



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 53624

(13) C2

(51) 7 A61K31/60, 31/405,
31/195, 31/19, 31/155

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

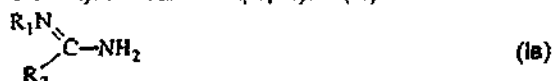
ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(54) КОМПОЗИЦІЯ СОЛЕЙ ПОХІДНИХ АМІДИНУ ТА ІНГІБІТОРА ЦИКЛООКСИГЕНАЗИ, СПОСІБ ЇЇ ОДЕРЖАННЯ, ЗАСТОСУВАННЯ ТА ФАРМАЦЕВТИЧНА КОМПОЗИЦІЯ

1

2

(21) 98010194
(22) 15 07 1996
(24) 17 02 2003
(86) PCT/FR96/01095, 15 07 1996
(31) 9514518 1
(32) 15 07 1995
(33) GB
(46) 17 02 2003, Бюл. №2, 2003 р.
(72) Шабрієр Де Лассон'єр, FR, Брокє Колетт, FR
(73) СОС'ЄТЕ ДЕ КОНСЕЙН ДЕ РЕШЕРШ Е
ДАПЛІКАСЬОН С'ЕНТІФІК, FR
(56) US, A, 4 324 801, 04 1982
GB, A, 2 263 111, 14 07 1993
JP, A, 61 143320, 01 07 1986
JP, A, 56 147761, 16 11 1981
(57) 1 Композиція солей похідних амідину та інгібітора циклооксигенази, яка складається із сполук А і В,
де
А є інгібітором циклооксигенази, що представляє карбокси групу,
В є сполука загальної формули (Ib)



де
R1 є Н, нітро або феніловий радикал, феніловий радикал, який при необхідності заміщується одним або кількома замісниками, вибраними серед гало, ціано, нітро, трифторометилілових радикалів, нижчих алкіл або алкокси радикалів,
R2 є нижчим алкіл радикалом, нижчим алкілтіо радикалом, алкілтіоалкілом, арилом, який при необхідності заміщується одним або кількома замісниками, вибраними серед гало, ціано, нітро, трифторометилілових радикалів, нижчих алкіл або алкокси радикалів, або аміно радикалом, що при необхідності заміщується радикалом, вибраним серед нітро, аміно нижчих алкіл або феніл радикалів, феніловий радикал сам при необхідності заміщується одним або кількома замісниками, вибраними з гало, ціано, нітро, трифторометилілових радикалів, нижчих алкіл або алкокси радикалів, за умови, якщо А є ацетилсаліцилова кислота, а R1 - атом водню, тоді R2 не є ні ариловим радикалом, ні феніламіновим радикалом, а феніловий

радикал при необхідності заміщується

2 Композиція солей похідних амідину та інгібітора циклооксигенази за п. 1, яка відрізняється тим, що сполука А вибрана з саліцилатів, індометацину, суліндаку, фенаматів і похідних пропіонової кислоти

3 Композиція солей похідних амідину та інгібітора циклооксигенази за будь-яким з пп. 1 або 2, яка відрізняється тим, що А є саліцилова кислота, метилсаліцилат, ацетилсаліцилова кислота, індометацин, суліндак, мефенамінова кислота, меклофенамінова кислота або ібупрофен, а В відповідає загальній формулі (Ib), представлений вище, де R1 є Н, нітро або феніловий радикал, феніловий радикал, який при необхідності заміщується одним або кількома замісниками, вибраними серед хлор, фтор, ціано, нітро, трифторометил, метил, етил, метокси, етоксиди або ізопропілокси радикалів, а R2 є амін, гідразин, нпроамін, метиламін, етиламін, метил, етил, метилтіо, метилтіометил, феніл при необхідності заміщується одним або кількома замісниками, вибраними з хлор, фтор, ціано, нітро, трифторометил, метил, етил, метокси, етоксиди або ізопропілокси, тієніл, фурил або піроліл радикалів
4 Композиція солей похідних амідину та інгібітора циклооксигенази за будь-яким з пп. 1-3, яка відрізняється тим, що представляє собою

- аміногуанідин саліцилат,
- аміногуанідин ібупрофенат,
- аміногуанідин індометацинат,
- метилгуанідин ацетилсаліцилат,
- метилгуанідин саліцилат,
- метилгуанідин ібупрофенат,
- метилгуанідин мефенамат

