

Винахід стосується нових сполук, способу їх виготовлення, їх використання, а також фармацевтичних композицій, які містять нові сполуки. Нові сполуки придатні для використання у терапії, і зокрема для вгамування болю.

δ -рецептор було визначено як такий, що відіграє роль у здійсненні багатьох фізичних функцій, наприклад, відповідає за системи циркуляції та болю. Тому, ліганди для δ -рецептору можуть виявитися потенційно корисними як аналгетики, та/або як гіпотензивні засоби. Ліганди для δ -рецептору також було виявлено як такі, що мають імуномодуляторну активність.

Зараз добре визначено щонайменше три різні популяції опіоїдних рецепторів (μ , δ і κ), і всі вони наявні у центральній і периферійній нервових системах багатьох видів, включно з людиною. Аналгезію спостерігали у багатьох моделях тварин, коли було активовано один або більше таких рецепторів.

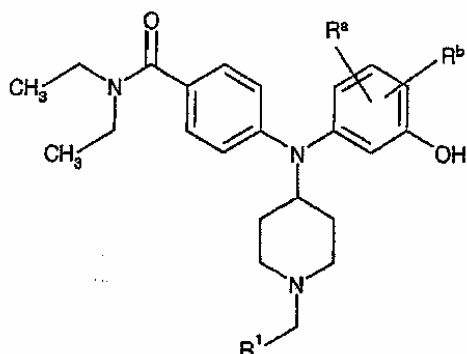
За деяким винятком, наявні зараз селективні опіоїдні ліганди є пептидними за своєю природою і не придатні для уведення системними шляхами. Одним прикладом непептидного δ -агоністу є SNC80 (Bilsky E.J. et al., Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 273(1), pp. 359-366 (1995 J)). Однак, все ще існує потреба у селективних δ -агоністах, які мають не лише удосконалену селективність, але й удосконалений профіль побічної дії.

Отже, проблема даного винаходу полягала у тому, щоб винайти нові аналгетики, що мають удосконалену аналгезивну дію, з удосконаленим профілем побічної дії, на відміну від наявних зараз μ -агоністів, і удосконалених системну ефективність.

Аналгетики, які було визначено, і, які присутні у рівні техніки, мають багато недоліків у тому, що мають погану фармакокінетику і не є аналгезивними, якщо вводити їх системними шляхами. Також, було задокументовано, що бажані сполуки δ -агоністу, описані у рівні техніки, виявляють значну конвульсивну дію.

Ми зараз виявили, що певні сполуки, які недостатньо описані, але включені до WO 98/28270, виявляють надзвичайно удосконалені властивості δ -агоністу та потенційність *in vivo*, якщо вводити їх системно. На відміну від сполук, описаних в WO98/28270, сполуки даного винаходу виявляють значні та несподівано збільшені рівні агонізму γ -рецептору та метаболічної стабільності.

Нові сполуки згідно з винаходом визначено за формулою I



де R^1 вибрано з групи, яка складається з

- (i) фенілу;
- (ii) піридинілу



- (iii) тіофенілу



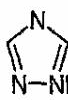
- (iv) фуранілу



- (v) імідазолілу



- (vi) триазолілу



де кожне фенільне кільце R^1 і гетероароматичне кільце R^1 може бути, як варіант і незалежно крім того заміщеним 1, 2 або 3 замісниками, вибраними з лінійних та розгалужених C_1 - C_6 алкілу, NO_2 , CF_3 , C_1 - C_6 алкоксилу, хлору, фтору, бромов та йоду.

Замісники на фенільному кільці та гетероароматичному кільці можуть знаходитися у будь-якій позиції на зазначених кільцевих системах;

R^a та R^b кожне і незалежно вибране з групи, яка складається з гідрогену, лінійного та розгалуженого C_1 - C_6 алкілу, NO_2 , CF_3 , C_4 - C_6 алкоксилу, хлору, фтору, бромов та йоду. R^a та R^b замісники можуть бути розміщені у будь-якій одній орто-, мета- і пара-позиції фенільного кільця. Переважно, R^a та R^b обидва є гідрогеном.

В рамках винаходу також передбачено фармацевтично прийнятні солі сполук формули I.

Коли фенільне і гетероароматичне кільце(я) заміщено, бажані замісники вибрано з групи, яка складається з CF_3 , метилу, йоду, бромов, фтору та хлору.

Нові сполуки згідно з винаходом придатні для використання у терапії, зокрема для вгамування різних станів болю, наприклад, хронічного, невропатологічного, різкого, болю, викликаного раком, болю, викликаного ревматичним артритом, мігренью, вісцерального болю, та інших видів болю. Однак, цей список не можна вважати обмеженим.

Сполуки згідно з винаходом придатні для використання як імуномодулятори, зокрема для лікування автоімунних захворювань, наприклад, артриту, трансплантатів шкіри, трансплантатів органів та подібних хірургічних потреб, для лікування колагенових захворювань, алергій різного виду, для використання як антиракових та антивірусних засобів.

Сполуки згідно з винаходом придатні для використання у станах захворювання, де присутня або включена у таку парадигму дегенерація або дисфункція опіоїдних рецепторів. Це може включати використання мічених ізотопами сполук згідно з винаходом при застосуванні в діагностиці та візуалізації, наприклад, при застосуванні позитронної емісійної томографії (ПЕТ)

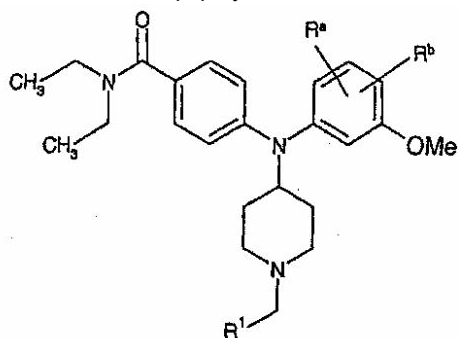
Сполуки згідно з винаходом придатні для використання у лікуванні діареї, депресії, збудження, невтримання сечі, різних психічних захворювань, кашлю, набряку легенів різних шлунково-кишкових розладів, пошкодження спинного мозку та залежності від ліків, а також для лікування зловживання алкоголем, нікотиним, опіоїдними та іншими ліками, і для лікування розладів симпатичної нервової системи, наприклад, гіпертонії.

Сполуки згідно з винаходом придатні для використання як анальгезивний засіб для використання під час загальної та місцевої анестезії. Комбінації засобів з різними властивостями часто використовують для досягнення рівноваги ефектів, необхідних для підтримання стану анестезії (наприклад, амнезії, анальгезії, релаксації м'язів та седативного ефекту). Також до цієї комбінації входять анестезуючі засоби для вдихання, гіпнотичні засоби, анкіолітики, нервово-м'язові блокатори та опіоїдні засоби.

Також, в рамки винаходу входить використання будь-якої зі сполук згідно з вищевказаною формулою I, у виготовленні медикаменту для лікування будь-якого з вищеописаних станів.

Ще одним аспектом винаходу є спосіб лікування пацієнта, який страждає від будь-якого з вищеописаних станів, причому пацієнту, який потребує такого лікування, вводять ефективну кількість сполуки згідно з вищевказаною формулою I.

Також в рамках винаходу передбачено проміжні сполуки формули II, придатні для синтезу сполук вищевказаною формули I



II

де R^1 вибрано з групи, яка складається з

- (i) фенілу;
- (ii) піридинілу



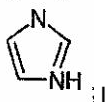
- (iii) тіофенілу



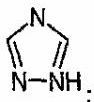
- (iv) фуранілу



(v) імідазолілу



(vi) триазолілу

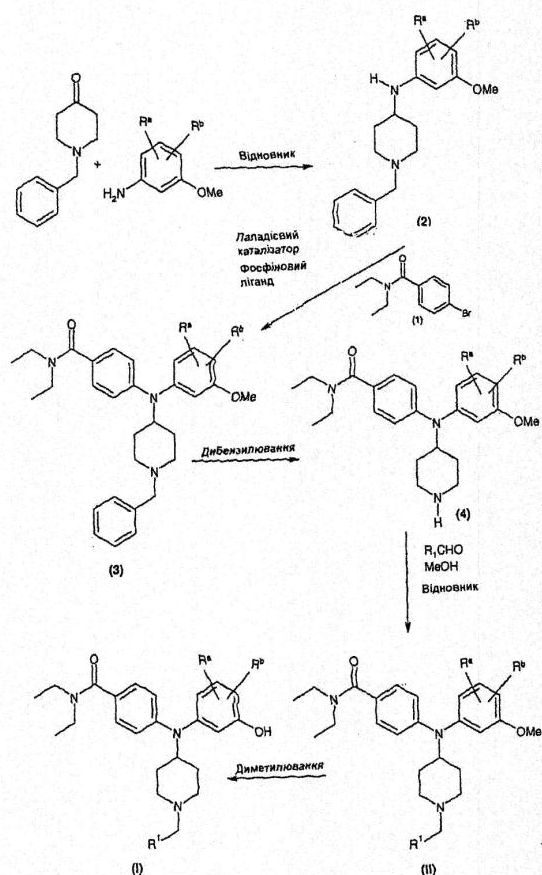


де кожне фенільне кільце R^1 і гетероароматичне кільце R^1 може бути як варіант і незалежно крім того заміщеним 1, 2 або 3 замісниками, вибраними з лінійних та розгалужених C_1 - C_6 алкілу, NO_2 , CF_3 , C_1 - C_6 алкоксилу, хлору, фтору, бром та йоду. Замісники на фенільному кільці та гетероароматичному кільці можуть знаходитися у будь-якій позиції на зазначених кільцевих системах; R^a та R_b кожне і незалежно вибране з групи, яка складається з гідрогену, лінійного та розгалуженого C_1 - C_6 алкілу, NO_2 , CF_3 , C_1 - C_6 алкоксилу, хлору, фтору, бром та йоду;

Способи виготовлення

I. Сполуки згідно з винаходом можна виготовити за допомогою способу, описаного на схемі I, представленій нижче. Ці відомі способи описано в C.G. Froct and P. Mendonca; Perkin 1 (1998), 2615; and in J.F.W. McOmie, M.L. WattC, D.E. WeCt, Tetrahedron, 1969, 24, 2289; які уведено сюди посиланням.

Схема 1

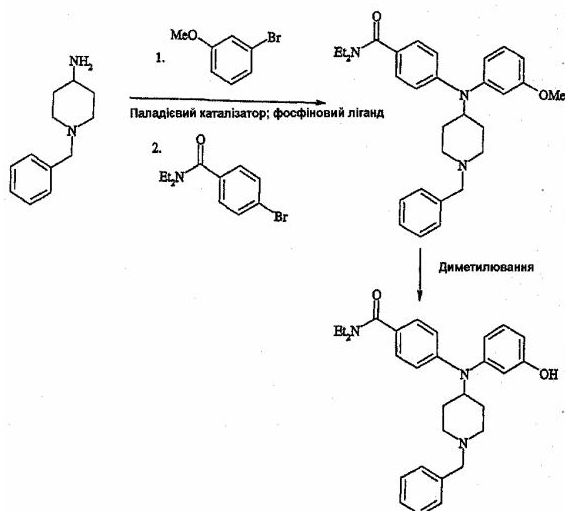


У вищенаведеній схемі I R^1 , R^a та R^b визначено для сполук вищезгаданої формули I.

II. З іншого боку, синтез можна проводити як показано на Схемі 2, наведеній нижче, через подвійне арилування в одній посудині (описано у C.G. Froct and P. Mendonca; Perkin 1 (1998), 2615) комерційно наявного 4-аміно-1-бензилпіперидину для виходу інтермедиату.

З Схеми 1 Коли R^1 = феніл, кінцевий продукт можна тоді отримати селективним етерним розщепленням (J.F.W. McOmie, M.L. WattC, D.E. WeCt, Tetrahedron, 1969, 24, 2289), як показано на Схемі 2, наведеній нижче.

