



УКРАЇНА

(19) UA (11) 85575 (13) C2

(51) МПК (2009)

A61K 31/445

C07D 211/68 (2006.01)

C07D 401/04 (2006.01)

C07D 401/10 (2006.01)

C07D 401/14 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) 4-АРИЛПІПЕРИДИНИ

1

2

(21) а200608045

(22) 13.01.2005

(24) 10.02.2009

(86) PCT/US2005/001131, 13.01.2005

(31) 10/757,962

(32) 14.01.2004

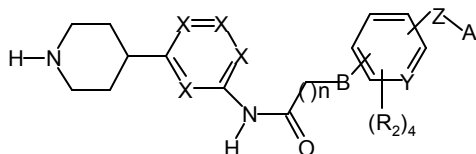
(33) US

(46) 10.02.2009, Бюл.№ 3, 2009 р.

(72) МАРЗАБАДІ МОХАМЕД АР., ВЕТЗЕЛЬ ДЖОН
М., ЧЕН ЧІЕН-АН, ДЕЛЕОН ДЖОН І., ДЖИАНГ Ю,
ЛУ КАЙ

(73) Х. ЛУННБЕК А/С

(56) WO 2004005257

(57) 1. Сполуки, що мають загальну структурну
формулу:де кожний Х являє собою незалежно CR₁ або N, за
умови, що, коли один Х являє собою N, тоді інші Х
являють собою CR₁;кожний R₁ являє собою незалежно -H, -F, -Cl, -Br, -
I, -CN, -NO₂, C₁-C₇алкіл, алкілокси, монофторалкіл
або поліфторалкіл з прямим або розгалуженим
ланцюгом або C₃-C₆циклоалкіл-C₁-C₇алкіл;кожний R₂ являє собою незалежно -H, -F, -Cl, -Br, -
I, -CN, -NO₂ або C₁-C₇алкіл, монофторалкіл або
поліфторалкіл з прямим або розгалуженим ланцю-
гом;

n - це ціле число від 2 до 6 включно;

В являє собою CH₂, CHOH, O або CO;

Y являє собою C або N;

Z являє собою O, S, SO, SO₂, CH₂, CO, CHOH або
відсутній;та А являє собою феніл або піридиніл, де феніл
або піридиніл необов'язково заміщений трьома
або менше R₂;

або їх фармацевтично прийнятні солі.

2. Сполука за п. 1, де n дорівнює 2 або 3.

3. Сполука за п. 2, де кожний R₁ являє собою не-
залежно -H, -F, -Cl, C₁-C₄алкіл або алкокси з пря-
мим або розгалуженим ланцюгом або C₃-
C₆циклоалкіл-C₁-C₄алкіл.4. Сполука за п. 3, де кожний R₂ являє собою не-
залежно -H, -F, -Cl або C₁-C₄алкіл, монофторалкіл
або поліфторалкіл з прямим або розгалуженим
ланцюгом.

5. Сполука за п. 4, де один Х являє собою N.

6. Сполука за п. 4, де кожний Х являє собою CR₁.7. Сполука за п. 6, де А являє собою піридиніл,
необов'язково заміщений трьома або менше R₂.8. Сполука за п. 6, де А являє собою феніл, не-
обов'язково заміщений трьома або менше R₂.9. Сполука за п. 8, де Z являє собою S, SO або
SO₂.10. Сполука за п. 8, де Z являє собою CH₂, CO або
CHOH.11. Сполука за п. 8, де Z являє собою O або відсу-
тній.12. Сполука за п. 11, де В являє собою CH₂.

13. Сполука за п. 12, де Z являє собою O.

14. Сполука за п. 13, де сполука вибрана з групи,
яка складається з:5-(2-феноксифеніл)-N-(3-(4-
піперидил)феніл)пентанаміду;N-(4-метил-3-(4-піперидил)феніл)-5-(2-
феноксифеніл)пентанаміду;N-(4-фтор-3-(4-піперидил)феніл)-5-(2-
феноксифеніл)пентанаміду;N-(2-фтор-5-(4-піперидил)феніл)-5-(2-
феноксифеніл)пентанаміду таN-(2-фтор-4-метил-5-(4-піперидил)феніл)-5-(2-
феноксифеніл)пентанаміду.

15. Сполука за п. 12, де Z відсутній.

16. Сполука за п. 15, де сполука вибрана з групи,
яка складається з:N-(4-метил-3-(4-піперидил)феніл)-5-(4-
фенілфеніл)пентанаміду;N-(2-фтор-5-(4-піперидил)феніл)-5-(4-
фенілфеніл)пентанаміду;N-(2-фтор-4-метил-5-(4-піперидил)феніл)-5-(4-
фенілфеніл)пентанаміду та

(13) C2

(11) 85575

(19) UA

N-(4-фтор-3-(4-піперидил)феніл)-5-(4-фенілфеніл)пентанаміду.

17. Сполука за п. 11, де В являє собою СО.

18. Сполука за п. 17, де Z відсутній.

19. Сполука за п. 18, де сполука вибрана з групи, яка складається з:

N-(4-фтор-3-(4-піперидил)феніл)-4-оксо-4-(4-фенілфеніл)бутанаміду;

N-(2-фтор-5-(4-піперидил)феніл)-4-оксо-4-(4-фенілфеніл)бутанаміду;

N-(4-фтор-3-(4-піперидил)феніл)-5-оксо-5-(4-фенілфеніл)пентанаміду;

5-оксо-5-(4-фенілфеніл)-N-(3-(4-піперидил)феніл)пентанаміду;

N-(4-метил-3-(4-піперидил)феніл)-5-оксо-5-(4-фенілфеніл)пентанаміду;

N-(2-фтор-5-(4-піперидил)феніл)-5-оксо-5-(4-фенілфеніл)пентанаміду та

N-(2,4-дифтор-5-(4-піперидил)феніл)-4-оксо-4-(4-фенілфеніл)бутанаміду.

20. Сполука за п. 1, де сполука є енантімерно чистою.

21. Сполука за п. 1, де сполука є діастереомерно чистою.

22. Фармацевтична композиція, яка містить терапевтично ефективну кількість сполуки за п. 1 та фармацевтично прийнятний носій.

23. Спосіб виготовлення фармацевтичної композиції, при якому змішують сполуку за п. 1 та фармацевтично прийнятний носій.

24. Спосіб лікування суб'єкта, що страждає на афективний розлад, вибраний з групи, яка складається з депресії, головного епізоду депресії, біполярного розладу, агорафобії, специфічної фобії, соціальної фобії, obsесивно-компульсивного розладу, посттравматичного стресового розладу, гострого стресового розладу та тривоги, при якому суб'єктові вводять терапевтично ефективну кількість сполуки за п. 1.

25. Спосіб лікування суб'єкта, що страждає на сечовий розлад, вибраний з групи, яка складається з нетримання сечі, нетримання позиву, частого сечовипускання, невідкладного позиву до сечовипускання, ніктурії або енурезу, при якому суб'єктові вводять терапевтично ефективну кількість сполуки за п. 1.

26. Спосіб лікування суб'єкта, що страждає на розлад харчової поведінки, вибраний з групи, яка складається з ожиріння, булімії, невротичної булімії або невротичної анорексії, при якому суб'єктові вводять терапевтично ефективну кількість сполуки за п. 1.

Цей винахід стосується 4-арилпіперидинів та споріднених гетероциклічних сполук як терапевтичних агентів для лікування фізіологічних хвороб, таких як певні психіатричні стани, включаючи, але не обмежуючись тільки ними, депресію та тривогу. Крім того, терапевтичний агент цього винаходу можна застосовувати для лікування ожиріння або нетримання позиву.

Меланін-концентрувальний гормон (MCH) - це циклічний нейропептид, який спочатку виділили зі слизистої лосося (гольця) [Kawauchi et al., 1983]. Про ідентифікацію зв'язаного з G-білком рецептора MCH публікувалося [Chambers et al., 1999; Saito et al., 1999]. Ці групи ідентифікували MCH як ендогенний ліганд зв'язаного з людським сирітським G-білком рецептора SLC-1 [Lakaye et al., 1998]. Завдяки цьому відкриттю виявили, що MCH ссавців (19 амінокислот) є високо консервативний у пацюків, мишей і людини, демонструючи 100% амінокислотну ідентичність. Повідомлялося, що щурячий гомолог цього рецептора, який зараз називається MCH1, локалізується у ділянках мозку щурів.

У наших дослідженнях антагоністи MCH1 були оцінені на декількох тваринних моделях, про які добре відомо, що завдяки їм можна передбачати ефективність сполук у людей, дивись [Bogowsky, V., et al. (2002)]. Ці експерименти дозволяють припустити, що антагоністи MCH1 можуть бути корисними для лікування депресії та/або тривоги. Після картування зв'язувальних сайтів для [(3) H] SNAP-7941, селективного та сильного антагоніста MCH1 у мозку щурів, ми оцінили його ефекти на ряді поведінкових моделей. SNAP-7941 демонстрував ефекти, подібні до ефектів під час клінічного за-

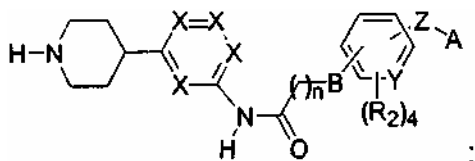
стосування антидепресантів та анксиолітиків, на трьох тваринних моделях депресії/тривоги: тест примусового плавання щурів, тест соціальної взаємодії та тести голосової реакції на відділення від матері у морських свинок. Ці спостереження дозволяють припустити, що антагоніст MCH1 можна застосовувати для лікування депресії та/або тривоги.

Крім того, у недавніх доповідях щодо фенотипу MCH1-нокаутованих мишей повідомлялося про можливий зв'язок між MCH1 та впливом MCH на харчування. Двома групами незалежно було показано [Marsh et al, 2002, Chen et al, 2002], що задаче руйнування гена рецептора MCH-1 (MCH-1-нокаут) у мишей, приводило до того, що тварини страждали на гіперфагію, але були худими і мали знижену масу тіла у порівнянні з диким типом того ж приплоду. Зниження маси тіла зв'язували з підвищенням метаболізму. У кожній групі було показано, що миші з MCH-1-нокаутом стійкі до ожиріння, викликаному режимом харчування, і що вони мають ту ж масу, що і миші того ж приплоду, які знаходяться на звичайному режимі харчування.

Синтетичні молекули-антагоністи рецептора MCH-1 були описані у літературі. [Bednarek зі співавторами (2002)] повідомляли про синтез високоафінних пептидних антагоністів MCH-1. Дрібна молекула-антагоніст MCH1 була описана [Takekawa et al. (2002)].

У наших лабораторіях ми відкрили дрібні молекули, які є антагоністами рецептора MCH1. Отже, сполуки цього винаходу можна застосовувати для лікування станів, перелічених вище.

Отже, цей винахід стосується сполук, що мають структуру:



де кожний X являє собою незалежно CR₁ або N за умовою, що коли один X являє собою N, тоді інші X являють собою CR₁;

де кожний R₁ являє собою незалежно -H, -F, -Cl, -Br, -I, -CN, -NO₂, C₁-C₇ алкіл, алкілокси, монофторалкіл або поліфторалкіл з прямим або розгалуженим ланцюгом або C₃-C₆ циклоалкіл-C₁-C₇ алкіл;

де кожний R₂ являє собою незалежно -H, -F, -Cl, -Br, -I, -CN, -NO₂ або C₁-C₇ алкіл, монофторалкіл або поліфторалкіл з прямим або розгалуженим ланцюгом;

де n - це ціле число від 2 до 6 включно;

де B являє собою CH₂, CHOH, O або CO;

де Y являє собою C або N;

де Z являє собою O, S, SO, SO₂, CH₂, CO, CHOH або відсутній

та де A являє собою феніл або гетероарил, де феніл або гетероарил необов'язково заміщений трьома або менше R₂;

або їх фармацевтично прийнятних солей.

В одному варіанті здійснення винаходу сполука вибрана з однієї або більше специфічних сполук, описаних у розділі "Докладний опис винаходу".

В одному варіанті здійснення цього винаходу сполука є енантімерно чистою. В іншому варіанті здійснення винаходу сполука є діастереомерно чистою. У ще одному варіанті здійснення винаходу сполука є енантімерно та діастереомерно чистою.

Цей винахід далі пропонує фармацевтичну композицію, яка містить терапевтично ефективну кількість сполуки цього винаходу та фармацевтично прийнятний носій.

Цей винахід далі пропонує фармацевтичну композицію, яка виготовлена шляхом змішування сполуки цього винаходу та фармацевтично прийнятного носія.

Цей винахід також пропонує спосіб виготовлення фармацевтичної композиції, який передбачає змішування сполуки цього винаходу та фармацевтично прийнятного носія.

Винахід далі пропонує спосіб лікування суб'єкта, що страждає на афективний розлад, вибраний з групи, яка складається з депресії, головного епізоду депресії, біполярного розладу, агорафобії, специфічної фобії, соціальної фобії, обсесивно-компульсивного розладу, посттравматичного стресового розладу, гострого стресового розладу та тривоги, який передбачає введення суб'єктові терапевтично ефективної кількості сполуки винаходу. В окремому варіанті здійснення винаходу розлад - це депресія або тривога.

Крім того, винахід далі пропонує спосіб лікування суб'єкта, що страждає на сечовий розлад,

вибраний з групи, яка складається з нетримання сечі, нетримання позиву (нетримання сечі при сильному позиві), частого сечовипускання, невідкладного позиву до сечовипускання, ніктурії або енурезу, який передбачає введення суб'єктові терапевтично ефективної кількості сполуки винаходу. В окремому варіанті здійснення винаходу розлад - це нетримання позиву.

Винахід далі пропонує спосіб лікування суб'єкта, що страждає на розлад харчової поведінки, вибраний з групи, яка складається з ожиріння, булімії, невротичної булімії або невротичної анорексії, який передбачає введення пацієнтові терапевтично ефективної кількості сполуки винаходу. В окремому варіанті здійснення винаходу розлад - це ожиріння.

У цьому винаході термін "C₁-C₇ алкіл з прямим або розгалуженим ланцюгом" означає насичений вуглеводень, що має від одного до семи атомів вуглецю включно. Приклади таких замісників включають, проте не обмежуються тільки ними, метил, етил, 1-пропіл, 2-пропіл, 1-бутил, 2-бутил, 2-метил-2-пропіл та 2-метил-1-пропіл. Термін "C₁-C₇ алкілокси з прямим або розгалуженим ланцюгом" означає насичену алкокси-групу, що має від одного до семи атомів вуглецю включно з відкритою валентністю на кисні. Приклади таких замісників включають, проте не обмежуються тільки ними, метокси, стокси, n-бутокси тощо. Термін "C₃-C₆ циклоалкіл-C₁-C₇ алкіл" означає насичений алкільний вуглеводень, заміщений моноциклічним карбоциклічним кільцем, що має від трьох до семи атомів вуглецю, приєднаних через C₁-C₇ алкілову складову. Приклади таких замісників включають, проте не обмежуються тільки ними, циклопропіл-метил, циклопентил-етил, циклогексил-n-пропіл тощо.

Як застосовується у цьому описі, термін "гетероарил" включає ненасичені кільця з п'яти та шести членів, які містять один або декілька атомів кисню, сірки або азоту. Приклади гетероарильних груп включають, проте не обмежуються тільки ними, фураніл, тієніл, піроліл, оксазоліл, тіазоліл, імідазоліл, піразоліл, ізоксазоліл, ізотіазоліл, оксадіазоліл, триазоліл, тіадіазоліл, піридил, піридиніл, піридазиніл, піримідиніл, піразиніл та триазиніл.

Винахід пропонує кожний чистий стереоізомер будь-якої сполуки, описаної у цьому описі винаходу. Такі стереоізомери можуть включати енантіомери, діастереомери або E-або Z-алкенові або імінові ізомери. Винахід також пропонує стереоізомерні суміші, включаючи рацемічні суміші, діастереомерні суміші або E/Z ізомерні суміші. Стереоізомери можна синтезувати у чистій формі [Nógrádi, M.; Stereo selective Synthesis, (1987) VCH Editor Ebel, H., та Asymmetric Synthesis, Volumes 3 B 5, (1983) Academic Press, Editor Morrison, J.] або їх можна розділити рядом способів, такими як способи кристалізації та хроматографії [Jaques, J.; Collet, A.; Wilen, S.; Enantiomer, Racemates, and Resolutions, 1981, John Wiley and Sons, та Asymmetric Synthesis, Vol. 2, 1983, Academic Press, Editor Morrison, J.]. Крім того, сполуки цього винаходу можна представити у вигляді суміші енантіомерів, діастереомерів або ізомерів. Крім того, дві

або декілька сполук можуть утворювати рацемічну або діастереомерну суміш.

Сполуки цього винаходу є чистими переважно на 80%, більш переважно на 90% та найбільш переважно на 95%. У цей винахід включені фармацевтично прийнятні солі та комплекси усіх сполук, описаних у цьому описі. Кислоти та основи, з яких готуються ці солі, включають, проте не обмежуються тільки ними, кислоти та основи, перелічені у цьому описі. Кислоти включають, проте не обмежуються тільки ними, наступні неорганічні кислоти: хлористоводневу кислоту, бромистоводневу кислоту, йодистоводневу кислоту, сірчану кислоту та борну кислоту. Кислоти включають, проте не обмежуються тільки ними, наступні органічні кислоти: оцтову кислоту, малонову кислоту, бурштинову кислоту, фумарову кислоту, винну кислоту, малеїнову кислоту, лимонну кислоту, метансульфонову кислоту, бензойну кислоту, гліколеву кислоту, молочну кислоту та мигдалеву кислоту. Основи включають, проте не обмежуються тільки ними, аміак, метиламін, етиламін, пропіламін, диметиламін, діетиламін, триметиламін, триетиламін, етилендіамін, гідроксиетиламін, морфолін, піперазин та гуанідин. Цей винахід далі пропонує гідрати та поліморфи усіх сполук, описаних у цьому описі.

Цей винахід включає у межах свого обсягу проліки сполук винаходу. Взагалі, такі проліки будуть являти собою функціональні похідні сполук винаходу, які можуть легко перетворюватися *in vivo* на необхідну сполуку. Отже, у цьому винаході, термін "введення" буде охоплювати лікування різних станів, які описано, сполукою, яку специфічно описано, або сполукою, яка може не бути специфічно описаною, але яка перетворюється на специфічну сполуку *in vivo* після введення пацієнтові. Традиційні способи вибору та приготування похідних придатних проліків описано, наприклад, у [Design of Prodrugs, ed. Bongaard, Elsevier, 1985]. Цей винахід далі включає метаболіти сполук цього винаходу. Метаболіти включають активні зразки, що утворюються після введення сполук цього винаходу у біологічне середовище.

