

Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum
Wydział Farmaceutyczny
Katedra Chemii Farmaceutycznej, Zakład Chemii Leków



Krzysztof Kamiński

Badania chemiczno-farmakologiczne *N*-fenyloaminowych
pochodnych imidów kwasu bursztynowego o potencjalnej aktywność
przeciwdrgawkowej

Rozprawa doktorska

Promotor
Dr hab. Jolanta Obniska

Kraków 2008

Pani Dr hab. Jolancie Obniskiej

*składam serdeczne podziękowania
za wskazanie tematu rozprawy doktorskiej,
życzliwość i pomoc w trakcie jej realizacji*

Panu Prof. dr hab. Maciejowi Pawłowskiemu

*składam serdeczne podziękowania
za życzliwość i umożliwienie rozwoju naukowego*

*Specjalne podziękowania dla Rodziców
i Żony Olgi za cierpliwość i podtrzymywanie
na duchu w trudnych chwilach*

SPIS TREŚCI

1. Wprowadzenie	11
2. Założenia i cel pracy	33
3. Badania chemiczne	39
3.1. Pochodne <i>N</i> -fenyloamino-2-azaspiro[4.4]nonano- i [4.5]dekano-1,3-dionu	39
3.2. Pochodne <i>N</i> -fenyloamino-3,3-dialkilo-pirolidyno-2,5-dionu	44
3.3. Pochodne <i>N</i> -fenyloamino-heksahydroizoindo-1,3-dionu	53
3.4. Pochodne <i>N</i> -fenyloamino-3-cykloheksylo-pirolidyno-2,5-dionu	56
3.5. Pochodne <i>N</i> -fenyloamino-3-fenylo-pirolidyno-2,5-dionu	59
4. Badania farmakologiczne	63
4.1. Badania farmakologiczne <i>in vivo</i>	63
4.1.1. Pochodne <i>N</i> -fenyloamino-2-azaspiro[4.4]nonano- i [4.5]dekano-1,3-dionu	66
4.1.2. Pochodne <i>N</i> -fenyloamino-3,3-dialkilo-pirolidyno-2,5-dionu	69
4.1.3. Pochodne <i>N</i> -fenyloamino-heksahydroizoindo-1,3-dionu.....	77
4.1.4. Pochodne <i>N</i> -fenyloamino- 3-cykloheksylo- i 3-fenylopirolidyno-2,5-dionu.....	79
4.2. Badania farmakologiczne <i>in vitro</i>	80
4.2.1. Powinowactwo do receptorów GABA _A	80
4.2.2. Powinowactwo do napięciowo-zależnych kanałów wapniowych.....	81
5. Badanie właściwości lipofilowych	83
6. Badanie trwałości	97
7. Podsumowanie i wnioski.....	99
8. Część doświadczalna	103
8.1. Badania fizykochemiczne	103
8.2. Metody spektroskopowe.....	104
8.3. Produkty wyjściowe.....	105
8.4. Ogólna metoda otrzymywania <i>N</i> -fenyloaminowych pochodnych 3-podstawionego pirolidyno-2,5-dionu oraz heksahydroizoindo-1,3-dionu	109
8.5. Badanie lipofilowości	112
8.6. Analiza statystyczna	114
9. Piśmiennictwo	115
10. Streszczenie	129
Aneks.....	133

ZASTOSOWANE SKRÓTY

ADD	Antiepileptic Drug Development Program
ASP	Anticonvulsant Screening Project
BBB	bariera krew - mózg
EI	jonizacja strumieniem elektronów
ESI	jonizacja przez elektrorozpraszanie
$^1\text{H NMR}$	spektroskopia magnetycznego rezonansu protonowego
IR	spektroskopia w podczerwieni
K_i	stała wiązania (stała powinowactwa)
$\log kw$	znormalizowany chromatograficzny parametr lipofilowości (RP-HPLC)
MES	drgawki wywołane prądem elektrycznym
MS	spektrometria masowa
NT	neurotoksyczność
PI	indeks ochronny
PISP	drgawki wywołane pilokarpiną
R_{M0}	znormalizowany chromatograficzny parametr lipofilowości (RP-TLC)
$scPTZ$	drgawki wywołane podskórnym podaniem kardiazolu
TPE	czas szczytowej aktywności farmakologicznej

1. Wprowadzenie

Układy heterocykliczne odgrywają niezwykle istotną rolę w procesie projektowania nowych leków. W wielu przypadkach są integralnymi elementami budowy aktywnych biologicznie związków, mimo że szereg fizjologicznych ligandów nie zawiera ich w swoich strukturach chemicznych. Pierścienie heterocykliczne warunkują określoną aktywność farmakologiczną, a także naśladując inne cykliczne układy heteroatomowe, bądź grupy funkcyjne, zapewniają odpowiednią trwałość oraz właściwości fizykochemiczne pozwalające otrzymać połączenia o optymalnych parametrach farmakokinetycznych.¹

Obserwowany w ostatnich latach dynamiczny rozwój technik syntezy organicznej sprawia, że nowoczesna chemia leków dysponuje aktualnie ogromną liczbą układów heterocyklicznych, zróżnicowanych pod względem rodzaju heteroatomu, wielkości i ilości pierścieni oraz stopnia nasycenia. Pełnią one w strukturze liganda rolę fragmentu rdzeniowego bądź podstawnika, decydując, a często zwiększając aktywność biologiczną.

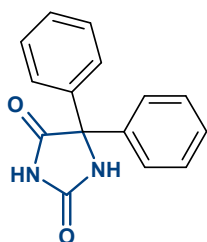
Z punktu widzenia podjętej w niniejszej rozprawie tematyki szczególnie interesujące wydają się azotowe pierścienie heteroatomowe, tworzące fragment imidowy lub laktamowy. Układy tego typu stanowią integralną część struktury związków o zróżnicowanym wpływie na ośrodkowy układ nerwowy. Ich obecność jest szczególnie widoczna wśród połączeń o aktywności przeciwdrgawkowej, a także związków działających antypsychotycznie, przeciwdepresyjnie i przeciwłękowo.

Prace prowadzone wśród związków o aktywności przeciwdrgawkowej mają na celu, z jednej strony otrzymanie substancji leczniczych pozwalających na kontrolowanie różnych typów napadów padaczkowych, z drugiej zaś związków posiadających możliwie najmniejsze działania niepożądane, szczególnie przy ich długotrwałym podawaniu.

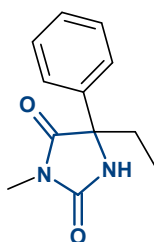
Dotychczasowe poszukiwania „idealnego” leku przeciwpadaczkowego zaowocowały opisaniem szeregu połączeń o silnych właściwościach przeciwdrgawkowych. Do związków tych, bardzo często zróżnicowanych pod względem budowy chemicznej, należą m.in. pochodne kwasu piperydino-2-karboksylowego,^{2,3} acetamidy oraz ich analogi propionamidowe tworzące grupę tzw. funkcjonalnych aminokwasów,^{4,5} pochodne kwasu γ -hydroksymasłowego,⁶ a także różnie podstawione semikarbazony.⁷ Wspólnym elementem struktur-

ralnym w tego typu związkach są wiązania amidowe, które można uznać, za jeden z najważniejszych fragmentów farmakoforowych. Ugrupowania te są również obecne w budowie najnowszych leków przeciwpadaczkowych, wśród których wymienić należy retigabinę, safinamid, harkoserid, talampanel czy walroceamid.⁸ Z danych literaturowych wynika, że wiązania amidowe mogą występować zarówno w postaci wolnej lub jako część pierścienia heterocyklicznego (imidy, laktamy). Wielu Autorów⁹⁻¹¹ uznaje więc pięcio- lub sześcioczłonowe pierścienie azotowe z jedną lub dwoma grupami karbonyłowymi oraz podstawnikami aromatycznymi, bądź alkilowymi jako układy farmakoforowe dla struktur charakteryzujących się aktywnością przeciwdrgawkową. Cechy te posiada szereg aktualnie stosowanych leków przeciwpadaczkowych, jak również połączeń otrzymanych w badaniach mających na celu poszukiwanie nowych aktywnych przeciwdrgawkowo substancji chemicznych.

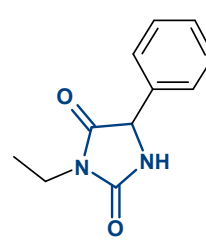
Przykładem związków spełniających powyższe wymagania strukturalne jest fenytoina (5,5-difenylohydantoina) oraz jej bliskie analogi mefenytoina, etotoina, a także związek o charakterze proleku - fosfenytoina (**Ryc. 1**).



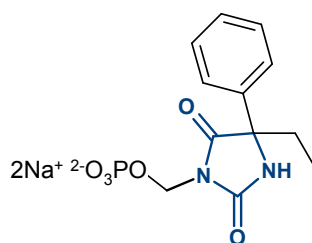
Fenytoina (*Phenytoinum*[®])



Mefenytoina (*Mesantoin*[®])



Etotoina (*Peganone*[®])

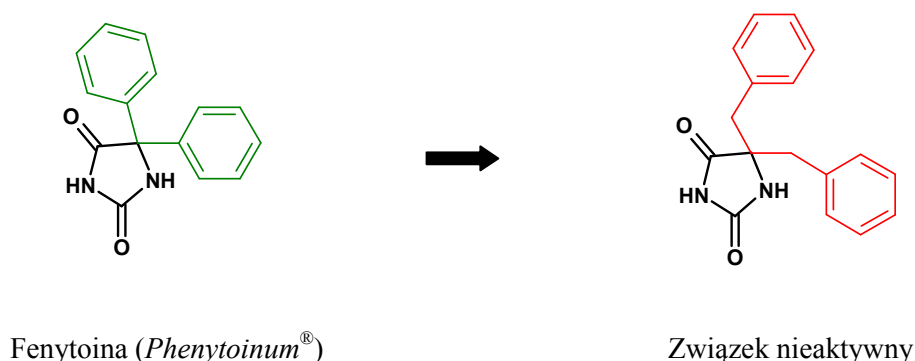


Fosfenytoina (*Cerebyx*[®])

Ryc. 1.

Fenytoina została zsyntetyzowana w 1908 roku przez Heinricha Biltz'a, a jej aktywność przeciwdrgawkową ustalili Merritt i Putnam w badaniach, których celem było otrzymanie pochodnych fenobarbitalu pozbawionych działania sedatywnego.¹² Ocena zależności pomiędzy strukturą i aktywnością wykazała istotną rolę pierścieni fenylowych

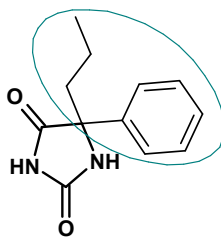
w położeniu-5 hydantoiny. Wprowadzenie w ich miejsce dwóch podstawników benzytowych spowodowało całkowitą utratę aktywności przeciwdrgawkowej (**Ryc. 2**).¹³



Ryc. 2.

Główny mechanizm działania fenytoiny i innych hydantoin polega na blokowaniu napięciowo-zależnych kanałów sodowych,^{14,15} przy czym wiążą się one tym silniej, im częściej kanały te są otwierane w jednostce czasu (*use dependence*).¹⁶ Fenytoina wpływa również na przewodnictwo wapniowe¹⁷ oraz hamuje ośrodkową neurotransmisję pobudzającą.¹⁸ Jest stosowana w terapii napadów dużych (*grand-mal*), napadach psychomotorycznych i częściowych.^{19,20} Do jej działań niepożądanych zalicza się m.in. przerost dziąseł, hirsutyzm i reakcje alergiczne.²¹ Wśród bliskich analogów fenytoiny wymienić należy mefenytoinę i etotoinę, które z uwagi na wyższą toksyczność i mniejszą skuteczność terapeutyczną nie znajdują obecnie zastosowania w leczeniu. Ciekawą pochodną fenytoiny jest jej sól dwusodowa estru kwsu fosforowego - fosfenytoina (*Cerebyx*®) (**Ryc. 1**). Ten prolek, dzięki dobrej rozpuszczalności w wodzie nadaje się do stosowania pozajelitowego i jest pozbawiony szeregu działań niepożądanych związanych z parenteralnym podaniem fenytoiny. W ustroju fosfenytoina ulega szybkiemu i całkowitemu metabolizmowi do macierzystej cząsteczki. Reakcja ta ma charakter enzymatyczny i jest katalizowana przez fosfatazę tkankową.^{22,23}

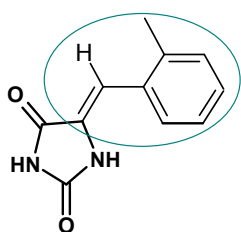
Fenytoina jako jeden z podstawowych leków przeciwpadaczkowych stanowi strukturę modelową dla szeregu nowych pochodnych zawierających w swojej budowie farmakoforowy układ hydantoiny. Modyfikacje chemiczne dotyczą głównie położenia-3 i 5 imidazolidyn-2,4-dionu. Wśród jej bliskich analogów na uwagę zasługuje 5-fenilo-5-*n*-propylo-imidazolidyn-2,4-dion (**Ryc. 3**), związek charakteryzujący się wysoką aktywnością w teście drgawek elektrycznych (MES).²⁴



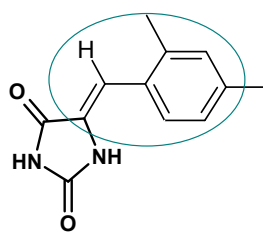
ED₅₀ = 25 mg/kg (MES)

Ryc. 3.

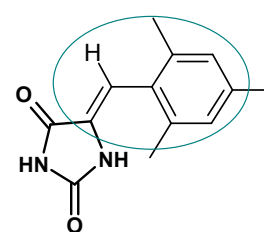
W dalszych badaniach otrzymano szereg aktywnych związków, w których w miejsce pierścieni aromatycznych w położeniu-5 hydantoiny wprowadzono podstawnik benzyli-denowy²⁵ lub β-tetralonowy.²⁶ Modyfikacje tego typu zilustrowano na Ryc. 4.



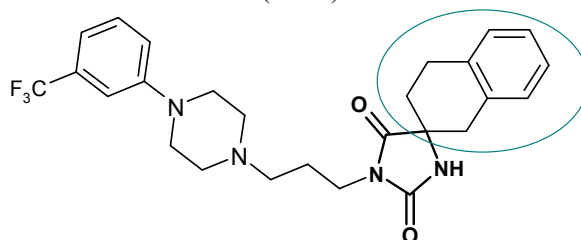
ED₅₀ = 59 mg/kg
(MES)



ED₅₀ = 39 mg/kg
(MES)



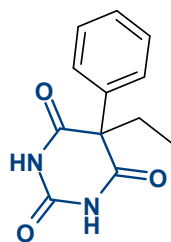
ED₅₀ = 28 mg/kg
(MES)



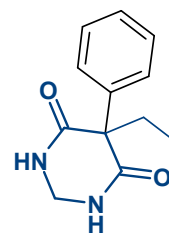
ED₅₀ = 12 mg/kg
(MES)

Ryc. 4.

Kolejną grupę leków, których budowa opiera się na układzie pirymidyno-2,4,6 (1*H*, 3*H*, 5*H*)-trionu stanowią barbiturany, wśród których zastosowanie w terapii padaczki znalazły fenobarbital (*Luminal*[®]) i primidon (*Mysoline*[®]) (Ryc. 5).



Fenobarbital (*Luminal*[®])

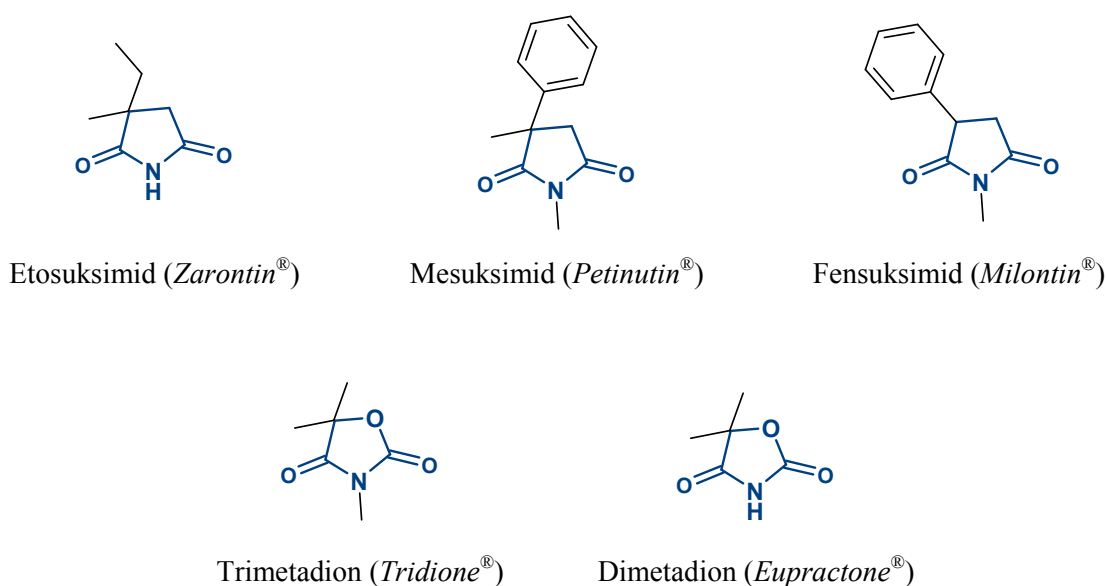


Primidon (*Mysoline*[®])

Ryc. 5.

Fenobarbital (5-etylo-5-fenyl-pirymidyno-2,4,6 (1*H*, 3*H*, 5*H*)-trion), został wprowadzony do leczenia w roku 1912.²⁷ Mimo pewnych analogii strukturalnych z fenytoiną, posiada całkowicie odmienny mechanizm działania. Nasila on hamujący wpływ kwasu γ -amino-masłowego (GABA) poprzez allosteryczne oddziaływanie z receptorem GABA_A, co powoduje wydłużenie czasu otwarcia kanału chlorkowego i hiperporalizację błon komórek nerwowych.^{28, 29} Fenobarbital posiada także zdolność blokowania wysoko-napięciowych kanałów wapniowych (HVA, *High Voltage - Activated*), w wyniku czego dochodzi do hamowania uwalniania neuroprzekaźników pobudzających w różnych strukturach OUN.³⁰ Dodatkowo, zmniejsza on przewodnictwo sodowe i zwiększa przepuszczalność błon neuronalnych dla jonów potasowych.³¹ Fenobarbital należy do leków skutecznych w różnych typach padaczki, niemiej jednak głównym wskazaniem są napady duże i częściowe. Podobne właściwości farmakodynamiczne i wskazania terapeutyczne dotyczą primidonu, będącego pochodną kwasu dezoksybarbiturowego, który w ustroju metabolizowany jest do dwóch aktywnych metabolitów - fenobarbitalu i fenyloetylomalonamidu.²⁷

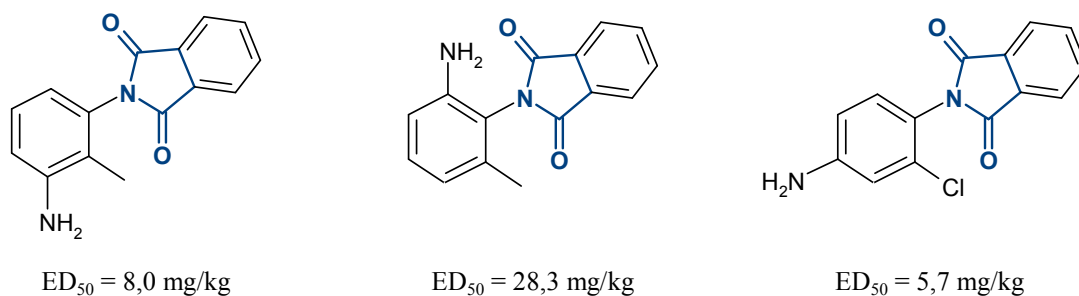
Kolejnymi przykładami leków przeciwpadaczkowych o budowie imidowej są pochodne pirolidyno-2,5-dionu: etosuksimid (*Zarontin*®), mesuksimid (*Petinutin*®) i fensuksimid (*Milontin*®), a także ich bliskie analogi trimetadion (*Tridione*®) i dimetadion (*Eupractone*®), których struktura opiera się na układzie oksazolidyno-2,4-dionu (**Ryc. 6**). Spośród wymienionych połączeń aktualnie jedynie etosuksimid i mesuksimid posiadają istotne znaczenie terapeutyczne.



Ryc. 6.

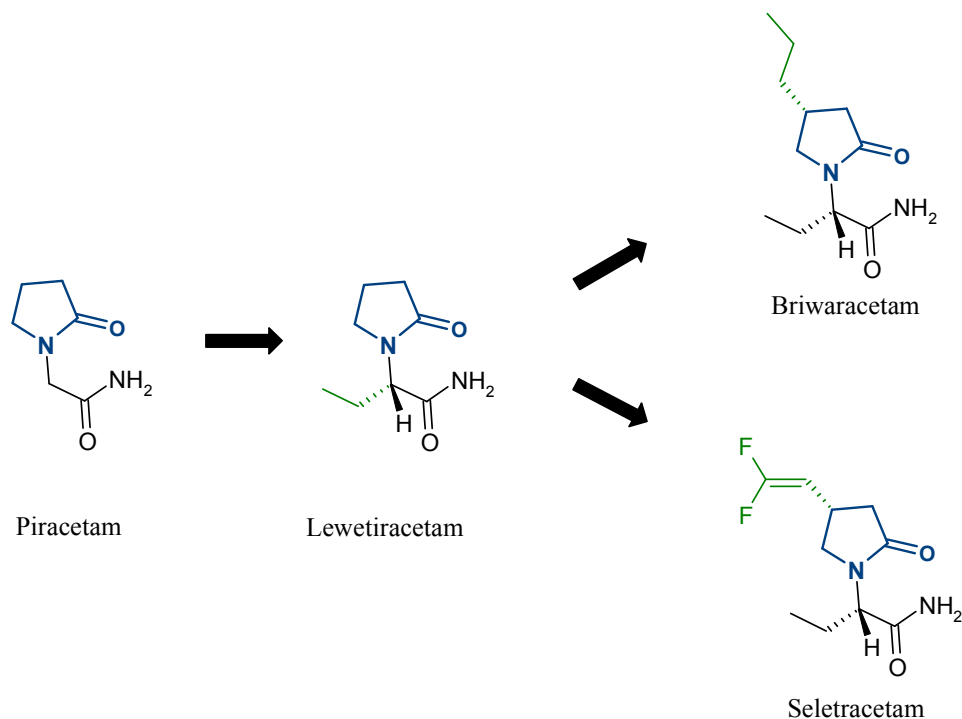
Mechanizm działania przedstawionych powyżej związków polega na blokowaniu niskonapięciowych kanałów wapniowych typu T, zlokalizowanych w neuronach wzgórzowo-korowych.^{30,32} Leki te charakteryzują się wąskim spektrum aktywności, są skuteczne w różnych postaciach padaczki uogólnionej typu *petit-mal* (napady małe) oraz młodzieńczych napadach mioklonicznych.^{27,30,33} Należy podkreślić, że w badaniach *in vivo* etosuksimid był nieaktywny w teście maksymalnego wstrząsu elektrycznego (MES), będącego modelem napadów dużych (*grand-mal*), natomiast okazał się skuteczny w drgawkach kardiazolowych (*scPTZ*), które odpowiadają napadom typu *absence*. Wprowadzenie pierścienia aromatycznego w położenie-3 pirolidyno-2,5-dionu (mesuksimid, fensuksimid), spowodowało, że leki te były aktywne w obu testach (MES i *scPTZ*). Natomiast w przypadku pochodnych oksazolidyno-2,4-dionu (trimetadionu i dimetadionu), przeważało działanie protekcyjne w modelu *scPTZ*.²⁷

Na przestrzeni ostatnich kilkunastu lat ukazało się wiele publikacji będących wynikiem szerokich badań dotyczących syntezy nowych pochodnych zawierających w swoich strukturach farmakoforowy układ imidowy. Spośród nich na szczególną uwagę zasługują prace Bailleux'a³⁴ i Vamecq'a,^{35,36} dotyczące pochodnych o budowie ftalimidowej. Wśród otrzymanych związków wiele charakteryzowało się wysoką aktywnością przeciwdrgawkową (**Ryc. 7**).



Ryc. 7.

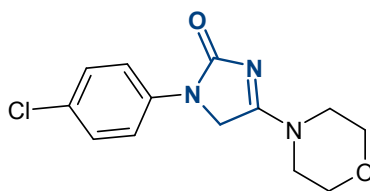
Jednym z najnowszych leków przeciwpadaczkowych jest lewetiracetam (*Keppra*®), będący bliskim analogiem strukturalnym piracetamu (*Nootropil*®), leku o działaniu nootropowym.^{37,38} Lewetiracetam jest pochodną pirolidyn-2-onu, który to fragment jest również obecny w jego pochodnych - briwaracetamie (UCB 34714)^{39,40} i seletracetamie (UCB 44212),^{41,42} znajdując się aktualnie w badaniach klinicznych (**Ryc. 8**).⁴³



Ryc. 8.

Lewetiracetam, (-)-(S)- α -etylo-2-okso-1-pirolidyno-acetamid, w badaniach *in vivo* był nieaktywny w testach MES i scPTZ, natomiast charakteryzował się znaczną skutecznością w drgawkach rozniecanych, audiogenicznych, pilokarpinowych i kainowych.^{44, 45} Lek ten posiada całkowicie nowy mechanizm działania, jest ligandem błonowego białka pęcherzyków synaptycznych (SV2A), które odpowiada za regulowanie procesu egzocytozy i uwalniania neuroprzekaźników.^{46, 47} Sugeruje się również jego oddziaływanie na kanały potasowe oraz wysoko-napięciowe kanały wapniowe.^{48, 49} Lewetiracetam jest skuteczny w młodzieńczej padaczce mioklonicznej, w napadach częściowych nieuogólnionych i wtórnie uogólnionych, w napadach nieświadomości, atonicznych oraz padaczce lekoopornej.⁴³ Ponadto wykazuje działanie przeciwdepresyjne i anksjolityczne.^{50, 51}

Kolejnym przykładem związku o aktywności przeciwdrgawkowej, w którego strukturze występuje fragment cyklicznego amidu, jest pochodna 1,5-dihydro-2*H*-imidazol-2-onu - AWD 131-138 (Ryc. 9).

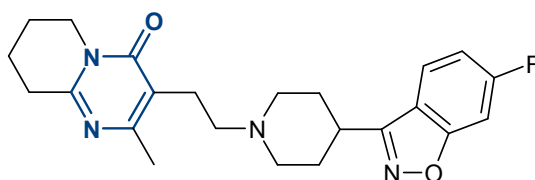


Ryc. 9. AWD 131-138

Związek ten charakteryzuje się aktywnością w drgawkach elektrycznych (MES) i kardiazolowych (scPTZ), a ponadto hamuje drgawki audiogeniczne. Mechanizm działania AWD 131-138 wiąże się z częściowym pobudzeniem receptorów benzodiazepinowych, z czego wynika również jego aktywność anksjolityczna.^{52, 53}

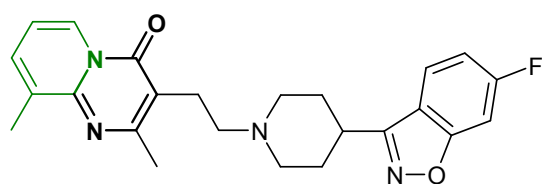
Fragment imidowy lub cykliczny amid występują nie tylko wśród związków działających przeciwdrgawkowo, ale również stanowią ważne elementy strukturalne w lekach przeciwpyschotycznych, co dotyczy szczególnie badań w grupie nowych atypowych neuroleptyków. Związki te w odróżnieniu od leków konwencjonalnych (m. in. haloperidolu), charakteryzują się lepszą tolerancją, brakiem lub nieznacznymi objawami ze strony układu pozapiramidowego, większą skutecznością w redukowaniu objawów negatywnych i zaburzeń poznawczych.⁵⁴⁻⁵⁶ Korzystny profil terapeutyczny jest wynikiem ich mechanizmu działania, który polega na silniejszym blokowaniu receptorów serotoninowych 5-HT₂ (głównie podtypu 5-HT_{2A}) niż dopaminowych D₂, podczas gdy efekt leczniczy klasycznych neuroleptyków związany jest z antagonizowaniem głównie receptorów D₂.^{57, 58}

Jednym z atypowych neuroleptyków, wprowadzonym do leczenia w latach 90-tych przez firmę Janssen Pharmaceuticals jest risperidon (*Risperdal*[®]), w którego strukturze obecny jest farmakoforowy układ 6,7,8,9-tetrahydro-4*H*-pyrido[1,2-*a*]pirymidyn-4-onu (**Ryc. 10**).⁵⁹

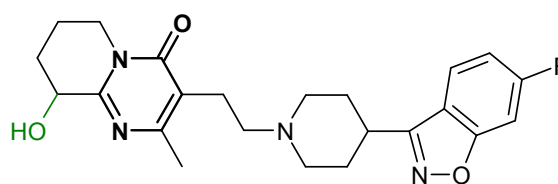


Ryc. 10. Risperidon (*Risperdal*[®])

W wyniku prowadzonych badań otrzymano szereg jego analogów, wśród których na uwagę zasługują okaperidon - pochodna o zwiększonej aromatyczności i paliperidon, będący 9-hydroksylową pochodną macierzystego leku (**Ryc. 11**).



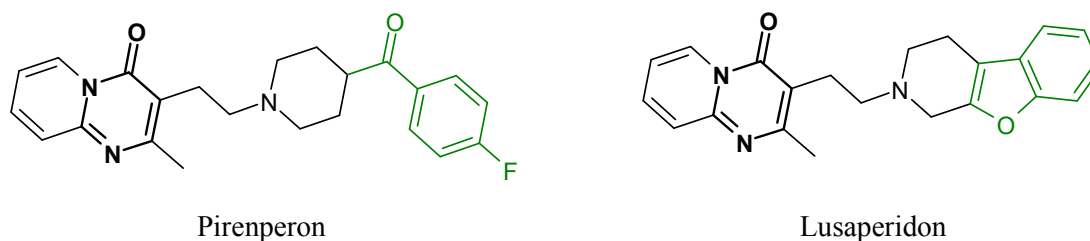
Okaperidon



Paliperidon

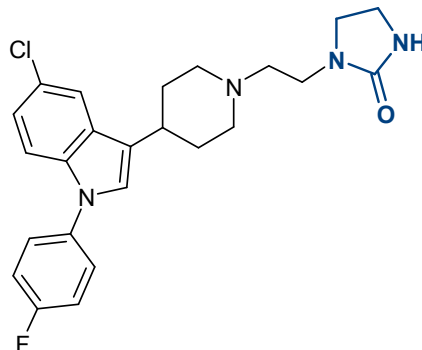
Ryc. 11.

Związki te charakteryzują się działaniem przeciwpsychotycznym, a paliperidon jest aktualnie przedmiotem badań klinicznych, których wstępne wyniki wskazują na korzystniejszy profil leczniczy w stosunku do referencyjnego risperidonu.^{60,61} Dalsze modyfikacje struktury risperidonu w obrębie układu benzoizoksazolu, przy jednocześnie zachowanym fragmencie 4*H*-pyrido[1,2-*a*]pirymidyn-4-onu wpłynęły na zmianę profilu aktywności z przeciwpsychotycznej na uspokajającą, co obserwowano w przypadku pirenperonu i lusaperidonu (**Ryc. 12**).



Ryc. 12.

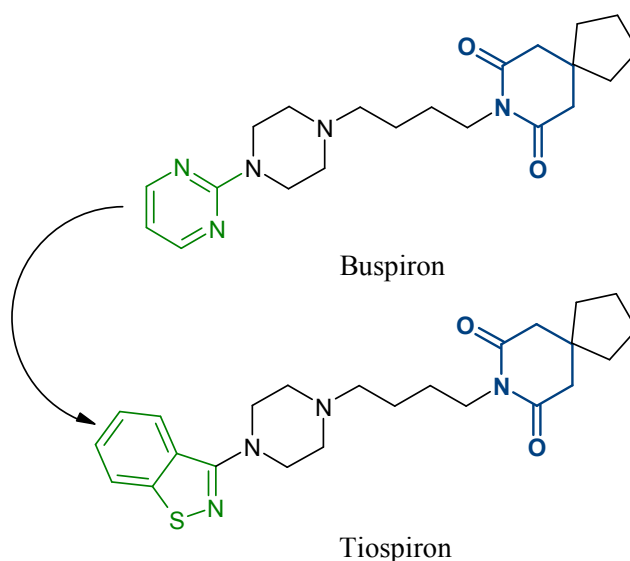
Sertindol (*Serlect*[®]), to kolejny przykład neuroleptyku, który w swojej strukturze posiada pięcioczłonowy układ imidazolidyn-2-onu (**Ryc. 13**).



Ryc. 13. Sertindol (*Serlect*[®])

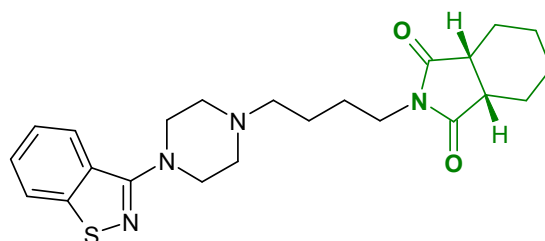
Został on otrzymany w wyniku badań mających na celu poszukiwanie nowych połączeń o aktywności neuroleptycznej w grupie pochodnych 1-(4-fluorofenilo)-1*H*-indolu.⁶² Badania te były prowadzone w oparciu o wcześniejsze doniesienia wskazujących na wysoką aktywność przeciwpsychotyczną pochodnych 1-fenilo- lub 3-fenilo-indanu posiadających w strukturach ugrupowania piperazynowe, piperydynowe lub pirydynowe.⁶³⁻⁶⁵ Jednak dopiero wprowadzenie układu imidazolidyn-2-onu połączonego z pierścieniem piperydynowym poprzez łącznik etylenowy pozwoliło otrzymać silny i skuteczny lek przeciwpsychotyczny - sertindol.

Badania ostatnich lat wskazują na istnienie funkcjonalnej zależności pomiędzy receptorami serotoninowymi 5-HT_{2A} i 5-HT_{1A}. Stwierdzono, że pobudzenie receptorów 5-HT_{1A} powoduje podobny efekt jak antagonizm 5-HT_{2A}.⁶⁶ Dlatego też, receptory 5-HT_{1A} stanowią jeden z obiecujących celów molekularnych, branych pod uwagę w projektowaniu nowych neuroleptyków, a związki, które jednocześnie blokują receptory D₂ i pobudzają receptory 5-HT_{1A} zasługują na szczególną uwagę jako nowe atypowe neuroleptyki. Pierwszym lekiem o takim mechanizmie działania był tiospiron, będący pochodną 8-aza-spiro[4.5]dekano-7,9-dionu, który otrzymano w firmie Bristol-Meyers (**Ryc. 14**).⁶⁷



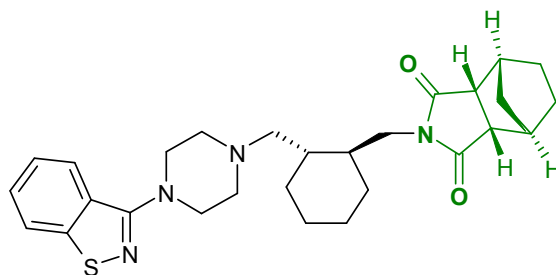
Ryc. 14.

Został on zsyntetyzowany jako analog buspironu, w którym w miejsce ugrupowania pirymidynylowego przy azocie piperazyny umieszczono układ benzoizotiazolu. Tiospiron mimo, że nie wprowadzono go do leczenia, został uznany za strukturę modelową dla wielu nowych atypowych neuroleptyków.⁶⁸ Efektem tych badań było otrzymanie przez japońską firmę Sumitomo Pharmaceuticals, Co. Ltd nowego leku przeciwpsychotycznego drugiej generacji - perospironu (*Lullan*[®]). Lek ten zsyntetyzowano wprowadzając w miejsce 8-aza-spiro[4.5]dekano-7,9-dionu, bicykliczny układ heksahydro-1*H*-izoindo-1,3(2*H*)-dionu (**Ryc. 15**).



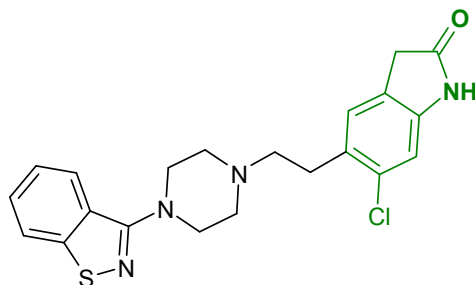
Ryc. 15. Perospiron (*Lullan*[®])

Analiza zależności struktura - aktywność wykazała, że bicykliczny imid zwiększa istotnie powinowactwo leku do receptorów 5-HT_{1A}.^{69, 70} Wyniki te przyczyniły się do dalszych badań, dzięki którym otrzymano szereg jego analogów o zbliżonej aktywności receptorowej.⁷¹ Jednym z takich związków jest lurasidon (SM-13496), będący aktualnie w badaniach klinicznych.⁷² W pochodnej tej łańcuch butylenowy został wbudowany w pierścień cykloheksanu, a fragment imidowy tworzy układ heksahydro-2*H*-4,7-metanoizoindol-1,3-dionu (**Ryc. 16**).



Ryc. 16. Lurasidon (SM-13496)

Kolejnym analogiem tiospironu jest ziprasidon (*Zeldox*[®])⁷³ - związek, w którym fragment imidowy zastąpiono pierścieniem 1,3-dihydro-2*H*-indol-2-onu (**Ryc. 17**).

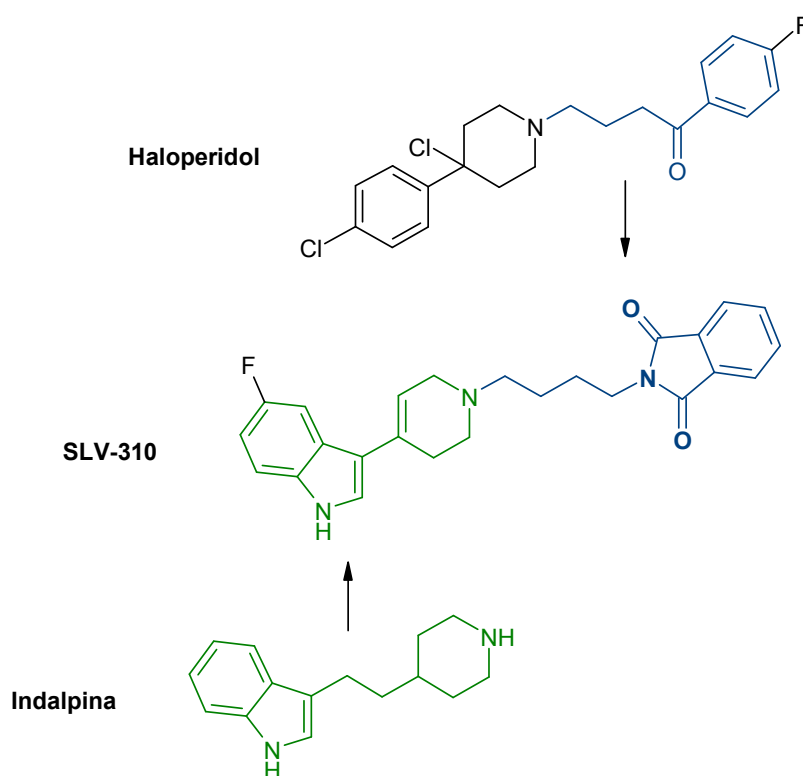


Ryc. 17. Ziprasidon (*Zeldox*[®])

Charakteryzuje się on silniejszym działaniem antagonistycznym w stosunku do receptorów serotoninowych 5-HT_{2A}, niż D₂ dopaminowych, a także częściowym agonizmem 5-HT_{1A}.⁷⁴ Jest dobrze tolerowany, a dopiero przy dłuższym stosowaniu obserwowano nieznaczne efekty pozapiramidowe. Ponadto nie stwierdzono istotnego przyrostu masy ciała, co jest jednym z poważniejszych i bardziej uciążliwych działań niepożądanych atypowych neuroleptyków.⁷⁵

Znaczna aktywność przeciwpyschotyczna wielu analogów tiospironu powoduje, że pochodne te stanowią nadal jeden z wiodących obszarów poszukiwania nowych leków neuroleptycznych. Potwierdzeniem tego faktu są badania prowadzone w firmie Solvay and Wyeth w wyniku, których otrzymano związek SLV-310 (**Ryc.18**) - pochodną ftalimidową

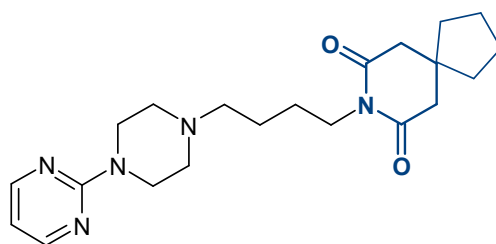
zawierającą w swojej strukturze zmodyfikowane fragmenty obecne w budowie haloperidolu, znanym neuroleptyku, jak i selektywnym inhibitorem wychwytu zwrotnego serotoniny - indalpinie. Tak zaprojektowana substancja łączy właściwości blokowania receptorów D₂ z selektywnym hamowaniem wychwytu zwrotnego serotoniny, a związki o tym mechanizmie działania stanowią obecnie ciekawy kierunek poszukiwania nowych leków przeciwpsychotycznych.⁷⁶⁻⁷⁹ Aktualnie SLV-310 znajduje się w drugiej fazie badań klinicznych w leczeniu schizofrenii, ponadto wskazuje się na jego potencjalną skuteczność w chorobie dwubiegunowej.



Ryc. 18. SLV-310

Podobnie jak w przypadku leków neuroleptycznych pięcio- lub sześcioczłonowe układy imidowe i laktamowe stanowią ważne elementy budowy wielu leków przeciwdepresyjnych i anksjolitycznych. Obecnie największe znaczenie terapeutyczne w leczeniu depresji odgrywają selektywne inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny (SSRI - *Selective Serotonin Reuptake Inhibitors*) oraz wprowadzone do lecznictwa w latach 90-tych inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny i noradrenaliny (SNRI - *Serotonin/Noradrenaline Reuptake Inhibitors*). Natomiast, wśród anksjolityków dominującą pozycję zajmują benzodiazepiny wykorzystywane w krótkotrwałej terapii stanów lękowych. Niemniej jednak stosowanie

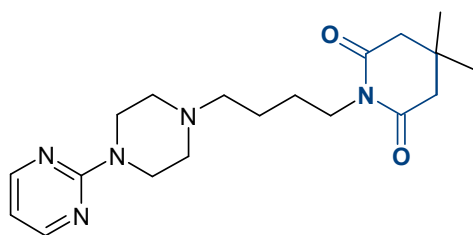
zarówno SSRI, jak i benzodiazepin ograniczają liczne działania niepożądane, a najważniejsze z nich to zaburzenia funkcji seksualnych, apetytu, snu, a także uzależnienie psychiczne, oszołomienie i ograniczenie sprawności intelektualnej.⁸⁰⁻⁸³ Dlatego też, w poszukiwaniu nowych leków przeciwlękowych i przeciwdepresyjnych duże nadzieje wiąże się z tzw. azapironami, które pozbawione są ww. działań niepożądanych. Pierwszym lekiem tego typu był buspiron (*Buspar*[®]), pochodna 8-azaspiro[4.5]dekano-7,9-dionu, który został wprowadzony do leczenia w 1986 roku przez firmę Bristol-Meyers (**Ryc. 19**).