5 Спосіб одержання композиції солей похідних амідину та інгібітора циклооксигенази за п. 1, у якому реакцію між сумішшю сполуки формули А та сполуки формули В проводять у воді при температурі, що знаходиться у межах від температури навоколишнього середовища до 70°C

6 Композиція солей похідних амідину та інгібітора циклооксигенази за будь-яким з пп. 1-4 як медикаменти

7 Композиція солей похідних амідину та інгібітора циклооксигенази за п. 6 для приготування медикаментів, призначених для лікування серцево-судинних і церебрально-судинних хвороб, до яких

C2 (13)

53624 (11)

UA (19)

належать, наприклад, мігрень, інсульт, інфаркти, ішемії, септичні шоки, ендотоксичні шоки, геморагічні шоки та болю

8 Композиція солей похідних амідину та інгібітора циклооксигенази за п 6 для приготування медикаментів, призначених для лікування різних форм запалення, до яких належать гострі ревматичні гарячки, ревматичні артрити або інші види артритів, остеоартрит, астма

9 Композиція солей похідних амідину та інгібітора циклооксигенази за п 6 для приготування медика-

ментів, призначених для лікування захворювань імунної системи, до яких відносяться вірусні або невірусні інфекції, аутоімунні захворювання і всі патології, що характеризуються надлишковим виробленням у організмі оксиду азоту та/або метаболітів арахідинової кислоти

10 Фармацевтична композиція, що складається з фармацевтично прийнятної носії і активної основи, яка відрізняється тим, що як активну основу вона містить ефективну кількість щонайменше одного з медикаментів за п 6

Даний винахід стосується нових сполук, які мають подвійну біологічну активність, а саме, таких, що одночасно інгібують утворення монооксиду азоту (NO) та активність циклооксигеназ, процедури їх приготування, фармацевтичних композицій, що їх містять, та їх конкретного застосування як інгібіторів NO синтази і циклооксигенази

Інгібітори циклооксигенази або медикаментів, аналогічних аспірину, тобто ацетилсаліцилової та саліцилової кислот, похідних метилованого індолу, таких як індометацин (DCI кислоти [1-(4-хлоробензоїл)-5-метокси-2-метил-1H-індол-3-іл]ацетат та супіндак (DCI кислоти [5-фтор-2-метил-1-([4-(метилсульфініл)феніл]-метил)-1H-інден-3-іл]ацетат, похідних N-фенілантранілових кислот (меклофенат, фенамат), похідних пропіонової кислоти, таких як ібупрофен (DCI р-ізобутилігдратропової кислоти), напроксену, фенпрофену, одержали широке застосування і визнання як ефективні ліки у терапії запалень, але з рядом вторинних небажаних ефектів у випадку передозування [R Flower, S Moncada i Z Vane, Mechanism of action of aspirinlike drugs - in the pharmacological basis of therapeutics Goodman and Gilman, 1985, 29, 674 - 715]. Окрім цього, ці сполуки також використовуються при стаціонарному лікуванні та профілактиці мігрень. Значення цих медикаментів незаперечно, хоча їх терапевтична дія може бути недостатньою, а тому застосування таких сполук для деяких хворих неприйнятне. Враховуючи їх протизапальні та антикоагуляційні властивості щодо тромбоцитів, ці сполуки застосовуються при лікуванні тромбозу зі значним зменшенням набряків, у випадках ішемії мозку і нині запропоновані для лікування та запобігання виникнення інфарктів, струсів і церебросудинних захворювань [W Armstrong Recent trends in research and treatment of stroke, SCRIP, PJB publications, 1991]

