здавалося б, незначних структурних змін виявиться така разюча відмінність.

Антагоністи NR2B з високим TI можуть, зокрема, бути корисними при медикаментозному лікуванні хвороб, що можуть бути лікувані антагоністами NR2B. Серед бензил-піперидинів існують сполуки з високою ефективністю і з високим терапевтичним індексом на моделі тривалого болю. Сполуки, що є об'єктом цього винаходу, мають набагато більш підходящі характеристики, що стосуються терапевтичного використання, порівняно до раніше запатентованих сполук.

Розлади, які можуть бути успішно лікувані антагоністами рецепторів NMDA, що діють по сайтах, які містять NR2B, як це було нещодавно описано Loftis [Pharmacology & Therapeutics, 97, 55-85(2003)], мають у своєму складі шизофренію, хворобу Паркінсона, хворобу Хантингтона, підвищену цитотоксичність, викликану гіпоксією та ішемією, припадки, залежність від ліків та біль, особливо невропатичний, запальний та внутрішній біль будь-якої природи [Eur. J. Pharmacol. 429, 71-78(2001)].

Завдяки малій тяжкості їхніх побічних ефектів порівняно з неселективними антагоністами NMDA, селективні антагоністи NR2B можуть приносити користь при тих захворюваннях, при яких можуть бути ефективними антагоністи NMDA, таких як боковий аміотрофічний склероз (хвороба Шарко) [Neurol. Res., 21, 309-12 (1999)], абстинентні синдроми з причини, наприклад, алкоголю, синтетичних наркотичних препаратів (опіоїдів) або кокаїну [Drug and Alcohol Depend., 59, 1-15 (2000)], м'язові спазми [Neurosci. Lett., 73, 143-148 (1987)], слабумство різного походження [Expert Opin. Investig. Drugs, 9, 1397-406 (2000)], тривога, депресія, мігрень, гіпоглікемія, дегенеративні розлади сітківки (наприклад, CMV ретиніт), глаукома, астма, дзвін у вухах, втрата слуху [Drug News Perspect 11, 523-569 (1998)] і міжнародна заявка на патент WO 00/00197].

Таким чином, ефективні кількості сполук, що є об'єктом цього винаходу, можуть з успіхом бути застосовані при лікуванні травматичних пошкоджень мозку або спинного мозку, толерантності та/або залежності до лікування болю із застосуванням синтетичних наркотичних препаратів (опіоїдів), абстинентних синдромів залежності від ліків, залежності від, наприклад, алкоголю, синтетичних наркотичних препаратів (опіоїдів) або кокаїну, ішемічних розладів ЦНС, хронічних нейродегенеративних розладів, таких як, наприклад,

хвороба Альцгеймера, хвороба Паркінсона, хвороба Хантингтона, болю і хронічних больових станів, таких як, наприклад, невропатичний біль.

Сполуки, що є об'єктом цього винаходу, також як і їхні фармацевтично прийнятні солі, можуть бути використані як самі по собі, так і, відповідно, у складі фармацевтичних композицій. Ці композиції (ліки) можуть бути у твердій, рідкій або напіврідкій формах, крім того, до них можуть входити фармацевтичні допоміжні лікарські речовини і допоміжні матеріали, які широко використовують на практиці, такі як носії, формоутворювальні речовини, розріджувачі, стабілізатори, зволожувальні або емульгуювальні агенти, речовини, що впливають на рН- і осмотичний тиск, духмян[або ароматизувальні речовини, рівно як і добавки, що активують композицію, та добавки, що доставляють композицію.

Дозування, необхідне для забезпечення терапевтичного ефекту, може варіюватися всередині широких меж, і оптимізуватиметься під індивідуальні вимоги у кожному конкретному випадку залежно від стадії захворювання, стану і маси тіла пацієнта, що потребує лікування, так само як і від чутливості пацієнта до активної речовини, способу введення та щоденної частоти прийняття препарату. Точна доза активної речовини, необхідна та підходяща для застосування, може бути безпомилково визначена лікуючим лікарем, досвідченим у цій галузі техніки, і який має повну інформацію про пацієнта, що потребує лікування.

Фармацевтичні композиції, які містять активну речовину, згідно з цим винаходом містять, як правило, від 0,01 до 100 мг активної речовини в одиничній лікарській одиниці. Само собою, можливо, що кількість активної речовини у деяких композиціях виходить за верхні або нижні межі вказаного вище діапазону.

