



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **109107** (13) **C2**
(51) МПК (2015.01)
C07D 489/00
A61K 31/4353 (2006.01)
A61P 29/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

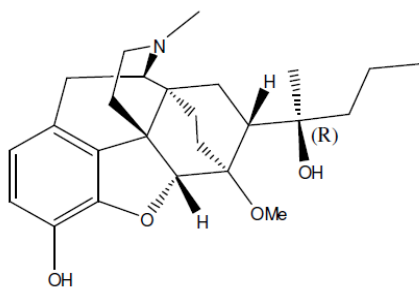
(21) Номер заявки: а 2011 08481	(72) Винахідник(и): Уайтлок Стів (GB), Хардінг Дебора Філіс (GB), Тернер Карл Девід (GB)
(22) Дата подання заявки: 04.12.2009	(73) Власник(и): ЕРО-СЕЛТІК С.А., 2, Avenue Charles de Gaulle, L-1653 Luxembourg, Luxembourg (LU)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 27.07.2015	(74) Представник: Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр. №115
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 0822342.2, 0920699.6	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: US 5849915 A (KIM YONG HAE [KR] ET AL), 15.12.1998 Park H. S. et al.: "A highly selective kappa-opioid receptor agonist with low addictive potential and dependence liability", BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, PERGAMON, ELSEVIER SCIENCE, GB, vol.16, no.13, 01.07.2006 Bentley, Kenneth W. et al.: "Novel analgesics and molecular rearrangements in the morphine-thebaine group. I. Ketones derived from 6,14-endo-ethenotetrahydrothebaine", JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY, 89 (13), 1967, page 3270-3272 COOP, ANDREW et al.: "Methylation of the enolates of thevinone and some analogs", TETRAHEDRON, 51(35), 1995, page 9685 Bentley, Kenneth W. et al.: "Novel analgesics and molecular rearrangements in the morphine-thebaine group. II. Alcohols derived from 6,14-endo-ethenotetrahydrothebaine", JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY, 89 (13), 1967, page 3280 MARTON J. et al.: "Herstellung von 6, 14-ethenomorphinan-derivaten", MONATSHFTE FUR CHEMIE, SPRINGER VERLAG WIEN, AT, vol.125, no.11, 01.01.1994, pages 1229-1240
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 08.12.2008, 26.11.2009	
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: GB, GB	
(41) Публікація відомостей про заявку: 26.09.2011, Бюл.№ 18	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 27.07.2015, Бюл.№ 14	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: PCT/GB2009/051655, 04.12.2009	

(54) ДИГІДРОЕТОРФІНИ І ЇХ ОДЕРЖАННЯ**(57) Реферат:**

Даний винахід стосується способу одержання сполуки формули (VI) або її солі або похідного, де R¹ і R² незалежно являють собою C₁₋₈-алкіл і * являє собою стереоцентр.

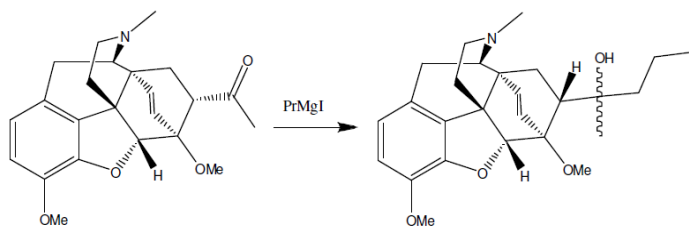
UA 109107 C2

Даний винахід стосується нового способу одержання дигідроеторфіну, по суті, (S)-дигідроеторфіну, а також проміжних сполук, що одержуються під час його синтезу.
(R)-дигідроеторфін (показано нижче) являє собою сильнодіючий аналгетичний засіб.



Його використовують, головним чином, в Китаї, в сублінгвальній формі при дозах, що знаходяться в межах від 20 до 180 мкг. У порівнянні з іншими анальгетиками, як повідомляється, він викликає сильну аналгезію і відносно м'які побічні впливи. Використання (R)-дигідроеторфіну в трансдермальних пластирах також описується в JP-10-231248. Наскільки відомо заявнику, однак, такі пластири не є комерційно доступними.

Дигідроеторфін являє собою один з варіантів еторфіну. (R)-Еторфін являє собою виключно сильнодіючий опіоїд, що використовується для анестезування тварин, наприклад, слонів. Його розробили в 1960 роках, і способи синтезу для його одержання добре відомі. Приклад 12 з GB 925723, наприклад, описує синтез еторфіну, де реагент Грін'єра (пропілмагнійїодид) додається до похідного тебаїну, як показано нижче:

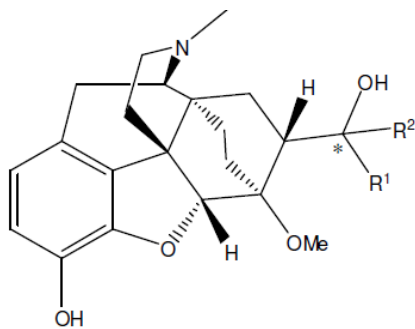


Результати, представлені в прикладі 12, стверджують, що α -ізомер одержується при перетиранні сирого продукту реакції з метанолом і що β -ізомер може кристалізуватися з метанольних вихідних розчинів, коли їх розбавляють водою і рідину декантують. З цієї причини заявник чекав, що спосіб синтезу, описаний в GB 925723, може застосовуватися до дигідроеторфіну і в результаті можуть бути одержані як (R)-, так і (S)-діастереомери. Виявлено, однак, що цього не відбувається. Замість цього, додавання пропілмагнійї галогеніду до похідного дигідротебаїну відбувається при несподівано високій стереоселективності і одержується тільки (R)-діастереомер.

Наскільки знають заявники, (S)-ізомер дигідроеторфіну ніколи не був одержаний. З цієї причини є необхідність в альтернативному способі синтезу, який дає (S)-дигідроеторфін, і зокрема, в процедурі, яка дає (S)-дигідроеторфін при великому діастереомерному надлишку. Цей ізомер необхідний для підтвердження стереохімії відомих стереоізомерів.

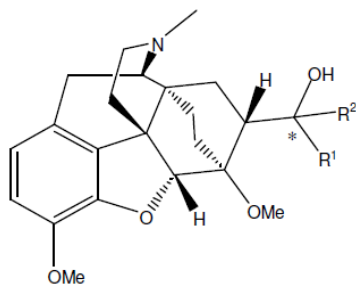
Тепер заявник знайшов спосіб, який задовольняє ці потреби. Крім того, заявник виявив, що (S)-ізомер дигідроеторфіну має корисні фармакологічні властивості і, зокрема, аналгетичні впливи.

Таким чином, з точки зору одного з аспектів, даний винахід стосується способу одержання сполуки формули (VI) або її солі або похідного,



(VI)

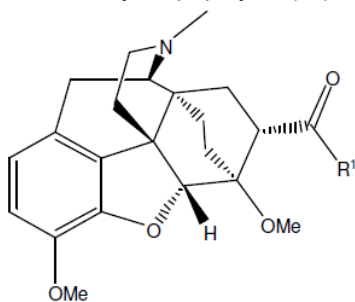
(де R^1 і R^2 незалежно являють собою C_{1-8} алкіл, і * являє собою стереоцентр, переважно, (S)-стереоцентр), що включає гідроліз сполуки формули (V)



(V)

5 де R^1 , R^2 і * є такими, як визначено вище.

У переважному способі за даним винаходом, сполуки формули (V) одержують за допомогою взаємодії сполуки формули (IV)

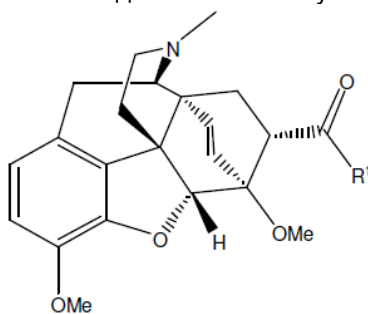


(IV)

(де R^1 є таким, як визначено вище);

10 зі сполукою формули $R^2M(X)_p$, де R^2 являє собою C_{1-8} алкіл, M являє собою метал, X являє собою галогенід і p дорівнює 1 або 0).

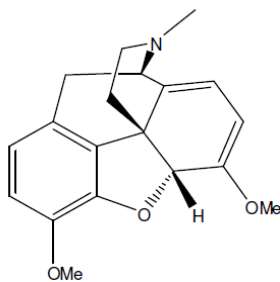
В іншому переважному способі за даним винаходом, сполуку формули (IV) одержують за допомогою відновлення сполуки формули (III)



(III)

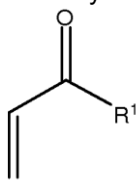
15 (де R^1 є таким, як визначено вище);

Ще в одному переважному способі за даним винаходом, сполуку формули (III) одержують за допомогою взаємодії сполуки формули (I)



(I)

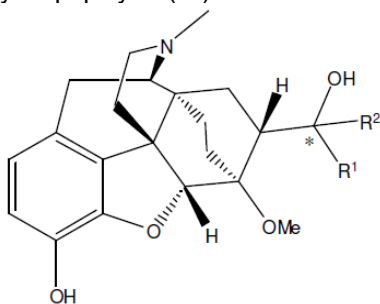
зі сполукою формули (II)



(II),

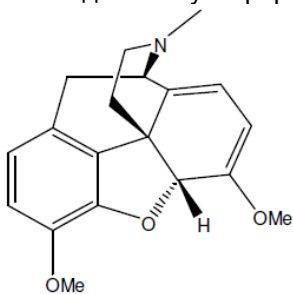
(де R^1 являє собою C_{1-8} алкіл).

- 5 Таким чином, з точки зору іншого аспекту, даний винахід передбачає спосіб одержання сполуки формули (VI) або її солі або похідного,



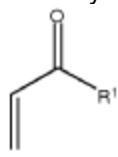
(VI)

- 10 (де R^1 і R^2 незалежно являють собою C_{1-8} алкіл, і * являє собою стереоцентр, переважно, (S)-стереоцентр), що включає:
взаємодію сполуки формули (I)



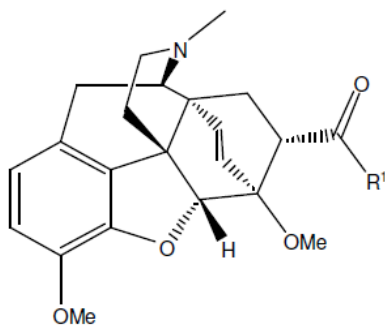
(I)

зі сполукою формули (II)



(II),

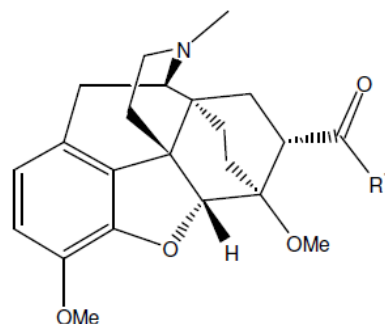
(де R^1 являє собою C_{1-8} алкіл), з одержанням сполуки формули (III)



(III) ,

(де R^1 є таким, як визначено вище);

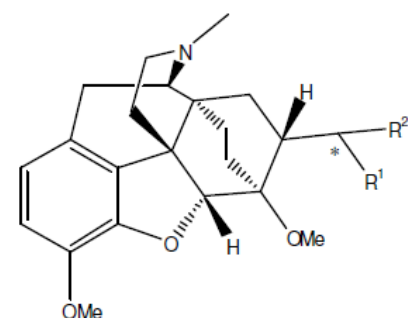
відновлення вказаної сполуки формули (III) з одержанням сполуки формули (IV)



(IV) ,

5 (де R^1 є таким, як визначено вище);

взаємодію вказаної сполуки формули (IV) зі сполукою формули $R^2M(X)_p$, де R^2 являє собою C_{1-8} алкіл, M являє собою метал, X являє собою галогенід і p дорівнює 1 або 0, з одержанням сполуки формули (V)

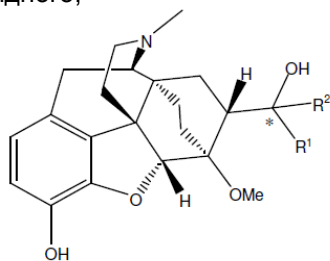


(V) ,

10 (де R^1 , R^2 і * є такими, як визначено вище);

гідроліз вказаної сполуки формули (V), з одержанням сполуки формули (VI).

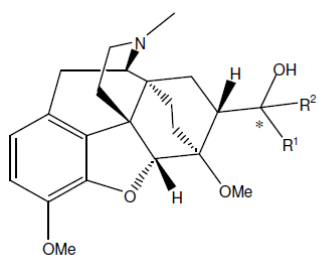
З точки зору іншого аспекту, даний винахід стосується сполуки формули (VI) або її солі або похідного,



(VI)

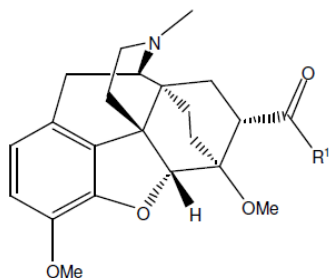
15 де R^1 і R^2 незалежно являють собою C_{1-8} алкіл, і * являє собою (S)-стереоцентр.

З точки зору ще одного аспекту, даний винахід стосується сполук, які являють собою проміжні сполуки в описаному вище способі, тобто сполук формул (V), (IV) і (III) або, де це можливо, їх солей або похідних, як показано нижче:



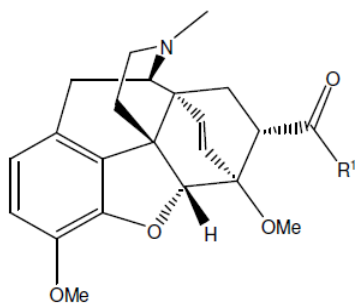
(V)

де R^1 і R^2 незалежно являють собою C_{1-8} алкіл, і * являє собою (S)- або (R)-стереоцентр, переважно, (S)-стереоцентр.



(IV)

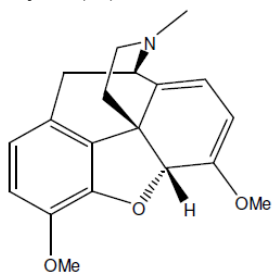
5 де R^1 являє собою C_{1-8} алкіл.



(III)

де R^1 являє собою C_{1-8} алкіл.

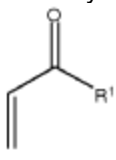
З точки зору ще одного аспекту, даний винахід стосується способу одержання сполуки формули (III), що включає взаємодію сполуки формули (I)



(I)

10

зі сполукою формули (II)



(II)

(де R^1 являє собою C_{1-8} алкіл).

15 З точки зору іншого аспекту, даний винахід стосується композицій, переважно, фармацевтичних композицій, що містять нову сполуку, як описано вище.

З точки зору іншого аспекту, даний винахід стосується сполук, як описано вище, для застосування в медицині (наприклад, як анальгетика).

З точки зору ще одного аспекту, даний винахід стосується використання сполуки, як описано вище, для одержання медикаменту для лікування болю.

20

Як використовується в цьому документі, термін "алкіл" використовується для згадки вуглеводню, що має прямий ланцюг, циклічного або розгалуженого, насиченого, аліфатичного.

Переважні алкільні групи, присутні в сполуках (II)-(VI), являють собою алкільні групи з прямим ланцюгом. Переважні алкільні групи мають формулу C_nH_{2n+1} , де n дорівнює 1-8. Типові алкільні групи включають метил, етил, пропіл, бутил, пентил, гексил, гептил і октил. Переважні алкільні групи в сполуках (II)-(VI) є незаміщеними.

5 Сполуки формули (I) являє собою тебаїн і є комерційно доступним, наприклад, від Tasmanian Alkaloids, Pty. Альтернативна сполука формули (I) може бути одержана відповідно до процедур, описаних в літературі.

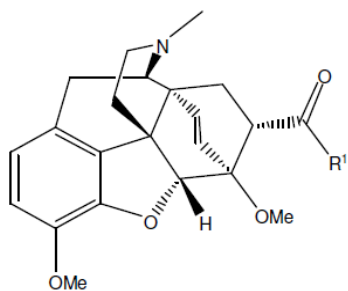
У переважному способі за даним винаходом, R^1 в сполучі формули (II), переважно, являє собою C_{2-7} алкіл, більш переважно, C_{3-5} алкіл, зокрема, C_3 алкіл (наприклад, *n*-пропіл). Особливо переважна сполука формули (II) являє собою гексен-3-он. Вона є комерційно доступною, наприклад, від Sigma-Aldrich.

Сполука формули (I) взаємодіє зі сполукою формули (II) з одержанням сполуки формули (III). Реакція, якій піддаються ці сполуки, як правило, згадується як реакція Дільса-Альдера. Реакція Дільса-Альдера може здійснюватися при звичайних умовах, відомих в даній галузі. Реакція сполук формул (I) і (II) може здійснюватися, наприклад, в будь-якому звичайному розчиннику. Розчинники, що мають температури кипіння вищу 60°C , є переважними (наприклад, метанол і етанол). Етанол є особливо переважним розчинником.

У типовій реакції між сполуками формул (I) і (II), сполуки нагрівають зі зворотним холодильником в надлишку розчинника, наприклад, протягом 10-24 годин. Хід реакції може відстежуватися з використанням, наприклад, ТШХ і/або ^1H -ЯМР. У переважній реакції використовують 1,2-15 молярних еквівалентів, більш переважно, 1,5-10 молярних еквівалентів або 2-8 молярних еквівалентів сполуки формули (II) відносно сполуки формули (I). В особливо переважній реакції використовують приблизно 1,2-2 молярні еквіваленти, більш переважно, 1,3-1,8 молярні еквіваленти, наприклад, приблизно 1,5 молярні еквіваленти сполуки формули (II) відносно сполуки формули (I).

Потім реакційну суміш охолоджують і концентрують. Одержаний продукт, сполуки формули (III), може бути одержаний за допомогою звичайної процедури витягання і необов'язково очищений. Очищення може здійснюватися, наприклад, за допомогою кристалізації з метанолу або ізопропілового спирту. Більш переважно, сполука формули (III) кристалізується безпосередньо з реакційного розчинника. Вона може необов'язково перекристалізовуватися. Вихід реакції, переважно, становить щонайменше 60%, більш переважно щонайменше 65%, наприклад щонайменше 80%. Максимальний вихід становить 100%. Чистота сполуки формули (III), переважно, становить щонайменше 95%, більш переважно щонайменше 97%, ще більш переважно щонайменше 99%, наприклад, 99,5%. Максимальна чистота становить 100%. Чистоту, переважно, визначають з використанням ВЕРХ.

У переважному способі за даним винаходом сполука формули (III) має формулу:



(III)

де R^1 є таким, як визначено вище, наприклад, R^1 являє собою C_{2-7} алкіл, більш переважно, C_{3-5} алкіл, зокрема, C_3 алкіл (наприклад, *n*-пропіл).

40 Сполука формули (III) може відновлюватися за допомогою будь-якої відповідної відомої реакції відновлення, але, переважно, відновлюється з використанням реакції гідрування (наприклад, з використанням H_2 в апараті Парра або перенесення водню). Сполуки формули (III) може, наприклад, гідруватися в розчиннику (наприклад, етанолі) за допомогою каталізатора (наприклад, паладію на вугіллі) під тиском водню (наприклад, аж до 50 фунт/кв. дюйм (3,1 кг/кв. см) H_2). Об'єм реакції, переважно, знаходиться в межах 5-80 л, більш переважно, 10-20 л, наприклад, становить приблизно 12 л. Кількість каталізатора, що використовується, переважно, знаходиться в межах 10-60 мас.%, більш переважно, 30-55 мас.%, наприклад, становить приблизно 50 мас.%. Реакція може здійснюватися при температурі від 30 до 100°C , переважно, при температурі від 40 до 60°C , наприклад, при 50 або 65°C .

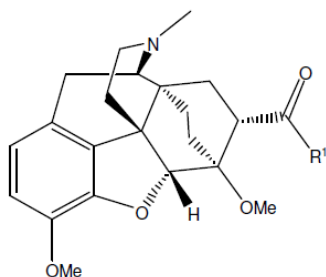
50 Після закінчення реакції, будь-який каталізатор (наприклад, паладій), що використовується в ній, може видалятися за допомогою фільтрування. Продукт сполуки формули (IV), може потім

виділятися за допомогою звичайної процедури витягання. Сполука формули (IV) необов'язково очищується.

Наприклад, промивання C_{1-8} алканом, таким як гептан, видаляє етанол. Одна з переваг реакції гідрування полягає, однак, в тому, що сполука формули (IV) може використовуватися без очищення за допомогою хроматографії і/або кристалізації. Вихід реакції, переважно, становить щонайменше 50%, більш переважно щонайменше 65%, ще більш переважно, 85%, ще більш переважно щонайменше 90%. Максимальний вихід становить 100%. Сполуки формули (IV), переважно, одержують з чистотою щонайменше 95%, більш переважно щонайменше 99%, наприклад щонайменше 99,5%. Максимальна чистота становить 100%.

Чистоту, переважно, визначають з використанням ВЕРХ.

У переважному способі за даним винаходом сполука формули (IV) має формулу:



(IV)

де R^1 є таким, як визначено вище, наприклад, R^1 являє собою C_{2-7} алкіл, більш переважно, C_{3-5} алкіл, зокрема, C_3 алкіл (наприклад, н-пропіл).

Сполуки формули (IV) взаємодіє зі сполукою формули $R^2M(X)_p$, де R^2 являє собою C_{1-8} алкіл, M являє собою метал (наприклад, лужний або лужноземельний метал), X являє собою галогенід і p дорівнює 1 або 0, з одержанням сполуки формули (V). У переважних сполуках формули $R^2M(X)_p$, R^2 являє собою C_{1-3} алкіл, більш переважно, C_{1-2} алкіл, наприклад, метил.

В інших переважних сполуках формули $R^2M(X)_p$, M являє собою магній або літій, переважно, магній. Коли M являє собою Mg, p переважно дорівнює 1. Коли M являє собою літій, p переважно дорівнює 0. Коли він присутній, X переважно являє собою Cl, Br або I. Метилмагнійгалогенід, зокрема, метилмагнійбромід і метилмагніййодид, є переважною сполукою формули $R^2M(X)_p$, особливо метилмагнійбромід.

Реакція сполуки формули (IV) зі сполукою формули $R^2M(X)_p$, як правило, згадується як реакція нуклеофільного додавання. Коли M являє собою Mg і X являє собою галогенід, реакцію часто згадують як реакцію додавання Гріньяра. Реакція додавання може здійснюватися в будь-якому звичайному розчиннику. Переважні розчинники є неводними (наприклад, являють собою безводні розчинники). Один з прикладів переважного розчинника являє собою простий ефір, наприклад, МТБЕ, ТГФ або простий діетиловий ефір. МТБЕ або простий діетиловий ефір є переважними. Простий діетиловий ефір є особливо переважним розчинником. ТГФ є особливо переважним, коли використовується сполука формули $R^2M(X)_p$, де M являє собою Mg, X являє собою Cl і p дорівнює 2.

Реакцію додавання, переважно, здійснюють при температурі в межах від 20 до 60°C, більш переважно, від 30 до 45°C, наприклад, приблизно 35°C. Переважно, використовується деякий надлишок сполуки формули $R^2M(X)_p$. Зокрема, переважно, використовують 1,2-4 еквіваленти, більш переважно, 1,5-3 еквіваленти сполуки формули $R^2M(X)_p$ відносно сполуки формули (IV).

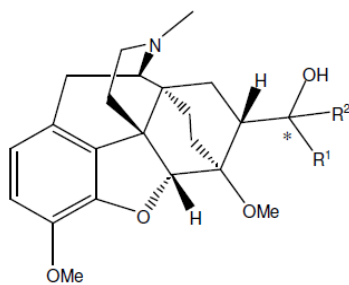
Сполука формули (V) може виділятися з використанням звичайних технологій. Воно необов'язково може перетиратися, наприклад, разом з метанолом. На додаток до цього або альтернативно, сполука формули (V) може очищуватися за допомогою колонкової хроматографії. Сполука формули (V) може також кристалізуватися. Переважно, сполука формули (V) кристалізується за допомогою метанолу. Вихід реакції, переважно, становить щонайменше 20%, більш переважно щонайменше 30%, наприклад, 20-60%, ще більш переважно щонайменше 65%. Максимальний вихід становить 100%. Чистота сполуки формули (V), переважно, становить щонайменше 95%, ще більш переважно щонайменше 99%, наприклад щонайменше 99,5%. Максимальна чистота становить 100%. Чистоту, переважно, визначають з використанням ВЕРХ.

Реакція додавання генерує новий стереоцентр в сполуці формули (V) на атомі вуглецю 19. Конфігурація цього стереоцентра залежить щонайменше частково, від природи R^1 і R^2 . Таким чином, можуть генеруватися як (R)-, так і (S)-стереоцентри. Спосіб за даним винаходом може, з цієї причини, давати рацемічну суміш сполук формули (V). Відповідно, даний винахід передбачає рацемічну суміш сполук формули (VI), наприклад, 19-(R)- і (S)-дигідроеторфін.

У переважних способах за даним винаходом, (S)-стереоцентр генерується на атомі вуглецю 19. В особливо переважних способах, (S)-стереоцентр генерується на атомі вуглецю 19 в діастереомерному надлишку щонайменше 85%, більш переважно щонайменше 90%, наприклад щонайменше 95% або щонайменше 99%. Таким чином, в переважному способі, сполука формули (V) одержується за відсутності або по суті за відсутності (R)-ізомеру. Переважно, в сполуці формули (V) присутньо менше 1 мас.%, ще більш переважно, менше 0,5 мас.% (R)-ізомеру.

В особливо переважному способі за даним винаходом, R^1 являє собою C_{3-6} алкіл (наприклад, пропіл), R^2 являє собою C_{1-2} алкіл (наприклад, метил) і (S)-стереоцентр генерується в реакції додавання на атомі вуглецю 19 при діастереомерному надлишку щонайменше 85%, більш переважно щонайменше 90%, наприклад щонайменше 95% або щонайменше 99%.

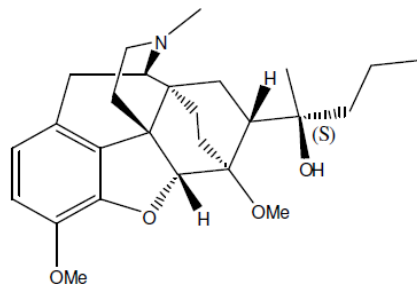
Таким чином, в переважному способі за даним винаходом сполука формули (V) має формулу:



(V)

де R^1 і R^2 є такими, як описано вище, наприклад, R^1 являє собою C_{2-7} алкіл, більш переважно, C_{3-5} алкіл, зокрема, C_3 алкіл (наприклад, н-пропіл), R^2 являє собою C_{1-3} алкіл, більш переважно, C_{1-2} алкіл, наприклад, метил, і (*) являє собою стереоцентр, переважно, (S)-стереоцентр.

В особливо переважному способі за даним винаходом сполука формули (V) являє собою:



(Va)

Як згадується вище, сполука формули (V) може необов'язково кристалізуватися. У переважному способі за даним винаходом, сполука формули (V) кристалізується. Для способу кристалізації може використовуватися будь-який звичайний розчинник, наприклад, C_{1-4} спирти, вода, ацетон, ацетонітрил, DCM і МТБЕ. Метанол, етанол, вода і їх суміші є переважними розчинниками для кристалізації, зокрема, етанол/вода і етанол. У типовому способі кристалізації деяку кількість сполуки формули (V), одержаної від реакції додавання, розчиняють у вибраному розчиннику, переважно, в мінімальній його кількості, і розчину дозволяють постояти, наприклад, протягом 3-4 днів. Переважно, кристалізація здійснюється при температурі від -5 до 5°C, наприклад, від 0 до 4°C.

Сполука формули (V), переважно, гідролізується за допомогою гідроксиду лужного металу, з утворенням сполуки формули (VI). Переважний гідроксид лужного металу являє собою КОН. У реакції гідролізу, переважно, використовують деякий надлишок гідроксиду лужного металу, наприклад, надлишок 10-40 еквівалентів відносно сполуки формули (V). Реакція може здійснюватися в будь-якому звичайному розчиннику. Переважний розчинник являє собою дітиленгліколь.

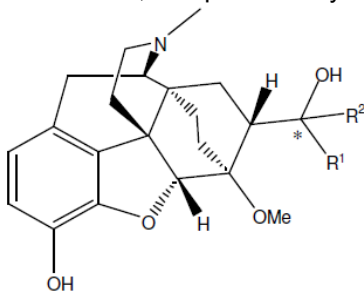
Реакцію гідролізу, переважно, здійснюють при температурі в межах 150-220°C, наприклад, приблизно 180-200°C. Хід реакції може відстежуватися за допомогою звичайних технологій, наприклад, ТШХ, але, як правило, вона буде займати 10-20 годин, наприклад, 12-18 годин. Після завершення реакції сполука формули (VI) може виділятися з використанням звичайних технологій. Сполука формули (VI) може перетиратися. Вихід реакції, переважно, становить щонайменше 40%, більш переважно щонайменше 45%, ще більш переважно, 85%, і ще більш переважно щонайменше 90%. Максимальний вихід становить 100%. Чистота сполуки формули

(VI), переважно, становить щонайменше 90%, ще більш переважно щонайменше 95%. Максимальна чистота становить 100%. Чистоту, переважно, визначають з використанням ВЕРХ.

5 Сполука формули (VI) може також кристалізуватися. Переважні розчинники для використання при кристалізації являють собою АсСН і МТБЕ. Більш переважно, сполуки формули (VI) кристалізується за допомогою С₁₋₄ спирту і/або води, наприклад, етанолу і/або суміші етанол/вода.