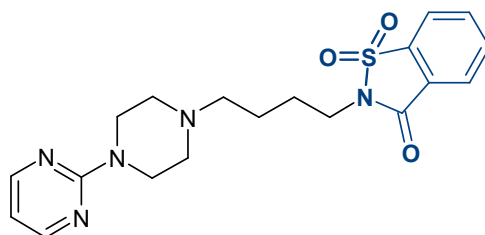
Ryc. 19. Buspiron (*Buspar*[®])

Lek ten otrzymano w wyniku badań mających na celu poszukiwanie nowych związków przeciwpyschotycznych w grupie *N*-(4-arylopiperazyn-1-ylo)-alkilowych pochodnych cyklicznych imidów.^{84,85} Niemniej jednak, mimo pozytywnych testów na zwierzętach, późniejsze badania kliniczne nie potwierdziły jego działania neuroleptycznego,⁸⁶ stwierdzono natomiast, że posiada on silne właściwości przeciwlękowe i przeciwdepresyjne.^{87,88} Zarówno buspiron jak i inne połączenia zaliczone do azapironów charakteryzują się wysoką selektywnością w stosunku do somatodendrytycznych receptorów 5-HT_{1A}.

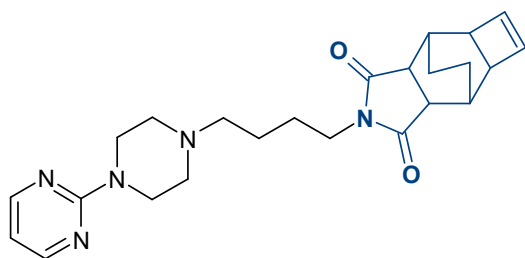
Buspiron, którego wprowadzenie do leczenia było przełomem w farmakoterapii lęku, stał się strukturą modelową dla wielu nowych niebenzodiazepinowych anksjolityków. Wśród szeregu azapironów, otrzymanych jako analogi buspironu wymienić należy gepiron,⁸⁹ zalospiron,⁹⁰ ipsapiron, tandospiron,⁹¹ sunepitron i WY-48723 (**Ryc. 20**). W porównaniu do buspironu, jego pochodne charakteryzują się znacznie wyższym powinowactwem i selektywnością w stosunku do receptorów 5-HT_{1A}, jednak podobnie jak on są szybko metabolizowane do 1-(pirymidyn-2-ylo)-piperazyny (1-PP), będącej silnym antagonistą receptorów α₂-adrenergicznych.^{92,93} Wykazano, że 1-PP odpowiada za wzmocnienie ośrodkowej neurotransmisji noradrenergicznej, która to nadaktywność jest brana pod uwagę jako jedna z przyczyn lęku.⁹⁴



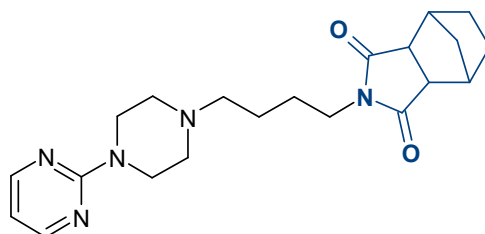
Gepiron (*Ariza*®)



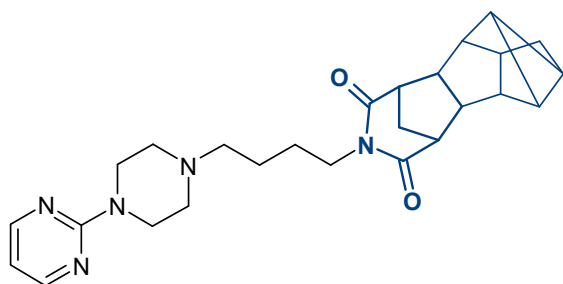
Ipsapiron



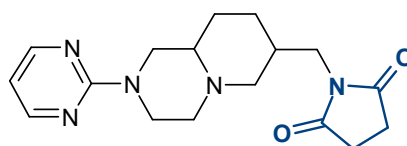
Zalospiron



Tandospiron (*Seidel*®)



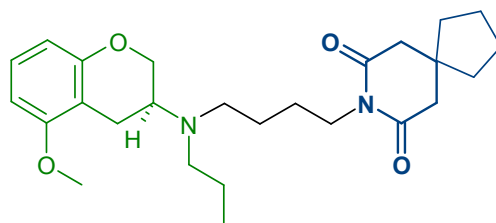
WY - 48723



Sunepitron

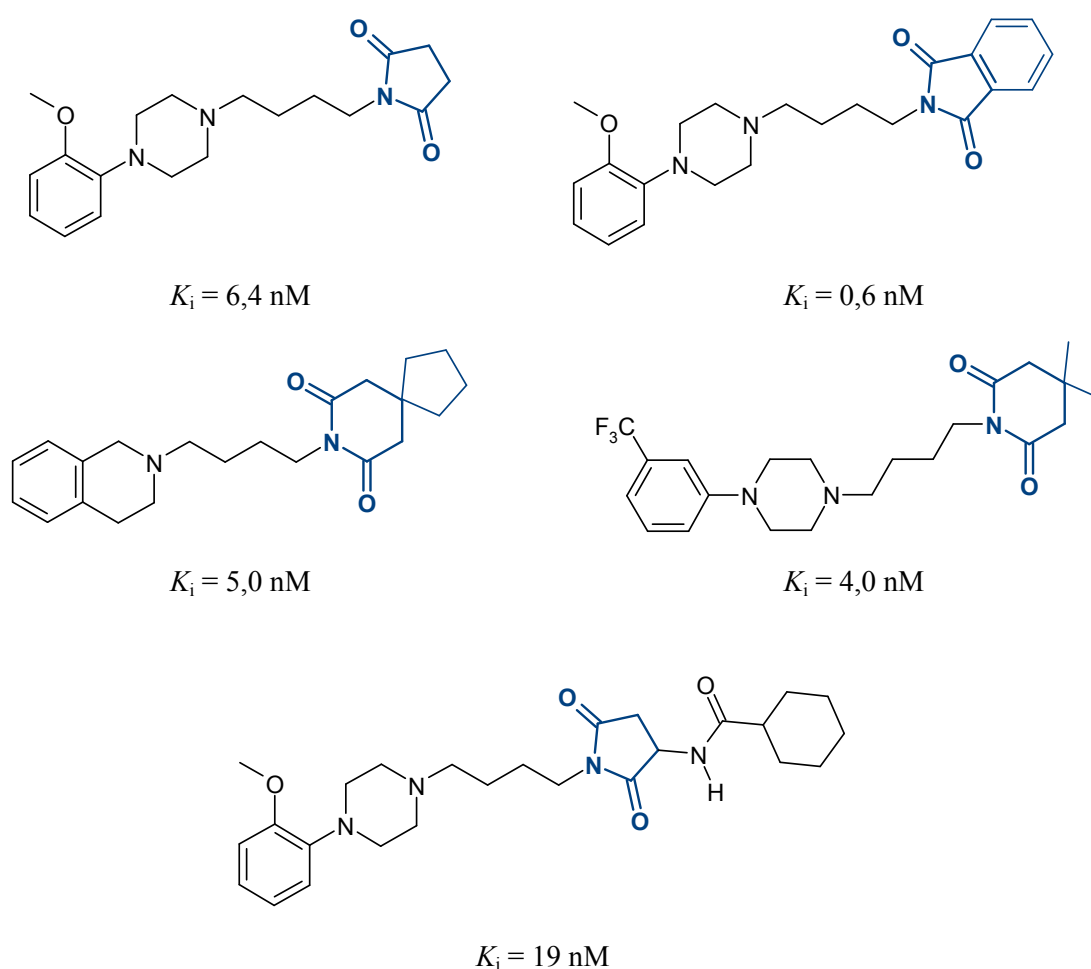
Ryc. 20. Struktury ważniejszych azapironów

Dlatego też, dalsze badania miały na celu otrzymanie połączeń, których biotransformacja nie prowadziła do tworzenia 1-PP. W wyniku tych badań otrzymano alnespiron (**Ryc. 21**), związek, w którym fragment pirymidyn-2-ylo-piperazyny zastąpiono podstawnikiem 5-metoksy-*N*-propylo-chromano-3-aminowym. Pochodna ta w odróżnieniu od buspironu i jego analogów nie wpływa na receptory α_2 -adrenergiczne.⁹⁵



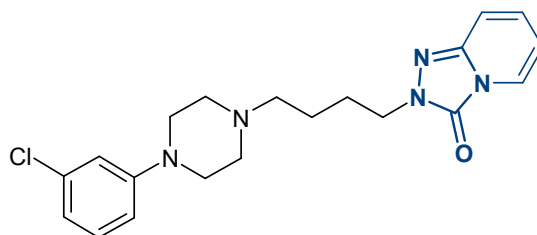
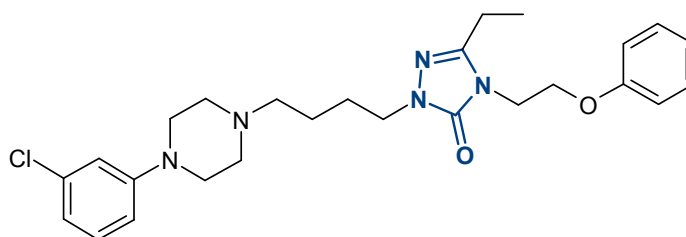
Ryc. 21. Alnespiron

Alnespiron działając przeciwłękowo i przeciwdepresyjne, jednocześnie charakteryzuje się korzystną farmakokinetyką, dlatego też może stać się kandydatem na nowy lek w terapii depresji i lęku.^{96, 97} Podobne badania wśród pochodnych azapironów prowadzone są w wielu ośrodkach naukowych na świecie. Proponowane modyfikacje chemiczne polegają przede wszystkim na wprowadzeniu różnie podstawionych układów imidowych do fragmentu 1-butylo-4-arylopiperazyny. W wyniku tych badań otrzymano szereg połączeń będących silnymi ligandami receptorów 5-HT_{1A}, z których wiele posiadało aktywność przeciwdepresyjną lub/i anksjolityczną.⁹⁸⁻¹⁰² Struktury oraz wartości stałych wiązania (K_i) dla wybranych związków przedstawiono na **Ryc. 22**.



Ryc. 22.

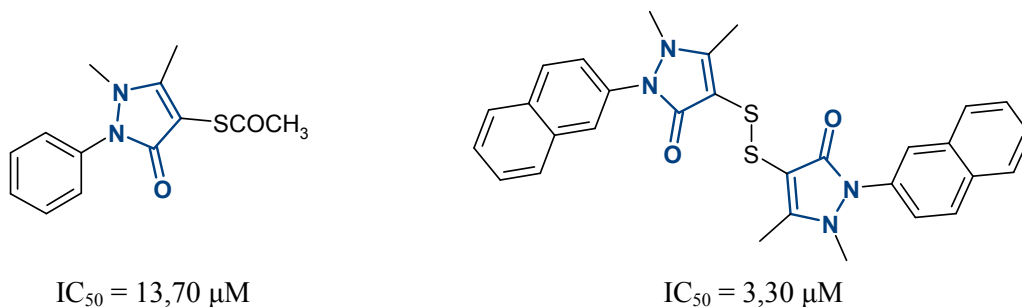
Cykliczny amid wbudowany w pierścień triazolowy jest również obecny w strukturach takich leków przeciwdepresyjnych jak trazodon (*Trittico*[®]) oraz jego bliski analog - nefazodon (*Serzone*[®]) (**Ryc. 23 i 24**).

Ryc. 23. Trazodon (*Trittico*®)Ryc. 24. Nefazodon (*Serzone*®)

Leki te, pomimo analogii strukturalnych do azapironów, charakteryzują się całkowicie odmiennym mechanizmem działania, który polega na hamowaniu wychwytu zwrotnego serotoniny i noradrenaliny z przestrzeni synaptycznej oraz blokowaniu postsynaptycznych receptorów 5-HT_{2A}. Ponadto stwierdzono, że nefazodon jest również relatywnie silnym antagonistą receptora α_1 -adrenergicznego.^{103, 104}

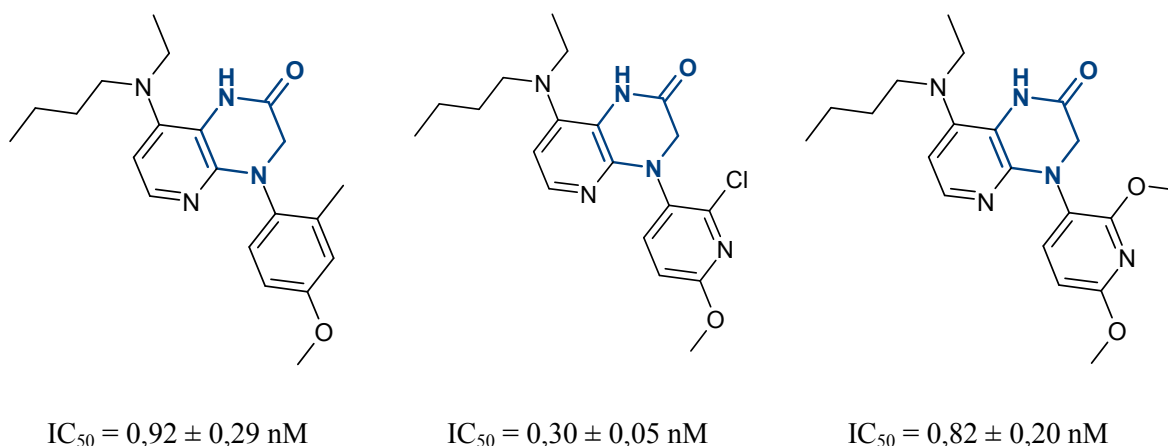
Jedną z teorii patogenezy depresji i lęku jest koncepcja dotycząca zaburzenia równowagi hormonalnej osi przysadka - podwzgórze - nadnercza. Ustalono, że stanom depresyjnym i lękowym towarzyszy zwiększenie poziomu kortyzolu oraz nasiloną aktywność podwzgórzowego hormonu CRH (*Corticotropin - Releasing Hormon*) i czynnika - CRF (*Corticotropin - Releasing Factor*), które pobudzają uwalnianie kortykotropiny (ACTH).¹⁰⁵ Dlatego też, nowa strategia leczenia depresji i leku może polegać na normalizowaniu funkcji wspomnianej osi m.in. przez zmniejszenie aktywności CRH i CRF.¹⁰⁶

Przykładem takiego podejścia są związki blokujące ośrodkowe receptory CRF. Pierwotnie były to połączenia o budowie peptydowej, które ze względu na wysoką hydrofilowość posiadały ograniczoną zdolność wchłaniania z jelit i słabą penetrację przez barierę krew - mózg.^{107, 108} Biorąc to pod uwagę, w wyniku dalszych prac otrzymano bardziej lipofilowe połączenia o budowie heterocyklicznej, spośród których wiele posiada w swojej strukturze układy laktamowe.¹⁰⁹ Wśród nich należy wymienić pochodne 1,2-dihydro-3H-pirazol-3-onu, będące antagonistami receptorów CRF (**Ryc. 25**).



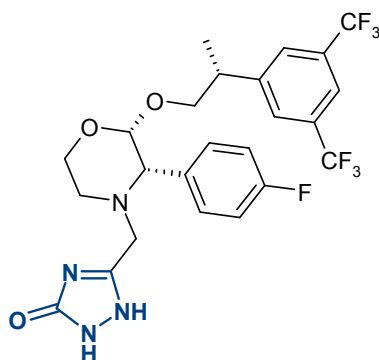
Ryc. 25. Antagoniści receptorów CRF

Związki te pomimo niskiego powinowactwa receptorowego dały początek dalszym badaniom, w wyniku, których otrzymano szereg połączeń zawierających w swoich strukturach dwupierścieniowe układy 3,4-dihydropyrido[2,3-*b*]pirazin-2(1*H*)-onu, charakteryzujące się nanomolowym powinowactwem do receptorów CRF-1 (**Ryc. 26**).^{110, 111}



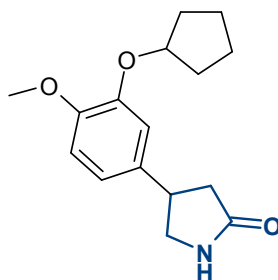
Ryc. 26. Antagoniści receptorów CRF-1

Kolejną pochodną 1,2-dihydro-3*H*-1,2,4-triazol-3-onu jest aprepitant (MK-896) (**Ryc. 27**), lek zarejestrowany jako środek zapobiegający nudnościom i wymiotom towarzyszącym chemioterapii, będący selektywnym antagonistą receptorów NK₁.^{112, 113} Biorąc pod uwagę doniesienia wskazujące na zaangażowanie neurokinin w patomechanizmie depresji, związek ten jest aktualnie przedmiotem drugiej fazy badań klinicznych w leczeniu depresji.¹¹⁴



Ryc. 27. Aprepitant (MK-896)

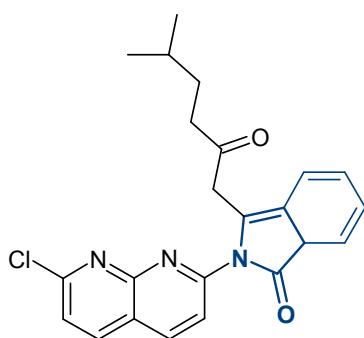
Pięcioczłonowy układ pirolidyn-2-onu obecny jest również w strukturze kolejnego z nowych leków przeciwdepresyjnych - rolipramie, będącego selektywnym inhibitorem fosfodiesterazy (PDE4), enzymu odpowiedzialnego za rozkład cAMP (**Ryc. 28**). Związek ten w badaniach przedklinicznych charakteryzował się silnym działaniem przeciwdepresyjnym, niemniej jednak, jego wykorzystanie w terapii mogą ograniczyć obserwowane działania niepożądane.^{115, 116}



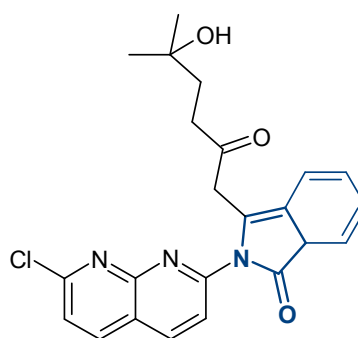
Ryc. 28. Rolipram

Fragment cyklicznego amidu jest ważnym elementem strukturalnym występującym wśród połączeń o przeważającej aktywności anksjolitycznej, stosowanych w różnych stanach lękowych, w tym także o charakterze uogólnionym (GAD - *Generalized Anxiety Disorder*). Szczególnie intensywne badania prowadzone są wśród związków nasilających aktywność ośrodkowego układu GABA-ergicznego, pozbawionych działania sedatywnego. Punktem wyjścia, było poznanie funkcji poszczególnych podtypów receptora GABA_A. Ustalono, że miejscem wiązania tego typu związków są receptory GABA_A, złożone z pod-jednostek β i γ oraz jednej z czterech domen λ . W badaniach radioreceptorowych ustalono, że za działanie przeciwlękowe odpowiedzialne są receptory GABA_A z podjednostką λ_1 , zaś za działanie sedatywne z λ_2 .¹¹⁷⁻¹²⁰ Biorąc pod uwagę powyższe wyniki, otrzymano m.in. pagoklon,

po pochodną cyklopirolonu, który w strukturze posiada dwa główne fragmenty - układ 1*H*-izoindol-1-onu i połączoną z nim 7-chloro-1,8-naftyrydynę (**Ryc. 29**).



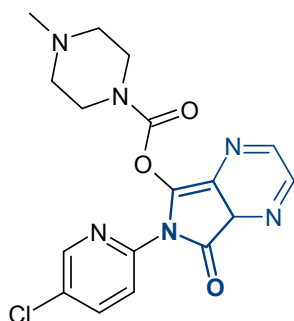
Pagoklon



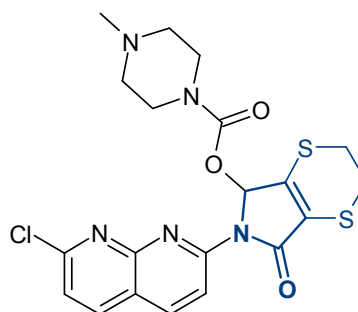
5'-Hydroksy-pagoklon

Ryc. 29.

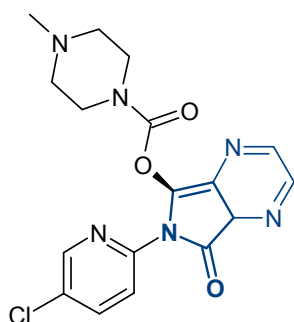
Pagoklon jako częściowy agonista receptorów GABA_A działa przeciwlękowo, jednak powoduje sedację. Jako anksjolityk dotarł do III fazy badań klinicznych w leczeniu GAD, które przerwano ze względu na brak przekonujących wyników terapeutycznych. Szczegółowe badania farmakodynamiczne wykazały, że za jego efekt leczniczy odpowiada głównie czynny metabolit macierzystej cząsteczki, 5'-hydroksy-pagoklon.¹²¹



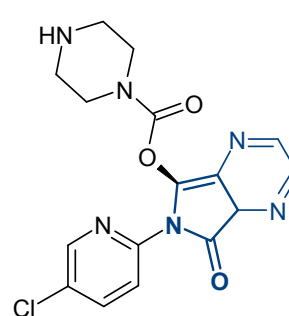
Zopiklon (*Imovane*®)



Suriklon



Eszopiklon (*Lunesta*®)

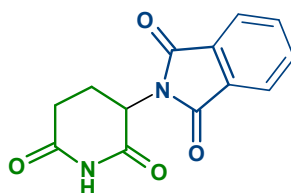


S-desmetylozopiklon

Ryc. 30.

Kolejnymi przykładami związków, będących bliskimi analogami pagoklonu, są suriklon i zopiklon (*Imovane*[®]) (**Ryc. 30**). Modyfikacje strukturalne w tej grupie połączeń polegały na zastąpieniu układu 1*H*-izoindol-1-onu fragmentem dihydro-7-okso-5*H*-pirolo [3,4-*b*]pirazyny (zopiklon) lub 2,3,6,7-tetrahydro-5*H*-*p*-ditiemo[2,3-*c*]pirol-5-onu (suriklon) oraz na wprowadzeniu w miejsce 7-chloro-1,8-naftyrydyny podstawnika 5-chloro-pirydylowego. Związki te, są nieselektywnymi agonistami poszczególnych podtypów receptora GABA_A.^{122, 123} Na uwagę zasługuje fakt, że badania farmakodynamiczne poszczególnych enancjomerów zopiklonu zaowocowały wprowadzeniem do leczenia jego formy lewoskrętnej - eszopiklonu (*Lunesta*[®]). Stwierdzono również, że w trakcie metabolizmu powstają aktywne metabolity, z których *S*-desmetylo-zopiklon posiada silniejsze działanie anksjolityczne od macierzystego leku.¹²⁴

Jednym z najbardziej znanych, kontrowersyjnym i szeroko dyskutowanym do tej pory lekiem o budowie imidowej jest talidomid (**Ryc. 31**).



Ryc. 31. Talidomid

Ta pochodna ftalimidu z pierścieniem glutarimidowym, przez wiele lat uważana była za jeden z najbezpieczniejszych środków uspokajających, który nie powodował zatruc nawet w przypadku przedawkowania. Dlatego też w latach 60-tych był często podawany kobietom w ciąży. Dość szybko okazało się, że działa on silnie teratogennie, co było przyczyną kalectwa wielu dzieci urodzonych w tym okresie. Talidomid wycofano z leczenia i na długie lata starano się o nim zapomnieć. Jednak z końcem lat 90-tych zaczął na nowo przeżywać swój „comeback”, ponieważ poddany ponownym badaniom okazał się związkiem silnie hamującym syntezę czynnika martwicy nowotworów TNF- α (*Tumor Necrosis Factor*), będącego jedną z głównych cytokin biorących udział w odpowiedzi zapalnej. Istnieje zatem prawdopodobieństwo, że potencjalnie będzie go można stosować m.in. w leczeniu chorób reumatycznych, stwardnienia rozsianego oraz rumieniu guzowatym.^{125, 126}

Podsumowując, można stwierdzić, że małe heterocykliczne układy imidowe i laktamowe są ważnymi elementami strukturalnymi, szeroko reprezentowanymi wśród związków i leków działających w obrębie ośrodkowego układu nerwowego, a ponadto jak wynika

z tematyki niniejszej rozprawy, odgrywają ważną rolę w strukturach związków charakteryzujących się aktywnością przeciwdrgawkową.

2. Założenia i cel badań

Na przestrzeni ostatnich dwudziestu lat obserwowany jest znaczny postęp w farmakoterapii padaczki, lecz pomimo wprowadzenia do leczenia szeregu nowych leków przeciwpadaczkowych, nadal u około 30% chorych nie można skutecznie opanować napadów. Ponadto leki te obarczone są szeregiem działań niepożądanych, z których najpoważniejsze dotyczą zmian w obrazie krwi, hepatotoksyczności i teratogenności.²¹ Nowa generacja leków, do której zaliczyć można między innymi lamotryginę, gabapentynę, lewetiracetam i pregabalinę, chociaż lepiej tolerowana, nie zmieniła jednak znacząco liczby chorych odpowiadających pozytywnie na stosowaną terapię. Ciągłe więc istnieje duże zapotrzebowanie na nowe leki, skutecznych u większej liczby chorych, w różnych typach napadów, lepiej tolerowanych i pozbawionych niejednokrotnie groźnych dla życia działań niepożądanych.¹²⁷⁻¹²⁹

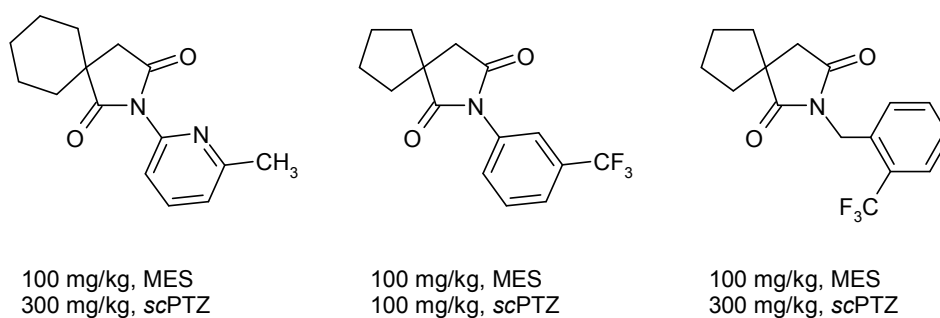
Padaczka jest heterogennym zespołem, w którego patogenezie bierze udział szereg czynników takich jak: spadek poziomu kwasu γ -aminomasłowego lub/i zwiększona aktywność układu glutaminergicznego, bądź też zaburzenia w obrębie przewodnictwa jonów sodu, wapnia i potasu. Różnorodność celów molekularnych, nie zawsze w pełni sprecyzowanych, utrudnia ustalenie jednoznacznego mechanizmu działania leków przeciwpadaczkowych. Dlatego poszukiwania nowych aktywnych przeciwdrgawkowo związków, a w konsekwencji nowych leków, prowadzone są w dwóch głównych kierunkach. Pierwszy to modyfikacje struktur o ustalonej pozycji w terapii. Wymienić tutaj można między innymi analogi kwasu walproinowego,¹³⁰ fenytoiny,¹³¹ karbamazepiny,¹³² i felbamatu.¹³³ Drugi kierunek obejmuje syntezę całkowicie nowych struktur, niejednokrotnie o bardzo zróżnicowanej budowie chemicznej.

Biorąc pod uwagę powyższe doniesienia, wielu Autorów^{36, 37, 134, 135} prowadzi badania mające na celu ustalenie elementów strukturalnych odpowiedzialnych za działanie przeciwdrgawkowe. Na podstawie tych badań opracowano szereg modeli farmakoforowych, umożliwiających racjonalne projektowanie nowych aktywnych przeciwdrgawkowo połączeń.

Jednym z istotnych fragmentów strukturalnych są 5- lub 6-członowe układy heterocykliczne z atomem azotu, tworzące zwykle imidy lub laktamy, ponadto pierścienie aromatyczne stanowiące część hydrofobową cząsteczki oraz ugrupowania karbonylowe umożliwiające tworzenie wiązań wodorowych.

W Katedrze Chemii Farmaceutycznej UJ CM od lat prowadzone są badania w grupie pochodnych imidu kwasu bursztynowego jako połączeń o potencjalnej aktywności przeciwdrgawkowej. Dotyczą one projektowania i syntezy nowych związków, posiadających różne ugrupowania przy imidowym atomie azotu oraz w położeniu-3 pierścienia pirolidyno-2,5-dionu. Wśród tego typu połączeń otrzymano wiele aktywnych związków, których wartości dawki efektywnej (ED_{50}) były porównywalne do ED_{50} znanych leków przeciwpadaczkowych.¹³⁶⁻¹³⁸

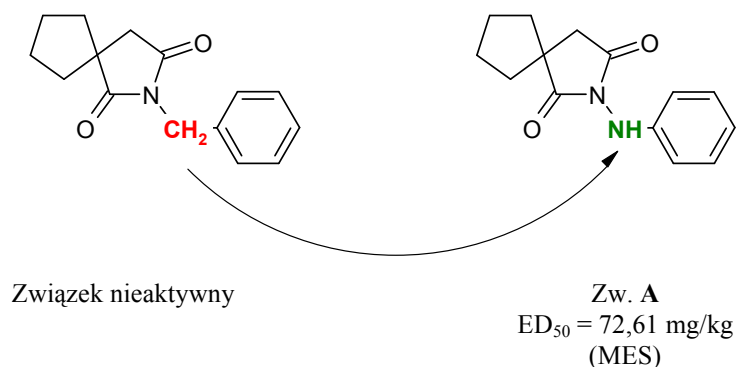
Z kolei, biorąc pod uwagę liczne doniesienia literaturowe dotyczące aktywności przeciwdrgawkowej spirocyklicznych pochodnych sukcyminidu,¹³⁹⁻¹⁴¹ w ostatnich latach otrzymano szereg nowych 2-azaspiro[4.4]nonano- oraz [4.5]dekano-1,3-dionów, posiadających przy imidowym atomie azotu różnie podstawione ugrupowania fenyłowe, benzyłowe i pirydylowe. Wstępne badania farmakologiczne wykazały, że większość tego typu związków charakteryzuje się aktywnością w drgawkach wywołanych prądem elektrycznym (MES) lub/i podskórnym podaniem kardiazolu (*scPTZ*).¹⁴²⁻¹⁴⁴ Struktury i aktywność przykładowych azaspiranów przedstawiono na **Ryc. 32**.



Ryc. 32. Struktury wybranych aktywnych pochodnych azaspiranów

Dalsze badania prowadzone w grupie *N*-benzyłowych pochodnych wykazały, że zastąpienie grupy metylenowej ($-CH_2-$) łączącej azot imidowy z pierścieniem aromatycznym, ugrupowaniem iminowym ($-NH-$) powoduje istotny wzrost aktywności. Wyznaczona wartość ED_{50} w teście maksymalnego wstrząsu elektrycznego (MES) dla *N*-fenyloamino-2-azaspiro

[4.4]nonano-1,3-dionu (zw. **A**) wynosiła 76,21 mg/kg, podczas gdy jego analog metylenowy był nieaktywny (**Ryc. 33**). Uzyskane wyniki wskazują na ważną rolę wiązania iminowego w aspekcie aktywności tego typu połączeń.¹⁴³



Ryc. 33. Struktura modelowego związku **A**

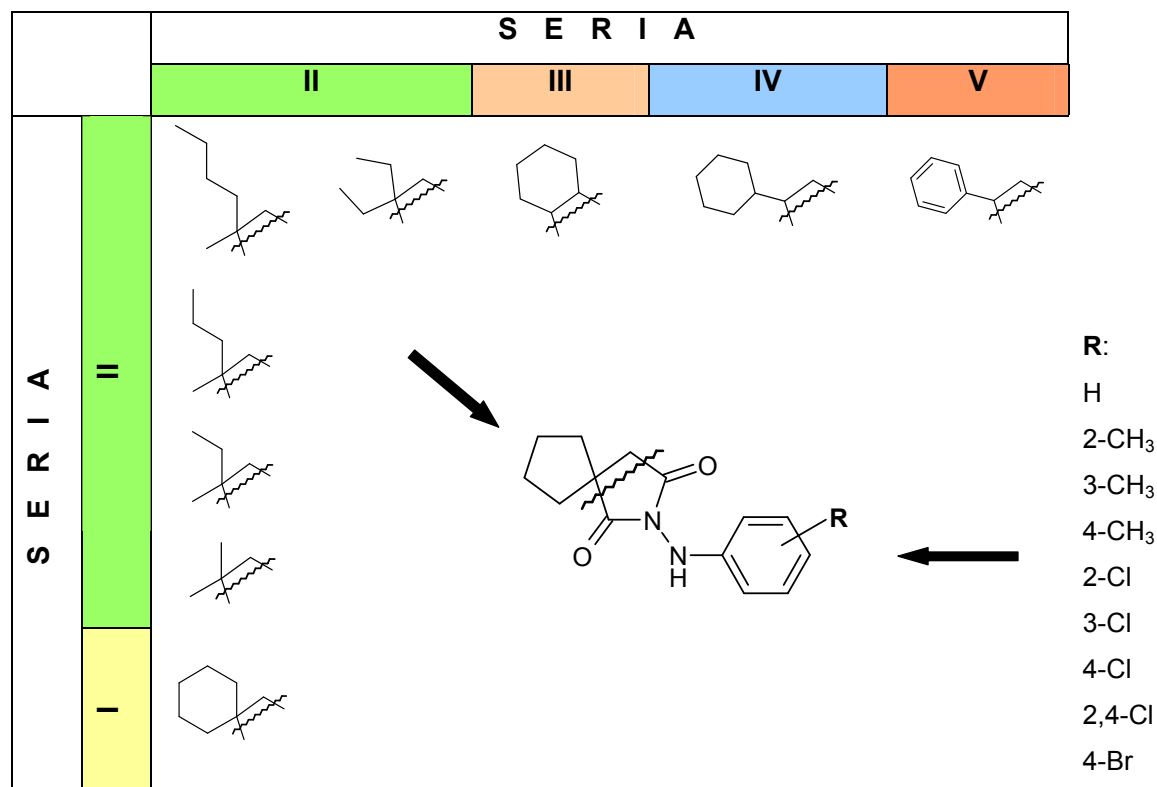
Kontynuując badania mające na celu poszukiwanie nowych aktywnych przeciwdrgawkowo substancji chemicznych oraz biorąc pod uwagę aktywność *N*-fenylo-amino-2-azaspiro[4.4]nonano-1,3-dionu, zaplanowano syntezę biblioteki związków, dla których modelową strukturą stanowi prezentowany zw. **A** (**Ryc. 33**). Modyfikacje tej pochodnej w pierwszej kolejności dotyczyły wprowadzenia elektrono-akceptorowych (Br, Cl) lub elektrono-donorowych (CH₃) podstawników w położenie-2, -3 lub -4 pierścienia aromatycznego, a następnie zastąpienia pierścienia cyklopentanu układem cykloheksanu (seria **I**) (**Ryc. 34**).

W kolejnym etapie badań postanowiono wprowadzić w miejsce układów spiranowych, podstawniki alkilowe (seria **II**), otrzymując pochodne, które mogą być uważane za analogi azaspiranów z otwartym lub/i zdegradowanym pierścieniem cykloalkilowym.

W dalszych badaniach postanowiono przeprowadzić syntezę bicyklicznych pochodnych heksahydroizoindo-1,3-dionu, w których pierścień cykloheksanu oraz układ sukcyimidu posiadają dwa wspólne atomy węgla (seria **III**).

W celu sprawdzenia roli, jaką odgrywa układ spiranowy w aktywności przeciwdrgawkowej azaspiranów, zaprojektowano serię analogów, w których w miejsce wspomnianego ugrupowania wprowadzono podstawnik cykloheksylowy o dużej swobodzie rotacyjnej (seria **IV**).

W ostatnim etapie prac postanowiono wykonać syntezę serii *N*-fenyloaminowych pochodnych 3-fenilo-pirolidyno-2,5-dionu, w celu zbadania wpływu zwiększonej aromatyczności na aktywność przeciwdrgawkową tego typu połączeń (seria V).



Ryc. 34. Struktury związków będących przedmiotem prezentowanych badań

Otrzymane związki zostaną przekazane do wstępnych badań farmakologicznych *in vivo* w ramach amerykańskiego programu poszukiwania nowych leków przeciwpadaczkowych Antiepileptic Drug Development (ADD). Otrzymane wyniki pozwolą na badania zależności pomiędzy strukturą, a działaniem oraz umożliwią ustalenie elementów strukturalnych istotnych dla aktywności przeciwdrgawkowej. Dla wybranych aktywnych związków przewidziano badania radioreceptorowe *in vitro* mające na celu ustalenie prawdopodobnego mechanizmu działania. Biorąc pod uwagę, że szereg leków przeciwpadaczkowych oddziałuje na neuroprzeżytność gabaergiczną, jak również fakt, że wiele z nich wpływa na przemieszczanie jonów wapniowych, dla wybranych pochodnych postanowiono wyznaczyć powinowactwo do receptorów GABA_A i napięciowo-zależnych kanałów wapniowych.

Mając na uwadze istotną rolę, jaką odgrywają właściwości lipofilowe w aktywności biologicznej, w kolejnym etapie badań przewidziano wyznaczenie lipofilowości dla

wszystkich otrzymanych związków, stosując eksperymentalne metody chromatograficzne w układzie faz odwróconych (RP - *Reversed Phase*), tj. technikę chromatografii cienkowarstwowej (RP-TLC) i wysokosprawnej chromatografii cieczowej (RP-HPLC). Otrzymane wyniki pozwolą na ustalenie zależności pomiędzy lipofilowością i budową chemiczną, a także na ocenę wpływu właściwości lipofilowych na aktywność przeciwdrgawkową badanych połączeń.

3. Badania chemiczne

Realizując cel niniejszej rozprawy otrzymano serię pięćdziesięciu dziewięciu nowych pochodnych 3-podstawionego sukcyimidu, których niezmiennym elementem był układ pirolidyno-2,5-dionu posiadający przy imidowym atomie azotu ugrupowanie fenyloaminowe.

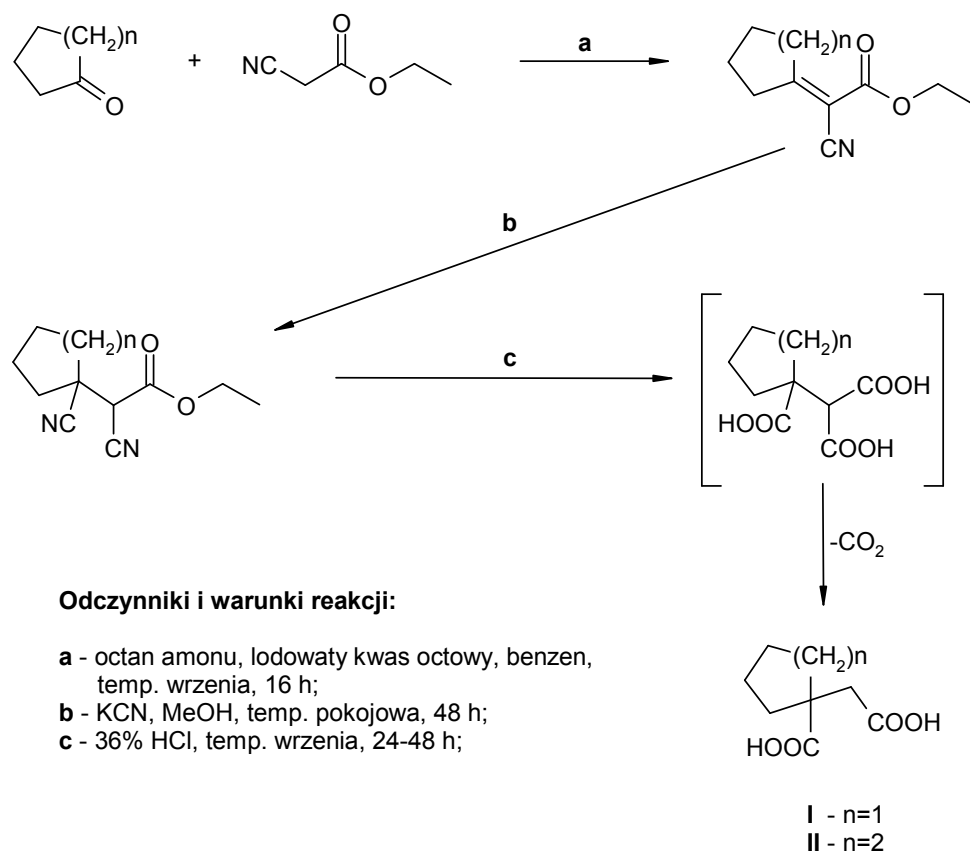
Syntezę produktów wyjściowych i zaprojektowanych połączeń przeprowadzono w oparciu o metody opisane w piśmiennictwie, wprowadzając pewne modyfikacje własne. Finalne związki otrzymano w reakcji cyklokondensacji odpowiednich kwasów dikarboksylowych bądź bezwodnika kwasowego z pochodnymi fenylohydrazyny.

3.1. Pochodne *N*-fenyloamino-2-azaspiro[4.4]nonano- i [4.5]dekano-1,3-dionu (1-16)

Biorąc pod uwagę aktywność przeciwdrgawkową *N*-fenyloamino-2-azaspiro[4.4]nonano-1,3-dionu, będącego strukturą modelową planowanych połączeń, w pierwszym etapie prac otrzymano serię jego bliskich analogów z różnymi podstawnikami w obszarze aromatycznym oraz pochodne, w których w miejsce układu cyklopentanu wprowadzono pierścień cykloheksanu.

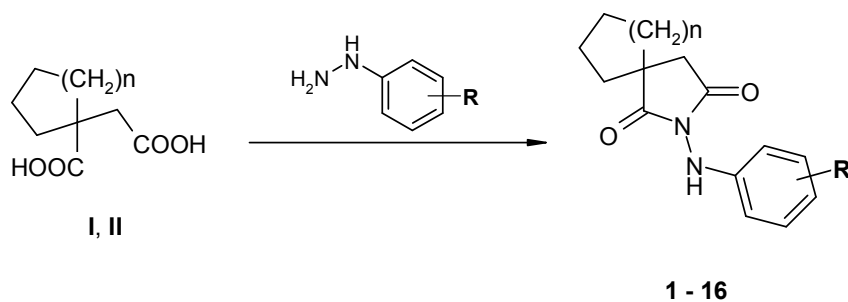
Substratami do syntezy serii azaspiranów były kwasy: 1-karboksy-1-cyklopentano-octowy (**I**) i 1-karboksy-1-cykloheksano-octowy (**II**), otrzymane w oparciu o metody opisane w literaturze.¹⁴⁵⁻¹⁴⁷ Synteza tego typu pochodnych była prowadzona wykorzystując reakcję Knoevenagel'a, która polega na kondensacji odpowiednio cyklopentanonu lub cykloheksanonu z cyjanooctanem etylu w obecności mieszaniny octanu amonu i lodowatego kwasu octowego jako katalizatorów. W wyniku tej reakcji otrzymuje się odpowiedni ester etylowy kwasu 2-cykloalkilideno-2-cyjanooctowego, który ulega addycji z cyjankiem potasu tworząc odpowiedni 1-(cyjanocykloalkilo)-cyjanooctan etylu. Produkty te poddane wielogodzinnej hydrolizie w stężonym kwasie solnym, tworzą odpowiednie kwasy dikarbo-

ksylowe. Związki **I** i **II** otrzymano z wydajnościami wynoszącymi około 60%. Syntezę oraz struktury kwasów dikarboksylowych (**I**, **II**) przedstawiono na **Schemacie 1**.



