



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **64860** (13) **U**
(51) **МПК (2011.01)**
C07D 455/00
A61K 31/517 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОЛУКА 2-АМІНО- 3-(4-ФТОРБЕНЗОІЛ)-N-[3-(4-МОРФОЛІНІЛ)ПРОПІЛ]-1-ІНДОЛІЗИНКАРБОКСАМІД, ЩО ПРОЯВЛЯЄ $[Ca^{2+}]_i$ -ДЕСЕНСИТИЗУЮЧУ АКТИВНІСТЬ

1

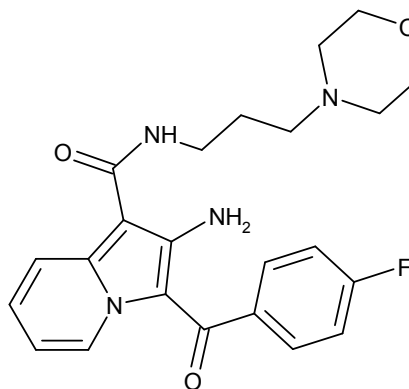
2

(21) u201103786

(22) 29.03.2011

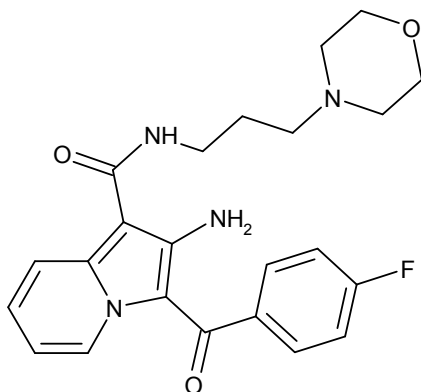
(24) 25.11.2011

(46) 25.11.2011, Бюл.№ 22, 2011 р.

(72) ДЕМЧЕНКО АНАТОЛІЙ МИХАЙЛОВИЧ,
ХАЙРУЛІН АНДРІЙ РАШИДОВИЧ, БОБКОВА
ЛЮДМИЛА СТАНІСЛАВІВНА, СОЛОВІЙОВ
АНАТОЛІЙ ІВАНОВИЧ, ЗЕЛЕНСЬКИЙ СЕРГІЙ
МИКОЛАЙОВИЧ(73) ІНСТИТУТ ФАРМАКОЛОГІЇ ТА ТОКСИКОЛОГІЇ
АМН УКРАЇНИ(57) Сполука 2-аміно-3-(4-фторбензоіл)-N-[3-(4-
морфолініл)пропіл]-1-індолізинкарбоксаміду
структурної формули:

що проявляє $[Ca^{2+}]_i$ -десенситизуючу активність.

Корисна модель належить до фармацевтичної хімії та медицини, а саме до одержання біологічно активної речовини 2-аміно-3-(4-фторбензоіл)-N-[3-(4-морфолініл)пропіл]-1-індолізинкарбоксаміду загальної формули:



що проявляє здатність впливати на тонус кровоносних судин як $[Ca^{2+}]_i$ -десенситайзер, що дозволяє передбачити можливість її використання в практичній медицині для лікування судинних дисфункцій, а саме при вазоспастичних станах різного генезу.

На сьогодні серед основних причини смертності і втрати працездатності населення продовжують домінувати серцево-судинні захворювання та артеріальна гіпертензія різного генезу, які пов'язані з порушеннями вазомоторики судинної стінки. Тривалий час вважали, що головною умовою розвитку скорочення як судинних, так і всіх інших гладеньком'язевих клітин (ГМК) є зростання концентрації іонів кальцію в міоплазмі $[Ca^{2+}]_i$ [1-3]. Однак, хоча скорочення судинних ГМК ініціюється іонами кальцію, їх кількість не завжди пропорційна амплітуді тонічного скорочення [4]. Останнім часом значна увага приділяється питанням регуляції судинного тонусу за участю шляхів, які прямо не пов'язані із змінами концентрації іонів кальцію в міоплазмі, але які відіграють величезну роль у формуванні судинного тонусу як за фізіологічних, так і за патологічних умов. За останні роки з'ясувалося, що однією із ключових ланок в цих механізмах є регуляторний фермент - протеїнкіназа С (ПКС), що має велику кількість білків-мішеней в судинних ГМК, регулюючи чутливість їх скоротливих елементів до іонів кальцію, іонний обмін через сарколему, а також впливаючи на тонус ГМК через зміни фізіологічної активності ендотеліальних

(13) **U**(11) **64860**(19) **UA**

клітин [5]. Надзвичайно широкий спектр регуляторної дії ПКС на тонус судинної стінки повною мірою проявляється за умов розвитку гіпертензивних станів різного ґенезу, де він залучений до формування гіпертонусу ГМК. Розробка нових лікарських засобів, що здатні впливати на активність ПКС дозволить створити принципово новий клас антигіпертензивних препаратів із направленою дією - $[Ca^{2+}]_i$ десенситайзерів.