З посиланням на розділ "Суть винаходу", цей винахід пропонує фармацевтичну композицію, яка містить терапевтично ефективну кількість сполуки винаходу та фармацевтично прийнятний носій. В одному варіанті здійснення кількість сполуки становить від приблизно 0,01мг до приблизно 800мг. В іншому варіанті здійснення кількість сполуки становить від приблизно 0,01мг до приблизно 500мг. У ще іншому варіанті здійснення кількість сполуки становить від приблизно 0,1мг до приблизно 250мг. В іншому варіанті здійснення кількість сполуки становить від приблизно 0,1мг до приблизно 60мг. У ще іншому варіанті здійснення кількість сполуки становить від приблизно 1мг до приблизно 20мг. У подальшому варіанті здійснення носій - це рідина, а композиція - це розчин. В іншому варіанті здійснення носій - це тверда речовина, а композиція - це таблетка. В іншому варіанті здійснення носій - це гель, а композиція - це капсула, супозиторій або крем. У подальшому варіанті здійснення сполука може бути виготовленою як частина фармацевтично прийнятного трансдермального пластиру. У ще подальшому варіанті

здійснення сполуку можна вводити суб'єктові за допомогою спрею або інгалятора. Цей винахід також пропонує фармацевтичну композицію, яка виготовлена шляхом змішування терапевтично ефективної кількості сполуки цього винаходу та фармацевтично прийнятного носія. Цей винахід пропонує спосіб виготовлення фармацевтичної композиції, який передбачає змішування терапевтично ефективної кількості сполуки цього винаходу та фармацевтично прийнятного носія.

Твердий носій може включати одну або декілька речовин, які можуть також діяти як ендогенні носії (наприклад, поживний або мікропофівний носій), ароматизатори, змащувальні речовини, солюбілізатори, суспендувальні агенти, наповнювачі, ковзні агенти, ущільнювальні добавки, зв'язувальні агенти або дезінтегратори таблеток; ним також може бути інкапсулювальний матеріал. У порошках носій є дрібнодиспергованою твердою речовиною, що знаходиться в суміші з дрібнодиспергованим активним інгредієнтом. У таблетках активний інгредієнт змішаний з носієм, який має необхідні властивості щодо пресування, у придатних пропорціях і спресований до потрібної форми та розміру. Порошки і таблетки переважно містять до 99% активного інгредієнта. Придатні тверді носії включають, наприклад, фосфат кальцію, стеарат магнію, тальк, цукри, лактозу, декстрин, крохмаль, желатин, целюлозу, полівінілпіролідін, віск з низькою точкою плавлення та іонно-обмінні полімери.

Рідкі носії застосовуються для приготування розчинів, суспензій, емульсій, сиропів, еліксирів та герметизованих композицій. Активний інгредієнт можна розчинити або суспендувати у фармацевтично придатному рідкому носії, такому як вода, органічний розчинник, їх суміш, або фармацевтично прийнятні олії, або жири. Рідкий носій може містити інші придатні фармацевтичні добавки, такі як солюбілізатори, емульгатори, буфери, консерванти, підсолоджувачі, ароматизатори, суспендувальні агенти, загусники, барвники, регулятори в'язкості, стабілізатори або регулятори осмосу. Придатні приклади рідких носіїв для перорального та парентерального введення включають воду (яка частково містить добавки, описані вище, наприклад, похідні целюлози, переважно розчин натрієвої солі карбоксиметилцелюлози), спирти (включаючи одноатомні спирти та багатоатомні спирти, наприклад, гліколи) та їх похідні, та олії (наприклад, фракціоновані кокосову олію та арахісову олію). Для парентерального введення носій може також являти собою естер жирної кислоти, такий як етилолеат або ізопропілміристат. Стерильні рідкі носії є застосовними у стерильних рідких композиціях для парентерального введення. Рідкий носій для герметизованих композицій може бути галогенованим вуглеводнем або іншим фармацевтично прийнятним диспергатором.

Рідкі фармацевтичні композиції, які являють собою стерильні розчини або суспензії, можна застосовувати шляхом, наприклад, внутрішньом'язової, інтратекальної, епідуральної, інтраперитонеальної або підшкірної ін'єкції. Стерильні розчини можна також вводити шляхом внутрішньої ін'єкції. Сполуки можна приготувати у вигляді стерильної твердої композиції, яку можна розчинити або су-

спендувати безпосередньо перед введенням, застосовуючи стерильну воду, фізіологічний розчин або інше відповідне стерильне середовище для ін'єкцій. Передбачається, що носії включають необхідні та інертні зв'язувальні агенти, суспендувальні агенти, змашувальні речовини, ароматизатори, підсолоджувачі, консерванти, барвники та покривні речовини. Сполуку можна вводити перорально у формі стерильного розчину або суспензії, що містить інші розчинники або суспендувальні агенти (наприклад, достатню кількість фізіологічного розчину або глюкози для надання розчину ізотонічності), солі жовчних кислот, гуміарабік, желатин, сорбітанмонолеат, полісорбат 80 (олеатні естери сорбіту та його ангідриди, сополімеризовані з етиленоксидом) тощо.

Сполуку можна також вводити перорально як у формі рідкої композиції, так і у формі твердої композиції. Композиції, придатні для перорального введення, включають тверді форми, такі як пілюлі, капсули, гранули, таблетки та порошки, та рідкі форми, такі як розчини, сиропи, еліксири та суспензії. Форми, корисні для парентерального введення, включають стерильні розчини, емульсії та суспензії. Оптимальну дозу, яку слід вводити, може визначити фахівець у галузі, та вона буде різнитися залежно від певної сполуки, яку застосовують, сили препарату, режиму введення та розвитку стану хвороби. Додаткові фактори, що залежать від певного суб'єкта, якого лікують, будуть зумовлювати необхідність регулювання дози. Ці фактори включають вік суб'єкта, його вагу, стать, режим харчування та час введення. Під час застосування для суб'єкта, "терапевтично ефективна кількість" - це будь-яка кількість сполуки, яка, коли вона введена суб'єктові, що страждає на захворювання, проти якої сполуки є ефективними, спричиняє ослаблення, ремісію або регресію захворювання. У виразі "застосування до суб'єкта" "суб'єкт" - це хребетна тварина, ссавець або людина.

Цей винахід пропонує спосіб лікування надмірно активного сечового міхура з симптомами нетримання сечі, нетримання позиву, невідкладного позиву до сечовипускання та/або частого сечовипускання у суб'єкта, який передбачає введення суб'єктові кількості сполуки винаходу, що є ефективною для лікування надмірно активного сечового міхура суб'єкта. Цей винахід також пропонує спосіб полегшення стану нетримання сечі або нетримання позиву у суб'єкта, що страждає на надмірно активний сечовий міхур, який передбачає введення суб'єктові кількості сполуки винаходу, що є ефективною для полегшення стану нетримання сечі або нетримання позиву у суб'єкта. Цей винахід далі пропонує спосіб полегшення стану невідкладного позиву до сечовипускання у суб'єкта, що страждає на надмірно активний сечовий міхур, який передбачає введення суб'єктові кількості сполуки винаходу, що є ефективною для полегшення стану невідкладного позиву до сечовипускання у суб'єкта. Крім того, цей винахід далі пропонує спосіб полегшення стану частого сечовипускання у суб'єкта, що страждає на надмірно активний сечовий міхур, який включає введення суб'єктові кількості сполуки винаходу, що є

ефективною для полегшення стану частого сечовипускання у суб'єкта. Цей винахід також пропонує спосіб лікування суб'єкта, що страждає на сечовий розлад, який включає введення суб'єктові кількості сполуки винаходу, що є ефективною для лікування сечового розладу у суб'єкта. У деяких варіантах здійснення сечовий розлад - це нетримання сечі, надмірно активний сечовий міхур, нетримання позиву, часте сечовипускання, невідкладний позив до сечовипускання, ноктурія або енурез. Надмірно активний сечовий міхур та невідкладний позив до сечовипускання можуть бути або можуть не бути пов'язаними з доброякісною гіперплазією простати. Цей винахід пропонує спосіб ослаблення симптомів розладу, який є сприйнятливим до лікування антагонізмом, що викликається рецептором MCH1, у суб'єкта, який включає введення суб'єктові кількості антагоністу MCH1, що є ефективною для ослаблення симптомів, де антагоніст MCH1 - це будь-яка сполука винаходу.

В одному варіанті здійснення винаходу суб'єкт - це хребетна тварина, ссавець, людина або собака. В іншому варіанті здійснення сполуку вводять перорально. В іще іншому варіанті здійснення сполуку вводять у комбінації з їжею. Цей винахід пропонує спосіб модифікації харчової поведінки суб'єкта, який передбачає введення суб'єктові кількості сполуки винаходу, що є ефективною для зменшення споживання їжі суб'єктом. Цей винахід також пропонує спосіб лікування розладу харчової поведінки у суб'єкта, який передбачає введення суб'єктові кількості сполуки винаходу, що є ефективною для зменшення споживання їжі суб'єктом. У варіанті здійснення цього винаходу розлад харчової поведінки - це булімія, ожиріння або невротична булімія. У варіанті здійснення цього винаходу суб'єкт - це хребетна тварина, ссавець, людина або собака. У подальшому варіанті здійснення сполуку вводять у комбінації з їжею. Цей винахід далі пропонує спосіб зниження ваги тіла суб'єкта, який передбачає введення суб'єктові кількості сполуки винаходу, що є ефективною для зниження ваги тіла суб'єкта.

Цей винахід також пропонує спосіб лікування суб'єкта, що страждає на головний епізод депресивного розладу, дистимічний розлад, біполярні розлади I та II, шизафективний розлад, когнітивні розлади з депресивним настроєм, розлади особистості, інсомнію, гіперсомнію, нарколепсію, порушення циркадного ритму, страждання на кошмари, приступи інтенсивного страху під час сну, сомнамбулізм, обсесивно-компульсивний розлад, панічний розлад з агорафобією або без неї, посттравматичний стресовий розлад, соціальний тривожний розлад, соціальні фобії та генералізований тривожний розлад. Цей винахід також пропонує спосіб лікування суб'єкта, що страждає на депресію, який передбачає введення суб'єктові кількості сполуки цього винаходу, що є ефективною для лікування депресії у суб'єкта. Цей винахід далі пропонує спосіб лікування суб'єкта, що страждає на тривогу, який передбачає введення суб'єктові кількості сполуки цього винаходу, що є ефективною для лікування тривоги у суб'єкта. Цей винахід також пропонує спосіб лікування суб'єкта, що страждає на депресію та тривогу, який перед-

бачає введення суб'єктові кількості сполуки цього винаходу, що є ефективною для лікування депресії та тривоги у суб'єкта.

Крім того, винахід пропонує певні варіанти здійснення цього винаходу.

В одному варіанті здійснення n - це ціле число від 2 до 5 включно. В іншому варіанті здійснення n дорівнює 2 або 3.

В одному варіанті здійснення кожний R_1 являє собою незалежно -H, -F, -Cl, C_1 - C_4 алкіл або алкокси з прямим або розгалуженим ланцюгом або C_3 - C_6 циклоалкіл- C_1 - C_4 алкіл.

В одному варіанті здійснення, кожний R_2 являє собою незалежно -H, -F, -Cl або C_1 - C_4 алкіл, монофторалкіл або поліфторалкіл з прямим або розгалуженим ланцюгом.

В одному варіанті здійснення один X являє собою N.

В одному варіанті здійснення кожний X являє собою CR_1 .

В одному варіанті здійснення A являє собою піридиніл, необов'язково заміщений трьома або менше R_2 .

В одному варіанті здійснення A являє собою тієніл, необов'язково заміщений трьома або менше R_2 .

В одному варіанті здійснення A являє собою фураніл, необов'язково заміщений трьома або менше R_2 .

В одному варіанті здійснення A являє собою тіазоліл, необов'язково заміщений трьома або менше R_2 .

В одному варіанті здійснення A являє собою імідазоліл, необов'язково заміщений трьома або менше R_2 .

В одному варіанті здійснення A являє собою піразоліл, необов'язково заміщений трьома або менше R_2 .

В одному варіанті здійснення A являє собою оксазоліл, необов'язково заміщений трьома або менше R_2 .

В одному варіанті здійснення A являє собою триазиніл, необов'язково заміщений трьома або менше R_2 .

В одному варіанті здійснення A являє собою феніл, необов'язково заміщений трьома або менше R_2 .

В одному варіанті здійснення Z являє собою S, SO або SO_2 .

В одному варіанті здійснення Z являє собою CH_2 , CO або $CHOH$.

В одному варіанті здійснення Z являє собою O або відсутній.

В одному варіанті здійснення V являє собою CH_2 .

В одному варіанті здійснення Z являє собою O.

В одному варіанті здійснення Z відсутній.

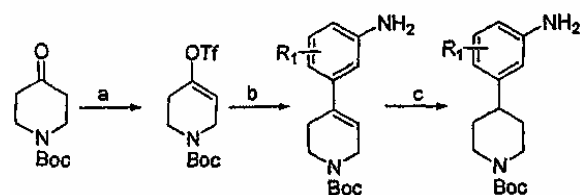
В одному варіанті здійснення V являє собою CO.

В одному варіанті здійснення Z відсутній.

Винахід буде краще зрозумілим завдяки наступним експериментальним деталям. Проте, фахівець у галузі легко зрозуміє, що специфічні способи та результати, які описано у цьому описі винаходу, тільки ілюструють винахід, який більш повно описаний у формулі винаходу, яка додається до цього опису.

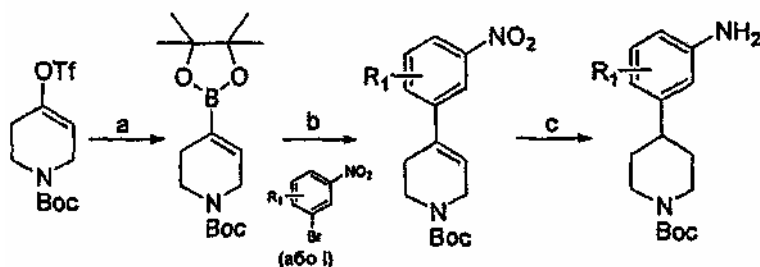
I. Схеми синтезу

Схема 1



(a) LDA/ $PhNTf_2$ / THF/ $-78^\circ C$, потім $0^\circ C$ протягом ночі. (b) Амінофенілборонова кислота/ $Pd(PPh)_4$ / LiCl/ Na_2CO_3 / DME- H_2O / кип'ятіння у колбі зі зворотним холодильником протягом 3 годин, (c) 10% Pd/C / H_2 / EtOH/ при кімнатній температурі протягом 24-48 годин.

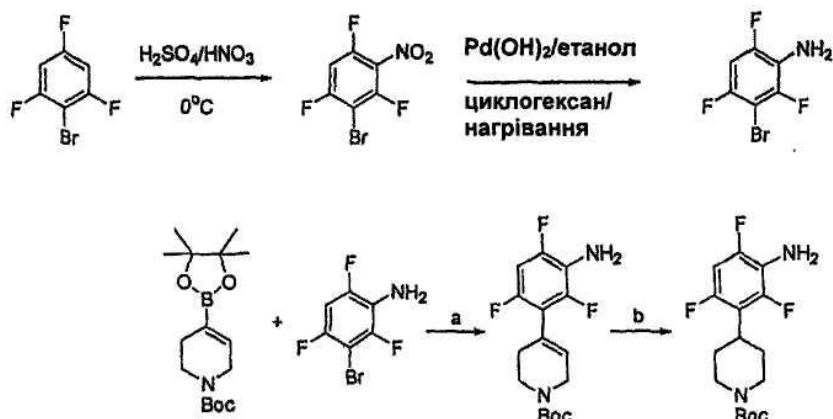
Схема 2



(a) Біс(пінаколато)дибор/ KOAc/ $PdCl_2dppf$ / $dppf$ / $80^\circ C$ протягом ночі.

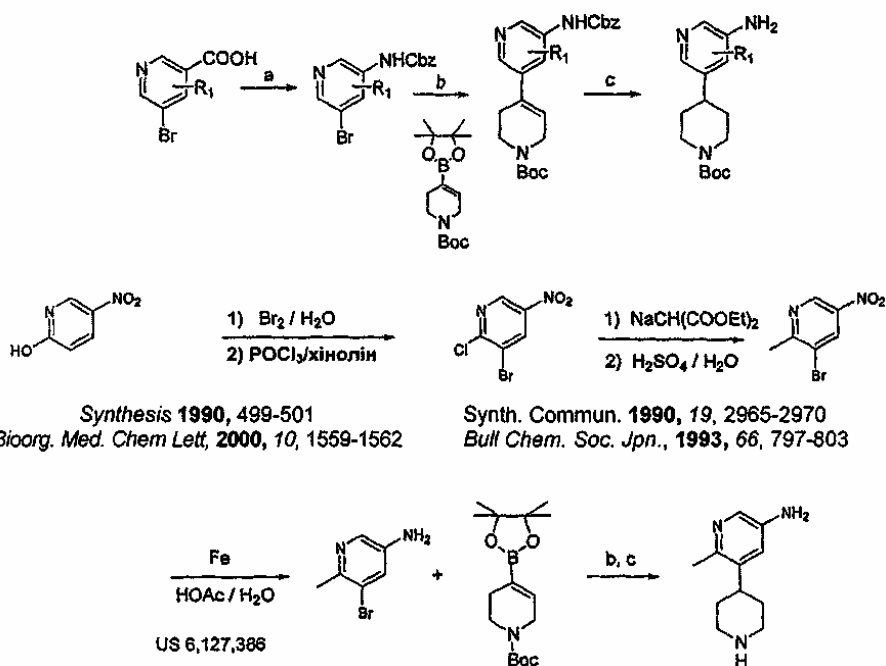
(b) K_2CO_3 / $PdCl_2dppf$ / DMF/ $80^\circ C$ протягом ночі, (c) 10% Pd/C / H_2 / EtOH/ кімнатна температура протягом 24-72 годин.

Схема 3



(a) K_2CO_3 / $PdCl_2dppf$ / DMF/ $80^\circ C$ протягом ночі, (b) 10% Pd/C / H_2 / HO Ac/ кімнатна температура протягом 24-72 годин.

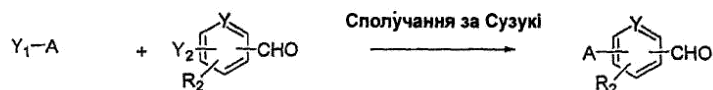
Схема 4



(a) DPPA/ Et_3N / $BnOH$ / толуол, кип'ятили у колбі зі зворотним холодильником протягом ночі. (b) K_2CO_3 / $PdCl_2dppf$ / DMF/ $80^\circ C$ протягом ночі, (c) 10% Pd/C / H_2 / EtOAc/ кімнатна температура протягом 24-72 годин.

