

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 244071 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **428485**

(22) Data zgłoszenia: **2019.01.07**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2020.07.13 BUP 15/2020**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.11.27 WUP 48/2023**

(51) MKP:

C07D 403/06 (2006.01)

C07D 401/06 (2006.01)

C07D 409/14 (2006.01)

C07D 413/14 (2006.01)

A61P 25/04 (2006.01)

A61P 25/06 (2006.01)

A61P 25/08 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

UNIwersytet Jagielloński, Kraków, PL
Warszawski Uniwersytet Medyczny,
Warszawa, PL

(72) Twórca(-y) wynalazku:

Krzysztof Kamiński, Kraków, PL
Michał Abram, Kraków, PL
Anna Rapacz, Kraków, PL
Szczepan Mogilski, Łabowa, PL
Gniewomir Latacz, Wolbrom, PL
Bartłomiej Szulczyk, Warszawa, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Krystian Żygadło, Wrocław, PL

(54) Tytuł:

Pochodne (2,5-dioksopirolidyn-1-ylo)(fenylo)-acetamidu i ich zastosowanie do leczenia chorób o podłożu neurologicznym

PL 244071 B1

Opis wynalazku

Wynalazek dotyczy pochodnych (2,5-dioksopiroolidyn-1-yl)(fenylo)-acetamidu oraz ich farmaceutycznie akceptowalnych soli, które nadają się do leczenia chorób o podłożu neurologicznym. Ujawnione związki wykazują szeroką aktywność protekcyjną w zwierzęcych modelach drgawek padaczkowych oraz modelach bólu i z tego względu mogą znaleźć zastosowanie w leczeniu chorób o podłożu neurologicznym, w szczególności padaczki, bólu neuropatycznego oraz migreny. Z uwagi na szeroki zakres wskazań terapeutycznych leków przeciwpadaczkowych, związki te mogą być również użyteczne m.in. do terapii zespołu abstynencyjnego, schizofrenii, zaburzeń schizoafektywnych, osobowości i odżywiania, a także lęku oraz stresu pourazowego.

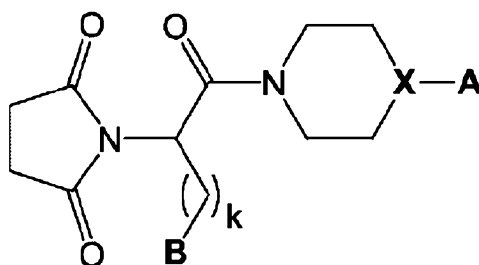
Padaczka należy do najczęstszych chorób neurologicznych związanych z zaburzeniami pobudliwości i przewodnictwa neuronalnego. Schorzenie to dotyka 1–2% populacji ludzkiej i w istotnym stopniu obniża jakość życia chorych i możliwości ich codziennego funkcjonowania (Nadkarni, S.; LaJoie, J.; Devinsky, O. *Neurology* 2005, 64, S2-S11). Z uwagi na złożoną patofizjologię, padaczka jest chorobą heterogenną, charakteryzującą się występowaniem różnych typów napadów (m.in. toniczno-klonicznych, nieświadomości, częściowych, itp.) oraz znaczną lekoopornością, sięgającą 30–40% diagnozowanych przypadków (Kwan, P.; Schachter, S.C.; Brodie, M.J. *N. Engl. J. Med.* 2011, 365, 919–926). Kolejną, poważną i trudną z punktu widzenia terapii chorobą neurologiczną jest ból neuropatyczny. Aktualne dane wskazują, że tylko u 50% chorych udaje się uzyskać zmniejszenie bólu neuropatycznego o 30–50%, natomiast u pozostałych pacjentów nie udaje się uzyskać poprawy za pomocą żadnego ze stosowanych leków (Butera, J.A. *J. Med. Chem.* 2007, 11, 2543–2546). Istnieje zatem duże zapotrzebowanie na nowe substancje lecznicze umożliwiające kontrolę różnych typów napadów padaczkowych, korzystnie działających dodatkowo skutecznie w bólu o podłożu neurologicznym. Większość z aktualnie stosowanych leków przeciwpadaczkowych posiada wąski zakres wskazań terapeutycznych i dlatego znajdują one zastosowanie jedynie w określonym typie napadów padaczkowych. Do leków tych należą m.in. najnowsze preparaty lewetyracetam i lakozamid. Prace badawcze prowadzone w ostatnich latach wskazują, iż do terapii chorób o złożonym patomechanizmie (tzw. choroby wieloczynnikowe) szczególnie korzystne mogą okazać się związki wielocelowe (ang. *multitargeted compounds*) określane również terminem wielofunkcyjne (ang. *multifunctional compounds*), tj. charakteryzujące się złożonym mechanizmem działania molekularnego. Łączenie różnych i synergistycznych mechanizmów umożliwi kompleksowe podejście do procesu leczniczego, co w efekcie zwiększa skuteczność terapeutyczną preparatu w stosunku do substancji działających na pojedynczy cel biologiczny (Bansal, Y.; Silakari, O. *Eur. J. Med. Chem.* 2014, 76, 31–42). Kolejną zaletą leków wielocelowych może być ograniczenie ilości przyjmowanych leków, co skutkować może zmniejszeniem działań niepożądanych, obniżeniem ryzyka interakcji lekowych oraz lepszą współpracą na linii lekarz-pacjent (tzw. *compliance*). Postuluje się również, iż związki wielocelowe mogą być użyteczne w leczeniu chorób charakteryzujących się wysoką lekoopornością (m.in. padaczki) (Talevi, A. *Front. Pharmacol.* 2015, 6, 205). Substancje wielocelowe projektowane są zwykle jako hybrydy lub chimery łączące na jednej matrycy chemicznej fragmenty strukturalne odpowiadające za określony efekt farmakologiczny (Morphy, R.; Rankovic, Z. *J. Med. Chem.* 2005, 48, 6523–6543). Szczególnie intensywne prace nad rozwojem związków wielocelowych jako kandydatów na nowe leki prowadzone są w obszarze chorób nowotworowych, neurodegeneracyjnych oraz zapalnych. Koncepcja hybrydyzacji molekularnej jako metody pozwalającej na projektowanie i rozwój nowych leków przeciwpadaczkowych o szerokim zakresie wskazań terapeutycznych została zaproponowana ostatnio przez nasz zespół (Abram, M.; Zagaja, M.; Mogilski, S.; Andres-Mach, M.; Latacz, G.; Baś, S.; Łuszczki, J. J.; Kieć-Kononowicz, K.; Kamiński, K. *J. Med. Chem.* 2017, 60, 8565–8579; Kamiński, K.; Zagaja, M.; Rapacz, A.; Łuszczki, J. J.; Andres-Mach, M.; Abram, M.; Obniska, J. *Bioorg. Med. Chem.* 2016, 24, 606–618; Kamiński, K.; Rapacz, A.; Filipek, B.; Obniska, J. *Bioorg. Med. Chem.* 2016, 24, 2938–2946; Kamiński, K.; Zagaja, M.; Łuszczki, J. J.; Rapacz, A.; Andres-Mach, M.; Latacz, G.; Kieć-Kononowicz, K. *J. Med. Chem.* 2015, 58, 5274–5286; Kamiński, K.; Rapacz, A.; Łuszczki, J. J.; Latacz, G.; Obniska, J.; Kieć-Kononowicz, K.; Filipek, B. *Bioorg. Med. Chem.* 2015, 23, 2548–2561).

Aktywność przeciwdrgawkowa lub/i przeciwbólowa nowych substancji chemicznych oceniana jest rutynowo w modelach zwierzęcych (głównie na myszach i szczurach). Z klinicznego punktu widzenia szczególnie obiecującymi kandydatami na nowe leki przeciwpadaczkowe o szerokim spektrum skuteczności w różnych typach napadów padaczkowych u ludzi, są substancje aktywne w teście maksymalnego elektroszoku (MES, *maximal electroshock seizure test*), teście drgawek indukowanych podskórnym po-

daniem pentetrazolu (scPTZ, *subcutaneous pentylenetetrazole sisure test*) oraz modelu drgawek indukowanych prądem o niskiej częstotliwości 6 Hz (32 mA lub/i 44 mA). Związki o takim profilu w badaniach przedklinicznych *in vivo* mogą działać efektywnie w ludzkich napadach toniczno-klonicznych przebiegających bez lub z wtórnym uogólnieniem, uogólnionych napadach nieświadomości (*absence*), napadach mioklonicznych, napadach częściowych oraz napadach lekoopornych. Wartością dodaną ww. połączeń jest aktywność w ważniejszych zwierzęcych testach oceniających działanie antynocyceptywne, tj. teście formalinowym, modelu bólu indukowanego kapsaicyną oraz modelu bólu neuropatycznego indukowanego oksaliplatyną.

Problemem technicznym stawianym przed wynalazkiem jest dostarczenie takich związków chemicznych, które byłyby proste w otrzymywaniu, nie wykazywałyby efektu hepatotoksycznego oraz możliwe byłoby ich zastosowanie, jako substancji aktywnych w kompozycjach farmaceutycznych, albo ich farmaceutycznie akceptowanych soli, do kontroli napadów padaczkowych różnego typu (toniczno-klonicznych przebiegających bez lub z wtórnym uogólnieniem, uogólnionych napadach nieświadomości, napadach mioklonicznych, napadach częściowych oraz napadach lekoopornych), przy czym związki takie powinny wykazywać także aktywność przeciwbólową względem bólu o podłożu neurologicznym czy migreny.

Pierwszym przedmiotem wynalazku jest związek o wzorze ogólnym (I) albo jego farmaceutycznie akceptowalne sole,



(I)

w którym:

X – oznacza N lub C,

k – jest liczbą równą 0

A oznacza podstawnik wybrany z grupy zawierającej:

- podstawnik fenyłowy;
- podstawnik fenyłowy podstawiony jednym albo dwoma podstawnikami bocznymi wybranymi z grupy zawierającej: atomy fluorowców, -SCF₃, -CF₃, -CHF₂, -OCF₃, -CH₃;
- podstawnik bifenyłowy;
- podstawnik 2-naftalenyłowy;
- podstawnik 5-benzotiofenyłowy;
- podstawnik 5-benzoksazolowy;

B oznacza:

- podstawnik fenyłowy;
- podstawnik fenyłowy podstawiony jednym atomem fluoru.

Związek o wzorze (I) posiada centrum chiralne, stąd może on występować w postaci izomerów optycznych i ich mieszanin. Poszczególne izomery można otrzymać, stosując odpowiednie formy izomeryczne substancji wyjściowej (pochodne aminokwasowe) lub można je rozdzielać po wytworzeniu związku końcowego według znanych metod rozdzielania.

W następnej korzystnej realizacji wynalazku atom fluorowca stanowi atom fluoru albo chloru, korzystnie atom chloru.

W kolejnej korzystnej realizacji wynalazku związek o wzorze ogólnym (I) jest wybrany z grupy zawierającej:

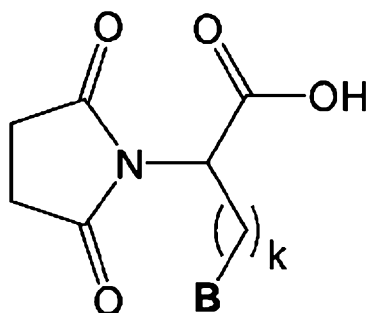
- 1) 1-(2-okso-1-fenylo-2-(4-fenylo-piperazyn-1-ylo)etylo)pirolidyno-2,5-dion,
- 2) 1-(2-(4-(3-chlorofenylo)piperazyn-1-ylo)-2-okso-1-fenyloetylo)pirolidyno-2,5-dion,
- 3) 1-(2-(4-(3,5-dichlorofenylo)piperazyn-1-ylo)-2-okso-1-fenyloetylo)pirolidyno-2,5-dion,
- 4) 1-(2-okso-1-fenylo-2-(4-(*m*-tolilo)piperazyn-1-ylo)etylo)pirolidyno-2,5-dion,
- 5) 1-(2-okso-1-fenylo-2-(4-(3-(trifluorometylo)fenylo)piperazyn-1-ylo)etylo)pirolidyno-2,5-dion,

- 6) 1-(2-okso-1-fenyl-2-(4-(4-(trifluorometylo)fenyl)piperazyn-1-ylo)etylo)pirolidyno-2,5-dion,
- 7) 1-(2-(4-(3,5-bis(trifluorometylo)fenyl)piperazyn-1-ylo)-2-okso-1-fenyl-2-etylo)pirolidyno-2,5-dion,
- 8) 1-(2-okso-1-fenyl-2-(4-(3-(difluorometylo)fenyl)piperazyn-1-ylo)etylo)pirolidyno-2,5-dion,
- 9) 1-(2-okso-1-fenyl-2-(4-(3-(trifluorometoksy)fenyl)piperazyn-1-ylo)etylo)pirolidyno-2,5-dion,
- 10) 1-(2-okso-1-fenyl-2-(4-(4-(trifluorometoksy)fenyl)piperazyn-1-ylo)etylo)pirolidyno-2,5-dion,
- 11) 1-(2-okso-1-fenyl-2-(4-(3-(trifluorometylo(sulfanylo)fenyl)piperazyn-1-ylo)etylo)pirolidyno-2,5-dion,
- 12) 1-(2-(4-([1,1'-bifenyl]-3-ylo)piperazyn-1-ylo)-2-okso-1-fenyl-2-etylo)pirolidyno-2,5-dion,
- 13) 1-(1-(4-fluorofenyl)-2-okso-2-(4-(3-(trifluorometylo)fenyl)piperazyn-1-ylo)etylo)pirolidyno-2,5-dion,
- 14) 1-(2-(4-(naftalen-2-ylo)piperazyn-1-ylo)-2-okso-1-fenyl-2-etylo)pirolidyno-2,5-dion,
- 15) 1-(2-(4-(benzo[b]tiofen-5-ylo)piperazyn-1-ylo)-2-okso-1-fenyl-2-etylo)pirolidyno-2,5-dion,
- 16) 1-(2-(4-(1,2-benzoksazol-5-ilo)piperazyn-1-ylo)-2-okso-1-fenyl-2-etylo)pirolidyno-2,5-dion,
- 17) 1-(2-(4-(3-chlorofenyl)piperazyn-1-ylo)-2-okso-1-fenyl-2-etylo)pirolidyno-2,5-dion,
- 18) 1-(2-okso-1-fenyl-2-(4-(3-(trifluorometylo)fenyl)piperazyn-1-ylo)etylo)pirolidyno-2,5-dion,
- 19) 1-(2-okso-1-fenyl-2-(4-(3-(trifluorometoksy)fenyl)piperazyn-1-ylo)etylo)pirolidyno-2,5-dion.

Drugim przedmiotem wynalazku jest związek według wynalazku, który został zdefiniowany powyżej, przeznaczony do stosowania w leczeniu lub zapobieganiu napadom padaczkowym, bólowi o podłożu neurologicznym, migrenie, bólowi neuropatycznemu lub bólowi o podłożu zapalnym. Związek według wynalazku jest stosowany jako substancja aktywna (jedyna lub jedna z wielu) zawarta w kompozycji farmaceutycznej służącej do leczenia lub zapobiegania co najmniej jednego z powyższych wskazań medycznych.

Związki według wynalazku posiadają aktywność przeciwdrgawkową i przeciwbólową w szerokim panelu modeli zwierzęcych i mogą znaleźć zastosowanie, jako substancje czynne różnych postaci leku do leczenia padaczki i bólu o podłożu neurologicznym.