Відомий потужний інгібітор $[Ca^{2+}]_i$ (- залежної) ПКС - хелеритрин (Chelerythrine chloride-1,2-диметокси-12-метил-[1,3] бензодіоксо[5,6-с]-фенантридин хлорид, $C_{21}H_{18}ClNO_4$) [6].

Хелеритрин характеризується наступними показниками $[Ca^{2+}]_i$ десенситизуючої активності, визначеної при одночасній реєстрації скорочувальної активності та внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію:

- у концентрації 10^{-5} моль/л викликає розслаблення ГМ аорти щурів попередньо активованих фенілефрином, на 30 %;

- одночасно з ефектом розслаблення ГМ відсутнє зниження концентрації внутрішньоклітинних іонів кальцію ($[Ca^{2+}]_i$), рівень якої не тільки не знижується, але дещо зростає, тобто має місце яскраво виражений ефект дисоціації між концентрацією $[Ca^{2+}]_i$ та силою скорочень судин;

- Токсичність LD_{50} 20 мг/кг (білі миші-самці масою 17-19) г).

В основу корисної моделі поставлено задачу пошуку нової хімічної речовини, що проявить $[Ca^{2+}]_i$ десенситизуючу дію, а також буде характеризуватися низькою токсичністю.

Поставлена задача вирішується тим, що як нову хімічну речовину запропоновано сполуку 2-аміно-3-(4-фторбензоїл)-N-[3-(4-морфолініл)пропіл]-1-індолізинкарбоксамід (сполука 1, шифр ІФТ000004).

Оцінку $[Ca^{2+}]_i$ -десенситизуючої активності 2-аміно-3-(4-фторбензоїл)-N-[3-(4-

морфолініл)пропіл]-1-індолізинкарбоксаміду (сполука 1) проводили за методом одночасної реєстрації скорочувальної активності гладеньких м'язів (ГМ) сегментів кровоносних судин та внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію у ГМК деендотелізованих судин грудного відділу аорти щурів-самців лінії Вістар-Кіото масою (230 ± 30) г на фоні активації фенілефрином.

Сполука 1 у концентрації 10^{-5} моль/л викликає розслаблення гладеньких м'язів судин в середньому на $(49,8 \pm 5,9)\%$ відносно до максимального значення скорочення судин фенілефрином (10^{-7} моль/л) при статистично достовірній відсутності зниження рівня внутрішньоклітинного кальцію, тобто може бути класифікована як Ca^{2+}_i десенситайзер.

Вимірювання внутрішньоклітинної концентрації кальцію проводили флуоресцентним методом з використанням барвника Fura-2 за співвідношенням:

$$[Ca^{2+}]_i = K_d(R - R_{min}) / (R_{max} - R) (I_{380(F)} / I_{380(B)})_i,$$

де K_d - константа дисоціації Fura-2 з кальцієм;

$R = I_{340nm} / I_{380nm}$ - відношення інтенсивності флуоресценції. При опроміненні досліджуваного об'єкта ультрафіолетом з довжиною хвилі 340 nm (I_{340nm}) та 380 nm (I_{380nm}) відповідно;

R_{min} - відношення інтенсивностей при відсутності у міоплазмі іонів кальцію;

R_{max} - граничне значення R, виміряне при насичуючій концентрації $[Ca^{2+}]_i$;

$I_{380(F)}$ та $I_{380(B)}$ - значення I_{340nm} та I_{380nm} при відсутності та при насиченій концентрації $[Ca^{2+}]_i$.

Для реєстрації флуоресцентного сигналу використовували неінвертований флуоресцентний мікроскоп ЛЮМАМ-И2. Перед початком дослідів вимірювальну апаратуру прогрівали впродовж 30 хв.