Схема 2



Приклади

Тепер винахід буде описано детальніше з посиланнями на приклади, які не повинні виходити за рамки даного винаходу.

I.

(i) Виготовлення 4-бром-N,N-діетилбензаміду (сполука 1).

До охолодженого льодом розчину 4-бромбензилхлориду (19,5г, 86,8ммоль) у 150мл CH_2Cl_2 додають краплями діетиламін (13,5мл, 130ммоль). Реакційну суміш перемішують протягом ночі, тоді концентрують. Суміш уводять у етер і 1 HCl, а водний шар розділяють. Органічний шар екстрагують наступні два рази етером, тоді промивають розсолем і висушують над Na_2SO_4 . Отримане масло уводять у етилацетат і піддають кристалізації. Ще 2 кристалізації маточного розчину дали вихід 18,6г, 83,6%.

(ii) Виготовлення N-(3-метоксифеніл)-1-(фенілметил)-4-піперидинаміну (сполука 2).

До 1-бензилпіперидону (10мл, 0,56ммоль) і 3-метоксифенілу (7,5мл, 67,2ммоль) додають $\text{Ti}(\text{i-OPr})_4$ (33,3, 112,06ммоль). Реакційну суміш перемішують до її завершення, що визначали газовою хроматографією (ГХ). Тоді додають EtOH (200мл), потім NaBH_4 (3,18г, 84ммоль). Реакційну суміш перемішують при кімнатній температурі. Хід реакції спостерігали за допомогою ГХ. По завершенні, до білої суміші додають NH_4OH і продовжують перемішувати наступні 30хв. Тоді отриману суміш розводять CH_2Cl_2 додаючи після цього Целіт. Отриману пасту фільтрують і екстрагують фільтрат декілька разів CH_2Cl_2 . Поєднані органічні фази концентрують, а продукт очищають флеш-хроматографією (1:1, гексани:ацетон) Вихід: 13,6г, 82%. Очищення також можна досягти дистиляцією Кугельрора у високому вакуумі з 2×10^{-3} м бар при темп, приблизно 225°C . З 25,6г бензилпіперидону вийшло 28,4г, 71,6%.

(iii) Виготовлення -діетил-4-[(3-метоксифеніл)[1-фенілметил]-4піперидиніл]аміно-3 бензаміду (сполука 3).

До 250мл круглодонної колби, у сухій камері в атмосфері N_2 , було додано 10г (0,34ммоль, 1екв.) сполуки 2, 13г (50,7ммоль, 1,5екв.) сполуки 1, $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (783мг, 0,85ммоль), BINAP (784мг, 1,26ммоль), та NaO^tBu , (6,53г, 68ммоль, 2екв.). До цієї суміші додавали через канюлю толуол на три чверті від об'єму колби. Тоді суміш нагрівали при темп. 110°C протягом приблизно 6 годин, до зникнення сполуки 2, як визначено вискозоефективною рідинною хроматографією (ВЕРХ). Реакційну суміш залишили охолоджуватися. Тоді додали етер, суспензію профільтрували через Целіт і концентрували. Це масло перенесли у етер і залишили настоюватися протягом 15хв., а тоді знову профільтрували через Целіт. Фільтрат екстрагували 5 разів 2 N HCl. Водну фазу тоді було взято за основу з 4 N NaOH і виділено етером. Поєднані шари етеру висушили над Na_2SO_4 , профільтрували та концентрували. Отримане масло було перенесено у етилацетат/гексан, залишено відстоюватися на тиждень. 8г твердої речовини (50%) було отримано фільтрацією, і промито етилацетатом/гексанами, 8/2. Залишений продукт від концентрованого маточного розчину не було виділено.

(iv) Виготовлення N,N-діетил-4-[(3-метоксифеніл)-4-піперидиніламіно]-бензаміду (сполука 4).

До розчину сполуки 3 (2,5г, 5,3ммоль) у 1,2-дихлоретані при темп. 0°C було додано α -хлоретил хлорформіат (0,93мл, 8,6ммоль). Тоді реакційну суміш нагрівали під зворотним холодильником протягом 3 годин і перемішували протягом ночі при кімнатній температурі. Розчинник було виділено і отримане масло було перенесено у метанол і нагріто під зворотним холодильником протягом 3 годин. Тоді те, що було концентровано, було перенесено у CH_2Cl_2 і екстраговано 5 разів 1 N HCl. Поєднані водні шари було зроблено основними за допомогою 5 N NaOH і екстраговано декілька разів CH_2Cl_2 . Органічні шари було концентровано і отримане масло очищено флеш-хроматографією на силікагелі $\text{CH}_2\text{Cl}_2/2\%$ MeOH, збільшуючи полярність до 20%. Вихід: 1,68г, 83%.

II. Загальний синтез сполук формули II.

До розчину сполуки 4 (1,05ммоль, 1екв.) у 10мл метанолу було додано (1,58ммоль, 1,5екв.) гетероциклічного або ароматичного альдегіду, з наступним додаванням NaBH_3CN (1,05ммоль, 3екв.). Рівень pH реакції тоді було доведено до приблизно 6 льодяною оцтовою кислотою. Реакційну суміш перемішували протягом ночі. Додають 2 N HCl і продовжують перемішувати протягом 1 години. Цю суміш концентрують для виділення метанолу, взятого за основу, з NaOH і виділяють CH_2Cl_2 , з наступним висушуванням над Na_2SO_4 . Очищують флеш-хроматографією на силікагелі, використовуючи $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, з послідовним градієнтом. Збільшення полярності від 0,025% до 4% MeOH дає чистий продукт.

III. Загальний синтез фенольних сполук формули I.

До розчину сполуки 5 (1екв.) у CH_2Cl_2 при темп. -78°C було додано Зекв. BBr_3 (1 М у CH_2Cl_2). Перемішували протягом приблизно 45хв., тоді при кімнатній темп, протягом 2 годин. Було додано MeOH з наступним додаванням насиченого NaHCO_3 . Фази було розділено, а водний шар екстраговано декілька разів CH_2Cl_2 . Поєднані органічні шари було висушено над MgSO_4 і концентровано. Очищено флеш-хроматографією на силікагелі. $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 100/0,25, повільно збільшуючи кількість MeOH. Подальшого очищення можна досягти у багатьох випадках кристалізацією з етилацетату. Очищення також досягли, використовуючи обернено-фазову ВЕРХ з градієнтом 0,1% ТФОК (Трифлуороцтова кислота) у $\text{H}_2\text{O}/0,1\%$ ТФОК у CH_3CN .

Утворення солі HCl: До розчину 1,1г вільного аміну у 10мл сухого CH_2Cl_2 при перемішуванні було додано 40мл сухого етеру з наступним додаванням 20мл 1 N HCl у етері. Наступні 40мл сухого етеру було додано і білу суспензію перемішували протягом 30хв. Під струмом N_2 твердий продукт було зібрано фільтрацією і промито етером. Продукт є гігроскопічним. Перед тим, як висушити твердий продукт, воронку Бюхнера помістили відразу під домашній вакуум у сушильній шафі на уся ніч. 1,14г білого твердого розчину було зібрано. Як варіант, фенол можна розчинити в етилацетаті, з наступним додаванням надлишку 1 N HCl у етері, потім етеру. Надлишковий етер і HCl видалили під вакуумом.

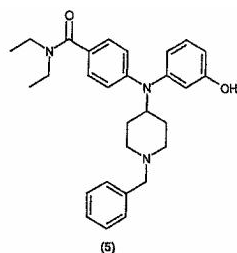
Солі трифлуороцтової кислоти було виділено після обернено-фазової ВЕРХ.

Приклад 1

Виготовлення N,Nдіетил-4-[[[(3-гідроксифеніл)][1-(фенілметил)-4-піперидиніламіно]бензаміду (сполука 5)

Названу сполуку 5 виготовили, дотримуючись синтетичної процедури, описаної на вищезазначеній Схемі

I.



Мас-спектрометрія (МС): $(M+1)$ обчислено: 458,62 (MH⁺); $(M+1)$ виявлено: 458,24 (MH⁺). ІЧ-спектр: Плівка HCl солі: 3047, 2974, 2531, 1600, 1471, 1455, 1283, 1186, 1093, 735, 701 cm^{-1} . ^1H ЯМР: (400 МГц, CDCl_3 Тетраметилсилан (TMS), Вільний амін): 7,39-7,10 (9H, m, Ar), 6,58-6,45 (3H, m, Ar), 6,23-6,22 (1H, m, Ar), 3,83-3,77 (1H, m, CH), 3,52 (3H, s, CH_3O), 3,43 (4H, s широкий, CH_2N), 2,98 (2H, d, CH_2), 2,17-2,11 (2H, t, CH_2), 1,85 (2H, d, CH_2), 1,59-1,51 (2H, m, CH₂), 1,20-1,16 (6H, m, CH₂).

ВЕРХ: >95% (215nm)

>98% (254nm)

>99% (280nm)

Аналіз:

$\text{C}_{29}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_2$, X 2.4 HCl, X 0.2 $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$, X 0.1 CH_2Cl_2

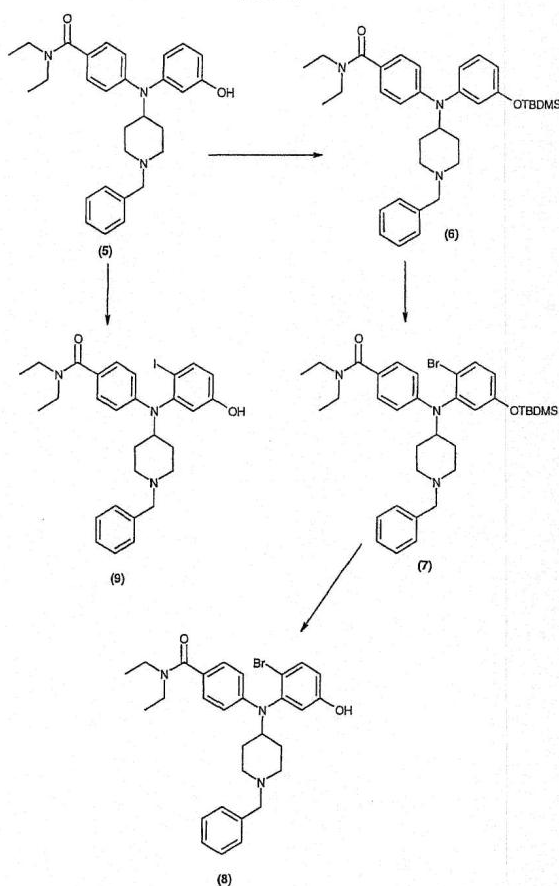
Виявлено: C 63.20%, H 7.07%, N 7.36%,

Обчисл.: C 63.18%, H 7.02%, N 7.39%, 06.19%, Cl 16.22%

IV. Синтез похідних п-галофенолу

Похідні п-галофенолу формул (8) і (9) виготовили, дотримуючись Схеми синтезу II, представленої нижче.

Схема II



(i) Виготовлення
N,N-діетил-4-[[3-[[1-(1-диметилетил)диметилсиліл]окси]феніл][1-(фенілметил)-4-піперидиніл]аміно-бензаміду (сполука 6).
(200мг, 0,4ммоль) 5, TBDMSCl (302мг, 2,0ммоль) та імідазолу(138мг, 2,0ммоль) у 15мл диметилформаміду (ДМФ) нагрівали протягом 3 годин при темп. 100°C. Розчинник було видалено і отримане масло очищено флеш-хроматографією на силікагелі, використовуючи 100% CH₂Cl₂, потім 1% і 2% MeOH. Вихід: 200мг, 87%.