Związki o wzorze (I) według wynalazku można otrzymać wychodząc ze związku o wzorze (II):



(II)

w którym B i k mają znaczenie takie jak zdefiniowano dla wzoru (I). Związek o wzorze (II) można otrzymać w dwuetapowym postępowaniu stosując, jako substraty dostępne w handlu bezwodnik bursztynowy i odpowiednie pochodne aminokwasowe. W etapie pierwszym w wyniku reakcji kondensacji bezwodnika bursztynowego z właściwym aminokwasem uzyskuje się produkt pośredni o strukturze amidokwasu, który następnie w wyniku reakcji cyklizacji tworzy żądany związek o wzorze (II). Alternatywnie, związek o wzorze (II) można wytwarzać stosując w tym celu jednoetapową reakcję cyklokondensacji termicznej, która zachodzi między bezwodnikiem bursztynowym bądź kwasem bursztynowym i odpowiednim aminokwasem.

Żądane związki wg wzoru (I) według wynalazku można otrzymać stosując w tym celu reakcję amidowania zachodzącą pomiędzy związkiem opisanym wzorem (II) i właściwą, dostępną w handlu drugorzędową aminą alifatyczną. Reakcja ta prowadzona może być w obecności znanych czynników sprzęgających m.in. CDI, EDCI, DCC, itp. Alternatywnie związki według wzoru (I) można otrzymać w wyniku reakcji zachodzącej pomiędzy chlorkiem kwasowym powstałym w wyniku przekształcenia kwasu karboksylowego opisanego wzorem (II) i odpowiednią dostępną komercyjnie drugorzędową aminą alifatyczną. Związki opisane wzorem (I) wg wynalazku mogą zostać również wytworzone w reak-

cji pomiędzy kwasem karboksylowym i odpowiednią aminą alifatyczną wykorzystując czynniki aktywujące wybrane z pośród BOP, HBTU, HATU, w obecności zasady organicznej, zwłaszcza trietyloaminy (TEA), *N*-metylomorfoliny (NMM) lub *N,N*-diizopropyleoetyloaminy (DIEA).

Postępowanie syntetyczne oraz warunki reakcji ilustruje Fig. 2, gdzie X, A, B i k mają znaczenie podane wyżej.

Rozwiązanie według wynalazku posiada szereg zalet. Ujawnione związki o wzorze (I) charakteryzują się silną i szeroką aktywnością przeciwdrgawkową w różnych zwierzęcych modelach padaczki tj. w teście maksymalnego elektroszoku (MES, *maximal electroshock seizure test*), teście drgawek indukowanych podskórnym podaniem pentetrazolu (*scPTZ, subcutaneous pentylene tetrazole seizure test*) oraz modelu drgawek indukowanych prądem o niskiej częstotliwości 6 Hz (32 mA lub/i 44 mA). Związki o takim profilu w badaniach przedklinicznych *in vivo* mogą działać efektywnie w różnych typach padaczki u człowieka w tym napadach toniczno-klonicznych przebiegających bez lub z wtórnym uogólnieniem, uogólnionych napadach nieświadomości (*absence*), napadach mioklonicznych, napadach częściowych oraz, co istotne, napadach lekoopornych. Inną zaletą związków o wzorze (I) jest silna aktywność nocyceptywna w zwierzęcych testach oceniających działanie antynocyceptywne, tj. teście formalinowym, modelu bólu indukowanego kapsaicyną oraz modelu bólu neuropatycznego indukowanego oksaliplatiną. Z tego względu związki o wzorze (I) mogą znaleźć zastosowanie do terapii bólu zarówno o podłożu neurogennym jak i zapalnym, co jest cechą niespotykaną wśród dostępnych w leczeniu leków przeciwpadaczkowych. Związki wg wzoru (I) posiadają złożony mechanizm działania molekularnego oddziałując z napięciowo-zależnymi kanałami sodowymi, wapniowymi oraz receptorem/kanałem TRPV1. Korzystne działanie antagonistyczne wobec TRPV1 nie zostało aktualnie dowiedzione dla znanych i stosowanych w leczeniu leków przeciwpadaczkowych. Co istotne, dane literaturowe sugerują możliwe zaangażowanie TRPV1 w indukcję napadów padaczkowych (Naziroğlu, M. *Curr. Neuropharmacol.* 2015, 13, 239–247; Naziroğlu, M.; Övey, I.S. *Neuroscience* 2015, 293, 55–66), natomiast jego rola, jako cel molekularny dla substancji o działaniu antynocyceptywnym, jest dobrze udokumentowana w literaturze (Szallasi, A.; Cortright, D.N.; Blum, C.A.; Eid, S.R. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2007, 6, 357–372). Związki wg wzoru (I) mogą być również potencjalnie użyteczne m.in. do terapii zespołu abstynencyjnego, schizofrenii, zaburzeń schizoafektywnych, osobowości i odżywiania, a także lęku oraz stresu porazowego. Niniejszy wynalazek zapewnia, zatem związki do zastosowania jako leki. Ponadto ujawnia się możliwość zastosowania antagonistów receptora TRPV1 do leczenia różnych typów napadów padaczkowych.

Związki według wynalazku mogą być podawane różnymi drogami m.in. dojelitowo, miejscowo lub pozajelitowo przy zastosowaniu odpowiedniego preparatu farmaceutycznego przydatnego do wymienionego podawania i zawierającego co najmniej jeden aktywny związek wg wzoru (I) w farmaceutycznie dopuszczalnych i skutecznych ilościach razem z farmaceutycznie dopuszczalnymi rozcieńczalnikami, nośnikami i/lub substancjami pomocniczymi znanymi w dziedzinie. Wytwarzanie takich preparatów farmaceutycznych jest znane w dziedzinie. Dawka terapeutyczna będzie zmienna i uzależniona od substancji, gatunku, płci, wieku, leczonej jednostki chorobowej, drogi i sposobu podania, co wymaga wyznaczenia przez specjalistę w dziedzinie. Proponowana dawka związków według wynalazku wynosi od 0,1 do około 1000 mg na dzień, w dawce pojedynczej lub w dawkach podzielonych. Związki według wynalazku podaje się pacjentowi, jako takie lub w połączeniu z jedną inną substancją czynną lub więcej, każdą w swej własnej kompozycji lub niektórymi bądź wszystkimi substancjami czynnymi połączonymi w pojedynczej kompozycji, i/lub odpowiednimi farmaceutycznymi substancjami pomocniczymi. Odpowiednie farmaceutyczne substancje pomocnicze obejmują typowo stosowane substancje pomocnicze i środki ułatwiające formulację, takie jak wypełniacze, środki wiążące, środki rozsadzające, środki poślizgowe, rozpuszczalniki, środki żelotwórcze, emulgatory, stabilizatory, barwniki i/lub środki konserwujące. Związki według wynalazku komponuje się w postaci dawkowania, stosując powszechnie znane farmaceutyczne metody wytwarzania. Postaciami dawkowania mogą być np. tabletki, kapsułki, granulki, czopki, emulsje, zawiesiny lub roztwory. Zależnie od sposobu podawania i formy galenowej, ilość substancji czynnej w preparacie może typowo wahać się w zakresie od 0,01% i 100% (wagowo).

Przykłady realizacji wynalazku zostały zobrazowane na rysunku, gdzie przedstawiono: na Fig. 1. wzór ogólny związku (I); Fig. 2 syntezy pochodnych wg wzoru (I); Fig. 3 aktywność analgetyczną związku 6 oraz kwasu walproinowego (VPA) w I i II fazie bólu testu formalinowego, gdzie wyniki przedstawiono jako czas lizania łapy w fazie pierwszej testu (0–5 minut po iniekcji formaliny) i w fazie II testu (15–30 minut po iniekcji formaliny), i wartości przedstawiają średnie \pm SEM dla grupy 8–10 zwierząt. Różnica statystycznie znamiennej w porównaniu do grupy kontrolnej, której podano sam nośnik

(Tween), analiza statystyczna-jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA, test post hoc Dunnett'a: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. C – grupa kontrolna; VPA – kwas walproinowy; Fig. 4 aktywność analgetyczną związku 6 oraz kwasu walproinowego (VPA) w teście kapsaicynowym, gdzie wyniki przedstawiono jako czas lizania łapy 0–5 minut po wstrzyknięciu kapsaicyny i wartości przedstawiają średnie \pm SEM. Różnica statystycznie znamiennej w porównaniu do grupy kontrolnej, której podano sam nośnik (Tween), analiza statystyczna-jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA, test post hoc Dunnett'a: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. C – grupa kontrolna; VPA – kwas walproinowy; Fig. 5 aktywność analgetyczną związku 6 oraz kwasu walproinowego (VPA) w neuropatii obwodowej indukowanej oksaliplatyną, gdzie: A – wpływ związku 6 na allodynię mechaniczną w teście von Frey'a. B – wpływ kwasu walproinowego (VPA) na allodynię mechaniczną w teście von Frey'a. C – wpływ związku 6 na allodynię termiczną w teście Cold Plate i wyniki przedstawiono jako średnią wartość siły nacisku powodującą uniesienie łapy (test von Frey'a) lub czas latencji do wystąpienia reakcji nocycyptywnej (test Cold Plate) \pm SEM dla grupy 8–10 zwierząt. Różnica statystycznie znamiennej w porównaniu do grupy kontrolnej (myszy po podaniu OXPT, a przed podaniem związków badanych, analiza statystyczna-jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA, test post hoc Dunnett'a: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Veh – nośnik (1% Tween 80); Fig. 6 wpływ związku 6 (w stężeniu 100 μ M) na szybkie potencjałozależne prądy sodowe, gdzie: A – przykładowe rejestracje maksymalnych, potencjałozależnych prądów sodowych w kontroli, w obecności związku 6 i po odplukaniu substancji. B – uśrednione, znormalizowane, maksymalne amplitudy prądów sodowych w kontroli, w obecności związku 6 (* $p < 0,001$, ANOVA z testem Tukey'a) i po odplukaniu substancji. I/I_{max} (na osi pionowej) oznacza, że prądy były normalizowane do wartości kontrolnych; Fig. 7 wpływ werapamilu, Na_3VO_4 oraz związku 6 na aktywność bazową Pgp i istotność statystyczną obliczono jednoczynnikową analizą wariancji ANOVA oraz metodą Bonferroniego (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, związki testowane w tryplikatach), Fig. 8A – wpływ referencyjnego inhibitora – ketokonazolu (KE) oraz związku 6 na aktywność CYP3A4. B – wpływ referencyjnego inhibitora – chinidyny (QD) oraz 6 na aktywność CYP2D6. Wartość IC_{50} dla KE i QD wyliczono przy użyciu oprogramowania GraphPad Prism 5. Związki testowane w tryplikatach; Fig. 9 wpływ referencyjnego cytostatyku dokсорubicyny (DX), toksyny mitochondrialnej CCCP (karbonylocyjanek *m*-chlorofenylohydrazonu) oraz związku 6 na żywotność komórek linii HepG2 po 72 h inkubacji. Istotność statystyczną obliczono jednoczynnikową analizą wariancji ANOVA oraz metodą Bonferroniego (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, związki testowane w czterech powtórzeniach); Fig. 10 Poziom ATP w komórkach linii komórek HepG2 po 3 godzinnej inkubacji. DX – dokсорubicyna, CCCP (karbonylocyjanek *m*-chlorofenylohydrazonu). Istotność statystyczną obliczono jednoczynnikową analizą wariancji ANOVA oraz metodą Bonferroniego (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, związki testowane w czterech powtórzeniach).

Metody analityczne:

Widma protonowego rezonansu magnetycznego (1H NMR) oraz magnetycznego rezonansu jądrowego węgla (^{13}C NMR) rejestrowano używając spektrometru Mercury-300 „Varian” (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA), przy odpowiednio 300 MHz i 75 MHz. Przesunięcia chemiczne podano w wartościach δ (ppm) w stosunku do TMS $\delta = 0$ (1H), jako wzorca wewnętrznego. Wartości J wyrażono w hercach (Hz). Jako rozpuszczalnik stosowano deuterowany chloroform ($CDCl_3$) lub deuterowany dimetylosulfotlenek ($DMSO-D_6$). W opisie widm użyto następujące skróty sygnałów: s (singlet), br. s (szeroki singlet), d (doublet), dd (doublet doubletów), t (triplet), td (triplet doubletów), q (kwartet), m (multiplet). System do analiz UPLC/MS składał się z aparatu Waters ACQUITY® UPLC® (Waters Corporation, Milford, MA, USA) sprzężonego ze spektrometrem masowym Waters TQD, pracującym w trybie jonizacji elektro-sprejem (ESI). Rozdziały chromatograficzne zostały przeprowadzone z wykorzystaniem kolumny Acquity UPLCBEH C18 o wymiarach 2,1 x 100 mm i średnicy ziaren 1,7 μ m. Kolumna była utrzymywana w temperaturze 40°C i eluowana w gradiencie od 95% do 0% eluentu A w czasie 10 min, przy przepływie 0,3 ml/min. Eluent A: woda/kwas mrówkowy (0,1%, v/v); eluent B: acetonitryl/kwas mrówkowy (0,1%, v/v). Chromatogramy zostały zarejestrowane przy użyciu detektora PDA Waters e λ . Widma były analizowane w zakresie 200–700 nm z rozdzielczością 1,2 nm i częstotliwością próbkowania 20 pkt/s. Chromatografia cienkowarstwowa (TLC) została wykonana na płytkach aluminiowych powlekanym żelem krzemionkowym 60 F $_{254}$ (Macherey-Nagel, Düren, Niemcy), przy użyciu układów rozwijających o następującym składzie: DCM : MeOH (9 : 0,2; v/v), DCM : MeOH (9 : 0,3; v/v), DCM : MeOH (9 : 0,5; v/v), DCM : MeOH (9 : 1; v/v). Detekcja plam – światło UV ($\lambda = 254$ nm). Temperatury topnienia (t.t.) oznaczono z użyciem kapilar otwartych w aparacie Büchi 353 (Büchi Labortechnik, Flawil, Szwajcaria).

Wytwarzanie związków według wynalazku zilustrowano w poniżej zamieszczonych przykładach. Przedstawione w poniższych przykładach syntezy nie były optymalizowane pod kątem wydajności, ilości zastosowanych reagentów jak i finalnej postaci otrzymanych związków.

Zastosowane skróty:

CDI	–	karbonyldiimidazol
DCM	–	dichlorometan
DMF	–	dimetyloformamid
Et ₂ O	–	eter dietylowy
HCl	–	kwas solny
HMDS	–	heksametylodisilazan
MeOH	–	metanol
NaCl	–	chlorek sodu
Na ₂ SO ₄	–	siarczan sodu
ZnCl ₂	–	chlorek cynku

Przykład 1. Synteza oraz dane fizykochemiczne i spektralne produktów pośrednich (II i III wg schematu na Fig. 2):

Produkt pośredni III: *Kwas 4-((karboksy(fenylo)metylo)amino)-4-oksobutanowy*

Bezwodnik bursztynowy (3,0 g, 30 mmol, 1 eq) rozpuszczono w 15 ml lodowatego kwasu octowego, a następnie dodano równomolową ilość DL-fenyloglicyny (4,53 g). Mieszaninę podgrzano do 70°C, a następnie mieszano przez 12 godzin. Po tym czasie kwas octowy oddestylowano do sucha. Produkt pośredni III otrzymano w postaci stałej po przemyciu Et₂O.

Biały stały. Wydajność: 87% (6,55 g); t.t. 199,4-200,6°C; TLC: R_f = 0,25 (DCM : MeOH (9 : 1; v/v)); C₁₂H₁₃NO₅ (251,24), Masa monoizotopowa: 251,08. UPLC (czystość 100%): t_R = 2,77 min. (M+H)⁺ 252,1.