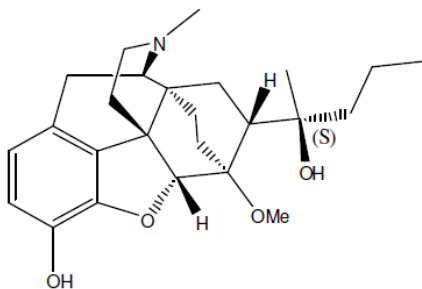
У переважній реакції гідролізу стереохімія кожного з стереоцентрів, присутніх в сполуці формули (V), зберігається. Переважно, сполуки формули (VI), наприклад, 19-S-дигідроеторфін, одержують за відсутності або по суті за відсутності (R)-ізомеру. Переважно, присутньо менше 1 мас.%, більш переважно, менше 0,5 мас.%, ще більш переважно, менше 0,01 мас.% (R)-ізомеру.

Таким чином, в переважному способі сполука формули (VI) являє собою:



15 де R¹ і R² є такими, як описано вище, наприклад, R¹ являє собою С₂₋₇ алкіл, більш переважно, С₃₋₅ алкіл, зокрема, С₃ алкіл (наприклад, н-пропіл), R² являє собою С₁₋₃ алкіл, більш переважно, С₁₋₂ алкіл, наприклад, метил, і (*) являє собою стереоцентр, переважно, (S)-стереоцентр. Переважно, сполука формули (VI) має чистоту щонайменше 99%, наприклад, як визначають за допомогою ВЕРХ.

20 В особливо переважному способі сполука формули (VI) являє собою:



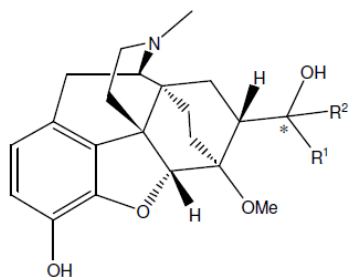
(VIa)

Сполуки (V) і (VI), описані вище, можуть перетворюватися на їх солі і похідні за допомогою технологій, добре відомих в даній галузі. Переважні солі являють собою фармацевтично прийнятні солі. Переважні похідні являють собою фармацевтично прийнятні похідні. Похідне, яке іноді одержується в малих кількостях (наприклад, <5 мас.%), являє собою 6-гідроксисполуку. Воно утворюється, якщо реакція гідролізу додатково гідролізує 6-метоксигрупу. 6-гідроксипохідне може виділятися за допомогою перекристалізації.

Переважні солі являють собою такі, які підтримують біологічну ефективність і властивості сполук за даним винаходом і утворюються з відповідних нетоксичних органічних або неорганічних кислот. Переважними є кислотно-адитивні солі. Репрезентативні приклади солей включають солі, одержані з неорганічних кислот, таких як хлористоводнева кислота, бромистоводнева кислота, йодистоводнева кислота, сірчана кислота, сульфамінова кислота, фосфорна кислота і азотна кислота, і солі, які одержані з органічних кислот, таких як п-толуолсульфонова кислота, саліцилова кислота, метансульфонова кислота, щавлева кислота, бурштинова кислота, лимонна кислота, яблучна кислота, молочна кислота, фумарова кислота, трифтороцтова кислота і тому подібне. Модифікація сполуки у вигляді солі являє собою технологію, добре відому хімікам, для одержання поліпшеної фізичної і хімічної стабільності, гігроскопічності, текучості і розчинності сполук.

40 Переважні сполуки за даним винаходом являють собою сполуки формул (VI), (V), (IV) і (III), як описано вище, де R¹, переважно, являє собою С₂₋₇ алкіл, більш переважно, С₃₋₅ алкіл, зокрема, С₃ алкіл (наприклад, н-пропіл). У переважних сполуках формул (VI) і (V), R² являє собою С₁₋₃ алкіл, більш переважно, С₁₋₂ алкіл, наприклад, метил. У сполуках (VI) і (V) за даним винаходом, стереоцентр на атомі вуглецю 19 являє собою (S).

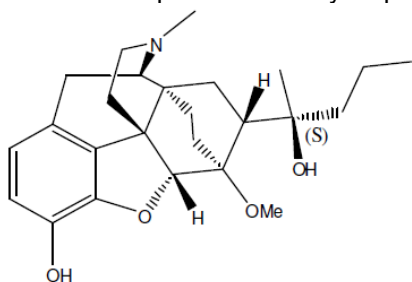
Переважно сполука формули (VI) являє собою сполуку формули:



(VI-S)

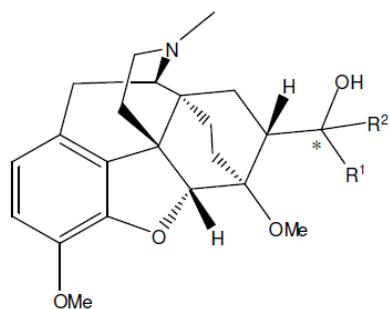
де R^1 і R^2 є такими, як описано вище (наприклад, R^1 являє собою C_{2-7} алкіл, більш переважно, C_{3-5} алкіл, зокрема, C_3 алкіл (наприклад, н-пропіл), R^2 являє собою C_{1-3} алкіл, більш переважно, C_{1-2} алкіл), і (*) являє собою (S)-стереоцентр.

Особливо переважно сполука формули (VI) являє собою сполуку формули:



(VIa)

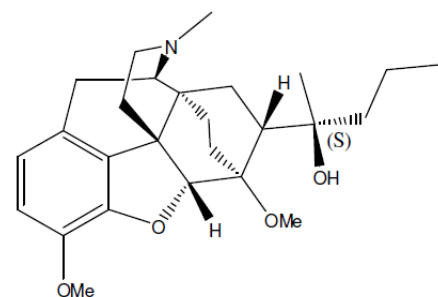
Інші переважні сполуки за даним винаходом являють собою сполуки, які є проміжними сполуками при одержанні сполук формули (VI). Таким чином, інші переважні сполуки за даним винаходом являють собою сполуки формули (V-S):



(V-S, V-R)

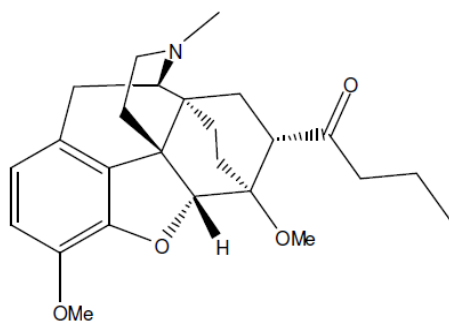
де R^1 і R^2 є такими, як описано вище (наприклад, R^1 являє собою C_{2-7} алкіл, більш переважно, C_{3-5} алкіл, зокрема, C_3 алкіл (наприклад, н-пропіл), R^2 являє собою C_{1-3} алкіл, більш переважно, C_{1-2} алкіл), і (*) являє собою (S)- або (R)-стереоцентр, переважно, (S)-стереоцентр.

Особливо переважно сполука формули (V) являє собою:

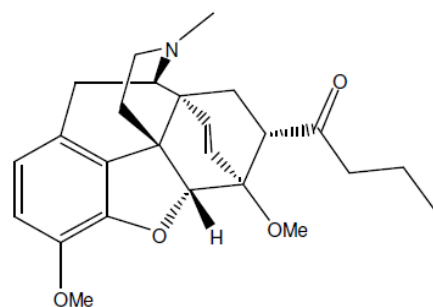


(Va)

Інші переважні проміжні сполуки являють собою сполуки формул (IVa) і (IIIa), як показано нижче:



(IVa)



(IIIa)

Як описано вище, сполуки формули (III), наприклад, (IIIa) вище, можуть бути одержані за допомогою реакції Дільса-Альдера зі сполукою формули (II). Ця реакція утворює додатковий

5 аспект даного винаходу. Переваги для R^1 є такими, як описано вище.

Сполуки за даним винаходом мають різні застосування. Сполуки (VI-S) можуть використовуватися, наприклад, для підтвердження (R)-хіральності відомих продуктів дигідроеторфіну. Використання сполук за даним винаходом таким чином ілюструється в

10 прикладах, які ідуть нижче. Сполуки (III) і (IV) за даним винаходом також є придатними для використання при одержанні (R)-дигідроеторфіну, який, як відомо, має корисні фармацевтичні властивості.

Крім того, сполуки формул (VI-S), (V-S), (V-R), (IV) і (III), зокрема, сполуки формули (VI-S), можуть включатися в композиції, переважно, фармацевтичні композиції. Таким чином, даний винахід також включає фармацевтичні композиції, що містять сполуку за даним винаходом, як

15 описано вище (наприклад, сполуки формул (VI-S), (V-S), (V-R), (IV) і (III), зокрема, (VI-S)) і один або декілька фармацевтично прийнятних носіїв. Сполуки за даним винаходом, наприклад, сполуки формули (VI-S), можуть бути присутніми окремо або в поєднанні з іншим активним інгредієнтом в композиції.

Композиції, наприклад, фармацевтичні композиції, за даним винаходом можуть приймати будь-які звичайні форми. Переважно, однак, композиції за даним винаходом приготуються в дозованій формі, придатній для трансдермального введення. Альтернативні переважні композиції за даним винаходом приготуються в дозованій формі, придатній для парентерального, наприклад, внутрішньовенного, введення.

Під "трансдермальною" доставкою розуміється введення сполук, описаних вище, на

25 поверхню шкіри індивідуума, так що агент проходить через тканини шкіри і в кровотік індивідуума. Термін "трансдермальний" призначається для включення трансмукозального введення, тобто введення сполуки на поверхню слизової (наприклад, сублінгвально, букально, вагінально, ректально) індивідуума, так що вона проходить через тканини слизової і в кровотік індивідуума.

Трансдермальні дозовані форми за даним винаходом включають, але, не обмежуючись цим, коржик, спреї, аерозолі, креми, примочки, мазі, гелі, розчини, емульсії, суспензії або інші форми, відомі фахівцям в даній галузі. Дозовані форми, придатні для лікування тканин слизових в ротовій порожнині, можуть приготуватися у вигляді полоскання для рота або у вигляді пероральних гелів. Крім того, трансдермальні дозовані форми включають пластири "типу резервуара" або "типу матриці", які можуть наноситися на шкіру і носитися протягом

35 конкретного періоду часу, щоб дозволити проникнення бажаної кількості активних інгредієнтів.

Відповідні наповнювачі (наприклад, носії і розріджувачі) і інші матеріали, які можуть використовуватися для одержання трансдермальних дозованих форм, що охоплюються даним винаходом, добре відомі фахівцям в галузі фармації і залежать від конкретних тканин, на які

40 буде наноситися дана фармацевтична композиція або дозована форма. Розуміючи це, типові наповнювачі включають, але, не обмежуючись цим, воду, ацетони, етанол, етиленгліколь,

пропіленгліколь, бутан-1,3-діол, ізопропілміристат, ізопропілпальмітат, мінеральне масло і їх суміші, для одержання примочок, кремів, емульсій, гелів або мазей, які є нетоксичними і фармацевтично прийнятними. Зволожувач або вологовмісні агенти також можуть додаватися до фармацевтичних композицій і дозованих форм, якщо це бажано. Приклади таких додаткових інгредієнтів добре відомі в даній галузі.

Залежно від конкретної тканини, яку треба лікувати, додаткові компоненти можуть використовуватися до або після лікування за допомогою сполук за даним винаходом або одночасно з нею. Наприклад, підсилювачі проникності можуть використовуватися, щоб допомогти при доставці сполуки до тканин. Відповідні підсилювачі проникності включають, але, не обмежуючись цим: ацетон; різні спирти, такі як етанол, олеїл і тетрагідрофурил; алкілсульфоксида, такі як диметилсульфоксид; диметилацетамід; диметилформамід; поліетиленгліколь; піролідони, такі як полівінілпіролідон; сорти Kollidon (Povidone, Polyvidone); сечовину і різні водорозчинні або нерозчинні складні ефіри цукрів, такі як Tween 80 (полісорбат 80) і Span 60 (сорбітан моностеарат).

pH фармацевтичної композиції або дозованої форми, або тканин, на які наноситься фармацевтична композиція або дозована форма, може також регулюватися для поліпшення доставки одного або декількох активних інгредієнтів. Подібним же чином, полярність носія розчинника, його іонна сила або тонічність можуть регулюватися для поліпшення доставки. Сполуки, такі як стеарати, можуть також додаватися до фармацевтичних композицій або дозованих форм для переважної зміни гідрофільності або ліпофільності одного або декількох активних інгредієнтів з метою поліпшення доставки. У зв'язку з цим, стеарати можуть служити як ліпідні носії для препарату, як емульсифікуючий агент або поверхнево-активна речовина і як агент для поліпшення доставки або поліпшення проникності. Різні солі, гідрати або сольвати активних інгредієнтів можуть використовуватися для додаткового регулювання властивостей одержаної композиції.

Пероральні гелі для сублінгвального введення сполук за даним винаходом (наприклад, сполук формул (VI-S)) можуть приготуватися за допомогою змішування сполуки з одним або декількома відповідними наповнювачами, включаючи ароматизуючі агенти. Супозиторії для ректального введення сполук за даним винаходом (наприклад, сполук формул (VI-S)) можуть приготуватися за допомогою змішування сполуки з відповідним наповнювачем, таким як олія какао, саліцилати і поліетиленгліколи. Препарати для вагінального введення можуть знаходитися в формі препарату песарію, тампона, крему, гелю, пасти, піни або спрею, що містить, на додаток до активного інгредієнта, такі придатні для використання носії, як відомо в даній галузі.

Фармацевтична композиція для місцевого введення, що містить сполуки за даним винаходом, може знаходитися в формі кремів, мазей, лініментів, примочок, емульсій, суспензій, гелів, розчинів, паст, порошків, спреїв, і крапель, придатних для введення на шкіру, в очі, вуха або ніс. Місцеве введення може також включати в себе трансдермальне введення за допомогою таких засобів, як трансдермальні пластири. Доставка в цій формі є особливо переважною.

Під внутрішньовенним введенням розуміється введення сполук, описаних вище, в формі рідини безпосередньо у вену. Дозовані форми, придатні для внутрішньовенного введення, включають, але, не обмежуючись цим, розчини, емульсії і суспензії.

Таким чином, з точки зору іншого аспекту, даний винахід передбачає сполуку, як визначено вище, і зокрема, сполуки формули (VI-S), для використання як анальгетика, де вказана сполука вводиться внутрішньовенно.

Як правило, композиції для внутрішньовенного введення містять стерильний ізотонічний водний буферний розчин. Коли це необхідно, композиції можуть також містити солюбілізуючий агент. Інгредієнти можуть доставлятися або по окремоті, або змішуватися разом в стандартній одиничній дозованій формі. Наприклад, інгредієнти можуть доставлятися окремо у вигляді сухого ліофілізованого порошку або концентрату, що не містить води, в герметично закритому контейнері, наприклад, в ампулі або саше, що показує кількість активного агента, і у вигляді ампули стерильної води або буферного розчину для змішування перед введенням. Альтернативна композиція може доставлятися в попередньо змішаній формі.

Сполуки за даним винаходом (наприклад, сполуки формул (VI-S)) можуть використовуватися в медицині, наприклад, для одержання аналгезії. Необхідні дози сполук будуть залежати, наприклад, від суб'єкта, якого треба лікувати, від тяжкості болю, який треба лікувати, від сполуки, що використовується, від способу введення і тому подібне, але будуть легко визначені фахівцями в даній галузі.

Таким чином, з точки зору іншого аспекту, даний винахід передбачає спосіб лікування суб'єкта (наприклад, ссавця), який потребує послаблення болю, що включає введення вказаному суб'єкту терапевтично ефективної кількості сполуки, як описано вище (наприклад, сполуки формули (VI-S)). Також несподівано виявлено, що при стандартних дослідженнях нудоти і блювоти на тхорах, ні R-DHE, ні S-DHE не викликають нудоти або блювоти в діапазонах дозування, схожих з тими, які використовують в дослідженнях, описаних нижче.

Сполуки за даним винаходом є особливо придатними при лікуванні ноцицептивного і нейропатичного болю.

Даний винахід буде тепер описуватися з посиланнями на необмежувальні приклади і фігури, що ідуть далі, де:

фіг. 1 показує спектри ^1H -ЯМР для (R)- і (S)-19-пропілдігідротевінолу;

фіг. 2 і 3 показують структуру, одержану за допомогою рентгеноструктурного аналізу, (R)-19-пропілдігідротевінолу;

фіг. 4 і 5 показують структуру, одержану за допомогою рентгеноструктурного аналізу, (S)-19-пропілдігідротевінолу;

фіг. 6 і 7 показують структуру, одержану за допомогою рентгеноструктурного аналізу, (R)-дігідроеторфіну;

фіг. 8 і 9 показують структуру, одержану за допомогою рентгеноструктурного аналізу, (S)-дігідроеторфіну;

фіг. 10 показує стехіометрію всіх хіральних атомів вуглецю, присутніх в (R)- і (S)-дігідроеторфіні;

фіг. 11-13 показують криву залежності відгуку від часу після внутрішньовенного введення (R)- або (S)-DHE або еталонної або порівняльної речовини;

фіг. 14-17 показують криві доза-відгук після внутрішньовенного введення (R)- або (S)-DHE або еталонної або порівняльної речовини;

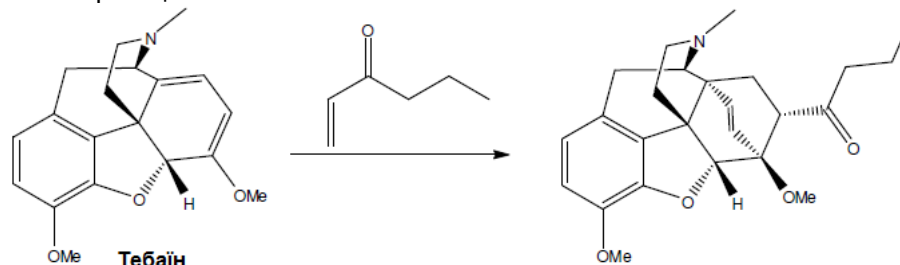
фіг. 18-23 показують впливи внутрішньовенного введення (R)- або (S)-DHE або еталонної або порівняльної речовини в моделі з лігуванням спінального нерва для нейропатичного болю.

ПРИКЛАДИ

Одержання (S)-дігідроеторфіну

Стадія 1 - Реакція Дільса-Альдера

Схема реакції



Спосіб

Тebaїн обробляють гексен-3-оном в розчиннику, як вказано в таблиці нижче, і нагрівають зі зворотним холодильником. Після проходження відповідної кількості часу (протягом ночі), реакційну суміш охолоджують і суміш випарюють. Одержане масло розчиняють в ізопропілацетаті (IPAc) і промивають 1 М розчином хлористоводневої кислоти. Кислотні шари об'єднують і промивають IPAc, потім підлучують розчином бікарбонату натрію і, нарешті, екстрагують дихлорметаном (DCM). Шар DCM випарюють, з одержанням твердого продукту жовтого кольору.

Таблиця 1

Узагальнені результати експериментів, стадія 1

Масштаб	Умови	Температура (°C)	Коментарі
500 мг	Бензол (20 об.) Гексен-3-он (2,0 моль. екв.)	Нагрівання зі зворотним холодильником	Нагрівання зі зворотним холодильником протягом ночі дає ступінь завершення приблизно 40%

Продовження таблиці 1

Масштаб	Умови	Температура (°C)	Коментарі
4,5 г	Метанол (10 об.) Гексен-3-он (2,0 моль. екв.)	Нагрівання зі зворотним холодильником	ступінь завершення 68% згідно з ЯМР
4,5 г	Етанол (10 об.) Гексен-3-он (7,5 моль. екв.)	Нагрівання зі зворотним холодильником	ступінь завершення >95% згідно з ЯМР. Вихід виділеного продукту 70%

При використанні етанолу як розчинника, кінцевий вихід виділеного продукту у вигляді твердого продукту світло-жовтого кольору після витягання становить 70%, і якість згідно з ¹H-ЯМР виглядає дуже хорошою.

5

Стадія 2 - Гідрування

Схема реакції

Спосіб

19-пропілтевінон (4,1 г), проміжну сполуку стадії 1, гіднують в етанолі (60 мл) з використанням паладію на вугіллі (1 г; 10%) при тиску водню до 50 фунт/кв. дюйм (3,1 кг/кв. см). Температуру ємності підтримують при приблизно 50°C і тиск підтримують при 50 фунт/кв. дюйм (3,1 кг/кв. см) доти, поки не буде відмічена відсутність подальшого споживання водню. Каталізатор фільтрують, і розчинник видаляють за допомогою відгонки у вакуумі. Вихід виділеного продукту загалом становить 91%, що дає 3,8 г продукту.

15

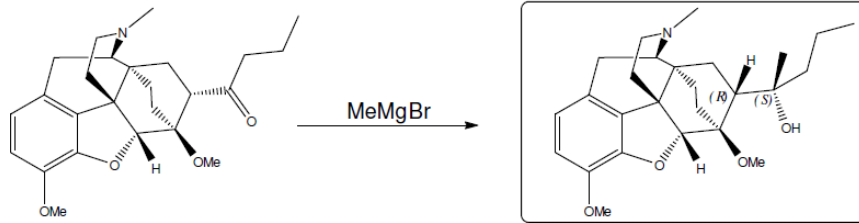
Таблиця 2

Узагальнені результати експериментів, стадія 2

Масштаб	Умови	Температура (°C)	Коментарі
4,1 г	Етанол (60 мл) 1 г Pd/C (10%) водень (50 фунт/кв. дюйм (3,1 кг/кв. см))	50°C	вихід виділеного продукту приблизно 91%

Стадія 3 - Додавання Гріньяра

Схема реакції



(S)-19Pr-DHT

20

Спосіб

19-пропілдігідротевінон (продукт стадії 2) розчиняють в простому діетиловому ефірі (35 об.). До цього розчину додають метилмагнійбромід (92,6 моль. екв.) протягом 5 хвилин при 20-25°C (невелика екзотермічність). Потім одержану суміш нагрівають до внутрішньої температури приблизно 40°C протягом приблизно 2 годин, перед охолодженням і гасінням розчином хлориду амонію. Суміш екстрагують 2-метил ТГФ, і органічні шари випарюють у вакуумі, з одержанням в'язкого масла.

25

Таблиця 3

Узагальнені результати експериментів, стадія 3

Масштаб	Умови	Температура (°C)	Коментарі
0,13 г	простий 2-діетиловий ефір (25 об.) 3 М MeMgBr (1,5 екв.)	40°C	Хороша якість одержаного продукту
0,79 г	простий 2-діетиловий ефір (25 об.) 3 М MeMgBr (1,5 екв.)	35°C	Перемішування протягом ночі. Чистота після витягання 93%. Сирий продукт перетирають в метанолі, з одержанням 0,32 г чистого матеріалу і 0,5 г забруднених залишків.
2,2 г	простий 2-діетиловий ефір (35 об.) 3 М MeMgBr (2,6 екв.)	35°C	Виділяють 2,6 г сирого продукту (чистота приблизно 90%). Перетирають в метанолі, з одержанням 1,6 г чистого матеріалу.

Єдиний продукт додавання Гріньяра являє собою (S)-енантіомер. (R)-енантіомера не виявляється.

5 Стадія 4 - Кристалізація (R)- і (S)-19-пропілдігідротевінолу

Для одержання монокристала високої якості для рентгеноструктурного аналізу, здійснюють ряд експериментів у множині розчинників для визначення найкращої системи розчинників для росту монокристала 19-пропілдігідротевінолу. Результати експериментів стисло викладені в таблиці 4, нижче. (R)-енантіомер одержують з використанням альтернативного способу.

10 Як правило, спосіб кристалізації, що використовується, являє собою наступне: малу кількість твердого 19-пропілдігідротевінолу (одержаного на стадії 3) розчиняють в кількості розчинника, що трохи перевищує мінімальну. Розчину дозволяють постояти протягом до 3-4 днів, і розчинник видаляють за допомогою фільтрування або декантування для виділення монокристалів.

15

Таблиця 4

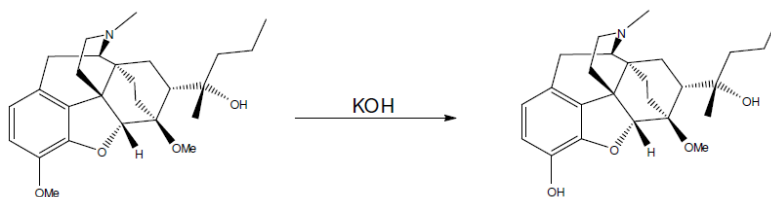
Узагальнені результати перекристалізації

Розчинник	Співрозчинник	Діастереоізомер	Температура	Кристали	Коментарі
MTBE	Немає	(S)	кімнатна температура	Так	Висока якість - передають для рентгеноструктурного аналізу
AcCN	Немає	(S)	кімнатна температура	Так	Висока якість
DCM	Немає	(R)	розчиняють гарячим	Так	Висока якість - передають для рентгеноструктурного аналізу
Ацетон	Немає	(R)	розчиняють гарячим	Так	Висока якість - передають для рентгеноструктурного аналізу
Етанол	Немає	(R)	розчиняють гарячим	Так	Висока якість - передають для рентгеноструктурного аналізу

Спектри ¹H-ЯМР для кожного з діастереомерів показані на фіг. 1.

Стадія 5 - Гідроліз (S)-19-пропілдігідротевінолу

Схема реакції



Спосіб

(S)-19-пропілдігідротевінол (стадії 3) розчиняють в діетиленгліколі (17 об.) і обробляють гідроксидом калію (приблизно 20 екв.), і нагрівають до приблизно 195°C протягом 12-18 годин. Після проходження цього часу, реакційну суміш охолоджують до кімнатної температури і гасять водою (40 об.). Одержаний в результаті розчин підкисляють до pH 9-10 з використанням твердого хлориду амонію, і суміш екстрагують DCM (3×50 об.). Об'єднані органічні екстракти випарюють у вакуумі до одержання сирого масла (чистота приблизно 40%). Чистоту підвищують за допомогою багаторазових перетирань в метанолі доти, поки не утворюється і не буде виділений з хорошою чистотою (>95%) твердий продукт жовтого кольору.

Продукт перекристалізують з декількох розчинників, і кристали одержують з ацетонітрилу. Вони використовуються для досліджень за допомогою рентгеноструктурного аналізу.

(R)-енантіомер одержують з використанням аналогічної реакції.

Дослідження за допомогою рентгеноструктурного аналізу

Всі експерименти з рентгеноструктурного аналізу здійснюють на дифрактометрі для монокристалів Oxford Xcalibur або на дифрактометрі Nonius Карра. Обидва прилади використовують джерела рентгенівських променів молібдену K альфа і детектори на основі CCD (цифрових камер).

(R)- і (S)-19-пропілдігідротевінол

Декілька завантажень як (R)-, так і (S)-19-пропілдігідротевінолу, направляються для рентгеноструктурного аналізу.

Структури, одержані за допомогою рентгеноструктурного аналізу, показані на фіг. 2-5.

Фіг. 2 і 3 показують структуру, одержану за допомогою рентгеноструктурного аналізу (R)-19-пропілдігідротевінолу. З рентгеноструктурного аналізу можна чітко побачити, що він має (R)-конфігурацію на атомі вуглецю 19. Це може бути приписано хіральному простому метиловому ефіру, який зберігає (R)-конфігурацію від вихідного матеріалу тебаїну.

Додатково, на фіг. 3, де показані атоми водню, можна побачити, що водень в положенні 7 знаходиться по той самий бік, що і атом водню в положенні 5 (поруч з фурановим кільцем), даючи (R)-конфігурацію.

Таким чином, всі хіральні атоми вуглецю тепер приписані і зображені на фіг. 10.

Таблиця 6

Інша інформація про (R)-19-пропілдігідротевінол

Властивість	Значення
Симетрія елементарної комірки	Моноклинна
Найменування просторової групи симетрії	H-M P2(1)
Еквівалентні положення групи симетрії петель як хуз	'x, y, z'-x, y+1/2, -z'
Довжина елементарної комірки a	11,0464(6)
Довжина елементарної комірки b	12,4554(7)
Довжина елементарної комірки c	16,2271(7)
Кут альфа елементарної комірки	90,00
Кут бета елементарної комірки	98,481(5)
Кут гамма елементарної комірки	90,00
Об'єм елементарної комірки	2208,2(2)

Фіг. 4 і 5 показують структуру, одержану за допомогою рентгеноструктурного аналізу, (S)-19-пропілдігідротевінолу.

На фіг. 4 можна чітко побачити, що він має стереохімію (S)-конфігурації на атомі вуглецю 19, протилежну відносно кристала, показаного на фіг. 3. Це може бути приписано хіральному простому метиловому ефіру, який зберігає (R)-конфігурацію від вихідного матеріалу тебаїну.

Знову ж, атом водню на атомі вуглецю в положенні 7 (показаний на фіг. 5) показує, що конфігурація на цьому атомі вуглецю також являє собою (R), як і для першого діастереоізомеру.

З цієї причини автори можуть тепер з впевненістю зробити висновок, що єдина відмінність між 2 сполуками згідно з рентгеноструктурним аналізом полягає в стереоконфігурації на атомі вуглецю 19.

Таблиця 7

Інша інформація про (S)-19-пропілдігідротевінолі

Властивість	Значення
Симетрія елементарної комірки	Моноклинна
Найменування просторової групи симетрії	H-M P2(1)
Еквівалентні положення групи симетрії петель як хуз	'x, y, z'-x, y+1/2, -z'
Довжина елементарної комірки a	13,8650(3)
Довжина елементарної комірки b	10,8560(2)
Довжина елементарної комірки c	15,4030(4)
Кут альфа елементарної комірки	90,00
Кут бета елементарної комірки	99,7500(8)
Кут гамма елементарної комірки	90,00
Об'єм елементарної комірки	2284,95(9)

5

(R)- і (S)-дигідроеторфін

Структури, одержані за допомогою рентгеноструктурного аналізу, показані на фіг. 6-9.