Schemat 1. Synteza kwasu 1-karboksy-1-cyklopentano-octowego (**I**) i 1-karboksy-1-cykloheksano-octowego (**II**)

Finalne związki **1-16** otrzymano w reakcji cyklokondensacji równomolowych ilości wyjściowego kwasu 1-karboksy-1-cyklopentano-octowego (**I**) lub 1-karboksy-1-cykloheksano-octowego (**II**) z odpowiednimi pochodnymi fenylhydrazyny. Reakcję prowadzono ogrzewając wodną zawiesinę kwasu dikarboksylowego ze stechiometryczną ilością aminy z równoczesnym oddestylowaniem wody. Po całkowitym usunięciu wody mieszaninę reakcyjną utrzymywano w temperaturze około 180°C przez 1 godzinę. Otrzymane zw. **1-16** krystalizowano z izopropanolu, a następnie oczyszczano wykorzystując w tym celu metodę chromatografii kolumnowej. Związki uzyskano z wydajnościami mieszczącymi się w granicach 48 - 75%. Syntezę oraz struktury zw. **1-16** przedstawiono na **Schemacie 2**.



Zw	1-8	9-16
n	1	2

Zw.	1, 9	2, 10	3, 11	4, 12	5, 13	6, 14	7, 15	8, 16
R	2-CH ₃	3-CH ₃	4-CH ₃	2-Cl	3-Cl	4-Cl	2,4-Cl	4-Br

Schemat 2. Synteza i struktury związków **1-16**

Struktury związków **1-16** zostały potwierdzone wynikami analizy elementarnej oraz spektralnej tj. widma protonowego rezonansu magnetycznego (¹H NMR) i badaniem widm w podczerwieni (IR). Ponadto, dla wybranych połączeń **7** i **16** wykonano widma masowe (MS). Czystości i jednorodności sprawdzono przy użyciu techniki chromatografii cienkowarstwowej (TLC) i wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC).

3.1.1. Dane spektralne związków 1-16

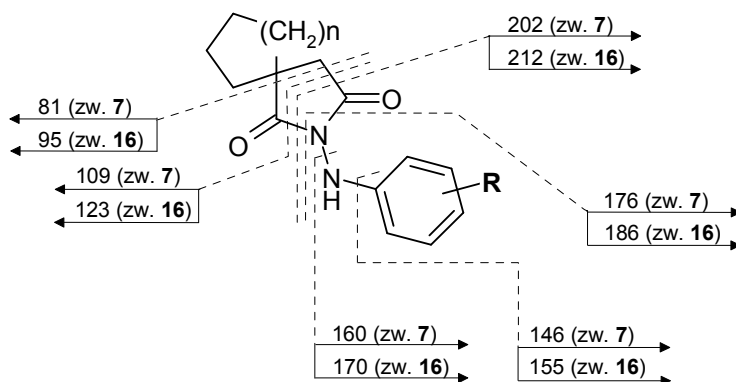
3.1.1.1. Analiza widm MS

W widmach MS zw. **7** i **16**, wykonanych metodą jonizacji strumieniem elektronów (EI-MS - *Electron Impact Ionization - Mass Spectrometry*), stwierdzono obecność jonów molekularnych - M⁺ *m/e* = 312 (100%), będącego pikiem głównym zw. **7** i M⁺ *m/e* = 336 (99%) (zw. **16**), które odpowiadały masom cząsteczkowym (**Ryc. 35**).

Jony fragmentacyjne *m/e* = 81 (28%), *m/e* = 109 (29%), *m/e* = 95 (17%) i *m/e* = 123 (10%) powstały w wyniku rozpadu układu 2-azaspiro[4.4]nonano- (zw. **7**), bądź 2-aza-spiro[4.5]dekano-1,3-dionu (zw. **16**). Sygnały odpowiadające fragmentacji pierścienia pirolidyno-2,5-dionu związku **7** rejestrowano jako jony *m/e* = 176 (54%) i *m/e* = 202 (48%), podczas gdy dla zw. **16** obserwowano je jako piki *m/e* = 186 (38%) i *m/e* = 212 (22%).

Zw. 7
m. cz. 313,19
$M^+ m/e = 312$ (100%)
$[M+2]^+ m/e = 314$ (64%)
$[M+4]^+ m/e = 316$ (10%)

Zw. 16
m. cz. 337,22
$M^+ m/e = 336$ (99%)
$[M+2]^+ m/e = 338$ (100%)

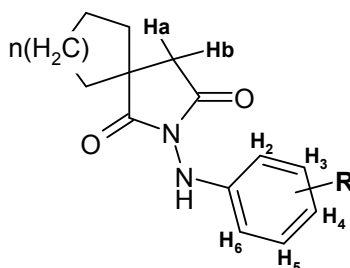


Ryc. 35. Analiza widm EI-MS zw. 7 i 16

Obecności jonów $m/e = 160$ (24%) (zw. 7) i $m/e = 170$ (10%) (zw. 16), stanowiących fragmenty fenylaminowe potwierdza rozerwanie wiązania iminowego (N-NH). Dalsza fragmentacja przebiegała z utworzeniem jonów $m/e = 146$ (24%) (zw. 7) i $m/e = 155$ (11%) (zw. 16), odpowiadających podstawnikom fenylowym. Obecność niejednorodnych izotopowo atomów chloru (zw. 7) lub bromu (zw. 16) powoduje występowanie w obu widmach pików izotopowych. Dla pochodnej 7 były to $[M+2]^+ m/e = 314$ (64%) i $[M+4]^+ m/e = 316$ (10%), natomiast w przypadku zw. 16 obserwowano pik $[M+2]^+ m/e = 338$ (100%), będący zarazem jego pikiem głównym o intensywności niemal równej jonowi molekularnemu.

3.1.1.2. Analiza widm ^1H NMR

W widmach ^1H NMR związków 1-16 w zakresie δ 1,35-2,37 ppm występują multiplety protonów alifatycznych pierścieni cyklopentanu (zw. 1-8) lub cykloheksanu (zw. 9-16). W przypadku wszystkich połączeń sygnały protonów H_a i H_b układu pirolidyno-2,5-dionu obserwowano jako singlety w zakresie δ 2,65-2,74 ppm.



Protony ugrupowania iminowego (-NH-) tworzą charakterystyczne szerokie singlety, występujące w zakresie δ 6,01-6,59 ppm. Przyczyną poszerzenia sygnału protonu połączonego z atomem azotu jest najprawdopodobniej występowanie momentu kwadrupolowego w jądrze ^{14}N na skutek niesferycznego rozkładu jego ładunku. Natomiast przesunięcia chemiczne protonów -NH- uzależnione są od rodzaju podstawnika w położeniu *orto* pierścienia fenyłowego. Zaobserwowano, że obecność silnie elektroujemnych atomów chloru, powoduje zmniejszenie gęstości elektronowej wokół protonów wiązania iminowego, czego efektem jest zmiana przesunięcia sygnału w kierunku większych wartości δ (efekt odsłaniania). Sygnały protonów aromatycznych były dobrze rozdzielone, a ich liczba i przesunięcia chemiczne są uzależnione od rodzaju i położenia podstawników w pierścieniu fenyłowym. W przypadku *orto*-metylo (zw. **1** i **9**) oraz *orto*-chloro (zw. **4** i **12**) podstawionych pochodnych, protony H_6 obserwowano jako dublety przy δ 6,47 ppm (zw. **1**) i δ 6,45 (zw. **9**), bądź podwójne dublety przy δ 6,53 (zw. **4**) oraz δ 6,50 (zw. **12**). Jednoprotonowe multiplety mieszczące się w zakresie δ 6,86-6,93 ppm zostały przypisane protonom H_4 . W widmach zw. **1** i **9** widoczne są dwuprotonowe multiplety w zakresie δ 7,06-7,12 ppm, będące wynikiem nałożenia się sygnałów protonów H_3 i H_5 . W przypadku pochodnych **4** i **12** protony H_5 obserwowano jako multiplety w zakresie δ 7,09-7,12 ppm, natomiast protony H_3 występują jako dublety dubletów przy δ 7,32 ppm. Analizując widma 3-metyłowych pochodnych (zw. **2** i **10**), stwierdzono obecność dwuprotonowych multipletów w zakresie δ 6,52-6,58 ppm, które przypisano protonom H_2 i H_6 . Sygnały protonów H_4 obserwowano jako multiplety w zakresie δ 6,77-6,80 ppm. Przy δ 7,12 ppm (zw. **2**) i δ 7,11 ppm (zw. **10**) widoczne są triplety o intensywności odpowiadającej jednemu protonowi, które przypisano protonom H_5 . W przypadku analogów 3-chloro, zw. **5** i **13**, protony H_6 występują jako podwójne dublety dubletów przy δ 6,63 ppm (zw. **5**) lub δ 6,62 ppm (zw. **13**). Sygnały protonów H_2 rejestrowano jako triplety przy przesunięciach wynoszących odpowiednio δ 6,71 ppm (zw. **5**) oraz δ 6,70 ppm (zw. **13**). Jednoprotonowe podwójne dublety dubletów przy 6,95 ppm (zw. **5**) lub δ 6,94 ppm (zw. **13**) przypisano protonom H_4 . Sygnały protonów H_5

obserwowano jako triplety (zw. **5** i **13**) przy δ 7,16 ppm W widmach połączeń posiadających w położeniu-4 podstawnika fenyłowego atomy chloru (zw. **6** i **14**), bromu (zw. **8** i **16**) lub grupę metylową (zw. **3** i **11**), w wyniku nałożenia się sygnałów protony aromatyczne obserwowano jako dwa multiplety w zakresach δ 6,63-7,72 ppm (H_2 , H_6) oraz δ 7,02-7,36 ppm (H_3 , H_5), z których każdy posiada intensywność odpowiadającą dwóm protonom. W przypadku 2,4-dichloro podstawionych pochodnych **7** i **15**, protony H_6 występują jako dublety przy δ 6,46 ppm (zw. **7**) oraz δ 6,44 ppm (zw. **15**). Protonom H_5 przypisano dublety dubletów widoczne w zakresie δ 7,10-7,12 ppm, podczas gdy H_3 obserwowano jako jednoprotonowe dublety przy tym samym przesunięciu δ 7,34 ppm. Analizując powyższe widma zaobserwowano, że wprowadzenie silnie elektroujemnych atomów chloru lub bromu powoduje przesunięcie sygnałów pochodzących od protonów aromatycznych w stronę mniejszych wartości natężenia pola magnetycznego. W widmach 1H NMR zw. **1-3** oraz **9-11** w zakresie δ 2,24-2,34 ppm występują dodatkowo trójprotonowe singlety pochodzące od protonów grup metylowych.

3.1.1.3. Analiza widm IR

W widmach IR wybranych związków **4**, **7**, **8**, **12**, **15** i **16** występują pasma absorpcji charakterystyczne dla *N*-podstawionych pochodnych pirolidyno-2,5-dionu. W zakresie 1716 - 1733 cm^{-1} obserwowano intensywne pasmo związane z drganiami rozciągającymi grup karbonylowych (C=O). Obecność podstawnika fenyłowego potwierdzają silne pasma w obszarze 1452 - 1597 cm^{-1} , wynikające z drgań rozciągających wiązania węgiel-węgiel (C=C) w układach aromatycznych. Drgania rozciągające alifatycznych wiązań C-H stwierdzono w zakresie 2857 - 2965 cm^{-1} , podczas gdy w przypadku pierścieni aromatycznych występowały w obszarze 3260 - 3334 cm^{-1} .

3.2. Pochodne *N*-fenyloamino-3,3-dialkilo-pirolidyno-2,5-dionu (**17-45**)

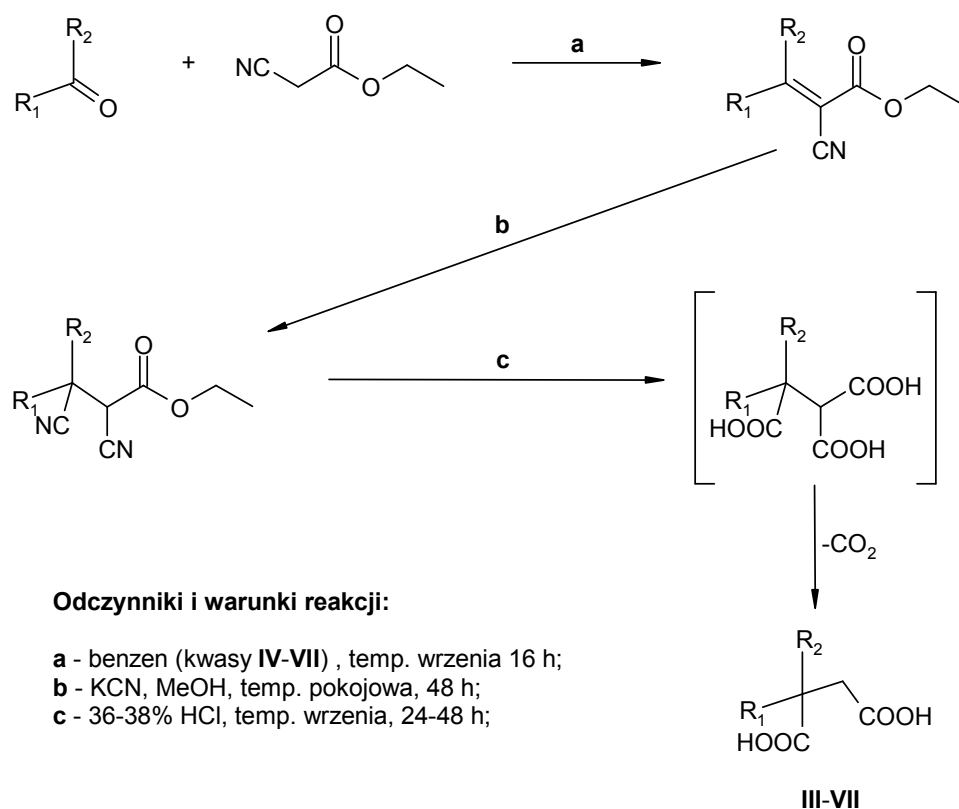
Biorąc pod uwagę wyniki badań farmakologicznych uzyskanych w grupie azaspiranów, które wykazały, że związki tego typu są aktywne głównie w teście maksymalnego wstrząsu elektrycznego (MES), w kolejnym etapie prac przeprowadzono syntezę ich analogów wprowadzając w położenie-3 układu pirolidyno-2,5-dionu różnej długości podstawniki alifatyczne. Struktury te zaprojektowano jako pochodne etosuksimidu (2-etylo-2-metylo-pirolidyno-2,5-dion), jednego z nielicznych leków przeciwpadaczkowych

skutecznych w leczeniu napadów nieświadomości. Lek ten jest nieaktywny w teście MES, natomiast hamuje drgawki wywołane kardiazolem (test scPTZ).²³ Głównym celem przeprowadzonych modyfikacji strukturalnych było zbadanie, w jaki sposób wpłynie na aktywność przeciwdrgawkową degradacja ugrupowań cykloalkilowych, a także otrzymanie związków aktywnych w obu modelach drgawkowych (MES, scPTZ). Połączenia o takim profilu farmakologicznym mogą być potencjalnie skuteczne w leczeniu różnych typów napadów.

Biorąc pod uwagę, obserwowaną w seriach 2-azaspiro[4.4]nonano i [4.5]dekano-1,3-dionów znacznie wyższą aktywność przeciwdrgawkową pochodnych niepodstawionych i związków zawierających silnie elektroujemne atomy bromu lub chloru, a także połączeń posiadających w położeniu-4 pierścienia fenyłowego grupę metylową, syntezę 3,3-dialkilo-pirolidyno-2,5-dionów (zw. **17-45**) ograniczono do tego typu analogów.

Otrzymano serie *N*-fenyloaminowych pochodnych 3,3-dimetylo-, 3-etylo-3-metylo-, 3-metylo-3-propylo-, 3-butylo-3-metylo- oraz 3,3-dietylo-pirolidyno-2,5-dionu, których substratami do syntezy były kwasy: 2,2-dimetylo-bursztynowy (**III**), 2-etylo-2-metylo-bursztynowy (**IV**) 2-metylo-2-propylo-bursztynowy (**V**), 2-metylo-2-butylo bursztynowy (**VI**) oraz 2,2-dietylo-bursztynowy (**VII**).

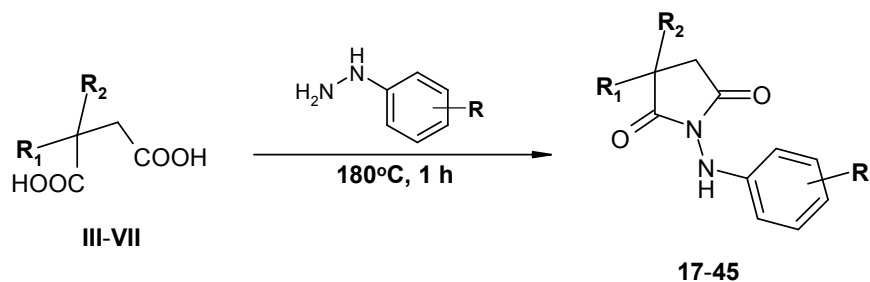
Wyjściowe kwasy 2,2-dialkilo-bursztynowe (**III-VII**) syntetyzowano w oparciu o metodę opisaną przez Smith'a i Horowitz'a,¹⁴⁸ zmodyfikowaną przez Moal'a.^{146, 149} Polega ona, podobnie jak w przypadku kwasu 1-karboksy-1-cyklopentano-octowego i 1-karboksy-1-cykloheksano-octowego, na kondensacji Knoevenagel'a odpowiednio podstawionego dialkiloowego ketonu z cyjanooctanem etylu w obecności mieszaniny octanu amonu i lodowatego kwasu octowego jako katalizatorów. W pierwszym etapie otrzymano odpowiednie estery etylowe kwasów 2-cyjano-3-alkilo-karboksylowych, ogrzewając w temperaturze wrzenia mieszaninę acetonu i cyjanooctanu etylu lub stosując jako środowisko reakcji benzen, w przypadku wyższych ketonów. Otrzymane produkty pośrednie poddano następnie reakcji addycji z cyjankiem potasu w wyniku, czego uzyskano różnie podstawione estrы etylowe kwasów 2,3-dicyjano-3-alkilokarboksylowych. Z estrów tych po wielogodzinnej hydrolizie prowadzonej w stężonym kwasie solnym powstają odpowiednie kwasy 2,2-dialkilo-bursztynowe (**III-VII**), z wydajnościami wynoszącymi 68 - 75%. Syntezę i struktury otrzymanych kwasów przedstawiono na **Schemacie 3**.



Zw.	III	IV	V	VI	VII
R ₁	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	C ₂ H ₅
R ₂	CH ₃	C ₂ H ₅	C ₃ H ₇	C ₄ H ₈	C ₂ H ₅

Schemat 3. Synteza kwasów 2,2-dialkilo-bursztynowych (III-VII)

Związki **17-45** otrzymano analogicznie jak pochodne azaspiranów, tj. w reakcji cyklokondensacji odpowiedniego 2,2-dialkylowego kwasu bursztynowego (III-VII) z pochodnymi fenylohydrazyny, stapiając ich stechiometryczne ilości w temperaturze około 180°C przez godzinę (**Schemat 4**). Jako aminy stosowano: fenylohydrazynę (zw. **17**, **24** i **40**), 4-metylo-fenylohydrazynę (zw. **18**, **25** i **41**), 2-chloro-fenylohydrazynę (zw. **19**, **26**, **31**, **36** i **42**), 3-chloro-fenylohydrazynę (zw. **20**, **27** i **32**), 4-chloro-fenylohydrazynę (zw. **21**, **28**, **33**, **37** i **43**), 2,4-dichloro-fenylohydrazynę (zw. **22**, **29**, **34**, **38** i **44**) oraz 4-bromo-fenylohydrazynę (zw. **23**, **30**, **35**, **39** i **45**). Otrzymane produkty krystalizowano z izopropanolu, a następnie oczyszczano stosując metodę chromatografii kolumnowej. Wydajność reakcji mieściła się w granicach 67 - 81%.



Zw.	17-23	24-30	31-35	36-39	40-45
R ₁	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	C ₂ H ₅
R ₂	CH ₃	C ₂ H ₅	C ₃ H ₇	C ₄ H ₈	C ₂ H ₅

R	Zw.
H	17, 24, 40
4-CH ₃	18, 25, 41
2-Cl	19, 26, 31, 36, 42
3-Cl	20, 27, 32
4-Cl	21, 28, 33, 37, 43
2,4-Cl	22, 29, 34, 38, 44
4-Br	23, 30, 35, 39, 45

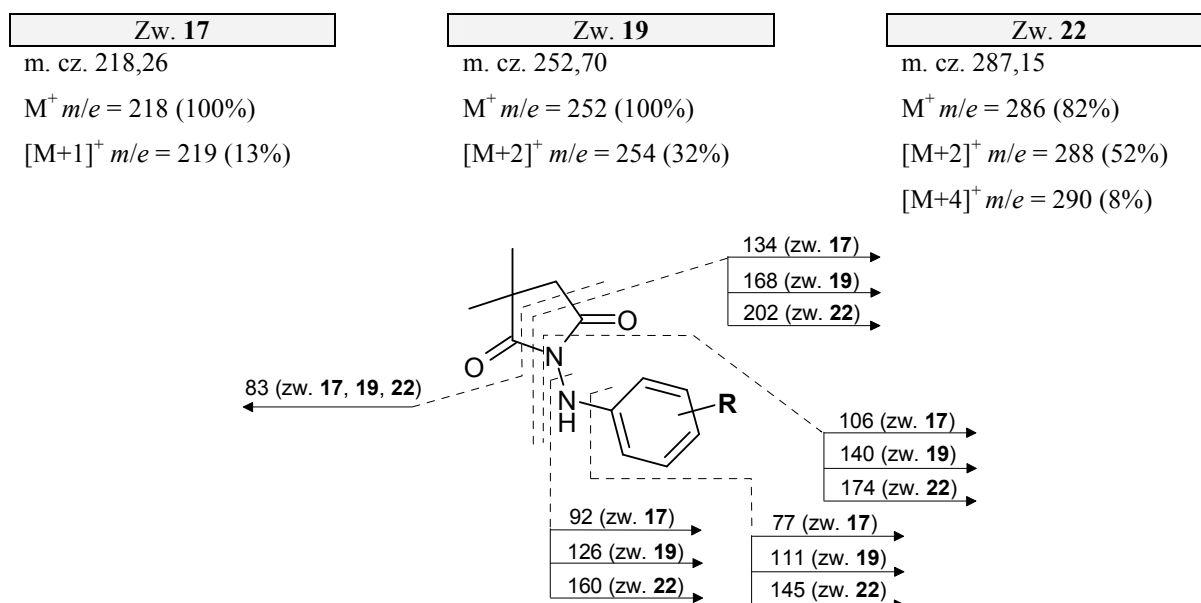
Schemat 4. Synteza i struktury związków **17-45**

Struktury związków **17-45** potwierdzono w oparciu o wyniki analizy elementarnej oraz badanie widm MS, ¹H NMR i IR. Czystość i jednorodność otrzymanych połączeń sprawdzono wykorzystując techniki chromatografii cienkowarstwowej (TLC) i wysoko-sprawnej chromatografii cieczowej (HPLC).

3.2.1. Dane spektralne związków 17-45

3.2.1.1. Analiza widm MS

W widmach EI-MS wybranych 3,3-dimetylowych pochodnych pirolidyno-2,5-dionu, zw. **17**, **19** i **22** stwierdzono obecność jonów molekularnych [M]⁺ *m/e* = 218 (zw. **17**), [M]⁺ *m/e* = 251 (zw. **19**) będących ich pikami głównymi oraz [M]⁺ *m/e* = 286 (zw. **22**) o intensywności 82%, które odpowiadały ich masom cząsteczkowym (**Ryc. 36**).

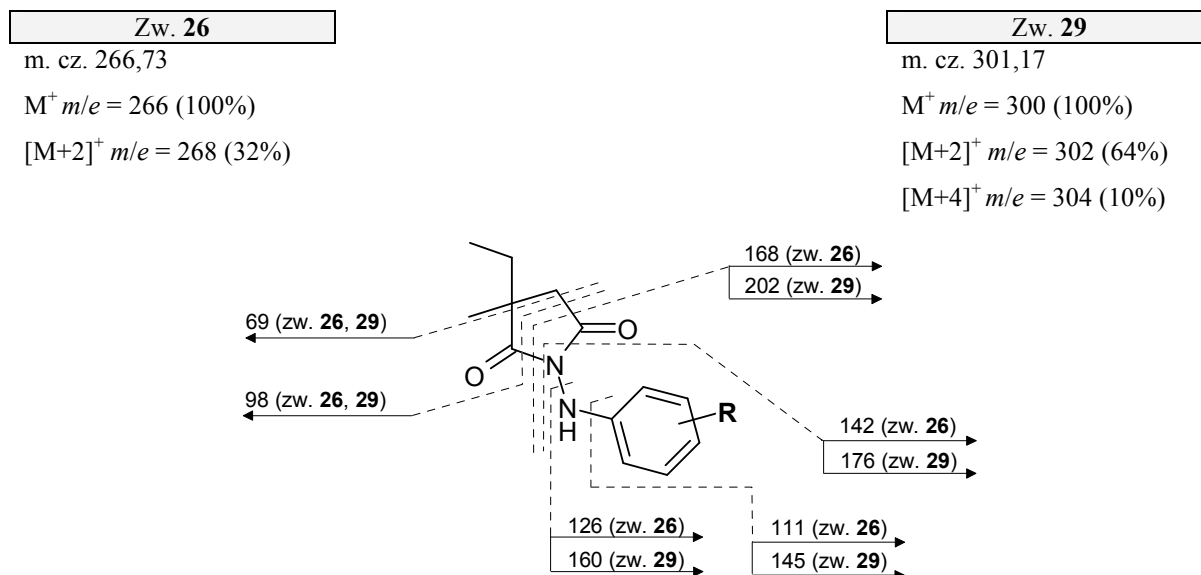


Ryc 36. Fragmentacja pochodnych 3,3-dimetylo-pirolidyno-2,5-dionu (zw. 17, 19 i 22)

W przypadku wszystkich połączeń (17, 19 i 22), jon fragmentacyjny $m/e = 83$ (14%-17, 26%-19, 23%-22), powstał w wyniku rozpadu układu pirolidyno-2,5-dionu. Dalsza fragmentacja tego pierścienia przebiegała z utworzeniem jonów $m/e = 134$ (95%), $m/e = 106$ (29%) (zw. 17), $m/e = 168$ (99%), $m/e = 140$ (27%) (zw. 19), $m/e = 202$ (100%) i $m/e = 174$ (20%) dla zw. 22. Jon $m/e = 202$ (100%) jest zarazem pikiem głównym pochodnej 22. Rozerwanie wiązania iminowego (N-NH) potwierdza obecności sygnałów $m/e = 92$ (9%) (zw. 17), $m/e = 126$ (10%) (zw. 19) i $m/e = 160$ (19%) (zw. 22), które odpowiadają fragmentom fenyloaminowym. Natomiast, jony $m/e = 77$ (17%) (zw. 17), $m/e = 111$ (19%) (zw. 18) i $m/e = 145$ (8%) (zw. 22) przypisano odpowiednim ugrupowaniom fenyłowym. Obecność niejednorodnych izotopowo atomów chloru w zw. 19 i 22 powoduje, że w obydwu widmach występują piki izotopowe, dla pochodnej 19 - $[M+2]^+ m/e = 254$ (32%) o względnej intensywności wynoszącej 0.32 w stosunku do jonu molekularnego, natomiast w przypadku 2,4-dichloro podstawionego zw. 22 są to piki $[M+4]^+ m/e = 290$ (8%) i $[M+2]^+ m/e = 288$ (52%).

Z kolei strukturę zw. 23, potwierdzono w oparciu o widmo zarejestrowane metodą jonizacji poprzez elektrorozpraszanie (ESI-MS - *Electrospray Ionisation* - *Mass Spectrometry*). Przeprowadzona analiza wskazała obecność jonu molekularnego $[M+H]^+ 297$. Ponadto w widmie tym obserwowano pik izotopowy $[M+2]^+ m/z = 299$ o intensywności niemal równej jonowi molekularnemu, który potwierdza występowanie w cząsteczce atomu bromu.

Analogiczną fragmentację obserwowano w przypadku widm EI-MS zw. **26** i **29** należących do serii *N*-fenyloamino-3-etylo-3-metylo-pirolidyno-2,5-dionów (**Ryc. 37**). W analizowanych widmach rejestrowano piki jonów molekularnych M^+ $m/e = 266$ (100%) (zw. **26**) oraz M^+ $m/e = 300$ (100%) (zw. **29**), będących ich pikami głównymi.



Ryc. 37. Fragmentacja pochodnych 3-etylo-3-metylo-pirolidyno-2,5-dionu (zw. **26** i **29**) - widma EI-MS

W efekcie rozpadu pierścienia pirolidyno-2,5-dionu powstały jony fragmentacyjne $m/e = 69$, $m/e = 98$ (zw. **26** i **29**) oraz $m/e = 168$ (76%) (zw. **26**) i $m/e = 202$ (92%) (zw. **29**). Dalsza fragmentacja przebiegała z utworzeniem jonów $m/e = 142$ (60%) (zw. **26**) oraz $m/e = 176$ (47%) w przypadku pochodnej **29**. Rozerwanie wiązania iminowego (N-NH) potwierdza obecności sygnałów $m/e = 126$ (10%) (zw. **26**) oraz $m/e = 160$ (22%) (zw. **29**), które przypisano fragmentom fenyloaminowym. Jony $m/e = 111$ (15%) (zw. **26**) oraz $m/e = 145$ (8%) (zw. **29**) odpowiadają ugrupowaniu 2-chlorofenyłowemu (zw. **26**) lub 2,4-dichlorofenyłowemu (zw. **29**). W przypadku obu widm rejestrowano piki izotopowe związane z obecnością w ich strukturach niejednorodnych izotopowo atomów chloru. Dla zw. **26** był to $[M+2]^+$ $m/e = 268$ (32%) o względnej intensywności wynoszącej 0,32 w odniesieniu do jonu molekularnego, natomiast w przypadku 2,4-dichloro-pochodnej **29** piki $[M+4]^+$ $m/e = 304$ (10%) oraz $[M+2]^+$ $m/e = 302$ (64%), o intensywności odpowiednio 0,10 oraz 0,64.

Fragmentację związków **38** i **44** należących do pozostałych serii 3,3-dialkilowych pochodnych pirolidyno-2,5-dionu zbadano w oparciu o analizę widm EI-MS (**Ryc. 38**).

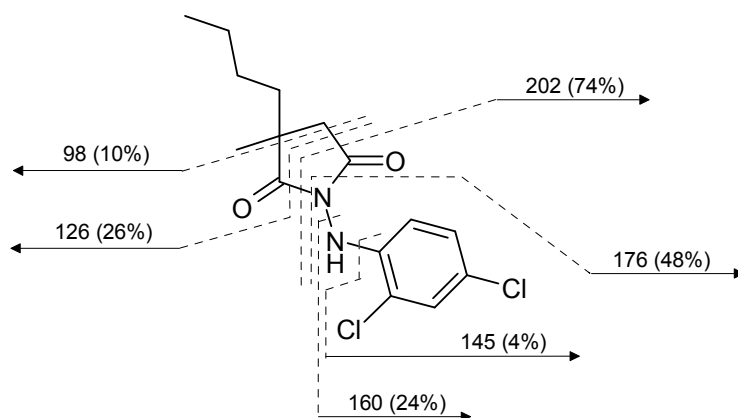
Zw. 38

m. cz. 329,23

$M^+ m/e = 328$ (100%)

$[M+2]^+ m/e = 330$ (62%)

$[M+4]^+ m/e = 332$ (9%)



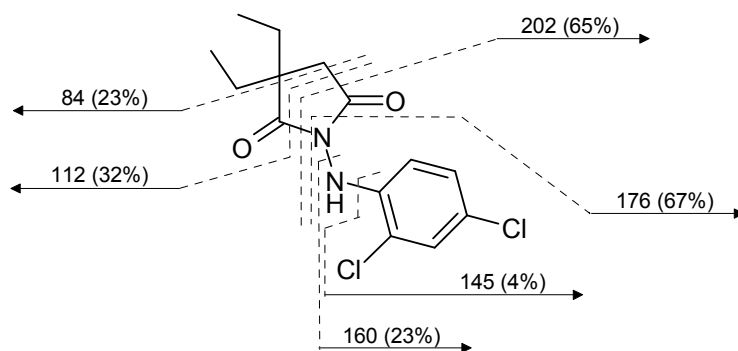
Zw. 44

m. cz. 315,20

$M^+ m/e = 314$ (100%)

$[M+2]^+ m/e = 316$ (63%)

$[M+4]^+ m/e = 318$ (10%)



Ryc. 38. Fragmentacja EI-MS pochodnych 3-etylo-3-metylo-pirolidyno-2,5-dionu (zw. 38 i 44)

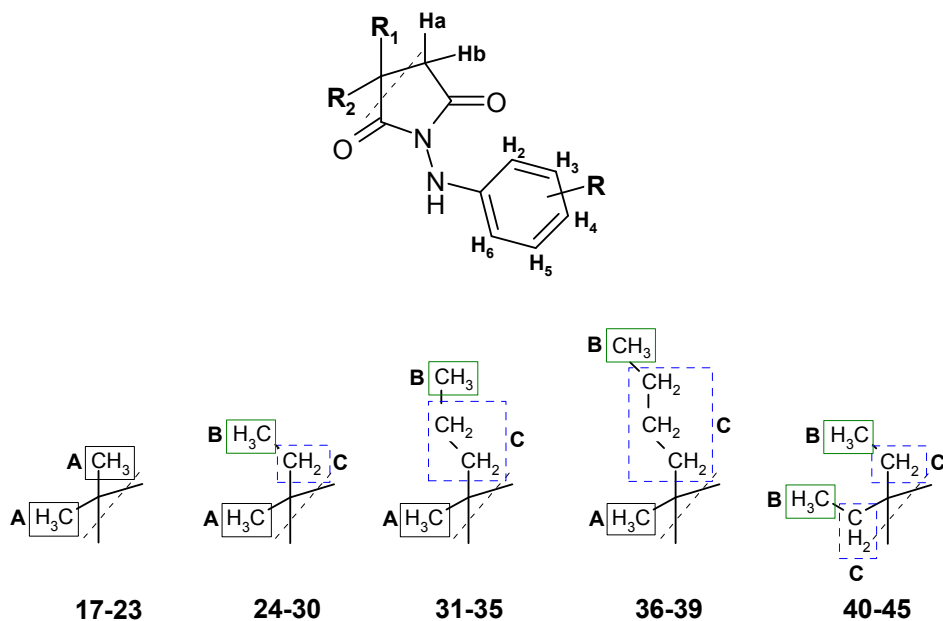
W widmach tych obserwowano jony molekularne odpowiednio $M^+ m/e = 328$ (100%) (zw. 38) oraz $M^+ m/e = 314$ (100%) (zw. 44). Podobnie jak w przypadku opisanych powyżej pochodnych, rozpad pierścienia pirolidyno-2,5-dionu przebiegał z utworzeniem fragmentów $m/e = 98$ (10%), $m/e = 126$ (26%) (zw. 38) i $m/e = 84$ (23%), $m/e = 112$ (32%) (zw. 44), a także z uwagi na analogiczne podstawniki przy imidowym atomie azotu - jonów $m/e = 176$ (48%-38, 67%-44) i $m/e = 202$ (74%-38, 65%-44). Obecność ugrupowania 2,4-dichlorofenyloaminowego potwierdza jon $m/e = 160$ (24%-38, 23%-44), powstały w wyniku rozerwania wiązania iminowego (N-NH) oraz jon $m/e = 145$ (4%-38, 44), który odpowiada fragmentowi 2,4-dichlorofenyłowemu. W obydwu analizowanych widmach obserwowano jony izotopowe $[M+4]^+ m/e = 332$ (9%) i $[M+2]^+ m/e = 330$ (62%) (zw. 38) oraz $[M+4]^+ m/e = 318$ (10%) i $[M+2]^+ m/e = 316$ (63%) (zw. 44), pochodzące od zawartych w ich cząsteczkach atomów chloru.

Strukturę zw. 37 i 43 potwierdzono w oparciu o widma ESI-MS, a ich analiza potwierdziła obecność jonów molekularnych $[M+H]^+ 294$ (zw. 37) i $[M+H]^+ 280$ (zw. 43). Z uwagi

na fakt, że w obu związkach występuje ugrupowanie 4-chlorofenylowe rejestrowano również piki izotopowe odpowiednio $[M+2]^+$ $m/z = 296$ (zw. **37**) i $[M+2]^+$ $m/z = 282$ (zw. **43**).

3.2.1.2. Analiza widm ^1H NMR

W widmach ^1H NMR związków **17-45** w zakresie δ 0,90-1,90 ppm obserwowano sygnały protonów alifatycznych pochodzących od podstawników alkilowych R_1 i R_2 . Ugrupowania metylowe (**A**) związane bezpośrednio z pierścieniem imidowym serii 3,3-dimetylowych (zw. **17-23**) oraz 3-etylo-3-metylowych (zw. **24-30**) pochodnych pirolidyno-2,5-dionu rejestrowano jako singlety w zakresie δ 1,37-1,43 ppm, podczas gdy w przypadku analogów 3-propylowych (zw. **31-35**) i 3-butylowych (zw. **36-39**) występują jako multiplety, łącznie z protonami łańcuchów alkilowych - **C**. Grupy metylowe (**B**) w podstawnikach etylowych, propylowych i butylowych tworzą triplety w zakresie δ 0,90-0,97 ppm, natomiast fragmenty metylenowe, etylenowe oraz propylenowe (**C**) obserwowano jako multiplety w zakresie 1,14-1,90 ppm.



Sygnały protonów H_a i H_b układu pirolidyno-2,5-dionu w związkach niechiralnych **17-23** i **40-45** obserwowano jako singlety w zakresie δ 2,61-2,70 ppm. Obecność asymetrycznego atomu węgla C-3 w połączeniach **24-39** powoduje, że protony te występują jako dublety przy δ 2,51-2,57 ppm (H_a) oraz δ 2,73-2,79 ppm (H_b) ze stałymi sprzężenia J wynoszącymi około 18 Hz.

Protony wiązania iminowego (-NH-) wszystkich analizowanych związków tworzą charakterystyczne szerokie singlety, rejestrowane w zakresie δ 6,06-6,60 ppm. Analogicznie jak w przypadku widm opisanych dla azaspiranów, przesunięcie chemiczne protonów -NH- uzależnione jest od rodzaju podstawnika w położeniu *orto* pierścienia fenyłowego, mianowicie obecność silnie elektroujemnych atomów chloru, powoduje zmniejszenie gęstości elektronowej wokół protonów wiązania iminowego, efektem tego jest zmiana przesunięcia sygnału w kierunku większych wartości δ (efekt odsłaniania).

Sygnały protonów aromatycznych były dobrze rozdzielone, a ich liczba i przesunięcia chemiczne uzależnione są od położenia atomów chloru, bromu, bądź grupy metylowej w pierścieniu fenyłowym. W przypadku niepodstawionych *N*-fenyloaminowych pochodnych **17**, **24** i **40** obserwowano je jako trzy multiplety w zakresach δ 6,75-6,79 ppm (H_2 , H_6), δ 6,94-7,01 ppm (H_4) oraz δ 7,21-7,27 ppm (H_3 , H_5).

Protony aromatyczne H_6 *orto*-chloro podstawionych pochodnych **19**, **26**, **31**, **36** i **42** występują jako podwójne dublety w zakresie δ 6,53-6,56 ppm. Potrójne dublety o intensywności odpowiadającej jednemu protonowi, występujące przy δ 6,90-6,91 ppm przypisano protonom H_4 . Atomy wodoru H_5 rejestrowano jako multiplety w zakresie δ 7,10-7,17 ppm, natomiast protony H_3 sąsiadujące z atomem chloru, obserwowano jako podwójne dublety przy δ 7,32-7,33 ppm.

Analizując widma 3-chloro pochodnych zw. **20**, **27** i **32** stwierdzono obecność jedno-protonowych podwójnych dubletów dubletów w zakresie δ 6,64-6,65 ppm, które przypisano protonom H_6 . Sygnały protonów H_2 obserwowano jako triplety przy δ 6,72-6,73 ppm. Podwójne dublety dubletów protonów H_4 we wszystkich widmach rejestrowano przy δ 6,95 ppm. Atomy wodoru H_5 występowały jako triplety w zakresie δ 7,16-7,17 ppm.

W widmach połączeń posiadających w położeniu-4 podstawnika fenyłowego atomy chloru (zw. **21**, **28**, **33**, **37**, **43**), bromu (zw. **23**, **30**, **35**, **39**, **45**), bądź grupy metylowe (zw. **18**, **25**, **41**), w wyniku nałożenia się sygnałów, protony aromatyczne obserwowano jako dwa multiplety w zakresach δ 6,63-6,75 ppm (H_2 , H_6) oraz δ 7,03-7,38 ppm (H_3 , H_5).

W przypadku 2,4-dichloro podstawionych pochodnych **22**, **29**, **34**, **38** i **44** protony H_6 występują jako dublety w zakresie δ 6,46-6,49 ppm (zw. **22**, **34**, **38** i **44**). Protonom H_5 przypisano dublety dubletów widoczne w zakresie δ 7,11-7,12 ppm. Jednoprotonowe dublety obserwowane we wszystkich widmach w zakresie δ 7,34-7,35 odpowiadają protonom H_3 pierścienia aromatycznego.

