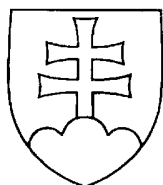


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PATENTOVÁ PRIHLÁŠKA

- (22) Dátum podania prihlášky: **16. 5. 2002**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **0101767-2**
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **18. 5. 2001**
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **SE**
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **4. 5. 2004**
Vestník ÚPV SR č.: **5/2004**
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **PCT/SE02/00946**
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **WO02/094810**

(11), (21) Číslo dokumentu:

1393-2003

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.7 :

**C07D401/06,
C07D405/06,
C07D409/06,
C07D211/70,
A61K 31/445,
A61K 31/4523,
A61P 25/04,
A61P 25/22**

(71) Prihlasovateľ: **AstraZeneca AB, Södertälje, ŠVÉDSKO;**

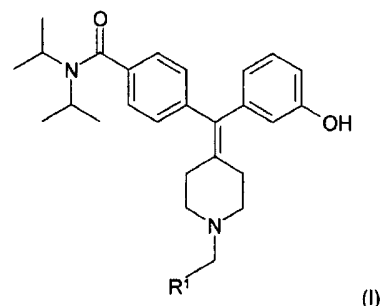
(72) Pôvodca: **Brown William, St. Laurent, Montreal, Québec, KANADA;
Walpole Christopher, St. Laurent, Montreal, Québec, KANADA;
Wei Zhongyong, St. Laurent, Montreal, Québec, KANADA;**

(74) Zástupca: **Žovicová Viera, Mgr., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **4-(Fenylpiperidin-4-ylidénmetyl)-benzamidové deriváty a ich použitie na liečbu bolesti, anxiety alebo gastrointestinálnych porúch**

(57) Anotácia:

Sú opísané zlúčeniny všeobecného vzorca (I), kde R¹ je vybraný spomedzi nasledujúcich: fenyl, pyridinyl, pyrolyl, tienyl, furanyl, imidazolyl, triazolyl, tiazolyl a pyridín N-oxid; kde každý fenylový kruh R¹ a heteroaromatický kruh R¹ môže byť voliteľne a nezávisle ďalej substituovaný 1, 2 alebo 3 substituentmi vybranými spomedzi nasledujúcich: lineárny a rozvetvený C₁-C₆ alkyl, NO₂, CF₃, C₁-C₆ alkoxy, chlór, fluór, bróm a jód. Substitúcie na fenylovom kruhu a na heteroaromatickom kruhu môžu byť v ktorejkoľvek polohe na týchto kruhových systémoch. Uvedené látky sú publikované a nárokované v tejto prihláške spolu so soľami a farmaceutickými kompozíciami obsahujúcimi tieto zlúčeniny a ich použitím v terapii, najmä v manažmente bolesti, anxiety a funkčných gastrointestinálnych porúch.



4-(Fenylpiperidin-4-ylidénmetyl)benzamidové deriváty a ich použitie na liečbu bolesti, anxiety alebo gastrointestinálnych porúch

Oblasť techniky

Predložený vynález sa týka nových zlúčenín, postupu na ich prípravu, ich použitia a farmaceutických kompozícií obsahujúcich tieto nové zlúčeniny. Tieto nové zlúčeniny sú užitočné v terapii a najmä pri liečbe bolesti, anxiety a funkčných gastrointestinálnych porúch.

Doterajší stav techniky

Receptor δ bol identifikovaný ako receptor s úlohou v mnohých telesných funkciách, napríklad systému obehu a bolesti. Ligandy pre receptor δ môžu preto nájsť potenciálne využitie ako analgetiká a/alebo antihypertoniká. Ukázalo sa tiež, že ligandy pre receptor δ majú imunomodulačné aktivity.

Identifikácia aspoň troch rôznych populácií receptorov opiátov (μ , δ a κ) je teraz dobre etablovaná a všetky tri sú evidentné v centrálnych a periférnych nervových systémoch mnohých druhov vrátane človeka. Pri aktivácii jedného alebo viacerých z týchto receptorov sa pozorovala analgézia na rôznych zvieracích modeloch.

S niekoľko málo výnimkami sú momentálne dostupné selektívne opiátové δ ligandy svojou povahou peptidické a sú nevhodné na podanie systémovými cestami. Jeden príklad nepeptidického δ -agonistu je SNC80 (Bilsky E. J. et al., Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 273(1), s. 359-366 (1995)). Existuje však stále potreba selektívnych δ -agonistov majúcich nielen zlepšenú selektivitu, ale aj zlepšený profil vedľajších účinkov.

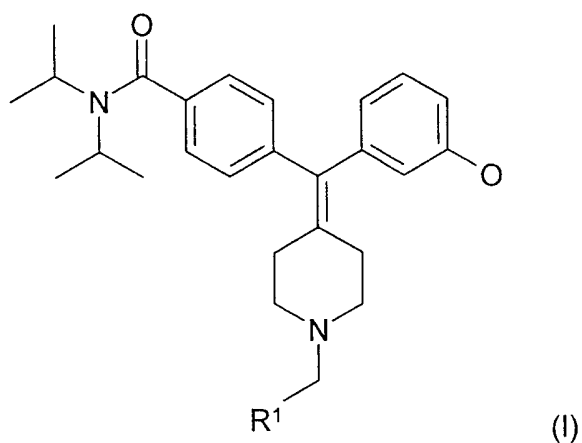
Problémom, ktorý bol základom predloženého vynálezu, bolo teda nájdanie nových analgetík so zlepšenými analgetickými účinkami, ale aj so zlepšeným profilom vedľajších účinkov oproti aktuálnym μ agonistom, ako aj majúcich zlepšenú systémovú účinnosť.

Analgetiká, ktoré boli identifikované a existujú v doterajšom stave techniky, majú mnohé nevýhody v tom, že majú slabú farmakokinetiku a nie sú analgetické, keď sa podajú systémovými cestami. Bolo tiež dokumentované, že výhodné δ agonistické zlúčeniny opísané v doterajšom stave techniky vykazujú pri systémovom podaní signifikantne konvulzívne účinky.

Objavili sme isté zlúčeniny, ktoré vykazujú prekvapujúco zlepšené vlastnosti, medzi inými zlepšenú potenciú proti δ -agonistom, in vivo potenciú, farmakokinetickú biologickú dostupnosť, in vitro stabilitu a/alebo nižšiu toxicitu.

Podstata vynálezu

Nové zlúčeniny podľa predloženého vynálezu sú definované vzorcom I



kde

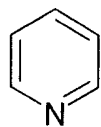
R^1 je vybrané z nasledujúcich:

(i) fenyľ;

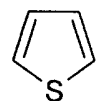


(ii) pyridinyl

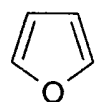
3



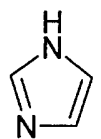
(iii) tienyl



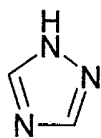
(iv) furanyl



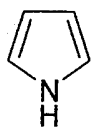
(v) imidazolyl



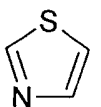
(vi) triazolyl



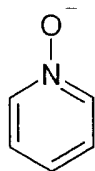
(vii) pyrolyl



(viii) tiazolyl



(ix) pyridyl-N-oxid



kde každý fenyl R^1 a heteroaromatický kruh R^1 môže byť voliteľne a nezávisle ďalej substituovaný 1, 2 alebo 3 substituentmi nezávisle vybranými spomedzi nasledujúcich: lineárny a rozvetvený C_1 - C_6 alkyl, NO_2 , CF_3 , C_1 - C_6 alkoxy, chlór, fluór, bróm, a jód. Substitúcie na fenyle a na heteroaromatickom kruhu môžu prebehnúť v ktorejkoľvek polohe na týchto kruhových systémoch;

Ďalším uskutočnením predloženého vynálezu je zlúčenina podľa obrázka I, kde R^1 má vyššie uvedený význam a každý fenylový kruh R^1 a heteroaromatický kruh R^1 môže byť nezávisle ďalej substituovaný metylovou skupinou.

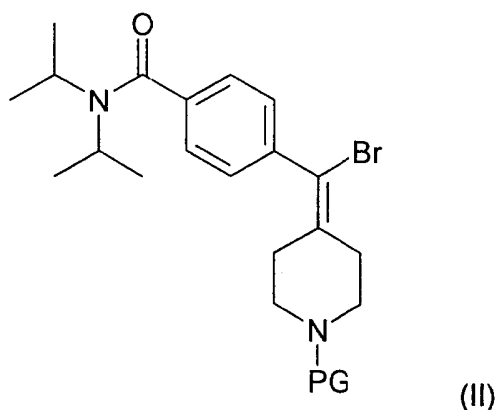
Ďalším uskutočnením predloženého vynálezu je zlúčenina podľa obrázka I, kde R^1 je fenyl, pyrolyl, pyridinyl, tienyl alebo furanyl, voliteľne s 1 alebo 2 z výhodných substituentov na fenyle R^1 alebo heteroaromatickom kruhu R^1 .

Ďalším uskutočnením predloženého vynálezu je zlúčenina podľa obrázka I, kde R^1 je fenyl, pyrolyl alebo pyridinyl, voliteľne s 1 alebo 2 z výhodných substituentov na fenyle R^1 alebo heteroaromatickom kruhu R^1 .

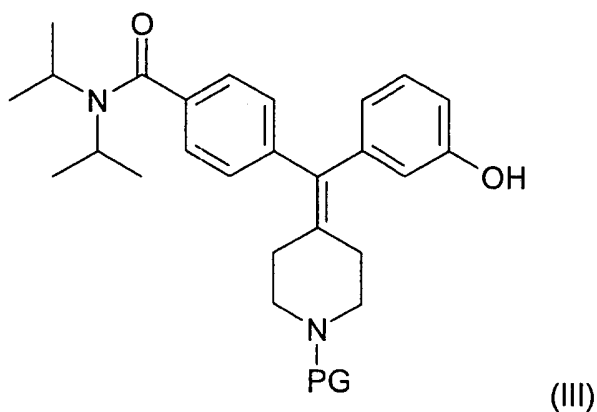
Ďalším uskutočnením predloženého vynálezu je zlúčenina podľa obrázka I, kde R^1 je tienyl alebo furanyl, voliteľne s 1 alebo 2 z výhodných substituentov na fenyle R^1 alebo heteroaromatickom kruhu R^1 .

