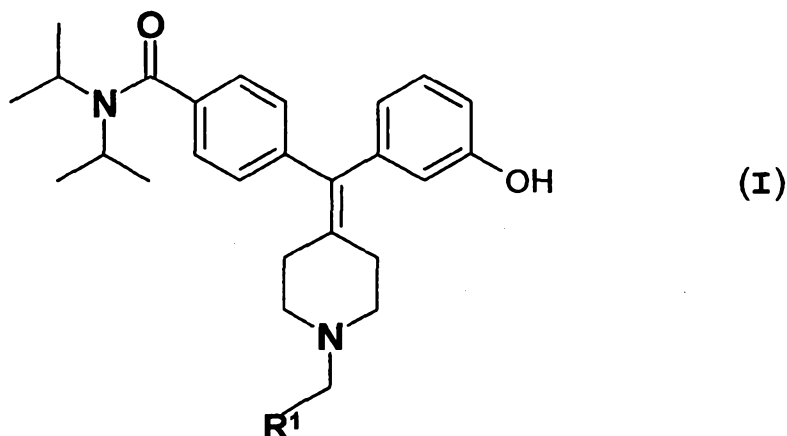


KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

4-[Fenil-(4-piperidinilidén)-metil]-benzamid-származékok alkalmazásuk

A találmány tárgyát az



általános képletű, új vegyületek — ahol

R¹ adott esetben mono-, di- vagy triszubsztituált fenil-,
piridil-, tienil-, furil-, imidazolil-, triazolil-,
pirrolil-, tiazolil- vagy N-oxido-piridinil-csoport —

és sóik, az előállításukra szolgáló eljárás, gyógyászati alkalmazásuk, főként a fájdalom, a szorongás és funkcionális gasztrointesztinális zavarok kezelésében, a vegyületeket tartalmazó gyógyszerkészítmények, és a vegyületek szintéziséhez használható köztitermékek képezik.

PK

A2

4-[Fenil-(4-piperidinilidén)-metil]-benzamid-származékok és alkalmazásuk

eljárás az előállításukra és ezeket tartalmazó gyógyszerkészítmények

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

A találmány tárgyát új vegyületek, előállításukra szolgáló eljárás, alkalmazásuk, és ezeket tartalmazó gyógyszerkészítmények képezik. Az új vegyületek a gyógyászatban, különösen a fájdalom, a szorongás és gasztrointesztinális rendellenességek kezelésében hasznosíthatók.

A δ -receptorról kimutatták, hogy számos testi funkcióban szerepe van, így a keringési és a fájdalomérzetet közvetítő rendszerben is, következésképpen jogos az a feltételezés, hogy a δ -receptor ligandumai esetleg fájdalomcsillapító és/vagy vérnyomáscsökkentő hatóanyagként hasznosíthatók. Ismeretes továbbá, hogy immunmodulátor hatást is mutatnak a δ -receptor ligandumai.

Legalább három különböző opioid receptortípust ismerünk, ezeket a μ , δ és κ görög betűkkel jelölik, és számos faj esetében, így az embernél is, mind a három megtalálható akár a központi, akár a perifériás idegrendszerben. Ezek közül a receptorok közül egyet vagy többet aktiválva, számos állatkísérletes modellen megfigyelhető a fájdalomcsillapítás.

Kevés kivétellel az opioid δ -receptor jelenleg hozzáférhető szelektív ligandumai peptidszerű vegyületek, ezért szisztémás alkalmazásuk nem lehetséges. A nem-peptid típusú δ -receptor agonisták egyike például az SNC80 [lásd E.J. Bilsky et al.: Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **273**(1), 359-366 (1995)], mindazonáltal továbbra is fennáll az igény olyan szelektív δ -agonista hatóanyagokra, amelyek azonfelül, hogy jobb szelektivitást mutatnak, mellékhatásprofiljuk is kedvezőbb az

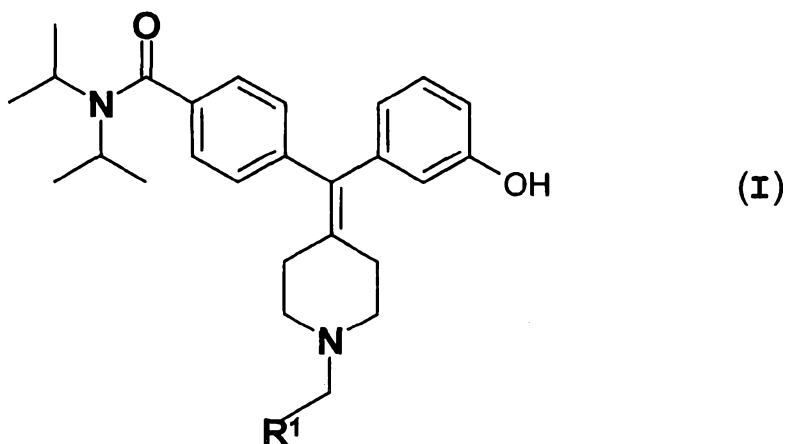
eddig ismertekénél.

A találmány hátterében tehát az a szándék húzódik meg, hogy találjunk olyan új hatóanyagokat, amelyek egyrészt a fájdalomcsillapító hatás tekintetében felülmúlják az eddig ismerteket, másrészt jobb a mellékhatásprofiljuk, mint a jelenlegi μ -agonistáké, és kedvezőbb a szisztémás hatásosságuk is.

A technika állásának megfelelő, jelenleg is alkalmazott fájdalomcsillapítóknak ugyanis számos előnytelen tulajdonságuk van, így említhetjük például a kedvezőtlen farmakokinetikai jellemzőket, és hogy szisztémásan alkalmazva nincs analgetikus hatásuk. Adatok vannak továbbá arra vonatkozóan is, hogy a leginkább preferált és eddig ismert δ -agonisták szisztémás alkalmazás esetén szignifikáns konvulzív hatást mutatnak.

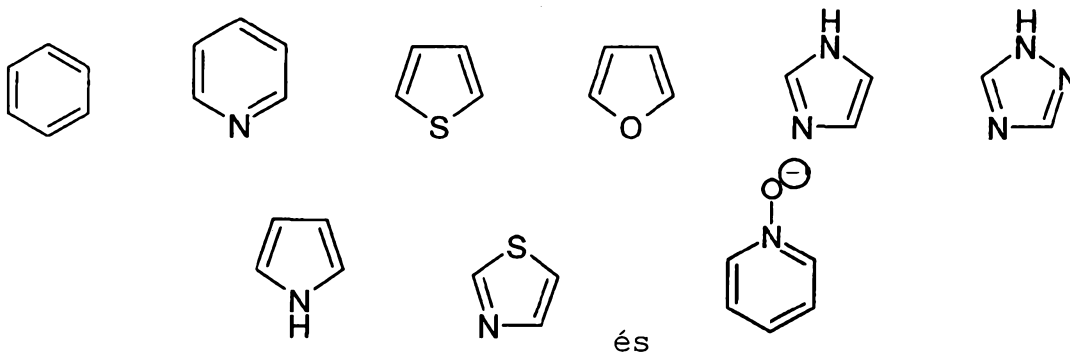
Legújabban találtunk olyan vegyületeket, amelyek bizonyos tulajdonságaik vonatkozásában meglepően előnyösek, vagyis az eddig ismert hatóanyagokat felülmúlják a δ -agonista hatáserősség, az in vivo hatásosság, a farmakokinetikai jellemzők, a biológiai hozzáférhetőség, az in vitro stabilitás és/vagy a kedvezőbb toxicitás tekintetében.

A találmány tárgyát tehát az



általános képletű, új vegyületek — a képletben

R^1 jelentése a



képletekkel ábrázolható vegyületekből származtatható fenil-, piridil-, tienil-, furil-, imidazolil-, triazolil-, pirrolil-, tiazolil- vagy N-oxido-piridinil-csoport, amely csoportokban a benzolgyűrű vagy heteroaromás gyűrű adott esetben bármely helyzetben, mindentől függetlenül 1, 2 vagy 3 szubsztituenst hordozhat, és a szubsztituensek egymástól függetlenül egyenes vagy elágazó láncú 1-6 szénatomos alkil-, nitro-, trifluor-metil- vagy 1-6 szénatomos alkoxicsoport, valamint klór-, fluor-, bróm- vagy jódatom közül kerülhetnek ki — képezik.

A találmány egyik megvalósításában a vegyületek olyan (I) általános képletű vegyületek, amelyek képletében R^1 jelentése a fent megadott, és az R^1 jelentésének megfelelő csoportban a benzolgyűrű vagy a heteroaromás gyűrű mindentől függetlenül egy metilcsoporttal szubsztituált.

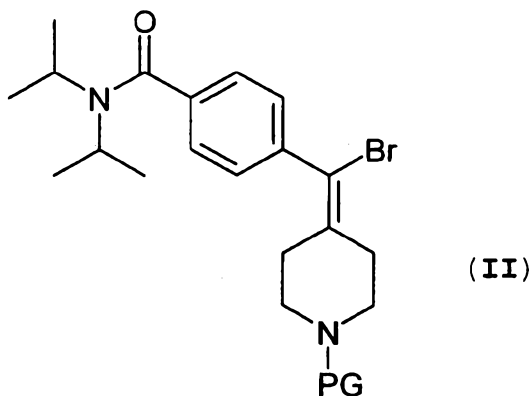
A találmány egy másik megvalósításában a vegyületek olyan (I) általános képletű vegyületek, amelyek képletében R^1 jelentése fenil-, pirrolil-, piridil-, tienil- vagy furilcsoport, és az R^1 jelentésének megfelelő csoportban a benzolgyűrű vagy a heteroaromás gyűrű adott esetben 1 vagy 2 előnyös szubsztituenst hordoz.

A találmány egy további megvalósításában a vegyületek olyan (I) általános képletű vegyületek, amelyek képletében R^1 jelentése fenil-, pirrolil- vagy piridilcsoport, és az R^1 jelentésének megfelelő csoportban a benzolgyűrű vagy a heteroaromás gyűrű adott esetben 1 vagy 2 előnyös szubsztituenst hordoz.

A találmány egy másik megvalósításában a vegyületek olyan (I) általános képletű vegyületek, amelyek képletében R^1 jelentése tienil- vagy furilcsoport, és az R^1 jelentésének megfelelő csoportban a heteroaromás gyűrű adott esetben 1 vagy 2 előnyös szubsztituenst hordoz.