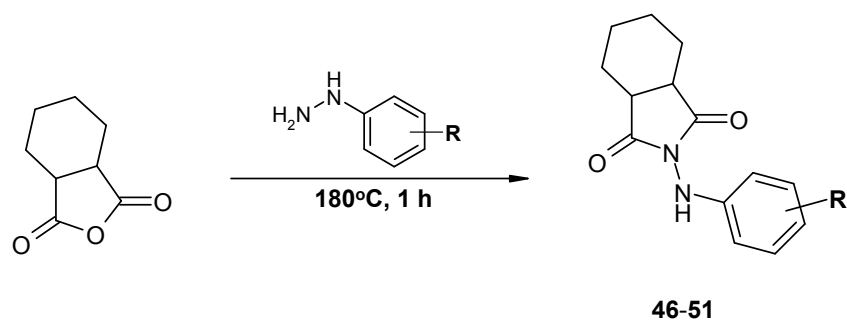
3.2.1.3. Analiza widm IR

W widmach IR wybranych związków **17**, **19**, **22**, **24**, **26**, **28**, **30-32**, **34**, **36**, **37**, **39**, **40** i **44**, reprezentujących wszystkie serie 3,3-dialkilowych pochodnych pirolidyno-2,5-dionu, występowały pasma absorpcji charakterystyczne dla *N*-podstawionych sukcyimidów. W zakresie 1704 - 1731 cm⁻¹ obserwowano intensywne pasmo związane z drganiami rozciągającymi grup karbonylowych. Obecność podstawnika fenylogowego potwierdzają silne pasma w obszarze 1403 - 1602 cm⁻¹, wynikające z drgań rozciągających wiązania węgiel-węgiel w układach aromatycznych. Drgania rozciągające alifatycznych wiązań C-H stwierdzono w zakresie 2933 - 2980 cm⁻¹, podczas gdy w przypadku pierścieni aromatycznych występowały w obszarze 3210 - 3436 cm⁻¹.

3.3. Pochodne *N*-fenyloamino-heksahydroizoindo-1,3-dionu (**46-51**)

Realizując dalsze badania otrzymano bicykliczne pochodne *N*-fenyloamino-heksahydroizoindo-1,3-dionu. Rozpatrując ich struktury jako pochodne pirolidyno-2,5-dionu, można stwierdzić, że w związkach tych pierścień cykloheksanu oraz układ sukcyimidu posiadają dwa wspólne atomy węgla C3 i C4. Modyfikacja tego typu miała na celu sprawdzenie czy odmienny sposób przyłączenia pierścienia cykloheksanu do układu imidowego, wpłynie na zmianę aktywności w porównaniu do odpowiednich związków serii azaspiranów. Dodatkowo struktura heksahydroizoindo-1,3-dionu może być traktowana jako nasycony układ ftalimidowy, opisywany przez Vamecq'a,^{36, 37} jako jeden z elementów farmakoforowych istotnych dla aktywności przeciwdrgawkowej.

Związki **46-51** otrzymano w reakcji cyklokondensacji równomolowych ilości bezwodnika kwasu cykloheksano-1,2-dikarboksylowego z odpowiednio podstawioną fenylohydrazyną, ogrzewając mieszaninę reakcyjną w temperaturze około 180°C przez godzinę. W reakcji użyto następujące aminy: fenylohydrazynę (zw. **46**), 4-metylofenylohydrazynę (zw. **47**), 2-chloro-fenylohydrazynę (zw. **48**), 3-chloro-fenylohydrazynę (zw. **49**), 4-chloro-fenylohydrazynę (zw. **50**) oraz 2,4-dichloro-fenylohydrazynę (zw. **51**). Produkty końcowe wyodrębniono po krystalizacji z izopropanolu, uzyskując je z wydajnością w granicach 69-74%. Syntezę i struktury otrzymanych związków przedstawiono na Schemacie 5.



Zw.	46	47	48	49	50	51
R	H	4-CH ₃	2-Cl	3-Cl	4-Cl	2,4-Cl

Schemat 5. Synteza oraz struktury związków **46-51**

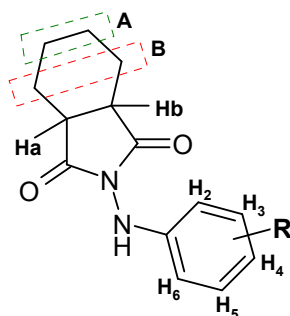
3.3.1. Dane spektralne związków 46-51

3.3.1.1. Analiza widm MS

Dla związku **50** wykonano widmo ESI-MS, w którym stwierdzono obecność jonu molekularnego $[M+H]^+$ 278 oraz pik izotopowy $[M+2]^+$ $m/z = 280$ związany z występowaniem w strukturze atomu chloru.

3.3.1.2. Analiza widm 1H NMR

W widmach związków **46-51** sygnały alifatycznych protonów pierścienia cykloheksanu, oznaczonych jako **A** i **B**, obserwowano w zakresie δ 1,47-1,58 ppm (**A**) i δ 1,81-1,98 ppm (**B**). Protony H_a i H_b związane z trzeciorzędowym atomem węgla występują jako multiplety w zakresie δ 2,95-3,06 ppm. Atomy wodoru wiązania iminowego (-NH-) związków **46**, **47**, **49** i **50** tworzą szerokie singlety, które rejestrowano w zakresie δ 6,00-6,09 ppm. W przypadku *ortho*-chloro podstawionych pochodnych **48** i **51**, w wyniku nałożenia się ich przesunięć chemicznych z sygnałami aromatycznych protonów H₆, sygnały -NH- obserwowano jako multiplety w zakresie δ 6,49-6,58 ppm.



Sygnały protonów aromatycznych niepodstawionej pochodnej **46** występowały jako trzy multiplety w zakresach δ 6,76-6,80 ppm - H_2 i H_6 , δ 6,94-7,00 ppm - H_4 oraz δ 7,21-7,27 ppm - H_3 i H_5 . Analizując widma *N*-(2-chlorofeniloamino)-heksahydroizoindo-1,3-dionu (zw. **48**) oraz jego 2,4-dichloro-podstawionego analogu (zw. **51**), w zakresie δ 6,49-6,58 ppm obserwowano multiplety protonów H_6 . Atomom wodoru H_5 przypisano multiplet w zakresie δ 7,10-7,26 (zw. **48**) lub podwójny dublet przy δ 7,11 ppm, w przypadku pochodnej **51**. Protony H_3 rejestrowano jako podwójny dublet przy δ 7,32 ppm (zw. **48**) lub jako dublet przy δ 7,34 ppm (zw. **51**). Triplet dubletów przy δ 6,90 ppm występujący w widmie związku **48** odpowiada protonowi H_4 . Analizując dane ^1H NMR 3-chloro pochodnej **49** stwierdzono obecność jednoprotonowego podwójnego dubletu dubletów przy δ 6,65 ppm, który przypisano protonowi H_6 . Sygnał protonu H_2 rejestrowano jako triplet przy δ 6,73 ppm. Atom wodoru H_4 występował jako podwójny dublet dubletów przy δ 6,95 ppm, podczas gdy proton H_5 tworzy triplet przy przesunięciu δ 7,17 ppm. W widmach *para*-metylo oraz *para*-chloro pochodnych **47** oraz **50** protony aromatyczne obserwowano jako dwa multiplety w zakresach δ 6,70-6,75 ppm (H_2 , H_6) oraz δ 7,03-7,22 ppm (H_3 , H_5).

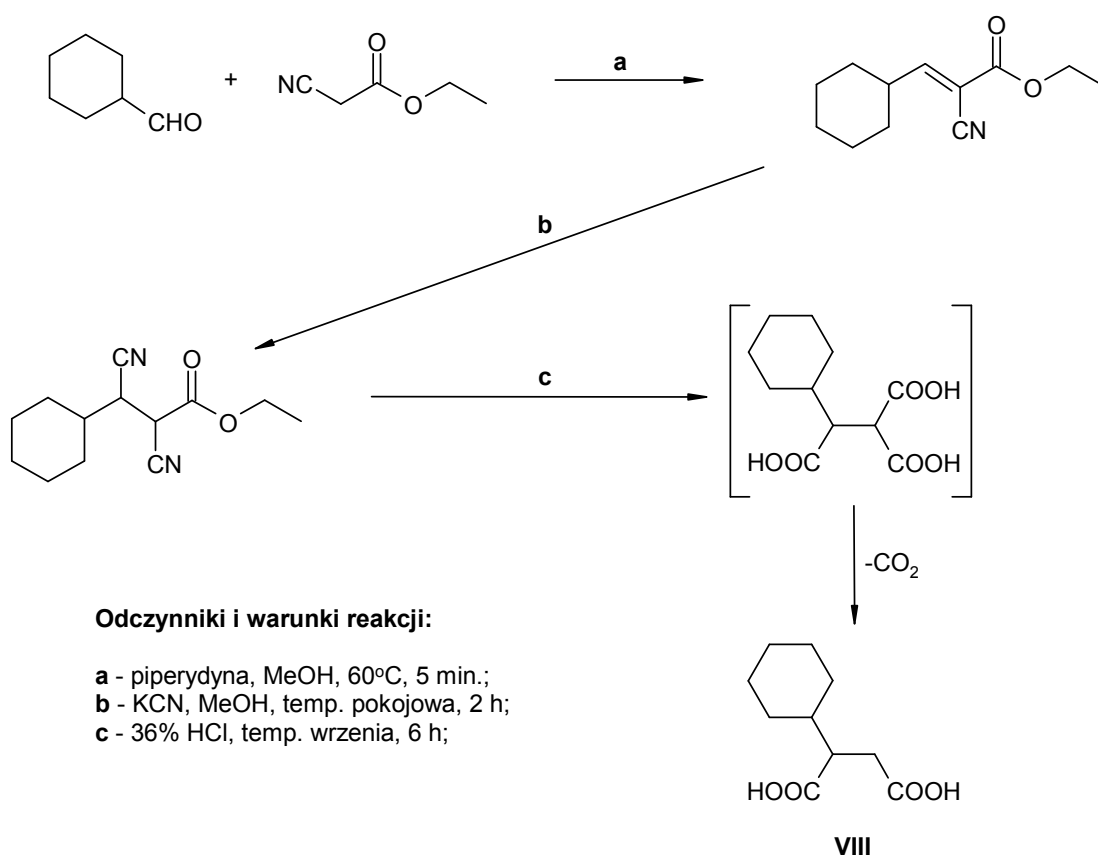
3.3.1.3. Analiza widm IR

W widmach IR wybranych związków **46** i **49** występowały pasma absorpcji charakterystyczne dla pochodnych sukcydimidu. Pasma związane z drganiami rozciągającymi grup karbonylowych obserwowano odpowiednio przy 1721 cm^{-1} (zw. **46**) oraz 1720 cm^{-1} (zw. **49**). Obecność podstawnika fenylowego potwierdzają pasma w obszarze $1482 - 1605\text{ cm}^{-1}$, wynikające z drgań rozciągających wiązań węgiel-węgiel w układach aromatycznych. Drgania rozciągające alifatycznych wiązań C-H obserwowano w zakresie $2955 - 2938\text{ cm}^{-1}$, podczas gdy te same drgania w pierścieniach aromatycznych występowały przy 3332 cm^{-1} (zw. **46**) lub 3321 cm^{-1} (zw. **49**).

3.4. Pochodne *N*-fenyloamino-3-cykloheksylo-pirolidyno-2,5-dionu (52-54)

W oparciu o wyniki badań farmakologicznych związków serii azaspiranów, istotnym wydawało się zbadanie roli układu spiranowego dla aktywności przeciwdrgawkowej tego typu połączeń. W tym celu otrzymano serię analogów, w których w miejsce układów spiranowych wprowadzono podstawnik cykloheksylový o dużej swobodzie rotacyjnej.

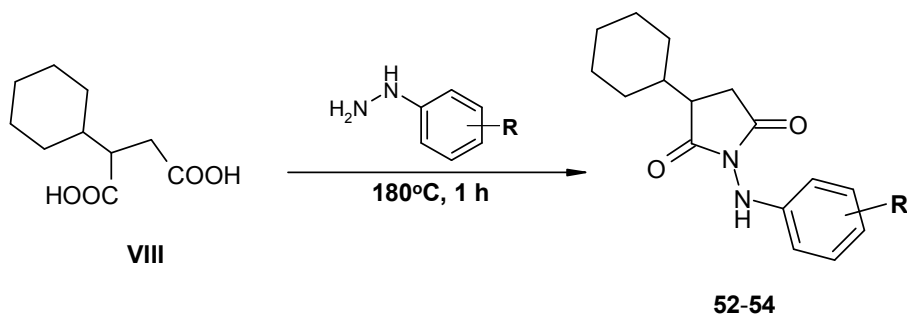
W pierwszym etapie przeprowadzono syntezę wyjściowego kwasu 2-cykloheksylo-bursztynowego (**VIII**), którą wykonano w oparciu o metodę opracowaną przez Miller'a i Long'a (**Schemat 6**).^{150, 151}



Schemat 6. Synteza kwasu 2-cykloheksylo-bursztynowego (**VIII**)

Metoda ta polega na kondensacji cykloheksanokarboksyaldehydu z cyjanooctanem etylu w obecności piperidyny jako katalizatora. Powstały ester etylowy kwasu 2-cyjano-3-cykloheksylo-akrylowego, w reakcji addycji z cyjankiem potasu tworzy ester etylowy kwasu 2,3-dicyjano-3-cykloheksylo-propanowego, z którego w wyniku wielogodzinnej hydrolizy stężonym kwasem solnym otrzymano kwas 2-cykloheksylo-bursztynowy. Produkt uzyskano z wydajnością 69%.

Związki **52-54** zsyntetyzowano stapiając równomolowe ilości kwasu 2-cykloheksylobursztynowego (**VIII**) z pochodnymi fenylohydrazyny w temperaturze około 180°C przez godzinę. Jako amin użyto fenylohydrazynę (zw. **52**), 2-chloro-fenylohydrazynę (zw. **53**) i 2,4-dichloro-fenylohydrazynę (zw. **54**) (**Schemat 7**).



Zw.	52	53	54
R	H	2-Cl	2,4-Cl

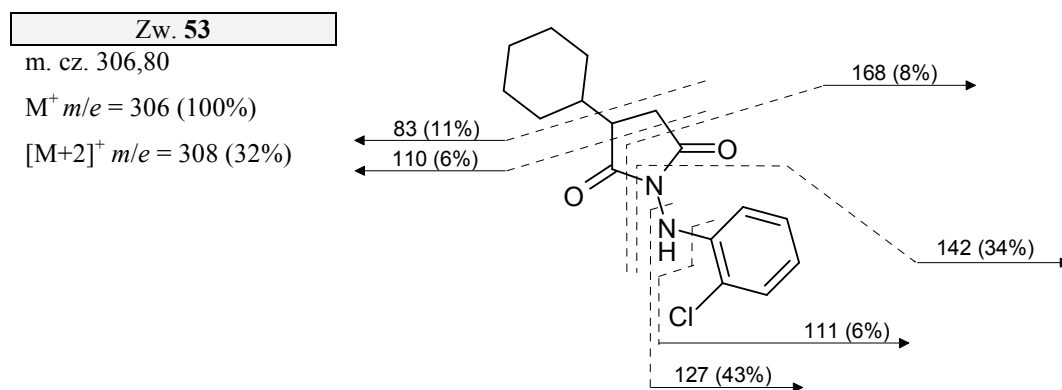
Schemat 7. Synteza oraz struktury związków **52-54**

Produkty końcowe krystalizowano z izopropanolu, a następnie oczyszczano przy użyciu chromatografii kolumnowej, otrzymując je z wydajnością 54 - 65 %.

3.4.1. Dane spektralne związków 52-54

3.4.1.1. Analiza widm MS

W widmie EI-MS związku **53** stwierdzono obecność jonu molekularnego M^+ $m/e = 306$ (100%), będącego jego pikiem głównym (**Ryc. 39**).

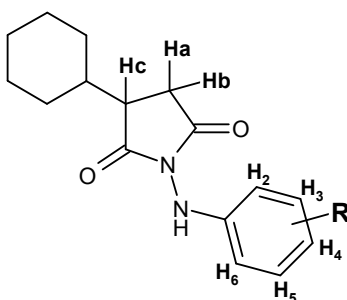


Ryc. 39. Fragmentacja zw. **53**

Jon fragmentacyjny $m/e = 110$ (6%) powstał w wyniku rozpadu pierścienia pirolidyno-2,5-dionu. Obecność podstawnika cykloheksylowego potwierdza jon $m/e = 83$ o intensywności 11%. Dalsza fragmentacja układu imidowego przebiegała z utworzeniem jonów $m/e = 168$ (8%) oraz $m/e = 142$ (34%). Rozerwanie wiązania iminowego (N-NH) potwierdza obecność jonu $m/e = 127$ (43%) odpowiadającego fragmentowi 2-chlorofenylaminowemu. Jon $m/e = 111$ (6%) przypisano ugrupowaniu 2-chlorofenylowemu. Obecność niejednorodnego izotopowo atomu chloru powoduje występowanie pików izotopowych, z których najintensywniejszy to $[M+2]^+$ $m/e = 308$ (32%) o względnej intensywności wynoszącej 0,32 w odniesieniu do jonu molekularnego.

3.4.1.2. Analiza widm ^1H NMR

W widmach ^1H NMR związków **52-54** w zakresie δ 1,03-2,17 ppm obserwowano multiplety protonów alifatycznych pierścieni cykloheksanu. Sygnały protonów H_a , H_b oraz H_c układu pirolidyno-2,5-dionu obserwowano jako multiplety w zakresie δ 2,60-2,94 ppm.



Protony wiązania iminowego (-NH-) tworzą charakterystyczne szerokie singlety, występujące w zakresie δ 6,10-6,57 ppm. Sygnały protonów aromatycznych były dobrze rozdzielone, a ich liczba i przesunięcia chemiczne uzależnione były od obecności i położenia podstawników w pierścieniu fenylowym. W przypadku niepodstawionej pochodnej **52** obserwowano je jako multiplety w zakresach δ 6,75-6,79 ppm (H_2 , H_6), δ 7,21-7,26 ppm (H_3 , H_5) lub triplet przy δ 6,98 ppm (H_4). W widmach zw. **53** i **54** widoczne są jednoprotonowe sygnały atomów wodoru H_6 , występujące jako podwójny dublet przy δ 6,53 ppm (zw. **53**), bądź dublet przy δ 6,46 ppm (zw. **54**). Protony H_5 obserwowano jako multiplet w zakresie δ 7,10-7,15 (zw. **53**) lub podwójny dublet przy δ 7,12 ppm (zw. **54**). Sygnały atomu wodoru H_3 występowały jako podwójny dublet przy δ 7,32 ppm (zw. **53**) lub dublet przy δ 7,34 ppm (zw. **54**). W widmie zw. **53** widoczny jest jednoprotonowy multiplet w zakresie δ 6,87-6,92 ppm, który przypisano protonowi H_4 .

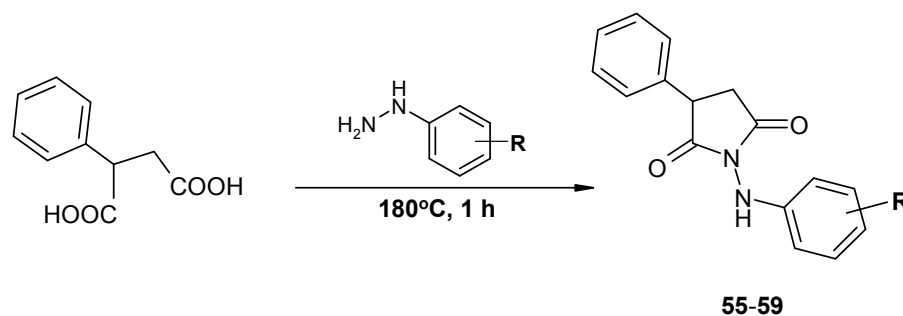
3.4.1.3. Analiza widm IR

W widmach IR wybranych związków **53** i **54** występują pasma absorpcji charakterystycznych dla tego typu połączeń. Przy liczbie falowej 1716 cm^{-1} (zw. **54**) oraz 1720 cm^{-1} (zw. **53**) obserwowano intensywne pasma związane z drganiami rozciągającymi grup karbonylowych (C=O). Obecność podstawnika fenylowego potwierdza silne pasmo w obszarze $1445 - 1595\text{ cm}^{-1}$, wynikające z drgań rozciągających wiązania węgiel-węgiel w układach aromatycznych (C=C). Drgania rozciągające alifatycznych wiązań C-H stwierdzono w zakresie $2851\text{--}2927\text{ cm}^{-1}$, natomiast aromatycznych przy 3322 cm^{-1} (zw. **53**) lub 3329 cm^{-1} (zw. **54**).

3.5. Pochodne *N*-fenyloamino-3-fenylo-pirolidyno-2,5-dionu (**55-59**)

Dotychczasowe badania nad poszukiwaniem nowych związków o potencjalnym działaniu przeciwdrgawkowym w grupie 1,3-podstawionego pirolidyno-2,5-dionu wykazały, że obecność obszaru aromatycznego w położeniu-3 pierścienia imidowego istotnie zwiększa aktywność tego typu pochodnych.¹³⁶⁻¹³⁸ Dlatego też, wydawało się zasadne otrzymanie analogów opisanych powyżej połączeń, w których w położeniu-3 sukcyimidu wprowadzono podstawnik fenylowy (zw. **55-59**).

Związki **55-59** otrzymano cyklizując równomolowe ilości kwasu 2-fenylo-bursztynowego z pochodnymi fenylhydrazyny w temperaturze około 180°C przez godzinę. W reakcji użyto następujące aminy: fenylhydrazynę (zw. **55**), 2-chloro-fenylhydrazynę (zw. **56**), 3-chloro-fenylhydrazynę (zw. **57**), 4-chloro-fenylhydrazynę (zw. **58**) oraz 2,4-dichloro-fenylhydrazynę (zw. **59**) (Schemat 9).



Zw.	55	56	57	58	59
R	H	2-Cl	3-Cl	4-Cl	2,4-Cl

Schemat 9. Synteza oraz struktury związków **55-59**

Produkty końcowe otrzymano z wydajnością 62 - 72%.

3.5.1. Dane spektralne związków 55-59

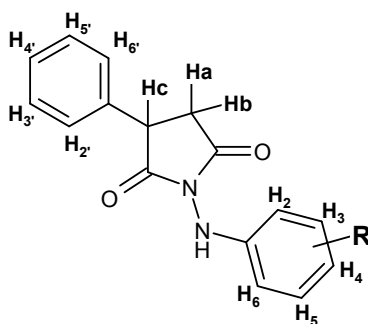
3.5.1.1. Analiza widm MS

Strukturę wybranego związku **59** potwierdzono w oparciu o widmo masowe wykonane techniką ESI-MS, w którym stwierdzono obecność jonu molekularnego $[M+H]^+$ 334 odpowiadającego jego masie cząsteczkowej. W widmie obserwowano również pik izotopowy $[M+2]^+$ $m/z = 336$, wynikający z występowania w cząsteczce atomu chloru.

3.5.1.2. Analiza widm 1H NMR

W widmach 1H NMR związków **55-59**, sygnały protonów H_a , H_b i H_c układu pirolidyno-2,5-dionu rejestrowano w każdym przypadku jako podwójne dublety w zakresach δ 2,97-3,01 ppm (H_a), δ 3,33-3,37 ppm (H_b) oraz δ 4,14-4,18 ppm (H_c).

Protony wiązania iminowego ($-NH-$) występowały jako charakterystyczne szerokie singlety, w zakresie δ 6,18-6,67 ppm. Ze względu na obecność dwóch obszarów aromatycznych i nałożenie się przesunięć chemicznych protonów podstawników fenylowych, ich sygnały były stosunkowo słabo rozdzielone. W przypadku niepodstawionej pochodnej **55** protony te tworzyły trzy multiplety w zakresach δ 6,81-6,98 ppm (H_2 i H_6), δ 7,00-7,03 ppm (H_4) oraz δ 7,23-7,43 ppm, które przypisano protonom H_3 i H_5 oraz atomom wodoru podstawnika fenylowego w położeniu-3 sukcyminidu ($H_{2'}$ - $H_{6'}$).



W widmie analogu 2-chloro (zw. **56**) protony aromatyczne rejestrowano jako podwójny dublet przy δ 6,60 ppm (H_6), triplet dubletów przy δ 6,92 ppm (H_4) oraz multiplet δ 7,11-7,18 ppm (H_5). W zakresie δ 7,24-7,45 ppm obserwowano multiplet sześciu protonów, który przypisano protonowi H_3 oraz atomom wodoru podstawnika fenylowego. W przypadku *meta*-chloro pochodnej **57**, protony H_2 , H_4 oraz H_6 rejestrowano jako multiplet w zakresie δ 6,67-6,98 ppm. Atomowi wodoru H_5 przypisano triplet przy δ 7,17 ppm. Multiplet w zakresie δ

7,26-7,44 ppm odpowiada pięciu protonom ugrupowania fenyłowego (H_2 - H_6) w pozycji-3 sukcyimidu. W widmie izomeru 4-chloro (zw. **58**), stwierdzono obecność multipletu w zakresie δ 6,74-6,79 ppm, który przypisano protonom H_2 i H_6 , natomiast pozostałe atomy wodoru obserwowano jako multiplet w zakresie δ 7,19-7,44 ppm. W przypadku 2,4-dichloro pochodnej **59**, protonowi H_6 przypisano dublet przy δ 6,54 ppm podczas gdy H_5 rejestrowano jako multiplet w zakresie δ 7,10-7,14 ppm. Protony aromatyczne H_3 oraz H_2 - H_6 obserwowano jako multiplet w zakresie δ 7,25-7,45 ppm.

Szczegółowe dane spektralne otrzymanych połączeń opisano w publikacjach 1, 3 i 4, zamieszczonych w *Aneksie*. W przypadku niepublikowanych połączeń **5**, **6**, **13**, **14** oraz **55-59** informacje przedstawiono w *Części doświadczalnej*.

4. Badania farmakologiczne

4.1. Badania farmakologiczne *in vivo*

Aktywność przeciwdrgawkowa oceniana jest rutynowo w zwierzęcych modelach drgawek padaczkowych.¹⁵²⁻¹⁵⁴ Pomimo pewnych niedoskonałości modele te często porównuje się z określonymi typami napadów padaczkowych u człowieka. Do najczęściej stosowanych testów, określanych mianem „złotego standardu” w poszukiwaniu nowych leków przeciwpadaczkowych należą: test maksymalnego wstrząsu elektrycznego (MES), który odpowiada ludzkim napadom toniczno-klonicznym oraz test drgawek chemicznych wywoływanych podskórnym podaniem kardiazolu (*scPTZ*), będący modelem napadów mioklonicznych i nieświadomości (*absence*).¹⁵⁵ Warty podkreślenia jest fakt, że opisane testy pozwalają na szybkie wyselekcjonowanie substancji będących potencjalnymi kandydatami na nowe leki przeciwpadaczkowe.

W ostatnim okresie coraz większe znaczenie przywiązuje się do modelu drgawek psychomotorycznych - 6 Hz oraz rozniecanych (*kindling*). Test 6-Hz, będący alternatywnym testem wstrząsu elektrycznego, odpowiada napadom częściowym, podczas gdy test drgawek rozniecanych (*kindling*), polega na wielokrotnym stosowaniu bodźców podprogowych (głównie elektrycznych), w wyniku czego dochodzi do stopniowych zmian w pobudliwości mózgu, podobnych jak obserwowane w przebiegu padaczki u człowieka. W zależności od zastosowanych parametrów stanowi on model napadów złożonych, bądź uogólnionych drgawek motorycznych.^{156, 157} Stwierdzono, że związki działające ochronnie w tego typu badaniach, mogą być skuteczne w opornych na terapię napadach padaczkowych i zarazem charakteryzować się nowym, często nieznanym jeszcze mechanizmem działania.¹⁵⁸ Przykładem tego typu związku jest lewetiracetam (*Keppra*[®]), który był nieaktywny w testach maksymalnego wstrząsu elektrycznego (MES) i podskórnego podania kardiazolu (*scPTZ*), natomiast zapewniał wysoką ochronę w drgawkach rozniecanych (*kindling*) oraz w teście 6-Hz.^{44, 159}

Mimo znacznego postępu w dziedzinie neurologii i biologii molekularnej, jaki dokonał się w ostatnich kilkudziesięciu latach, wszystkie nowe leki przeciwpadaczkowe zostały wprowadzone do leczenia w oparciu o aktywność przeciwdrgawkową stwierdzoną w modelach zwierzęcych. W przypadku tej grupy leków znacznie mniejsze znaczenie przypisuje się racjonalnemu projektowaniu struktur w oparciu o cele molekularne zaangażowane w patomechanizm napadów padaczkowych.¹⁶⁰

Do wstępnych badań farmakologicznych na aktywność przeciwdrgawkową przekazano wszystkie otrzymane połączenia. Badania wykonano w ramach amerykańskiego programu poszukiwania nowych leków przeciwpadaczkowych Antiepileptic Drug Development (ADD), realizowanego w Narodowym Instytucie Zdrowia w Bethesda (Epilepsy Branch, National Institute of Neurological Disorders and Stroke, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).¹⁶¹

Wstępny *screening* obejmuje dwa podstawowe testy *in vivo*: test maksymalnego wstrząsu elektrycznego (MES) oraz test drgawek wywołanych podskórnym podaniem kardiazolu (*scPTZ*). Równocześnie wyznaczana jest neurotoksyczność (NT) w teście obracającego się pręta (*rotarod*). Krótką charakterystykę testów fazy I na myszach oraz fazy VIa na szczurach przedstawiono poniżej:

- MES - test drgawek wywołanych prądem elektrycznym.

Stymulację prądem przeprowadza się przy użyciu elektrod rogówkowych impulsami elektrycznymi o czasie trwania 0,2 s i natężeniu odpowiednio 50 mA dla myszy oraz 150 mA w przypadku szczurów. Drgawki u myszy wywoływane są po 30 minutach i po 4 godzinach po dootrzewnowym podaniu badanej substancji. Natomiast szczury testowane są w pięciu przedziałach czasowych - 15 min., 0,5 h, 1 h, 2 h i 4 h.

- *scPTZ* - test drgawek wywołanych podskórnym podaniem kardiazolu.

Kardiazol podawany jest podskórnym w dawce wywołującej drgawki kloniczne, u co najmniej 97% badanych zwierząt i czasie trwania nie krótszym niż 5 s. Dawka ta wynosi 85 mg/kg dla myszy oraz 70 mg/kg dla szczurów. Kardiazol podawany jest podskórnym w czasach analogicznych jak w teście MES.

- NT - neurotoksyczność wyznaczana jest w teście obracającego się pręta (*rotarod*). Test ten polega na ocenie zdolności zwierząt do utrzymania się na obracającym pręcie w czasie 1 min.

Testy fazy I, jako kwalifikacyjne, wykonywane są na małych grupach zwierząt (1-4). Związki podawane są dootrzewnowo myszom w zawiesinie 0,5% metylocelulozy w dawkach 30, 100, 300 mg/kg. Wybrane połączenia charakteryzujące się aktywnością, w kolejnym etapie, badane są na szczurach (faza VIa), po podaniu doustnym w dawkach 30 mg/kg (MES), bądź 50 mg/kg (scPTZ). Wyniki tych badań są o tyle cenne, że pozwalają na ustalenie początku oraz całkowitego czasu działania, a także momentu w którym obserwowana jest szczytowa aktywność przeciwdrgawkowa (tzw. **TPE**, *Time to Peak Effect*). Z uwagi na odmienną charakterystykę i niewątpliwe zalety innych testów farmakologicznych, niektóre z połączeń będących przedmiotem niniejszej rozprawy zostały dodatkowo przebadane w teście drgawek psychomotorycznych 6-Hz, a także w teście drgawek pilokarpinowych - *Pilocarpine Induced Status Prevention* (PISP), który jest najczęściej stosowanym zwierzęcym modelem stanu padaczkowego (*status epilepticus*).

W testach fazy II określa się ilościowo działanie przeciwdrgawkowe poprzez wyznaczenie farmakologicznych parametrów ED₅₀ (dawka efektywna u 50% badanych zwierząt), TD₅₀ (dawka toksyczna u 50% badanych zwierząt) oraz indeksu ochronnego (PI, *Protective Index*), który określa stosunek między dawką efektywną a dawką wywołującą objawy toksyczne. Badania ilościowe przeprowadza się w czasie szczytowego działania przeciwdrgawkowego (TPE).

Wyniki badań farmakologicznych otrzymanych związków opisano w poszczególnych podrozdziałach. Aktywność przeciwdrgawkową w testach fazy I, przedstawiono podając najniższą dawkę badanej substancji, przy której obserwowano działanie ochronne oraz stosując tzw. klasyfikację ASP (*Anticonvulsant Screening Project*), według której, związek zaliczony do **klasy 1** hamuje drgawki w dawce 100 mg/kg lub mniejszej, do **klasy 2** w dawce 300 mg/kg, natomiast połączenia nieaktywne kwalifikowane są do **klasy 3**. Związki aktywne przeciwdrgawkowo, które powodują wystąpienie objawów neurotoksycznych w dawce 30 mg/kg zaliczane są do **klasy 4**, która obejmuje także związki nieaktywne lecz toksyczne. Działanie neurotoksyczne określa najmniejsza dawka, przy której obserwowano zaburzenia koordynacji ruchowej badanych zwierząt w teście obracającego się pręta (*rotarod*).

W testach fazy VIa na szczurach, a także drgawkach psychomotorycznych (6-Hz) i pilokarpinowych, aktywność przeciwdrgawkową wyrażono jako liczbę zwierząt, u których obserwowano działanie ochronne.

Spośród wszystkich otrzymanych połączeń 22 pochodne zostały zakwalifikowane do 1 klasy. Pozostałe aktywne związki zaliczono do klasy 2 ASP. Wśród badanych połączeń 11 związków było pozbawionych aktywności przeciwdrgawkowej w obu stosowanych testach.

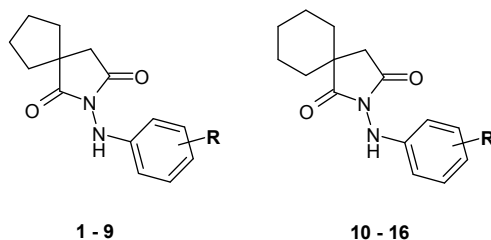
4.1.1. Pochodne *N*-fenyloamino-2-azaspiro[4.4]nonano- i [4.5]dekano-1,3-dionu

Na podstawie wyników, które przedstawiono w **Tabeli 1**, można stwierdzić, że większość z otrzymanych azaspiranów charakteryzuje się aktywnością, hamując drgawki wywołane prądem elektrycznym lub/i podskórnym podaniem kardiazolu.

W badanej serii trzy związki zostały zakwalifikowane do klasy 1 ASP ponieważ hamowały drgawki w dawce 100 mg/kg (zw. **7**, **14** i **15**). Pozostałe pochodne były aktywne w dawce 300 mg/kg (zw. **2-6**, **8** i **10**) lub nie wykazały aktywności w stosowanych testach (zw. **1**, **9**, **11-13**). Związek **16**, mimo działania ochronnego w drgawkach elektrycznych w dawce 100 mg/kg, wywoływał objawy neurotoksyczne po podaniu dawki 30 mg/kg i zgodnie z klasyfikacją ASP został zaliczony do klasy 4.

Wśród badanych połączeń najaktywniejsze okazały się związki z silnie elektroujemnymi atomami bromu lub chloru w położeniu-4 lub dwoma atomami chloru w pozycji-2,4 podstawnika fenyłowego. Połączenia te hamowały przede wszystkim drgawki wywołane prądem elektrycznym. Działanie to obserwowano w dawkach 100 mg/kg w czasie 0,5 h (zw. **7**), 2 h (zw. **6** i **8**) lub 4 h (zw. **14**, **15** i **16**). Związki **6**, **7** i **8** były również aktywne w tym samym modelu w dawkach wynoszących 300 mg/kg w czasie 4 h. Ponadto, *N*-(4-bromofenylo)-2-azaspiro[4.4]nonano-1,3-dion (zw. **8**) i *N*-(2,4-dichlorofenylo)-2-azaspiro[4.5]dekano-1,3-dion (zw. **15**) hamowały drgawki kardiazolowe (*scPTZ*) w dawce 300 mg/kg w czasach wynoszących odpowiednio 0,5 h i 4 h. Wprowadzenie atomu chloru w położenie *orto* lub *meta* pierścienia aromatycznego lub zastąpienie go grupą metylową powodowało obniżenie lub całkowitą utratę aktywności. Pochodne **4** i **10** były aktywne w obu zastosowanych testach w dawce 300 mg/kg w czasie 0,5 h, podczas gdy związki **2** i **5** hamowały jedynie drgawki elektryczne, a zw. **3** był aktywny tylko w teście *scPTZ*.

Tabela 1. Aktywność przeciwdrgawkowa *N*-fenyloaminowych pochodnych 2-azaspiro[4.4]nona-
no- i [4.5]dekano-1,3-dionu (Testy fazy I)



Związek	R	MES ^a		scPTZ ^b		NT ^c		Klasa ASP ^d	<i>R</i> _{M0} ^e	log <i>k</i> _w ^f
		0,5 h	4 h	0,5 h	4 h	0,5 h	4 h			
1	2-CH ₃	-	-	-	-	-	-	3	1,470	1,917
2	3-CH ₃	300	-	-	-	300 ¹⁴	-	2	1,221	1,866
3	4-CH ₃	-	-	300	-	100	-	2	1,281	1,876
4	2-Cl	300	-	300	-	-	-	2	1,399	2,095
5	3-Cl	300	-	-	-	-	-	2	1,576	2,234
6*	4-Cl	-	300	-	-	300	-	2	1,631	2,250
7	2,4-Cl	100	300	-	-	300 ¹⁴	-	1	1,954	2,419
8*	4-Br	-	300	300	-	100	-	2	1,612	2,115
9	2-CH ₃	-	-	-	-	300	-	3	1,890	2,195
10	3-CH ₃	300	-	300	-	100	100	2	1,631	2,126
11	4-CH ₃	-	-	-	-	-	-	3	1,710	2,148
12	2-Cl	-	-	-	-	-	-	3	1,740	2,322
13	3-Cl	-	-	-	-	-	-	3	1,896	2,223
14	4-Cl	-	100	-	-	100	-	1	1,946	2,393
15	2,4-Cl	-	100	-	300	-	-	1	2,164	2,634
16	4-Br	-	100	-	-	30	100	4	1,915	2,337
Fenytoina^g		30	30	-	-	100	100			
Etosuksimid^g		-	-	100	300	-	-			

^{a)} Drgawki wywołane prądem elektrycznym;

^{b)} Drgawki wywołane podskórnym podaniem kardiazolu;

^{c)} Neurotoksyczność, test *rotarod*;

^{d)} Klasyfikacja ASP: 1 - związek aktywny w dawce 100 mg/kg lub mniejszej, 2 - substancja aktywna w dawce 300 mg/kg, 3 - związek nieaktywny, 4 - substancja aktywna lecz toksyczna w dawce 30 mg/kg;

^{e)} Znormalizowany chromatograficzny parametr lipofilowości (RP-TLC);

^{f)} Znormalizowany chromatograficzny parametr lipofilowości (RP-HPLC);

^{g)} Dane lit.¹⁶²

* Zw. **6** i **8**, aktywne w dawce 100 mg/kg (MES) w czasie 2 h;

Komentarz: ¹⁴ Zwierzęta były niezdolne do utrzymania się na obracającym przęcie.

W badaniach neurotoksyczności zw. **1**, **4**, **5** oraz **11-13**, nie zaburzały koordynacji ruchowej zwierząt, po podaniu maksymalnej dawki 300 mg/kg, przy czym pochodne **1** i **11**-

13 były pozbawiane aktywności. Pozostałe połączenia wywoływały objawy neurotoksyczne w dawce 30 mg/kg (zw. **16**), 100 mg/kg (zw. **3, 8, 10 i 14**) lub 300 mg/kg (zw. **2, 6, 7 oraz 9**).

Wybrane związki **4, 7 i 15** aktywne w testach fazy I, zostały przebadane pod kątem ich aktywności przeciwdrgawkowej po doustnym podaniu szczurom, w dawkach wynoszących odpowiednio 30 mg/kg dla testu maksymalnego wstrząsu elektrycznego (MES) oraz 50 mg/kg w przypadku drgawek wywołanych podskórnym podaniem kardiazolu (*scPTZ*). Otrzymane wyniki pozwalają na ustalenie początku aktywności przeciwdrgawkowej, a także szczytowego (tzw. TPE, *Time to Peak Effect*) oraz całkowitego czasu działania. W podobny sposób oceniana jest neurotoksyczność. Spośród badanych połączeń zw. **15** był nieaktywny w obu stosowanych testach. Dane dla zw. **4 i 7** przedstawiono w **Tabeli 2**.

Tabela 2. Aktywność przeciwdrgawkowa zw. **4 i 7** po doustnym podaniu szczurom

Test*	Związek	Przedział czasowy				
		0,25 h	0,5 h	1 h	2 h	4 h
MES ^a	4	1	1	0	1	0
MES	7	2	2	2	3	0
<i>scPTZ</i> ^b	7	2	1	0	0	1
MES	Fenytoina ^c	1	4	3	3	3
<i>scPTZ</i>	Etosuksimid ^d	0	2	1	1	0

* Aktywność przeciwdrgawkową określono jako liczbę zwierząt z czterech badanych, u których obserwowano działanie ochronne;

^{a)} Drgawki wywołane prądem elektrycznym;

^{b)} Drgawki wywołane podskórnym podaniem kardiazolu;

^{c)} Dane lit.⁷

^{d)} Dane lit.¹⁶²

Otrzymane wyniki wskazują na marginalną aktywność przeciwdrgawkową zw. **4**, który chronił jedynie 25% badanych zwierząt w czasie 0,25 h, 0,5 h oraz 2 h. Natomiast, znacznie wyższą aktywność obserwowano w przypadku zw. **7**, który w teście MES działał ochronnie u 75% zwierząt w czasie 2 h. Ponadto, pochodna ta chroniła 50% szczurów w przedziałach czasowych 0,25 h, 0,5 h i 1 h, a całkowity czas działania wynosił 2 godziny. Związek **7** był również aktywny w teście *scPTZ*, w którym hamował drgawki u 50% zwierząt w czasie 0,25 h oraz u 25% po 0,5 h i 4 h. Substancje te podane doustnie nie wywoływały objawów neurotoksycznych.

Biorąc pod uwagę wyniki przedstawionych powyżej testów *in vivo*, *N*-(2,4-dichlorofenyloamino)-2-azaspiro[4.4]nonano-1,3-dion (**7**) został zakwalifikowany do badań fazy II, w których wyznaczone zostały wartości dawki efektywnej ED₅₀ oraz toksycznej TD₅₀.

Parametry te określono w teście MES po doustnym podaniu szczurom w czasie szczytowego działania przeciwdrgawkowego (TPE) wynoszącego 2 h. Otrzymane wyniki wykazały, że wartość ED₅₀ w teście MES jest większa od 180 mg/kg, natomiast w teście scPTZ jest większa od 125 mg/kg. Dawka toksyczna TD₅₀ wynosiła powyżej 250 mg/kg.

4.1.2. Pochodne *N*-fenyloamino-3,3-dialkilo-pirolidyno-2,5-dionu

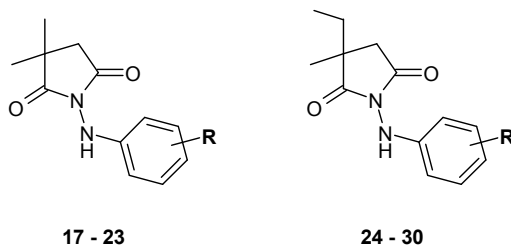
W badaniach farmakologicznych przeprowadzonych w grupie pochodnych 3,3-dialkilo-pirolidyno-2,5-dionu, zaobserwowano, że wprowadzenie podstawników alkilowych w położenie-3 układu imidowego w istotny sposób zwiększa aktywność w porównaniu do pochodnych azaspiranów (**Tabela 3 i 4**).