Keď je fenyl R^1 a heteroaromatický kruh R^1 substituovaný, výhodné substituenty sú nezávisle vybrané spomedzi nasledujúcich: CF_3 , metyl, jód, bróm, fluór a chlór.

Krok reakcie A v schéme 2 (pozrite ďalej) sa uskutočňuje reakciou intermediátu všeobecného vzorca II



kde PG je uretánová chrániaca skupina, napríklad Boc alebo CBZ, alebo benzylová alebo substituovaná benzylová chrániaca skupina, napríklad 2,4-dimetoxybenzyl, s kyselinou 3-hydroxyfenylboritou, použitím paládiového katalyzátora, napr. $(\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4)$, za prítomnosti bázy, napr. Na_2CO_3 , za vzniku zlúčenín všeobecného vzorca III,



z ktorej sa potom odstráni chrániaca skupina za štandardných podmienok a alkyluje sa za redukčných podmienok zlúčeninou všeobecného vzorca $\text{R}^1\text{-CHO}$ za vzniku zlúčenín všeobecného vzorca 1.

Nové zlúčeniny podľa predloženého vynálezu sú užitočné pri terapii, najmä na liečbu rôznych stavov bolesti, napríklad chronickej bolesti, neuropatickej bolesti, akútnej bolesti, rakovinovej bolesti, bolesti spôsobenej reumatoidnou artritídou, migrénou, viscerálnou bolesťou atď. Tento zoznam by sa však nemal vykladať ako vyčerpávajúci.

Zlúčeniny podľa vynálezu sú užitočné ako imunomodulátory, najmä na autoimunitné choroby, ako je artritída, na kožné štepy, orgánové transplantáty a podobné chirurgické potreby, na kolagénové choroby, rôzne alergie, na použitie ako protinádorové prostriedky a protivírusové prostriedky.

Zlúčeniny podľa vynálezu sú užitočné pri chorobných stavoch, kde je prítomná alebo implikovaná degenerácia alebo dysfunkcia opiátových receptorov. To môže zahŕňať použitie izotopovo označených verzií zlúčenín podľa vynálezu v diagnostických technikách a zobrazovacích aplikáciách, napríklad v pozitronovej emisnej tomografii (PET).

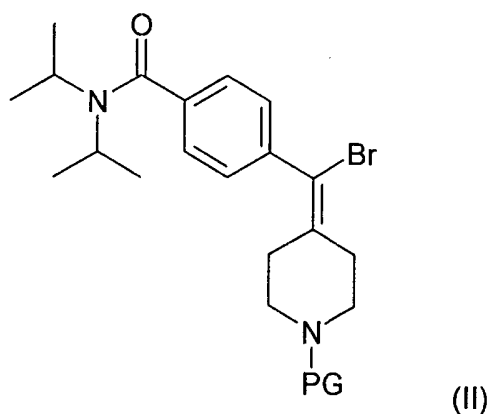
Zlúčeniny podľa vynálezu sú užitočné na liečbu hnačky, depresie, anxiety a so stresom súvisiacich porúch, ako sú poruchy púrazového stresu, panická porucha, generalizovaná anxietná porucha, sociálna fóbia a obsedantná kompulzívna porucha, inkontinencie moču, rôznych psychických chorôb, kašľa, edému pľúc, rôznych gastrointestinálnych porúch, napr. zápchy, funkčných gastrointestinálnych porúch ako syndróm dráždivého čreva a funkčná dyspepsia, Parkinsonova choroba a iné motorické poruchy, traumatického poranenia mozgu, mŕtvice, kardioprotekcie po infarkte myokardu, zranení chrbtice a závislosti od drog, vrátane liečby zneužívania alkoholu, nikotínu, opiátov a iných drog a na poruchy sympatického nervového systému, napríklad hypertenzie.

Zlúčeniny podľa vynálezu sú užitočné ako analgetické prostriedky na použitie počas celkovej anestézie a monitorovanej anestetickkej starostlivosti. Kombinácie prostriedkov s rôznymi vlastnosťami sa často používajú na dosiahnutie rovnováhy účinkov potrebných na udržanie anestetického stavu (napr. amnézie, analgézie, svalovej relaxácie a upokojenia). V tejto kombinácii sú zahrnuté inhalované anestetiká, hypnotiká, anxiolytiká, neuromuskulárne blokátory a opiáty.

Do rozsahu vynálezu spadá aj použitie ktorejkoľvek zo zlúčenín vyššie uvedeného vzorca I na výrobu liečiva na liečbu ktoréhokoľvek z vyššie diskutovaných stavov.

Ďalším aspektom vynálezu je spôsob liečby subjektu trpiaceho ktorýmkoľvek z vyššie diskutovaných stavov, pri ktorom sa podá účinné množstvo zlúčeniny vyššie uvedeného vzorca I pacientovi s potrebou takej liečby.

Ďalším aspektom predloženého vynálezu sú intermediáty všeobecného vzorca II,



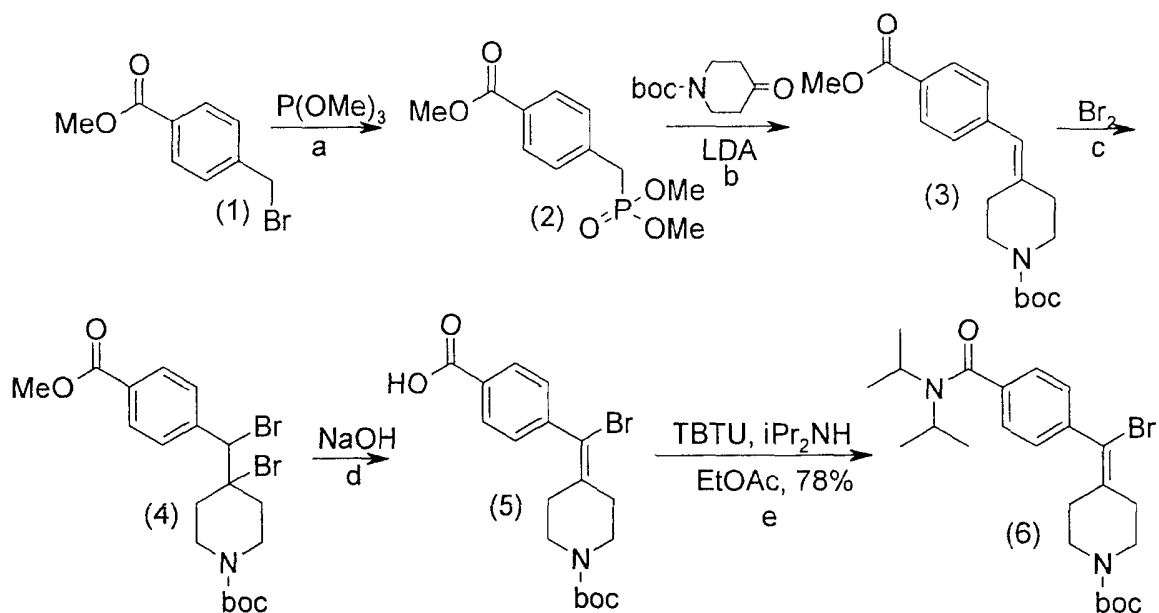
kde PG je uretánová chrániaca skupina, napríklad Boc alebo CBZ, alebo benzylová alebo substituovaná benzylová chrániaca skupina, napríklad 2,4-dimetoxybenzyl.

Spôsoby prípravy

Príklady uskutočnenia vynálezu

Vynález bude teraz opísaný podrobnejšie na nasledujúcich príkladoch, ktoré sa nemajú vysvetľovať ako obmedzenie rozsahu vynálezu.

Schéma 1: Syntéza vinylbromidového intermediátu 6



Intermediát 3: *Terc*-butyl ester kyseliny 4-(4-metoxykarbonylbenzylidén)piperidín-1-karboxylovej

(i) Zmes východiskovej látky 1 (11,2 g, 49 mmol) a trimetylfosfitu (25 ml) sa refluxovala pod N_2 5 hod. Nadbytok trimetylfosfitu sa odstránil oddestilovaním s toluénom, čím sa získala zlúčenina 2 v kvantitatívnom výťažku:

1H NMR ($CDCl_3$) δ 3,20 (d, 2 H, $J = 22$ Hz, CH_2), 3,68 (d, 3 H 10,8 Hz, OCH_3), 3,78 (d, 3 H, 11,2 Hz, OCH_3), 3,91 (s, 3 H, OCH_3), 7,38 (m, 2 H, Ar-H), 8,00 (d, 2 H, $J = 8$ Hz, Ar-H).

Do roztoku látky 2 v suchom THF (200 ml) sa po kvapkách pridal diizopropylamid lítny (32,7 ml 1,5 M roztoku v hexánoch, 49 mmol) pri -78 °C. Reakčná zmes sa potom nechala ohriať na laboratórnu teplotu a pridal sa *N-terc*-butoxykarbonyl-4-piperidón (9,76 g, 49 mmol v 100 ml suchého THF). Po 12 hodinách sa reakcia ukončila pridaním vody (300 ml) a extrahovala sa etylacetátom (3 x 300 ml). Spojené organické fázy sa vysušili nad $MgSO_4$ a odparili sa na surový produkt, ktorý sa vyčistil flash chromatografiou, čím sa získala zlúčenina 3 vo forme bielej tuhej látky (5,64 g, 35 %):

IČ (NaCl) 3424, 2974, 2855, 1718, 1 688, 1606, 1427, 1362, 1276 cm^{-1} ;

^1H NMR (CDCl_3) δ 1,44 (s, 1 H), 2,31 (t, $J = 5,5$ Hz, 2 H), 2,42 (t, $J = 5,5$ Hz, 2 H), 3,37 (t, $J = 5,5$ Hz, 2 H), 3,48 (t, $J = 5,5$ Hz, 2 H), 3,87 (s, 3 H), 6,33 (s, 1 H), 7,20 (d $J = 6,7$ Hz, 2 H), 7,94 (d, $J = 6,7$ Hz, 2 H); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 28,3, 29,2, 36,19, 51,9, 123,7, 127,8, 128,7, 129,4, 140,5, 142,1, 154,6, 166,8.