Схема 5

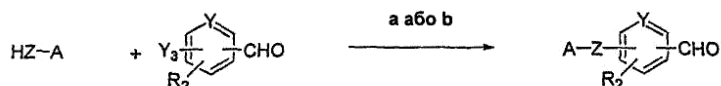
Синтез біарилу



$Y_1=Br, I, OTf$; $Y_2=B(OH)_2$ або боронат

$Y_1=B(OH)_2$ або боронат; $Y_2=Br, I, OTf$

Синтез діарилового етеру/тіоетеру

Y₃=галоген;

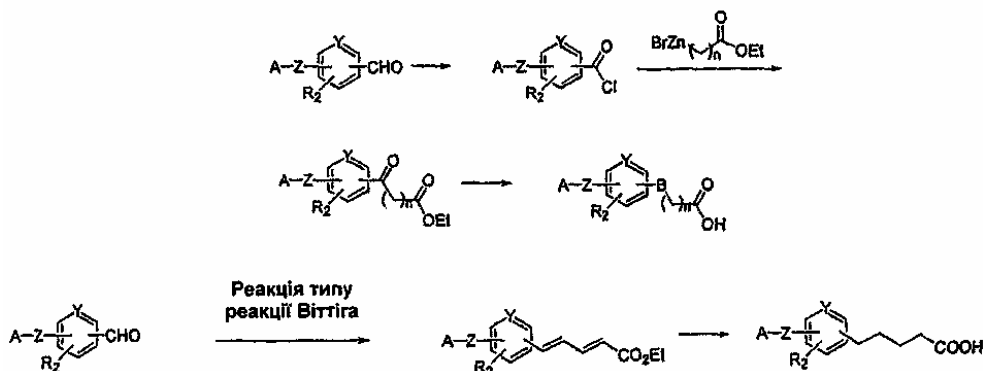
(а) Основа/ DMF/ нагрівання, (b) сполучання за допомогою паладію або Cu.

Для синтезу біфенілу, діарилового етеру та діарилового тіоетеру початкові матеріали є доступними з комерційних джерел, або альтернативно їх можна приготувати з різноманітних проміжних сполук, відомих фахівцям у цій галузі. Додаткову інформацію можна знайти у наступних

джерелах: [Suzuki, 1995, Chem. Rev. 95, 2457; Suzuki, 1999, J. Organomet Chem. 576(1-2), 147-168; Schopfer, 2001, Tetrahedron, 57, 3069-3073; Venkataraman, 2002, Org. Lett. 16,2803-2806; Hartwig, 1998, Angew. Chem. Int. Ed. 37,2046-2067, та в інших публікаціях, на які зроблено тут посилання].

Схема 6

Для біарилів, біарилового етеру/тіоетерів

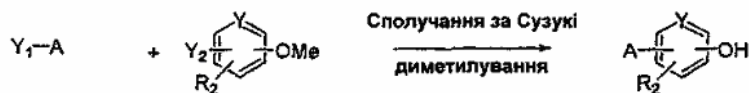


Для органоцинкових реагентів початкові матеріали є доступними з комерційних джерел, або альтернативно їх можна приготувати з різноманітних проміжних сполук, відомих фахівцям у цій галузі. Додаткову інформацію можна знайти у наступних джерелах: [Rieke, 1991, J. Org. Chem. 56,1445; Rieke, 1997, Tetrahedron 53,1925, та в інших публікаціях, на які зроблено тут посилання].

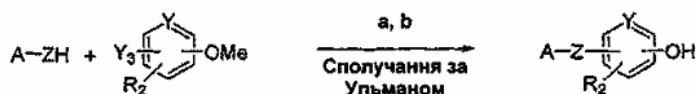
Для реакцій типу реакції Віттіга (Wittig) початкові матеріали є доступними з комерційних джерел, або альтернативно їх можна приготувати з різноманітних проміжних сполук, відомих фахівцям у цій галузі. Додаткову інформацію можна знайти у наступних джерелах: [Fesik, 1997, J. Med. Chem. 40, 3144-3150, та в інших публікаціях, на які зроблено тут посилання].

Схема 7

Синтез біфенілу

Y₁=Br, I, OTf; Y₂=B(OH)₂ або боронатY₁=B(OH)₂ або боронат; Y₂=Br, I, OTf

Синтез діарилового етеру/тіоетеру

Y₃=галоген; ZH=OH, SH

(a) $\text{CuCl}/\text{Cs}_2\text{CO}_3/2,2,6,6\text{-тетраметилгептан-3,5-діон}$ (b) $\text{HBr}/\text{CH}_3\text{COOH}$ або $\text{BBr}_3/\text{CH}_2\text{Cl}_2$.

Для синтезу біфенілу, діарилового етеру та діарилового тіоетеру початкові матеріали є доступними з комерційних джерел, або альтернативно їх можна приготувати з різноманітних проміжних сполук, відомих фахівцям у цій галузі. Додаткову інформацію можна знайти у наступних джерелах: [Suzuki, 1995, Chem. Rev. 95,2457; Suzuki, 1999, J. Organomet. Chem. 576(1-2), 147-168; Schopfer, 2001, Tetrahedron, 57, 3069-3073; Venkataraman, 2002, Org. Lett. 16, 2803-2806;

Hartwig, 1998, Angew. Chem. Int. Ed. 37, 2046-2067, та в інших публікаціях, на які зроблено тут посилання].

Для синтезу сполучанням за Ульманом (Ullmann) початкові матеріали є доступними з комерційних джерел, або альтернативно їх можна приготувати з різноманітних проміжних сполук, відомих фахівцям у цій галузі. Додаткову інформацію можна знайти у наступних джерелах: [Song, 2002, Org. Lett. 4,1623-1626, та в інших публікаціях, на які зроблено тут посилання].

Схема 8

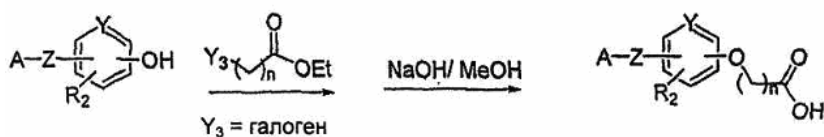
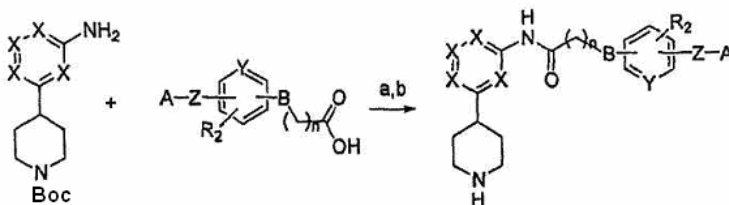


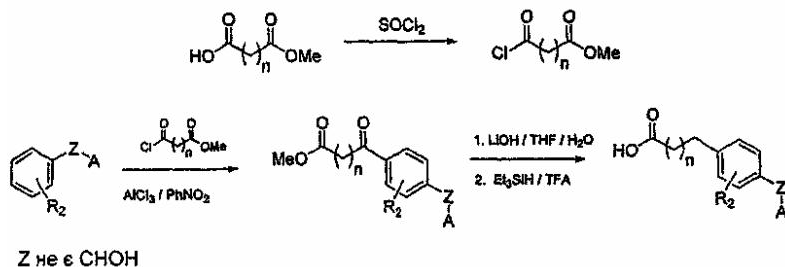
Схема 9



(a) $\text{EDC}/\text{DMAP}/\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}$ при кімнатній температурі протягом 24 годин, (b) 4M HCl у 1,4-діоксані/кімнатна температура протягом 1 години

або $\text{TFA}/\text{CH}_2\text{Cl}_2/$ кімнатна температура протягом 1-2 годин.

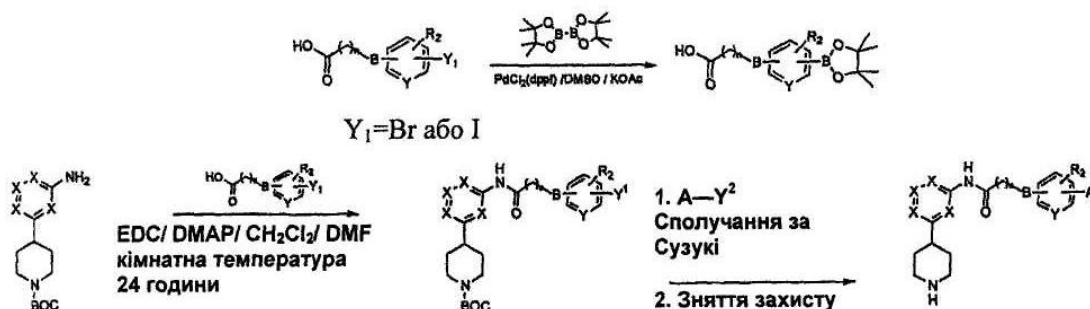
Схема 10



Біарилові проміжні матеріали, що застосовуються у Схемі 9, можна альтернативно синтезувати шляхом Friedel-Crafts, застосовуючи акти-

вані карбонові кислоти та біарилові системи, як показано на Схемі 10.

Схема 11



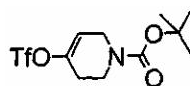
Біарили, показані на Схемі 11, можна синтезувати шляхом сполучання за Сузукі (Suzuki), застосовуючи боронові кислоти/боронати та арильні галіди/трифлати, як показано на Схемі 11.

II. Детальний синтез прикладів речовин

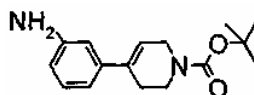
Наступні приклади призначені для ілюстрації способів, застосованих для виготовлення сполук винаходу.

Загальні способи: Усі реакції здійснювали в атмосфері азоту, а реагенти, без розчинника або у відповідних розчинниках, переносили у реакційну судину за допомогою шприца та канюлі. Безводні розчинники були придбані у Aldrich Chemical Company і використовувалися такими, якими вони були одержані. Приклади сполук, описаних у патенті, назвали, застосовуючи ACD/Name Program (version 4.01, Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Ontario, M5H2L3, Canada). Спектри ^1H ЯМР та ^{13}C ЯМР записували при 300 та 75 МГц, відповідно (GE QE Plus) або при 400 та 100 МГц, відповідно (Bruker Avance) у CDCl_3 як розчиннику з тетраметилсиланом як внутрішнім стандартом, якщо інше не вказано. Хімічні зсуви (δ) виражаються у ppm (млн^{-1}), константи зв'язування (J) виражаються у Гц, та картини розщеплення описано наступним чином: c=синглет, d=дублет, t=триплет, kv=квартет, kvkv=квінтет, s=секстет, septет, u=уширений, m=мультиплет, dd=дублет дублетів, ddcc=дублет дублетів дублетів; dt=дублет триплетів; td=триплет дублетів; dm=дублет мультиплетів. Елементний аналіз виконувала фірма Robertson Microlit Laboratories, Inc. Якщо не вказано інше, мас-спектри отримали, застосовуючи іонізацію електророзпилюванням (ESMS, Micromass Platform II або Quattro Micro) та повідомляється про $(\text{M}+\text{H})^+$ або $(\text{M}-\text{H})^-$. Тонкошарову хроматографію (ТШХ) виконували на скляних пластинах, попередньо покритих силікагелем 60 F254 (0,25 мм, EM Separations Tech.). Препаративну ТШХ виконували на скляних пластинах, попередньо покритих силікагелем GF (2 мм, Analtech). Колонкову флеш-хроматографію виконували на силікагелі Merck 60 (230-400 меш). Точки плавлення (m) визначали на відкритих капілярних трубках на апараті Mel-Temp та їх не коректували. Мікрохвильові експерименти виконували, застосовуючи Biotage Emrys Optimizes або Smithcreator. Картридж елювання зв'язку: силікагелевий твердофазний екстракційний карт-

ридж Isolute з силаноловими групами на поверхні частинок силікагелю постачається Argonaut Technologies.

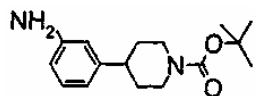


Трет-бутил 4-[[[(трифторметил)сульфоніл]окси]-3,6-дигідро-1(2H)-піридинкарбоксилат: n-бутиллітій (17,6 мл, 44,2 ммоль, 2,5 M у гексанах) додали до розчину діізопропіламіну (96,2 мл, 44,2 ммоль) у безводному тетрагідрофурані (THF) (40,0 мл) при температурі 0°C та отриману суміш перемішували протягом 20 хвилин. Реакційну суміш охолодили до -78°C та до реакційної суміші по краплях додавали трет-бутил 4-оксо-1-піперидинкарбоксилат (Aldrich Chemical Company, 7,97 г, 40,0 ммоль) у тетрагідрофурані (40,0 мл), реакційну суміш потім перемішували протягом 30 хвилин. До реакційної суміші краплями додавали Tf_2NPh (42,0 ммоль, 15,0 г) у тетрагідрофурані (40,0 мл) та реакційну суміш перемішували при 0°C протягом ночі. Реакційну суміш концентрували в умовах вакууму, знов розчинили у гексанах:EtOAc (9:1), пропустили крізь шар оксиду алюмінію та шар оксиду алюмінію промили гексанами:EtOAc (9:1). Об'єднані екстракти концентрували в умовах вакууму, внаслідок чого отримали бажаний продукт (16,5 г), який був забруднений деякою кількістю початкового матеріалу Tf_2NPh : ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,77 (с, 1H), 4,05 (дм, 2H, $J=3,0$ Гц), 3,63 (т, 2H, $J=5,7$ Гц), 2,45 (м, 2H), 1,47 (с, 9H).

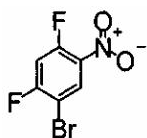


Трет-бутил 4-(3-амінофеніл)-3,6-дигідро-1(2H)-піридинкарбоксилат: дегазовану суміш 2,0 M водного розчину Na_2CO_3 (4,20 мл), трет-бутил 4-[[[(трифторметил)сульфоніл]окси]-3,6-дигідро-1(2H)-піридинкарбоксилату (0,500 г, 1,51 ммоль), гемісульфату 3-амінофенілборонові кислоти (0,393 г, 2,11 ммоль), хлориду літію (0,191 г, 4,50 ммоль) та тетракістрифенілфосфінпаладію (0,080 г, 0,075 ммоль) у диметоксигетані (5,00 мл)

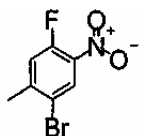
нагрівали при температурі дефлегмації протягом 3 годин в атмосфері аргону. Органічний шар охолодженої реакційної суміші відокремили та водний шар промили етилацетатом (3x50мл). Об'єднані органічні розчини висушили та концентрували у вакуумі. Сирий продукт піддали хроматографії (сілікагель, гексани:EtOAc:дихлорметан, 6:1:1 з 1% ізопропіламіном), внаслідок чого отримали бажаний продукт (0,330г, 81%). ^1H ЯМР (400МГц, CDCl_3) δ 7,12 (т, 1H, $J=7,60\text{Гц}$), 6,78 (д, 1H, $J=8,4\text{Гц}$), 6,69 (т, 1H, $J=2,0\text{Гц}$), 6,59 (дд, 1H, $J=2,2$, $8,0\text{Гц}$), 6,01 (ушир, 1H), 4,10-4,01 (д, 2H, $J=2,4\text{Гц}$), 3,61 (т, 2H, $J=5,6\text{Гц}$), 2,52-2,46 (м, 2H), 1,49 (с, 9H); ESMS m/e : 275,2 ($M+H$) $^+$. Розраховано для $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_2$: C, 70,04, H, 8,08, N, 10,21. Знайдено: C, 69,78, H, 7,80, N, 9,92.



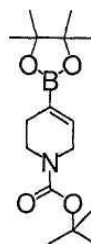
Трет-бутил 4-[3-(аміно)феніл]-4-піридинкарбоксилат: суміш трет-бутил 4-(3-амінофеніл)-3,6-дигідро-1(2H)-піридинкарбоксилату (3,10г, 11,3ммоль) та 10% Pd/C (1,00г) в етанолі (100мл) гідрували при кімнатній температурі, застосовуючи балонний спосіб, протягом 2 днів. Реакційну суміш профільтрували крізь Celite (броунмілерит) та промили етанолом. Об'єднані етанолові екстракти концентрували в умовах вакууму та залишок піддали хроматографії на сілікагелі (дихлорметан:метанол:ізопропіламін, 95:5:1), внаслідок чого отримали бажаний продукт (2,63г, 84%). ^1H ЯМР (400МГц, CDCl_3) δ 7,10 (т, 1H, $J=7,6\text{Гц}$), 6,62 (д, 1H, $J=8,4\text{Гц}$), 6,60-6,59 (м, 2H), 4,27-4,18 (м, 2H), 3,62-3,58 (м, 2H), 2,80-2,72 (м, 2H), 2,62-2,59 (м, 1H), 1,89-1,52 (м, 4H), 1,49 (с, 9H); ESMS m/e : 277,2 ($M+H$) $^+$.



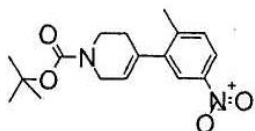
1-бром-2,4-дифтор-5-нітробензол: при 0°C до суміші 1-бром-2,4-дифторбензолу (20,0г; 11,7мл; 0,100ммоль) та H_2SO_4 (76,8мл) додавали HNO_3 (68,0мл) протягом 45 хвилин з витратою такою, щоб внутрішня температура становила <7°C. Отриману суміш перемішували протягом 1 години при 0°C, вилили у льодяну воду (400мл), сильно перемішували протягом 2-3 хвилин та екстрагували CH_2Cl_2 (400мл). Екстракт CH_2Cl_2 промили сольовим розчином (1x500мл), висушили над Na_2SO_4 , профільтрували та випаровували, внаслідок чого отримали продукт у вигляді жовтої оливи (23,5г, 95%). ^1H ЯМР (300МГц, CDCl_3) δ 7,14 (ddd, $J=0,3$, $7,8$, $9,9\text{Гц}$, 1H), 8,39 (т, $J=7,2\text{Гц}$, 1H).



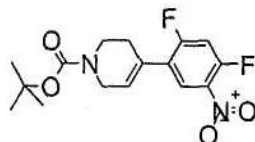
2-бром-5-фтор-4-нітротолуол: до суміші нітро-нітетрафторборату (11,6г; 87,0ммоль) та CH_2Cl_2 (60,0мл), яку кип'ятили у колбі зі зворотним холодильником, додавали 2-бром-5-фтортолуол (15,0г, 10,0мл, 79,0ммоль) протягом більше ніж 5 хвилин. Суміш перемішували при температурі дефлегмації протягом 4,5 години, охолодили та вилили у льодяну воду (150мл). Водну частину екстрагували CH_2Cl_2 (1x150мл). Об'єднані екстракти CH_2Cl_2 промили сольовим розчином (100мл), висушили над Na_2SO_4 , профільтрували та випаровували, внаслідок чого отримали 18,3г сирого продукту, який обробили гексаном та випаровували до появи кристалів. Суміш охолодили до -70°C та гексан декантували від отриманої твердої речовини. Залишок гексану видалили шляхом випаровування, внаслідок чого отримали 9,77г продукту у вигляді напівтвердої речовини (53%). Маточні розчини випаровували та очистили шляхом колонкової хроматографії (сілікагель, 2% EtOAc у гексані). Внаслідок випаровування відповідних фракцій отримали 1,0г продукту (59% взагалі). ^1H ЯМР (300МГц, CDCl_3) δ 2,48 (с, 3H), 7,20 (д, $J=11,7\text{Гц}$, 1H), 8,26 (д, $J=6,9\text{Гц}$, 1H).



