

Біль є сенсорним відчуттям, відмінним від відчуття дотику, тиску, тепла і холоду. Він характеризується тими, хто страждає від нього, як гострий, тупий, колючий, ріжучий або пекучий і звичайно включає як саме відчуття, так і реакцію на нього. Такий діапазон відчуттів, а також різне сприйняття болю різними особами, робить важким визначення болю, однак, є багато осіб, що страждають від сильних і тривалих болів.

Біль, що спричиняється пошкодженням нейронних структур, часто проявляє себе як надчутливість або гіпералгезія і її часто називають "нейропатичним". Біль може також "спричинятись" стимулюванням ноцицептичних рецепторів і передаватись через непошкоджені нейронні шляхи. Такий біль називають ноцицептичним.

Рівень стимуляції, при якому біль стає помітним, називають "больовим порогом". Аналгетики є фармацевтичними агентами, які полегшують біль підняттям больового порогу без втрати свідомості. Після введення аналгетичних ліків відчуття болю стає помітним лише після більш інтенсивного або тривалішого стимулювання. У тих, хто страждає від гіпералгезії, аналгетик може викликати антигіпералгезію. На відміну від аналгетиків такі агенти, як локальні анестетики, блокують передачу у периферійному нервовому волокні і цим блокують відчуття болю. Загальні анестетики знижують відчуття болю через втрату свідомості.

Були повідомлення про те, що антагоністи тахікініну викликають антиноцицепцію у тварин, яка, як вважають, є аналогом алгезії у людини [Maggi et al., J. Auton. Pharmacol, 1993, 13, 23-93]. Зокрема, було показано, що непептидні антагоністи рецептора NK-1 викликають таку алгезію. Наприклад, антагоніст RP 67580 рецептора NK-1 викликав алгезію, за рівнем близьку до морфіну [Garret et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, 88, 10208-10212].

Опіїодні аналгетики є добре відомим класом аналгетичних агентів з морфіноподібною дією. Синтетичні і напівсинтетичні опіїодні аналгетики є похідними п'яти хімічних класів сполук: фенатренів, фенілгептиламінів, фенілпіперидинів, морфінанів і бензоморфанів. Ці сполуки мають різну фармакологічну активність: деякі з них є сильними агоністами у опіїодних рецепторах (наприклад, морфін), інші є слабкими або помірними агоністами (наприклад, кодеїн) або проявляють змішану агоністичну-антагоністичну активність (наприклад, нальбуфін), або є частковими агоністами (наприклад, налорфін). Хоча такий опіїодний частковий агоніст, як налорфін (N-алкільний аналог морфіну), антагонізує аналгетичну дію морфіну, сам по собі він може бути сильним аналгетиком.

Серед опіїодних аналгетиків морфін має найбільш широке застосування, але, поряд з терапевтичними якостями, він має ряд вад, включаючи респіраторну депресію, зниження шлунково-кишкової перистальтики, нудоту і блювання. Толерантність і фізична залежність також обмежують клінічне застосування опіїодних сполук.

Аспірин і інші саліцилатні сполуки часто використовуються у терапії для переривання підсилення запального процесу при ревматичних захворюваннях і артритах і для тимчасового зменшення болю. Інші лікувальні сполуки, призначені для цього, включають такі похідні фенілпропіонової кислоти, як ібупрофен і напроксен, суліндак, фенілбутазон, кортикостероїди, антималярійні препарати, наприклад, хлорохін і гідроксихлорохінсульфат, і фенемати [J.Hosp. Pharm., 36: 622 (Травень 1979)]. Ці сполуки, однак, є малоефективними проти невропатичного болю.

Існуюча терапія проти болю також має вад. Деякі терапевтичні агенти вимагають тривалого використання перед тим, як пацієнт відчує їх дію. Інші ліки викликають серйозні побічні явища у певних пацієнтів, які мають бути під пильним наглядом, щоб своєчасно відвернути появу таких явищ. Більшість існуючих ліків лише тимчасово полегшують біль і потребують постійного щоденного або щотижневого вживання. Якщо захворювання прогресує, кількість ліків, необхідних для полегшення болю, часто зростає, підвищуючи можливість появи шкідливих побічних явищ.

Рецептори NDMA визначаються зв'язуванням N-метил-О-аспартату і включають рецептор/іонний каналний комплекс з кількома різними зв'язуваними доменами. Молекула NDMA структурно подібна до глютамату (Glu), який зв'язує у глютаматному сайті, і є високоселективним і потужним активатором рецептора NDMA (Watkins (1987), Olney (1989)).