Produkt pośredni II: *Kwas 2-(2,5-dioksopirolidyn-1-ylo)-2-fenylooctowy*

Do zawiesiny kwasu 4-((karboksy(fenylo)metylo)amino)-4-oksobutanowego (5,0 g, 20 mmol, 1 eq) w suchym benzenie (100 ml) dodano ZnCl₂ (2,73 g, 20 mmol, 1 eq), całość ogrzano do 80°C. Następnie przez 30 minut wkraplano roztwór HMDS (4,84 g, 6,25 ml, 30 mmol, 1,5 eq) w suchym benzenie (15 ml). Reakcję kontynuowano mieszając całość w temperaturze wrzenia przez ok. 12 godzin, po czym załóżono pod zmniejszonym ciśnieniem. Po oddestylowaniu rozpuszczalnika oleistą pozostałość rozpuszczono w DCM i ekstrahowano 0,1 M HCl (3 x 50 ml), wodą (3 x 50 ml) i nasyconym roztworem NaCl (3 x 50 ml). Warstwę organiczną suszono nad bezwodnym Na₂SO₄, a następnie odparowano do sucha. Kwas 2-(2,5-dioksopirolidyn-1-ylo)-2-fenylooctowy otrzymano jako substancję stałą po przemyciu Et₂O.

Biały stały. Wydajność: 90% (4,20 g); t.t. 195,5-198,2°C; TLC: R_f = 0,45 (DCM : MeOH (9 : 1; v/v)); C₁₂H₁₁NO₄ (233,22), Masa monoizotopowa: 233,07. UPLC (czystość 100%): t_R = 3,41 min. (M+H)⁺ 234,1. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-D₆) δ 2,73 (s, 4H), 5,76 (s, 1H), 7,26-7,35 (m, 3H), 7,36-7,45 (m, 2H), 13,22 (br. s, 1H).

Przykład 2. 1-(2-Okso-1-fenylo-2-(4-fenylopiperazyn-1-ylo)etylo)pirolidyno-2,5-dion

Karbonyldiimidazol (1,17 g, 7,2 mmol, 1,2 eq) rozpuszczono w 5 ml suchego DMF, a następnie dodano do roztworu kwasu 2-(2,5-dioksopirolidyn-1-ylo)-2-fenylooctowego (1,40 g, 6 mmol, 1 eq) rozpuszczonego w 10 ml bezwodnego DMF. Całość mieszano przez 0,5 godziny, po czym wkroplono roztwór 1-fenylopiperazyny (0,97 g, 6 mmol, 1 eq) w 5 ml bezwodnego DMF. Reakcję kontynuowano mieszając całość w temperaturze pokojowej przez 24 godziny. Po tym czasie DMF oddestylowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy produkt oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej w układzie DCM : MeOH (9 : 0,3; v/v). Związek otrzymano w postaci stałej, po przemyciu eterem Et₂O.

Biały stały. Wydajność: 84% (1,90 g); t.t. 156,7-157,4°C; TLC: R_f = 0,35 (DCM : MeOH (9 : 0,3; v/v)); C₂₂H₂₃N₃O₃ (377,44), Masa monoizotopowa: 377,17. UPLC (czystość 100%): t_R = 5,88 min. (M+H)⁺ 378,1.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 2,58-2,81 (m, 5H), 2,95-3,15 (m, 2H), 3,17-3,42 (m, 3H), 3,63-3,76 (m, 1H), 3,92-4,05 (m, 1H), 6,12 (s, 1H), 6,80-6,91 (m, 3H), 7,19-7,28 (m, 2H), 7,29-7,47 (m, 5H);

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 28,1, 42,4, 45,8, 48,9, 49,2, 56,8, 116,5, 116,6, 120,6, 128,6, 128,6, 128,9, 129,1, 129,2, 129,8, 129,9, 133,0, 150,7, 165,0, 176,3.

Przykład 3. 1-(2-(4-(3-Chlorofenylo)piperazyn-1-ylo)-2-okso-1-fenyloetylo)pirolidyno-2,5-dion

Związek otrzymano wykorzystując analogiczną procedurę jak w przykładzie 2. Jako substraty użyto kwas 2-(2,5-dioksopirolidyn-1-ylo)-2-fenylooctowy (1,40 g, 6 mmol, 1 eq) oraz 1-(3-chlorofenylo)piperazynę (1,40 g, 6 mmol, 1 eq). Surowy produkt oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej w układzie eluentów DCM : MeOH (9 : 0,2 v/v).

Biały stały. Wydajność: 81% (2,00 g); t.t. 128,1-129°C; TLC: $R_f = 0,51$ (DCM : MeOH (9 : 0,2; v/v)); $C_{22}H_{22}ClN_3O_3$ (411,89), Masa monoizotopowa: 411,13. UPLC (czystość 100%): $t_R = 6,69$ min, (M+H)⁺ 412,1.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 2,58-2,73 (m, 4H), 3,00 (br. s, 1H), 3,27-3,53 (m, 3H), 3,54-3,86 (m, 2H), 4,17 (br. s, 2H), 6,02 (s, 1H), 7,27-7,40 (m, 7H), 7,51-7,63 (m, 2H);

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 28,0, 40,0, 43,3, 53,3, 53,7, 56,5, 118,9, 120,8, 128,9, 129,1, 129,3, 129,6, 131,4, 132,1, 135,9, 143,8, 165,5, 176,7.

Przykład 4. 1-(2-(4-(3,5-Dichlorofenylo)piperazyn-1-ylo)-2-okso-1-fenyloetylo)pirolidyno-2,5-dion

Związek otrzymano wykorzystując analogiczną procedurę jak w przykładzie 2. Jako substraty użyto kwas 2-(2,5-dioksopirolidyn-1-ylo)-2-fenylooctowy (1,40 g, 6 mmol, 1 eq) oraz 1-(3,5-dichlorofenylo)piperazynę (1,20 g, 6 mmol, 1 eq). Surowy produkt oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej w układzie eluentów DCM : MeOH (9 : 0,3; v/v).

Biały stały. Wydajność: 77% (2,06 g); t.t. 213,1-214,7°C; TLC: $R_f = 0,35$ (DCM : MeOH (9 : 0,3; v/v)); $C_{22}H_{21}Cl_2N_3O_3$ (446,33), Masa monoizotopowa: 446,10. UPLC (czystość 99%): $t_R = 6,39$ min, (M+H)⁺ 447,1.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 2,50-2,74 (m, 4H), 2,84-3,12 (m, 4H), 3,18-3,97 (m, 4H), 6,12 (s, 1H), 6,71-6,87 (m, 1H), 6,99-7,12 (m, 2H), 7,29-7,57 (m, 5H).

Przykład 5. 1-(2-Okso-1-fenylo-2-(4-(m-tolilo)piperazyn-1-ylo)etylo)pirolidyno-2,5-dion

Związek otrzymano wykorzystując analogiczną procedurę jak w przykładzie 2. Jako substraty użyto kwas 2-(2,5-dioksopirolidyn-1-ylo)-2-fenylooctowy (1,40 g, 6 mmol, 1 eq) oraz 1-(3-metylofenylo)piperazynę (1,18 g, 6 mmol, 1 eq). Surowy produkt oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej w układzie eluentów DCM : MeOH (9 : 0,3; v/v).

Biały stały. Wydajność: 86% (2,02 g); t.t. 188,7-192,1°C; TLC: $R_f = 0,45$ (DCM : MeOH (9 : 0,3; v/v)); $C_{23}H_{25}N_3O_3$ (391,47), Masa monoizotopowa: 391,19. UPLC (czystość 98,9%): $t_R = 6,35$ min, (M+H)⁺ 392,2.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 2,36 (s, 3H), 2,57-2,78 (m, 5H), 2,91-3,54 (m, 3H), 3,63-4,55 (m, 4H), 6,06 (s, 1H), 7,22 (d, 1H, $J = 7,5$ Hz), 7,27-7,62 (m, 8H);

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 21,4, 28,1, 39,7, 43,0, 54,1, 54,6, 56,5, 117,9, 121,7, 128,9, 129,3, 129,7, 130,2, 130,8, 132,3, 141,0, 141,8, 165,4, 176,3.

Przykład 6. 1-(2-Okso-1-fenylo-2-(4-(3-(trifluorometylo)fenylo)piperazyn-1-ylo)etylo)pirolidyno-2,5-dion

Związek otrzymano wykorzystując analogiczną procedurę jak w przykładzie 2. Jako substraty użyto kwas 2-(2,5-dioksopirolidyn-1-ylo)-2-fenylooctowy (1,40 g, 6 mmol, 1 eq) oraz 1-[3-(trifluorometylo)fenylo]piperazynę (1,38 g, 6 mmol, 1 eq). Surowy produkt oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej w układzie eluentów DCM : MeOH (9 : 0,2; v/v).

Biały stały. Wydajność: 82% (2,19 g); t.t. 150,3-151,4°C; TLC: $R_f = 0,34$ (DCM : MeOH (9 : 0,2; v/v)); $C_{23}H_{22}F_3N_3O_3$ (445,44), Masa monoizotopowa: 445,16. UPLC (czystość 100%): $t_R = 6,94$ min, (M+H)⁺ 446,2. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 2,60-2,86 (m, 5H), 3,00-3,20 (m, 2H), 3,23-3,44 (m, 3H), 3,62-3,76 (m, 1H), 3,93-4,06 (m, 1H), 6,12 (s, 1H), 6,94-7,04 (m, 2H), 7,09 (d, 1H, $J = 7,7$ Hz), 7,28-7,51 (m, 6H);

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 28,0, 42,2, 45,6, 48,4, 48,6, 56,8, 112,7 (q, $J = 4,6$ Hz), 116,7 (q, $J = 4,6$ Hz), 119,2, 123,4 (q, $J = 271,8$ Hz), 128,7, 128,9, 129,7, 129,8, 131,5 (q, $J = 31,8$ Hz), 132,9, 150,8, 165,1, 176,3.

Przykład 7. 1-(2-Okso-1-fenylo-2-(4-(4-(trifluorometylo)fenylo)piperazyn-1-ylo)etylo)pirolidyno-2,5-dion

Związek otrzymano wykorzystując analogiczną procedurę jak w przykładzie 2. Jako substraty użyto kwas 2-(2,5-dioksopirolidyn-1-ylo)-2-fenylooctowy (1,40 g, 6 mmol, 1 eq) oraz 1-[4-(trifluorometylo)fenylo]piperazynę (1,38 g, 6 mmol, 1 eq). Surowy produkt oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej w układzie eluentów DCM : MeOH (9 : 0,3; v/v).

Biały stały. Wydajność: 62% (1,66 g); t.t. 173,2-174,3°C; TLC: $R_f = 0,49$ (DCM : MeOH (9 : 0,3; v/v)); $C_{23}H_{22}F_3N_3O_3$ (445,44), Masa monoizotopowa: 445,16. UPLC (czystość 100%): $t_R = 6,89$ min, $(M+H)^+ 446,2$.

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 2,61-2,85 (m, 5H), 3,04-3,43 (m, 5H), 3,63-3,77 (m, 1H), 3,91-4,05 (m, 1H), 6,12 (s, 1H), 6,83 (d, 2H, $J = 8,6$ Hz), 7,30-7,40 (m, 3H), 7,40-7,50 (m, 4H);

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 28,0, 42,1, 45,4, 47,6, 47,9, 56,8, 115,0, 124,5 (q, $J = 270,6$ Hz), 126,5 (q, $J = 4,6$ Hz), 128,7, 128,8, 128,9, 129,8, 132,8, 152,7, 165,1, 176,3.

Przykład 8. 1-(2-(4-(3,5-Bis(trifluorometylo)fenylo)piperazyn-1-ylo)-2-okso-1-fenyloetylo)pirolidyno-2,5-dion

Związek otrzymano wykorzystując analogiczną procedurę jak w przykładzie 2. Jako substraty użyto kwas 2-(2,5-dioksopirolidyn-1-ylo)-2-fenylooctowy (1,40 g, 56 mmol, 1 eq) oraz 1-[3,5-bis(trifluorometylo)fenylo]piperazynę (1,18 g, 6 mmol, 1 eq). Surowy produkt oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej w układzie DCM : MeOH (9 : 0,5; v/v).

Biały stały. Wydajność: 69% (2,12 g); t.t. 228,1-229,4°C; TLC: $R_f = 0,47$ (DCM : MeOH (9 : 0,5; v/v)); $C_{24}H_{21}F_6N_3O_3$ (513,44), Masa monoizotopowa: 513,13. UPLC (czystość 100%): $t_R = 6,58$ min, $(M+H)^+ 514,1$.

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 2,52-2,75 (m, 4H), 2,82-3,07 (m, 4H), 3,123,86 (m, 4H), 6,11 (s, 1H), 6,97-7,05 (m, 3H), 7,22-7,61 (m, 5H).

Przykład 9. 1-(2-Okso-1-fenylo-2-(4-(3-(difluorometylo)fenylo)piperazyn-1-ylo)etylo)pirolidyno-2,5-dion

Związek otrzymano wykorzystując analogiczną procedurę jak w przykładzie 2. Jako substraty użyto kwas 2-(2,5-dioksopirolidyn-1-ylo)-2-fenylooctowy (1,40 g, 6 mmol, 1 eq) oraz 1-(3-difluorometylofenylo)piperazynę (1,27 g, 6 mmol, 1 eq). Surowy produkt oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej w układzie eluentów DCM : MeOH (9 : 0,2; v/v).

Biały stały. Wydajność: 83% (2,13 g); t.t. 156,4-157,6°C; TLC: $R_f = 0,55$ (DCM : MeOH (9 : 0,2; v/v)); $C_{23}H_{23}F_2N_3O_3$ (427,45), Masa monoizotopowa: 427,17. UPLC (czystość 100%): $t_R = 6,36$ min, $(M+H)^+ 428,2$.

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 2,58-2,78 (m, 5H), 3,02-3,18 (m, 2H), 3,24-3,46 (m, 3H), 3,62-4,08 (m, 2H), 6,12 (s, 1H), 6,44-7,62 (m, 1H), 6,94-7,04 (m, 2H), 7,28-7,51 (m, 7H).

Przykład 10. 1-(2-Okso-1-fenylo-2-(4-(3-(trifluorometoksy)fenylo)piperazyn-1-ylo)etylo)pirolidyno-2,5-dion

Związek otrzymano wykorzystując analogiczną procedurę jak w przykładzie 2. Jako substraty użyto kwas 2-(2,5-dioksopirolidyn-1-ylo)-2-fenylooctowy (1,40 g, 6 mmol, 1 eq) oraz 1-[3-(trifluorometoksy)fenylo]piperazynę (1,48 g, 6 mmol, 1 eq). Surowy produkt oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej w układzie eluentów DCM : MeOH (9 : 0,3; v/v).

Biały stały. Wydajność: 89% (2,46 g); t.t. 100,3-101,6°C; TLC: $R_f = 0,42$ (DCM : MeOH (9 : 0,3; v/v)); $C_{23}H_{22}F_3N_3O_4$ (461,44), Masa monoizotopowa: 461,16. UPLC (czystość 100%): $t_R = 7,15$ min, $(M+H)^+ 462,2$.

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 2,63-2,79 (m, 5H), 3,00-3,16 (m, 2H), 3,22-3,39 (m, 3H), 3,93-4,05 (m, 1H), 3,63-3,75 (m, 1H), 6,12 (s, 1H), 6,62 (s, 1H), 6,66-6,78 (m, 2H), 7,16-7,28 (m, 1H), 7,32-7,48 (m, 5H);

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 28,0, 42,2, 45,5, 48,3, 48,5, 56,8, 108,8, 112,1, 114,2, 120,4 (q, $J = 256,8$ Hz), 128,7, 128,9, 129,8, 130,2, 132,8, 150,2, 151,9, 165,1, 176,3.