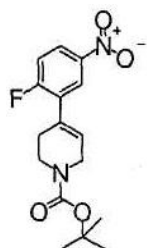
Трет-бутил 4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-діоксaborolan-2-іл)-3,6-дигідро-1(2H)-піридинкарбоксилат: до 50-мл круглодонної колби, що містила біс(пінаколато)дибор (422мг, 1,66ммоль), KOAc (444мг, 4,53ммоль), PdCl_2dppf (37,0мг, 3,00мол%) та dppf (25,0мг, 3,00мол%) додали розчин трет-бутил 4-[(трифторметил)-сульфоніл]окси-3,6-дигідро-1(2H)-піридинкарбоксилату (500мг, 1,51ммоль) у 1,4-діоксані (10,0мл) при кімнатній температурі в атмосфері аргону. Суміш нагрівали при 80°C протягом ночі. Після охолодження до кімнатної температури суміш профільтрували крізь Celite та Celite промили EtOAc (3x20 мл). Фільтрати концентрували у вакуумі. Отриманий залишок розчинили в EtOAc та промили H_2O та сольовим розчином, висушили над MgSO_4 , профільтрували та концентрували у вакуумі. Сирий продукт очистили шляхом флеш-хроматографії (EtOAc:гексан, 1:9), внаслідок чого отримали трет-бутил 4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-діоксaborolan-2-іл)-3,6-дигідро-1(2H)-піридинкарбоксилат (355мг, 76%): ^1H ЯМР (400МГц, CDCl_3) δ 6,60-6,34 (ушир, 1H), 4,06-3,86 (ушир, 2H), 3,55-3,34 (ушир, 2H), 2,35-2,09 (ушир, 2H), 1,46 (с, 9H), 1,26 (с, 12H); ESMS m/e : 310,4 ($M+H$) $^+$.



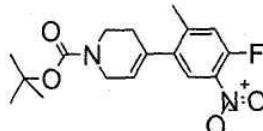
Трет-бутил 4-(5-нітро-2-метилфеніл)-3,6-дигідро-1(2H)-піридинкарбоксилат: до розчину 2-бром-1-метил-4-нітробензолу (14,0г, 64,8ммоль) та DMF (400мл) додали трет-бутил 4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-діоксаборолан-2-іл)-3,6-дигідро-1(2H)-піридинкарбоксилат (20,0г; 64,8 ммоль), K_2CO_3 (27,0г; 194ммоль) та $PdCl_2dppfCH_2Cl_2$ (3,20г; 3,90ммоль; 6мол% каталізатора). Отриману суміш нагрівали при 80°C в атмосфері азоту протягом 6 годин, охолодили до кімнатної температури, дозволили настоюватися протягом 18 годин, потім охолодили до 4°C. Воду (400мл) додавали протягом більше ніж 10 хвилин з такою витратою, щоб температура становила менше 35°C. Додали EtOAc (400мл), суміш перемішували протягом 15 хвилин та шар EtOAc видалили. Процедуру екстракції повторили з EtOAc (2X400мл). Органічні екстракти об'єднали, промили водою (800мл) та насиченим водним NaCl (320мл), профільтрували крізь шар Celite®, висушили над $MgSO_4$, профільтрували та випаровували, внаслідок чого отримали темний залишок, який очистили шляхом колонкової хроматографії (силікагель, гексан/EtOAc, 70:30). Внаслідок випаровування відповідних фракцій отримали 22,0г продукту у вигляді твердої речовини, яку застосовували на наступному етапі. 1H ЯМР (300МГц, $CDCl_3$) δ 1,50 (с, 9H), 2,30-2,39 (м, 5H), 3,64 (т, $J=5,7$ Гц, 2H), 4,03-4,08 (м, 2H), 5,60-5,66 (м, 1H), 7,31 (д, $J=8,4$ Гц, 1H), 7,95 (д, $J=2,7$ Гц, 1H), 8,01 (дд, $J=2,7, 8,4$ Гц, 1H).



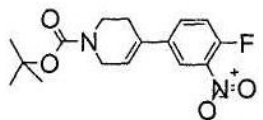
Трет-бутил 4-(5-нітро-2,4-дифторфеніл)-3,6-дигідро-1(2H)-піридинкарбоксилат: 1H ЯМР (300МГц, $CDCl_3$) δ 1,50 (с, 9H), 2,44-2,52 (м, 2H), 3,63 (т, $J=5,7$ Гц, 2H), 4,07-4,12 (м, 2H), 6,01-6,07 (м, 1H), 7,02 (т, $J=10,2$ Гц, 1H), 8,05 (т, $J=8,1$ Гц, 1H).



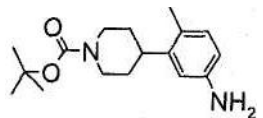
Трет-бутил 4-(5-нітро-2-фторфеніл)-3,6-дигідро-1(2H)-піридинкарбоксилат: 1H ЯМР (300МГц, $CDCl_3$) δ 1,49 (с, 9H), 2,48-2,55 (м, 2H), 3,64 (т, $J=5,4$ Гц, 2H), 4,08-4,13 (м, 2H), 6,07 (шир с, 1H), 7,18 (дд, $J=9,2, 9,9$ Гц, 1H), 8,09-8,20 (м, 2H).



Трет-бутил 4-(5-нітро-4-фтор-2-метилфеніл)-3,6-дигідро-1(2H)-піридинкарбоксилат: 1H ЯМР (300МГц, δ) δ 1,50 (с, 9H), 2,57-2,74 (м, 5H), 3,63 (т, $J=6,3$ Гц, 2H), 4,03-4,08 (м, 2H), 5,61-5,68 (м, 1H), 7,09 (д, $J=11,7$ Гц, 1H), 7,80 (д, $J=7,8$ Гц, 1H).

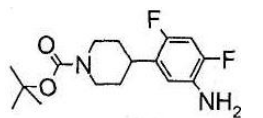


Трет-бутил 4-(3-нітро-4-фторфеніл)-3,6-дигідро-1(2H)-піридинкарбоксилат: 1H ЯМР (300МГц, $CDCl_3$) δ 1,50 (с, 9H), 2,48-2,56 (м, 2H), 3,63-3,69 (м, 2H), 4,08-4,14 (м, 2H), 6,10-6,16 (м, 1H), 7,22-7,30 (м, 1H (затемнений розчинником), 7,60-7,65 (м, 1H), 8,03 (дд, $J=2,4, 6,9$ Гц, 1H).

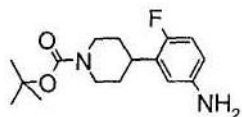


Трет-бутил 4-(5-аміно-2-метилфеніл)-1-піперидинкарбоксилат:

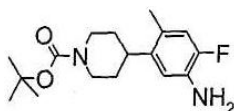
суміш трет-бутил 4-(5-нітро-2-метилфеніл)-3,6-дигідро-1(2H)-піридинкарбоксилату (22,0г), етанолу (абсолютний, 300мл) та 10% Pd-C (2,00г) витримували при 55-60psi (фунтів на квадратний дюйм) в атмосфері водню протягом 66 годин. Суміш профільтрували та концентрували, внаслідок чого отримали сирий продукт у вигляді зеленої оливи (55% перетворення за 1H ЯМР). До розчину оливи та етанолу (300мл) додали 10% Pd-C (2,00г) та отриману суміш витримували при 55-60psi (фунтів на квадратний дюйм) в атмосфері водню протягом 20 годин 15 хвилин. Суміш профільтрували крізь Celite® та корж промили етанолом (200мл) та EtOAc (100мл). Фільтрат концентрували, розбавили EtOAc (500мл), висушили над $MgSO_4$, профільтрували та випаровували, внаслідок чого отримали 18,4г оливи, яку розчинили в EtOAc (10мл) та гексанах (350мл) та їй дозволили настоюватися при 5°C протягом 18 годин. Отриману суміш профільтрували, внаслідок чого отримали 13,4г продукту у вигляді твердої речовини (71% вихід за 2 етапи). 1H ЯМР (300МГц, $CDCl_3$) δ 1,49 (с, 9H), 1,50-1,63 (м, 2H), 1,68-1,77 (м, 2H), 2,23 (с, 3H), 2,51-2,86 (м, 3H), 3,53 (ушир с, 2H), 4,18-4,30 (м, 2H), 6,47 (дд, $J=2,4, 8,1$ Гц, 1H), 6,53 (д, $J=2,4$ Гц, 1H), 6,93 (д, $J=8,1$ Гц, 1H).



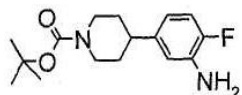
Трет-бутил 4-(5-аміно-2,4-дифторфеніл)-1-піперидинкарбоксилат: суміш трет-бутил 4-(5-нітро-2,4-дифторфеніл)-3,6-дигідро-1(2Н)-піридинкарбоксилату (128,0г, 53,0ммоль), етанолу (720мл) та 10% Pd-C (50% води за масою, 3,20г) витримували при 60psi (фунтів на квадратний дюйм) в атмосфері водню протягом 16 годин. Суміш профільтрували крізь шар Celite® та шар Celite® промили етанолом (4X25мл). Фільтрат концентрували, внаслідок чого отримали 17,0г густої оливи, яку далі висушували у високому вакуумі протягом декількох годин. Додали гексани (125мл) та суміш охолоджували до 5°C протягом 30 хвилин при сильному перемішуванні. Отриману тверду речовину зібрали шляхом фільтрації та твердий корж промили маточними розчинами, а потім холодними гексанами (50мл) та висушили, внаслідок чого отримали 15,5г продукту у вигляді бежевої твердої речовини (94% вихід). ¹H ЯМР (300МГц, CDCl₃) δ 1,48 (с, 9H), 1,49-1,63 (м, 2H), 1,70-1,79 (м, 2H), 2,73-2,81 (м, 3H), 3,30-3,80 (ушир с, 2H), 4,14-4,30 (м, 2H), 6,58 (дд, J=7,5, 9,9Гц, 1H), 6,73 (т, J=9,9 Гц, 1H); ¹⁹F ЯМР (282МГц, CDCl₃) δ -134,55, -134,52, -134,48, -129,51 (т, J=8,5Гц).



Трет-бутил 4-(5-аміно-2-фторфеніл)-1-піперидинкарбоксилат: ¹H ЯМР (300МГц, CDCl₃) δ 1,48 (с, 9H), 1,50-1,66 (м, 2H), 1,73-1,82 (м, 2H), 2,73-2,98 (м, 3H), 3,51 (ушир с, 2H), 4,15-4,30 (м, 2H), 6,44-6,51 (м, 2H), 6,76-6,85 (м, 1H); ¹⁹F ЯМР (282МГц, CDCl₃) δ -133,11, -133,09, -133,07, -133,05, -133,04.



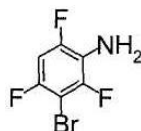
Трет-бутил 4-(5-аміно-4-фтор-2-метилфеніл)-1-піперидинкарбоксилат: ¹H ЯМР (300МГц, CDCl₃) δ 1,43-1,60 (м, 11H), 1,69 (м, 2H), 2,22 (с, 3H), 2,67-2,86 (м, 3H), 3,52-3,86 (ушир с, 2H), 4,16-4,32 (м, 2H), 6,60 (д, J=9,0Гц, 1H), 6,77 (д, J=12,0Гц, 1H); ¹⁹F ЯМР (282МГц, CDCl₃) δ -139,28, -139,24, -139,23, -139,20.



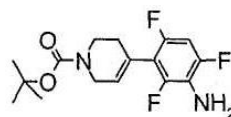
Трет-бутил 4-(5-аміно-4-фторфеніл)-1-піперидинкарбоксилат: ¹H ЯМР (300МГц, CDCl₃) δ 1,49 (с, 9H), 1,50-1,62 (м, 2H), 1,72-1,81 (м, 2H), 2,45-2,58 (м, 1H), 2,70-2,83 (м, 2H), 3,68 (ушир с, 2H), 4,16-4,28 (м, 2H), 6,47-6,53 (м, 1H), 6,61 (дд, J=2,1, 8,7Гц, 1H), 6,89 (дд, J=8,4, 10,8Гц, 1H); ¹⁹F ЯМР (282МГц, CDCl₃) δ -139,01 до -139,10.



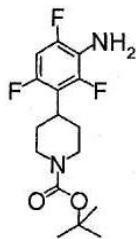
1-бром-3-нітро-2,4,6-трифторбензол: до охолодженої (1,3°C) суміші 1-бром-2,4,6-трифторбензолу (30,0г, 142ммоль) та H₂SO₄ (115мл) додавали HNO₃ (68%; 102мл) протягом більш ніж 1 година 25 хвилин з такою витратою, щоб внутрішня температура становила менше ніж 8°C. Отриману суміш перемішували протягом 1 години 50 хвилин при 0°C (температура при 1 годині 50 хвилинах=4,6°C), вилили на лід (1200мл) та воду (650мл), сильно перемішували протягом 30 хвилин та екстрагували CH₂Cl₂ (3x600мл). Екстракти CH₂Cl₂ об'єднали, промили водою (2X600мл), висушили над MgSO₄, профільтрували та випаровували, внаслідок чого отримали продукт у вигляді прозорої жовтої оливи (35,0 г, 99% вихід). ¹H ЯМР (300МГц, CDCl₃) δ 7,01 (ддд, J=2,4, 7,8, 9,3 Гц, 1H); ¹⁹F ЯМР (282МГц, CDCl₃) δ -116,20 до -116,10, -107,73 до -107,71, -93,80 до -93,70.



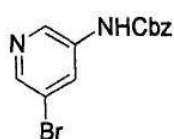
3-аміно-1-бром-2,4,6-трифторбензол: суміш 1-бром-3-нітро-2,4,6-трифторбензолу (15,1г, 59,0ммоль), етанолу (590мл), циклогексену (177мл) та Pd(OH)₂ (5,90г) нагрівали при 80-85°C (зовнішня температура) в атмосфері азоту протягом 2 годин 5 хвилин (внутрішня температура=70°C). Суміш охолодили до 30°C, профільтрували крізь шар Celite® та промили EtOAc (200мл) та етанолом (200мл). Жовтий фільтрат концентрували та висушили в умовах високого вакууму при 60°C, внаслідок чого отримали 11г продукту у вигляді твердої речовини (83% вихід). ¹H ЯМР (300МГц, CDCl₃) δ 3,60-3,80 (ушир с, 2H), 6,76 (ддд, J=2,4, 8,4, 10,2Гц, 1H); ¹⁹F ЯМР (282МГц, CDCl₃) δ -120,44 до -120,49, -131,20 до -131,28, -124,72 до -124,78.



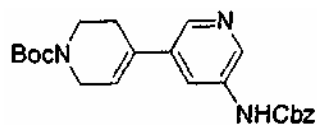
Трет-бутил 4-(3-аміно-2,4,6-трифторфеніл)-3,6-дигідро-1(2Н)-піридинкарбоксилат: ¹H ЯМР (300МГц, CDCl₃) δ 1,49 (с, 9H), 2,33-2,41 (м, 2H), 3,61 (т, J=5,5Гц, 2H), 4,03-4,07 (м, 2H), 5,74-5,81 (м, 1H), 6,63 (ддд, J=2,4, 9,6, 10,5Гц, 1H).



Трет-бутил 4-(3-аміно-2,4,6-трифторфеніл)-1-піперидин-карбоксилат: ^1H ЯМР (300МГц, CDCl_3) δ 1,46 (с, 9H), 1,60-1,70 (м, 2H), 1,88-2,06 (м, 2H), 2,68-2,84 (м, 2H), 2,97-3,10 (м, 1H), 3,48-3,60 (м, 2H), 4,15-4,32 (м, 2H), 6,54-6,67 (м, 1H); ^{19}F ЯМР (282МГц; CDCl_3) δ -133,53 до -133,52, -127,48 (д, $J=10,7\text{Гц}$).

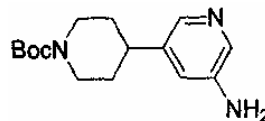


Бензил 5-бром-3-піридинілкарбамат: до суспензії 5-бромнікотинової кислоти (20,0г, 99,0ммоль) у толуолі (200мл) додали дифенілфосфорилазид (25,6мл, 118,8ммоль) та Et_3N (16,6мл, 118,8ммоль). Після перемішування при кімнатній температурі протягом 30 хвилин додали бензильний спирт (15,4мл, 148,5ммоль). Суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 1 години, потім кип'ятили у колбі зі зворотним холодильником протягом ночі. Після охолодження до кімнатної температури реакційну суміш промили H_2O , NaHCO_3 та сольовим розчином, висушили над MgSO_4 та концентрували. Внаслідок очищення шляхом флеш-хроматографії (15-50% EtOAc /гексан) отримали 22,2г (72,5ммоль, 73%) бензил 5-бром-3-піридинілкарбамату: ^1H ЯМР (400МГц, CDCl_3) δ 8,39-8,32 (м, 2H), 8,29 (с, 1H), 7,45-7,32 (м, 5H), 6,94 (с, 1H), 5,22 (с, 2H); ESMS m/e : 307,0 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

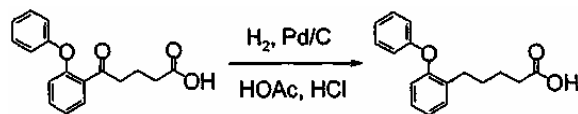


Трет-бутил-4-(5-[(фенілметокси)карбоніламіно]-3-піридил)-1,2,5,6-тетрагідропіридинкарбоксилат: ^1H ЯМР (400МГц, CDCl_3) δ 8,38-8,30 (м, 2H), 8,10-7,97 (м, 1H), 7,47-7,31 (м, 5H), 7,14 (с, 1H), 6,10 (с, 1H), 5,22 (с, 2H), 4,16-4,03 (м, 2H), 3,71-3,57 (м,

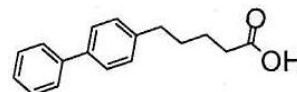
2H), 2,57-2,42 (м, 2H), 1,49 (с, 9H); ESMS m/e : 410,2 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.



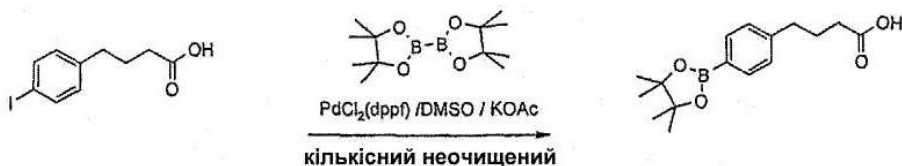
Трет-бутил 4-(5-аміно-3-піридиніл-1-піперидинкарбоксилат: ^1H ЯМР (400МГц, CDCl_3) δ 8,01-7,95 (м, 1H), 7,89 (с, 1H), 6,83 (с, 1H), 4,39-4,09 (ушир, 2H), 3,90-3,50 (ушир, 2H), 2,88-2,68 (м, 2H), 2,67-2,52 (м, 1H), 1,88-1,71 (м, 2H), 1,68-1,49 (м, 2H), 1,48 (с, 9H); ESMS m/e : 278,3 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.