Тверді форми фармацевтичних композицій можуть являти собою, наприклад, таблетки, драже, капсули, пілюлі або ампули, що містять ліофілізовані порошки, придатні для приготування ін'єкцій. Рідкі композиції являють собою придатні для ін'єкцій і вливань композиції, рідкі медикаменти, капсули з рідким вмістом і краплі. Напіврідкі композиції можуть являти собою мазі, бальзами, креми, збовтувані мікстури та супозиторії.

Виходячи з міркувань зручності застосування, є придатним, якщо фармацевтичні композиції вміщують в себе дозувальні одиниці, що мають у своєму складі таку кількість активної речовини, яка придатна для однократного прийняття, або декількох повторних прийнять їхньої половини, третини або чверті. Такими лікарськими одиницями можуть бути, наприклад, таблетки, які можуть бути покриті борозенками, що дозволяють розламувати їх навпіл або на чотири частини з метою прийняття суворо необхідної кількості активної речовини.

Таблетки можуть бути покриті шаром, що розчиняється в кислоті, який гарантує вивільнення активної речовини, що міститься у таблетці, після проходження таблетки крізь шлунок. Такі таблетки покриті енттеросолюбильною оболонкою.

Такий саме ефект може бути також досягнутий при інкапсулюванні активної речовини.

Фармацевтичні композиції, придатні для перорального застосування, можуть містити, наприклад, лактозу або крохмаль як формоутворювальні речовини, натрієву сіль карбоксиметилцелюлози, метилцелюлозу; полівініл піролідон або крохмальну пасту як зв'язуючі речовини або гранулювальні агенти. Картопляний крохмаль або мікрокристалічну целюлозу додають як дезінтегрувальні агенти, але також можуть бути додані ультраамілопектин або формальдегідказеїн. Тальк, колоїдна кремнієва кислота, стеарин, стеарати кальцію або магнію можуть бути застосовані як антиадгезивні та мастильні речовини.

Таблетки можуть бути виготовлені, наприклад, шляхом вологого гранулювання з подальшим спресовуванням. Змішані активні речовини та наповнювачі, так само як і, у цьому разі, частина дезінтегрувальних речовин, піддаються гранулюванню із застосуванням водного, спиртового або водно-спиртового розчину зв'язуючих речовин, із використанням відповідного обладнання, після чого грануляти піддають висушуванню. До висушеного гранулята додають інші дезінтегрувальні речовини, мастильні речовини та антиадгезивні агенти, після чого суміш спресовують у таблетку. У цьому разі таблетки виготовляють з борозенкою посередині, що полегшує прийняття препарату.

Таблетки можуть бути виготовлені безпосередньо із суміші активної речовини і підходящих допоміжних речовин шляхом спресовування. У цьому разі, таблетки можуть бути покриті додатковими речовинами, які широко застосовують у фармакологічній практиці, такими як, наприклад, стабілізатори, ароматизатори, барвники, такі як цукор, похідні целюлози (метил- або етилцелюлоза, натрієва сіль карбоксиметилцелюлози тощо), полівінілпіролідон, фосфат кальцію, карбонат кальцію, харчові барвники, харчові добавки, ароматизувальні речовини, пігменти на основі окису заліза тощо. У разі капсул, суміш активної речовини та допоміжних речовин уміщують всередині капсул.

Рідкі композиції, призначені для перорального застосування, такі як, наприклад, суспензії, сиропи, еліксири, можуть бути приготовані із застосуванням води, гліколів, масел, спиртів, барвників та ароматизувальних речовин.

Композиції, призначені для ректального застосування, виготовляють у вигляді супозиторіїв або розчинів для клізм. Супозиторії, крім активної речовини, можуть мати у своєму складі носій, так звані основи для супозиторіїв (adeps pro suppository). Носіями можуть бути рослинні олії, такі як гідровані рослинні олії, тригліцериди C₁₂-C₁₈ жирних кислот (краще носії, що мають торгову назву Witepsol). Активна речовина гомогенним чином змішується з подрібненою основою для супозиторіїв, після чого формуються супозиторії.

