



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 80605

(13) C2

(51) МПК (2006)

A61P 29/00

C07D 231/56

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

(54) ІНДАЗОЛИ, ЯКІ МАЮТЬ АНАЛЬГЕТИЧНУ АКТИВНІСТЬ

1

2

(21) а200509350

(22) 23.04.2004

(24) 10.10.2007

(86) РСТ/ЕР2004/004390, 23.04.2004

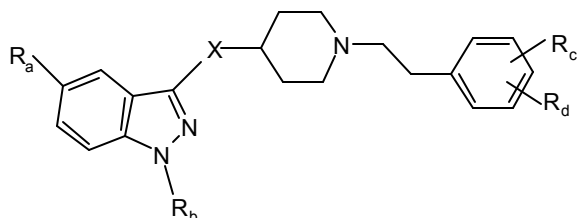
(31) MI2003A000972

(32) 15.05.2003

(33) IT

(72) АЛІСІ МАРІЯ АЛЕССАНДРА, КАЦЦОЛЛА
НІКОЛА, ФУРЛОТТИ ГВІДО, ГУГЛІЕЛМОТТИ
АНДЖЕЛО, ПОЛЕНЦАНІ ЛОРЕНЦО(73) АЦЬЄНДЕ КІМІКЕ РІУНІТЕ АНДЖЕЛІНІ
ФРАНЧЕСКО А.ЧІ.Р.А.Ф. С.П.А.(56) WO, 03/004026, A1, 2003
WO, 98/46589, A2, 1998
EP, 0 908 459, A1, 1999

(57) 1. Сполука формули

(I),
у якій

X є C(O)NHCH₂, NHC(O) або NHC(O)CH₂,
R_a є H, NH₂C(O), CH₃C(O)NH, CH₃SO₂, CH₃SO₂NH,
лінійним або розгалуженим C₁-C₃алкілом, лінійним
або розгалуженим C₁-C₃алкокси або галогеном,
R_b є H, лінійним або розгалуженим C₁-C₆алкілом;
арил-(C₁-C₃)алкілом, необов'язково заміщеним 1
або 2 атомами галогену, C₁-C₃алкільною групою
або C₁-C₃алкоксигрупою,
і в якій

а) якщо X є C(O)NHCH₂,
R_c є гідрокси, аміно, ді-(C₁-C₃)алкіламіно, три-(C₁-
C₃)алкіламоніометил, нітро, трифторометил,
нітро, трифторометил, нітрилом, CH₃C(O)NH,
CH₃SO₂NH, CH₃SO₂,
R'R''NSO₂, де R' та R'' є H, або лінійним або
розгалуженим C₁-C₆алкілом,
R_d є H, гідрокси, аміно, ді-(C₁-C₃)алкіламіно, три-
(C₁-C₃)алкіламоніометил, нітро,
трифторометил, нітрилом, CH₃C(O)NH,
CH₃SO₂NH, CH₃SO₂, R'R''NSO₂, де R' та R'' мають
вищезазначені значення,

за умови, що коли R_a та R_d обидва є H, і R_b є
ізопропілом, то R_c не є гідрокси;

б) коли X є NHC(O) або NHC(O)CH₂,

R_c та R_d, які можуть бути однаковими або різними,
є H, гідрокси, C₁-C₃алкокси, галогеном, аміно, ді-
(C₁-C₃)алкіламіно, три-(C₁-C₃)алкіламоніометил,
нітро, трифторометил, нітрилом, CH₃C(O)NH,
CH₃SO₂NH, CH₃SO₂, R'R''NSO₂, де R' та R'' мають
вищезазначені значення,

та її кислі адитивні солі з фармацевтично
прийнятними органічними та неорганічними
кислотами.

2. Сполука за п. 1, яка відрізняється тим, що R_a є
H або C₁-C₃алкілом.

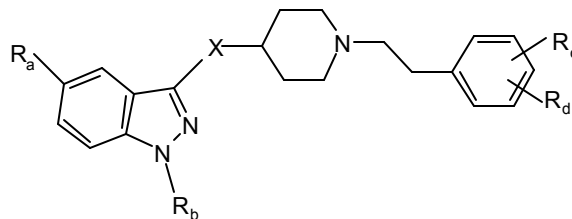
3. Сполука за пп. 1 або 2, яка відрізняється тим,
що R_b є H або C₁-C₃алкілом.

4. Сполука за будь-яким з пп. з 1 по 3, яка
відрізняється тим, що R_c є H, NO₂, NH₂, OH або
C₁-C₃алкокси.

5. Сполука за будь-яким з пп. з 1 по 4, яка
відрізняється тим, що R_d є H.

6. Кисла адитивна сіль сполуки за будь-яким з пп. з
1 по 5, яка відрізняється тим, що кислоту
вибирають із групи, яка включає щавлеву,
малеїнову, метансульфонову,
паратолуолсульфонову, бурштинову, лимонну,
винну, молочну, хлористоводневу, фосфорну та
сірчану кислоти.

7. Фармацевтична композиція, яка містить
ефективну кількість сполуки формули (I):

(I),
у якій

X є C(O)NHCH₂, NHC(O) або NHC(O)CH₂,
R_a є H, NH₂C(O), CH₃C(O)NH, CH₃SO₂, CH₃SO₂NH,
лінійним або розгалуженим C₁-C₃алкілом, лінійним
або розгалуженим C₁-C₃алкокси або галогеном,
R_b є H, лінійним або розгалуженим C₁-C₆алкілом;
арил-(C₁-C₃)алкілом, необов'язково заміщеним 1

(13) C2

(11) 80605

(19) UA

або 2 атомами галогену, C₁-C₃алкільною групою або C₁-C₃алкоксигрупою, і в якій

а) якщо X є C(O)NHCH₂, R_c є гідрокси, аміно, ді-(C₁-C₃)алкіламіно, три-(C₁-C₃)алкіламоніометил, нітро, трифторометил, нітрилом, CH₃C(O)NH, CH₃SO₂NH, CH₃SO₂, R'R''NSO₂, де R' та R'' є H, або лінійним або розгалуженим C₁-C₆алкілом, R_d є H, гідрокси, аміно, ді-(C₁-C₃)алкіламіно, три-(C₁-C₃)алкіламоніометил, нітро, трифторометил, нітрилом, CH₃C(O)NH, CH₃SO₂NH, CH₃SO₂, R'R''NSO₂, де R' та R'' мають вищезазначені значення, за умови, що коли R_a та R_d обидва є H, і R_b є ізопропілом, то R_c не є гідрокси,

б) якщо X є NHC(O) або NHC(O)CH₂,

R_c та R_d, які можуть бути однаковими або різними, є H, гідрокси, C₁-C₃алкокси, галогеном, аміно, ді-(C₁-C₃)алкіламіно, три-(C₁-C₃)алкіламоніометил, нітро, трифторометил, нітрилом, CH₃C(O)NH, CH₃SO₂NH, CH₃SO₂, R'R''NSO₂, де R' та R'' мають вищезазначені значення,

або її фармацевтично прийнятну адитивну сіль з органічною або неорганічною кислотою та принаймні один фармацевтично прийнятний інертний інгредієнт.