Відомо, що деякі сполуки можуть зв'язувати у зв'язувальному сайті NDMA/Glu (наприклад, CPP, DCCP-ен, CGP 40116, CGP 37849, CGS 19755, NPC 12636, NPC 17742, D-AP5, D-AP7, CGP 39551, CGP-43487, MDL-100,452, LY-274614, LY-233536 і LY233053). Інші сполуки, які називають неконкурентними антагоністами NDMA, зв'язують у інших сайтах рецепторного комплексу NDMA (прикладом є фенциклідин, дизоцилін, кетамін, тілетамін, CNS 1102, декстрометорфан, мемантин, кінуренова кислота, CNQX, DNQX, 6,7-DCQX, 6,7-DCHQC, R(+)-HA-966, 7-хлоркінуренова кислота, 5,7-DCKA, 5-іод-7-хлоркінуренова кислота, MDL-28,469, MDL-100,748, MGL-29,951, L-689,560, L-687,414, ACPC, ACPCM, ACPCE, аркаїн, дітилентріамін, 1,10-діамінодекан, 1,12-діамінододекан, іфенпродил і SL-82.0715). Ці сполуки були детально розглянуті Rogawski (1992) і Nassieu et al., (1993) і у наведених тут роботах.

На додаток до фізіологічних функцій глютамат (Glu) може бути нейротоксином. Його нейротоксичність називають "екзитотоксичністю", оскільки медіатором його як нейротоксичної, так і лікувальної дії є процес збудження (Olney (1990), Choi (1992)).

Звичайно коли Glu вивільняється на синаптичному рецепторі, від зв'язує лише тимчасово і потім швидко видаляється з рецептора процесом, який переносить його назад у клітину. За ненормальних умов, наприклад, удару, епілепсії і травми ЦНС, видалення Glu не відбувається і він накопичується у рецепторі, зумовлюючи цим постійне збудження електрохімічної активності, яка вбиває нейрон, що має рецептори Glu. У ЦНС численні нейрони мають рецептори Glu і тому екзитотоксичність може спричинити дуже значні пошкодження ЦНС.

Гостра екзитотоксична травма може виникнути як результат ішемії, гіпоксії, травми головного або спинного мозку, деяких харчових отруєнь, пов'язаних з такою екзитотоксичною отрутою, як домінова кислота, дегенерації нейронів, викликаній судомогою, яка може бути результатом постійної епілептичної судорожної активності (status epilepticus). Значна кількість даних підтверджує те, що рецептор NDMA є одним субтипом рецепторів, через які Glu стає медіатором численних травм ЦНС, і що антагоністи NDMA ефективно

захищають нейрони ЦНС від екзитотоксичної дегенерації при цих гострих травматичних синдромах ЦНС (Choi (1988), Olney (1990)).

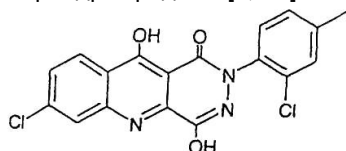
На додаток до пошкодження нейронів, спричиненого гострими інсультами, надмірна активація рецепторів Glu може сприяти більш поступовому нейродегенеративному процесу, який призводить до смерті клітин при різних хронічних нейродегенеративних хворобах, включаючи хворобу Альцгеймера, аміотрофічний вторинний склероз, пов'язане з СНІД слабощесть, хворобу Паркінсона і хворобу Хантингтона (Olney (1990)). Вважається, що антагоністи NDMA можуть бути корисними у терапії таких хронічних захворювань.

У 1980р. було виявлено, що PCP (відомий також як "янгольський пил") діє як "сайт впізнання PCP" у іонному каналі рецептора NDMA Glu. PCP діє як неконкурентний антагоніст, який блокує потік іонів через іонний канал NDMA. Пізніше було виявлено, що ліки, які діють у сайті PCP як неконкурентні антагоністи NDMA, можуть створювати психотоміметичні бічні ефекти. Крім того, було виявлено, що певні конкурентні і неконкурентні антагоністи NDMA можуть викликати подібні патоморфологічні зміни у мозку щура [Olney et al. (1991), Hargreaves et al. (1993)]. Такі сполуки також мають психотоміметичну дію на мозок людини [Kristensen et al. (1992), Herrling (1994), Grotta (1994)].

Гліциновий зв'язувальний сайт рецепторного комплексу NDMA може бути розрізнений від зв'язувальних сайтів Glu і PCP. Крім того, нещодавно було виявлено, що рецептори NDMA існують у вигляді кількох субтипів, які відрізняються особливостями гліцинових зв'язувальних сайтів рецептора. Сполуки, що зв'язують у гліциновому сайті рецептора NDMA і можуть бути використані для лікування удару і нейродегенеративних станів, описані у патентах США 5 604 227, 5 733 910, 5 599 814, 5 593 133, 5 744 471, 5 837 705 і 6 103 721.

Було виявлено, що певні сполуки, здатні приєднуватись до гліцинового сайту рецептора NDMA, можуть полегшувати біль, зокрема, нейропатичний біль.

Отже, одним з об'єктів винаходу є сполука - 7-хлор-4-гідрокси-2-(2-хлор-4-метилфеніл)-1,2,5,10-тетрагідропіридазин[4,5-b]хінолін-1,10-діон структурної формули I:



(I)

Іншим об'єктом винаходу є спосіб лікування від болю сполуками структурної формули I, який включає введення ефективно полегшуючої біль кількості цієї сполуки.