Композиція, призначена для парентерального застосування, приготована у вигляді розчину для ін'єкцій. Для приготування розчину для ін'єк-

цій активні речовини розчиняють у дистильованій воді та/або у різних органічних розчинниках, таких як гліколієві ефіри, у цьому разі, у присутності солюбілізаторів, таких як, наприклад, поліоксіетиленсорбітан-монолаурат, -моноолеат або моностеарат (Tween 20, Tween 60, Tween 80). Розчин для ін'єкцій може також містити різні допоміжні речовини, такі як консервувальні агенти, наприклад, етилендіамінтетраацетат, також як і pH регулювальні агенти та буфери і, у цьому разі, місцеву анестезувальну речовину, таку як, наприклад, лідокаїн. Розчин для ін'єкцій, що містить активну речовину, яка є об'єктом цього винаходу, перед уміщуванням в ампули піддають фільтруванню, і стерилізують після уміщування в ампулу.

Якщо активна речовина є гігроскопічною, у такому разі вона може бути стабілізована шляхом ліофілізації.

Характеристичний метод

Сполуки, що є об'єктом цього винаходу, були охарактеризовані із застосуванням високоефективної рідинної хроматографії, суміщеної із мас селективним детектором (LC/MS) із використанням HP 1100 бінарно градієнтної хроматографічної системи із пристроєм відбирання проб з мікропланшету (Agilent, Waldbronn), керованої комп'ютерною програмою ChemStation. HP діодний променевий детектор (diode array (діодна матриця) detector) використовували для реєстрації ультрафіолетових (УФ) спектрів при 225 і 240 нм. Всі експерименти були проведені із використанням HP MSD (Agilent, Waldbronn) однопроменевого чотириканального спектрометра (single quadrupole spectrometer), обладнаного джерелом для електророзсіювальної іонізації для встановлення структури.

Синтезовані продукти були розчинені у 1 мл DMSO (Aldrich, Німеччина). 100 мкл кожного розчину було розріджено DMSO до об'єму 1000 мкл. Експерименти із аналітичної хроматографії були проведені на колонці Discovery RP C-16 Amide, 5 см x 4,6 мм x 5 мкм фірми Supelco (Bellefonte, Пенсильванія) при швидкості потоку, що дорівнює 1 мл/хвилину для гарного дозволу. Одержані сполуки були охарактеризовані за величиною їхнього k' фактору (чистота, коефіцієнт ємності). Фактори k' обчислювали згідно з такою формулою:

$$k' = (t_R - t_0)/t_0$$

де k' - коефіцієнт ємності, t_R = час утримування і t₀ = час утримування елюенту.

Як елюент А використовували трифторацетилу кислоту (TFA) (Sigma, Німеччина), що містить 0,1% води, як елюент В використовували 95% ацетонітрил (Merck, Німеччина), що містить 0,1% TFA і 5% елюенту А. Використовували градієнтну елюцію, що починалася з 100% елюенту А і продовжувалася до 100% елюенту В, що тривала впродовж 5 хвилин.

Наведені нижче приклади ілюструють цей винахід, жодним чином не обмежуючи його.

Приклад 1

2-(4-бензиліден-піперидин-1-іл)-2-оксо-N-(2-оксо-2,3-дигідро-бензооксазол-6-іл)-ацетамід

1 а) 1-Бензил-4-бензиліден-піперидин

В атмосфері аргону до збовтаного розчину 133,2 г (704 ммоль) N-бензил-4-піперидону (Aldrich) і 161 г (705 ммоль) діетилового ефіру бензил-фосфонові кислоти (Aldrich) у 1350 мл диметилформаміду при 0°C додають 40,5 г (60%, 37,5 ммоль) гідриду натрію. Реакційну суміш перемішують впродовж 2 годин при 20°C, потім у неї краплями додають 100 мл етилового спирту, суміш виливають у 1500 мл води та екстрагують діетиловим ефіром. Органічний шар висушують над сульфатом натрію і концентрують. Неочищений продукт використовують на наступній стадії. Точка плавлення: масло.

1b) 4-бензиліден-піперидин гідрохлорид

До збовтаного розчину раніше одержаного неочищеного 1-бензил-4-бензиліден-піперидину (~704 ммоль) у 2 л дихлоретану при 0°C краплями додають 80 мл (741 ммоль) 1-хлоретилхлороформату. Реакційну суміш перемішують при 0°C впродовж 1 години і піддають перегонці зі зворотним холодильником впродовж 1 години, після чого суміш концентрують і осад розчиняють в 1 літрі метанолу, що зазнав перегонки зі зворотним холодильником впродовж 1 години. Реакційну суміш концентрують і осад кристалізують у присутності ацетону до досягнення виходу, що відповідає 103,25 г (70,1%) вказаної у заголовку сполуки. Точка плавлення: 186°C (ацетон).

