

РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ

(19) BG

(11) 108333 A
7(51) C 07 D 233/94,

295/155, 333/20

A 61 K 31/495, 31/496

A 61 P 25/04, 25/22



ЗАЯВКА ЗА ПАТЕНТ

ЗА

ИЗОБРЕТЕНИЕ

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Регистров № 108333

(22) Заявено на 07.11.2003

(24) Начало на действие
на патента от:

Приоритетни данни

(31) 0101772 (32) 18.05.2001 (33) SE
0103820 15.11.2001 SE

(41) Публикувана заявка в
бюлетин № 12 на 31.12.2004

(45) Отпечатано на

(46) Публикувано в бюлетин №
на

(56) Информационни източници:

(62) Разделена заявка от рег. №

(71) Заявител(и):

ASTRAZENECA AB, SOEDERTAELJE (SE)

(72) Изобретател(и):

William Brown

Christopher Walpole, Montreal, Quebec (CA)

Niklas Plobeck, Soedertaelje (SE)

(74) Представител по индустриална
собственост:

Георги Цветанов Перев, 1124 София,
ул. "Леонардо да Винчи" 3

(86) № и дата на PCT заявка:

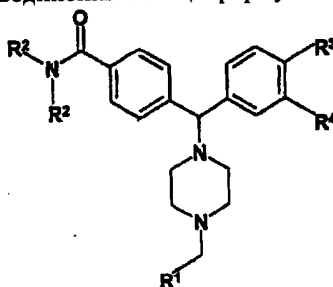
PCT/SE2002/000956, 16.05.2002

(87) № и дата на PCT публикация:

WO2002/094794, 28.11.2002

(54) 4(ФЕНИЛ-ПИПЕРАЗИНИЛ-МЕТИЛ) БЕНЗАМИДНИ ПРОИЗВОДНИ И ТЯХНОТО ИЗПОЛЗВАНЕ ЗА ЛЕЧЕНИЕ НА БОЛКА, ПОТИСНАТОСТ ИЛИ СТОМАШНО-ЧРЕВНИ РАЗСТРОЙСТВА

(57) Изобретението се отнася до съединения с обща формула



в която R¹ е избран от групата, състояща се от фенил, пиридинил, тиенил, фуранил, имидазолил, пирилолил, триазолил, тиазолил и пиридин-N-оксид; R² е независимо избран от етил и изопропил; R³ е независимо избран от водород и флуоро; R⁴ е независимо избран от -OH, -NH₂ и -NHSO₂R⁵; и R⁵ е независимо избран от водород, -CF₃ и C₁-C₆ алкил, или техни соли или отделни енантиомери и техни соли, като всеки R¹ хетероароматен пръстен може да бъде евентуално и независимо допълнително заместен с 1, 2 или 3 заместителя, избрани от линеен и разклонен C₁-C₆ алкил, NO₂, CF₃, C₁-C₆ алкокси, хлоро, флуоро, бром и йодо. Заместванията при фениловия и хетероароматния пръстен могат да се проведат в която и да е позиция на пръстенните системи. Изобретението се отнася и до техни фармацевтично приемливи соли и фармацевтични състави, съдържащи новите съединения, и до използването им в медицината, по-специално за лечение на болка, потиснатост и функционални стомашно-чревни разстройства.

BG 108333 A

15 претенции

2687/03-ГП

**4 - (ФЕНИЛ-ПИПЕРАЗИНИЛ-МЕТИЛ) -БЕНЗАМИДНИ ПРОИЗВОДНИ И ТЯХНОТО
ИЗПОЛЗВАНЕ ЗА ЛЕЧЕНИЕТО НА БОЛКА, ПОТИСНАТОСТ ИЛИ СТОМАШНО-
ЧРЕВНИ РАЗСТРОЙСТВА**

Област на техниката

Настоящото изобретение се отнася до нови съединения, до метод за тяхното получаване, тяхното използване и фармацевтични състави, съдържащи новите съединения. Новите съединения са полезни в терапията и по-специално за лечение на болка, потиснатост и функционални стомашно-чревни разстройства.

Предшестващо състояние на техниката

Установено е, че δ рецепторът има значение за много функции в тялото, като например за кръвоносната система и системата за болка. Лигандите за δ рецептора могат следователно да намерят потенциално приложение като аналгетици, и/или като антихипертонични средства. Показано е също така, че лигандите за δ рецептора притежават имуномодулираща активност.

Понастоящем са идентифицирани най-малко три различни популации опиоидни рецептори (μ , δ и κ), като и трите се явяват както в централната, така и в периферната нервна система при много видове, включително човек. В различни животински модели при активирането на един или повече от тези рецептори се наблюдава аналгезия.

С малки изключения, намиращите се понастоящем δ опиоидни лиганди са по природа пептидни и не са подходящи за прилагане чрез системните пътища. Пример за непептиден δ агонист е SNC80 (Bilsky E.J. et al., Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 273 (1), pp.

359-366 (1995)). Все още обаче съществува необходимост от селективни δ -агонисти, които притежават не само подобрена селективност, но и подобрен профил на страничните ефекти.

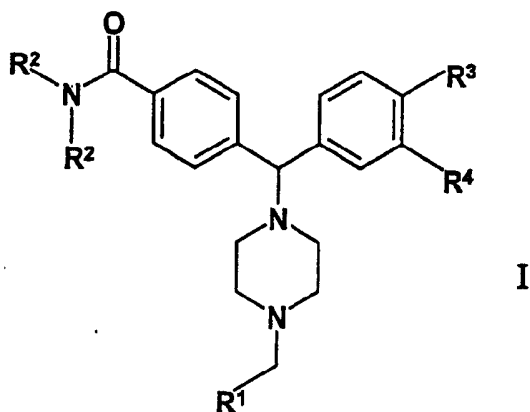
Следователно, задачата на настоящето изобретение е да се открият нови аналгетици с подобро аналгетично действие, но и с подобрен профил на странично действие спрямо съществуващите μ агонисти, както и с подобрена системна ефективност.

Познатите аналгетици, представени в предшестващото ниво на техниката имат много недостатъци като лоша фармакокинетика и не действат аналгетично, когато се прилагат чрез системните пътища. Документирано е също така, че предпочитани съединения, които са δ -агонисти, описани в предшестващото ниво на техниката, показват значителни конвулсивни ефекти когато се прилагат системно.

Понастоящем ние открихме съединения, които показват изненадващи подобрени свойства, а. а. подобро δ -агонистично действие, *in vivo* ефикасност, фармакокинетика, бионаличност, стабилност *in vitro* и/или по-ниска токсичност.

Техническа същност на изобретението

Новите съединения съгласно настоящето изобретение са с формулата I



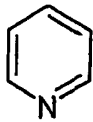
където

R^1 е избран от кой да е от

(i) фенил;



(ii) пиридинил



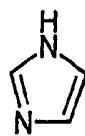
(iii) тиенил



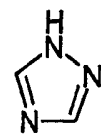
(iv) фуранил



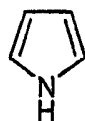
(v) имидазолил



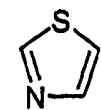
vi) триазолил



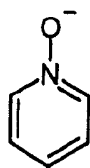
(vii) пиролил



(viii) тиазолил



(ix) пиридил-N-оксид



където всеки R^1 хетероароматен пръстен може да бъде евентуално и независимо допълнително заместен с 1, 2 или 3 заместители, избрани от линеен и разклонен C_1-C_6 алкил, халогениран C_1-C_6 алкил, NO_2 , CF_3 , C_1-C_6 алкокси, хлоро, флуоро, бромо и йодо.

R^2 е независимо избран от етил и изопропил;

R^3 е независимо избран от водород и флуоро;

R^4 е независимо избран от $-OH$, $-NH_2$ и $-NHSO_2R^5$; и

R^5 е независимо избран от водород, $-CF_3$ и C_1-C_6 алкил, при условие, че, когато R^2 е етил и R^3 е водород, тогава R^4 не може да бъде $-OH$.

Заместванията при хетероароматния пръстен могат да се проведат в коя да е позиция на споменатите пръстенни системи;

Когато R^1 фениловият пръстен и R^1 хетероароматният пръстен (и) са заместени, предпочитаните заместители са независимо избрани от кой да е от CF_3 , метил, йодо, бромо, флуоро и хлоро, от които метил е най-предпочитан.

Друг вариант на настоящето изобретение е съединение съгласно формула I, където R^1 има значението, дадено по-горе, а всеки R^1 фенилов пръстен и R^1 хетероароматен пръстен може да бъде независимо допълнително заместен с метилова група

Друг вариант на настоящето изобретение е съединение съгласно формула I, където

R^1 е фенил, пиридил, фуранил, тиенил или имидазолил; R^2 е етил или изопропил; R^3 е водород или флуоро; R^4 е $-NH_2$ или $-NHSO_2R^5$; и R^5 е C_1-C_6 алкил, евентуално с 1 или 2 от

предпочитаните заместители при R^1 фениловия или R^1 хетероароматния пръстен.

Друг вариант на настоящето изобретение е съединение съгласно формула I, където

R^1 е фенил, пиролил, фуранил, тиенил или имидазоллил; R^2 е етил или изопропил; R^3 е водород; R^4 е $-NHSO_2R^5$; и R^5 е C_1-C_6 алкил, евентуално с 1 или 2 от предпочитаните заместители при R^1 фениловия или R^1 хетероароматния пръстен.

Друг вариант на настоящето изобретение е съединение съгласно формула I, където а) R^1 е фенил, пиролил или фуранил; R^2 е етил или изопропил; R^3 е водород или флуоро; и R^4 е $-NH_2$; б) R^1 е тиенил или имидазоллил; R^2 е етил или изопропил; R^3 е водород или флуоро; и R^4 е $-NH_2$; в) R^1 е фенил, пиролил, фуранил, тиенил или имидазоллил; R^2 е етил или изопропил; R^3 е водород или флуоро; R^4 е $-NHSO_2R^5$; и R^5 е C_1-C_6 алкил; и д) R^1 е фенил, пиролил, фуранил, тиенил или имидазоллил; R^2 е етил или изопропил; R^3 е водород или флуоро; R^4 е $-NHSO_2R^5$; и R^5 е C_1-C_6 алкил, където всички варианти а) до д) могат да бъдат евентуално заместени с 1 или 2 от предпочитаните заместители при R^1 фениловия или R^1 хетероароматния пръстен.

В обхвата на изобретението са включени също така отделни енантиомери и соли на съединенията с формула I, включително соли на енантиомери. Също така в обхвата на настоящето изобретение са включени смеси на отделните енантиомери, такива като рацемична смес, както и соли на смеси на отделни енантиомери.