Біологічна активність інгібіторів NO-синтази була відкрита зовсім недавно, і тому їх потенціальне терапевтичне застосування знаходиться поки що на стадії вивчення. Ці субстанції, структури котрих представлені аналогами L-аргініну і описані у датському патенті 3041/90, є інгібіторами вироблення оксиду азоту (NO). Наші теперішні знання про NO в 1991 р. були заково переглянуті Монкада та ін [S Moncada, R M J Palmer, E A Higgs Nitric oxide physiology, pathophysiology pharmacology - Pharmacological reviews 43 2 109 - 142] і зовсім недавно Кервіном з співавторами [Kerwin J, Lancaster J, Feldman P, Nitric oxide a new paradigm

for second messengers, J. Med Chem (1995), vol. 38, 22, 4343 - 4362]. По суті, виявляється, що NO служить механізмом трансдукції для панілат циклази, розчинної у тромбоцитах, нервовій системі, та діючої молекули в імунологічних реакціях у багатьох тканинних клітинах, у тому числі в макрофагах та нейтрофілах. NO є продуктом ферментації L-аргініну, що відбувається за допомогою ензиму з назвою NO синтаза. Цей фермент існує у двох формах конституційній (ендотеліал та нейронал) та індуктований. У деяких патологіях може проявлятися надлишкове вироблення NO, як це вже було показано на прикладі одного шоку, і як було описано у вищезгаданому патенті. У цьому контексті інгібітори NO синтази виступають ефективними медичними препаратами для запобігання судинних ускладнень та смертності, спричиненої хворобою, особливо коли вони комбінуються з такими інгібіторами циклооксигенази як аспірин, індометацин або меклофенат.

Сприятлива для поєднання двох активних принципів у одній і тій же молекулі може бути корисною для пацієнтів, що мають інші патології, наприклад

- серцево-судинні та церебрально-судинні захворювання, до яких належать, наприклад, атеросклероз, мігрень, артеріальна гіпертонія, септичний шок, серцеві або церебральні інфаркти ішемічного або геморагічного походження, ішемія та тромбози,

- захворювання центральної та периферійної нервової системи такі, наприклад, як невродегенеративні, серед яких особливо можна виділити церебральні інфаркти, старечі деменції, у тому числі хворобу Альцгеймера, хорею Хантингтона, хворобу Паркінсона, хворобу Якова Крейтцфельда, аміотрофічний бічний склероз, а також біль, церебральні травми або травми спинного мозку, вживання наркотиків, алкоголю, а також речовин, що спонукають до виникнення шкідливих звичок, неплідність, кон'югація, енцефалопатичні захворювання,

- швидко розповсюджувани та запальні хвороби такі, наприклад, як атеросклероз, легенева гіпертонія, гломерулонефрити, гіпертензія, псоріаз, артроз та ревматоїдний артрит, фібрози, амліодози, запалення гастроентестинальної системи (коліт, хвороба Крона) або легеневої системи та дихальних шляхів (астма, синусити),

- пов'язані з трансплантацією органів,

- аутоімунні та вірусні захворювання такі, наприклад, як вівчанка, СНІД, паразитарні та вірусні

інфекції, діабет, розсіяний склероз;

- рак або
- всі паталогічні захворювання, що характеризуються виробленням чи дисфункціонуванням NO та/або циклооксигенази.

Метою даного винаходу є продукти загальної формули I

АБ, (I)

у вигляді солі, у якій

А - є інгібітором циклооксигенази, що представляє карбокси групу; В - є сполука загальної формули I_B



у якій

R₁ є Н, нітро або феніловий радикал, феніловий радикал, який при необхідності заміщується одним або кількома замісниками, вибраними серед гало, ціано, нітро, трифторометиллових радикалів, нижчих алкіл або алкокси радикалів;

R₂ є нижчим алкіл радикалом; нижчим алкілто радикалом; алкілтоалкілом, арилом, який при необхідності заміщується одним або кількома замісниками, вибраними серед гало, ціано, нітро, трифторометиллових радикалів, нижчих алкіл або алкокси радикалів, або аміно радикалом, що при необхідності заміщується радикалом, вибраним серед нітро, аміно, нижчих алкіл радикалів або фенілу, феніловий радикал сам при необхідності заміщується одним або кількома замісниками, вибраними з гало, ціано, нітро, трифторометиллових радикалів, нижчих алкіл або алкокси радикалів;

і коли А є ацетилсаліцилова кислота, а R₁ - атом водню, тоді R₂ не є ні ариловим радикалом, ні феніламіновим радикалом, а феніловий радикал при необхідності заміщується.

У визначеннях, що приведені вище, термін гало означає фтор, хлор, бром або іод радикал, переважно фтор або хлор радикал.