У іншому втіленні цей спосіб полягає у введенні ефективно полегшуючої біль кількості сполуки формули I у формі фармацевтичної композиції, яка містить як активний інгредієнт сполуку структурної формули I з одним або більше фармацевтично прийнятними добавками.

У ще одному втіленні винаходу цей спосіб полягає у приєднанні сполуки винаходу до гліцинового сайту рецептора NDMA у теплокровних тварин, наприклад, людини, для лікувального інгібування активності рецептора NDMA.

Іншим об'єктом винаходу є спосіб виготовлення сполуки структурної формули I.

Ще одним об'єктом винаходу є фармацевтичні композиції, які містять сполуку структурної формули I, і використання сполуки структурної формули I для приготування медикаментів і фармацевтичних композицій.

Винахід включає сполуку - 7-хлор-4-гідрокси-2-(2-хлор-4-метилфеніл)-1,2,5,10-тетрагідропіридазин[4,5-b]хінолін-1,10-діон, її фармацевтично прийнятні солі, способи виготовлення цієї сполуки і її солей, фармацевтичні композиції, що містять цю сполуку і способи використання цієї сполуки, її солей і цих фармацевтичних композицій.

Прийнятні фармацевтично прийнятні солі сполук винаходу включають такі солі приєднання кислот, як метансульфонат, фумарат, гідрохлорид, гідробромід, цитрат, трис(гідроксиметил)амінометан, малеат і солі фосфорної у сульфурової кислот. У інших втіленнях придатними є такі основні солі, як солі лужних металів, наприклад, натрію, лужноземельних металів, наприклад, кальцію або магнію, органічні амініні солі, наприклад, тріетиламін, морфолін, N-метилпіперидин, N-етилпіперидин, прокаїн, дибензиламін, холін, N,N-дибензилетиламін або амінокислоти, наприклад, лізини.

Для використання сполуки згідно з винаходом або її фармацевтично прийнятною солі для лікування або профілактики болю у ссавців, включаючи людину, цю сполуку можна ввести у фармацевтичну композицію згідно з стандартною фармацевтичною практикою.

Фармацевтичні композиції, що містять сполуку винаходу, можна вводити звичайними шляхами, наприклад, орально, локально, парентерально, під'язично, назально, вагінально або ректально, або інгаляцією. Для цього сполуки згідно з винаходом можуть бути виготовлені у вигляді, наприклад, таблеток, капсуль, водних або масляних розчинів, суспензій, емульсій, кремів, мазей, желе, носових вприскувань, супозиторіїв, тонкодисперсних порошоків або аерозолів для інгаляції, і стерильні водні або масляні розчини або стерильні суспензії або емульсії для парентерального введення (включаючи внутрішньовенне, внутрішньом'язове або інфузійне). Бажаним способом введення є оральний таблеткою або капсулою.

Крім сполуки винаходу фармацевтична композиція згідно з винаходом може містити один або кілька інших фармакологічно активних агентів, або такі фармацевтичні композиції можна одночасно або у послідовності вводити разом з одним або кількома іншими фармакологічно активними агентами.

Фармацевтичні композиції згідно з винаходом мають вводитись пацієнту ефективно полегшуючими біль денними дозами. Денну дозу, якщо необхідно, можна розділити на окремі дози, причому точна кількість сполуки при прийомі і спосіб введення залежить від маси, віку і статі пацієнта, що одержує лікування, і від конкретної стадії захворювання, згідно з відомими принципами. Бажаним є одноразовий щоденний прийом.

У іншому втіленні винахід дає фармацевтичну композицію, яка містить сполуку винаходу або її фармацевтично прийнятну сіль разом з одним або більше фармацевтично прийнятними добавками, наприклад, наповнювачем або носієм.

Інше втілення винаходу передбачає використання сполуки винаходу або її фармацевтично прийнятної солі для приготування медикаменту, призначеного для приєднання до гліцинового сайту рецептора NDMA у теплокровних тварин, наприклад, людини.

Ще одне втілення винаходу включає спосіб зв'язування сполуки винаходу з гліциновим сайтом рецептора NDMA у теплокровної тварини, наприклад, людини, що потребує лікування від болю, який включає введення цій тварині ефективної кількості сполуки структурної формули I або її фармацевтично прийнятної солі.

Визначення

Взагалі у наведених тут способах, процесах і прикладах:

концентрація здійснюється відцентровим випаровуванням *in vacuo*;

операції проводяться при зовнішній температурі, що лежить у межах 18-26°C у атмосфері нітрогену;

колонна хроматографія (флеш-процедура), якщо не зумовлено інше, виконується на кремнеземі Merck Kieselgel (Art. 9385);

виходи наведені лише для ілюстрації і не відповідають максимально можливим;

структура кінцевих продуктів формули I звичайно визначаються за допомогою ЯМР і мас-спектрографії, протонний магнітний резонанс визначається у ДМСО- d_6 з використанням спектрометра Varian Gemini 2000, що працює у полі 300МГц; хімічні зсуви наведені у частинках на мільйон нижче від тетраметилсилану як внутрішнього стандарту (шкала 8). Пікові мультиплети позначені таким чином: s - синглет, bs - широкий синглет, d - дублет, AB або dd - подвійний дублет, t - триплет, dt - подвійний триплет, m - мультиплет, bm - широкий мультиплет. Мас-спектрографічні дані при бомбардування швидкими атомами (FAB) одержуються спектрометром Platform від Micromass у електронному промені, причому, були зібрані дані про позитивні і негативні іони, у даному випадку наведено $(M+H)^+$. Дані інфрачервоного спектра одержуються за допомогою Nicolet Avatar 360 FT-IR.

