



EESTI VABARIIK

PATENDIAMET

(11) **EE-EP 2 598 503 B1**

(51)

Int. Cl.

C07D 471/10 (2006.01)

A61K 31/438 (2006.01)

A61P 25/04 (2006.01)

(12) **EESTIS KEHTIVA EUROOPA PATENDI  
PATENDIKIRJELDUSE TÕLGE**

(10) Registreeringu number: <b>E009327</b>	(73) Patendiomanik:
(11) Patendikirjelduse tõlke number: <b>EE-EP 2 598 503</b>	<b>Grünenthal GmbH</b> Zieglerstrasse 6, D-52078 Aachen, DE
(30) Prioriteediandmed: <b>28.07.2010</b> <b>EP 10007822</b>	(72) Leiutise autorid:
(96) Euroopa patenditaotluse esitamise kuupäev: <b>27.07.2011</b>	<b>LINZ, Klaus</b> Nachtigallengrund 5, 53359 Rheinbach, DE
(96) Euroopa patendi- taotluse number: <b>11737904.0</b>	<b>ZEMOLKA, Saskia</b> Am Kupferofen 3, 52066 Aachen, DE
(97) Euroopa patendi väljaand- misest teatamise kuupäev: <b>26.03.2014</b>	<b>NOLTE, Bert</b> Windheckenweg 29, 53902 Bad Münstereifel, DE
(97) Euroopa patendi number: <b>EP 2 598 503</b>	<b>SCHUNK, Stefan</b> Maargasse 20, 52080 Aachen, DE
Patendikirjelduse tõlke esitamise kuupäev: <b>03.06.2014</b>	<b>SCHICK, Hans</b> Parkstrasse 36, 13086 Berlin-Weissensee, DE
Patendikirjelduse tõlke avalikustamise kuupäev: <b>15.08.2014</b>	(74) Patendivolinik:
	<b>Ljubov Kesselman</b> OÜ Kesna Tedre 77-52, 10616 Tallinn, EE

(54) CIS-tetrahüdrospiro(tsükloheksaan-1,2'-pürido[3,4-B]indool)-4-amiini derivaadid

## Kirjeldus

Käesolev leiutis käsitleb ühendeid, mis toimivad notsitseptiin/ORL-1-retseptorsüsteemile ja ka  $\mu$ -opioidretseptorsüsteemile ning mis eristuvad eelkõige oma selektiivse efektiivsuse tõttu kroonilise valu ravimisel (muu hulgas põletikust tingitud valu, vistseraalne valu, kasvajast tingitud valu, eelistatult neuropaatiline 5 valu) ilma, et samal ajal avalduks efektiivsus akuutse, notsitseptiivse valu korral. Leiutisekohasteks ühenditeks on cis-tetrahydrospiro(tsükloheksaan-1,1'-pürido[3,4-b]indool-4-amiini derivaadid.

Kroonilise valu võib jagada kahte suurde gruppi. Patofüsioloogiline notsitseptori valu tekib intaktsete notsitseptorite ärrituse tõttu pärast koetraumasid. See hõlmab 10 eelkõige kroonilist põletikust tingitud valu. Teisest küljest valu, mida põhjustavad närvide mehaanilised, metaboolsed või põletikust tingitud kahjustused, käsitletakse kui neuropaatilist valu. Kroonilise valu ravimine on üheks peamiseks meditsiiniliseks probleemiks, sest kuigi turul olevatest ravimitest on mõned akuutse valu korral kõrge efektiivsusega, ei ole nende toime paljudel juhtudel piisav kroonilise ja eriti 15 neuropaatiline valu ravis.

Põletikulised protsessid kuuluvad kõige olulisemate valu tekkemehhanismide hulka. Tüüpiline põletikust tingitud valu tekib bradükiniini, histamiini ja prostaglandiinide vabanemisel koe hapestumisel ning eritiste rõhumisel notsitseptoritele. Tulemusena tekib kesknärvisüsteemis sageli ülitundlikkusreaktsioon, mis väljendub spontaanse 20 neuronaalse aktiivsuse suurenemises ja tsentraalsete neuronite tugevamares vastustes (Coderre jt, Pain 1993, 52, 259-285). Need muutused tsentraalsete närvide vastuskäitumises võivad soodustada spontaanset valu ja hüperalgeesiat (suurenenud valutundlikkus kahjulike (toksiliste) stiimulite suhtes), mis on põletikus koele tüüpiline (Yaksh jt, PNAS 1999, 96, 7680-7686).

25 Mittesteroidsed põletikuvastased ravimid (NSAID'id – *non-steroidal anti-inflammatory drugs*), millel on lisaks analgeetilisele toimele ka põletikuvastane toime, on eriti edukad põletikust tingitud valu ravimisel (Dickensen, A., International Congress and Symposium Series – Royal Society of Medicine (2000), 246, 47-54).

Nende kasutamine krooniliste valude pikaajalises ravis on siiski piiratud mõnikord tekkivate märkimisväärsete ebasoovitavate kõrvaltoimete nagu maohaavandite või toksiliste neerukahjustuste tõttu. Tugeva või väga tugeva põletikust tingitud valu korral (näiteks kroonilise pankreatiidi korral) suudavad NSAID'id vähendada valu ainult veidi, kuid, kuna suureneb verejooksu risk, siis on tekkiv risk liiga kõrge. Järgmiseks astmeks on üldiselt ravimine  $\mu$ -opioididega, kusjuures narkosõltuvus on asjasse puutuvate isikute hulgas laialdaselt levinud (Vercauteren jt, Acta Anaesthesiologica Belgica 1994, 45, 99-105). Seetõttu olemas tungiv vajadus ühendite järele, mis on põletikust tingitud valu korral kõrge efektiivsusega ja millel on vähenenud sõltuvust tekitav potentsiaal.

Neuropaatiline valu tekib kui perifeersed närvid on mehaaniliselt, metaboolselt või põletiku tõttu kahjustunud. Seejuures tekkinud valuprofiile iseloomustab peamiselt spontaanne valu, hüperalgeesia ja allodüünia (valu on juba tekkinud mittetoksiliste stiimulite tõttu) (vt Baron, Clin. J. Pain 2000; 16 (2 lisa), 12-20). Neuropaatilise valu põhjuseid ja omadusi ning seetõttu ka ravivajadusi on palju ja erinevaid. Need tekivad aju, seljaaju või perifeersete närvide kahjustuse või haiguse tulemusena. Võimalikeks põhjusteks on operatsioonid (näiteks amputatsioonijärgne fantoomvalu), seljaahju vigastused, rabandus, hulgisklerosis, alkoholi- või ravimisõltuvus või muud toksilised ained, vähk ja samuti ka metaboolsed haigused nagu diabeet, podagra, neerupuudulikkus või maksatsirroos, samuti ka nakkushaigused (muuhulgas herpes, vöötohatis, infektsioosne mononukleosis, erlihhiosis, tüüfus, difteeria, HIV, süüfilis või borreliosis). Valukogemusel on väga erinevad nähud ja sümptomid (näiteks kipitav, põletav, löikav, elektriline või kiirgav valu), mis võib muutuda aja jooksul nii esinemissageduse kui intensiivsuse osas.

Neuropaatilise valu põhiline farmakoloogiline teraapia hõlmab tritsüklilisi antidepressante ja krambivastaseid ravimeid, mida kasutatakse monoterapiiana või ka kombinatsioonis opioididega. Enamikul juhtudel pakuvad sellised ravimid valule ainult mõningal määral leevendust, samal ajal, kui täieliku valust vabanemist sageli ei saavutata. Sageli tekkivad kõrvaltoimed aga takistavad tihtipeale ravimiannuste suurendamist, mis on vajalik valu adekvaatse leevenemise saavutamiseks. Tegelikult nõuab neuropaatilise valu rahuldav ravi sageli kõrgemaid  $\mu$ -opioidi

annuseid kui akuutse valu ravi, mille tulemusena muutuvad kõrvaltoimed veelgi olulisemaks. Seetõttu on käesoleval ajal neuropaatilist valu raske ravida. Isegi 3. astme opioidide kõrged annused leevendavad seda valu vaid osaliselt (Saudi Pharm. J. 2002, 10(3), 73-85).

- 5 Neuropaatilise valu ravimiseks kasutatavad opioidid on samal ajal tavaliselt efektiivsed ka akuutse valu vastu kasutamise korral. Seetõttu ei ole tänini olnud võimalik eristada ühest küljest neuropaatilise valu ravi ja teisest küljest akuutse valu ravi. Seetõttu sõltuvalt opioidi annusest surutakse patsiendi iga valuaisting maha, mis kokkuvõttes võib olla ebasoodne. Akuutsel valul on keha suhtes
- 10 kaitsefunktsioon, mis läheb kaduma, kui akuutse valu tundlikkus on kahjustunud või maha surutud. Seetõttu on vajalik säilitada üldine valutundlikkus, vaigistades samal ajal neuropaatilist valu.

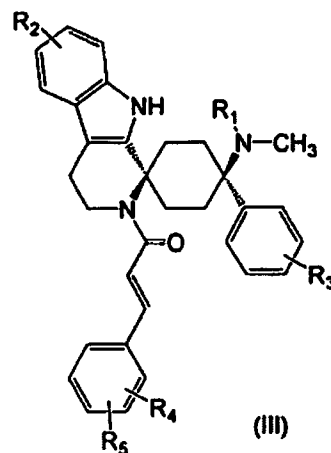
- Tehnika tasemel on tuntud spirotsükliilised tsükloheksaani derivaadid, mis toimivad notsitseptiin/ORL-1 ja  $\mu$ -opioidi retseptorsüsteemile. Neid ühendeid eristab
- 15 muuhulgas erakordselt suur struktuuriline mitmekesisus ning muu hulgas sobivad nad põletikust tingitud ja neuropaatilise valu ravimiseks. Sellega seoses kaasame viitena täies mahus WO2004/043967, WO2005/063769, WO2005/066183 ja WO2006/108565.

- On olemas vajadus selliste ravimite järele, mis on efektiivsed kroonilise, eriti
- 20 neuropaatilise valu ravimisel ning mis samal ajal mõjutavad akuutse valu tajumist vaid kõige väiksemal võimalikul määral. Kui võimalik, peaksid sellised ravimid sisaldama toimeainet nii väikses annuses, et oleks võimalik tagada rahuldav valuravi ilma ebasoovitavate kõrvaltoimete tekkimiseta.

- Käesoleva leiutise ülesanne on luua uudsed ühendid, mis sobivad ravimiteks ja
- 25 millel on olemasoleva tehnika taseme ees eeliseid.

See ülesanne lahendatakse patendinõudluse sisu abil.

Leiutis käsitleb ühendeid üldvalemiga (III):



milles

R<sub>1</sub> on -H või -CH<sub>3</sub>;

R<sub>2</sub> on -H või -halogeen;

R<sub>3</sub> on -H või -halogeen;

5 R<sub>4</sub> on -H, -halogeen või -OC<sub>1,3</sub>-alküülrühm; ja

R<sub>5</sub> on -H, -halogeen või -OC<sub>1,3</sub>-alküülrühm;

nende vabade aluste või füsioloogiliselt vastuvõetavate soolade kujul.

Üllatuslikult leiti, et leiutisekohased ühendid toimivad notsitseptiin/ORL-1- ja  $\mu$ -  
 opioid-retseptorsüsteemile ning on eriti efektiivsed kroonilise valu ravimisel, eriti  
 10 neuropaatilise valu korral, ilma samal ajal akuutse valu tajumist maha surumata.  
 Lisaks on neil ühenditel üllatuslikult, kui üldse, vaid väga nõrgad opioid-tüüpilised  
 kõrvaltoimed analgeetiliselt efektiivses annusevahemikus.

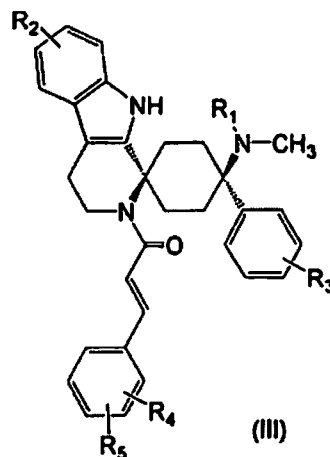
Leiutisekohastel ühenditel on väga kõrge analgeetiline efektiivsus kroonilise valu,  
 eriti neuropaatilise valu, eelistatult allpool toodud polü- või mononeuropaatiliste  
 15 haiguste ravimisel.

Üllatuslikult leiti, et ühenditel puudub tervete loomade või mononeuropaatiliste  
 loomade terve koe korral toime normaalsele notsitseptsioonile annustes, mis  
 põhjustavad peaaegu täieliku neuropaatilise valu kadumise mono- või  
 polüneuroopatia mudelite korral. See tähendab, et ühendid elimineerivad  
 20 patoloogilised tingimused (allodüünia või hüperalgeesia), vähendades samal ajal

normaalset valutundlikkust ainult veidi või üldse mitte. Seetõttu on ühendite antinotsitseptiivne toime akuutse valu korral mitteamvestatav.