Разделянето на рацемични смеси на отделни енантиомери е добре известно в областта и може да се осъществи, например, чрез разделяне на подходяща хирална хроматографска колона. Получаването на соли е добре известно в областта и може да се осъществи, например, чрез смесване на съединение с формула I в подходящ разтворител с желаната протонна киселина и изолиране по известни в

областта методи. Соли на съединения с формула I включват фармацевтично приемливи соли и също така фармацевтично неприемливи соли.

Новите съединения от изобретението са полезни в терапията, по-специално за лечение на различни състояния, свързани с болка, като например хронична болка, невропатична болка, остра болка, болка, свързана с рак, болка, предизвикана от ревматоиден артрит, мигрена, висцерална болка и т.н. Този списък обаче не трябва да се счита за изчерпателен.

Съединенията от изобретението са полезни като имуномодулатори, по-специално за автоимунни заболявания, като например артрит, за кожни присадки, органични трансплантанти и подобни хирургични нужди, за колагенни заболявания, различни алергии, за използване като противотуморни средства и противовирусни средства.

Съединенията от изобретението са полезни при болестни състояния, при които е налице дегенерация или дисфункция на опиоидни рецептори или участват в тях. Това може да включва използването на изотопно белязани версии на съединенията от изобретението в диагностични техники и приложения с изображения като например позитронна емисионна томография (PET).

Съединенията от изобретението са полезни за лечение на диария, депресия, потиснатост и свързани със стрес разстройства, като например разстройства, свързани с посттравматичен стрес, паника, генерализирана потиснатост, социална фобия, натрапливо компулсивно разстройство; инконтиненция на урината, различни умствени разстройства, кашлица, белодробен оток, различни стомашно-чревни разстройства, напр. запек, функционални стомашно-чревни разстройства, като например синдром на възпалени черва, и функционална диспепсия, болест на Паркинсон и други двигателни заболявания, мозъчна травма, удар, предпазване

на сърцето след инфаркт на миокарда, гръбначно нараняване и лекарствено пристрастяване, включващо лечение при злоупотреба с алкохол, никотин, опиоидни и други лекарства и за разстройства на симпатичната нервна система например хипертония.

Съединенията от изобретението са полезни като аналгетични средства за приложение при обща анестезия и контролирана анестезия. Често се използва комбинация от средства с различни свойства за постигане на баланс на необходимите ефекти за поддържане на състояние на анестезия (напр. амнезия, аналгезия, мускулна релаксация и успокоение). В тази комбинация са включени са инхалирани анестетици, сънотворни лекарства, анксиолитици, нервномускулни блокери и опиоиди.

В обхвата на изобретението е и използването на кое да е от съединенията с формула I по-горе за производство на лекарство за лечение на кое да е от състоянията, дискутирани по-горе.

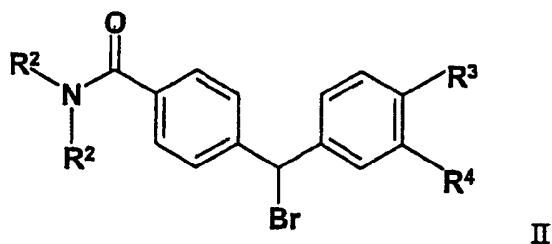
Друг вариант на изобретението е метод за лечение на субект, страдащ от кое да е от състоянията, дискутирани по-горе, като ефективно количество от съединение с формулата I по-горе, се прилага на пациент, нуждаещ се от такова лечение.

Методи за получаване

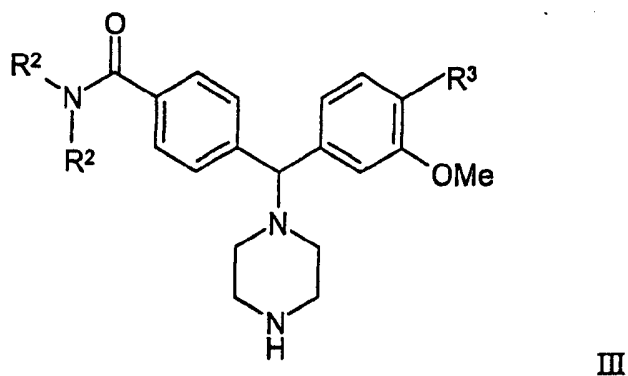
Съединенията на настоящото изобретение могат да се получат чрез следния общ метод.

Получаване на феноли; Примери 1-3

Съединенията с формула I, където R^4 е $-OH$, се получават чрез взаимодействие на съединение с общата формула II



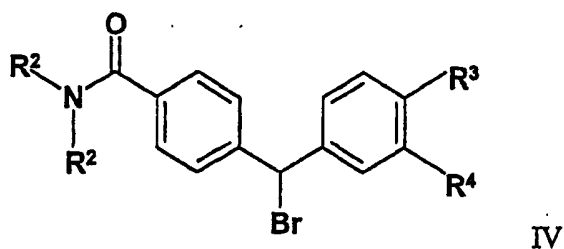
където R^2 и R^3 са дефинирани във фигура 1 и R^4 е OMe,
с Вос-пиперазин в ацетонитрил в присъствието на триетиламин
при стандартни условия, последвано от отстраняване на Вос
защитната група при стандартни условия, при което се
получава съединение с формулата III



което след това се алкилира при редукционни условия със
съединение с формулата R^1-CHO , последвано от отцепване на
метиловия етер с помощта на BBr_3 в дихлорометан, при което
се получава съединение с формулата I, където R^4 е -OH.

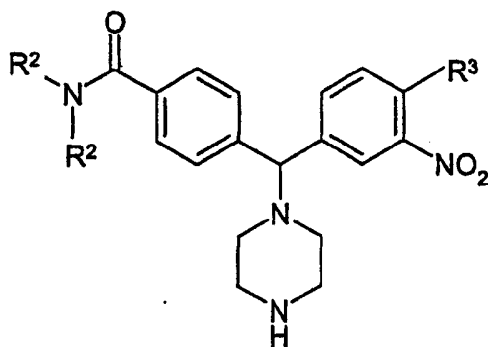
Получаване на анилини; Примери 4-6

Съединението с формула I, където R^4 е $-NH_2$, се
получава чрез взаимодействие на съединение с общата формула
IV



където R^2 и R^3 са дефинирани във фигура 1 и R^4 е NO_2 ,

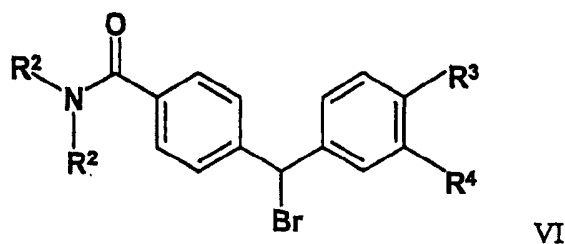
с Вос-пиперазин в ацетонитрил в присъствието на триетиламин при стандартни условия, последвано от отстраняване на Вос защитната група при стандартни условия, при което се получава съединение с формулата V



което след това се алкилира при редукционни условия със съединение с формулата R^1-CHO , последвано от редукция на нитро-групата с помощта на водород и паладий върху въглен, при което се получава съединение с формулата I, където R^4 е $-NH_2$.

Получаване на метилсулфонанилиди ; Примери 7-8

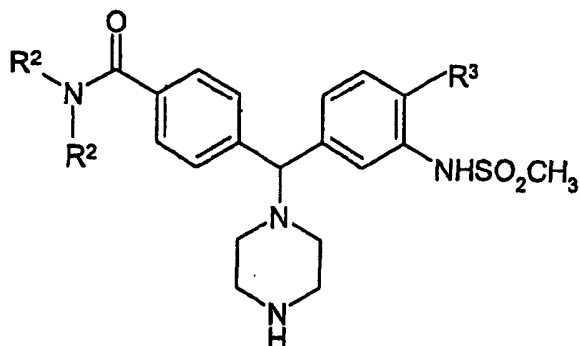
Съединението с формула I, където R^4 е $-NHSO_2R^5$ се получава чрез взаимодействие на съединение с общата формула VI



където R^2 и R^3 са дефинирани в претенция 1 и R^4 е NO_2 ,

с Вос-пиперазин в ацетонитрил в присъствието на триетиламин при стандартни условия, последвано от редукция на нитро-групата чрез хидрогенолиза с помощта на паладий върху въглен като катализатор, метансулфонилиране с помощта на метансулфониланхидрид в дихлорометан в присъствието на триетиламин, и след това отстраняване на Вос защитната

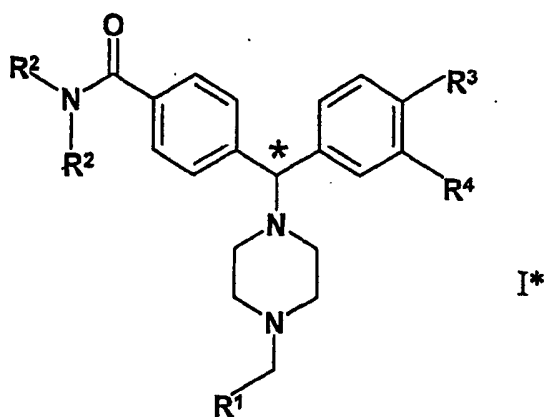
група при стандартни условия, при което се получава съединение с формулата VII



VII

което след това се алкилира при редукционни условия със съединение с формулата R^1-CHO , последвано от редукция на нитро-групата с помощта на водород и паладий върху въглен, при което се получава съединение с формулата I, където R^4 е $-NHSO_2R^5$.

В обхвата на изобретението се включват и отделни енантиомери и соли на съединенията с формулата I, включително соли на енантиомери. Съединенията с формула I са хирални съединения с диарилметилпиперазиновата група като хирален център, виж фигура I* по-долу.