Z badań tych wynika, że z wyjątkiem trzech pochodnych **37**, **40** i **45** nieaktywnych w obu stosowanych testach, wszystkie pozostałe połączenia hamowały drgawki wywołane prądem elektrycznym (MES) lub/i podskórnym podaniem kardiazolu (scPTZ). Jedenaście związków z tej serii zaliczono do klasy 1 ASP co oznacza, że działały ochronnie w dawce 100 mg/kg, natomiast dziesięć hamowało drgawki w dawce 300 mg/kg (klasa 2 ASP). Związki, **19** i **29**, pomimo aktywności w dawce 100 mg/kg odpowiednio w testach MES (zw. **19**) lub scPTZ (zw. **29**), były jednocześnie neurotoksyczne w dawce 30 mg/kg i zgodnie z zasadami ASP zostały zaliczone do klasy 4.

W badanych seriach związków aktywność przeciwdrgawkowa zależna jest od długości grup alkilowych w pozycji-3 układu pirolidyno-2,5-dionu, a także od rodzaju i położenia podstawników w pierścieniu aromatycznym.

Generalnie najwyższą aktywnością charakteryzowały się 2,4-dichloro- oraz 4-chloro pochodne. Z wyjątkiem *N*-(2,4-dichlorofenyloamino)-3-metylo-3-propylo-pirolidyno-2,5-dionu (zw. **34**), aktywnego jedynie w teście scPTZ w dawce 100 mg/kg, wszystkie pozostałe związki hamowały drgawki w obu stosowanych modelach (MES, scPTZ). Pochodne **21**, **22**, **28**, **33** i **38** były aktywne w teście MES w dawce 100 mg/kg po 0,5 h (zw. **21**, **28**, **33**, **38**) lub 4 h (zw. **22**). Działanie ochronne w teście MES obserwowano również w dawce 300 mg/kg po 0,5 h (zw. **29**) lub/i 4 h (zw. **21**, **29**, **43** i **44**).

Tabela 3. Aktywność przeciwdrgawkowa *N*-fenyloaminowych pochodnych 3,3-dimetylo- i 3-etylo-3-metylo-pirolidyno-2,5-dionu (Testy fazy I)



Związek	R	MES ^a		scPTZ ^b		NT ^c		Klasa ASP ^d	log <i>k_w</i> ^e
		0,5 h	4 h	0,5 h	4 h	0,5 h	4 h		
17*	H	300	-	300	-	100	-	2	1,471
18	4-CH ₃	300	-	-	-	300	-	2	1,642
19[#]	2-Cl	100	-	300	-	30	-	4	1,876
20	3-Cl	100	-	-	-	300	-	1	2,071
21	4-Cl	100	300	100	300	300	300	1	2,080
22	2,4-Cl	-	100	100	-	100	-	1	2,179
23[†]	4-Br	300	300	-	-	300 ¹⁴	-	2	1,864
24	H	300	-	300	-	100	-	2	1,695
25	4-CH ₃	300	-	300	-	300	-	2	1,928
26	2-Cl	300	-	-	-	300	-	2	2,029
27	3-Cl	300	-	-	-	300	-	2	2,183
28	4-Cl	100	-	300	-	100	300	1	2,201
29[†]	2,4-Cl	300	300	100	300	30	300 ¹⁴	4	2,334
30^{††}	4-Br	300	-	300	100	300 ¹⁴	-	1	2,024
Fenytoina[†]		30	30	-	-	100	100		
Etosuksimid^f		-	-	100	300	-	-		

^{a)} Drgawki wywołane prądem elektrycznym;

^{b)} Drgawki wywołane podskórnym podaniem kardiazolu;

^{c)} Neurotoksyczność, test *rotarod*;

^{d)} Klasyfikacja ASP: 1- związek aktywny w dawce 100 mg/kg lub mniejszej, 2 - substancja aktywna w dawce 300 mg/kg, 3 - związek nieaktywny, 4 - substancja aktywna lecz toksyczna w dawce 30 mg/kg;

^{e)} Znormalizowany chromatograficzny parametr lipofilowości (RP-HPLC);

* Zw. **17**, aktywny w dawce 100 mg/kg w MES i scPTZ (0,25 h);

Zw. **19**, aktywny w dawce 100 mg/kg w MES (0,25 h);

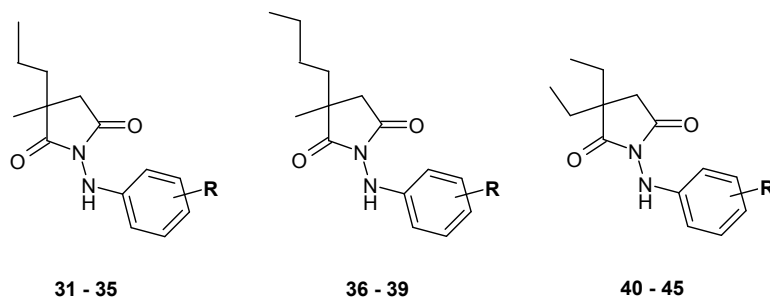
† Zw. **23** i **29** aktywny w dawce 100 mg/kg w MES (1 h);

†† Zw. **30**, aktywny w dawce 100 mg/kg w scPTZ (0,25 h);

^{f)} Dane lit.¹⁶²

Komentarz: ¹⁴ Zwierzęta były niezdolne do utrzymania się na obracającym pręcie.

Tabela 4. Aktywność przeciwdrgawkowa *N*-fenyloaminowych pochodnych 3-metylo-3-propylo-, 3- butylo-3- metylo- i 3,3-dimetylo-pirolidyno-2,5-dionu (Testy fazy I)



Związek	R	MES ^a		scPTZ ^b		NT ^c		Klasa ASP ^d	log <i>k_w</i> ^e
		0.5 h	4 h	0.5 h	4 h	0.5 h	4 h		
31	2-Cl	300	-	300	-	300	-	2	2,364
32*	3-Cl	300	-	300	-	100	-	2	2,401
33	4-Cl	100	-	300	-	100	300 ¹⁴	1	2,445
34	2,4-Cl	-	-	100	-	-	-	1	2,647
35	4-Br	100	300	300	-	300	300	1	2,403
36 [#]	2-Cl	300	-	300	-	300	-	2	2,566
37	4-Cl	-	-	-	-	300	-	3	2,638
38	2,4-Cl	100	-	100	-	100 ¹⁴	-	1	2,896
39 [#]	4-Br	-	-	300	-	300	-	2	2,539
40	H	-	-	-	-	300	-	3	1,826
41	4-CH ₃	300	-	-	-	100 ¹⁴	-	2	1,999
42	2-Cl	-	-	300	-	100	-	2	2,244
43 [†]	4-Cl	-	300	100	300	300	300	1	2,314
44 ^{††}	2,4-Cl	300	300	100	-	100	-	1	2,552
45	4-Br	-	-	-	-	-	-	3	2,221
Fenytolina ^f		30	30	-	-	100	100		
Etosuksimid ^f		-	-	100	300	-	-		

a), b), c), d), e), f) Jak w Tabeli 3;

* Zw. 32, aktywny w dawce 100 mg/kg w MES (0,25 h);

[#] Zw. 36 i 39, aktywne w dawce 100 mg/kg w scPTZ (0,25 h);

[†] Zw. 43, aktywny w dawce 100 mg/kg w MES (2 h);

^{††} Zw. 44, aktywny w dawce 100 mg/kg w MES (1 h);

Komentarz: ¹⁴ Zwierzęta były niezdolne do utrzymania się na obracającym pręcie.

Związki 29, 43 i 44 były także aktywne w tym samym teście w dawce 100 mg/kg po 1 h (zw. 29 i 44) lub 2 h (zw. 43). Dodatkowo, analiza otrzymanych danych wskazała, że pochodne 4-chloro (zw. 21, 43) i 2,4-dichloro (zw. 22, 29, 34, 38 i 44), charakteryzowały się

działaniem ochronnym w drgawkach wywołanych podskórnym podaniem kardiazolu (*scPTZ*). Związki **22**, **29**, **34**, **38**, **43** i **44** były aktywne w dawce 100 mg/kg po 0,5 h, a w przypadku pochodnych **21**, **29** oraz **43** działanie to obserwowano także w dawce 300 mg/kg po 4 h, co oznacza, że charakteryzują się one identyczną aktywnością przeciwdrgawkową jak etosuksimid, będący modelowym lekiem przeciwpadaczkowym, aktywnym w teście *scPTZ*. Pozostałe połączenia były aktywne w tym teście w dawce 300 mg/kg po 0,5 h (zw. **28** i **33**). Wprowadzenie atomu chloru w pozycję *orto* lub *meta*, zastąpienie go grupą metylową lub jej usunięcie w przypadku połączeń niepodstawionych, wpłynęło na obniżenie aktywności.

Spośród 2-chloro pochodnych, najaktywniejszy, okazał się zw. **19**, który hamował drgawki elektryczne w dawce 100 mg/kg po 0,5 h i 0,25 h. Dodatkowo, był aktywny w teście *scPTZ* w dawce 300 mg/kg po 0,5 h. Pozostałe związki z atomem chloru w pozycji-2 pierścienia fenyłowego, były aktywne w dawce 300 mg/kg po 0,5 h w obu zastosowanych testach (zw. **31** i **36**) lub w teście MES (zw. **26**), bądź *scPTZ* (zw. **42**). Pochodna **36** była również aktywna w drgawkach kardiazolowych w dawce 100 mg/kg po 0,25 h. Podobną aktywnością charakteryzowały się analogi *meta*-chloro. Wśród nich najaktywniejszy to *N*-(3-chloro-feniloamino)-3,3-dimetylo-pirolidyno-2,5-dion (zw. **20**), który hamował drgawki elektryczne w dawce 100 mg/kg (0,5 h). Pozostałe związki działały słabiej, chroniąc zwierzęta w dawce 300 mg/kg po 0,5 h w obu stosowanych testach (zw. **32**) lub jedynie w teście MES (zw. **27**). Ponadto, pochodna **32** była aktywna w teście MES w dawce 100 mg/kg po 0,25 h.

Zastąpienie atomu chloru w położeniu-4 pierścienia fenyłowego, większym i mniej elektroujemnym bromem pozwoliło otrzymać związki o zbliżonej aktywności biologicznej. Z wyjątkiem nieaktywnej pochodnej **45**, pozostałe połączenia były aktywne w drgawkach elektrycznych (zw. **23**), kardiazolowych (zw. **39**) lub obu stosowanych testach (zw. **30** i **35**). Wśród nich zw. **30** był aktywny w teście *scPTZ* w dawce 100 mg/kg po 0,25 h i 4 h oraz w dawce 300 mg/kg po 0,5 h, a także w teście MES w dawce 300 mg/kg po 0,5 h. Podobne wyniki obserwowano w przypadku zw. **35**, który hamował drgawki w dawce 100 mg/kg po 0,5 h oraz 300 mg/kg po 4 h (test MES), natomiast w modelu *scPTZ* był aktywny w dawce 300 mg/kg po 0,5 h. Związek **23** był aktywny jedynie w teście MES w dawkach 100 mg/kg (1 h) i 300 mg/kg po 0,5 h i 4 h. Natomiast pochodna **39** działała ochronnie w drgawkach kardiazolowych w dawce 100 mg/kg oraz 300 mg/kg po 0,25 h i 0,5 h.

Wprowadzenie w miejsce silnie elektroujemnych podstawników Cl i Br, elektrondonorowej grupy metylowej (zw. **18**, **25** i **41**) wpłynęło na osłabienie aktywności. Związki te

hamowały drgawki jedynie w dawce 300 mg/kg po 0,5 h (MES, zw. **18** i **41**) lub obu modelach drgawkowych (zw. **25**). Na uwagę zasługuje fakt, że podobną zależność między strukturą i działaniem obserwowano w seriach *N*-fenyloaminowych pochodnych 2-aza-spiro[4.4]nonano- i [4.5]dekano-1,3-dionu (zw. **1-16**).

Niepodstawione związki **17** i **24** zaliczono do klasy 2 ASP, co oznacza, że hamowały drgawki w dawce 300 mg/kg. Związki te były aktywne w obu stosowanych testach po 0,5 h. Ponadto, pochodna **17** działała ochronnie w teście MES i *sc*PTZ w dawce 100 mg/kg po 0,25 h.

W badaniach neurotoksyczności, w teście obracającego się pręta (*rotarod*), jedynie dwa związki **34** i **45** nie zaburzały koordynacji ruchowej zwierząt po podaniu maksymalnej dawki 300 mg/kg. Pozostałe połączenia wywoływały objawy neurotoksyczne w dawce 30 mg/kg (zw. **19** i **29**), 100 mg/kg (zw. **17**, **22**, **28**, **32**, **33**, **38**, **41**, **42** i **44**) lub 300 mg/kg (zw. **18**, **20**, **21**, **23**, **25-27**, **30**, **31**, **35-37**, **39**, **40** i **43**).

Przedstawione wyniki badań farmakologicznych wskazują, że badane związki charakteryzują się szybko występującą, lecz krótkotrwałą aktywnością przeciwdrgawkową.

Wybrane połączenia, **17**, **23**, **28**, **29** i **30** aktywne w testach na myszach, w dalszym etapie, były badane na szczurach w teście maksymalnego wstrząsu elektrycznego (MES), po podaniu doustnym dawki 30 mg/kg. Wyniki badań przedstawiono w **Tabeli 5**.

Tabela 5. Aktywność przeciwdrgawkowa zw. **17**, **23**, **28**, **29** i **30** po doustnym podaniu szczurom dawki 30 mg/kg (MES)

Test*	Związek	Przedział czasowy				
		0,25 h	0,5 h	1 h	2 h	4 h
MES	17	1	0	2	0	0
	23	0	1	1	2	2
	28	0	0	1	0	1
	29	0	1	0	1	0
	30	3	2	1	1	1
	Fenytoina^a	1	4	3	3	3

* Aktywność przeciwdrgawkową określono jako liczbę zwierząt z czterech badanych, u których obserwowano działanie ochronne;

^{a)} Dane lit.⁷

Otrzymane wyniki wskazują, że do najaktywniejszych należą związki **17**, **23** i **30**, które chroniły 50% badanych zwierząt po 0,5 h (zw. **30**), 1 h (zw. **17**) oraz 2 h i 4 h (zw. **23**). Ponadto, pochodna **30** hamowała drgawki u 75% szczurów po 0,25 h. Dodatkowo, związki **17**

i **23** chroniły 25% zwierząt po 0,25 h (zw. **17**), 0,5 h i 1 h (zw. **23**). Pozostałe połączenia **28** i **29** działały przeciwdrgawkowo u 25% szczurów po 0,5 h i 2 h (zw. **29**) lub 1 h i 4 h (zw. **28**). Jak wynika z **Tabeli 5**, badane związki charakteryzowały się niższą aktywnością w porównaniu do fenytoiny. Pochodne te działały stosunkowo krótko, a najdłuższe działanie obserwowano w przypadku zw. **23** (0,5 h - 4 h) oraz zw. **30**, który chronił zwierzęta we wszystkich przedziałach czasowych. Połączenia te stosowane w dawce 30 mg/kg nie zaburzały koordynacji ruchowej w teście *rotarod*.

Wybrane związki **34** i **39**, aktywne w drgawkach kardiazolowych u myszy, badano w tym samym teście po doustnym podaniu szczurom dawki 50 mg/kg. Otrzymane wyniki, w porównaniu do etosuksimidu, przedstawiono w **Tabeli 6**.

Tabela 6. Aktywność przeciwdrgawkowa zw. **34** i **39** po doustnym podaniu szczurom w dawce 50 mg/kg (scPTZ)

Test*	Związek	Przedział czasowy				
		0,25 h	0,5 h	1 h	2 h	4 h
	34	1	2 ²⁵	0	0	1
scPTZ	39	0	1	0	0	0
	Etosuksimid ^a	0	2	1	1	0

* Aktywność przeciwdrgawkową określono jako liczbę zwierząt z czterech badanych, u których obserwowano działanie ochronne;

^{a)} Dane lit.¹⁶²

Komentarz: ²⁵ drgawki miokloniczne.

Z badań tych wynika, że pochodna **34** chroniła 50% badanych zwierząt w czasie 0,5 h, co odpowiada aktywności obserwowanej w przypadku etosuksimidu. Niemniej jednak w tym samym czasie wywoływała drgawki miokloniczne. Ponadto, związek ten był aktywny u 25% badanych szczurów w przedziałach czasowych 0,25 h i 4 h. Wynika stąd, że działał on dłużej niż etosuksimid. Natomiast, pochodna **39** chroniła 25% zwierząt 0,5 h po podaniu. Połączenia **34** i **39** w dawce 50 mg/kg nie upośledzały koordynacji ruchowej szczurów w teście *rotarod*.

W kolejnym etapie, związki **36** i **39** były badane w teście drgawek elektrycznych - 6-Hz. Test 6-Hz został po raz pierwszy opisany przez Brown'a¹⁶³ jako model drgawek psychomotorycznych odpowiadających napadom częściowym u człowieka. Test ten przez dłuższy czas nie należał do standardowych badań, ponieważ fenytoina oraz jej pochodne były w nim nieaktywne. Natomiast badania ostatnich lat wykazały, że stanowi on ważne narzędzie farmakologiczne, które pozwala na wyselekcjonowanie połączeń skutecznych w leczeniu napadów padaczkowych opornych na działanie klasycznych leków.¹⁵⁸

Otrzymane wyniki badań w teście 6-Hz dla zw. **36** i **39** po dootrzewnowym podaniu myszom dawki 100 mg/kg wskazują, że pochodne te są aktywne po 0,5 h i chronią odpowiednio 50% (zw. **36**) lub 25% (zw. **39**) badanych zwierząt (**Tabela 7**).

Tabela 7. Aktywność przeciwdrgawkowa zw. **36** i **39** po dootrzewnowym podaniu myszom w dawce 100 mg/kg - Test 6-Hz

Test*	Związek	Przedział czasowy				
		0,25 h	0,5 h	1 h	2 h	4 h
6-Hz	36	0	2	0	0	0
	39	0	1	0	0	0

* Aktywność przeciwdrgawkową określono jako liczbę zwierząt z czterech badanych, u których obserwowano działanie ochronne.

Acetylocholina jest jednym z neuroprzekaźników pobudzających ośrodkowego układu nerwowego. Na podstawie szeregu obserwacji na szczurach i myszach stwierdzono, że podanie domózgowe lub systemowe agonistów receptorów muskarynowych m. in. pilokarpiny, powoduje drgawki z następczymi zmianami degeneracyjnymi neuronów mózgu. Ich lokalizacja i charakterystyka są zbliżone do tych, które zaobserwowano *post mortem* u osób, które przebyły stan padaczkowy.^{164, 165} Dlatego też, do panelu badań *screeningowych* Narodowego Instytutu Zdrowia, wprowadzono test drgawek pilokarpinowych (PISP, *Pilocarpine Induced Status Prevention*), który jest aktualnie najczęściej stosowanym zwierzęcym modelem *status epilepticus*.

Spośród wszystkich otrzymanych związków, *N*-(3-chlorofenylo)-amino-3,3-dimetylo-pirolidyno-2,5-dion (zw. **32**), został wyselekcjonowany do badań w opisanym powyżej teście PISP. Zdolność hamowania drgawek pilokarpinowych zw. **32** została oceniona na szczurach, po jego podaniu dootrzewnowym. Wyniki testu PISP wyrażone zostały jako „liczba szczurów chronionych” vs „liczba szczurów niechronionych”. W momencie podania pilokarpiny dochodzi do charakterystycznych zmian w zachowaniu zwierząt, które opisuje pięciostopniowa skala Racine’a:¹⁶⁶

- Stopień **1** - znieruchomienie, mrużenie oczu, miokloniczne skurcze mięśni pyska;
- Stopień **2** - przejawy ogniskowych drgawek klonicznych, np. uporczywe ruchy żucia, rytmiczne „kiwanie” głową (tzw. *head nodding*);
- Stopień **3** - jednostronne drgawki kloniczne przednich łap;
- Stopień **4** - wspięcia z towarzyszącymi często obustronnymi drgawkami klonicznymi przednich łap;

- Stopień 5 - wspięcia z utratą równowagi i uogólnione drgawki kloniczne.

Działanie przeciwdrgawkowe wyznaczane jest w tzw. czasie zero, tj. czasie pierwszego stadium drgawek stopnia 3, przedstawionej powyżej klasyfikacji. Otrzymane wyniki w teście drgawek pilokarpinowych dla pochodnej **32** przedstawiono w **Tabeli 8**.

Tabela 8. Aktywność przeciwdrgawkowa zw. **32** po dootrzewnowym podaniu szczurom w teście PISP

Związek	Dawka (mg/kg)	Czas [h] ^a	Liczba szczurów chronionych	Liczba szczurów niechronionych	Średnia zmiana ciężaru ± SEM (g) ^b	
					Szczury chronione	Szczury niechronione
32	65	0	7	8	15 ± 0,0	12,9 ± 2,2

^{a)} Pierwsze stadium drgawek stopnia 3;

^{b)} Średnia zmiana ciężaru ciała 24 po wystąpieniu drgawek stopnia 3.

Przedstawione wyniki wskazują, że badana substancja podana dootrzewnowo w dawce 65 mg/kg, chroniła 7 z 15 badanych szczurów. Równocześnie oceniono neurotoksyczność w teście *rotorod*. Zw. **32** zaburzał koordynację ruchową zwierząt jedynie w najwyższej stosowanej dawce 300 mg/kg.

Związek **17** aktywny w testach na myszach i szczurach został zakwalifikowany do testów fazy II, w celu ilościowego wyznaczenia dawki efektywnej ED₅₀, toksycznej TD₅₀ oraz indeksu ochronnego (PI). Wartość PI jest miarą bezpieczeństwa danego leku, im jest on wyższy tym wyższe bezpieczeństwo stosowania danej substancji leczniczej. ED₅₀ *N*-fenylo-amino-3,3-dimetylo-pirolidyno-2,5-dionu (zw. **17**) wyznaczono w teście MES, po doustnym podaniu szczurom w czasie najwyższej aktywności - 0,5 h. W tym samym czasie określono TD₅₀ oraz PI. Wyniki badań ilościowych zw. **26** i fenytoiny, które przedstawiono w **Tabeli 9**, wskazują, że zw. **17** był mniej aktywny, działał krócej, a także był bardziej toksyczny niż fenytoina.

Tabela 9. Wartości ED₅₀, TD₅₀ i PI dla zw. **26**

Związek	TPE (h) ^a	MES ED ₅₀ (mg/kg) ^b	NT TD ₅₀ (mg/kg) ^c	PI ^d
17	0,5	69,89 ± 1,64	500	7,15
Fenytoina ^e	2,0	23,2 ± 4,28	>500	>21,6

^{a)} Czas szczytowej aktywności farmakodynamicznej (TPE);

^{b)} ED₅₀ - Dawka efektywna u 50% badanych szczurów po podaniu doustnym (test MES);

^{c)} TD₅₀ - Dawka toksyczna u 50% badanych szczurów po podaniu doustnym;

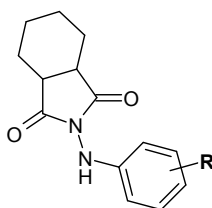
^{d)} PI - Indeks ochronny (*Protective Index*) - TD₅₀/ED₅₀;

^{e)} Dane lit.¹⁴¹

4.1.3. Pochodne *N*-fenyloamino-heksahydroizoindo-1,3-dionu

W kolejnym etapie badań otrzymano bicykliczne pochodne heksahydroizoindo-1,3-dionu, które można uznać za analogi odpowiednich 2-azaspiro[4.5]dekano-1,3-dionów. W związkach tych pierścień cykloheksanu oraz układ sukcyimidu posiadają dwa wspólne atomy węgla. Otrzymane wyniki badań farmakologicznych zebrano w **Tabeli 10**.

Tabela 10. Aktywność przeciwdrgawkowa *N*-fenyloaminowych pochodnych heksahydroizoindo-1,3-dionu (Testy fazy I)



46 - 51

Związek	R	MES ^a		scPTZ ^b		NT ^c		Klasa ASP ^d	log <i>k_w</i> ^e
		0,5 h	4 h	0,5 h	4 h	0,5 h	4 h		
46	H	300	-	300	-	-	-	2	1,937
47	4-CH ₃	-	-	-	-	300	-	3	2,028
48	2-Cl	-	-	-	-	-	-	3	2,162
49	3-Cl	-	-	300	-	300	-	2	2,173
50	4-Cl	-	-	100	-	-	-	1	2,224
51	2,4-Cl	-	100	-	-	300	300	1	2,425
Fenytoina^f		30	30	-	-	100	100		
Etosuksimid^f		-	-	100	300	-	-		

^{a)} Drgawki wywołane prądem elektrycznym;

^{b)} Drgawki wywołane podskórnym podaniem kardiazolu;

^{c)} Neurotoksyczność, test *rotarod*;

^{d)} Klasyfikacja ASP: 1 - związek aktywny w dawce 100 mg/kg lub mniejszej, 2 - substancja aktywna w dawce 300 mg/kg, 3 - związek nieaktywny, 4 - substancja aktywna lecz toksyczna w dawce 30 mg/kg;

^{e)} Znormalizowany chromatograficzny parametr lipofilowości (RP-HPLC).

^{f)} Dane lit.¹⁶²

W analizowanej grupie najaktywniejszy był związek **51** zawierający dwa atomy chloru w położeniu-2,4 układu aromatycznego. Hamował on drgawki wywołane prądem elektrycznym w dawce 100 mg/kg po czasie 4 h. Aktywność mono-chloro pochodnych **48**, **49** oraz **50** zależna była od położenia chlorowca w pierścieniu fenylowym. Izomery *para* (zw. **50**) i *meta* (zw. **49**), były aktywne w teście scPTZ w dawkach wynoszących odpowiednio 100 i 300 mg/kg, natomiast analog *orto* (zw. **48**), był pozbawiony aktywności.

Niepodstawione pochodna **46** chroniła zwierzęta w dawce 300 mg/kg w obu zastosowanych testach, natomiast jego analog z grupą metylową w położeniu-4 (zw. **47**), był nieaktywny.

Objawy neurotoksyczne obserwowano w dawce 300 mg/kg dla zw. **47**, **49** i **51**. Pozostałe pochodne nie upośledzały koordynacji ruchowej zwierząt.

Związek **46**, aktywny w testach MES i scPTZ na myszach, badano w tych samych modelach drgawek po doustnym podaniu szczurom (**Tabela 11**). Otrzymane wyniki wskazują, że pochodna **46** jest praktycznie nieaktywna, chroniąc jedynie 25% badanych zwierząt w teście MES w czasie 0,5 h oraz w teście scPTZ w czasie 0,25 h i 1 h. Związek ten w stosowanych dawkach nie upośledzał koordynacji ruchowej badanych zwierząt.

Tabela 11. Aktywność przeciwdrgawkowa zw. **46** po doustnym podaniu szczurom

Test*	Związek	Przedział czasowy				
		0,25 h	0,5 h	1 h	2 h	4 h
MES ^a	46	0	1	0	0	0
scPTZ ^b		1	0	0	0	1
MES	Fenytoina ^c	1	4	3	3	3
scPTZ	Etosuksimid ^d	0	2	1	1	0

* Aktywność przeciwdrgawkową określono jako liczbę zwierząt z czterech badanych, u których obserwowano działanie ochronne, bądź toksyczne;

^{a)} Drgawki wywołane prądem elektrycznym;

^{b)} Drgawki wywołane podskórnym podaniem kardiazolu;

^{c)} Dane lit.⁷

^{d)} Dane lit.¹⁶²

Spośród *N*-fenyloamino-heksahydroizoindo-1,3-dionów zw. **47** został zakwalifikowany do badań w teście drgawek pilokarpinowych PISP na szczurach (**Tabela 12**).

Tabela 12. Aktywność przeciwdrgawkowa zw. **47** po dootrzewnowym podaniu szczurom w teście PISP

Związek	Dawka (mg/kg)	Czas [h] ^a	Liczba szczurów chronionych	Liczba szczurów niechronionych	Średnia zmiana ciężaru ± SEM (g) ^b	
					Szczury chronione	Szczury niechronione
47	450	0	6	7	10,0 ± 1,2	12,0 ± 0,0

^{a)} Pierwsze stadium drgawek stopnie 3;

^{b)} Średnia zmiana ciężaru ciała 24 po wystąpieniu drgawek stopnia 3, SEM - standardowy błąd pomiaru.

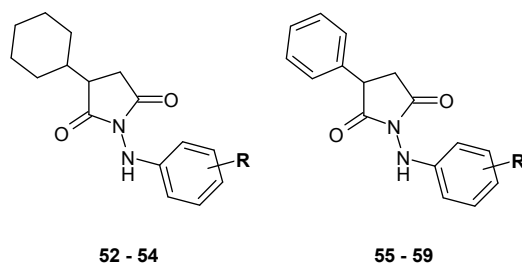
Pochodna ta charakteryzowała się aktywnością, chroniąc blisko 50% badanych zwierząt w dawce 450 mg/kg. Istotnym jest również fakt, że związek ten był nieaktywny w klasy-

cznych testach MES i scPTZ. Działanie neurotoksyczne obserwowano u 100% zwierząt w dawce 300 mg/kg po 0,25 h, 0,5 h oraz 1 h.

4.1.4. Pochodne *N*-fenyloamino- 3-cykloheksylo- i 3-fenylo-pirolidyno-2,5-dionu

Prowadząc dalsze badania otrzymano serie *N*-fenyloaminowych pochodnych 3-cykloheksylo-pirolidyno-2,5-dionu zw. **52** - **54** oraz pochodne posiadające w położeniu-3 sukcyminidu pierścień aromatyczny (zw. **55** - **59**). Modyfikacje tego typu miały na celu ocenę roli układu spiranowego dla aktywności biologicznej, natomiast z drugiej strony odpowiedzieć na pytanie czy zwiększenie aromatyczności cząsteczek, poprzez wprowadzenie podstawnika fenylowego w położenie-3 pierścienia imidowego spotęguje działanie przeciwdrgawkowe (**Tabela 13**).

Tabela 13. Aktywność przeciwdrgawkowa *N*-fenyloaminowych pochodnych 3-cykloheksylo-, 3-fenylo-pirolidyno-2,5-dionu (Testy fazy I)



Związek	R	MES ^a		scPTZ ^b		NT ^c		Klasa ASP ^d	log <i>k_w</i> ^e
		0,5 h	4 h	0,5 h	4 h	0,5 h	4 h		
52	H	-	-	-	-	-	-	3	2,406
53	2-Cl	-	-	-	-	-	-	3	2,536
54	2,4-Cl	-	-	-	-	-	-	3	2,896
55	H	-	-	-	-	-	-	3	2,228
56	2-Cl	-	-	-	-	-	-	3	2,520
57	3-Cl	-	-	-	-	-	-	3	2,538
58	4-Cl	-	-	-	-	-	-	3	2,581
59	2,4-Cl	-	-	-	-	-	-	3	2,749
Fenytoina ^f		30	30	-	-	100	100		
Etosuksimid ^f		-	-	100	300	-	-		

a), b), c), d), e), f) Jak w Tabeli 10.

Otrzymane wyniki wskazują, że związki **52 - 59**, niezależnie od rodzaju podstawienia w pierścieniu imidowym oraz podstawników w ugrupowaniu fenyloaminowym były nieaktywne. Związki **52 - 59** nie działały również neurotoksycznie po podaniu maksymalnej dawki, wynoszącej 300 mg/kg. Pomimo braku aktywności pochodnych **52 - 59**, uzyskane wyniki pozwoliły na systematyczną ocenę zależności struktura - aktywność przeciwdrgawkowa w analizowanych seriach połączeń. Na ich podstawie można stwierdzić, że wprowadzenie zarówno podstawnika fenyłowego jak i pierścienia cykloheksylowego w położenie-3 pirolidyno-2,5-dionu powoduje całkowitą utratę aktywności.

4.2. Badania farmakologiczne *in vitro**

Padaczka jest heterogennym zespołem chorobowym o złożonej patogenezie. Różnorodność celów molekularnych, nie zawsze w pełni sprecyzowanych, utrudnia ustalenie jednoznacznego mechanizmu działania stosowanych aktualnie leków przeciwpadaczkowych. Niemniej jednak, w przypadku wielu połączeń, można określić pewne dominujące właściwości farmakodynamiczne, którym przypisuje się decydującą rolę dla aktywności. Stąd działanie przeciwpadaczkowe leku może być wynikiem:¹⁶⁷

- Blokowania napięciowo-zależnych kanałów sodowych;
- Nasilenia ośrodkowych efektów hamujących układu GABA-ergicznego;
- Hamowania napięciowo-zależnych kanałów wapniowych;
- Zapobiegania uwalniania aminokwasów pobudzających (kwas glutaminowy i asparaginowy);
- Blokowania receptorów NMDA, dzięki czemu ograniczana jest pobudzająca neurotransmisja glutaminergiczna.

W celu wyjaśnienia prawdopodobnego mechanizmu działania dla wybranych aktywnych przeciwdrgawkowo związków wykonano badania radioreceptorowe mające na celu określenie ich powinowactwa do receptorów GABA_A oraz napięciowo-zależnych kanałów wapniowych.

4.2.1. Powinowactwo do receptorów GABA_A

Kardiazol jest jedną z najczęściej wykorzystywanych substancji drgawkotwórczych. Mimo, że mechanizm jego działania drgawkotwórczego jest ciągle niejasny, sugeruje się, że

* Badania radioreceptorowe wykonano w zespole kierowanym przez Prof. dr hab. Gabriela Nowaka w Zakładzie Cytobiologii i Histochemii UJ CM

blokuje on kanał dla jonów chlorkowych w kompleksie receptora GABA_A. Do leków skutecznych w modelu *scPTZ* należą między innymi etosuksimid, strukturalnie zbliżony do połączeń będących tematem niniejszej rozprawy, kwas walproinowy oraz inne substancje mające wpływ na transmisję w układzie GABA-ergicznym.¹⁶⁸ Dlatego też wydawało się celowym określenie wpływu wybranych związków na receptor GABA_A.

Do badań tych przekazano zw. **7**, **8**, **15** i **16** należące do serii pochodnych 2-aza-spiro[4.4]nonano- (zw. **7** i **8**) i [4.5]dekano-1,3-dionu (zw. **15** i **16**), aktywne w teście drgawek elektrycznych (zw. **7** i **16**) lub w obu stosowanych testach (MES i *scPTZ*) (zw. **8** i **15**). Badania te wykonano na homogenizatach tkankowych mózgu szczura stosując [³H]muscimol (5-aminometylo-3-izoksazol), będący agonistą receptorów GABA_A. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że związki o tej strukturze są pozbawione powinowactwa do miejsca wiążącego [³H]muscimolu w obrębie receptora GABA_A, co wyklucza jego udział w mechanizmie działania badanych połączeń.

4.2.2. Powinowactwo do napięciowo-zależnych kanałów wapniowych

Napięciowo-zależne kanały wapniowe odgrywają istotną rolę w patogenezie padaczki. Stwierdzono, że ich nasilona aktywacja jest jednym ze zjawisk odpowiedzialnych za spontaniczne wyładowania komórek nerwowych, występujących podczas napadu padaczkowego. Szereg z aktualnie stosowanych leków przeciwpadaczkowych posiada zdolność antagonizowania różnych typów kanałów wapniowych. Należą tu etosuksimid, karbamazepina, gabapentyna, pregabalina, a także zonisamid i lamotrigina. Warto podkreślić, że również inne blokery kanałów wapniowych, między innymi pochodne dihydropirydyny (nitrendypina, nifedypina), a także flunarizyna, wykazują działanie przeciwdrgawkowe w różnych modelach drgawek padaczkowych.¹⁶⁹

Biorąc po uwagę powyższe dane, dla wybranych aktywnych połączeń **7** i **9** oraz nieaktywnej pochodnej **12**, należących do serii azaspiranów, wyznaczono ich powinowactwo do napięciowo-zależnych kanałów wapniowych. Badania zostały wykonane na homogenizatach tkanki mózgowej szczura z użyciem jako radioliganda [³H]nitrendypiny. Otrzymane wyniki wskazują, że połączenia te nie wiązały się z kanałem wapniowym, bez względu na ich aktywność *in vivo*. Świadczy to o odmiennym mechanizmie odpowiedzialnym za efekt przeciwdrgawkowy.

Szczegółowe dane dotyczące badań farmakologicznych otrzymanych połączeń opisano w publikacjach 1, 3 i 4, zamieszczonych w *Aneksie*.

5. Badanie właściwości lipofilowych

Lipofilowość jest jednym z najważniejszych parametrów fizykochemicznych związków biologicznie aktywnych. Decyduje o przechodzeniu substancji przez błony biologiczne, wpływa na procesy wchłaniania i dystrybucji cząsteczek w ustroju, ponadto bierze udział w oddziaływaniach ligand - receptor, które do pewnego stopnia mają charakter oddziaływań hydrofobowych.¹⁷⁰ Cząsteczki posiadające odpowiednią lipofilowość, co wiąże się ściśle z ich powinowactwem do lipidowych błon biologicznych, są dobrze absorbowane, odpowiednio rozmieszczone w ustroju, a w konsekwencji dostarczone do danego celu molekularnego. Ze wzrostem lipofilowości wiąże się zmiana aktywności biologicznej, zmniejszenie rozpuszczalności w wodzie, nasilenie penetracji do tkanek, a także przyspieszenie metabolizmu i eliminacji. Dlatego też, właściwości lipofilowe obok sterycznych, elektronowych oraz wiązań wodorowych, stanowią podstawę ilościowej analizy struktura - aktywność (QSAR), a ich pomiar jest ważnym elementem w procesie racjonalnego projektowania nowych leków.¹⁷¹

Lipofilowość jest parametrem szczególnie istotnym dla połączeń działających w obrębie ośrodkowego układu nerwowego (OUN), których interakcję z określonym celem biologicznym, poprzedza przejście poprzez barierę krew-mózg (BBB). Według Hansach i współprac. optymalna lipofilowość dla tego typu substancji, wyrażona jako logarytm współczynnika podziału ($\log P$); oscyluje w granicach 2.¹⁷² Biorąc pod uwagę fakt, że właściwości lipofilowe są jednym z podstawowych czynników determinujących ośrodkowe działanie związków chemicznych, wykazano istnienie korelacji między lipofilowością i efektem biologicznym, w tym również dla połączeń o aktywności przeciwdrgawkowej.¹⁷³ Niemniej jednak, wiadomym jest, że aktywność farmakologiczna stanowi wypadkową szeregu właściwości fizykochemicznych, ale przede wszystkim struktury i związanej tym obecności określonych ugrupowań w odpowiedniej konfiguracji, które decydują o powinowactwie i sposobie oddziaływania cząsteczki z danym receptorem. Dlatego też, pomiar

właściwości lipofilowych oraz ich wpływ na aktywność należy uznać za jedno z wielu narzędzi pomocnych w projektowaniu nowych leków.

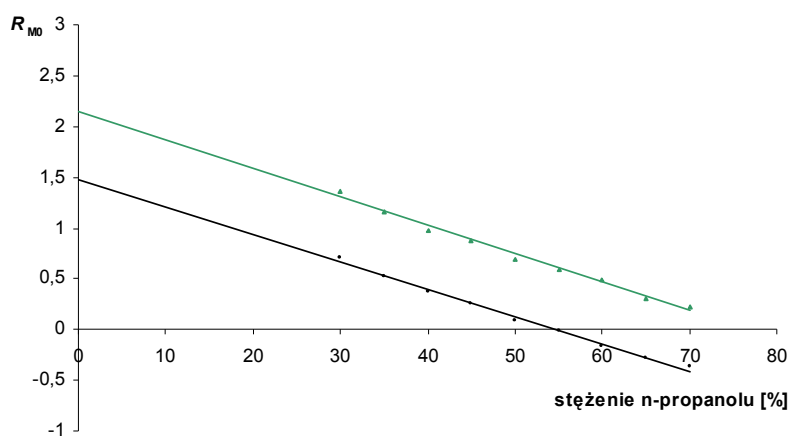
Lipofilowość charakteryzuje powinowactwo substancji chemicznej do fazy lipidowej, a jej miarą jest logarytm dziesiętny współczynnika podziału $P - \log P$. Standardowym rozpuszczalnikiem stosowanym do jego wyznaczania jest n-oktanol. Spośród wielu układów modelowych, mieszanina złożona z n-oktanolu i wody, odpowiada najbliższej rozkładowi faz polarnych i niepolarnych w ustroju.¹⁷⁴ Ze względu na szereg niedogodności klasycznej metody (*shake-flask*), polegającej na podziale substancji między fazę olejową i wodną, w celu określenia właściwości lipofilowych do najważniejszych zalicza się aktualnie techniki chromatograficzne w układzie faz odwróconych (*RP-Reversed Phase*). Najczęściej stosowane to chromatografia cienkowarstwowa (RP-TLC) oraz wysokosprawna chromatografia cieczowa (RP-HPLC). Pomiar właściwości lipofilowych metodami chromatograficznymi opiera się na podziale substancji między polarną fazą ruchomą i niepolarną fazą stacjonarną. Ich miarą są chromatograficzne parametry R_M dla techniki RP-TLC¹⁷⁵ lub logarytm współczynnika pojemnościowego $\log k$ w przypadku metody RP-HPLC.¹⁷⁶

Wyniki wcześniejszych badań prowadzonych w Katedrze Chemii Farmaceutycznej UJ CM wskazują na istnienie zależności między lipofilowością i aktywnością przeciwdrgawkową w seriach *N*-benzylowych,¹⁷⁷ *N*-pirydylowych,¹⁴⁴ oraz *N*-(4-arylo-piperazyn-1-yl)-alkilowych¹⁷⁸ pochodnych azaspiranów. Biorąc pod uwagę powyższe doniesienia i dysponując dużą grupą bliskich pod względem strukturalnym związków, w kolejnym etapie badań postanowiono wyznaczyć ich właściwości lipofilowe stosując metody chromatograficzne w układzie faz odwróconych - RP-TLC oraz RP-HPLC. Otrzymane wyniki pozwoliły na ustalenie zależności struktura - lipofilowość oraz ocenę wpływu lipofilowości na aktywność przeciwdrgawkową badanych połączeń.

Do badań lipofilowości metodą chromatografii cienkowarstwowej podziałowej z odwróconymi warstwami (RP-TLC) wybrano związki **1-16**, należące do serii azaspiranów. W pierwszym etapie badań opracowano warunki oznaczenia, stosując jako fazę ruchomą dwuskładnikowe układy złożone z n-propanolu oraz buforu TRIS o pH = 7,4.

Na podstawie uzyskanych wyników, w dziewięciu różnych stężeniach n-propanolu, obserwowano liniową zależność między wartościami R_M i jego zawartością w fazie ruchomej. Parametry R_M zmniejszały się liniowo wraz ze wzrostem modyfikatora organicznego w układzie rozwijającym. Wysoka korelacja, mieszcząca się w granicach 0,978-0,993, umożliwiła, w oparciu o metodę ekstrapolacji, wyznaczenia znormalizowanych chromatograficznych parametrów lipofilowości R_{M0} , dla zerowej zawartości n-propanolu. Zależność współ-

czynników R_M od stężenia n-propanolu w układzie rozwijającym dla wybranych związków **1** oraz **15** przedstawiono na **Ryc. 40**.