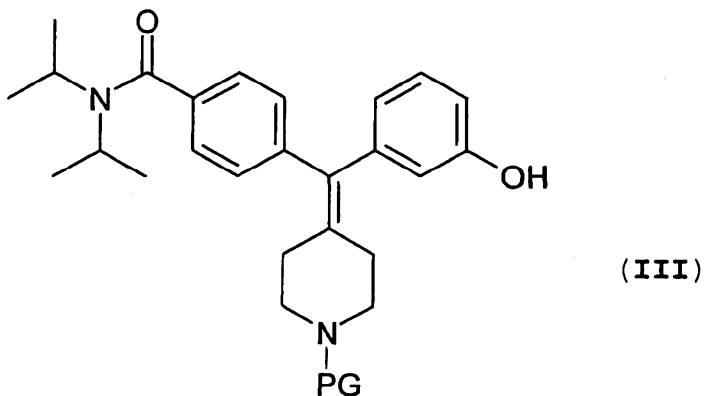
Olyan esetben, amikor az R^1 jelentésének megfelelő csoportban a benzolgyűrű vagy a heteroaromás gyűrű szubsztituált, előnyös szubsztituensek a következők: trifluor-metil- és metilcsoport, továbbá jód-, bróm-, fluor- és klóratom

A 2. reakcióvázlat A lépésében (lásd később) egy



általános képletű vegyületet, amelynek a képletében PG egy uretánt képező védőcsoportot, például (terc-butoxi)-karbonil- vagy (benzil-oxi)-karbonil-csoportot (általánosan ismert rövidítéssel Boc vagy CBZ), illetve benzil- vagy szubsztituált benzilcsoportot, például 2,4-dimetoxi-benzil-csoportot jelent, valamilyen palládium(0)-katalizátort, például [tetrakis(trifenil-foszfin)-

-palládium(0)] komplexet alkalmazva, bázis, például nátrium-karbonát jelenlétében 3-hidroxi-fenil-bórsavval egy



általános képletű vegyületté reagáltatunk, majd a szokásos módon eltávolítjuk a védőcsoportot, és a köztiterméket egy $R^1\text{-CHO}$ általános képletű vegyülettel redukzív alkilezésnek alávetve megkapjuk a kívánt (I) általános képletű vegyületet.

A találmány szerinti új vegyületek a gyógyászatban hasznosíthatók, elsősorban a fájdalom különböző típusai, így a krónikus fájdalom, a neuropátiás fájdalom, az akut fájdalom, a rákkal összefüggő fájdalom, a reumetoid arthritis okozta fájdalom, a migrén és a zsigeri fájdalom stb. kezelésére. Természetesen a lista nem tekinthető teljesnek.

A találmány szerinti vegyületek hasznosíthatók továbbá immunmodulátorként, különösen autoimmun betegségek, így arthritis, bőrátültetés, szervátültetés vagy hasonló sebészeti beavatkozások, valamint kollagénbetegségek és különféle allergiák esetében, de hasznosíthatók még daganatellenes vagy vírusellenes szerekként is.

A találmány szerinti vegyületek alkalmazási területei közé sorolhatjuk azokat a kóros állapotokat, amelyek kapcsolatba hozhatók az opioid receptorok degenerációjával vagy diszfunkciójá-

val. A felhasználás kiterjedhet a találmány szerinti vegyületek izotóposan jelzett formáira, amelyeknek a diagnosztikában és a képmezgelenítő vizsgálatokban, például a pozitron emissziós tomográfiában (PET) lehet szerepük.

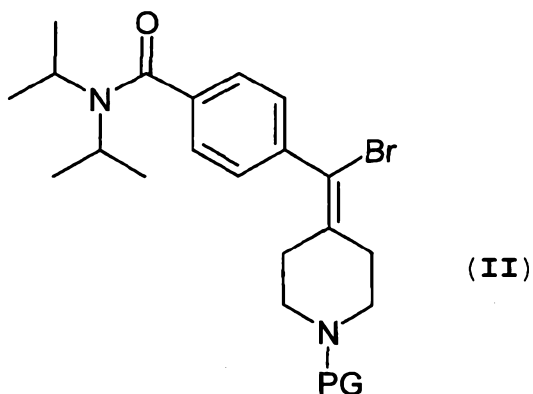
A találmány szerinti vegyületeket alkalmazhatjuk hasmenés, depresszió, szorongás, stressz okozta zavarok, így poszttraumás stresszbetegség, pánikbetegség, generalizált szorongásos betegség, szociális fóbia, mániás-kényszeres viselkedési rendellenességek, vizelet-inkontinencia, különféle mentális betegségek, köhögés, tüdőödéma, különféle gasztrointesztinális rendellenességek, például székrekedés, funkcionális gasztrointesztinális zavarok, például irritábilis bél-szindróma és funkcionális diszpepszia, Parkinson-kór és más motoros rendellenességek, traumás agysérülés, stroke, szívizominfarktus utáni kardioprotekciót igénylő állapot, gerincsérülés, drogfüggőség, így az alkoholhoz, nikotinhoz, opioidokhoz és más szerekhez köthető szenvedélybetegségek, valamint a szimpatikus idegrendszer rendellenességei, például magas vérnyomás kezelésére.

A találmány szerinti vegyületek hasznosíthatók fájdalomcsillapítóként általános érzéstelenítésben vagy intenzív ápolás során alkalmazott érzéstelenítésben. A különböző tulajdonságú hatóanyagok kombinációját gyakran használják azzal a céllal, hogy az érzéstelenítés során a kívánt hatások, például amnézia, analgészia, izomrelaxáció és szedálás egyensúlyát sikerüljön elérni. Az ilyen kombinációkban helye lehet a belélegzett érzéstelenítőknek, a hipnotikumoknak, az anxiolitikumoknak, a neuromuszkuláris blokkolóknak és az opioidoknak.

A találmány tárgyát képezi továbbá az (I) általános képletű vegyületek alkalmazása az imént felsorolt betegségek és kóros állapotok bármelyikének kezelésére szolgáló gyógyszerkészítmények előállítására.

A találmány még további tárgya eljárás az előzőekben felsorolt betegségek bármelyikében szenvedő egyének kezelésére, ami abból áll, hogy az ilyen kezelést igénylő páciensnek egy (I) általános képletű vegyület hatásos mennyiségét adjuk be.

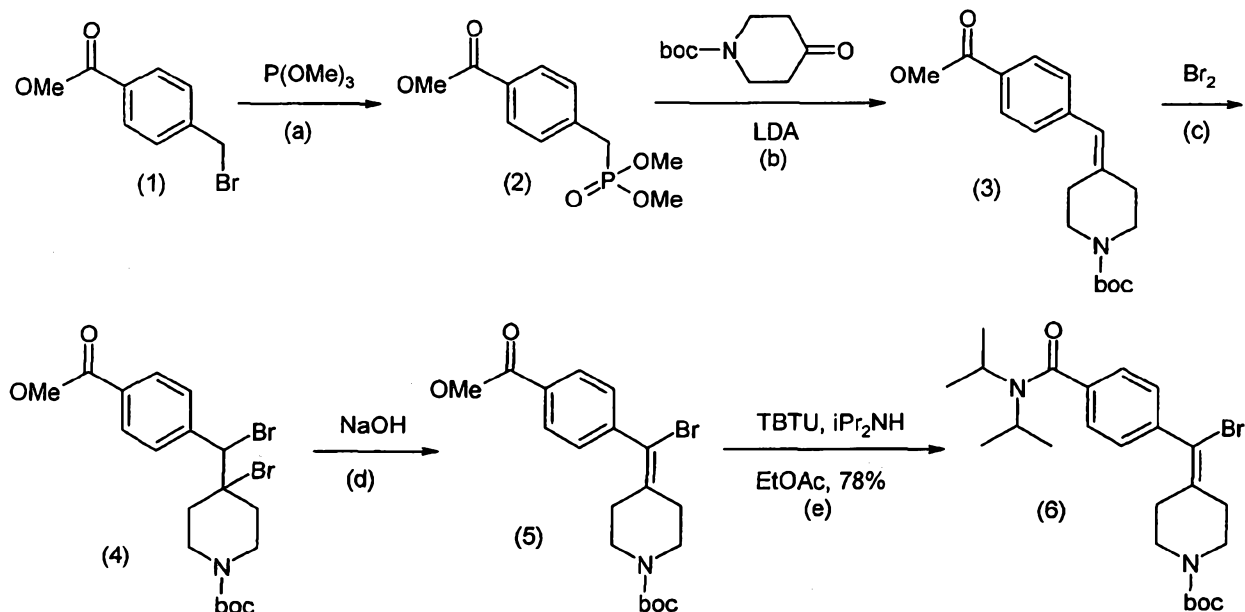
Ugyancsak a találmány tárgyát képezik az (I) általános képletű vegyületek szintézisének felhasználható köztitermékek, azaz a



általános képletű vegyületek, amelyek képletében PG jelentése egy uretánt képező csoport, például (terc-butoxi)-karbonil-, vagy (benzil-oxi)-karbonil-csoport vagy benzil- vagy szubsztituált benzil-, például 2,4-dimetoxi-benzil-csoport.

Találmányunk még részletesebb bemutatása végett az itt következő részben példákat adunk meg, ezek azonban semmiképpen nem tekinthetők korlátozó érvényűnek az oltalmi körre nézve.

1. reakcióvázlat:

A (6) képletű vinyl-bromid köztitermék előállítása

**4-[4-(Metoxi-karbonil)-benzilidén]-1-piperidinkarbonsav-
-(terc-butyl)-észter [(3) képletű vegyület]**

11,2 g (49 mmol) (1) képletű kiindulási vegyület és 25 ml trimetil-foszfát elegyét nitrogéngáz atmoszférában 5 óra hosszáig visszafolyató hűtő alatt forraljuk, majd a trimetil-foszfát feleslegét toluol hozzáadása után, azeotrop desztillációval eltávolítjuk a rendszerből. Az így kapott termék a (2) képletű vegyület, a kitermelés 100%.

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

A fent leírtak szerint kapott (2) képletű vegyületet feloldjuk 200 ml vízmentes tetrahidrofuránban, és -78°C -on cseppenként beadagolunk 32,7 ml (49 mmol) 1,5 M hexános lítium-diizopropil-amid-oldatot. A reakcióelegyet hagyjuk szobahőmérsékletre melegedni, hozzáadjuk 9,76 g (49 mmol) N-[(terc-butoxi)-karbonil]-4-

-piperidon 100 ml vízmentes tetrahidrofuránnal készített oldatát, majd 12 órányi reagáltatás után 300 ml vízzel megbontjuk, és a vi-
zes keveréket háromszor 300 ml etil-acetáttal extraháljuk. Az egye-
sített szerves oldószeres extraktumot magnézium-szulfáton szárít-
juk, bepároljuk, és a visszamaradó nyersterméket flash-kromatográ-
fiás eljárással tisztítjuk, így 5,64 g fehér, szilárd anyagként
kapjuk a (3) képletű vegyületet, a kitermelés 35%.

Infravörös színekép (NaCl): 3424, 2974, 2855, 1718, 1688, 1606,
1427, 1362, 1276 cm^{-1} .

^1H -NMR-spektrum (CDCl_3 , δ): 1,44 (s, 1H); 2,31 (t, $J = 5,5$ Hz, 2H); 2,42 (t, $J = 5,5$ Hz, 2H); 3,37 (t, $J = 5,5$ Hz, 2H); 3,48 (t, $J = 5,5$ Hz, 2H); 3,87 (s, 3H); 6,33 (s, 1H); 7,20 (d $J = 6,7$ Hz, 2H); 7,94 (d, $J = 6,7$ Hz, 2H).

^{13}C -NMR-spektrum (CDCl_3 , δ): 28,3; 29,2, 36,19; 51,9, 123,7, 127,8; 128,7; 129,4; 140,5; 142,1, 154,6, 166,8.