Przykład 11. 1-(2-Okso-1-fenylo-2-(4-(4-(trifluorometoksy)fenylo)piperazyn-1-ylo)etylo)pirolidyno-2,5-dion

Związek otrzymano wykorzystując analogiczną procedurę jak w przykładzie 2. Jako substraty użyto kwas 2-(2,5-dioksopirolidyn-1-ylo)-2-fenylooctowy (1,40 g, 6 mmol, 1 eq) oraz 1-[4-(trifluorometoksy)fenylo]piperazynę (1,48 g, 6 mmol, 1 eq). Surowy produkt oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej w układzie eluentów DCM : MeOH (9 : 0,3; v/v).

Biały stały. Wydajność: 83% (2,29 g); t.t. 102,3-103,5°C; TLC: $R_f = 0,43$ (DCM : MeOH (9 : 0,3; v/v)); $C_{23}H_{22}F_3N_3O_4$ (461,44), Masa monoizotopowa: 461,16. UPLC (czystość 100%): $t_R = 7,17$ min, $(M+H)^+ 462,2$.

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 2,61-2,73(m, 5H), 2,98-3,13 (m, 2H), 3,20-3,37 (m, 3H), 3,91-4,08 (m, 1H), 3,63-3,75 (m, 1H), 6,13 (s, 1H), 6,60 (s, 1H), 6,63-6,79 (m, 2H), 7,14-7,28 (m, 1H), 7,29-7,51 (m, 5H).

Przykład 12. 1-(2-Okso-1-fenylo-2-(4-(3-(trifluorometylo(sulfanylo)fenylo)piperazyn-1-ylo)etylo)pirolidyno-2,5-dion

Związek otrzymano wykorzystując analogiczną procedurę jak w przykładzie 2. Jako substraty użyto kwas 2-(2,5-dioksopirolidyn-1-ylo)-2-fenylooctowy (1,40 g, 6 mmol, 1 eq) oraz 1-[3-(trifluorometylotio)fenylo]piperazynę (1,57 g, 6 mmol, 1 eq). Surowy produkt oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej w układzie eluentów DCM : MeOH (9 : 0,5; v/v).

Biały stały. Wydajność: 64% (1,83 g); t.t. 153,8-155,1°C; TLC: $R_f = 0,54$ (DCM : MeOH (9 : 0,5; v/v)); $C_{23}H_{22}F_3N_3O_3S$ (423,53), Masa monoizotopowa: 423,16. UPLC (czystość 99%): $t_R = 6,92$ min, $(M+H)^+$ 424,1.

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 2,54-2,73 (m, 4H), 3,21-3,48 (m, 4H), 3,55-3,79 (m, 4H), 6,12 (s, 1H), 7,13-7,34 (m, 2H), 7,51-7,65 (m, 7H).

Przykład 13. 1-(2-(4-([1,1'-Bifenylo]-3-ylo)piperazyn-1-ylo)-2-okso-1-fenyloetylo)pirolidyno-2,5-dion

Związek otrzymano wykorzystując analogiczną procedurę jak w przykładzie 2. Jako substraty użyto kwas 2-(2,5-dioksopirolidyn-1-ylo)-2-fenylooctowy (1,40 g, 6 mmol, 1 eq) oraz 1-(bifenylo-3-ylo)piperazynę (1,43 g, 6 mmol, 1 eq). Surowy produkt oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej w układzie eluentów DCM : MeOH (9 : 0,5; v/v).

Biały stały. Wydajność: 82% (2,23 g); t.t. 114,1-115,4°C ; TLC: $R_f = 0,4$ (DCM : MeOH (9 : 0,5; v/v)); $C_{28}H_{27}N_3O_3$ (453,54) Masa monoizotopowa: 453,20. UPLC (czystość 100%): $t_R = 7,43$ min, $(M+H)^+$ 454,2.

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 2,56-2,81 (m, 5H), 3,00-3,21 (m, 2H), 3,23-3,56 (m, 3H), 3,65-3,79 (m, 1H), 3,94-4,11 (m, 1H), 6,14 (s, 1H), 6,83 (dd, 1H, $J = 8,1, 2,0$ Hz), 7,00-7,17 (m, 2H), 7,27-7,62 (m, 11H);

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 28,1, 42,5, 45,8, 49,0, 49,2, 56,8, 115,4, 115,6, 119,7, 127,2, 127,4, 128,7, 128,8, 129,6, 129,9, 132,9, 141,4, 142,5, 151,1, 165,0, 176,4.

Przykład 14. 1-(1-(4-Fluorofenylo)-2-okso-2-(4-(3-(trifluorometylo)fenylo)piperazyn-1-ylo)-etylo)pirolidyno-2,5-dion

Związek otrzymano wykorzystując analogiczną procedurę jak w przykładzie 2. Jako substraty użyto kwas 2-(2,5-dioksopirolidyn-1-ylo)-2-(4-fluorofenylo)octowy (1,51 g, 6 mmol, 1 eq) oraz 1-[3-(trifluorometoksy)fenylo]piperazynę (1,38 g, 6 mmol, 1 eq). Surowy produkt oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej w układzie eluentów DCM : MeOH (9 : 0,5; v/v).

Biały stały. Wydajność: 73% (2,03 g); t.t. 88,8-90,7°C; TLC: $R_f = 0,63$ (DCM : MeOH (9 : 0,5; v/v)); $C_{23}H_{21}F_4N_3O_3$ (463,43), Masa monoizotopowa: 463,15. UPLC (czystość 100%): $t_R = 7,05$ min, $(M+H)^+$ 464,2.

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 2,61-2,89 (m, 5H), 3,02-3,46 (m, 5H), 3,67-3,80 (m, 1H), 3,88-4,04 (m, 1H), 6,09 (s, 1H), 6,94-7,27 (m, 6H), 7,29-7,40 (m, 2H),

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 28,0, 42,3, 45,6, 48,5, 48,6, 56,0, 112,7 (q, $J = 3,4$ Hz), 115,9, 116,2, 116,7 (q, $J = 3,4$ Hz), 117,0, 119,3, 124,1 (q, $J = 272,9$ Hz), 125,5 (d, $J = 3,4$ Hz), 129,7, 130,2, 130,3, 131,5 (q, $J = 31,1$ Hz), 135,1 (d, $J = 6,9$ Hz), 150,7, 160,9, 164,2, 164,5, 176,23.

Przykład 15. 1-(2-(4-(Naftalen-2-ylo)piperazyn-1-ylo)-2-okso-1-fenyloetylo)pirolidyno-2,5-dion

Związek otrzymano wykorzystując analogiczną procedurę jak w przykładzie 2. Jako substraty użyto kwas 2-(2,5-dioksopirolidyn-1-ylo)-2-fenylooctowy (1,40 g, 6 mmol, 1 eq) oraz 1-(naftalen-2-ylo)piperazynę (1,27 g, 6 mmol, 1 eq). Surowy produkt oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej w układzie eluentów DCM : MeOH (9 : 0,5; v/v).

Biały stały. Wydajność: 79% (2,02 g); t.t. 197,1-198,5°C; TLC: $R_f = 0,71$ ((DCM : MeOH (9 : 0,5; v/v)); $C_{26}H_{25}N_3O_3$ (427,50), Masa monoizotopowa: 427,19. UPLC (czystość 100%): $t_R = 6,97$ min $(M+H)^+$ 428,2.

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 2,58-2,87 (m, 5H), 3,03-3,25 (m, 2H), 3,29-3,60 (m, 3H), 3,69-3,89 (m, 1H), 3,96-4,17 (m, 1H), 6,12-6,18 (m, 1H), 7,00-7,24 (m, 2H), 7,28-7,54 (m, 7H), 7,61-7,80 (m, 3H).

Przykład 16. 1-(2-(4-(Benzo[b]tiefen-5-ylo)piperazyn-1-ylo)-2-okso-1-fenyloetylo)pirolidyno-2,5-dion

Związek otrzymano wykorzystując analogiczną procedurę jak w przykładzie 2. Jako substraty użyto kwas 2-(2,5-dioksopirolidyn-1-ylo)-2-fenylooctowy (1,40 g, 6 mmol, 1 eq) oraz 1-(benzo[b]tiefen-5-ylo)piperazynę (1,30 g, 6 mmol, 1 eq). Surowy produkt oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej w układzie eluentów DCM : MeOH (9 : 0,5; v/v).

Białe stały. Wydajność: 79% (2,05 g); t.t. 164,1-165,3°C; TLC: $R_f = 0,66$ (DCM : MeOH (9 : 0,5; v/v)); $C_{24}H_{23}N_3O_3S$ (433,53), Masa monoizotopowa: 433,15. UPLC (czystość 100%): $t_R = 6,62$ min (M+H)⁺ 434,1.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 2,56-2,85 (m, 5H), 2,96-3,17 (m, 2H), 3,20-3,54 (m, 3H), 3,66-3,87 (m, 1H), 3,96-4,12 (m, 1H), 6,14 (s, 1H), 6,99 (dd, $J = 8,7, 1,9$ Hz, 1H), 7,15-7,25 (m, 1H), 7,30-7,55 (m, 7H), 7,72 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H).

Przykład 17. 1-(2-(4-(1,2-Benzoksazol-5-ilo)piperazyn-1-ylo)-2-okso-1-fenylloetylo)pirolidyno-2,5-dion

Związek otrzymano wykorzystując analogiczną procedurę jak w przykładzie 2. Jako substraty użyto kwas 2-(2,5-dioksopirolidyn-1-ylo)-2-fenyllooctowy (1,40 g, 6 mmol, 1 eq) oraz 5-(piperazyn-1-ylo)benzo[d]izoksazol (1,22 g, 6 mmol, 1 eq). Surowy produkt oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej w układzie eluentów DCM : MeOH (9 : 0,5; v/v).

Białe stały. Wydajność: 57% (1,43 g); t.t. 186,4-187,8°C; TLC: $R_f = 0,58$ (DCM : MeOH (9 : 0,5; v/v)); $C_{23}H_{22}N_4O_4$ (418,45), Masa monoizotopowa: 418,16. UPLC (czystość 98%): $t_R = 7,25$ min, (M+H)⁺ 419,1.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 2,57-2,86 (m, 5H), 2,95-3,19 (m, 3H), 3,22-3,53 (m, 2H), 3,62-3,84 (m, 2H), 3,94-4,11 (m, 1H), 6,14 (s, 1H), 7,05-7,32 (m, 1H), 7,29-7,54 (m, 6H), 7,98 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H).

Przykład 18. 1-(2-(4-(3-Chlorofenyl)piperidyn-1-ylo)-2-okso-1-fenylloetylo)pirolidyno-2,5-dion

Związek otrzymano wykorzystując analogiczną procedurę jak w przykładzie 2. Jako substraty użyto kwas 2-(2,5-dioksopirolidyn-1-ylo)-2-fenyllooctowy (1,40 g, 6 mmol, 1 eq) oraz 4-(3-chlorofenyl)piperidynę (1,17 g, 6 mmol, 1 eq). Surowy produkt oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej w układzie eluentów DCM : MeOH (9 : 0,5; v/v).

Białe stały. Wydajność: 74% (1,83 g); t.t. 111,8-113,4°C; TLC: $R_f = 0,43$ (DCM : MeOH (9 : 0,5; v/v)); $C_{23}H_{23}ClN_2O_3$ (410,90), Masa monoizotopowa: 410,14. UPLC (czystość 100%): $t_R = 7,05$ min, (M+H)⁺ 411,1,

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1,52-2,05 (m, 4H), 2,33-2,84 (m, 8H), 2,96-3,34 (m, 1H), 6,15 (s, 1H), 7,05-7,28 (m, 6H), 7,32-7,66 (m, 3H).

Przykład 19. 1-(2-Okso-1-fenyl-2-(4-(3-(trifluorometyl)fenyl)piperidyn-1-ylo)etylo)pirolidyno-2,5-dion

Związek otrzymano wykorzystując analogiczną procedurę jak w przykładzie 2. Jako substraty użyto kwas 2-(2,5-dioksopirolidyn-1-ylo)-2-fenyllooctowy (1,40 g, 6 mmol, 1 eq) oraz 1-[3-(trifluorometyl)fenyl]piperidynę (1,37 g, 6 mmol, 1 eq). Surowy produkt oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej w układzie eluentów DCM : MeOH (9 : 0,5; v/v).

Białe stały. Wydajność: 85% (2,26 g); t.t. 100,1-101,5°C; TLC: $R_f = 0,45$ (DCM : MeOH (9 : 0,5; v/v)); $C_{24}H_{23}F_3N_2O_3$ (444,45), Masa monoizotopowa: 444,17. UPLC (czystość 100%): $t_R = 7,26$ min (M+H)⁺ 445,1.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1,49-2,00 (m, 3H), 2,54-2,83 (m, 8H), 2,94-3,77 (m, 2H), 6,14 (s, 1H), 7,09-7,60 (m, 9H).

Przykład 20. 1-(2-Okso-1-fenyl-2-(4-(3-(trifluorometoksy)fenyl)piperidyn-1-ylo)etylo)pirolidyno-2,5-dion

Związek otrzymano wykorzystując analogiczną procedurę jak w przykładzie 2. Jako substraty użyto kwas 2-(2,5-dioksopirolidyn-1-ylo)-2-fenyllooctowy (1,40 g, 6 mmol, 1 eq) oraz 4-[3-(trifluorometoksy)fenyl]piperidynę (1,45 g, 6 mmol, 1 eq). Surowy produkt oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej w układzie eluentów DCM : MeOH (9 : 0,5; v/v).

Białe stały. Wydajność: 79% (2,18 g); t.t. 112,1-113,2°C; TLC: $R_f = 0,47$ (DCM : MeOH (9 : 0,5; v/v)); $C_{24}H_{23}F_3N_2O_4$ (460,45), Masa monoizotopowa: 460,16. UPLC (czystość 100%): $t_R = 7,12$ min, (M+H)⁺ 461,1,

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1,38-2,15 (m, 3H), 2,49-2,92 (m, 8H), 2,99-3,85 (m, 2H), 6,15 (s, 1H), 7,11-7,64 (m, 9H).

Przykład 21. Oznaczenie aktywności przeciwdrgawkowej w badaniach in vivo na myszach

Badania zostały przeprowadzone na osobnikach męskich myszy białych typu Swiss (CD-1) o wadze 22–26 g. Wszystkie procedury wykonano zgodnie z obowiązującymi polskimi i międzynarodowymi wytycznymi dotyczącymi etyki badań na zwierzętach, po uzyskaniu stosownej zgody instytucjonalnej. Substancje podawane były dootrzewnowo (*i.p.*) po uprzednim zawieszeniu w 1% wodnym roztworze Tweenu, jako pojedyncze wstrzyknięcia o objętości 10 ml/kg, 30 minut przed danym testem. Badania

przesiewowe wykonano na grupach złożonych z 4 myszy. Średnią dawkę efektywną (ED_{50}) w danym teście oraz toksyczną w teście obracającego się pręta (TD_{50}) oszacowano na podstawie wyników uzyskanych na 4 grupach zwierząt złożonych z co najmniej 6 osobników. Wszystkie testy zostały przeprowadzone w oparciu o procedury opisane w literaturze specjalistycznej.