(ii) Виготовлення
N,N-діетил-4-[[2-бром-5-[[1-(1-диметилетил)диметилсиліл]окси]феніл][1-(фенілметил)-4-піперидиніл]аміно-бензаміду (сполука 7).
До розчину (82,9мг, 0,145ммоль) 6 у 6мл ДМФ при 0°C було додано розчин NBC (27,7мг, 0,155ммоль) у 2мл ДМФ. Реакційну суміш перемішували протягом 2 годин, концентрували, флеш-хроматографували 10% ацетону/гексану, з наступним додаванням 20%ацетону. Зібрано 61,25мг, 65%.

Приклад 2

Виготовлення

N,N-діетил-4-[[2-бром-5-гідроксифеніл][1-(фенілметил)-4-піперидиніл]аміно]-бензаміду (сполука 8)

Сполуку 6 у діоксані було оброблено 4 N HCl у діоксані. Реакційну суміш перемішували до повного закінчення реакції. Очищення було здійснено препаративною обернено-фазовою ВЕРХ, використовуючи CH₃CN/H₂O.

Анал. Обчисл. для C₂₉H₃₄N₃O₂Br × 1,4 GF₃CO₂H × 0,3 H₂O: C, 54,44; H, 5,17; N, 5,99;

Виявлено: C, 54,43; H, 5,06; N, 6,05.; М.С (Обчисл.): 537.15(MH⁺),

М.С (виявлено): 536.16 (MH⁺)

Умови ВЕРХ: колонка: Luna C-18, Градієнт 20-50% В за 25хв., потік: 1мл/хв,

40°C, А- 0.1% ТФОК у H₂O, В- 0.1% ТФОК в CH₃CN, k': 7.94. Чистота: >97%(215нм), >97% (254нм)

Приклад 3

Виготовлення

N,N-діетил-4-[[5-гідрокси-2-йодофеніл][1-(фенілметил)-4-піперидиніл]аміно]-бензаміду (сполука 9).

До суспензії солі трифлуороцтової кислоти (25мг, 0,044ммоль)бензолного аналогу 5 і (11,3мг, 0,044ммоль) трифлату (трифлуорацетату) аргентуму у 5мл CH₂Cl₂ при 0°C було додано краплями розчин 23мг I₂ у 2мл CH₂Cl₂. По завершенні реакційну суміш ; концентрували та очищали препаративною ВЕРХ.

Вихід 7,9мг.

Анал. Обчисл. для C₂₉H₃₄N₃O₂I × 1,6 C₂H₃O₂F₃ × 0,5 H₂O: C, 49,91; H, 4,76; N, 5,42;

Виявлено: C, 49,84.; H, 4,75; N, 5,60

М.С (Обчисл.): 584.51 (MH⁺),

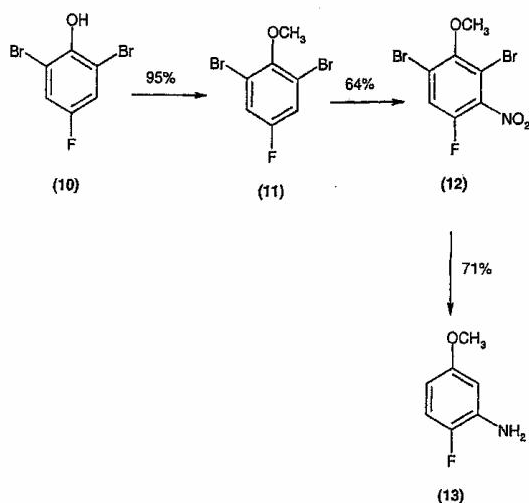
М.С (виявили): 584.16 (MH⁺)

умови ВЕРХ: колонка: Zorbax SB-C18, Градієнт 20-50% В за 25хв., потік 1мл/хв, 40 C, А- 0.1% ТФОК в H₂O,

В- 0.1% ТФОК в CH_3CN , κ' : 8.56. Чистота: >96% (215нм), >96% (254нм)

V. Синтез 2-флуор-5-метоксианіліну

Схема III



(i) Виготовлення 1,3-дібром-5-флуор-2-метоксибензолу (сполука 11).

До розчину 10, 2,6-дібром-4-флуорфенолу (1г, 3,7ммоль), у 50мл ацетону було додано K_2CO_3 (0,56г, 4,1ммоль), з наступним додаванням CH_3I (0,58г, 255мкл, 4,1ммоль). Реакційну суміш нагрівали під зворотним холодильником протягом 2 годин, охолоджували, тоді фільтрували і промивали повторно CHCl_3 . Концентрований фільтрат дав 1г кольорової кремової твердої речовини. 95.2%.

(ii) Виготовлення 1,3-дібром-5-флуор-2-метокси-4-нітро-бензолу (сполука 12).

До каламутного розчину 11 (920мг, 3,24ммоль) у 3мл H_2SO_4 , охолодженій у льоді, було додано краплями розчин $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$ (3мл/163мкл, 3,9ммоль). Реакційну суміш перемішували протягом 2 годин, тоді 30хв. при кімнатній темп. Тоді було додано лід і реакційну суміш екстрагували декілька разів CH_2Cl_2 . Поєднані органічні шари промивали Na_2CO_3 (Cat), висушували над Na_2SO_4 , фільтрували і концентрували. Очищення через силікагель 100 гексанами, потім 10% етилацетатом/гексанами дало 685мг, 64%.

(iii) Виготовлення

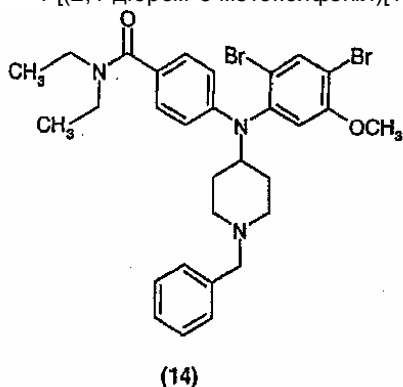
2-флуор-5-метоксианіліну (сполука 13).

В апараті Парра при 40фунт/кв.дюйм струшували суспензію 66мг Pd/C 10% 12 (670мг, 0,2ммоль) у 40мл етанолу протягом 36 годин. Реакційну суміш фільтрували і концентрований фільтрат очищували флеш-хроматографією на силікагелі, збільшуючи полярності 10, 20, тоді 30 етилацетат/гексани. Вихід 200мг, 70,8%.

Приклад 4

Виготовлення

4-[(2,4-дібром-5-метоксифеніл)[1-(фенілметил)-4-піперидиніл]аміно]-N,N-діетил-бензаміду (сполука 14)



510мг сполуки 3 розчиняють у льодяній оцтовій кислоті/ CH_2Cl_2 при 0°C . 90мкл бромододають краплями, з перемішуванням протягом 15хв. Після концентрації реакційну суміш переносили у CH_2Cl_2 і H_2O . Суміш роблять основною за допомогою 2 N NaOH і екстрагують 3 рази CH_2Cl_2 , тоді промивають розсолем. Сполуку очистили препаративною ВЕРХ. Сіль ТФОК було перетворено на вільний амін (347мг), екстракцією з 1 N NaOH і CH_2Cl_2 . Сіль HCl було отримано з 1 N HCl в етері.

Анал. Обчисл. для $\text{C}_{30}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_2\text{Br}_2 \times 1,5 \text{ HCl} \times 0,7 \text{ H}_2\text{O}$; C, 51.72; H, 5.48; N, 6.03;

Виявлено: C, 51.67; H, 5.50; N, 5.88

М.С (Обчисл.): 630.44 (MH⁺),

М.С (виявлено): 630.15 (MH⁺)

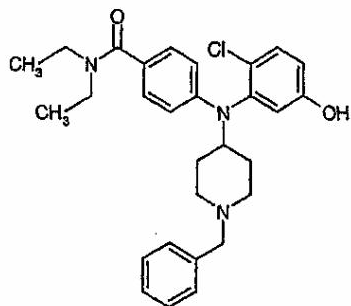
Умови ВЕРХ: колонка: Luna C-18, Градієнт 30-50% В за 25хв., потік: 1мл/хв.,

40°C , А- 0.1% ТФОК в H_2O , В- 0.1% ТФОК в CH_3CN , κ' : 3.25. Чистота: >95% (215нм), >99% (254нм)

Приклад 5

Виготовлення 4-[(2-хлор-5-гідроксифеніл)[1-(фенілметил)-4-піперидиніл]аміно]-N,N-діетил-бензаміду (сполука 15)

Названу сполуку 15 виготовили, слідуючи синтетичного способу, представленого на вищенаведеній Схемі I, використовуючи 2-хлор-3-метоксианалін на етапі 1.



(15)

М.С (Обчисл.): 492.24 (MH⁺),

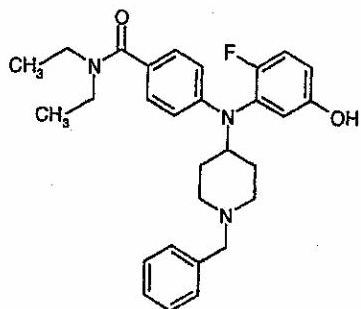
М.С (виявлено): 491.92 (MH⁺)

Умови ВЕРХ: колонка: Luna C-18, Градієнт 30-80% В за 25хв., потік: 1мл/хв., 25°С, А-0.1% ТФОК в Н₂О, В-0.1%ТФОК в СН₃CN, к': 2.60. Чистота: >90%(215нм), >92% (254нм)

Приклад 6

Виготовлення N,N-діетил-4-[(2-флуор-5-гідроксифеніл)[1-(фенілметил)-4-піперидиніл]аміно]-бензаміду (сполука 16).

Названу сполуку 16 було отримано на основі вищенаведеної Схеми I, використовуючи 2-флуор-3-метоксианалін на етапі 1.



(16)

¹H ЯМР: CDCl₃ d 1.15-1.19, (м, 6H), 1.49-1.57, (м, 2H), 1.87-1.90 (м, 2H), 2.12-2.19 (м, 2H), 2.97-3.01 (м, 2H), 3.42 (brs, 4H), 3.53 (с, 2H), 3.80-3.55 (м, 2H), 6.27-6.29 (м, 1H), 6.45 (d, J=8.7 Гц, 2H) 6.51-6.55 (м, 1H), 6.89 (час, 1H), 7.20 (d, J=8.7 Гц, 2H), 7.24-7.27 (м, 5H).

ІЧ: 3160.1, 2936.0, 1602.6, 1502.1, 1472.0, 1456.3, 1283.3

М.С (Обчисл.): 476.61 (MH⁺),

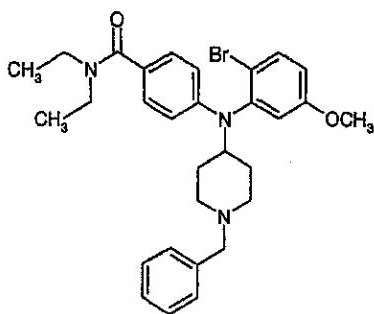
М.С (виявлено): 476.16 (MH⁺)

Умови ВЕРХ: колонка: Zorbax CB-C18, Градієнт 30-80% В за 25хв, потік: 1мл/хв, 40 С, А- 0.1% ТФОК в Н₂О, В- 0.1% ТФОК в СН₃CN, к': 6.61. Чистота: >99% (215нм), >99% (254нм)

Приклад 7

Виготовлення 4-[(4-бром-3-метоксифеніл)[1-(фенілметил)-4-піперидиніл]аміно]-N,N-діетил-бензаміду (сполука 17)

Названу сполуку 17 виготовили згідно з вищенаведеною Схемою I, використовуючи 2-бром-3-метоксианалін на етапі 1.



(17)

¹H ЯМР: CDCl₃ d 1.16, (br t, 6H), 1.43-1.53, (м, 2H), 1.86-1.89 (м, 2H), 2.06-2.11 (м, 2H), 2.91-2.94 (м, 2H), 3.38 (br c, 4H), 3.37 (с, 2H), 3.46 (с, 2H), 3.75 (с, 3H), 3.77-3.83 (м, 1H), 6.44-6.46 (м, 2H), 6.63 (d, J= 8.8 Гц, 2H), 7.19-7.27 (м, 7H), 7.44 (d, l H) Анал. Обчисл. і для C₃₀H₃₆N₃O₂Br × 1.9 HCl × 0.2 H₂O: C, 57.80; H, 6.19; N, 6.74;

Виявлено: C, 57.83; H, 6.17; N, 7.16.