**4-Bróm-4-{bróm-[4-(metoxi-karbonil)-fenil]-metil}-1-piperi-
dinkarbonsav-(terc-butil)-észter [(4) képletű vegyület]**

Bemérünk 5,2 g (16 mmol) (3) képletű vegyületet, 1,0 g káli-
um-karbonátot és 200 ml vízmentes metilén-dikloridot, majd 0 °C-
on beadagoljuk 2,9 g (18 mmol) bróm 30 ml metilén-dikloriddal
készített oldatát. Ezt követően 1,5 óra hosszat szobahőmérsékle-
ten reagáltatjuk az elegyet, utána a kálium-karbonátot kiszűr-
jük, és a szűrletet bepároljuk. A párlási maradékot feloldjuk
200 ml etil-acetátban, 200 ml vízzel, 200 ml 0,5 M sósavval és
200 ml telített nátrium-klorid-oldattal mossuk, a szerves fázist
magnézium-szulfáton szárítjuk, és az oldószert elpárologtatjuk.
A visszamaradó nyersterméket metanolból átkristályosítjuk, így

megkapjuk a (4) képletű vegyületet, amely fehér, szilárd anyag, a tömege 6,07 g, a kitermelés 78%.

Infravörös színekép (NaCl): 3425, 2969, 1725, 1669, 1426, 1365, 1279, 1243 cm^{-1} .

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

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

**4-[Bróm-(4-karboxi-fenil)-metilén]-1-piperidinkarbonsav-
-(terc-butil)-észter [(5) képletű vegyület]**

5,4 g (11 mmol) (4) képletű vegyületet feloldunk 300 ml metanol és 100 ml 2,0 M nátrium-hidroxid-oldat elegyében, az oldatot 40 °C-ra melegítjük, és ezen a hőmérsékleten tartjuk 3 óra hosszáig. Ezt követően a szilárd anyagot kiszűrjük, éjszakán át vákuumban szárítjuk, majd másnap a száraz sót feloldjuk 40%-os acetonitril-víz elegyben, és az oldat pH-ját tömény sósavval 2-re állítjuk. Az így kapott 3,8 g fehér por az (5) képletű vegyület, a kitermelés 87%.

^1H -NMR-spektrum (CDCl_3 , δ) 1,45 (s, 9H, ^tBu); 2,22 (dd, $J = 5,5$ Hz és 6,1 Hz, 2H); 2,64 (dd, $J = 5,5$ Hz és 6,1 Hz, 2H); 3,34 (dd, $J = 5,5$ Hz és 6,1 Hz, 2H); 3,54 (dd, $J = 5,5$ Hz és 6,1 Hz, 2H); 7,35 (d, $J = 6,7$ Hz, 2H, Ar-H); 8,08 (d, $J = 6,7$ Hz, 2H, Ar-H).

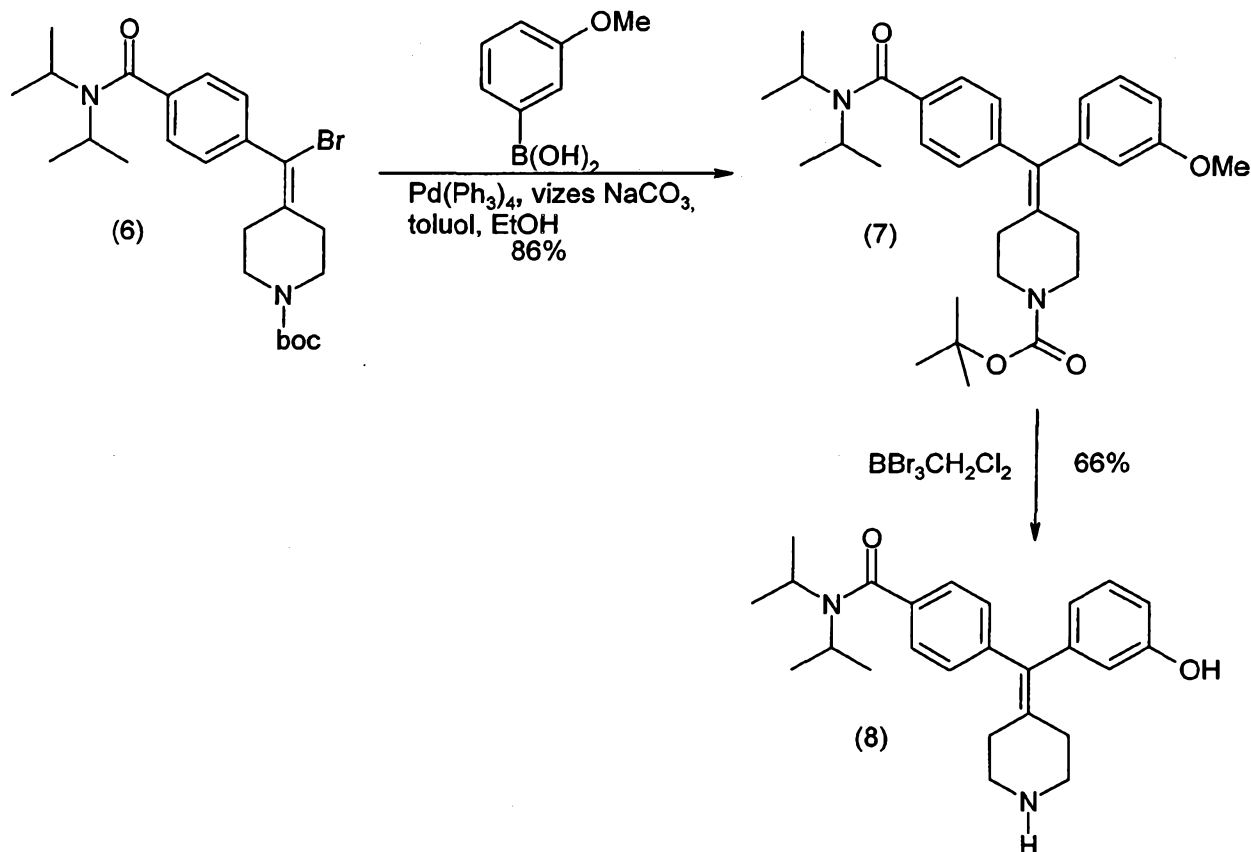
^{13}C -NMR-spektrum (CDCl_3 , δ) 28,3; 31,5; 34,2; 44,0; 115,3; 128,7; 129,4; 130,2; 137,7; 145,2; 154,6; 170,3.

**4-{Bróm-[4-(N,N-diizopropil-karbamoil)-fenil]-metilén}-1-
-piperidinkarbonsav-(terc-butil)-észter [(6) képletű vegyület]**

50,27 g (0,127 mol; 1,0 ekvivalens) (5) képletű savat fel-szuszpendálunk 350 ml etil-acetátban, és a szuszpenzióhoz szoba-hőmérsékleten 71,10 ml (0,510 mol; 4,0 ekvivalens) diizopropil-amint és 44,90 g (0,140 mol; 1,1 ekvivalens) 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametil-urónium-[tetrafluoro-borát]-ot adunk. A keletkezett híg, fehér szuszpenziót 2 napon át keverjük, utána 200 ml vizet adunk hozzá, és a két fázist elválasztjuk. A vizes fázist kétszer 100 ml metilén-dikloriddal extraháljuk, majd az egyesített szerves oldószeres extraktumot 150 ml 1 M vizes só-savval és 100 ml telített nátrium-klorid-oldattal mossuk, nátri-um-szulfáton szárítjuk, szűrjük, és az oldószert vákuumban elpá-rologtatjuk. A visszamaradó nyersterméket, amely halványsárga olaj, 300 ml (terc-butil)-metil-éterből átkristályosítjuk, a szűrletből kinyert anyagot pedig előbb flash-kromatográfiás el-járással tisztítjuk, 30% etil-acetátot és hexánt tartalmazó ol-dószereleggyel eluálva az oszlopot, azután etil-acetát és hexán 10:90 arányú elegyéből kristályosítjuk át. A fehér porként ka-pott egyesített termék tömege 47,28 g, a kitermelés 78%.

2. reakcióvázlat:

A (8) képletű vegyület előállítása palládium-katalizált kapcsolással és a védőcsoportok eltávolításával



4-([4-(N,N-Diizopropil-karbamoil)-fenil]-(3-metoxi-fenil)-metilén)-1-piperidinkarbonsav-(terc-butil)-észter [(7) képletű vegyület]

8,26 g (17,2 mmol; 1,0 ekvivalens) (6) képletű vinil-bromidot feloldunk 130 ml toluolban, és szobahőmérsékleten hozzáadunk 3,14 g (20,7 mmol; 1,2 ekvivalens) 3-metoxi-fenil-bórsavat, 27 ml etanolt és 21,5 ml (43,0 mmol; 2,5 ekvivalens) 2 M vizes nátrium-karbonát-oldatot. A rendszertt 15 percig nitrogéngázzal fűvátjuk át, utána 1,43 g (1,24 mmol; 0,072 ekvivalens) [tetra-kisz(trifenil-foszfín)-palládium(0)] komplexet adunk az elegyhez, és éjszakán át 90 °C-on folytatjuk a reagáltatást. Másnap a

reakcióelegyet szobahőmérsékletre hűtjük, 100 ml vízzel megbontjuk, a két nem elegyedő fázist elválasztjuk, majd a szerves fázist 100 ml vízzel és 50 ml telített nátrium-klorid-oldattal mossuk, nátrium-szulfáton szárítjuk, szűrjük, végül vákuumban bepároljuk. A visszamaradó nyersterméket flash-kromatográfiás eljárással tisztítjuk, 50% etil-acetátot és hexánt tartalmazó oldó-szereleggyel eluálva az oszlopot, így 7,5 g, a címben megnevezett vegyületet kapunk, a kitermelés 86%.

4-[(3-Hidroxi-fenil)-(4-piperidinilidén)-metil]-N,N-diizopropil-benzamid [(8) képletű vegyület]

5,61 g (11,05 mmol; 1,0 ekvivalens) (7) képletű karbamátot feloldunk 200 ml metilén-dikloridban, és -78 °C-on beadagolunk 110,7 ml (160,7 mmol; 10,0 ekvivalens) -78 °C-ra hűtött, 1 M metilén-dikloridos bór-tribromid-oldatot. A reakcióelegyet lassan hagyjuk szobahőmérsékletre melegedni, éjszakán át keverjük, másnap 0 °C-ra hűtjük, metanol lassú hozzáadásával megbontjuk, aztán vákuumban bepároljuk. A nyerstermékként visszamaradó olajat flash-kromatográfiás eljárással tisztítjuk, 15% etil-acetátot és hexánt tartalmazó oldószerleggyel eluálva az oszlopot. A megfelelő frakciókat összeöntjük, az oldószert elpárologtatjuk, és a párlási maradékot feloldjuk 200 ml 0,1 M vizes sósav és 200 ml metilén-diklorid keverékében. A két nem elegyedő fázist elválasztjuk, a vizes rész pH-ját 1,0 M vizes nátrium-hidroxid-oldattal 9-re állítjuk, majd a vizes keveréket háromszor 200 ml etil-acetáttal extraháljuk. Az egyesített szerves oldószeres extraktumot vákuumban bepárolva, 2,88 g kristályos anyag formájában megkapjuk a kívánt vegyületet, a kitermelés 66%.