Przykład 22. Test maksymalnego wstrząsu elektrycznego

W teście maksymalnego wstrząsu elektrycznego (MES) drgawki wywołano bodźcem elektrycznym o czasie trwania 0,2 s, napięciu 500 V i natężeniu 25 mA. Impuls elektryczny wytwarzano przy użyciu generatora elektrowstrząsów (Rodent shocker, Typ 221, Hugo Sachs Elektronik, Niemcy) i doprowadzano do zwierzęcia za pomocą elektrod zakładanych na małżowiny uszne. Badanie przeprowadzano 30 minut po dootrzewnowym podaniu związków w różnych dawkach. Podczas eksperymentu zliczano ilość zwierząt, u których wystąpił epizod drgawkowy w postaci tonicznego wyprostu tylnych kończyn (Kamiński, K.; Rapacz, A.; Łuszczki, J. J.; Latacz, G.; Obniska, J.; Kieć-Kononowicz, K.; Filipek, B. *Bioorg. Med. Chem.* 2015,23, 2548–2561; Castel-Branco, M. M.; Alves, G. L.; Figueiredo, I. V.; Falcão, A. C.; Caramona, M. M. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 2009, 31, 101–106).

Przykład 23. Test drgawek psychomotorycznych (test 6 Hz)

W teście drgawek psychomotorycznych (test 6 Hz), drgawki wywoływano bodźcem elektrycznym o natężeniu 32 mA lub/i 44 mA oraz częstotliwości 6 pulsów na sekundę. Impuls elektryczny wytwarzano przy użyciu generatora elektrowstrząsów (ECT Unit 57800; Ugo Basile, Gemonio, Italy) i doprowadzano do zwierzęcia za pomocą elektrod ocznych. Przed rozpoczęciem testu elektrody delikatnie zwilżano roztworem środka miejscowego znieczulającego (1% rozt. lidokainy). Badanie przeprowadzano 30 minut po dootrzewnowym podaniu związków w różnych dawkach. Impuls elektryczny dostarczano nieprzerwanie przez okres 3 sekund, a następnie prowadzono obserwację zwierzęcia przez okres 10 sekund. W tym czasie obserwowano zahamowanie ruchowe u myszy, oszołomienie, utrzymywanie postawy siedzącej na tylnych łapach, automatyczne ruchy przednich łap, drganie nozdrzy oraz ogon Strauba. Objawy te utrzymujące się przez cały okres obserwacji świadczyły o wystąpieniu drgawek psychomotorycznych u myszy (Barton, M. E.; Klein, B. D.; Wolf, H. H.; White, H. S. *Epilepsy Res.* 2001, 47, 217–227; Wojda, E.; Właż, A.; Patsalos, P. N.; Łuszczki, J. J. *Epilepsy Res.* 2009, 86, 163–174).

Przykład 24. Test drgawek wywołanych podskórnym podaniem pentetrazolu (scPTZ)

W teście wywołania drgawek podskórnym podaniem pentetrazolu zwierzęta otrzymywały pentetrazol w dawce 100 mg/kg. Jest to dawka, która powodowała u zwierząt wystąpienie drgawek klonicznych z utratą równowagi i upadkiem. Badane związki podawano 30 minut przed eksperymentem. Po podaniu PTZ zwierzęta umieszczano indywidualnie w przezroczystych pojemnikach i obserwowano przez okres 30 minut. W tym czasie mierzono latencję wystąpienia pierwszego napadu drgawek klonicznych z utratą równowagi oraz notowano ilość napadów drgawkowych podczas testu (Ferreri, G.; Chimirri, A.; Russo, E.; Gitto, R.; Gareri, P.; De Sarro, A.; De Sarro, G. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2004, 77, 85–94).

Przykład 25. Ocena wpływu na koordynację ruchową myszy w teście pręta obrotowego (rotarod)

Wpływ badanych związków na koordynację ruchową, oceniano w teście rotarod (wykorzystano aparat – May Commat, RR 0711 Rota Rod, Turcja). Myszy trenowano dzień przed właściwym eksperymentem. Umieszczano je indywidualnie na pręcie o średnicy 2 cm obracającym się z prędkością 10 obrotów na minutę (rpm). Podczas każdej sesji treningowej zwierzęta pozostawały na pręcie przez 3 minuty. Eksperyment przeprowadzono 30 minut po podaniu związków. Koordynację ruchową badano przy prędkości obracającego się pręta: 10 rpm w czasie 60 sekund. Rejestrowano czas utrzymywania się przez myszy na pręcie (Dunham, N. W.; Miya, T. A.; Edwards, L. D. *J. Am. Pharm. Assoc.* 1957, 46, 64–66).

Przykład 26. Analiza statystyczna

Wartości ED_{50} (dawka efektywna) i TD_{50} (dawka toksyczna) wraz z odpowiadającymi im 95% przedziałami ufności obliczono w oparciu o metodę Litchfield'a i Wilcoxon'a. W celu przeprowadzenia oceny statystycznej wyników, wykorzystano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA oraz test *post hoc* Dunnett'a (test porównań wielokrotnych). Wartość przy poziomie istotności $p < 0,05$ uznawano za istotną statystycznie.

Przykład 27. Wyniki badań w kierunku aktywności przeciwdrgawkowej

Związki według wynalazku (I) wykazały szeroką aktywność przeciwdrgawkową działając skutecznie w teście MES, 6 Hz (32 mA lub/i 44 mA) oraz scPTZ. W punkcie czasowym 30 min. chroniły od 50–100% badanych zwierząt. Najsilniejsze działanie ochronne ujawniły związki zawierające w pozycji 3 pierścienia aromatycznego połączonego z piperazyną elektrono-akceptorowe podstawniki, korzystnie

Cl, CF₃, OCF₃, SCF₃, CHF₂ lub podstawnik fenyłowy. W Tabeli 1 przedstawiono przesiewowe dane farmakologiczne dla wybranych substancji (przykłady 2–20).

Tabela 1. Dane z badań przesiewowych dla wybranych związków wg wzoru ogólnego (I).

Przykład związku	Test*			
	MES	6 Hz (32 mA)	6 Hz (44 mA)	scPTZ
2	4/4	3/4	2/4	3/4
3	4/4	4/4	3/4	3/4
4	3/4	4/4	-	3/4
5	3/4	4/4	2/4	3/4
6	4/4	4/4	4/4	4/4
7	3/4	3/4	-	3/4
8	4/4	3/4	-	4/4
19	4/4	4/4	2/4	4/4
10	4/4	4/4	3/4	2/4
11	3/4	3/4	-	2/4
12	4/4	4/4	3/4	4/4
13	4/4	4/4	4/4	2/4
14	4/4	3/4	-	2/4
15	2/4	3/4	-	3/4
16	3/4	3/4	-	3/4
17	3/4	3/4	-	3/4
18	3/4	3/4	-	3/4
19	3/4	4/4	2/4	3/4
20	4/4	3/4	-	2/4

* Badania przeprowadzone w punkcie czasowym 0,5 h na myszach po podaniu dootrzewnym; MES – test maksymalnego elektrowstrząsu, 6 Hz (32 mA) i 6 Hz (44 mA) – testy drgawek wywołanych prądem o niskim natężeniu odpowiednio 32 mA lub 44 mA, scPTZ – test drgawek indukowanych podskórnym podaniem pentetrazolu. „-” – substancja nie badana.

W Tabeli 2 przedstawiono ilościowe dane farmakologiczne dla wybranego, aktywnego związku – 1-(2-okso-1-fenilo-2-(4-(3-(trifluorometylo)fenylo)piperazyn-1-ylo)etylo)pirolidyno-2,5-dionu (6), który chronił 100% myszy w teście MES, 6 Hz (32 mA i 44 mA) i scPTZ w badaniach przesiewowych (punkt czasowy 0,5 h).

Tabela 2. Wartości parametrów ED₅₀ i TD₅₀ dla związku 6 i kwasu walproinowego (VPA) po dootrzewnowym podaniu myszom

Test ^a	Parametry ED ₅₀ i TD ₅₀		PI (TD ₅₀ /ED ₅₀) ^b
	Związek 6	VPA	
MES	23,7 (18,4–31,2)	252,7 (220,1–290,2)	8,2 (6) 1,7 (VPA)
6 Hz (32 mA)	22,4 (17,4–28,8)	130,6 (117,6–145,2)	8,7 (6) 3,3 (VPA)
6 Hz (44 mA)	73,2 (57,4–93,4)	183,1 (143,5–233,7)	2,7 (6) 2,3 (VPA)
scPTZ	59,4 (37,5–94,1)	239,4 (209,2–274,1)	3,3 (6) 1,8 (VPA)
Test rotarod	195,7 (132,7–288,6)	430,7 (407,9–454,9)	

^a Zw. 6 i kwas walproinowy (VPA) badano 0,5 h po podaniu dootrzewnowym; MES – test maksymalnego elektrowstrząsy, 6 Hz (32 mA) i 6 Hz (44 mA) – testy drgawek wywołanych prądem o niskim natężeniu odpowiednio 32 mA i 44 mA, scPTZ – test drgawek indukowanych podskórnym podaniem pentetrazolu, test rotarod – test obracającego się pręta; ^b PI – indeks ochronny (TD₅₀/ED₅₀).

Otrzymane wyniki potwierdziły, iż związek 6 posiadał silniejsze działanie ochronne oraz korzystniejsze indeksy ochronne w porównaniu do szeroko-zakresowego, modelowego leku przeciwpadaczkowego – kwasu walproinowego.

Przykład 28. Oznaczenie aktywności antynocyceptywnej w badaniach *in vivo* na myszach

Badania zostały przeprowadzone na osobnikach męskich myszy białych typu Swiss (CD-1) o wadze 18–25 g. Wszystkie procedury wykonano zgodnie z obowiązującymi polskimi i międzynarodowymi wytycznymi dotyczącymi etyki badań na zwierzętach, po uzyskaniu stosownej zgody instytucjonalnej. Grupa badana składała się z 8–10 zwierząt. Substancje badane i referencyjne podawane były 30 minut przed danym testem w formie wstrzyknięć dootrzewnowych jako zawiesiny w 1% wodnym roztworze Tweenu. Wszystkie testy/modele zostały przeprowadzone w oparciu o procedury opisane w literaturze specjalistycznej: test formalinowy (Beirith, A.; Santos, A. R.; Calixto, J. B.; Rodrigues, A. L.; Creczynski-Pasa, T. B. *Eur. J. Pharmacol.* 1998, 345, 233–245), model bólu wywołanego kapsaicyną (Mogilski, S.; Kubacka, M.; Redzicka, A.; Kazek, G.; Dudek, M.; Malinka, W.; Filipek, B. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2015, 133, 99–110), modelu bólu neuropatycznego indukowanego oksaliplatyną – test von Frey'a (Sałat, K.; Cios, A.; Wyska, E.; Sałat, R.; Mogilski, S.; Filipek, B.; Więckowski, K.; Malawska, B. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2014, 122, 173–181).

Przykład 29. Oznaczenie aktywności przeciwbólowej w teście formalinowym

Ból indukowano czynnikiem chemicznym wstrzykując myszom podpowięziowo 2,5% roztwór formaliny w stałej objętości 20 µl. Zwierzęta umieszczano w oddzielnych, przezroczystych komorach obserwacyjnych na okres 30 minut. Wartością mierzoną był całkowity czas lizania i gryzienia łapy, do której podano roztwór formaliny. Czas reakcji nocyceptywnej liczono przez pierwsze 5 minut od wstrzyknięcia formaliny (I faza testu – ból ostry) oraz w przedziałach czasowych 15–20, 20–25 i 25–30 minut od momentu jej podania (II faza testu – ból zapalny). Obserwowane hamowanie reakcji nocyceptywnej – skrócenie czasu lizania i gryzienia łapy, interpretowano jako efekt analgetyczny badanego związku. Badane związki podawano drogą dootrzewnową. Na podstawie uzyskanych wyników obliczono dawkę

ED₅₀(dawka powodująca skrócenie czasu reakcji nocyceptywnej o 50%). Związkiem odniesienia w teście był kwas walproinowy, który podawano dootrzewnowo w dawkach 100 mg/kg, 150 mg/kg oraz 200 mg/kg. Związek 6 podawano w dawkach 10 mg/kg, 20 mg/kg oraz 30 mg/kg.

Związek 6 wykazał wyraźną aktywność przeciwbólową w obu fazach testu. Średni czas reakcji nocyceptywnej w grupie kontrolnej wynosił $90,0 \pm 4,97$ sekund i $212,70 \pm 10,16$ sekund, odpowiednio w pierwszej i drugiej fazie testu. Związek 6 we wszystkich badanych dawkach zmniejszał czas reakcji nocyceptywnej w I fazie testu formalinowego, odpowiadającej bólowi ostremu przy czym efekt statystycznie zaobserwowano dla dwóch najwyższych dawek. Wartość ED₅₀ dla związku 6 w pierwszej fazie testu wyniosła 28,50 mg/kg. W przypadku drugiej fazy testu odpowiadającej tonicznemu bólowi zapalnemu związek 6 we wszystkich zastosowanych dawkach w sposób znamieny statystycznie skracał czas reakcji nocyceptywnej. Wartość ED₅₀ w drugiej fazie testu dla tego związku wyniosła 12,40 mg/kg (Fig. 3).

Kwas walproinowy (VPA) nie wykazywał aktywności przeciwbólowej w pierwszej fazie testu w żadnej z badanych dawek. W drugiej fazie testu VPA skracał czas reakcji nocyceptywnej we wszystkich zastosowanych dawkach, a wartość ED₅₀ w tej fazie testu wyniosła 132,90 mg/kg (Fig. 3).

Przykład 30. Oznaczenie aktywności przeciwbólowej w kapsaicynowym modelu bólu (Fig. 4)

W teście tym oceniano czas lizania i/lub gryzienia tylnej łapy, do której myszom wstrzykiwano podpowięziowo kapsaicynę w ilości 1,6 µg, w stałej objętości 20 µl. Obserwację prowadzono przez 5 minut od podania kapsaicyny. Związki badane podawano dootrzewnowo 30 minut przed podaniem kapsaicyny. Hamowanie reakcji nocyceptywnej – skrócenie czasu lizania i gryzienia łapy, stanowiło miarę aktywności antynocyceptywnej badanego związku.

Związkiem odniesienia w teście był kwas walproinowy, który podawano dootrzewnowo w dawkach 100 mg/kg, 150 mg/kg i 200 mg/kg. Związek 6 podawano w dawkach 20 mg/kg, 30 mg/kg oraz 40 mg/kg. Badane związki podawano w postaci zawiesiny w 1,0% roztworze Tween 80. Grupę kontrolną stanowiły myszy, którym podano sam nośnik (1% roztwór Tweenu 80). Czas reakcji nocyceptywnej w tej grupie wynosił $43,29 \pm 3,21$ sekund.

Związek 6 w sposób znamieny statystycznie obniżał czas reakcji nocyceptywnej w dawkach 20 mg/kg i 30 mg/kg, a wartość ED₅₀ wyniosła dla niego 17,9 mg/kg.

Związek odniesienia (kwas walproinowy) w sposób znamieny statystycznie obniżał czas reakcji nocyceptywnej do wartości $25,00 \pm 4,57$ sekund (co odpowiada aktywności analgetycznej o wysokości 42,25%), jedynie po podaniu dawki 200 mg/kg.

Przykład 31. Oznaczenie aktywności przeciwbólowej w modelu bólu neuropatycznego indukowanego oksaliplatyną – test von Frey'a

Oksaliplatynę (OXPT) rozpuszczono w 5% roztworze glukozy, a następnie podano myszom dootrzewnowo. Zastosowano jedнокrotną dawkę 10 mg/kg. Zaburzenia czucia o charakterze alldyni dotykowej i termicznej na niską temperaturę towarzyszące neuropatii indukowanej oksaliplatyną charakteryzuje się występowaniem dwóch faz. Faza wczesna ma charakter ostry i rozwija się wkrótce po podaniu cytostatyku, natomiast objawy fazy później (związanej z uszkodzeniem neuronów) – chronicznej, rozwijają się po upływie kilku dni. Testy behawioralne na myszach z neuropatią indukowaną OXPT były prowadzone po 7 dniach od jego podania, czyli w fazie późnej neuropatii.