Vastavalt sellele on leitud kohased ühendid selektiivselt efektiivsed kroonilise valu, eelistatult neuropaatilise valu, enameelistatult mononeuropaatilise/neuralgilise või polüneuropaatilise valu korral, veel enam eelistatult sellise valu korral nagu herpesejärgse neuralgia või diabeedist tingitud polüneuropaatia, eelistatult mitteolulise antinotsitseptiivse toimega akuutse valu korral. Leitud kohaste ühendite selline ebaharilik omadus on fundamentaalse tähtsusega kogu valuteraapias.

Leitud esimene aspekt käsitleb ühendeid üldvalemiga (III),



10 milles

R<sub>1</sub> on -H või -CH<sub>3</sub>, eelistatult -CH<sub>3</sub>;

R<sub>2</sub> on -H või -halogeen, eelistatult -H või -F, enameelistatult -H;

R<sub>3</sub> on -H või -halogeen, eelistatult -halogeen, enameelistatult -F;

R<sub>4</sub> on -H, halogeen või -OC<sub>1-3</sub>-alküülrühm, eelistatult -H või -OCH<sub>3</sub>;

15 R<sub>5</sub> on -H, halogeen või -OC<sub>1-3</sub>-alküülrühm; eelistatult -H või -OCH<sub>3</sub>; ja

nende vabade aluste või füsioloogiliselt vastuvõetavate soolade kujul.

Ühendid üldvalemiga (III) on fenüüläädikhappe amiid-derivaadid.

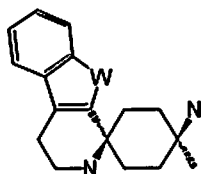
Leiutisekohased ühendid hõlmavad valikut patendidokumentides WO2004/043967, WO2005/066183 ja WO2006/108565 avaldatud ühenditest. Üllatuslikult leiti, et leiutisekohased spiroamiinid, millel on kaks tsükloheksaantuuma suhtes cis-konfiguratsioonis olevat lämmastikuaatomit (cis-tetrahydrospiro(tsükloheksaan-1,1'-pürido[3,4-b]indool)-4-amiini derivaadid), omavad eeliseid võrreldes teiste heterotsükliitega.

Seega näitasid leiutisekohased cis-spiroamiidid erinevalt teistes ühenditest, vastavalt WO2004/043967, WO2005/066183 ja WO2006108565, loomudelitel väljapaistvat toimet kroonilise, eelistatult neuropaatilise valu vastu, enameelistatult diabeetilise polüneuropaatia vastu, ilma märkimisväärse toimetakuutse valu korral selleks nõutavate terapeutiliste annuste juures. Kuna tavapäraste valuvaigistite arvukaid kõrvaltoimeid seostatakse akuutse valu vastase toimemehhanismiga, siis eristuvad leiutisekohased spirotsükliilised cis-asendatud tsükloheksaani derivaadid eriti soodsa kõrvaotimete profiili poolest, eriti selles osas, mis puudutab opioididele tüüpilisi kõrvaotimeid.

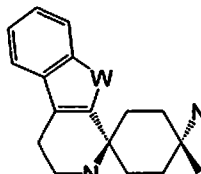
Leiutisekohased ühendid on eelistatult mittekiraalsed; põhistruktuur üldvalemiga (III) ei sisalda kiraalsuselementi (kiraalset) (tsentrit, telge või tasapinda).

Leiutisekohased ühendid on spiro-tuumasüsteemi osas isomeerid, milles spiro-tsükloheksaantuumasüsteemi (mitte indooli) juures olevat asenduste mustrit võib tähistada ka kui cis/trans, Z/E või syn/anti. "Cis-trans isomeerid" on stereoisomeeride (e konfiguratsiooniisomeeride) alagrupp.

Leiutisekohastes ühendites olemasolevad spiroamiini kaks on teineteise suhtes vastavalt syn- või cis- või Z-konfiguratsioonis:



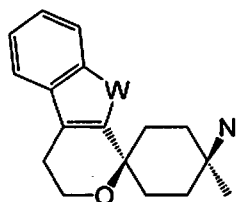
cis-spiroamiin



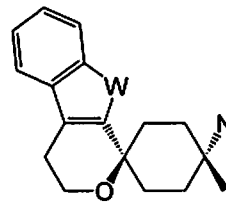
trans-spiroamiin

Eelistatud teostuses on nii nimetatud cis-isomeeri ülehulk (liig) vähemalt 50% de (diastereomeerne liig), enameelistatilt vähemalt 75% de, veelgi enam eelistatult vähemalt 90% de, enimeelistatult vähemalt 95% de ja kõige enam eelistatult vähemalt 99% de.

- 5 Sobivad meetodid isomeeride (diastereoisomeeride) lahutamiseks on antud valdkonna spetsialistile tuntud. Näited, mida võib mainida, hõlmavad kolonnkromatograafiat, preparatiivsed HPLC-d ja kristallisatsiooniprotsesse. Suunatud sünteesi meetodite, milles üht isomeeri moodustub liiga, põhimõtted on antud valdkonna spetsialistile samuti tuntud.
- 10 Lisaks on cis-isomeeri eelised eriti üllatavad selle poolest, et struktuurselt seotud spiroeetrite korral ei ole tavaliselt mitte cis-isomeer, vaid hoopis trans-isomeer see, millel on farmakoloogilisest seisukohast eelistatud omadusi (kuid mis on vahelt teistsuguse iseloomuga kui leiutisekohaste cis-spiroamiinide eelised):



cis-spiroeeter



trans-spiroeeter

Eelistatud teostuses on leiutisekohased ühendid vabade aluste kujul.

- 15 Teises eelistatult teostuses on leiutisekohased ühendid füsioloogiliselt sobivate soolade kujul.

- 20 Käesolevas kirjelduses tuleb termini "sool" all mõista ühendi mis tahes vormi, milles see võib olla ioonilisel või laetud kujul ja ühenduses vastasiooniga (katiooni või aniooniga) või on lahuses. Terminiga alla käivad ka ühendi kompleksid teiste molekulide ja ionidega, eriti kompleksid, mis on seotud iooniliste interaktsioonide kaudu. Eelistatud soolad on füsioloogiliselt vastuvõetavad, eriti füsioloogiliselt



vastuvõetavad soolad anioonide või hapetega või ka soolad, mis on moodustatud füsioloogiliselt sobiva happega.

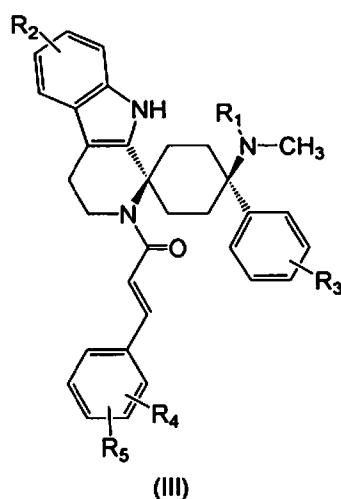
Füsioloogiliselt vastuvõetavateks sooladeks anioonide või hapetega on teatud kindla ühendi soolad anorgaaniliste või orgaaniliste hapetega, mis on füsioloogiliselt  
5 vastuvõetavad – eriti kasutamiseks inimestel ja/või imetajatel. Näideteks teatud hapetega moodustatud füsioloogiliselt sobivatest sooladest on järgmiste hapete soolad: vesinikkloriidhape, vesinikbromiidhape, väävelhape, metaansulfoonhape, sipelghape, äädikhape, oksaalhape, merevaikhape, õunhape, viinhape, mandelhape, fumaarhape, piimhape, sidrunhape, glutamiinhape, sahhariinhape,  
10 monometüülsebatsiinhape, 5-oksoproliin, heksaan-1-sulfoonhape, nikotiinhape, 2-, 3- või 4-aminobensoehape, 2,4,6-trimetüülbensoehape,  $\alpha$ -lipoehape, atsetüülglütsiin, atsetüülsalitsüülhape, hippuurhape ja/või asparagiinhape. Eriti eelistatud soolad on hüdrokloriid, tsitraat ja pooltsitraat.

Eelistatud teostuses on leiutisekohane ühend vaba ühendina või füsioloogiliselt  
15 vastuvõetava soola kujul, kuid eelistatavalt mitte benseensulfoonhappe soolana, vesinikkloriidhappe soolana või sidrunhappe soolana.

Kirjelduses tähistab termin “-halogeen” eelistatult -F, -Cl, -Br või -I, enameelistatult -F või -Cl, eriti -F.

Kirjelduses on “C<sub>1-3</sub>-alküül-” vastavalt, sõltumatult hargnemata või hargnenud  
20 ahelaga, küllastatud või mono- või polüküllastamata rühm. Seega hõlmab “C<sub>1-3</sub>-alküülrühm” atsüklilisi küllastatud või küllastamata süsivesinikradikaale, mis võivad olla hargnenud või hargnemata ahelaga, ehk nii-öelda C<sub>1-3</sub>-alkanüül-, C<sub>1-3</sub>-alkenüül- ja C<sub>1-3</sub>-alkünüülrühmi.

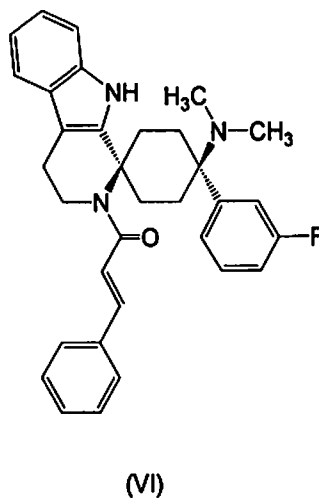
Eelistatud ühendite üldvalemiga (III) teostusvormiks on sellised ühendid üldvalemiga  
25 (III):



vabade aluste või füsioloogiliselt vastuvõetavate soolade kujul, milles  $R_2$  on -H ja/või  $R_3$  on -F.

Eelistatult on  $R_4$  ja  $R_5$  kas mõlemad -H või mõlemad -OCH<sub>3</sub>.

Eriti eelistatud teostuses käsitleb leiutis ühendeid üldvalemiga (VI)



5 selle vaba aluse või füsioloogiliselt vastuvõetava soolana.

Üldvalemile (VI) vastava ühendi vaba alust võib süsteemi järgi nimetada (E)-2',3',4',9'-tetrahydro-N,N-dimetüül-4-(3-fluorofenüül)-2'-(2-fenüülvinüül)karbonüülspiro[tsükloheksaan-1,1'(1'H)pürido[3,4-b]indool]-4-amiiniks (cis-diastereomeer) või ka (E)-1-((1s,4s)-4-(dimetüülamino)-4-(3-fluorofenüül)-3',4'-dihüdrospiro[tsükloheksaan-1,1'-pürido[3,4-b]indool]-2'(9'H)-üül)-3-fenüülprop-2-een-1-ooniks. See

ühend esineb eelistatult vaba alusena või hüdrokloriidina, tsitraadina või pooltsitraadina (soolana).

Leiutisekohaselt on eriti eelistatud ühendid, mis on valitud grupist:

(E)-2',3',4',9'-tetrahüdro-N,N-dimetüül-4-fenüül-2'-(2-fenüülvinüül)-karbonüülspiro[tsükloheksaan-1,1'(1'H)-pürido[3,4-b]indool]-4-amiin (cis-diastereomeer) või (E)-1-((1s,4s)-4-(dimetüülamino)-4-fenüül-3',4'-dihüdrospiro[tsükloheksaan-1,1'-pürido[3,4-b]indool]-2'(9'H)-üül)-3-fenüülprop-2-een-1-oon	AMD-1 <sup>cis</sup>
(E)-2',3',4',9'-tetrahüdro-N,N-dimetüül-4-(3-fluorofenüül)-2'-(2-fenüülvinüül)karbonüülspiro[tsükloheksaan-1,1'(1'H)-pürido[3,4-b]indool]-4-amiin (cis-diastereomeer) või (E)-1-((1s,4s)-4-(dimetüülamino)-4-(3-fluorofenüül)-3',4'-dihüdrospiro[tsükloheksaan-1,1'-pürido[3,4-b]indool]-2'(9'H)-üül)-3-fenüülprop-2-een-1-oon	AMD-5 <sup>cis</sup> AMD-6 <sup>cis</sup>
(E)-2',3',4',9'-tetrahüdro-N,N-dimetüül-6'-fluoro-4-(3-fluorofenüül)-2'-(2-fenüülvinüül)karbonüülspiro[tsükloheksaan-1,1'(1'H)-pürido[3,4-b]indool]-4-amiin (cis-diastereomeer) või (E)-1-((1s,4s)-4-(dimetüülamino)-6'-fluoro-4-(3-fluorofenüül)-3',4'-dihüdrospiro[tsükloheksaan-1,1'-pürido[3,4-b]indool]-2'(9'H)-üül)-3-fenüülprop-2-een-1-oon	AMD-8 <sup>cis</sup>
(E)-2',3',4',9'-tetrahüdro-N,N-dimetüül-6'-fluoro-4-fenüül-2'-(2-fenüülvinüül)karbonüülspiro[tsükloheksaan-1,1'(1'H)-pürido[3,4-b]indool]-4-amiin (cis-diastereomeer) või (E)-1-((1s,4s)-4-(dimetüülamino)-6'-fluoro-4-fenüül-3',4'-dihüdrospiro[tsükloheksaan-1,1'-pürido[3,4-b]indool]-2'(9'H)-üül)-3-fenüülprop-2-een-1-oon	AMD-10 <sup>cis</sup>
(E)-2',3',4',9'-tetrahüdro-N,N-dimetüül-4-(4-fluorofenüül)-2'-(2-fenüülvinüül)karbonüülspiro[tsükloheksaan-1,1'(1'H)-pürido[3,4-b]indool]-4-amiin (cis-diastereomeer) või (E)-1-((1s,4s)-4-(dimetüülamino)-4-(4-fluorofenüül)-3',4'-dihüdrospiro[tsükloheksaan-1,1'-pürido[3,4-b]indool]-2'(9'H)-üül)-3-fenüülprop-2-een-1-oon	AMD-12 <sup>cis</sup>

ning nende füsioloogiliselt vastuvõetavad soolad ja/või solvaadid, eriti vabad alused, hüdrokloriidid, tsitraadid või pooltsitraadid.