320 mg (0,82 mmol) fenti, a védőcsoportoktól megszabadított

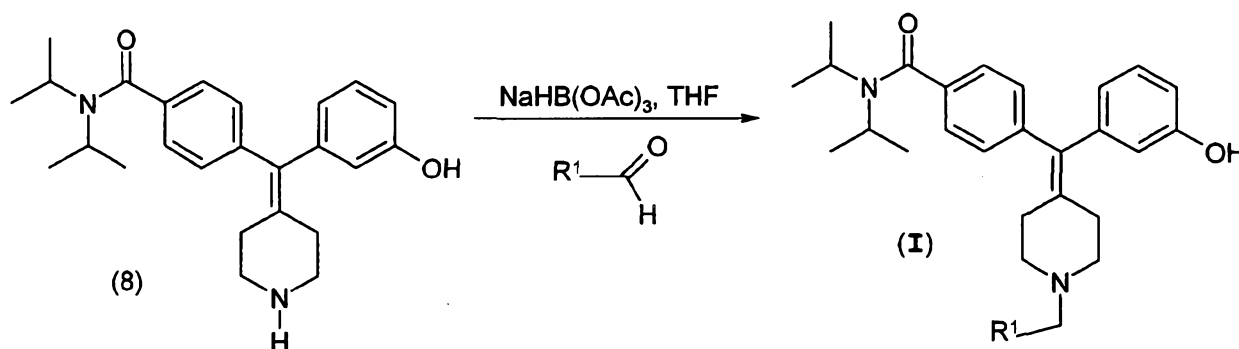
(8) képletű amint flash-kromatográfiás eljárással tisztítunk, 5% metanolt és metilén-dikloridot tartalmazó oldószerkeleggyel eluálva az oszlopot. A megfelelő frakciókat vákuumban bepároljuk, és a visszamaradó fehér, szilárd anyagot dietil-éterrel trituráljuk, majd az oldószert vákuumban elpárologtatjuk. Az így kapott (8) képletű termék tömege 180 mg.

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

Az 1-12. példák szerinti vegyületeket az alábbiakban ismertetendő általános eljárást követve állítjuk elő.

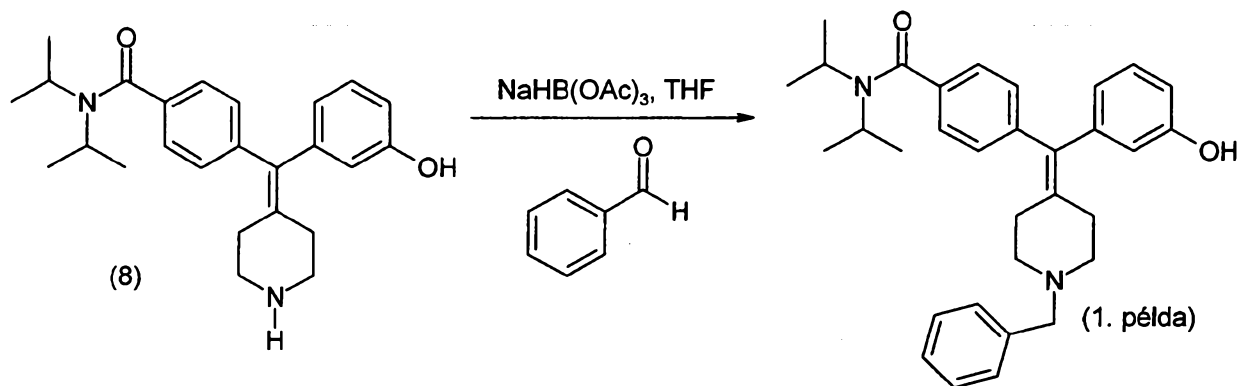
3. reakcióvázlat:

A találmány szerinti vegyületek előállítása a (8) képletű köztitermék redukatív aminálási reakciójával



Az itt következő részben, az 1. példa szerinti vegyület szintézisével kapcsolatban a találmány szerinti vegyületek előállítására szolgáló tipikus eljárást adunk meg. A (8) képletű köztitermék redukatív alkilezését az 1. példa szerinti vegyületté a 4. reakcióvázlat szemlélteti.

4. reakcióvázlat:

1. példa:

**4-[(1-Benzil-piperidin-4-ilidén) - (3-hidroxi-fenil) -metil] -
-N,N-diizopropil-benzamid**

390 mg (0,99 mmol; 1,0 ekvivalens) amint feloldunk 20 ml tetrahidrofuránban, az oldathoz szobahőmérsékleten 120 µl (1,19 mmol; 1,2 ekvivalens) benzaldehydet és 276 mg (1,20 mmol; 1,3 ekvivalens) nátrium-[triacetoxi-hidrido-borát]-ot adunk, azután az elegyet éjszakán át keverjük. Másnap a reakcióelegyet 10 ml metilén-dikloriddal és 15 ml 2 M vizes nátrium-hidroxid-oldattal meghígítjuk, a nem elegyedő fázisokat elválasztjuk, és a szerves fázist 15 ml telített nátrium-klorid-oldattal mossuk. Az előző vizes fázist háromszor 15 ml metilén-dikloriddal visszaextraháljuk, majd az egyesített szerves oldószeres extraktumot nátrium-szulfáton szárítjuk, szűrjük, vákuumban bepároljuk, és a nyers-terméket flash-kromatográfiás eljárással szilikagélen tisztítjuk, 5% metanolt és metilén-dikloridot tartalmazó oldószer-eleggyel eluálva az oszlopot. A megfelelő frakciókat összeöntjük, az oldószert vákuumban elpárologtatjuk, és a párlási maradékhoz előbb dietil-étert és metilén-dikloridot, azután 4 ml

(körülbelül 3,5 ekvivalens) 1 M dietil-éteres hidrogén-klorid-oldatot adunk. Az elegyet vákuumban bepároljuk, a visszamaradó fehér, szilárd anyagot dietil-éterrel trituráljuk, és az oldószert vákuumban elpárologtatjuk. Az így kapott termék a címben megnevezett vegyület, a tömege 183 mg, a kitermelés 36%.

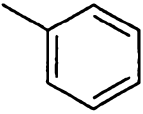
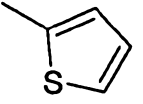
Az elemanalízis értékei a $C_{32}H_{38}N_2O_2 \cdot 1,80HCl$ összegképletre:

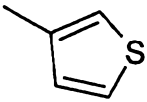
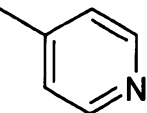
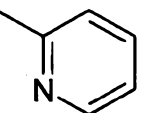
Számított (%): C 70,10; H 7,32; N 5,11.

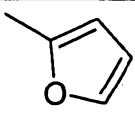
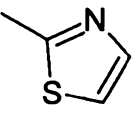
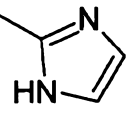
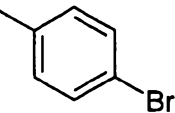
Talált (%): C 70,16; H 7,21; N 4,55.

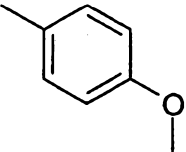
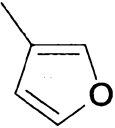
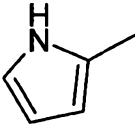
Azonos módon eljárva állítjuk elő a 2-12. példák szerinti vegyületeket. Az analitikai adatokat az 1. táblázatban közöljük.

1. táblázat: A találmány szerinti vegyületek analitikai adatai

Eld.	R ¹	Név	NMR adatok (400 MHz)
1		4-[(1-Benzil-piperidin-4-ilidén)-(3-hidroxi-fenil)-metil]-N,N-diizopropil-benzamid	(400 MHz, DMSO) 7,55 (m, 2H, Ar-H); 7,44 (m, 3H, Ar-H); 7,23 (m, 2H, Ar-H); 7,15 (m, 3H, Ar-H); 6,65 (d, J=8,0Hz, 1H); 6,57 (d, J=7,6Hz, 1H, Ar-H); 6,49 (s, 1H, Ar-H); 4,30 (s, 2H, NCH ₂ Ar); 3,62 (széles s, 2H, NCH); 3,38 (m, 2H, CH ₂); 3,02 (m, 2H, CH ₂); 2,50 (m, 4H, NCH ₂); 1,22 (m, 12H, CH ₃).
2		4-[(3-Hidroxi-fenil)-(1-[(2-tienil)-metil]-piperidin-4-ilidén)-metil]-N,N-diizopropil-benzamid	(400 MHz, DMSO) 7,66 (m, 1H, Ar-H); 7,32 (széles s, 1H, Ar-H); 7,16 (m, 2H, Ar-H); 7,09 (m, 4H, Ar-H); 6,64 (dd, J=1,8 és 8,4Hz, 1H, Ar-H); 6,54 (d, J=8,4Hz, 1H, Ar-H); 6,46 (m, 1H, Ar-H); 4,52 (m, 2H, NCH ₂ Ar); 3,59 (széles s, 2H, NCH); 3,38 (m 3H, CH ₂); 2,97 (m, 1H, CH ₂); 2,50 (széles s, 4H, NCH ₂); 1,24 (széles s, 12H, CH ₃).

3		4-[(3-Hidroxi-fenil)-{1-[(3-tienil)-metil]-piperidin-4-ilidén}-metil]-N,N-diizopropil-benzamid	(400 MHz, DMSO) 7,71 (m, 1H, Ar-H); 7,61 (m, 1H, Ar-H); 7,26 (széles s, 1H, Ar-H); 7,20 (d, J=8,4Hz, 2H, Ar-H); 7,12 (m, 3H, Ar-H); 6,62 (dd, J=1,9 és 7,4Hz és 1H, Ar-H); 6,54 (d, J=7,4Hz, 1H, Ar-H); 6,46 (széles s, 1H, Ar-H); 4,27 (széles s, 2H, NCH ₂ Ar); 3,59 (széles s, 2H, NCH); 3,38 (m, 3H, CH ₂); 2,94 (m, 2H, CH ₂ , NCH ₂); 2,55 (széles s, 3H, NCH ₂); 1,24 (széles s, 12H, CH ₃).
4		4-[(3-Hidroxi-fenil)-{1-[(4-piridil)-metil]-piperidin-4-ilidén}-metil]-N,N-diizopropil-benzamid	(400 MHz, DMSO) 8,82 (m, 2H, Ar-H); 7,98 (széles s, 2H, Ar-H); 7,20 (d, J=8,4Hz, 2H, Ar-H); 7,10 (m, 3H, Ar-H); 6,62 (d, J=8,4Hz, 1H, Ar-H); 6,54 (d, J=7,4Hz, 1H, Ar-H); 6,47 (m, 1H, Ar-H); 4,45 (s, 2H, NCH ₂ Ar); 3,58 (széles s, 2H, NCH); 3,40 (m, 2H, CH ₂); 3,03 (széles s, 2H, CH ₂); 2,54 (széles s, 4H, NCH ₂); 1,18 (széles s, 12H, CH ₃).
5		4-[(3-Hidroxi-fenil)-{1-[(2-piridil)-metil]-piperidin-4-ilidén}-metil]-N,N-diizopropil-benzamid	(400 MHz, DMSO) 8,63 (d, J=4,6Hz, 1H, Ar-H); 7,86 (dd, J=2,0 és 7,4Hz, 1H, Ar-H); 7,58 (d, J=7,4Hz, 1H, Ar-H); 7,44 (dd, J=4,6 és 8,4Hz, 1H, Ar-H); 7,20 (d, J=8,4Hz, 2H, Ar-H); 7,08 (m, 3H, Ar-H); 6,62 (dd, J=2,8 és 7,4Hz, 1H, Ar-H); 6,54 (d, J=7,4Hz, 1H, Ar-H); 6,47 (m, 1H, Ar-H); 4,84 (s, 1H, OH); 4,43 (m, 2H, NCH ₂ Ar); 3,59 (széles s, 2H, NCH); 3,26 (széles s, 4H, CH ₂); 2,55 (széles s, 4H, NCH ₂); 1,22 (széles s, 12H, CH ₃).