Oznaczano wpływ badanych związków na alldynię dotykową w teście von Frey'a. Zwierzęta umieszczano pojedynczo w klatkach z siatkowanym dnem, już na 60 minut przed rozpoczęciem eksperymentu w celu adaptacji do nowego otoczenia. Do oceny progu bólu na bodźce mechaniczne użyto elektroniczny aparat von Frey'a (Electronic Fov Frey, Bioseb, Francja). Tzw. włókno von Frey'a przykładano do spodniej powierzchni prawej łapy myszy z narastającą siłą nacisku. Nocyceptywna odpowiedź zwierzęcia w postaci cofnięcia łapy powodowała automatyczną rejestrację wartości siły, która tą reakcję wywołała. Pomiar wykonywano 3-krotnie u każdej myszy, z przynajmniej 30-sekundowym odstępem czasowym pomiędzy kolejnymi pomiarami, następnie otrzymane wyniki uśredniono. Całość badania wykonywano 3-krotnie: przed podaniem OXPT w celu ustalenia wyjściowego progu reakcji bólowej; po 7 dniach od podania OXPT, a przed podaniem badanych związków celem oceny rozwijającej się neuropatii poprzez ustalenie nowego progu bólowego; po 30 minutach od podania związków celem oznaczenia i wpływu na powstałą neuropatię.

Wpływ badanego związku na alldynię termiczną oceniono w teście zimnej płytki (Cold Plate) z wykorzystaniem specjalistycznego sprzętu (Cold/Hot Plate; Bioseb, Francja). Zwierzęta umiesz-

czano pojedynczo na metalowej płytce chłodzonej do temperatury 2°C z zastosowaniem wmontowanego do urządzenia termostatu. Obserwowano reakcje nocycyptywne zwierząt, za które uznano lizanie i/lub charakterystyczne unoszenie tylnych łap lub podskok. Maksymalny czas obserwacji ustalono na 60 s aby wyeliminować potencjalne ryzyko uszkodzenia tkanek oraz zminimalizować dyskomfort zwierząt. Podobnie jak w przypadku testu Von Frey'a, pomiar wykonywano 3-krotnie. Badany związek 6 oraz kwas walproinowy jako związek odniesienia podawano dootrzewnowo w postaci zawiesiny w 1% roztworu Tweenu 80. Związek 6 podawano w dawkach 10, 20 i 30 mg/kg. Związek odniesienia (kwas walproinowy) podano w dawkach 50, 100 i 150 mg/kg.

Podanie OXPT u myszy doprowadziło do rozwoju neuropatii, czego skutkiem było znaczące, znamienne statystycznie obniżenie progu bólowego mierzonego metodą von Freya. Próg wrażliwości bólowej uległ zmniejszeniu z poziomu $3,18 \pm 0,06$ – $3,36 \pm 0,10$ g u zdrowych myszy do poziomu mieszczącego się w zakresie $1,89 \pm 0,04$ – $1,94 \pm 0,14$ g u myszy, którym podano OXPT. Otrzymane wyniki wskazują na istotne statystycznie działanie analgetyczne badanego związku 6. Średni próg wrażliwości bólowej w grupie kontrolnej wynosił $3,36 \pm 0,10$ g, natomiast po podaniu OXPT zmniejszył się do $1,89 \pm 0,04$ g (56,25% wartości wyjściowej). Podanie związku 6 w dawce 10 mg/kg spowodowało wzrost progu bólowego do $2,87 \pm 0,12$ g (85,41% wartości wyjściowej), co świadczy o wpływie hamującym na rozwój allodyni mechanicznej już w niskich dawkach. Dawka 20 mg/kg prowadziła do wzrostu progu wrażliwości bólowej do $3,83 \pm 0,13$ g, co stanowi 113,98% wartości wyjściowej. Dawka 30 mg/kg skutkowała wzrostem progu bólowego do $4,17 \pm 0,17$ g, co stanowi 124,10% wartości wyjściowej. Uzyskane wyniki wskazują, że związek 6 jest wysoce skuteczny w znoszeniu allodyni mechanicznej rozwijającej się na skutek uszkodzenia układu nerwowego przez chemioterapeutyk jakim jest OXPT (Fig. 5A).

Średni próg wrażliwości bólowej w grupie kontrolnej dla związku odniesienia (VPA) wynosił $2,62 \pm 0,06$ g, a po podaniu OXPT zmniejszył się do $1,78 \pm 0,04$ g. Podanie VPA w dawce 150 mg/kg spowodowało wzrost progu bólowego do $3,97 \pm 0,30$ g, podczas gdy dawki 100 mg/kg oraz 50 mg/kg masy ciała pozwoliły na uzyskanie wzrostu średniego progu bólowego do odpowiednio $3,18 \pm 0,14$ g oraz $2,75 \pm 0,06$ g (Fig. 5B).

Związek 6 podnosił również istotnie wrażliwość na allodynię termiczną w teście zimnej płytki (Fig. 5C).

Przykład 32. Badania *in vitro* powinowactwa i funkcji

Przeprowadzone badania powinowactwa i testy funkcjonalne w warunkach *in vitro* dla najaktywniejszej substancji 6, reprezentujących związki wg wzoru (I) pokazały, iż ich mechanizm działania związany jest z wpływem na przewodnictwo neuronalne poprzez oddziaływanie z napięciowo-zależnymi kanałami sodowymi (miejsce 2) i kanałami wapniowymi (miejsca wiązania dla dihydropirydyny, diltiazemu i werapamilu). Unikalną cechą 6 reprezentującego związku wg wzoru (I) wynalazku, nieopisaną dotychczas dla leków przeciwpadaczkowych, jest hamowanie prądów wapniowych poprzez blokowanie receptora wanilidowego przejściowego potencjału typu 1 (TRPV1). Zaangażowanie receptora TRPV1 decydując może o działaniu antynocycyptywnym związków wg wynalazku. Udział receptora TRPV1 w przewodzeniu bodźców bólowych został dobrze udokumentowany w piśmiennictwie specjalistycznym (Szallasi, A.; Cortright, D.N.; Blum, C.A.; Eid, S.R. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2007, 6, 357–372). Związki wg wynalazku, charakteryzują się złożonym mechanizmem działania i nie opisanym do tej pory dla substancji przeciwdrgawkowych. Należy jednak podkreślić, iż dalsze badania *in vitro* ujawnić mogą kolejne cele molekularne odpowiedzialne za działanie farmakologiczne substancji będących przedmiotem niniejszego zastrzeżenia. Wyniki badań wiązania (kanał sodowy, kanał wapniowy) oraz testów funkcjonalnych (receptor TRPV1) dla związku 6 przedstawiono w Tabeli 3.

Tabela 3. Wyniki badań *in vitro* powinowactwa/testów funkcjonalnych dla związku 6

Badania powinowactwa	Materiał	% Hamowania wiązania specyficznego kontroli (badane stężenie [μ M]) ^g
Kanał Na ⁺ (miejsce 2) ^a	Kora mózgowa szczura	82,5 (100) 33,4 (10)
Kanał Ca ²⁺ typ L (miejsce dihydropirydynowe) ^b	Kora mózgowa szczura	82,3 (100) 30,8 (10)
Kanał Ca ²⁺ typ L (miejsce diltiazemu) ^c	Kora mózgowa szczura	69,6 (100)
Kanał Ca ²⁺ typ L (miejsce werapamilu) ^d	Kora mózgowa szczura	58,2 (100)
Kanał potasowy (hERG) ^e	Ludzkie rekombinowane komórki (HEK-293)	25,8 (100)
Badania funkcjonalne		% Hamowania odpowiedzi agonistycznej kontroli (badane stężenie [μ M]) ^a
Receptor TRPV1 (VR1) (h) (efekt antagonistyczny) ^f	Ludzkie rekombinowane komórki (CHO)	71,7 (100)

* Badania zostały przeprowadzone w laboratoriach CEREP (Francja) zgodnie z procedurami opisanymi w literaturze: ^a Brown, G. B. *J. Neurosci.* 1986, 6, 2064–2070; ^b Gould, R. J.; Murphy, K. M.; Snyder, S. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1982, 79, 3656–3660; ^c Schoemaker, H.; Langer, S.Z. *Eur. J. Pharmacol.* 1985, 111, 273–277; ^d Reynolds, I. J.; Snowman, A. M.; Snyder, S. H. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1986, 237, 731–738; ^e Huang, X. P.; Mangano, T.; Hufeisen, S.; Setola, V.; Roth, B. L. *Assay Drug Dev. Technol.* 2010, 8, 727–742; ^f Phelps, P. T.; Anthes, J.C.; Correll, C.C. *Eur. J. Pharmacol.* 2005, 513, 57–66; ^g % hamownia > 50% uważany jest za istotny efekt wywierany przez związek.

Przykład 33. Badania elektrofizjologiczne *in vitro*

Eksperymenty przeprowadzono zgodnie z instytucjonalnymi i międzynarodowymi wytycznymi dotyczącymi etyki badań na zwierzętach. Szczury (wiek 3 tygodnie) znieczulono chlorkiem etylu i dekapitowano. Następnie mózgowie wyjęto i umieszczano w zmrożonym płynie zewnątrzkomórkowym. Metodyka przygotowywania skrawków i ich preinkubacji została opisana wcześniej (Szulczyk, B.; Nurowska, E. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2017, 491, 291–295). Części skrawków zawierające korę przedczołową były rozpraszane enzymatycznie i mechanicznie. Pojedyncze neurony piramidowe kory przedczołowej uwidaczniano przy pomocy mikroskopu odwróconego (Nikon). Prądy sodowe były wywoływane przy pomocy prostokątnych bodźców depolaryzujących. Potencjał między bodźcami depolaryzującymi był utrzymywany na poziomie -65 mV.

Płyn wewnątrzkomórkowy w pipiecie zawierał (w mM): CsF (110), NaCl (7), EGTA (3), HEPES-Cl (10), MgCl₂ (2), Na₂ATP (4), (pH 7,4 i osmolarność 290 mOsm).

Płyn zewnątrzkomórkowy omywający neurony zawierał (w mM): NaCl (30), chlorek choliny (90), TEA-Cl (30), CaCl₂ (2), MgCl₂ (2), glukoza (15), HEPES (10), LaCl₃ (0.001) i CdCl₂ (0.4), (pH 7,4). Prądy były rejestrowane przy pomocy wzmacniacza Axopatch 1D i analizowane przy użyciu oprogramowania pClamp (Axon Instruments and Molecular Devices, USA). Oporność pipet wynosiła pomiędzy

4 a 5 MΩ. Po utworzeniu tzw. gigaseala, pojemność ładowania kondensatora pipety była kompensowana przy pomocy wzmacniacza.

Błona pod pipetą była przerywana przy zastosowaniu podciśnienia, a następnie pojemność ładowania kondensatora błony komórkowej była kompensowana. Opór dostępu wahał się pomiędzy 5 a 7 MΩ. Stosowano kompensację oporu szeregowego wynoszącą 80%. Od rejestrowanych prądów odejmowano prąd upływu. Rejestracje prowadzono w temperaturze pokojowej. Potencjałozależne prądy potasowe były blokowane przez TEA-Cl w płynie zewnątrzkomórkowym. Potencjałozależne prądy wapniowe były blokowane przez jony kadmu i lantanu w płynie zewnątrzkomórkowym. Potencjał neuronu utrzymywano na poziomie -65 mV. Substancję 6 podawano od strony zewnątrzkomórkowej.

Otrzymane wyniki potwierdziły inhibicyjny wpływ związku 6 na szybko aktywujące się, potencjałozależne kanały sodowe w neuronach piramidowych kory przedczołowej (badania wykonano w stężeniu 100 μM). Maksymalne prądy były wywoływane przy pomocy prostokątnych bodźców depolaryzujących trwających 20 msec. Potencjał między bodźcami depolaryzującymi utrzymywano na poziomie -65 mV. Rejestracje kontrolne prowadzono przez 2 minuty, badaną substancję podawano przez 3 minuty a prądy po odpłukaniu substancji rejestrowano przez 5 minut. Rejestrowane prądy normalizowano do wartości prądów kontrolnych. Substancja 6 blokowała maksymalną amplitudę prądów sodowych do 0,59±0,08 w porównaniu do kontroli (1.0, p< 0,001). Po odpłukaniu amplituda prądów częściowo wracała do wartości kontrolnych (0,79±0,07, n=5). Przykładowe rejestracje prądów sodowych oraz uśrednione wyniki przedstawiono na Fig. 6.

Przykład 34. Ocena parametrów ADMETox w badaniach *in vitro*

Parametry ADME-Tox związku 6 oszacowane zostały metodami *in vitro* przy zastosowaniu rekombinowanych enzymów, ludzkich i mysich mikrosomów wątrobowych oraz eukariotycznych linii komórkowych.

Stabilność metaboliczna. Stabilność metaboliczną związku 6 oszacowano za pomocą ludzkich (HLMs) mikrosomów wątrobowych. Wartości klirensu wewnętrznego CL_{int} zostały obliczone dzięki monitorowaniu zmian stężenia związku w obecności mikrosomów w jednostce czasu, wg procedury zaproponowanej przez Obach R.S (Obach, R. S. *Drug Metab. Dispos.* 1999, 27, 1350–1359). Na podstawie otrzymanych danych stwierdzono niezwykle niską wartość klirensu związku 6 po inkubacji z HLMs, wynoszącą $CL_{int} = 5,8$ ml/min/kg, świadczącą o jego przewidywanej wysokiej stabilności w organizmie ludzkim.

Badania stabilności metabolicznej – metodyka. Badania stabilności metabolicznej 6 wykonano przy użyciu HLMs (Promega, Madison, WI, USA). W tym celu 10 μl zw. 6 o stężeniu 100 μM rozcieńczono 132 μl buforem tris-HCl (100 mM, pH 7,4), a następnie dodano 8 μl odpowiednich mikrosomów. Mieszaninę reakcyjną poddano preinkubacji w temperaturze 37°C przez 5 minut, a następnie dodano 50 μl NADPH Regeneration System, dostarczonego przez firmę Promega (Madison, WI, USA). Po wymieszaniu, całość inkubowano w temperaturze 37°C przez 120 minut. Aby zakończyć reakcję, do próbek dodano po 200 μl zimnego metanolu i odwirowano. Supernatant poddano analizie UPLC/MS, w tym analizie fragmentacyjnej. Celem wyznaczenia klirensu wewnętrznego CL_{int} przygotowano cztery mieszaniny związku 6 z HLMs. Każda z tych reakcji była zakończona w różnym punkcie czasowym, po 5, 15, 30 oraz 45 min, przez dodanie zimnego metanolu zawierającego 50 μM standardu wewnętrznego. Następnie, zgodnie z wytycznymi literaturowymi (Obach, R. S. *Drug Metab. Dispos.* 1999, 27, 1350-1359), na podstawie wykresu zależności stosunku wysokości pików pochodzącego od 6 do wysokości pików standardu wewnętrznego, wyznaczono równanie regresji i obliczono stałą szybkości reakcji k . Następnie stałą k podstawiono do równania (1).