Intermediát 4: terc-Butylester kyseliny 4-bróm-4-[bróm-(4-metoxycarbonylfenyl)metyl]piperidín-1-karboxylovej

Do zmesi zlúčeniny 3 (5,2 g, 16 mmol) a K_2CO_3 (1,0 g) v suchom dichlórmetáne (200 ml) sa pridal roztok brómu (2,9 g, 18 mmol) v 30 ml CH_2Cl_2 pri 0 °C. Po 1,5 hod pri laboratórnej teplote sa roztok po odfiltrovaní K_2CO_3 zahustil. Zvyšok sa potom rozpustil v etylacetáte (200 ml), premyl sa vodou (200 ml), 0,5 M HCl (200 ml) a roztokom NaCl (200 ml) a vysušil sa nad MgSO_4 . Odstránením rozpúšťadiel sa získal surový produkt, ktorý sa rekryštalizoval z metanolu, čím sa získala zlúčenina 4 vo forme bielej tuhej látky (6,07 g, 78 %):

IČ (NaCl) 3425, 2969, 1725, 1669, 1426, 1365, 1279, 1243 cm^{-1} ;

^1H NMR (CDCl_3) δ 1,28 (s, 9 H), 1,75 (m, 1 H), 1,90 (m, 1 H), 2,1 (m, 2 H), 3,08 (br, 2 H), 3,90 (s, 3 H, OCH_3), 4,08 (br, 3 H), 7,57 (d, $J = 8,4$ Hz, 2 H, Ar-H) 7,98 (d, $J = 8,4$ Hz, 2 H, Ar-H);

^{13}C NMR (CDCl_3) δ 28,3, 36,6, 38,3, 40,3, 52,1, 63,2, 72,9, 129,0, 130,3, 130,4, 141,9, 154,4, 166,3.

Intermediát 5: terc-Butyl ester kyseliny 4-[bróm-(4-karboxyfenyl)metylén]piperidín-1-karboxylovej

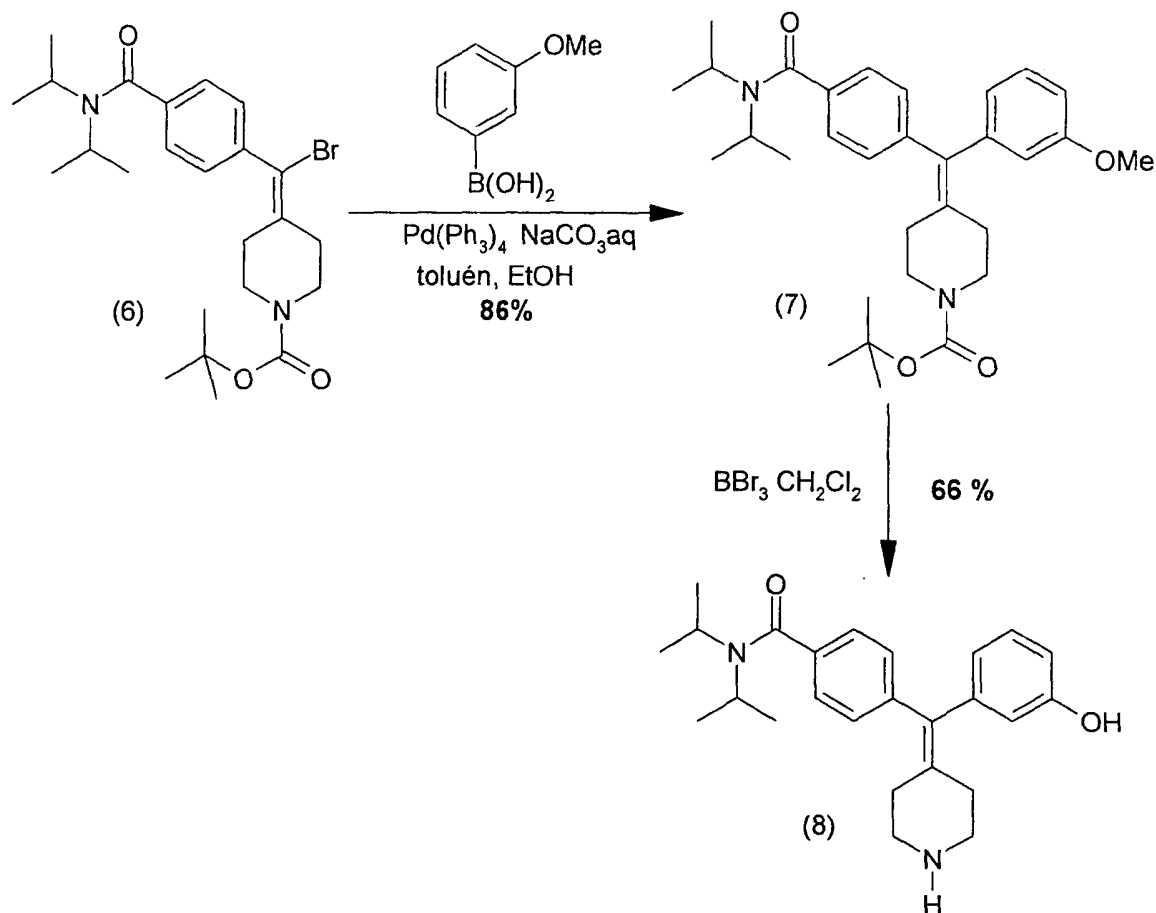
Roztok zlúčeniny 4 (5,4 g, 11 mmol) v metanole (300 ml) a 2,0 M NaOH (100 ml) sa zahrieval na 40 °C 3 hodiny. Tuhá látka sa oddelila filtráciou a vysušila sa cez noc pod vákuom. Suchá soľ sa rozpustila v 40 % acetonitrile vo vode a upravila sa na pH 2 pomocou koncentrovanej HCl. Produkt 5 (3,8 g, 87 %) sa izoloval ako biely prášok filtráciou:

^1H NMR (CDCl_3) δ 1,45 (s, 9 H, ^tBu), 2,22 (dd, $J = 5,5$ Hz, 6,1 Hz, 2 H), 2,64 (dd, $J = 5,5$ Hz, 6,1 Hz, 2 H), 3,34 (dd, $J = 5,5$ Hz, 6,1 Hz, 2 H), 3,54 (dd, $J = 5,5$ Hz, 6,1 Hz, 2 H), 7,35 (d, $J = 6,7$ Hz, 2 H, Ar-H), 8,08 (d, $J = 6,7$ Hz, 2 H, Ar-H); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 28,3, 31,5, 34,2, 44,0, 115,3, 128,7, 129,4, 130,2, 137,7, 145,2, 154,6, 170,3.

Intermediát 6: terc-Butyl ester kyseliny 4-[bróm-(4-diizopropylkarbamoylfenyl)metylén]piperidín-1-karboxylovej

Do riedkej suspenzie kyseliny 5 (50,27 g, 0,127 mol, 1,0 ekv.) v etylacetáte (350 ml) pri laboratórnej teplote sa pridá diizopropylamín (71,10 ml, 0,510 mol, 4,0 ekv.) a 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametyluróniumtetrafluórborát (TBTU, 44,90 g, 0,140 mol, 1,1 ekv.). Po dvoch dňoch miešania získanej riedkej bielej suspenzie sa reakcia ukončila pridaním vody (200 ml) a vytvorené dve fázy sa oddelili. Organická fáza sa extrahovala dvakrát dichlórmetánom (100 ml). Spojené organické extrakty sa premyli 1 M vodným roztokom HCl (150 ml) a roztokom NaCl (100 ml), vysušili sa síranom sodným, prefiltrovali a nakoncentrovali za zníženého tlaku na svetložltý olej. Surový produkt sa rekryštalizoval v terc-butylmetyléteri (300 ml). Filtrát sa vyčistil flash chromatografiou elúciou 30% etylacetátu v hexánoch a rekryštalizoval sa v zmesi etylacetátu a hexánov 10:90. Biele tuhé produkty sa spojili (47,28 g, 78 %).

Schéma 2: Paládiom katalyzovaná syntéza a odstránenie chrániacich skupín na intermediát 8



Intermediát 7: terc-Butyl ester kyseliny 4-[1-(4-diizopropylkarbamoylfenyl)-1-(3-metoxifynyl)metylén]piperidín-1-karboxylovej

Do roztoku vinylbromidu 6 (8,26 g, 17,2 mmol, 1,0 ekv.) v toluéne (130 ml) pri laboratórnej teplote sa pridala kyselina 3-metoxifynylboritá (3,14 g, 20,7 mmol, 1,2 ekv.) a po nej etanol (27 ml) a uhličitan sodný (2 M vodný roztok, 21,5 ml, 43,0 mmol, 2,5 ekv.). Po preplachovaní systému dusíkom v priebehu 15 minút sa do zmesi pridala paládium tetrakis(trifenyfosfin) (1,43 g, 1,24 mmol, 0,072 ekv.) a zmes sa potom zahriala na 90 °C. Po miešaní cez noc sa reakčná zmes ochladila na laboratórnu teplotu, reakcia sa ukončila pridaním vody (100 ml) a fázy sa oddelili. Organická fáza sa premyla vodou (100 ml) a roztokom NaCl (50 ml), vysušila síranom sodným,

prefiltrovala a nakoncentrovala za zníženého tlaku. Surový produkt sa vyčistil flash chromatografiou elúciou 50 % etylacetátu v hexánoch (7,5 g, 86 %).