5-(2-феноксфеніл)валеріанова кислота: до розчину 5-(2-феноксфеніл)-5-оксо-валеріанової кислоти (Rieke Metals, Inc.) (500мг, 1,8ммоль) в оцтовій кислоті (4мл) при кімнатній температурі додали Pd/C (10%, 50мг) та 0,2мл HCl (концентрованої). Отриману суміш потім гідрували (кімнатна температура, 100psi (фунтів на квадратний дюйм), протягом ночі). Реакційну суміш профільтрували крізь *celite* та розчинник видалили у вакуумі. Залишок піддали впливу високого вакууму протягом ночі з метою видалення остаточних кількостей оцтової кислоти. Сирий продукт застосовували на наступному етапі без будь-якої додаткової очистки (500мг, 1,8ммоль, кількісний вихід). ^1H ЯМР (400МГц, CDCl_3) δ 7,35-7,21 (м, 3H), 7,19-7,12 (м, 1H), 7,11-7,01 (м, 2H), 6,96-6,83 (м, 3H), 2,65 (т, 2H, $J=7,2\text{Гц}$), 2,34 (т, 2H, $J=7,2\text{Гц}$), 1,73-1,59 (м, 4H); ESI-MS m/e : 269,4 ($\text{M}-\text{H}$) $^-$.



5-(4-біфеніл)валеріанова кислота: ^1H ЯМР (400МГц, CDCl_3) δ 7,63-7,06 (м, 9H), 2,75-2,62 (м, 2H), 2,48-2,32 (м, 2H), 1,79-1,62 (м, 4H).

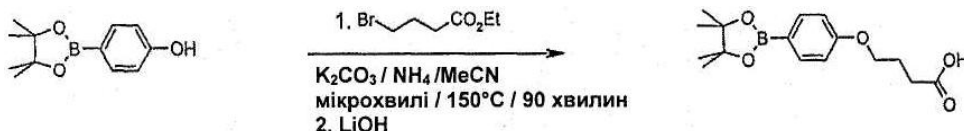


4-[4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-діоксаборолан-2-іл)фенокси]бутанова кислота: 4-(4-йодфеніл)бутанову кислоту (40,0мг, 0,130ммоль),

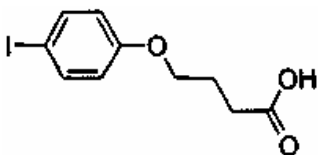
4,4,5,5-тетраметил-2-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-діоксаборолан-2-іл)-1,3,2-діоксаборолан(біс(піноколато)дифор) (33,3мг,

0,150ммоль), ацетат калію (54,1мг, 0,550ммоль) та 1,1'-біс(дифенілфосфіно)фероцен-дихлорпаладій (5,60мг, 5мол%) у диметилсульфоксиді (1,50мл) нагрівали при 100°C протягом 18 годин. Реакційну суміш концентрували у вакуумі, після чого залишилася темна олива. Зали-

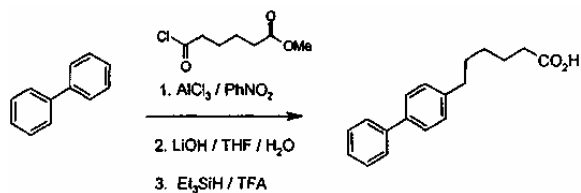
шок розвели EtOAc, профільтрували та фільтрат концентрували у вакуумі, внаслідок чого залишилася сира кислота (38,0мг, 95%). ESMS m/e: 291,2 (M-H)⁻.



4-[4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-діоксaborolan-2-іл)феноксi]бутанова кислота: суміш 4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-діоксaborolan-2-іл)фенолу (2,00г, 10,0 ммоль), етил 4-бромбутоату (2,00мл, 14,9ммоль), K₂CO₃ (2,40г, 17,0ммоль), NH₄I (1,00г, 7,00ммоль) та ацетонітрилу (14мл) нагрівали при 140°C усього протягом 90 хвилин з періодичними перервами на моніторинг. Реакційну суміш розподілили між водою (100мл) та діетиловим етером (50мл), відокремили та промили діетиловим етером (50мл). Об'єднані органічні екстракти висушили над сульфатом натрію, потім концентрували у вакуумі, внаслідок чого залишилася жовта олива. Сирий продукт очистили на картриджі елювання зв'язку (70г, виконували двічі), елюючи пентаном, а потім знов пентаном:діетиловим етером, 4:1, потім 1:1, внаслідок чого отримали етил 4-[4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-діоксaborolan-2-іл)феноксi]бутоат у вигляді безбарвної оливи (1,17г, 35%). ¹H ЯМР (CDCl₃), δ 7,73 (м, 2H), 6,87 (м, 2H), 4,14 (к, J=7,1Гц, 2H), 4,03 (т, J=6,1Гц, 2H), 2,51 (т, J=7,3Гц, 2H), 2,11 (м, 2H), 1,33 (с, 12H), 1,25 (т, J=7,1Гц, 3H). Етил 4-[4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-діоксaborolan-2-іл)феноксi]бутоат (1,17г, 3,50ммоль) розчинили в етанолі (10мл) та додали гідроксид літію (1М, 10мл). Отриману суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 1 години, потім підкислили хлористоводневою кислотою (1М, 25,0мл). Водну суміш екстрагували EtOAc (3x20мл) та об'єднані органічні екстракти висушили над сульфатом натрію та концентрували у вакуумі, внаслідок чого залишилася 4-[4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-діоксaborolan-2-іл)феноксi]бутанова кислота у вигляді білої твердої речовини (0,906г, 96%). ¹H ЯМР (CDCl₃), δ 7,65 (м, 2H), 6,89 (м, 2H), 4,04 (т, J=6,2Гц, 2H), 2,48 (т, J=7,3Гц, 2H), 2,06 (м, 2H), 1,32 (с, 12H).



4-(4-йодфеноксi)масляну кислоту також приготували з 4-йодфенолу та етил 4-бромбутоату, застосовуючи такий самий спосіб, як і для приготування 4-[4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-діоксaborolan-2-іл)феноксi]бутанової кислоти. ¹H ЯМР (CD₃OD), δ 7,54 (м, 2H), 6,73 (м, 2H), 3,99 (т, J=6,3Гц, 2H), 2,47 (т, J=7,3Гц, 2H), 2,04 (м, 2H).



6-(4-фенілфеніл)гексанова кислота: метил 5-(хлоркарбоніл)пентаноат (2,00г, 11,2ммоль) додали в охолоджений (приблизно 5°C) розчин фенілбензол(біфенілу) (0,580г, 3,73ммоль) у нітробензолі (15мл). Трихлорид алюмінію (2,99г, 22,4ммоль) додавали частинами до реакційної суміші, перемішування тривало 16 годин при кімнатній температурі, а потім суміш вилили на колотий лід (50мл). Реакційній суміші дозволили настоюватися протягом 1 години, біфазну суміш розділили та водну фазу екстрагували дихлорметаном. Об'єднані органічні екстракти промили хлористоводневою кислотою (2x0,1М), потім розчином карбонату натрію (2x5%) та висушили над сульфатом магнію та концентрували у вакуумі, внаслідок чого залишилася блідо-коричнева тверда речовина. Сирий продукт розчинили у тетрагідрофурани (10мл) та додали гідроксид літію (0,82М, 5мл) та суміш перемішували протягом 2 годин. Реакційну суміш концентрували у вакуумі та водний залишок екстрагували дихлорметаном, потім EtOAc, потім підкислили хлористоводневою кислотою (0,1М). Водну фазу далі екстрагували EtOAc (3x), об'єднані органічні екстракти висушили над сульфатом магнію та концентрували у вакуумі, внаслідок чого отримали 6-оксо-6-(4-фенілфеніл)гексанову кислоту у вигляді твердої речовини кремового кольору (0,220г, 21%). ESMS m/e: 283,2 (M-H)⁻; ¹H ЯМР (CDCl₃), δ 8,03 (м, 2H), 7,68 (м, 2H), 7,63 (м, 2H), 7,47 (м, 2H), 7,40 (м, 1H), 3,04 (т, J=7,0Гц, 2H), 2,44 (т, J=7,2Гц, 2H), 1,84 (м, 2H), 1,77 (м, 2H). 6-Оксо-6-(4-фенілфеніл)гексанову кислоту (0,220г, 0,780ммоль) розчинили у трифтороцтовій кислоті (5мл) та додавали краплями триетилсилан (0,310мл, 1,25ммоль). Реакційну суміш нагрівали при 55°C в атмосфері азоту протягом 72 годин, потім охолодили до кімнатної температури та концентрували у вакуумі, внаслідок чого залишилася масляниста тверда речовина. Сирий продукт розподілили між насиченим розчином бікарбонату натрію та діетиловим етером. Водний шар підкислили хлористоводневою кислотою, екстрагували діетиловим етером (3x10мл), об'єднані органічні екстракти висушували над сульфатом магнію та

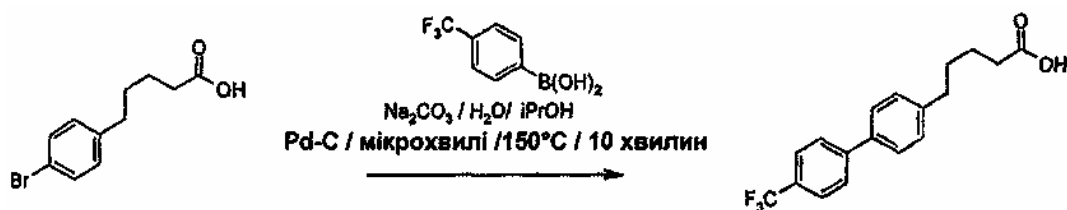
31

85575

32

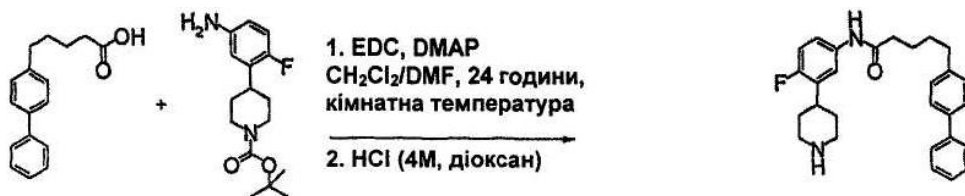
концентрували у вакуумі, внаслідок чого залишилася 6-(4-фенілфеніл)гексанова кислота у вигляді блідо-коричневої твердої речовини (105мг, 50%). ESMS m/e: 267,0 (M-H)⁻; ¹H ЯМР (CDCl₃), δ 7,58 (м,

2H), 7,51 (м, 2H), 7,42 (м, 2H), 7,32 (м, 1H), 7,24 (м, 2H), 2,66 (т, J=7,7Гц, 2H), 2,37 (т, J=7,5Гц, 2H), 1,68 (м, 4H), 1,43 (м, 2H).



5-[4-[4-(Трифторметил)феніл]феніл]пентанова кислота: суміш 5-(4-бромфеніл)-пентанової кислоти (300мг, 1,17ммоль), 4-(трифторметил)бензолборонової кислоти (243мг, 1,28ммоль), карбонату натрію (154мг, 1,41ммоль), води (1,55мл) та ізопропанолу (0,220мл) нагрівали при 150°C протягом 10 хвилин. Реакційну суміш розподілили між водою та EtOAc, органічну фазу відокремили, висушили

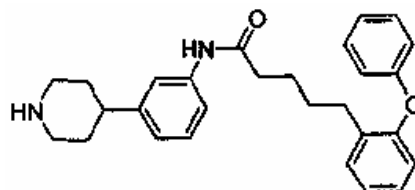
над сульфатом магнію та концентрували у вакуумі, внаслідок чого отримали 5-[4-(трифторметил)феніл]феніл]-пентанову кислоту у вигляді твердої речовини (120мг, 32%). ESMS m/e: 321,3 (M-H)⁻; ¹H ЯМР (CDCl₃), δ 7,67 (с, 4H), 7,51 (д, J=8,2Гц, 2H), 7,27 (д, J=8,2Гц, 2H), 2,70 (м, 2H), 2,41 (м, 2H), 1,72 (м, 4H).



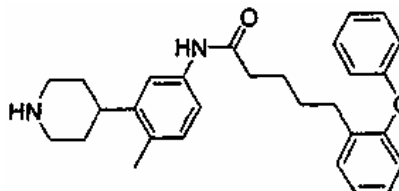
N-(4-фтор-3-(4-піперидил)феніл)-5-(4-фенілфеніл)пентанамід: 5-(4-біфеніл)-валеріанову кислоту (0,20ммоль, 50мг), EDC (100мг, 0,52ммоль), DMAP (15мг, 0,12ммоль) у 2мл CH₂Cl₂/DMF (10:1) перемішували протягом 15 хвилин, після чого додали трет-бутил 4-(5-аміно-2-фторфеніл)-1-піперидинкарбоксилат (0,17ммоль, 50мг). Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 24 годин. Реакційну суміш піддали безпосередньо препаративній ТШХ (без будь-якої обробки) (силікагель, гексан/EtOAc, 1:1), внаслідок чого отримали трет-бутил 4-[2-фтор-5-[5-(4-фенілфеніл)-пентаноїламіно]феніл]піперидинкарбоксилат. ¹H ЯМР (400МГц, CDCl₃) δ 7,60-7,55 (м, 2H), 7,54-7,48 (м, 2H), 7,45-7,39 (м, 2H), 7,39-7,28 (м, 4H), 7,27-7,22 (м, 2H), 6,98-6,91 (м, 1H), 4,33-4,13 (ушир, 2H), 3,01-2,90 (м, 1H), 2,89-2,60 (м, 2H), 2,69 (т, 2H, J=7,2Гц), 2,37 (т, 2H, J=7,2Гц), 1,85-1,04 (м, 9H); ESI-MS m/e: 529,5 (M-H)⁻. Трет-бутил 4-[2-фтор-5-(4-фенілфеніл)пентаноїламіно]феніл]піперидинкарбоксилат з попереднього етапу обробляли 4M HCl у діоксані (1мл) при кімнатній температурі протягом 2 годин. Внаслідок видалення розчинника у вакуумі та очищення на ТШХ з силікагелем (силікагель, 2M NH₃/MeOH:EtOAc, 1:4) (11,6мг, 15% за два етапи) отримали N-(4-фтор-3-(4-піперидил)феніл)-5-(4-фенілфеніл)пентанамід. ¹H ЯМР (400МГц, CDCl₃) δ 8,51 (с, 1H), 7,76-7,69 (м, 1H), 7,58-7,52 (м, 2H), 7,51-7,45 (м, 2H), 7,45-7,36 (м, 2H), 7,35-7,27 (м,

1H), 7,25-7,18 (м, 3H), 6,97-6,89 (м, 1H), 3,55-3,44 (м, 2H), 3,08-2,97 (м, 1H), 2,97-2,86 (м, 2H), 2,66 (т, 2H, J=7,2Гц), 2,46 (т, 2H, J=7,2Гц), 2,00-1,83 (м, 4H), 1,83-1,65 (м, 4H); ESI-MS m/e: 431,3 (M+H)⁺.

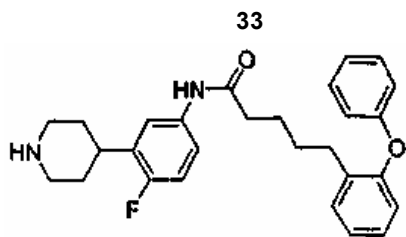
Наступні сполуки приготували аналогічно:



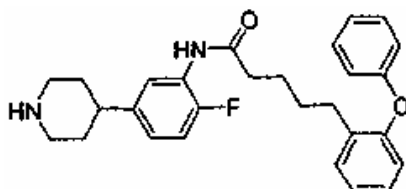
5-(2-феноксифеніл)-N-(3-(4-піперидил)феніл)пентанамід: приготували згідно з процедурами, наведеними на Схемі 9. ESI-MS m/e: 429,4 (M+H)⁺.



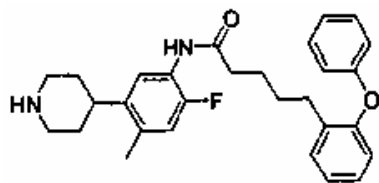
N-(4-Метил-3-(4-піперидил)феніл)-5-(2-феноксифеніл)пентанамід: приготували згідно з процедурами, наведеними на Схемі 9. ESI-MS m/e: 443,4 (M+H)⁺.



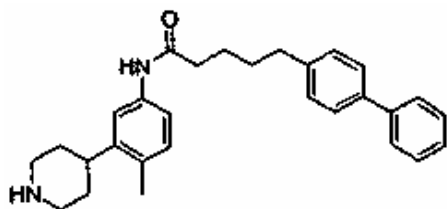
N-(4-Фтор-3-(4-піперидил)феніл)-5-(2-феноксифеніл)пентанамід: приготували згідно з процедурами, наведеними на Схемі 9. ESI-MS m/e : 447,3 ($M+H$)⁺.



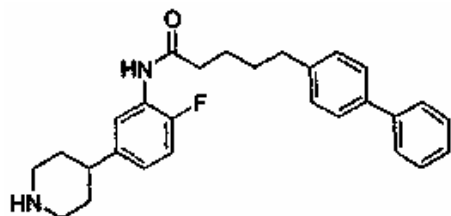
N-(2-Фтор-5-(4-піперидил)феніл)-5-(2-феноксифеніл)пентанамід: приготували згідно з процедурами, наведеними на Схемі 9. ESI-MS m/e : 447,3 ($M+H$)⁺.



N-(2-Фтор-4-метил-5-(4-піперидил)феніл)-5-(2-феноксифеніл)пентанамід: приготували згідно з процедурами, наведеними на Схемі 9. ESI-MS m/e : 461,3 ($M+H$)⁺.



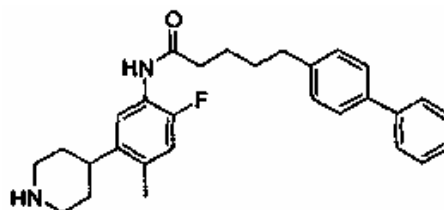
N-(4-Метил-3-(4-піперидил)феніл)-5-(4-фенілфеніл)пентанамід: приготували згідно з процедурами, наведеними на Схемі 9. ESI-MS m/e : 427,3 ($M+H$)⁺.



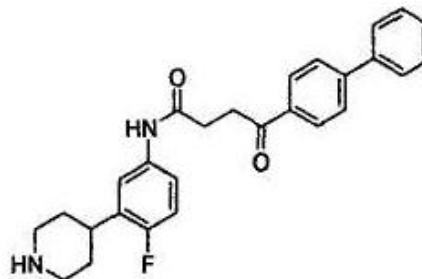
N-(2-Фтор-5-(4-піперидил)феніл)-5-(4-фенілфеніл)пентанамід: приготували згідно з процедурами, наведеними на Схемі 9. ESI-MS m/e : 431,3 ($M+H$)⁺.