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{-k} \quad (1)$$

Obliczoną wartość $t_{1/2}$ podstawiono następnie do równania (2):

$$CL_{int} \text{ (ludzki) } = \frac{0.693}{in\ vitro\ t_{1/2}} \times \frac{ml\ mieszaniny}{mg\ mikros.} \times \frac{45\ mg\ mikros.}{g\ wątroby} \times \frac{20g\ wątroby}{kg\ b.w.} \quad (2)$$

Wpływ na aktywność Pgp. Glikoproteina-P (Pgp) to integralne białko błony plazmatycznej, które jako zależna od ATP pompa przynosi aktywnie usuwa ksenobiotyki i może być przyczyną interakcji międzylekowych. Pgp odgrywa ważną rolę w absorpcji leków w przewodzie pokarmowym a także poprzez

barierę krew-mózg. Do badania wpływu związku 6 na aktywność Pgp zastosowano komercyjny, bioluminescencyjny test Pgp-Glo™ Assay System (Promega, Madison, WI, USA). Działanie testu opiera się na pomiarze zmian w poziomie ATP, konsumowanego przez membrany zawierające rekombinowane białko Pgp w obecności badanych związków. Wyniki zostały przedstawione jako % aktywności bazowej i porównane do związków referencyjnych: selektywnego inhibitora Pgp Na_3VO_4 oraz stymulatora werapamilu. Związek 6 wykazał istotny statystycznie ($p < 0.01$) efekt hamujący działanie Pgp do wartości 38% aktywności bazowej w stężeniu $100 \mu\text{M}$, natomiast odnotowano brak efektu na aktywność Pgp w stężeniu $50 \mu\text{M}$ (Fig. 7).

Wpływ na aktywność Pgp – metodyka. Badania wykonano według dostarczonego przez producenta protokołu bioluminescencyjnego testu Pgp-Glo™ Assay System firmy Promega (Madison, WI, USA). Reakcje enzymatyczne prowadzono w białych płytkach 96-dołkowych Nunc™ MicroWell™ 96-well firmy Thermo Scientific (Waltham, MA, USA). Bioluminescencja mierzona była wielofunkcyjnym czynnikiem płytek EnSpire firmy PerkinElmer (Waltham, MA, USA). Po zastosowaniu inhibitora Pgp Na_3VO_4 (wywołuje 100% inhibicji), nastąpił wzrost sygnału w stosunku do próbki kontrolnej, świadczący o zahamowaniu konsumpcji ATP przez Pgp, tzw. aktywności bazowej. Wyliczona różnica pomiędzy wartościami luminescencji próbki traktowanej inhibitorem i próbki kontrolnej została przyjęta jako 100% aktywności bazowej Pgp i potraktowana w teście jako kontrola negatywna. Związki referencyjne Na_3VO_4 oraz werapamil użyto odpowiednio w stężeniach $100 \mu\text{M}$ i $200 \mu\text{M}$, wg zaleceń producenta. Związek 6 był badany w stężeniach 50 oraz $100 \mu\text{M}$, otrzymanych po rozcieńczeniu w buforze reakcyjnym stężonego roztworu wyjściowego (10mM) w DMSO. Inkubację związków z membranami zawierającymi Pgp prowadzono przez 40 minut w temperaturze 37°C , następnie wykonywano pomiar bioluminescencji celem określenia stopnia konsumpcji ATP przez Pgp. Istotność statystyczną obliczono jednoczynnikową analizą wariancji ANOVA oraz metodą Bonferroniego przy użyciu oprogramowania GraphPad Prism 5. Związki były testowane w tryplikatach.

Wpływ na aktywność izoform CYP3A4 i CYP2D6 cytochromu P-450. Badania zostały przeprowadzone wykorzystując komercyjne testy luminescencyjne CYP3A4 P450-Glo™ oraz CYP2D6 P450-Glo™ firmy Promega (Madison, WI, USA) w oparciu o metodykę opisaną w literaturze (Socala, K.; Mogilski, S.; Pieróg, M.; Nieoczym, D.; Abram, M.; Szulczyk, B.; Lubelska, A.; Latacz, G.; Doboszewska, U.; Wlaź, P.; Kamiński, K. *ACS Chem. Neurosci.* 2018, doi: 10.1021/acchemneuro.8b00476; Latacz, G.; Lubelska, A.; Jastrzębska-Więsek, M.; Partyka, A.; Sobiło, A.; Olejarz, A.; Kucwaj-Brysz, K.; Satała, G.; Bojarski, A. J.; Wesołowska, A.; Kieć-Kononowicz, K.; Handzlik, J. *Chem. Biol. Drug. Des.* 2017, 90, 1295–1306). Wybrane do badań izoformy CYP odpowiadają za metabolizm około 40–50% dostępnych na rynku leków, a ich pobudzenie lub hamowanie decyduje o większości metabolicznych interakcji lekowych. Otrzymane wyniki wskazują na brak wpływu związku 6 na aktywność CYP3A4 (Fig. 8A) i bardzo słaby wpływ stymulujący na CYP2D6 (Fig. 8B) w wysokim stężeniu $100 \mu\text{M}$. Podsumowując, otrzymane wyniki wskazują na niskie prawdopodobieństwo potencjalnych metabolicznych interakcji wywołanych przez 6.

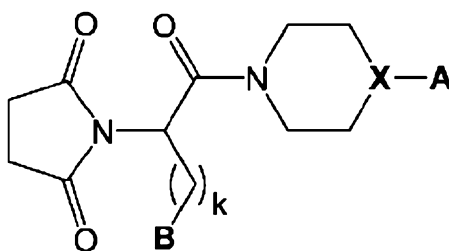
Ocena hepatotoksyczności in vitro. Badania zostały przeprowadzone przy użyciu linii komórkowej nowotworu wątroby *hepatoma* HepG2, która wykorzystywana jest do oceny hepatotoksyczności substancji w warunkach *in vitro*. Do zbadania wpływu 6 na żywotność i proliferację komórek HepG2 zastosowano klasyczny kolorymetryczny test MTS firmy Promega (Madison, WI, USA). Związek był testowany w czterech stężeniach w zakresie ($0,1$ – $100 \mu\text{M}$). Dokсорubicyna w stężeniu $1 \mu\text{M}$ została użyta jako referencyjny cytostatyk. Dodatkowo, zastosowano również referencyjną toksynę mitochondrialną – karbonylocyjanek *m*-chlorofenylohydrazonu (CCCP) w stężeniu $10 \mu\text{M}$ (Fig. 9). Badania hepatotoksyczności po 72 h inkubacji linii HepG2 ze związkiem 6 wykazały istotnie statystycznie ($p < 0,05$) obniżenie żywotności komórek jedynie dla najwyższego użytego w badaniu stężenia związku $100 \mu\text{M}$ (Fig. 9). Ponadto, żywotność komórek została obniżona do zaledwie 84% kontroli, wskazując na śladowy toksyczny wpływ tego związku na komórki linii HepG2. Ze względu na szczególne narażenie komórek wątroby na potencjalne toksyczne działanie ksenobiotyku, z udziałem linii HepG2 przeprowadzono dodatkowy test, w postaci luminescencyjnego pomiaru poziomu ATP w komórkach, po krótkiej, 3-godzinnej ekspozycji na związek 6, w stężeniach w zakresie 1 – $100 \mu\text{M}$. W tym celu zastosowano komercyjny test CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay firmy Promega (Madison, WI, USA). Celem badania było sprawdzenie wpływu związku na oddychanie mitochondrialne komórek *hepatoma*. Punktem odniesienia była referencyjna toksyna mitochondrialna CCCP w stężeniu $10 \mu\text{M}$. Wykazano brak istotnie statystycznego wpływu związku 6 na poziom ATP w komórkach HepG2, nawet w najwyższym użytym stężeniu $100 \mu\text{M}$. Wskazuje to na bardzo niewielkie ryzyko efektu hepatotoksycznego związku 6 (Fig. 10).

Ocena hepatotoksyczności *in vitro* – metodyka. Do badań użyto linii komórkowej *hepatoma* HepG2 (ATCC HB-8065). Linię HepG2 inkubowano w medium hodowlanym "Modified Eagle's Medium" (MEM) z dodatkiem 2 mM glutaminy oraz 10% FBS firmy Gibco (Carlsbad, CA, USA). Komórki inkubowano w temperaturze 37°C w atmosferze zawierającej 5% CO₂. Do badania żywotności komórek zastosowano CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (MTS) dostarczony przez firmę Promega (Madison, WI, USA). Przed przystąpieniem do testu komórki wysiewano na transparentne 96-dołkowe płytki hodowlane Nunc™ firmy Thermo Scientific (Waltham, MA, USA) w stężeniu 1,5 x 10⁴ komórek na dołek i inkubowano przez 24 h. Następnie 10 mM roztwór wyjściowy związku 6 był rozcieńczany w odpowiednim medium hodowlanym i dodawany do komórek w stężeniach końcowych w zakresie 0,1–100 μM (stężenie DMSO we wszystkich dołkach wynosiło 1%). Związki referencyjne CCCP oraz DX były nakładane w finalnych stężeniach odpowiednio 10 μM i 1 μM. Po 72 h inkubacji w temperaturze 37°C w atmosferze zawierającej 5% CO₂ medium ze związkiem usuwano, a następnie dodawano świeżą pożywkę z rozcieńczonym odczynnikiem MTS. Płytki ponownie inkubowano przez 2–3 godziny, a następnie prowadzono pomiar absorbancji przy długości fali 490 nm czytnikiem EnSpire. Istotność statystyczną obliczono jednoczynnikową analizą wariancji ANOVA oraz metodą Bonferroniego. Związki testowane były w czterech powtórzeniach.

Do badania poziomu ATP w komórkach HepG2 zastosowano CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay firmy Promega (Madison, WI, USA). Przed przystąpieniem do testu, komórki wysiewano na białe, 96-dołkowe płytki hodowlane z transparentnym dnem, przystosowane do pomiaru luminescencji firmy Corning, (Tewksbury, MA, USA) w stężeniu 1,5 x 10⁴ komórek na dołek. Następnie, komórki inkubowano w temperaturze 37°C w atmosferze zawierającej 5% CO₂. Związek 6 nałożono na płytkę w trzech stężeniach finalnych 1, 10 i 100 μM, CCCP w stężeniu 10 μM oraz DX w stężeniu 1 μM oraz ilości 100 μl. Płytkę inkubowano przez 3 h w temperaturze 37°C i atmosferze 5% CO₂. Pomiar luminescencji prowadzono czytnikiem EnSpire po dodaniu do hodowli odczynnika CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay w ilości 100 μl. Istotność statystyczną obliczono jednoczynnikową analizą wariancji ANOVA oraz metodą Bonferroniego przy użyciu oprogramowania GraphPad Prism 5. Wszystkie substancje były testowane w czterech powtórzeniach.

Zastrzeżenia patentowe

1. Związek o wzorze ogólnym (I) albo jego farmaceutycznie akceptowalne sole



(I)

w którym:

X – oznacza N lub C,

k – jest liczbą równą 0

A oznacza podstawnik wybrany z grupy zawierającej:

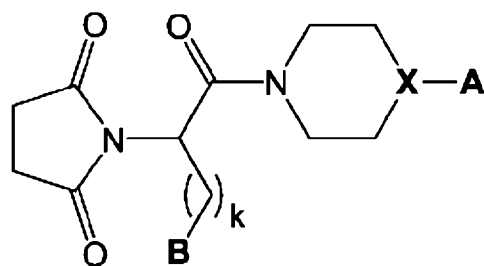
- podstawnik fenyłowy;
- podstawnik fenyłowy podstawiony jednym albo dwoma podstawnikami bocznymi wybranymi z grupy zawierającej: atomy fluorowców, -SCF₃, -CF₃, -CHF₂, -OCF₃, -CH₃;
- podstawnik bifenyłowy;
- podstawnik 2-naftalenyłowy;
- podstawnik 5-benzotiofenyłowy;
- podstawnik 5-benzoksazolowy;

B oznacza:

- podstawnik fenyłowy;
- podstawnik fenyłowy podstawiony jednym atomem fluoru.

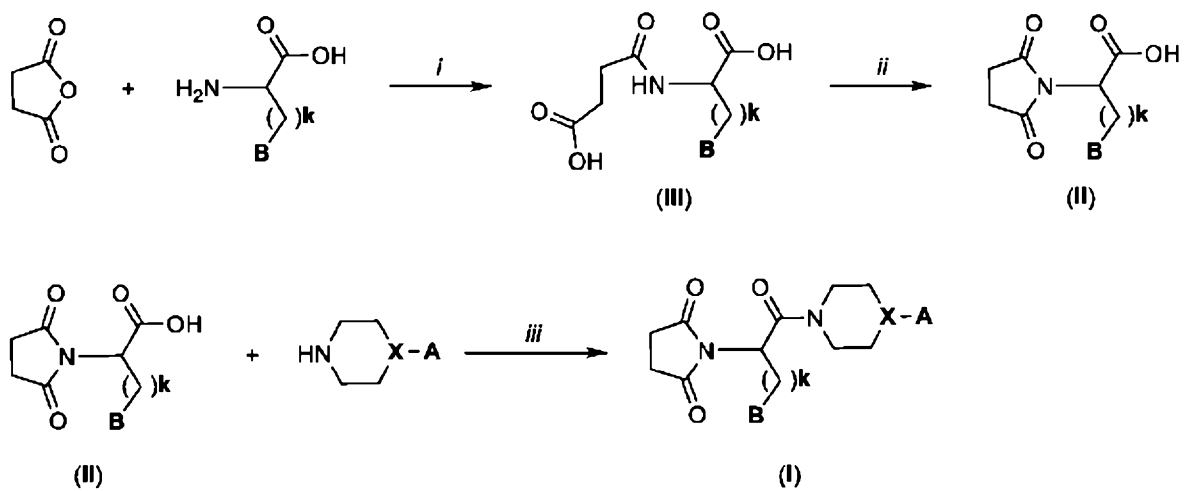
2. Związek według zastrz. 1, **znamienny tym**, że atom fluorowca stanowi atom fluoru albo chloru, korzystnie atom chloru
3. Związek według dowolnego z poprzedzających, **znamienny tym**, że jest wybrany z grupy zawierającej:
 - 1-(2-okso-1-fenylo-2-(4-fenylo-piperazyn-1-ylo)etylo)pirolidyno-2,5-dion,
 - 1-(2-(4-(3-chlorofenylo)piperazyn-1-ylo)-2-okso-1-fenyloetylo)pirolidyno-2,5-dion,
 - 1-(2-(4-(3,5-dichlorofenylo)piperazyn-1-ylo)-2-okso-1-fenyloetylo)pirolidyno-2,5-dion,
 - 1-(2-okso-1-fenylo-2-(4-(*m*-tolilo)piperazyn-1-ylo)etylo)pirolidyno-2,5-dion,
 - 1-(2-okso-1-fenylo-2-(4-(3-(trifluorometylo)fenylo)piperazyn-1-ylo)etylo)pirolidyno-2,5-dion,
 - 1-(2-okso-1-fenylo-2-(4-(4-(trifluorometylo)fenylo)piperazyn-1-ylo)etylo)pirolidyno-2,5-dion,
 - 1-(2-(4-(3,5-bis(trifluorometylo)fenylo)piperazyn-1-ylo)-2-okso-1-fenyloetylo)pirolidyno-2,5-dion,
 - 1-(2-okso-1-fenylo-2-(4-(3-(difluorometylo)fenylo)piperazyn-1-ylo)etylo)pirolidyno-2,5-dion,
 - 1-(2-okso-1-fenylo-2-(4-(3-(trifluorometoksy)fenylo)piperazyn-1-ylo)etylo)pirolidyno-2,5-dion,
 - 1-(2-okso-1-fenylo-2-(4-(4-(trifluorometoksy)fenylo)piperazyn-1-ylo)etylo)pirolidyno-2,5-dion,
 - 1-(2-okso-1-fenylo-2-(4-(3-(trifluorometylo(sulfanylo)fenylo)piperazyn-1-ylo)etylo)pirolidyno-2,5-dion,
 - 1-(2-(4-([1,1'-bifenylo]-3-ylo)piperazyn-1-ylo)-2-okso-1-fenyloetylo)pirolidyno-2,5-dion,
 - 1-(1-(4-fluorofenylo)-2-okso-2-(4-(3-(trifluorometylo)fenylo)piperazyn-1-ylo)etylo)pirolidyno-2,5-dion,
 - 1-(2-(4-(naftalen-2-ylo)piperazyn-1-ylo)-2-okso-1-fenyloetylo)pirolidyno-2,5-dion,
 - 1-(2-(4-(benzo[b]tiofen-5-ylo)piperazyn-1-ylo)-2-okso-1-fenyloetylo)pirolidyno-2,5-dion,
 - 1-(2-(4-(1,2-benzoksazol-5-ilo)piperazyn-1-ylo)-2-okso-1-fenyloetylo)pirolidyno-2,5-dion,
 - 1-(2-(4-(3-chlorofenylo)piperydyn-1-ylo)-2-okso-1-fenyloetylo)pirolidyno-2,5-dion,
 - 1-(2-okso-1-fenylo-2-(4-(3-(trifluorometylo)fenylo)piperydyn-1-ylo)etylo)pirolidyno-2,5-dion,
 - 1-(2-okso-1-fenylo-2-(4-(3-(trifluorometoksy)fenylo)piperydyn-1-ylo)etylo)pirolidyno-2,5-dion.
4. Związek określony w jakimkolwiek zastrz. od 1 do 3 do stosowania w leczeniu lub zapobieganiu napadom padaczkowym, bólowi o podłożu neurologicznym, migrenie, bólowi neuropatycznemu lub bólowi o podłożu zapalnym.