Фіг. 6 і 7 показують структуру, одержану за допомогою рентгеноструктурного аналізу, для (R)-дигідроеторфіну. На цих фігурах можна чітко побачити, що він має (R)-конфігурацію на атомі вуглецю 19. Це може бути приписано хіральному простому метиловому ефіру, який зберігає (R)-конфігурацію від початкового вихідного матеріалу тебаїну.

10

Таблиця 8

Інша інформація про (R)-дигідроеторфін

Властивості	Значення
Найменування просторової групи симетрії	P 2 ₁ 2 ₁ 2
Еквівалентні положення групи симетрії петель як хуз	'x, y, z', '-x, 1/2+y, -z'
Довжина елементарної комірки a	16,3405(7)
Довжина елементарної комірки b	35,605(2)
Довжина елементарної комірки c	7,5209(3)
Кут альфа елементарної комірки	90,00
Кут бета елементарної комірки	90,00
Кут гамма елементарної комірки	90,00
Об'єм елементарної комірки	4375,69

Фіг. 8 і 9 показують структуру, одержану за допомогою рентгеноструктурного аналізу, для (S)-дигідроеторфіну. На цих фігурах можна чітко бачити, що він має (S)-конфігурацію на атомі вуглецю 19. Це може бути приписано хіральному простому метиловому ефіру, який зберігає (R)-конфігурацію від початкового вихідного матеріалу, тебаїну.

15

На додаток до цього, атом водню на атомі вуглецю в положенні 7 (показано на фіг. 9) показує, що конфігурація на цьому атомі вуглецю також являє собою (R), як і для першого діастереоізомеру.

20

З цієї причини, можна зробити висновок, що єдина відмінність між 2 сполуками згідно з рентгеноструктурним аналізом являє собою стереоконфігурацію на атомі вуглецю 19.

Таблиця 9

Інша інформація про (S)-дигідроеторфін

Властивість	Значення
Найменування просторової групи симетрії	H-M P2(1)
Еквівалентні положення групи симетрії петель як хуз	'x, y, z',
	Вісь обертання (2 порядку): '-x, -y, z'
	Гвинтова вісь (2 порядку): '1/2-x, 1/2+y, -z'
	Гвинтова вісь (2 порядку): '1/2+x, 1/2-y, -z'
Довжина елементарної комірки a	7,2310(3)
Довжина елементарної комірки b	14,0795(6)
Довжина елементарної комірки c	10,6984(5)
Кут альфа елементарної комірки	90,00
Кут бета елементарної комірки	96,226(4)
Кут гамма елементарної комірки	90,00
Об'єм елементарної комірки	1082,77

Оптимізація способу

Використовуються наступні способи і обладнання:

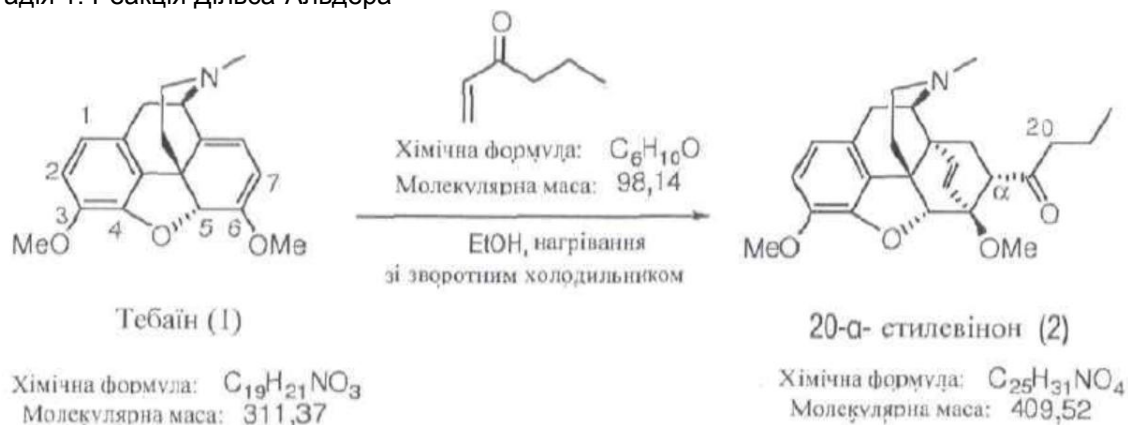
- 5 Спосіб 38XB і UFC-LC-MUN-1 являють собою процедури градієнтної ВЕРХ з оберненою фазою, з використанням колонки Xbridge C18 і рухомої фази, що складається з ацетонітрилу і 0,01 М ацетату амонію, pH 9,2.

ЯМР здійснюють з використанням спектрометра Bruker Avance 400 МГц.

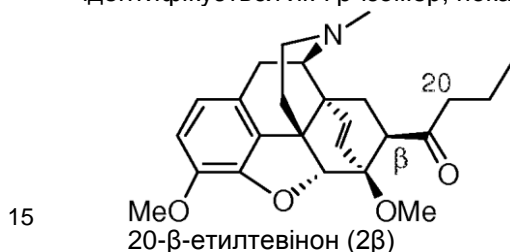
МС здійснюють з використанням маси-спектрометра ZMD Micromass.

- 10 РХ здійснюють з використанням системи ВЕРХ Agilent 1100.

Стадія 1: Реакція Дільса-Альдера



Використовуваний початковий спосіб є таким, як описано вище. Головна домішка ідентифікується як 7β-ізомер, показано нижче.



Згодом виявлено, що як чистота, так і витягання 20-β-етилтевінону можуть бути поліпшені за допомогою зменшення завантаження 1-гексен-3-ону від 2,8 до 1,8 еквівалента, таблиця 10. Додаткове поліпшення досягається за допомогою використання 1,5 еквівалента 1-гексен-3-ону (додають в 2 порції по 1,4 екв. і 0,1 екв.) і, при завершенні реакції, видалення 0,5 об. розчинника за допомогою відгонки. При охолодженні одержаного розчину продукт осаджується у вигляді твердого продукту (зістарюється протягом 1 години) і відфільтровується.

ПРОЦЕДУРА

- У 1-л (3-горлу) колбу, з'єднану з підвішеною зверху мішалкою і зворотним холодильником, завантажують наступне, тебаїн (0,32 М, 100 г, 1 екв.), EtOH (250 мл) і 1-гексен-3-он (90%, 0,45 М, 58 мл, 1,4 екв.). Суміш нагрівають зі зворотним холодильником протягом 13 годин і аналізують за допомогою ¹H-ЯМР і виявляють, що вона містить вихідний матеріал (приблизно 4,5% молярних). Додають додатково 0,1 екв. 1-гексен-3-ону, і суміш нагрівають протягом додаткових 2 годин, перед перемішуванням протягом ночі при кімнатній температурі. Аналіз показує вихідний матеріал (приблизно 2,8% молярних). Матеріал переносять в круглодонну колбу (500 мл) (колбу промивають 20 мл EtOH). EtOH (приблизно 65 мл) видаляють у вакуумі при 50°C, і одержаний осаджений твердий продукт перемішують при 5°C протягом 1 години перед фільтруванням. Твердий продукт промивають охолодженим на льоді EtOH (4×20 мл) і збирають сухим на фільтрі протягом приблизно 1,5 години. Твердий продукт білого кольору (105,4 г, 80%).

Таблиця 10

Масштаб	Умови	Температура (°C)	Коментарі
10 г	1 екв. тебаїну 2,8 екв. 1-гексен-3-ону 2,5 об. EtOH	Нагрівання зі зворотним холодильником (температура бані 94°C)	Вихід 69%, 9,03 г, містить 6% 7β-ізомеру - чистота 92%
2 г	1 екв. тебаїну 1,8 екв. 1-гексен-3-ону 2,5 об. EtOH	Нагрівання зі зворотним холодильником (температура бані 94°C)	Вихід 55%, 1,44 г. Матеріал осаджується при охолодженні - чистота >99,5%
100 г	1 екв. тебаїну 1,5 екв. 1-гексен-3-ону 2,5 об. EtOH	Нагрівання зі зворотним холодильником (температура бані 101°C)	Вихід 80%, 105,4 г. Матеріал осаджується. Чистота >99,5%

- Аналітичні методи і перевірки в ході способу (IPC)
Для IPC використовують ¹H-ЯМР (400 МГц) плюс метод ВЕРХ 38ХВ під час роботи в лабораторії.
Реакцію вважають завершеною, коли залишається <5% молярних вихідних матеріалів згідно з ¹H-ЯМР на основі сигналів при δ 5,05 м. ч. і 5,3 м. ч. (CDCl₃).
Для підтвердження чистоти і для роботи РХ-МС використовують метод UFC-LC-MUN-1 в аналітичній лабораторії.
ТШХ (5% MeOH/95% DCM) із забарвленням йодоплатинатом: R_f=0,25, тебаїн, R_f=0,66, (7α)-20-етилтевінон.

Узагальнені аналітичні результати

Зовнішній вигляд	ВЕРХ (% площа/площа)		
	7α-20-етилтевінон	Тебаїн	7β-20-етилтевінон
RT/RRT	10,69/1,0	5,82/0,54	11,67/1,09
Твердий продукт білого кольору	>99,5	немає	немає

- ¹H-ЯМР (CDCl₃; 400 МГц); δ=0,80 (3H, т), 1,4 (1H, м), 1,6 (3H, секст.), 1,9 (1H, д), 2,0 (1H, ушир.), 2,4-2,6 (8H, м), 2,9 (2H, ушир.), 3,35 (2H, д), 3,6 (3H, с), 3,85 (3H, с), 4,6 (1H, с), 5,6 (1H, д), 6,0 (1H, д), 6,55 (1H, д), 6,7 (1H, д)
¹³C-ЯМР (CDCl₃; 75 МГц); δ=13,71, 16,89, 22,49, 30,25, 43,26, 43,51, 45,57, 45,72, 47,40, 49,94, 53,78, 56,68, 60,06, 81,52, 95,84, 113,61, 119,36, 125,89, 134,07, 135,53, 141,87, 148,07.
МС; [M+H]⁺=410,3.
РХ; чистота >99,5%.
ТШХ; 5:95; MeOH:DCM; R_f=0,66 для однієї плями.
Переваги оптимізованого способу
Збільшення виходу до 80%.

Кількість 1-гексен-3-ону знижується до 1,5 еквівалента без зменшення перетворення або виходу.

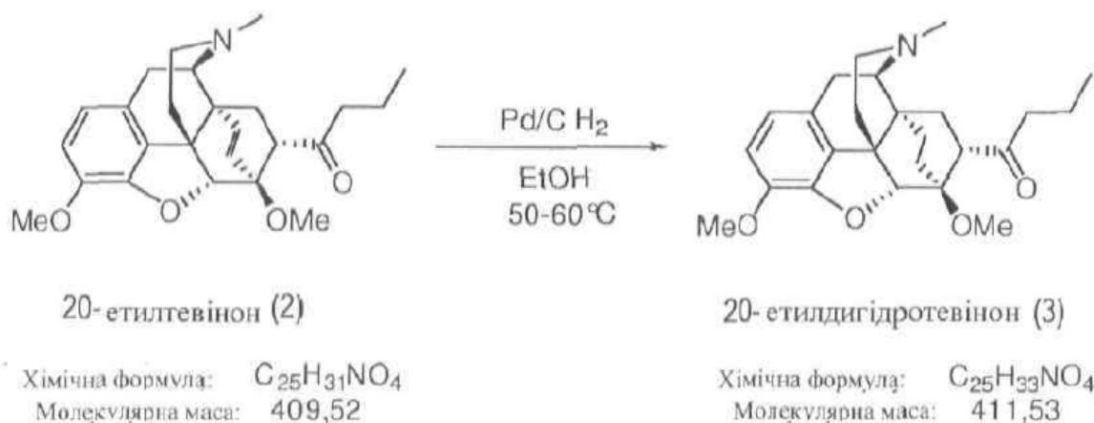
Зменшення кількості еквівалентів 1-гексен-3-ону робить можливим поліпшення виділення (пряма кристалізація з реакційного розчинника), що дає матеріал дуже високої чистоти.

Об'ємна ефективність є дуже високою (максимум приблизно 4 об. загалом).

Чистота поліпшується до >99% (згідно з ВЕРХ).

ІРС показує завершення при перетворенні >97% згідно з ^1H -ЯМР (<3% тебаїну).

Стадія 2: Гідрування



Результати технологічної роботи для стадії гідрування показані в таблиці 11 нижче. Реакцію „стискають” як з точки зору навантаження каталізатора, так і температури реакції. На додаток до цього, за допомогою зменшення об'єму реакції від 17 до 12 об., поліпшується як якість продукту, так і виділення продукту.

Цікаво, що як вихідний матеріал, так і продукт є термічно стабільними до приблизно 80°C протягом 1-2 годин, що робить можливою більш високою температуру реакції, збільшуючи розчинність, як вихідного матеріалу, так і продукту, під час реакції. Виявлено, що в цьому випадку розчинність є ключем до хорошої реакційної здатності і використання більш високих температур під час масштабування для досягнення завершення реакції.

При кінцевому масштабуванні реакції температура підвищується поза "нормальним" діапазоном під час вихідного нагрівання реакційної ємності, і спостерігається швидка реакція (споживання водню). При зниженні температури до 55°C реакція значно сповільнюється, і тільки при додатковому додаванні каталізатора і при збільшенні температури до приблизно 65°C реакція досягає завершення.

Виділення продукту спрощується за допомогою нагрівання реакційної суміші до 77°C, що дозволяє одержання температури трохи нижче температури дефлегмації, а потім відфільтровування каталізатора з реакційної суміші. Одержаний розчин спочатку зменшується в об'ємі за допомогою відгонки, однак, виявлено, що розчин міг би охолоджуватися на льодяній бані, і матеріал високої чистоти виділяється за допомогою фільтрування твердого продукту, що кристалізувався, з хорошим виходом (72%).

ПРОЦЕДУРА

20-етилтевінон (0,244 М, 100 г) завантажують в 2-л апарат Парра для гідрування. 10% Pd/C (вологість 50%, 10 г) суспендують в EtOH (200 мл) і завантажують в ємність для гідрування. EtOH (1 л) завантажують в ємність, ємність герметизують і заповнюють інертним газом аргонем (×4). Ємність повторно заповнюють воднем до тиску 50 фунт/кв. дюйм (3,1 кг/кв. см) (×2) і, нарешті, залишають при тиску 50 фунт/кв. дюйм (3,1 кг/кв. см). Температуру встановлюють при 35°C. Внутрішню температуру швидко доводять до 82°C, а потім дають можливість для охолодження зворотно до кімнатної температури протягом ночі (екзотермічне виділення тепла в ємності). Ємність повторно заповнюють H_2 , відбирають зразки і аналізують їх за допомогою РХ, і виявляють, що реакція не завершується. Ємність нагрівають до внутрішньої температури 55-65°C, і хід реакції відстежують за допомогою РХ - тиск водню підтримують при 50 фунт/кв. дюйм (3,1 кг/кв. см) за допомогою періодичних повторних наповнювань. Через 24 години здійснюють додаткове завантаження каталізатора (5 г), і реакція продовжується. Після проходження додаткових 16 годин реакція завершується згідно з РХ і ^1H -ЯМР. Внутрішню температуру підвищують до 68°C, і суміш переносять у вакуумі в 3-л ємності RBF. Апарат Парра промивають гарячим EtOH (200 мл), і промивання переносять в RBF. Суміш нагрівають до 77°C

перед фільтруванням (папір GF/F). Шар каталізатора промивають гарячим EtOH (1×300 мл), і фільтрату дозволяють охолоджуватися до кімнатної температури. Фільтрат охолоджується на льодяній бані протягом 50 хвилин перед фільтруванням. Зібраний твердий продукт промивають охолодженим на льоді EtOH (1×100 мл), гептаном (1×300 мл) і збирають сухим протягом 1,5 години. Твердий продукт білого кольору (72 г, 72%).

Таблиця 11

Масштаб	Умови	Температура (°C)	Коментарі
4,5 г	1 екв. 20-етилтевінону, Pd/C (вологість 50%, 2,71 г), 14 об. EtOH, 25 фунт/кв. дюйм (1,55 кг/кв. см) H ₂	Температура в ємності 55°C	Через 16 годин, 1 г зразка (залишають 0,7% SM) видаляють. Реакцію продовжують до завершення. Вихід 90%, 3,4 г
0,680 г	1 екв. 20-етилтевінону, Pd/C (вологість 50%, 0,034 г), 70 об. EtOH, 50 фунт/кв. дюйм (3,1 кг/кв. см) H ₂	Температура в ємності 55°C	Вихід 85%, 0,580 г
2,32 г	1 екв. 20-етилтевінону (547-089-1), Pd/C (вологість 50%, 0,232 г), 17 об. EtOH, 50 фунт/кв. дюйм (3,1 кг/кв. см) H ₂	Температура в ємності 55°C	Через 16 годин реакція завершується. Реакційну суміш фільтрують, концентрують до приблизно 1/3 об. і осад збирають. Вихід 64%, 1,494 г
0,6 г	1 екв. 20-етилтевінону (547-090-1), Pd/C (вологість 50%, 0,60 г), 17 об. EtOH, 50 фунт/кв. дюйм (3,1 кг/кв. см) H ₂	Температура в ємності 55°C	Реакція завершується через 16 годин. Витягання неповне.
100 г	1 екв. 20-етилтевінону, Pd/C (вологість 50%, 15 г), 12 об. EtOH, 50 фунт/кв. дюйм (3,1 кг/кв. см) H ₂	Максимальна температура в ємності 82°C Оптимальна температура приблизно 60°C.	Продукт кристалізують з реакційної суміші після видалення з каталізатора. Вихід 72%, чистота >99%

Аналітичні методи і перевірки в ході способу

Використовують ¹H-ЯМР (400 МГц) для IPC плюс метод ВЕРХ 38ХВ під час роботи в лабораторії. Хід реакції відстежують за допомогою аналізу РХ: реакція, здійснювана в масштабі 100 г, показує відсутність 20-етилтевінону і 96% 20-етилдигідротевінону.

Для підтвердження чистоти і для роботи методу РХ-МС продукт реакції в масштабі 100 г використовують в аналітичній лабораторії.

Аналітичні результати

Зовнішній вигляд	ВЕРХ (% площа/площа)	Коментарі
Твердий продукт білого кольору	>99	20-етилтевінону не залишається. Інші домішки не виявляються.

Аналіз

¹H-ЯМР (CDCl₃, 400 МГц); δ=0,75 (1H, т, т), 0,9 (1H, т), 1,35 (1H, т, д), 1,5-1,75 (7H, м), 2,1 (1H, т, д), 2,3 (5H, м), 2,5 (2H, кв.), 2,6-2,7 (3H, м), 3,0 (1H, кв., т), 3,1 (1H, д), 3,5 (3H, с), 3,9 (3H, с), 4,5 (1H, д), 6,6 (1H, д), 6,7 (1H, д).

¹³C-ЯМР (CDCl₃, 75 МГц); δ=13,73, 16,99, 17,31, 21,98, 28,67, 30,70, 35,17, 35,66, 43,51, 45,24, 45,78, 48,28, 48,91, 52,26, 56,76, 61,35, 94,96, 114,01, 119,16, 128,71, 132,47, 141,76, 146,80.

РХ; >99%.

Залишковий розчинник (згідно ¹H-ЯМР); залишкового етанолу немає.

Переваги оптимізованого способу

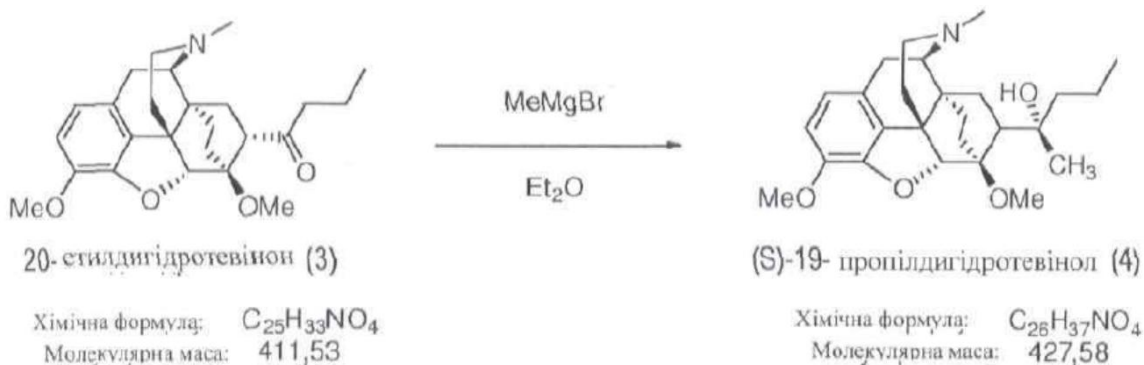
Зменшення об'єму реакції від 17 до 12 об. дозволяє пряму кристалізацію продукту.

Продукт виділяється з виходом 72%, з чистотою >99%.

Температура приблизно 65°C, очевидно, є оптимальною для розчинності і реакційної здатності.

Сушіння твердого продукту на фільтрувальному шарі і промивання гептаном видаляє сліди етанолу до прийнятного рівня, готового для наступної стадії.

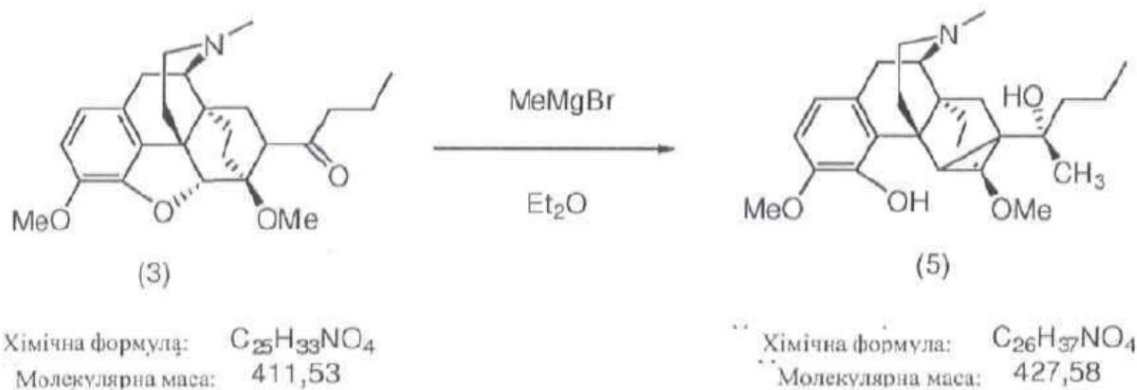
Стадії 3 і 4: Реакція Грін'єра і кристалізація



5

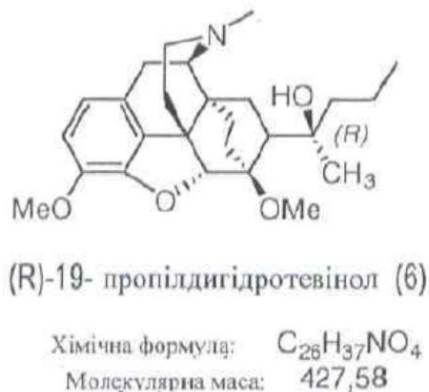
Результати роботи наводяться в таблиці 12, нижче. Досліджують різні ефірні розчинники, при цьому простий діетиловий ефір дає матеріал, найкращий за якістю, хоча різниця між простим діетиловим ефіром і МТБЕ, як виявлено, є відносно невеликою.

10 Як правило, сирий матеріал, одержаний при реакції Грін'єра, містить дві головних домішки (приблизно 10% кожні, РХ-МС). Обидві домішки мають однакову масу ($[M+H]^+=428,4$) як продукт). Одна з двох домішок експериментально визначається як складовий ізомер, який виникає внаслідок реакції закривання кільця і відкривання кільця при надлишку реагенту Грін'єра на 20-етилдигідротевіноні.



15

Друга домішка, яка має час утримування (РХ-МС), схожий з продуктом, як передбачається, є діастереоізомером (R)-19-пропільдигідротевінолу.



20

Обидві домішки ефективно віддаляються за допомогою перекристалізації з метанолу.

Роль температури реакції досліджують за допомогою простого діетилового ефіру, і виявлено, що профілі реакції, з точки зору як ходу реакції, так і домішок (аналіз РХ) порівнянні при кімнатній температурі і при температурі дефлегмації.

Таким чином, відмінності, що спостерігаються в чистоті, відмічені в реакціях, як вважається, виникають з відмінностей в процедурах очищення (перекристалізація з використанням масляної

бані і нагрівання зі зворотним холодильником з магнітною мішалкою, або перетирання за допомогою обертання в роторному випарнику з метанолом).

Метилмагнійодид також використовують, і він дає результати, порівнянні з бромідом.

ПРОЦЕДУРА

- 5 20-етилдигідротевінон (0,073 М, 30 г) розчиняють (каламутний розчин) в безводному простому діетиловому ефірі (1050 мл; 35 об.). Метилмагнійбромід (0,189 М, 63 мл) додають по краплях протягом 1 години, підтримуючи внутрішню температуру нижче 28°C. Одержану суспензію білого кольору нагрівають зі зворотним холодильником протягом 5 годин, охолоджують до кімнатної температури і перемішують в атмосфері азоту протягом ночі.
- 10 Аліквоту (приблизно 0,3 мл) видаляють і гасять насиченим NH_4Cl (приблизно 1,0 мл), і аналізують за допомогою РХ (верхній шар від аліквоти розбавляють MeCN (приблизно 1 мл). Реакцію продовжують доти, поки рівень вихідних матеріалів не стане меншим 5%. Реакцію гасять за допомогою додавання насиченого розчину NH_4Cl (138 мл) до реакційної суміші, підтримуючи внутрішню температуру нижче 30°C. Фази суміші розділяють, водну фазу екстрагують простим діетиловим ефіром (1×200 мл), а об'єднану органічну фазу сушать (MgSO_4). Розчин концентрують у вакуумі, з одержанням в'язкого масла (33,4 г). Додають MeOH (100 мл), і суміш нагрівають до температури бані 60°C, перед охолодженням до кімнатної температури. Твердий продукт фільтрують, промивають охолодженим на льоді MeOH (3×25 мл), промивають гептаном (1×25 мл), і сухий продукт збирають. Твердий продукт білого кольору
- 20 (21 г, 68%).

Таблиця 12

Масштаб	Умови	Температура (°C)	Коментарі
1,0 г	1 екв. 20-EtDHT, 1,2 екв. MeMgBr 6,1 об. 2-MeTHF	60°C	Сирий матеріал очищують за допомогою колонкової хроматографії з одержанням двох головних фракцій: 180 мг продукту з домішками плюс неідентифікований матеріал (140 мг)
0,5 г	1 екв. 20-EtDHT, 2,6 екв. MeMgBr 35 об. Et_2O	нагрівання зі зворотним холодильником	0,44 г маслянистої смоли, яка гарно виглядає згідно з ^1H -ЯМР. Перетирання з MeOH дає два зразки: 160 мг (96%) і 150 мг (90%)
0,6 г	1 екв. 20-EtDHT, 2,6 екв. MeMgI 35 об. Et_2O	нагрівання зі зворотним холодильником	0,45 г маслянистої смоли. Чистота = 77% (згідно з РХ). Перетирання дає 110 мг з чистотою 94,1%.
30,0 г	1 екв. 20-EtDHT 2,6 екв. MeMgBr 35 об. Et_2O	нагрівання зі зворотним холодильником	<2% SM і 81% продукту. Після витягання і перекристалізації з MeOH : вихід 68%, 21 г, чистота >99%.
1 г	1 екв. 20-EtDHT 2,6 екв. MeMgBr 35 об. TBME	швидке додавання, потім нагрівання, 45°C/4 години	Після витягання і перетирання з MeOH : вихід 54%, 0,56 г, чистота 96%
1 г	1 екв. 20-EtDHT 2,6 екв. MeMgBr 35 об. CPME	швидке додавання, потім нагрівання, 45°C/4 години	Після витягання і перетирання з MeOH : вихід 52%, 0,54 г, чистота 95,7%
10 г	1 екв. 20-EtDHT 2,6 екв. MeMgBr 35 об. TBME	швидке додавання, потім нагрівання, 35°C/4 години	Після завершення додавання MeMgBr : 1,2% 20-EtDHT, 85% продукту (ВЕРХ). Після нагрівання, витягання і перетирання з MeOH : вихід 75%, 7,79 г, чистота 96,4%
1 г	1 екв. 20-EtDHT 2,6 екв. MeMgBr 35 об. Et_2O	швидке додавання, без нагрівання, перемішують 4 години	Після завершення додавання MeMgBr : 0,3% 20-EtDHT, 84% продукту (ВЕРХ). Після витягання і перетирання з MeOH : вихід 58%, 0,60 г, чистота 94,8%

Аналітичні методи і перевірки в ході способу

Використовують ^1H -ЯМР (400 МГц) плюс метод ВЕРХ 38ХВ під час лабораторної роботи. Реакцію відстежують за допомогою аналізу РХ, і гасять аліквоту реакції (насичений розчин NH_4Cl): <2,0% 20-етилдигідротевінолу і 71% (S)-19-пропіддигідротевінолу.

Для підтвердження чистоти і для роботи РХ-МС використовують метод UFC-LC-MUN-1 в аналітичній лабораторії.

Аналітичні результати

Зовнішній вигляд	ВЕРХ (площа/площа %)	Коментарі
Твердий продукт білого кольору	94,1	3 MeMgl
Твердий продукт білого кольору	>99	Сирий матеріал має загальну чистоту 81% і містить <2% вихідних матеріалів

^1H -ЯМР (CDCl_3 , 400 МГц); δ =0,75 (1H, м), 0,85 (3H, т), 0,95-1,1 (6H, м), 1,3 (1H, м), 1,5-1,7 (7H, м), 1,8 (1H, т), 2,0 (1H, т, д), 2,1-2,4 (6H, м), 2,6 (1H, д), 2,7 (1H, т, д), 3,0 (1H, д), 3,5 (3H, с), 3,8 (3H, с), 4,3 (1H, с), 4,7 (1H, с), 6,5 (1H, д), 6,7 (1H, д).