Проміжні сполуки звичайно не характеризуються повністю, а чистота визначається мас-спектрографією або аналізом ЯМР.

У подальшому використані такі аббревіатури і визначення:

CDCl₃ - дейтерований хлороформ;

ЦМК - 1-циклогексил-3-(морфолінетил)карбодіімід-мето-р-толуолсульфонат;

ДХМ - дихлорметан;

ДХЛМ - дихлормочевина;

ДЦК - 1,3-дициклогексилкарбодіімід;

ДМАП - 4-(диметиламіно)піридин;

ДМФ - N,N-диметилформамід;

ДМСО - диметилсульфоксид;

m/s - мас-спектрографія;

NМП - N-метилпіролідон;

ЯМР - ядерно-магнітний резонанс;

ТГФ - тетрагідрофуран;

Наведені приклади і тести ілюструють винахід, не обмежуючи його.

Приклади

Приклад 1

Сполуку винаходу: 7-хлор-4-гідрокси-2-(2-хлор-4-метилфеніл)-1,2,5,10-тетрагідропіридазин[4,5-6]хінолін-1,10-діон можна приготувати за такою процедурою:

2-хлор-4-метил фенілгідазин гідрохлорид.

Суспензію 2-хлор-4-метиланіліну (10,1мл, 11,63г, 82,1ммоль) у 64мл води і 60мл 12N HCl охолоджують до -5°C (внутрішня температура) і перемішують механічним перемішувачем. Додають розчин нітриту натрію (8,26г, 119,7ммоль) у 56мл води протягом 30хвил. Розчин стає більш прозорим, але ще залишається тверда речовина. Суміш перемішують при -5°C 20хвил. і потім охолоджують до -10°C. Краплями протягом 30хвил. додають розчин хлориддигідрату олова (II) (53,60г, 237,6ммоль) у 36мл 12N HCl, підтримуючи внутрішню температуру на рівні -5 - -10°C. Одержану рожево-коричневу суміш перемішують при -5 - -10°C 2год. і потім холодною фільтрують через охолоджену воронку з оплавленого скла. Зібрану тверду речовину промивають холодним 1%-м етанолом у етері (100мл), потім холодним етером (500мл) і сушать повітрям 30хвил. Після висушування у вакуумі одержують бажаний продукт у вигляді блідо-жовтої кристалічної твердої речовини (7,76г, 49%).

¹H ЯМР δ (300МГц, CDCl₃) δ 10,09 (bs, 2H), 7,89 (s, 1H), 7,25 (d, 1H, J_m=1,2Гц), 7,13 (dd, 1H, J_o=8,4Гц, J_m=1,2Гц), 7,02 (d, 1H, J_o=8,4Гц), 2,24 (s, 3H);

МС (CI) m/z 157/159.

(Трет-бутокс)-N-[(2-хлор-4-метилфеніламіно)карбоксамід.

Суспензію 2-хлор-4-метилфенілгідазингідрохлориду (7,74г, 40,09ммоль) у 95мл насиченого водного NaHCO₃ перемішують 10хвил. і потім обробляють твердим K₂CO₃ (9,45г, 68,37ммоль). Одержану тонку світло-жовту суспензію перемішують 10хвил., протягом 5хвил. додають розчин ди-*t*-бутилкарбонату (12,97г, 46,12ммоль) у 195мл ТГФ і одержану біфазну суміш енергійно перемішують 3год. Реакційну суміш розділяють і водний шар екстрагують етером (5x25мл). Об'єднані органічні шари промивають дистильованою водою (2x75мл), висушують над MgSO₄ і концентрують під зниженим тиском. Висушування у вакуумі дає світло-оранжеве масло (14,07г), яке очищують флеш-хроматографією на силікагелі з етер/гексанами (10:90) як елюентом. Одержане світло-жовте масло твердіє (9,92г, 96%).

¹H ЯМР (300МГц, CDCl₃) δ 8,88 (s, 1H), 7,15 (s, 1H), 7,09 (d, 1H, J_m=1,2Гц), 6,97 (d, 1H, J_o=8,1Гц), 6,64 (d, 1H, J_m=8,1Гц), 2,18 (s, 3H), 1,41 (s, 9H).

МС(CI) m/z 279/281.