I*

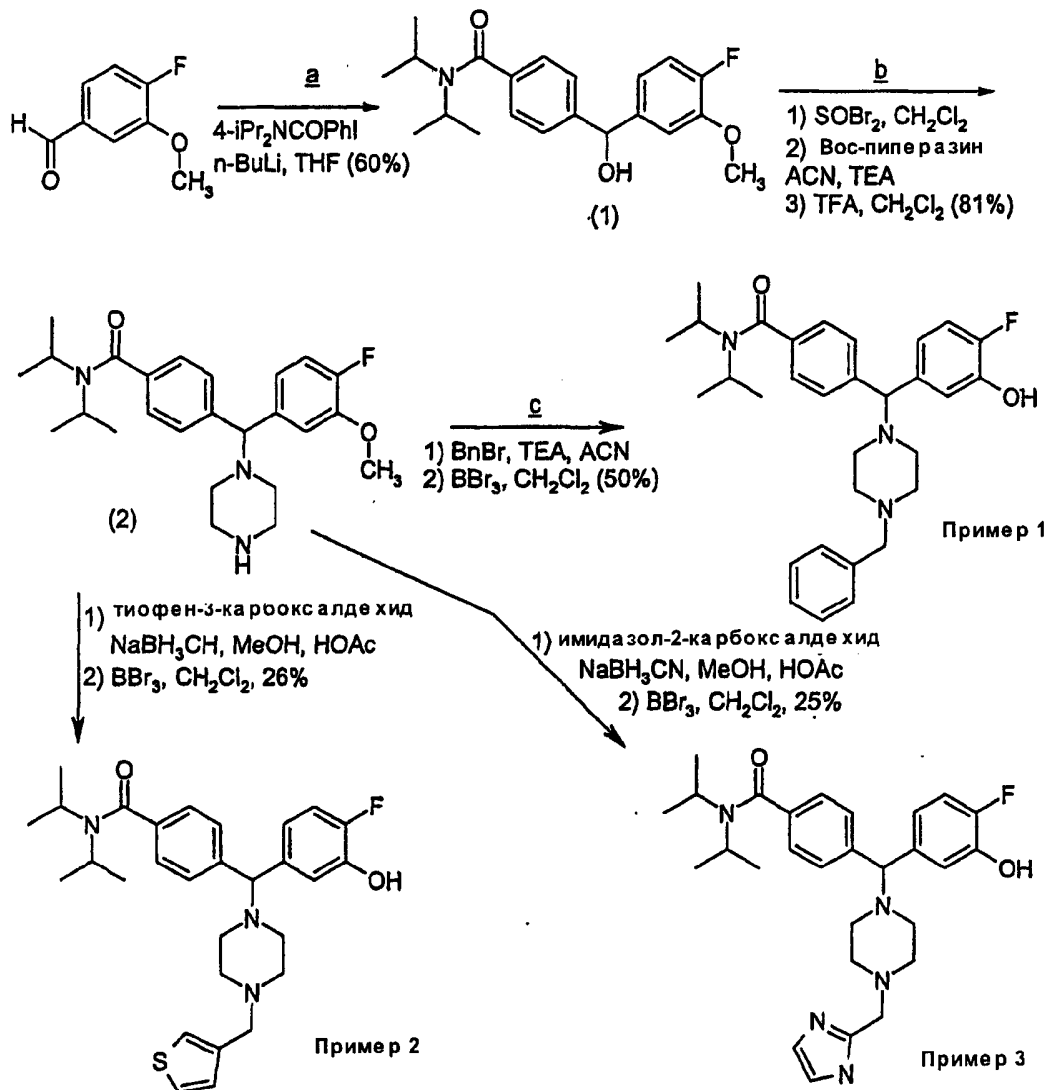
Друг вариант на настоящото изобретение се отнася до (-)-енантиомера на съединение съгласно Формула I, както и до сол на споменатото съединение.

Друг вариант на настоящото изобретение се отнася до (+)-енантиомера на съединение съгласно Формула I, както и до сол на споменатото съединение.

Примери за изпълнение на изобретението

Изобретението се описва по-подробно със следните схеми и примери, които не го ограничават.

Схема 1: Получаване на флуорофеноли; Примери 1-3



Междино съединение 1: 4-[(4-флуоро-3-метоксифенил)-(хидрокси)-метил]-N,N-диизопропилбензамид.

N,N-Диизопропил-4-йодобензамид (6.0 g, 18 mmol) се разтваря в THF (200 mL) и се охлажда до -78°C под азотна

атмосфера. $n\text{-BuLi}$ (14 mL, 1.3 M разтвор в хексан, 18 mmol) се прибавя на капки в продължение на 10 минути при -65 до -78°C . 4-флуоро-3-метоксибензалдехид (2.8 g, 18 mmol) се прибавя на капки, разтворен в THF (5 mL). NH_4Cl (aq.) се прибавя след 30 минути. След концентриране под вакуум, екстрахиране с EtOAc/вода, сушене (MgSO_4) и изпаряване на органичната фаза, остатъкът се пречиства чрез хроматография върху силикагел (0-75% EtOAc/хептан), при което се получава желаният продукт (3.9 g, 60%). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 1.0-1.6 (m, 12H), 2.65 (d, $J = 4\text{Hz}$, 1H), 3.4-3.9 (m, 2H), 3.80 (s, 3H), 6.10 (d, $J = 4\text{Hz}$, 1H), 6.76 (m, 1H), 6.95 (m, 1H), 7.04 (m, 1H), 6.76 (m, 1H), 7.25, 7.40 (2d, $J = 7.5\text{Hz}$, 4H).

Междинно съединение 2: 4-[(4-флуоро-3-метоксифенил)-(1-пиперазинил)-метил]-N,N-диизопропилбензамид.

Междинно съединение 1 (3.9 g, 11 mmol) се разтваря в сух CH_2Cl_2 (50 mL) и се третира с SOBr_2 (0.88 mL, 11 mmol) до 0 до 25°C в продължение на 30 минути. След неутрализиране с K_2CO_3 (aq.) и сушене (K_2CO_3) на органичната фаза следва изпаряване на разтворителя под вакуум. Остатъкът и Et_3N (1.8 mL, 13 mmol) се разтварят в MeCN (50 mL) и се бърка с Вос-пиперазин (2.1 g, 11 mmol) при 25°C в продължение на 12 h. Концентриране под вакуум и хроматография върху силикагел (0 to 50% EtOAc в хептан) дава 4.6 g. 1.6g се обработват с TFA в CH_2Cl_2 (1:1), концентрат се под вакуум, екстрахират се $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{K}_2\text{CO}_3$ (aq.), сушат се (K_2CO_3) и се изпаряват под вакуум, при което се получава междинно съединение 2 (1.3 g, 81% от междинно съединение 1). MS (ES) 428.21 (MH+).

Пример 1: 4-[1-(4-Бензил-пиперазин-1-ил)-1-(4-флуоро-3-хидрокси-фенил)-метил]-N,N-диизопропил-бензамид.

Междинно съединение 2 (0.41 g, 0.96 mmol) и триетиламин (0.20 mL, 1.4 mmol) се разтварят в MeCN (10 mL). Бензилбромид (0.14 mL, 1.1 mmol) се прибавя с бъркане при 25°C . След 12 h разтворът се концентрира и пречиства чрез хроматография с обръната фаза (LiChroprep RP-18,10-80

% MeCN във вода, 0.1 % TFA). 0.53 g от свободната база се получават след екстрахиране с $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{K}_2\text{CO}_4$ (aq.), сушене (K_2CO_4) и изпаряване под вакуум. Третиране с борен трибромид (4 екв., 1M разтвор в CH_2Cl_2) в CH_2Cl_2 при -78°C , прибавяне на вода, концентриране под вакуум и хроматография с обърнатата фаза дава Пример 1 като трифлуороацетат (0.35 g, 50%). MS (ES) 504.22 (MH+). IR (NaCl) 3222, 1677, 1592, 1454, 1346, 1201, 1135 (cm^{-1}). ^1H NMR (CD_3OD) δ = 1.1, 1.5 (m, 12H), 2.3 (m, 3H), 2.9-3.8 (m, 7H), 4.33 (s, 2H), 4.75 (s, 1H), 6.60 (m, 1H), 6.83 (m, 1H), 6.94 (m, 1H), 7.24 (d, J = 8 Hz, 2H), 7.47 (m, 7H). Анализ: изчислено за $\text{C}_{31}\text{H}_{38}\text{FN}_3\text{O}_2 \times 0.8\text{C}_4\text{H}_2\text{F}_6\text{O}_4$ C: 59.87, H: 5.82, N: 6.12.: намерено C: 60.06, H: 5.83, N: 6.19.

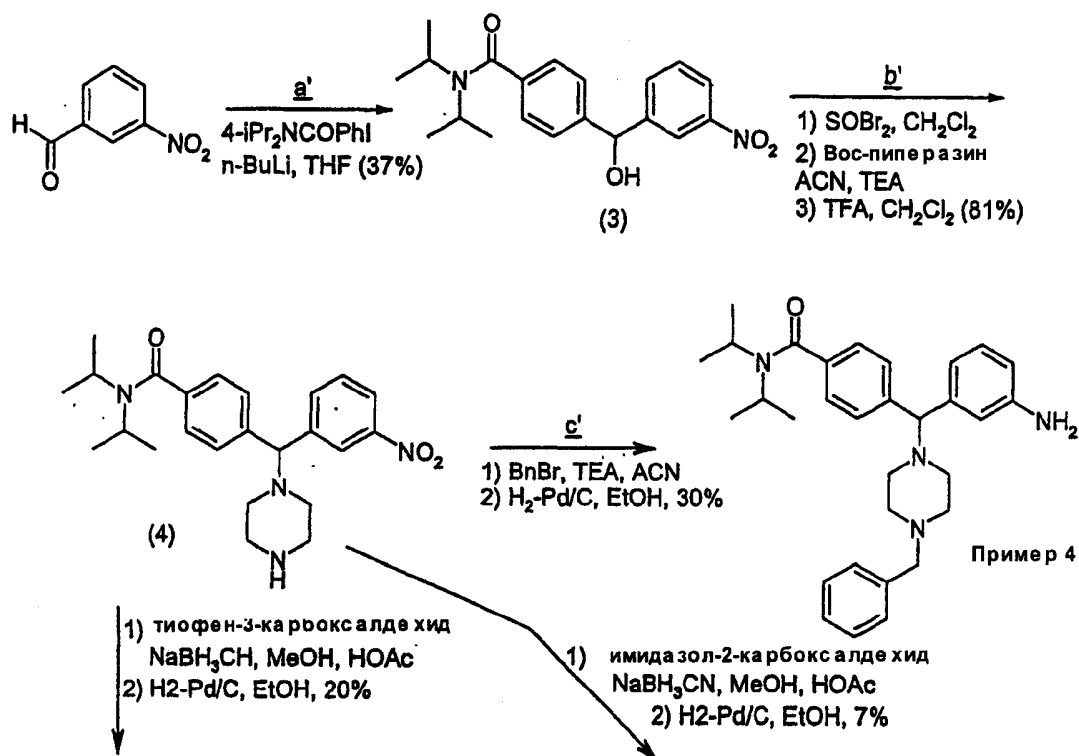
Пример 2: 4-[1-(4-Флуоро-3-хидрокси-фенил)-1-(4-тиофен-3-илметил-пиперазин-1-ил)метил]-N,N-диизопропил-бензамид.