Вираз нижчий алкіл означає переважно алкіловий радикал, що містить у собі від 1 до 6 атомів лінійного або розгалуженого вуглецю та особливо алкіловий радикал, що містить у собі від 1 до 4 атомів вуглецю, таких як метиловий, етиловий, пропіловий, ізопропіловий, бутиловий, ізобутиловий, втор-бутиловий, та трет-бутиловий радикали. Нижчі алкокси радикали можуть відповідати алкіловим радикалам, що зазначені вище. Перевага надається метокси, етокси або ізопропілокси радикалам.

Вираз арил означає ароматичний радикал, який складається з одного циклу або з конденсованих циклів; кожен цикл при необхідності може містити один або декілька гетероатомів, ідентичних або різних, вибраних з сірки, азоту або кисню. Прикладами радикалу арилу є радикали феніл, нафтил, тієніл, фурил, піроліл, імідазоліл, піразоліл, ізопазоліл, тіазоліл, ізоксазоліл, оксазоліл, піріділ, піразиніл, піриміділ, бензотієніл, бензофурил та індопіл.

Ще одною метою даного винаходу є продукти вищевказаної загальної формули I, які характеризуються тим, що складова А вибирається з саліцилатів, таких як саліцилова кислота та її похідні, індометацин, суліндак, фенамати та похідні пропі-

онової кислоти.

Серед похідних саліцилової кислоти можливо відзначити сполуки, отримані шляхом етерифікації карбокси групи саліцилової кислоти, такі, наприклад, як метилсаліцилат, сполуки, отримані шляхом заміщення саліцилової кислоти по гідроксигрупи, такі, наприклад, як ацетилсаліцилова кислота, або сполуки, отримані шляхом введення замісника (ів) на вільні місця фенілу саліцилової кислоти, як, наприклад, дифлунізал. Серед фенаматів можливо відмітити мефенамінову, меклофенамінову, флуфенамінову та толфенамінову кислоти. Як приклад похідних пропіонової кислоти, можливо відзначити такі сполуки як ібупрофен, напроксен, фенпрофен, фенбуфен, флурбіпрофен, індопрофен, кетопрофен або супрофен.

Метою даного винаходу є також сполуки загальної формули I, як описано вище, які характеризуються тим, що

- А є саліцилова кислота, метилсаліцилат, ацетилсаліцилова кислота, індометацин, суліндак, мефенамінова кислота, меклофенамінова кислота або ібупрофен; та

- В відповідає загальній формулі (I_B), представлений вище, у якій R₁ є Н, нітро або феніловий радикал, феніловий радикал, який при необхідності заміщується одним або кількома замісниками, вибраними серед хлор, фтор, ціано, нітро, трифторометил, метил, етил, метокси, етокси або ізопропілокси радикалів; та R₂ є амін; піразин; нітроамін; метиламін; етиламін; метил; етил; метилто; метилтіометил радикал; феніл при необхідності заміщується одним або кількома замісниками, вибраними з хлор, фтор, ціано, нітро, трифторометил, метил, етил, метокси, етокси або ізопропілокси, тієніл, фурил або піроліл радикалів.

Ще одною метою даного винаходу є сполуки, які описані далі в прикладах, а саме сполуки, котрі відповідають таким формулам:

- аміногуанідин саліцилат;
- аміногуанідин ібупрофенат;
- аміногуанідин індометацинат;
- метилгуанідин ацетилсаліцилат;
- метилгуанідин саліцилат;
- метилгуанідин ібупрофенат;
- метилгуанідин мефенамат.

Метою даного винаходу є також спосіб одержання продуктів загальної формули I, зазначеної вище, що характеризується тим, що реакція між сумішшю сполуки з формулою А, визначеною вище, та сполукою формули В, визначеною вище, проводиться у воді при температурі, що знаходиться у межах від температури навколишнього середовища до 70°C.

При проведенні реакції сполуку формули А можливо використовувати у чистому вигляді або у вигляді солі, наприклад, солі натрію. Сполуку формули В можливо також використовувати у чистому вигляді або у вигляді, наприклад, її бікарбонату або гідрохлориду.

Продукти формули А відомі або можуть бути виготовлені за загальновідомими методами. Сполуки формули В можуть бути отримані шляхом застосування загальновідомих методів приготування амідинів [Schwan T. J. et coll., J. Pharm. Sci. (1975), 64, 337 - 338, Roger R et coll., Chem. Rev.