6		4-[[1-[(2-Furil)-metil]-piperidin-4-ilidén)-(3-hidroxi-fenil)-metil]-N,N-diizopropil-benzamid	(400 MHz, DMSO) 7,80 (m, 1H, Ar-H); 7,24 (d, J=8,4Hz, 2H, Ar-H); 7,15 (m, 3H, Ar-H); 6,71 (m, 1H, Ar-H); 6,65 (d, J=7,2Hz, 1H, Ar-H); 6,56 (m, 2H, Ar-H); 6,49 (m, 1H, Ar-H); 4,39 (széles s, 2H, NCH ₂ Ar); 3,61 (széles s, 2H, NCH); 3,44 (m, 2H, CH ₂); 2,99 (m, 2H, CH ₂); 2,49 (széles s, 4H, NCH ₂); 1,22 (m, 12H, CH ₃)
7		4-[(3-Hidroxi-fenil)-{1-[(2-tiazolil)-metil]-piperidin-4-ilidén)-metil]-N,N-diizopropil-benzamid	(400 MHz, DMSO) 7,97 (m, 1H, Ar-H); 7,93 (m, 1H, Ar-H); 7,24 (d, J=7,6Hz, 2H, Ar-H); 7,19 (m, 3H, Ar-H); 6,65 (m, 1H, Ar-H); 6,57 (d, J=7,6Hz, 1H, Ar-H); 6,49 (s, 1H, Ar-H); 4,72 (s, 2H, NCH ₂ Ar); 3,50 (széles s, 4H, NCH, CH ₂); 3,15 (széles s, 2H, CH ₂); 2,53 (széles s, 4H, NCH ₂); 1,20 (széles s, 12H, CH ₃).
8		4-[(3-Hidroxi-fenil)-{1-[(1H-imidazol-2-il)-metil]-piperidin-4-ilidén)-metil]-N,N-diizopropil-benzamid	(400 MHz, DMSO) 7,69 (s, 2H, Ar-H); 7,23 (d, J=8,0Hz, 2H, Ar-H); 7,14 (m, 3H, Ar-H); 6,66 (d, J=7,6Hz, 1H); 6,58 (d, J=7,6Hz, 1H, Ar-H); 6,49 (s, 1H, Ar-H); 4,46 (széles s, 2H, NCH ₂ Ar); 3,58 (széles s, 2H, NCH); 3,20 (széles s, 4H, CH ₂); 2,55 (széles s, 4H, NCH ₂); 1,02 (széles s, 12H, CH ₃).
9		4-[[1-(4-Bróm-benzil)-piperidin-4-ilidén)-(3-hidroxi-fenil)-metil]-N,N-diizopropil-benzamid	(400 MHz, DMSO) 7,66 (d, J=8,4Hz, 2H, Ar-H); 7,51 (d, J=8,0Hz, 2H, Ar-H); 7,22 (d, J=8,4Hz, 2H, Ar-H); 7,15 (m, 3H, Ar-H); 6,65 (d, J=8,4Hz, 1H); 6,57 (d, J=7,2Hz, 1H, Ar-H); 6,49 (s, 1H, Ar-H); 4,29 (s, 2H, NCH ₂ Ar); 3,58 (széles s, 2H, NCH); 3,36 (m, 2H, CH ₂); 3,00 (m, 2H, CH ₂); 2,49 (m 4H, NCH ₂); 1,17 (széles s, 12H, CH ₃).

10		4-[(3-Hidroxi-fenil)-[1-(4-metoxi-benzil)-piperidin-4-ilidén]-metil]-N,N-diizopropil-benzamid	(400 MHz, DMSO) 7,44 (d, J=8,0Hz, 2H, Ar-H); 7,23 (d, J=8,0Hz, 2H, Ar-H); 7,15 (m, 3H, Ar-H); 6,99 (d, J=8,8Hz, 2H, Ar-H); 6,65 (d, J=8,0Hz, 1H, Ar-H); 6,57 (d, J=7,6Hz, 1H, Ar-H); 6,49 (s, 1H, Ar-H); 4,23 (s, 2H, NCH ₂ Ar); 3,76 (s, 3H, OMe); 3,58 (széles s, 2H, NCH); 3,38 (m, 2H, CH ₂); 2,99 (m, 2H, CH ₂); 2,55 (széles s, 4H, NCH ₂); 1,15 (széles s, 12H, CH ₃).
11		4-[(1-(3-Furil)-metil]-piperidin-4-ilidén)-(3-hidroxi-fenil)-metil]-N,N-diizopropil-benzamid	(400 MHz, DMSO) 7,81 (s, 1H, Ar-H); 7,71 (s, 1H, Ar-H); 7,20 (d, J=7,4Hz, 2H, Ar-H); 7,10 (m, 3H, Ar-H); 6,69 (s, 1H, Ar-H); 6,62 (dd, J=1,9 és 8,4Hz, 1H, Ar-H); 6,54 (d, J=8,4Hz, 1H, Ar-H); 4,13 (s, 2H, NCH ₂ Ar); 3,59 (széles s, 2H, NCH); 3,37 (széles s, 2H, CH ₂); 2,92 (m, 2H, CH ₂); 2,49 (széles s, 4H, NCH ₂); 1,22 (széles s, 12H, CH ₃).
12		4-[(3-Hidroxi-fenil)-{1-(2-pirrolil)-metil]-piperidin-4-ilidén)-metil]-N,N-diizopropil-benzamid	(400 MHz, CD ₃ OD) 1,13 (széles s, 6H, CH ₃); 1,48 (széles s, 6H, CH ₃); 2,40-2,50 (m, 2H, CH ₂); 2,70-2,81 (m, 2H, CH ₂); 2,94-3,00 (m, 2H, CH ₂); 3,46-3,50 (m, 2H, CH ₂); 3,62 (széles s, 1H, NCH); 3,83 (széles s, 1H, NCH); 6,13-6,15 (m, 1H, Ar-H); 6,32-6,34 (m, 1H, Ar-H); 6,50-6,52 (m, 1H, Ar-H); 6,58-6,61 (m, 1H, Ar-H); 6,65-6,68 (m, 1H, Ar-H); 6,85-6,86 (m, 1H, Ar-H); 7,12 (t, J=8Hz, 1H, Ar-H); 7,19-7,28 (m, 4H, Ar-H).

Gyógyszerkészítmények

A találmány szerinti új vegyületeket alkalmazhatjuk orálisan, intramuszkulárisan, szubkután, helyileg, intranazálisan,

intraperitoneálisan, intratorakálisan, intravénásan, epidurális injekció formájában, intratekálisan, intracerebroventrikulárisan és az ízületekbe fecskendezve.

Előnyösnek az orális, intravénás vagy intramuszkuláris alkalmazási módot tartjuk.

A gyógyászati felhasználás során az alkalmazott dózisok természetesen különbözőek lehetnek a beadás módjától, a betegség súlyosságától, a páciens életkorától és testtömegétől, továbbá más tényezőktől függően, amelyeket a kezelőorvos normális körülmények között mérlegelni kénytelen, amikor egy adott páciens kezelése során meg kell határoznia az egyénre vonatkozó legmegfelelőbb adagolást és alkalmazást.

A találmány szerinti vegyületekből gyógyszerkészítményt inert, gyógyszerészetileg elfogadható, szilárd vagy folyékony hordozókkal állíthatunk elő. A szilárd gyógyszerforma lehet por, tabletta, diszpergálható granulátum, kapszula, ostyatok és kúp.

A szilárd hordozó egy vagy több anyagból állhat, és ezek egyike vagy másika hígítószerként, ízjavító anyagként, szolubilizálószerként, lubrikánsként, szuszpendálószerként, kötőanyagként vagy a tabletta szétesését elősegítő szerként, továbbá bevonatot képező anyagként is szolgálhat.

A poroknál a hordozó valamilyen finom eloszlású szilárd anyag, amely a finoman elporított hatóanyaggal keveréket képez. A tabletták esetében a hatóanyagot a szükséges kötési szilárdságot biztosító, megfelelő mennyiségű hordozóval keverjük össze, majd a porkeveréket a kívánt nagyságú és formájú tablettákká préseljük.



A kúpok előállításához alacsony olvadáspontú viaszt, zsírsav-gliceridek keverékét, továbbá kakaóvaját használunk, és úgy járunk el, hogy a kúpalapanyagot megömlesztjük, a hatóanyagot az ömledékben diszpergáljuk, például keveréssel, végül a homogén diszperziót megfelelő méretű formákba öntjük és hagyjuk lehűlni, hogy megszilárduljon.

Megfelelő hordozók például az alábbiak: magnézium-karbonát, magnézium-sztearát, talkum, laktóz, szacharóz, pektin, dextrin, keményítő, tragakantgyanta, metil-cellulóz, (karboxi-metil)-cellulóz-nátrium-só, egy alacsony hőmérsékleten olvadó viasz, kakaóvaj és hasonlók.

A gyógyszerészetileg elfogadható sókra a korlátozás szándéka nélkül például a következőket adhatjuk meg: acetát, benzolszulfonát, benzoát, hidrogén-karbonát, hidrogén-tartarát, bromid, kalcium-acetát, kámforszulfonát, karbonát, klorid, citrát, dihidriklorid, edetát, ediszilát, esztolát, ezilát, fumarát, glukaptát, glukonát, glutamát, glikolil-arzanilát, hexil-rezorcínát, hidrabaminát, hidrobromid, hidroklorid, hidrox-naftoát, izetionát, laktát, laktobionát, malát, maleát, mandulasavas só, metánszulfonát, metil-bromid, metil-nitrát, metil-szulfát, mukonát, napszilát, nitrát, pamoát (embonát), pantotenát, foszfát/difoszfát, poligalakturonát, szalicilát, sztearát, szubacetát, szukcinát, szulfát, tannát, tartarát, teoklát, trietijodid, N,N'-dibenzil-etilén-diamin-só, klór-prokain-só, 2-hidrox-N,N,N-trimetil-etil-ammónium-só, bisz(2-hidrox-etil)-amin-só, etilén-diamin-só, megluminát, prokainsó, alumíniumsó, kalciumsó, lítiumsó, magnéziumsó, káliumsó, nátriumsó és cinksó.