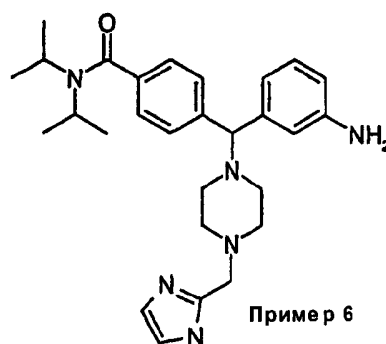
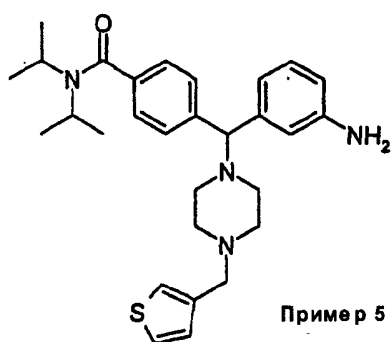
Междинно съединение 2 (0.43 g, 1.0 mmol) се разтваря в MeOH (5 mL) с 3-тиофенкарбоксалдеhid (0.11 mL, 1.2 mmol) и HOAc (57 μL , 1.0 mmol) и се бърка 1 h. натриев цианоборохидрид (63 mg, 1.0 mmol) се прибавя на порции в продължение на 6 h и реакционната смес се бърка при 25°C още 12 h преди да се преработи чрез концентриране под вакуум и екстрахиране ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{K}_2\text{CO}_3$ (aq)). След пречистване чрез хроматография с обърнатата фаза както при Пример 1, се получава 0.32 g (0.62 mmol) като свободна база. Третиране с борен трибромид както при пример Пример 1 и хроматография се получава Пример 2 (0.20 g, 26%) като трифлуороацетат. MS (ES) 510.17 (MH+). IR (NaCl) 3281, 1674, 1606, 1454, 1346, 1200, 1135 (cm^{-1}). ^1H NMR (CD_3OD) δ = 1.1, 1.5 (m, 12H), 2.30 (m, 2H), 2.9-3.7 (m, 10H), 4.37 (s, 2H), 4.75 (s, 1H), 6.60 (m, 1H), 6.84 (m, 1H), 6.94 (m, 1H), 7.18 (m, 1H), 7.25, 7.48 (2d, J = 8.0Hz, 4H), 7.55 (m, 1H), 7.65 (m, 1H). Анализ: изчислено за $\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{FN}_3\text{O}_2\text{S} \times 0.8\text{C}_4\text{H}_2\text{F}_6\text{O}_4 \times 0.5\text{H}_2\text{O}$, C: 55.16, H: 5.55, N: 5.99. намерено, C: 55.12, H: 5.39, N: 6.07.

Пример 3: 4-{1-(4-Флуоро-3-хидрокси-фенил)-1-[4-(1Н-имидазол-2-илметил)-пиперазин-1-ил]-метил}-N,N-диизопропил-бензамид.

Прилагайки същата процедура както при Пример 2 реакция с 2-имидазол-карбоксалдехид (0.10 g, 1.1 mmol) последвана от третиране с борен трибромид (6 екв.) дава Пример 3 (0.18 g, 25%) като трифлуороацетат. MS (ES) 494.23 (MH⁺). IR (NaCl) 3123, 1673, 1592, 1454, 1350, 1201, 1135 (cm⁻¹). ¹H NMR (CD₃OD) δ = 1.1, 1.5 (m, 12H), 2.7-3.8 (m, 10H), 3.95 (s, 2H), 5.20 (m, 1H), 6.70 (m, 1H), 6.94 (m, 1H), 7.02 (m, 1H), 7.32, 7.58 (2d, J = 8.0Hz, 4H), 7.46 (s, 1H). Анализ: изчислено за C₂₈H₃₆FN₅O₂ x 1.2 C₄H₂F₆O₄ x 0.7 H₂O, C: 50.51, H: 5.14, N: 8.98. намерено, C: 50.44, H: 5.18, N: 9.11.

Схема 2: Получаване на анилини; Примери 4-6





Междинно съединение 3: 4-[хидрокси-(3-нитрофенил)метил]-N,N-диизопропилбензамид.

Процедура както за междинно съединение 1, но след прибавяне на n-BuLi разтворът се изсипва в разтвор на 3-нитробензалдехид (2.7 g, 18 mmol) в толуен/THF (прибл. 1:1,100 mL) при -78°C . Преработка и хроматография дава междинно съединение 3 (2.4 g, 37%). ^1H NMR (CDCl_3) δ 1.1-1.7 (m, 12H), 3.90 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H), 3.4-3.9 (m, 2H), 5.91 (s, $J = 3.5$ Hz, 1H), 7.27, 7.35 (2d, $J = 8$ Hz, 4H), 7.51 (m, 1H), 7.71 (m, 1H), 8.13 (m, 1H), 8.30 (s, 1H).

Междинно съединение 4: N,N-диизопропил-4-[(3-нитрофенил)(1-пиперазинил)метил]бензамид.

Прилагайки същата процедура както за междинно съединение 2, междинно съединение 3 (2.4 g, 6.7 mmol) дава Вос-защитено междинно съединение 4 (2.83 g, 81%). TFA третиране дава количествено междинно съединение 4. MS (ES) 425.23 (MH⁺).

Пример 4: 4-[1-(3-Амино-фенил)-1-(4-бензил-пиперазин-1-ил)-метил]-N,N-диизопропилбензамид.

Взаимодействие на 7 (0.40 g, 0.94 mmol) с бензил-бромид както при Пример 1 е последвано от хидриране (H_2 , 40 psi) с 10% Pd/C (50 mg) в EtOH (25 mL) и 2N HCl (1.2 mL, 2.4 mmol) в продължение на 2 h. След пречистване чрез хроматография с обръната фаза, като се прилагат същите условия както при Пример 1 се получава Пример 4 (0.20 g, 30%) като трифлуороацетат. MS (ES) 485.40 (MH⁺). IR (NaCl)

3414, 1673, 1605, 1455, 1345, 1201, 1134 (cm⁻¹). ¹H NMR (CD₃OD) δ = 1.1, 1.5 (m, 12H), 2.3 (m, 2H), 2.9-3.8 (m, 8H), 4.31 (s, 2H), 4.47 (s, 1H), 7.02 (m, 1H), 7.21-7.52 (m, 12H). Анализ: изчислено за C₃₁H₄₀N₄O x 1.2 C₄H₂F₆O₄ x 0.5 H₂O, C: 56.04, H: 5.70, N: 7.30. намерено, C: 56.06, H: 5.67, N: 7.41.

Пример 5: 4-[1-(3-Амино-фенил)-1-(4-тиофен-3-илметил-пиперазин-1-ил)-метил]-N,N-диизопропил-бензамид.

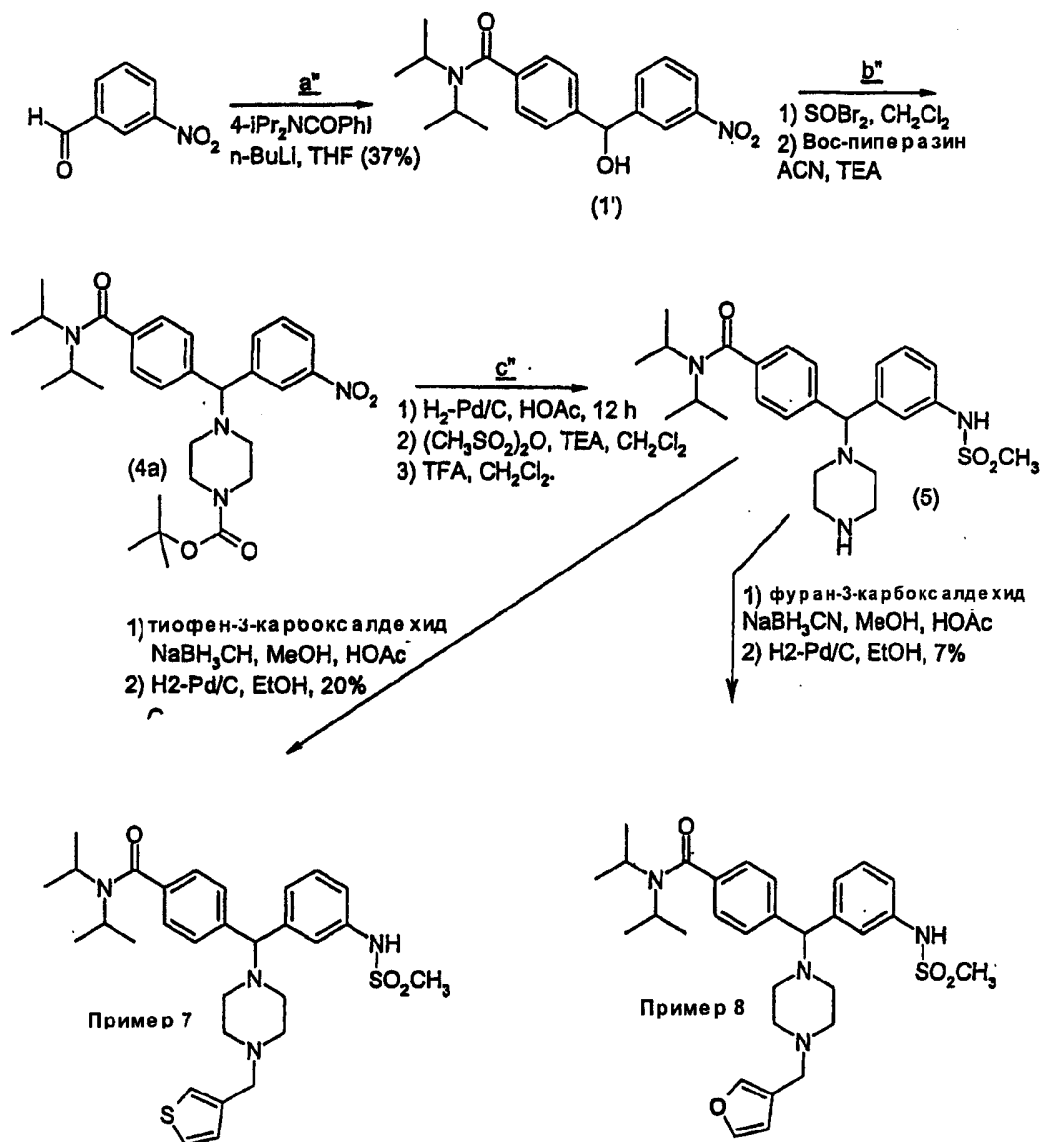
Взаимодействие на междинно съединение 4 (0.40 g, 0.94 mmol) с 3-тиофен-карбоксалдехид както при Пример 2 е последвано от хидриране (H₂, 30 psi) с 10% Pd/C (50 mg) в EtOH (25 mL) и 2N HCl (1.0 mL, 2.0 mmol) в продължение на 12 h. След пречистване чрез хроматография с обръната фаза, като се прилагат същите условия както при Пример 1 се получава Пример 5 (0.13 g, 20%) като дитрифлуороацетат. MS (ES) 491.28 (M⁺). IR (NaCl) 3408, 1673, 1605, 1455, 1345, 1201, 1134 (cm⁻¹). ¹H NMR (CD₃FD) δ = 1.1, 1.5 (m, 12H), 2.3 (m, 2H), 2.9-3.8 (m, 8H), 4.35 (s, 2H), 4.44 (s, 1H), 6.98 (m, 1H), 7.16-7.32 (m, 6H), 7.49 (d, J = 8Hz, 2H), 7.55 (m, 1H), 7.64 (m, 1H). Анализ: изчислено за C₂₉H₃₈N₄OS x 1.3 C₄H₂F₆O₄ x 0.6 H₂O, C: 51.48, H: 5.28, N: 7.02. намерено, C: 51.51, H: 5.20, N: 7.01.