8. Фармацевтична композиція за п. 7, яка **відрізняється** тим, що містить сполуку за будь-яким з пп. з 2 по 6.

Даний винахід стосується індазолу, який має анальгетичну активність, способу його одержання та фармацевтичної композиції, яка його містить.

Хронічний біль є дуже поширеною проблемою. У середньому приблизно 20% дорослого населення страждає від нього, і його зазвичай пов'язують із клінічними станами, які характеризуються хронічними та/або дегенеративними пошкодженнями.

Типовими прикладами патологій, які характеризуються хронічним болем, є ревматоїдний артрит, остеоартрит, фіброміалгія, невралгія і т. ін. [Ashburn MA, Staats PS. Management of chronic pain. Lancet 1999; 353: 1865-69].

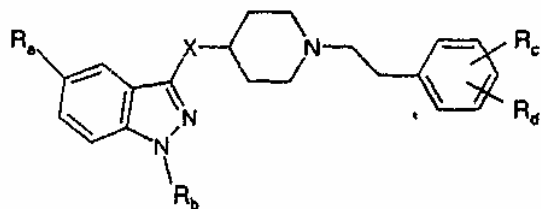
Хронічний біль часто забирає багато сил і буває причиною втрати працездатності та низької якості життя. Таким чином, він також має негативні економічні та соціальні наслідки.

Анальгетичні медикаменти, які нині застосовують для лікування від хронічного болю, належать здебільшого до двох класів: нестероїдних протизапальних ліків (NSAID), які поєднують анальгетичну активність та протизапальну активність, і опіїдних анальгетиків. Ці класи складають основу триступінчастої "анальгетичної шкали", запропонованої Всесвітньою організацією охорони здоров'я для медикаментозного лікування від болю [Textbook of Pain. 4th edition. PD Wall and R Melzack Eds. Churchill Livingstone, 1999].

Загальновідомо, що хронічний біль важко піддається лікуванню з застосуванням наявних на даний час засобів. Отже, розробка нових анальгетиків завжди була однією з головних цілей фармацевтичної промисловості. Незважаючи на широкі дослідження, спрямовані на пошук прийнятної анальгетичної сполуки, все ще існує значна кількість пацієнтів, больовий стан яких і досі неможливо належним чином вилікувати [Scholz J, Woolf CJ. Can we conquer pain? Nat Neurosci. 2002; 5: 1062-76].

Несподівано було виявлено, що такі властивості має нова група індазолів.

Таким чином, у першому аспекті даний винахід стосується індазолу загальної формули:



(I)

де

X є C(O)NHCH₂, NHC(O) або NHC(O)CH₂;

R_a є H, NH₂C(O), CH₃C(O)NH, CH₃SO₂, CH₃SO₂NH, лінійним або розгалуженим C₁-C₃ алкілом, лінійним або розгалуженим C₁-C₃ алкокси або галогеном;

R_b є H, лінійним або розгалуженим C₁-C₆ алкілом; арил-(C₁-C₃)алкілом, необов'язково заміщеним 1 або 2 атомами галогену, C₁-C₃алкільною групою або C₁-C₃алкокси-групою;

і

а) якщо X є C(O)NHCH₂

R_c є гідрокси, аміно, ді-(C₁-C₃)алкіл-аміно, три-(C₁-C₃)алкіл-амоніометил, нітро, трифторометил, нітрилом, CH₃C(O)NH, CH₃SO₂NH, CH₃SO₂, R'R''NSO₂, де R та R'' є H, або лінійним або розгалуженим C₁-C₆алкілом,

R_d є H, гідрокси, аміно, ді-(C₁-C₃)алкіламіно, три-(C₁-C₃)алкіл-амоніометил, нітро, трифторометил, нітрилом, CH₃C(O)NH, CH₃SO₂NH, CH₃SO₂, R'R''NSO₂, де R' та R'' мають вищезазначені значення,

однак, за умови, що коли R_a та R_d обидва є H, і R_b є ізопропілом, то R_c не є гідрокси;

б) коли X є NHC(O) або NHC(O)CH₂

R_c та R_d, які можуть бути однаковими або різними, є H, гідрокси, C₁-C₃алкокси, галогеном, аміно, ді-(C₁-C₃)алкіламіно, три-(C₁-C₃)алкіл-амоніометил, нітро, трифторометил, нітрилом, CH₃C(O)NH, CH₃SO₂NH, CH₃SO₂, R'R''NSO₂, де R' та R'' мають вищезазначені значення,

та їх кислими адичійними солями з фармацевтично прийнятними органічними та неорганічними кислотами.

Типовими прикладами фармацевтично прийнятних кислот є: щавлева, малеїнова, метансульфонова, паратолуолсульфонова, бурштинова, лимонна, винна, молочна, хлористоводнева, фосфорна, сірчана.

Оптимальними значеннями для R_3 є H та C_{1-3} алкіл.

Оптимальними значеннями для R_b є H та C_{1-3} алкіл.

Оптимальними значеннями для R_c є H, NO_2 , NH_2 , OH та C_{1-3} алкокси.

Оптимальним значенням для R_d є H.

Анальгетичну активність сполук формули (I) визначали за допомогою двох експериментальних моделей на щурах: механічної гіпералгезії, викликаной CFA, та механічної гіпералгезії при діабетичній невротії, викликаной стрептозоцином.

Як відомо спеціалістам у даній галузі, вищезгадані експериментальні моделі можна з вважати такими, що дозволяють прогнозувати активність у людському організмі.

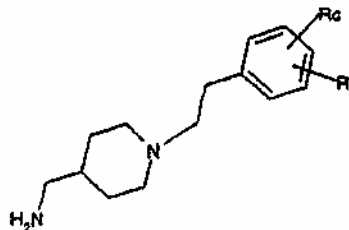
Викликана CFA гіпералгезія є синдромом, який характеризується активацією кругообігів з метою контролювання запальної реакції, і є пов'язаним з виникненням станів, які перешкоджають сприйняттю болю. Ін'єкція CFA фактично є здатною периферично викликати вивільнення специфічних речовин (посередників запальної реакції та альгогенних агентів), які відповідають за локальне пошкодження, і центрально, на рівні спинного мозку, визначати біохімічні зміни, які підтримують посилення сприйняття болю. Загальновідомо, що ця модель являє собою дійсний засіб дослідження ліків для застосування у лікуванні запального болю в людини і, зокрема, для боротьби з такими станами, як гіпералгезія та алодинія.