М.С (Обчисл.): 551.54(MH+),

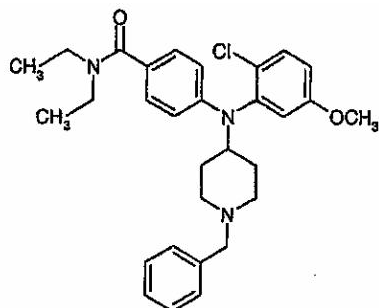
М.С (виявлено): 550.39, 552.38 (MH+, бромінована сполука)

Умови ВЕРХ: колонка: Luna C-18, Градієнт 20-50% В in 25хв., потік: 1мл/хв, 40°C, А- 0.1% ТРА в НА В- 0.1% ТФОК в CH₃CN, к': 5.05. Чистота: >99%(215нм), >99% (254нм)

Приклад 8

Виготовлення (1R)-N-[4-[(1-іміноетил)аміно]-(1R)-[[1.2.3.4-тетрагідро-1-нафталеніламіно]карбоніл]бутил)-1-(феніл)-циклогексилкарбоксаміду (сполука 18)

Названу сполуку 18 виготовили згідно з вищенаведеною схемою I, використовуючи 2-хлор-3-метоксианалін на етапі 1.



(18)

М.С (Обчисл.): 507

М.С (виявили): 505,91. 507.85 (MH+, хлоридна сполука)

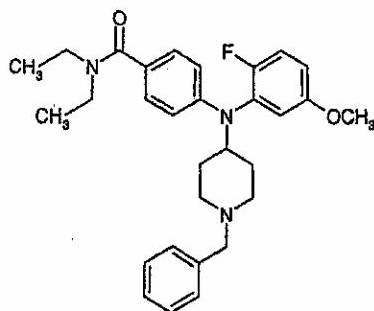
Умови ВЕРХ: колонка: Luna C-18, Градієнт 30-80% В за 25 хвм потік: 1мл/хвм

40°C, А-0.1% ТФОК в H₂O В-0.1% ТФОК в CH₃CN, к':4.06.Чистота: >88%(215нм), >90%(254нм)

Приклад 9

Виготовлення N,N-діетил-4-[(2-флуор-5-метоксифеніл)[1-(фенілметил)-4-піперидиніл]аміно]-бензаміду (сполука 19)

Названу сполуку 19 виготовили згідно з вищенаведеною схемою I, використовуючи 2-флуор-3-метоксианалін на етапі 1.



(19)

¹H ЯМР: CDCl₃ d 1.15-1.18, (m, 6H), 1.50-1.59, (m, 2H), 1.96-1.99 (m, 2H), 2.09-2.15 (m, 2H), 2.95-2.98 (m, 2H), 3.42 (br s, 4H). 3.50 (s, 2H), 3.77 (s, 3H), 3.84-3.90 (m, 2H), 6.27-6.29 (m, 1H), 6.51 (d, J=8.9 Гц, 2H) 6.6 (dd, J=3.3 Гц, 6.3 Гц 1H), 7.08 (dt, J=3.4 Гц, 8.9 Гц, 1H), 7.08 (t, J=9.0 Гц, 2H), 7.22 (d, J=8.9 Гц, 2H) 7.24-7.32 (m, 5H).

М.С (Обчисл.): 490.63 (MH+),

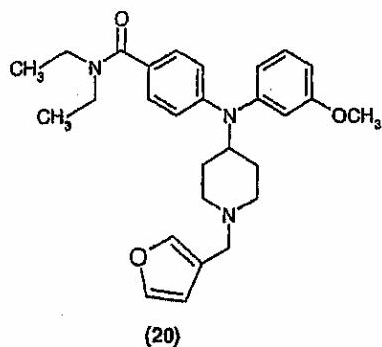
М.С (виявили): 490.08 (MH+)

Умови ВЕРХ: колонка: Luna C-18; градієнт 30-80% В за 25хв., потік: 1мл/хв, 40С, А-0.1% ТФОК в H₂O, В- 0.1% ТФОК в CH₃CN, к':4.61. Чистота: >99% (215нм), >99% (254нм)

Приклад 10

Виготовлення N,N-діетил-4-[[1-(3-фуранілметил)-4-піперидиніл](3-метоксифеніл)аміно]-бензаміду (сполука 20)

Названу сполуку 20 виготовили згідно з вищенаведеною схемою I, використовуючи фуран-3-карбоксалдегід.



^1H ЯМР: CDCl_3 d 1.18, (t, 6H), 1.48-1.58, (m, 2H), 1.92-1.96 (m, 2H), 2.06-2.12 (m, 2H), 2.96-2.99 (m, 2H), 3.37 (s, 2H), 3.42 (br s, 4H), 3.50 (s, 2H), 3.77 (s, 3H), 3.79-3.86 (m, 1H), 6.34 (m, 1H), 6.51-6.52 (m, 1H) 6.55-6.57 (m, 1H), 6.64-6.66 (m, 2H), 6.73 (dd, $J=2.4, 8.1$ Гц, 1H), 7.23-7.26 (m, 3H) 7.31 (m, 1H), 7.36-7.37 (m, 1H)

ІЧ спектр: 2935.4, 1611.0, 1595.4, 1469.4, 1425.6, 1280.7

М.С (Обчисл.): 462.60(MH⁺),

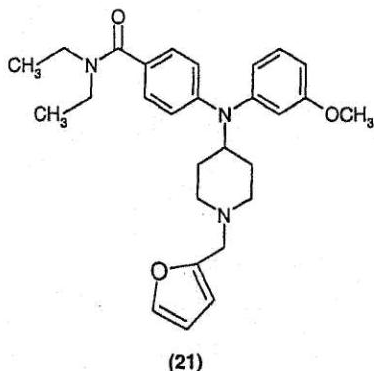
М.С (виявили): 462.21 (MH⁺)

Умови ВЕРХ: колонка: Luna C-18; градієнт: 20-50% В за 25хв., 1мл/хв., 25°C, А- 0.1% ТФОК в H_2O , В- 0.1% ТФОК в CH_3CN ; κ' : 7.5; Чистота: >99 % (215нм), >99% (254нм)

Приклад 11

Виготовлення N,N-діетил-4-[[1-(2-фуранілметил)-4-піперидиніл](3-метоксифеніл)аміно]-бензаміду (сполука 21)

Названу сполуку 21 виготовили згідно з вищенаведеною схемою І, використовуючи фуран-2-карбоксальдегід.



^1H ЯМР: CDCl_3 d 1.19, (t, 6H), 1.54-1.64, (m, 2H), 1.92-1.96 (m, 2H), 2.13-2.19 (m, 2H), 2.96-2.99 (m, 2H), 3.42 (br s, 4H), 3.53 (s, 2H), 3.76 (s, 3H), 3.80-3.86 (m, 1H), 6.18 (d, $J=7$ Гц, 1H), 6.31 (dd, $J=2.1$ Гц, 3.3 Гц, 1H) 6.49-6.51 (m, 1H), 6.53-6.56 (m, 1H), 6.71 (d, 8.4 Гц, 2H) 6.73 (dd, $J=2.5, 8.2$ Гц, 1H), 7.23-7.26 (m, 3H) 7.36-7.37 (m, 1H)

ІЧ спектр: 2935.5, 1611.3, 1595.2, 1469.0, 1424.6, 1280.6

М.С (Обчисл.): 462.60(MH⁺),

М.С (виявили): 462.21 (MH⁺)

Анал. Обчисл. для $\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{N}_3\text{O}_3 \times 1.7 \text{ HCl} \times 0.3 \text{ H}_2\text{O}$: С, 63.58; Н, 7.11; N, 7.94;

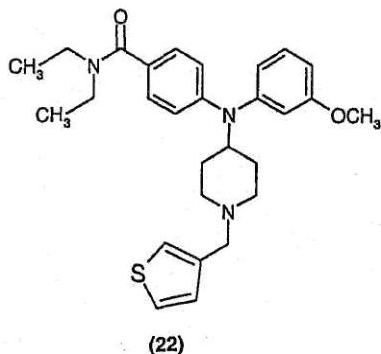
Виявили: С, 63.70; Н, 7.04; N, 7.84.

Умови ВЕРХ: колонка: Luna C-18; Градієнт 20-50% В за 25 хв.; потік: 1мл/хв., 25°C, А- 0.1% ТФОК в H_2O , В- 0.1% ТФОК в CH_3CN , κ' : 7.19. Чистота: >95% (215нм), >99% (254нм)

Приклад 12

Виготовлення N,N-діетил-4-[(3-метоксифеніл)[1-(3-тієнілметил)-4-піперидиніл]аміно]-бензаміду (сполука 22)

Названу сполуку 22 виготовили згідно з вищенаведеною схемою І, використовуючи тіофен-3-карбоксальдегід.



¹H ЯМР: CDCl₃ d 1.18, (t, 6H), 1.52-1.58, (m, 2H), 1.92-1.95 (m, 2H), 2.08-2.13 (m, 2H), 2.95-2.98 (m, 2H), 3.42 (br s, 4H), 3.53 (s, 2H), 3.77 (s, 3H), 3.79-3.86 (m, 1H), 6.51-6.52 (m, 1H) 6.55-6.57 (m, 1H), 6.65 (d, J= 8.5 Гц, 2H), 6.72-6.74 (m, 1H), 7.00-7.01 (m, 1H), 7.08-7.09 (m, 1H), 7.24-7.26 (m, 4H)

ІЧ спектр: 2936.1, 1611.1, 1595.6, 1469.4, 1425.1, 1280.6

М.С (Обчисл.): 478.67(MH⁺),

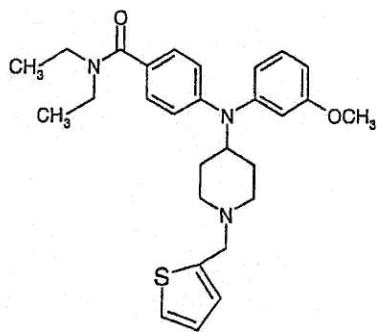
М.С (виявили): 478.07 (MH⁺)

Умови ВЕРХ: колонка: Luna C-18; градієнт: 20-50% В за 25хв., 1мл/хв., 25°C, А- 0.1% ТФОК в Н₂О, В- 0.1% ТФОК в СН₃CN; κ': 7.0; Чистота: >99 % (215нм), >99% (254нм)

Приклад 13

Виготовлення N,N-діетил-4-[(3-метоксифеніл)[1-(2-тієнілметил)-4-піперидиніл]аміно]-бензаміду (сполука 23)

Названу сполуку 23 виготовили згідно з вищенаведеною схемою І, використовуючи тіофен-2-карбоксальдегід.



(23)

М.С (Обчисл.): 477.67(MH⁺),

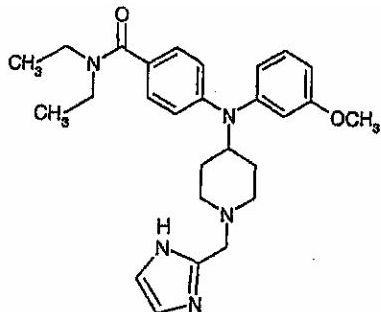
М.С (виявили): 478.09 (MH⁺)

Умови ВЕРХ: колонка: Luna C-18; градієнт: 20-50% В за 25хв., 1мл/хв. (25°C, А- 0.1% ТФОК в Н₂О, В- 0.1% ТФОК в СН₃CN; κ': 7.64; Чистота: >99 % (215нм), >99% (254нм)

Приклад 14

Виготовлення N,N-діетил-4-[[1-(1H-імідазол-2-ілметил)-4-піперидиніл](3-метоксифеніл)аміно]-бензаміду (сполука 24)

Названу сполуку 24 виготовили згідно з вищенаведеною схемою І, використовуючи імідазол-2-карбоксальдегід.