Rysunki



(I)

Fig. 1



i - 100% CH₃COOH, 70°C, 12 h

ii - HMDS, ZnCl₂, benzen, temp. wrzenia, 24 h

iii - CDI, DMF, temp. pok., 24 h

Fig. 2

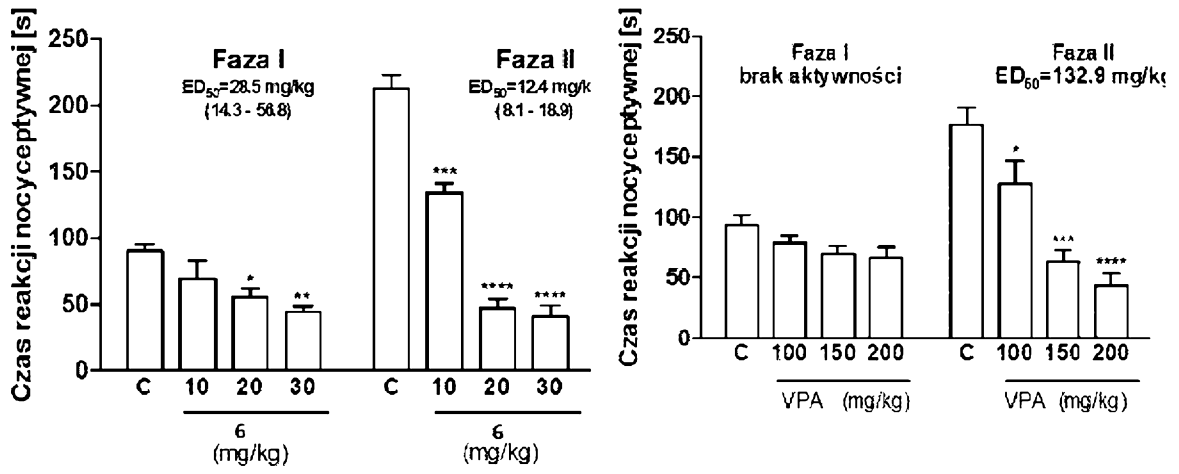


Fig. 3

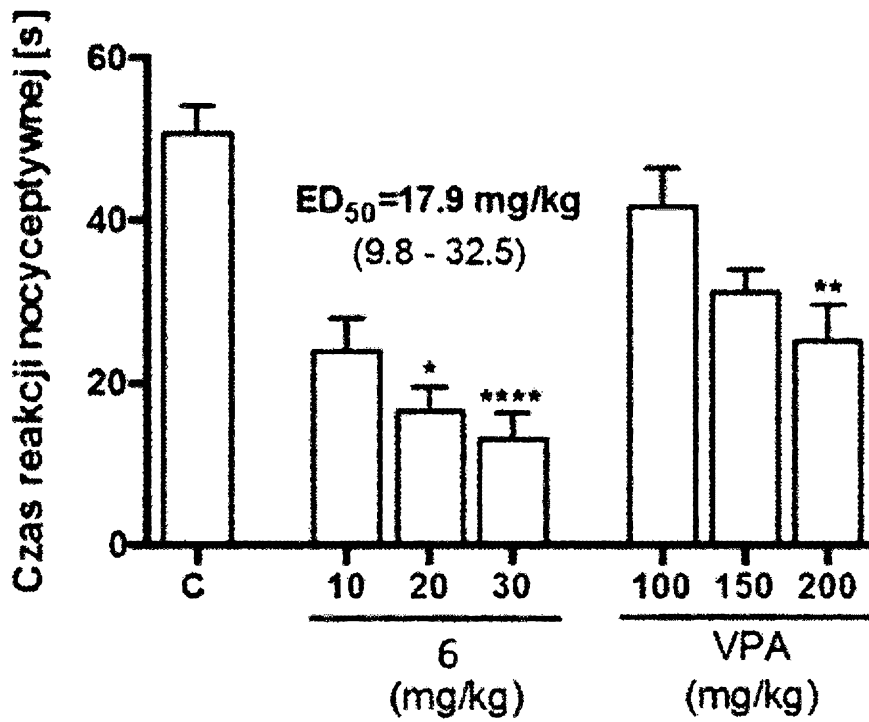


Fig. 4

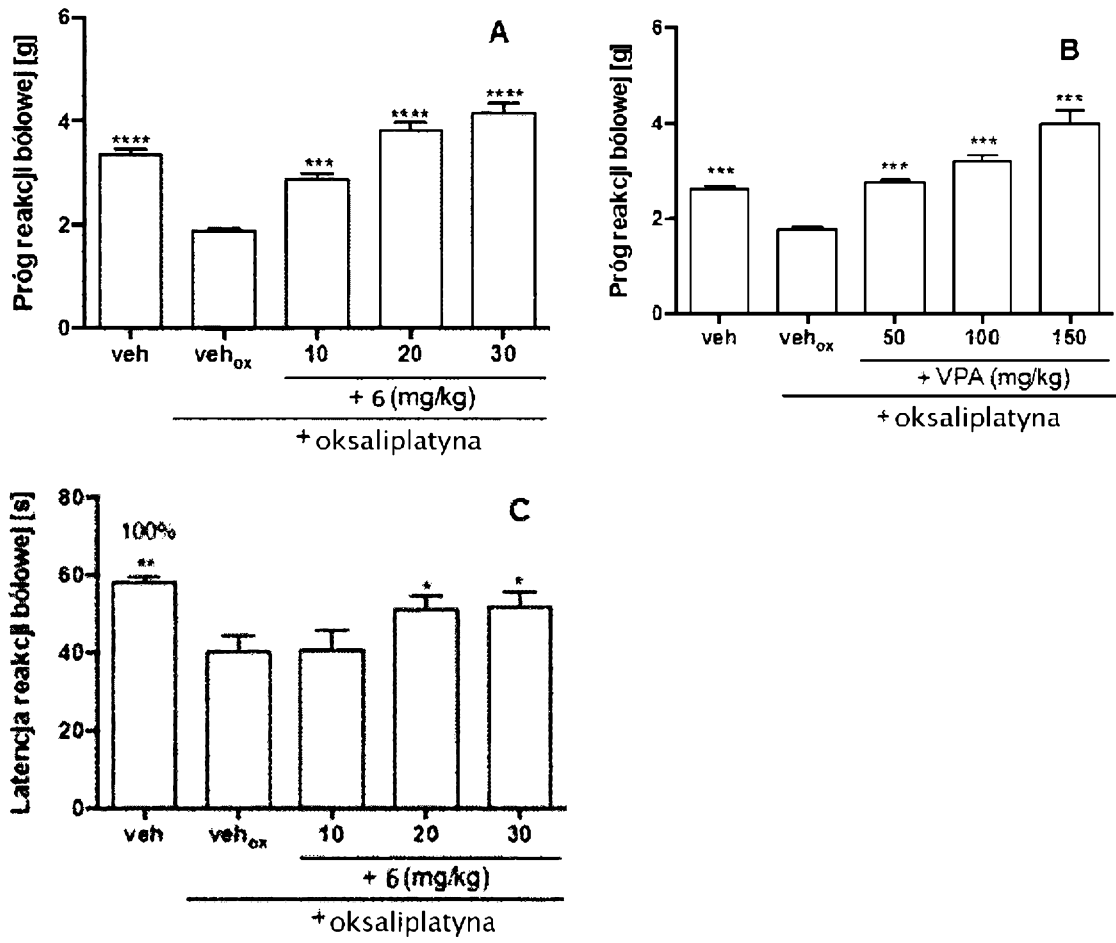


Fig. 5

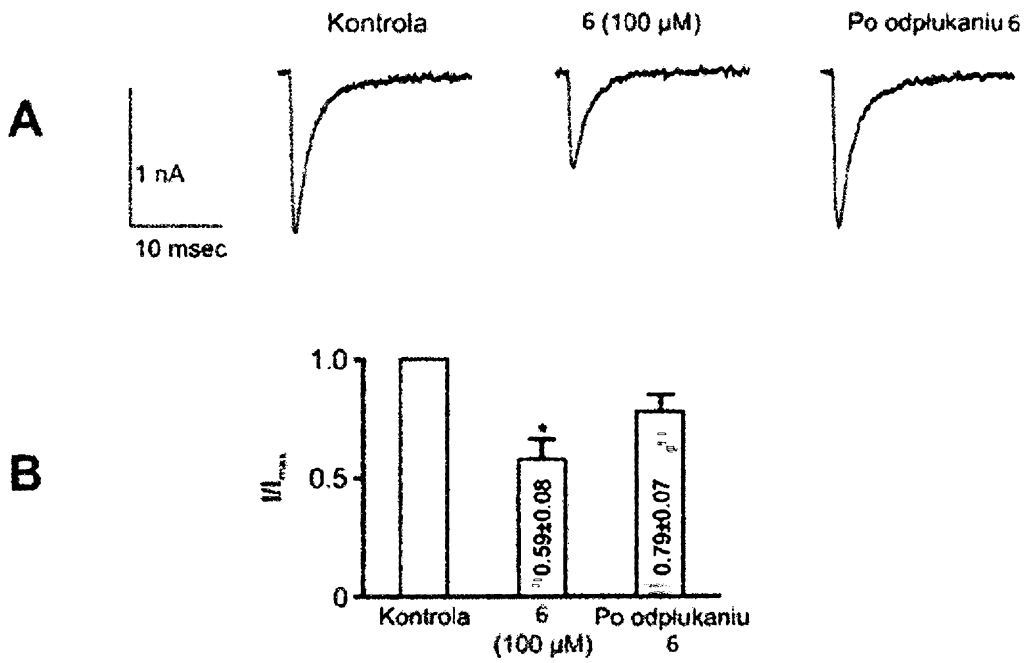


Fig. 6

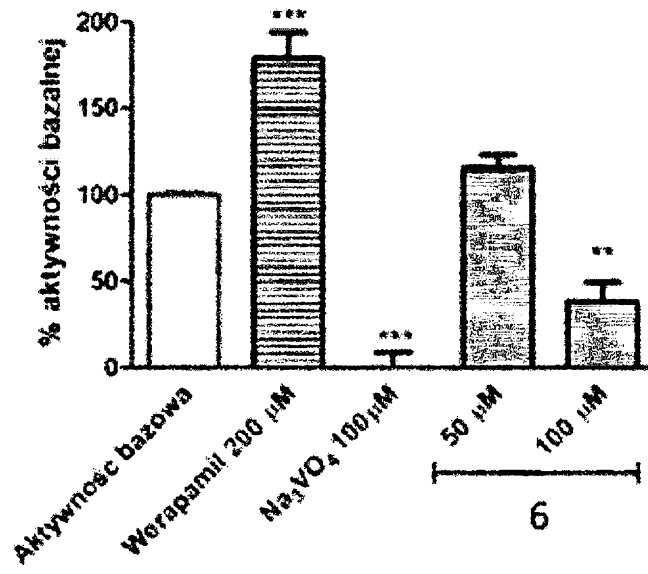


Fig. 7

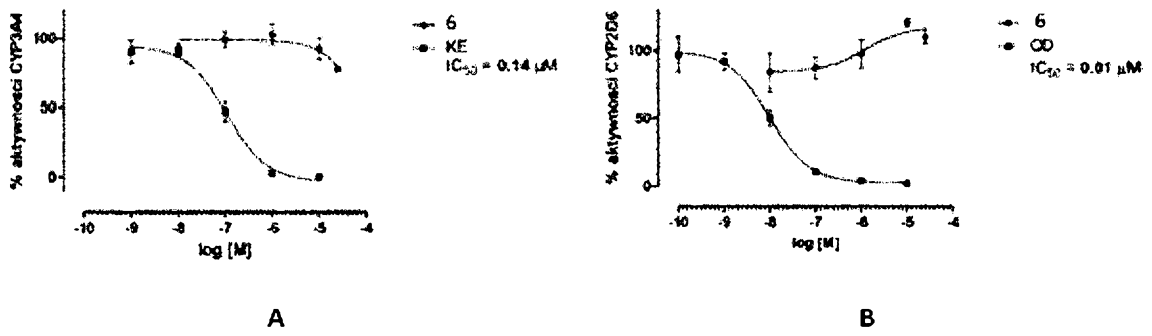


Fig. 8

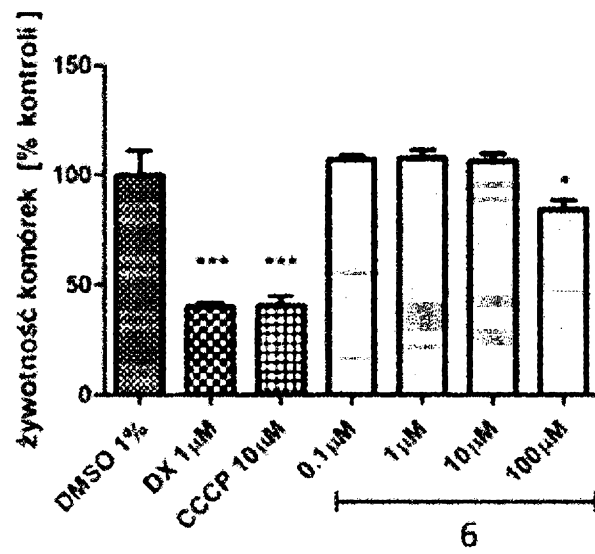


Fig. 9

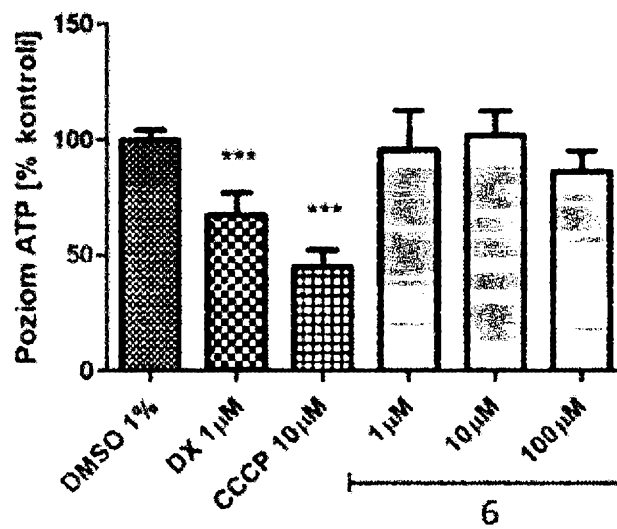


Fig. 10