Järgmine leiutise aspekt käsitleb leiutisekohaste ühendite kasutamist ravimina.

Leiutise järgmine aspekt käsitleb leiutisekohaste ühendite kasutamist neuropaatilise ja/või kroonilise valu ravimisel, kusjuures manustamine toimub eelistatult kaks korda päevas, üks kord päevas või veelgi harvemini, enameelistatult mitte rohkem kui üks  
5 kord päevas.

Lisaks käsitletakse leiutises leiutisekohaseid ühendeid, mis on ette nähtud kasutamiseks kroonilise valu ravimisel. Eelistatult on krooniline valu valitud grupist: põletikust tingitud valu, vistseraalne valu, kasvajast tingitud valu ja neuropaatiline valu. Neuropaatiline valu võib olla mononeuropaatilist/neuralgilist või  
10 polüneuropaatilist päritolu.

Lisaks käsitleb leiutis leiutisekohaste ühendite kasutamist valu ravimiseks diabeetilise polüneuropaatia korral.

Lisaks käsitleb leiutis leiutisekohaste ühendite kasutamist herpesejärgse neuralgia tagajärjel tekkinud valu ravimiseks

15 Leiutisekohased ühendid sobivad neuropaatilise valu ravimiseks, eelistatult mononeuropaatilise/neuralgilise või polüneuropaatilise valu ravimiseks. Nimetatud valuks on eelistatult perifeerne polüneuropaatiline valu või tsentraalne polüneuropaatiline valu.

20 Polüneuropaatia või polüneuropaatiline valu on eelistatult akuutne (kuni neli nädalat), subakuutne (neli kuni kaheksa nädalat) või krooniline (rohkem kui 8 nädalat).

Polüneuropaatia korral on eelistatult mõjutatud motoorne, sensoorne, autonoomne, sensorimotoorne või kesknärvisüsteem. Sümptomid on eelistatult jaotunud sümmeetriliselt või asümmeetriliselt. Valu võib olla kerge, mõõdukas, mõõdukalt  
25 tugev, tugev või väga tugev. Määramiseks võib kasutada neuropaatilise valu skaalat (NPS – *neuropatic pain scale*) (vaata B. S. Galer jt, *Neurology* 1997, 48, 332-8).

- Näideteks perifeerse neuropaatilise valu põhjustest on diabeetiline polüneuropaatia, herpesejärgne neuralgia, radikulopaatia, traumajärgne (posttraumaatiline) neuralgia, keemiliste ainete, näiteks kemoterapiaga tekitatud polüneuropaatia, fantoomvalud jäsemetes, kompleksne regionaalne valusündroom, HIV-põhjustatud sensoorne
- 5 polüneuropaatia ja alkoholist tingitud polüneuropaatia. Näideteks tsentraalse polüneuropaatilise valu põhjustest on (seljaaju) kitsenenud kanali stenoosist tingitud kompressiooni müelopaatia, traumajärgne seljavalu, rabandusest tingitud (insuldijärgne) valu, isheemijärgne müelopaatia, radiatsioonist põhjustatud müelopaatia, hulgiskleroosist tingitud müelopaatia ja HIV-indutseeritud müelopaatia.
- 10 Eelistatud leiutise teostuste korral on neuropaatilist valu põhjustav neuropaatia seotud haigusega, mis on valitud grupist: meliididiabeet, vaskuliit (soonepõletik), ureemia, hüpotüreoidism, alkoholi kuritarvitamine, herpesejärgne neuralgia, idiopaatiline neuropaatia, krooniline põletikuline demüeliniseeriv neuropaatia, multifokaalne motoorne neuropaatia, pärilik polüneuropaatia, Guillain-Barré
- 15 sündroom, mürgistus [näiteks alkoholi, raskmetallide {eriti Pb, Hg, As}, süsivesinike, tsütostaatikumidega läbi viidud kemoterapia tulemusel], porfüüria, nakkushaigused, vähktõbi [näiteks müeloom, amüloid, leukeemia, lümfoom], pernitsiosne aneemia, E-vitamiini puudus, Refsumi tõbi, Bassen-Kornzweig sündroom, Fabry tõbi, vaskuliit ja amüloidoos. Eriti eelistatud on diabeetiline
- 20 polüneuropaatia ja herpesejärgne neuralgia. Kui haiguseks on nakkushaigus, siis on see eelistatult valitud grupist: mononukleoos, ehrlihhioos, tüüfus, difteeria, pidalitõbi (*lepra*), HIV, süüfilis (*lues*) ja borrelioos.

Polüneuropaatiliseks valuks on eelistatult valu, mida põhjustab polüneuropaatia ICD-10 tähenduses (Rahvusvaheline Haiguste ja Nendega Seotud

25 Terviseprobleemide Statistiline Klassifikatsioon - *International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems*, WHO väljaanne, eelistatult 2008. a.).

Lisaks käsitleb leiutis leiutisekohaseid ühendeid, mis on ette nähtud kasutamiseks ärevusseisundite, stressi ja stressiga seotud sündroomide, depressioonide,

30 epilepsia, Alzheimeri tõve, vanadusdementsuse, üldiste kognitiivsete

düsfunktsioonide, õppimis- ja mäluhäirete (nootroopikuna), võõrutusnähtude, alkoholi ja/või narkootikumide ja/või ravimite kuritarvitamise ja/või sõltuvuse, seksuaalsete funktsioonihäirete, südameveresoonkonna haiguste, hüpotensiooni, hüpertensiooni, tinnituse, pruritus (sügelus), migreeni, kuulmisraskuste, soolemotoorika puudulikkuse, (söömis-) toitumishäirete, anoreksia, rasvumise, lokomotoorsete häirete, kõhulahtisuse, kahheksia ja uriinipidamatuse ravimiseks või lihase relaksandina, antikonvulsandina või anesteetikumina, või koosmanustamiseks opioidse anageetikumi või anesteetikumiga toimuva ravi korral, diureesiks või antinatriureesiks, anksiolüüsiks, lokomotoorse aktiivsuse moduleerimiseks, neurotransmitterite (virgatsainete) vabanemise moduleerimiseks ning sellega seotud neurodegeneratiivsete haiguste ravimiseks, võõrutusnähtude ravimiseks ja/või opioididest tekkiva sõltuvuspotentsiaali vähendamiseks.

Leiutisekohaseid ühendeid võib kasutada ka ravimeetodites, eriti mõne üldnimetatud näidustuse korral, nii imetajatel kui inimestel, kellel on vaja ravida kroonilist valu, eelistatult neuropaatilist valu, enameelistatult diabeetilise polüneuropaatia või herpesejärgse neuralgia korral tekkivat valu, manustades individuaalselt terapeutiliselt vajalikus päevases annuses leiutisekohast ühendit või leiutisekohast manustamisvormi (ravimvorm), kusjuures samal ajal eelistatult ei toimu märkimisväärset akuutse notsitseptoorse valu mahasurumist ja/või ei ilmne märkimisväärseid opioididele tüüpilisi kõrvaltoimeid, eriti ei esine olulist respiratoorset depressiooni ja/või kõhukinnisust ja/või uriinipeetust ja/või iiveldust ja/või oksendamist ja/või hüpotooniat ja/või bradükardiat ja/või narkomaaniat ja/või sõltuvuse teket ja/või eufooriat ja/või depressiooni ja/või sedatsiooni (uimasus) ja/või peeringlust.

Leiutisekohaseid ühendeid võib kasutada ka ravimeetodites, eriti mõne üldnimetatud näidustuse korral, nii imetajatel kui inimestel, kellel on vaja ravida kroonilist valu, eelistatult neuropaatilist valu, enameelistatult diabeetilise polüneuropaatia või herpesejärgse neuralgia korral tekkivat valu, manustades individuaalselt, päevases annuses X leiutisekohast ühendit või leiutisekohast manustamisvormi, kusjuures eelistatult ei toimu samaaegset märkimisväärset akuutse notsitseptoorse valu mahasurumist ja/või ei ilmne märkimisväärseid

opioididele tüüpilisi kõrvaltoimeid, eriti ei esine olulist respiratoorset depressiooni ja/või kõhukinnisust ja/või uriinipeetust ja/või liiveldust ja/või oksendamist ja/või hüpotooniat ja/või bradükardiat ja/või narkomaaniat ja/või sõltuvuse teket ja/või eufooriat ja/või depressiooni ja/või uimasust ja/või pearinglust; kusjuures päevane

5 annus X on valitud grupist: 0,001 mg, 0,002 mg, 0,003 mg, 0,004 mg, 0,005 mg, 0,006 mg, 0,007 mg, 0,008 mg, 0,009 mg, 0,01 mg, 0,02 mg, 0,03 mg, 0,04 mg, 0,05 mg, 0,06 mg, 0,07 mg, 0,08 mg, 0,09 mg, 0,1 mg, 0,2 mg, 0,3 mg, 0,4 mg, 0,5 mg, 0,6 mg, 0,7 mg, 0,8 mg, 0,9 mg, 1 mg, 2 mg, 3 mg, 4 mg, 5 mg, 6 mg, 7 mg, 8 mg, 9 mg, 10 mg.

- 10 Edasi käsitleb leiutis leiutisekohaseid ühendeid, millel on afiinsus  $\mu$ -opioidretseptorile ja ORL-1 retseptorile ja mis
- on märkimisväärse efektiivsusega neuropaatilise valu ravimisel, eelistatult rottidel, enameelistatult mononeuropaatilise valu ravimisel vastavalt Chung'i mudelile ja mida iseloomustab poolmaksimaalne efektiivne annus  $ED_{50}^n$ , ning
  - 15 - mis valdavalt ei ole märkimisväärselt efektiivne akuutse valu ravimisel, eelistatult rottidel, enameelistatult sabaäratõmbamise katses (*tail-flick test*) annustes, mis on 5 korda suuremad kui  $ED_{50}^n$ .

Vastavalt sellele näitavad leiutisekohased ühendid, kui neid manustada poolmaksimaalses efektiivses annuses  $ED_{50}^n$ , mis defineeritakse kui ühendi

20 efektiivsus neuropaatilise valu suhtes, ja isegi 5 korda suuremas annuses kui  $ED_{50}^n$ , akuutse valu korral, kui üldse, kõige enam mitteolulist antinotsitseptiivset toimet, eelistatult rottidel, enameelistatult sabaäratõmbamise (*tail-flick*) katses.

Eelistatud teostuses on neuropaatiliseks valuks mononeuropaatiline või neuralgiline valu, eelistatult herpesejärgse neuralgia tagajärjel tekkinud valu. Teises eelistatud

25 teostuses on neuropaatiliseks valuks polüneuropaatiline valu, eelistatult diabeetilisest polüneuropaatiast tingitud valu.

Eelistatult ei ole leiutisekohased ühendid üldiselt märkimisväärse efektiivsusega akuutse või notsitseptiivse valu ravimisel isegi sellistes annustes, mis on 10, 20, 30, 40 või 50 korda kõrgemad, enameelistatult 75, 100, 125, 150 või 175 korra

kõrgemad, veel enam eelistatult 200, 300, 400 või 500 korra kõrgemad, enimeelistatult 600, 700, 800 või 900 korra kõrgemad ja kõige enam eelistatult 1000 korra kõrgemad kui poolmaksimaalne efektiivne annus  $ED_{50}^n$ .

Poolmaksimaalne efektiivne annus  $ED_{50}^n$  on antud valdkonna spetsialistidele tuntud.

- 5 Eelistatult defineeritakse see kui annus, mille juures neuropaatilise valu ravimisel saavutatakse 50% maksimaalsest terapeutilisest toimest. Vastavalt sellele võib akuutse valu ravimise korral poolmaksimaalse efektiivse annuse  $ED_{50}^a$  defineerida kui annuse, mille juures saavutatakse 50% maksimaalsest terapeutilisest toimest (efektiivsusest). Leiutisekohased ühendid defineeritakse  $ED_{50}^n$  järgi, mitte  $ED_{50}^a$
- 10 järgi.