Типовими прикладами людських патологій, які характеризуються цим типом болю, пов'язаного з дегенеративними запальними процесами, є ревматоїдний артрит та остеоартрит.

У свою чергу, діабетична невротія, викликана стрептозоцином у щура, представляє інсулін-залежний синдром, який характеризується супутнім зниженням швидкості провідності рухових та сенсорних нервів та виникненням багатьох відхилень у сприйнятті болю. Загальновідомо, що ця експериментальна модель є корисним засобом для дослідження ліків для застосування у лікуванні невротичного болю в людини. Зокрема, ця модель є дійсним прикладом організму, що страждає від невротичних болів, які характеризуються такими явищами, гіпералгезії та алодинії внаслідок первинних пошкоджень або дисфункцій нервової системи. Типовими прикладами людських патологій, які характеризуються дисфункціями цього типу та наявністю невротичного болю, є діабет, рак, імунodefіцитні хвороби, травми, ішемії, розсіяний склероз, невралгії сидничного нерва, невралгія трійчастого нерва та посттерпетичні синдроми.

У другому аспекті даний винахід стосується способу одержання сполуки формули (I), у якій X = $C(O)NHCH_2$, та її кислих адичійних солей з фармацевтично прийнятними органічними або неорганічними кислотами, який характеризується тим, що включає такі етапи:

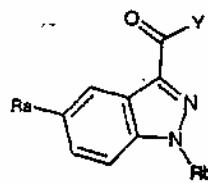
а) реакція аміну формули (II)



(II)

де

R_c та R_d мають однакові значення, як було зазначено вище, або, якщо R_c або R_d є аміно- або спиртовою групою, R_c та R_d можуть бути аміно- або спиртовою групою, захищеною захисною групою традиційного типу, з похідною індазол-карбонової кислоти формули (IIIa)



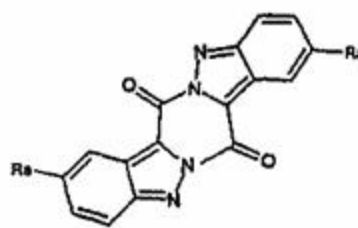
(IIIa)

де

R_a та R_b мають вищезазначені значення, і

Y є атомом Cl або Br, або OR або $OC(O)R$ групою, де R є лінійним або розгалуженим алкілом, який має від 1 до 6 атомів вуглецю,

або з похідною індазол-карбонової кислоти формули (IIIb)



(IIIb)

де

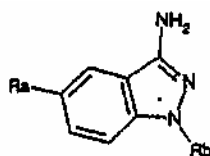
R_a має вищезгадане значення,

б) розщеплення будь-якої можливої захисної групи вищезгаданої аміно- або спиртової групи і

в) необов'язкове утворення кислій адичійної солі індазоламідів формули (I) з фармацевтично прийнятною органічною або неорганічною кислотою.

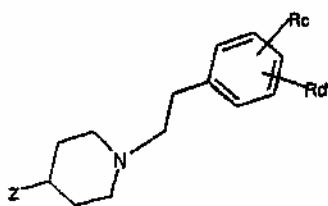
У третьому аспекті даний винахід стосується способу одержання сполуки формули (I), у якій X = $NH(CO)$ або $NH(CO)CH_2$ та її кислих адичійних солей з фармацевтично прийнятними органічними

або неорганічними кислотами, який характеризується тим, що включає такі етапи:
а) реакція аміну формули (IV)



(IV)

де
Ra та Rb мають вищезазначені значення, конденсують з похідною карбонової кислоти формули (V)



(V)

де
Rc та Ra мають однакові значення, як було зазначено вище, або, якщо Rc або Rd є аміно- або спиртовою групою, Rc та Rd можуть бути аміно- або спиртовою групою, захищеною захисною групою традиційного типу, і

Z є групою C(O)Y або CH₂C(O)Y, у якій Y є атомом Cl або Br, або OR або OC(O)R групою, де R є лінійним або розгалуженим алкілом, який має від 1 до 6 атомів вуглецю,

б') розщеплення будь-якої можливої захисної групи вищезгаданої аміно- або спиртової групи і

с') необов'язкове утворення кислотної адичійної солі індазоламідів формули (I) з фармацевтично прийнятною органічною або неорганічною кислотою.

Звичайному спеціалістові у даній галузі легко стане зрозуміло, що деякі сполуки формули (I) також можуть бути одержані з іншої сполуки формули (I) традиційними способами. Наприклад, якщо Rc та/або Rd є NO₂ групою, остання може бути відновлена для забезпечення відповідної сполуки формули (I), у якій Rc та/або Rd є NH₂.

Амін формули (II) одержують згідно з традиційними способами. Наприклад, шляхом алкілювання ізоніпекотаміду прийнятним галідом з наступним відновленням аміду до первинного аміну [WO 9807728] або шляхом захисту амінометилпіперидину бензальдегідом [Synthetic Communications 22(16), 2357-2360, 1992], алкілювання прийнятним галідом та депroteкції.

Проміжна сполука формули (II), у якій Rc та Rd мають вищезазначені значення, є новою. Ця проміжна сполука, таким чином, є іншим аспектом даного винаходу.

Сполуки формули (IIIa) та (IIIb) також одержують згідно з традиційними способами. Наприклад, сполуки формули (IIIa), у яких Y є хлором, одержують із відповідної кислоти тіонілхлоридом [J. Med. Chem., 1976, Vol. 19 (6),

стор. 778-783], тоді як сполуки формули (IIIa), у яких Y є OR або OC(O)R, одержують за допомогою відомих реакцій етерифікації або утворення змішаних ангідридів [R.C. Larok, Comprehensive Organic Transformations, VCH, стор. 965-966]. У свою чергу, сполуки формули (IIIb) можуть бути одержані згідно з [J.O.C. 1958, Vol. 23 стор. 621].

У свою чергу, сполуки формули (IV) можуть бути одержані згідно з традиційними способами, описаними у літературі, наприклад, у [публікаціях J. of Heterocyclic Chemistry 1979 (16) 783-784, або J.A.C.S., 1943 (65) 1804-1806].