^{13}C -ЯМР (CDCl_3 , 75 МГц); δ =15,12, 16,96, 18,04, 21,91, 25,55, 29,88, 31,99, 35,53, 36,05, 38,97, 43,53, 45,17, 46,19, 49,09, 50,77, 52,72, 56,93, 61,32, 80,34, 97,05, 114,21, 119,06, 128,84, 132,48, 141,63, 146,97.

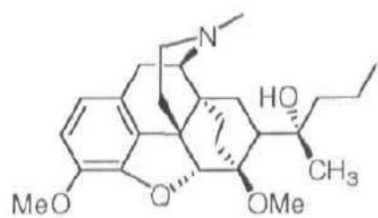
РХ; >99%.

Переваги оптимізованого способу

Реакція працює в деякому діапазоні ефірних розчинників, хоча простий діетиловий ефір, очевидно, дає самий чистий сирий продукт.

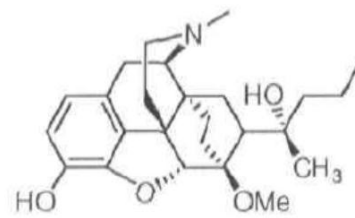
Матеріал чудової чистоти одержують після перекристалізації з метанолу.

Стадія 5: Гідроліз



(S)-19-пропіддигідротевінол (4)

Хімічна формула: $\text{C}_{25}\text{H}_{37}\text{NO}_4$
Молекулярна маса: 427,58



(S)-дигідроеторфін

Хімічна формула: $\text{C}_{25}\text{H}_{35}\text{NO}_4$
Молекулярна маса: 413,55

Реакція здійснюється без значних змін (таблиця 13). Перекристалізацію здійснюють з суміші етанол/вода, а потім з етанолу.

ПРОЦЕДУРА

(S)-DHE (10 г) додають до EtOH (60 мл) і нагрівають зі зворотним холодильником до розчинення. Вода (32 мл) утворює каламутний розчин, якому дозволяють охолоджуватися до кімнатної температури протягом приблизно 2 годин. Твердий продукт білого кольору збирають за допомогою фільтрування. (4,26 г, витягання 42 мас.%). Чистота 98%. Загальний вихід рівний 45 мас.%.

Таблиця 13

Масштаб	Умови	Температура (°C)	Коментарі
15 г	(S)-19-пропіддигідротевінол (1 екв.), KOH (20,85 екв.), діетиленгліколь (16,6 об.)	185	Реакцію нагрівають при 185°C протягом приблизно 18 годин за допомогою повітряного конденсора. Вихід сирого продукту 107%, чистота 95%

Аналітичні методи і перевірки в ході способу

Для IPC під час роботи в лабораторії використовують ^1H -ЯМР (400 МГц) плюс метод ВЕРХ 38ХВ. Реакцію відстежують за допомогою аналізу РХ і потім гасять, коли не залишається (S)-19-пропілдігідротевінолу. Реакція завершується на 92%.

Для підтвердження чистоти і для роботи РХ-МС використовують метод UFC-LC-MUN-1 в аналітичній лабораторії.

Аналітичні результати

Зовнішній вигляд	ВЕРХ (площа/площа %)
Твердий продукт жовтувато-коричневого кольору	95,0

^1H -ЯМР (CDCl_3 , 400 МГц); δ =0,7 (1H, м), 0,8 (3H, т), 1,0-1,1 (5H, м), 1,3 (1H, м), 1,5-1,8 (6H, м), 1,85 (1H, т), 1,95 (1H, т, д), 2,1-2,3 (5H, м), 2,6 (1H, д), 2,7 (1H, т), 3,0 (1H, д), 3,5 (3H, с), 4,3 (1H, с), 4,8 (1H, с), 6,0 (1H, ушир.), 6,4 (1H, д), 6,7 (1H, д).

^{13}C -ЯМР (CDCl_3 , 75 МГц); δ =15,10, 16,95, 18,00, 21,99, 25,37, 29,82, 31,96, 35,43, 36,15, 38,93, 43,51, 45,22, 46,50, 49,04, 52,72, 61,33, 80,42, 97,38, 116,61, 119,46, 127,92, 132,07, 137,56, 145,67.

РХ; 98,8%.

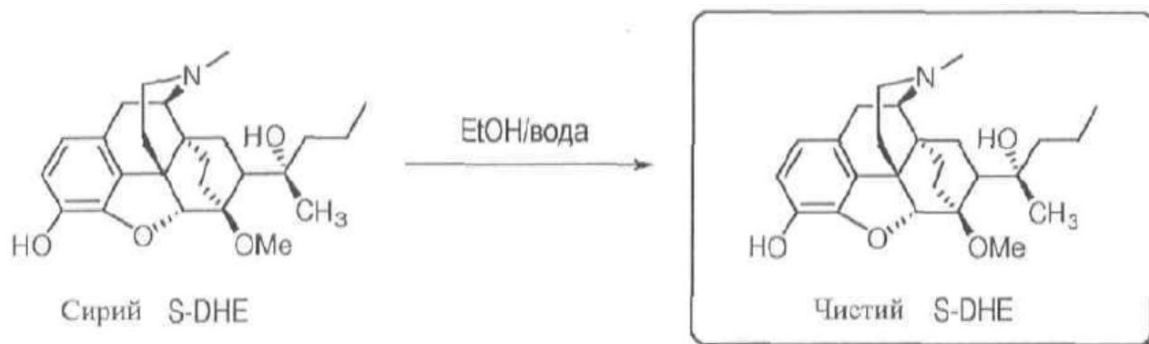
Хіральна РХ; 99,44% (S)-DHE, 0,554 (R)-DHE.

Переваги оптимізованого способу

Значне поліпшення чистоти сирового матеріалу, одержаного при реакції, до 95%.

Усунення перетирання з метанолом - матеріал перекристалізується з суміші етанол/вода і з етанолу.

Стадія 6: Перекристалізація



Збільшення вмісту води до приблизно 35% (загальний об'єм 9,2 об.) призводить до утворення твердого продукту білого кольору. Додаткові перекристалізації з етанолу і суміші етанол/вода поліпшують чистоту матеріалу (таблиця 14).

ПРОЦЕДУРА

(1) (S)-DHE (3,0 г) додають до EtOH (10 мл) і суспензію нагрівають зі зворотним холодильником, з одержанням розчину оранжевого кольору. Розчину дозволяють охолоджуватися до кімнатної температури протягом 16 годин. Одержаний твердий продукт білого кольору збирають за допомогою фільтрування (2,1 г, 70 мас.%). Чистота >99%.

(2) (S)-DHE (1,8 г) додають до EtOH (7 мл), і суміш нагрівають зі зворотним холодильником до одержання розчину. Додають воду (2 мл), і каламутному розчину дозволяють охолоджуватися до кімнатної температури протягом 2 годин. Одержаний твердий продукт білого кольору збирають за допомогою фільтрування (1,29 г, 72 мас.%).

Таблиця 14

Масштаб	Умови	Температура (°C)	Коментарі
10 г	9,2 об. суміші EtOH/вода, приблизно 65/35	нагрівання зі зворотним холодильником	Матеріал нагрівають в EtOH, потім додають воду. Твердий продукт білого кольору, витягання 42 мас.%, чистота 98%
3,0 г	3,3 об. (EtOH)	нагрівання зі зворотним холодильником	Твердий продукт білого кольору, витягання 70 мас.%, чистота >99%

Продовження таблиці 14

Масштаб	Умови	Температура (°C)	Коментарі
1,8 г	4,5 об. (20% води/80% EtOH)	нагрівання зі зворотним холодильником	При нагріванні зі зворотним холодильником додають воду, потім дозволяють охолоджуватися. Витягання 72 мас.%, чистота >99%

- Аналітичні методи і перевірки в ході способу
- 5 Для IPC під час лабораторної роботи використовують ^1H -ЯМР (400 МГц) плюс метод ВЕРХ 38ХВ.
- Для підтвердження чистоти і для робіт РХ-МС використовують метод UFC-LC-MUN-1 в аналітичній лабораторії. Для підтвердження хіральної чистоти використовують метод UFC-LC-MUN-2 в аналітичній лабораторії.

Аналітичні результати

Зовнішній вигляд	ВЕРХ (площа/площа %)	Хіральна чистота (ВЕРХ), %
Твердий продукт білого кольору	>99%	99,98

10

Переваги оптимізованого способу

Перекристалізація з суміші етанол/вода або з етанолу дає матеріал з хорошою загальною чистотою і <0,02% (R)-DHE.

- 15 Використання (R)- і (S)-дигідроеторфіну при лікуванні болю
- Вплив (R)- і (S)-дигідроеторфіну в тесті відсмикувати хвоста для ноцицепції у щурів
- Модель, що використовується для дослідження, добре відома в даній галузі і описується в J. Pharmacol Exp Ther, 1941, 72, 74-79 (D'Amour et al, A method for determining loss of pain sensation)).

- 20 Метою цього дослідження є оцінка потенційних анагетичних впливів R- і S-ізомерів дигідроеторфіну (R-DHE і S-DHE), при дозах 0,1, 0,3 і 0,5 мкг/кг (R-DHE) і 3, 10 і 30 мкг/кг (S-DHE), в тесті відсмикувати хвоста, розробленому для виявлення впливів на ноцицепцію у щурів. Як еталонну речовину використовують морфін гідрохлорид, а як порівняльну речовину використовують фентаніл цитрат.

- 25 Досліджувані речовини і матеріали
- Досліджувані речовини, еталонна речовина і носій
- Досліджувана речовина: Дигідроеторфін (R-DHE безбарвна рідина, що використовується у вигляді вільної основи) і дигідроеторфін (S-DHE рідина; що використовується у вигляді вільної основи).

- 30 Носій для досліджуваної речовини: цитратний буфер (моногідрат лимонної кислоти:цитрат натрію:хлорид натрію:вода для інфузії при відношенні 0,03:0,10:0,86:90,01 (г:г:г:мл)) [моногідрат лимонної кислоти (порошок білого кольору, Sigma, UK), цитрат натрію (Sigma, UK), хлорид натрію (твердий продукт білого кольору; Merck), стерильна вода для інфузії (прозора рідина; Baxter Healthcare, UK)].

- 35 Еталонна речовина: морфін гідрохлорид (порошок білого кольору; Macfarlan Smith, Edinburgh, UK).

Порівняльна речовина: фентаніл цитрат (порошок білого кольору; Sigma, UK).

Зберігання досліджуваної, еталонної і порівняльної речовини

Досліджувані речовини зберігають при кімнатній температурі, захищають від світла, а еталонну і порівняльну речовини зберігають при кімнатній температурі.

- 40 Спосіб введення і рівні дозування

Спосіб введення R- і S-ізомерних форм DHE і носія являє собою внутрішньовенне введення. Можливий спосіб введення людям являє собою внутрішньовенне введення. Дози R-DHE складають 0,1, 0,3 і 0,5 мкг/кг. Дози S-DHE складають 3, 10 і 30 мкг/кг.

- 45 Доза морфіну складають 5 мг/кг. Спосіб введення морфіну являє собою внутрішньовенне введення.

Дози фентанілу складають 0,5, 2 і 6 мкг/кг. Спосіб введення фентанілу являє собою внутрішньовенне введення.

Тварини

Вид:

Щури

Лінія: Sprague-Dawley

Стать: чоловіча

Кількість тварин: для дослідження призначається 111 тварин; інші 9 тварин повертають на ферму

Віковий діапазон: 9-11 тижнів (на основі середньої маси тіла)

Діапазон мас: 198-258 г

Акліматизація: 6 днів після доставки, перед початком досліджень

Джерело: Harlan UK Ltd

Ідентифікація і випадковий розподіл тварин

Кожній тварині довільним чином привласнюється власний ідентифікаційний номер, який з'являється на картках з даними і на картках на клітках. Тварин ідентифікують за допомогою водостійкого маркування на хвості.

5 Здоров'я тварин і догляд за ними

Всі дослідження здійснюють відповідно до вказівок Animals (Scientific Procedures) Act 1986, з UK Home Office Guidance відносно застосування акту і з всіма застосовними Codes of Practice відносно відходу і утримання лабораторних тварин. Процедура, що застосовується в даних дослідженнях, покривається процедурою номер 213N, яка має помірну межу тяжкості.

10 Утримання і навколишнє середовище

Тварин утримують групами по 5 в клітках з твердим дном, заповнених тирсою. Під час акліматизації, кімнати і клітки чистять через регулярні інтервали для підтримки гігієни. Кімнати освітлюють за допомогою набору флуоресцентних ламп, з одержанням 12 годинного циклу світло-темрява (включають у 7.00, вимикають в 19.00), як рекомендується в Home Office Animals (Scientific Procedures) Act 1986. Повітря в кімнатах кондиціонується, і температура повітря і відносна вологість вимірюються. Під час періоду акліматизації підтримується кімнатна температура (в межах від 19 до 22°C) і рівні вологості знаходяться в межах від 22 до 44%. Під час процедури підтримується кімнатна температура (в межах від 20 до 21°C) і рівні вологості знаходяться в межах від 22 до 26%.

20 Дієта і вода

Дієта RM1(E) SQC (Special Diets Services, Witham, UK) і водопровідна вода з водопроводу пропонуються за вимогою. Кожне завантаження дієти доставляють з сертифікатом аналізу, що додається, який деталізує поживну композицію і рівні вказаних забруднень (наприклад, важких металів, афлатоксину і інсектицидів). Воду періодично аналізують на домішки і забруднення. Критерії для прийнятних рівнів забруднень в вихідних матеріалах дієти і воді, що поставляється, знаходяться в межах аналітичних специфікацій, встановлених виробником дієти і службою аналізів води, відповідно.

Стан здоров'я

30 Тварин перевіряють після прибуття і перед дослідженням; всі тварини здорові і вважаються придатними для експериментального використання.

ПОСТАНОВКА ЕКСПЕРИМЕНТУ

Приготування досліджуваних, еталонних і порівняльних речовин

35 Цитратний буфер приготують за допомогою точного зважування відповідних кількостей кожного компонента і розчинення їх в стерильній воді для інфузії. Коли компоненти повністю розчиняються, вимірюють осмоляльність і pH розчину. Носій вважається прийнятним, оскільки pH становить 5,01, що знаходиться в діапазоні pH від 4,8 до 5,2, і осмоляльність становить 96 мОсмор/кг, в межах від 280 до 300 мОсмор/кг. Нарешті, носій фільтрують через модуль Stericup Millex GV при асептичних умовах і зберігають при 2-8°C до використання.

40 Досліджувані речовини DHE (R- і S-ізомери), приготують для дозування як розчини в цитратному буфері. Бажані концентрації (0,02, 0,06 і 0,10 мкг/мл для R-DHE, і 0,6, 2 і 6 мкг/мл для S-DHE) для дозування одержують за допомогою послідовного розведення відповідних вихідних розчинів, які одержують при приблизній концентрації 20 мкг/мл. Вихідні розчини пропускають через вузол стерильного фільтрування 0,22 мкм Durapore Millex GV в скляні флакони і кожне подальше розведення стерильним цитратним буфером здійснюють за допомогою стерильних маніпуляцій. Препарати приготують в межах відомого періоду стабільності для R-DHE і зберігають в холодильнику, приблизно при 4°C, доти, поки вони не потребуватимуться для дозування.

50 Еталонну речовину, морфін гідрохлорид, приготують для дозування за допомогою розчинення відомої кількості в цитратному буфері, з одержанням розчину 1 мг/мл. Використовують коефіцієнт коректування 1,32, щоб дати можливість для вираження дози

морфіну в термінах вільної основи. Розчини приготують безпосередньо перед використанням і захищають від світла.

Порівняльну речовину, фентаніл цитрат, приготують для дозування за допомогою розчинення відомої кількості в цитратному буфері, з одержанням концентрації вихідного розчину 0,36 мг/мл. Цей вихідний розчин потім послідовно розбавляють цитратним буфером, з одержанням кінцевих концентрацій 0,1, 0,4 і 1,2 мкг/мл. Використовують коефіцієнт коректування 1,57, щоб дати можливість для вираження дози фентанілу в термінах вільної основи. Розчини приготують безпосередньо перед використанням і захищають від світла.

Розміри груп, дози і ідентифікаційні номери

Є 11 груп лікування, до 10 щурів в кожній групі. Кожній групі лікування привласнюють букву (від А до К). Щури розподіляються випадковим чином по групах лікування за день перед дозуванням на основі фонових значень перед дозуванням для тесту відсмикувати хвоста (дивіться нижче).

	D	Носій	5 мл/кг
F		R-DHE	0,1 мкг/кг
E		R-DHE	0,3 мкг/кг
K		R-DHE	0,5 мкг/кг
I		S-DHE	3 мкг/кг
H		S-DHE	10 мкг/кг
G		S-DHE	30 мкг/кг
J		Фентаніл	0,5 мкг/кг
C		Фентаніл	2 мкг/кг
B		Фентаніл	6 мкг/кг
A		Морфін	5 мг/кг

Носій являє собою цитратний буфер. Тварин дозують внутрішньовенно в хвостову вену з використанням об'єму дози 5 мл/кг і поліпропіленового шприца з голкою 25G Becton Dickinson (0,5×16 мм). Загальний об'єм 5 мл/кг доставляють при швидкості настільки постійній, наскільки це можливо протягом інтервалу часу 2 хвилини ± 10 секунд. Час початку і закінчення для повільного введення болюсу реєструють. Час дозування реєструють в вихідних даних.

Організація лікування наосліп

Дозовані розчини кодуються (від А до К), так що спостерігач не знає ідентифікації груп лікування.

Маса тіла

Тварин зважують перед дослідженням, і маса тіла реєструє в той самий день, коли вводяться речовини.

ПРОЦЕДУРА

1. Акліматизація

При першій можливості, перед поведінковим дослідженням, кожну тварину піддають рутинним маніпуляціям і акліматизації в навколишньому середовищі поведінкового дослідження.

2. Фонове поведінкове дослідження

Щурів переміщують в кімнату для процедур за 1 день до експерименту. Потім щурів утримують, дозують і спостерігають в кімнаті для процедур. Тест з відсмикуванням хвоста (дивіться нижче) здійснюють на всіх щурах в 3 окремих випадках перед дозуванням, для встановлення фонових значень. Фонові значення перед дозуванням беруться як дані останнього дослідження (дані від першого і другого досліджень не включаються, але класифікуються як частина акліматизації).

Тест з відсмикуванням хвоста: Кожного щура злегка притримують на поверхні пристрою для тесту з відсмикуванням хвоста (Ugo Basile, Italy) так, що його хвіст розташовується безпосередньо над джерелом інфрачервоного випромінювання. Потім джерело інфрачервоного випромінювання направляється на малу ділянку на вентральній поверхні хвоста. Запуск джерела інфрачервоного випромінювання одночасно з ним запускає таймер, який автоматично реєструє час, необхідний для відхилення хвоста (щоб відсунути або відсмикувати його). Латентність відсмикувати хвоста відмічається для кожної тварини. Інтенсивність інфрачервоного випромінювання встановлюється при IR50, і максимальна тривалість експонування для ІЧ джерела становить 10 секунд. Отже, нереагуючі тварини являють собою таких тварин, які мають латентність відсунування 10 секунд.

3. Розподіл по групах і критерії виключення

Тварин випадковим чином розподіляють за групами лікування (від А до К) за день перед дозуванням, на основі фонових значень перед дозуванням для тесту відсмикувати хвоста.

4. Дозування і поведінкове дослідження

Тварин не годують для цього дослідження. Тести відсмикувати хвоста здійснюють приблизно через 5, 10, 20, 30, 60 і 120 хвилин після дозування (по відношенню на початок дозування), для дослідження впливу лікування.

5. Закінчення досліджень

Будь-яких тварин, не розподілених в групи лікування, забивають за допомогою змішування шийних хребців по закінченні дослідження. Інших тварин повертають на ферму після того, як роблять висновки після кінцевого періоду дослідження.

СТАТИСТИЧНИЙ АНАЛІЗ

- Здійснюють статистичне порівняння між дозованими групами DHE (R- і S-ізомери), морфіном, фентанілом і групою, що дозується носієм, з використанням параметричних або непараметричних статистичних процедур. Вибір параметричних (односторонній аналіз рознесення (ANOVA), t-критерій Даннета) або непараметричних (статистика Крускала-Валліса, критерій Данна і U-критерій Уїтні) статистичних процедур ґрунтується на тому, чи задовольняють групи, які повинні порівнюватися, гомогенність критерію рознесення (оцінюється за допомогою критерію Левена для середнього значення F-критерію). Статистична значущість визначається як $P < 0,05$.

- На додаток до цього, дані перетворюються на % MPE (максимального можливого впливу), що визначається як $100 \times (\text{дослідження-контроль}) / (\text{поріг-контроль})$, де 'контроль' являє собою спостереження для групи, що дозується носієм, 'дослідження' являє собою спостереження після дозування і 'поріг' являє собою максимальну тривалість стимулу, що допускається (10 секунд для відсмикувати хвоста). Криві доза-реакція для кожного ізомеру DHE (R- і S-ізомери) і фентанілу генеруються для перших 4 часових точок спостереження, і обчислюється ED_{50} (доза, що відповідає 50% MPE). Здійснюють аналіз для \log_{10} (доза $\times 10^3$), з використанням нелінійної регресії (кривої найкращої підгонки), для S-подібної кривої доза-реакція. Оскільки дані після дозування повертаються до фонових значень для часових точок 60 і 120 хвилин, обчислень для цих даних не потрібно.

РЕЗУЛЬТАТИ

- Дані, середнє значення \pm стандартна помилка для латентності відсудання з відсмикуванням хвоста у різних груп, наводяться в таблиці 15. Значення ED_{50} , обчислені для R-DHE, S-DHE і фентанілу, порівнюються для оцінки їх відносної сильності (таблиця 11). Графіки часової залежності подані на фіг. 11-13, і криві доза-реакція і дані для ED_{50} (доза, що відповідає 50% MPE) подані на фіг. 14-17.

Таблиця 15
Вплив дигідросторфіну (R- і S-ізомери), фентанілу і морфіну на латентність відсудання відсмикуванням хвоста у щурів

Лікування	Перед дозуванням	Латентність відсмикування хвоста (секунди) в момент часу (хвилини) після дозування					
		5	10	20	30	60	120
Носій, 5 мл/кг, внутрішньовенно	4,2 \pm 0,3	5,2 \pm 0,6	5,0 \pm 0,2	5,1 \pm 0,2	4,9 \pm 0,4	5,6 \pm 0,4	5,1 \pm 0,6 (9)
DHE (R-ізомер), 0,1 мкг/кг, внутрішньовенно	4,2 \pm 0,3	7,9 \pm 0,7*	6,1 \pm 0,6	6,3 \pm 0,9	4,7 \pm 0,4	4,6 \pm 0,5	4,8 \pm 0,3
DHE (R-ізомер), 0,3 мкг/кг, внутрішньовенно	4,2 \pm 0,3	9,2 \pm 0,5**	7,7 \pm 0,7 ^s	7,6 \pm 0,8	6,1 \pm 0,9	5,2 \pm 0,4	4,6 \pm 0,6
DHE (R-ізомер), 0,5 мкг/кг, внутрішньовенно	4,4 \pm 0,3	9,4 \pm 0,6**	9,7 \pm 0,3 ^{sss}	8,8 \pm 0,5 ^{ss}	8,2 \pm 0,8 ^s	3,6 \pm 0,4**	4,8 \pm 0,6 (8)
DHE (S-ізомер), 3 мкг/кг, внутрішньовенно	4,2 \pm 0,3	8,3 \pm 0,8	7,0 \pm 0,9	7,0 \pm 0,7	5,7 \pm 0,5	5,8 \pm 0,6	4,9 \pm 0,4 (9)
DHE (S-ізомер), 10 мкг/кг, внутрішньовенно	4,2 \pm 0,3	9,7 \pm 0,3 ^{ss}	9,3 \pm 0,3 ^{ss}	7,3 \pm 0,8	5,8 \pm 0,5	4,0 \pm 0,4*	3,9 \pm 0,4
DHE (S-ізомер), 30 мкг/кг, внутрішньовенно	4,2 \pm 0,3	10,0 \pm 0,0 ^{sss}	9,2 \pm 0,8 ^{ss}	9,1 \pm 0,6 ^{sss}	8,3 \pm 0,7**	4,9 \pm 0,3	3,5 \pm 0,5 (8)
Фентаніл, 0,5 мкг/кг, внутрішньовенно	4,2 \pm 0,3	5,8 \pm 0,6	5,3 \pm 0,6	5,2 \pm 0,6	4,6 \pm 0,4	4,8 \pm 0,4	4,6 \pm 0,4 (9)
Фентаніл, 2 мкг/кг, внутрішньовенно	4,2 \pm 0,3	9,0 \pm 0,7 ^{ss}	9,1 \pm 0,4 ^{sss}	7,5 \pm 0,9	7,1 \pm 0,7	4,9 \pm 0,7	4,2 \pm 0,8
Фентаніл, 6 мкг/кг, внутрішньовенно	4,2 \pm 0,3	10,0 \pm 0,0 ^{sss}	8,4 \pm 0,7 ^{ss}	8,1 \pm 0,7 ^s	6,5 \pm 1,0	6,0 \pm 1,0	6,3 \pm 0,7
Морфін, 5 мкг/кг, внутрішньовенно	4,2 \pm 0,3	10,0 \pm 0,0 ^{###}	10,0 \pm 0,0 ^{###}	10,0 \pm 0,0 ^{###}	10,0 \pm 0,0 ^{###}	8,7 \pm 0,9 [#]	6,2 \pm 0,9 (8)

Носій являє собою цитратний буфер [моногідрат лимонної кислоти:цитрат натрію:хлорид натрію:вода для інфузії при відношенні 0,03:0,10:0,86:99,01 (г:г:г:мл)]

Дані виражені як середнє значення \pm SEM.

N=10 тварин в кожній групі, якщо в дужках не вказано іншого.

*P<0,05 і **P<0,01, у порівнянні з носієм (ANOVA і t-критерій Даннета).

\$P<0,05, \$\$P<0,01 і \$\$\$P<0,001, у порівнянні з носієм (критерії Крускала-Валліса і Данна).

#P<0,05 і ###P<0,001, у порівнянні з носієм (U-критерій Манна-Уїтні).

Вплив дигідроеторфіну (R-DHE) на латентність відсування з відсмикуванням хвоста (фіг. 11)

Внутрішньовенне введення R-DHE при дозі 0,1 мкг/кг спричиняє значуще збільшення латентності відсмикувати хвоста через 5 хвилин після дозування ($7,9 \pm 0,7$ секунди; P<0,05; ANOVA і t-критерій Даннета), в порівнянні з даними для групи, що дозується носієм ($5,2 \pm 0,6$ секунди). Внутрішньовенне введення R-DHE при 0,3 мкг/кг спричиняє значуще збільшення латентності відсування з відсмикуванням хвоста через 5 і 10 хвилин після дозування ($9,2 \pm 0,5$ секунди; P<0,01; ANOVA і t-критерій Даннета; $7,7 \pm 0,7$ секунди; P<0,05; критерії Крускала-Валліса і Данна, відповідно), в порівнянні з даними для групи, що дозується носієм ($5,2 \pm 0,6$ і $5,0 \pm 0,2$ секунди, відповідно), але не надає впливу в будь-яких інших часових точках. Внутрішньовенне введення R-DHE при дозі 0,5 мкг/кг спричиняє значуще збільшення латентності відсування з відсмикуванням хвоста при 5, 10, 20 і 30 хвилин після дозування ($9,4 \pm 0,6$ секунди; P<0,01; ANOVA і t-критерій Даннета; $9,7 \pm 0,3$ секунди; P<0,001; $8,8 \pm 0,5$ секунди; P<0,01; $8,2 \pm 0,8$ секунди; P<0,05; все - для критеріїв Крускала-Валліса і Данна, відповідно), в порівнянні з даними для групи, що дозується носієм ($5,2 \pm 0,6$, $5,0 \pm 0,2$, $5,1 \pm 0,2$ і $4,9 \pm 0,4$ секунди, відповідно). Значуще зменшення, що спостерігається для латентності відсмикувати хвоста через 60 хвилин після дозування в групі з 0,5 мкг/кг, не вважається фармакологічно релевантним. Не спостерігається впливу через 120 хвилин після дозування. Ці дані показують безпосереднє настання аналгезії з піковим впливом приблизно через 5 і 10 хвилин після дозування, з поверненням до фонових значень (порівнянням з контролем, що дозується носієм) через 60 хвилин після часової точки дозування.

Оцінювані значення ED₅₀ для R-DHE, тобто 50% MPE, складають 0,08, 0,23, 0,25 і 0,42 мкг/кг через 5, 10, 20 і 30 хвилин після дозування, відповідно. Реакція на дозування у часових точках через 60 і 120 хвилин після дозування відсутня.