Sobivad meetodid toimeaine efektiivsuse määramiseks neuropaatilise valu ravimisel ning poolmaksimaalse efektiivse annuse  $ED_{50}^n$  määramiseks neuropaatilise valu ravimisel on antud valdkonna spetsialistidele tuntud. Sama kehtib ka toimeaine efektiivsuse uurimisel akuutse valu suhtes.

- 15 Näiteks võib määramise läbi viia loomudelil (näiteks hiirel või rotil), kus
- mononeuropaatilist valu võib uurida vastavalt Chung'ile (vt S. H. Kim, J. M. Chung, Pain. 1992, 50(3), 355-63) või Bennett' ile (vt G. J. Bennett, Y. K. Xie, Pain. 1988, 33(1), 87-107),
  - diabeetilise polüneuropaatia korral tekkivat valu võib uurida streptosototsiiniga (STZ - *streptozotocin*) indutseeritud diabeedi abil (E. K. Joseph, J. D. Levine, Neuroscience. 2003; 120(4):907-13), ning
  - akuutset valu võib uurida niinimetatud *tail-flick* testi abil (D'Amour ja Smith, J. Pharm. Exp. Ther. 72, 1941, 74-9).
- 20

- Määratlemine viiakse eelistatult läbi loomudelil, kusjuures nii efektiivsus
- 25 neuropaatilise valu vastu kui ka efektiivsus mononeuropaatilise valu vastu rotil määratakse vastavalt Chung'i mudelile ning efektiivsus akuutse valu vastu rotil määratakse *tail flick* testiga, eelistatult kõigil juhtudel selliselt nagu on kirjeldatud eksperimentide osas.



Eelistatult on need leiutisekohased ühendid, millel on afiinsus  $\mu$ -opioidretseptori suhtes ja ORL-1 retseptori suhes, rottide korral:

- 5 - märkimisväärselt efektiivsed mononeuropaatilise valu ravimisel vastavalt Chung'i mudelile ja neid iseloomustab poolmaksimaalne efektiivne annus  $ED_{50}^n$ , ja
- need ei ole märkimisväärselt efektiivsed akuutse valu ravimisel sabaäratõmbamise katses, annuses, mis on 5 korda kõrgem kui  $ED_{50}^n$ .

10 Eksperimendi tulemuste hindamine statistiliselt märkimisväärsete erinevuste osas loomagruppides: (aine) annuse saanud grupis ja vehiikel-kontrollgrupis viiakse läbi korduvmõõtmistega dispersioonanalüüsi abil (korduvmõõtmistega ANOVA) ning *post hoc* analüüsi abil vastavalt Bonferroni meetodile, eelistatult nii nagu on kirjeldatud eksperimentaalses osas. Olulisuse tase on seatud  $p < 0,05$  juurde. Grupi suurus on tavaliselt  $n$  on 0 ( $n=0$ ).

15 Põhimõtteliselt võib analgeetilise efektiivsuse määramise neuropaatilise valu ning akuutse, notsitseptiivse valu vastu viia läbi ka inimestel, kuid see on muu hulgas eetilistel põhjustel vähem eelistatud. Neuropaatilise valu vastase efektiivsuse uuringu, mis toimuks neuropaatilise valu käes kannatavatel patsientidel, võiks siis läbi viia vastavalt artiklile Hansson P., Backonja M., Bouhassira D. (2007) „Usefulness and limitations of quantitative sensory testing: clinical and research  
20 application in neuropathic pain states” *Pain*. 129(3): 256-9. Efektiivsuse uuringu akuutse valu vastu võib viia vastavalt artiklile Posner J., Telekes A., Crowley D., Phillipson R., Peck A. W. (1985) „Effects of an opiate on cold-induced pain and the CNS in healthy volunteers” *Pain*. 23(1):73-82.

25 Üllatuslikult leiti, et leiutisekohased ühendid on erinevad võrreldes tavapäraste 3-astme opioididega väga soodsa kõrvaltoimete profiili poolest. Seega isegi terapeutiliselt efektiivsete annuste manustamisel, mis on nõutud eriti neuropaatilise valu ravimisel, ei ole täheldatud üldse või täheldati ainult vähesel määral opioididele tüüpilisi kõrvaloimeid, nagu näiteks hingamisdepressioon, kõhukinnisus, uriinipeetus, iiveldus, oksendamine, hüpotoonia, bradükardia, narkomaania, 30 sõltuvus, eufooria, depressioon, unisus ja pearinglus. Täna on

eksperimentaalselt loommudelitel näidatud, et selliste opioididele tüüpiliste kõrvaltoimete nagu hingamisdepressiooni, kõhukinnisuse, hüpotoonia, bradükardia, motoorse koordinatiivse võimekuse häirete (kui kesknärvisüsteemile mõjuvate kõrvaltoimete mõõt), füüsilise ja vaimse sõltuvuse, ilmnenise sagedus on

5 märkimisväärselt vähenenud.

Eelistatud teostuses ei tekita leiutisekohased ühendid, nende poolmaksimaalses efektiivses annuses  $ED_{50}^n$ , mis on defineeritud kui ühendi efektiivsus neuropaatilise valu vastu, ja eelistatult isegi sellises annuses, mis on 5 korda kõrgem kui  $ED_{50}^n$ , manustamisel, kõrvaltoimena märkimisväärselt hingamisdepressiooni, eelistatult

10 rotil, enameelistatult veregaasi analüüsi mudelis. Eelistatult ei tekita leiutisekohased ühendid kõrvaltoimena märkimisväärselt hingamisdepressiooni isegi annuses, mis on 10, 20, 30, 40 või 50 korda kõrgem, enameelistatult 75, 100, 125, 150 või 175 korda kõrgem ja enimeelistatult 200 korda kõrgem kui poolmaksimaalne efektiivne annus  $ED_{50}^n$ .

15 Sobivad meetodid toimeaine poolt esile kutsutud hingamisdepressiooni uurimiseks on antud valdkonna spetsialistidele tuntud. Uuring eelistatult viiakse läbi veregaasi analüüsi mudeli abil rotil, vaadeldes arteriaalse  $O_2$  ja  $CO_2$  partsiaalrõhkude muutumist. Eksperimendi tulemuste hindamine statistiliselt märkimisväärsete erinevuste suhtes (ravimi) annuse saanud rühmas ja vehiikel-kontrollrühmas viiakse

20 läbi ühefaktorilise dispersioonanalüüsi (*one-way ANOVA*) abil ja *post hoc* Dunnett'i testi abil, eelistatult selliselt nagu on kirjeldatud käesoleva kirjelduse eksperimentaalses osas. Olulisuse tase on seatud  $p < 0,05$  juurde. Grupi suurus on tavaliselt  $n=6$ . Täiendavate detailide jaoks selle loommudeli kohta on toodud eksperimentaalses osas ka viided.

25 Eelistatud teostuses ei tekita leiutisekohased ühendid poolmaksimaalses efektiivses annuses  $ED_{50}^n$ , mis on defineeritud kui ühendi efektiivsus neuropaatilise valu vastu, ja eelistatult isegi annuses, mis on 5 korda kõrgem kui  $ED_{50}^n$ , manustamisel kõrvaltoimena märkimisväärselt kõhukinnisust, eelistatult hiirel, enameelistatult (aktiiv)söe läbimise testis. Eelistatult ei tekita leiutisekohased ühendid kõrvaltoimena

30 märkimisväärselt kõhukinnisust isegi annuses, mis on 10, 20, 30, 40 või 50 korda

kõrgem, enameelistatult 75, 100, 125, 150 või 175 korda kõrgem ja veel enam eelistatult 200, 300, 400 või 500 korda kõrgem ja enimeelistatult 600 korda kõrgem kui poolmaksimaalne efektiivne annus  $ED_{50}^n$ .

Sobivad meetodid toimeaine poolt esile kutsutud kõhukinnisuse uurimiseks on antud valdkonna spetsialistidele tuntud. Uuring viiakse eelistatult läbi söe läbimise mudeli abil hiirtel, vaadeldes muutusi soolestiku läbimise kiiruses. Eksperimendi tulemuste hindamine statistiliselt oluliste erinevuste suhtes annuse saanud rühmas ja vehiikel-kontrollrühmas viiakse läbi ühefaktorilise dispersioonanalüüsi (*one-way ANOVA*) abil ja *post hoc* Dunnett'i testi abil, eelistatult selliselt nagu on kirjeldatud käesoleva kirjelduse eksperimentaalses osas. Olulisuse tase on seatud  $p < 0,05$  juurde. Grupi suurus on tavaliselt  $n=10$ . Täiendavate detailide jaoks selle loomumudeli kohta on toodud eksperimentaalses osas ka viide.

Eelistatud teostuses ei tekita leiutisekohased ühendid poolmaksimaalses efektiivses annuses  $ED_{50}^n$ , mis on defineeritud kui ühendi efektiivsus neuropaatilise valu vastu, ja eelistatult isegi annuses, mis on 5 korda kõrgem kui  $ED_{50}^n$ , manustamisel kõrvaltoimena märkimisväärset hüpotooniat, eelistatult ärkvel küülikutel, enameelistatult vereringe mudeli abil ärkvel küülikutel telemeetriaga. Eelistatult ei tekita leiutisekohased ühendid kõrvaltoimena märkimisväärset hüpotooniat isegi annuses, mis on 10, 20, 30, 40 või 50 korda kõrgem, enameelistatult 75, 100, 125, 150 või 175 korda kõrgem ja enimeelistatult 200 korda kõrgem kui poolmaksimaalne efektiivne annus  $ED_{50}^n$ .

Sobivad meetodid toimeaine poolt esile kutsutud hüpotoonia uurimiseks on antud valdkonna spetsialistidele tuntud. Uuring viiakse eelistatult läbi vereringe mudeli abil ärkvel küülikutes telemeetriaga, vaadeldes muutusi arteriaalses vererõhus (süstoolne, diastoolne keskmine väärtus). Eksperimendi tulemuste hindamine statistiliselt oluliste erinevuste suhtes annuse saanud rühmas ja vehiikel-kontrollrühmas viiakse läbi ühefaktorilise dispersioonanalüüsi (*one-way ANOVA*) abil ja *post hoc* Dunnett'i testi abil, eelistatult selliselt nagu on kirjeldatud eksperimentaalses osas. Olulisuse tase on seatud  $p < 0,05$  juurde. Grupi suurus on

tavaliselt  $n=6$ . Täiendavate detailide jaoks selle loomumudeli kohta on toodud eksperimentaalses osas ka viide.

5 Eelistatud teostuses ei tekita leiutisekohased ühendid poolmaksimaalses efektiivses annuses  $ED_{50}^n$ , mis on defineeritud kui ühendi efektiivsus neuropaatilise valu vastu, ja eelistatult isegi annuses, mis on 5 korda kõrgem kui  $ED_{50}^n$ , manustamisel kõrvaltoimena märkimisväärset bradükardiat, eelistatult ärkvel olekus küülikutel, enameelistatult vereringe mudeli abil ärkvel küülikutes telemeetriaga. Eelistatult ei tekita leiutisekohased ühendid kõrvaltoimena märkimisväärset bradükardiat isegi 10 annuses, mis on 10, 20, 30, 40 või 50 korda kõrgem, enameelistatult 75, 100, 125, 150 või 175 korda ja enimeelistatult 200 korda kõrgem kui poolmaksimaalne efektiivne annus  $ED_{50}^n$ .

15 Sobivad meetodid toimeaine poolt esile kutsutud bradükardia uurimiseks on antud valdkonna spetsialistidele tuntud. Uuring viiakse eelistatult läbi vereringe mudeli abil ärkvel küülikutes telemeetriaga, vaadeldes muutusi südame löögisageduses. Eksperimendi tulemuste hindamine statistiliselt märkimisväärsete erinevuste suhtes annuse saanud rühmas ja vehiikel-kontrollrühmas viiakse läbi ühefaktorilise dispersioonanalüüsi abil (*one-way ANOVA*) ja *post hoc* Dunnett'i testi abil, eelistatult selliselt nagu on kirjeldatud eksperimentaalses osas. Olulisuse tase on seatud 20  $p < 0,05$  juurde. Grupi suurus on tavaliselt  $n=6$ . Täiendavate detailide jaoks selle loomumudeli kohta on toodud eksperimentaalses osas ka viide.

25 Eelistatud teostuses ei tekita leiutisekohased ühendid poolmaksimaalses efektiivses annuses  $ED_{50}^n$ , mis on defineeritud kui ühendi efektiivsus neuropaatilise valu vastu, ja eelistatult isegi annuses, mis on 5 korda kõrgem kui  $ED_{50}^n$ , manustamisel kõrvaltoimena märkimisväärset motoorse koordinatiivse võimekuse häiret (kui kesknärvisüsteemile mõjuvate kõrvaltoimete mõõt), eelistatult hiirtel, enameelistatult Rota-Rod testis. Eelistatult ei tekita leiutisekohased ühendid kõrvaltoimena märkimisväärset motoorse koordinatiivse võimekuse häiret (kui kesknärvisüsteemile mõjuvate kõrvaltoimete mõõt) isegi annuses, mis on 10, 20, 30, 40 või 50 korda 30 kõrgem, enameelistatult 75, 100, 125, 150 või 175 korda, veel enam eelistatult 200,

300, 400 või 500 korda, enimeelistatult 600, 700, 800 või 900 korda kõrgem ja kõige enam eelistatult 1000 korda kõrgem kui poolmaksimaalne efektiivne annus  $ED_{50}^n$ .