(24)

¹H ЯМР: CDCl₃ d 1.18, (t, 6H), 1.46-1.55, (m, 2H), 1.95-1.97 (m, 2H), 2.24-2.30 (m, 2H), 2.88-2.91 (m, 2H), 3.43 (br s, 4H), 3.63 (s, 2H), 3.50 (s, 2H), 3.78 (s, 3H), 3.88-3.92 (m, 2H), 6.50 (t, 1H), 6.54-6.57 (m, 1H), 6.71 (d, J= Гц, 2H), 6.74 (dd, 2.3 Гц, 8.3 Гц, 1H) 6.96 (s, 2H), 7.24-7.29 (m, 3H)

ІЧ спектр.- 2935.6, 1615.0, 1601.8, 1503.4, 1469.8, 1454.2, 1425.2, 1281.4

М.С (Обчисл.): 462.61 (MH⁺),

М.С (виявили): 462.10 (MH⁺)

Умови ВЕРХ: колонка: Luna C-18; градієнт: 20-50% В за 25хв., 1мл/хв., 25°C, А- 0.1% ТФОК в Н₂О, В- 0.1% ТФОК в СН₃CN; κ': 4.9; Чистота: >99 % (215нм), >99% (254нм)

Приклад 15

Виготовлення N,N-діетил-4-[[1-(3-фуранілметил)-4-піперидиніл](3-гідроксифеніл)аміно]-бензаміду (сполука 25)

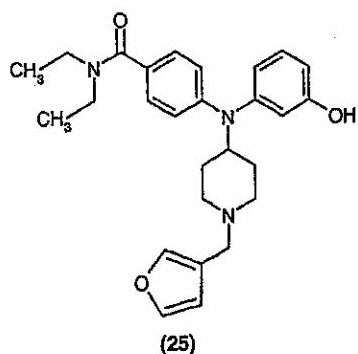
Названу сполуку 25 виготовили згідно з вищенаведеною схемою І, використовуючи фуран-3-карбоксальдегід.

¹H ЯМР: CDCl₃ d 1.17-1.20, (m, 6H), 1.54-1.63, (m, 2H), 1.90-1.93 (m, 2H), 2.12-2.17 (m, 2H), 3.02-3.05 (m, 2H), 3.42 (br s, 6H), 3.42 (br s, 4H), 3.80-3.86 (m, 1H), 6.29-6.30 (m, 1H), 6.35-6.37 (m, 1H) 6.47-6.50 (m, 1H), 6.53-6.56 (m, 1H), 6.60-6.63 (m, 2H), 7.12-7.22 (m, 1H) 7.23-7.28 (s, 4H), 7.28-7.34 (m, 1H)

М.С (Обчисл.): 448.58(MH⁺),

М.С (виявили): 448.21 (MH⁺)

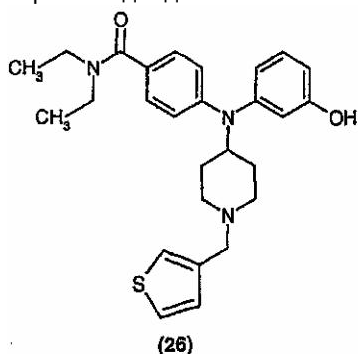
Умови ВЕРХ: колонка: Luna C-18; градієнт: 20-50% В за 25хв., 1мл/хв., 25°C, А- 0.1% ТФОК в Н₂О, В- 0.1% ТФОК в СН₃CN; κ': 5.53; Чистота: >99 % (215нм), >99% (254нм)



Приклад 16

Виготовлення N,N-діетил-4-[(3-гідроксифеніл)[1-(3-тієнілметил)-4-піперидиніліаміно]-бензаміду (сполука 26)

Названу сполуку 26 виготовили згідно з вищенаведеною схемою I, використовуючи тіофен-3-карбоксалдегід.



М.С (Обчисл.): 464.64 (МН+),

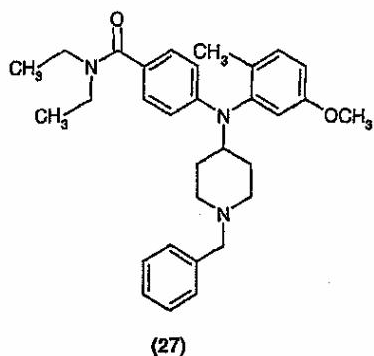
М.С (виявили): 464.15 (МН+)

Умови ВЕРХ: колонка: Luna C-18; градієнт: 20-50% В за 25 хв., 1мл/хв., 25°C, А- 0.1% ТФОК в Н₂О, В- 0.1% ТФОК в СН₃CN; к': 7.64; Чистота: >99 % (215нм), >99% (254нм)

Приклад 17

Виготовлення N,N-діетил-4-[(5-метокси-2-метилфеніл)[1-(фенілметил)-4-піперидиніл]аміно]-бензаміду (сполука 27)

Названу сполуку 27 виготовили згідно з вищенаведеною схемою I, використовуючи 2-метил-5-метоксианалін на етапі 1.



М.С (Обчисл.): 486.67(МН+),

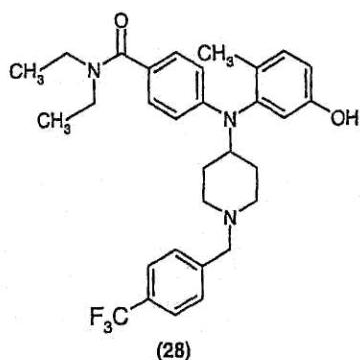
М.С (виявили): 486.19 (МН+)

Умови ВЕРХ: колонка: Luna C-18; градієнт: 20-50% В за 25хв., 1мл/хв., 25°C, А-і 0.1% ТФОК в Н₂О, В- 0.1% ТФОК в СН₃CN; к': 8.46; Чистота: >99 % (215нм), >99% (254нм)

Приклад 18

Виготовлення N,N-діетил-4-[(3-гідроксифеніл)[1-[[4-(трифлуорметил)феніл]метил]-4-піперидиніл]аміно]-бензаміду (сполука 28)

Названу сполуку 28 виготовили згідно з вищенаведеною схемою I, використовуючи 4-трифлуорметилбензалдегід.



Анал. Обчисл. для $C_{30}H_{34}N_3O_2F_3 \times 1.4 CF_3CO_2H$: C, 57.34; H, 5.22; N, 6.12;

Виявили: C, 57.31; H, 5.18; N, 6.23.

М.С (Обчисл.): 526.61 (MH⁺),

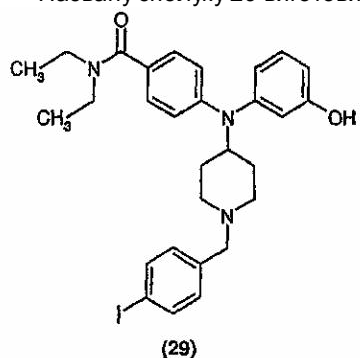
М.С (виявили): 526.29 (MH⁺)

Умови ВЕРХ: колонка: Zorbax SB C-18, Градієнт 30-80% В за 25хв., потік: 1мл/хв., 40°C, А- 0.1% ТФОК в H₂O, В- 0.1% ТФОК в CH₃CN, к': 3.29. Чистота: >96%(215нм), >98% (254нм)

Приклад 19

Виготовлення N,N-діетил-4-[(3-гідроксифеніл)[1-[(4-йодфеніл)метил]-4-піперидиніл]аміно]-бензаміду (сполука 29)

Названу сполуку 29 виготовили згідно з вищенаведеною схемою I, використовуючи 4-йодбензалдегід.



¹H ЯМР: CDC13 d 1.16, (brs, 6H), 1.88-2.06, (br m, 6H), 2.78-2.84 (m, 2H), 3.40-3.43 (m, 4H), 3.39-3.49 (br m, 4H), 3.92 (m, 1H), 4.12 (s, 2H), 4.32 (s, 2H), 6.54 (d, J= 8.8 Гц, 2H), 6.61 (s, 1H), 6.71 (d, J= 7.7 Гц, 2H), 7.44 (d, J=7.7 Гц, 2H), 7.13 (t, 1H), 7.36-7.45 (m, 5H)

Анал. Обчисл. для $C_{29}H_{34}N_3O_2I \times 1.5 C_2HO_2F_3 \times 0.1 H_2O$: C, 50.82; H, 4.76; N, 5.56;

Виявили: C, 50.79; H, 4.77; N, 5.62.

М.С (Обчисл.): 584.51 (MH⁺),

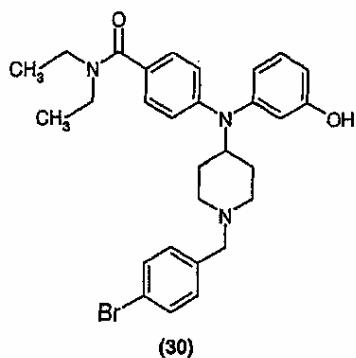
М.С (виявили): 584.14 (MH⁺)

Умови ВЕРХ: колонка: Zorbax SB C-18, Градієнт 20-50% В за 25хв., потік: 1мл/хв., 40°C, А- 0.1% ТФОК в H₂O, В- 0.1% ТФОК в CH₃CN, к': 7.96. Чистота: >98%(215нм), >98% (254нм)

Приклад 20

Виготовлення N,N-діетил-4-[[1-[(4-бромфеніл)метил]-4-піперидиніл](3-гідроксифеніл)аміно]-бензаміду (сполука 30)

Названу сполуку 30 виготовили згідно з вищенаведеною схемою I, використовуючи 4-бромбензалдегід.



Анал. Обчисл. для $C_{29}H_{34}BrN_3O_2 \times 1.30 TFOK$ Обчисл.: C 55.43%, H 5.20%, N 6.14%;

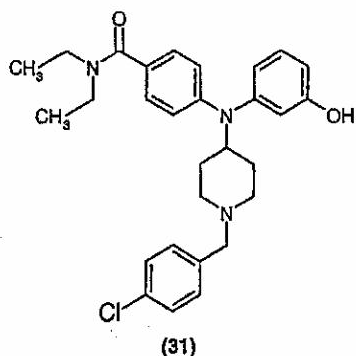
Виявили: C 55.43%, H 5.25%, N 5.94%.

М.С (Обчисл.): 537.51 (MH⁺),

М.С (виявили): 536.54 (MH⁺), 538.04 (бромінована сполука)

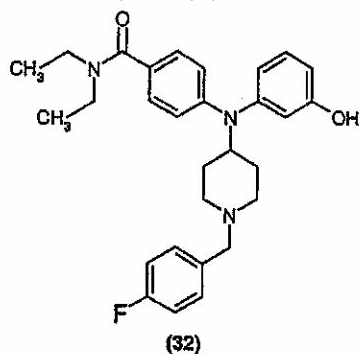
Умови ВЕРХ: колонка: Zorbax SB C-18, Градієнт 20-50% В за 25хв., потік: 1мл/хв., 40°C, А- 0.1% ТФОК в H₂O, В- 0.1% ТФОК в CH₃CN, к': 7.58. Чистота: > 99% (215нм), >99%(254нм)

Приклад 21
 Виготовлення N,N -діетил-4-[[1-(4-хлорфеніл)метил]-4-піперидиніл](3-гідроксифеніл)аміно]-бензаміду
 (сполука 31)
 Названу сполуку 31 виготовили згідно з вищенаведеною схемою I, використовуючи 4-хлоролбензалдегід.