1с) етиловий ефір (4-бензиліден-піперидин-1-іл)-оксо-оцтової кислоти

До збовтаного розчину 103,25 г (0,492 моль) 4-бензиліден-піперидин гідрохлориду і 144,55 мл (1,039 моль) тріетиламіну у 1 л хлороформу при температурі нижче 10°C краплями додають 55,75 мл (0,499 моль) етилоксалілхлориду, і реакційну суміш перемішують впродовж 1 години при кімнатній температурі. Потім до суміші додають 200 мл води і 200 мл 8% розчину гідрокарбонату натрію, органічний шар відокремлюють, висушують над сульфатом натрію і концентрують. Неочищений

продукт використовують на наступній стадії. Точка плавлення: масло.

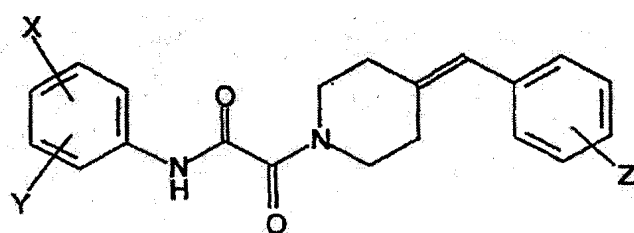
1d) (4-бензиліден-піперидин-1-іл)-оксо-оцтова кислота

До збовтаного розчину раніше одержаного неочищеного етилового ефіру (4-бензиліден-піперидин-1-іл)-оксо-оцтової кислоти (~0,492 моль) у 200 мл етилового спирту додають розчин 27,6 г (0,69 моль) гідроксиду натрію у 300 мл води і 500 мл етилового спирту. Реакційну суміш перемішують впродовж 1 години при кімнатній температурі, після чого охолоджують і підкислюють хлористоводневою кислотою. Твердий осад збирають, промивають водою до досягнення виходу, що відповідає 107,32 г (88,9%) вказаної у заголовку сполуки. Точка плавлення: 125°C (етанол-вода).

1е) 2-(4-бензиліден-піперидин-1-іл)-2-оксо-N-(2-оксо-2,3-дигідро-бензооксазол-6-іл)-ацетамід

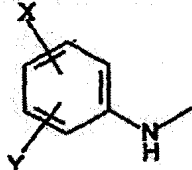
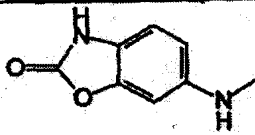
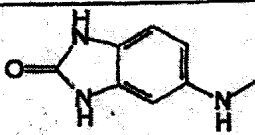
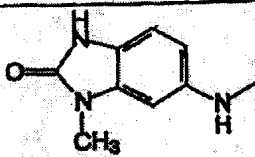
Суміш, що складається з 49 мг (0,2 ммоль) (4-бензиліден-піперидин-1-іл)-оксо-оцтової кислоти, 33 мкл (0,24 ммоль) тріетиламіну, 30 мг (0,2 ммоль) 6-аміно-3H-бензоксазол-2-ону [J. Chem. Soc, 321. (1938)], 79,6 мг (0,21 ммоль) HBTU [0-бензотріазол-1-іл-N,N,N',N'-тетраметилуроніумгексафторфосфату (Advanced Chem. Tech.)] і 1 мл диметилформаміду, перемішують впродовж 24 годин при кімнатній температурі. Реакційну суміш очищують за допомогою хроматографії на колонці із використанням силікагелю Kieselgel 60 (Merck) як абсорбента і суміші толуол: метиловий спирт = 4 : 1 як елюенту. Якість і кількість продукту визначають із використанням методу високоефективної рідинної хроматографії, суміщеної з мас селекцією (HPLC-MS спосіб), як це було описано вище, $k' = 9,66$.