Intermediát 8: 4-[1-(3-Hydroxyfenyl)-1-piperidin-4-ylidénmetyl]-*N,N*-diizopropylbenzamid

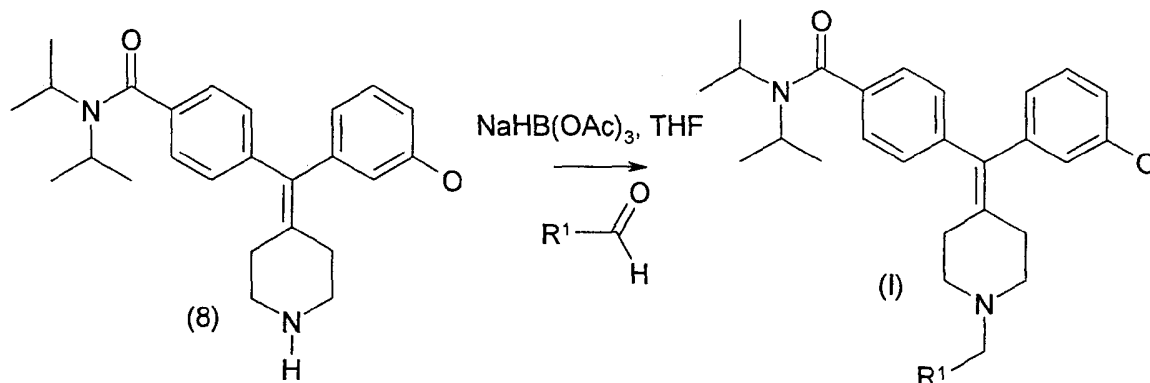
Do roztoku karbamátu 7 (5,61 g, 11,05 mmol, 1,0 ekv.) v dichlórmetáne (200 ml) pri $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ sa pridal 1 M roztok bromidu boritého v dichlórmetáne pri $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ (110,7 ml, 160,7 mmol, 10,0 ekv.). Reakčná zmes sa potom nechala pomaly ohriať na teplotu miestnosti. Po miešaní cez noc sa reakcia ukončila pri $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ pomalým pridaním metanolu. Zmes sa nakoncentrovala za zníženého tlaku. Surový olej sa vyčistil flash chromatografiou elúciou 15 % etylacetátu v hexánoch. Frakcia sa nakoncentrovala a rozpustila v zmesi 0,1 M vodného roztoku HCl (200 ml) a dichlórmetánu (200ml). Fázy sa oddelili. pH vodnej fázy sa upravilo na 9 pridaním 1,0 M vodného roztoku NaOH a roztok sa extrahoval trikrát etylacetátom (200 ml). Organické fázy sa spojili a nakoncentrovali za zníženého tlaku, čím sa získalo 2,88 g požadovanej zlúčeniny v kryštalickej forme (66 %).

Časť (320 mg, 0,82 mmol) amínu 8 s odstránenou chrániacou skupinou sa vyčistila flash chromatografiou elúciou 5 % metanolu v dichlórmetáne. Frakcia sa nakoncentrovala za zníženého tlaku a zriedila sa v dietyléteri a dichlórmetáne. Do tejto zmesi sa pridal 1 M roztok HCl v dietyléteri (cca 4 ml, cca 3,5 ekv.). Získaná zmes sa nakoncentrovala za zníženého tlaku. Biela tuhá látka sa rozotrela s dietyléterom a nakoncentrovala sa za zníženého tlaku, čím sa získala látka 8 (180 mg).

^1H NMR (400 MHz, DMSO) 7,19 (d, $J = 8,4\text{ Hz}$, 2 H, Ar-H); 7,12 (d, $J = 8,3\text{ Hz}$, 2 H, Ar-H); 7,08 (d, $J = 8,3\text{ Hz}$, 1 H, Ar-H); 6,61 (d, $J = 7,4\text{ Hz}$, 1 H, Ar-H); 6,54 (d, $J = 7,4\text{ Hz}$, 1 H, Ar-H); 6,48 (br s, 1 H, Ar-H); 3,58 (br s, 2 H, NCH); 3,10 (br s, 4 H, CH_2); 2,46 (s, 2 H, NCH_2); 2,40 (m, 2 H, NCH_2); 1,24 (br s, 12 H, CH_3)

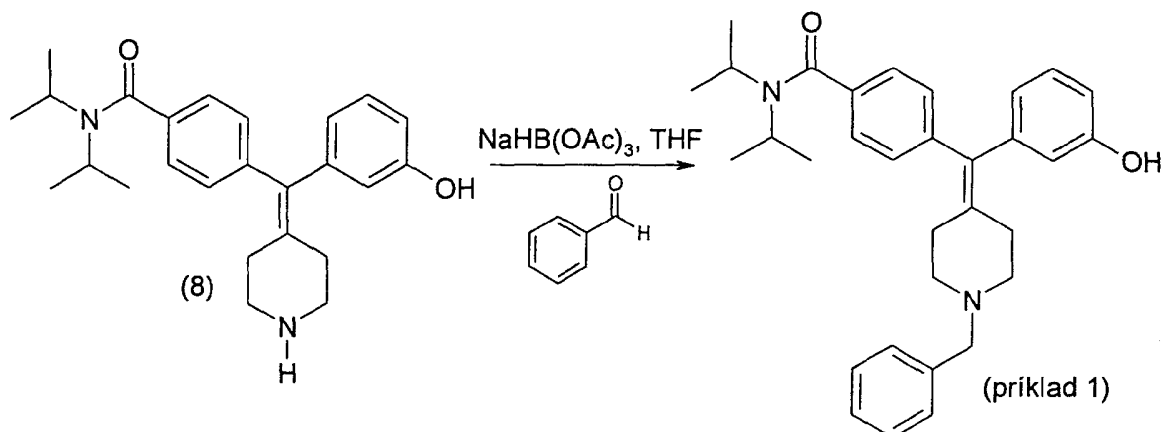
Príklady 1 – 12 sa syntetizovali podľa všeobecného syntetického postupu uvedeného nižšie.

Schéma 3: Redukčná aminácia intermediátu 8 za vzniku zlúčenín podľa predloženého vynálezu



Syntéza zlúčeniny z príkladu 1 uvedeného nižšie je typická.

Schéma 4: Redukčná aminácia intermediátu 8 s benzaldehydom za vzniku zlúčeniny podľa príkladu 1



Príklad 1: 4-[1-(1-Benzylpiperidin-4-ylidén)-1-(3-hydroxyfenyl)metyl]-*N,N*-diizopropylbenzamid

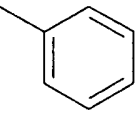
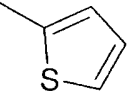
Do roztoku aminu (390 mg, 0,99 mmol, 1,0 ekv.) v tetrahydrofuráne (20 ml) pri laboratórnej teplote sa pridal benzaldehyd (121 μ l, 1,19 mmol, 1,2 ekv.). Po 10 minútach miešania sa do roztoku pridal triacetoxybórhydrid sodný (276 mg, 1,30 mmol, 1,3 ekv.). Po miešaní cez noc sa reakčná zmes zriedila dichlórmetánom (10 ml) a 2 M vodným roztokom hydroxidu sodného (15 ml). Fázy sa oddelili a organická fáza sa extrahovala roztokom NaCl (15 ml). Vodná fáza sa extrahuje trikrát dichlórmetánom (3

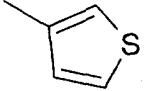
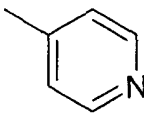
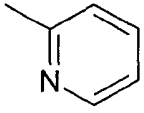
x 15 ml). Organické fázy sa spojili, vysušili síranom sodným, prefiltrovali a nakoncentrovali sa za zníženého tlaku. Surový produkt sa vyčistil flash chromatografiou elúciou 5 % metanolu v dichlórmetáne. Frakcia sa nakoncentrovala za zníženého tlaku a zriedila sa v dietyléteri a dichlórmetáne. Do tejto zmesi sa pridal 1 M roztok HCl v dietyléteri (4 ml, cca 3,5 ekv.). Získaná zmes sa nakoncentrovala za zníženého tlaku. Biela tuhá látka sa rozotrela s dietyléterom a nakoncentrovala sa za zníženého tlaku, čím sa získala látka z príkladu 1 (183 mg, 36 %).

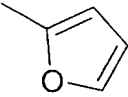
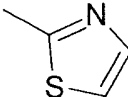
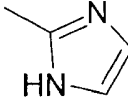
Elementárna analýza: Nájdené: C 70,16 %, H 7,21 %, N 4,55 %; vypočítané pre $C_{32}H_{38}N_2O_2 \cdot 1,80 \text{ HCl}$: C 70,10 %, H 7,32 %, N 5,11 %.

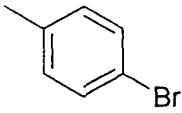
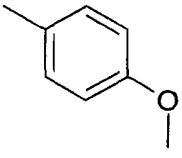
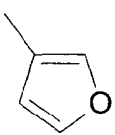
Látky z príkladov 2 – 12 sa pripravili analogicky. Analytické údaje pre látky z príkladov 1 – 10 sú zhrnuté v nižšie uvedenej tabuľke 1.

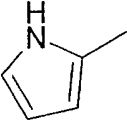
Tabuľka 1: Analytické údaje pre zlúčeniny podľa predloženého vynálezu

Pr. č.	R ¹	Názov	Údaje NMR (400 MHz)
1		4-[1-(1-Benzylpiperidin-4-ylidén)-1-(3-hydroxyfenyl)metyl]-N,N-diizopropylbenzamid	(400 MHz, DMSO) 7,55 (m, 2 H, Ar-H); 7,44 (m, 3 H, Ar-H); 7,23 (m, 2 H, Ar-H); 7,15 (m, 3 H, Ar-H); 6,65 (d, J = 8,0 Hz, 1 H); 6,57 (d, J = 7,6 Hz, 1 H, Ar-H); 6,49 (s, 1 H, Ar-H); 4,30 (s, 2 H, NCH ₂ Ar); 3,62 (br s, 2 H, NCH); 3,38 (m, 2 H, CH ₂); 3,02 (m, 2 H, CH ₂); 2,50 (m, 4 H, NCH ₂); 1,22 (m, 12 H, CH ₃)
2		4-[1-(3-Hydroxyfenyl)-1-(1-tiofen-2-ylmetyl)piperidin-4-ylidén)metyl]-N,N-diizopropylbenzamid	(400 MHz, DMSO) 7,66 (m, 1 H, Ar-H); 7,32 (br s, 1 H, Ar-H); 7,16 (m, 2 H, Ar-H); 7,09 (m, 4 H, Ar-H); 6,64 (dd, J = 1,8, 8,4 Hz, 1 H, Ar-H); 6,54 (d, J = 8,4 Hz, 1 H, Ar-H); 6,46 (m, 1 H, Ar-H); 4,52 (m, 2 H, NCH ₂ Ar); 3,59 (br s, 2 H, NCH); 3,38 (m, 3 H, CH ₂); 2,97 (m, 1 H, CH ₂); 2,50 (br s, 4 H, NCH ₂); 1,24 (br s, 12 H, CH ₃)