Диметил 7-хлор-4-гідроксихінолін-2,3-дикарбоксилат

Перемішану суміш метил-2-аміно-4-хлорбензоату (2,50г, 13,5ммоль) і диметилацетиленкарбоксилату

(2,05г, 14,4ммоль) у трет-бутанолі (22мл) витримують під зворотним холодильником 7год. у атмосфері нітрогену. Після додавання ще диметилацетиленкарбоксилату (1,16г, 8,13ммоль) і витримання під зворотним холодильником ще 2,5год. реакційну суміш залишають охолонути до кімнатної температури і додають трет-бутоксид натрію (1,56г, 13,9ммоль). Після утворення осаду суміш витримують під зворотним холодильником 1,5год., потім охолоджують до кімнатної температури і фільтрують, одержуючи тверду речовину, яку промивають трет-бутанолом і етером. Тверду речовину розчиняють у воді і підкислюють 1N сульфурою до утворення осаду. Одержану суміш екстрагують метиленхлоридом і об'єднані екстракти промивають розсолон і водою, висушують над $MgSO_4$, фільтрують і концентрують, одержуючи зелену тверду речовину. Рекристалізація цього матеріалу з метанолу дає бажану сполуку (1,15г, 47%) у вигляді білуватої твердої речовини, темп. пл. 232-233°C.

МС(Cl): 296 (M+H).

Аналіз для $C_{13}H_{10}ClNO_3$: за розрахунком: С, 52,81; Н, 3,41; N, 4,74; одержано: С, 52,75; Н, 3,47; N, 4,69.

3-карбометокси-7-хлор-4-гідоксигінолін-2-карбонова кислота

До перемішаної суспензії диметил-7-хлор-4-гідоксигінолін-2,3-дикарбоксилату (1,0г, 3,38ммоль) у воді (20мл) додають водний розчин гідроксиду натрію (0,27г, 6,75ммоль). Після розчинення суспензії реакційну суміш розігрівують до 60°C протягом 1год. і потім охолоджують до кімнатної температури і підколюють концентрованою гідрохлоридною кислотою. Продукт екстрагують у діетиетер і етилацетат, органічні екстракти висушують над $MgSO_4$, фільтрують і концентрують у вакуумі, одержуючи кінцеву сполуку у вигляді твердої речовини (900мг). Цей матеріал очищують рекристалізацією з використанням системи співрозчинників ацетат/гексан і одержують кінцеву сполуку (571мг, 60%) у вигляді білої твердої речовини, темп. пл. 296°C (розклад).

МС(Cl)=238 (M+H).

Аналіз для $C_{12}H_8NO_5Cl \cdot 0,4CH_3CO_2CH_2CH_3 \cdot 0,10H_2O$: за розрахунком: С, 51,30; Н, 3,68; N 4,34; одержано: С, 51,28; Н, 3,62; N 3,97.

1H ЯМР 8,22 (d, J=8,7Гц, 1H), 7,92 (d, J=1,8Гц, 1H), 7,28 (dd, J=8,7, 1,8Гц, 1H). 3,90 (s, 3H).

3-карбометокси-2-піролідиніл карбамід-7-хлор-4-гідоксигінолін

До суспензії 3-карбометокси-7-хлор-4-гідоксигінолін-2-карбонової кислоти (2,25г, 8,0ммоль) у ТГФ (20мл) при кімнатній температурі у атмосфері нітрогену додають дициклогексидкарбодіімід (1,65г, 8,0ммоль) і піролідин (0,596г, 8,4ммоль). Реакцію перемішують при кімнатній температурі 15год., після чого фільтруванням видаляють побічну мочевину. Продукт очищують флеш-хроматографією з метанолом (5%) у хлороформі і одержують кінцеву сполуку (2,52г, 94,3%) у вигляді світло-коричневої твердої речовини, темп. пл. 215°C;

МС (Cl): 335 (M+H).

300МГц 1H ЯМР (ДМСО- d_6): 8,12 (d, J=8,7Гц, 1H), 7,60 (d, 1H, J=1,8Гц), 7,47 (dd, 1H, J=8,8, 2,0Гц), 3,69 (s, 3H), 3,40-3,49 (m, 2H), 3,27-3,33 (m, 2H), 1,80-1,96 (m, 4H).

7-хлор-4-оксо-2-(піролідинілкарбоніл)гідрогінолін-3-карбонова кислота

До суспензії 3-карбометокси-2-піролідинілкарбамід-7-хлор-4-гідоксигіноліну (2,52г, 7,5ммоль) у деіонізованій воді (40мл) додають краплями водний розчин (20мл) гідроксиду натрію (882мг, 15,75ммоль), після чого реакцію розігрівують до 60°C. Через 3год. реакцію фільтрують для видалення нерозчинного матеріалу, фільтрат підкислюють до pH=1 і одержують білий осад. Тверду речовину відділяють вакуумним фільтруванням, промивають водою і сушать при 30°C у вакуумі 16год. Це дає кінцеву сполуку у вигляді білої твердої речовини (1,5г, 64%), темп. пл. 225-8°C.

МС (Cl): 321 (M+H).

300МГц 1H ЯМР (ДМСО- d_6): 8,28 (d, J=8,8Гц, 1H), 7,77 (s, 1H), 7,64 (d, 1H, J=8,7), 3,52-3,57 (m, 2H), 3,17-3,19 (m, 2H), 1,83-1,98 (m, 4H).