Sobivad meetodid toimeaine poolt esile kutsutud motoorse koordinatiivse võimekuse häire (kui kesknärvisüsteemile mõjuvate kõrvaltoimete mõõt) uurimiseks on antud valdkonna spetsialistidele tuntud. Uuring viiakse eelistatult läbi Rota-Rod mudeli abil hiirtel (analoogiliselt kirjeldatule - Kuribara H., Higuchi Y., Tadokoro S. (1977), Effects of central depressants on Rota-Rod and traction performance in mice. Japan. J. Pharmacol. 27, 117-126), vaadeldes muutusi võimes joosta pöörleval vardal. Eksperimendi tulemuste hindamine statistiliselt oluliste erinevuste suhtes annuse saanud rühmas ja vehiikel-kontrollrühmas viiakse läbi ühefaktorilise dispersioonanalüüsi (*one-way ANOVA*) abil ja *post hoc* Dunnett'i testi abil, eelistatult selliselt nagu on kirjeldatud eksperimentaalses osas. Olulisuse tase on seatud  $p < 0,05$  juurde. Grupi suurus on tavaliselt  $n=10$ . Täiendavate detailide jaoks selle loomumudeli kohta on tehtud eksperimentaalses osas ka viide.

Eelistatud teostuses ei tekita leiutisekohased ühendid poolmaksimaalses efektiivses annuses  $ED_{50}^n$ , mis on defineeritud kui ühendi efektiivsus neuropaatilise valu vastu, ja eelistatult isegi annuses, mis on 5 korda kõrgem kui  $ED_{50}^n$ , manustamisel kõrvaltoimena märkimisväärset füüsilist sõltuvust või võõrutusnähte, eelistatult hiirtel, enameelistatult hüppamise testis (*Jumping-Test*). Eelistatult ei tekita leiutisekohased ühendid kõrvaltoimena märkimisväärset füüsilist sõltuvust või võõrutusnähte isegi annuses, mis on 10, 20, 30, 40 või 50 korda kõrgem, enameelistatult 75, 100, 125, 150 või 175 korda, veel enam eelistatult faktori 200, 300, 400 või 500 korda, enimeelistatult 600, 700, 800 või 900 korda ja kõige enam eelistatult 1000 korda kõrgem kui poolmaksimaalne efektiivne annus  $ED_{50}^n$ .

Sobivad meetodid toimeaine poolt esile kutsutud füüsilise sõltuvuse uurimiseks on antud valdkonna spetsialistidele tuntud. Uuring viiakse eelistatult läbi hüppamise mudelil hiirtel (analoogiliselt kirjeldatule - Saelens J.K., Arch Int Pharmacodyn 190: 213-218, 1971), naloksooni poolt esile kutsutud võõrutusena. Eksperimendi tulemuste hindamine statistiliselt oluliste erinevuste suhtes annuse saanud rühmas ja vehiikel-kontrollrühmas viiakse eelistatult läbi Fisheri täpse testi (ingl. *Fisher exact*

test) abil parameetritele "võõrutusnähtudega loomade arv", samuti ka Kruska-Wallis testi abil parameetritele "hüppamise sagedus", eelistatult selliselt nagu on kirjeldatud eksperimentaalses osas. Olulisuse tase on seatud kõigil juhtudel  $p < 0,05$  juurde. Grupi suurus on tavaliselt  $n=12$ . Täiendavate detailide jaoks selle loommudeli kohta on tehtud eksperimentaalses osas ka viide.

Eelistatud teostuses ei tekita leiutisekohased ühendid poolmaksimaalses efektiivses annuses  $ED_{50}^n$ , mis on defineeritud kui ühendi efektiivsus neuropaatilise valu vastu, ja eelistatult isegi annuses, mis on 5 korda kõrgem kui  $ED_{50}^n$ , manustamisel kõrvaltoimena märkimisväärset vaimset sõltuvust või narkosõltuvust, eelistatult rottidel, enameelistatult kohaeelistuse testis. Eelistatult ei tekita leiutisekohased ühendid kõrvaltoimena märkimisväärset vaimset sõltuvust või narkosõltuvust isegi annuses, mis on 10, 20, 30, 40 või 50 korda kõrgem, enameelistatult 75, 100, 125, 150 või 175 korda, veel enam eelistatult 200, 300, 400 või 500 korda, enimeelistatult 600, 700, 800 või 900 korda ja kõige enam eelistatult 1000 korda kõrgem kui poolmaksimaalne efektiivne annus  $ED_{50}^n$ .

Sobivad meetodid toimeaine poolt esile kutsutud vaimse sõltuvuse või narkosõltuvuse uurimiseks on antud valdkonna spetsialistidele tuntud. Uuring viiakse eelistatult läbi kohaeelistuse testi abil rottidel, eelistatult selliselt nagu on kirjeldanud Tzschentke, T.M., Bruckmann, W. ja Friderichs, F. (2002) „Lack of sensitization during place conditioning in rats is consistent with the low abuse potential of tramadol” Neuroscience Letters 329, 25-28. Eksperimendi tulemuste hindamine statistiliselt oluliste erinevuste suhtes loomade eelistustes toimeaine osas või vehikli osas viiakse eelistatult läbi paaris t-testi abil. Olulisuse tase on seatud kõigil juhtudel  $p < 0,05$  juurde. Grupi suurus on tavaliselt  $n=8$ . Täiendavate detailide jaoks selle loommudeli kohta on tehtud viide meetodi kirjeldusele artiklis Tzschentke, T.M., Bruckmann, W. and Friderichs, F. (2002) Neuroscience Letters 329, 25-28.

Leiutisekohased ühendid sobivad kroonilise valu ravimiseks, eelistatult neuropaatilise valu, enameelistatult mononeuropaatilise/neuralgilise või

polüneuropaatilise valu ning veelgi enam eelistatult herpesejärgse neuralgia või diabeetilise polüneuropaatia poolt põhjustatud valu ravimiseks.

Kroonilise valu erinevate vormide definitsioonid on antud valdkonna spetsialistile tuntud. Sellega seoses võib viidata näiteks väljaannetele Merskey H., Bogduk N.  
5 „Classification of chronic pain”. Seattle: IASP Press 1994, Bennett G.J., Anesth Analg. 2003, 97, 619-20 ja Backonja M. M., Anesth Analg. 2003, 97, 785-90.

Antud kirjelduse konteksti kohaselt on krooniline valu defineeritud eelistatult kui valu, mis kestab pikemat aega (tavaliselt vähemalt 3, 4, 5 või 6 kuud) ja püsib kauem normaalsest tervenemisajast. Neuropaatiline valu defineeritakse eelistatult  
10 kui valu või sensoorne fenomen, mille põhjuseks on kesk- või perifeerse närvisüsteemi kahjustus, haigus või düsfunktsioneerimine. Antud kirjelduse konteksti kohaselt on akuutne valu defineeritud eelistatult kui ebameeldiv sensoorne ja emotsionaalne kogemus, mis kaasneb akuutse või potentsiaalse koekahjustusega või mida kirjeldatakse sellise kahjustuse terminites (vaata  
15 Rahvusvahelise Valu-uuringute Assotsiatsiooni (*International Association for the Study of Pain® (IASP)*) definitsiooni).

Leiutisekohastel ühenditel on  $K_i$ -väärtus  $\mu$ -opioidretseptori suhtes eelistatult mitte suurem kui 1000 nM, enameelistatult mitte suurem kui 500 nM, veel enam eelistatult mitte suurem kui 100 nM, veelgi enam eelistatult mitte suurem kui 50 nM ja  
20 enimeelistatult mitte suurem kui 25 nM.

Meetodid  $K_i$ -väärtuse  $\mu$ -opioidretseptorite suhtes määramiseks on antud valdkonna spetsialistile tuntud. Määramine viiakse eelistatult läbi homogeense partiina mikrotiiterplaatidel. Selleks inkubeeritakse eelistatult testitavate ainete lahjenduste seeriaid 90 minutit toatemperatuuril koos retseptor-membraanpreparaadiga  
25 (15-40  $\mu$ g valku 250  $\mu$ l inkubatsioonipartii kohta) CHO-K1 rakkudes, mis ekspresseerivad inimese  $\mu$ -opioidretseptorit (RB-HOM *receptor membrane preparation*, NEN, Zaventem, Belgia), 1 nmol/l radioaktiivse ligandi [ $^3$ H]-naloksooni (NET719, NEN, Zaventem, Belgia) ja 1 mg WGA-SPA (nisuidu aglutiniini) terakeste (*Wheat germ agglutinin SPA Beads* firmalt Amersham/Pharmacia, Freiburg,

Saksamaa) juuresolekul, koguruumalas 250  $\mu$ l. Eelistatult kasutatakse inkubatsioonipuhvrina 50 mmol/l Tris-HCl, millele on lisatud 0,05 massiprotsenti naatriumasiidi ja 0,06 massiprotsenti veise seerumi albumiini. Mittespetsiifilise sidumise määramiseks lisatakse eelistatult täiendavalt 25  $\mu$ mol/l naloksooni. Pärast 5 90-minutilise inkubatsiooniaja lõppemist tsentrifugeeritakse mikrotiiterplaate eelistatult 20 minutit 1000 g juures ning radioaktiivsus määratakse  $\beta$ -loenduri abil (Microbeta-Trilux, PerkinElmer Wallac, Freiburg, Saksamaa). Määratakse radioaktiivse ligandi välja tõrjumise protsent (*percentage displacement*) selle sidumiskohalt inimese  $\mu$ -opiaadireseptoril testaine kontsentratsioonil, eelistatult 1  $\mu$ mol/l ja see näitab 10 spetsiifilise sidumise inhibitsiooniprotsenti (inhibitsiooni%). Testitavate ühendite erinevate kontsentratsioonide juures saadavate väljatõrjumisprotsentide alusel on võimalik arvutada  $IC_{50}$  inhibeerimiskontsentratsioonid, mille juures tõrjutakse välja 50% radioaktiivsest ligandist. Selle põhjal võib arvutada testainete  $K_i$ -väärtused, kasutades Cheng-Prusoffi valemit.

15 Leiutisekohastel ühenditel on  $K_i$  väärtus ORL1-retseptori suhtes eelistatult mitte suurem kui 500 nM, enameelistatult mitte suurem kui 100 nM, veel enam eelistatult mitte suurem kui 50 nM ja enimeelistatult mitte suurem kui 10 nM.

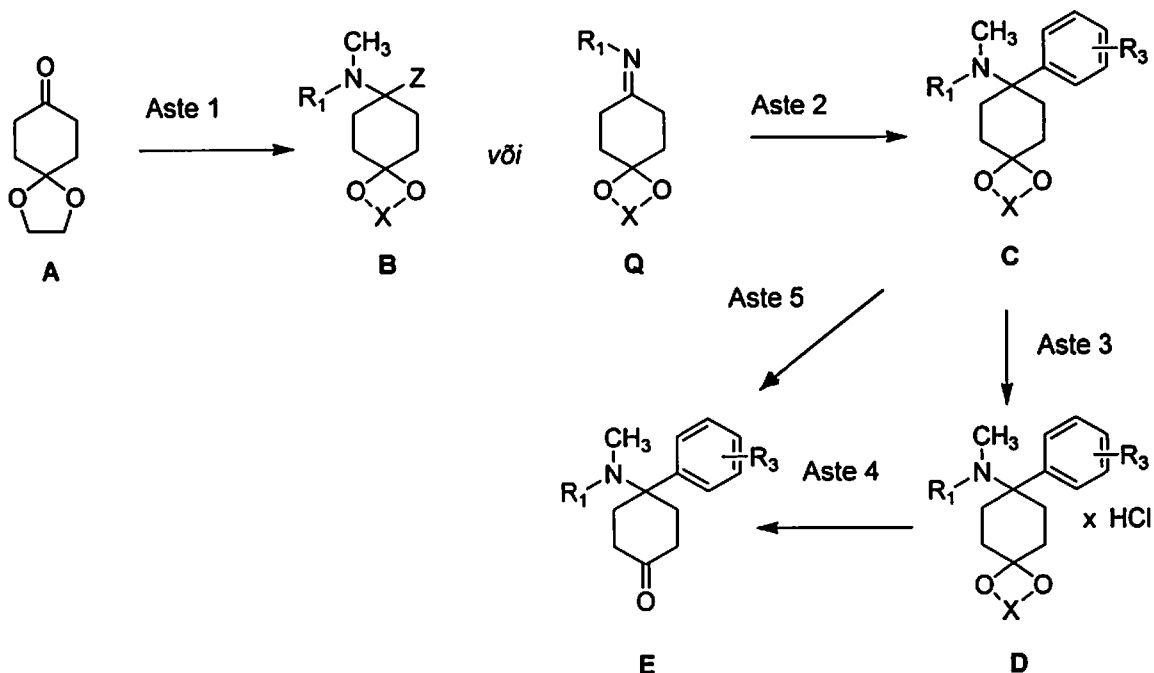
Meetodid  $K_i$ -väärtuse määramiseks ORL1-retseptori suhtes on antud valdkonna spetsialistile tuntud. Määramine viiakse eelistatult läbi retseptorile sidumise katses 20  $^3$ H-notsitseptiin/orfaniini FQ-ga rekombinantsete CHO-ORL1 rakkude membraanidel. See eksperiment (katse-süsteem) viiakse eelistatult läbi vastavalt Ardati jt. (Mol. Pharmacol., 51, 1997, lk 816-824) poolt loodud meetodile.  $^3$ H-notsitseptiin/orfaniini FQ kontsentratsioon on neis katsetes eelistatult 0,5 nM. Sidumiskatsed viiakse eelistatult läbi iga kord 20  $\mu$ g membraanvalguga iga 200  $\mu$ l 25 portsu kohta puhvrilahuses 50 mM HEPES, pH 7,4, 10 mM  $MgCl_2$  ja 1 mM EDTA-s. Sidumine ORL1-retseptorile määratakse eelistatult, kasutades iga kord 1 mg WGA-SPA terakesi (WGA-SPA Beads, Amersham-Pharmacia, Freiburg), inkubeerides partiid üks tund toatemperatuuril ja määrates seejärel seondumise ulatust Trilux stsintillatsioonloenduri abil (Wallac, Soome).