Pr. č.	R ¹	Názov	Údaje NMR (400 MHz)
3		4-[1-(3-Hydroxyfenyl)-1-(1-tiofen-3-ylmetylpiperidin-4-ylidén)metyl]- <i>N,N</i> -diizopropylbenzamid	(400 MHz, DMSO) 7,71 (m, 1 H, Ar-H); 7,61 (m, 1 H, Ar-H); 7,26 (br s, 1 H, Ar-H); 7,20 (d, J = 8,4 Hz, 2 H, Ar-H); 7,12 (m, 3 H, Ar-H); 6,62 (dd, J = 1,9, 7,4 Hz, 1 H, Ar-H); 6,54 (d, J = 7,4 Hz, 1 H, Ar-H); 6,46 (br s, 1 H, Ar-H); 4,27 (br s, 2 H, NCH ₂ Ar); 3,59 (br s, 2 H, NCH); 3,38 (m, 3 H, CH ₂); 2,94 (m, 2 H, CH ₂ , NCH ₂); 2,55 (br s, 3 H, NCH ₂); 1,24 (br s, 12 H, CH ₃)
4		4-[1-(3-Hydroxyfenyl)-1-(1-pyridin-4-ylmetylpiperidin-4-ylidén)metyl]- <i>N,N</i> -diizopropylbenzamid	(400 MHz, DMSO) 8,82 (m, 2 H, Ar-H); 7,98 (br s, 2 H, Ar-H); 7,20 (d, J = 8,4 Hz, 2 H, Ar-H); 7,10 (m, 3 H, Ar-H); 6,62 (d, J = 8,4 Hz, 1 H, Ar-H); 6,54 (d, J = 7,4 Hz, 1 H, Ar-H); 6,47 (m, 1 H, Ar-H); 4,45 (s, 2 H, NCH ₂ Ar); 3,58 (br s, 2 H, NCH); 3,40 (m, 2 H, CH ₂); 3,03 (br s, 2 H, CH ₂); 2,54 (br s, 4 H, NCH ₂); 1,18 (br s, 12 H, CH ₃)
5		4-[1-(3-Hydroxyfenyl)-1-(1-pyridin-2-ylmetylpiperidin-4-ylidén)metyl]- <i>N,N</i> -diizopropylbenzamid	(400 MHz, DMSO) 8,63 (d, J = 4,6 Hz, 1 H, Ar-H); 7,86 (dd, J = 2,0, 7,4 Hz, 1 H, Ar-H); 7,58 (d, J = 7,4 Hz, 1 H, Ar-H); 7,44 (dd, J = 4,6, 8,4 Hz, 1 H, Ar-H); 7,20 (d, J = 8,4 Hz, 2 H, Ar-H); 7,08 (m, 3 H, Ar-H); 6,62 (dd, J = 2,8, 7,4 Hz, 1 H, Ar-H); 6,54 (d, J = 7,4 Hz, 1 H, Ar-H); 6,47 (m, 1 H, Ar-H); 4,84 (s, 1 H, OH); 4,43 (m, 2 H, NCH ₂ Ar); 3,59 (br s, 2 H, NCH); 3,26 (br s, 4 H, CH ₂); 2,55 (br s, 4 H, NCH ₂); 1,22 (br s, 12 H, CH ₃)

Pr. č.	R ¹	Názov	Údaje NMR (400 MHz)
6		4-[1-(1-Furan-2-ylmetyl)piperidin-4-ylidén)-1-(3-hydroxyfenyl)metyl]- <i>N,N</i> -diizopropylbenzamid	(400 MHz, DMSO) 7,80 (m, 1 H, Ar-H); 7,24 (d, J = 8,4 Hz, 2 H, Ar-H); 7,15 (m, 3 H, Ar-H); 6,71 (m, 1 H, Ar-H); 6,65 (d, J = 7,2 Hz, 1 H, Ar-H); 6,56 (m, 2 H, Ar-H); 6,49 (m, 1 H, Ar-H); 4,39 (br s, 2 H, NCH ₂ Ar); 3,61 (br s, 2 H, NCH); 3,44 (m, 2 H, CH ₂); 2,99 (m, 2 H, CH ₂); 2,49 (br s, 4 H, NCH ₂); 1,22 (m, 12 H, CH ₃)
7		4-[1-(3-Hydroxyfenyl)-1-(1-tiazol-2-ylmetyl)piperidin-4-ylidén)metyl]- <i>N,N</i> -diizopropylbenzamid	(400 MHz, DMSO) 7,97 (m, 1 H, Ar-H); 7,93 (m, 1 H, Ar-H); 7,24 (d, J = 7,6 Hz, 2 H, Ar-H); 7,19 (m, 3 H, Ar-H); 6,65 (m, 1 H, Ar-H); 6,57 (d, J = 7,6 Hz, 1 H, Ar-H); 6,49 (s, 1 H, Ar-H); 4,72 (s, 2 H, NCH ₂ Ar); 3,50 (br s, 4 H, NCH, CH ₂); 3,15 (br s, 2 H, CH ₂); 2,53 (br s, 4 H, NCH ₂); 1,20 (br s, 12 H, CH ₃)
8		4-{1-(3-Hydroxyfenyl)-1-[1-(1H-imidazol-2-ylmetyl)piperidin-4-ylidén)metyl]- <i>N,N</i> -diizopropylbenzamid	(400 MHz, DMSO) 7,69 (s, 2 H, Ar-H); 7,23 (d, J = 8,0 Hz, 2 H, Ar-H); 7,14 (m, 3 H, Ar-H); 6,66 (d, J = 7,6 Hz, 1H); 6,58 (d, J = 7,6 Hz, 1 H, Ar-H); 6,49 (s, 1 H, Ar-H); 4,46 (br s, 2 H, NCH ₂ Ar); 3,58 (br s, 2 H, NCH); 3,20 (br s, 4 H, CH ₂); 2,55 (br s, 4 H, NCH ₂); 1,02 (br s, 12 H, CH ₃)

Pr. č.	R ¹	Názov	Údaje NMR (400 MHz)
9		4-[1-[1-(4-Brómbenzyl)piperidin-4-ylidén]-1-(3-hydroxyfenyl)metyl]- <i>N,N</i> -diizopropylbenzamid	(400 MHz, DMSO) 7,66 (d, J = 8,4 Hz, 2 H, Ar-H); 7,51 (d, J = 8,0 Hz, 2 H, Ar-H); 7,22 (d, J = 8,4 Hz, 2 H, Ar-H); 7,15 (m, 3 H, Ar-H); 6,65 (d, J = 8,4 Hz, 1 H); 6,57 (d, J = 7,2 Hz, 1 H, Ar-H); 6,49 (s, 1 H, Ar-H); 4,29 (s, 2 H, NCH ₂ Ar); 3,58 (br s, 2 H, NCH); 3,36 (m, 2 H, CH ₂); 3,00 (m, 2 H, CH ₂); 2,49 (m, 4 H, NCH ₂); 1,17 (br s, 12 H, CH ₃)
10		4-[1-[1-(4-metoxibenzyl)piperidin-4-ylidén]-1-(3-hydroxyfenyl)metyl]- <i>N,N</i> -diizopropylbenzamid	(400 MHz, DMSO) 7,44 (d, J = 8,0 Hz, 2 H, Ar-H); 7,23 (d, J = 8,0 Hz, 2 H, Ar-H); 7,15 (m, 3 H, Ar-H); 6,99 (d, J = 8,8 Hz, 2 H, Ar-H); 6,65 (d, J = 8,0 Hz, 1 H); 6,57 (d, J = 7,6 Hz, 1 H, Ar-H); 6,49 (s, 1 H, Ar-H); 4,23 (s, 2 H, NCH ₂ Ar); 3,76 (s, 3 H, OMe); 3,58 (br s, 2 H, NCH); 3,38 (m, 2 H, CH ₂); 2,99 (m, 2 H, CH ₂); 2,55 (br s, 4 H, NCH ₂); 1,15 (br s, 12 H, CH ₃)
11		4-[1-(1-Furan-3-ylmetyl)piperidin-4-ylidén)-1-(3-hydroxyfenyl)metyl]- <i>N,N</i> -diizopropylbenzamid	(400 MHz, DMSO) 7,81 (s, 1 H, Ar-H); 7,71 (s, 1 H, Ar-H); 7,20 (d, J = 7,4 Hz, 2 H, Ar-H); 7,10 (m, 3 H, Ar-H); 6,69 (s, 1 H, Ar-H); 6,62 (dd, J = 1,9, 8,4 Hz, 1 H, Ar-H); 6,54 (d, J = 8,4 Hz, 1 H, Ar-H); 4,13 (s, 2 H, NCH ₂ Ar); 3,59 (br s, 2 H, NCH); 3,37 (br s, 2 H, CH ₂); 2,92 (m, 2 H, CH ₂); 2,49 (br s, 4 H, NCH ₂); 1,22 (br s, 12 H, CH ₃)

Pr. č.	R ¹	Názov	Údaje NMR (400 MHz)
12		4-[1-(1-pyrol-2-ylmetylpiperidin-4-ylidén)-1-(3-hydroxyfenyl)metyl]-N,N-diizopropylbenzamid	(400 MHz, CD ₃ OD) 1,13 (br s, 6 H, CH ₃); 1,48 (br s, 6 H, CH ₃); 2,40 – 2,50 (m, 2 H, CH ₂); 2,70 – 2,81 (m, 2 H, CH ₂); 2,94 – 3,00 (m, 2 H, CH ₂); 3,46 – 3,50 (m, 2 H, CH ₂); 3,62 (br s, 1 H, NCH); 3,83 (br s, 1 H, NCH); 6,13 – 6,15 (m, 1 H, Ar-H); 6,32 – 6,34 (m, 1 H, Ar-H); 6,50 – 6,52 (m, 1 H, Ar-H); 6,58 – 6,61 (m, 1 H, Ar-H); 6,65 – 6,68 (m, 1 H, Ar-H); 6,85 – 6,86 (m, 1 H, Ar-H); 7,12 (t, J = 8 Hz, 1 H, Ar-H); 7,19 – 7,28 (m, 4 H, Ar-H)

Farmaceutické kompozície

Nové zlúčeniny podľa predloženého vynálezu možno podávať orálne, intramuskulárne, subkutánne, lokálne, intranazálne, intraperitoneálne, intratorakálne, intravenózne, epidurálne, intratekálne, intracerebroventrikulárne a injekciou do kĺbov.