N-[(трет-бутоксикарбоніламіно)][7-хлор-4-оксо-2-(піролідинілкарбоніл)(3-гідрогінолін)]-N-(2-хлор-4-метилфенілкарбоксамід

До перемішаної суспензії 7-хлор-4-оксо-2-(піролідинілкарбоніл)гідрогінолін-3-карбонової кислоти (14,57г, 45,43ммоль) у безводному ТГФ (300мл) у атмосфері нітрогену додають мето-р-толуолсульфонат 1-циклогексил-3-(2-морфолінетил)-карбодііміду (ЦМС, 34,89г, 82,37ммоль). Біла суспензія стає яскраво-жовтою. Додають твердий (трет-бутоксикарбоніламіно)карбоксамід (13,89г, 54,10ммоль) і потім 50мл безводного ТГФ. Реакційну суміш перемішують при кімнатній температурі 22год. До реакційної суміші при кімнатній температурі додають другу порцію ЦМК (16,77г, 39,59ммоль) і через 2,5год. реакцію гріють при 60°C протягом 5,5год. Після охолодження до кімнатної температури, реакційну суміш фільтрують і тверду речовину промивають ТГФ. Фільтрат і промивки концентрують і висушують у вакуумі, одержуючи світло-жовту піну, яку розчиняють у метиленхлориді (400мл), промивають дистильованою водою (2×150мл), і екстрагують 10%-м $NaHCO_3$ (2×500мл). Органічний шар висушують над Na_2SO_4 , концентрують і висушують у вакуумі, одержуючи світло-коричневу піну, яку очищують флеш-хроматографією на силікагелі з градієнтом від 95:5 до 85:15 для хлороформ/метанолу як елюента. Це дає бажаний продукт (15,42г, 61%) у вигляді білої твердої речовини.

1H ЯМР (300МГц, ДМСО, d_6) δ 13,03 (bs, 1H), 9,19 (bs, 1H), 8,25 (d, 1H, J_o =8,7Гц), 7,68 (d, 1H, J_m =1,8Гц), 7,54 (dd, 1H, J_o =8,7Гц, J_m =1,8Гц), 7,50 (d, 1H, J_m =1,8Гц), 7,45 (d, 1H, J_o =7,8Гц), 6,81 (d, 1H, J_o =7,8Гц), 3,47 (m, 4H), 2,34 (s, 3H), 1,90 (m, 4H), 1,40 (s, 9H).

МС (-Cl) m/z 559/561.

7-хлор-4-гідрокси-2-(2-хлор-4-метилфеніл)-1,2,5,10-тетрагідропіразин[4,5-b]хінолін-1,10-діон.

До перемішаної суспензії N-[(трет-бутоксикарбоніламіно)][7-хлор-4-оксо-2-(піролідинілкарбоніл)(3-гідрогінолін)]-N-(2-хлор-4-метилфенілкарбоксаміду) (21,16г, 37,82ммоль) у 900мл безводного ТГФ у атмосфері нітрогену повільно додають метансульфонову кислоту (120,0мл, 184,9ммоль). Одержаний темно-жовтий розчин перемішують при кімнатній температурі 18год., потім вливають у 7л води, перемішують 3год. і фільтрують, одержуючи світло-жовту тверду речовину, яку обробляють ультразвуком у метанолі, відокремлюють фільтруванням, сушать у вакуумі (30мм) при 40°C і одержують продукт у вигляді білої твердої

речовини (12,93г, 88%).

¹H ЯМР (300МГц ДМСО, d₆) δ 12,90 (bs, 1H), 12,10 (bs, 1H), 8,16 (d, 1H, J_o=8,7Гц), 8,07 (d, 1H, J_m=1,8Гц), 7,47 (dd, 1H, J_o=8,7Гц, J_m=1,8Гц), 7,47 (d, 1H, J_m=1,2Гц), 7,42 (d, 1H, J_o=8,1Гц), 7,29 (dd, 1H, J_o=8,1Гц, J_m=1,2Гц), 2,38 (s, 3H).

МС (CI) m/z 388/390/392.

За розрахунком для C₁₈H₁₁Cl₂NaO₅: С, 55,69; Н, 2,86; N, 10,82; одержано С, 55,78; Н, 2,89; N, 10,79.

Приклад 2

Холінова сіль 7-хлор-4-гідрокси-2-(2-хлор-4-метилфеніл)-1,2,5,10-тетрагідропіридазин[4,5-*b*]хінолін-1,10-діону