Előnyös gyógyszerészetileg nem elfogadható sók például a tálmány szerinti vegyületek sói közül a hidrokloridok, perklorátok és tetrafluoro-borátok. A gyógyszerészetileg nem elfogadható sók előnyös fizikai vagy kémiai tulajdonságaik, például a kristályosságuk miatt nyerhetnek alkalmazást.

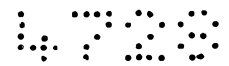
Előnyös gyógyszerészetileg elfogadható sók a hidrokloridok, szulfátok és hidrogén-tartarátok. A hidrokloridok és a szulfátok különösen előnyösek.

A gyógyszerkészítmény meghatározás értelmezésünk szerint vonatkozik a hatóanyagból valamilyen gyógyszerertok, például kapszula felhasználásával készített gyógyszerformákra is, amelyek más hordozókkal együtt vagy anélkül tartalmazzák a hatóanyagot, azt veszi körül a kapszulát képező hordozó, és így azzal egységet képez. Hasonlóképpen ide sorolandó az ostyatok is.

A tabletták, porok, ostyatokok és kapszulák orális alkalmazásra megfelelő, szilárd gyógyszerformák.

A folyékony gyógyszerkészítmények körébe tartoznak az oldatok, szuszpenziók és emulziók. Parenterális beadásra alkalmas folyékony gyógyszerkészítményre példaként említhetjük a hatóanyagok steril, vízzel vagy víz és propilénglikol elegyével készített oldatait. Folyékony gyógyszerkészítményként előállíthatunk olyan gyógyszerformát is, amely vizes polietilénglikollal készített oldat.

Az orális beadásra szánt vizes oldatokat úgy állíthatjuk elő, hogy a hatóanyagot vízben feloldjuk, majd kívánt esetben megfelelő színezőanyagot, ízjavító szert, stabilizálószer és sűrítőanyagot adunk az oldathoz. Az orálisan alkalmazható vizes



szuszpenziók előállításánál a finom eloszlású hatóanyagot vizkózus anyagokkal, például természetes vagy szintetikus mézgákkal, gyantákkal, metil-cellulózzal, (karboxi-metil)-cellulóz-nátrium-sóval vagy más, a gyógyszerkészítésben általánosan ismert szuszpendálószerekkel együtt vízben diszpergáljuk.

Előnyösen a gyógyszerkészítmények egységnyi dózisokat tartalmazó gyógyszerformák. Ilyen esetben a készítményt egységekre osztott részek alkotják, és minden egység a megfelelő mennyiségű hatóanyagot tartalmazza. Az egységnyi dózist tartalmazó gyógyszerforma lehet kisserelt készítmény, ahol is egy-egy csomag különálló részekre osztva tartalmazza a készítmény meghatározott mennyiségét, ilyen például a kisserelt tabletta, kapszula, por-ampulla vagy injekciós ampulla. Az egységnyi dózist tartalmazó készítmény lehet azonfelül egy kapszula, ostyatok vagy tabletta maga, vagy lehet megfelelő számú darab ezekből az itt felsorolt gyógyszerformákból.

Az itt következő részben a találmány szerinti vegyületekkel elvégzett biológiai vizsgálatokat ismertetjük.

In vitro kísérletek

Sejtenyészet

A) Klónozott humán μ -, δ - és κ -receptorokat expresszáló és neomicin-rezisztens humán 293S sejteket tenyésztünk 37 °C-on, 5% szén-dioxidot tartalmazó atmoszférában, rázólabdikokban, kalciummentes DMEM tápoldatban, amelynek az összetétele: 10% magzati borjúsérum (FBS), 5% szarvasmarha-borjúsérum (BCS), 0,1% Pluronic F-68 és 600 μ g/ml geneticin.

B) Egér- és patkányagyakat megmérünk, majd jéghideg, eti-

lén-diamin-tetraecetsavat (EDTA, 2,5 mM) tartalmazó, foszfáttal pufferolt fiziológiás nátrium-klorid-oldattal (PBS) megmosunk. Az agyakat ezután egy Polytron készüléket használva, jéghideg lízis-pufferoldattal [50 mM Tris, pH = 7,5; 2,5 mM EDTA; közvetlenül a felhasználás előtt α -toluolszulfonil-fluorid dimetil-szulfoxid-etanol oldószerkeleggyel készített 0,5 M törzsoldatából 0,5 mM koncentrációnak megfelelő mennyiség hozzáadva] egér esetében 15 másodpercig, patkány esetében 30 percig homogenizáljuk.

Membránpreparátum

A sejteket kiülepítjük, majd lízis-pufferoldatban [50 mM Tris, pH = 7,0; 2,5 mM EDTA; közvetlenül a felhasználás előtt 0,1 M etanolos törzsoldat formájában 0,1 mM koncentrációnak megfelelő mennyiségű α -toluolszulfonil-fluoridot (PMSF) adunk az oldathoz] újra felfuszpendáljuk, a szuszpenziót 15 percig jégen inkubáljuk, azután 30 másodpercig homogenizáljuk. Ezt követően a szuszpenziót 4 °C-on 1000 g-vel (max) 10 percig centrifugáljuk, a felülúszót jégen félretesszük, majd a pelletet ismét felfuszpendáljuk és a fent leírttal azonos módon újból centrifugáljuk. A két centrifugálás során kapott felülúszót egyesítjük, azután 46 000 g-vel (max) 30 percig centrifugáljuk. A kiülepedett részeket ezúttal is újból felfuszpendáljuk hideg Tris-pufferoldatban (50 mM Tris/Cl, pH = 7,0), ismételten centrifugáljuk a szuszpenziót, végül az így kapott pelletet membrán-pufferoldatban (50 mM Tris, 0,32 M szacharóz, pH = 7,0) szuszpendáljuk fel. Ebből a szuszpenzióból 1 ml térfogatú mintákat veszünk ki, ezeket polipropilén csövekben etanolos szárazjéggel lefagyaszt-

juk, majd felhasználásig -70°C -on tároljuk. A fehérjekoncentrációt egy módosított Lowry-assay módszert alkalmazva, dodecilszulfát-nátrium-sóval (SDS) határozzuk meg.

Kötődési vizsgálatok

A membránpreparátumot 37°C -ra felengedjük, majd jégre helyezve lehűtjük, háromszor egymás után átnyomatjuk egy 25-ös méretű injekciós tűn, végül mérési pufferoldattal [50 mM Tris, 3 mM magnézium-klorid, 1 mg/ml BSA (Sigma A-7888), $\text{pH} = 7,4$; az oldatot 4°C -on tároljuk, és miután egy 0,22 m szűrőn megszűrtük, közvetlenül a felhasználás előtt frissen hozzáadunk 5 $\mu\text{g/ml}$ aprotinint, 10 μM besztatint és 10 μM diprotin A-t, ditiotreit (DTT) azonban nem tartalmazhat] meghígítjuk. 100 μl térfogatú adagokat mérünk ki 12 x 75 mm méretű, jéggel hűtött polipropilén csövekbe, amelyek 100 μl megfelelő radioligandot és 100 μl különböző koncentrációjú, a vizsgálati anyagból készített oldatot tartalmaznak. A teljes kötődést (TB), illetve a nonspecifikus kötődést (NS) 10 μM naloxon távollétében, illetve jelenlétében határozzuk meg. A csövek tartalmát örvénymozgású keverővel (vortex) összekeverjük, utána 25°C -on 60-75 percig inkubáljuk, majd legalább 2 óra hosszáig 0,1%-os poli(etilén-imin)-nel előkezelt GF/B szűrőn (Whatman), vákuumot alkalmazva gyorsan megszűrjük, és a szűrőt csövenként számítva mintegy 12 ml jéghideg mosó-pufferoldattal [50 mM Tris, $\text{pH} = 7,0$; 3 mM magnézium-klorid] átmoszuk. A szűrőn visszamaradt radioaktivitást (dpm), miután a szűrőket 6-7 ml szcintillációs folyadékot tartalmazó miniküvet-tába helyezve legalább 12 órán át áztattuk, egy béta-számlálóban megmérjük. Ha a méréshez 96 kísérleti helyes

titrálótálcát használunk, 96 helyes, előzőleg poli(etilén-imin)-nel kezelt szűrőtálcán végezzük a szűrést, majd egy-egy szűrőt háromszor 1 ml mosópufferoldattal átmosva, a tálcát szárítószekrényben, 55 °C-on, 2 óra hosszat szárítjuk. A szűrőtálca által visszatartott radioaktivitást kísérleti helyenként 50 µl MS-20 szcintillációs folyadék hozzáadása után, egy Top Count (Packard) készülékben határozzuk meg.

Funkcionális vizsgálatok

A vegyületek agonista hatásának megállapítása végett meghatározzuk, hogy a vegyület-receptor komplex milyen mértékű aktivitást fejt ki a guanozin-trifoszfátnak (GTP) a receptorral összekapcsolt G-fehérjékhez való kötődésére. Ebben a vizsgálatban a GTP[γ]³⁵S radioindikátort a vizsgálati anyagokkal és a klónozott humán opioid receptorokat expresszáló HEK-293S sejtekből származó membránpreparátummal vagy a homogenizált patkány- és egéragyakkal hozzuk érintkezésbe, mivel az agonisták stimulálják a GTP[γ]³⁵S kötődését ezekhez a sejtmembránokhoz. A vegyületekre vonatkozó EC₅₀- és E_{max}-értékeket a dózis-hatás görbék alapján határozzuk meg. A delta-agonista naltrindollal elvégezve a vizsgálatot azt tapasztaltuk, hogy a dózis-hatás görbe jobbra tolódik el, ami megerősíti, hogy az agonista hatást a delta-receptorok közvetítik.

GTP-kötődési vizsgálat patkányaggyal

A patkányagy-membránpreparátumot 37 °C-ra felengedjük, majd háromszor egymás után átnyomatjuk egy 25-ös méretű, tompa hegyű injekciós tűn, végül mérési pufferoldattal [50 mM Hepes, 20 mM nátrium-hidroxid, 100 mM nátrium-klorid, 1 mM EDTA, 5 mM magnézium-klorid, pH = 7,4; frissen hozzáadva 1 mM ditiotreit (DTT)

és 0,1% BSA] meghígítjuk. Ezt követően még 120 μM végső koncentrációnak megfelelő mennyiségű guanozin-difoszfátot (GDP) adunk a hígított membránpreparátumhoz, és egy titrálótálca lyukaiba 300 μl térfogatú, 20 μg membránfehérjét tartalmazó adagokat mérünk be, ezekhez lyukanként 100 000–130 000 dpm aktivitású (0,11–0,14 nM) GTP[γ]³⁵S radioindikátort adunk, majd 10 pontos dózis-hatás görbéket veszünk fel, hogy megállapítsuk az EC_{50} - és E_{max} -értékeket. Az alapértéknek megfelelő és a maximális stimulált kötődést 3 μM SNC-80 távollétében, illetve jelenlétében határozzuk meg.