61, 179. (1961); Tetrahedron. 29 (14), 2147 - 51 (1973); Patai S., Chem. Amidines Imidates, vol. 1, 283 - 348 (1975); Patai S., Chem. Amidines Imidates, vol. 2, 339 - 366 (1990)].

Сполуки даного винаходу мають цікаві фармакологічні властивості. Вони проявляються у подвійній біологічній активності, а саме - одночасно інгують процеси L-аргінін/оксид азоту (NO) і процеси циклооксигенази. Сполуки даного винаходу можуть також бути використані у різних терапевтичних застосуваннях.

Враховуючи потенційну роль NO синтази і циклооксигенази у фізіопатології, сполуки даного винаходу можуть відігравати сприятливу роль при лікуванні:

- серцево-судинних і церебрально-судинних захворювань, включаючи мігрень, інсульти, інфаркти, ішемії, септичні, ендотоксичні та гемаррогічні шоки, болі;

- різні форми запалень, до яких, наприклад, належать гострі ревматичні гарячки, ревматичні артрити або інші види артритів, остеоартрит, астма;

- захворювання імунної системи, до яких відносяться вірусні та невірусні інфекції, захворювання аутоімунні і всі патології, що характеризуються надлишком оксиду азоту в організмі та/або метаболітів арахідинової кислоти.

Далі в експериментальній частині буде представлено опис фармакологічних властивостей сполук даного винаходу.

Ці властивості надають продуктам формули I придатність до їх застосування у фармакології. Предметом винаходу є, у рівній мірі, продукти вищевизначеної формули I, як медикаменти, а також фармацевтичні композиції, що містять як активну складову щонайменше один з зазначених вище медикаментів.

Таким чином, даний винахід стосується також фармацевтичних композицій, до яких входять сполуки даного винаходу, спільно з фармацевтичним прийнятним носієм. Фармацевтична композиція може бути у твердій формі, наприклад, у вигляді порошку, гранул, таблеток, капсул або суппозиторів. Придатними твердими носіями можуть бути, наприклад, фосфат кальцію, стеарат магнію, тальк, цукор, лактоза, декстрин, крохмаль, желатин, целюлоза, метилцелюлоза, натрій карбоксиметилцелюлоза, полівінілпіролідін, та віск.

Фармацевтичні композиції, що містять сполуку даного винаходу, можуть бути також у вигляді рідини, наприклад, розчинів, емульсій, суспензій, сиропів. Прийнятними рідкими носіями можуть бути, наприклад, вода, органічні розчинники, такі як гліцерин або гліколи, а також їх суміші у різних пропорціях, у воді, з доданнями олій або фармацевтично прийнятних жирів. Фармацевтичні композиції, згідно з даним винаходом, в залежності від форми випуску можуть вживатися за класичними способами, такими як оральний або шляхом ін'єкцій, внутрішньом'язових, внутрішньочеревних, внутрішньовенних або підшкірних.

Предметом винаходу є також застосування продуктів, згідно формули I, для виготовлення медикаментів, призначених для лікування серцево-судинних та церебрально-судинних захворю-

вань, медикаментів, призначених для лікування різних форм запалень, медикаментів, призначених для лікування захворювань імунної системи.

Представлені нижче приклади призначені для ілюстрації вищевизначених способів, і ні у якому разі не повинні розглядатися як будь-які обмеження щодо даного винаходу.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА:

Приклад 1: Аміногуанідин саліцилат

В 25мл води розчиняють, підігрівуючи до 70°C, 420мг (2,5ммоль) бікарбонату аміногуанідину, потім, помішуючи, додають водний розчин 400мг саліцилату натрію. Підігрівують суміш протягом 20 хвилин і потім ліофілізують (білий порошок; температура топлення $T_f = 148^\circ\text{C}$).

Приклад 2: Аміногуанідин ібупрофенат

В 25мл води розчиняють, підігрівуючи до 70°C, 420мг (2,5ммоль) бікарбонату аміногуанідину, потім, помішуючи, додають водний розчин 570мг солі ібупрофену натрію. Продовжують підігрівувати суміш протягом 20 хвилин і потім ліофілізують (білий порошок; $T_f = 134^\circ\text{C}$).