Пример 6: 4-[1-(3-Амино-фенил)-1-[4-(1H-имидазол-2-илметил)-пиперазин-1-ил]метил]-N,N-диизопропил-бензамид.

Прилагайки същата процедура както при Пример 2, взаимодействие на междинно съединение 4 с 2-имидазол-карбоксалдехид (0.10 g, 1.1 mmol) последвано от хидриране дава Пример 6 (45 mg, 7%) като дитрифлуороацетат. MS. (ES) 475.30 (M⁺). IR (2x TFA, NaCl) 3351, 1674, 1621, 1455, 1349, 1202, 1134 (cm⁻¹). ¹H NMR (2x TFA, CD₃OD) δ = 1.1, 1.5 (m, 12H), 2.9-3.8 (m, 8H), 4.35 (s, 2H), 4.44 (s, 1H), 6.98 (m, 1H), 7.16-7.32 (m, 6H), 7.49 (d, J = 8Hz, 2H), 7.55 (m, 1H), 7.64 (m, 1H). Анализ: изчислено за C₂₈H₃₈N₆O x 1.6

$C_4H_2F_6O_4 \times 0.8 H_2O$, C: 48.39, H: 5.05, N: 9.84. намерено, C: 48.43, H: 5.06, N: 9.85.

Схема 3: Получаване на метилсулфонанилиди; Примери 7-8



Междинно съединение 5: N,N-диизопропил-4-[[3-[(метил-сулфонил)амино]фенил](1-пиперазинил)метил]бензамид.

Междинно съединение 3 дава Вос-защитено междинно съединение 4 както е описано за междинно съединение 4, по-горе. Вос-защитено междинно съединение 4 (1.21 g, 2.3 mmol) се хидрира под H_2 при 30 psi с 10% Pd/C (150 mg) в AcOH (25

mL) в продължение на 12 h. Изпаряване под вакуум и екстрахиране с $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{K}_2\text{CO}_4$ (aq.) дава 1.1 g (2.3 mmol) от междинния анилин, който се разтваря в $\text{MeCN}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (1:1, 10 mL). Et_3N (0.48 mL, 3.4 mmol), след това метансулфониланхидрид (0.41 g, 2.4 mmol) се прибавя при 0°C . След затопляне до стайна температура реакционната смес се преработва чрез екстрахиране CH_2Cl_2 /солев разтвор. След пречистване чрез хроматография върху силикагел (0-5% $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$) се получава Вос-защитено междинно съединение 5 (1.3 g, 97%). Третиране с TFA в CH_2Cl_2 дава количествено междинно съединение 5. MS (ES) 473.16 (MH+).

Пример 7: N,N-Диизопропил-4-[1-(3-метансулфониламино-фенил)-1-(4-тиофен-3-илметил-пиперазин-1-ил)-метил]-бензамид.

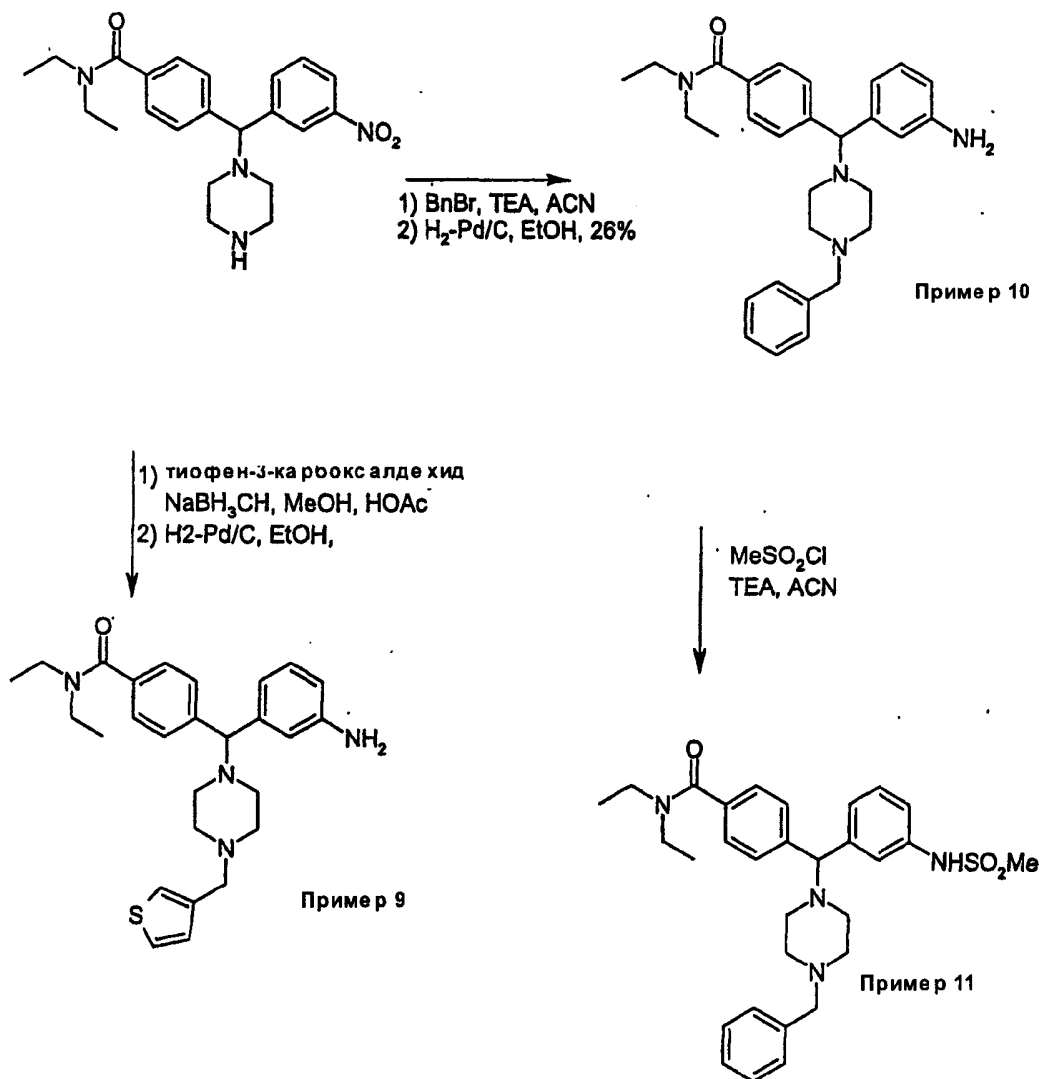
Редукционно аминирание както при Пример 2. Междинно съединение 5 (0.20 g, 0.43 mmol) дава Пример 7 (90 mg, 26%) дитрифлуороацетат. Дихидрогенхлоридната сол се получава след екстрахиране на свободната база с $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{K}_2\text{CO}_4$ (aq.) и третиране с 2 екв. HCl (aq.). MS (ES) 569.21 (MH+). IR (свободна база, NaCl) 1604, 1455, 1340, 1151 (cm^{-1}). ^1H NMR (свободна база, CDCl_3) δ = 0.9-1.7 (m, 12H), 2.5 (m, 8H), 2.85 (s, 3H), 3.55 (s, 2H), 3.8 (m, 2H), 4.22 (s, 1H), 7.00-7.40 (m, 12H). Анализ: изчислено за $\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{N}_4\text{O}_3\text{S}_2 \times 2.6 \text{ HCl}$, C: 54.30, H: 6.47, N: 8.44. намерено, C: 54.33, H: 6.20, N: 8.32.

Пример 8: 4-([4-(3-фурилметил)-1-пиперазинил]{3-[(метилсулфонил)амино]фенил})-N,N-диизопропил-бензамид.

Прилагайки същата процедура както за междинно съединение 7, междинно съединение 5 (0.21 g, 0.45 mmol) дава Пример 8 (80 mg, 32%) като свободна база. MS (ES) 553.23 (MH+). IR (свободна база, NaCl) 1604, 1455, 1340, 1151 (cm^{-1}). ^1H NMR (свободна база, CDCl_3) δ = 1.0-2.6 (m, 20H), 2.91 (s, 3H), 3.40 (s, 2H), 4.22 (s, 1H), 6.39 (s, 1H), 7.06-7.42 (m, 11H). Анализ: изчислено за $\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$ x

2.8 HCl, C: 55.03, H: 6.59, N: 8.56. намерено, C: 54.93, H: 5.93, N: 8.49.

Схема 4: Получаване на Примери 9-11



Пример 9: 4-((3-аминофенил) [4-(3-тиенилметил)-1-пиперазинил]-метил)-N,N-диетилбензамид.

N,N-диетил-4-((3-нитрофенил) (1-пиперазинил)-метил)-бензамид (получен аналогично на междинно съединение (4) в Схема 2) (0.85 g, 2.1 mmol) се разтваря в MeOH (5 mL) с 3-тиофенкарбоксалде хид (0.40 mL, 4.3 mmol) и HOAc (60 μL , 1.0 mmol) и се бърка 1 h. Натриев цианоборохидрид (135 mg, 2.1 mmol) се прибавя на порции в продължение на 6 h и реакционната смес се бърка при 25°C още 12 h преди да се преработи чрез концентриране под вакуум и екстрахиране

(CH₂Cl₂/K₂CO₃ (aq)). След пречистване чрез хроматография върху силикагел се получава 3-тиенилметилово производно (0.45 g, 43%). Хидриране на продукта (0.30 g, 0.61 mmol) и хроматография с обърната фаза дават съединението от заглавието (0.17 g, 35%) като трис-трифлуороацетат. MS (ES) 463.34 (MH⁺). IR (NaCl) 3418, 1673, 1600, 1461, 1200, 1135 (cm⁻¹). ¹H NMR (CD₃OD) δ = 1.17, 1.31 (m, 6H), 2.45 (m, 2H), 3.11 (m, 2H), 3.24-3.66 (m, 10H), 4.47 (s, 2H), 4.62 (s, 1H), 7.21 (m, 1H), 7.31 (m, 1H), 7.39-7.56 (m, 5H), 7.61-7.68 (m, 3H), 7.77 (m, 1H).

Пример 10: 4-[(3-аминофенил)(4-бензил-1-пиперазинил)метил]-N,N-диетилбензамид.