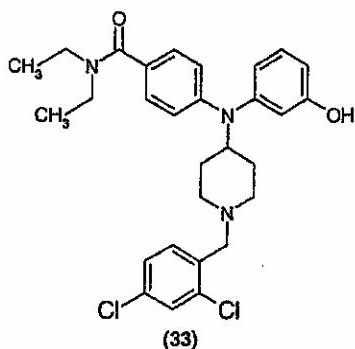
Анал. Обчисл. для $C_{29}H_{34}N_3O_2 \cdot 1.4 CF_3CO_2H \cdot 0.3 H_2O$: C, 57.64; H, 5.43; N, 6.34;
 Виявили: C, 57.49; H, 5.36; N, 6.41
 М.С (Обчисл.): 496.06 (MH⁺),
 М.С (виявили): 496.68 (MH⁺)
 Умови ВЕРХ: колонка: Zorbax SB C-18, Градієнт 20-50% В за 25хв., потік: 1мл/хв., 40°C, А- 0.1% ТФОК в H₂O, В- 0.1% ТФОК в CH₃CN, к': 7.36. Чистота: >99%(215нм), >98% (254нм)

Приклад 22
 Виготовлення N,N -діетил-4-[[1-(4-флуорфеніл)метил]-4-піперидиніл](3-гідроксифеніл)аміно]-бензаміду
 (сполука 32)
 Названу сполуку 32 виготовили згідно з вищенаведеною схемою I, використовуючи 4-флуорбензалдегід.



Анал. Обчисл. для $C_{29}H_{34}FN_3O_2 \cdot 1.90 TFA \cdot 0.10 H_2O$: C 56.91 %, H 5.23%, N 6.07%;
 Виявили: C 56.77%, H 5.39 %, N 5.95%,
 М.С (Обчисл.): 476.61 (MH⁺),
 М.С (виявили): 476.18 (MH⁺)
 Умови ВЕРХ: колонка: Zorbax SB C-18, Градієнт 20-50% В за 25хв., потік: 1мл/хв., 40°C, А- 0.1% ТФОК в H₂O, В- 0.1% ТФОК в CH₃CN, к': 2.45. Чистота: >91%(215нм), >96%(254нм)

Приклад 23
 Виготовлення 4-[[1-[(2,4-дихлорфеніл)метил]-4-піперидиніл](3-гідроксифеніл)аміно]-N,N-діетил-бензаміду
 (сполука 33)
 Названу сполуку 33 виготовили згідно з вищенаведеною схемою I, використовуючи 2,4-дихлоролбензалдегід.



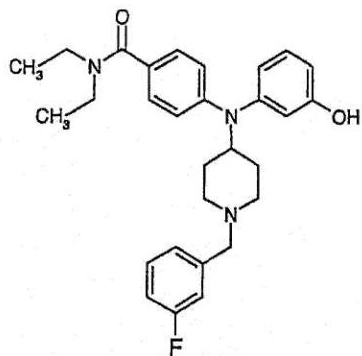
Анал. Обчисл. для $C_{29}H_{33}Cl_2N_3O_2 \cdot 0.10 H_2O \cdot 1.60 TFA$: C 54.42%, H 4.94%, N 5.91%
 Виявили: C 54.46%, H 4.94%, N 5.83%,
 М.С (Обчисл.): 527.51 (MH⁺),
 М.С (виявили): 527.84 (MH⁺) 3

Умови ВЕРХ: колонка: Zorbax CB C-18, Градієнт 20-50% В за 25хв., потік: 1мл/хв., 40°C, А- 0.1% ТФОК в H₂O, В- 0.1% ТФОК в CHCCN, k': 8.14. Чистота: >99%(215нм), >99% (254нм)

Приклад 24

Виготовлення N,N-діетил-4-[[1-(3-флуорфеніл)метил]-4-піперидиніл](3-гідроксифеніл)аміно]-бензаміду (сполука 34)

Названу сполуку 34 виготовили згідно з вищенаведеною схемою I, використовуючи 3-флуорбензалдегід.



(34)

Анал. Обчисл. для C₂₉H₃₄N₃O₂F × 1.2 C₂H₂O₂F₃ × 1.1 H₂O: C, 59.56; H, 6.11; N, 6.64;

Виявили: C, 59.43; H, 5.48; N, 6.54.

М.С (Обчисл.): 476.61 (MH⁺),

М.С (виявили): 476.18 (MH⁺)

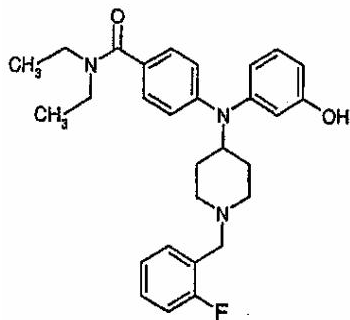
Умови ВЕРХ: колонка: Zorbax CB C-18, Градієнт 20-50% В за 25хв., потік:

1мл/хв., 40°C, А- 0.1% ТФОК в H₂O, В- 0.1% ТРА в CHCCN, k': 6.53. Чистота: >99%(215нм), >99%(254нм)

Приклад 25

Виготовлення N,N-діетил-4-[[1-(2-флуорфеніл)метил]-4-піперидиніл](3-гідроксифеніл)аміно]-бензаміду (сполука 35)

Названу сполуку 35 виготовили згідно з вищенаведеною схемою I, використовуючи 2-флуорбензалдегід.



(35)

Анал. Обчисл. для C₂₉H₃₄N₃O₂F × 1.4 C₂H₂O₂F₃: C, 60.09; H, 5.62; N, 6.61;

Виявили: C60.09; H, 5.59; N, 6.62.

М.С (Обчисл.): 476.61 (MH⁺),

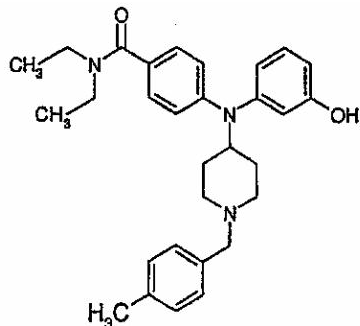
М.С (виявили): 476.18 (MH⁺)

Умови ВЕРХ: колонка: Zorbax CB C-18, Градієнт 20-50% В за 25хв., потік: 1мл/хв., 40°C, А- 0.1% ТФОК в H₂O, В- 0.1% ТФОК в CHCCN, k': 5.63. Чистота: >99%(215нм), >99% (254нм)

Приклад 26

Виготовлення N,N-діетил-4-[(3-гідроксифеніл)[1-(4-метилфеніл)метил]-4-піперидиніл]аміно]-бензаміду (сполука 36)

Названу сполуку 36 виготовили згідно з вищенаведеною схемою I, використовуючи 4-метилбензалдегід.



(36)

Анал. Обчисл. для C₃₀H₃₇N₃O₂ × 1.4 C₂H₂O₂F₃ × 0.4 H₂O: C, 61.70; H, 6.19; N, 6.58;

Виявили: С, 61.78.; Н, 6.25; N, 6.55.

М.С (Обчисл.): 472.64 (МН+),

М.С (виявили): 472.18 (МН+)

Умови ВЕРХ: колонка: Zorbax SB C-18, Градієнт 20-50% В за 25хв., потік:

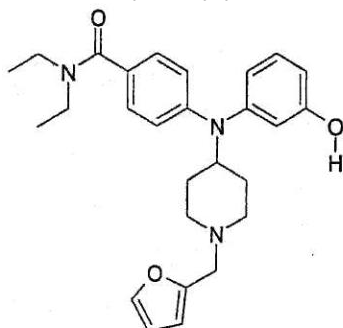
1мл/хв., 40°C, А- 0.1% ТФОК в Н₂О, В- 0.1% ТФОК в СН₃CN, к': 7.12. Чистота: >98%(215нм), >98% (254нм)

Приклад 27

Виготовлення N,N-діетил-4-[[1-(2-фуранілметил)-4-піперидиніл](3-гідроксифеніл)аміно]-бензаміду (сполука

37)

Названу сполуку 37 виготовили згідно з вищенаведеною схемою I, використовуючи 2-фуралдегід.



(37)

400 МГц, DMSO) d 1.07 (t, J=7.4 Гц, 6H, 2 × CH₃), 1.53-1.63 (m, 2H, 2 × CH), 2.04-2.08 (m, 2H, 2 × CH), 3.11-3.18 (m, 2 × CH), 3.37-3.41 (m, 2 × CH), 3.48 (Br, 2 × CH₂), 4.17-4.24 (m, 1H, NCH), 4.33 (s, 2H, NCH₂), 6.36-6.38 (m, 1H), 6.44-6.46 (m, 1H), 6.55-6.56 (m, 1H), 6.62-6.68 (m, 4H), 7.16-7.23 (m, 3H), 7.81 (m, 1H), 9.53 (br, 1H)

Анал. Обчисл. для C₂₇H₃₃N₃O₃ × 1.3 C₂H₃P₃O₂ × 1.0 H₂O: С, 58.09; Н, 5.95; N, 6.87;

Виявили: С, 58.03; Н, 5.90; N, 6.94.

М.С (Обчисл.): 448.58(МН+),

М.С (виявили): 448.21 (МН+)

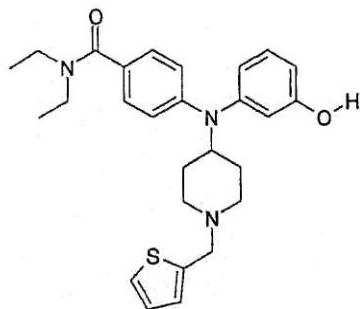
Умови ВЕРХ: колонка: Luna C-18; градієнт: 20-50% В за 25 хв., 1мл/хв., 25°C, А-0.1% ТФОК в Н₂О, В- 0.1% ТФОК в СН₃CN; к': 2.83; Чистота: >99 % (215нм), >99% (254нм)

Приклад 28

Виготовлення N,N-діетил-4-[(3-гідроксифеніл)[1-(2-тієнілметил)-4-піперидиніл]аміно]-бензаміду (сполука

38)

Названу сполуку 38 виготовили згідно з вищенаведеною схемою I, використовуючи 2-тіофенкарбоксалдегід.



(38)

¹H ЯМР: (400 МГц, DMSO) d 1.18 (t, J=7.4 Гц, 6H, 2 ч CH₃), 1.52-1.62 (m, 2H, 2 × CH), 1.89-1.93 (m, 2H, 2 × CH), 2.14-2.21 (m, 2 × CH), 3.00-3.03 (m, 2 × CH), 3.42 (Br, 2 × CH₂), 3.74 (s, 2H, NCH₂), 3.80-3.83 (m, 1H, NCH), 6.33-6.35 (m, 1H), 6.47-6.49 (m, 1H), 6.56-6.59 (m, 1H), 6.62-6.65 (m, 2H), 6.89-6.94 (m, 2H), 7.13 -7.17 (m, 1H), 7.20-7.22 (m, 1H), 7.22-7.26 (m, 2H)

¹H ЯМР: (Анал. Обчисл. для C₂₇H₃₃N₃O₂S × 1.3 C₂H₃F₃O₂ × 0.5 H₂O: С, 57.26; Н, 5.73; N, 6.77;

Виявили: С, 57.32; Н, 5.79; N, 6.73.

М.С (Обчисл.): 464.64 (МН+),

М.С (виявили): 464.15 (МН+)

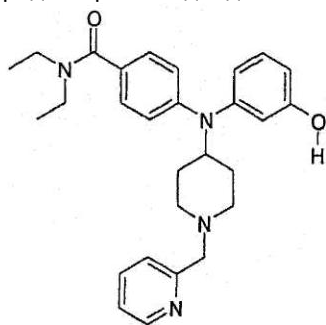
Умови ВЕРХ: колонка: Luna C-18; градієнт: 20-50% В за 25 хв., 1мл/хв., 25°C, А- 0.1 % ТФОК в Н₂О, В- 0.1 % ТФОК в СН₃CN; к': 5.99; Чистота: >99 %(215нм), >99% (254нм)

Приклад 29

Виготовлення N,N-діетил-4-{3-гідрокси[1-(1-імідазол-2-ілметил)-4-піперидиніл]аніліно}бензаміду (сполука

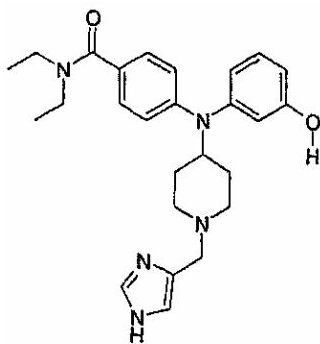
39)

Названу сполуку 39 виготовили згідно з вищенаведеною схемою I, використовуючи 2-імідазолкарбоксалдегід.