Приклад 3: Аміногуанідин індометацинат

Виконуються такі ж самі дії, як описано у прикладі 1, але замість саліцилату натрію використовується індометацин (жовтий порошок; $T_f = 196^\circ\text{C}$).

Приклад 4: Метилгуанідин ацетилсаліцилат

Розчиняється 450мг (2,5ммоль) ацетилсаліцилової кислоти у 20мл води з 2,5мл 1N NaOH. Потім добавляється 237,8мг хлорідрату метилгуанідину у 10мл води. Перемішують протягом 15 хвилин. Отримують прозорий розчин. Ліофілізація дає білий порошок ($T_f = 153^\circ\text{C}$).

ЯМР - ^1H (100МГц, D_2O): 7,3 - 6,6 (m, 4H, ароматичний); 2,3 (s, 3H, NCH_3); 1,8 (s, 3H, COCH_3).

Приклад 5: Метилгуанідин саліцилат

Розчиняють у гарячому стані 345мг (2,5ммоль) саліцилової кислоти у 20мл води з 2,5мл 1N NaOH. Додають розчин хлорідрату метилгуанідину (2,5ммоль) у 10мл води. Помішують протягом 10 хвилин при 40°C. Ліофілізація дає досить об'ємний білий порошок ($T_f = 140^\circ\text{C}$) ЯМР - ^1H (100МГц, D_2O): 7 - 6,8 (m, 4H, ароматичний); 2,4 (s, 3H, NCH_3).

Приклад 6: Метилгуанідин ібупрофенат

Розчиняють у гарячому стані 2,5ммоль ібупрофену у 20мл води з 2,5мл 1N NaOH. Додають розчин хлорідрату метилгуанідину (2,5ммоль) у 10мл води. Помішуючи, підігрівують при 60°C протягом 15 хвилин. Ліофілізація дає білий порошок ($T_f = 174^\circ\text{C}$). ^1H -ЯМР (100МГц, D_2O): 7,2 (s, 4H, ароматичний); 3,4 (q, 1H, $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH(Me)-CO}$); 2,6 (s, 3H, NCH_3); 2,25 (d, 2H, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$); 1,6 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 1,2 (d, 3H - $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{-CO}_2\text{H}$); 0,8 (d, 6H, 2CH_3).

Приклад 7: Метилгуанідин мефенамат

Виконуються дії, аналогічні до тих, що описані в прикладі 6, але замість ібупрофену використовується мефенамінова кислота. При охолодженні сполука випадає у осад. Отриманий продукт фільтрується і висушується ($T_f = 124^\circ\text{C}$).

^1H -ЯМР (100МГц, D_2O): 8,1 (m, 1H, H у o CO_2H); 7,2 - 6,8 (m, 6H, $2\text{C}_6\text{H}_5$); 2,9 (s, 3H, NCH_3); 2,4 та 2,3 (d, $2\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_5$).

Використовуючи вище приведений спосіб, мо-

жна також одержати продукти, які у рівній мірі входять до складу винаходу та котрим надається пе-

ревага:

Таблиця 1

Сполука	A	B	
		R1	R2
C	Кислота саліцилова	Нітро	гідразин
D	Кислота саліцилова	H	метиламін
E	Кислота саліцилова	2-фторфеніл	амін
F	Кислота ацетилсаліцилова	4-метоксифеніл	етил
G	Кислота ацетилсаліцилова	нітро	етокси
H	Метилсаліцилат	3-хлорофеніл	метил
I	Метил саліцилат	H	гідразин
J	Індометацин	3-4 діхлорфеніл	пропіл
K	Індометацин	4-метилфеніл	гідразин
L	Індометацин	H	метиламін
M	Індометацин	нітро	етил амін
N	Індометацин	нітро	3-хлорофеніл
O	Суліндак	3-ціанофеніл	амін
P	Суліндак	H	метиламін
Q	Суліндак	H	гідразин
R	Кислота мефенамінова	H	амін
S	Кислота мефенамінова	H	тієніл
T	Кислота мефенамінова	нітро	гідразин
U	Кислота меклофенамінова	нітро	амін
V	Кислота меклофенамінова	3-трифторфеніл	ізопропілокси
W	Ібупрофен	H	метилтіометил
X	Ібупрофен	нітро	метил
Y	Ібупрофен	нітро	фурил

Фармакологічне вивчення продуктів винаходу. Винайдені сполуки були піддані біологічним випробуванням *in vitro* для перевірки їх спроможності блокувати індуктовану NO синтазу та циклооксигеназу. Вони порівнювались з такими еталонними речовинами як аміногуанідин, L-нітроаргінин, Ібупрофен, індометацин, ацетилсаліцилова кислота.