85575

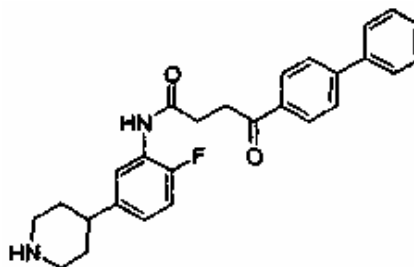
34



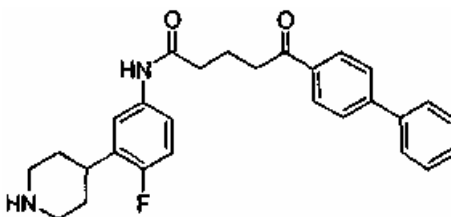
N-(2-Фтор-4-метил-5-(4-піперидил)феніл)-5-(4-фенілфеніл)пентанамід: приготували згідно з процедурами, наведеними на Схемі 9. ESI-MS m/e : 445,3 ($M+H$)⁺.



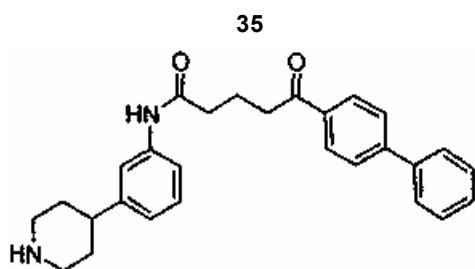
N-(4-фтор-3-(4-піперидил)феніл)-4-оксо-4-(4-фенілфеніл)бутанамід: приготували згідно з процедурами, наведеними на Схемі 9. ESI-MS m/e : 431,3 ($M+H$)⁺.



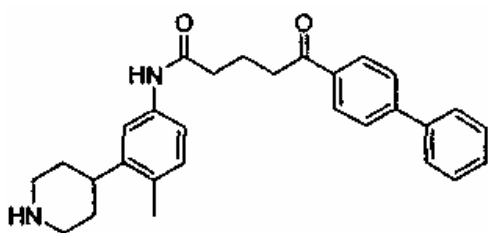
N-(2-фтор-5-(4-піперидил)феніл)-4-оксо-4-(4-фенілфеніл)бутанамід: приготували згідно з процедурами, наведеними на Схемі 9. ESI-MS m/e : 431,3 ($M+H$)⁺.



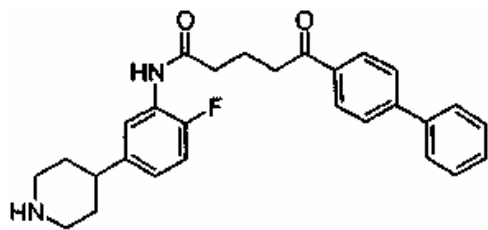
N-(4-фтор-3-(4-піперидил)феніл)-5-оксо-5-(4-фенілфеніл)пентанамід: приготували згідно з процедурами, наведеними на Схемі 9. ESI-MS m/e : 445,3 ($M+H$)⁺.



5-оксо-5-(4-фенілфеніл)-N-(3-(4-піперидил)феніл)пентанамід: приготували згідно з процедурами, наведеними на Схемі 9. ESI-MS m/e : 427,3 ($M+H$)⁺.

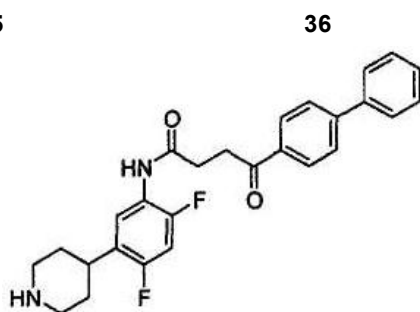


N-(4-метил-3-(4-піперидил)феніл)-5-оксо-5-(4-фенілфеніл)пентанамід: приготували згідно з процедурами, наведеними на Схемі 9. ESI-MS m/e : 441,3 ($M+H$)⁺.

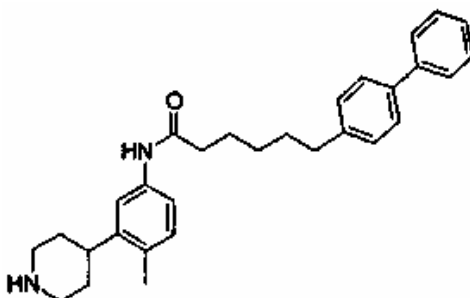


N-(2-фтор-5-(4-піперидил)феніл)-5-оксо-5-(4-фенілфеніл)пентанамід: приготували згідно з процедурами, наведеними на Схемі 9. ESI-MS m/e : 445,2 ($M+H$)⁺.

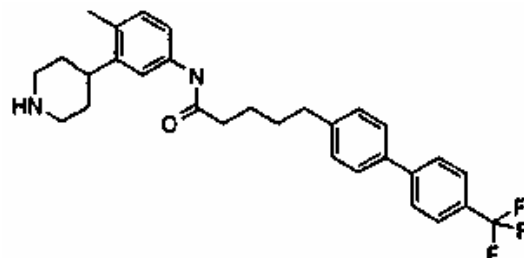
85575



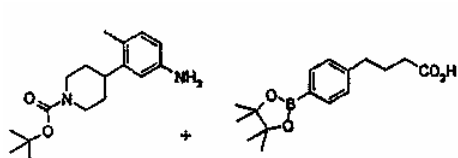
N-(2,4-дифтор-5-(4-піперидил)феніл)-4-оксо-4-(4-фенілфеніл)бутанамід: приготували згідно з процедурами, наведеними на Схемі 9. ESI-MS m/e : 449,2 ($M+H$)⁺.



N-(4-метил-3-(4-піперидил)феніл)-6-(4-фенілфеніл)гексанамід: приготували згідно з процедурами, наведеними на Схемі 9. ESI-MS m/e : 441,3 ($M+H$)⁺.

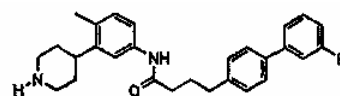


N-(4-метил-3-(4-піперидил)феніл)-5-4-[4-(трифторметил)феніл]феніл]пентанамід: приготували згідно з процедурами, наведеними на Схемі 9. ESI-MS m/e : 495,1 ($M+H$)⁺.



1. HATU / DIPEA / DMF

2. Br-Ph-F
K₂CO₃ / PdCl₂(dppf) / DMF
мікрохвилі / 110°C /
25 хвилин



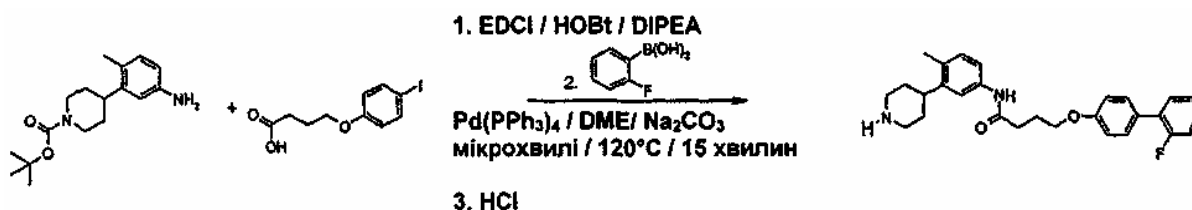
3. 95% TFA/DCM, 1:1

4-[4-(3-фторфеніл)феніл]-N-(4-метил-3-(4-піперидил)феніл)бутанамід: Суміш трет-бутил 4-(3-аміно-6-метилфеніл)піперидинкарбоксилату (39,6мг, 0,130ммоль), 4-[4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-діоксaborolan-2-іл)феніл]бутанової кислоти, (38,0мг, 0,130ммоль), [диметиламіно-[1,2,3]триазоло[4,5-b]піридин-3-

ілокси)метилен]диметиламонію гексафторфосфату (HATU, 54,3мг, 0,140ммоль) та діізопропілетиламіну (68,0мл, 0,390ммоль) у диметилформаміді (2мл) перемішували при кімнатній температурі протягом 18 годин. Реакційну суміш концентрували у вакуумі, розчинили в EtOAc (20мл) та промили бікарбонатом натрію (насиченим, 10мл) та во-

дою (2x10мл), потім висушили над сульфатом натрію та концентрували у вакуумі, внаслідок чого отримали смолу. Внаслідок очищення на силікагелі (силікагель 60,40мл) та елюювання циклогексаном:EtOAc, 8:1, потім 4:1, отримали трет-бутил 4-(2-метил-5-{4-[4-(4,4,5,5-тетраметил(1,3,2-діоксaborolan-2-іл))феніл]бутаноїламіно}феніл)піперидинкарбоксилат у вигляді жовтої оливи (39,0мг, 53%). ESI-MS m/e : 563,3 ($M+H$)⁺. Дегазований розчин трет-бутил 4-(2-метил-5-{4-[4-(4,4,5,5-тетраметил(1,3,2-діоксaborolan-2-іл))феніл]бутаноїламіно}феніл)піперидинкарбоксилату (19,0мг, 0,033ммоль) у диметилформаміді (0,8мл) додали до суміші 3-фторбромбензолу (6,55мг, 0,370ммоль), 1,1'-біс-(дифенілфосфіно)-фероцендихлорпаладію (3,30мг, 8мол%) та розчину карбонату цезію (2М, 50мкл) та отриману суміш нагрівали у мікрохвильовій печі при 110°C протягом 25 хвилин. Реакційну суміш концентрували у вакуумі, потім розподілили між водою (20мл) та EtOAc (2x10мл). Органічну фазу відокремили, промили водою (2x20мл), висушили над сульфатом натрію та концентрували у вакуумі, внаслідок чого залишилися смола. Внаслідок очищення сирого продукту на силікагелі (силікагель 60, 20мл) та елюювання

циклогексаном:EtOAc, 85:15, потім 4:1, отримали трет-бутил 4-(5-4-[4-(3-фторфеніл)феніл]бутаноїламіно)-2-метилфеніл)піперидинкарбоксилат (13,0мг, 73%). ESI-MS m/e : 431,3 ($M-C_5H_8O_2+H$)⁺. Отриманий трет-бутил 4-(5-{4-[4-(3-фторфеніл)феніл]бутаноїламіно}-2-метилфеніл)піперидинкарбоксилат розчинили у дихлорметані (0,8мл), та додали трифтороцтову кислоту (95%, 0,8мл), та реакційну суміш перемішували протягом 2 годин, потім концентрували у вакуумі. Залишок розчинили в ацетонітрилі (1мл), додали хлористоводневу кислоту (1М, 1мл) та реакційну суміш концентрували у вакуумі, внаслідок чого отримали 4-[4-(3-фторфеніл)феніл]-N-(4-метил-3-(4-пшеридил)феніл)бутанаміду гідрохлорид у вигляді білої твердої речовини (11,2мг, 98%). ESMS m/e : 431,2 ($M+H$)⁺; ¹H ЯМР (CD₃OD) δ 7,59 (м, 1H), 7,53 (д, J=8,0Гц, 2H), 7,40 (м, 2H), 7,30 (м, 3H), 7,17 (м, 1H), 7,10 (д, J=8,4Гц, 1H), 7,03 (м, 1H), 3,49 (д, J=12,6Гц, 2H), 3,17 (тд, J=12,7, 2,8Гц, 2H), 3,11 (тт, J=12,0, 3,5Гц, 1H), 2,75 (т, J=7,5Гц, 2H), 2,41 (т, J=7,5Гц, 2H), 2,32 (с, 3H), 2,05 (квартет, J=7,5Гц, 2H), 1,93 (м, 4H).

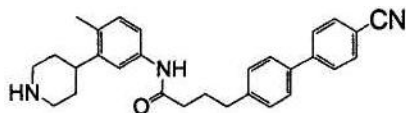


4-[4-(2-фторфеніл)фенокси]-N-(4-метил-3-(4-піперидил)феніл)бутанамід: Суміш трет-бутил 4-(3-аміно-6-метилфеніл)піперидинкарбоксилату (436мг, 1,50ммоль), 4-(4-йодфенокси)бутанової кислоти (460мг, 1,50ммоль), 1-[3-диметиламінопропіл]-3-етилкарбодііміду гідрохлориду (370мг, 1,90ммоль) та HOBT (320мг, 2,30ммоль) у диметилформаміді (10мл) перемішували при кімнатній температурі протягом 2 годин. Реакційну суміш розподілили між водою (80мл) та діетиловим етером (3x20мл). Органічну фазу висушували над сульфатом натрію та концентрували у вакуумі, внаслідок чого залишилися жовта олива. Внаслідок очищення сирого продукту на картриджі SPE (5г) та елюювання пентаном, а потім пентаном:діетиловим етером, 1:1, потім 1:4, потім 100% діетиловим етером отримали трет-бутил 4-{5-[4-(4-йодфенокси)бутаноїламіно]-2-метилфеніл}піперидинкарбоксилат у вигляді піни кремового кольору (514мг, 59%). ESMS m/e : 579,2 ($M+H$)⁺; ¹H ЯМР (CDCl₃) δ 7,54 (м, 2H), 7,30 (д, J=2,1Гц, 1H), 7,23 (дд, J=8,2, 2,1Гц, 1H), 7,17 (ушир с, 1H), 7,09 (д, J=8,2Гц, 1H), 6,67 (м, 2H), 4,26 (ушир с, 2H), 4,03 (т, J=5,9Гц, 2H), 2,80 (м, 3H), 2,55 (т, J=7,1Гц, 2H), 2,30 (с, 3H), 2,20 (м, 2H), 1,73 (ушир д, J=13,6Гц, 2H), 1,58 (м, 2H), 1,49 (с, 9H). трет-Бутил 4-5-[4-(4-йодфенокси)бутаноїл-аміно]-2-метилфеніл)піперидинкарбоксилат та 2-фторбензолборонову кислоту (35мг, 0,250ммоль), тетракістрифенілфосфінпаладій(0) (12,0мг,

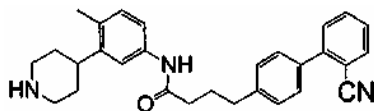
10мол%), водний карбонат натрію (2М, 1мл) та диметоксіетан (2мл) нагрівали у мікрохвильовій печі при 120°C протягом 15 хвилин. Реакційну суміш розбавили водою (2мл), екстрагували етилацетатом (3x0,5мл) та об'єднані органічні фази видули, застосовуючи азот. Отриману смолу очистили на картриджі SPE (5г) та елюювали циклогексаном:етилацетатом, 9:1, потім 3:2, внаслідок чого отримали трет-бутил 4-(5-{4-[4-(2-фторфеніл)фенокси]-бутаноїламіно}-2-метилфеніл)піперидинкарбоксилат (60,0мг, кількісний). ESMS m/e : 447,3 ($M-C_5H_8O_2+H$)⁺; ¹H ЯМР (CDCl₃) δ 7,47 (2H, м), 7,40 (1H, тд, J=7,7, 1,9Гц), 7,34 (1H, д, J=1,8Гц), 7,28 (1H, м), 7,24 (2H, м), 7,18 (1H, тд, J=7,7, 1,2Гц), 7,13 (1H, ддд, J=10,8, 8,1, 1,2Гц), 7,09 (1H, д, J=8,2Гц), 6,97 (2H, м), 4,26 (2H, ушир с), 4,11 (2H, т, J=6,0Гц), 2,80 (3H, м), 2,59 (2H, т, J=7,1Гц), 2,30 (3H, с), 2,24 (2H, м), 1,73 (2H, ушир д), J=12,3Гц), 1,60 (2H, кд, J=12,3, 3,8Гц), 1,48 (9H, с). Амід розчинили у дихлорметані (1мл) та додали трифтороцтову кислоту (1мл). Отриманий розчин струшували по колу протягом 1 години, потім продули, застосовуючи азот, внаслідок чого залишилася олива. Внаслідок очищення на картриджі SPE-аміно (2г) та елюювання діетиловим етером, а потім етилацетатом, потім 10% метанолом в етилацетаті, отримали 4-[4-(2-фторфеніл)фенокси]-N-(4-метил-3-(4-піперидил)феніл)бутанамід. Його розчинили у метанолі (2мл) та додали хлористоводневу кислоту

(1M, 3мл) та отриману суміш концентрували у вакуумі та розтерли в порошок з діетиловим етером, внаслідок чого отримали 4-[4-(2-фторфеніл)фенокси]-N-(4-метил-3-(4-піперидил)феніл)бутанамід. ESMS m/e: 447,2 (M+H)⁺; ¹H ЯМР (DMSO-D₆) δ 9,95 (с, 1H), 8,92 (ушир д, J=10,9Гц, 1H), 8,68 (ушир к, J=10,9Гц, 1H), 7,58 (д, J=2,0Гц, 1H), 7,49 (м, 3H), 7,37 (м, 1H), 7,28 (м, 3H), 7,07 (д, J=8,6Гц, 1H), 7,04 (м, 2H), 4,07 (т, J=6,4Гц, 2H), 3,36 (4H, під піком води), 3,02 (м, 3H), 2,25 (с, 3H), 2,05 (квінтет, 2H), 1,81 (м, 4H).

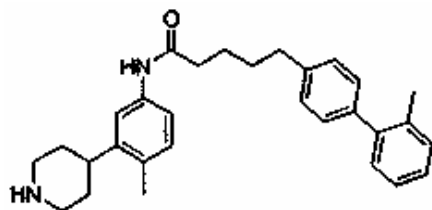
Наступні сполуки приготували аналогічно:



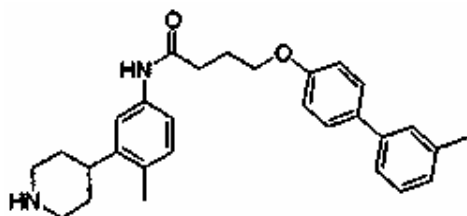
4-[4-(4-ціанофеніл)феніл]-N-(4-метил-3-(4-піперидил)феніл)бутанамід: приготували згідно з процедурами, наведеними на Схемі 11. ESI-MS m/e: 438,0 (M+H)⁺.



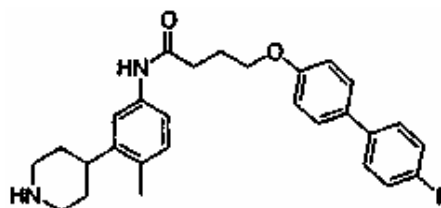
4-[4-(2-ціанофеніл)феніл]-N-(4-метил-3-(4-піперидил)феніл)бутанамід: приготували згідно з процедурами, наведеними на Схемі 11. ESI-MS m/e: 438,0 (M+H)⁺.



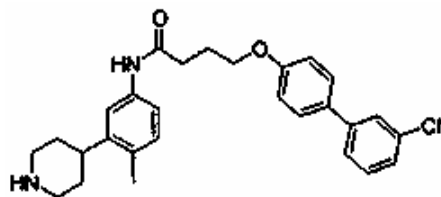
N-(4-метил-3-(4-піперидил)феніл)-5-[4-(2-метилфеніл)феніл]пентанамід: приготували згідно з процедурами, наведеними на Схемі 11. ESMS m/e: 441,3 (M+H)⁺.



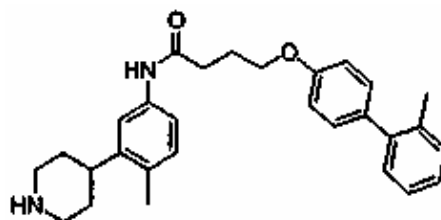
N-(4-метил-3-(4-піперидил)феніл)-4-[4-(3-метилфеніл)фенокси]бутанамід: приготували згідно з процедурами, наведеними на Схемі 11. ESMS m/e: 443,1 (M+H)⁺.