Сполуки формули (V) також можуть бути одержані згідно з традиційними способами. Наприклад, сполуки формули (V), у якій Y є хлором, можуть бути одержані шляхом омилення відповідних естерів з наступною обробкою тіонілхлоридом.

В оптимальному варіанті етапи (а) та (а') здійснюють шляхом реакції

- сполуки формули (II) зі сполукою формули (IIIa), у якій Y є хлором, або
- сполуки формули (II) зі сполукою формули (IIIb), або
- сполуки формули (IV) зі сполукою формули (V), у якій Y є хлором,

у присутності прийнятного розріджувача і при температурі від 0 до 140°C протягом часу від 0,5 до 20 годин.

В оптимальному варіанті температура реакції становить від 15 до 40°C. В оптимальному варіанті час реакції становить від 1 до 18 годин.

В оптимальному варіанті розріджувач є апротонним, полярним або неполярним. У ще кращому варіанті він є апротонним неполярним. Прикладами прийнятних апротонних неполярних розріджувачів є ароматичні вуглеводні, наприклад, толуол. Прикладами прийнятних апротонних полярних розріджувачів є диметилформамід та диметилсульфоксид.

У варіантах втілення, у яких сполуку формули (II) піддають реакції зі сполукою формули (IIIa), у якій Y є хлором, або у яких сполуку формули (IV) піддають реакції зі сполукою формули (V), у якій Y є хлором, вищезгадані етапи (а) та, відповідно, (а') в оптимальному варіанті здійснюють у присутності органічного або неорганічного акцептора кислот.

Прикладами прийнятних органічних акцепторів кислот є піридин, триетиламін та інші подібні сполуки. Прикладами прийнятних неорганічних акцепторів кислот є лужні карбонати та бікарбонати.

На етапах (б) та (б') розщеплення захисної групи аміно- або спиртової групи в оптимальному варіанті здійснюють способами, відомими у хімії захисних груп.

У свою чергу, перед етапами (в) та (в') в оптимальному варіанті здійснюють етап виділення індазоламідів формули (I).

У ще одному аспекті даний винахід стосується фармацевтичної композиції, яка містить ефективну кількість сполуки формули (I) або її адичійної солі з фармацевтично прийнятною кислотою та принаймні один фармацевтично прийнятний інертний інгредієнт.

Типовим прикладом патологічного стану, який може бути поліпшений шляхом лікування з застосуванням фармацевтичної композиції згідно з даним винаходом, є хронічний біль. Як правило, цей хронічний біль є зумовленим хронічними пошкодженнями або дегенеративними процесами, такими як ревматоїдний артрит, остеоартрит, фіброміалгія, онкологічний біль, невропатичний біль і т. ін.

В оптимальному варіанті фармацевтичні композиції згідно з даним винаходом одержують у прийнятній дозованій формі.

Прикладами прийнятних дозованих форм є таблетки, капсули, вкриті таблетки, гранули, розчини та сиропи для перорального введення; креми, мазі та лікарські пластирі для місцевого застосування; супозиторії для ректального застосування та стерильні розчини для ін'єкційного, аерозольного або очного введення.

В оптимальному варіанті ці дозовані форми рецептують таким чином, щоб забезпечувати контрольоване вивільнення з часом сполуки формули (I) або її солі з фармацевтичне прийнятною кислотою. Дійсно, залежно від типу лікування, потрібний час вивільнення може бути дуже коротким, нормальним або тривалим.

Дозовані форми також можуть містити інші традиційні інгредієнти, такі як: консерванти, стабілізатори, поверхнево-активні речовини, буфери, солі для регулювання осмотичного тиску, емульгатори, підсолоджувачі, барвники, ароматизатори і т. ін.

Крім того, якщо це вимагається конкретними способами терапії, фармацевтична композиція згідно з даним винаходом може містити інші фармакологічне активні інгредієнти, супутні застосування яких є терапевтично корисним.

Кількість сполуки формули (I) або її фармацевтичне прийнятною кислотою солі у фармацевтичній композиції згідно з даним винаходом може бути різною в широких межах, залежно від відомих чинників, таких як, наприклад тип хвороби, яку піддають лікуванню, тяжкість хвороби, маса тіла пацієнта, дозована форма, вибраний шлях введення, кількість введення на день та ефективність вибраної сполуки формули (I). Однак оптимальна кількість легко і звично може бути визначена спеціалістом у даній галузі.

Як правило, кількість сполуки формули (I) або її солі з фармацевтичне прийнятною кислотою у фармацевтичній композиції згідно з даним винаходом має бути такою, щоб забезпечувати рівень введення від 0,001 до 100 мг/кг/день. У ще кращому варіанті - від 0,1 до 10 мг/кг/день.

Дозовані форми фармацевтичної композиції згідно з даним винаходом одержують згідно зі способами, відомими хімікам-фармацевтам, і ці способи включають змішування, гранулювання, пресування, розчинення, стерилізацію і т. ін.

Представлені нижче приклади пояснюють винахід, жодним чином його не обмежуючи.

У представлених нижче прикладах замісники на ароматичному кільці (Re та Rd) вказано жирними цифрами.

Приклад 1

(N((1-(2-(4-нітрофеніл)етил)-4-піперидил)метил-1H-індазол-3-карбоксамід гідрохлорид (AF3R298)

(I, $R_a = R_b = R_d = H$; $R_c = 4-NO_2$; $X = C(O)NHCH_2$)

a) N-гексагідро-4-піридиндіметил-N-фенілметиліден-амін

Бензальдегід (4,6г; 0,044моль) по краплях додавали до розчину 4-амінометилпіперидину (5,0г; 0,044моль) у толуолі (20 мл). Одержаний таким чином розчин перемішували протягом 3 год. при кімнатній температурі. Потім розчинник видаляли шляхом випарювання під зниженим тиском і залишок двічі захоплювали толуолом для одержання потрібного продукту, який використовували як такий без подальшого очищення.

b) 1-(2-(4-нітрофеніл)етил)-4-піперидилметан-амін

Продукт з Прикладу 1a) (8,8г; 0,044моль) розчиняли в абсолютному етанолі (50 мл) і додавали до суспензії, яка містила 2-(4-нітрофеніл)етилбромід (10,0г; 0,044моль) та безводний карбонат калію (12,1г; 0,088моль) в абсолютному етанолі (100мл). Одержану таким чином суспензію кип'ятили з дефлегмацією протягом 16 годин. Реакційну суміш після цього залишали для охолодження до кімнатної температури і фільтрували. Фільтрат випарювали під зниженим тиском. Одержаний таким чином залишок після цього суспендували у 3N HCl (50мл) і перемішували протягом 3 год. при кімнатній температурі. Розчин після цього переносили до ділільної лійки і кислотну водну фазу промивали етилацетатом (4x50мл), водну фазу після цього робили лужною шляхом додавання 6N NaOH і екстрагували дихлорометаном. Органічну фазу висушували над Na_2SO_4 і, розчинник видаляли шляхом випарювання під зниженим тиском для одержання потрібного продукту (9г).