1) Для *in vitro* на NO синтазу, індуктовану мишачими макрофагами J774A1.

Випробування полягають у вимірюванні трансформації, що відбувається в L-цитруліні під дією NO синтази L-аргініну, за методом Бредта і Снідера (Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87, 682-685, 1990). Мишачі макрофаги J774A1 виробляють велику кількість NO після активації ліпополісахаридами (LPS) та γ -інтерфероном (IFN- γ). Клітини культивуються у середовищі DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), збагаченому 10% телячої зародкової сироватки, при 37°C у атмосфері 5% CO₂ після активації LPS та IFN- γ . Вони засіваються з розрахунку 5000 клітин/см² у склянках по 150 см². Інкубаційний процес проходить у присутності LPS (1 мг/мл) та IFN- γ мишачого (50 Одиниць/мл) у DMEM, збагаченому 10% телячої зародкової сироватки. NO синтазу виділяють за допомогою екстракційного буферного розчину (HEPES 50 мМ, pH 7.4, дитотрейтол 0.5 мМ, лепстатин A 1 мг/мл, лепетин 1 мг/мл, інгібітор соєвого трипсину 1 мг/мл, антипаїн 1 мг/мл та PMSP (фенілметилсульфоніл-фторид) 10 мг/мл). Після обробки ультразвуком у екстракційному буфері при 4°C розчини піддають

ультрацентрифугуванню (100 000g при 4°C протягом 1 години).

Дозування проводять у скляних пробірках, у які додають 100 мкл буферного інкубаційного розчину, що містить 100 мМ HEPES, pH 7.4, 1 мМ дитотрейтол, 2.5 мМ CaCl₂, 10 мМ тетрагідробіоптерину, FAD (флавінаденідинуклеотид) 10 мМ, BSA 1 мг/мл, 2 мМ NADPH відновленого, 2 мМ EDTA (етиленадіамінтетраоцтова кислота) і 2.5 мМ CaCl₂. Додається 25 мкл розчину, що містить 100 нМ аргініну тритієвого (питома активність: 56,4 Кюри/ммоль, Amersham) і 40 мМ нерадіоактивного аргініну. Реакцію ініціюють шляхом додавання 50 мкл гомогенату, кінцевий об'єм складає 200 мкл (нестачу у 25 мкл складає або вода, або випробуваний продукт). Через 15 хвилин реакцію зупиняють шляхом додавання 2 мл буферного зупиняючого розчину (20 мМ HEPES, pH 5.5, 2 мМ EDTA). Після проходження проб через колонку з 1 мл смоли DOWEX, рівень радіоактивності визначається за допомогою рідинного сцинтиляційного спектрометру.

Результати, виражені у значеннях CI₅₀, зведені в таблиці 2 параграфу 2 (перша колонка результатів під назвою "Індуктована NO синтаза, утворення цитруліну").

2) Для *in vitro* на вироблення нітрів мишачими макрофагами J774A1: Це випробування використовується для вимірювання інгібуючої дії продуктів на NO синтазу, індуктовану клітинами в культурах. Клітини культивуються в середовищі DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), збагаченому 10% телячої зародкової сироватки, при 37°C у атмосфері 5% CO₂. Для проведення дослі-

дія вони розміщуються на пластині у 96 комірок (50000 клітин на комірку) й проходять інкубаційний період у DMEM без фенолового червоного при 10% телячої зародкової сироватки з LPS (1мг/мл) та IFN- γ мишачим (50 О/мл) у присутності або відсутності продуктів, що випробуються. Через 48 годин концентрацію нітритів у культурних середовищах, продуктів деградації NO, вимірюють колориметричним методом згідно з Green et al., Analytical Biochemistry 126, 131 - 138 (1982). Результати, виражені у значеннях Cl_{50} , зведені в таблиці 2 параграфу 2 (друга колонка результатів під назвою "Індуктована NO синтаза, утворення нітритів").