A mérési adatok feldolgozása

A specifikus kötődést (SB) úgy számítjuk ki, hogy a teljes kötődésre kapott értékből kivonjuk a nonspecifikus kötődés értékét: TB-NS, majd a különböző vizsgálati anyagok jelenlétében kapott specifikus kötődési értékeket a kontrol SB értékének százalékában fejezzük ki. Az IC_{50} -értékeket és az adott ligandra érvényes Hill-koeficienst (n_H) a specifikusan kötött radioligand leszorítására vonatkozóan logit ábrázolással szerkesztett görbe vagy illesztési programok — ilyenek például a következők: Ligand, GraphPad Prism, SigmaPlot és ReceptorFit — segítségével, míg a K_i értékeit a Cheng—Prussoff-egyenletből számítjuk ki. Minden egyes vizsgált ligandra vonatkozóan legalább három leszorítási görbét vettünk fel, és ezekből végeztük el a számításokat, amelyek eredményeképpen megkaptuk az IC_{50} , K_i és n_H átlagait, valamint a szórást. A találmány szerinti vegyületek biológiai aktivitására vonatkozó adatokat a 2. táblázat tartalmazza.

2. táblázat:

Biológiai adatok

Pld.	HDELTA (nM)			Patkányagy (nM)		Egéragy (nM)	
	IC ₅₀	EC ₅₀	%E _{Max}	EC ₅₀	%E _{Max}	EC ₅₀	%E _{Max}
1-11	0,36- -1,45	0,26- -0,91	91-97	0,85- -7,28	95-170	0,88- 6,28	96-163

Receptor telítési kísérletek

Sejtmembránon elvégeztük a kötődési vizsgálatot a megfelelő radioligand becsült K_8 -értékeinek 0,2-5-szörös (ha a radioligand mennyisége lehetővé tette, 0,2-10-szeres) koncentrációi mellett, és így meghatároztuk a radioligandok K_8 -értékeit. A radioligandra vonatkozó specifikus kötődést pmol/mg membránfehérje egységekben fejeztük ki. Az egyes kísérletek során érvényes K_8 - és B_{max} -értékeket egyoldali modell alkalmazásával, a specifikusan kötött (B) radioligand mennyiségét a nM-ban kifejezett szabad radioligand (F) mennyiségének függvényében ábrázolva, nemlineáris illesztéssel kapjuk.

Mechano-allodynia meghatározása Frey-teszt segítségével

A vizsgálatot mindig 8 és 16 óra között, a Chaplan és munkatársai (1994) által leírt módszert követve végeztük, ennek menete a következő: A patkányokat olyan plexiüveg ketrecekbe helyezük, amelyeknek az alja dróthálóból készült, és így azon keresztül az állatok lába hozzáférhetővé válik, majd mintegy 10-15 perces hozzászokási periódust engedélyezünk. A vizsgálatokhoz a bal hátsó láb középső talprésze szolgál felületként, kikerülve a kevésbé érzékeny talprészeket. A vizsgálat abból áll, hogy a talpat logaritmikusan növekvő merevségű (0,41, 0,69, 1,20, 2,04,

3,63, 5,50, 8,51 és 15,14 g; Stoelting, Ill, USA) Frey-féle sörtesorozat egy-egy tagjával megérintjük. Ez az ingerlés mindig alulról, a hálószövésű aljzaton keresztül, a talpi felületre merőlegesen történik, olyan erővel, hogy a sörte nekifeszülve a talpnak kissé elhajoljon, az időtartama hozzávetőleg 6-8 másodperc. Pozitív a válasz, ha az állat a lábát hirtelen visszahúzza. Ugyancsak pozitív válaszként értékeljük, ha a sörte elvételekor az állat azonnal összerándul. A járkálást viszont kétértelmű válasznak fogadjuk el, ilyen esetben az ingerlést megismételjük.

A vizsgálat kivitelezése

Az állatokat a Freund-féle komplett adjuvánssal (FCA) kezelt csoportban a műtétet követő első napon vetjük alá a vizsgálatnak. Az 50%-os visszahúzási küszöböt Dixon (1980) eljárása szerint, az úgynevezett fel-le módszerrel határozzuk meg, így az ingerlést a sorozat közepén elhelyezkedő, 2,04 g merevségű sörtevel kezdjük. A következő ingerlést vagy a sorban felette, vagy a sorban alatta álló sörtevel végezzük. A haladás iránya attól függ, hogy az állat miként reagált az ingerre. A láb visszahúzásával járó válasz elmaradása esetén a kezdetben használt sörte által okozottnál erősebb ingerlést végzünk, ha pedig az állat a kezdetben alkalmazott ingerre a láb visszahúzásával reagál, a legközelebbi gyengébb ingerlésre alkalmas sörtét választjuk. Az optimális küszöb-megállapításhoz ezzel a módszerrel 6 válasz szükséges közvetlenül az 50%-os küszöb szomszédságában, és a számlálást akkor kezdjük, amikor az első ellentétes választ tapasztaljuk, azaz a küszöböt első alkalommal léptük át. Azokban az esetekben, amikor a küszöb kívül esik az ingerlés tartomá-

nyán, a 15,14-es (normális érzékenység) vagy 0,41-es (maximális fájdalomérzet) jelöléseket alkalmazzuk. A vizsgálat eredményeképpen kapott válaszokat táblázatba foglaljuk, amelyben X jelet kap az ingerre adott negatív válasz (nincs visszahúzás), és O jelet kap a pozitív válasz (van visszahúzás), majd az 50%-os visszahúzási küszöböt interpolációval állapítjuk meg, a következő képlet alapján:

$$50\text{-os küszöb} = 10^{(X_f + k\delta)} / 10\ 000$$

ahol a képletben X_f = az utolsóként alkalmazott Frey-féle sörte értéke (log egységekben); k = táblázatból vett érték (lásd Chaplan et al., 1994) a pozitív/negatív válaszok rendszeréből adódóan; és δ = az ingerek erőssége közötti átlagos különbség (log egységekben). Itt $\delta = 0,224$.

A Frey-féle küszöbértéket Chaplan és munkatársai (1994) szerint átalakítottuk a maximális pozitív hatás százalékában kifejezett értéké (%MPE), ezt a számítást a következő egyenlet segítségével végeztük:

$$\%MPE = \frac{\text{kezelt küszöb (g)} - \text{allodynia küszöb (g)}}{\text{kontrol küszöb (g)} - \text{allodynia küszöb (g)}} \times 100$$

A vizsgálati anyag beadása

A patkányok injekció formájában (szubkután, intraperitoneális vagy intravénás) vagy orálisan kapták a vizsgálati anyagot a Frey-teszt megkezdése előtt. A hatóanyag beadása és a vizsgálat megkezdése között eltelt időt a vizsgálati anyag sajátosságaitól függően változtattuk.

Writhing-teszt

A writhing-teszt néven ismert vizsgálati módszer abból áll, hogy egereknek intraperitoneálisan ecetsavat adunk be, ami abdominális görcsös összehúzódásokat, úgynevezett writhing-reflexet vált ki. Ennek az egész testre kiterjedő jellegzetes mozgássémának a gyakoriságát a fájdalomcsökkentő hatóanyagok beadása csökkenti, vagyis ha a megfigyelésünk ezt támasztja alá, akkor az illető kísérleti anyagot potenciálisan jó gyógyszerjelöltnek tekinthetjük.

A writhing-reflexként aposztrofált mozgásséma csak akkor nevezhető teljesnek és tipikusnak, ha megfigyelhetők a következő elemek: az állat nem változtatja a helyét; a hát alsó része kissé benyomott; plantáris nézetből mindkét láb megfigyelhető. Ebben a vizsgálatban a találmány szerinti vegyületek orálisan beadott 1-100 $\mu\text{mol/kg}$ -os dózisa a writhing-reflex szignifikáns gátlását okozzák.

i) Oldatok készítése

Ecetsav: 120 μl ecetsavat adunk 19,88 ml desztillált vízhez, aminek eredményeképpen 20 ml 0,6%-os ecetsavoldatot kapunk. Az oldatot örvénymozgású keverővel (vortex) összekeverjük, így készen áll arra, hogy befecskendezzük.

Vizsgálati anyag: Az előállított vegyületeket a legalkalmasabb vivőközegben, a standard eljárást követve oldjuk fel.

ii) Az oldatok beadása

A vizsgálati anyagot orálisan, valamint intraperitoneális (i.p.), szubkután (s.c.) vagy intravénás (i.v.) injekció formájában, a vegyület tulajdonságaitól függően a vizsgálat megkezdé-

se előtt 20, 30 vagy 40 perccel, az egerek átlagos testtömegére számítva 10 ml/kg mennyiségű oldatként adjuk be. Olyan esetben, amikor a centrálisan alkalmazott anyag hatását akarjuk vizsgálni, intraventrikulárisan (i.c.v.) vagy intratekálisan (i.t.) 5 μ l a beadott térfogat.

Az ecetsavat közvetlenül a vizsgálat megkezdése előtt, két helyen, az egerek átlagos testtömegére számítva 10 ml/kg mennyiségű oldatként, intraperitoneálisan (i.p.) fecskendezzük az állatokba.

iii) A teszt kivitelezése

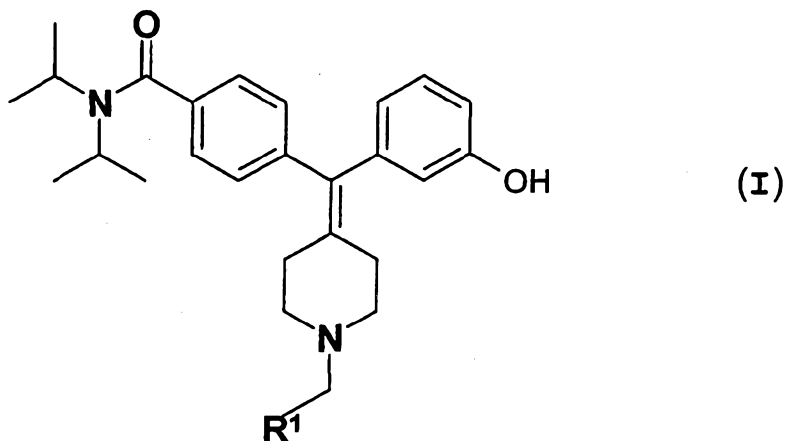
Az állatokat 20 percig tartjuk megfigyelés alatt, és közben feljegyezzük a writhing-reflexnek nevezett görcsös mozgások számát, majd ezeket a kísérlet végén összesítjük. Az egyenként elkülönített egereket úgynevezett "cipősdoboz" ketrecben, az alommal érintkezve tartjuk. Egyidejűleg általában 4 állattal végezzük a kísérletet, ezek közül egy állat kontrollként szolgál, a többi három pedig vizsgálati anyaggal kezelt.

A szorongás és a szorongáshoz hasonló indikáció esetére a hatásosságot a Geller—Seifert-féle conflict-tesztben, patkányokon állapítjuk meg.

A funkcionális gastrointesztinális zavarokra vonatkozó indikáció esetére a hatásosságot patkányokon, a szakirodalomban leírt vizsgálati módszert [S.V. Coutinho et al.: American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology **282**(2), G307-16 (2002)] követve állapítjuk meg.