1H -ЯМР (δ, CDCl₃ + D₂O): 1,43-1,50 (m, 3H); 1,76 (d, J=12 Гц, 2H); 2,03 (t, J=12 Гц, 2H); 2,67-2,52 (m, 4H); 2,82-3,06 (m, 4H); 7,39 (d, J=9 Гц, 2H); 8,12 (d, J=9 Гц, 2H); 7,95 (квінтет, J=1 Гц, 1H).

v) N((1-(2-(4-нітрофеніл)етил)-4-піперидил)метил)-1H-індазол-3-карбоксамід гідрохлорид

Розчин продукту з Прикладу 1b) (8,4г; 0,032моль) у толуолі (85мл) додавали, застосовуючи крапельну лійку, до суспензії, яка містила 7H,14H-індазол(2',3':4,5)піразин(1,2-b)індазол-7,14,діон (4,6г; 0,016моль), одержаної, як описано у [J.O.C., 1958, Vol. 23, стор. 621], у толуолі (60 мл). Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 38 годин, а потім фільтрували. Тверду речовину відокремлювали і додавали до перемішаного насиченого розчину $NaHCO_3$ (200мл) протягом 2 год. Реакційну суміш фільтрували і, таким чином, одержаний твердий продукт перетворювали на відповідний гідрохлорид шляхом розчинення в абсолютному етанолі, додавання хлористого водню в етанолі та рекристалізації з етанолу для одержання потрібного продукту (4,2г).

т. пл.: 251-252.5°C

Елементний аналіз для $C_{22}H_{25}N_5O_3 \cdot HCl$

	C	H	N
Виявлено %	59,60	5,96	15,77
Розраховано %	59,52	5,90	15,78

1H -ЯМР (δ , DMSO): 1,52-2,11 (m, 5H); 2,85-302 (m, 2H); 3,17-3,64 (m, 8H); 7,19-7,28 (m, 1H); 7,36-7,46 (m, 1H); 7,53-7,56 (m, 3H); 8,13-8,26 (m, 3H); 8,55 (t, J=6 Гц, 1H); 10,82 (s широк., 1H); 13,70 (s, 1H).

Приклад 2

$N((1-(2-(4-амінофеніл)етил)-4-піперидил)метил)-1H$ -індазол-3-карбоксамід дигідрохлорид (AF3R02)

(I, $R_a = R_b = R_c = H$, $R_e = 4-NH_2$, $X = C(O)NHCH_2$)

Розчин продукту з Прикладу 1в) у формі основи (3г; 0,007моль) у 95° етанолі (200мл) гідрогенізували на 10% Pd-C (0,3г) при 40 psi протягом 3 годин. Суміш після цього фільтрували і фільтрат концентрували під зниженим тиском. Одержаний таким чином продукт кристалізували з етилацетату і перетворювали на відповідний гідрохлорид шляхом розчинення у суміші етилацетату: етанолу = 9:1 та додавання хлористого водню в етанолі для одержання потрібного продукту (1,2г).

т. пл.: 271-273°C (декомп.)

Елементний аналіз для $C_{22}H_{27}N_5O \cdot 2HCl \cdot \frac{1}{2}H_2O$

	C	H	N
Виявлено %	57,31	6,68	15,05
Розраховано %	57,52	6,58	15,24

1H -ЯМР (δ , DMSO + D_2O): 1,45-1,66 (m, 2H); 1,80-2,00 (m, 3H); 2,86-3,14 (m, 4H); 3,19-3,35 (m, 4H); 3,46-3,80 (m, 2H + HDO); 7,22-7,35 (m, 3H); 7,35-7,49 (m, 3H); 7,64 (d, J=9 Гц, 1H); 8,17 (d, J=9 Гц, 1H).

Приклад 3

$N((1-(2-(4-нітрофеніл)етил)-4-піперидил)метил)-1-(1-метилетил)-1H$ -індазол-3-карбоксамід оксалат (AF3R306)

(I, $R_a = R_d = H$, $R_b = i-C_3H_7$, $R_e = 4-NO_2$, $X = C(O)NHCH_2$)

Хлорид 1-(1-метилетил)-1H-індазол-3-карбонової кислоти (2,45г; 0,011моль), одержаний, як описано [у EP-B1-0 975 623], порціями додавали до розчину продукту 1б) (3,0г; 0,011моль) та триетиламіну (4,6мл; 0,033моль) у толуолі (50мл). Суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 18 год. Розчинник видаляли шляхом випарювання під зниженим тиском. Залишок захоплювали у IN NaOH та дихлорометан. Суміш переносили до ділільної лійки. Органічну фазу відокремлювали і висушували над Na_2SO_4 . Розчинник видаляли шляхом випарювання під зниженим тиском і одержаний таким чином залишок очищали шляхом флеш-хроматографії, елюючи з етилацетатом для одержання потрібного продукту (5,5г), який після цього перетворювали на відповідний оксалат шляхом розчинення в етилацетаті, додавання

стехіометричної кількості щавлевої кислоти та рекристалізації з етилацетату: етанолу = 9:1, двічі, для одержання потрібної солі (3,5г).

т. пл.: 98°C (декомп.)

Елементний аналіз для $C_{25}H_{31}N_5O_3 \cdot C_2H_2O_4 \cdot \frac{1}{2}H_2O$

	C	H	N
Виявлено %	59,27	6,15	12,72
Розраховано %	59,11	6,25	12,77

1H -ЯМР (δ , DMSO + D_2O): 1,55 (d, J=7 Гц, 6H); 1,44-1,66 (m, 2H); 1,83-2,02 (m, 3H); 2,98 (t, J=12 Гц, 2H); 3,10-3,40 (m, 6H); 3,55 (d, J=12 Гц, 2H); 5,07 (гептет, J=7 Гц, 1H); 7,28 (t, J=8 Гц, 1H); 7,46 (t, J=7 Гц, 1H); 7,59 (d, J=9 Гц, 2H); 7,79 (d, J=8 Гц, 1H); 8,11-8,26 (m, 3H); 8,42 (t, J=6 Гц, 1H).