Таблиця 2

Продукти	Cl_{50} (мкМ)	
	Індуктована NO синтаза (утворення цитруліну)	Індуктована NO синтаза (утворення нітритів)
Аміногуанідін	20	22
L-нітроаргінін	21	100
Ібупрофен	інактивний	інактивний
Індометацин	інактивний	інактивний
Приклад 2	11	16
Приклад 3	26	33

3) Дія in vitro на вироблення нітритів та PGE₂ мікрогліальними клітинами щура

Мікрогліальні клітини виділяють з культур гліальних клітин, взятих з кори головного мозку новонародженого щура Wistar, за протоколом Thery et al. (1991 р.). Мікрогліальні клітини засівають у пластини з 24 комірками, з розрахунку 5×10^5 клітин на мл і 0,5мл на комірку. Мікрогліальні клітини проходять інкубаційний період у присутності LPS (10мг/мл) та інгібіторів протягом 24 годин при 37°C у присутності 5% CO₂. Через 24 години вилучають сполуки, що спливають, для їх аналізу на концентрації нітритів та PGE₂. PGE₂ дозується за допомогою радіоімунологічного дозатора, виготовленого підприємством NEN, керуючись інструкцією по користуванню цим приладом, наданою його виробником. Кожен зразок дозується двічі. Результати, виражені у формі Cl_{50} , розраховані за методом лінійної регресії на лінійному відрізку кривої інгібування (FitP6C). Нітрити дозуються за методом Green et al. [Analytical Biochemistry 126, 131 - 138, 1982]. Результати, виражені у формі Cl_{50} , подані у таблиці 3 нижче для прикладу 2.

Таблиця 3

Продукт	Виробництво нітритів Cl_{50} (мкМ)	Виробництво PGE ₂ Cl_{50} (мкМ)
---------	--------------------------------------	--

Приклад 2	97 \pm 35	3,1 \pm 1,9
Аміногуанідін	109 \pm 44	інактивний
Ібупрофен	інактивний	1,3 \pm 0,22

4) Ефект in vitro на індуктовану циклооксигеназу:

Циклооксигеназа існує у двох ізоформах, COX-1 (конституційна) і COX-2, індуктована запальними мітогенами, цитокінами та ендотоксинами. Дані сполуки були випробувані на ензиматичну активність двох напівочищених ізоформ.

Принцип випробування полягає у кількісному визначенні ступеню трансформації арахідонової кислоти (AA) у PGE₂ за допомогою COX-1 або COX-2. Спосіб застосовується за Futaki et al. [Prostaglandins, 47, 55 - 59, 1994]. COX-1 [Prostaglandine H synthase-1, EC 1.14.9.1] зберігається при -80°C і походить від запліднюючої везикули бика. COX-2 (Prostaglandine H synthase-2) також зберігається при температурі -80°C і походить від плаценти вівця.

Пробірки наповнюють 500мкл буферного розчину (100 мМ Tris HCl, pH8, 1мкМ гематину, 1мМ фенолу) і сполуками даного винаходу або еталонними речовинами з концентраціями від 1нМ до 1мМ. Контрольні зразки отримуються з буферного розчину без інгібіторів. Через 2 хвилини інкубаційного періоду з 5 одиницями (COX-2)- або 10 одиницями (COX-1)-ензиму від 5мкл арахідонової кислоти до 10мкМ додаються на 2 хвилини. Реакцію припиняють за допомогою 30мкл 1N HCl. Екстракція проводиться через колонки Seppack C18 (Waters). Після випаровування до сухого стану PGE₂ вимірюється за радіоімунологічною дозиметрією. Результати, виражені у значеннях Cl_{50} , зведені до приведеної нижче таблиці 4.

Таблиця 4

Продукти	Cl_{50} (МкМ)	
	COX-1	COX-2
Ацетилсаліцилова кислота	77,8	648
Кислота саліцилова	>1000	>1000
Кислота мефенамінова	83,9	388
Ібупрофен	>1000	>1000
Індометацин	0,54	15,9
Аміногуанідін	>1000	>1000
L-нітроаргінін	>1000	>1000
Приклад 2	459	525
Приклад 3	0,108	29,4
Приклад 4	243	>1000
Приклад 5	>1000	>1000
Приклад 6	>1000	>1000
Приклад 7	411	331