N,N-диетил-4-[(3-нитрофенил)(1-пиперазинил)метил]-бензамид (1.7g g, 4.3 mmol) и триетиламин (1.2 mL, 8.6 mmol) се разтварят в MeCN (10 mL). Бензилбромид (0.56 mL, 4.7 mmol) се прибавя с разбъркване при 25°C. След 12 h разтворът се концентрира под вакуум. Екстрахиране (CH₂Cl₂/K₂CO₃ (aq)) и пречистване чрез хроматография върху силикагел дават бензилирания продукт (1.4 g, 2.9 mmol). Хидриране (H₂, 40 psi) с 10% Pd/C (100 mg) в EtOH (25 mL) и 2N HCl (2.5 mL, 5 mmol) в продължение на 4 h и след последващо концентриране под вакуум и хроматография с обърната фаза, се получава съединението от заглавието като трис-трифлуороацетат (0.9 g, 26%). MS (ES) 457.26 (MH⁺). IR (NaCl) 3422, 1672, 1603, 1458, 1209, 1133 (cm⁻¹). ¹H NMR (CD₃OD) δ = 1.1, 1.2 (m, 6H), 2.3 (m, 2H), 2.9-3.6 (m, 10H), 4.33 (s, 2H), 4.49 (s, 1H), 5.48 (s, 2H), 7.01 (m, 1H), 7.24-7.34 (m, 5H), 7.47 (m, 5H), 7.52 (d, J = 7.5 Hz, 2H).

Пример 11: 4-((4-бензил-1-пиперазинил){3-[(метилсулфонил)-амино]фенил}метил)-N,N-диетилбензамид.

Продуктът от Пример 10 (0.35 g, 0.76 mmol) и триетиламин (0.12 mL, 0.84 mmol) се разтварят в MeCN (10 mL) и се прибавя метансулфонов анхидрид (0.14 g, 0.84 mmol) при 0°C. След 10 минути бъркане при 25°C, разтворът се

концентрира под вакуум и пречиства чрез хроматография с обърната фаза, при което се получава съединението от заглавието като бис-трифлуороацетат (0.23 g, 40%). MS (ES) 535.21 (MН+). IR (NaCl) 3479, 1673, 1604, 1458, 1337, 1200, 1150 (cm⁻¹). ¹H NMR (CD₃OD) δ = 1.18, 1.31 (m, 6H), 2.41 (m, 2H), 2.98 (s, 3H), 3.13 (m, 2H), 3.28-3.65 (m, 8H), 4.44 (s, 2H), 4.57 (s, 1H), 5.57 (d, J=2Hz, 2H), 7.15 (m, 1H), 7.30 (m, 1H), 7.37 (m, 1H), 7.42 (m, 2H), 7.54-7.60 (m, 6H), 7.63 (m, 2H).

Фармацевтични състави

Новите съединения съгласно настоящето изобретение могат да се прилагат орално, сублингвално, интрамускулно, подкожно, локално, интраназално, интраперитонеално, интраторакално, интравенозно, епидурално, интратекално, интрацеребровентрикуларно и инжекционно в ставите.

Предпочитан начин на прилагане е оралният, интравенозният или интрамускулният.

Дозата ще зависи от начина на прилагане, остротата на заболяването, възрастта и теглото на пациента и други фактори, които обикновено се взимат пред вид от лекуващия лекар, при определяне на индивидуалния режим и дозировка като най-подходящи за отделния пациент.

За получаване на фармацевтични състави от съединения съгласно това изобретение, инертните фармацевтично приемливи носители могат да бъдат твърди или течни. Препаратите в твърда форма включват прахове, таблетки, диспергируеми гранули, капсули, облатки и свещички.

Твърд носител може да бъде едно или повече вещества, които могат да действат като разредители, ароматизатори, солюбилайзери, повърхностноактивни вещества, суспендиращи средства, свързващи вещества, или дезинтегратори на таблетки; може да бъде също материал за капсулиране.

В прахове носителят е фино смляно твърдо вещество, смесено с фино смления активен компонент. В таблетки активният компонент е смесен с носителя, притежаващ необходимите свързващи свойства, в подходящи пропорции и пресован в необходимата форма и големина.

За да се приготвят супозиторни смеси, най-напред нискотапящ се восък, като например смес от глицериди на мастни киселини и какаово масло, се смела и активното вещество се диспергира в него чрез, например, бъркане. Стопената хомогенна смес след това се изсипва във форма с подходяща големина и се оставя да се охлади и втвърди.

Подходящи носители са магнезиев карбонат, магнезиев стеарат, талк, лактоза, захар, пектин, декстрин, нишесте, трагаканта, метилцелулоза, натриева карбоксиметилцелулоза, нискотапящ се восък, какаово масло и подобни.

Солите включват, но без да се ограничават, фармацевтично приемливи соли. Примери на фармацевтично приемливи соли в обхвата на изобретението включват: ацетат, бензенсулфонат, бензоат, бикарбонат, битартарат, бромид, калциев ацетат, камзилат, карбонат, хлорид, цитрат, дихидрогенхлорид, едетат, едизилат, естолат, езилат, фумарат, глюкапнат, глюконат, глутамат, гликалиларсанилат, хексилрезорцинат, хидрабамин, хидрогенбромид, хидрогенхлорид, хидроксинафтоат, изетионат, лактат, лактобионат, малат, малеат, манделат, мезилат, метилбромид, метилнитрат, метилсулфат, мукат, напзилат, нитрат, памоат (ембонат), пантотенат, фосфат/дифосфат, полигалактуронат, салицилат, стеарат, субацетат, сукцинат, сулфат, танат, тартарат, теоклат, тритиодид; и соли на бензатин, хлоропрокаин, холин, диетаноламин, етилендиамин, меглумин, прокаин, алуминий, калций, литий, магнезий, калий, натрий и цинк. Примери за фармацевтично неприемливи соли в обхвата на изобретението включват: хидройодид, перхлорат, тетрафлуоро-борат. Фармацевтично неприемливи соли биха били полезни поради благоприятните си физични и/или химични свойства, като например кристалност.

Предпочитани фармацевтично приемливи соли са хидроген-хлориди, сулфати и битартарати.

Особено се предпочитат хидрохлоридната и сулфатната соли

Понятието състав включва формулировка на активния компонент с капсулиращ материал като носител, при което се осигурява капсула, в която активният компонент (с или без други носители) е заобиколен от носител, който по този начин е свързан с него. По подобен начин са включени и облатки.

Таблетките, праховете, облатките и капсулите могат да се използват като твърди дозирани форми, подходящи за орално прилагане.

Течните форми на съставите включват разтвори, суспензии и емулсии. Разтвори на активните съединения в стерилна вода или вода-пропиленгликол могат да се споменат като пример за течни препарати, подходящи за парентерално приложение. Течни състави могат да се приготвят също така във воден полиетиленгликолов разтвор.

Водни разтвори за орално приложение могат да се получат чрез разтваряне на активния компонент във вода и добавяне на оцветители, ароматизатори, стабилизатори, и стъстителни, ако е необходимо. Водни суспензии за орално приложение могат да се приготвят чрез диспергиране на финия прахообразен активен компонент във вода заедно с вискозно вещество като например естествени синтетични смоли, полимери, метилцелулоза, натриева карбоксиметилцелулоза, и други суспендиращи средства, известни в областта на фармацевтичните препарати.

Предпочита се фармацевтичните състави да са в единична дозирана форма. В такива форми съставът е разпределен на единични дози, съдържащи подходящи количества на активното съединение. Единичната дозирана форма може да бъде

пакетиран препарат, като опаковката съдържа дискретни количества от препаратите, например, опаковани таблетки, капсули, и прахове във флакони или ампули. Единичната дозирана форма може да бъде капсула, облатка или самата таблетка, или може да представлява подходящият брой от коя да е от тези опаковани форми.

БИОЛОГИЧНА ОЦЕНКА

In vitro модел

Клетъчна култура

А. Човешки 293S клетки, експресиращи клонирани човешки μ , δ и κ , рецептори и неомицинова резистентност се отглеждат в суспензия при 37 °C и 5% CO₂ в клатачни колби, съдържащи свободен от калций DMEM10% FBS, 5% BCS, 0.1% Pluronic F-68, и 600 μ g/ml генетицин.

В. Миши и плъши мозъци се претеглят и промиват в ледено студен PBS (съдържащ 2.5mM EDTA, pH 7.4). Мозъците се хомогенизират с политрон в продължение на 15 sec (мишка) или 30 sec (плъх) в ледено студен лизисен буфер (50mM Tris, pH 7.0, 2.5 mM EDTA, с фенилметилсулфонил флуорид, добавен непосредствено преди употреба към 0.5mM от 0.5M изходен концентрат в DMSO:етанол).

Приготвяне на мембраните

Клетките се утаяват и ресуспендират в лизисен буфер (50 mM Tris, pH 7.0, 2.5 mM EDTA, с PMSF, добавен непосредствено преди употреба към 0.1 mM от 0.1 M изходен концентрат в етанол), инкубират се върху лед в продължение на 15 min, след това се хомогенизират с политрон в продължение на 30 sec. Суспензията се центрофугира при 1000g (макс.) в продължение на 10 min при 4 °C. Супернатантата се запазва върху лед и утайките се ресуспендират и центрофугират, както преди. Супернатантите от двете центрофугирания се обединяват и центрофугират при 46,000 g (max) в продължение на 30 min. Утайките се

ресуспендираат в студен Tris буфер (50 mM Tris/Cl, pH 7.0) и се центрофугират отново. Крайните утайки се ресуспендираат в буфер за мембрани (50 mM Tris, 0.32 M захароза, pH 7.0). Аликвоти (1 ml) се замразяват в полипропиленови епруветки в сух лед/етанол и се съхраняват при -70°C до употреба. Концентрациите на протеин се определят с модифициран Lowry анализ с натриев додецилсулфат.