Приклад 4

$N((1-(2-(4-амінофеніл)етил)-4-піперидил)метил)-1-(1-метилетил)-1H$ -індазол-3-карбоксамід дигідрохлорид (AF3R294)

(I, $R_a = R_d = H$, $R_b = i-C_3H_7$, $R_e = 4-NH_2$, $X = C(O)NHCH_2$)

Розчин продукту з Прикладу 3, у формі основи (2,7г; 0,006моль) у 95° етанолі (30мл) гідрогенізували на 10% Pd-C (0,27г) при 40 psi протягом 5 годин. Суміш після цього фільтрували і фільтрат концентрували під зниженим тиском. Одержаний таким чином продукт перетворювали на відповідний гідрохлорид шляхом розчинення в етилацетаті, додавання хлористого водню в етанолі та рекристалізації з суміші етилацетату: етанолу = 8:2, для одержання потрібного продукту (1,4г).

т. пл.: 278°C (декомп.)

Елементний аналіз для $C_{25}H_{33}N_5O \cdot 2HCl \cdot H_2O$

	C	H	N
Виявлено %	59,05	7,42	13,63
Розраховано %	58,82	7,31	13,72

1H -ЯМР (δ , DMSO): 1,55 (d, J=7 Гц, 6H); 1,45-2,13 (m, 5H); 2,80-3,64 (m, 10H); 5,08 (гептет, J=7 Гц, 1H); 7,20-7,49 (m, 6H); 7,79 (d, J=9 Гц, 1H); 8,18 (d, J=9 Гц, 1H); 8,39 (t, J=6 Гц, 1H); 9,15-11,18 (m, 4H)

Приклад 5

$N(1-(2-фенілетил)-1H$ -індазол-3-іл)-1-(2-фенілетил)піперидин-4-карбоксамід гідрохлорид (AF3R334)

(I, $R_a = R_e = R_c = H$, $R_b = CH_3$, $X = NHC(O)$)

а) гідрохлорид 1-(2-фенілетил)-4-піперидин-карбонової кислоти

Суспензію 1-(2-фенілетил)-4-карбетоксипіперидин (12,2г, 0,047моль), одержану, як описано у [J. Med. Chem. 1996 (39), 749-756], у IN NaOH (100мл) нагрівали з дефлегмацією протягом 4год. Після охолодження до кімнатної температури розчин робили кислотним за допомогою 6N HCl, доводячи до pH 2, концентрували шляхом випарювання під зниженим тиском і одержану таким чином тверду речовину фільтрували і висушували в сушильній камері у вакуумі для одержання потрібного продукту (12,1г).

¹H-ЯМР (δ, DMSO + D₂O): 1,79-2,19 (m, 4H); 2,43-3,74 (m, 9H); 7,18-7,41 (m, 5H);

б) 1-(2-фенілетил)-4-піперидинкарбонілхлорид гідрохлорид

Суспензію продукту з Прикладу 5а) (2,0г; 0,007моль) та тіонілхлориду (0,81мл; 0,011моль) у толуолі (20мл) нагрівали з дефлегмацією протягом 3год. Розчинник після цього видаляли шляхом випарювання під зниженим тиском і залишок захоплювали у толуол (2х20мл) для одержання потрібного продукту (2,2г), який використовували як такий без подальшого очищення.

в) N-(1-метил-1H-індазол-3-іл)-1-(2-фенілетил)піперидин-4-карбоксамід гідрохлорид

Продукт з Прикладу 5б) (1,68г; 0,006моль) додавали до розчину 1-метил-1H-3-індазоламіну (0,86г; 0,006моль), одержаного, як описано у [журналі Journal of Heterocyclic Chemistry 1979 (16), 783-784], та триетиламіну (2,4мл; 0,018моль) у толуолі (20мл). Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 18год., а потім розчинник видаляли шляхом випарювання під зниженим тиском. Одержаний таким чином залишок захоплювали у 1N NaOH та дихлорометан і переносили до ділильної лійки.

Органічну фазу відокремлювали, висушували над Na₂SO₄ і розчинник видаляли шляхом випарювання під зниженим тиском. Одержаний таким чином продукт перетворювали на відповідний гідрохлорид шляхом розчинення в етанолі, додавання хлористого водню в етанолі та рекристалізації з етанолу для одержання потрібної солі (1,6г).

т. пл.: 235-237°С

Елементний аналіз для C₂₂H₂₆N₄O. HCl 1/4 H₂O

	C	H	N
Виявлено %	65,71	6,80	13,73
Розраховано %	65,50	6,87	13,89

¹H-ЯМР (δ, DMSO + D₂O): 1,91-2,27 (m, 4H); 2,70-3,42 (m, 7H); 3,63-3,75 (m, 2H); 3,96 (s, 3H); 7,10 (t, J=8 Гц, 1H); 7,22-7,46 (m, 6H); 7,56 (d, J=8 Гц, 1H); 7,74 (d, J=8 Гц, 1H); 10,51 (s, 1H)

Приклад 6

N-(1-метил-1H-індазол-3-іл)-1-(2-(4-метоксибеніл)етил)піперидин-4-карбоксамід гідрохлорид (AF3R328)

(I, R_a = R_a = H, R_b = CH₃, R_e = 4-OCH₃, X = NHC(O))

а) гідрохлорид 1-(2-(4-метоксибеніл)етил)-4-піперидин-карбонової кислоти.

Названий продукт одержували (15,8г) шляхом обробки способом, подібним до описаного у Прикладі 5а), але беручи за вихідну сполуку 1-(2-(4-метоксибеніл)етил)-4-карбетоксипіперидин (16,5г; 0,057моль), одержаний, як описано [у US 6 017 931], замість 1-(2-фенілетил)-4-карбетоксипіперидину.

¹H ЯМР (δ, DMSO): 1,80-2,17 (m, 4H); 2,41-3,74 (m, 7H); 3,73- (s, 3H); 6,89 (d, J=9 Гц, 2H); 7,19 (d, J=9 Гц, 2H) 11,00 (s широк., 1H); 12,53 (s широк., 1H)

б) 1-(2-(4-метоксибеніл)етил)-4-піперидинкарбонілхлорид гідрохлорид.

Названий продукт одержували (14,2г), беручи за вихідну сполуку продукт з Прикладу 6а) (13,8г; 0,048моль), і шляхом обробки способом, подібним до описаного у Прикладі 5б). Одержаний таким чином продукт використовували як такий без подальшого очищення.

в) N-(1-метил-1H-індазол-3-іл)-1-(4-метоксибеніл)етил)піперидин-4-карбоксамід гідрохлорид

Названий продукт одержували (9,2г), беручи за вихідну сполуку продукт з Прикладу 6б) (14,2г; 0,045моль) та 1-метил-1H-3-індазоламін (6,6г; 0,045моль) і шляхом обробки способом, подібним до описаного у Прикладі 5в). Суміш етилацетату: етанолу (9:1) використовували як розчинник для кристалізації.