(40)

Названу сполуку 41 виготовили згідно з вищенаведеною схемою І, використовуючи 4-імідазолкарбоксалдегід.



(41)

¹H ЯМР: (400 МГц, DMSO) δ 1.08 (t, 6H, 2 × CH₃), 1.54-1.63 (m, 2H, 2 × CH), 2.04-2.08 (m, 2H, 2 × CH), 3.09-3.17 (m, 2 × CH), 3.27-3.33 (m, 2 × CH₂), 3.40-3.45 (2 × CH), 4.16-4.22 (m, 3H, NCH, NCH₂), 6.38 (C, 1H), 6.45-6.48 (m, 1H), 6.64 (d, J=8.4 Гц, 2H), 6.66-6.69 (m, 1H), 7.18 (d, J=8.4 Гц, 2H), 7.20-7.22 (m, 1H), 7.48 (C 1H), 8.28 (br s, 1H), 9.53 (br s, 1H)

Анал. Обчисл. для C₂₆H₃₃N₅O₂ × 2.3 C₂HF₃O₂ × 0.8 H₂O: C, 50.75; H, 5.14; N, 9.67;

Виявили: C, 50.80; H, 5.15; N, 9.56.

М.С (Обчисл.): 448.58 (MH⁺),

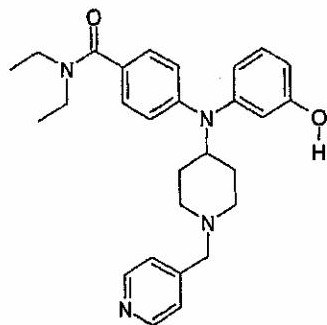
М.С (виявили): 448.23 (MH⁺)

Умови ВЕРХ: колонка: Luna C-18; градієнт: 20-50% В за 25 хв., 1мл/хв., 25°C, А- 0.1% ТФОК в H₂O, В- 0.1% ТФОК в CH₃CN; κ': 2.92; Чистота: >99 % (215нм), >99% (254нм)

Приклад 32

Виготовлення N,N-діетил-4-((3-гідроксипіперидин-1-іл)метил)анілінобензаміду (сполука 42)

Названу сполуку 42 виготовили згідно з вищенаведеною схемою I, використовуючи 4-піридинкарбоксалдегід.



(42)

¹H ЯМР: (400 МГц, DMSO) δ 1.06 (t, 6H, 2 × CH₃), 1.53-1.62 (m, 2H, 2 × CH), 2.04-2.08 (m, 2H, 2 × CH), 3.15-3.21 (m, 2H, 2 × CH), 3.26-3.31 (m, 4H, 2 × CH₂), 3.39-3.42 (m, 2H, 2 × CH), 4.18-4.24 (m, 1H, NCH), 4.30 (C, 2H, NCH₂), 6.36-39 (m, 1H), 6.44-6.47 (m, 1H), 6.62 (d, J=8.4 Гц, 2H), 6.66-6.689 (m, 1H), 7.18 Гц (d, J=8.4 Гц, 2H), 7.21-7.24 (m, 1H), 7.51 (d, J= 5.6 Гц, 2H), 8.68 (d, J =5.6 Гц, 1 H), 9.45 (br s. 1H)

Анал. Обчисл. для C₂₈H₃₄N₄O₂ × 2.4 C₂HF₃O₂ × 1.1 H₂O: C, 52.38; H, 5.17; N, 7.45;

Виявили: C, 52.42; H, 5.27; N, 7.35.

М.С (Обчисл.): 459.60 (MH⁺),

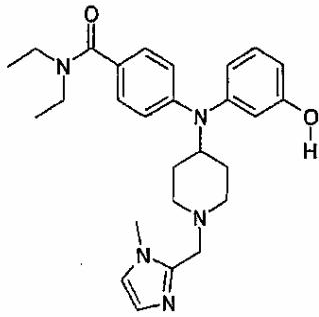
М.С (виявили): 459.23 (MH⁺)

Умови ВЕРХ: колонка: Luna C-18; градієнт: 20-50% В за 25 хв., 1мл/хв., 25°C, А-0.1% ТФОК in H₂O, В- 0.1% ТРА in CH₃CN; κ': 3.07; Чистота: >99 % (215нм), >99% (254нм)

Приклад 33

Виготовлення N,N-діетил-4-((3-гідрокси-1-((1-метил-1H-імідазол-2-іл)метил)-4-піперидиніл)анілін)бензаміду (сполука 43)

Названу сполуку 43 було виготовлено на основі вищенаведеної Схеми I, використовуючи 1-метил-2-імідазолекарбоксалдегід.



(43)

^1H ЯМР: (400 МГц, (CD₃OD) δ 1,15-1,20 (m, 6H, 2 \times CH₃), 1,57-1,67 (m, 2H, 2 \times CH), 2,02-2,08 (m, 2H, 2 \times CH), 2,59-2,66 (m, 2 \times CH), 3,03-3,09 (m, 2 \times CH), 3,44 (br s, 2 \times CH₂), 3,83 (s, 3H, NCH₃), 3,99 (Br s, NCH₂), 4,01-4,09 (m, 1H, CH), 6,48-6,50 (m, 1H), 6,53-6,56 (m, 1H), 6,64-6,67 (m, 2H), 6,72-6,75 (m, 1H), 7,19-7,25 (m, 3H), 7,37 (m, 1H), 7,44 (m, 1H)

Анал. Обчисл. для C₂₇H₃₅N₅O₂ \times 2,0 C₂HF₃O₂ \times 0,2 H₂O: C, 53,71; H, 5,44; N, 10,10;

Виявлено: C, 53,67; H, 5,80; N, 10,20.

М.С (Обчисл.): 462,61 (MH⁺),

М.С (виявлено): 462,23 (MH⁺)

Умови ВЕРХ: колонка: Luna C-18; градієнт: 20-50% В за 25хв., 1мл/хв., 25°C, А-0,1% ТФОК в Н₂О, В- 0,1% ТФОК в CH₃CN; k': 3.07; Чистота: >99 % (215нм), >99% (254нм)

Фармацевтичні композиції

Нові сполуки згідно з винаходом можна уводити перорально, внутрішньом'язово, підшкірно, місцево, через ніс, інтраперитонально, через грудну клітку, внутрішньовенно, епідурально, інтратекально, внутрішньоцереброспінно (інтрацеребровентрикулярно), та ін'єкцією в суглоби.

Бажаним шляхом введення є пероральний, внутрішньовенний або внутрішньом'язовий.

Доза залежатиме від шляху введення, складності захворювання, віку і маси пацієнта та інших факторів, які звичайно враховує обслуговуючий лікар, при визначенні індивідуального режиму та рівня дози, як найбільш характерних для кожного пацієнта.

Для виготовлення фармацевтичних композицій зі сполук згідно з винаходом, інертні, фармацевтично прийнятні носії можуть бути або у рідкій, або у твердій формі. До препаратів у вигляді твердої форми належать порошки, таблетки, дисперговані гранули, капсули, крохмальні облатки, та супозиторії.

Твердим носієм може бути одна або більше речовин, які також можуть діяти як розріджувачі, ароматизатори, солюбілізатори, змащувальні, суспендувальні засоби, зв'язувальні засоби, або дезинтегратори таблеток; ним також може бути капсулюючий матеріал.

В порошках носієм є тонкоподрібнена тверда речовина у суміші з тонкоподрібненим активним компонентом. В таблетках активний компонент змішано з носієм, що має необхідні зв'язувальні властивості у відповідних пропорціях, і спресовано у бажану форму і розмір.

Для виготовлення супозиторних композицій, спочатку розплавляють низькоплавкий віск, як наприклад, суміш гліцеридів жирної кислоти і масла какао, а активний інгредієнт диспергують у ньому, наприклад, перемішуванням. Розплавлену однорідну суміш тоді виливають у форми відповідного розміру і залишають охолоджуватися і твердіти.

Придатними носіями є карбонат магнію, стеарат магнію, тальк, лактоза, сахароза, пектин, декстрин, крохмаль, трагакант, метилцелюлоза, натрій-карбоксиметилцелюлоза, низькоплавкий віск, масло какао, та подібні їм.

Фармацевтично прийнятними солями є ацетат, бензолсульфонат, бензоат, гідрокарбонат, гідротартрат, бромід, ацетат кальцію, камзилат, карбонат, хлорид, цитрат, дигідрохлорид, едетат, едизилат, естолат, езилат, фумарат, глюкапнат, глюконат, глютамат, гліколіларазанілат, гексилрезорцинат, гідрабамін, гідробромід, гідрохлорид, гідроксинафтоат, йодид, ізетіонат, лактат, лактобіонат, малат, малеат, манделат, мезилат, метилбромід, метилнітрат, метилсульфат, мукат, напсилат, нітрат, памоат (ембонат), пантотенат, фосфат/дифосфат, полігалактуронат, саліцилат, стеарат, субацетат, сукцинат, сульфат, танат, тартрат, теоклат, триетидид, бензатин, хлорпрокаїн, холін, діетаноламін, етилендіамін, меглумін, прокаїн, солі алюмінію, кальцію, літію, магнію, калію, натрію та цинку. Бажаними фармацевтично прийнятними солями є гідрохлориди, і гідротартрати.

Гідрохлориди і сульфати є бажанішими.

Названа композиція повинна включати композицію активного компоненту з капсулюючим матеріалом у вигляді носія, що забезпечує капсулу, в якій активний компонент (з іншими носіями або без них) оточений носієм, який таким чином пов'язаний з ним. Подібним чином, включені і крохмальні облатки.

Таблетки, порошки, крохмальні облатки, і капсули можуть бути використані як тверді дозовані форми, придатні для перорального введення.

Рідина з композицій включає розчини, суспензії, та емульсії. Стерильну воду або водо-пропіленгліколеві розчини активних сполук можна визнати як приклад рідких препаратів, придатних для парентерального введення. Рідкі композиції також можуть бути сформовані у розчині у водному розчині поліетиленгліколю.

Водні розчини для перорального введення можна виготовити розчиненням активного компоненту у воді і додаванням відповідних барвників, коригентів, стабілізаторів, та згущувачів, як бажаних елементів. Водні суспензії для перорального застосування можна виготовити розподіленням тонкоподрібненого активного компонента у воді разом з клейким матеріалом, як наприклад, натуральна синтетична гума, смола,

метилцелюлоза, натрій-карбоксиметилцелюлоза, та інші суспендувальні засоби, відомі у рівні фармацевтичного складу.

Бажано, щоб фармацевтичні композиції були у формі одиначної (разової) дози. У такій формі, композицію розподіляють на одиначні дози, які містять відповідну кількість активного компонента. Одиначна доза може бути упакованим препаратом, упаковкою, що містить роздільні кількості препаратів, наприклад, упаковані таблетки, капсули, та порошки в пузирьках або ампулах. Одиначна доза сама також може бути капсулою, крохмальною облаткою, або таблеткою, або нею може бути відповідна кількість будь-якої з цих упакованих форм.

Біологічна оцінка

Модель In vitro

Клітинна культура

Клітини 293S людини, що експресують рецептори μ , δ і κ людини і резистентні до неоміцину було вирощено у суспензіях при 37°C і 5% CO₂ у вібраційних колбах, що містять вільний від кальцію DMEM10% FBS, 5% BCS, 0,1% Pluronic F-68, і 600мкг/мл генетичину.