Анализ за свързване

Мембраните се разтопяват при 37°C , охлаждаат се върху лед, прекарват се 3 пъти през 25-размер игла, и се разреждат в буфер за свързване (50 mM Tris, 3 mM MgCl_2 , 1 mg/ml BSA (SigmaA-7888), pH 7.4, който е съхраняван при 4°C след филтрация през 0.22 m филтър, и към който непосредствено преди това е добавен 5 $\mu\text{g/ml}$ апротинин, 10 μM бестатин, 10 μM дипротин А, не DTT). Аликвоти от 100 μl се добавят към ледено студени 12x75 mm полипропиленови епруветки, съдържащи 100 μl от съответния радиолиганд и 100 μl от изследваното съединение при различни концентрации. Общото (TB) и неспецифично (NS) свързване се определят в отсъствие и съответно в присъствие на 10 μM налоксон. Епруветките се бъркат на бъркалка вортекс и инкубират при 25°C в продължение на 60-75 min, след което съдържанията се филтруват бързо с вакуум и се измиват с около 12ml/епруетка леден промивен буфер (50 mM Tris, pH 7.0, 3 mM MgCl_2) през GF/B филтри (Whatman) напоени предварително за най-малко 2h в 0.1% полиетиленимин. Радиоактивността (dpm) задържана от филтрите се измерва с бета брояч след потапяне на филтрите за най-малко 12h в минифлакони, съдържащи 6-7 ml сцинтилационна течност. Ако анализът се провежда в 96 ямкови плаки с дълбоки ямки, филтруването се извършва през PEI-напоени унифилтри за 96-ямкови плаки, които се измиват 3 x 1 ml с буфер за измиване, и сушат в пещ при 55°C в продължение на 2h. Филтърните плаки се броят в TopCount (Packard) след добавяне на 50 μl MS-20 сцинтилационна течност/ямка.

Функционални изпитания

Агонистичната активност на съединенията се измерва чрез определяне на степента до която рецепторният комплекс на съединенията активира свързването на GTP към G-протеини, към които рецепторите са свързани. В GTP анализа за свързване, GTP[γ]³⁵S е комбиниран със съединенията за изследване и мембраните от HEK-293S клетки, експресиращи клонираните човешки опиоидни рецептори или от хомогенизирани плъщи и миши мозък. Агонистите стимулират GTP[γ]³⁵S свързването в тези мембрани. EC₅₀ и E_{max} стойностите на съединенията са определени от кривите доза-отговор. Отмествания в дясно на кривата доза-отговор при делта антагониста налтриндол потвърждават, че агонистичната активност се медира през делта рецептори.

Метод за GTP в мозък на плъх

Мембрани от мозък на плъх се разтопяват при 37 °C, прекарват се 3 пъти през 25-размер игла със затъпен връх и се разреждат в GTP γ S буфер за свързване (50 mM Hepes, 20 mM NaOH, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, pH 7.4, добавя се свеж: 1 mM DTT, 0.1% BSA). 120 μ M GDP с крайна концентрация се добавя към мембранните разреждания. EC₅₀ и E_{max} на съединенията се оценяват от 10 точкови криви доза-отговор получени в 300 μ l със съответното количество мембранен протеин (20 μ g/ямка) и 100000-130000 dpm от GTP γ ³⁵S на ямка (0.11-0.14nM). Основното и максимално стимулирано свързване се определят в отсъствие и присъствие на 3 μ M SNC-80.

Данни от анализа

Специфичното свързване (SB) се изчислява като TB-NS, а SB в присъствието на различни съединения за изследване се изразява като процент от контролата SB. Стойностите за IC₅₀ и Hill коефициента (n_H) за лиганди при изместване на специфично свързан радиолиганд се изчисляват от логаритмични графики или програма за напасване на криви

като например Ligand, GraphPad Prism, SigmaPlot, или ReceptorFit. Стойности за K_i се изчисляват от уравнението на Cheng-Prussoff. Средни \pm S.E.M. стойности за IC_{50} , K_i и n_H са докладвани за лиганди, изследвани в най-малко три криви за изместване. Биологичната активност на съединенията на настоящето изобретение е показана в Таблица 2.

Таблица 2: Биологични данни

Пр. №	HDELTA (nM)			Мозък на плъх (nM)		Мозък на мишка (nM)	
	IC_{50}	EC_{50}	%E _{Max}	EC_{50}	%E _{Max}	EC_{50}	%E _{Max}
1-11	0.50 - 13	0.32 - 104	94 - 106	2.9 - 867	125 - 159	4.9 - 1441	126 - 154

Експерименти за рецепторно насищане

Стойностите за радиолиганд K_d се определят чрез провеждане на анализ за свързване върху клетъчни мембрани със съответни радиолиганди при концентрации в границите от 0.2 до 5 пъти пресметнатата K_d (до 10 пъти ако количествата необходим радиолиганд са приемливи). Специфичното радиолигандно свързване се изразява в $\mu\text{mole/mg}$ мембранен протеин. Стойности на K_d и V_{max} от отделните експерименти се получават от нелинейни апроксимации на специфично свързан радиолиганд (B) спрямо nM свободен (F) радиолиганд от отделния експеримент съгласно едностранния модел.

Определяне на механо-алодиния с теста на Von Frey

Изследването се провежда между 08:00 и 16:00h като се използва методът, описан от Chaplan et al. (1994). Плъховете се поставят в плексигласови клетки върху телена мрежа, която позволява достъп до лапата, и се оставят да привикнат за 10-15 min. Изследваната област е средната част на стъпалото на лявата задна лапа, като се избягва по-малко чувствителната възглавничка на ходилото. Лапата се докосва със серия от 8 Von Frey влакна с логаритмично нарастваща твърдост (0.41, 0.69, 1.20, 2.04, 3.63, 5.50, 8.51, и 15.14 grams; Stoelting, Ill, USA). Влакното на von Frey се

прилага отдолу на мрежестия под, перпендикулярно към плантарната повърхност с достатъчна сила за да се предизвика леко изкривяване спрямо лапата, и се задържа приблизително 6-8 секунди. Отчита се положителен отговор ако лапата се отдръпне енергично. Потрепване непосредствено след отстраняване на влакното се счита също така за положителен отговор. Преместването се отчита като съмнителен отговор, и в тези случаи дразненето се повтаря.

Протокол за изследване

Животните се изследват в постоперативен ден 1 за FCA-третираната група. 50% праг на отдръпване се определя като се използва up-down (нарастване-снижаване) метод на Dixon (1980). Изследването започва с 2.04 g влакно, в средата на сериите. Дразненето се извършва последователно, или във възходящ или в низходящ ред. При отсъствие на отговор с отдръпване на лапата към първоначално избраното влакно, се осъществява по-силно дразнене; в случай на отдръпване на лапата, се избира по-слабо следващо дразнене. Изчислението на оптималния праг с този метод изисква 6 отговора в непосредствената близост до 50% праг, и отброяването на тези 6 отговора започва когато се появи първата промяна в отговора, напр. прагът се пресича за първи път. В случаите когато праговете попадат извън обхвата на дразненията, се получават стойности от 15.14 (нормална чувствителност) или 0.41 респективно (максимално алодинични). Получената закономерност на положителни и отрицателни отговори се нанася в таблица като се използва условието, X = няма отдръпване; 0 = отдръпване, и 50% праг на отдръпване се интерполира като се използва формулата:

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

където X_f = стойност на последното използвано von Frey влакно (log единици); k = таблична стойност (от Chaplan et al. (1994)) за образците с положителни/отрицателни

отговори; и δ = средна разлика между дразнения (log единици). Тук $\delta = 0.224$.

Von Frey праговете се превръщат в процент максимум възможен ефект (% MPE), съгласно Chaplan et al. 1994. Следното уравнение се използва за да се пресметне % MPE:

$$\% \text{ MPE} = \frac{\text{праг (g) на третирани с лекарство} - \text{праг (g) на алодиния} \times 100}{\text{праг (g) на контрола} - \text{праг (g) на алодиния}}$$

Прилагане на изпитвано съединение

Плъховете се инжектират (подкожно, интраперитонеално, интравенозно или орално) с изследвано съединение преди изследването на von Frey, времето между прилагането на изследваното съединение и теста на von Frey варира в зависимост от природата на изследваното съединение.

Тест за изпъване на тялото

Оцетната киселина предизвиква абдоминални контракции при интраперитонеално прилагане при мишки.

Те след това изпъват телата си в типична поза. Когато се прилагат аналгетици, това описано движение се наблюдава по-рядко и избраното лекарство представлява един добър кандидат.

Пълен и типичен рефлекс на изпъване се отчита само когато присъстват следните елементи: животното не се движи; долната част на гърба е слабо снижена; плантарната част на двете лапи се вижда. В този анализ, съединенията от изобретението демонстрират значително инхибиране на отговора с изпъване след орално дозиране на 1-100 $\mu\text{mol/kg}$.

(i) Приготвяне на разтвори

Оцетна киселина (АСОН): 120 μL оцетна киселина се добавят към 19.88 ml дестилирана вода за да се получи краен обем от 20 ml с крайна концентрация от 0.6% АСОН. След това разтворът се смесва (вортекс) и е готов за инжекционно прилагане.

Съединение (лекарство): Всяко съединение се получава и разтваря в най-подходящия носител съгласно стандартните методи.

(ii) Прилагане на разтворите

Съединението (лекарство) се прилага орално, интраперитонеално (i.p.), подкожно (s.c.) или интравенозно (i.v.) при 10 ml/kg (като се има предвид средното тегло на мишка) 20, 30 или 40 минути (съгласно класа съединение и неговите характеристики) преди изследването. Когато съединението се доставя централно: интравентрикуларно (i.c.v.) или интратекално (i.t.) се прилага обем от 5 μ L.

АСОН се прилага интраперитонеално (i.p.) на две места при 10 ml/kg (като се има предвид средното мише тегло) непосредствено преди изследването.

(iii) Изследване

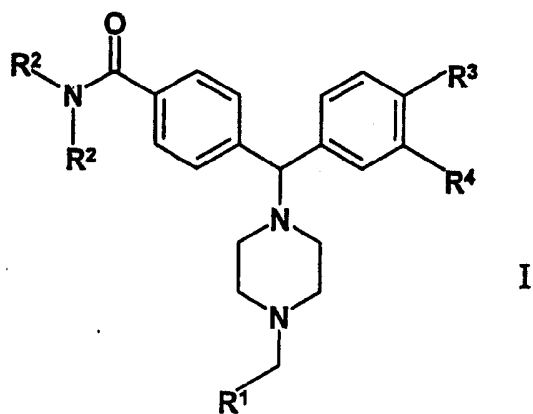
Животното (мишка) се наблюдава за период от 20 минути и броят събитията (рефлекс за изпъване) се записват и компилират в края на експеримента. Мишките се държат в отделни кафези "кутия за обувки" в съприкосновение със сламена настилка. По едно и също време се наблюдават 4 мишки: една контрола и три с доза лекарство.

За потиснатостта и потиснатост-подобни индикации, ефикасността се установява в конфликтен тест geller-seifter при плъх.

Ефикасността за функционална индикация за гастроинтестинално разстройство може да се установи в анализа, описан от Coutinho SV et al, в American Journal of Physiology-Gastrointestinal & Liver Physiology. 282 (2):G307-16, 2002 Feb, в плъх.