т. пл.: 137-139°С(декомп.)

Елементний аналіз для C₂₃H₂₈N₄O₂. HCl H₂O

	C	H	N
Виявлено %	61,80	7,14	12,45
Розраховано %	61,80	6,99	12,53

¹H-ЯМР (δ, DMSO): 1,95-2,25 (m, 4H); 2,69-3,48 (m, 7H); 3,57-3,70 (m, 2H); 3,74 (s, 3H); 3,96 (s, 3H); 6,92 (d, J=9 Hz, 2H); 7,08 (t, J=9 Гц, 1H); 7,20 (d, J=9 Гц, 2H); 7,38 (t, J=8 Гц, 1H); 7,56 (d, J=9 Гц, 1H); 7,76 (d, J=8 Гц, 1H); 10,36-11,07 (m, 2H)

Приклад 7

N-(1-метил-1H-індазол-3-іл)-1-2-4-гідроксибеніл)етил)піперидин-4-карбоксамід гідрохлорид (AF3R330)

(I, R_a - R_d = H, R_b = CH₃, R_e = 4-OH, X = NHC(O))

Розчин продукту з Прикладу 6в) (6,7г; 0,017моль) у дихлорометані (300мл) по краплях додавали до розчину BBr₃ (8,5г; 0,034моль) у дихлорометані (50мл). Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 6 год. Потім обережно додавали воду і суміш робили лужною за допомогою 1N NaOH, доводячи до pH = 9, і переносили до ділильної лійки. Органічну фазу відокремлювали, висушували над Na₂SO₄ і розчинник видаляли шляхом випарювання під зниженим тиском. Одержаний таким чином залишок (4,4г) очищали шляхом флеш-хроматографії, застосовуючи суміш CHCl₃:MeOH = 9:1 як елюент. Таким чином, одержували 3 г продукту і перетворювали на відповідний гідрохлорид шляхом розчинення в етанолі, додавання хлористого водню в етанолі, випарювання розчинника та кристалізації з суміші етилацетату:етанолу (9:1) для одержання потрібного продукту (2,8г).

т. пл.: 249-252°С

Елементний аналіз для C₂₂H₂₆N₄O₂. HCl 2/3 H₂O

	C	H	N
Виявлено %	62,14	6,64	13,45
Розраховано %	61,91	6,69	13,13

¹H-ЯМР (δ, DMSO): 1,96-2,25 (m, 4H); 2,67-3,47 (m, 7H); 3,63 (d, J=12 Гц, 2H); 3,95 (s, 3H); 6,69-6,80 (m, 2H); 7,00-7,13 (m, 3H); 7,38 (t, J=9 Гц, 1H); 7,56

(d, J=9 Гц, 1H); 7,76 (d, J=9 Гц, 1H); 9,37 (s широк., 1H); 10,35-10,90 (m, 2H)

Приклад 8

N((1-(2-(4-гідроксифеніл)етил-4-піперидил)метил-5-метил-1-(1-метилетил)-1H-індазол-3-карбоксамід гідрохлорид (AF3R296)

(I, R_a = CH₃, R_b = i-C₃H₇, R_c = 4-OH, R_d = H, X = C(O)NHCH₂)

а) 1-(2-(4-гідроксифеніл)етил)-4-піперидилметан-амін

Названий продукт одержували (9,3г) шляхом обробки способом, подібним до описаного у Прикладі 16), але беручи за вихідну сполуку продукт з Прикладу 1а) (7,5г, 0,037моль) та 2-(4-гідроксифеніл)етилбромід (7,5г; 0,037моль), одержаний, як описано в [Acta Chemica Scandinavica (1947-1973) 1967, 21 (1), 52-62], замість 2-(4-нітрофеніл)етил бромиду.

¹H-ЯМР (δ, CDCl₃ + D₂O): 1,15-1,41 (m, 3H); 1,74 (d, J=9 Гц, 2H); 1,90-2,07 (m, 2H); 2,45-2,61 (m, 4H); 2,65-2,75 (m, 2H); 3,01 (d, J=12 Гц, 2H); 6,75 (d, J=9 Гц, 2H); 7,00 (d, J=9 Гц, 2H).

б) ізопропіловий естер 1-(1-метилетил)-5-метил-1H-індазол-3-карбоної кислоти 60% суспензію йодиду натрію в мінеральній олії (17,1г; 0,43моль) додавали до суспензії 5-метил-1H-індазол-3-карбоної кислоти (30г; 0,17моль), приготовленої, як описано у [J. Heterocyclic Chem. 1964, Vol. 1 (5) 239-241], у диметилформаміді (450мл), і реакційну суміш нагрівали до 70°C. Через 30 хвилин додавали ізопропілбромід (48мл, 0,51моль).

Реакційну суміш перемішували протягом 6 годин при 70°C. Після охолодження додавали воду. Реакційну суміш переносили до ділільної лійки й екстрагували діетиловим етером. Органічну фазу промивали водним сатуратом з бікарбонатом натрію і, нарешті, розчинник видаляли шляхом випарювання під зниженим тиском.

Таким способом одержували 20г олії, яку очищали шляхом флеш-хроматографії, елюючи з сумішшю гексану: етилацетату = 7:3 для одержання 12г потрібного продукту.

¹H-ЯМР (δ, CDCl₃): 1,47 (d, J=6 Гц, 6H); 1,64 (d, J=7 Гц, 6H); 2,50 (d, J=1 Гц, 3H); 4,92 (гептет, J=7 Гц, 1H); 5,39 (гептет, J=6 Гц, 1H); 7,23 (dd, J=9;1 Гц, 1H); 7,40 (d, J=9 Гц, 1H); 7,95 (квінтет, J=1 Гц, 1H).

в) 1-(1-метилетил)-5-метил-1H-індазол-3-карбонова кислота

Суспензію продукту, одержаного згідно з Прикладом 8б) (8г; 0,03моль), у 1M NaOH (42мл) нагрівали з дефлегмацією протягом 3 годин. Потім її виливали у воду, підкислювали 2M HCl і екстрагували дихлорометаном. Після випарювання розчинника під зниженим тиском одержували 7г потрібного продукту.

¹H-ЯМР (δ, CDCl₃): 1,61 (d J=7 Гц, OH); 2,44 (s, 3H); 4,88 (гептет, J=7 Гц, 1H); 7,19 (d, J=9 Гц, 1H); 7,34 (d, J=9 Гц, 1H); 7,97 (s, 1H); 9,32 (s широк., 1H).