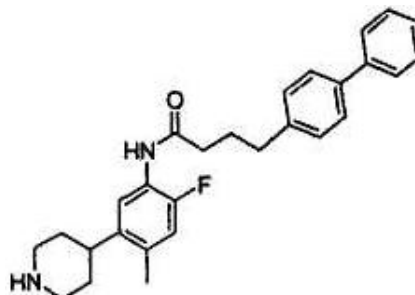
4-[4-(4-фторфеніл)фенокси]-N-(4-метил-3-(4-піперидил)феніл)бутанамід: приготували згідно з процедурою, наведеною на Схемі 11. ESMS m/e: 447,2 (M+H)⁺.



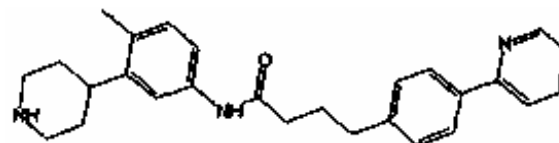
4-[4-(3-ціанофеніл)фенокси]-N-(4-метил-3-(4-піперидил)феніл)бутанамід: приготували згідно з процедурою, наведеною на Схемі 11. ESMS m/e: 454,2 (M+H)⁺.



N-(4-метил-3-(4-піперидил)феніл)-4-[4-(2-метилфеніл)фенокси]бутанамід: приготували згідно з процедурами, наведеними на Схемі 11. ESMS m/e: 443,2 (M+H)⁺.

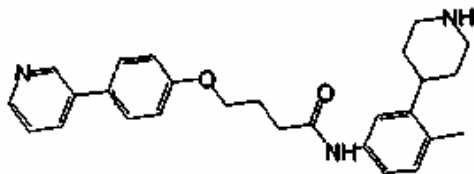


N-(2-фтор-4-метил-5-(4-піперидил)феніл)-4-(4-фенілфеніл)бутанамід: приготували згідно з процедурами, наведеними на Схемі 11. ESMS m/e: 431,3 (M+H)⁺.

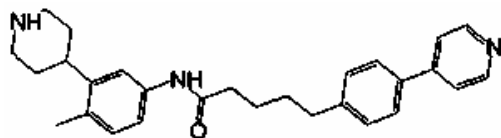


N-(4-метил-3-(4-піперидил)феніл)-4-(4-(2-піридил)феніл)бутанамід: приготували згідно з

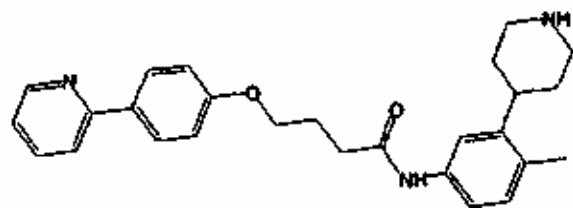
процедурами, наведеними на Схемі 11. ESMS m/e: 414,2 (M+H)⁺.



N-(4-метил-3-(4-піперидил)феніл)-4-(4-(3-піридил)фенокси)бутанамід: приготували згідно з процедурами, наведеними на Схемі 11. ESMS m/e: 430,3 (M+H)⁺.



N-(4-метил-3-(4-піперидил)феніл)-5-(4-(4-піридил)феніл)пентанамід: приготували згідно з процедурами, наведеними на Схемі 11. ESMS m/e: 428,3 (M+H)⁺.



N-(4-метил-3-(4-піперидил)феніл)-5-(4-(4-піридил)фенокси)пентанамід: приготували згідно з процедурами, наведеними на Схемі 11. ESMS m/e: 430,1 (M+H)⁺.

III. Композиції для перорального введення

Як конкретний варіант здійснення композиції для перорального введення сполуки цього виходу, змішували 100мг однієї зі сполук, описаних тут, з достатньо тонкоподрібненою лактозою з одержанням загальної кількості у 580-590мг для наповнення О-подібної капсули з твердого гелю.

IV. Фармакологічне оцінювання сполук на клонованому рецепторі МСН1 щурів.

Фармакологічні властивості сполук цього виходу оцінювали на клонованому рецепторі МСН1 щурів, застосовуючи процедури, описані нижче. Клітини-хазяїни Широку різноманітність клітин-хазяїнів можна застосовувати для дослідження гетерологічної експресії білків. Ці клітини включають, проте не обмежуються лише ними, систематизовані лінії ссавців, такі як: Cos-7, CHO, LM (tk-), НЕК293 та Peak rapid 293; клітинні лінії комах, такі як Sf9 та Sf21; клітини земноводних, такі як овоцити жаби *Xenopus*; та інші. Клітини COS7 вирощують у чашках розміром 150-мм у модифікованому за способом Дульбеко середовищі Ігла (DMEM) з добавками (10% телячої сироватки, 4мМ glutаміну, 100одиницями/мл пеніциліну/100Fg/мл стрептоміцину) при 37°C, 5% CO₂. Чашки з культурою клітин COS7 обробляють трипсином та розщеплюють 1:6 кожні 3-4 дні. Ниркові

ембріональні клітини 293 людини вирощують у чашках розміром 150мм у DMEM з добавками (10% телячої сироватки, 4мМ glutаміну, 100одиницями/мл пеніциліну/100Fg/мл стрептоміцину) при 37°C, 5% CO₂. Чашки з культурою клітин 293 обробляють трипсином та розщеплюють 1:6 кожні 3-4 дні.

Ниркові ембріональні клітини людини Peak rapid 293 (Peakr293) вирощують у чашках розміром 150мм у DMEM з добавками (10% фетальної бичачої сироватки, 10% L-glutamіну, 50Fg/мл гентаміцину) при 37°C, 5% CO₂. Чашки з культурою клітин Peak rapid 293 обробляють трипсином та розщеплюють 1:12 кожні 3-4 дні. Фібробласти LM (tk-) мишей вирощують у чашках розміром 150мм у DMEM з добавками (модифікованому за способом Дульбеко середовищі Ігла з 10% телячої сироватки, 4мМ glutаміну, 100одиницями/мл пеніциліну/100Fg/мл стрептоміцину) при 37°C, 5% CO₂. Чашки з культурою клітин LM (tk-) обробляють трипсином та розщеплюють 1:10 кожні 3-4 дні. Клітини яєчника китайського хом'ячка (CHO) вирощують у чашках розміром 150мм у середовищі HAM's F-12 з добавками (10% телячої сироватки, 4мМ L-glutamіну та 100 одиницями/мл пеніциліну/100Fg/мл стрептоміцину) при 37°C, 5% CO₂. Чашки з культурою клітин CHO обробляють трипсином та розщеплюють 1:8 кожні 3-4 дні. Ембріональні фібробласти NIH-3T3 мишей вирощують у чашках розміром 150мм у модифікованому за способом Дульбеко середовищі Ігла (DMEM) з добавками (10% телячої сироватки, 4мМ glutаміну, 100одиницями/мл пеніциліну/100Fg/мл стрептоміцину) при 37°C, 5% CO₂. Чашки з культурою клітин NIH-3T3 обробляють трипсином та розщеплюють 1:15 кожні 3-4 дні. Клітини Sf9 та Sf21 вирощують у моношарах на 150мм чашках для тканинної культури у середовищі TMN-FH з добавкою 10% фетальної телячої сироватки при 27°C без CO₂. Клітини комах High Five вирощують у 150мм чашках для тканинної культури у середовищі Ex-Cell 400™ з добавкою L-glutamіну також при 27°C без CO₂. У деяких випадках клітинні лінії, що вирощували як прилипли моношари, можуть бути перетворені на суспензійну культуру для збільшення виходу клітин та одержання великих партій однорідного матеріалу для аналізу з метою здійснення звичайних програм скринінгу рецепторів.

Тимчасова експресія

ДНК-кодуювальні білки, що слід досліджувати, можна тимчасово експресувати у різноманітних клітинних лініях ссавців, комах, земноводних та інших тварин декількома способами, включаючи, проте не обмежуючись тільки ними, опосередковану фосфатом кальцію доставку, опосередковану DEAE (діетиламіноетил)-декстраном доставку, опосередковану ліпосомами доставку, опосередковану вірусом доставку, опосередковану електропорацією доставку та доставку шляхом мікроін'єкції. Кожен з цих способів може потребувати оптимізації згрупованих експериментальних параметрів залежно від ДНК, клітинної лінії та типу аналізу, який слід застосовувати у подальшому. Далі описаний звичайний протокол способу із застосуванням фосфату кальцію, який застосовується до клітин Peak rapid 293. Прилипли клітини зби-

рали приблизно за 24 години до трансфекції та переносили з щільністю $3,5 \times 10^6$ клітин/чашку у чашці розміром 150мм для тканинної культури та залишали інкубуватися протягом ночі при 37°C при 5% CO_2 . До пластикової пробірки об'ємом 5мл додавали 250 F1 суміші CaCl_2 та ДНК (15Fg ДНК у 250мМ CaCl_2) та повільно додавали, злепка перемішуючи, 500 F1 2X HBS (280мМ NaCl , 10мМ KCl , 1,5мМ Na_2HPO_4 , 12мМ декстрози, 50мМ HEPES (N-2-гідроксietилпіперазин-N'-2-етансульфонової кислоти)). Суміш залишали інкубуватися протягом 20 хвилин при кімнатній температурі, щоб дозволити ДНК осадитися, щоб сформуватися. Суміш осаду ДНК потім додавали до культурального середовища у кожній чашці та інкубували протягом 5 годин при 37°C , 5% CO_2 . Після інкубування до кожної чашки додавали 5мл культурального середовища (DMEM, 10% FBS (фетальної бичачої сироватки), 10% L-глутаміну та 50мкг/мл гентаміцину). Клітини потім інкубували протягом 24-48 годин при 37°C , 5% CO_2 . Далі описаний звичайний протокол способу із застосуванням DEAE-декстрану у відношенні клітин Cos-7. Клітини, які слід застосовувати для трансфекції, розщеплювали за 24 години до трансфекції з одержанням 70-80% конфлюєнта у колбі на час проведення трансфекції. Стисло, 8Fg рецепторної ДНК та 8Fg будь-якої додаткової ДНК, що є необхідною (наприклад, вектор експресії білка G_{α} , конструкт-репортер, маркер стійкості до антибіотика, моск-вектор тощо), додавали до 9мл суміші повного DMEM та суміші DEAE-декстрану (10мг/мл у фізіологічному розчині з фосфатним буфером (PBS)). Клітини Cos-7, розташовані у колбі T225 (суб-конфлюєнт), промивали один раз PBS та у кожну колбу додавали суміш ДНК. Клітини залишали інкубуватися протягом 30 хвилин при 37°C , 5% CO_2 . Після інкубування у кожну колбу додавали 36мл повного DMEM з 80FM хлорохіну та залишали інкубуватися протягом додаткових 3 годин. Середовище потім відсмоктували та додавали 24мл повного середовища, що містить 10% диметилсульфоксиду (DMSO), протягом точно 2 хвилин, а потім відсмоктували. Клітини потім двічі промивали PBS та 30мл повного DMEM додавали у кожну колбу. Клітини потім залишали інкубуватися протягом ночі. Наступного дня клітини збирали шляхом трипсинізації та пересівали за необхідністю залежно від типу аналізу, який слід було виконувати.

Далі описаний звичайний протокол опосередкованої ліпосомами трансфекції, що застосовується до клітин CHO. Клітини, які слід використовувати для трансфекції, розщеплювали за 24 години до трансфекції з одержанням 70-80% конфлюєнта у колбі на час проведення трансфекції. Взагалі 10Fg ДНК, яка може включати змінні співвідношення рецепторної ДНК та будь-якої додаткової ДНК, яка є необхідною (наприклад, вектор експресії білка G_{α} , конструкт-репортер, маркер стійкості до антибіотика, моск-вектор тощо), застосовували з метою трансфекції кожної 75cm^2 колби, що містить клітини. Опосередковану ліпосомами трансфекцію здійснювали згідно з рекомендаціями виробника (LipofectAMINE, GibcoBRL, Bethesda, MD). Трансфектовані клітини збирали через 24 години

після трансфекції та їх або застосовували, або пересівали згідно з вимогами аналізу, який слід було застосовувати. Далі описаний звичайний протокол способу електропорації, який застосовується до клітин Cos-7. Клітини, які слід використовувати для трансфекції, розщеплювали за 24 години до трансфекції з одержанням субконфлюєнта у колбах під час трансфекції. Клітини збирали трипсинізацією, знов суспендували у тому ж середовищі та підраховували. 4×10^6 клітин суспендували у 300 F1 DMEM та розташовували у кюветці для електропорації. 8Fg рецепторної ДНК та 8Fg будь-якої додаткової ДНК, що потребується (наприклад, вектор експресії білка G_{α} , конструкт-репортер, маркер стійкості до антибіотика, моск-вектор тощо), додавали до клітинної суспензії, кювету розташовували у імпульсному генераторі BioRad Gene Pulser, де вона зазнавала впливу електричних імпульсів (характеристики Gene Pulser: напруга 0,25кВ, потужність - 950 FF). Після впливу імпульсу 800 F1 повного DMEM додавали до кожної кюветки та суспензію переносили у стерильну пробірку. Повне середовище додавали у кожну пробірку, щоб отримати кінцеву концентрацію клітин 1×10^5 клітин/100 F1. Клітини потім розташовували на планшетах, як це необхідно, залежно від типу аналізу, який слід було виконати.

Далі описаний звичайний протокол опосередкованої вірусом експресії гетерологічних білків для бакуловірсної інфекції клітин комах Sf9. Кодувальну ділянку ДНК, що кодує рецептор, описаний тут, можна субклонувати у pBlueBacIII в існуючі сайти рестрикції або сайти, вбудовані у послідовності 5' та 3' до кодувальної ділянки поліпептидів. Для одержання бакуловірусу, 0,5Fg вірусної ДНК (BaculoGold) та 3Fg конструкту ДНК, що кодує поліпептид, можна трансфектувати спільно у 2×10^6 клітин Sf9 комах *Spodoptera frugiperda* шляхом осадження фосфатом кальцію, що описується у Phamingen [у "Baculovirus Expression Vector System: Procedures and Methods Manual"]. Клітини потім інкубували протягом 5 днів при температурі 27°C . Супернатант чашки, у якій проводили спільну трансфекцію, можна зібрати шляхом центрифугування, а пляму рекомбінантного вірусу очистити. Процедуру інфікування клітин вірусом, приготування вірусної культури та титрування вірусної культури виконували так, як описано у посібнику Phamingen. Подібні принципи будуть взагалі застосовуватися для експресії клітин ссавців, опосередкованої ретровірусами, лісовим вірусом Simliki та вірусами з ДНК з подвійним ланцюгом, такими як аденовірус, вірус герпесу та вірус вісповакцини тощо.

Стійка експресія

Гетерологічну ДНК можна стабільно включити у клітини-хазяїни, примушуючи клітину постійно експресувати сторонній білок. Способи уведення ДНК у клітину є подібними до способів, описаних вище для тимчасової експресії, проте вони потребують спільної трансфекції допоміжного гена, щоб надати стійкості до антибіотиків цільовій клітині-хазяїні. Одержану стійкість до антибіотиків можна застосовувати для відбору та зберігання клітин з одержаною гетерологічною ДНК. Набір генів стійкості є доступним і включає, проте, не обмежую-

чись лише ними, ген стійкості до неомицину, канамицину та пігроміцину. Для цілей проведення дослідів з рецептором, стійку експресію гетерологічного рецепторного білка здійснюють у, проте не обмежуючись обов'язково тільки ними, клітинах ссавців, які включають CHO, HEK293, LM (tk-) тощо.

Приготування клітинних мембран

Для здійснення аналізів зв'язування, осад трансфектованих клітин суспендували у льодяному буфері (20мМ Tris-HCl, 5мМ EDTA, pH 7,4) та гомогенізували ультразвуком протягом 7 секунд. Клітинні лізати центрифугували при 200хg протягом 5 хвилин при 4°C. Супернатанти потім центрифугували при 40000хg протягом 20 хвилин при 4°C. Отриманий осад потім промивали один раз у буфері гомогенізації та суспендували у буфері зв'язування (дивись способи для зв'язування радіолігандів). Концентрацію білків визначали за способом Bradford (1976), застосовуючи бичачий сироватковий альбумін як стандарт. Аналізи зв'язування звичайно виконували одразу, проте можна приготувати мембрани в певній кількості та зберігати замороженими у рідкому азоті для наступного застосування.

Аналізи зв'язування радіолігандів

Аналізи зв'язування радіолігандів для рецептора MCH1 щура здійснювали із застосуванням плазмиди pcDNA3.1-rMCH1-f (ATCC Patent Deposit Designation No. PTA-3505). Плазміда pcDNA3.1-rMCH1-f включає регуляторні елементи, необхідні для експресії ДНК у клітині ссавця, яка є так оперативно зв'язаною з ДНК, яка кодує рецептор MCH1 щура, що забезпечує його експресію. Плазмиду pcDNA3.1-rMCH1-f було віддано на депонування 5 липня 2001 року в Американську Колекцію Типових Культур (ATCC), 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, U.S.A за умовами Будапештського договору про міжнародне визнання депонування мікроорганізмів з метою здійснення процедури патентування, та вона відповідає у ATCC Patent Deposit Designation №PTA-3505. Аналізи зв'язування можна також виконувати, як описано далі з плазмидою rEXJ.HR-TL231 (ATCC Accession №203197). Плазміда rEXJ.HR-TL231 кодує рецептор MCH1 людини, та її було віддано на депонування 17 серпня 1998 року в Американську Колекцію Типових Культур (ATCC), 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, U.S.A за умовами Будапештського договору про міжнародне визнання депонування мікроорганізмів з метою здійснення процедури патентування, та вона відповідає у ATCC Accession №203197. Ембріональні клітини Peak rapid 293 нирки людини (клітини Peakr293) тимчасово трансфектували ДНК, що кодує рецептор MCH1, застосовуючи спосіб з фосфатом кальцію, та клітинні мембрани одержували, як описано вище. Експерименти зі зв'язуванням з мембранами клітин Peakr293, трансфектованих рецептором MCH1 щура, виконували з 0,08нМ [³H] Сполуки А із застосуванням буферу для інкубації, що складається з 50мМ Tris pH 7,4, 10мМ MgCl₂, 0,16мМ PMSF (фенілметилсульфонілфторид), 1мМ 1,10 фенантроліну та 0,2% BSA (альбуміну бичачої сироватки). Зв'язування виконували при 25°C протягом 90 хвилин.