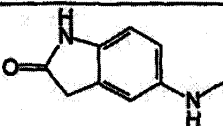
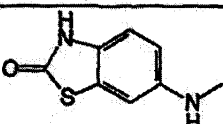
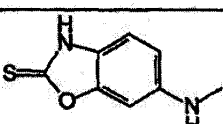
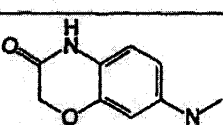
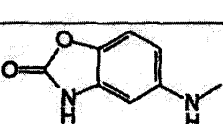
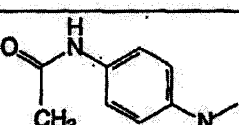
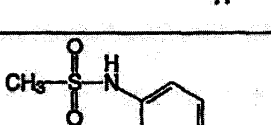
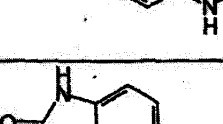
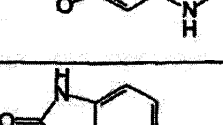
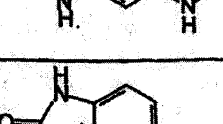
Застосовуючи описану вище процедуру, автори синтезували такі сполуки, що відповідають формулі (I):

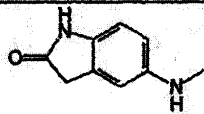
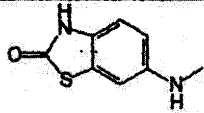
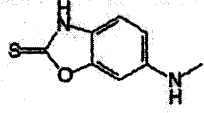
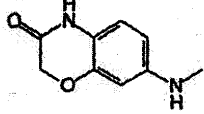
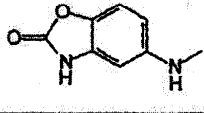
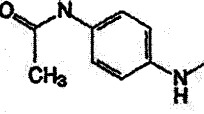
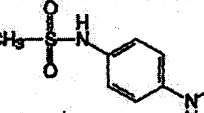
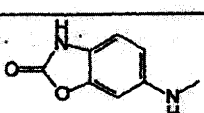
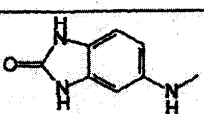
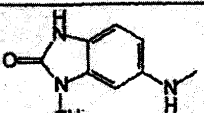


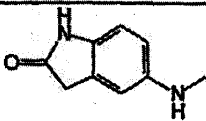
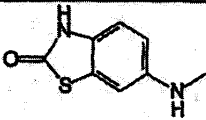
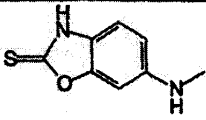
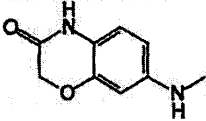
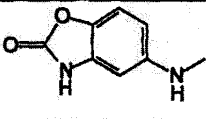
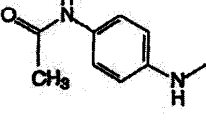
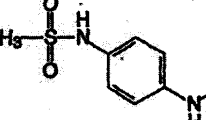
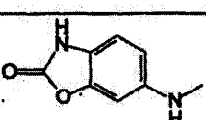
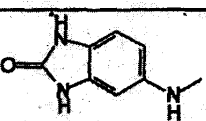
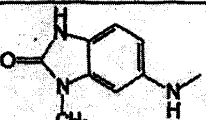
(I)

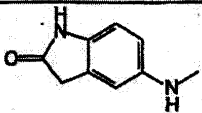
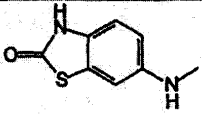
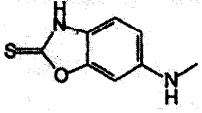
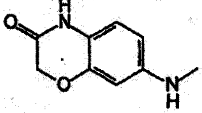
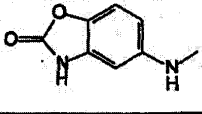
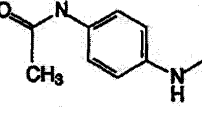
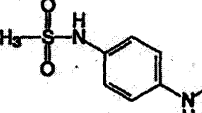
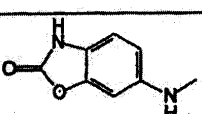
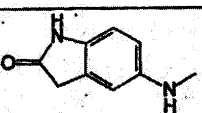
Таблица 5

No.		Z	k'
1		H	9.66
2		H	8.694
3		H	9.29

4		H	8.99
5		H	10.27
6		H	10.66
7		H	9.78
8		H	9.73
9		H	9.385
10		H	9.55
11		4-Cl	10.73
12		4-Cl	10.01
13		4-Cl	10.38

14		4-Cl	10.18
15		4-Cl	11.29
16		4-Cl	11.62
17		4-Cl	10.766
18		4-Cl	10.656
19		4-Cl	10.52
20		4-Cl	10.74
21		4-CH ₃	10.69
22		4-CH ₃	9.48
23		4-CH ₃	10.06