Досліджувані речовини (сполука 1 та хелеритрин - сполука 2) використовувалися в концентраціях 10^{-5} моль/л.

Таблиця

Характеристики $[Ca^{2+}]_i$ -десенситизуючої активності 2-аміно-3-(4-фторбензоїл)-N-[3-(4-морфолініл)пропіл]-1-індолізинкарбоксаміду (сполука 1) та хелеритрину (сполука 2) у концентраціях 10^{-5} моль/л на фоні активації фенілефрином у концентрації 10^{-7} моль/л

Сполука	Розслаблення ГМ сегментів кровоносних судин, %	Зміни $[Ca^{2+}]_i$ у ГМК деендотелізованих судин грудного відділу аорти щурів
1	$49,8 \pm 5,9$	відсутні
2	~30	не значне зростання

Як показано в табл. 1, сполука 1 проявляє $[Ca^{2+}]_i$ десенситизуючу активність та за силою розслаблення ГМ перевищує хелеритрин.

Гостру токсичність визначали за методом "Up-and-Down" [7] на білих безпородних мишах-самцях масою (17-19) г при внутрішньо-шлунковому шляху введення.

Середньосмертельна доза для мишей-самців за ліміт-тестом для сполуки 1 становить понад 2000 мг/кг (ІУ клас токсичності за класифікацією Сидорова).

Приклади конкретного виконання

Приклад 1. Синтез 2-аміно-3-(4-фторбензоїл)-N-[3-(4-морфолініл)пропіл]-1-індолізинкарбоксаміду (сполука 1). До розчину 0,01 моль 2-бromo-1-[2-(4-фторфеніл)-2-оксоетил]піридиній броміду в 10 мл. сухого диметилформаміду додають 0,015 моль 2-ціано-N-(3-морфолін-4-ілпропіл)ацетаміду та 0,03 моль тріетиламіну. Реакційну суміш нагрівають на водяній бані протягом чотирьох годин, після чого охолоджують і виливають у воду. Кристали, що

утворилися, фільтрують, кристалізують із суміші етиловий спирт - ДМФА 3:1. Вихід 80 %. $T_{пл}$ 163 °С. Спектри ЯМР 1H записано на приладі Bruker-300, робоча частота 300 МГц, розчинник $DMCO-d_6$, внутрішній стандарт - TMC: 1.8 м (2H, CH_2), 2.5 м (2H, CH_2) 3.29 м (2H, CH_2), 2.39-2.49 м (4H, CH_2 , морфолініл), 3.58-3.63 м (4H, CH_2 , морфолініл), 5.75 с (2H, NH_2), 6.89-7.68 м (10H, аром.+ індоліз.), 7.8 д ($1H^8$ індоліз.), 9.3 д ($1H^5$ індоліз.), 9.49 с (1H, NH).

Приклад 2. Визначення скорочувальної активності гладеньких м'язів (ГМ) сегментів кровоносних судин та внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію у ГМК деендотелізованих судин грудного відділу аорти щурів-самців на фоні активації фенілефрином.

Ізольовані гладеньком'язові препарати з грудного відділу аорти були отримані від дорослих щурів лінії Вістар масою (230 ± 30) г. Сегменти аорти довжиною (1.0-1.5) см відрізали, очищували від сполучної тканини. Після препарування сегменти судин вивертали, та поміщали у завантажувальний розчин (тМ 122 NaCl, 4.7 KCl, 2.5CaCl₂, 1.2 MgCl₂, 11.6 HEPES, 11.5 glucose, pH 7.3-7.4; 2.5 %DMSO, 5 mg/ml Pluronic F-127) барвника Fura 2-AM ($10 \mu M$) при температурі (18-22)°С в захищеному від світла місці на 2 год. Після завантаження зразки судин переносили в розчин Кребса та промивали 30 хв... Потім зразки обробляли фенілефрином (0.1 цМ). Випробуваний зразок фіксували на гачках датчика скорочень у робочій камері при температурі 36 °С під навантаженням (0,3-0,4) г та перфузували розчином Кребса зі швидкістю 1 мл/хв... протягом 30 хв.

Вимірювання проводили за допомогою флуоресцентного методу. Для реєстрації флуоресцентного сигналу використовували неінвертований флуоресцентний мікроскоп ЛЮМАМ-2. Вимірювали відношення R (Ratio $340_{nm}/380_{nm}$), що відображає зміни концентрації внутрішньоклітинного кальцію, та силу скорочень судини (Force, mN) (фіг. 1, 2).