Виготовлення мембран

Клітини гранулювали і повторно суспендували в лізісному буфері (50мМ Трис, pH 7.0, 2.5мМ EDTA, з PMSF, який додають як безпосередньо перед використанням до 0,1мМ з 0.1М вихідного розчину в етанолі), інкубували на льоді протягом 15хв., потім гомогенізували з політроном протягом 30с Суспензію центрифугували (прокручували) при 1000g. (макс.) протягом 10хв. при 4°C. Супернатант (надосадковий шар) було збережено на льоді, а гранули повторно суспендували і центрифугували як раніше. Супернатанти з двох центрифугувань, було поєднано і центрифуговано при 46000g (макс.) протягом 30хв. Гранули було повторно суспендовано у холодному буфері Трис (50мМ Трис/Cl, pH 7.0) і центрифуговано знову. Отримані гранули було повторно суспендовано в буфері для мембран (50мМ Трис, 0.32М сахароза, pH 7.0). Аліквоти (1мл) у поліпропіленових трубках було заморожено у сухому льоді/етанолі і збережено при -70°C до використання. Концентрації білків було визначено модифікованим аналізом за Лоурі за допомогою SDS.

Аналіз зв'язування

Мембрани розморожували при 37°C, охолоджували на льоді, пропускали 3 рази через голку 25 розміру, і розбавляли буфером для зв'язування (50мМ Трис, 3мМ MgCl₂, 1мг/мл BSA (Sigma A-7888), pH 7.4, які зберігали при 4°C, після фільтрування через 0,22м фільтр, і до яких тільки що було додано 5мкг/мл аprotиніну, 10мкМ бестатину, 10мкМ дипротину А, без DTT). Аліквоти по 100мкл (на мкг білку, див. Таблицю 1) було додано у охолоджені льодом пропіленові труби 12x75мм, що містять 100мкл відповідного радіоліганду (див. Таблиця 1) і 100мкл тестованих при різних концентраціях пептидів. Загальне (33) та неспецифічне (HC) зв'язування визначали у відсутності і присутності 10мкМ налоксану, відповідно. Труби струшували та інкубували при 25°C протягом 60-75хв., після чого вміст швиденько фільтрували у вакуумі та промивали приблизно 12 мл/тубу льодяним буфером для промивання (50мМ Трис, pH 7.0, 3мМ MgCl₂) через фільтри GF/B (Whatman), попередньо просочених протягом щонайменше 2 годин у 0,1% поліетиленіміні. Радіоактивність (dpm), що залишилась на фільтрах, було визначено бета-лічильником, після промочування фільтрів протягом щонайменше 12 годин в мінісклянках, що містять 6-7мл сцинтиляційної рідини. Якщо аналіз проведено у планшетах з 96 глибокими комітками, фільтрування здійснювали на 96-місцевих попередньо просочених PEI уніфільтрах, які було промито 3 x 1мл промивочним буфером, і висушено у сушильній шафі при 55°C протягом 2 годин. Фільтр-плати було підраховано лічильником TopCount (Packard) після додавання 50мкл/комірку сцинтиляційної рідини MS-20. Усі біологічні дані зафіксовано у Таблиці 1.

Таблиця 1

Біологічні дані для Прикладів, наведених у описі.

Приклад №	HDELTA	HDELTA		мозок пацієнтів		Мозок мишей		MLM		RLM	
		EC50	% EMAX	EC50	% EMAX	EC50	% EMAX	10000 %REM	100000 %REM	10000 %REM	100000 %REM
1	0.436	0.61	105.4	9.61	99.49	14.97	112.07	10.4	85.2	4.333	66.125
6	0.466	0.21	107.1	3.41	133.06	3.54	134.25	2	69	5.333	81.333
15	0.221	0.22	104.82	429	140.11	7.5	131.28	3.5	83.5	8	73
16	0.271	0.22	96.86	5.53	123.99	7.92	140.7	5	83	1.5	66.5
19	1.296	1.26	103.63	50.48	88.32			30.667	61.667	0	35.667
20	1.324	0.98	99.86	36.88	86.02	20.72	74.02	30.5	81.5	4.5	51.5
21	0.987	1.52	98.72	81.24	101.79			16.333	85	2.333	45
22	2.127	1.23	109.06	19.03	102.46	23.98	96.36	8.5	85	17	63
23	1.436	0.4	98.85	6.83	102.98	4.74	91.08	30.5	93	20.5	75
24	0.704	2.63	92.31	45.93	92.88	43.21	91.26	3.5	71.5	3.5	87.5
25	0.763	1.13	111.21	14.1	113.59	16.14	112.12	0	71	4	71
26	0.641	1.14	104.65	11.72	78.42	9.3	88.34	31.5	86	3.5	63.5
27	0.416	1.29	101.34	19.64	129.03	44.19	130.03	2	65	3.5	54.5
28	0.651	0.7	106.46	23.45	141.23	40.24	144.02	1.5	80	1.5	52
29	0.3	1.17	118.27	18.68	107.04	31.03	130.01	6	92.5	36.5	74.5
30	0.24	0.26	95.88	4.12	158.09	6.55	159.09	26	82	31	74
31	1.61	14.05	105.52	130.53	41.3	152.57	50.26				
32	1.023	3.92	114.6	85	122.51	119.46	115.43				
33	1.707	13.3	87.74	125.51	100.37	217.34	100.53				

Аналіз даних

Специфічне зв'язування (C3) було обчислено як TB-NS, і C3 у присутності різних тестованих пептидів було виражено як процент від контрольного C3. Значення IK_{50} і коефіцієнту Хілла (n_H) для лігандів при витісненні специфічно зв'язаного радіоліганду було обчислено за логіт-перетворенням графіків або програмами підгонки кривих, наприклад, Ligand, GraphPad Prism, SigviaPlot, або ReceptorFit. Значення K_i було обчислено за рівнянням Ченга-Прусофа. Значення \pm стандартна похибка величин IK_{50} , K_i та n_H повідомлено для лігандів, тестованих за щонайменше трьома кривими заміщення.

Експерименти на насичення рецепторів

Значення радіоліганду K_d було визначено на основі проведення аналізу зв'язування на мембранах клітин з прийнятими радіолігандами при концентраціях в межах 0,2-5 разів оціненого K_d (до 10 разів, якщо кількості необхідного радіоліганду є допустимими). Специфічне зв'язування радіолігандів було виражено як пмоль/мг мембранного білку. Значення K_d і B_{max} з окремих експериментів було отримано з нелінійних пригіток специфічно зв'язаного (B) проти нМ вільного радіоліганду (F) від індивідуалу згідно з одномісцевою моделлю.

Визначення механо-алодинії, використовуючи тестування вон-фрея

Тестування проводили між 08:00 і 16:00, застосовуючи спосіб, описаний Chaplan et al. (1994). Щурів помістили у клітку з плексигласу на сітчасте дно з дроту, яке дає доступ до лапи, і залишили там для звикання на 10-15хв. Зоною тестування було вибрано середину підшви лівої задньої лапи, уникаючи менш чутливих подушечок ступні. До лап торкалися набором з 8 волосинок Вон Фрея з логарифмічно зростаючою жорсткістю (0,41, 0,69, 1,20, 2,04, 3,63, 5,50, 8,51, і 15,14г.; Stoelting, 111, USA). Волосинку Вон Фрея підкладали з під-низу сітчастої підлоги, перпендикулярно до поверхні підшви, з достатньою силою, щоб спричинити таким чином легкий вигин лапи, і тримали приблизно 6-8сек. Позитивну реакцію було помічено, коли лапа різко відсмикувалася. Відсмикування відразу після усунування волосинки, також приймалося за позитивну реакцію. Рухомість вважали сумнівною реакцією, і у таких випадках подразнення повторювали знову.

Протокол тестування

Тварин тестували в день 1 після операції для FCA-лікувальної групи. 50% поріг відсмикування визначали, використовуючи понижуючий спосіб Діксона (1980). Тестування почали з волосинки 2,04г, у середині набору. Стимули завжди представляли у послідовному напрямку, при зростанні чи зменшенні. У відсутність реакції відсмикування лапи на спочатку вибрану волосинку, спостерігали сильне збудження; якщо лапа відсмикувалася, спостерігали наступне слабше збудження. Для обчислення оптимального порогу на основі цього способу необхідно 6 реакцій у безпосередній близькості до 50% порогу, і підрахування 6 реакцій почалося тоді, коли відбулася перша зміна реакції, наприклад, поріг було вперше перейдено. У випадках, коли пороги виходили за межі стимулів, значення 15,14 (нормальна чутливість) або 0,41 (максимальна алодинічна) задавалися відповідно. Отриману картину позитивної та негативної реакції було занесено у таблицю, використовуючи умовні позначення, X = ніякого відсмикування; 0 = відсмикування, а 50% поріг відсмикування було уведено, використовуючи формулу:

$$50\% \text{ г поріг} = 10^{(Xf+Kd)/10,000}$$

де Xf = значення останньої використаної волосинки вон Фрея (у логарифмічних одиницях); k = табличне значення (з Chaplan et al. (1994)) для зразка позитивної/негативної реакції; і d = слабка різниця між стимулами (у логарифмічних одиницях). Тут $\delta = 0,224$.

Пороги вон Фрея було перетворено у процент максимально можливої дії (% MPE), згідно з Chaplan et al. 1994. Наступне рівняння було використано для обчислення % MPE:

$$\% \text{ MPE} = \text{Поріг обробки ліками (g)} - \text{поріг алодинії fg)} \times 100 \text{ поріг для контролю (g)} - \text{поріг алодинії (g)}$$

Уведення тест-речовини

Щурам робили ін'єкції (підшкірно, інтраперитонально, внутрішньовенно або перорально) з тест-речовиною до початку тестування за Вон Фреєм, час між введенням тест-сполуки і тестом Вон Фрея змінювали, залежно від природи тест-сполуки.

Тест вритинга

Оцтова кислота призвела би до абдомінальних скорочень при інтраперитональному введенні мишам, витягуючи таким чином їх тіло у типовій картині. Коли вводять аналгезивні ліки, цю описану зміну спостерігали рідше, і ліки вибирали як потенційно гарний засіб.

Повним і типовим рефлекс Вритинга вважають лише тоді, коли присутні наступні елементи: тварина не рухається; нижча частина спини послаблена; видно підшву обох лап.

(i) Виготовлення розчинів

Оцтова кислота (AcOH): 120мкл Оцтової кислоти додають до 19,88мл дистильованої води для того, щоб отримати кінцевий об'єм 20мл з кінцевою концентрацією 0,6% AcOH. Розчин тоді змішують (перемішують мішалкою) і він готовий для ін'єкцій.

Сполука (лікувальний засіб): Кожну сполуку виготовляють і розчиняють у найпридатнішому носії згідно зі стандартними способами.

(ii) Уведення розчинів

Сполуку (лікувальний засіб) вводять перорально, інтраперитонально (i.p.), підшкірно (s.c.) або внутрішньовенно (i.v.) при 10мл/кг (враховуючи середню масу тіла мишей) за 20, 30 або 40хв. (згідно з класом сполук і їх характеристиками) перед тестуванням. Коли сполуку вводять центральним шляхом: інтравентрикулярно (i.c.v.) або інтратекально (i.t.) вводять об'єм 5мкл.

AcOH вводять інтраперитонально (i.p.) у двох місцях при концентрації 10мл/кг (враховуючи середню масу тіла мишей) відразу до тестування.

(iii) Тестування

За твариною (мишею) спостерігали протягом 20хв. і записували кількість випадків (рефлекс Вритинга), і компілювали під кінець експерименту. Мишей тримали в індивідуальних клітках типу "коробка для взуття" з контактною підкладкою. Всього спостерігали за 4 мишами протягом того самого часу: одна контрольна і три

для доз лікувального засобу.