Ryc. 40. Liniowa zależność współczynników R_M od zawartości n-propanolu w układzie rozwijającym dla zw. **1** (•) i **15** (▲)

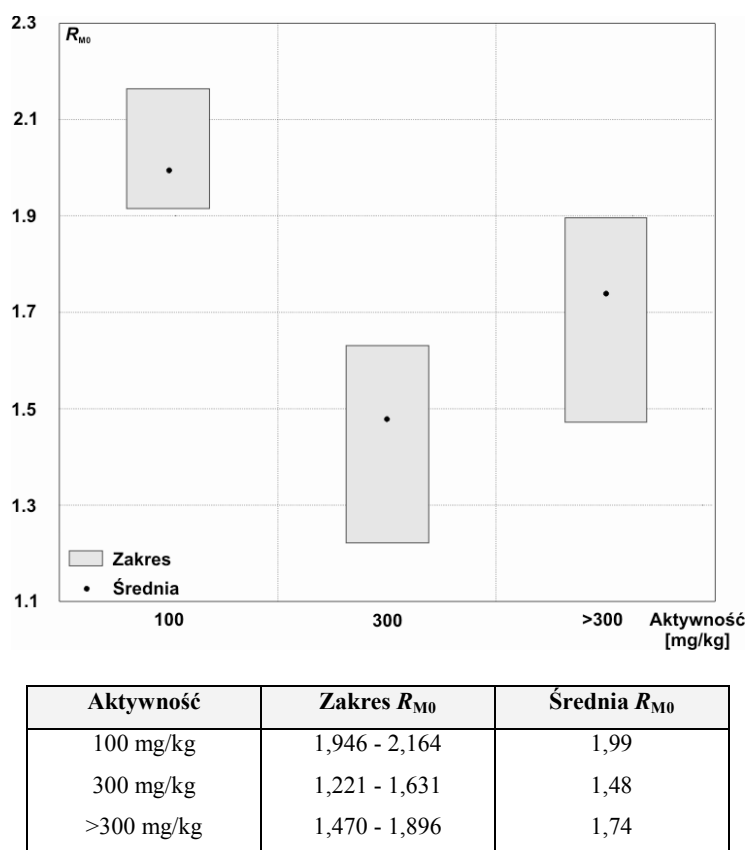
Znormalizowane chromatograficzne parametry lipofilowości R_{M0} opisują podział badanej substancji między wodę (w przedstawionym badaniu bufor TRIS o pH = 7,4) oraz niepolarną fazę stacjonarną. Parametry te są rekomendowane jako chromatograficzna miara lipofilowości w analizach QSAR.¹⁷⁹ Otrzymane wartości R_{M0} dla zw. **1-16** zebrano w **Tabeli 1**.

Analiza otrzymanych danych wykazała, że lipofilowość badanych połączeń jest uzależniona od wielkości pierścienia cykloalkilowego oraz rodzaju i położenia podstawników w układzie aromatycznym:

- Pochodne 2-azaspiro[4.5]dekano-1,3-dionu (zw. **9-16**) (R_{M0} w granicach 1,631-2,164), charakteryzują się wyższą lipofilowością w porównaniu do ich cyklopentanowych analogów (zw. **1-8**) (R_{M0} w granicach 1,221-1,954);
- Wprowadzenie atomów chloru lub bromu powoduje zwiększenie lipofilowości w porównaniu do analogów metylowych;
- Wartości parametrów R_{M0} dla izomerów uzależnione są od położenia danego podstawnika w układzie aromatycznym. W przypadku związków posiadających w strukturze atom chloru, najwyższą lipofilowością charakteryzują się pochodne *para* (zw. **6** i **14**), natomiast najniższą izomery *orto* (zw. **4** i **12**). Przeciwnie, wśród analogów metylowych najwyższe wartości R_{M0} zaobserwowano dla *orto*-podstawionych pochodnych **1** i **9**, a najniższą lipofilowością charakteryzowały się izomery

meta - **2** i **10**. Wynika to z odmiennych właściwości elektronowych atomu chloru i grupy metylowej. Wprowadzenie silnie elektroujemnego atomu chloru w położenie *para* powoduje zrównoważenie rozkładu elektronowego i zmniejszenie polarności cząsteczki spowodowanej obecnością silnie elektrono-akceptorowych atomów azotu i tlenu w układzie imidowym oraz wiązaniu iminowym. Natomiast, w przypadku analogów metylowych, ze względu na obojętny elektronowo charakter podstawnika CH₃, większy udział w lipofilowości związku przypisuje się efektom sterycznym.

W kolejnym etapie badań, w oparciu o wyznaczone eksperymentalnie wartości parametrów R_{M0} , ustalono zależność pomiędzy lipofilowością i aktywnością przeciwdrgawkową otrzymanych połączeń. Zależność tą przedstawiono na **Ryc. 41**.

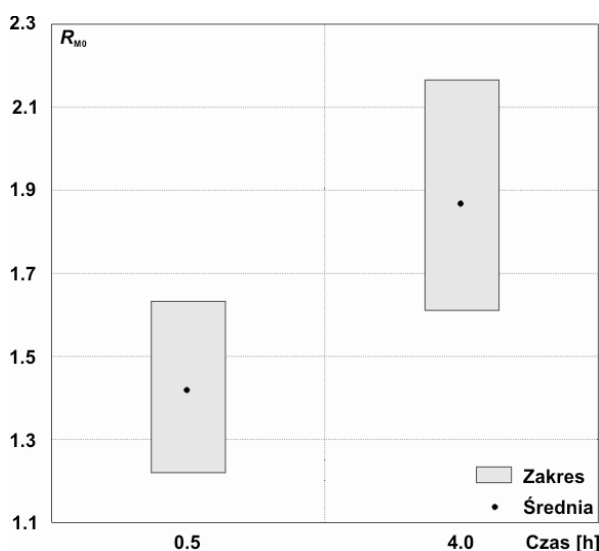


Ryc. 41. Zależność lipofilowość - aktywność dla zw. **1-16**

W analizie tej wykorzystano zakresy oraz średnie wartości parametrów R_{M0} dla grup związków aktywnych w dawce 100 mg/kg, 300 mg/kg oraz substancji pozbawionych aktywności (>300 mg/kg). Stwierdzono, że najwyższą lipofilowością charakteryzują się pochodne aktywne w dawce 100 mg/kg z zakresem R_{M0} wynoszącym 1,946-2,164 i średnią równą 1,99.

Wartym podkreślenia jest fakt, że związki aktywne w dawce 300 mg/kg posiadają najniższą lipofilowość. Jak wynika z prezentowanej ryciny zakres parametrów R_{M0} dla substancji nieaktywnych pokrywał się częściowo z zakresem dla połączeń aktywnych w dawce 300 mg/kg. Zastosowana analiza statystyczna - test Kruskala-Wallisa, wykazała, że różnice pomiędzy badanymi grupami były istotne statystycznie, $H(2, n = 16) = 11,24, p = 0,0036$.

Z uwagi na fakt, że właściwości lipofilowe niejednokrotnie decydują o początku i całkowitym czasie trwania efektu biologicznego, przeprowadzono ocenę wpływu lipofilowości na czas, w którym obserwowano działanie przeciwdrgawkowe. W tym celu, porównano wartości chromatograficznych parametrów R_{M0} związków aktywnych po 0,5 h i 4 h (**Ryc. 42**).



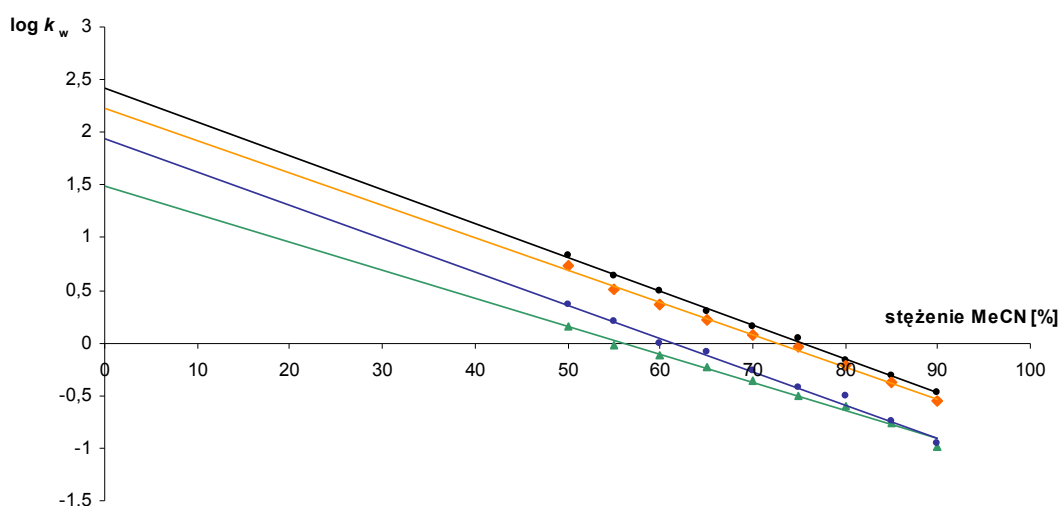
Czas [h]	Zakres R_{M0}	Średnia R_{M0}
0,5	1,221 - 1,631	1,42
4,0	1,612 - 2,164	1,87

Ryc. 42. Zależność lipofilowość - czas działania przeciwdrgawkowego dla aktywnych połączeń serii azaspiranów

Zaobserwowano, że substancje aktywne po czasie 4 h od podania charakteryzują się wyższą lipofilowością (zakres: 1,612-2,164, średnia: 1,87), w porównaniu do związków, których efekt obserwowano po 0,5 h (zakres: 1,221-1,631, średnia: 1,42). Zastosowany test Manna - Whitney'a, potwierdził istotną statystycznie różnicę między analizowanymi grupami ($U = 1,50, p = 0,0137$).

W kolejnym etapie prac, dla wszystkich otrzymanych połączeń, wyznaczono lipofilowość wykorzystując technikę RP-HPLC. W metodzie tej parametrem charakteryzującym właściwości lipofilowe jest współczynnik pojemnościowy - k .

Uzyskane wyniki, w dziewięciu różnych stężeniach acetonitrylu (MeCN), wskazują na liniową zależność między wartościami k i zawartością modyfikatora organicznego w fazie ruchomej. Na tej podstawie, w oparciu o metodę regresji liniowej, wyznaczone zostały znormalizowane chromatograficzne parametry lipofilowości - $\log k_w$, które opisuje równanie Soczewińskiego-Wachtmeister'a.¹⁷⁹ Liniową korelację współczynników k od zawartości MeCN w fazie ruchomej dla wybranych zróżnicowanych pod względem strukturalnym połączeń **7**, **17**, **43** i **45** przedstawiono na **Ryc. 43**.



Ryc. 43. Liniowa zależność współczynników k od zawartości MeCN w fazie ruchomej dla zw. **7** (•), **17** (▲), **43** (♦) oraz **45** (•)

Wyznaczone zależności charakteryzowały się wysokimi współczynnikami korelacji, które mieściły się w granicach 0,990-0,998. Parametry $\log k_w$ zebrano w **Tabelach 1, 3, 4, 10 i 13**.

Otrzymane dane wskazują, że na lipofilowość badanych połączeń miały wpływ ugrupowania w pozycji-3 układu pirolidyno-2,5-dionu oraz rodzaj i położenie podstawników w układzie aromatycznym. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić:

- Najwyższe wartości eksperymentalnych parametrów $\log k_w$ obserwowano w przypadku serii 3-butylo-3-metylowych pochodnych pirolidyno-2,5-dionu (zw. **36-40**)

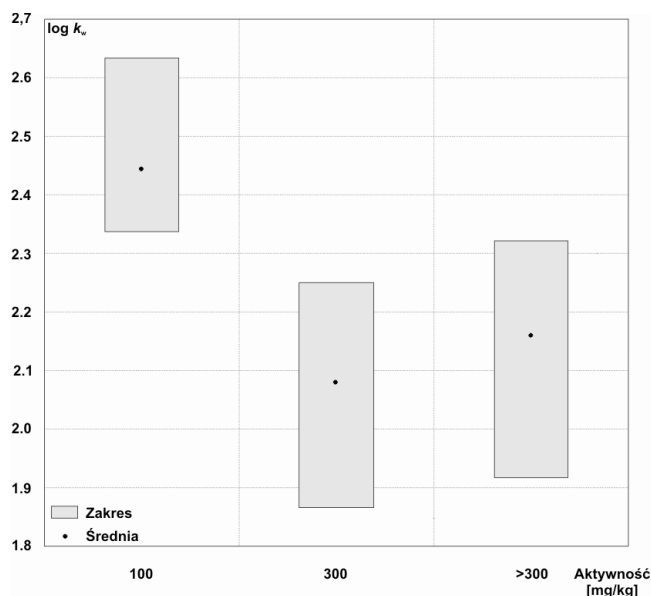
(2,566 - 2,896). Zgodnie z przewidywaniami, najniższą lipofilowością charakteryzowały się analogi 3,3-dimetylowe (zw. **17-23**) (1,471 - 2,179);

- Wprowadzenie w miejsce podstawnika cykloheksylowego w położeniu-3 pirolidyno-2,5-dionu (zw. **52-54**), ugrupowania fenyloвого (zw. **55-59**) spowodowało obniżenie lipofilowości;
- Zmiana sposobu przyłączenia pierścienia cykloheksanu do układu sukcyimidu z atomu węgla „spiro” (zw. **9-16**) na dwa wspólne atomy węgla w przypadku pochodnych heksahydroizoindo-1,3-dionu (zw. **45-50**), zmniejszyła lipofilowość odpowiednich analogów;
- W poszczególnych seriach najwyższe wartości parametrów $\log k_w$ obserwowano dla 2,4-dichoro- pochodnych, podczas gdy najniższe w przypadku związków niezawierających podstawników w pierścieniu fenylowym. Podobnie jak w metodzie RP-TLC, spośród izomerów chloro najbardziej lipofilowe okazały się pochodne *para*, natomiast najmniej izomery *orto*. W przypadku analogów metylowych, w serii azaspiranów, najwyższe wartości $\log k_w$ obserwowano dla pochodnych z grupą metylową w położeniu-2, podczas gdy najniższe dla izomerów *meta*;
- Lipofilowość 4-bromo pochodnych była zbliżona do ich 2- lub 3-chloro analogów.

W oparciu o wyznaczone wartości parametrów $\log k_w$ zbadano wpływ lipofilowości na aktywność przeciwdrgawkową. Ponieważ korelację taką wykonuje się dla bliskich strukturalnie połączeń, różniących się jedynie rodzajem podstawników lub długością fragmentów alkilowych, analizę tą wykonano oddzielnie dla związków z serii azaspiranów oraz pochodnych 3,3-dialkilo-pirolidyno-2,5-dionu. Warto podkreślić, że w obydwu seriach dysponowano stosunkowo licznymi grupami związków, zróżnicowanych pod względem budowy i właściwości farmakologicznych, co pozwala na otrzymanie miarodajnych i rzetelnych wyników.

Ocena zależności lipofilowość - aktywność była prowadzona w sposób analogiczny jak w przypadku parametrów wyznaczonych metodą RP-TLC, tj. porównano zarówno zakresy oraz średnią lipofilowość połączeń aktywnych w dawce 100 mg/kg, 300 mg/kg oraz pochodnych pozbawionych aktywności (**Ryc. 44 i 45**).

Pochodne *N*-fenyloamino-2-azaspiro[4.4]nonano- i dekan-1,3-dionu (zw. **1-16**)



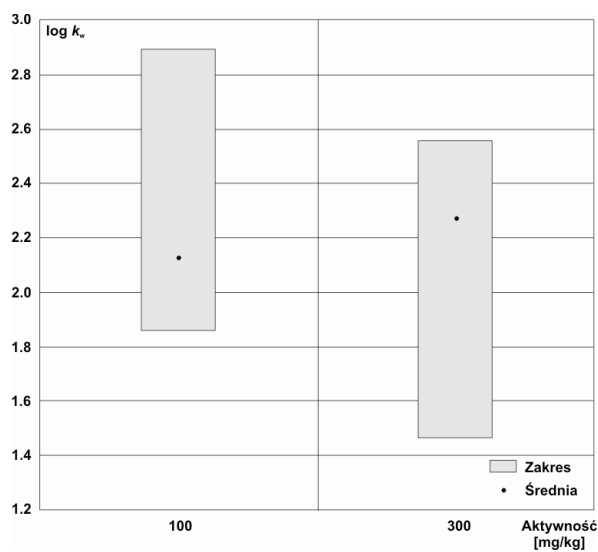
Aktywność	Zakres log k_w	Średnia log k_w
100 mg/kg	2,337 - 2,634	2,45
300 mg/kg	1,866 - 2,250	2,08
>300 mg/kg	1,917 - 2,322	2,16

Ryc. 44. Zależność lipofilowość - aktywność dla zw. **1-16**

Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że w seriach pochodnych 2-azaspiro[4.4]nonano- i [4.5]dekan-1,3-dionu, najaktywniejsze związki charakteryzują się najwyższą lipofilowością, a różnice pomiędzy poszczególnymi grupami związków aktywnych w dawce 100 mg/kg, 300 mg/kg oraz połączeń nieaktywnych są istotne statystycznie (test Kruskala - Wallis'a, $H(2, n = 16) = 9,11, p = 0,011$). Natomiast, zarówno średnia lipofilowość jak i zakresy parametrów $\log k_w$ związków aktywnych w dawce 300 mg/kg i pozbawionych aktywności były do siebie zbliżone.

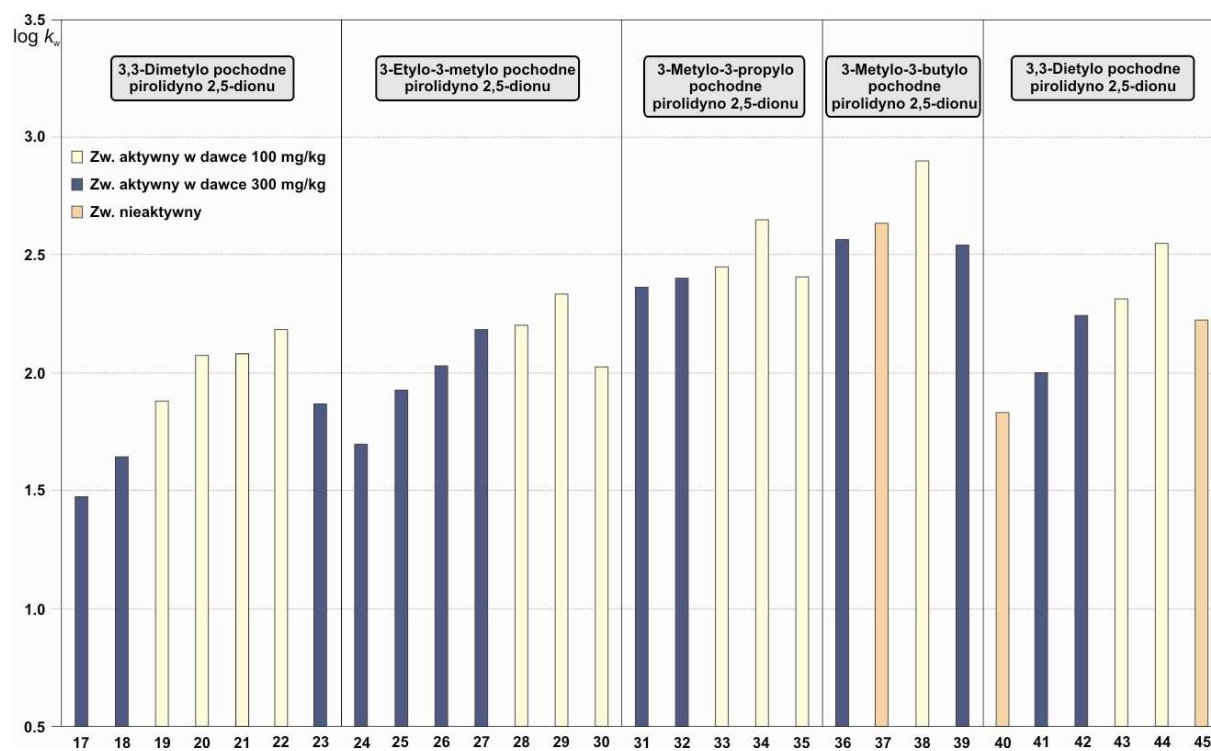
Przeciwnie, korelacji takiej nie stwierdzono wśród pochodnych 3,3-dialkilo-pirolidyno-2,5-dionu. Przyczyną tego może być ukierunkowanie syntezy, którą wykonano na podstawie danych farmakologicznych otrzymanych dla serii azaspiranów, skupiając się głównie na pochodnych zawierających w strukturze atomy chlorowców. Ponadto, z uwagi na obecność jedynie trzech nieaktywnych związków (**37**, **40** i **45**), postępowanie to przeprowadzono dla substancji działających przeciwdrgawkowo w dawkach 100 mg/kg lub 300 mg/kg (**Ryc. 45**).

Pochodne *N*-fenyloamino-3,3-dialkilo-pirolidyno-2,5-dionu (zw. 17-45)



Aktywność	Zakres log k_w	Średnia log k_w
100 mg/kg	1,876 - 2,896	2,31
300 mg/kg	1,471 - 2,566	2,07

Ryc. 45. Zależność lipofilowość - aktywność dla zw. 17-45

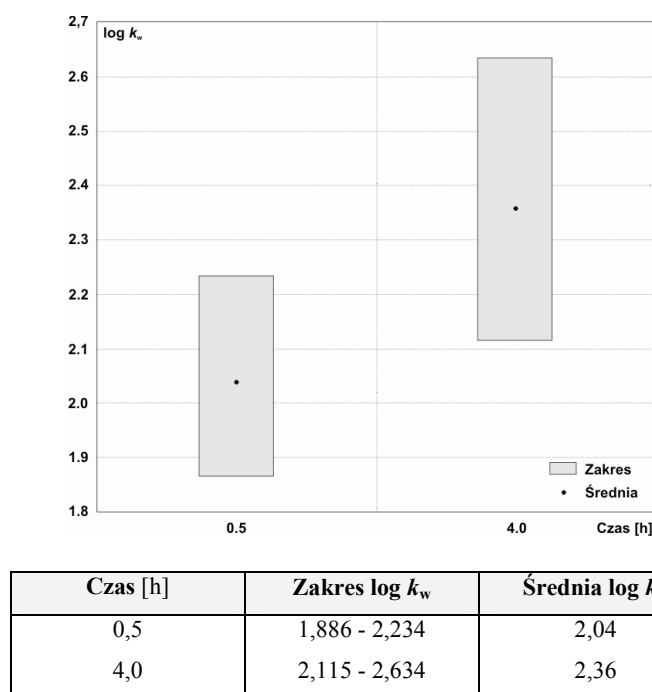


Ryc. 46. Zależność pomiędzy wartościami log k_w zw. 17-54 i ich aktywnością przeciwdrgawkową

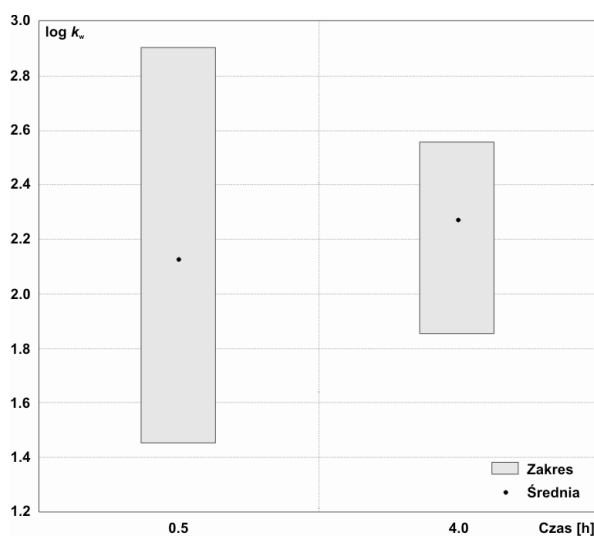
Pomimo że, test Manna-Whitney'a ($U = 52,0$, $p = 0,0956$) wskazuje na brak statystycznej różnicy między analizowanymi grupami, można jednak zauważyć pewną tendencję wskazującą, że połączenia bardziej aktywne charakteryzują się wyższą lipofilowością. Zależność ta jest szczególnie widoczna, gdy badany jest rozkład parametrów $\log k_w$ i aktywności biologicznej osobno dla poszczególnych serii 3,3-dialkilowych pochodnych pirolidyno-2,5-dionu (**Ryc. 46**). Największe odchylenia zaobserwowano w przypadku *N*-(4-chlorofenyloamino)-3-butylo-3-metylo-pirolidyno-2,5-dionu (zw. **37**) oraz *N*-(4-bromofenyloamino)-3,3-dietylo-pirolidyno-2,5-dionu (zw. **45**), które mimo wysokiej lipofilowości były nieaktywne.

W kolejnym etapie badań określono wpływ lipofilowości wyznaczonej metodą RP-HPLC na czas, w którym obserwowano aktywność przeciwdrgawkową. Zależności te przedstawiono na **Ryc. 47 i 48**.

Pochodne *N*-fenyloamino-2-azaspiro[4.4]nonano- i dekan-1,3-dionu (zw. **1 - 16**)



Ryc. 47. Zależność lipofilowość - czas, po którym obserwowano działanie (zw. **1-16**)

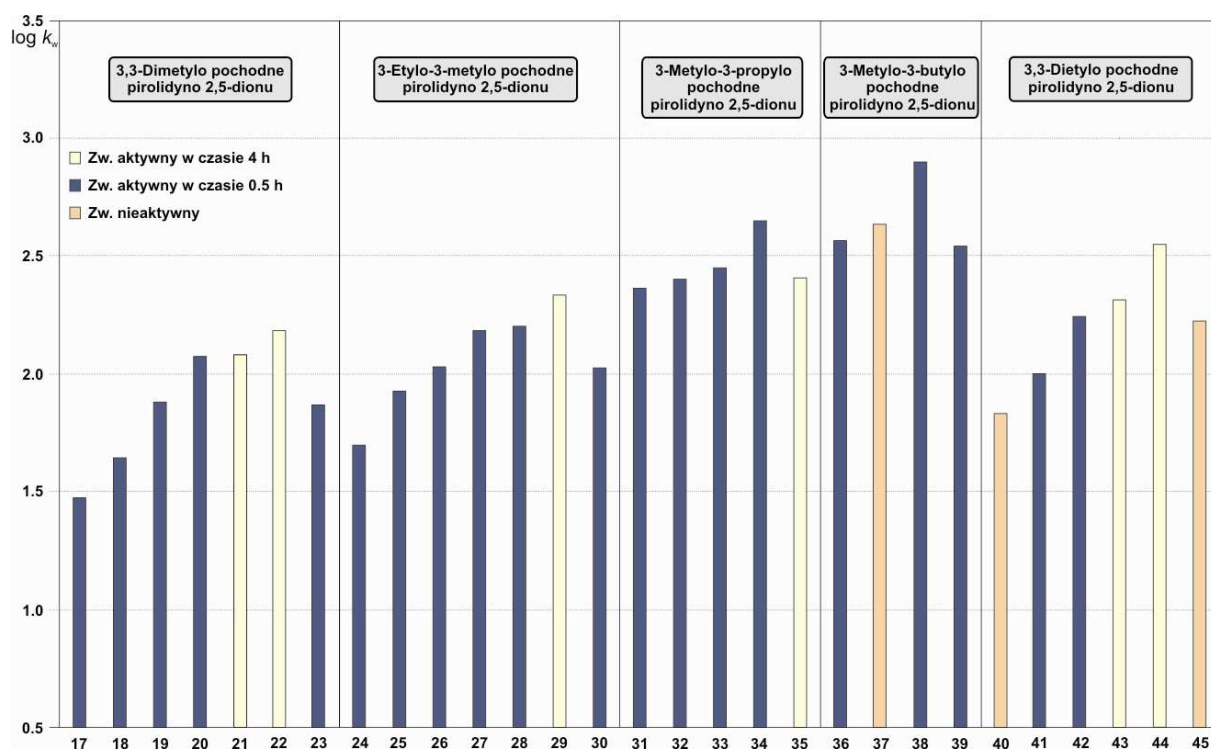
Pochodne *N*-fenyloamino-3,3-dialkilo-pirolidyno-2,5-dionu (zw. **17-45**)


Czas [h]	Zakres log k_w	Średnia log k_w
0,5	1,471 - 2,896	2,13
4,0	1,864 - 2,552	2,27

6

Ryc. 48. Zależność lipofilowość - czas, po którym obserwowano działanie (zw. **17-45**)

Otrzymane wyniki wskazują, że wśród pochodnych 2-azaspiro[4.4]nonano- i [4.5]dekano-1,3-dionu, związki bardziej lipofilowe charakteryzowały się dłuższym działaniem przeciwdrgawkowym. Obserwowane różnice były statystycznie istotne ($U = 2,0$, $p = 0,018$). Zależności tej nie stwierdzono wśród *N*-fenyloaminowych pochodnych 3,3-dialkilo-pirolidyno-2,5-dionów, co potwierdza wynik analizy statystycznej ($U = 66,0$, $p = 0,302$). Warto natomiast zauważyć, że w poszczególnych seriach, połączenia z atomami chloru w położeniu-2,4 lub -4 podstawnika fenyłowego, należące do najbardziej lipofilowych pochodnych, charakteryzują się jednocześnie najdłuższym czasem działania (**Ryc. 49**). Prawidłowość tą obserwowano w trzech seriach pochodnych: 3,3-dimetylo (zw. **17 - 23**), 3-etylo-3-metylo (zw. **24 - 30**) oraz 3,3-dietylo-pirolidyno-2,5-dionów (zw. **40 - 45**). Pewne różnice występowały w grupie 3-metylo-3-propylowych analogów (zw. **31 - 35**), wśród których najdłuższym działaniem charakteryzował się zw. **35** o niższej wartości $\log k_w$. Natomiast pochodne 3-butylo-3-metylowe (zw. **36 - 39**), były aktywne jedynie pół godziny po podaniu.



Ryc. 49. Wartości $\log k_w$ zw. 17-45 i czas, po którym obserwowano działanie przeciwdrgawkowe

Podsumowując, techniki chromatograficzne w układzie faz odwróconych RP-TLC i RP-HPLC okazały się dogodnymi metodami pozwalającymi na eksperymentalne wyznaczenie właściwości lipofilowych badanych połączeń. Otrzymane znormalizowane chromatograficzne parametry lipofilowości R_{M0} i $\log k_w$ pozwoliły na ocenę wpływu poszczególnych elementów strukturalnych na właściwości lipofilowe danej serii połączeń. Ponadto, w grupie pochodnych 2-azaspiro[4.4]nonano- i [4.5]dekano-1,3-dionu, wykazano istnienie korelacji między lipofilowością i aktywnością przeciwdrgawkową oraz jej wpływ na czas, po którym obserwowano działanie. Zależności takiej nie stwierdzono w przypadku pochodnych 3,3-dialkilo-pirolidyno-2,5-dionu, które zostały zaprojektowane jako analogi najaktywniejszych i najbardziej lipofilowych azaspiranów. Istotnym jest również fakt, że w poszczególnych seriach 3,3-dialkilowych pochodnych pirolidyno-2,5-dionu najwyższą aktywnością i zarazem najdłuższym działaniem charakteryzowały się najbardziej lipofilowe połączenia.

Na podstawie przeprowadzonych badań zarówno RP-TLC jak i RP-HPLC można stwierdzić, że metody te pozwalają na szybki i rzetelny pomiar właściwości lipofilowych, a otrzymane parametry lipofilowości umożliwiają wstępne przewidywanie aktywności biologicznej.

Szczegółowe dane dotyczące eksperymentalnego pomiaru właściwości lipofilowych otrzymanych związków opisano w publikacjach 2, 3 i 4, zamieszczonych w *Aneksie* niniejszej rozprawy.

6. Badanie trwałości

Badanie trwałości w środowisku kwaśnym i zasadowym wykonano dla 23 zróżnicowanych pod względem strukturalnym związków, reprezentujących wszystkie otrzymane serie:

- Zw. 4, 5, 6 i 7 - pochodne 2-azaspiro[4.4]nonano-1,3-dionu;
- Zw. 15 i 16 - pochodne 2-azaspiro[4.5]dekano-1,3-dionu;
- Zw. 17, 19 i 22 - pochodne 3,3-dimetylopirolidyno-2,5-dionu;
- Zw. 25, 26 i 28 - pochodne 3-etylo-3-metylopirolidyno-2,5-dionu;
- Zw. 31 i 33 - pochodne 3-metylo-3-propylopirolidyno-2,5-dionu;
- Zw. 36, 37 i 39 - pochodne 3-butylo-3-metylopirolidyno-2,5-dionu;
- Zw. 40 i 43 - pochodne 3,3-dietylopirolidyno-2,5-dionu;
- Zw. 46 i 51 - pochodne heksahydroizoindo-1,3-dionu;
- Zw. 54 - pochodna 3-cykloheksylo-pirolidyno-2,5-dionu;
- Zw. 59 - pochodna 3-fenylo-pirolidyno-2,5-dionu.

Badania prowadzono w temperaturze pokojowej w następujących warunkach:

- **Trwałość w środowisku kwaśnym** - 10 mg badanego związku w 96% etanolu z dodatkiem 0,5 ml 10% HCl,
- **Trwałość w środowisku zasadowym** - 10 mg badanego związku w 96% etanolu z dodatkiem 0,5 ml 10% NaOH.

Próbki pobierano po 10 minutach, po 1, 2, 3 godzinach, następnie po 1 i 2 dniach. Przebieg reakcji kontrolowano techniką TLC, stosując jako układy rozwijające S₁ (butanol : kwas octowy : woda; 5 : 4 : 1) i S₂ (chloroform : aceton; 9 : 1).

Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że na trwałość badanych połączeń nie wpływają zarówno podstawniki w położeniu-3 układu imidowego, jak i w ugrupowaniu fenyloaminowym.

Wszystkie badane związki ulegały bardzo szybkiemu rozkładowi w środowisku zasadowym, co obserwowano już po 10 minutach. Przeciwnie, w środowisku kwaśnym pochodne te charakteryzowały się znaczną trwałością, nawet po upływie 48 godzin nie stwierdzono na chromatogramie produktów rozkładu.

7. Podsumowanie i wnioski

Głównym celem niniejszej rozprawy było badanie wpływu modyfikacji strukturalnych nowych *N*-fenyloaminowych pochodnych 3-podstwowego pirolidyno-2,5-dionu na ich aktywność przeciwdrgawkową. W wyniku przeprowadzonej syntezy otrzymano bibliotekę pięćdziesięciu dziewięciu związków, zaprojektowanych jako bliższe lub dalsze analogi struktury wiodącej - *N*-fenyloamino-2-azaspiro[4.4]nonano-1,3-dionu (zw. **A**). Wstępne badania farmakologiczne wykazały, że czterdzieści dwie pochodne to związki aktywne w co najmniej jednym teście drgawek padaczkowych (MES lub/i *scPTZ*).

W oparciu o uzyskane wyniki badań farmakologicznych ustalono następujące zależności pomiędzy strukturą i działaniem przeciwdrgawkowym (SAR) badanych połączeń:

- Obecność układu spiranowego jest niezbędna dla aktywności. Niemniej jednak wśród pochodnych 2-azaspiro[4.4]nonano- (zw. **1-9**) i [4.5]dekano-1,3-dionów (zw. **10-16**), nie otrzymano połączeń o aktywności wyższej w porównaniu do związku modelowego - *N*-fenyloamino-2-azaspiro[4.4]nonano-1,3-dionu;
- W seriach tych, zastąpienie układu cyklopentanu (zw. **1-9**), pierścieniem cykloheksanu (zw. **10-16**) spowodowało nieznaczne obniżenie aktywności;
- Wprowadzenie w położenie-3 układu pirolidyno-2,5-dionu w miejsce pierścieni cykloalkilowych połączonych z nim poprzez atom węgla spiro (zw. **1-16**), różnej długości podstawników alkilowych (zw. **17-45**), powoduje znaczące zwiększenie i rozszerzenie aktywności przeciwdrgawkowej. Związki tego typu były w większości aktywne w obu stosowanych testach (MES i *scPTZ*);
- Najaktywniejsze spośród 3,3-dialkilowych pochodnych (zw. **17-45**), były połączenia z dwoma grupami metylowymi w położeniu-3 sukcyimidu. Obniżenie aktywności obserwowano wraz z wydłużaniem jednego z podstawników alkilowych, kolejno pochodne 3-etylo-3-metylowe (zw. **24-30**), 3-metylo-3-propylowe (zw. **31-35**) oraz 3-butylo-3-metylowe (zw. **36-39**). Najmniej aktywne były analogi 3,3-dietylowe (zw. **40-45**);

- Wprowadzenie pierścienia cykloheksanu jako elementu posiadającego dwa wspólne atomy węgla z układem pirolidyno-2,5-dionu w serii heksahydroizoindolo-1,3-dionów (zw. **47-51**) nie ma istotnego wpływu na aktywność;
- Zastąpienie powyższych układów pierścieniem cykloheksylowym o swobodzie rotacyjnej (zw. **52-54**) lub wprowadzenie w tym położeniu podstawnika fenylogowego (zw. **55-59**) powoduje całkowitą utratę aktywności;
- Aktywność przeciwdrgawkowa badanych połączeń zależna jest również od rodzaju i położenia podstawników w pierścieniu fenylogowym. Do najaktywniejszych należą pochodne niepodstawione lub/i z silnie elektroujemnymi atomami chloru lub bromu. Szczególnie uprzywilejowane jest podstawienie w pozycji-4 oraz związki z dwoma atomami chloru w położeniu-2,4 pierścienia fenylogowego. Wprowadzenie elektrono-donorowych grup metylowych osłabia działanie przeciwdrgawkowe, przy czym również wśród tego typu pochodnych najaktywniejsze były izomery *para*.

Wśród badanych połączeń najaktywniejszy okazał się *N*-fenyloamino-3,3-dimetylopirolidyno-2,5-dion (zw. **17**), którego dawka efektywna w teście MES (ED_{50}) wynosiła 68,89 mg/kg. Działa on silniej i jednocześnie jest mniej toksyczny ($TD_{50} = 500$ mg/kg) od *N*-fenyloamino-2-azaspiro[4.4]nonano-1,3-dionu, będącego strukturą modelową dla pochodnych omawianych w niniejszej rozprawie ($ED_{50} = 72,61$ mg/kg, $TD_{50} = 250$ mg/kg).

Ponadto, wybrane połączenia działały ochronnie w dodatkowych testach *in vivo*, takich jak: test 6-Hz, identyfikujący związki skuteczne w terapii napadów padaczkowych opornych na działanie klasycznych leków przeciwpadaczkowych (zw. **36 i 39**) oraz test drgawek pilokarpinowych - *Pilocarpine Induced Status Prevention* (PISP), będący zwierzęcym modelem stanu padaczkowego (*status epilepticus*) - zw. **32 i 47**.

W celu wyznaczenia prawdopodobnego mechanizmu działania dla wybranych pochodnych, przeprowadzono badania radioreceptorowe w kierunku ich powinowactwa do receptorów gabaergicznych ($GABA_A$) (zw. **7, 8, 15 i 16**) oraz napięciowo-zależnych kanałów wapniowych (zw. **7, 9 i 12**). Uzyskane wyniki wskazują, że tego typu połączenia nie wiążą się zarówno z receptorem $GABA_A$, jak i kanałem wapniowym, co wyklucza ich zaangażowanie w mechanizm działania przeciwdrgawkowego badanych związków.

W kolejnym etapie pracy dokonano eksperymentalnej oceny właściwości lipofilowych otrzymanych połączeń. W badaniach wykorzystano metodę chromatografii cienko-

warstwowej (RP-TLC) oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej (RP-HPLC) w układzie faz odwróconych. Uzyskane wartości znormalizowanych parametrów lipofilowości R_{M0} i $\log k_w$ umożliwiły ocenę zależności pomiędzy strukturą i lipofilowością analizowanych połączeń. Zaobserwowano również korelację pomiędzy właściwościami lipofilowymi i aktywnością przeciwdrgawkową. Stwierdzono, że najaktywniejsze związki charakteryzowały się najwyższą lipofilowością.

Podsumowując, cel niniejszej rozprawy został w pełni zrealizowany, a uzyskane wyniki stanowią podstawę do kontynuowania badań w grupie pochodnych 1,3-podstawionego pirolidyno-2,5-dionu, jako związków o potwierdzonej aktywności przeciwdrgawkowej.

8. Część doświadczalna

8.1. Badania fizykochemiczne

METODY CHROMATOGRAFICZNE:

Chromatografia cienkowarstwowa (TLC).

Stosowano płytki powlekane żel krzemionkowym Kieselgel 60 F₂₅₄ firmy Merck (Darmstadt, Niemcy), o grubości warstwy 0,25 mm.

Korzystano z następujących układów rozwijających:

S₁ - butanol : kwas octowy : woda (5 : 4 : 1) (v/v)

S₂ - chloroform : aceton (9 : 1) (v/v)

Po rozwinięciu i wysuszeniu chromatogramy oglądano w świetle UV ($\lambda = 254$ nm). Ponadto wywołano je spryskując 0,05 molowym roztworem jodu w 10% kwasie solnym.

Chromatografia kolumnowa.

Użyto żel krzemionkowy Kieselgel 60 firmy Merck (Darmstadt, Niemcy), o wielkości ziaren 0,063-0,200 mm (70-230 mesh ATM).

Układ rozwijający:

S₂ - chloroform : aceton [9 : 1] (v/v)

Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC)

Wykorzystano zestaw do HPLC firmy Waters (Milford, USA), w którego skład wchodziły: dwie pompy (Waters 515 HPLC), kontroler przepływu (600S Flow Controller), detektor UV Waters 486 oraz injektor (Rheodyne 7161 firmy Cotali, CA, USA). Warunki pomiaru:

- Metoda elucji gradientowej (badanie czystości związków)

Kolumna chromatograficzna: Chromolit ($50 \times 4,6$ mm). Analizę prowadzono w gradientcie 5 minutowym od 0% do 100% zawartości rozpuszczalnika B, stosując przepływ 5 ml/min. Faza ruchoma zawierała: A-wodę, uprzednio oczyszczoną przez filtrację, wykorzystując filtr HA Millipore (Millipore, Milford, MA, USA) o wielkości porów $0,45 \mu\text{m}$, B-acetonitryl do chromatografii HPLC (Merck, Darmstadt, Niemcy). Na kolumnę wprowadzano po 5 μl roztworów badanych substancji o stężeniu 1 mg/ml. Związki rozpuszczano w mieszaninie acetonitryl/woda (50 : 50; v/v).

Pomiar absorbancji prowadzono przy długości fali $\lambda_{\text{max}} = 214 \text{ nm}$.

Wszystkie otrzymane połączenia charakteryzowały się czystością mieszczącą się w granicach 98,67% do 99,89%.

TEMPERATURA TOPNIENIA:

Oznaczono w aparacie Büchi 535 (Büchi Labortechnik, Flawil, Szwajcaria). Temperatury topnienia badanych związków podano niekorygowane.

ANALIZA ELEMENTARNA (C, H, N):

Analizę elementarną przeprowadzono w aparacie Vario El III (Elementar, Niemcy). W przypadku wszystkich połączeń procentowa zawartość C, H i N wyznaczona eksperymentalnie mieściła się w granicach $\pm 0,4\%$ wartości teoretycznych.