Вплив дигідроеторфіну (S-DHE) на латентність відсування з відсмикуванням хвоста (фіг. 12)

Внутрішньовенне введення S-DHE при дозі 3 мкг/кг не впливає значущо на латентність відсування з відсмикуванням хвоста в будь-якій часовій точці, що досліджується, в порівнянні з даними для групи, що дозується носієм. Внутрішньовенне введення S-DHE при 10 мкг/кг спричиняє значуще збільшення латентності відсування з відсмикуванням хвоста при 5 і 10 хвилин після дозування ($9,7 \pm 0,3$ і $9,3 \pm 0,3$ секунди, відповідно; для обох часових точок P<0,01; критерії Крускала-Валліса і Данна), в порівнянні з даними для групи, що дозується носієм ($5,2 \pm 0,6$ і $5,0 \pm 0,2$ секунди, відповідно). Значуще зменшення для латентності відсування з відсмикуванням хвоста, що спостерігається через 60 хвилин після дозування не вважається фармакологічно релевантним. Внутрішньовенне введення S-DHE при дозі 30 мкг/кг спричиняє значуще збільшення латентності відсування з відсмикуванням хвоста через 5, 10, 20 і 30 хвилин після дозування ($10,0 \pm 0,0$ секунди; P<0,001; $9,2 \pm 0,8$ секунди; P<0,01; $9,1 \pm 0,6$ секунди; P<0,001; критерії Крускала-Валліса і Данна, і $8,3 \pm 0,7$ секунди; P<0,01; ANOVA і t-критерій Даннета; відповідно), в порівнянні з даними для групи, що дозується носієм ($5,2 \pm 0,6$, $5,0 \pm 0,2$, $5,1 \pm 0,2$ і $4,9 \pm 0,4$ секунди, відповідно). Ці дані показують безпосереднє настання аналгезії з піковим впливом у часовій точці через 5 хвилин після дозування, з поверненням до фонових значень (порівнянням з контролем, що дозується носієм) у часовій точці через 60 хвилин після дозування.

Оцінені значення ED₅₀ для DHE (S-ізомер), тобто 50% MPE, становить 2,17, 3,80, 7,52 і 20,95 мкг/кг через 5, 10, 20 і 30 хвилин після дозування, відповідно. Реакція на дозування у часових точках через 60 і 120 хвилин після дозування відсутня.

Вплив фентанілу на латентність відсування з відсмикуванням хвоста (фіг. 13)

Внутрішньовенне введення фентанілу при дозі 0,5 мкг/кг не впливає значущо на латентність відсування з відсмикуванням хвоста в будь-якій часовій точці, що досліджується, в порівнянні з даними для групи, що дозується носієм. Внутрішньовенне введення фентанілу при 2 мкг/кг призводить до значущого збільшення латентності відсування з відсмикуванням хвоста через 5 і 10 хвилин після дозування ($9,0 \pm 0,7$ секунди; P<0,01 і $9,1 \pm 0,4$ секунди; P<0,001, відповідно; для обох часових точок - критерії Крускала-Валліса і Данна), в порівнянні з даними для групи, що дозується носієм ($5,2 \pm 0,6$ і $5,0 \pm 0,2$ секунди, відповідно). Внутрішньовенне введення фентанілу при дозі 6 мкг/кг спричиняє значуще збільшення латентності відсування з відсмикуванням хвоста через 5, 10 і 20 хвилин після дозування ($10,0 \pm 0,0$ секунди; P<0,001; $8,4 \pm 0,7$ секунди; P<0,01; $8,1 \pm 0,7$ секунди; P<0,05, відповідно; всі оцінки - згідно з критеріями Крускала-Валліса і

Данна), в порівнянні з даними для групи, що дозується носієм ($5,2 \pm 0,6$, $5,0 \pm 0,2$ і $5,1 \pm 0,2$ секунди, відповідно). Ці дані показують безпосереднє настання аналгезії з піковими впливами у часовій точці через 5 хвилин, з поверненням до фонових значень (порівнянням з контролем, що дозується носієм) у часовій точці через 60 хвилин після дозування.

5 Оцінені значення ED_{50} фентанілу, тобто 50% МРЕ, складають 1,14, 1,25, 3,11 і 9,68 мкг/кг через 5, 10, 20 і 30 хвилин після дозування, відповідно. Реакція на дозування у часових точках через 60 і 120 хвилин після дозування відсутня.

Порівняльний вплив R-DHE, S-DHE і фентанілу

10 Значення ED_{50} , обчислені для R-DHE, S-DHE і фентанілу, порівнюють для оцінки їх відносної сильності (таблиця 16). Дані передбачають, що протягом перших 30 хвилин після однократного внутрішньовенного введення кожної сполуки самцям щура, R-DHE має аналгетичну сильність, яка в 5-23 рази вище, ніж у фентанілу, S-DHE має аналгетичну сильність, яка становить 0,3-0,5 від впливу фентанілу, і що R-DHE має аналгетичну сильність, яка в 17-50 разів вище, ніж у S-DHE.

15

Таблиця 16

Значення ED_{50} і порівняльні відношення ED_{50} для R-DHE, S-DHE і фентанілу

Час після дозування, (хвилини)	ED_{50} R-DHE (мкг/кг)	ED_{50} S-DHE (мкг/кг)	ED_{50} фентанілу (мкг/кг)	ED_{50} відношення фентанілу/R-DHE	ED_{50} відношення фентанілу/S-DHE	ED_{50} відношення фентанілу/S-DHE/R-DHE
5	0,08	2,17	1,14	14	0,5	28
10	0,23	3,80	1,24	5	0,3	17
20	0,25	7,52	3,11	12	0,4	30
30	0,42	20,95	9,68	23	0,5	50

Вплив морфіну на латентність відсування з відсмикуванням хвоста

20 Внутрішньовенне введення морфіну (5 мг/кг) спричиняє значуще збільшення латентності відсування з відсмикуванням хвоста через 5, 10, 20, 30 ($10,0 \pm 0,0$ секунди; $P < 0,001$; U-критерій Уїтні - для всіх 4 часових точок) і через 60 хвилин після дозування ($8,7 \pm 0,9$ секунди; $P < 0,05$; U-критерій Уїтні), в порівнянні з даними для групи, що дозується носієм ($5,2 \pm 0,6$, $5,0 \pm 0,2$, $5,1 \pm 0,2$, $4,9 \pm 0,4$ і $5,6 \pm 0,4$ секунди, відповідно).

ВИСНОВКИ

25 Однократне внутрішньовенне введення R-DHE при дозах 0,1, 0,3 і 0,5 мкг/кг і S-DHE при дозах 10 і 30 мкг/кг спричиняє значуще залежне від дози збільшення латентності відсування з відсмикуванням хвоста у самців щурів аж до 30 хвилин після дозування. Внутрішньовенне введення фентанілу при дозах 2 і 6 мкг/кг спричиняє значуще залежне від дози збільшення латентності відсування з відсмикуванням хвоста аж до 30 хвилин після дозування.

30 Значення ED_{50} , обчислені для R-DHE, S-DHE і фентанілу, порівнюють для оцінки їх відносної сильності (таблиця 16). Дані передбачають, що протягом перших 30 хвилин після однократного внутрішньовенного введення кожної сполуки самцям щурів, R-DHE має аналгетичну сильність, яка в 5-23 рази вище, ніж для фентанілу, S-DHE має аналгетичну сильність, яка становить 0,3-0,5 від сильності фентанілу, і що R-DHE має аналгетичну сильність, яка в 17-50 разів вище, ніж у S-DHE.

35 Тривалість опіоїдної аналгетичної активності R-DHE і S-DHE після внутрішньовенного введення говорить про потенційний вигравш і про терапевтичний потенціал цих сполук при лікуванні гострого болю.

40 Впливи, відмічені після введення морфіну, узгоджуються з його відомою фармакологічною активністю, і таким чином, ця система досліджень є чутливою при виявленні ноцицептивних впливів.

Вплив (R)- і (S)-дигідроеторфіну в моделі нейропатичного болю з лігуванням спінального нерва

45 Використовувана модель дослідження добре відома в даній галузі і описана в Pain 1992; 50: 355-363 (Kim SH, Chung JM., An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat).

Досліджуються потенційні аналгетичні впливи дигідроеторфіну після однократного внутрішньовенного дозування 0,1, 0,3 і 0,5 мкг/кг (R-ізомер) і однократного внутрішньовенного дозування 3, 10 і 30 мкг/кг (S-ізомер) в моделі нейропатичного болю з лігуванням спінального

нерва. Периферійна мононейропатія викликається в лівій задній кінцівці щурів за допомогою щільного лігування спінальних нервів L5 і L6. Розвиток механічної алодинії і теплової гіперальгезії відстежують з використанням встановлених поведінкових досліджень (тест фон Фрея і плантарний тест Гаргрєвса, відповідно). Морфін використовують як еталонну речовину, і

5 прєгабалін використовують як порівняльну речовину.

ДОСЛІДЖУВАНІ РЕЧОВИНИ І МАТЕРІАЛИ

Досліджувані речовини, еталонна речовина, порівняльна речовин і носії

Досліджувані речовини: дигідроеторфін (R-ізомер) і дигідроеторфін (S-ізомер).

Носій для і еталонних досліджуваних речовин:

10 Цитратний буфер (моногодрат лимонної кислоти:цитрат натрію:хлорид натрію:стерильна вода, при відношенні 0,03:0,10:0,86:99,01 (г:г:г:мл); [моногодрат лимонної кислоти (порошок білого кольору; Sigma, UK), цитрат натрію (Sigma, UK), хлорид натрію (твердий продукт білого кольору; Merck), стерильна вода (прозора рідина; Baxter Healthcare, UK)].

15 Еталонна речовина: морфін гідрохлорид (порошок білого кольору; Macfarlan Smith, Edinburgh, UK).

Порівняльна речовина: прєгабалін (торгове найменування Lyrica®; капсули білого кольору; виробляється Pfizer і постачається Lindsay & Gilmour Chemist, Juniper Green, Edinburgh).

Носій для порівняльної речовини: карбоксиметилцелюлоза, 1% мас./об. (СМС, порошок; Sigma, UK).

20 Зберігання досліджуваної, еталонної і порівняльної речовини

Досліджувані речовини зберігають при кімнатній температурі, захищають від світла, і еталонну і порівняльну речовини зберігають при кімнатній температурі.

Спосіб введення і рівні дозування

25 Спосіб введення R- і S-ізомерних форм дигідроеторфину і носія (цитратного буфера) являє собою внутрішньовенне введення. Воно являє собою потенційний спосіб введення для людей. Дози R-DHE складають 0,1, 0,3 і 0,5 мг/кг, і дози S-DHE складають 3, 10 і 30 мг/кг.

Спосіб введення морфіну являє собою внутрішньовенне введення. Доза морфіну становить 5 мг/кг.

30 Спосіб введення порівняльної речовини, прєгабаліну, являє собою пероральне введення. У фазі 2 дослідження, доза прєгабаліну становить 30 мг/кг. Для фази 3, рівні дозування порівняльної речовини, прєгабаліну, складають 30, 50 і 100 мг/кг.

Тварини

Вид:

Щури

Лінія: Sprague-Dawley

Стать: чоловіча

Кількість тварин: хірургічно готують 75 тварин

Віковий діапазон: 6-7 тижнів (для операції); 8-9 тижнів (фаза 1 дозування); 9-10 тижнів (фаза 2 дозування); 11-12 тижнів (фаза 3 дозування)

Діапазон маси: 139-183 г (для операції); 190-257 г (фаза 1 дозування); 210-284 г (фаза 2 дозування); 243-341 г (фаза 3 дозування)

Акліматизація: 3 дня після доставки, перед початком поведінкового дослідження

Джерело: Harlan UK Ltd

Ідентифікація і випадковий розподіл тварин

35 Кожній тварині довільним чином привласнюється власний ідентифікаційний номер, який з'являється на картках з даними і на картках на клітках. Тварини ідентифікуються за допомогою водостійкого маркування на хвості.

Здоров'я тварин і догляд за ними

40 Всі дослідження здійснюють відповідно до вказівок Animals (Scientific Procedures) Act 1986, з UK Home Office Guidance для застосування акту і з всіма застосовними Codes of Practice відносно догляду і утримування лабораторних тварин.

Утримування і навколишнє середовище

45 Тварин поміщують групами аж до 5 в клітках з твердим дном, заповнених тирсою. Під час акліматизації, кімнати і клітки очищають через регулярні інтервали часу для підтримки гігієни. Кімнати освітлюють набором флуоресцентних ламп, з одержанням 12-годинного циклу світло-темрява (включають у 7.00, вимикають в 19.00), як рекомендується в Home Office Animals (Scientific Procedures) Act 1986. У кімнатах кондиціонують повітря і вимірюють температуру повітря і відносну вологість. Під час періоду акліматизації підтримується кімнатна температура (діапазон від 20 до 22°C), і рівні вологості знаходяться в діапазоні від 46 до 59%. Протягом процедури підтримується кімнатна температура (діапазон від 19 до 22°C) і рівні вологості

50 знаходяться в діапазоні від 26 до 43%.

Дієта і вода

Розширену дієту для гризунів RM1(E) SQC (Special Diets Services, Witham, UK) і водопровідну воду з водопроводу пропонують за вимогою. Кожне завантаження дієти доставляють з сертифікатом аналізу (C of A), який додається, що деталізує поживну композицію і рівні вказаних забруднень (наприклад, важких металів, афлатоксину і інсектицидів). Воду періодично аналізують на домішки і забруднення. Критерії прийнятних рівнів забруднень в вихідних матеріалах дієти і у воді, що поставляється, знаходяться в межах аналітичних специфікацій, встановлених виробником дієти і службою аналізів води, відповідно.

Стан здоров'я

Тварин перевіряють після прибуття і перед дослідженням; всі тварини здорові і вважаються придатними для експериментального використання.

ПОСТАНОВКА ЕКСПЕРИМЕНТУ

Приготування досліджуваних, еталонних і порівняльних речовин

Цитратний буфер приготують за допомогою точного зважування відповідних кількостей кожного компонента і їх розчинення в стерильній воді для ін'єкцій. Коли компоненти повністю розчиняються, вимірюють осмоляльність і pH розчину.

Носій вважається прийнятним, оскільки pH становить 5,03, що знаходиться в межах від 4,8 до 5,2, і осмоляльність становить 295 мОсмол/кг, в межах від 280 до 300 мОсмол/кг. Нарешті, носій фільтрують через пристрій Stericup Millex GV (фільтр 0,22 мкм) при асептичних умовах і зберігають при 2-8°C до використання.

Досліджувані речовини дигідроеторфін (R- і S-ізомери), приготують для дозування у вигляді розчинів в цитратному буфері. Бажані концентрації (0,02, 0,06 і 0,10 мкг/мл для R-ізомеру і 0,6, 2 і 6 мкг/мл для S-ізомеру) для дозування одержують за допомогою послідовного розведення відповідних вихідних розчинів, які одержують при приблизній концентрації 20 мкг/мл. Реальну концентрацію вихідних розчинів відмічають в вихідних даних. Перед послідовним розбавленням, вихідні розчини пропускають через вузол стерильного фільтрування Dugroge 0,22 мкм Millex GV в скляні флакони, і кожне подальше розведення стерильним цитратним буфером здійснюють за допомогою стерильних маніпуляцій. Коефіцієнтів коректування не використовують, і препарати приготують у вигляді вільної основи. Препарати приготують заздалегідь, до моменту дозування для досліджень, і використовують (через 1-2 дні після приготування) в межах відомого періоду стабільності для R-DHE, який становить 11 днів. S-DHE використовують протягом 1-2 днів після приготування. Розчини для дозування дигідроеторфіну (R- і S-ізомери) зберігають в холодильнику, приблизно при 4°C, доти, поки вони не будуть потрібні для дозування.

Еталонну речовину, морфін гідрохлорид, приготують для дозування за допомогою розчинення відомої кількості в цитратному буфері, з одержанням розчину 1 мг/мл. Застосовують коефіцієнт коректування 1,32, щоб зробити можливим вираження дозування морфіну в термінах вільної основи. Розчини приготують безпосередньо перед використанням і захищають від світла.

Порівняльну речовину, прегабалін, приготують для дозування за допомогою суспендування відомої кількості в 1% мас./об. СМС, з одержанням суспензії 3 мг/мл для фази 2, і 3, 5 і 10 мг/мл суспензії приготують для фази 3. Отже, не потрібно коефіцієнта коректування, оскільки прегабалін дозується як вільна основа. Суспензії приготують безпосередньо перед використанням і захищають від світла.

Розміри груп, дози і ідентифікаційні номери

Є 5 груп лікування, максимум 10 щурів в кожній групі. Кожній групі лікування привласнюють букву (фаза 1: від А до Е, фаза 2: від F до J і фаза 3: від К до О). Щурів випадковим чином розподіляють за групами лікування за день перед дозуванням на основі фонових значень перед дозуванням для досліджень теплової гіперальгезії (дивіться нижче).

Фаза 1:

C	Носій	5 мл/кг, внутрішньовенно
B	R-DHE	0,1 мкг/кг, внутрішньовенно
A	R-DHE	0,3 мкг/кг, внутрішньовенно
E	R-DHE	0,5 мкг/кг, внутрішньовенно
D	Морфін	5 мг/кг, внутрішньовенно

Фаза 2:

I	Носій	5 мл/кг, внутрішньовенно
F	S-DHE	3 мкг/кг, внутрішньовенно
G	S-DHE	10 мкг/кг, внутрішньовенно
J	S-DHE	30 мкг/кг, внутрішньовенно

Н	Прегабалін	30 мг/кг, перорально
Фаза 3:		
Н	Носій	10 мл/кг, перорально
М	Прегабалін	30 мг/кг, перорально
Л	Прегабалін	50 мг/кг, перорально
К	Прегабалін	100 мг/кг, перорально
О	Морфін	5 мг/кг, внутрішньовенно

Внутрішньовенний носій, цитратний буфер, використовують для фаз 1 і 2, і пероральний носій, 1% мас./об. СМС, використовують для фази 3. Тварини, розподілені в групи лікування з внутрішньовенним введенням, дозуються в хвостову вену з використанням об'єму дози 5 мл/кг і поліпропіленового шприца з голкою Becton Dickinson 25G (0,5×16 мм). Загальний об'єм внутрішньовенного введення в 5 мл/кг доставляють зі швидкістю, настільки постійною, наскільки це можливо, протягом інтервалу часу 2 хвилини \pm 10 секунд. Час початку і закінчення для повільного внутрішньовенного введення болюсу реєструють. Тварини, розподілені в групи перорального лікування, дозуються за допомогою перорального зонда, з використанням об'єму дози 10 мл/кг. Час дозування реєструють як вихідні дані.

Організація лікування наосліп

Дозовані розчини кодується (фаза 1: від А до Е, фаза 2: від F до J і фаза 3: від К до О), так що спостерігачі не знають ідентифікації груп лікування. Оскільки порівняльна речовина в фазі 2 дослідження вводиться іншим способом дозування, ця група не досліджується наосліп для особи, що здійснює дозування, і кодується Н. Також, контроль з введенням морфіну в фазі 3 вводиться внутрішньовенно, і це являє собою спосіб, який відрізняється від груп з введенням носія і порівняльної речовини (пероральне дозування), група з введенням морфіну не досліджується наосліп, і з цієї причини кодується як О.

Маса тіл

Тварин зважують перед операцією, в день 1 після операції (РО) і в кожен день дозування перед введенням речовин, і маси тіл реєструють.

Щоденні спостереження

Загальні спостереження здійснюють для всіх тварин щодня, починаючи з дня 0 РО, при цьому особлива увага приділяється стану лівої і правої задніх лап тварини.

ПРОЦЕДУРА

1. Акліматизація

Перед поведінковим дослідженням, тварин піддають рутинним маніпуляціям і акліматизації для навколишнього середовища поведінкового дослідження.

2. Фонове поведінкове дослідження

Щурів переміщують в кімнату процедур за 1 день перед експериментом. Потім щурів утримують, дозують і спостерігають в кімнаті для процедур. Поведінкові дослідження (дивіться нижче) здійснюють на всіх щурах для 2 окремих випадків перед операцією, для встановлення фонових значень. Фонові значення перед операцією беруться як дані від кінцевого (другого) дня досліджень (дані від першого дня досліджень класифікуються як частина акліматизації). Послідовність досліджень являє собою механічну алодинію, після якої іде теплова гіперальгезія, з мінімальним допустимим періодом часу між дослідженнями 5 хвилин.

Механічна алодинія (тест фон Фрея): Кожну тварину поміщують в клітку з дротяної сітки і ряд ниток фон Фрея прикладають до плантарної поверхні задньої лапи, знизу. Нитки прикладають у висхідному порядку (починаючи з самого слабкого зусилля), і оцінюють поріг відсування як для лівої, так і для правої задньої лапи. Кожна нитка прикладається на середній плантарній поверхні лапи в точці, де вона якраз починає згинатися; це повторюють приблизно 8-10 разів для кожної нитки з частотою приблизно 1 Гц. Поріг відсування визначають як зусилля, що являє собою найнижче зусилля, з двох або більше послідовних ниток фон Фрея, необхідних для того, щоб викликати рефлексивну реакцію відсування (тобто короткочасне відсмикувати лапи).

Теплова гіперальгезія (плантарний тест Гаргревса): Кожного щура поміщують в прозору пластикову камеру зі скляною підлогою і дозволяють протягом короткого періоду акліматизуватися в його навколишньому середовищі перед дослідженням (приблизно 1 хвилина). Потім тварини провокуються за допомогою радіантного інфрачервоного (ІЧ) джерела тепла, направлено на плантарну поверхню їх задньої лапи знизу, і обчислюють латентність відсування як для лівої, так і для правої задньої лапи. Інтенсивність інфрачервоного випромінювання встановлюють при IR50 (установка, призначена для доставки теплового потоку, що відповідає 250 мВт/см³), і максимальна тривалість експонування для джерела ІЧ

випромінювання становить 18 секунд. Отже, нереагуючі тварини відповідають латентності відсування 18 секунд.

3. Хірургічна процедура

Тварин готують хірургічно протягом 3 днів. Кожного щура анестезують за вимогою ізофлуораном в 1-3% кисні. Кожного щура поміщують в лежачому положенні, і поверхню навколо місця надрізу голять і стерилізують хірургічним спиртом. При асептичних умовах, ліві параспинальні м'язи відділяють від остистих відростків на рівнях S2 L4. Потім поперечний відросток L6 обережно видаляють за допомогою малих кісткових кусачок і ідентифікують спінальні нерви L4 L6. Ліві спінальні нерви L5 і L6 ізолюють і щільно лігують з використанням шовкової нитки 6-0 (як видно при збільшенні $\times 40$). М'язи і шкіру, що лежать зверху, закривають шарами з використанням відповідного шовного матеріалу, і після завершення анестезію припиняють. При відновленні після анестезії, щурів знову утримують в їх клітках, спочатку на м'якій підстилці протягом ночі, для зменшення ризику інфекції, а потім на підстилці з тирси, після повного відновлення. Тваринам дозволяють відновлюватися протягом мінімум 4 днів перед початком поведінкового дослідження.

4. Дослідження розвитку

Після операції, двічі здійснюють поведінкове дослідження перед днем дозування, для відстеження розвитку алодинії/гіперальгезії. Включають також додаткові довільні дні дослідження, щоб забезпечити достатню кількість тварин, що мають розвинену алодинію/гіперальгезію перед кожною фазою дозування.

5. Розподіл за групами і критерії виключення

Тварин випадковим чином розподіляють в групи лікування за день перед дозуванням на основі фонових значень перед дозуванням для дослідження теплової гіперальгезії. Тільки тварини, як з розвиненою механічною алодинією, так і з розвиненою тепловою гіперальгезією, включаються в дослідження. Тварини вважаються такими, що мають розвинену механічну алодинію, якщо поріг відсування їх лівої лапи для ниток фон Фрея складає ≤ 5 г сили (що відповідає номеру мононитки 4,56 або менше). Тварини вважаються такими, що мають розвинену теплову гіперальгезію, якщо латентність відсування їх лівої лапи для теплового плантарного пристрою перед дозуванням показує відмінність $\geq 30\%$ від значення для лівої лапи перед операцією.

6. Дозування і поведінкове дослідження

Тварин не годують протягом цього дослідження. Кожний день дозування, кожна з розподілених тварин отримує однократну внутрішньовенну дозу досліджуваної речовини, еталонної речовини або носія або пероральную дозу порівняльної речовини або носія. Є 3 фази дослідження. Дозування кожної фази розділене на 2 дні, і кожний день дозування дозуються тварини мінімум з 3 груп лікування. Після завершення кожної фази, тварині надається мінімальний період відпочинку в 1 тиждень перед початком наступної фази дослідження.

У фазах 1 і 2 дослідження, після дозування (приблизно через 5 хвилин від початку дозування) і приблизно через 25, 50 і 120 хвилин після дозування, ліву і праву задні лапи кожного щура оцінюють на механічну алодинію з використанням тесту фон Фрея. Приблизно через 15, 35, 60 і 130 хвилин після дозування, ліву і праву задні лапи кожного щура оцінюють на теплову гіперальгезію з використанням плантарного тесту Гаргрєвса, для дослідження впливу лікування. Всі часові точки наводяться відносно до початку дозування.

У фазі 3 дослідження, приблизно через 60, 120, 180 і 240 хвилин після дозування, ліву і праву задні кінцівки кожного щура оцінюють на механічну алодинію з використанням тесту фон Фрея. Приблизно через 70, 130, 190 і 250 хвилин після дозування, ліву і праву задні кінцівки кожного щура оцінюють на теплову гіперальгезію з використанням плантарного тесту Гаргрєвса, для дослідження впливу лікування.

7. Закінчення досліджень

Всіх тварин, що досліджуються, умертвлювали за допомогою зміщування шийних хребців після одержання висновків від кінцевого періоду дослідження.

СТАТИСТИЧНИЙ АНАЛІЗ

Здійснюють статистичне порівняння між групами лікування з використанням параметричних (наприклад, одностороннього аналізу рознесення, t-критерію Даннета, t-критерію Ст'юдента) або непараметричних (наприклад, статистики Крускала-Валліса, критерію Данна, U-критерію Уїтні) статистичних процедур. Вибір параметричного або непараметричного критерію ґрунтується на тому, чи задовольняють групи, які повинні порівнюватися, гомогенність критерію рознесення (що оцінюється за допомогою критерію Левена для середнього значення або F-критерію). Дані фон Фрея логарифмічно перетворюються (\log_{10} (сила в грамах $\times 10000$)) перед аналізом. У фазі 2 досліджень, оскільки порівняльна речовина, прегабалін, вводиться за

допомогою іншого способу дозування, дані для прегабаліну порівнюються зі значеннями перед дозуванням з використанням парного t-критерію Ст'юдента. У фазі 3 дослідження, оскільки еталонна речовина, морфін вводиться за допомогою способу дозування, іншого, ніж для носія і досліджуваної речовини, дані для морфіну порівнюються зі значеннями перед дозуванням з використанням парного t-критерію Ст'юдента. Для всіх критеріїв, статистична значущість визначається як $P < 0,05$. Статистична значущість для тесту фон Фрея, хоча вона оцінюється на логарифмічно перетворених даних, виражається відносно грамів сили в секції результатів, для цілей ілюстрації. Всі деталі аналізу наводяться в вихідних даних.

РЕЗУЛЬТАТИ

Усереднені дані для груп, середнє значення \pm стандартна помилка, для порогів відсування і латентності відсування наводяться в таблицях 17-22.

Розвиток станів нейропатичного болю

Два різні компоненти нейропатичного болю досліджують з використанням встановлених поведінкових досліджень, а саме ниток фон Фрея для дослідження присутності механічної алодинії і плантарного тесту Гаргрєвса для дослідження для присутності теплової гіперальгезії. Більшість тварин, які зазнають лігування спінального нерва, демонструють помітне збільшення чутливості лівої задньої лапи для двох поведінкових досліджень в дні після пошкодження, показуючи розвиток периферичної мононейропатії. Права задня лапа не показує збільшення чутливості після операції. У кожній фазі дослідження, всі дозовані тварини, як вважається, мають невропатію в лівій задній лапі, як оцінюється з використанням встановлених поведінкових досліджень за день перед дозуванням.

Вплив R-DHE на реакції при поведінкових дослідженнях (фаза 1)

Механічна алодинія: У фазі 1, внутрішньовенне введення R-DHE при 0,1 і 0,3 мкг/кг не виробляє ніяких значущих змін в порогах відсування лівої або правої лапи для ниток фон Фрея. Однак внутрішньовенне введення R-DHE при 0,5 мкг/кг спричиняє значуще збільшення порога відсування в лівій лапі приблизно через 5 хвилин після дозування ($21,97 \pm 2,30$ г; $P \leq 0,01$; критерії Крускала-Валліса і Данна), в порівнянні зі значеннями групи, що дозується носієм, $5,43 \pm 2,58$ г, а також приблизно через 25 хвилин після дозування ($13,12 \pm 3,41$ г; $P < 0,05$; ANOVA і t-критерій Даннета), в порівнянні зі значеннями групи, що дозується носієм, $2,25 \pm 0,75$ г (таблиця 17, фіг. 18).

Теплова гіперальгезія: Внутрішньовенне введення R-DHE не дає значущого впливу на латентність відсування лівої лапи, в порівнянні з носієм. Внутрішньовенне введення R-DHE при дозі 0,3 мкг/кг спричиняє значуще збільшення латентності відсування правої лапи приблизно через 35 хвилин після дозування ($14,5 \pm 0,7$ секунди; $P < 0,05$; ANOVA і t-критерій Даннета), в порівнянні зі значеннями групи, що дозується носієм ($10,3 \pm 0,9$ секунди); однак це є фізіологічно ірелевантним, оскільки поріг відсування для правої лапи є схожим зі значеннями перед дозуванням для правої лапи ($14,3 \pm 0,6$ секунди) (таблиця 18, фіг. 19).

Вплив S-DHE на реакції при поведінкових дослідженнях (фаза 2)

Механічна алодинія: У фазі 2, внутрішньовенне введення S-DHE при 3 і 10 мкг/кг не дає ніяких значущих змін для порогів відсування лівої або правої лапи для ниток фон Фрея. Однак внутрішньовенне введення при 30 мкг/кг спричиняє значуще збільшення порога відсування лівої лапи приблизно через 5 хвилин після дозування ($24,56 \pm 0,33$ г; $P \leq 0,001$; критерії Крускала-Валліса і Данна), в порівнянні зі значеннями для групи, що дозується носієм, $6,11 \pm 2,39$ г, а також приблизно через 25 хвилин після дозування ($21,92 \pm 1,70$ г; $P < 0,001$; критерії Крускала-Валліса і Данна), в порівнянні зі значеннями для групи, що дозується носієм, $1,66 \pm 0,47$ г (таблиця 19, фіг. 20).