Патентни претенции

1. Съединение с формулата I



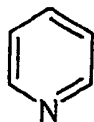
където

R¹ е избран от кой да е от

(i) фенил;



(ii) пиридинил



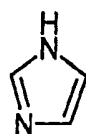
(iii) тиенил



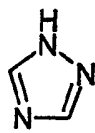
(iv) фуранил



(v) имидазолил



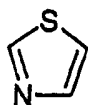
vi) триазолил



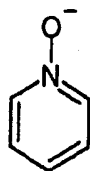
(vii) пиролил



(viii) тиазолил



(ix) пиридил-N-оксид



където всеки R^1 хетероароматен пръстен може да бъде евентуално и независимо допълнително заместен с 1, 2 или 3 заместители, избрани от линеен и разклонен C_1-C_6 алкил, халогениран C_1-C_6 алкил, NO_2 , CF_3 , C_1-C_6 алкокси, хлоро, флуоро, бромо и йодо.

R^2 е независимо избран от етил и изопропил;

R^3 е независимо избран от водород и флуоро;

R^4 е независимо избран от $-OH$, $-NH_2$ и $-NHSO_2R^5$; и

R^5 е независимо избран от водород, $-CF_3$ и C_1-C_6 алкил, при условие, че, когато R^2 е етил и R^3 е водород, тогава R^4 не може да бъде $-OH$.

2. Съединение съгласно претенция 1, където R^1 е фенил, пиролил, фуранил, тиенил или имидазолил; R^2 е етил или изопропил; R^3 е водород или флуоро; R^4 е $-NH_2$ или $-NHSO_2R^5$; и R^5 е C_1-C_6 алкил.

3. Съединение съгласно претенция 1, където R^1 е фенил, пиролил, фуранил, тиенил или имидазол; R^2 е етил или изопропил; R^3 е водород; R^4 е $-NHSO_2R^5$; и R^5 е C_1-C_6 алкил.

4. Съединение съгласно претенция 1, където хетероароматният пръстен(и) са заместени с CF_3 , йодо, бром, флуоро или хлоро.

5. Съединение съгласно претенция 1, където хетероароматният пръстен(и) са заместени с метил.

6. Съединение съгласно претенция 1, избрано от:

4-[1-(4-Бензил-пиперазин-1-ил)-1-(4-флуоро-3-хидрокси-фенил)-метил]-N,N-диизопропил-бензамид;

4-[1-(4-Флуоро-3-хидрокси-фенил)-1-(4-тиофен-3-ил-метил-пиперазин-1-ил)-метил]-N,N-диизопропил-бензамид;

4-{1-(4-Флуоро-3-хидрокси-фенил)-1-[4-(1H-имидазол-2-илметил)-пиперазин-1-ил]-метил}-N,N-диизопропил-бензамид;

4-[1-(3-Амино-фенил)-1-(4-бензил-пиперазин-1-ил)-метил]-N,N-диизопропил-бензамид;

4-[1-(3-Амино-фенил)-1-(4-тиофен-3-илметил-пиперазин-1-ил)-метил]-N,N-диизопропил-бензамид;

4-{1-(3-Амино-фенил)-1-[4-(1H-имидазол-2-илметил)-пиперазин-1-ил]-метил}-N,N-диизопропил-бензамид;

N,N-Диизопропил-4-[1-(3-метансулфониламино-фенил)-1-(4-тиофен-3-илметил-пиперазин-1-ил)-метил]-бензамид;

4-([4-(3-фурилметил)-1-пиперазинил]{3-[метилсулфонил]амино}фенил)-N,N-диизопропил-бензамид;

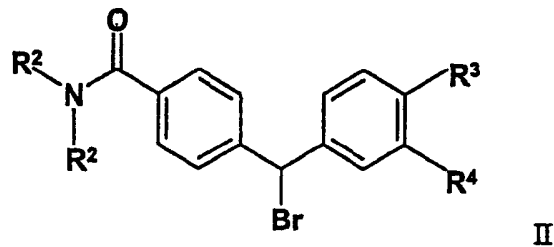
4-{(3-аминофенил)[4-(3-тиенилметил)-1-пиперазинил]-метил}-N,N-диетилбензамид;

4-[(3-аминофенил)(4-бензил-1-пиперазинил)метил]-N,N-диетилбензамид, и

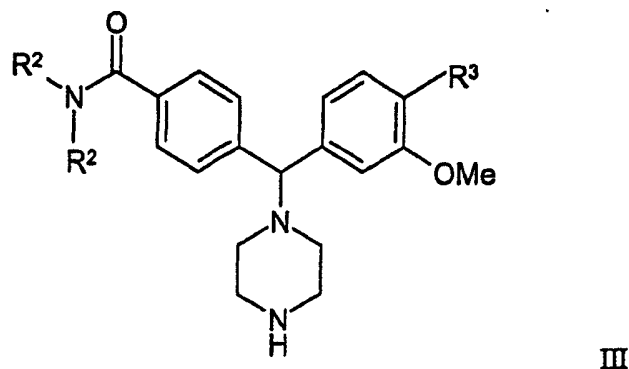
4-((4-бензил-1-пиперазинил){3-[(метилсулфонил)амино]фенил}метил)-N,N-диетилбензамид.

7. Съединение съгласно коя да е от предходните претенции, под формата на негови хидрогенхлоридна, дихидрогенхлоридна, сулфатна, тартаратна, дитрифлуороацетатна или цитратна соли.

8. Метод за получаване на съединение с формула I където R^4 е -OH, характеризиращ се с това, че включва взаимодействие на съединение с общата формула II

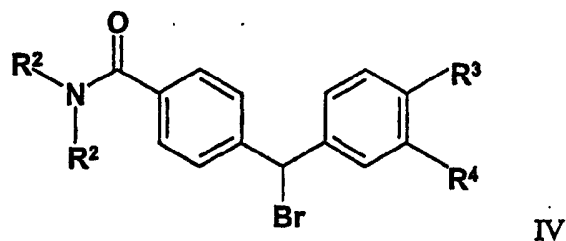


където R^2 и R^3 са дефинирани както в претенция 1 и R^4 е OMe, с Вос-пиперазин в ацетонитрил в присъствието на триетиламин при стандартни условия, последвано от отстраняване на Вос защитната група при стандартни условия, при което се получава съединение с формулата III

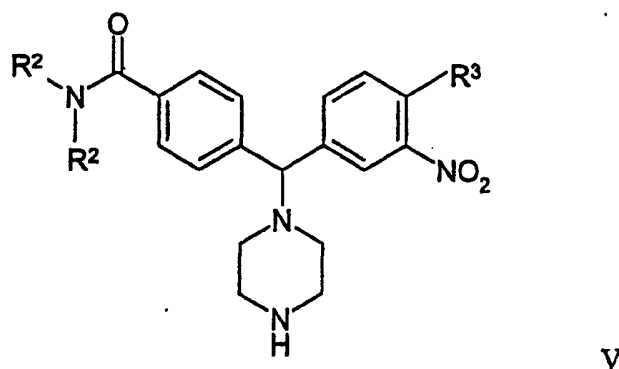


което след това се алкилира при редукционни условия със съединение с формулата R^1-CHO , последвано от отцепване на метиловия етер с помощта на BBr_3 в дихлорометан, при което се получава съединение с формулата I, където R^4 е -OH.

9. Метод за получаване на съединение с формула I където R^4 е $-NH_2$, характеризиращ се с това, че включва взаимодействие на съединение с общата формула IV

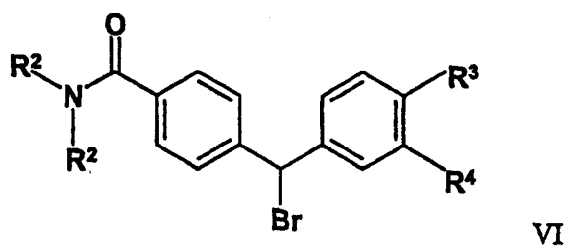


където R^2 и R^3 са дефинирани както в претенция 1 и R^4 е NO_2 , с Вос-пиперазин в ацетонитрил в присъствието на триетиламин при стандартни условия, последвано от отстраняване на Вос защитната група при стандартни условия, при което се получава съединение с формулата V

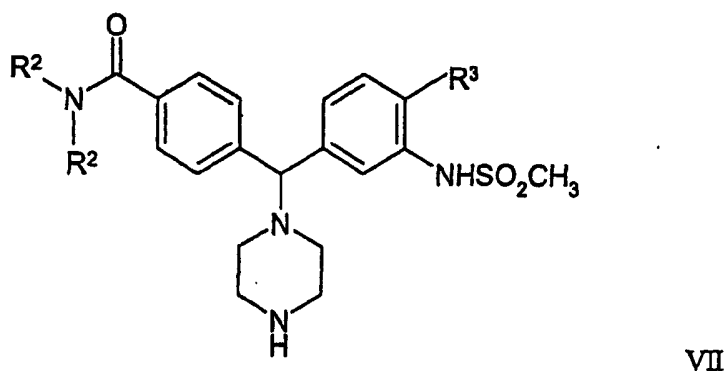


което след това се алкилира при редукционни условия със съединение с формулата R^1-CHO , последвано от редукция на нитро-групата с помощта на водород и паладий върху въглен, при което се получава съединение с формулата I, където R^4 е $-NH_2$.

10. Метод за получаване на съединение с формула I където R^4 е $-NHSO_2R^5$, характеризиращ се с това, че включва взаимодействие на съединение с общата формула VI



където R^2 и R^3 са дефинирани както в претенция 1 и R^4 е NO_2 , с Вос-пиперазин в ацетонитрил в присъствието на триетиламин при стандартни условия, последвано от редукция на нитро-групата чрез хидрогенолиза с помощта на паладий върху въглен като катализатор, метансулфониране с помощта на метансулфониланхидрид в дихлорометан в присъствието на триетиламин, и след това отстраняване на Вос защитната група при стандартни условия, при което се получава съединение с формулата VII



което след това се алкилира при редукционни условия със съединение с формулата $R^1\text{-CHO}$, последвано от редукция на нитро-групата с помощта на водород и паладий върху въглен, при което се получава съединение с формулата I, където R^4 е $-\text{NHSO}_2R^5$.

11. Съединение съгласно коя да е от претенции претенции 1-7 за използване за лечение.

12. Използване на съединение съгласно формула I на претенция 1 за производството на лекарство за използване при лечение на болка, потиснатост или функционални стомашно-чревни разстройства.

13. Фармацевтичен състав, характеризиращ се с това, че включва съединение с формула I съгласно претенция 1 като активен компонент, заедно с фармакологично и фармацевтично приемлив носител.

14. Използване на съединение с формула I съгласно претенция 1 за лечение на болка, при което ефективно количество от споменатото съединение се прилага върху субект, нуждаещ се от лечение на болка.

15. Използване на съединение с формула I съгласно претенция 1 за лечение на функционални стомашно-чревни разстройства, при което ефективно количество от споменатото съединение се прилага върху субект, страдащ от споменатото функционално стомашно-чревно разстройство.