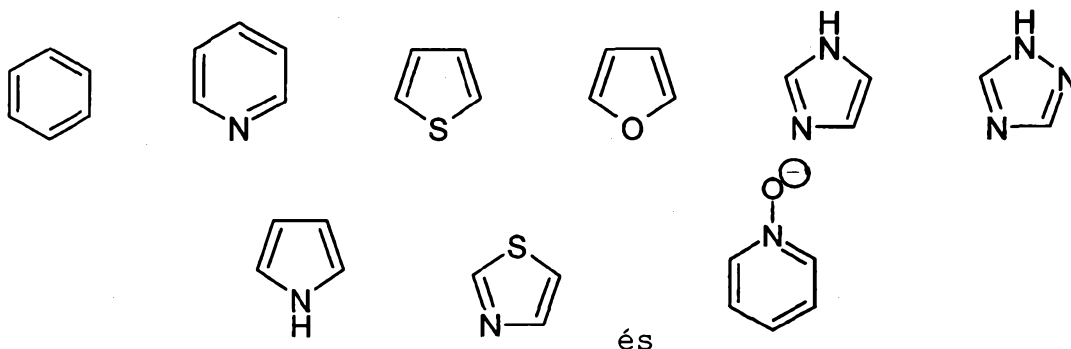
Szabadalmi igénypontok

1. Az



általános képletű vegyületek — a képletben

R¹ jelentése a



képletekkel ábrázolható vegyületekből származtatható fenil-, piridil-, tienil-, furil-, imidazolil-, triazolil-, pirrolil-, tiazolil- vagy N-oxido-piridinil-csoport, amely csoportokban a benzolgyűrű vagy heteroaromás gyűrű bármely helyzetben, mindentől függetlenül 1, 2 vagy 3 szubsztituenst hordozhat, és a szubsztituensek egymástól függetlenül egyenes vagy elágazó láncú 1-6 szénatomos alkil-, nitro-, trifluor-metil- vagy 1-6 szénatomos alkoxicsoport, valamint klór-, fluor-, bróm- vagy jódatom közül kerülhetnek ki —

és sóik.

2. Az 1. igénypont szerinti vegyületek, amelyek képletében az R^1 szimbólum jelentésének megfelelő csoportban a benzolgyűrű vagy a heteroaromás gyűrű mindentől függetlenül 1, 2 vagy 3 szubsztituenszt hordozhat, és a szubsztituensek egymástól függetlenül metil- vagy trifluor-metil-csoport, valamint klór-, fluor-, bróm- vagy jódatom közül kerülhetnek ki.

3. Az 1. igénypont szerinti vegyületek, amelyek képletében az R^1 jelentésének megfelelő csoportban a benzolgyűrű vagy a heteroaromás gyűrű mindentől függetlenül egy metilcsoporttal szubsztituált.

4. Az 1. igénypont szerinti vegyületek, amelyek képletében R^1 jelentése fenil-, pirrolil-, piridil-, tienil- vagy furilcsoport.

5. Az 1. igénypont szerinti

4-[(1-benzil-piperidin-4-ilidén)-(3-hidroxi-fenil)-metil]-
-N,N-diizopropil-benzamid;

4-[(3-hidroxi-fenil)-(1-[(2-tienil)-metil]-piperidin-4-
-ilidén)-metil]-N,N-diizopropil-benzamid;

4-[(3-hidroxi-fenil)-(1-[(3-tienil)-metil]-piperidin-4-
-ilidén)-metil]-N,N-diizopropil-benzamid;

4-[(3-hidroxi-fenil)-(1-[(4-piridil)-metil]-piperidin-4-
-ilidén)-metil]-N,N-diizopropil-benzamid;

4-[(3-hidroxi-fenil)-(1-[(2-piridil)-metil]-piperidin-4-
-ilidén)-metil]-N,N-diizopropil-benzamid;

4-[(1-[(2-furil)-metil]-piperidin-4-ilidén)-(3-hidroxi-
-fenil)-metil]-N,N-diizopropil-benzamid;

4-[(3-hidroxi-fenil)-(1-[(2-tiazolil)-metil]-piperidin-4-
-ilidén)-metil]-N,N-diizopropil-benzamid;

4-[(3-hidroxi-fenil)-{1-[(1H-imidazol-2-il)-metil]-piperidin-4-ilidén}-metil]-N,N-diizopropil-benzamid;

4-{[1-(4-bróm-benzil)-piperidin-4-ilidén]-(3-hidroxi-fenil)-metil}-N,N-diizopropil-benzamid;

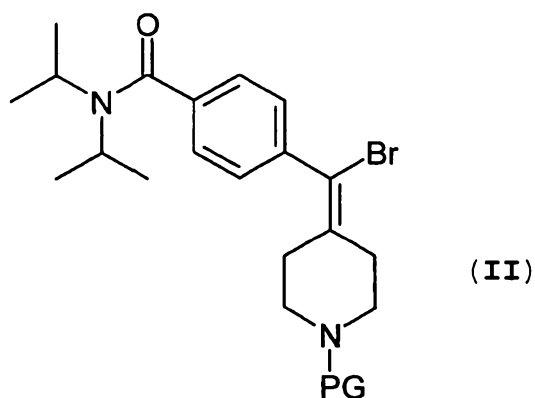
4-[(3-hidroxi-fenil)-{1-[(1-pirrolil)-metil]-piperidin-4-ilidén}-metil]-N,N-diizopropil-benzamid;

4-{(3-hidroxi-fenil)-[1-(4-metoxi-benzil)-piperidin-4-ilidén]-metil}-N,N-diizopropil-benzamid; és

4-[[1-[(3-furil)-metil]-piperidin-4-ilidén]-(3-hidroxi-fenil)-metil]-N,N-diizopropil-benzamid;

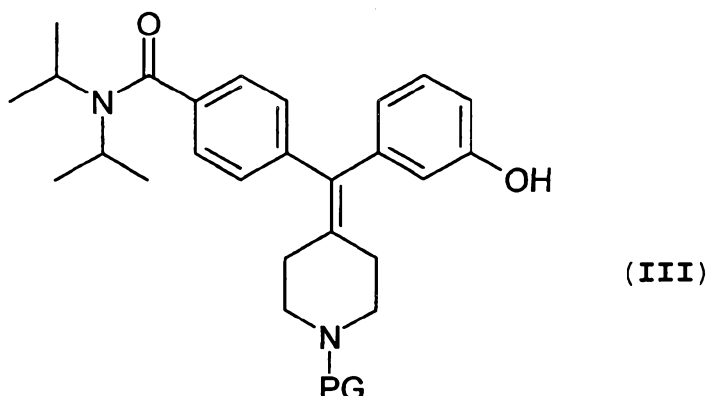
6. Az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti vegyületek hidroklorid-, dihidroklorid-, szulfát-, tartarát-, bisz(trifluor-acetát)- vagy citrátsó formájában.

7. Eljárás az (I) általános képletű vegyületek előállítására, azzal jellemezve, hogy egy



általános képletű vegyületet — amelynek képletében PG jelentése egy uretánt képező védőcsoport, például (terc-butoxi)-karbonil- vagy (benzil-oxi)-karbonil-csoport (Boc vagy CBZ) vagy benzil- vagy szubsztituált benzil-, például 2,4-dimetoxi-benzil-csoport — valamilyen palládium(0)-katalizátort, például [tetrakisz-(trifenil-foszfin)-palládium(0)] komplexet alkalmazva, bázis, például nátri-

um-karbonát jelenlétében 3-hidroxi-fenil-bórsavval egy



általános képletű vegyületté reagáltatunk, majd a szokásos módon eltávolítjuk a védőcsoportot, és az így kapott köztiterméket egy R^1 -CHO általános képletű vegyülettel redukzív körülmények között a megfelelő (I) általános képletű vegyületté alkilezzük.

8. Az 1. igénypont szerinti vegyületek a gyógyászatban való alkalmazásra.

9. Az 1. igénypont szerinti vegyületek fájdalom kezelésére való alkalmazásra.

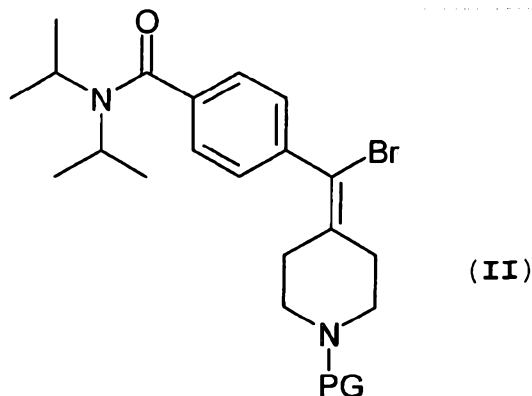
10. Gyógyszerkészítmény, amely hatóanyagként egy 1. igénypont szerinti (I) általános képletű vegyületet tartalmaz gyógyszerészetileg elfogadható hordozóval kombinálva.

11. Az 1. igénypont szerinti (I) általános képletű vegyületek alkalmazása fájdalomcsillapításra szolgáló gyógyszerkészítmény előállítására.

12. Az 1. igénypont szerinti (I) általános képletű vegyületek alkalmazása gasztrointesztinális rendellenességek kezelésére szolgáló gyógyszerkészítmény előállítására.

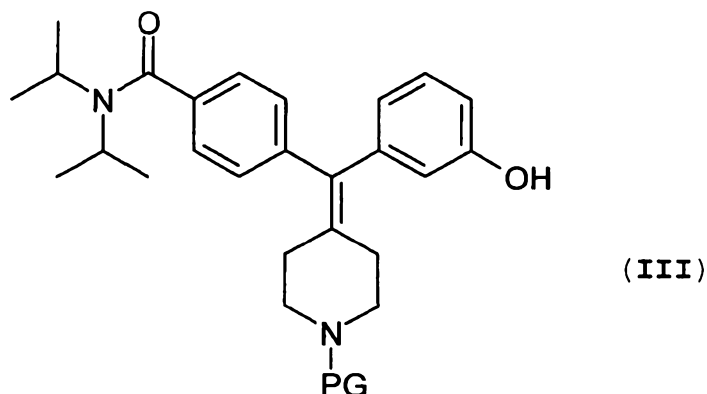
13. Az 1. igénypont szerinti (I) általános képletű vegyületek alkalmazása szorongás kezelésére szolgáló gyógyszerkészítmény előállítására.

14. A



általános képletű vegyületek, amelyek képletében PG jelentése uretánt képező védőcsoport, például (terc-butoxi)-karbonil- vagy (benzil-oxi)-karbonil-csoport (Boc vagy CBZ) vagy benzil- vagy szubsztituált benzil-, például 2,4-dimetoxi-benzil-csoport.

15. A



általános képletű vegyületek, amelyek képletében PG jelentése uretánt képező védőcsoport, például (terc-butoxi)-karbonil- vagy (benzil-oxi)-karbonil-csoport (Boc vagy CBZ) vagy benzil- vagy szubsztituált benzil-, például 2,4-dimetoxi-benzil-csoport.

A meghatalmazott:

Ráthonyi Zoltán

szabadalmi ügyvivő

az S.B.G. & K. Szabadalmi Ügyvivői Iroda
tagjaH-1062 Budapest, Andrásy út 113.
Telefon: 461-1000 Fax: 461-1099

ragz nélkül

2004. 09. 22.

TK