г) хлорид 1-(1-метилетил)-5-метил-1H-індазол-3-карбоної кислоти

Тіонілхлорид (6,78г; 0,057моль) додавали до суспензії продукту, приготовленого згідно з Прикладом 8в) (4,01г; 0,019моль) у толуолі (70мл), і реакційну суміш нагрівали з дефлегмацією протягом 2 годин. Розчинник видаляли шляхом випарювання під зниженим тиском і двічі захоплювали толуолом (50 мл x 2) для одержання потрібного продукту (4,3г), який використовували як такий без подальшого очищення.

д) N((1-(2-(4-гідроксифеніл)етил)-4-піперидил)метил)-5-метил-1-(1-метилетил)-1H-індазол-3-карбоксамід гідрохлорид

Обробка способом, подібним до описаного у Прикладі 3, але з використанням продукту з Прикладу 8а) (4,0г, 0,017моль) та хлориду 1-(1-метилетил)-5-метил-1H-індазол-3-карбоної кислоти (4,0г, 0,017моль), приготовленого, як описано у попередньому Прикладі 8г), одержували 4,5г потрібного продукту і його перетворювали на відповідний гідрохлорид шляхом розчинення в абсолютному етанолі, додавання хлористого водню в етанолі та рекристалізації з етанолу для одержання потрібної солі (3,2г).

т. пл.: 257,5-259,5°C

Елементний аналіз для C₂₆H₃₄N₄O₂ HCl

	C	H	N
Виявлено %	66,20	7,75	11,87
Розраховано %	66,30	7,49	11,89

¹H-ЯМР (δ, DMSO): 1,53 (d, J=7 Гц, 6H); 1,44-1,76 (m, 3H); 1,87 (d, J=12 Гц, 2H); 2,42 (s, 3H); 2,79-3,45 (m, 8H); 3,54 (d, J=12 Гц, 2H); 5,03 (гептет, J=7 Гц, 1H); 6,73 (d, J=9 Гц, 2H); 7,05 (d, J=9 Гц, 2H); 7,26 (d, J=9,2 Гц, 1H); 7,67 (d, J=9 Гц, 1H); 7,96 (s, 1H); 8,30 (t, J=6 Гц, 1H); 9,35 (s, 1H); 10,35 (s широк., 1H).

Випробування

1. Механічна гіпералгезія, викликана шляхом CFA у щура

Самців CD-щурів масою 150-200г використовували після надходження. Застосовуючи анальгезіометр, відбирали щурів, які мали поріг реакції на механічний ноцицептивний подразник від 150 до 180г. Через застосування поступового підвищення тиску на дорсальну зону лівої задньої лапи щура інструмент дозволяє записувати ноцицептивну реакцію, виражену у грамах, згідно з рухом, коли тварина відсмикує лапу [Randall LO and Semite JJ. A method for the measurement of analgesic activity on inflamed tissue. Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 1957; 111: 409-419].

Гіпералгезію викликали шляхом однобічної ін'єкції 150мкл повного ад'юванта Фройнда (Complete Freund's Adjuvant - CFA) у підшовну поверхню лівої задньої лапи тварини [Andrew D, Greenspan JD. Mechanical and heat sensitization of cutaneous nociceptors after peripheral inflammation in the rat. J Neurophysiol 1999; 82(5): 2649-2656; Hargreaves K, Dubner R, Brown R, Flores C, Joris J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. Pain 1988; 32: 77-88].

Досліджувані сполуки випробували (доза 10^{-5} моль/кг) шляхом здійснення тесту через 23 години після ін'єкції CFA.

Через 1 год. після введення больовий поріг, виміряний у контрольних тварин, порівнювали з виміряним у тварин, яким вводили досліджуваний продукт. Контрольним тваринам вводили такий самий індиферентний наповнювач (воду), як і той, який застосовували для досліджуваних продуктів. Результати показано у Таблиці 1.

Таблиця 1

Вплив на CFA

Лікування	Кількість щурів	Больовий поріг (г) через 1 год. після введення
Носій	12	121±4,1
AF3R294	12	194±22,4
AF3R296	12	151±10,7
AF3R298	12	174±9,8
AF3R302	12	160±10,2
AF3R306	12	186±11,0
AF3R328	12	150±8,7
AF3R330	12	161±10,5
AF3R334	12	170±11,0

Больовий поріг нормальних тварин однакової маси/віку = 155±2,1г.

2. Механічна гіпералгезія у щурів з діабетом, викликаним стрептозотоцином Самців CD-щурів масою 240-300г використовували після надходження. Діабетичний синдром викликали однією внутрішньочеревинною (i.p.) ін'єкцією 80 мг/кг стрептозоточину, розчиненого у стерильному фізіологічному розчині [Courteix C, Eschaliere A, Lavarenne J. Streptozotocin-induced diabetic rats: behavioural evidence for a model of chronic pain. Pain, 1993; 53: 81-88; Bannion AW, Decker MW, Kim DJ, Campbell JE, Americ SP. ABT-594, a novel cholinergic channel modulator, is efficacious in nerve ligation and diabetic neuropathy models of neuropathic pain. Brain Res. 1998; 801: 158-63].

Через принаймні три тижні після ін'єкції стрептозоточину відбирали щурів, які мали рівень глікемії >300мг/дл і мали поріг реакції на механічний ноцицептивний подразник ≤120г. Рівні глікемії вимірювали за допомогою рефлектометра з застосуванням реактивних смужок, просочених глюкозо-оксидазою. Больовий поріг вимірювали, застосовуючи анальгезіометр. Через застосування поступового підвищення тиску на дорсальну зону лівої задньої лапи щура інструмент дозволяє записувати ноцифенсивну реакцію, виражену у грамах, згідно з рухом, коли тварина відсмикує лапу.

Через 2 год. після введення больовий поріг, виміряний у контрольних тварин, порівнювали з виміряним у тварин, яким вводили досліджуваний продукт (доза 10^{-5} моль/кг).

Контрольним тваринам вводили такий самий індиферентний наповнювач (воду), як і той, який

застосовували для досліджуваних продуктів. Результати показано у Таблиці 2.

Таблиця 2

Вплив на діабетичну невротію

Лікування	Кількість щурів	Больовий поріг (г) через 2 год. після введення
Носій	8	112±4,0
AF3R294	8	198±18,6
AF3R296	8	154±8,7
AF3R298	8	170±10,2
AF3R302	8	164±10,2
AF3R306	8	184±13,8
AF3R328	8	158±6,2
AF3R330	8	171±9,6
AF3R334	8	184±10,5

Больовий поріг нормальних тварин однакової маси/віку = 240±8,7г.