Теплова гіперальгезія: Внутрішньовенне введення S-DHE не дає значущого впливу на латентності відсування лівої і правої лап при дозах 3 і 10 мкг/кг, в порівнянні зі значеннями для групи, що дозується носієм. Внутрішньовенне введення S-DHE при дозі 30 мкг/кг, однак, дає значуще збільшення латентностей відсування лапи приблизно через 15 хвилин після дозування як для лівої ($17,6 \pm 0,4$ секунди; $P < 0,01$; критерії Крускала-Валліса і Данна), так і правої ($17,5 \pm 0,4$ секунди; $P < 0,01$; критерії Крускала-Валліса і Данна) задньої лапи, в порівнянні зі значеннями для групи, що дозується носієм, $10,3 \pm 0,8$ секунди і $13,4 \pm 0,8$ секунди, відповідно. Збільшення латентності правої лапи може показувати вплив дигідроетофіну (S-ізомеру) на центральну нервову систему при рівні дози 30 мкг/кг (таблиця 20, фіг. 21).

Вплив морфіну на реакцію при поведінкових дослідженнях (фази 1 і 3)

У фазі 1, морфіновий еталон порівнюють з носієм, оскільки їх обидва вводять перорально. У фазі 3, морфіновий еталон порівнюють зі станом перед дозуванням, оскільки він не є релевантним для порівняння його з носієм, що дозується перорально.

Механічна алодинія: Після внутрішньовенного введення морфіну при 5 мг/кг (фаза 1), поріг відсування лівої задньої лапи значущо збільшується приблизно через 25 хвилин після дозування ($19,23 \pm 2,73$ г; $P < 0,001$; непарний 2-сторонній t-критерій Ст'юдента) і приблизно через 50 хвилин після дозування ($21,55 \pm 2,40$ г; $P < 0,001$; непарний 2-сторонній t-критерій Ст'юдента), в порівнянні зі значеннями для групи, що дозується носієм, $2,25 \pm 0,75$ і $2,11 \pm 0,82$ г. Є значуще зменшення, що спостерігається в даних для правої лапи перед дозуванням ($16,37 \pm 2,20$ г; $P < 0,05$; непарний 2-сторонній t-критерій Ст'юдента), в порівнянні зі значеннями для групи, що дозується носієм ($22,26 \pm 1,52$ г). Це є неминучим, оскільки розподіл по групах лікування 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60

У фазі 3, внутрішньовенне введення морфіну (5 мг/кг) значущо збільшує порогові відсування лівої лапи приблизно через 60 хвилин ($21,32 \pm 2,56$ г; $P < 0,001$; парний 2-сторонній t-критерій Ст'юдента), 120 хвилин ($11,08 \pm 2,85$ г; $P < 0,01$; парний 2-сторонній t-критерій Ст'юдента) і приблизно через 180 хвилин після дозування ($3,68 \pm 0,97$ г; $P < 0,05$; парний 2-сторонній t-критерій Ст'юдента) в порівнянні зі значеннями перед дозуванням, $1,46 \pm 0,37$ г (таблиця 21, фіг. 22).

Теплова гіперальгезія: У фазі 1, внутрішньовенне введення морфіну при 5 мг/кг спричиняє значуще збільшення латентностей відсування для лівої лапи у всіх часових точках, що досліджуються і для правої лапи приблизно через 15, 35 і 60 хвилин після дозування. Приблизно через 15 хвилин після дозування: (ліва; $12,0 \pm 1,5$ секунди; $P < 0,05$; U-критерій Уїтні), (права; $17,5 \pm 0,5$ секунди; $P < 0,001$; U-критерій Уїтні), через 35 хвилин після дозування (ліва; $16,4 \pm 0,9$ секунди; $P < 0,001$; непарний 2-сторонній t-критерій Ст'юдента), (права; $16,8 \pm 0,7$ секунди; $P < 0,001$; непарний 2-сторонній t-критерій Ст'юдента) і приблизно через 60 хвилин після дозування для обох лап (ліва; $12,8 \pm 1,3$ секунди; $P < 0,01$; непарний 2-сторонній t-критерій Ст'юдента), (права; $16,3 \pm 1,1$ секунди; $P < 0,05$; непарний 2-сторонній t-критерій Ст'юдента) і приблизно через 130 хвилин після дозування для лівої лапи ($10,6 \pm 0,9$ секунди; $P < 0,05$; непарний 2-сторонній t-критерій Ст'юдента), в порівнянні зі значеннями для групи, що дозується носієм ($7,5 \pm 0,5$, $12,8 \pm 1,1$, $7,0 \pm 1,2$, $10,3 \pm 0,9$, $7,6 \pm 0,9$, $12,4 \pm 1,4$ і $7,4 \pm 0,9$ секунди, відповідно) (таблиця 18, фіг. 19).

У фазі 3 дослідження, внутрішньовенне введення морфіну спричиняє значуще збільшення латентності відсування лівої лапи приблизно через 70 хвилин після дозування ($11,8 \pm 1,2$ секунди; $P < 0,01$; парний 2-сторонній t-критерій Ст'юдента), приблизно через 190 хвилин після дозування ($8,0 \pm 0,8$ секунди; $P < 0,05$; парний 2-сторонній t-критерій Ст'юдента) і приблизно через 250 хвилин після дозування ($10,6 \pm 1,4$ секунди; $P < 0,05$; парний 2-сторонній t-критерій Ст'юдента), в порівнянні зі значенням перед дозуванням, $6,0 \pm 0,5$ секунди (таблиця 22, фіг. 23).

Вплив прегабаліну на реакції при поведінкових дослідженнях (фази 2 і 3)

Прегабалін порівнюють з станом перед дозуванням в фазі 2, але порівнюють з носієм в фазі 3 дослідження. У фазі 2 дослідження прегабалін вводять за допомогою способу (перорально), іншого, ніж для носія (внутрішньовенно), так що порівняння з носієм є некоректним. У фазі 3 дослідження, реакція на дозу прегабаліну, з використанням 3 рівнів дози порівнюється швидше з носієм, ніж зі станом перед дозуванням.

Механічна алодинія: У фазі 2, пероральне введення прегабаліну (30 мг/кг) викликає значуще збільшення порога відсування лівої лапи приблизно через 50 хвилин після дозування ($10,35 \pm 2,51$ г; $P < 0,001$; парний 2-сторонній t-критерій Ст'юдента) і приблизно через 120 хвилин після дозування ($13,90 \pm 3,00$ г; $P < 0,001$; парний 2-сторонній t-критерій Ст'юдента), в порівнянні зі значеннями перед дозуванням, $1,09 \pm 0,35$ г (таблиця 19, фіг. 20).

У фазі 3, прегабалін, що вводиться перорально при дозі 30 мг/кг, спричиняє значуще збільшення порога відсування лівої лапи приблизно через 120 хвилин після дозування ($17,06 \pm 2,88$ г; $P < 0,01$; критерії Крускала-Валліса і Данна) і приблизно через 180 хвилин після дозування ($13,86 \pm 3,21$ г; $P < 0,01$; ANOVA і критерій Даннета), в порівнянні зі значеннями для групи, що дозується носієм, $5,00 \pm 2,34$ г і $2,57 \pm 0,92$ г, відповідно. Пероральне введення прегабаліну при дозі 50 мг/кг спричиняє значуще збільшення порогів відсування як лівої, так і правої лапи приблизно через 180 хвилин після дозування (ліва лапа: $15,20 \pm 3,31$ г; $P < 0,01$; ANOVA і критерій Даннета, і права лапа: $24,20 \pm 0,39$ г; $P < 0,05$; критерії Крускала-Валліса і Данна), в порівнянні зі значеннями для групи, що дозується носієм, $2,57 \pm 0,92$ г і $16,57 \pm 1,75$ г, відповідно, і для порога відсування лівої лапи приблизно через 240 хвилин після дозування ($12,05 \pm 3,41$ г; $P < 0,05$; критерії Крускала-Валліса і Данна), в порівнянні зі значеннями для групи, що дозується носієм ($1,48 \pm 0,30$ г). Пероральне введення прегабаліну при дозі 100 мг/кг спричиняє значуще збільшення порога відсування лівої лапи приблизно через 120 хвилин після дозування ($23,29 \pm 1,19$ г; $P < 0,01$; ANOVA і критерій Даннета), для лівої і правої лап приблизно через 180 хвилин після дозування (ліва лапа: $19,77 \pm 2,70$ г; $P < 0,01$; ANOVA і критерій Даннета, і

права лапа: $23,70 \pm 1,04$ г; $P < 0,01$; критерії Крускала-Валліса і Данна), в порівнянні зі значеннями для групи, що дозується носієм, $2,57 \pm 0,92$ і $16,57 \pm 1,75$ г, відповідно, і приблизно через 240 хвилин після дозування для порога відсування лівої лапи ($15,91 \pm 2,86$ г; $P < 0,001$; критерії Крускала-Валліса і Данна), в порівнянні зі значеннями для групи, що дозується носієм ($1,48 \pm 0,30$ г). Збільшення порогів відсування правої лапи після введення прегабаліну 50 і 100 мг/кг показує вплив прегабаліну на центральну нервову систему при цих рівнях дозування. Це узгоджується з тваринами, що демонструють залежне від дози збільшення рівня седативних клінічних симптомів. (Таблиця 21, фіг. 22).

Теплова гіперальгезія: У фазі 2, пероральне введення прегабаліну (30 мг/кг) викликає значуще збільшення латентності відсування лівої лапи приблизно через 15, 35, 60 і 130 хвилин після дозування ($8,3 \pm 0,7$ секунди; $P < 0,05$; $8,6 \pm 1,0$ секунди; $P < 0,05$; $8,8 \pm 1,0$ секунди; $P < 0,05$; $9,6 \pm 0,8$ секунди; $P < 0,001$; все - згідно з парним 2-стороннім t-критерієм Ст'юдента), в порівнянні зі значенням перед дозуванням, $6,2 \pm 0,5$ секунди. Ці значні збільшення не вважаються фармакологічно релевантними, оскільки є схожі збільшення значень для латентності відсування в контрольній групі, що дозується носієм (внутрішньовенне введення) в фазі 2 (приблизно через 15, 35, 60 і 130 хвилин після дозування ($10,3 \pm 0,8$ секунди; $P < 0,01$; $8,1 \pm 0,5$ секунди; $P < 0,05$; $9,3 \pm 0,7$ секунди; $P < 0,001$; $9,8 \pm 1,0$ секунди; $P < 0,01$; все - згідно з парним 2-стороннім t-критерієм Ст'юдента), в порівнянні зі значенням перед дозуванням, $6,2 \pm 0,5$ секунди, і в фазі 3 дослідження, пероральне введення прегабаліну не дає значущих впливів на латентності відсування лівої і правої лап при всіх дозах (30, 50 і 100 мг/кг), що досліджуються і для всіх часових точок після дозування (60, 120, 180 і 240 хвилин), в порівнянні з контролем, що дозується носієм. (Таблиця 20, фіг. 21 і таблиця 22, фіг. 23).

ВИСНОВКИ

Периферична мононейропатія викликається в лівій задній кінцівці щурів за допомогою щільного лігування спінальних нервів L5 і L6. Розвиток механічної алодинії і теплової гіперальгезії відстежують з використанням встановлених поведінкових досліджень (тест фон Фрея і плантарний тест Гаргрєвса, відповідно). Поріг реакції і латентність оцінюють як для лівої (схильної до впливу), так і для правої (не схильної до впливу) задньої лапи. У кожній фазі дослідження, всі дозовані тварини, як вважається, мають невропатію для лівої задньої лапи, як оцінюється з використанням встановлених поведінкових досліджень в день перед дозуванням.

Внутрішньовенне введення R-DHE при 0,5 мг/кг спричиняє збільшення порога відсування (механічну алодинію) аж до 25 хвилин після дозування, при піковому впливі приблизно через 5 хвилин після дозування. Впливів R-DHE при 0,5 мг/кг на латентність відсування (теплова гіперальгезія) немає в будь-якій з досліджуваних часових точок. Немає також впливів або на механічну алодинію, або на теплову гіперальгезію при більш низьких дозах 0,1 і 0,3 мг/кг R-DHE.

Внутрішньовенне введення S-DHE при дозі 30 мг/кг викликає значні анагетичні впливи як на поріг відсування (механічна алодинія), з піковими впливами приблизно через 5-25 хвилин після дозування, так і на латентність відсування (теплова гіперальгезія), з піковим впливом приблизно через 15 хвилин після дозування. Не відмічається впливу на механічну алодинію або теплову гіперальгезію при 3 і 10 мг/кг S-DHE.

Внутрішньовенне введення опіоїдних сполук, R-DHE і S-DHE демонструє анагетичну активність в дослідженнях як механічній алодинії, так і теплової гіперальгезії на щурах. Це вказує на терапевтичний потенціал цих сполук при лікуванні нейропатичного болю.

Після введення прегабаліну (в фазі 3) при дозах до 100 мг/кг, є залежне від дози збільшення порога відсування з піковими впливами в межах приблизно між 180 і 240 хвилин після дозування. Немає впливів прегабаліну для досліджень теплової гіперальгезії. Впливи, що відмічаються після введення прегабаліну, узгоджуються з його відомою фармакологічною активністю (на основі літературних даних) зі значними впливами на механічну алодинію, але з обмеженим впливом на теплову гіперальгезію.

Впливи, що відмічаються після внутрішньовенного введення морфіну, узгоджуються з його відомою фармакологічною активністю, зі значними впливами на механічну алодинію і теплову гіперальгезію. Отже, ця система досліджень є чутливою при виявленні ноцицептивних впливів при дослідженні як механічній алодинії, так і теплової гіперальгезії на щурах.

Таблиця 17

Вплив внутрішньовенного введення R-DHE на пороги відсування лівої (L) і правої (R) лапи у відповідь на провокування монотонною фон Фрея у щурів (фаза I) (а) вихідні дані

Лікування	Поріг відсування (г) в момент часу (хвилини) після дозування									
	Перед дозуванням		Фаза I							
			5		25		50		120	
	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R
Носій† 5 мл/кг, внутрішньовенно	0,95± 0,09 (9)	22,26±1,5 2 (9)	5,43±2,5 8 (9)	22,26±1,5 2 (9)	2,25±1,1 6 (9)	23,25±1,1 6 (9)	2,11±0,8 2 (9)	22,26±1,5 2 (9)	1,09±0,2 3 (9)	23,25±1,1 6 (9)
Дигідроеторфін (R) 0,1 мкг/кг, внутрішньовенно	1,37± 0,31	21,07±1,9 9	5,35±0,7 9	23,30±1,0 0	6,55±3,0 4	19,81±1,9 7	1,35±0,3 2	18,11±2,5 2	1,07±0,1 6	18,05±1,9 4
Дигідроеторфін (R) 0,3 мкг/кг, внутрішньовенно	1,27± 0,33	17,45±2,0 1	11,13±3, 54	22,20±1,3 0	2,41±0,5 9	22,37±1,3 6	1,14±0,3 1	18,55±2,2 5	0,95±0,1 0	18,25±1,5 4
Дигідроеторфін (R) 0,5 мкг/кг, внутрішньовенно	1,05± 0,18	16,32±1,9 9	21,97±2, 30	24,36±0,3 4	13,12±3, 41	24,36±0,3 4	6,17±2,3 3	21,84±1,7 7	1,80±0,8 8	20,41±1,6 3
Морфін 5 мг/кг, внутрішньовенно	1,69± 0,53	16,37±2,2 0	13,38±3, 14	23,50±1,0 2	19,23±2, 73	23,50±1,0 2	21,55±2, 40	24,56±0,3 3	9,37±3,6 0	23,46±1,0 6

Дані виражені, як середнє значення ±SEM.

n=10 тварин в кожній групі, якщо в дужках не вказано іншого.

Статистичний аналіз здійснюють тільки на логарифмічних даних.

† Носій = цитратний буфер (моногідрат лимонної кислоти:цитрат натрію:хлорид натрію:вода для ін'єкцій, при відношенні 0,03:0,10:0,86:99,01 (г:г:мл).

Таблиця 17 (продовження)

Лікування	(b) Логарифмічні дані Поріг відсування (log ₁₀ (сила (г)×10000)) в момент часу (хвилини) після дозування									
	Перед дозуванням		Фаза I							
			5		25		50		120	
	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R
Носій† 5 мл/кг, внутрішньове нно	3,96±0,0 4 (9)	5,34±0,0 3 (9)	4,48±0,1 8 (9) ⁵	5,34±0,0 3 (9)	4,21±0,12 (9)	5,36±0, 03 (9)	4,12±0,14 (9)	5,34±0,0, 3 (9)	3,96±0,08 (9)	5,36±0,03 (9)
Дигідроеторфі н (R) 0,1 мкг/кг, внутрішньове нно	4,06±0,0 8	5,30±0,0 5	4,65±0,1 0	5,36±0,0 2	4,42±0,19	5,27±0, 05	4,05±0,08	5,21±0,0 7	3,99±0,06	5,23±0,05
Дигідроеторфі н (R) 0,3 мкг/кг, внутрішньове нно	4,01±0,0 9	5,21±0,0 5	4,71±0,2 0	5,34±0,0 3	4,26±0,10	5,34±0, 03	3,97±0,08	5,23±0,0 6	3,95±0,05	5,25±0,04
Дигідроеторфі н (R) 0,5 мкг/кг, внутрішньове нно	3,96±0,0 7	5,18±0,0 5	5,26±0,1 2 [#]	5,39±0,0 1	4,89±0,17 [‡]	5,39±0, 01	4,50±0,17	5,32±0,0 5	4,03±0,12	5,30±0,03
Морфін 5 мг/кг, внутрішньове нно	4,08±0,1 1	5,17±0,0 6*	4,93±0,1 6	5,37±0,0 2	5,20±0,11* **	5,37±0, 02	5,26±0,11* **	5,39±0,0 0	4,49±0,23	5,36±0,02

Дані виражені, як середнє значення \pm SEM.

n=10 тварин в кожній групі, якщо в дужках не вказано іншого.

† Носій = цитратний буфер (монопідрат лимонної кислоти:цитрат натрію:хлорид натрію:вода для ін'єкцій, при відношенні 0,03:0,10:0,86:99,01 (г:г:г:мл).

P<0,05, у порівнянні з даними для групи, дозованої носієм (непарний 2-сторонній t-критерій Ст'юдента).

*** P<0,001, у порівнянні з даними для групи, дозованої носієм (непарний 2-сторонній t-критерій Ст'юдента).

P<0,01, у порівнянні з даними для групи, дозованої носієм (критерії Крускала-Валліса і Данна).

‡ P<0,05, у порівнянні з даними для групи, дозованої носієм (ANOVA і критерій Даннета).

⁵ P<0,05, у порівнянні з даними перед дозуванням (парний 2-сторонній t-критерій Ст'юдента).

Таблиця 18

Вплив внутрішньовенного введення R-DHE на латентність відсудання лівої (L) і правої (R) лап у відповідь на теплове плантарне стимулювання у щурів (фаза 1)

Лікування	Латентність відсудання (секунди) в момент часу (хвилини) після дозування									
	Перед дозуванням		Фаза 1							
			15		35		60		130	
	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R
Носій† 5 мл/кг, внутрішньовенно	6,4 \pm 0,5 (9)	13,9 \pm 1, 2 (9)	7,5 \pm 0,5 (9)	12,8 \pm 1,1 (9)	7,0 \pm 1,2 (9)	10,3 \pm 0,9 (9)	7,6 \pm 0,9 (9)	12,4 \pm 1,4 (9)	7,4 \pm 0,9 (9)	14,1 \pm 1,3 (9)
Дигідроеторфін (R) 0,1 мкг/кг, внутрішньовенно	6,4 \pm 0,5	13,5 \pm 1, 0	6,9 \pm 1,0	13,2 \pm 1,0	7,4 \pm 0,5	12,6 \pm 1,1	7,7 \pm 1,0	12,9 \pm 1,2	8,1 \pm 0,6	14,3 \pm 0,8

Дигідроеторфін (R) 0,3 мкг/кг, внутрішньовенно	6,3 \pm 0,6	14,3 \pm 0, 6	9,4 \pm 0,8	15,1 \pm 0,9	9,9 \pm 1,1	14,5 \pm 0,7 [‡]	8,3 \pm 0,8	14,6 \pm 0,9	7,7 \pm 0,8	14,2 \pm 0,9
Дигідроеторфін (R) 0,5 мкг/кг, внутрішньовенно	6,4 \pm 0,4	14,1 \pm 0, 9	9,6 \pm 1,2	15,9 \pm 1,2	9,2 \pm 1,2	13,1 \pm 1,2	8,4 \pm 0,6	13,3 \pm 1,2	8,0 \pm 1,1	10,9 \pm 1,0
Морфін 5 мг/кг, внутрішньовенно	6,4 \pm 0,4	15,4 \pm 1, 0	12,0 \pm 1,5 ^s	17,5 \pm 0,5 ^{sss}	16,4 \pm 0,9 ^{**}	16,8 \pm 0,7 ^{**}	12,8 \pm 1,3 [*]	16,3 \pm 1,1 [*]	10,6 \pm 0,9 [*]	13,8 \pm 1,1

Дані виражені, як середнє значення \pm SEM.

n=10 тварин в кожній групі, якщо в дужках не вказано іншого, Носій † = цитратний буфер (монопідрат лимонної кислоти:цитрат натрію:хлорид натрію:вода для ін'єкцій при відношенні, 0,03:0,10:0,86:99,01 (г:г:г:мл).

\$ P<0,05, у порівнянні з даними для групи, дозованої носієм (U-критерій Манна-Уїтні).

\$\$\$ P<0,001, у порівнянні з даними для групи, дозованої носієм (U-критерій Манна-Уїтні).

* P<0,05, у порівнянні з даними для групи, дозованої носієм (непарний 2-сторонній t-критерій Ст'юдента).

** P<0,01, у порівнянні з даними для групи, дозованої носієм (непарний 2-сторонній t-критерій Ст'юдента).

*** P<0,001, у порівнянні з даними для групи, дозованої носієм (непарний 2-сторонній t-критерій Ст'юдента).

‡ P<0,05, у порівнянні з даними для групи, дозованої носієм (ANOVA і t-критерій Даннета).

Таблиця 19

Вплив внутрішньовенного введення S-DHE на поріг відсудання лівої (L) і правої (R) лап у відповідь на провокування монотонною фоно Фрея у щурів (фаза 2) (а) вихідні дані

Лікування	Поріг відсудання (г) в момент часу (хвилини) після дозування									
	Перед дозуванням		Фаза 2							
			5		25		50		120	
	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R
Носій† 5 мл/кг, внутрішньове нно	1,37 \pm 0,3 1	21,03 \pm 1, 84	6,11 \pm 2,3 9	23,46 \pm 1, 06	1,66 \pm 0,4 7	21,67 \pm 1, 61	1,11 \pm 0,1 5	20,94 \pm 1, 90	1,35 \pm 0,2 8	19,55 \pm 1, 69
Дигідроеторфін (S) 3 мкг/кг, внутрішньове нно	0,94 \pm 0,1 1	17,27 \pm 2, 12	8,69 \pm 2,9 8	21,10 \pm 1, 46	8,28 \pm 2,4 8	19,15 \pm 1, 55	0,99 \pm 0,1 2	21,27 \pm 1, 53	1,19 \pm 0,2 0	19,84 \pm 1, 94
Дигідроеторфін (S) 10 мкг/кг, внутрішньове нно	1,19 \pm 0,3 1	20,94 \pm 1, 90	12,15 \pm 2, 99	23,46 \pm 1, 06	3,09 \pm 1,3 5	22,57 \pm 1, 39	1,48 \pm 0,4 2	23,46 \pm 1, 06	0,83 \pm 0,1 0	21,51 \pm 1, 55
Дигідроеторфін (S) 30 мкг/кг, внутрішньове нно	0,84 \pm 0,1 0	18,78 \pm 1, 89	24,56 \pm 0, 33	24,56 \pm 0, 33	21,92 \pm 1, 70	24,56 \pm 0, 33	7,34 \pm 2,4 7	23,67 \pm 1, 07	1,20 \pm 0,3 4	20,83 \pm 1, 99
Прегабалін 30 мг/кг, перорально	1,09 \pm 0,3 5	18,63 \pm 2, 21	2,83 \pm 0,6 2	20,42 \pm 2, 14	3,27 \pm 0,9 7	19,39 \pm 1, 61	10,35 \pm 2, 51	21,34 \pm 1, 49	13,90 \pm 3, 00	23,26 \pm 1, 04

Дані виражені, як середні значення \pm SEM.

n=10 тварин в кожній групі.

Статистичний аналіз здійснюють тільки на логарифмічних даних.

† Носій = цитратний буфер (моногідрат лимонної кислоти:цитрат натрію:хлорид натрію:вода для ін'єкцій, при відношенні 0,03:0,10:0,86:99,01 (г:г:г:мл).

Таблиця 19 (продовження)

Лікування	(b) Логарифмічні дані									
	Поріг відсування (\log_{10} (сила (г)×10000)) в момент часу (хвилини) після дозування									
	Перед дозуванням		Фаза 2							
	L	R	5		25		50		120	
	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R
Носій† 5 мл/кг, внутрішньове нно	4,07±0,07	5,30±0,05	4,50±0,16 ^s	5,36±0,02	4,11±0,10	5,32±0,04	4,01±0,05	5,30±0,05	4,08±0,06	5,28±0,04
Дигідроеторфі н (S) 3 мкг/кг, внутрішньове нно	3,95±0,05	5,20±0,06	4,60±0,20	5,31±0,03	4,69±0,17	5,27±0,04	3,96±0,05	5,32±0,03	4,02±0,07	5,27±0,05
Дигідроеторфі н (S) 10 мкг/кг, внутрішньове нно	3,99±0,08	5,30±0,05	4,90±0,16	5,36±0,02	4,26±0,13	5,34±0,03	4,05±0,10	5,36±0,02	3,89±0,05	5,32±0,03

Дигідроеторфі н (S) 30 мкг/кг, внутрішньове нно	3,90±0,05	5,25±0,05	5,39±0,00 ^{##}	5,39±0,00	5,23±0,04 ^{##}	5,39±0,00	4,60±0,17	5,37±0,02	3,97±0,09	5,29±0,05
Прегабалін 30 мг/кг, перорально	3,92±0,09	5,24±0,06	4,31±0,13	5,28±0,06	4,35±0,13	5,27±0,04	4,87±0,14 ^{**}	5,32±0,03	5,03±0,11 ^{**}	5,36±0,02

Дані виражені, як середні значення \pm SEM.

n=10 тварин в кожній групі.

† Носій = цитратний буфер (моногідрат лимонної кислоти:цитрат натрію:хлорид натрію:вода для ін'єкцій, при відношенні 0,03:0,10:0,86:99,01 (г:г:г:мл).

*** P<0,001, у порівнянні з даними перед дозуванням (парний 2-сторонній t-критерій Ст'юдента).

P<0,001, у порівнянні з даними для групи, дозованої носієм (критерій Крускала-Валліса і Данна).

^s P<0,05, у порівнянні з даними перед дозуванням (парний 2-сторонній t-критерій Ст'юдента).

Таблиця 20

Вплив внутрішньовенного введення S-DHE на латентність відсування лівої (L) і правої (R) лап у відповідь на теплове плантарне стимулювання у щурів (фаза 2)

Лікування	Латентність відсування (секунди) в момент часу (хвилини) після дозування									
	Перед дозуванням		Фаза 2							
	L	R	15		35		60		130	
	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R
Носій† 5 мл/кг, внутрішньове нно	6,2±0,5	14,8±0,6	10,3±0,8 ^{ss}	13,4±0,8	8,1±0,5 ^s	11,7±0,7 ^s	9,3±0,7 ^{ss}	12,1±0,6 ^s	9,8±1,0 ^{ss}	13,1±1,0
Дигідроеторфі н (S) 3 мкг/кг, внутрішньове нно	6,2±0,6	12,6±0,7	9,8±0,9	15,0±0,7	10,0±0,7	12,1±0,9	9,1±0,9	13,5±0,8	10,4±1,3	14,3±0,8
Дигідроеторфі н (S) 10 мкг/кг, внутрішньове нно	6,2±0,6	13,8±0,8	10,4±1,3	14,5±0,9	10,8±1,1	12,5±0,9	11,3±1,1	12,7±0,6	11,3±1,6	13,0±0,8
Дигідроеторфі н (S) 30 мкг/кг, внутрішньове нно	6,2±0,5	13,5±0,9	17,6±0,4 ^{##}	17,5±0,4 ^{##}	10,1±1,4	11,8±1,1	8,3±1,0	14,3±1,1	8,7±0,9	14,2±1,3
Прегабалін 30 мг/кг, перорально	6,2±0,5	13,4±0,9	8,3±0,7 [*]	13,4±0,6	8,6±1,0 [*]	11,9±0,8	8,8±1,0 [*]	12,9±0,6	9,6±0,8 ^{**}	13,4±0,9

Дані виражені, як середнє значення \pm SEM.

n=10 тварин в кожній групі.

† Носій = цитратний буфер (моногідрат лимонної кислоти:цитрат натрію:хлорид натрію:вода для ін'єкцій, при відношенні, 0,03:0,10:0,86:99,01 (г:г:г:мл).

^{##} P<0,01, у порівнянні з даними для групи, дозованої носієм (критерії Крускала-Валліса і Данна).

* P<0,05, у порівнянні з даними перед дозуванням (парний 2-сторонній t-критерій Ст'юдента).