Суспензію 7-хлор-4-гідрокси-2-(2-хлор-4-метилфеніл)-1,2,5,10-тетрагідропіридазин-[4,5-*b*]хінолін-1,10-діону (753мг, 1,94ммоль) у метанолі (50мл) обробляють холінгідроксидом (550мл 45%-го розчину у метанолі, 1,94ммоль). Більшу частину твердої речовини розчиняють негайно і суміш обробляють ультразвуком (10хвил.) для розчинення решти. Розчин фільтрують через 0,2-мікронний нейлоновий фільтр-шприц. Розчин зменшують відцентровим випаровуванням до 1,01г (>100%) жовтої твердої речовини, яку рекристалізують з етанолу (25мл) під зворотним холодильником і залишають розчин для повільної кристалізації без перемішування. Через приблизно 2год. кристали збирають вакуумним фільтруванням і висушують, одержуючи сполуку у вигляді жовтої твердої речовини (696мг, 73%), яку рекристалізують з етанолу (20мл) під зворотним холодильником. Тверду речовину залишають на 16год. для формування, обережно зіскоблюють з колби, збирають вакуумним фільтруванням, промивають етанолом (2×3мл) і одержують 500мг продукту, який сушать протягом 3 днів при 100мкм рт.ст. і 30°C і одержують 480мг кінцевої сполуки (50%), темп. пл. 239,5-240,5°C (розклад.).

¹H ЯМР (300МГц, ДМСО-d₆) δ 8,12-8,09 (2H, m); 7,34-7,17 (4H, m); 3,86-3,80 (2H, m); 3,39 (2H, t, J=5,25Гц); 3,09 (9H, s); 2,35 (3H, s);

За розрахунком для C₁₈H₁₀N₃O₃Cl₂•1,0C₅O₁₄NO•0,6H₂O: С, 55,01; Н, 5,06; N, 11,16; одержано С, 55,04, 54,75; Н, 4,86, 4,86; N, 11,05, 11,07.

Випробування біологічних функцій

Тест А: Інгібування зв'язування [³H]MDL105,519

Мозкові мембрани щура, які використовувались у експериментах, були одержані від Analytical Biological Services Inc. і були приготовлені згідно з методом В.М. Baron et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 250, 162 (1989). Свіжу мозкову тканину щурів Sprague-Dawley, що включала церебральну кору і гіпокамп, гомогенізували у 0,32М сахарозі і центрифугували з малою швидкістю, щоб відокремити клітинні мембрани від інших компонентів клітини. Мембрани тричі промивали деіонізованою водою і потім обробляли 0,04%-м Triton X-100, після чого промивали 6 разів у 50мМ Tris-цитратному буфері, рН7,4 і заморожували при -80°C для подальшого використання.

[³H]MDL105,519 (72Ci/ммоль) був придбаний від Amersham, холодний MDL105,519 - від Sigma/RBI. Аналіз на зв'язування виконували згідно з В.М. Baron et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 279, 62 (1996), як це описано далі.

У день експеримента мозкові мембрани були розморожені і при кімнатній температурі суспендовані у 50мМ tris-ацетатному буфері, рН7,4 ("TAB"). Для конкурентного зв'язування був використаний протеїн (75мкг/мл) з забарвлювачем BioRad. Експерименти були проведені на 96-гніздових платах. Мембрани інкубували з 20мкл сполук різної концентрації і 1,2нМ [³H]MDL105,519 протягом 30хвил. при кімнатній температурі у об'ємі 250мкл. Неспецифічне зв'язування визначали, використовуючи 100мкМ неміченого MDL105,519. Немічений MDL105,519 і сполуки розчиняли як основні 12,5мМ розчини у ДМСО. Кінцева концентрація ДМСО у кожному гнізді підтримували на рівні нижче 1%, оскільки було виявлено, що така концентрація не впливає на результати зв'язування. Після інкубації незв'язаний [³H]MDL105,519 був видалений фільтруванням у плати GF/B Unifilter з використанням збиральника Packard. Фільтри промивали 4 рази льодяним TAB (повна кількість буфера 1,2мл). Плати сушили протягом ночі при кімнатній температурі і зв'язану радіоактивність виміряли лічильником Packard TopCount після додавання 45мкл у кожне гніздо MICROSCINT O.

Мозкові мембрани людини були одержані від Analytical Biological Services Inc. і були приготовлені, як це було описано для мембран щура.

Аналіз даних був виконаний з використанням програмних пакетів Microsoft Excel і GraphPad Prism, а дієвість сполук виміряли у Кі (нм).

Тест В. Формаліновий тест

Формаліновий тест використовують для оцінювання здатності сполуки інгібувати індуковану формаліном ноцицептивну поведінку у щурів [D. Dubuisson et al., Pain 4, 161-174 (1977); H. Wheeler-Aceto et al., Psychopharmacology 104, 35-44 (1991); T.J. Coderre et al., Pain 54, 43-50 (1993)]. У цьому тесті спостерігають дві різні фази індукованої формаліном поведінки. Перша фаза реакції, спричиненої гострою ноцицепцією у відповідь ін'єкцію їдкої хімічної речовини (формаліну) у лапу, триває 0 - 5хвил. Після ін'єкції протягом 5-15хвил. триває період заспокоювання. Після цього через 15хвил. починається і триває до 60хвил. друга фаза реакції, зумовлена сенсibilізацією центральних нейронів у дорсальному розі. Сенсibilізація центральних спинних нейронів підсилює аферентний подразнюючий вхід і спричиняє передачу підсиленого болю у мозок. Отже, інгібуванням другої фази реакції визначається центральний механізм дії ліків.