24		4-CH ₃	10.05
25		4-CH ₃	10.97
26		4-CH ₃	11.4
27		4-CH ₃	10.44
28		4-CH ₃	10.3
29		4-CH ₃	10.21
30		4-CH ₃	10.44
31		4-CH ₃ O	9.58
32		4-CH ₃ O	8.86
33		4-CH ₃ O	9.27

34		4-CH ₃ O	9.05
35		4-CH ₃ O	10.27
36		4-CH ₃ O	10.73
37		4-CH ₃ O	9.65
38		4-CH ₃ O	9.542
39		4-CH ₃ O	9.39
40		4-CH ₃ O	9.64
41		4-F	8.29
42		4-F	7.77

Приклад 2

Приготування фармацевтичних композицій:

а) Таблетки:

0,01-50% активної речовини, що відповідає формулі (I), 15-50% лактози, 15-50% картопляного крохмалю, 5-15% полівініл піролідону, 1-5% тальку, 0,01-3% стеарату магнію, 1-3% колоїдного двоокису кремнію і 2-7% ультраамілопектину змішують, після чого гранулюють методом мокро-го гранулювання та спресовують у таблетки.

б) Драже, таблетки з плівковим покриттям:

Таблетки, виготовлені описаним вище способом, покривають шаром, що складається з енто-ро- або гастросолюбильної плівки, або з цукру і тальку. Драже натирають сумішшю воску з кар-наубським воском.

с) Капсули:

0,01-50% активної речовини, що відповідає формулі (I), 1-5% лаурилсульфату натрію, 15-50% крохмалю, 15-50% лактози, 1-3% колоїдного

двоокису кремнію і 0,01-3% стеарату магнію, ретельно перемішують, суміш пропускають крізь сито і уміщують всередині капсул з твердого желатина.

д) Суспензії:

Інгредієнти: 0,01-15% активної речовини, що відповідає формулі (I), 0,1-2% гідроксиду натрію, 0,1-3% лимонної кислоти, 0,05-0,2% ніпагіну (метил 4-гідроксибензоату натрію), 0,005-0,02% ніпазолу, 0,01-0,5% карбополу (поліакрилату), 0,1-5% 96% етанолу, 0,1-1% ароматизувального агенту, 20-70% сорбітолу (70% водний розчин) і 30-50% дистильованої води.

До розчину ніпагіну і лимонної кислоти у 20 мл дистильованої води, у малих кількостях при сильному перемішуванні додають карбопол, і розчин залишають для відстоювання на 10-12 годин. Потім, при перемішуванні, додають гідроксид натрію у 1 мл дистильованої води, водний розчин сорбітолу і, в останню чергу, малиновий

ароматизатор на основі етилового спирту. До цього носія у малих кількостях додають активну речовину, після чого суспендують за допомогою гомогенізатора, що занурюється. В кінці суспензію доводять дистильованою водою до бажаного кінцевого об'єму, і суспензійний сироп пропускають крізь обладнання типу колоїдного млина.

е) Супозиторії:

Для виготовлення кожного супозиторію ретельно перемішують 0,01-15% активної речовини, що відповідає формулі (I) і 1-20% лактози, після чого подрібнюють 50-95% основи для супозиторіїв (adepts pro suppository) (наприклад, Witepsol 4), охолоджують до 35°C і суміш активної речовини і лактози змішують із застосуванням гомогенізатора. Одержану суміш відливають в охолоджені форми.

ф) Композиції у вигляді ліофілізованого порошку, уміщеного в ампулу: Готують 5% розчин манітолу або лактози на бідистильованій воді, призначений для застосування при ін'єкціях, після чого цей розчин фільтрують для одержання стерильного розчину. 0,01-5% розчин активної речовини, що відповідає формулі (I), також готують на бідистильованій воді, призначений для використання при ін'єкціях, після чого цей розчин фільтрують для одержання стерильного розчину. Два цих розчини змішують у стерильних умовах, уміщують в ампули в аліквотах, що дорівнюють 1 мл, вміст ампул ліофілізують, і ампули запаюють в атмосфері азоту. Перед введенням пацієнту вміст ампул розчиняють стерильною водою або 0,9% (фізіологічним) стерильним водним розчином хлориду натрію.