Výhodnou cestou podania je orálne, intravenózne alebo intramuskulárne podanie.

Dávka bude závisieť od cesty podania, závažnosti choroby, veku a váhy pacienta a ďalších faktorov bežne zvažovaných ošetrojúcim lekárom pri určovaní individuálneho režimu a úrovne dávkovania ako najvhodnejšej pre konkrétneho pacienta.

Na prípravu farmaceutických kompozícií zo zlúčenín podľa tohto vynálezu môžu byť inertné farmaceuticky prijateľné nosiče buď tuhé alebo kvapalné. Medzi prípravky v tuhej forme patria prášky, tablety, dispergovateľné granuly, kapsuly, obličky a supozitória.

Tuhým nosičom môže byť jedna alebo viacero látok, ktoré môžu pôsobiť aj ako riedidlá, príchute, solubilizátory, mazadlá, suspenlačné prostriedky, spojivá alebo tabletové dezintegrátory; môže to byť aj puzdrový materiál.

V práškoch je nosičom jemne rozomletá tuhá látka, ktorá je v zmesi s jemne rozomletou aktívnou zložkou. V tabletách je aktívna zložka zmiešaná s nosičom majúcim potrebné väzobné vlastnosti vo vhodných pomeroch a zlisovaná do požadovaného tvaru a veľkosti.

Pri príprave kompozícií supozitórií sa nízko topiaci vosk, napríklad zmes glyceridov mastných kyselín a kakaového masla, najprv roztopí a aktívna zložka sa v ňom disperguje napríklad miešaním. Roztavená homogénna zmes sa potom naleje do foriem vhodnej veľkosti a nechá sa vychladnúť a stuhnúť.

Vhodnými nosičmi sú uhličitan horečnatý, stearan horečnatý, mastenec, laktóza, cukor, pektín, dextrín, škrob, tragant, metylcelulóza, natrium karboxymetylcelulóza, nízko topiaci vosk, kakaové maslo a podobne.

Medzi soli patria okrem iných aj farmaceuticky prijateľné soli. Medzi príklady farmaceuticky prijateľných solí v rámci rozsahu predloženého vynálezu patria: acetát, benzénsulfonát, benzoát, bikarbonát, bitartrát, bromid, kalcium acetát, kamzylát, karbonát, chlorid, citrát, dihydrochlorid, edetát, edisylát, estolát, esylát, fumarát, glukaptát, glukonát, glutamát, glykolyarzanilát, hexylrezorcínát, hydrabamín, hydrobromid, hydrochlorid, hydroxynaftoát, isetionát, laktát, laktobionát, malát, maleát, mandelát, mezlát, metylbromid, metylnitrát, metylsulfát, mukát, napsylát, nitrát, pamoát (embonát), pantotenát, fosfát/difosfát, polygalakturonát, salicylát, stearát, subacetát, sukcinát, sulfát, tanát, tartrát, teoklát, trietjodid, benzatín, chlórprokaín, cholín, dietanolamín, etyléndiamín, meglumín, prokaín, soli alumínia, kalcia, lítia, magnézia, draslíka a zinku.

Medzi príklady farmaceuticky neprijateľných solí v rámci rozsahu predloženého vynálezu patria: hydrojodid, perchlorát a tetrafluórborát. Mohli by byť využiteľné aj

farmaceuticky neprijateľné soli vzhľadom na svoje výhodné fyzikálne a/alebo chemické vlastnosti, napríklad kryštalinitu.

Výhodné farmaceuticky prijateľné soli sú hydrochloridy, sírany a bitartráty.

Hydrochloridové a síranové soli sú osobitne výhodné.

Pojem kompozícia zahŕňa prípravok aktívnej zložky s puzdrovým materiálom ako nosičom dávajúcim kapsľu, v ktorej je aktívna zložka (s ďalšími nosičmi alebo bez nich) obalená nosičom, ktorý je takto v spojení s ňou. Podobne sú zahrnuté aj obličky.

Tablety, prášky, obličky a kapsuly možno použiť ako tuhé liekové formy vhodné na orálne podanie.

Medzi kvapalné kompozície patria roztoky, suspenzie a emulzie. Ako príklady vodných prípravkov vhodných na parenterálne podanie možno spomenúť roztoky aktívnej zlúčeniny v sterilnej vode alebo vodno-propylénglykolové roztoky. Kvapalné kompozície možno formulovať aj v roztoku vo vodno-polyetylénglykolovom roztoku.

Vodné roztoky na orálne podanie možno pripraviť rozpustením aktívnej zložky vo vode a pridaním vhodných farbív, príchuťí, stabilizátorov a zahusťovadiel podľa potreby. Vodné suspenzie na orálne použitie možno pripraviť dispergovaním jemne rozomletej aktívnej zložky vo vode spolu s viskóznym materiálom, napríklad prírodnými syntetickými gumami, živicami, metylcelulózou, natrium karboxymetylcelulózou a ďalšími suspenzačnými prostriedkami známymi v oblasti farmaceutických formulácií.

Farmaceutická kompozícia je s výhodou v jednotkovej liekovej forme. V takej forme je kompozícia rozdelená na jednotkové dávky obsahujúce vhodné množstvá aktívnej zložky. Jednotkovou liekovou formou môže byť balený prípravok, pričom balenie obsahuje diskrétne množstvá prípravku, napríklad balené tablety, kapsuly a prášky v liekovkách alebo ampulkách. Jednotkovou liekovou formou môže byť aj kapsula, oblička alebo tableta samotná, alebo to môže byť vhodné množstvo ktorýchkoľvek z týchto balených foriem.

Biologické hodnotenie

In vitro model

Bunková kultúra

A. Ľudské bunky 293S exprimujúce klonované ľudské receptory μ , δ a κ a neomycínovú rezistenciu sa kultivovali v suspenzii pri 37 °C a 5 % CO₂ v trepačkových bankách obsahujúcich bezkalciový DMEM 10 % FBS, 5 % BCS, 0,1 % Pluronic F-68 a 600 μ g/ml geneticínu.

B. Myšacie a potkanie mozgy sa odvážili a prepláchli v ľadovo studenom PBS (obsahujúcom 2,5 mM EDTA, pH 7,4). Mozgy sa homogenizovali polytrónom 15 s (myš) alebo 30 s (potkan) v ľadovo studenom lýznom tlmivom roztoku (50 mM Tris, pH 7,0, 2,5 mM EDTA, s fenylmetylsulfonyl fluoridom pridaným bezprostredne pred použitím do 0,5 mM z 0,5 M zásobného roztoku v DMSO:etanol).

Príprava membrány

Bunky sa granulovali a resuspendovali v lýznom tlmivom roztoku (50 mM Tris, pH 7,0, 2,5 mM EDTA s prídavkom PMSF bezprostredne pred použitím na 0,1 mM z 0,1 M zásobného roztoku v etanole), inkubovali sa na ľade 15 min a potom sa homogenizovali polytrónom počas 30 s. Suspenzia sa centrifugovala pri 1000 g (max) počas 10 min pri 4 °C. Supernatant sa odložil na ľad a granuly sa resuspendovali a centrifugovali ako predtým. Supernatanty z oboch centrifugovaní sa skombinovali a centrifugovali pri 46 000 g (max) počas 30 min. Granuly sa resuspendovali v studenom tlmivom roztoku Tris (50 mM Tris/Cl, pH 7,0) a centrifugovali sa znova. Konečné granuly sa resuspendovali v membránovom tlmivom roztoku (50 mM Tris, 0,32 M sacharózy, pH 7,0). Alikvóty (1 ml) v polypropylénových skúmavkách sa zmrazili v suchom ľade s etanolom a uložili sa pri -70 °C až do použitia. Proteínové koncentrácie sa určili modifikovaným Lowreyho testom pomocou SDS.

Skúšky viazania

Membrány sa roztopili pri 37 °C, ochladili sa na ľade, pretlačili sa 3 krát cez ihlu veľkosti 25 a zriedili sa do väzobného tlmivého roztoku (50 mM Tris, 3 mM MgCl₂, 1 mg/ml BSA (Sigma A-7888), pH 7,4, ktorý sa uložil pri 4 °C po prefiltrovaní cez 0,22 m filter a do ktorého sa čerstvo pridalo 5 µg/ml aprotinínu, 10 µM bestatínu, 10 µM diprotínu A, žiadny DTT). Alikvóty po 100 µl sa pridali do ľadom chladených 12 x 75 mm polypropylénových skúmaviek obsahujúcich 100 µl príslušného rádioligandu a 100 µl testovanej zlúčeniny pri rôznych koncentráciách. Celkové (TB) a nešpecifické (NS) viazanie bolo určené za neprítomnosti a prítomnosti 10 µM naloxónu. Skúmavky sa vírili a inkubovali pri 25 °C počas 60 – 75 min, na čo sa obsah rýchlo odsal a premyl približne 12 ml/skúmavku ľadového premývacieho tlmivého roztoku (50 mM Tris, pH 7,0, 3 mM MgCl₂) cez filtre GF/B (Whatman) namočené najmenej 2 h vopred v 0,1 % polyetylénimíne. Rádioaktivita (dpm) zachytená na filtroch sa zmerala pomocou beta počítateľa po máčaní filtrov počas aspoň 12 h v miniampulkách obsahujúcich 6 – 7 ml scintilačnej tekutiny. Ak sa test robí v 96-jamkových platničkách s hlbokými jamkami, filtrácia sa robí cez 96-miestne unifiltre namočené v PEI, ktoré sa premyjú 3 x 1 ml premývacieho tlmivého roztoku a vysušia v peci pri 55 °C počas 2 h. Filtračné platničky sa spočítali v prístroji TopCount (Packard) po pridaní 50 µl MS-20 scintilačnej tekutiny na jednu jamku.