Процедура формалінового тесту така: самців щура розміщують у камері з оргскла і спостерігають 30-45хвил. основні особливості їх поведінки. Тваринам вводять носій (контр. група) або різні дози сполуки, що випробовується, за три год. до ін'єкції 0,05мл стерильного 1%-го формаліну під дорсальну шкіру задньої лапи. Кількість сіпань лапи (реакції) протягом першої (0-5хвил.) і другої (20-35хвил.) фаз підраховували і реєстрували. Сіпань реакцію порівнювали з середньою відповідною кількістю у контрольній групі (соляний розчин) і обчислювали як інгібування у %. ED₅₀ - доза сполуки, яка дає 50%-не інгібування ноцицептивної реакції у першій або другій фазі. Перша фаза реакції може бути інгібована сполуками, які діють периферійно і сполуками, які діють центрально. Друга фаза реакції може бути інгібована сполуками, які мають центральну

дію.

Інгібування ноцицептивної реакції (%) = $100 \times (\text{кількість реакцій у групі сполук}) / (\text{кількість реакцій у контрольній групі})$

Для визначення статистичної значущості дії сполуку був використаний тест Ст'юдента. Активність сполук визначали через їх здатність інгібувати сипальну реакцію.

Тест С. Модель нейропатичного болю (Хронічне Стискання)

Антигіпералгезійні якості сполуки можуть бути випробувані на моделі Хронічного стискання (CCI). Тест є моделлю нейропатичного болю, пов'язаного з пошкодженнями нерва, що безпосередньо походять від травми або стискання або є непрямим наслідком таких захворювань, як інфекція, рак, метаболічні порушення, токсини, недостатнє живлення, імунологічна дисфункція і м'язово-скелетні зміни. У цій моделі унілатеральна периферійна гіпералгезія у щурів створюється накладанням лігатури на нерв [G.J. Bennett et al., Pain 33, 87-107 (1988)].

Згідно з процедурою, щурів Sprague-Dawley (250-350g) анестезують пентобарбіталом натрію і оголяють спільний сідничний нерв на рівні середини стегна розрізом через biceps femoris. Частину нерва (прибл. 7мм) вивільняють від тканин і у чотирьох місцях з інтервалом 1мм накладають лігатуру хромовим кетгуттом. Розріз закривають шарами і тварин залишають рекуперувати. Термальну гіпералгезію вимірюють тестом на відсмикування лапи [K. Hargreaves et al., Pain 32, 77-88 (1988)]. Перед проведенням тесту тварин при звичають до піднятої скляної підлоги. Тепловий промінь від джерела спрямовують на область сідничного нерва на задній лапі через скляну підлогу періодами 20с, щоб уникнути травмування шкіри. Латентності відсмикувального рефлексу у обох задніх лапах вимірюють.

Травмовані лапи з лігатурами нерва показують коротші латентності відсмикування лапи порівняно з нетравмованими лапами. Реакції на сполуки, що проходять тести, оцінювались у різні часи після орального введення для визначення початку і тривалості дії сполуки. При виконанні тесту групи щурів CCI приймали носій або сполуку орально тричі на день протягом 5 днів. Латентності відсмикування лапи виміряли кожного дня за 10хвил. до і через 2 або 3 год. після першої денної дози. Ефективність сполуки оцінювали як середнє зниження у % гіпералгезії порівняно з контрольною групою тварин як

$100 \times (\text{середнє у контр. групі} - \text{середнє у групі сполук}) / (\text{середнє у контр. групі})$

Аналіз даних був виконаний через тест порівняння множинних середніх (тест Данета) і його результати і потентності сполук були представлені як МЕД (мінімальна ефективна доза) у мг/кг/день, що визначає статистично значуще зниження (у %) гіпералгезії.

Таблиця містить результати тестів А, В і С для сполук винаходу.

Таблиця

Тест	Результат
А: Спорідненість до гліцинового сайту (інгібування 56нМ 50нМ (мозок людини) (мозок щура) приєднання [³ H]MDL105,519	
В: Ефективність у формаліновій больовій моделі	ED ₅₀ - прибл. 100мг/кг
С: Модель CCI нейропатичного болю, термічна гіпералгезія	65%-на антигіпералгезія при МЕД < 2мг/кг/день

У формаліновій больовій моделі доза сполуки винаходу, яка забезпечує 50%-не зниження чутливості до болетворного стимулу, становить приблизно 100мг/кг, і є близькою до дози габапентину, яка дає такий же результат. У моделі CCI нейропатичного болю, однак, мінімальна ефективна доза сполуки винаходу становить менше 2мг/кг і дає 65%-ну антигіпералгезію. Порівняно з цим доза габапентину у 90мг/кг/день дає приблизно 46%-ну антигіпералгезію.

При введенні інтратекальною ін'єкцією сполука винаходу інгібує розвиток індукованої NMDA поведінки/судороги з ED₅₀=110нмоль.

Сполука винаходу була випробувана на зв'язування з більш, як 80 неNMDA рецепторами. Не було виявлено значної взаємодії з будь-якими рецепторами окрім NMDA.