Sobivad meetodid leiutisekohaste ühendite sünteesimiseks on antud valdkonna spetsialistile põhimõtteliselt tuntud.

Allpool on kirjeldatud eelistatud sünteesiradu:

### Ketoon-struktuuriühikute E süntees:



#### 5 Aste 1 (ühendi B kaudu)

- Struktuurid üldvalemiga B võib valmistada ketoonide A reageerimisel amiinide ja happeliste reagentidega Z-H. Sobivateks reagentideks Z-H on näiteks vesiniktsüaniid, 1,2,3-triasool, bensotriasool või pürasool. Eriti eelistatud reaktsioonirajaks ühendite struktuuriga B saamiseks on ketoonide reageerimine metalli tsüaniididega ja vastava amiiniga mõne happe, eelistatult alkohollahuses, juuresolekul temperatuuridel -40 °C kuni 60 °C, eelistatult toatemperatuuri leelismetalli tsüaniidiga metanoolis. Järgmiseks eriti eelistatud reaktsioonirajaks ühendite struktuuriga B saamiseks on ketoonide reageerimine 1,2,3-triasooliga ja vastava amiiniga vett eemaldavates tingimustes, kasutades eelistatult veeseparaatorit, kõrgendatud temperatuuril, inertses lahustis või kasutades molekulaarsõela või mõnda muud kuivatavat vahendit. Analoogilisel viisil võib B-le

analoogseid struktuure saada, kasutades triasoolrühmade asemel bensotriasool- või pürasoolrühmi.

#### *Aste 1 (ühendi Q kaudu)*

5 Imiinide üldvalemiga Q valmistamine ketoonidest A on tuntud käesoleva tehnika tasemest.

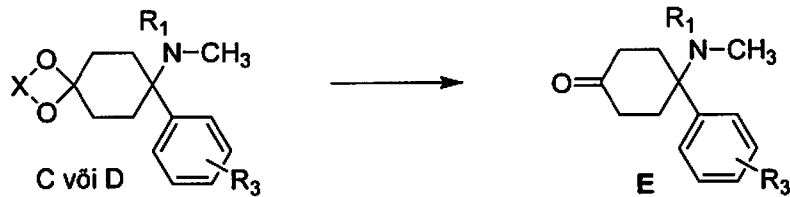
#### *Aste 2 (ühendi B kaudu)*

Üldiselt võib atsetaale C saada sobiva lahkuva rühma Z asendamisel struktuurides valemiga B. Sobivateks lahkuvateks rühmadeks on eelistatult tsüanorühmad; 1,2,3-triasool-1-üülrühmad. Järgmisteks sobivateks lahkuvateks rühmadeks on 1H-  
10 benso[d][1,2,3]triasool-1-üülrühmad ja pürasool-1-üülrühmad (Katritzky jt, Synthesis 1989, 66-69). Eriti eelistatud viisiks ühendite struktuuriga C saamiseks on aminonitriilide B (Z on CN) reageerimine vastavate metallorgaaniliste ühenditega, eelistatult Grignard'i ühenditega, eelistatult eetrites, eelistatult toatemperatuuril. Metallorgaanilised ühendid on kaubanduslikult kättesaadavad või võib neid  
15 valmistada vastavalt tehnika tasemest tuntud meetoditele. Järgmiseks eriti eelistatud viisiks ühendite struktuuriga C saamiseks on aminotriasoolide B (Z on triasool) reaktsioon vastavate metallorgaaniliste ühenditega, eelistatult Grignard'i ühenditega, eelistatult eetrites, eelistatult toatemperatuuril. Metallorgaanilised ühendid on kaubanduslikult kättesaadavad või võib neid valmistada vastavalt  
20 tehnika tasemest tuntud meetoditele.

#### *Aste 2 (ühendi Q kaudu)*

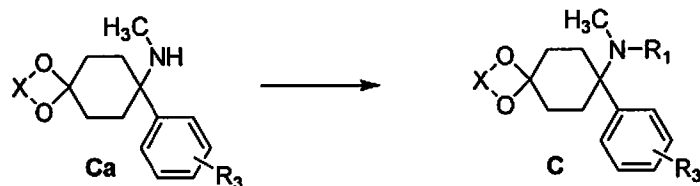
Aminoatsetaale C, millel on lämmastikuaatomi juures mitte rohkem kui üks asendaja, võib saada vastavalt meetoditele, mis on antud valdkonna spetsialistile  
25 põhimõtteliselt tuntud, lisades imiinidele Q süsiniknukleofiile, eelistatult lisades metallorgaanilisi ühendeid inertsetes lahustites, enameelistatult Grignard'i reaktiive või liitiumorgaanilisi ühendeid, eelistatult eetrites, eelistatult temperatuurivahemikul 100 °C kuni toatemperatuurini.

Aste 4/5:



Ühendeid üldvalemiga E võib saada vabastamise teel vastavatest atsetaalidest C või nende sooladest D vastavalt tehnika tasemest üldtuntud meetoditele, eemaldades hapete abil kaitserühmad. Seejuures on X valitud grupist: alküülrühm, arüülrühmaga alküül-/alkülideenrühm või alküülrühmaga (küllastatud/küllastamata) asendatud alkülideenrühm.

Ühendi C ( $R_1 \neq -H$ ) saamine Ca-st ( $R_1$  on  $-H$ )



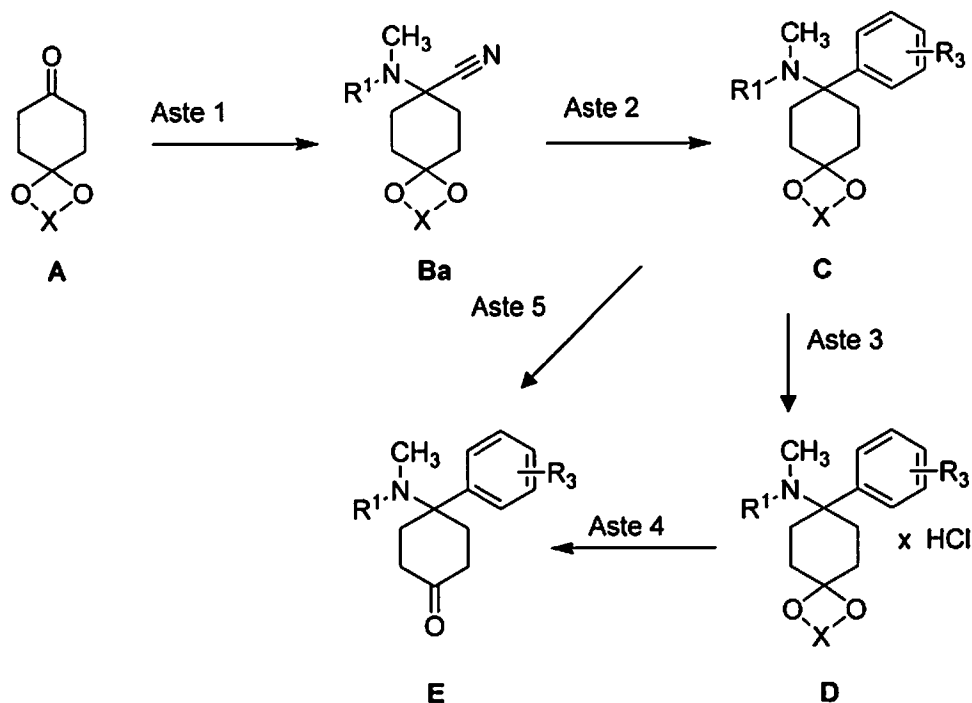
Aminoatsetaale Ca, millel on lämmastikuaatomi juures mitte rohkem kui üks asendaja, võib muundada vastavalt antud valdkonna spetsialistile põhimõtteliselt tuntud meetoditele, näiteks redutseerival amiinimisel vastavateks aminoatsetaalideks C, millel on lämmastikuaatomi juures üks või kaks täiendavat asendajat.

Aminonitrilli rada, imiini rada ja triasooli rada.

Vajalike ketooni vaheühendeid E võib valmistada näiteks vastavalt järgnevale kolmele rajale: (1) aminonitrilli rada, (2) imiini rada ja (3) triasooli rada.

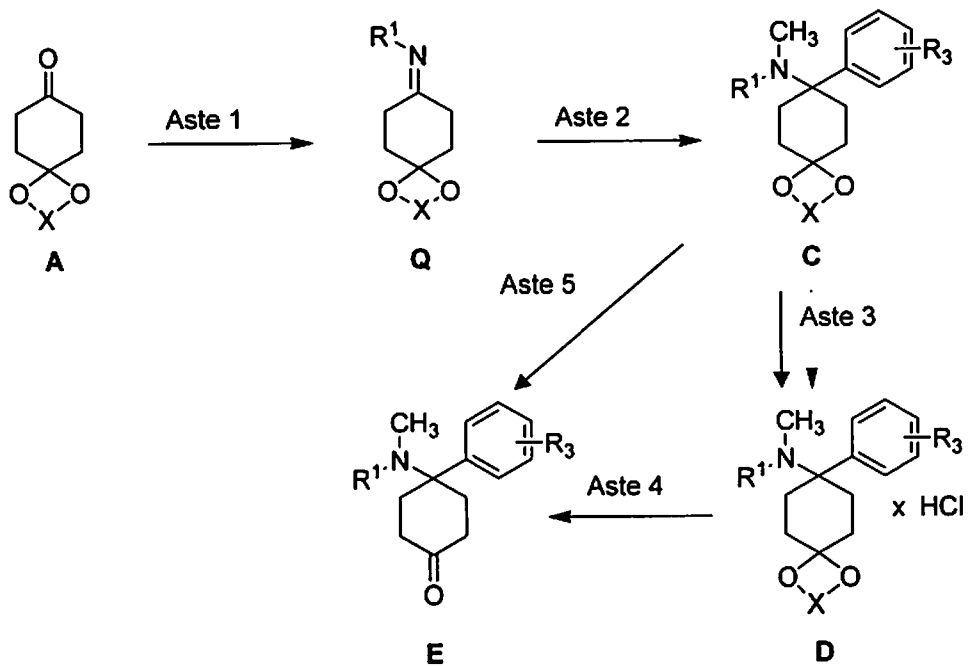
(1) Aminonitrilli rada:

Aminonitriili rajas sünteesitakse, nagu on kirjeldatud järgnevas sünteesiskeemis, ketooni prekursorist A aminonitriil Ba, mis muundatakse, kasutades nukleofiili MR3, struktuurivalemiteks C ja D ning edasi E-ks. Seda sünteesiviisi on juba kirjeldatud patendipublikatsioonis WO 2004/043967 ja kasutatud.