Фіг. 1. Оригінальна крива скорочення та $[Ca^{2+}]_i$ у гладеньком'язових клітинах деендотелізованих фрагментів-кілець грудного відділу аорти щурів на фоні активації фенілефрином (PE, 10^{-7} моль/л) при дії 2-аміно- 3-(4-фторбензоїл)-N-[3-(4-

морфолініл)пропіл]-1-індолізинкарбоксаміду (сполука 1) у концентрації 10^{-5} моль/л.

Фіг. 2. Оригінальна крива скорочення та $[Ca^{2+}]_i$ у гладеньком'язових клітинах деендотелізованих фрагментів-кілець грудного відділу аорти щурів на фоні активації фенілефрином (PE, 10^{-7} моль/л) при дії хелеритрину (сполука 2) у концентрації 10^{-5} моль/л.

Приклад 3. Визначення токсичності сполук.

Гостру токсичність вивчали при внутрішньо-шлунковому шляху введення (білі безпородні миші-самці масою (17-19) г, кількість в кожній групі по 5 осіб) розрахованих доз сполук 1,2 за два прийоми за допомогою металевго зонда (за один прийом - 0,4 мл, Інтервал між введеннями - 45 хв.). Досліджувані сполуки готували безпосередньо перед введенням експериментальним тваринам, індивідуальні дози розраховували для кожної тварини з урахуванням маси тіла та об'єму суспензії, що була однаковою для всіх тварин. Спостереження за тваринами проводили протягом 14 діб. Контроль виникнення/зникнення клінічних ознак токсичності проводили: у перший день після введення суспензій протягом першої години безперервно, а потім через 2, 3, 5 год.; у наступні 13 днів кожну тварину обстежували два рази на добу. Усі тварини, що вижили по завершенні експерименту, були знеживлені шляхом цервікальної дислокації під ефірним наркозом. Гостру токсичність (LD_{50}) розраховували згідно з ліміт-тестом методом "Up-and-Down".

1. Шуба М. Ф. // Физиол. журн.-1981. - V. 27, № 4. - С 33-41.

2. McKillen K., Thornton T., Taylor C. W. // Am. J. Physiol.-1999. - V. 276,N2.-P.E34-E31.

3. Sanborn B. M. // Exp. Physiol.-2001. - V. 86. - P. 223-237.

4. Olsson M.C., Patel J.R.,Fitzsimons D.P. et al. // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.-2004. - V.287. - P.H2712-H2718.

5. Steinber R., Harari O. et al. // J. Biol. Chem.-2007. - V.282. - P. 32288-32297.

6. Catalog Research Biochemical International.-1997/1998. - Chelerytrine chloride.-C.I94.

7. OECD Guideline for Testing of Chemical. OECD Guideline 425. Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure // Approved: June 1998, Adopted: March 2006. - Paris: OECD.-2006. - P. 27.

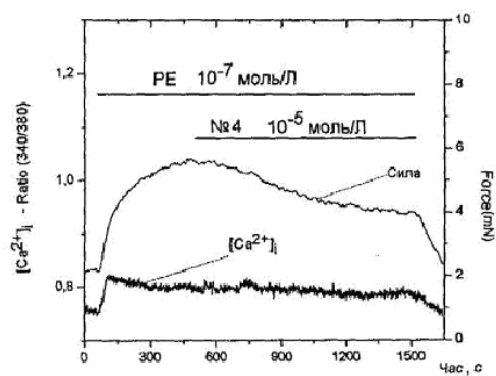


Fig.1

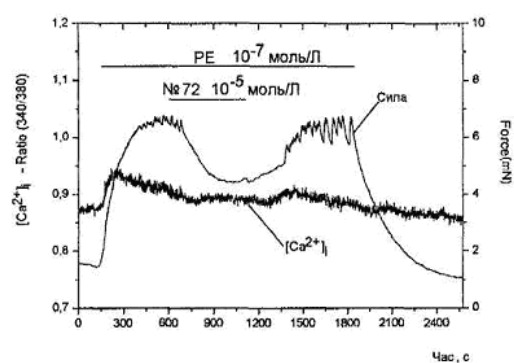


Fig.2