Funkčné testy

Agonistická aktivita zlúčenín sa meria určovaním stupňa, v ktorom komplex zlúčenín s receptorom aktivuje viazanie GTP na G-proteíny, na ktoré sú receptory naviazané. V teste viazania GTP sa GTP[γ]³⁵S kombinuje s testovanými zlúčeninami a membránami z buniek HEK-293S exprimujúcich klonované ľudské opiátové receptory alebo z homogenizovaného potkanieho a myšacieho mozgu. Agonisti stimulujú viazanie GTP[γ]³⁵S v týchto membránach. Hodnoty EC₅₀ a E_{max} zlúčenín sa určujú z kriviek dávka – odozva. Uskutočňujú sa posuny krivky dávka – odozva doprava pomocou delta agonistu naltrindolu, aby sa overilo, či je agonistická aktivita sprostredkovaná cez delta receptory.

Postup pre GTP potkanieho mozgu

Membrány potkanieho mozgu sa rozmrazia pri 37 °C, 3 krát sa nechajú prejsť cez ihlu veľkosti 25 s tupým koncom a zriedia sa vo väzobnom roztoku GTP γ S (50 mM Hepes, 20 mM NaOH, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, pH 7,4, pridá sa čerstvé: 1 mM DTT, 0,1 % BSA). 120 μ M GDP v konečnej koncentrácii sa pridá do membránových zriedení. EC₅₀ a E_{max} zlúčenín sa vyhodnotí z 10-bodových kriviek dávka – odozva nameraných v 300 μ l s vhodným množstvom membránového proteínu (20 μ g/jamka) a 100 000 – 130 000 rozpadov za minútu GTP γ ³⁵S na jamku (0,11 – 0,14 nM). Bazálne a maximálne stimulované viazanie sa určí za neprítomnosti a za prítomnosti 3 μ M SNC-80.

Analýza dát

Špecifické viazanie (SB) sa vypočítalo ako TB-NS a SB za prítomnosti rôznych testovaných zlúčenín sa vyjadriť ako percento kontrolného SB. Hodnoty IC₅₀ a Hillových koeficientov (n_H) pre ligandy pri vytesňovaní špecificky viazaného rádioligandu sa vypočítali z logaritmickej kriviek alebo programov na prekladanie kriviek bodmi ako Ligand, GraphPad Prism, SigmaPlot alebo ReceptorFit. Hodnoty K_i sa vypočítali z Cheng-Prussoffovej rovnice. Stredné \pm S.E.M. hodnoty pre IC₅₀, K_i a n_H sa udávajú pre ligandy testované aspoň tromi krivkami vytesňovania. Biologická aktivita zlúčenín podľa predloženého vynálezu je uvedená v tabuľke 2.

Tabuľka 2: Biologické údaje

Pr. č.	HDelta (nM)			Potkanie mozog (nM)		Myšací mozog (nM)	
	IC ₅₀	EC ₅₀	%EMax	EC ₅₀	%EMax	EC ₅₀	%EMax
1-11	0,36-1,45	0,26-0,91	91-97	0,85-7,28	95-170	0,88-6,28	96-163

Experimenty nasýtenia receptorov

Hodnoty K_{δ} rádioligandov sa určili uskutočnením testov viazania na bunkových membránach s vhodnými rádioligandmi pri koncentráciách od 0,2 do 5-násobku odhadovanej K_{δ} (až do 10 krát, ak sú potrebné množstvá rádioligandu praktické). Špecifické viazanie rádioligandu sa vyjadrilo v pmol/mg membránového proteínu. Hodnoty K_{δ} a B_{max} z jednotlivých experimentov sa získali z nelineárnych závislostí špecificky viazaného (B) oproti nM voľného (F) rádioligandu z jednotlivca podľa jednomiestneho modelu.

Určenie mechano-alodýnie pomocou Von Freyovho testu

Test sa uskutočnil medzi 08:00 a 16:00 h použitím metódy, ktorú opísal Chaplan et al. (1994). Potkany sa umiestnili do plexisklových klietok na dne z drôteného sita, ktoré umožňovalo prístup k labkám, a nechali sa udomáčniť 10 – 15 min. Testovanou oblasťou bol stred chodidla zadnej labky vyhýbajúc sa menej citlivým chodidlovým vankúšikom. Labky sa dotýkalo pomocou série 8 Von Freyových vlasov s logaritmicke narastajúcou tuhosťou (0,41, 0,69, 1,20, 2,04, 3,63, 5,50, 8,51 a 15,14 gramov; Stoelting, III, USA). Von Freyov vlas sa aplikoval odspodu cez podlahu z drôteného sita kolmo na povrch chodidla s dostatočnou silou, aby sa spôsobilo mierne prehnutie oproti labke, a držal sa približne 6 – 8 sekúnd. Pozitívna odozva sa zaznamenala, ak bola labka prudko odtiahnutá. Myknutie okamžite po odstránení vlasu sa tiež považovalo za pozitívnu odozvu. Chôdza sa považovala za nejednoznačnú reakciu a v takých prípadoch sa stimul opakoval.

Protokol testu

Zvieratá sa testovali na pooperačný deň 1 pre skupinu ošetrovanú FCA. Prah 50 % uhýbania sa určil pomocou Dixonovej metódy zdola nahor (1980). Testovanie sa začalo 2,04 g vlasom uprostred série. Stimuly sa vždy prezentovali postupne, či vzostupne alebo zostupne. Za neprítomnosti reakcie odtiahnutia labky na prvotne vybraný vlas sa prezentoval silnejší stimul; v prípade odtiahnutia labky sa zvolil nasledujúci slabší stimul. Výpočet optimálneho prahu touto metódou vyžaduje 6 reakcií

v bezprostrednej blízkosti 50 % prahu a počítanie týchto 6 reakcií začalo, keď sa objavila prvá zmena v reakcii, teda keď sa prvýkrát prekročil prah. V prípadoch, kedy prahy spadali mimo intervalu stimulov, priradili sa hodnoty 15,14 (normálna citlivosť) alebo 0,41 (maximálne alodynické). Výsledný vzor pozitívnych a negatívnych reakcií sa vyjadril v tabuľkovej forme pomocou konvencie X = žiadne odtiahnutie; O = odtiahnutie a 50 % prah odťahovania sa interpoloval pomocou vzorca:

$$50 \% \text{ g prah} = 10^{(X_f + k\delta)} / 10\ 000$$

kde X_f = hodnota posledného použitého von Freyovho vlasu (logaritmickej jednotky); k = tabuľková hodnota (z Chaplan et al. (1994)) pre vzor pozitívnych/negatívnych reakcií; a δ = stredný rozdiel medzi stimulmi (logaritmickej jednotky). Tu $\delta = 0,224$.

Von Freyove prahy sa skonvertovali na percento maximálneho možného účinku (% MPE) podľa Chaplan et al. 1994. Na výpočet % MPE sa použila nasledujúca rovnica:

$$\%MPE = \frac{\text{Prah pod pôsobením liečiva (g) - prah alodýnie (g) \times 100}{\text{kontrolný prah (g) - prah alodýnie (g)}}$$

Podávanie testovanej látky

Potkanom sa injekčne podala (subkutánne, intraperitoneálne, intravenózne alebo orálne) testovaná látka pred von Freyovým testom, pričom čas medzi podaním testovanej zlúčeniny a von Freyovým testom sa menil v závislosti od povahy testovanej zlúčeniny.

Test zvlývania

Kyselina octová vyvoláva brušné kontrakcie pri intraperitoneálnom podaní myšiam. Tie potom typickým spôsobom vystierajú telo. Keď sa podajú analgetiká, tento opísaný pohyb sa pozoruje menej často a liečivo je potenciálne dobrým kandidátom. Za kompletný a typický reflex zvlývania sa považuje to, keď sú prítomné

nasledujúce prvky: zviera sa nehýbe, dolná časť chrbta je mierne preliačená, sú pozorovateľné dolné plochy chodidiel *oboich* labiek. V tomto teste zlúčeniny podľa predloženého vynálezu vykazujú významnú inhibíciu odoziev zvládania po orálnom podaní 1 – 100 $\mu\text{mol/kg}$.

(i) Príprava roztokov

Kyselina octová (AcOH): 120 μl kyseliny octovej sa pridá do 19,88 ml destilovanej vody, aby sa získal konečný objem 20 ml s konečnou koncentráciou 0,6 % AcOH. Roztok sa potom pomieša (vívka) a je pripravený na injekciu.

Zlúčenina (liečivo): Každá zlúčenina sa pripraví a rozpustí v najvhodnejšom vehikule podľa štandardných postupov.

(ii) Podávanie roztokov

Zlúčenina (liečivo) sa podá orálne, intraperitoneálne (i.p.), subkutánne (s.c.) alebo intravenózne (i.v.) pri 10 ml/kg (s prihliadnutím na priemernú telesnú hmotnosť myši) 20, 30 alebo 40 minút (podľa triedy zlúčeniny a jej charakteristik) pred testovaním. Keď sa zlúčenina podáva centrálné – intraventrikulárne (i.c.v.) alebo intratekálne (i.t.), podá sa objem 5 μl .

AcOH sa podá intraperitoneálne (i.p.) na dvoch miestach pri 10 ml/kg (s prihliadnutím na priemernú telesnú hmotnosť myši) bezprostredne pred testovaním.

(iii) Testovanie

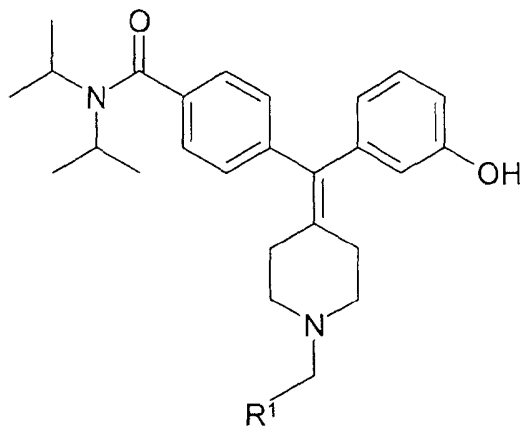
Zviera (myš) sa pozoruje počas 20 minút a počet výskytov (reflexu zvládania) sa zaznamená a sumarizuje na konci experimentu. Myši sa držia v individuálnych klietkach typu škatule na topánky s kontaktnou podstielkou. Obyčajne sa súčasne pozorujú 4 myši: jedna kontrolná a tri dávky liečiva.