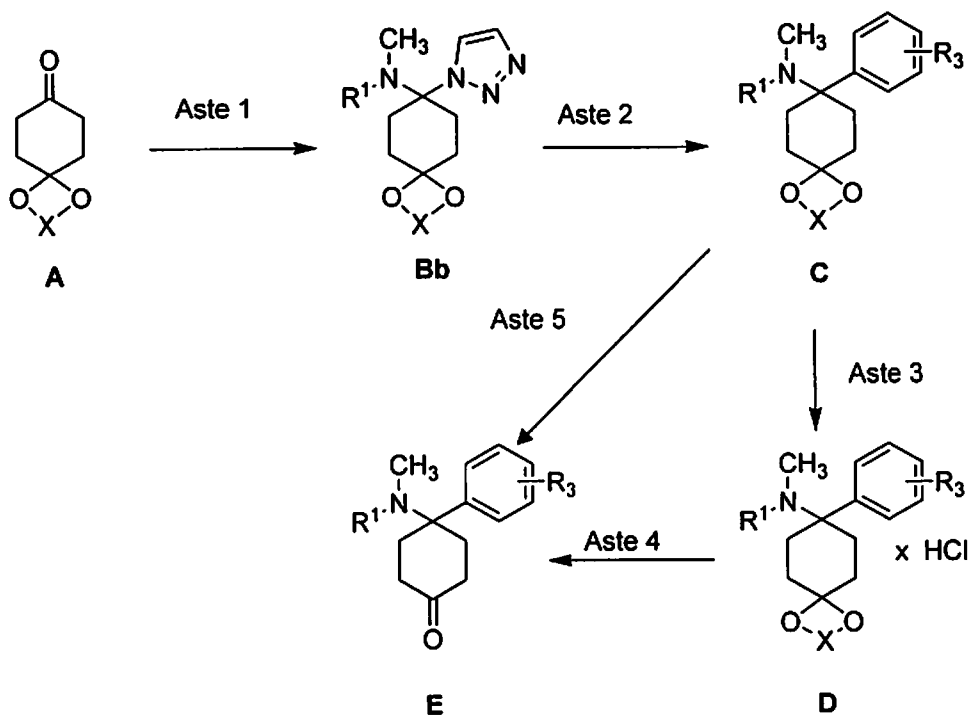
## 5 (2) Imiini rada:

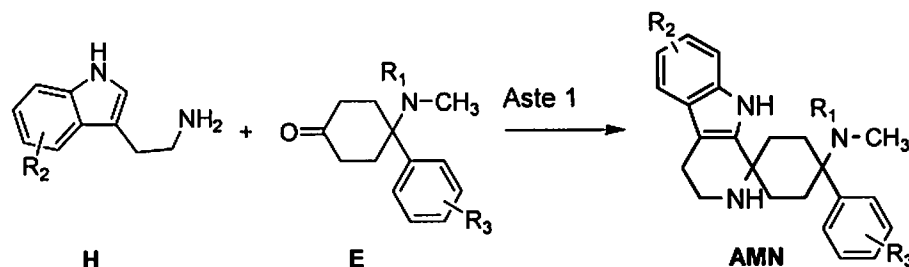
Imiini rajal sünteesitakse, nagu on kirjeldatud järgmisel skeemil, ketooni prekursorist A imiin Q, mis viiakse, kasutades nukleofiili MR3, üle struktuurivalemiteks C ja D ning edasi ühendiks E. Vajaliku imiinstruktuuri valemiga Q võib valmistada vastavalt selle valdkonna spetsialistile tuntud meetodile (Layer, Chem. Rev., 1963, 8, 489-510). Metallorgaaniliste ühendite MR3 lisamiseks imiinile Q kasutati, vajadusel, kirjandusest tuntud meetodeid (näiteks, Maddox jt, J. Med. Chem., 1965, 8, 230-235. Kudzma jt, J. Med. Chem., 1989, 32, 2534-2542). Astmed 3, 4 ja 5 viidi läbi analoogiliselt aminonitriili rajale.



## (3) Triasooli rada:

Triasooli rajas sünteesiti, nagu on kirjeldatud järgneval skeemil, ketooni prekursorist A triasool Bb, mis muundati edasi, kasutades nukleofiili MR3, struktuurivalemiteks C ja D ning edasi E-ks,. Tingimused võib leida toodud kirjandusviidetest: (a) Katritzky jt, *Synthesis*, 1992, 1295-1298; (b) Prashad jt, *Tetrahedron Lett.* 2005, 46, 5455-5458.



**Spiroamiinide (AMN) süntees**

H tüüpi trüptamiinid võib panna Pictet-Spengler'i tüüpi reaktsioonis reageerima ketoonidega E, lisades vähemalt ühte reagenti grupist: happed, happeanhüdriidid, estrid, nõrgalt happelise reaktsiooniga soolad või Lewise happed, et moodustada produktid valemiga AMN.

Eelistatult kasutatakse vähemalt ühte reagenti grupist, millesse kuuluvad: karboksüülhapped, fosforhapped või sulfoonhapped või nende anhüdriidid, karboksüülhapete trialküülsilüülestrid, happelise reaktsiooniga soolad (vesiniksoolad), mineraalhapped või Lewise happed, mis on valitud grupist:

10 boortrifluoriid, indium(III)kloriid, titaantetrakloriid, alumiinium(III)kloriid, või lisades vähemalt üht üleminekumetalli soola, eelistatult lisades vähemalt üht üleminekumetalli triflaati (üleminekumetalli trifluorometaansulfonaat), enameelistatult lisades vähemalt ühte üleminekumetalli sulfonaati, mis on valitud grupist, kuhu kuuluvad: skandium(III)trifluorometaansulfonaat, üterbium(III)-

15 trifluorometaansulfonaat ja indium(III)trifluorometaansulfonaat, vajaduse korral lisades tseliiti, tahkele faasile seotud reagente või reaktiive, kõrgendatud või alandatud temperatuuril, koos mikrolainekiirgusega või ilma selleta, vajaduse korral sobivates lahustites või lahustisegus, nagu näiteks klooritud või kloorimata, eelistatult aromaatsetes süsivesinikes, atsetonitriilis; eeterlahustites, eelistatult

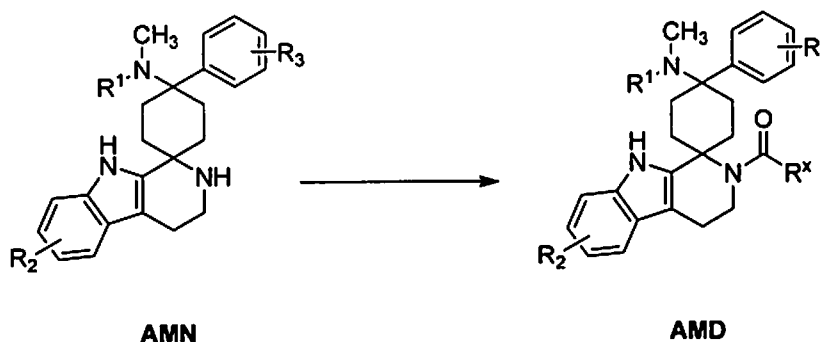
20 dietüületris või THF-s; või nitrometaanis, sobivail juhtudel ka alkoholides või vees. Eriti eelistatud on püridiin-para-tolueensulfonaadi, fosforpentoksiidi tseliidi juuresolekul, boortrifluorideteraadi, trifluoroäädikhappe, orto-titaanhappe tetraisopropüülestri koos trifluoroäädikhappega, trifluorometaansulfoonhappe trimetüülsilüülestri, trifluorometaansulfoonhappe, metaansulfoonhappe,

trifluoroäädikhappe, äädikhappe, fosforhappe, polüfosforhappe, polüfosfaatestrite, p-tolueensulfoonhappe, vesinikkloriidhappe HCl gaasina, väävelhappe koos atsetaatpuhvriga, tinatetrakloriidi kasutamine.

Omakorda kasutatakse eeslitatult järgnevas näidetes toodud tingimusi.

- 5 Ühendid üldvalemitega H ja E on kaubanduslikult kättesaadavad või võib neid valmistada vastavalt tehnika tasemest tuntud meetoditele või võib neid saada antud valdkonna spetsialistile tehnika tasemest tulenevalt, tuntud viisil. Sellega seoses on eriti asjakohased järgmised viited: Jirkovsky jt, *J. Heterocycl. Chem.*, 12, 1975, 937-940; Beck jt, *J. Chem. Soc. Perkin 1*, 1992, 813-822; Shinada jt, *Tetrahedron Lett.*, 39, 1996, 7099-7102; Garden jt, *Tetrahedron*, 58, 2002, 8399-8412; Lednicer jt, *J. Med. Chem.*, 23, 1980, 424-430; Bandini jt, *J. Org. Chem.* 67, 15; 2002, 5386 – 5389; Davis jt, *J. Med. Chem.* 35, 1, 1992, 177-184; Yamagishi jt, *J. Med. Chem.* 35, 11, 1992, 2085-2094; Gleave jt, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8, 10, 1998, 1231-1236; Sandmeyer, *Helv. Chim. Acta*; 2; 1919; 239; Katz jt, *J. Med. Chem.* 31, 6, 15 1988; 1244-1250; Bac jt, *Tetrahedron Lett.* 1988, 29, 2819; Ma jt, *J. Org. Chem.* 2001, 66, 4525; Kato jt, *J. Fluorine Chem.* 99, 1, 1999, 5-8.

### Spiroamiidide (AMD) süntees



- Ühendid üldvalemiga AMN võib panna reageerima karboksüülhapetega vähemalt ühes lahustis, mis on eelistatult valitud grupist: diklorometaan, atsetonitril, 20 dimetüülformamiid, dietüüleeter, dioksaan ja tetrahüdrofuraan, lisades vähemalt üht sidestusreagenti, mis on eelistatult valitud grupist, kuhu kuuluvad: karbonüüldiimidiasool (CDI), 2-kloro-1-metüülpüridiiniumjodiid (Mukaiyama reagent),

N-(3-dimetüülaminopropüül)-N'-etüülkarbodiimiid (EDCI), O-(bensotriasool-1-üül)-N,N,N',N'-tetrametüüluroonium-tetrafluoroboraat (TBTU), N,N'-ditsükloheksüülkarbodiimiid (DCC) ja 1-bensotriasoolüül-oksü-tris-(dimetüülamino)fosfoonium-heksafluorofosfaat (BOP), vajaduse korral vähemalt ühe anorgaanilise aluse juuresolekul, mis on eelistatult valitud grupist: kaalumkarbonaat ja tseesiumkarbonaat, või orgaanilise aluse juuresolekul, mis on eelistatult valitud grupist: trietüülamiin, diisopropüületüülamiin ja püridiin, ning vajaduse korral lisades 4-(dimetüülamino)püridiini või 1-hüdroksübensotriasooli, temperatuuridel eelistatult vahemikus 25 °C kuni 150 °C, vajaduse korral mikrolainekiirguse toimetel, et saada ühendid üldvalemiga AMD.

Ühendid üldvalemiga AMN võib panna reageerima happeahüdriidide ja karboksüülhapete kloriididega vähemalt ühes lahustis, mis on eelistatult valitud grupist: diklorometaan, atsetonitriil, dimetüülformamiid, dietüüleeter, dioksaan ja tetrahüdrofuraan, vajaduse korral vähemalt ühe anorgaanilise aluse juuresolekul, mis on eelistatult valitud grupist: kaalumkarbonaat ja tseesiumkarbonaat, või orgaanilise aluse juuresolekul, mis on eelistatult valitud grupist: trietüülamiin, diisopropüületüülamiin ja püridiin, ning vajaduse korral lisades 4-(dimetüülamino)püridiini või 1-hüdroksübensotriasooli, temperatuuridel eelistatult vahemikus 25 °C kuni 150 °C, vajaduse korral mikrolainekiirgusega, et saada ühendid üldvalemiga AMD.

Täiendavate detailide osas, mis puudutavad leiutisekohaste ühendite sünteesi, eriti selles osas, mis puudutab sobivate lähtestruktuuriühikute sünteesi, on viitena käesolevasse kaasatud kogu ulatuses järgmised patendipublikatsioonid: WO2004/043967, WO2005/063769, WO2005/066183, WO2006/018184, WO2006/108565, WO2007/124903 ja WO2008/009416. Antud valdkonna spetsialistidele on arusaadav, et leiutisekohaste ühendite sünteesimiseks sobivad lähtestruktuuriühikud võib valmistada analoogiliselt neis publikatsioonides avaldatud sünteesiskeemidele ja rakendusnäidetele.



Leiutisekohased ühendid toimivad näiteks ORL1- ja  $\mu$ -opioidretseptoritele, mis on relevantne seoses mitmete haigustega, seega sobivad nad toimeainena (ravimina) kasutamiseks farmatseutilises kompositsioonis.

5 Leiutis käsitleb lisaks farmatseutilist kompositsiooni, mis sisaldab füsioloogiliselt vastuvõetavat vehiiklit ja vähemalt üht leiutisekohast ühendit.

Eelistatult on leiutisekohane kompositsioon, mis

- on tahke, vedel või pastataoline; ja/või
  - sisaldab leiutisekohast ühendit koguses 0,001 massiprotsenti (edaspidi massi%) kuni 99 massi%, eelistatult 1,0 massi% kuni 70 massi% kompositsiooni kogumassist.
- 10

Leiutisekohane farmatseutiline kompositsioon võib vajaduse korral sisaldada sobivaid lisandeid ja/või abiaineid ja/või vajaduse korral täiendavaid toimeaineid.

Näideteks sobivatest füsioloogiliselt vastuvõetavatest vehiiklitest, lisanditest ja/või abiainetest on täiteained, lahustid, lahjendid, värvained ja/või sideained. Need ained on antud valdkonna spetsialistidele tuntud (vaata H. P. Fiedler, Lexikon der Hilfsstoffe für Pharmazie, Kosmetik und angrenzende Gebiete, Editio Cantor Aulendoff).

15

Leiutisekohane kompositsioon sisaldab leiutisekohast ühendit koguses eelistatult 0,001 massi% kuni 99 massi%, enameelistatult 0,1 massi% kuni 90 massi%, veelgi enam eelistatult 0,5 massi% kuni 80 massi%, enimeelistatult 1,0 massi% kuni 70 massi% ja kõige enam eelistatult 2,5 massi% kuni 60 massi% kogu kompositsiooni massist.