*** P<0,001, у порівнянні з даними перед дозуванням (парний 2-сторонній t-критерій Ст'юдента).

^s P<0,05, ^{ss} P<0,01 і ^{sss} P<0,001, у порівнянні з даними перед дозуванням (парний 2-сторонній t-критерій Ст'юдента).

Таблиця 21

Вплив перорального введення прегабаліну і внутрішньовенного введення морфіну на пороги відсування лівої (L) і правої (R) лапи у відповідь на провокування мононіткою фон Фрея у нейропатичних щурів (фаза 3) (а) вихідні дані

Лікування	Поріг відсування (г) в момент часу (хвилини) після дозування									
	Перед дозуванням		Фаза 3							
	L	R	60		120		180		240	
Носій† 10 мл/кг, перорально	1,87 \pm 0,3 8	22,53 \pm 1, 97	4,95 \pm 0,9 5	20,30 \pm 1, 99	5,00 \pm 2,3 4	18,36 \pm 2, 34	2,57 \pm 0,9 2	16,57 \pm 1, 75	1,48 \pm 0,3 0	20,54 \pm 1, 93
Прегабалін 30 мг/кг, перорально	2,59 \pm 0,6 3	23,25 \pm 1, 41	10,53 \pm 3, 25	23,26 \pm 1, 04	17,06 \pm 2, 88	23,02 \pm 1, 01	13,86 \pm 3, 21	22,74 \pm 0, 97	8,02 \pm 2,6 5	23,99 \pm 0, 38
Прегабалін 50 мг/кг, перорально	2,02 \pm 0,3 5	20,61 \pm 2, 00	18,48 \pm 3, 27	22,57 \pm 1, 39	13,69 \pm 3, 68	21,67 \pm 1, 61	15,20 \pm 3, 31	24,20 \pm 0, 39	12,05 \pm 3, 41	22,74 \pm 0, 97
Прегабалін 100 мг/кг, перорально	1,31 \pm 0,1 8	21,67 \pm 1, 93	15,53 \pm 2, 78	22,24 \pm 1, 82	23,29 \pm 1, 19	24,28 \pm 0, 37	19,77 \pm 2, 70	23,70 \pm 1, 04	15,91 \pm 28 6	23,18 \pm 1, 00
Морфін 5 мг/кг, внутрішньове нно	1,46 \pm 0,3 7 (9)	21,26 \pm 2,1 1 (9)	21,32 \pm 2, 56 (9)	24,02 \pm 0, 34 (9)	11,08 \pm 2, 85 (9)	20,04 \pm 1, 81 (9)	3,68 \pm 0,9 7 (9)	19,57 \pm 1, 75 (9)	1,29 \pm 0,2 0 (9)	18,71 \pm 1, 81 (9)

Дані виражені, як середнє значення \pm SEM.

n=10 тварин в кожній групі, якщо в дужках не вказано іншого.

Статистичний аналіз здійснюють тільки на логарифмічних даних.

† Носій = 1% карбоксиметилцелюлоза.

Таблиця 21 (продовження)

(b) Логарифмічні дані

Лікування	Поріг відсування (\log_{10} (сила (г) \times 10000)) в момент часу (хвилини) після дозування									
	Перед дозуванням		Фаза 3							
	L	R	60		120		180		240	
Носій† 10 мл/кг, перорально	4,20 \pm 0,0 8	5,33 \pm 0, 05	4,57 \pm 0,13 ^s	5,28 \pm 0,0 5	4,43 \pm 0,15	5,22 \pm 0, 07	4,23 \pm 0,12	5,20 \pm 0,05	4,11 \pm 0,07	5,29 \pm 0,05
Прегабалін 30 мг/кг, перорально	4,29 \pm 0,1 1	5,35 \pm 0, 93	4,70 \pm 0,20	5,36 \pm 0,0 2	5,13 \pm 0,11 ^{##}	5,36 \pm 0, 02	4,95 \pm 0,16 ^{**}	5,35 \pm 0,02	4,68 \pm 0,16	5,38 \pm 0,01
Прегабалін 50 мг/кг, перорально	4,25 \pm 0,0 7	5,29 \pm 0, 05	5,10 \pm 0,16	5,34 \pm 0,0 3	4,85 \pm 0,19	5,32 \pm 0, 04	5,00 \pm 0,15 ^{**}	5,38 \pm 0,01 [#]	4,83 \pm 0,18 [#]	5,35 \pm 0,02
Прегабалін 100 мг/кг, перорально	4,07 \pm 0,0 6	5,31 \pm 0, 05	5,08 \pm 0,12	5,33 \pm 0,0 5	5,36 \pm 0,03 ^{**}	5,38 \pm 0, 01	5,23 \pm 0,09 ^{**}	5,37 \pm 0,02 ^{##}	5,11 \pm 0,10 [#]	5,36 \pm 0,02
Морфін 5 мг/кг, внутрішньове нно	4,08 \pm 0,0 9 (9)	5,30 \pm 0, 05 (9)	5,22 \pm 0,15 ⁺⁺⁺ (9)	5,38 \pm 0,0 1 (9)	4,89 \pm 0,14 ^{**} (9)	5,29 \pm 0, 04 (9)	4,45 \pm 0,11 ⁺ (9)	5,28 \pm 0,04 (9)	4,07 \pm 0,07 (9)	5,26 \pm 0,04 (9)

Дані виражені, як середнє значення \pm SEM.

n=10 тварин в кожній групі, якщо в дужках не вказано іншого.

† Носій = 1% карбоксиметилцелюлоза.

* P<0,05, ** P<0,01 і *** P<0,001, у порівнянні з даними перед дозуванням (парний 2-сторонній Ст'юдента критерій).

[#] P<0,05, ^{##} P<0,01 і ^{###} P<0,001, у порівнянні з даними для групи, дозованої носієм (критерії Крускала-Валліса і Данна).

** P<0,01, у порівнянні з даними для групи, дозованої носієм (ANOVA і критерій Даннета).

^{ss} P<0,01, у порівнянні з даними перед дозуванням (парний 2-сторонній t-критерій Ст'юдента).

Таблиця 22

Вплив перорального введення прегабаліну і внутрішньовенного введення морфіну на латентність відсування лівої (L) і правої (R) лап у відповідь на теплове плантарне стимулювання у нейропатичних щурів (фаза 3)

Лікування	Латентність відсування (секунди) в момент часу (хвилини) після дозування									
	Перед дозуванням		Фаза 3							
	L	R	70		130		190		250	
			L	R	L	R	L	R	L	R
Носій† 10 мл/кг, перорально	6,5±0,5	12,4±0,8	9,2±1,0	12,2±0,5	9,0±1,0	10,7±0,7	9,3±1,2	12,2±1,0	9,5±0,8 ^{ss}	11,4±0,6
Прегабалін 30 мг/кг, перорально	6,5±0,5	13,1±0,6	9,9±0,8	13,4±1,0	9,3±0,8	13,7±0,9	8,3±1,1	12,2±0,4	10,9±0,8	14,0±0,8
Прегабалін 50 мг/кг, перорально	6,5±0,6	11,4±0,8	10,6±0,6	12,9±0,9	9,7±1,1	13,6±1,1	11,2±1,1	12,7±0,5	9,0±0,7	11,9±0,7
Прегабалін 100 мг/кг, перорально	6,6±0,7	11,6±0,5	11,5±0,8	12,6±0,9	9,9±0,9	13,4±1,3	7,6±0,5	13,7±0,7	9,7±0,8	13,7±1,1
Морфін 5 мг/кг, внутрішньове нно	6,0±0,5 (9)	11,8±0,6 (9)	11,8±1,2 ⁺ (9)	14,0±1,2 (9)	7,3±0,9 (9)	13,1±1,0 (9)	8,0±0,8 ⁺ (9)	14,3±1,0 (9)	10,6±1,4 ⁺ (9)	14,1±0,9 (9)

Дані виражені, як середні значення ±SEM.

n=10 тварин в кожній групі, якщо в дужках не вказано іншого

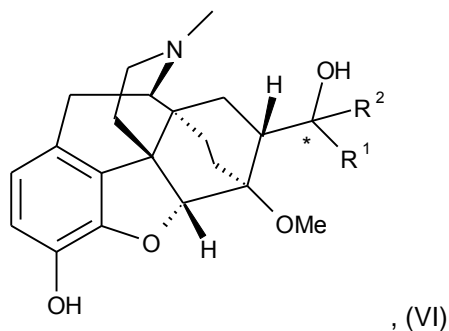
† Носій = 1% карбоксиметилцелюлоза.

⁺P<0,05 і ⁺⁺P<0,01, у порівнянні з даними перед дозуванням (парний 2-сторонній t-критерій Ст'юдента).

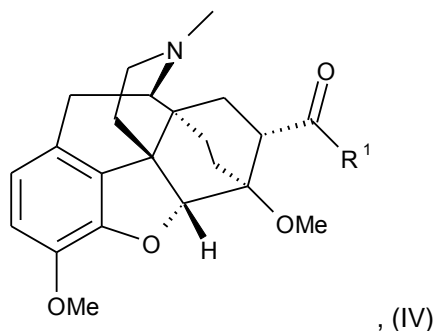
^{ss}P<0,01, у порівнянні з даними перед дозуванням (парний 2-сторонній t-критерій Ст'юдента)

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

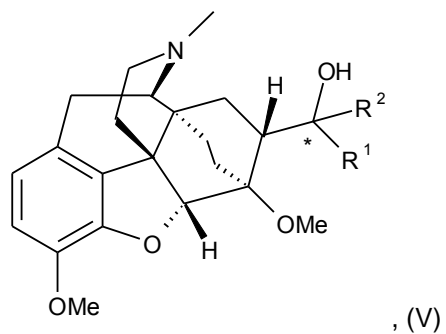
5 1. Спосіб одержання сполуки формули (VI) або її солі



- 10 де R¹ і R² незалежно являють собою C₁₈-алкіл з прямим ланцюгом і * являє собою (S)-стереоцентр, в якому здійснюють взаємодію сполуки формули (IV)



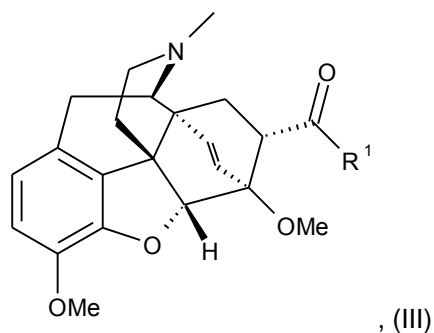
- 15 де R¹ є таким, як визначено вище, зі сполукою формули R²M(X)_p, де R² являє собою C₁₋₈-алкіл з прямим ланцюгом, M являє собою метал, X являє собою галоген і p дорівнює 1 або 0, з одержанням сполуки формули (V)



де R^1 , R^2 і * є такими, як визначено вище;

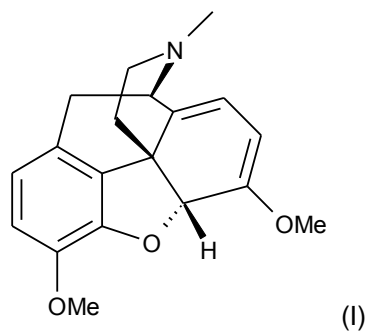
і гідроліз вказаної сполуки формули (V) з одержанням сполуки формули (VI).

- 5 2. Спосіб за п. 1, в якому вказану сполуку формули (IV) одержують за допомогою відновлення сполуки формули (III)

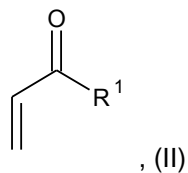


- 10 де R^1 є таким, як визначено вище.

3. Спосіб за п. 2, в якому вказану сполуку формули (III) одержують за допомогою взаємодії сполуки формули (I)

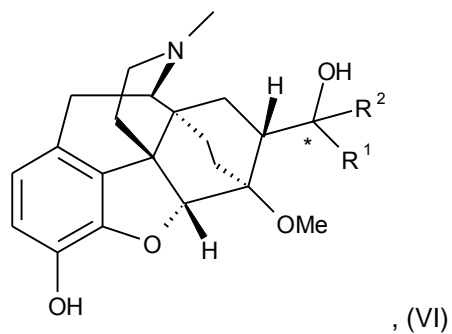


- 15 зі сполукою формули (II)

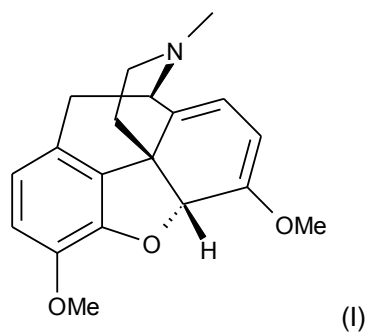


- 20 де R^1 являє собою C_{1-8} -алкіл з прямим ланцюгом.

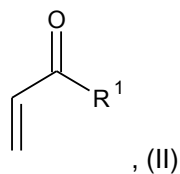
4. Спосіб одержання сполуки формули (VI) або її солі



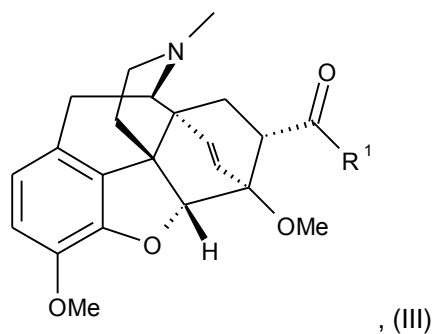
- 5 де R^1 і R^2 незалежно являють собою C_{1-8} -алкіл з прямим ланцюгом і * являє собою (S)-стереоцентр, в якому здійснюють: взаємодію сполуки формули (I)



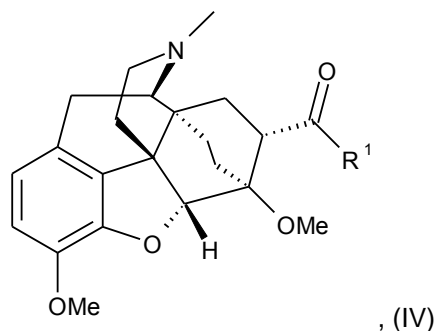
- 10 зі сполукою формули (II)



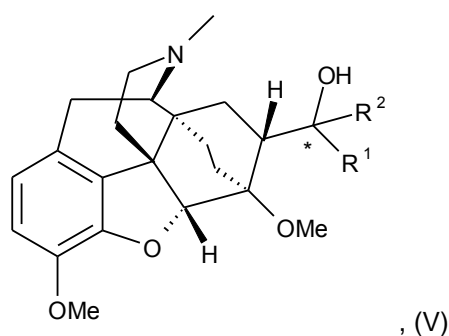
- 15 де R^1 являє собою C_{1-8} -алкіл з прямим ланцюгом, з одержанням сполуки формули (III)



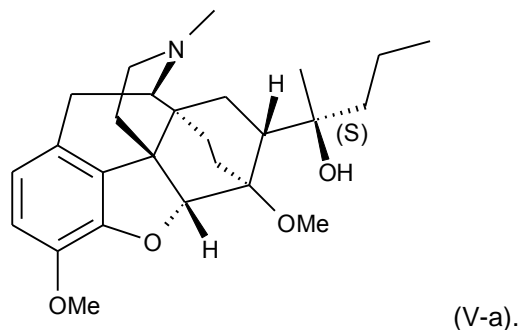
- 20 де R^1 є таким, як визначено вище; відновлення вказаної сполуки формули (III) з одержанням сполуки формули (IV)



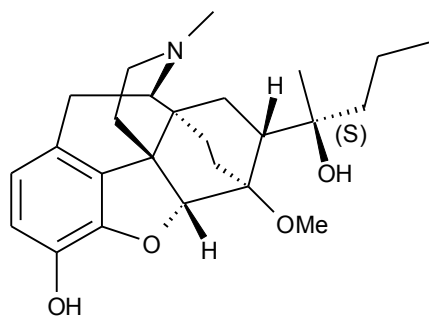
- де R^1 є таким, як визначено вище;
 взаємодію вказаної сполуки формули (IV) зі сполукою формули $R^2M(X)_p$, де R^2 являє собою C_{1-8} -
 алкіл з прямим ланцюгом, М являє собою метал, Х являє собою галоген і р дорівнює 1 або 0,
 з одержанням сполуки формули (V)



- де R^1 , R^2 і * є такими, як визначено вище;
 і гідроліз вказаної сполуки формули (V) з одержанням сполуки формули (VI).
 5. Спосіб за будь-яким з пп. 1-4, де М являє собою магній або літій.
 6. Спосіб за п. 5, де $R^2M(X)_p$ являє собою R^2MgCl , R^2MgBr , R^2MgI або R^2Li .
 7. Спосіб за будь-яким з пп. 1-6, в якому додатково здійснюють стадію кристалізації вказаної
 сполуки формули (VI).
 8. Спосіб за будь-яким з пп. 1-7, в якому R^1 являє собою C_{3-5} -алкіл.
 9. Спосіб за будь-яким з пп. 1-8, в якому R^1 являє собою н-пропіл.
 10. Спосіб за будь-яким з пп. 1-9, в якому R^2 являє собою C_{1-2} -алкіл.
 11. Спосіб за будь-яким з пп. 1-10, в якому R^2 являє собою метил.
 12. Спосіб за будь-яким з пп. 1-11, в якому сполуку формули (V) одержують в діастереомерному
 надлишку щонайменше 90 %.
 13. Спосіб за будь-яким з пп. 1-12, в якому сполука формули (V) являє собою:

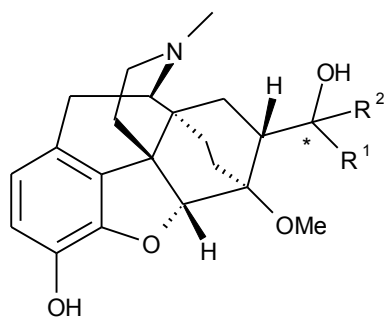


14. Спосіб за будь-яким з пп. 1-12, в якому сполука формули (VI) являє собою:



(VI-a).

15. Сполука формули (VI) або її сіль

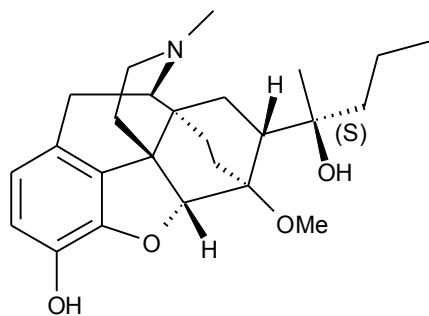


5

, (VI)

де R^1 і R^2 незалежно являють собою C_{1-8} -алкіл з прямим ланцюгом і * являє собою (S)-стереоцентр.

16. Сполука за п. 15 формули (VIa) або її сіль



10

(VI-a).

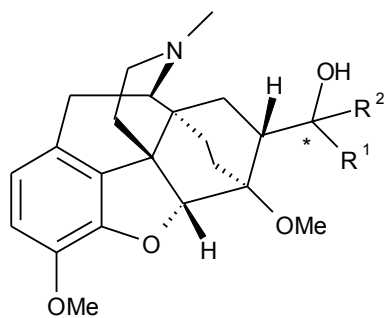
17. Сполука за п. 15 або 16 у формі основи.

18. Сполука за п. 15 або 16 у вигляді фармацевтично прийнятної солі.

19. Сполука за п. 18 у вигляді солі хлористоводневої кислоти.

15

20. Сполука формули (V) або її сіль

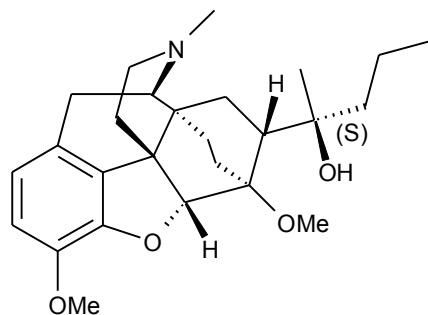


, (V)

де R^1 і R^2 незалежно являють собою C_{1-8} -алкіл з прямим ланцюгом і * являє собою (S)-стереоцентр.

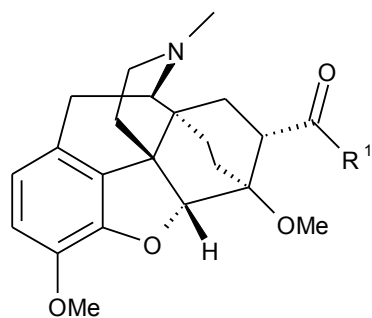
20

21. Сполука за п. 20 формули (Va) або її сіль



(V-a).

22. Сполука за будь-яким з пп. 20 або 21 у формі вільної основи.
 23. Сполука за будь-яким з пп. 20 або 21 у формі фармацевтично прийнятної солі.
 24. Сполука за п. 23 у формі солі хлористоводневої кислоти.
 25. Сполука формули (IV)



, (IV)

де R¹ являє собою н-пропіл.

26. Фармацевтична композиція, що містить ефективну кількість сполуки за будь-яким з пп. 15-19.

27. Композиція за п. 26 в дозованій формі, прийнятній для черезшкірного введення.

28. Застосування сполуки за будь-яким з пп. 15-19 в медицині.

29. Застосування сполуки за будь-яким з пп. 15-19 як анальгетика.

30. Застосування сполуки за будь-яким з пп. 15-19 для одержання медикаменту для лікування болю.

31. Спосіб лікування суб'єкта, який потребує послаблення болю, в якому здійснюють введення вказаному суб'єкту терапевтично ефективної кількості сполуки за будь-яким з пп. 15-19.

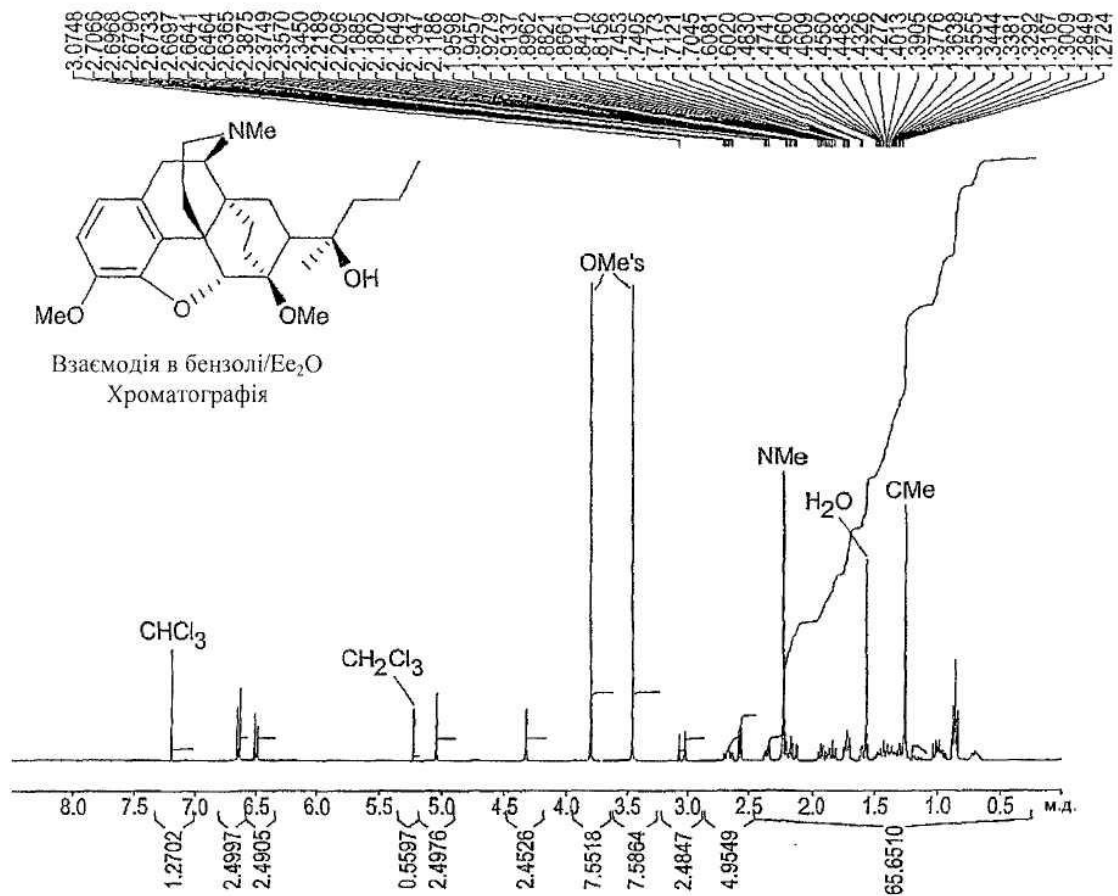


Fig. 1a

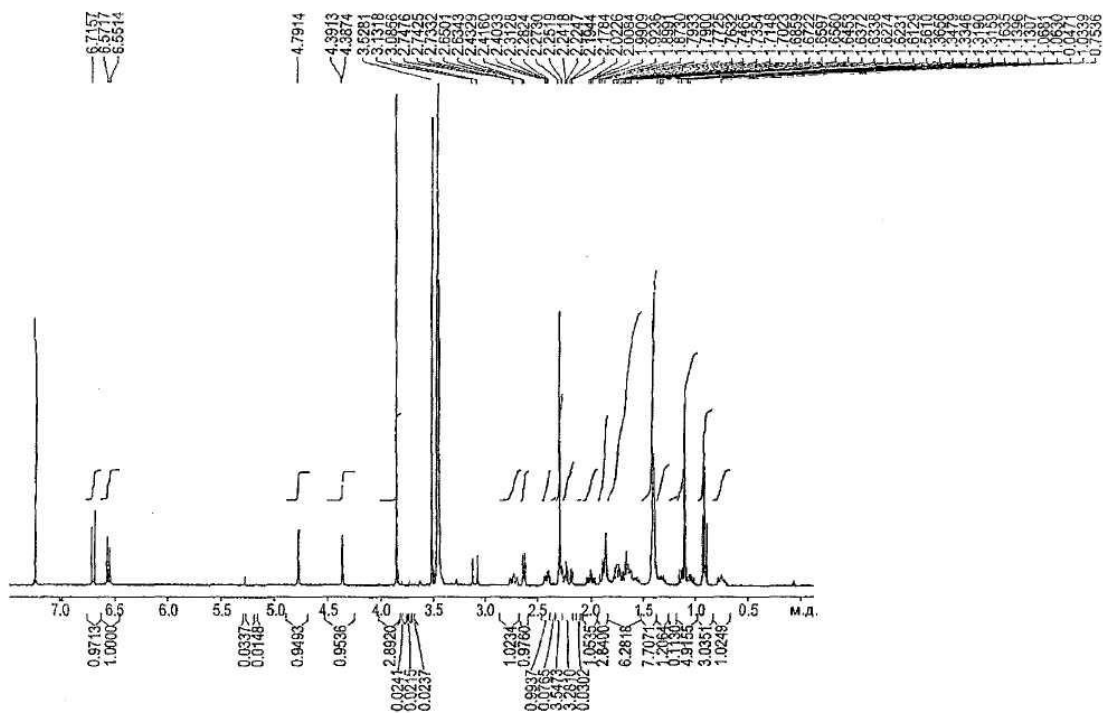


Fig. 1b

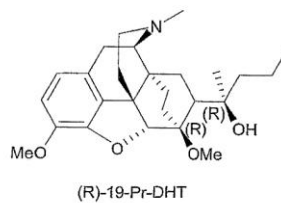
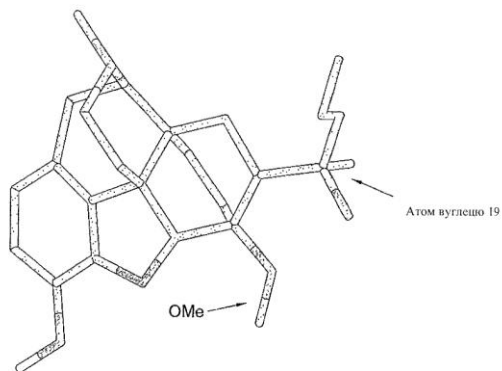
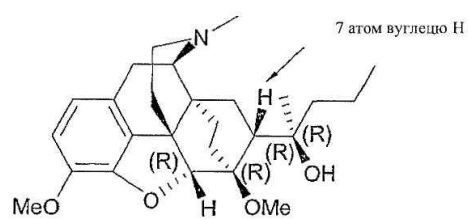
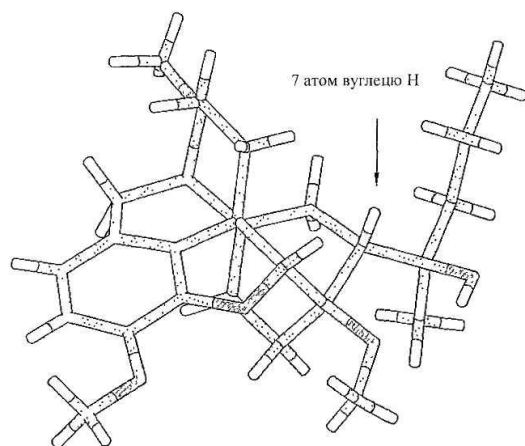
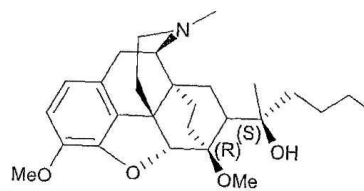
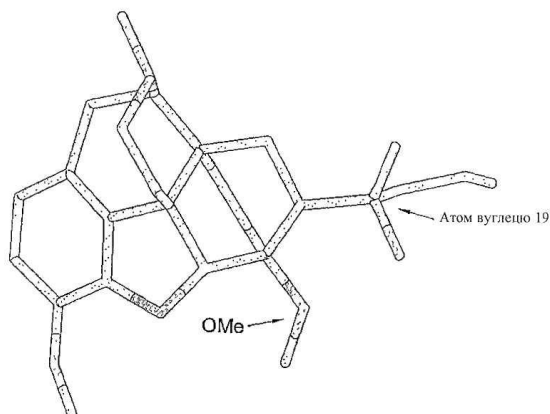