Pre indikácie anxiety a anxiety podobné indikácie sa účinnosť stanovila Geller – Seirterovým testom konfliktu u potkanov.

Pre indikáciu funkčnej gastrointestinálnej poruchy sa účinnosť stanovila testom, ktorý opísal Coutinho S. V. *et al*, American Journal of Physiology - Gastrointestinal & Liver Physiology, 282 (2): G307 – 16, február 2002, na potkanoch.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Zlúčenina vzorca I



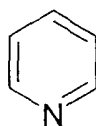
kde

R¹ je vybrané z nasledujúcich:

(i) fenyl;



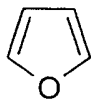
(ii) pyridinyl



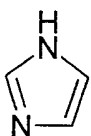
(iii) tienyl



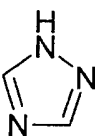
(iv) furanyl



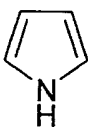
(v) imidazolyl



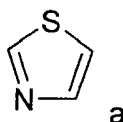
(vi) triazolyl



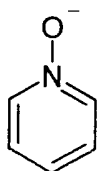
(vii) pyrolyl



(viii) tiazolyl



(x) pyridyl-N-oxid



kde každý fenylový kruh R^1 a heteroaromatický kruh R^1 môže byť nezávisle ďalej substituovaný 1, 2 alebo 3 substituentmi nezávisle vybranými spomedzi

nasledujúcich: lineárny a rozvetvený C₁-C₆ alkyl, NO₂, CF₃, C₁-C₆ alkoxy, chlór, fluór, bróm, a jód, ako aj ich soli.

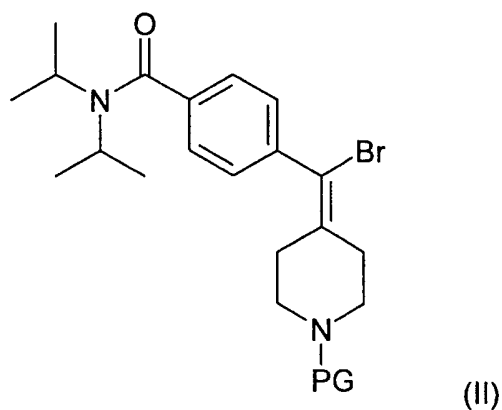
2. Zlúčenina podľa nároku 1, kde každý fenylový kruh R¹ a heteroaromatický kruh R¹ môže byť nezávisle ďalej substituovaný 1, 2 alebo 3 substituentmi nezávisle vybranými spomedzi nasledujúcich: metyl, CF₃, chlór, fluór, bróm, and jód.
3. Zlúčenina podľa nároku 1, kde každý fenylový kruh R¹ a heteroaromatický kruh R¹ môže byť nezávisle ďalej substituovaný metylovou skupinou.
4. Zlúčenina podľa nároku 1, kde R¹ je fenylyl, pyrolyl, pyridinyl, tienyl alebo furanyl.
5. Zlúčenina podľa nároku 1, vybraná spomedzi nasledujúcich:
 - 4-[1-(1-benzylpiperidin-4-ylidén)-1-(3-hydroxyfenyl)metyl]-*N,N*-diizopropylbenzamid;
 - 4-[1-(3-hydroxyfenyl)-1-(1-tiofen-2-ylmetylpiperidin-4-ylidén)metyl]-*N,N*-diizopropylbenzamid;
 - 4-[1-(3-hydroxyfenyl)-1-(1-tiofen-3-ylmetylpiperidin-4-ylidén)metyl]-*N,N*-diizopropylbenzamid;
 - 4-[1-(3-hydroxyfenyl)-1-(1-pyridin-4-ylmetylpiperidin-4-ylidén)metyl]-*N,N*-diizopropylbenzamid;
 - 4-[1-(3-hydroxyfenyl)-1-(1-pyridin-2-ylmetylpiperidin-4-ylidén)metyl]-*N,N*-diizopropylbenzamid;
 - 4-[1-(1-furan-2-ylmetylpiperidin-4-ylidén)-1-(3-hydroxyfenyl)metyl]-*N,N*-diizopropylbenzamid;
 - 4-[1-(3-hydroxyfenyl)-1-(1-tiazol-2-ylmetylpiperidin-4-ylidén)metyl]-*N,N*-diizopropylbenzamid;
 - 4-[1-(3-hydroxyfenyl)-1-[1-(1H-imidazol-2-ylmetyl)piperidin-4-ylidén]-metyl]-*N,N*-diizopropylbenzamid;
 - 4-[1-[1-(4-brómbenzyl)piperidin-4-ylidén]-1-(3-hydroxyfenyl)metyl]-*N,N*-diizopropylbenzamid;

4-[1-(1-pyrol-2-ylmethylpiperidin-4-ylidén)-1-(3-hydroxyfenyl)metyl]-*N,N*-diizopropylbenzamid;

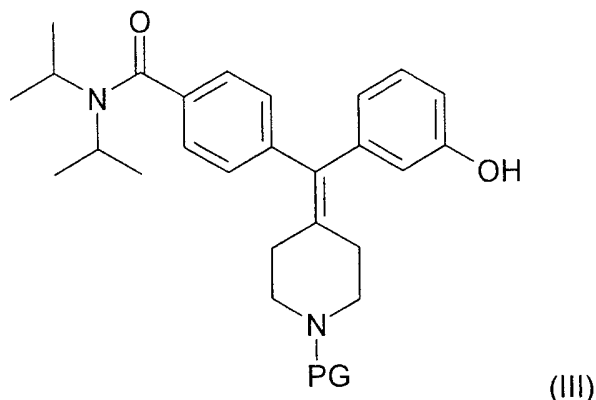
4-[1-[1-(4-metoxybenzyl)piperidin-4-ylidén]-1-(3-hydroxyfenyl)metyl]-*N,N*-diizopropylbenzamid a

4-[1-(1-furan-3-ylmethylpiperidin-4-ylidén)-1-(3-hydroxyfenyl)metyl]-*N,N*-diizopropylbenzamid.

6. Zlúčenina podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov vo forme svojho dihydrochloridu, sulfátu, tartrátu, ditrifluóracetátu alebo citrátu.
7. Postup na prípravu zlúčeniny vzorca I, vyznačujúci sa tým, že sa zahŕňa reakciu A) zlúčeniny všeobecného vzorca II

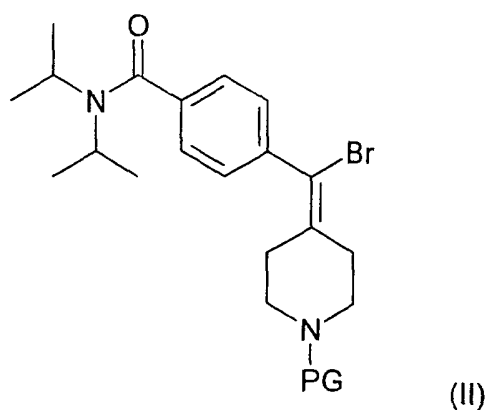


kde PG je uretánová chrániaca skupina, napríklad Boc alebo CBZ, alebo benzylová alebo substituovaná benzylová chrániaca skupina, napríklad 2,4-dimetoxybenzyl, s kyselinou 3-hydroxyfenylboritou, použitím paládiového katalyzátora, napr. $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, za prítomnosti bázy, napr. Na_2CO_3 , za vzniku zlúčenín všeobecného vzorca III,



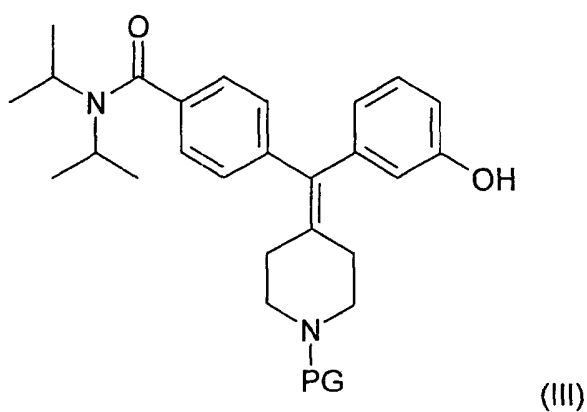
z ktorej sa potom odstráni chrániaca skupina za štandardných podmienok a alkyluje sa za redukčných podmienok zlúčeninou všeobecného vzorca $R^1\text{-CHO}$ za vzniku zlúčenín všeobecného vzorca 1.

8. Zlúčenina podľa nároku 1 na použitie pri terapii.
9. Zlúčenina podľa nároku 8, kde terapiou je manažment bolesti.
10. Farmaceutická kompozícia, vyznačujúca sa tým, že zahŕňa zlúčeninu vzorca I podľa nároku 1 ako aktívnu zložku spolu s farmaceuticky prijateľným nosičom.
11. Spôsob liečby bolesti, vyznačujúci sa tým, že sa účinné množstvo zlúčeniny vzorca I podľa nároku 1 podá subjektu s potrebou manažmentu bolesti.
12. Spôsob liečby funkčných gastrointestinálnych porúch, vyznačujúci sa tým, že sa účinné množstvo zlúčeniny vzorca I podľa nároku 1 podá subjektu trpiacemu touto funkčnou gastrointestinálnou poruchou.
13. Spôsob liečby anxiety, vyznačujúci sa tým, že sa účinné množstvo zlúčeniny vzorca I podľa nároku 1 podá subjektu trpiacemu touto anxiety.
14. Zlúčenina všeobecného vzorca II



kde PG je uretánová chrániaca skupina, napríklad Boc alebo CBZ, alebo benzylová alebo substituovaná benzylová chrániaca skupina, napríklad 2,4-dimetoxybenzyl.

15. Zlúčenina všeobecného vzorca III



kde PG je uretánová chrániaca skupina, napríklad Boc alebo CBZ, alebo benzylová alebo substituovaná benzylová chrániaca skupina, napríklad 2,4-dimetoxybenzyl.