8.2. Metody spektroskopowe

Spektrometria masowa (MS)

- *Technika jonizacji strumieniem elektronów (EI-MS, Electron Impact Ionization - Mass Spectrometry)*. Widma masowe wykonano za pomocą spektrometru LKB 2091 (Varian, Les Ulis, Francja). Energia jonizacji wynosiła 70 eV. Próbkę wprowadzano bezpośrednio;
- *Technika jonizacji poprzez elektrorozpraszanie (ESI-MS, Electrospray Ionisation - Mass Spectrometry)*. Widma masowe wykonano za pomocą spektrometru Esquire 3000 (Bruker-Daltonics, Bremen, Niemcy). Jonizacja pozytywna, różnica potencjałów w źródle 4500 V.

Spektroskopia magnetycznego rezonansu protonowego (^1H NMR)

Widma protonowego rezonansu magnetycznego rejestrowano przy użyciu spektrometru Varian Mercury (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA) (300 MHz) w CDCl_3 , stosując tetrametylosilan (TMS) jako wzorzec wewnętrzny.

W opisie widm stosowano następujące skróty:

- s. - singlet
- d. - dublet
- d.d. - dublet dubletów
- d.d.d. - podwójny dublet dubletów
- t. - triplet
- d.t. - dublet tripletów
- t.d. - triplet dubletów
- m. - multiplet

Spektroskopia w podczerwieni (IR)

Widma w podczerwieni wykonano używając spektrometru FT/IR 410 Furier Transform Infrared Spectrometer (Jasco, USA).

8.3. Produkty wyjściowe

- Kwas 1-karboksy-1-cyklopentano-octowy (I)
- Kwas 1-karboksy-1-cykloheksano-octowy (II)
- Kwas 2,2-dimetylo-bursztynowy (III)
- Kwas 2-etylo-2-metylo-bursztynowy (IV)
- Kwas 2-metylo-2-propylo-bursztynowy (V)
- Kwas 2-butylo-2-metylo-bursztynowy (VI)
- Kwas 2,2-dietylo-bursztynowy (VII)
- Kwas 2-cykloheksylo-bursztynowego (VIII)
- Kwas 2-fenylo-bursztynowego (Merck, Darmstadt, Niemcy)
- Bezwodnik kwasu cykloheksano-1,2-dikarboksylowego (Merck, Darmstadt, Niemcy)

Pochodne fenylodrazyny:

(produkty handlowe, Merck, Darmstadt, Niemcy)

- Fenylodrazyna
- 2-Metylo-fenylodrazyna
- 3-Metylo-fenylodrazyna
- 4-Metylo-fenylodrazyna
- 2-Chloro-fenylodrazyna
- 3-Chloro-fenylodrazyna
- 4-Chloro-fenylodrazyna
- 2,4-Dichloro-fenylodrazyna
- 4-Bromo-fenylodrazyna

8.3.1. Kwasy 1-karboksy-1-cyklopentano-octowy (I) i 1-karboksy-1-cykloheksano-octowy (II)

Zostały otrzymane zgodnie z procedurą opisaną w literaturze.¹⁴⁵⁻¹⁴⁷

Mieszaninę zawierającą 1,2 mola cyklopentanonu (100,94 g) lub 1,2 mola cykloheksanonu (117,78 g), 1,0 mol cyjanooctanu etylu (113,12), 0,1 mola octanu amonu (7,71 g) i 0,2 mola lodowatego kwasu octowego (12,01 g) w 150 ml benzenu ogrzewano w temperaturze wrzenia przez 12 godzin. Reakcję prowadzono w kolbie okrągłodennej zaopatrzonej w nasadkę azeotropową (aparatus Deana-Starka), służącą do usuwania powstającej wody reakcyjnej. Po ochłodzeniu mieszaninę przemywano trzykrotnie w rozdzielaczu 100 ml wody destylowanej, a następnie nasyconym roztworem chlorku sodu. Warstwy wodne ekstrahowano kilkakrotnie benzenem. Połączone warstwy organiczne suszono nad bezwodnym siarczanem sodu. Po odsączeniu siarczanu sodu mieszaninę zagęszczono otrzymując w postaci żółtych olejów ester etylowy kwasu 2-cyklopentylideno-2-cyjanooctowego (145,50 g, wyd. 67,6%) oraz ester etylowy kwasu 2-cykloheksylideno-2-cyjanooctowego (173,47 g, wyd. 74,8%). Estry te rozpuszczono w 400 ml metanolu i dodano porcjami, mieszając, 1,5-krotny nadmiar molowy cyjanku potasu rozpuszczonego uprzednio w około 100 ml wody. Całość pozostawiono w temperaturze pokojowej na dwa dni. Po tym czasie rozpuszczalnik oddestylowano. Do oleistej pozostałości dodano 500 ml stężonego kwasu solnego i ogrzewano w temperaturze wrzenia przez kolejne 16 godzin. Surowe produkty krystalizowano z wody. Otrzymane ilości oraz wydajność reakcji liczoną w stosunku do wyjściowego ketonu zebrano w **Tabeli 14**.

Tabela 14.

Zw.	Nawa chemiczna	Otrzymana ilość [g]	Wydajność [%]	t.t. [°C]
I	Kwas 1-karboksy- 1-cyklopentano-octowy	123,26	59,7	162-164 (lit. 163) ¹⁴⁶
II	Kwas 1-karboksy- 1-cykloheksano-octowy	131,62	58,9	140-142 (lit. 136) ¹⁴⁶

8.3.2. Kwasy 2,2-dialkilo-bursztynowe (III-VII)

Syntezę prowadzono według metody opisanej przez Smith'a i Horwitz'a,¹⁴⁸ a zmodyfikowanej przez Moal'a.^{146, 149}

W kolbie okrągłodennej umieszczono 0,2 mola odpowiedniego ketonu dialkilowego tj.: acetonu (11,62 g), butan-2-onu (14,42 g), pentan-2-onu (17,23 g), heksan-2-onu (20,03 g) lub pentan-3-onu (17,23 g) z 0,38 mola cyjanooctanu etylu (42,98 g), 0,2 mola octanu amonu (15,42 g), 0,61 mola lodowatego kwasu octowego (36,63 g) w 160 ml benzenu (z wyjątkiem reakcji z acetonem). Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w temperaturze wrzenia przez około 17 godzin usuwając powstającą wodę. W wyniku reakcji otrzymano odpowiednie dialkilidenowe pochodne cyjanooctanu etylu, które izolowano wykorzystując proces destylacji pod zmniejszonym ciśnieniem. Estry zbierano jako frakcje, destylujące odpowiednio w temperaturach: ester etylowy kwasu 2-cyjano-3-metylobut-2-enowego, 184-186°C (28,64 g, wyd. 93,5%); ester etylowy kwasu 2-cyjano-3-metylopent-2-enowego, 195-197°C (28,76 g, wyd. 86,0%); ester etylowy kwasu 2-cyjano-3-metyloheks-2-enowego, 210-212°C (33,10 g, wyd. 91,3%); ester etylowy kwasu 2-cyjano-3-metylohept-2-enowego, 215-217°C (30,77 g, wyd. 78,8%); ester etylowy kwasu 2-cyjano-3-etylopent-2-enowego, 205-207°C (32,51 g, wyd. 89,7%).

Otrzymane produkty pośrednie rozpuszczono w 200 ml metanolu i dodano stopniowo, dwukrotny nadmiar molowy cyjanku potasu, rozpuszczonego w około 100 ml wody. Mieszaninę reakcyjną ogrzano do wrzenia, a następnie szybko ochłodzono. Po oddestylowaniu metanolu otrzymano odpowiednie estry etylowe kwasów 2,3-dicyjano-3-alkilokarboksylowych w postaci gęstych olejów, które następnie zadano 200 ml stężonego kwasu solnego i hydrolizowano w temperaturze wrzenia przez 18 godzin. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną ochłodzono i ekstrahowano trzykrotnie 200 ml eterem dietylowym. Po rozdzieleniu warstwę eterową suszono nad bezwodnym siarczanem sodu. Eter dietylowy oddestylowano uzyskując w każdym przypadku jasne oleje. Odpowiednie kwasy 2,2-dialkilo-bursztynowe

(III - VII) otrzymano w postaci stałej w wyniku krystalizacji z 10% roztworu kwasu solnego. Temperatuty topnienia poszczególnych produktów oraz wydajności reakcji zebrano w **Tabeli 15**.

Tabela 15.

Zw.	Nawa chemiczna	Otrzymana ilość [g]	Wydajność [%]	t.t. [°C]
III	Kwas 2,2-dimetylo-bursztynowy	20,21	69,2	140-142 (lit. 139°C) ¹⁴⁶
IV	Kwas 2-etylo-2-metylo-bursztynowy	22,54	70,4	108-110 (lit. 113°C) ¹⁴⁶
V	Kwas 2-metylo-2-propylo-bursztynowy	23,18	72,0	122-124 (lit. 126-127°C) ¹⁴⁶
VI	Kwas 2-butylo-2-metylo-bursztynowy	25,73	68,4	94-96 (lit. 102°C) ¹⁴⁶
VII	Kwas 2,2-dietylo-bursztynowy	24,81	59,7	114-116 (lit. 113°C) ¹⁴⁶

8.3.3. Kwas 2-cykloheksylo-bursztynowy (VIII)

Kwas 2-cykloheksylo-bursztynowy (VIII) otrzymano w oparciu o metodą opisaną przez Miller'a i Long'a.^{150, 151}

W kolbie okrągłodennej zmieszano 0,2 mola cykloheksanokarboksyaldehydu (22,43 g), 0,2 mola cyjanooctanu etylu (22,62 g) i 2 ml piperydyny w 300 ml metanolu. Całość ogrzewano w temperaturze 60°C przez 15 minut. Po ochłodzeniu, wykrystalizował biały osad estru etylowego kwasu 2-cyjano-3-cykloheksylo-akrylowego, który oczyszczono przez krystalizację z metanolu. Otrzymano 35,23 g produktu z wydajnością 85,0%. Ester rozpuszczono w 300 ml metanolu i dodano dwukrotny nadmiar molowy cyjanku potasu, rozpuszczonego w około 100 ml wody. Całość mieszano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej, następnie rozpuszczalnik oddestylowano, otrzymując ester etylowy kwasu 2,3-dicyjano-3-cykloheksylo-propanowego w postaci gęstego oleju. Olej zadano 200 ml stężonego kwasu solnego i hydrolizowano utrzymując całość w temperaturze wrzenia przez 12 godzin. Po ochłodzeniu otrzymano kwas 2-cykloheksylo-bursztynowy (VIII) w postaci białego osadu, który oczyszczono poprzez krystalizację z wody, uzyskując 27,65 g czystego produktu z wydajnością 69,0% (t.t. 147-149°C, lit. 144-146°C¹⁸⁰).

8.4. Ogólna metoda otrzymywania *N*-fenyloaminowych pochodnych 3-podstawionego pirolidyno-2,5-dionu i heksahydroizoindo-1,3-dionu

W kolbie okrągłodennej mieszało 0,01 mola odpowiedniej pochodnej fenylohydrazyny, 0,01 mola odpowiedniego kwasu dikarboksylowego lub bezwodnika kwasowego w 15 ml wody destylowanej. Całość ogrzewano na łaźni grafitowej do momentu całkowitego oddestylowania wody. Po jej oddestylowaniu temperatura mieszaniny reakcyjnej wzrosła do około 180°C i w tej temperaturze prowadzono cyklizację przez 1 h. Surowe produkty krystalizowano z izopropanolu, a następnie otrzymane krystaliczne substancje oczyszczono wykorzystując technikę chromatografii kolumnowej stosując jako układ rozwijający chloroform : aceton (9 : 1) (v/v) (S₂).

Szczegółowe dane spektralne otrzymanych połączeń opisano w publikacjach 1, 3 i 4, zamieszczonych w *Aneksie*. W przypadku niepublikowanych połączeń **5**, **6**, **13**, **14** oraz **55-59** dane te przedstawiono poniżej.

8.4.1. Pochodne *N*-fenyloamino-2-azaspiro[4.4]nonano- i [4.5]dekano-1,3-dionu

8.4.1.1. *N*-(3-chlorofenyloamino)-2-azaspiro[4.4]nonano-1,3-dion (**5**)

Biały krystaliczny osad; temperatura topnienia: 138-140°C; wydajność: 64%.

¹H NMR (300MHz, CDCl₃): δ 1,74-2,26 (m, 8H, cyklopentan), 2,72 (s, 2H, H_a, H_b, imid), 6,17 (brs, 1H, NH), 6,63 (ddd, 1H, Ar - H₆, *J* = 1,52 Hz, *J* = 2,31 Hz, *J* = 8,24 Hz), 6,71 (t, 1H, Ar - H₂, *J* = 2,05 Hz), 6,95 (ddd, 1H, Ar - H₄, *J* = 0,90 Hz, *J* = 1,92 Hz, *J* = 7,96 Hz), 7,16 (t, 1H, Ar - H₅, *J* = 8,08 Hz).

Wzór sumaryczny: C₁₄H₁₅ClN₂O₂ (m. cz. 278,74).

TLC: *R*_f = 0,60 (S₂)

HPLC: *R*_t = 2,74 min. (5)

8.4.1.2. *N*-(4-chlorofenyloamino)-2-azaspiro[4.4]nonano-1,3-dion (**6**)

Biały krystaliczny osad; temperatura topnienia: 145-147°C; wydajność: 71%.

¹H NMR (300MHz, CDCl₃): 1,73-2,22 (m, 8H, cyklopentan), 2,71 (s, 2H, H_a, H_b, imid), 6,11 (brs, 1H, NH), 6,69-6,72 (m, 2H, Ar - H_{2,6}), 7,19-7,22 (m, 2H, Ar - H_{3,5}).

Wzór sumaryczny: C₁₄H₁₅ClN₂O₂ (m. cz. 278,74).

TLC: *R*_f = 0,63 (S₂)

HPLC: *R*_t = 2,75 min. (5)

8.4.1.3. *N*-(3-chlorofenyloamino)-2-azaspiro[4.5]dekano-1,3-dion (**13**)

Biały krystaliczny osad; temperatura topnienia: 174-176°C; wydajność: 68%.

¹H NMR (300MHz, CDCl₃): δ 1,36-1,96 (m, 10H, cykloheksan), 2,69 (s, 2H, H_a, H_b, imid), 6,13 (brs, 1H, NH), 6,62 (ddd, 1H, Ar - H₆, *J*=0,90 Hz, *J*=2,31 Hz, *J*=8,08 Hz), 6,70 (t, 1H, Ar - H₂, *J*=2,05 Hz), 6,94 (ddd, 1H, Ar - H₄, *J*=0,90 Hz, *J*=1,92 Hz, *J*=7,95 Hz), 7,16 (t, 1H, Ar - H₅, *J*=8,08 Hz).

Wzór sumaryczny: C₁₅H₁₇ClN₂O₂ (m. cz. 292,77).

TLC: *R*_f = 0,68 (S₂)

HPLC: *R*_t = 2,96 min. (5)

8.4.1.4. *N*-(4-chlorofenyloamino)-2-azaspiro[4.5]dekano-1,3-dion (**14**)

Biały krystaliczny osad; temperatura topnienia: 178-180°C; wydajność: 72%.

¹H NMR (300MHz, CDCl₃): 1,36-1,95 (m, 10H, cykloheksan), 2,67 (s, 2H, H_a, H_b, imid), 6,08 (brs, 1H, NH), 6,68-6,72 (m, 2H, Ar - H_{2,6}), 7,17-7,21 (m, 2H, Ar - H_{3,5}).

Wzór sumaryczny: C₁₅H₁₇ClN₂O₂ (m. cz. 292,77).

TLC: *R*_f = 0,69 (S₂)

HPLC: *R*_t = 2,96 min. (5)

8.4.2. Pochodne *N*-fenyloamino-3,3-dialkilo-pirolidyno-2,5-dionu (**17-45**)

Dane fizykochemiczne i spektralne zw. **17-45** zamieszczono w publikacji 4 (*Aneks*).

8.4.3. Pochodne *N*-fenyloamino-heksahydroizoindo-1,3-dionu (**46-51**).

Dane fizykochemiczne i spektralne dla zw. **46-51** zamieszczono w publikacji 4 (*Aneks*).

8.4.4. Pochodne *N*-fenyloamino-3-cykloheksylo-pirolidyno-2,5-dionu (**52-54**)

Dane fizykochemiczne i spektralne połączeń **52-54** opisano w publikacjach 1 i 3 (*Aneks*).

8.4.5. Pochodne *N*-fenyloamino-3-fenylopirolidyno-2,5-dionu (**55-59**)8.4.9.1. *N*-fenyloamino-3-fenylopirolidyno-2,5-dion (**55**)

Biały krystaliczny osad; temperatura topnienia: 138-140°C; wydajność: 64%.

^1H NMR (300MHz, CDCl_3): δ 2,97 (dd, 1H, H_a , imid, $J = 4,68$ Hz, $J = 18,59$ Hz), 3,34 (dd, 1H, H_b , imid, $J = 9,58$ Hz, $J = 18,60$ Hz), 4,16 (dd, 1H, H_c , imid, $J = 4,65$, $J = 9,57$ Hz), 6,21 (brs, 1H, NH), 6,81-6,98 (m, 2H, Ar - $\text{H}_{2,6}$), 7,00-7,03 (m, 1H, Ar- H_4), 7,23-7,43 (m, 7H, Ar - $\text{H}_{3,5}$, Ar - $\text{H}_{2',6'}$).

IR; ν (cm^{-1}): 3414 (C-H, aromat.), 1709 (C=O), 1603, 1497, (C=C).

Wzór sumaryczny: $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$ (m. cz. 266,30).

TLC: $R_f = 0,45$ (S_2)

HPLC: $R_t = 2,19$ min. (5)

8.4.9.2. *N*-(2-chlorofenyloamino)-3-fenylopirolidyno-2,5-dion (**56**)

Biały krystaliczny osad; temperatura topnienia: 98-100°C; wydajność: 62%.

^1H NMR (300MHz, CDCl_3): δ 3,01 (dd, 1H, H_a , imid, $J = 4,68$ Hz, $J = 18,64$ Hz), 3,37 (dd, 1H, H_b , imid, $J = 9,61$ Hz, $J = 18,64$ Hz), 4,18 (dd, 1H, H_c , imid, $J = 4,68$ Hz, $J = 9,59$ Hz), 6,60 (dd, 1H, Ar - H_6 , $J = 1,41$ Hz, $J = 8,10$ Hz), 6,67 (brs, 1H, NH), 6,92 (td, 1H, Ar - H_4 , $J = 1,44$ Hz, $J = 7,75$ Hz), 7,11-7,18 (m, 1H, Ar - H_5), 7,24-7,45 (m, 6H, Ar - H_3 , Ar - $\text{H}_{2',6'}$).

IR; ν (cm^{-1}): 3312 (C-H, aromat.), 1717 (C=O), 1596, 1498, (C=C).

Wzór sumaryczny: $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{ClN}_2\text{O}_2$ (m. cz. 300,75).

TLC: $R_f = 0,76$ (S_2)

HPLC: $R_t = 2,81$ min. (5)

8.4.9.3. *N*-(3-chlorofenyloamino)-3-fenylopirolidyno-2,5-dion (**57**)

Biały krystaliczny osad; temperatura topnienia: 129-131°C; wydajność: 67%.

^1H NMR (300MHz, CDCl_3): δ 2,98 (dd, 1H, H_a , imid, $J = 4,49$ Hz, $J = 18,59$ Hz), 3,34 (dd, 1H, H_b , imid, $J = 9,62$ Hz, $J = 18,59$ Hz), 4,16 (dd, 1H, H_c , imid, $J = 4,62$, $J = 9,49$ Hz), 6,24 (brs, 1H, NH), 6,67-6,98 (m, 3H, Ar - $\text{H}_{2,4,6}$), 7,17 (t, 1H, Ar - H_5 , $J = 8,05$ Hz), 7,26-7,44 (m, 5H, Ar - $\text{H}_{2',6'}$).

Wzór sumaryczny: $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{ClN}_2\text{O}_2$ (m. cz. 300,75).

TLC: $R_f = 0,60$ (S_2)

HPLC: $R_t = 2,84$ min. (5)

8.4.9.4. *N*-(4-chlorofenyloamino)-3-fenylopirolidyno-2,5-dion (**58**)

Biały krystaliczny osad; temperatura topnienia: 163-165°C; wydajność: 72%.

¹H NMR (300MHz, CDCl₃): δ 2,97 (dd, 1H, H_a, imid, *J* = 4,62 Hz, *J* = 18,47 Hz), 3,33 (dd, 1H, H_b, imid, *J* = 9,62 Hz, *J* = 18,59 Hz), 4,14 (dd, 1H, H_c, imid, *J* = 4,62 Hz, *J* = 9,99 Hz), 6,18 (brs, 1H, NH), 6,74-6,79 (m, 2H, Ar - H_{2,6}), 7,19-7,44 (m, 7H, Ar-H_{3,5}, Ar - H_{2',6'}).

Wzór sumaryczny: C₁₆H₁₃ClN₂O₂ (m. cz. 300,75).

TLC: *R*_f = 0,59 (S₂)

HPLC: *R*_t = 2,85 min. (5)

8.4.9.5. *N*-(2,4-dichlorofenyloamino)-3-fenylopirolidyno-2,5-dion (**59**)

Biały krystaliczny osad; temperatura topnienia: 156-158°C; wydajność: 66%.

¹H NMR (300MHz, CDCl₃): δ 3,01 (dd, 1H, H_a, imid, *J* = 4,64 Hz, *J* = 18,67 Hz), 3,37 (dd, 1H, H_b, imid, *J* = 9,60 Hz, *J* = 18,67 Hz), 4,18 (dd, 1H, H_c, imid, *J* = 4,62 Hz, *J* = 9,49 Hz), 6,54 (d, 1H, Ar - H₆, *J* = 8,69 Hz), 6,61 (brs, 1H, NH), 7,10-7,14 (m, 1H, Ar - H₅), 7,25-7,45 (m, 6H, Ar - H₃, Ar - H_{2',6'}).

ESI-MS; *m/z*: [M+H]⁺ 335, [M+2]⁺ 337.

Wzór sumaryczny: C₁₆H₁₂Cl₂N₂O₂ (m. cz. 335,19).

TLC: *R*_f = 0,65 (S₂)

HPLC: *R*_t = 3,12 min. (5)

8.5. Badanie lipofilowości

Dla wszystkich otrzymanych połączeń **1-59** wykonano eksperymentalną ocenę właściwości lipofilowych metodą RP-HPLC. Ponadto w przypadku związków **1-16** lipofilowość została wyznaczona metodą RP-TLC.

8.5.1. Metoda wysokosprawnej chromatografii cieczowej RP-HPLC

Wykorzystano zestaw do HPLC firmy Waters (Milford, USA), w którego skład wchodziły: dwie pompy (Waters 515 HPLC), kontroler przepływu (600S Flow Controller), detektor UV Waters 486 oraz injektor (Rheodyne 7161 firmy Cotali, CA, USA). Warunki pomiaru:

- Metoda elucji polikratycznej (badanie właściwości lipofilowych)

Kolumna chromatograficzna: LiChrospher C₁₈ (End-capped column) o wielkości ziaren 5 µm i wymiarach 250 × 4,6 mm (Merck, Darmstadt, Niemcy). Analizę prowadzono stosując przepływ 1 ml/min i fazę ruchomą zawierającą wodę oraz od 40% do 95% (v/v) acetonitrylu, przy każdorazowym wzroście zawartości modyfikatora organicznego o 5% (v/v). Czas pomiaru był uzależniony od czasu retencji związku. Na kolumnę wprowadzano po 5 µl roztworu badanych substancji o stężeniu 1 mg/ml. Związki rozpuszczono w mieszaninie acetonitryl/woda (50 : 50; v/v). W celu wyznaczenia czasu martwego kolumny (t₀) stosowano uracyl (Merck, Darmstadt, Niemcy), jako substancję niepodlegającą retencji. Pomiar absorbancji prowadzono przy długości fali λ_{max} = 214 nm.

Wartości współczynników pojemnościowych k obliczono wg wzoru:

$$k = (t_r - t_0) / t_0$$

gdzie:

t_r - czas retencji badanej substancji

t₀ - czas retencji związku nie ulegającego retencji (uracyl, Merck, Darmstadt, Niemcy)

Czasy retencji (t_r) zastosowane w obliczeniach były wielkościami średnimi wyznaczonymi na podstawie trzech pomiarów. W oparciu o metodę regresji liniowej, wyznaczone zostały chromatograficzne parametry log k_w , które opisuje równanie Soczewińskiego-Wachtmeister'a:¹⁸¹

$$\log k = \log k_w - S\varphi$$

gdzie:

φ - zawartość acetonitrylu w fazie ruchomej

S - nachylenie krzywej regresji

log k_w - znormalizowane chromatograficzne parametry lipofilowości

Znormalizowane chromatograficzne parametry lipofilowości log k_w zebrano w **Tabelach 1, 3, 4, 10, 13** (Rozdz. *Badania farmakologiczne*) i publikacjach 3 i 4 zamieszczonych w *Aneksie*.

8.5.2. Metoda chromatografii cienkowarstwowej RP-TLC.

Do badań lipofilowości metodą RP-TLC wybrano związki serii 2-azaspiro[4.4]nonano- (**1-8**) i 2-azaspiro[4.5]dekano-1,3-dionu (**9-16**). Szczegółowe dane dla związków **1-5**, **7-12** oraz **15** i **16** zostały opisane w publikacji 2 (*Aneks*). Lipofilowość pochodnych **5**, **6**, **13** i **14** wyznaczono w analogiczny sposób, a otrzymane wartości R_{M0} przedstawiono w **Tabeli 1**. (Rozdz. *Badania farmakologiczne*).

Chromatografię wykonano na płytkach chromatograficznych RP-18_{F254} o wymiarach 20 × 20 cm i grubości warstwy 0,25 mm firmy Merck (Darmstadt, Niemcy). Stosowano dwuskładnikowe układy rozwijające zawierające od 30% do 70% n-propanolu w 5% odstępach oraz bufor TRIS o pH=7,4. Na płytki nanoszono po 10 µl 1% roztworów chloroformowych badanych substancji. Dla każdego ze związków wykonano po trzy pomiary przy danym stężeniu modyfikatora organicznego w fazie ruchomej. Chromatograficzne parametry lipofilowości R_M obliczono stosując wzór:

$$R_M = \log (1/R_f - 1)$$

Liniowa zależność pomiędzy R_M i stężeniem n-propanolu w układzie rozwijającym pozwoliła wyznaczyć znormalizowane chromatograficzne parametry lipofilowości R_{M0} wg równania:

$$R_M = R_{M0} + Ac$$

gdzie:

R_M -chromatograficzny parametr lipofilowości

A -nachylenie krzywej regresji

c -zawartość n-propanolu w fazie ruchomej

R_{M0} -znormalizowany chromatograficzny parametr lipofilowości dla zerowej zawartości n-propanolu w fazie ruchomej

8.6. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną wykonano wykorzystując program komputerowy Statistica 7.0 (StatSoft, Inc.).

9. Piśmiennictwo

- ¹ Lima, L.M.; Barreiro, E.J. Bioisosterism: A useful strategy for molecular modification and drug design. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 23-49.
- ² Ho, B.; Venkatarangan, P.M.; Cruse, S.F.; Hinko, C.N.; Andersen, P.H.; Crider, A.M.; Adloo, A.A.; Roane, D.S.; Stables, J.P. Synthesis of 2-piperidinecarboxylic acid derivatives as potential anticonvulsants. *Eur. J. Med. Chem.* **1998**, *33*, 23-31.
- ³ Ho, B.; Crider, A.M.; Stables, J.P. Synthesis and structure-activity relationships of potential anticonvulsants based on 2-piperidinecarboxylic acid and related pharmacophores. *Eur. J. Med. Chem.* **2001**, *36*, 265-286.
- ⁴ Choi, D.; Stables, J.P.; Kohn, H. The anticonvulsant activities of functionalized *N*-benzyl 2-acetamidoacetamides. The importance of the 2-acetamido substituent. *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 2105-2114.
- ⁵ Choi, D.; Stables, J. P.; Kohn, H. Synthesis and anticonvulsant activities of *N*-benzyl-2-acetamidopropionamide derivatives. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 1907-1916.
- ⁶ Malawska, B.; Kulig, K.; Śpiwak, A.; Stables, J.P. Investigation into new anticonvulsant derivatives of α -substituted *N*-benzylamides of γ -hydroxy- and γ -acetoxybutyric acid. Part 5: Search for new anticonvulsant compounds. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 625-632.
- ⁷ Yogeewari, P.; Sriram, D.; Thirumurugan, R.; Raghavendran, J. V.; Sudhan, K.; Pavana, R. K.; Stables, J. Discovery of *N*-(2,6-dimethylphenyl)-substituted semicarbazones as anticonvulsants: Hybrid pharmacophore-based design. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6202-6211.
- ⁸ Bialer, M.; Johannessen, S.I.; Kupferberg, H.J.; Levy, R.H.; Loiseau, P.; Perucca, E. Progress report on new antiepileptic drugs: a summary of the Sixth Eilat Conference (EILAT VI). *Epilepsy Res.* **2002**, *51*, 31-71.
- ⁹ Wong, M.G.; Defina, J.A.; Andrews, P.R. Conformational analysis of clinically active anticonvulsant drugs. *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 562-572.
- ¹⁰ Tasso, S.M.; Bruno-Blanch, L.E.; Moon, S.C.; Estiú, G.L. Pharmacophore searching and QSAR analysis in the design of anticonvulsant drugs. *J. Mol. Struct. THEOCHEM* **2000**, *504*, 229-240.
- ¹¹ Estrada, E.; Peña, A. In silico studies for the rational discovery of anticonvulsant compounds. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 2755-2770.
- ¹² Merritt, H.H.; Putnam, T.J. A New series of anticonvulsant drugs tested by experiments on animals. *Arch. Neurol. Psychiatry* **1938**, *39*, 1003-1015.
- ¹³ Tunncliffe, G. Basis of the antiseizure action of phenytoin. *Gen. Pharmac.* **1996**, *27*, 1091-1097.
- ¹⁴ Davies, J.A. Mechanisms of action of antiepileptic drugs. *Seizure* **1995**, *4*, 267-272.
- ¹⁵ Söderpalm, B. Anticonvulsants: aspects of their mechanisms of action. *Eur. J. Pain* **2002**, *6* (Suppl. A) 3-9.

- ¹⁶ Ragsdale, D.S.; Scheuer, T.; Catterall, W.A. Frequency and voltage-dependent inhibition of type IIA Na⁺ channels, expressed in a mammalian cell line, by local anesthetic, antiarrhythmic, and anticonvulsant drugs. *Mol. Pharmacol.* **1991**, *40*, 756-765.
- ¹⁷ Twombly, D.A.; Yoshii, M.; Narahashi, T. Mechanisms of calcium channel block by phenytoin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1988**, *246*, 189-195.
- ¹⁸ Gatti, G.; Bonomi, I.; Jannuzzi, G.; Perucca, E. The new antiepileptic drugs: Pharmacological and clinical aspects. *Curr. Pharm. Des.* **2000**, *6*, 839-860.
- ¹⁹ McCorry, D.; Chadwick, D.; Marson, A. Current drug treatment of epilepsy in adults. *Lancet. Neurol.* **2004**, *3*, 729-735.
- ²⁰ Nadkarni, S.; LaJoie, J.; Devinsky, O. Current treatments of epilepsy. *Neurology* **2005**, *64* (Suppl. 3), S2-S11.
- ²¹ Greenwood, R.S. Adverse effects of antiepileptic drugs. *Epilepsia* **2000**, *41* (Suppl. 2), S42-S52.
- ²² Stella, V.J.; Nti-Addae, K.W. Prodrug strategies to overcome poor water solubility. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2007**, *59*, 677-694.
- ²³ Browne, T.R.; Kugler, A.R.; Eldon, M.A. Pharmacology and pharmacokinetics of fosphenytoin. *Neurology* **1996**, *46* (Suppl. 1), S3-S7.
- ²⁴ Brouillette, W.J.; Brown, G.B.; DeLorey, T.M.; Liang, G. Sodium channel binding and anticonvulsant activities of hydantoins containing conformationally constrained 5-phenyl substituents. *J. Pharm. Sci.* **1990**, *79*, 871-874.
- ²⁵ Thenmozhiyal, J.C.; Wong, P.T.-H.; Chui, W.-K. Anticonvulsant activity of phenylmethylene-hydantoins: A structure-activity relationship study. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1527-1535.
- ²⁶ Byrtus, H.; Obniska J.; Chlebek I.; Gajda, B. Synteza *N*-zasad Mannicha pochodnych imidazolidyno-2,4-dionu i pirolidyno-2,5-dionu o potencjalnym działaniu przeciwdrgawkowym. XX Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego, Katowice 25-28 wrzesień **2007**. Streszczenia, Tom II, str. 445.
- ²⁷ Rogawski, M.A.; Porter, R.J. Antiepileptic drugs: Pharmacological mechanisms and clinical efficacy with consideration of promising developmental stage compounds. *Pharmacol. Rev.* **1990**, *42*, 223-286.
- ²⁸ Twyman, R.E.; Rogers, C.J.; Macdonald, R.L. Differential regulation of gamma-aminobutyric acid receptor channels by diazepam and phenobarbital. *Ann. Neurol.* **1989**, *25*, 213-220.
- ²⁹ Kwan, P.; Sills, G.J.; Brodie, M.J. The mechanisms of action of commonly used antiepileptic drugs. *Pharmacol. Ther.* **2001**, *90*, 21-34.
- ³⁰ Rogawski, M.A.; Löscher, W. The neurobiology of antiepileptic drugs. *Nature Rev. Neurosci.* **2004**, *5*, 553-564.
- ³¹ Mathers, D.A.; Wan, X.; Puil, E. Barbiturate activation and modulation of GABA_A receptors in neocortex. *Neuropharmacol.* **2007**, *52*, 1160-1168.

- ³² Zhang, Y.-F.; Gibbs III, J.W.; Coulter, D.A. Anticonvulsant drug effects on spontaneous thalamocortical rhythms in vitro: Ethosuximide, trimethadione, and dimethadione. *Epilepsy Res.* **1996**, *23*, 15-36.
- ³³ Manning, J.-P.A.; Richards, D.A.; Bowery, N.G. Pharmacology of absence epilepsy. *Trends in Pharmacol. Sci.* **2003**, *24*, 542-549.
- ³⁴ Tanaka, E.; Kurata, N.; Yasuhara, H. Involvement of cytochrome P450 2C9, 2E1 and 3A4 in trimethadione *N*-demethylation in human microsomes. *J. Clin. Pharm. Ther.* **2003**, *28*, 493-496.
- ³⁵ Bailleux, V.; Vallee, L.; Nuyts, J.P.; Vamecq, J. Synthesis and anticonvulsant activity of some *N*-phenylphthalimides. *Chem. Pharm. Bull.* **1994**, *42*, 1817-1821.
- ³⁶ Vamecq, J.; Lambert, D.; Poupaert, J. H.; Masereel, B.; Stables, J.P. Anticonvulsant activity and interactions with neuronal voltage-dependent sodium channel of analogues of ameltolide. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 3307-3313.
- ³⁷ Vamecq, J.; Bac, P.; Herrenknecht, C.; Maurois, P.; Delcourt, P.; Stables, J.P. Synthesis and anticonvulsant and neurotoxic properties of substituted *N*-phenyl derivatives of the phthalimide pharmacophore. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1311-1319.
- ³⁸ Kenda, B.M.; Matagne, A.C.; Talaga, P.E.; Pasau, P.M.; Differding, E.; Lallemand, B.I.; Frycia, A.M.; Moureau, F.G.; Klitgaard, H.V.; Gillard, M.R.; Fuks, B.; Michel, P. Discovery of 4-substituted pyrrolidone butanamides as new agents with significant antiepileptic activity. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 530-549.
- ³⁹ Von Rosenstiel P. Briwaracetam (UCB 34714). *Neurotherapeutics* **2007**, *4*, 84-87.
- ⁴⁰ Malawska, B.; Kulig, K. Brivaracetam UCB. *Curr. Opin. Investig. Drugs* **2005**, *6*, 740-746.
- ⁴¹ Bennett, B.; Matagne, A.; Michel, P.; Leonard, M.; Cornet, M.; Meeus, M.A.; Toubanc, N. Seletacetam (UCB 44212). *Neurotherapeutics* **2007**, *4*, 117-122.
- ⁴² Pollard, J.R. Seletacetam, a small molecule SV2A modulator for the treatment of epilepsy. *Curr. Opin. Investig. Drugs* **2008**, *9*, 101-107.
- ⁴³ Bialer, M.; Johannessen, S.I.; Kupferberg, H.J.; Levy, R.H.; Perucca, E.; Tomson, T. Progress report on new antiepileptic drugs: A summary of the Eighth Eilat Conference (EILAT VIII). *Epilepsy Res.* **2007**, *73*, 1-52.
- ⁴⁴ Klitgaard, H. Levetiracetam: the preclinical profile of a new class of antiepileptic drugs? *Epilepsia* **2001**, *42* (Suppl. 4), 13-18.
- ⁴⁵ Löscher, W.; Hönack, D.; Rundfeld, C. Antiepileptogenic effects of the novel anticonvulsant levetiracetam (ucb L059) in the kindling model of temporal lobe epilepsy. *J. Pharm. Exp. Ther.* **1998**, *284*, 474-479.
- ⁴⁶ Gillard, M.; Chatelain, P.; Fuks, B. Binding characteristics of levetiracetam to synaptic vesicle protein 2A (SV2A) in human brain and in CHO cells expressing the human recombinant protein. *Eur. J. Pharmacol.* **2006**, *536*, 102-108.
- ⁴⁷ Lynch, B.A.; Lambeng, N.; Nocka, K.; Kensel-Hammes, P.; Bajjalieh, S.M.; Matagne, A.; Fuks, B. The synaptic vesicle protein SV2A is the binding site for the antiepileptic drug levetiracetam. *PNAS* **2004**, *101*, 9861-9866.

- ⁴⁸ Madeja, M.; Margineanu, D.G.; Gorji, A.; Siep, E.; Boerrigter, P.; Klitgaard, H.; Speckmann, E.J. Reduction of voltage-operated potassium currents by levetiracetam: a novel antiepileptic mechanism of action? *Neuropharmacol.* **2003**, *45*, 661-671.
- ⁴⁹ Pisani, A.; Bonsi, P.; Martella, G.; De Persis, C.; Costa, C.; Pisani, F.; Bernardi, G.; Calabresi, P. Intracellular calcium increase in epileptiform activity: modulation by levetiracetam and lamotrigine. *Epilepsia* **2004**, *45*, 719-728.
- ⁵⁰ Mazza, M.; Martini, A.; Scoppetta, M.; Mazza, S. Effect of levetiracetam on depression and anxiety in adult epileptic patients. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **2008**, *32*, 539-543.
- ⁵¹ Stefan, H.; Feuerstein, T.J. Novel anticonvulsant drugs. *Pharmacol. Therap.* **2007**, *113*, 165-183.
- ⁵² Yasar, S.; Bergman, J.; Munzar, P.; Redhi, G.; Tober, C.; Knebel, N.; Zschiesche, M.; Paronim, C. Evaluation of the novel antiepileptic drug, AWD 131-138, for benzodiazepine-like discriminative stimulus and reinforcing effects in squirrel monkeys. *Eur. J. Pharmacol.* **2003**, *465*, 257-265.
- ⁵³ Bialer, M.; Johannessen, S.I.; Kupferberg, H.J.; Levy, R.H.; Loiseau, P.; Perucca, E. Progress report on new antiepileptic drugs: a summary of the Fifth Eilat Conference (EILAT V). *Epilepsy Res.* **2001**, *43*, 11-58.
- ⁵⁴ Blin, O. A comparative review of new antipsychotics. *Can. J. Psychiatry* **1999**, *44*, 235-244.
- ⁵⁵ Lieberman, J.A.; Stroup, S.T.; McEvoy, J.P.; Swartz, M.S.; Rosenheck, R.A.; Perkins, D.O.; Keefe, R.S.E.; Davis, S.M.; Davis, C.E.; Lebowitz, B.D.; Severe, J.; Hsiao, J.K. Effectiveness of antipsychotic drugs in patients with chronic schizophrenia. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *353*, 1209-1223.
- ⁵⁶ Miyamoto, S.; Duncan, G.E.; Marx, C.E.; Lieberman, J.A. Treatments for schizophrenia: a critical review of pharmacology and mechanisms of action of antipsychotic drugs. *Mol. Psychiatry* **2005**, *10*, 79-104.
- ⁵⁷ Kapur, S.; Remington, G. Serotonin-dopamine interaction and its relevance to schizophrenia. *Am. J. Psychiatry* **1996**, *153*, 466-476.
- ⁵⁸ Richelson, E.; Souder, T. Binding of antipsychotic drugs to human brain receptors. Focus on newer generation compounds. *Life Sci.* **2000**, *68*, 29-39.
- ⁵⁹ Janssen, P.A.J.; Niemegeers, C.J.E.; Awouters, F.; Schellekens, K.H.L.; Megens, A.A.H.P.; Meert, T.F. Pharmacology of risperidone (R 64 766), a new antipsychotic with serotonin-5HT₂ and dopamine-D₂ antagonistic properties. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1988**, *244*, 685-693.
- ⁶⁰ Megens, A.A.H.P.; Awouters, F.H.L.; Meert, T.F.; Schellekens, K.H.L.; Niemegeers, C.J.E.; Janssen, P.A.J. Pharmacological profile of the new potent neuroleptic ocapiridone (R 79 598). *J. Exp. Pharmacol. Ther.* **1992**, *260*, 146-159.
- ⁶¹ Dolder, C.; Nelson, M.; Deyo, Z. Paliperidone for schizophrenia. *Am. J. Health Syst. Pharm.* **2008**, *65*, 403-413.
- ⁶² Perregaard, J.; Arnt, J.; Bøgesø, K.P.; Hyttel, J.; Sánchez, C. Noncataleptogenic, centrally acting dopamine D₂ and serotonin 5-HT₂ antagonists within a series of 3-substituted 1-(4-fluorophenyl)-1H-indoles. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 1092-1101.