Fig. 2



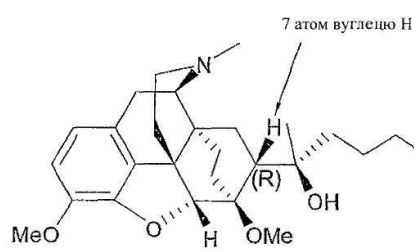
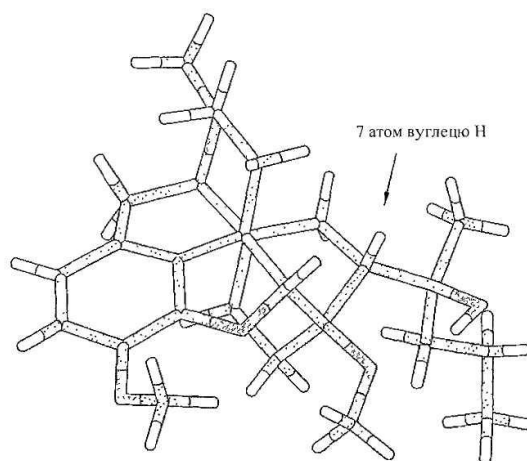
(R)-19-Pr-DHT

Fig. 3



(S)-19-Pr-DHT

Fig. 4



(S)-19-Pr-DHT

Fig. 5

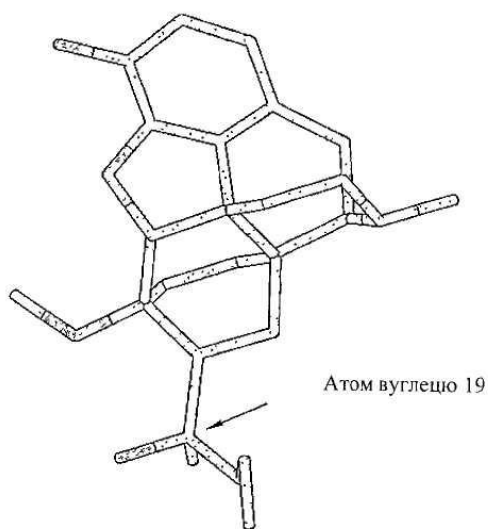
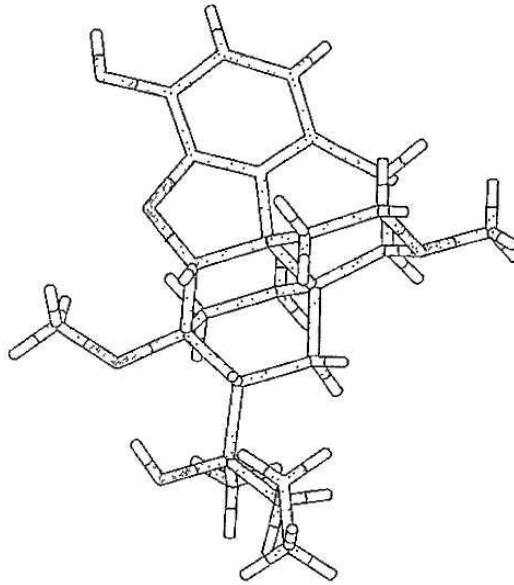
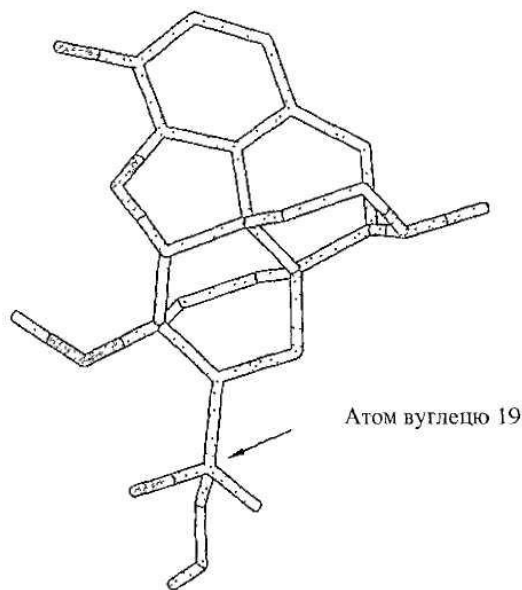


Fig. 6



Фіг. 7



Фіг. 8

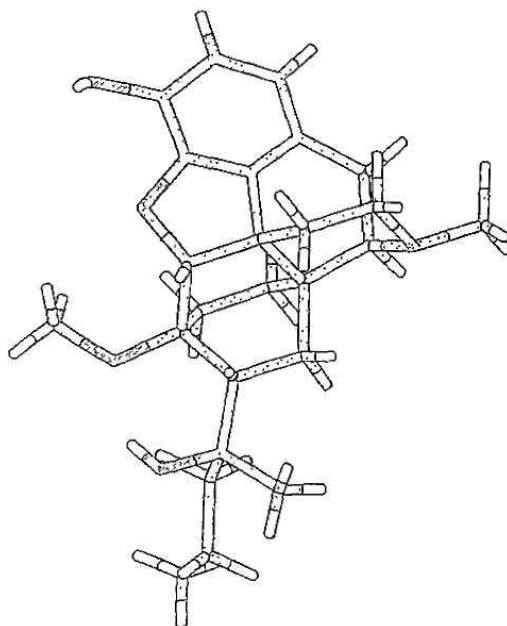


Fig. 9

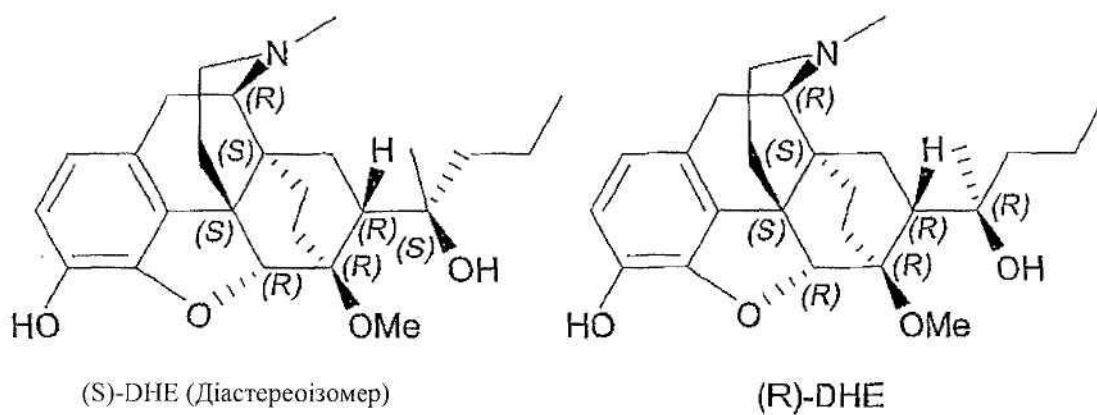
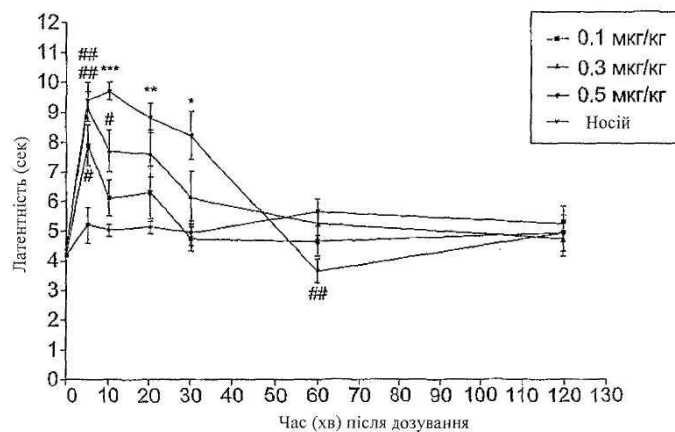
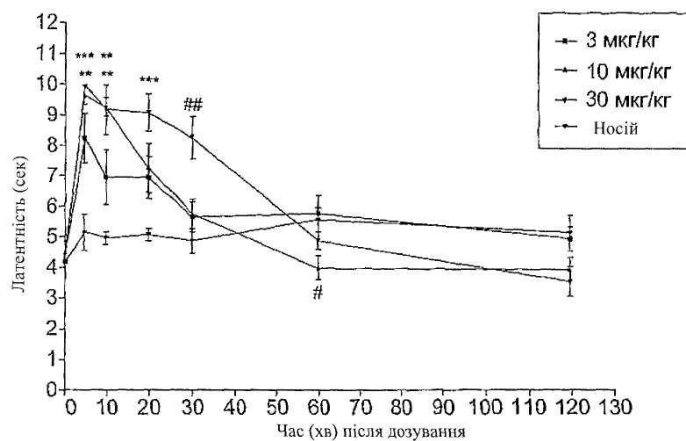


Fig. 10



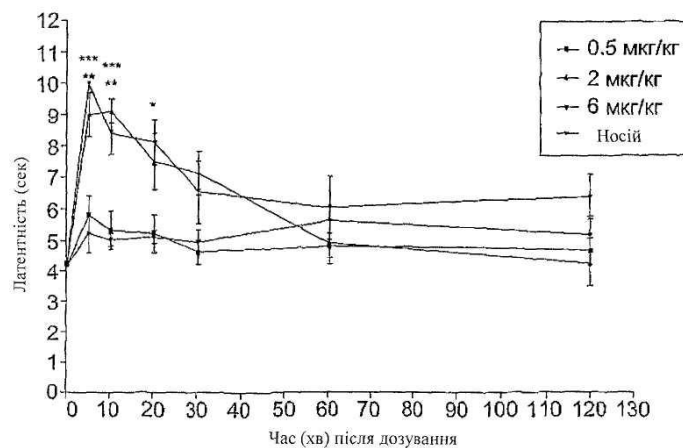
$P < 0,05$, ## $P < 0,01$ в порівнянні з групою, що дозується носієм (ANOVA і t-критерій Даннета),
* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ і *** $P < 0,001$ в порівнянні з групою, що дозується носієм (критерій Крускала-Валліса і Данна)

Фіг. 11



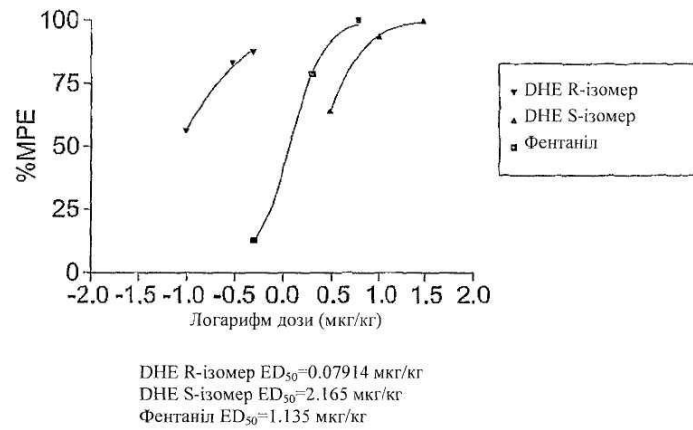
$P < 0,05$, ## $P < 0,01$ в порівнянні з групою, що дозується носієм (ANOVA і t-критерій Даннета),
* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ і *** $P < 0,001$ в порівнянні з групою, що дозується носієм (критерій Крускала-Валліса і Данна)

Фіг. 12

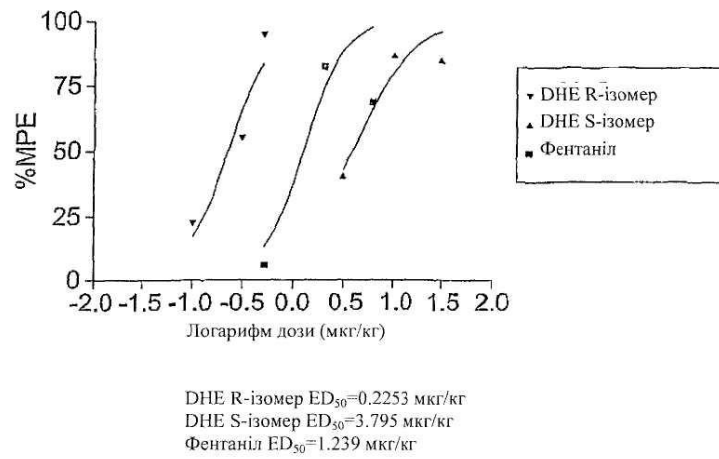


* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ і *** $P < 0,001$ в порівнянні з групою, що дозується носієм (критерій Крускала-Валліса і Данна)

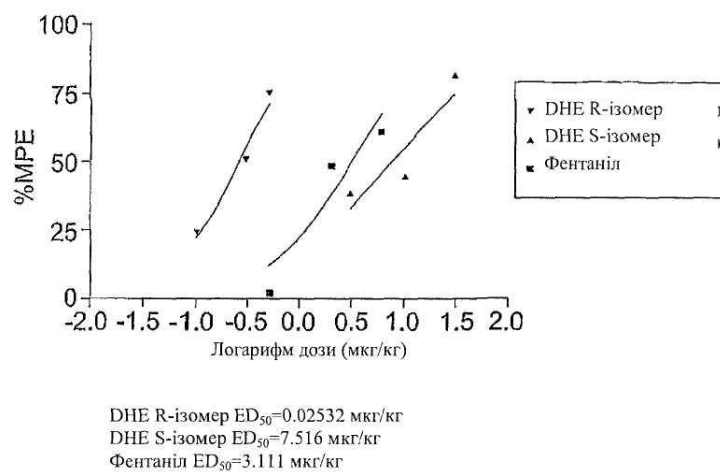
Фіг. 13



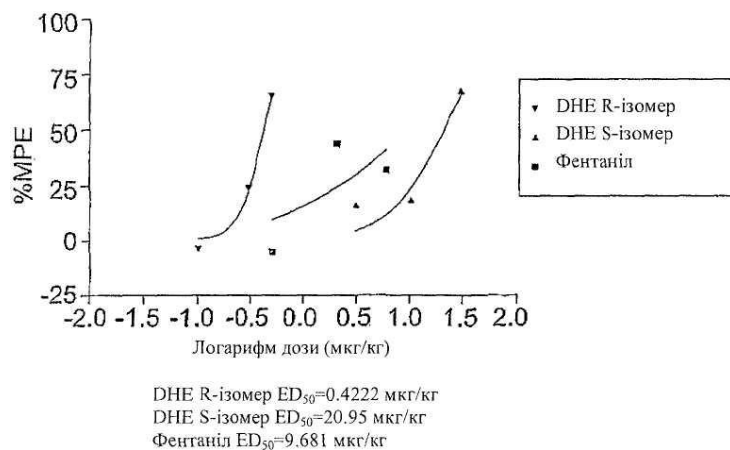
Фіг. 14



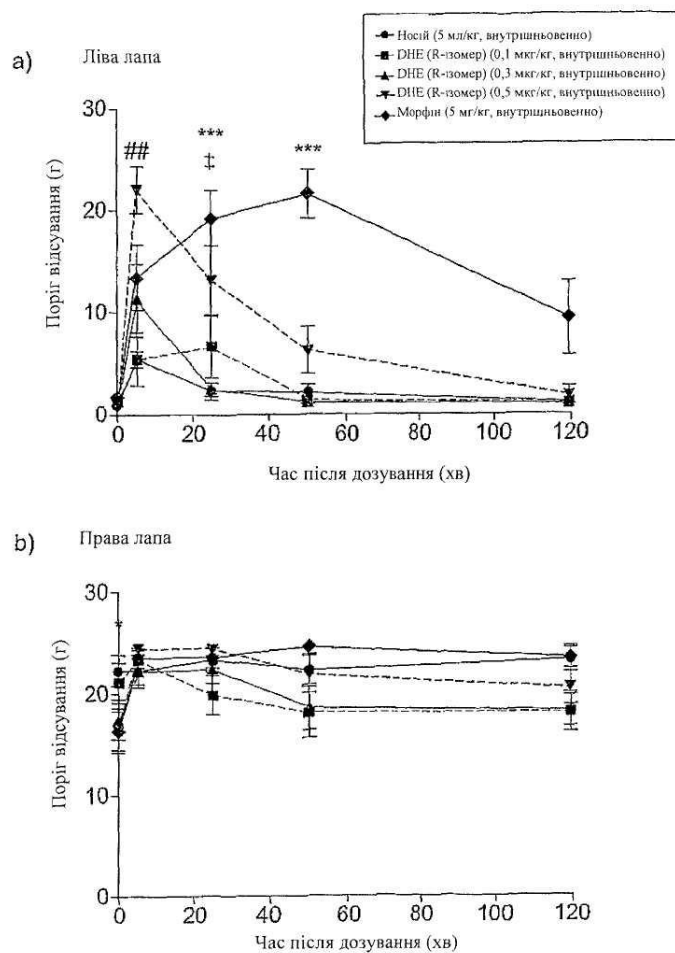
Фіг. 15



Фіг. 16

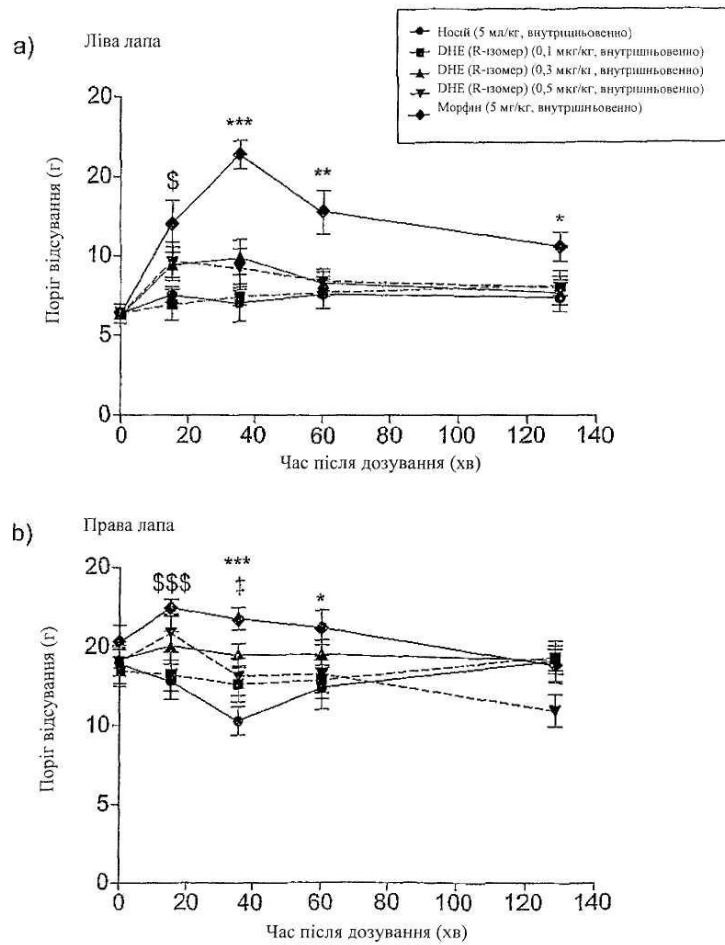


Фіг. 17



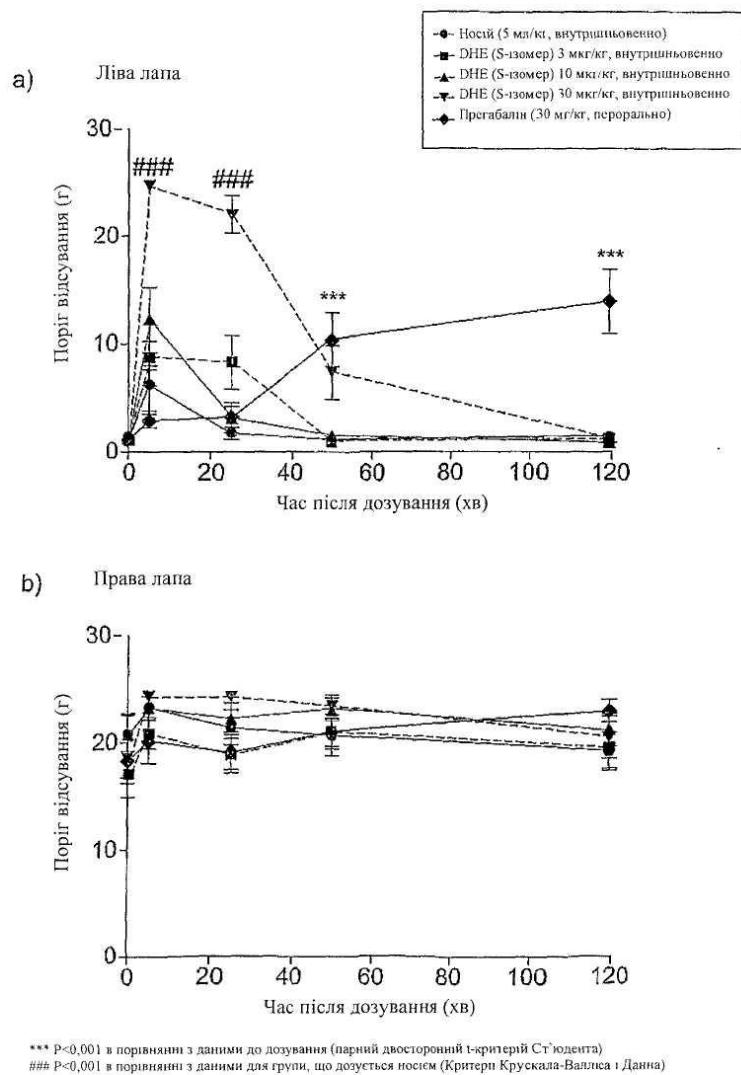
P<0,01 в порівнянні з даними для групи, що дозується носієм (Критерій Крускала-Валліса і „Данна)
 ‡ P<0,05 в порівнянні з даними для групи, що дозується носієм (ANOVA і t-критерій Даннета)
 * P<0,05 ; *** P<0,001 в порівнянні з даними для групи, що дозується носієм (непарний двосторонній t-критерій Ст'юдента)

Фіг. 18

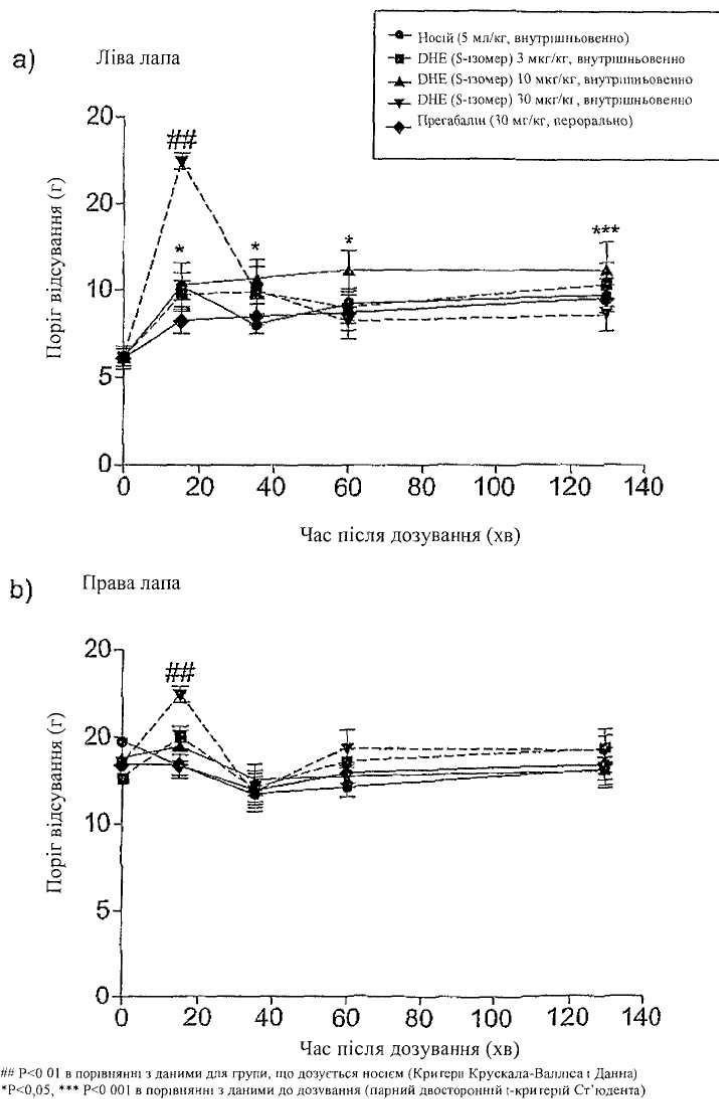


\$ P<0,05, \$\$\$ P<0,001 в порівнянні з даними для групи, що дозується носієм (U-критерій Уїтні)
 * P<0,05, ** P<0,01 *** P<0,001 в порівнянні з даними для групи, що дозується носієм
 (непарний двосторонній t-критерій Ст'юдента)
 ‡P<0,05 в порівнянні з даними для групи, що дозується носієм (ANOVA і t-критерій Даннета)

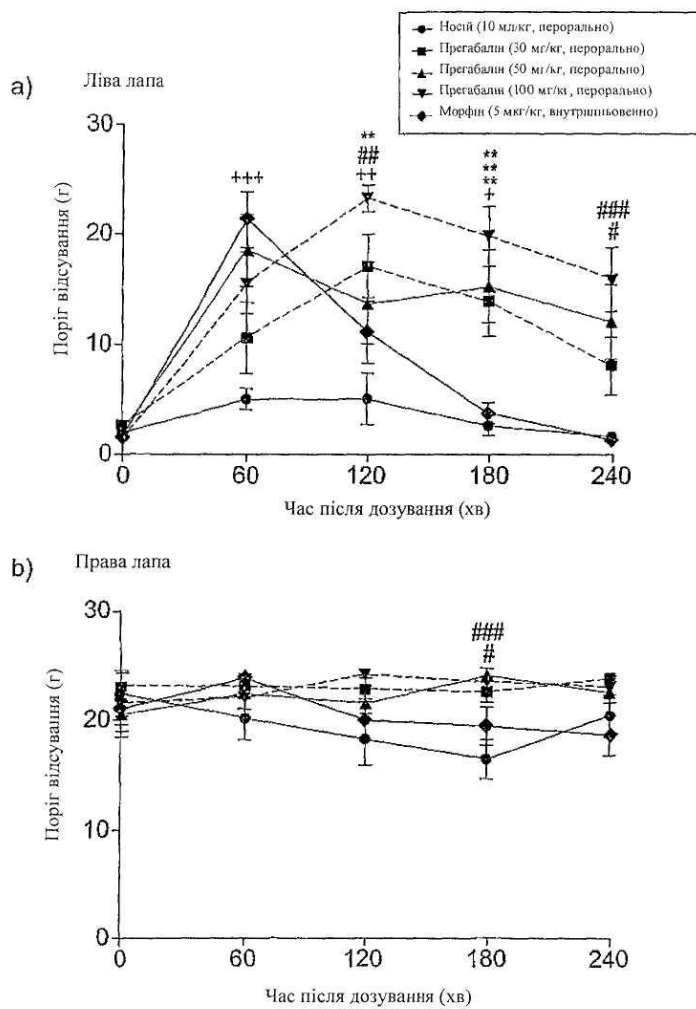
Fig. 19



Фіг. 20

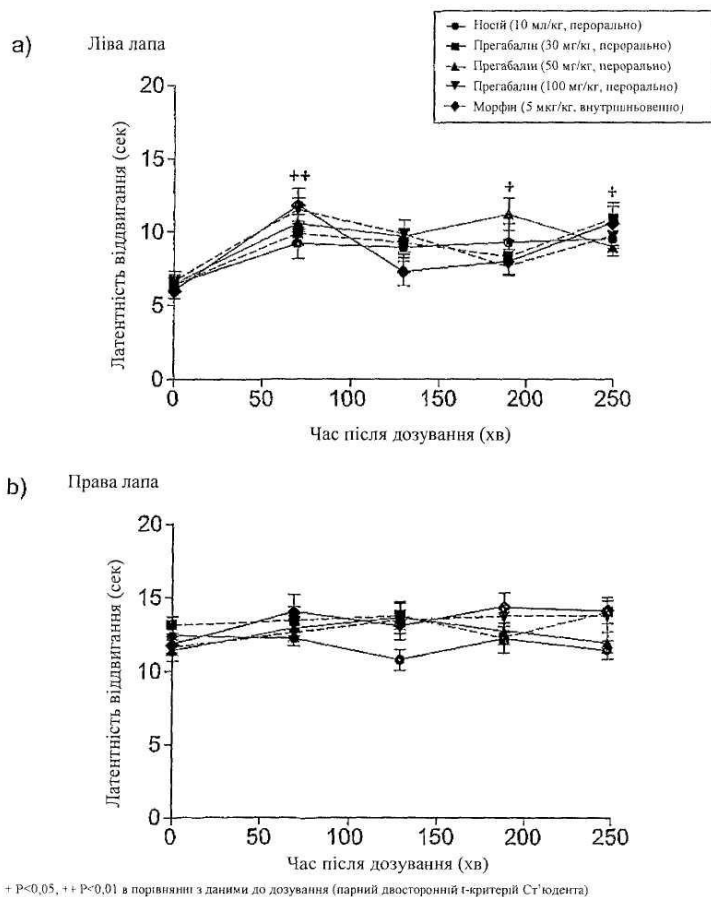


Фіг. 21



+ $P < 0,05$, ++ $P < 0,01$, +++ $P < 0,001$ в порівнянні з даними до дозування (парний двосторонній t-критерій Ст'юдента)
 # $P < 0,005$, ## $P < 0,01$, ### $P < 0,001$ в порівнянні з даними для групи, що дозується носієм (Критерій Крускала-Валліса і Данна)
 ** $P < 0,01$ в порівнянні з даними для групи, що дозується носієм (ANOVA і критерій Даннета)

Фіг. 22



Фіг. 23

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601