Інкубацію припиняли шляхом швидкого вакуумного фільтрування через фільтри із скловолокна GF/C, які попередньо змочили у 5% PEI, застосовуючи 50нМ Tris pH 7,4 як буфер для промивання. В усіх експериментах неспецифічне зв'язування визначали, застосовуючи 10пМ міченого тритієм метил (4S)-3-[[[3-(4-[3-(ацетиламіно)феніл]-1-піперидиніл)пропіл]аміно]карбоніл]-4-(3,4-дифторфеніл)-6-(метоксиметил)-2-оксо-1,2,3,4-тетрагідро-5-піримідинкарбоксилату. Синтез цієї міченої радіоактивним ізотопом сполуки описано у [WO 03/04027].

Дані зв'язування

Вищевказаний аналіз застосовували для ідентифікації сполук цього винаходу як сильних інгібіторів цього рецептора MCH1. Значення K_i для описаної сполуки знаходяться в діапазоні від 0,1нМ до 1000нМ. В одному варіанті здійснення зв'язувальна афінність для сполук щодо рецептора MCH1 становить від 0,5нМ до 500нМ. В одному варіанті здійснення зв'язувальна афінність для сполук щодо рецептора MCH1 становить від 1,0нМ до 100нМ. В іншому варіанті здійснення зв'язувальна афінність для сполук щодо рецептора MCH1 становить від 1,0нМ до 75нМ.

VI. Способи in-vivo

A. Ожиріння

Наступні два (2) способи описують протоколи, які можна застосовувати, щоб передбачити ефективність антагоністів MCH1 для лікування ожиріння.

1. Вплив антагоністів MCH1 на вагу тіла (3 дні)

Самців щурів Long Evans (Charles River), що мають вагу 180-200 грамів, розташовують групами по 4 тварини з 12-годинним циклом чергування освітленості та темряви з вільним доступом до їжі та води. Сполуки, що випробовуються, вводяться двічі на день шляхом інтраперитонеальної ін'єкції за 1 годину перед циклом темряви та за 2 години після вмикання світла протягом 3 днів. Усіх щурів зважують щоденно після кожної ранкової ін'єкції. Загальні результати виражаються як вага тіла (грами), набута за день (значення±SEM), та аналізуються шляхом двофакторного дисперсійного аналізу ANOVA. Данні для кожної часової точки аналізуються шляхом однофакторного дисперсійного аналізу ANOVA, а потім визначають post hoc критерій за Ньюманом-Кельсом (Newman-Keuls). Дані потім аналізуються із застосуванням програми GraphPad Prism (v 2.01) (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

2. Вплив антагоністів MCH1 на споживання підсолоджененого згущеного молока

Самців мишей C57BL/6 (Charles River), що мають вагу 17-19 грамів на початку експериментів, розташовують групами по 4 тварини з 12-годинним циклом чергування освітленості та темряви з вільним доступом до їжі та води. Протягом 7 днів мишей зважують, розташовують їх в окремих клітках та дозволяють їм пити підсолоджене згущене молоко (Nestle, розведене 1:3 водою) протягом 1 години, 2-4 години під час циклу освітленості. Кількість спожитого молока визначається шляхом зважування пляшки молока до та після кожного циклу споживання. У день тесту мишам вводять шляхом інтраперитонеальних ін'єкцій випробовувані спо-

луки (3,10 або 30мг/кг у 0,01% молочній кислоті), носій (0,01% молочна кислота), d-фенфлурамін (10мг/кг в 0,01% молочній кислоті) за 30 хвилин до отримання молока. Кількість молока, спожитого у день тесту (у мл молока/кг ваги тіла), порівнюється з базисним споживанням для кожної миші, що було визначено у попередні 2 дні. Дані для кожної часової точки аналізуються шляхом однофакторного ANOVA.

В. Депресія

Наступний спосіб описує протокол, який можна застосовувати для того, щоб передбачити ефективність антагоністів MCH1 для лікування депресії. 1.

Тест примусового плавання (FST) у щурів

Тварини

В усіх експериментах застосовували щурів Sprague-Dawley (Taconic Farms, NY). Щурів розташовують групами по 5 тварин на клітку та підтримують 12-годинний цикл чергування освітленості та темряви. Щурам дають звикнути до рук протягом 1 хвилини кожного дня протягом 4 днів до початку тестування поведінки.

Введення ліків

Тваринам довільно призначають отримати єдине інтраперитонеальне введення носія (2,5% EtOH/2,5% Tween-80), імпреміну (позитивний контроль, 60мг/кг) або випробовуваної сполуки за 60 хвилин до початку 5-хвилинного періоду тесту. Усі ін'єкції виконують, застосовуючи туберкуліновий шприц об'ємом 1см³ з 26 3/8-калібровими голками (Becton-Dickinson, WWR Scientific, Bridgeport, NJ). Об'єм ін'єкції становить 1мл/кг.

Схема експерименту

Процедура, яку застосовують у цьому досліді, є подібною до процедури, описаної раніше [Porsolt et al., 1978], за винятком того, що глибина води у цій процедурі становить 31см. Більша глибина у цьому тесті запобігає тому, щоб щури підтримували себе, торкаючись своїми лапами дна циліндра. Сеанси плавання виконують шляхом розташування щурів в окремих циліндрах з плексигласу (висота 46см×діаметр 20см), що містять воду з температурою 23-25°C та глибиною 31см. Тести плавання завжди проводять між 9:00 та 17:00 годинами, та вони складаються з початкового 15-хвилинного адаптаційного тесту та 5-хвилинного тесту через 24 години після початкового тесту. Ліки вводять за 60 хвилин до періоду 5-хвилинного тесту. Після усіх сеансів плавання щурів виймають з циліндрів, висушують паперовими рушниками та поміщають їх у нагріту клітку на 15 хвилин, а потім повертають їх до їх кліток-домівок. Усі сеанси тесту знімаються на відеоплівку зі застосуванням кольорової відеокамери та записуються для подальшого визначення показників.

Поведінкові показники

Поведінку щурів на 5-секундних інтервалах під час 5-хвилинного тесту оцінює окрема людина, яка не знає про введення речовини. Показники поведінки є наступними.

1. Імобільність - щур залишається плавати у воді без ознак боротьби та робить тільки ті рухи, які необхідні для підтримання голови над поверхнею води;

2. Видряпування - щур робить активні рухи своїми передніми лапами у воді та над нею, звичайно рухаючись у напрямку до стінок;

3. Плавання - щур робить активні плавальні рухи, більш активно, ніж це необхідно для простого підтримання голови над поверхнею води, наприклад, рухаючись колами у циліндрі; та

4. Занурення - усе тіло щура є зануреним.

Аналіз даних

Дані тесту примусового плавання (імобільність, плавання, видряпування, занурення) рандомізують, проводять однофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA) та post hoc аналіз із застосуванням критерію за Ньюманом-Кельсом (Newman-Keuls). Дані аналізують із застосуванням програми GraphPad Prism (V2.01) (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

2. Тест примусового плавання (FST) у мишей

Тварини

Миші DBA/2 (Taconic Farms, NY) застосовують у всіх експериментах. Тварин розташовують по 5 тварин на клітку у контрольованому оточенні з 12-годинним циклом чергування освітленості та темряви. Тваринам дають звикнути до рук протягом 1 хвилини кожного дня протягом 4 днів до початку експерименту. Ця процедура включає примусове харчування через 1,5-дюймову трубку для годування.

Введення ліків

Тваринам довільно призначають отримати єдине введення носія (5% EtOH/5% Tween-80), випробовуваної сполуки або імпреміну (60мг/кг) шляхом перорального примусового введення за 1 годину до тесту плавання.

Схема експерименту

Процедура тесту вимушеного плавання у мишей є подібною до процедури, описаної вище для щурів, але з деякими модифікаціями. Циліндр, що застосовується під час тесту, є 1-літровою лабораторною склянкою (10,5см у діаметрі х висоту 15см), наповненою водою до відмітки 800мл (глибина 10см), температура якої становить 23-25°C. Для кожної миші виконують лише один 5-хвилинний тест між 13:00 та 17:00 годинами. Ліки вводять за 30-60 хвилин до періоду 5-хвилинного тесту. Після усіх сеансів плавання мишей виймають з циліндрів, висушують паперовими рушниками та поміщають у нагріту клітку на 15 хвилин. Усі сеанси тесту знімаються за допомогою кольорової відеокамери SONY та записуються для подальшого визначення показників.

Поведінкові показники

На телевізійному моніторі дослідники продивляються запис поведінки під час 2-5 хвилин тесту та оцінюють її. Реєструють загальний час, коли тварини залишаються іммобільними (тварини плавають з мінімальними рухами для того, щоб залишатися на плаву) та мобільними (плавання та рухи є більш активними, ніж необхідно для того, щоб утримуватися на плаву).

Аналіз даних

Дані тесту примусового плавання (час іммобільності, мобільності, у секундах) рандомізують, проводять однофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA) та post hoc аналіз із застосуванням критерію за Ньюманом-Кельсом (Newman-Keuls). Дані

аналізують із застосуванням програми GraphPad Prism (V2.01) (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

С. Тривога

Наступний спосіб описує протокол, який можна застосовувати, щоб передбачити ефективність антагоністів MCH1 для лікування тривоги.

Тест соціальної взаємодії (SIT)

Щурам дозволяють адаптуватися до умов догляду за тваринами протягом 5 днів та їх розташовують окремо один від одного за 5 днів до експерименту. Тваринам дають звикнути до рук протягом 5 хвилин на день. Схему та спосіб проведення тесту соціальної взаємодії здійснюють, як це раніше було описано у [Kennett et al., (1997)]. У день проведення експерименту парам незнайомих один з одним щурів, що мають однакову вагу ($\pm 5\%$), роблять ідентичні ін'єкції та повертають у їх клітки-домівки. Тварин довільно розподіляють на 5 лікувальних груп, по 5 пар на групу, та їм вводять інтраперитонеально одну з наступних речовин: випробовувану сполуку (10, 30 або 100 мг/кг), носій (1 мл/кг) або хлордіазепоксид (5 мг/кг). Дозу вводять за 1 годину до тесту. Потім щурів на 15 хвилин поміщають у білу коробку або арену з матеріалу perspex (54x37x26 см) для тесту, дно якої розділене на 24 однакові квадрати. Повітряний кондиціонер застосовують для створення фонового шуму та для підтримання кімнатної температури приблизно 23,3°C (74°F). Усі сеанси знімаються на відеоплівку, застосовуючи відеокамеру JVC (модель GR-SZ1, Elmwood Park, NJ) та 30-хвилинні відеокасети TDK (останній бренд HG) або Sony. Усі сеанси виконують у період між 13:00 та 16:30 годинами. Активну соціальну взаємодію, визначену як догляд за поверхнею тіла, обнюхування, кусання, боксування, ігрова боротьба, переслідування та перелазування або підлазування, підраховують із застосуванням секундоміра (модель Sportsline no. 226, із роздільною здатністю 1/100 секунди). Підраховують кількість епізодів підйому на задні лапи (тварина повністю підіймає своє тіло на задніх кінцівках), догляду за поверхнею тіла (вилизування, покусування, шкрябання тіла) та умивання морди (тобто неодноразові рухи лап по морді), а також кількість квадратів, що перетиналися твариною. Пасивну соціальну взаємодію (тварини лежать поруч або одна на одній) не рахують. Уся поведінка пізніше оцінюється дослідником, який нічого не знає про ін'єкції, зроблені кожній парі. Наприкінці кожного тесту коробку ретельно витирають зволоженими паперовими рушниками.

Тварини

Самців щурів-альбіносів Sprague-Dawley (Taconic Farms, NY) розташовують парами в умовах чергування кожні 12 годин періодів освітленості та темряви (світло вмикають о 07:00), при цьому вони мають необмежений доступ до води та їжі.

Введення ліків

Випробовувану сполуку розчиняють у 100% диметилсульфоксиді (DMSO) або у 5% молочній кислоті (об'ємних %) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Хлордіазепоксид (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) розчиняють у двічі дистильованій воді. Носій складається з 50% диметилсульфокси-

ду (об'ємних %) або 100% диметилацетаміду (DMA). Усі розчини ліків готують за 10 хвилин до ін'єкції та розчини виливають наприкінці кожного дня тестування. Об'єм розчину ліків, що вводиться, становить 1 мл/кг.

Аналіз даних

Дані тесту соціальної взаємодії (час взаємодії, підведення на задні лапи та перетинання квадратів) рандомізують та проводять однофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA) та post hoc аналіз із застосуванням критерію за Стьюдентом-Ньюманом-Кельсом (Student-Newman-Keuls). Дані аналізують на відповідність критерію нормальності за Шапіро-Уїлком (Shapiro-Wilk). Дані аналізують за допомогою програми GBSTAT, за версією 6,5 (Dynamics Microsystems, Inc., Silver Spring, MD, 1997).

D. Сечові розлади

Вплив сполук на рефлекс сечовипускання оцінювали на щурих моделях з "зумовленим розтягненням ритмічним скороченням" (DIRC), як описано у попередніх публікаціях [наприклад, Maggi et al., 1987, Morikawa et al., 1992], та з безперервною повільною трансвезикулярною інфузією (CSTI).

1. Модель зумовленого розтягненням ритмічного скорочення (DIRC)

Самок щурів Sprague Dawley, вага яких становила приблизно 300 г, анестезували підшкірним введенням уретану (1,2 г/кг). У трахею ввели канюлю з трубкою PE240 для забезпечення безперешкодної прохідності дихальних шляхів під час усього експерименту. По серединній лінії черевини зробили розріз та ізолювали лівий та правий сечоводи. На сечоводи дистально наклали лігатуру (щоб запобігти витіканню рідини з сечового міхура), а проксимально в них увели канюлю з трубкою PE10. Розріз зашили за допомогою шовкових ниток 4-0, залишивши кінець трубок PE10 зовні для виведення сечі. У сечовий міхур трансуретральнов увели канюлю, застосовуючи трубку PE50, яку ввели на відстані 2,5 см від отвору уретри. Цю канюлю закріпили на хвості за допомогою стрічки та з'єднали з датчиком тиску. Для того, щоб запобігти витіканню сечі з сечового міхура, канюлю міцно приєднали до зовнішнього отвору уретри, застосовуючи шовкові нитки 4-0. Для того, щоб стимулювати рефлекс сечовипускання, сечовий міхур спочатку спорожнили шляхом прикладання тиску на нижній відділ черевини, а потім заповнювали звичайним фізіологічним розчином з 100 збільшенням (максимум=2 мл) до спонтанного скорочування сечового міхура (звичайно 20-40 мм рт. ст.) зі швидкістю одне скорочення кожні 2-3 хвилини. Коли встановився регулярний ритм, носій (фізіологічний розчин) або випробовувані сполуки вводили шляхом внутрішньої або інтраперитонеальної ін'єкції для того, щоб досліджувати їх вплив на активність сечового міхура. Як позитивний контрольний препарат часто застосовують антагоніст 5-HT_{1A} WAY-100635. Дані представили як інтервал скорочення (у секундах) перед введенням препарату (базисні) або після застосування носія або випробовуваної речовини.

2. Моделювання безперервної повільної трансвезикулярної інфузії (CSTI) на щурах

Для досліджу застосовували самців щурів Sprague Dawley, вага яких становила приблизно 300г. Щурів анестезували пентобарбітоном натрію (50мг/кг, інтраперитонеальна ін'єкція). Зробивши розріз посередині черевини, отримали доступ до сечового міхура, у який крізь невеликий надріз на куполі сечового міхура ввели поліетиленову канюлю (РЕ 50) та канюлю закріпили за допомогою касетного шва. Інший кінець канюлі вивели зовні крізь шкіру на дарсальній ділянці шиї. Подібно до цього, іншу канюлю (РЕ 50) ввели у шлунок крізь парамедіальний розріз черевини, при цьому вільний кінець канюлі вивели зовні крізь шкіру на ділянці шиї. Хірургічні рани зашили шовковою ниткою 4-0 та тварин залишали відновлюватися, застосовуючи відповідний пост-хірургічний догляд. Наступного дня тварину розташовували у апараті для фіксування лап щурів. Відкритий кінець канюлі сечового міхура приєднали через трибічний запірний кран як до датчика тиску, так і до інфузійного насоса. Цикли спорожнення сечового міхура ініціювали безперервною інфузією звичайного фізіологічного розчину з витратою 100мкл/хвилину. Повторні спорожнювальні стиснення реєстрували з використанням програмного забезпечення безпосереднього отримання даних Power Lab. Після реєстрування базисної кривини спорожнення протягом години, безпосередньо у шлунок через внутрішньошлунковий катетер вводили випробовувану сполуку або носій та протягом 5 годин спостерігали за циклами спорожнення. Тиск при сечовипусканні та частоту підраховували до та після ін'єкції (з інтервалом кожні 30 хвилин) для кожної тварини. Місткість сечового міхура рахували на основі частоти сечовипускання при постійній інфузії 100мкл/хвилину. Вплив випробовуваної сполуки представили як відсоток від базисної (до застосування сполук) місткості сечового міхура. WAY 100635 часто застосовується як позитивний контроль для порівняння.

Посилання

1. Bednarek, M. A., et al., "Synthesis and biological evaluation in vitro of a selective, high potency peptide agonist of human melanin-concentrating hormone

action at human melanin-concentrating hormone receptor 1" *J Biol Chem.* 277 (16): 13821-13826 (2002).

2. Borowsky, B., et al., "Antidepressant, anxiolytic and anorectic effects of a melanin-concentrating hormone-1 receptor antagonist" *Nature Medicine*, 8 (8): pg 825-830 (2002).

3. Chambers, J., et al., "Melanin-concentrating hormone is the cognate ligand for the orphan G-protein-coupled receptor SLC-1" *Nature* 400(6741): 261-6 (1999).

4. Chen, Y., et al., "Targeted disruption of the melanin-concentrating hormone receptor-1 results in hyperphagia and resistance to diet-induced obesity" *Endocrinology* 143(7): 2469-2477 (2002).

5. Doggrell SA., "Does the melanin-concentrating hormone antagonist SNAP-7941 deserve 3As? Expert Opinion on Investigational Drugs; 2003,121(6): pp. 1035-1038 (2003).

6. Kawachi, H., et al., Characterization of melanin-concentrating hormone in chum salmon pituitaries. *Nature*, 305: 321-333 (1983).

7. Lakaye, B., et al., "Cloning of the rat brain cDNA encoding for the SLC-1 G protein-coupled receptor reveals the presence of an intron in the gene" *Biochem Biophys Acta* 1401(2): 216-220(1998).

8. Maggi, C A., et al., "Spinal and supraspinal components of GABAergic inhibition of the micturition reflex in rats". *J Pharmacol Exp Ther* 240: 998-1005 (1987).

9. Marsh, D. J., et al., "Melanin-concentrating hormone 1 receptor-deficient mice are lean, hyperactive, and hyperphagic and have altered metabolism" *Proc Natl Acad Sci USA* 99(5): 3240-3245 (2002).

10. Saito, Y., et al., "Molecular characterization of the melanin-concentrating-hormone receptor" *Nature*, 400(6741): 265-269 (1999).

11. Porsolt, R. D., et al., "Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments" *Eur J Pharmacol* 47(4): 379-391 (1978).

12. Takekawa, S., et al., "T-226296: a novel, orally active and selective melanin-concentrating hormone receptor antagonist" *Eur J Pharmacol* 438(3): 129-35 (2002).