- ⁶³ Bøgesø, K.P.; Arnt, J.; Boeck, V.; Vibeke Christensen, A.; Hyttel, J.; Gundertofte Jensen, K. Antihypertensive activity in a series of 1-piperazino-3-phenylindans with potent 5-HT₂-antagonistic activity. *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 2247-2256.
- ⁶⁴ Bøgesø, K.P. Neuroleptic activity and dopamine-uptake inhibition in 1-piperazino-3-phenylindans. *J. Med. Chem.* **1983**, *26*, 935-947.
- ⁶⁵ Perregaard, J.; *Jpn. Kokai Tokkyo Koho* JP 5989661, **1984**; *Chem. Abstr.* **1985**, *102*, 24484m.
- ⁶⁶ Meltzer, H.Y. The role of serotonin in antipsychotic drug action. *Neuropsychopharmacol.* **1999**, *21* (Suppl. 2), S106-S115.
- ⁶⁷ Yevich, J.P.; New, J.S.; Smith, D.W.; Lobeck, W.G.; Catt, J.D.; Minielli, J.L.; Eison, M.S.; Taylor, D.P.; Riblet, L.A.; Temple, Jr., D.L. Synthesis and biological evaluation of 1-(1,2-benzisothiazol-3-yl)- and (1,2-benzisoxazol-3-yl)piperazine derivatives as potential antipsychotic agents. *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 359-369.
- ⁶⁸ Proudfoot, J.R. Drugs, leads, and drug-likeness: An analysis of some recently launched drugs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 1647-1650.
- ⁶⁹ Ishizumi, K.; Kojima, A.; Antoku, F.; Saji, I.; Yoshigi, M. Succinimide derivatives. II. Synthesis and antipsychotic activity of *N*-[4-[4-(1,2-benzisothiazol-3-yl)-1-piperazinyl]butyl]1,2-cis-cyclohexane-dicarboximide (SM-9018) and related compounds. *Chem. Pharm. Bull.* **1995**, *43*, 2139-2151.
- ⁷⁰ De Paulis, T. Perospirone (Sumitomo Pharmaceuticals). *Curr. Opin. Invest. Drugs* **2002**, *3*, 121-129.
- ⁷¹ Armer, R.; Miller, D.J. Recent advances in atypical antipsychotics. *Curr. Opin. Invest. Drugs* **2000**, *1*, 481-493.
- ⁷² Clinical Trials.gov (The U.S. National Institutes of Health) (<http://clinicaltrials.gov/search/intervention=sm-13496>).
- ⁷³ Howard, H.R.; Lowe, J.A., III; Seeger, T.F.; Seymour, P.A.; Zorn, S.H.; Maloney, P.R.; Ewing, F.E.; Newman, M.E.; Schmidt, A.W.; Furman, J.S.; Robinson, G.L.; Jackson, E.; Johnson, C.; Morrone, J. 3-Benzisothiazolylpiperazine derivatives as potential atypical antipsychotic agents. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 143-148.
- ⁷⁴ Newman-Tancredi, A.; Gavaudan, S.; Conte, C.; Chaput, C.; Touzard, M.; Verrielle, L.; Audinot, V.; Millan, M.J. Agonist and antagonist actions of antipsychotic agents at 5-HT_{1A} receptors: a [³⁵S]GTPγS binding study. *Eur. J. Pharmacol.* **1998**, *355*, 245-256.
- ⁷⁵ Wetterling, T. Body weight gain with atypical antipsychotics. A comparative review. *Drug Safety* **2001**, *24*, 59-73.
- ⁷⁶ Smid, P.; Coolen, H.K.A.C.; Keizer, H.G.; van Hes, R.; de Moes, J.P.; den Hartog, A.P.; Stork, B.; Plekkenpol, R.H.; Niemann, L.C.; Stroome, C.N.J.; Tulp, M.Th.M.; van Stuivenberg, H.H.; McCreary, A.C.; Hesselink, M.B.; Herremans, A.H.J.; Kruse, C.G. Synthesis, structure-activity relationships, and biological properties of 1-heteroaryl-4-[ω-(1*H*-indol-3-yl)alkyl]piperazines, novel potential antipsychotics combining potent dopamine D₂ receptor antagonism with potent serotonin reuptake inhibition. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6855-6869.
- ⁷⁷ Gueremy, C.; Audiau, F.; Champseix, A.; Uzan, A.; Le Fur, G.; Rataud, J. 3-(4-Piperidinylalkyl)-indoles, selective inhibitors of neuronal 5-hydroxytryptamine uptake. *J. Med. Chem.* **1980**, *23*, 1306-1310.

- ⁷⁸ van Hes, R.; Smid, P.; Stroomer, C.N.J.; Tipker, K.; Tulp, M.Th.M.; van der Heyden, J.A.M.; McCreary, A.C.; Hesselink, M.B.; Kruse, C.G. SLV310, a novel, potential antipsychotic, combining potent dopamine D₂ receptor antagonism with serotonin reuptake inhibition. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 405-408.
- ⁷⁹ Mealy, N.E.; Bayes M. SLV-310/SLV-313/SLV-314. *Drugs Fut.* **2004**, *29*, 972.
- ⁸⁰ Middlemiss, D.N.; Price, G.W.; Watson, J.M. Serotonergic targets in depression. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2002**, *2*, 18-22.
- ⁸¹ Michelson, D.; Bancroft, J.; Targum, S.; Kim, Y.; Tepner, R. Female sexual dysfunction associated with antidepressant administration. A randomised, placebo-controlled study of pharmacologic intervention. *Am. J. Psychiatry* **2000**, *157*, 239-243.
- ⁸² Ekselius, L.; von Knorring, L. Effect on sexual function of long-term treatment with selective serotonin reuptake inhibitors in depressed patients treated in primary care. *J. Clin. Psychopharmacol.* **2001**, *21*, 154-160.
- ⁸³ Wafford, K.A. GABA_A receptor subtypes: any clues to the mechanism of benzodiazepine dependence? *Curr. Opin. Pharmacol.* **2005**, *5*, 47-52.
- ⁸⁴ Yao-Hua, Wu.; Rayburn, J.W.; Allen, L.E.; Ferguson, H.C.; Kissel, J.W. Psychosedative agents. 2. 8-(4-Substituted 1-piperazinylalkyl)-8-azaspiro[4.5]decane-7,9-diones. *J. Med. Chem.* **1972**, *15*, 477-479.
- ⁸⁵ Yao-Hua, Wu.; Smith, K.R.; Rayburn, J.W.; Kissel, J.W. Psychosedative agents. *N*-(4-phenyl-1-piperazinyl-alkyl)-substituted cyclic imides. *J. Med. Chem.* **1969**, *12*, 876-881.
- ⁸⁶ Yocca, F.; Altar, C.A. Partial agonism of dopamine, serotonin and opiate receptors for psychiatry. *DDT* **2006**, *3*, 429-435.
- ⁸⁷ De Vry, J. 5-HT_{1A} receptor agonists: recent developments and controversial issues. *Psychopharmacology (Berl)* **1995**, *121*, 1-26.
- ⁸⁸ Becker, O.M.; Dhanoa, D.S.; Marantz, Y.; Chen, D.; Shacham, S.; Cheruku, S.; Heifetz, A.; Mohanty, P.; Fichman, M.; Sharadendu, A.; Nudelman, R.; Kauffman, M.; Noiman, S. An integrated in silico 3D model-driven discovery of a novel, potent, and selective amidosulfonamide 5-HT_{1A} agonist (PRX-00023) for the treatment of anxiety and depression. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 3116-3135.
- ⁸⁹ Yevich, J.P.; Temple, D.L.; New, J.S.; Taylor, D.P.; Riblet, L.A. Buspirone analogs. 1. Structure-activity relationships in a series of *N*-aryl- and heteroarylpiperazine derivatives. *J. Med. Chem.* **1983**, *26*, 194-203.
- ⁹⁰ Abou-Gharbia, M.; Patel, U.R.; Webb, M.B.; Moyer, J.A.; Andree, T.H.; Muth, E.A. Polycyclic aryl- and heteroarylpiperazinyl imides as 5-HT_{1A} receptor ligands and potential anxiolytic agents: synthesis and structure-activity relationship studies. *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 1382-1392.
- ⁹¹ Ishizumi, K.; Kojima, A.; Antoku, F. Synthesis and anxiolytic activity of *N*-substituted cyclic imides (1R*,2S*,3R*,4S*)-*N*-[4-[4-(2-pyrimidinyl)-1-piperazinyl]butyl]-2,3-bicyclo[2.2.1]heptane-dicarboximide (tandospirone) and related compounds. *Chem. Pharm. Bull.* **1991**, *39*, 2288-2300.
- ⁹² Caccia, S.; Conti, I.; Viganò, G.; Garattini, S. 1-(2-Pyrimidinyl)-piperazine as active metabolite of buspirone in man and rat. *Pharmacol.* **1986**, *33*, 46-51.

- ⁹³ Bianchi, G.; Caccia, S.; Della Vedova, F.; Garattini, S. The alpha 2-adrenoceptor antagonist activity of ipsapirone and gepirone is mediated by their common metabolite 1-(2-pyrimidinyl)-piperazine (PmP). *Eur. J. Pharmacol.* **1988**, *151*, 365-371.
- ⁹⁴ Astier, B.; Lambás Señas, L.; Soulière, F.; Schmitt, P.; Urbain, N.; Rentero, N.; Bert, L.; Denoroy, L.; Renaud, B.; Lesourd, M.; Muñoz, C.; Chouvet, G. In vivo comparison of two 5-HT_{1A} receptors agonists alnespirone (S-20499) and buspirone on locus coeruleus neuronal activity. *Eur. J. Pharmacol.* **2003**, *459*, 17-26.
- ⁹⁵ Casanovas, J.M.; Lésourd, M.; Artigas, F. The effect of the selective 5-HT_{1A} agonists alnespirone (S-20499) and 8-OH-DPAT on extracellular 5-hydroxytryptamine in different regions of rat brain. *Br. J. Pharmacol.* **1997**, *122*, 733-741.
- ⁹⁶ Cervo, L.; Munoz, C.; Bertaglia, A.; Samanin, R. Alnespirone and buspirone have anxiolytic-like effects in a conflict procedure in rats by stimulating 5-HT_{1A} receptors. *Behav. Pharmacol.* **2000**, *11*, 153-160.
- ⁹⁷ De Boer, S.F.; Lesourd, M.; Mocoer, E.; Koolhaas, J.M. Selective antiaggressive effects of alnespirone in resident-intruder test are mediated via 5-hydroxytryptamine_{1A} receptors: A comparative pharmacological study with 8-hydroxy-2-dipropylaminotetralin, ipsapirone, buspirone, eltopracine, and WAY-100635. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1999**, *288*, 1125-1133.
- ⁹⁸ Mokrosz, J. L.; Dereń-Wesołek, A.; Tatarczyńska, E.; Duszyńska, B.; Bojarski, A. J.; Mokrosz, M. J.; Chojnacka-Wójcik, E. 8-[4-[2-(1,2,3,4-Tetrahydroisoquinolinyl)]butyl]-8-azaspiro[4.5]decane-7,9-dione: A new 5-HT_{1A} receptor ligand with the same activity profile as buspirone. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 1125-1129.
- ⁹⁹ Glennon, R.A.; Naiman, N.A.; Lyon, R.A.; Titeler, M. Arylpiperazine derivatives as high-affinity 5-HT_{1A} serotonin ligands. *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 1968-1971.
- ¹⁰⁰ Mokrosz, M.J.; Chojnacka-Wójcik, E.; Tatarczyńska, E.; Kłodzińska, A.; Filip, M.; Boksa, J.; Charakchieva-Minol, S.; Mokrosz, J.L. 1-(2-Methoxyphenyl)-4-[(4-succinimido)butyl]-piperazine (MM-77): A new, potent, postsynaptic antagonist of 5-HT_{1A} receptors. *Med. Chem. Res.* **1994**, *4*, 161-169.
- ¹⁰¹ Paluchowska, M.H.; Bugno, R.; Bojarski, A.J.; Charakchieva-Minol, S.; Duszyńska, B.; Tatarczyńska, E.; Kłodzińska, A.; Stachowicz, K.; Chojnacka-Wójcik, E. Novel, flexible, and conformationally defined analogs of gepirone: synthesis and 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, and D₂ receptor activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 1195-1200.
- ¹⁰² Zajdel, P.; Subra, G.; Bojarski, A.J.; Duszyńska, B.; Tatarczyńska, E.; Nikiforuk, A.; Chojnacka-Wójcik, E.; Pawłowski, M.; Martineza, J. Novel class of arylpiperazines containing N-acylated amino acids: Their synthesis, 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} receptor affinity, and in vivo pharmacological evaluation. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 2907-2919.
- ¹⁰³ Pinder, R.M.; Wieringa, J.H. Third-generation antidepressants. *Med. Res. Rev.* **1993**, *13*, 259-325.
- ¹⁰⁴ Sánchez, C.; Hyttel, J. Comparison of the effects of antidepressants and their metabolites on reuptake of biogenic amines and on receptor binding. *Cell. Mol. Neurobiol.* **1999**, *14*, 467-489.
- ¹⁰⁵ Gilligan, P.J.; Robertson, D.W.; Zaczek, R. Corticotropin Releasing Factor (CRF) Receptor modulators: progress and opportunities for new therapeutic agents. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1641-1660.

- ¹⁰⁶ Broekkamp, C.L.E.; Leysen, D.; Peeters, B.W.M.M.; Pinder, R.M. Prospects for improved antidepressants. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 4615-4633.
- ¹⁰⁷ Hernandez, J.F.; Kornreich, W.; Rivier, C.; Miranda, A.; Yamamoto, G.; Andrews, J.; Tache, Y.; Vale, W.; Rivier, J. Synthesis and relative potencies of new constrained CRF antagonists. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 2860-2867.
- ¹⁰⁸ Rivier, J.; Rivier, C.; Galyean, R.; Miranda, A.; Miller, C.; Grey Craig, A.; Yamamoto, G.; Brown, M.; Vale, W. Single point D-substituted corticotropin-releasing factor analogs: effects on potency and physicochemical characteristics. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 2851-2859.
- ¹⁰⁹ Abreu, M.E.; Rzeszutarski, Kyle, D.J.; Hiner, R.N.; Elliott, R.L. Corticotropin-releasing factor antagonism compounds. U.S. Patent 5063245, **1991**.
- ¹¹⁰ Dzierba, C.D.; Takvorian, A.G.; Rafalski, M.; Kasireddy-Polam, P.; Wong, H.; Molski, T.F.; Zhang, G.; Li, Y.W.; Lelas, S.; Peng, Y.; McElroy, J.F.; Zaczek, R.C.; Taub, R.A.; Combs, A.P.; Gilligan, P.J.; Trainor, G.L. Synthesis, structure-activity relationships, and in vivo properties of 3,4-dihydro-1H-pyrido[2,3-b]pyrazin-2-ones as Corticotropin-Releasing Factor-1 receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 5783-5790.
- ¹¹¹ Dzierba, C.D.; Tebben, A.J.; Wilde, R.G.; Takvorian, A.G.; Rafalski, M.; Kasireddy-Polam, P.; Klaczkiwicz, J.D.; Pechulis, A.D.; Davis, A.L.; Sweet, M.P.; Woo, A.M.; Yang, Z.; Ebeltoft, S.M.; Molski, T.F.; Zhang, G.; Zaczek, R.C.; Trainor, G.L.; Combs, A.P.; Gilligan, P.J. Dihydropyridopyrazinones and dihydropteridinones as Corticotropin-Releasing Factor-1 receptor antagonists: Structure-activity relationships and computational modeling. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 2269-2272.
- ¹¹² Rupniak, N.M.J. New insight into antidepressant actions of substance P (NK₁ receptor) antagonists. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **2002**, *80*, 489-494.
- ¹¹³ Kramer, M.S.; Cutler, N.; Feighner, J.; Shrivastava, R.; Carman, J.; Sramek, J.J.; Reines, S.A.; Liu, G.; Snively, D.; Wyatt-Knowles, E.; Hale, J.J.; Mills, S.G.; MacCoss, M.; Swain, C.J.; Harrison, T.; Hill, R.G.; Hefti, F.; Scolnick, E.M.; Cascieri, M.A.; Chicchi, G.G.; Sadowski, S.J.; Williams, A.R.; Hewson, L.; Smith, D.; Carlson, E.J.; Hargreaves, R.J.; Rupniak, N.M.J. Distinct mechanism for antidepressant activity by blockade of central substance P receptors. *Science* **1998**, *281*, 1640-1645.
- ¹¹⁴ Van den Hoogenband, A.; van Maarseveen, J.H.; McCreary, A.C.; Mulder, A.T.; Scharrenburg, G.J.M.; van Stuivenberg, H.H.; Zethof, T.J.J.; Ziuta, B.; Bakker, W.I.I. Piperazinyl oxime ethers as NK-1 receptor antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 1045-1048.
- ¹¹⁵ Pacher, P.; Kecskemeti, V. Trends in the development of new antidepressants. Is there a light at the end of the tunnel? *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 925-943.
- ¹¹⁶ Fujimaki, K.; Morinobu, S.; Duman, R.S. Administration of a cAMP phosphodiesterase 4 inhibitor enhances antidepressant-induction of BDNF mRNA in rat hippocampus. *Neuropsychopharmacol.* **2000**, *22*, 42-51.
- ¹¹⁷ Sieghart, W.; Sperk, G. Subunit composition, distribution and function of GABA_A receptor subtypes. *Curr. Top. Med. Chem.* **2002**, *2*, 795-816.
- ¹¹⁸ Löw, K.; Crestani, F.; Keist, R.; Benke, D.; Brünig, I.; Benson, J.A.; Fritschy, J.-M.; Rüllicke, T.; Bluethmann, H.; Möhler, H.; Rudolph, U. Molecular and neuronal substrate for the selective attenuation of anxiety. *Science* **2000**, *290*, 131-134.

- ¹¹⁹ Dias, R.; Sheppard, W.F.A.; Fradley, R.L.; Garrett, E.M.; Stanley, J.L.; Tye, S.J.; Goodacre, S.; Lincoln, R.J.; Tye, S.J.; Cook, S.; Conley, R.; Hallett, D.; Humphries, A.C.; Thompson, S.A.; Wafford, K.A.; Street, L.J.; Castro, J.L.; Whiting, P.J.; Rosahl, T.W.; Atack, J.R.; McKernan, R.; Dawson, G.R.; Reynolds, D.S.; Evidence for a significant role of α_3 -containing GABA_A receptors in mediating the anxiolytic effects of benzodiazepines. *J. Neurosci.* **2005**, *25*, 10682-10688.
- ¹²⁰ McKernan, R.M.; Rosahl, T.W.; Reynolds, D.S.; Sur, C.; Wafford, K.A.; Atack, J.R.; Farrar, S.; Myers, J.; Cook, G.; Ferris, P.; Garrett, L.; Bristow, L.; Marshall, G.; Macaulay, A.; Brown, N.; Howell, O.; Moore, K.W.; Carling, R.W.; Street, L.J.; Castro, J.L.; Ragan, C.I.; Dawson, G.R.; Whiting, P.J. Sedative but not anxiolytic properties of benzodiazepines are mediated by the GABA_A receptor α_1 subtype. *Nature Neurosci.* **2000**, *3*, 587-592.
- ¹²¹ Atack, J.R.; Pike, A.; Marshall, G.; Stanley, J.; Lincoln, R.; Cook, S.M.; Lewis, R.T.; Blackaby, W.P.; Goodacre, S.C.; McKernan, R.M.; Dawson, G.R.; Wafford, K.A.; Reynolds, D.S. The in vivo properties of pagoclone in rat are most likely mediated by 5'-hydroxy pagoclone. *Neuropharmacol.* **2006**, *50*, 677-689.
- ¹²² Korpi, E.R.; Gründer, G.; Lüddens, H.; Drug interactions at GABA_A receptors. *Prog. Neurobiol.* **2002**, *67*, 113-159.
- ¹²³ Sanger, D.J. The pharmacology and mechanisms of action of new generation, non-benzodiazepine hypnotic agents. *CNS Drugs* **2004**, *18* (Suppl. 1) S9-S15.
- ¹²⁴ Carlson, J.N.; Haskew, R.; Wacker, J.; Maisonneuve, I.M.; Glick, S.D.; Jerussi, T.P. Sedative and anxiolytic effects of zopiclone's enantiomers and metabolite. *Eur. J. Pharmacol.* **2001**, *415*, 181-189.
- ¹²⁵ Porche, D. Thalidomide: The past, present, and future. *JANAC* **1999**, *10*, 82-84.
- ¹²⁶ Franks, M.E.; Macpherson, G.R.; Figg, W.D. Thalidomide. *Lancet* **2004**, *363*, 1802-1811.
- ¹²⁷ Löscher, W.; Schmidt, D. New horizons in the development of antiepileptic drugs. *Epilepsy Res.* **2002**, *50*, 3-16.
- ¹²⁸ Tomson, T.; Battino, D. Teratogenic effects of antiepileptic drugs. *Seizure* **2008**, *17*, 166-171.
- ¹²⁹ Brodie, M.J. Do we need any more new antiepileptic drugs? *Epilepsy Res.* **2001**, *45*, 3-6.
- ¹³⁰ Shimshoni, J.A.; Bialer, M.; Wlodarczyk, B.; Finnell, R.H.; Yagen, B. Potent anticonvulsant urea derivatives of constitutional isomers of valproic acid. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 6419-6427.
- ¹³¹ Thenmozhiyal, J. C.; Wong, P. T.-H.; Chui, W.-K. Anticonvulsant activity of phenylmethylenhydantoins: A structure-activity relationship study. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1527-1535.
- ¹³² Benes, J.; Parada, A.; Figueiredo, A.A.; Alves, P.C.; Freitas, A.P.; Learmonth, D.A.; Cunha, R.A.; Garrett, J.; Soares-da-Silva, P. Anticonvulsant and sodium channel-blocking properties of novel 10,11-dihydro-5H-dibenz[b,f]azepine-5-carboxamide derivatives. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 2582-2587.
- ¹³³ Mazarati, A.M.; Sofia, R.D.; Wasterlain, C.G. Anticonvulsant and antiepileptogenic effects of fluorofelbamate in experimental status epilepticus. *Seizure* **2002**, *11*, 423-430.
- ¹³⁴ Dimmock, J.R.; Puthucode, R.N.; Smith, J.M.; Hetherington, M.; Quail, J.W.; Pugazhenth, U.; Lechler, T.; Stables, J.P. (Aryloxy)aryl semicarbazones and related compounds: A novel class of

anticonvulsant agents possessing high activity in the maximal electroshock screen. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 3984-3997.

¹³⁵ Dimmock, J.R.; Pandeya, S.N.; Quail, J.W.; Pugazhenth, U.; Allen, T.M.; Kao, G.Y.; Balzarini, J.; DeClercq, E. Evaluation of the semicarbazones, thiosemicarbazones and bis-carbohydrazones of some aryl alicyclic ketones for anticonvulsant and other biological properties. *Eur. J. Med. Chem.* **1995**, *30*, 303-314.

¹³⁶ Obniska, J.; Zagórska, A. Synthesis and anticonvulsant properties of new *N*-[(4-arylpiperazin-1-yl)-methyl] derivatives of 3-aryl pyrrolidine-2,5-dione and 2-azaspiro[4.4]nonane-1,3-dione. *Il Farmaco* **2003**, *58*, 1227-1234.

¹³⁷ Zejc, A.; Obniska, J.; Wilimowski, M.; Rutkowska, M.; Witkowska, M.; Barczyńska, J.; Kędzierska-Goździk, L.; Wojewódzki, W.; Orzechowska-Juzwenko, K.; Pławiak, T.; Duś, E.; Gryśka, J.; Gliniak, H. Synthesis and anticonvulsant properties of some arylsuccinate methylpyridyl imides. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.* **1990**, *42*, 69-77.

¹³⁸ Obniska, J.; Jurczyk, S.; Zejc, A.; Kamiński, K.; Tatarczyńska, E.; Stachowicz, K. Anticonvulsant properties of *N*-(4-methylpiperazin-1-yl)- and *N*-[3-(4-methylpiperazin-1-yl)propyl] derivatives of 3-aryl- and 3-spirocycloalkyl-pyrrolidine-2,5-dione. *Pharmacol. Rep.* **2005**, *57*, 170-175.

¹³⁹ Alexander, M.S.; Stables, J.P.; Ciechanowicz-Rutkowska, M.; Hursthouse, M.B.; Hibbs, D.E.; Edafiogho, I.O.; Farrar, V.A.; Moore, J.A.; Scott, K.R. Spiranes 6. Ring A homologues of *N*-benzyloxy-2-azaspiro[4.4]nonane-1,3-dione. Synthesis, X-ray analysis and anticonvulsant evaluation. *Eur. J. Med. Chem.* **1996**, *31*, 787-795.

¹⁴⁰ Edafiogho, I.O.; Scott, K.R.; Moore, J.A.; Farrar, V.A.; Nicholson, J.M. Synthesis and anticonvulsant activity of imidooxy derivatives. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 387-392.

¹⁴¹ Farrar, V.A.; Ciechanowicz-Rutkowska, M.; Grochowski, J.; Serda, P.; Pilati, T.; Filippini, G.; Hinko, C.F.; El-Assadi, A.; Moore, J.A.; Edafiogho, I.O.; Andrews, W.; Cory, M.; Nicholson, J.M.; Scott, K.R. Synthesis and calculated log P correlation of imidooxy anticonvulsants. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 3517-3525.

¹⁴² Obniska, J.; Kamiński, K.; Zagórska, A.; Dzierżawska-Majewska, A.; Karolak-Wojciechowska, J. Synthesis and anticonvulsant activity of new fluorinated *N*-phenyl- and *N*-benzyl-2-azaspiro[4.4]nonane- and [4.5]decane-1,3-dione derivatives: Part III *J. Fluorine Chem.* **2006**, *127*, 417-425.

¹⁴³ Obniska, J.; Dzierżawska-Majewska, A.; Zagórska, A.; Zajdel, P.; Karolak-Wojciechowska, J. Synthesis, physicochemical and anticonvulsant properties of *N*-benzyl and *N*-aminophenyl derivatives of 2-azaspiro[4.4]nonane and [4.5]decane-1,3-dione. Part I. *Il Farmaco* **2005**, *60*, 529-539.

¹⁴⁴ Kamiński, K.; Obniska, J.; Zagórska, A.; Maciąg, D. Synthesis, physicochemical and anticonvulsant properties of new *N*-(pyridine-2-yl) derivatives of 2-azaspiro[4.4]nonane and [4.5]decane-1,3-dione. Part II. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2006**, *339*, 255-261.

¹⁴⁵ Scott, K.R.; Moore, J.A.; Zalucky, T.B.; Nicholson, J.M.; Lee, J.A.M.; Hinko, C.N. Spiro[4.5] and spiro[4.6] carboxylic acids: cyclic analogs of valproic acid synthesis and anticonvulsant evaluation. *J. Med. Chem.* **1985**, *28*, 413-417.

¹⁴⁶ Le Moal, H.; Foucaud, A.; Carrié, R.; Hamelin, J.; Sévellec, C. Recherches sur la structure les propriétés physicochimiques des acides succiniques dissymétriquement substitués. I.-Préparation des acides succiniques mono- et α,α -disubstitués. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1964**, 579-584.

- ¹⁴⁷ Harding, V.J.; Haworth, W.N. The synthesis of Δ^1 -cyclopenteneacetic acid and 1-methyl- Δ^2 -cyclohexane-3-acetic acid. *J. Chem. Soc.* **1910**, 97, 486-498.
- ¹⁴⁸ Smith, P.A.S.; Horowitz, J.P. A Synthesis for unsymmetrically substituted succinic acids. *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, 71, 3418-3419.
- ¹⁴⁹ Le Moal, H. Recherches dans la série des diacides α,α -disubstitués et de leurs derives. Étude physico-chimique de la structure de quelques diacides organiques α - et α,α -disubstitués. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1956**, 1, 418-424.
- ¹⁵⁰ Miller, C.A.; Long L.M. Anticonvulsants. I. An Investigation of *N*-R- α -R1- α -phenylsuccinimides. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, 73, 4895-4898.
- ¹⁵¹ Miller, C.A.; Long L.M. Anticonvulsants. III. A Study of *N*, α , β -Alkylsuccinimides. *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, 75, 373-375.
- ¹⁵² De Deyn, P.P.; D'Hooge R.; Marescau, B.; Pei, Y.Q. Chemical models of epilepsy with some reference to their applicability in the development of anticonvulsants. *Epilepsy Res.* **1992**, 12, 87-110.
- ¹⁵³ Fisher, R.S. Animal models of epilepsy. *Brain Res. Rev.* **1989**, 14, 245-278.
- ¹⁵⁴ Löscher, W.; Schmidt, D. Which animal model should be used in the search for new antiepileptic drugs? A proposal based on experimental and clinical considerations. *Epilepsy Res.* **1988**, 2, 145-181.
- ¹⁵⁵ Rogawski, M.A. Molecular targets versus models for new antiepileptic drug discovery. *Epilepsy Res.* **2006**, 68, 23-26.
- ¹⁵⁶ Kaminski, R.M.; Livingood, M.R.; Rogawski, M.A. Allopregnanolone analogs that positively modulate GABA receptors protect against partial seizures induced by 6-Hz electrical stimulation in mice. *Epilepsia* **2004**, 45, 864-867.
- ¹⁵⁷ Matagne, A.; Klitgaard, H. Validation of corneally kindled mice: a sensitive screening model for partial epilepsy in man. *Epilepsy Res.* **1998**, 31, 59-71.
- ¹⁵⁸ Barton, M.E.; Klein, B.D.; Wolf, H.H.; White, H.S. Pharmacological characterization of the 6 Hz psychomotor seizure model of partial epilepsy. *Epilepsy Res.* **2001**, 47, 217-227.
- ¹⁵⁹ Löscher, W.; Hönack, D.; Rundfeldt, C. Antiepileptogenic effects of the novel anticonvulsant Levetiracetam (ucb L059) in the kindling model of temporal lobe epilepsy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1998**, 284, 474-479.
- ¹⁶⁰ Löscher, W. New vision in the pharmacology of anticonvulsion. *Eur. J. Pharmacol.* **1998**, 342, 1-13.
- ¹⁶¹ Kupferberg, H.J. Antiepileptic drug development program: A cooperative effort of government and industry. *Epilepsia* **1989**, 30 (Suppl.1), S51-S56.
- ¹⁶² Thirumurugan, R.; Sriram, D.; Saxena, A.; Stables, J.; Yogeewari, P. 2,4-Dimethoxy-phenylsemicarbazones with anticonvulsant activity against three animal models of seizures: Synthesis and pharmacological evaluation. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, 14, 3106-3112.
- ¹⁶³ Brown, W.C.; Schiffman, D.O.; Swinyard, E.A.; Goodman, L.S. Comparative assay of antiepileptic drugs by "psychomotor" seizure test and minimal electroshock threshold test. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1953**, 107, 273-283.

- ¹⁶⁴ Turski, W.A.; Cavalheiro, E.A.; Schwarz, M.; Czuczwar, S.J.; Kleinrok, Z.; Turski, L. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav. Brain Res.* **1983**, *9*, 315-335.
- ¹⁶⁵ Turski, L.; Ikonomidou, C.; Turski, W.A.; Bortolotto, Z.A.; Cavalheiro, E.A. Review: Cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by pilocarpine: a novel experimental model of intractable epilepsy. *Synapse* **1989**, *3*, 154-171.
- ¹⁶⁶ Racine, R.J. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* **1972**, *32*, 281-294.
- ¹⁶⁷ Mutschler, E.; Geisslinger, G.; Kroemer, H.K.; Schäfer-Korting, M. Padaczka i leki przeciwpadaczkowe (przeciwdrżawkowe). *Farmakologia i toksykologia*. Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner, Wrocław **2004**, str. 309-323.
- ¹⁶⁸ Tasso, S.M.; Moon, S.C.; Bruno-Blanch, L.E.; Estiú, G.L. Characterization of the anticonvulsant profile of valpromide derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 3857-3869.
- ¹⁶⁹ Kamiński, R.M.; Mazurek, M.; Turski, W.A.; Kleinrok, Z.; Czuczwar, S.J. Amlodipine enhances the activity of antiepileptic drugs against pentylenetetrazole-induced seizures. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2001**, *68*, 661-668.
- ¹⁷⁰ Perišić-Janjić, N.; Djaković-Sekulić, T.; Stojanović, S.; Penov-Gaš, K. Evaluation of the lipophilicity of some dehydroepiandrosterone derivatives using RP-18 HPTLC chromatography. *Chromatographia* **2004**, *60*, s201-s205.
- ¹⁷¹ Gensmantel, N.P. Physicochemical Properties and Drug Design, w *Medical Chemistry: Principles and Practice*, King F.D. (red.), The Royal Society of Chemistry, London, **1994**.
- ¹⁷² Hansach, C.; Bjorkroth, J.P.; Leo, A. Hydrophobicity and central nervous system agents: on the principle of minimal hydrophobicity in drug design. *J. Pharm. Sci.* **1987**, *76*, 663-687.
- ¹⁷³ Hadjipavlou-Litina D. Review, reevaluation, and new results in quantitative structure-activity studies of anticonvulsants. *Med. Res. Rev.* **1998**, *18*, 91-119.
- ¹⁷⁴ Kubinyi, H. The quantitative analysis of structure-activity relationships, w Wolff, M. (red.), *Burger's Chemistry and Drug Discovery*, John Wiley & Sons Inc., New York, **1995**.
- ¹⁷⁵ Biagi, G.L.; Barbaro, A.M.; Sapone, A.; Recanatini M. Determination of lipophilicity by means of reversed-phase thin-layer chromatography. I. Basic aspects and relationship between slope and intercept of TLC equations. *J. Chromatogr. A* **1994**, *662*, 341-361.
- ¹⁷⁶ Hollósy, F.; Lóránd, T.; Örfi, L.; Erős, D.; Kéri, Gy.; Idei, M. Relationship between lipophilicity and antitumor activity of molecule library of Mannich ketones determined by high-performance liquid chromatography, clogP calculation and cytotoxicity test. *J. Chromatogr. B* **2002**, *768*, 361-368.
- ¹⁷⁷ Obniska, J.; Kamiński K. Relationships between the lipophilicity and anticonvulsant activity of *N*-benzyl-2-azaspiro[4.4]nonane and [4.5]decane-1,3-dione derivatives. *J. Planar Chromatogr.* **2005**, *18*, 240-243.
- ¹⁷⁸ Obniska, J.; Kamiński K. RPTLC determination of the lipophilicity of some new *N*-[(4-arylpiperazin-1-yl)-alkyl] spirosuccinimides. *J. Planar Chromatogr.* **2005**, *18*, 384-387.

¹⁷⁹ Dross, K.; Sonntag, C.; Mannhold, R. Determination of the hydrophobicity parameter R(MW) by reversed-phase thin-layer chromatography. *J. Chromatogr. A* **1994**, 673, 113-124.

¹⁸⁰ Stille, J.K.; Divakaruni, R. Palladium(II)-catalyzed carboxylation reactions of olefins: scope and utility. *J. Org. Chem.* **1979**; 44, 3474-3482.

¹⁸¹ Soczewinski, E.; Wachtmeister, C.A. The relation between the composition of certain ternary two-phase solvent systems and R_M values. *J. Chromatogr.* **1962**, 7, 311-320.

10. Streszczenie

We wstępie niniejszej rozprawy omówiono rolę azotowych układów heterocyklicznych - imidowego i laktamowego, jako fragmentów istotnych dla aktywności biologicznej związków działających na ośrodkowy układ nerwowy. W opisie uwzględniono zarówno leki znajdujące się aktualnie w terapii, jak i substancje będące w różnych fazach badań klinicznych.

W badaniach własnych opisano przeprowadzoną syntezę pięćdziesięciu dziewięciu nowych pochodnych, w których podstawowym układem jest *N*-fenyloamino-pirolidyno-2,5-dion. Połączenia te zostały zaprojektowane jako analogi aktywnego przeciwdrgawkowo *N*-fenyloamino-2-azaspiro[4.4]nonano-1,3-dionu, stanowiącego dla nich strukturę modelową. Główne modyfikacje strukturalne dotyczyły położenia-3 pierścienia pirolidyno-2,5-dionu, a celem niniejszej rozprawy było badanie ich wpływu na aktywność przeciwdrgawkową. Wyniki badań farmakologicznych pozwoliły na ustalenie pewnych zależności struktura - aktywność i na wskazanie fragmentów budowy istotnych dla działania biologicznego.

Realizując zamierzony cel badań otrzymano następujące serie *N*-fenyloaminowych pochodnych 3-podstawionego pirolidyno-2,5-dionu:

- 2-Azaspiro[4.4]nonano- (zw. **1-9**) i [4.5]dekano-1,3-dionu (zw. **10-16**);
- 3,3-Dimetylopirolidyno-2,5-dionu (zw. **17-23**);
- 3-Etylo-3-metylopirolidyno-2,5-dionu (zw. **24-30**);
- 3-Metylo-3-propylopirolidyno-2,5-dionu (zw. **31-35**);
- 3-Butylo-3-metylopirolidyno-2,5-dionu (zw. **36-39**);
- 3,3-Dietylopirolidyno-2,5-dionu (zw. **40-45**);
- Haksahydroizoindo-1,3-dionu (zw. **46-51**);
- 3-Cykloheksylo-pirolidyno-2,5-dionu (zw. **52-54**);
- 3-Fenylo-pirolidyno-2,5-dionu (zw. **55-59**).

Związki **1-59** otrzymano w wyniku kilkietapowej syntezy, stosując jako substraty odpowiednie kwasy dikarboksylowe lub bezwodnik kwasowy. Do reakcji użyto następujące produkty wyjściowe:

- Kwas 1-karboksymetylo-1-cyklopentanooctowy;
- Kwas 1-karboksymetylo-1-cykloheksanooctowy;
- Kwasy 2,2-dimetylo-, 2-etylo-2-metylo-, 2-metylo-2-propylo-, 2-butylo-2-metylo- oraz 2,2-dietylo-bursztynowe;
- Bezwodnik kwasu cykloheksano-1,2-dikarboksylowego;
- Kwas 2-cykloheksylo-bursztynowy;
- Kwas 2-fenylo-bursztynowy.

Zaplanowane związki zsyntetyzowano w wyniku cyklokondensacji równomolowych ilości odpowiednich kwasów dikarboksylowych lub bezwodnika kwasu cykloheksano-1,2-dikarboksylowego z pochodnymi fenylohydrazyny. Reakcję prowadzono w temperaturze około 180°C przez 1 godzinę. Surowe produkty krystalizowano z izopropanolu, a następnie dodatkowo oczyszczano wykorzystując technikę chromatografii kolumnowej. Struktury otrzymanych połączeń zostały potwierdzone wynikami analizy elementarnej oraz spektralnej - widma protonowego rezonansu magnetycznego (^1H NMR) i widma w podczerwieni (IR). Dla wybranych związków wykonano widma masowe (MS). Czystości i jednorodności sprawdzono przy użyciu techniki chromatografii cienkowarstwowej (TLC) i wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC).

Wszystkie związki zostały przekazane do wstępnych badań farmakologicznych na aktywność przeciwdrgawkową w ramach amerykańskiego programu poszukiwania nowych leków przeciwpadaczkowych Antiepileptic Drug Development (ADD), realizowanego w Narodowym Instytucie Zdrowia - Epilepsy Branch, National Institute of Neurological Disorders and Stroke, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA.

Zgodnie z procedurami Anticonvulsant Screening Project (ASP), wstępny *screening* obejmuje dwa podstawowe testy *in vivo* - test maksymalnego wstrząsu elektrycznego (MES) i test drgawek wywołanych podskórnym podaniem kardiazolu (*scPTZ*).

Otrzymane wyniki badań farmakologicznych wykazały, że większość z badanych związków była aktywna w teście drgawek elektrycznych - MES. Pośród badanych serii, najwyższą aktywnością charakteryzują się *N*-fenyloaminowe pochodne 3,3-dimetylo-pirolidyno-2,5-dionu (zw. **17-23**), natomiast ulegała ona osłabieniu wraz z wydłużaniem

jednego z podstawników alkilowych (zw. **31-45**), bądź wprowadzeniem w ich miejsce pierścienia cyklopentanu (zw. **1-8**) lub cykloheksanu (zw. **9-16**), połączonego z układem imidowym poprzez atom węgla „spiro”. Wprowadzenie pierścienia cykloheksanu jako elementu posiadającego dwa wspólne atomy węgla z układem pirolidyno-2,5-dionu, w serii heksahydroizoindo-1,3-dionów (zw. **47-51**), nie miało istotnego wpływu na aktywność w porównaniu do odpowiednich azaspiranów. Wśród aktywnych połączeń najsilniejsze właściwości przeciwdrgawkowe posiadały związki z silnie elektroujemnymi atomami Br i Cl w położeniu-4 lub -2,4 pierścienia fenyłowego. Pochodne 3-cykloheksylo- (zw. **52-54**) i 3-fenylopirolidyno-2,5-dionu (zw. **55-59**) były nieaktywne w obu stosowanych testach.

Wśród badanych połączeń najwyższą aktywnością charakteryzował się *N*-fenyloamino-3,3-dimetylopirolidyno-2,5-dion (zw. **17**), dla którego dawka efektywna (ED_{50}) wynosi 68,89 mg/kg (MES). Związek ten działał silniej i był mniej toksyczny niż *N*-fenyloamino-2-azaspiro[4.4]nonano-1,3-dionu (zw. **A**), będący strukturą modelową dla połączeń prezentowanych w niniejszej rozprawie.

Wykonane badania radioreceptorowe, mające na celu ustalenie prawdopodobnego mechanizmu działania badanych związków, wykazały brak powinowactwa zarówno do receptora GABA_A jak i do napięciowo-zależnych kanałów wapniowych.

Mając na uwadze, że lipofilowość jest jednym z najczęściej wykorzystywanych deskryptorów opisujących właściwości fizykochemiczne cząsteczek, dla wszystkich związków wykonano chromatograficzny pomiar lipofilowości stosując w tym celu metody RP-TLC i RP-HPLC. W przypadku obu zastosowanych technik uzyskano liniową zależność pomiędzy chromatograficznymi parametrami lipofilowości i stężeniem modyfikatora organicznego w fazie ruchomej, co pozwoliło na wyznaczenie tzw. znormalizowanych chromatograficznych parametrów lipofilowości R_{M0} (RP-TLC) i $\log k_w$ (RP-HPLC) dla zerowej zawartości rozpuszczalnika organicznego w fazie ruchomej. Otrzymane wartości R_{M0} i $\log k_w$ umożliwiły ocenę zależności pomiędzy strukturą i lipofilowością, a także zaobserwowano korelację pomiędzy właściwościami lipofilowymi i aktywnością przeciwdrgawkową analizowanych połączeń.

Prezentowane badania były współfinansowane w ramach grantu Ministerstwa Nauki i Informatyzacji nr 4P05702425 oraz z Europejskiego Funduszu Społecznego i budżetu państwa w ramach Zintegrowanego Programu Operacyjnego Rozwoju Regionalnego.



Aneks

Publikacje stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej:

1. Obniska, J.; **Kamiński, K.** Synthesis and anticonvulsant properties of new *N*-phenylamino derivatives of 2-azaspiro[4.4]nonane, 2-azaspiro[4.5]decane-1,3-dione and 3-cyclohexyl pyrrolidine-2,5-dione. Part IV. *Acta Polon. Pharm.-Drug Res.* **2006**, *63*, 101-108.
2. Obniska, J.; **Kamiński, K.** Lipophilicity characterization of new *N*-phenylaminoazaspiranes as potential anticonvulsant agents. *Biomed. Chromatogr.* **2006**, *20*, 1185-1191.
3. **Kamiński, K.**; Obniska, J.; Dybała, M. Synthesis, physicochemical and anticonvulsant properties of new *N*-phenylamino derivatives of 2-azaspiro[4.4]nonane and [4.5]decane-1,3-diones. Part V. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43*, 53-61.
4. **Kamiński, K.**; Obniska, J. Design, synthesis and anticonvulsant activity of *N*-phenylamino derivatives of 3,3-dialkyl-pyrrolidine-2,5-diones and hexahydro-isoindole-1,3-diones. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 4921-4931.