20

Leiutisekohane kompositsioon valmistatakse eelistatult süsteemseks, paikseks või lokaalseks manustamiseks, eelistatult oraalseks manustamiseks.

25 Edasi käsitleb leiutis farmatseutilist manustamisvormi (ravimvorm), mis sisaldab leiutisekohast farmatseutilist kompositsiooni.

Eelistatud teostuses valmistatakse selline leiutisekohane manustamisvorm, mis on mõeldud kaks korda päevas manustamiseks, üks kord päevas manustamiseks või harvemini kui üks kord päevas manustamiseks, eelistatult mitte rohkem kui üks kord päevas manustamiseks.

## 5 Manustamine toimub eelistatult süsteemselt, eriti oralselt.

Eelistatud teostuses sisaldab leiutisekohane manustamisvorm leiutisekohast ühendit nii väikeses koguses (annuses), et see ei ole märkimisväärselt toimiv (efektiivne) akuutse valu ravimisel. See annus on eelistatult vahemikus 1,0 µg kuni 10 mg, arvestatuna vaba aluse molekulmassi suhtes.

- 10 Eelistatult on annus 0,001 mg±50%, 0,002 mg±50%, 0,003 mg±50%, 0,004 mg±50%, 0,005 mg±50%, 0,006 mg±50%, 0,007 mg±50%, 0,008 mg±50%, 0,009 mg±50%, 0,01 mg±50%, 0,02 mg±50%, 0,03 mg±50%, 0,04 mg±50%, 0,05 mg±50%, 0,06 mg±50%, 0,07 mg±50%, 0,08 mg±50%, 0,09 mg±50%, 0,1 mg±50%, 0,15 mg±50%, 0,2 mg±50%, 0,25 mg±50%, 0,3 mg±50%,  
 15 0,35 mg±50%, 0,4 mg±50%, 0,45 mg±50%, 0,5 mg±50%, 0,55 mg±50%, 0,6 mg±50%, 0,65 mg±50%, 0,7 mg±50%, 0,75 mg±50%, 0,8 mg±50%, 0,85 mg±50%, 0,9 mg±50%, 0,95 mg±50%, 1 mg±50%, 1,5 mg±50%, 2 mg±50%, 2,5 mg±50%, 3 mg±50%, 3,5 mg±50%, 4 mg±50%, 4,5 mg±50%, 5 mg±50%, 5,5 mg±50%, 6 mg±50%, 6,5 mg±50%, 7 mg±50%, 7,5 mg±50%, 8 mg±50%,  
 20 8,5 mg±50%, 9 mg±50%, 9,5 mg±50% või 10 mg±50%, arvestatuna vaba aluse molekulmassi järgi.

- Enameelistatult on annus 0,001 mg±25%, 0,002 mg±25%, 0,003 mg±25%, 0,004 mg±25%, 0,005 mg±25%, 0,006 mg±25%, 0,007 mg±25%, 0,008 mg±25%, 0,009 mg±25%, 0,01 mg±25%, 0,02 mg±25%, 0,03 mg±25%, 0,04 mg±25%, 0,05 mg±25%, 0,06 mg±25%, 0,07 mg±25%, 0,08 mg±25%, 0,09 mg±25%, 0,1 mg±25%, 0,15 mg±25%, 0,2 mg±25%, 0,25 mg±25%, 0,3 mg±25%, 0,35 mg±25%, 0,4 mg±25%, 0,45 mg±25%, 0,5 mg±25%, 0,55 mg±25%, 0,6 mg±25%, 0,65 mg±25%, 0,7 mg±25%, 0,75 mg±25%, 0,8 mg±25%, 0,85 mg±25%, 0,9 mg±25%, 0,95 mg±25%, 1 mg±25%, 1,5 mg±25%, 2 mg±25%, 2,5 mg±25%, 3 mg±25%, 3,5

mg±25%, 4 mg±25%, 4,5 mg±25%, 5 mg±25%, 5,5 mg±25%, 6 mg±25%, 6,5 mg±25%, 7 mg±25%, 7,5 mg±25%, 8 mg±25%, 8,5 mg±25%, 9 mg±25%, 9,5 mg±25% või 10 mg±25%, arvestatuna vaba aluse molekulmassi järgi.

Enimeelistatult on annus 0,001 mg, 0,002 mg, 0,003 mg, 0,004 mg, 0,005 mg, 0,006 mg, 0,007 mg, 0,008 mg, 0,009 mg, 0,01 mg, 0,02 mg, 0,03 mg, 0,04 mg, 0,05 mg, 0,06 mg, 0,07 mg, 0,08 mg, 0,09 mg, 0,1 mg, 0,15 mg, 0,2 mg, 0,25 mg, 0,3 mg, 0,35 mg, 0,4 mg, 0,45 mg, 0,5 mg, 0,55 mg, 0,6 mg, 0,65 mg, 0,7 mg, 0,75 mg, 0,8 mg, 0,85 mg, 0,9 mg, 0,95 mg, 1 mg, 1,5 mg, 2 mg, 2,5 mg, 3 mg, 3,5 mg, 4 mg, 4,5 mg, 5 mg, 5,5 mg, 6 mg, 6,5 mg, 7 mg, 7,5 mg, 8 mg, 8,5 mg, 9 mg, 9,5 mg või 10 mg, arvestatuna vaba aluse molekulmassi järgi.

Eelistatud teostuses sisaldab leiutisekohane manustamisvorm leiutisekohast ühendit koguses 10 µg±90%, enameelistatult 10 µg±75%, veelgi enam eelistatult 10 µg±50%, enimeelistatult 10 µg±25% ja kõige enam eelistatult 10 µg±10%, arvestatuna vaba aluse molekulmassi järgi.

15 Teises eelistatud teostuses sisaldab leiutisekohane manustamisvorm leiutisekohast ühendit koguses 100 µg±90%, enameelistatult 100 µg±75%, veelgi enam eelistatult 100 µg±50%, enimeelistatult 100 µg±25% ja kõige enam eelistatult 100 µg±10%, arvestatuna vaba aluse molekulmassi järgi.

Järgmises eelistatud teostuses sisaldab leiutisekohane manustamisvorm 20 leiutisekohast ühendit koguses 250 µg±90%, enameelistatult 250 µg±75%, veelgi enam eelistatult 250 µg±50%, enimeelistatult 250 µg±25% ja kõige enam eelistatult 250 µg±10%, arvestatuna vaba aluse molekulmassi järgi.

Järgmises eelistatud teostuses sisaldab leiutisekohane manustamisvorm leiutisekohast ühendit koguses 500 µg±90%, enameelistatult 500 µg±75%, veelgi enam eelistatult 500 µg±50%, enimeelistatult 500 µg±25% ja kõige enam eelistatult 500 µg±10%, arvestatuna vaba aluse molekulmassi järgi.

Veel ühes eelistatud teostuses sisaldab leiutisekohane manustamisvorm leiutisekohast ühendit koguses  $750 \mu\text{g} \pm 90\%$ , enameelistatult  $750 \mu\text{g} \pm 75\%$ , veelgi enam eelistatult  $750 \mu\text{g} \pm 50\%$ , enimeelistatult  $750 \mu\text{g} \pm 25\%$  ja kõige enam eelistatult  $750 \mu\text{g} \pm 10\%$ , arvestatuna vaba aluse molekulmassi järgi.

- 5 Järgmises eelistatud teostuses sisaldab leiutisekohane manustamisvorm leiutisekohast ühendit koguses  $1000 \mu\text{g} \pm 90\%$ , enameelistatult  $1000 \mu\text{g} \pm 75\%$ , veelgi enam eelistatult  $1000 \mu\text{g} \pm 50\%$ , enimeelistatult  $1000 \mu\text{g} \pm 25\%$  ja kõige enam eelistatult  $1000 \mu\text{g} \pm 10\%$ , arvestatuna vaba aluse molekulmassi järgi.

- Leiutisekohast manustamisvormi võib manustada näiteks vedela ravivormina  
10 (e manustamisvormina) nagu süstelahusena, tilkade või ekstraktidena või pooltahkete ravivormidena nagu graanulite, tablettide, pillide, plaastrite, kapslite, plaastrite/pealepihustatavate plaastrite või aerosoolidena. Abiainete jt lisandite kogus ning nende kasutatavate koguste valik sõltub sellest, kas manustamisvormi manustatakse oraalselt, peroraalselt, parenteraalselt, intravenoosselt,  
15 intraperitoneaalselt, intradermaalselt, intramuskulaarselt, intranasaalselt, bukaalselt, rektaalselt või paiksel, näiteks nahale, limaskestadele või silma.

- Oraalseks manustamiseks sobivad manustamisvormid tablettide, dražeede, kapslite, graanulite, tilkade, ekstraktide ja siirupite kujul, ning lahused suspensioonid, kergesti rekonstrueeritavad kuivpreparaadid ning samuti ka spreid  
20 sobivad parenteraalseks, paikseks ja inhalatiivseks manustamiseks. Perkutaanseteks manustamispreparaatideks sobivad depoovormis, lahustatud kujul või plaastris olevad leiutisekohased üendid, vajaduse korral koos naha läbimist soodustavate vahenditega.

- Oraalselt või perkutaanselt manustatavad manustamisvormid võivad vabastada  
25 leiutisekohaseid ühendeid viivitusega. Leiutisekohaseid ühendeid võib manustada ka parenteraalselt pika-ajaliste (prolongeeritud toimega) depoovormidena nagu näiteks implantaadid või implanteeritud pumbad. Põhimõtteliselt võib

leiutisekohastesse manustamisvormidesse lisada ka teisi antud valdkonna spetsialistile tuntud täiendavaid toimeaineid.

Eelistatud teostuses vabastatakse leiutisekohased ühendid manustamisvormist koheselt (*immediate release*, IR), st vähemalt 80% toimeainest, mis oli algsest  
5 olemas, on 20 minuti pärast vabanenud *in vitro* tingimustel, mis eelistatult vastavad Ph. Eur.-le.

Üllatuslikult leiti, et leiutisekohased ühendid erinevad ebatavaliselt pika poolestusaja ( $t_{1/2}$ ) või farmakodünaamilise toime kestvuse poolest, nii et võrdlemisi harv manustamine on piisav, et saavutada farmakoloogilist efektiivsust ja vastavalt valu  
10 leevenemist, mis kestab võrdlemisi pikka aega.

Seetõttu ei ole leiutisekohaseid ühendeid viivitusega vabastavad manustamisvormid absoluutselt vajalikud, pika poolestusaja tõttu saavutatakse pikaajaline toime isegi kohese vabanemise (*immediate release*, IR) korral. Selliste manustamisvormide IR-omadustel on täiendavaid eeliseid, kuna vaatamata pikaajalisele efektiivsusele  
15 saavutatakse siiski toimeaine kiire omastamine ja vastavalt kiire farmakoloogilise efektiivsuse algus pärast esimest manustamist. Seega on IR-manustamisvormide omadused kombineeritud PR-manustamisvormide omadustega (PR, *prolonged release*, pikenenud vabanemisega).

Eelistatud teostuses on leiutisekohaseks manustamisvormiks toimeaine kohese vabastamisega (IR) manustamisvorm, mis sisaldab leiutisekohast ühendit, eelistatult üldvalemiga (V) või (VI) vaba alusena või füsioloogiliselt vastuvõetava soolana, eelistatult hüdrokloriidi, tsitraadi või pooltsitraadina ning mis valmistatakse eelistatult  
20 oraalseks manustamiseks mitte rohkem kui kord päevas, eelistatult täpselt üks kord päevas manustamiseks. Seejuures tähendab "kohese vabanemisega toimeaine", et  
25 *in vitro* tingimustes, eelistatult vastavalt Ph. Eur.-le, on vähemalt 80% algsest olemas olnud toimeainest 20 minuti pärast vabanenud.

Patsiendile manustatavate leiutisekohaste ühendite kogus varieerub sõltuvalt patsiendi kehakaalust, manustamisviisist, näidustusest ja haiguse raskusest.

Tavaliselt manustatakse vähemalt üht leiutisekohast ühendit koguses 0,00005 mg/kg kuni 50 mg/kg, eelistatult 0,001 mg/kg kuni 0,5 mg/kg, enameelistatult 1 mg/kg kuni 10 mg/kg.

- 5 Kõigi leiutisekohaste manustamisvormide ülaltoodud teostuste (rakenduste) jaoks on eriti eelistatud selline manustamisvorm, mis sisaldab lisaks vähemalt ühele leiutisekohasele ühendile veel üht täiendavat toimeainet.

- 10 ORL1-retseptor ja  $\mu$ -opioïdretseptor on seotud eelkõige valu tekkimisega. Vastavalt sellele võib leiutisekohaseid ühendeid kasutada niisuguse ravimi valmistamiseks, mis on mõeldud kroonilise valu, eelistatult neuropaatilise valu, enameelistatult mononeuropaatilise/neuralgilise või polüneuropaatilise valu, veelgi enam eelistatult herpesjärgse neuralgia või diabeetilise polüneuropaatia tulemusel tekkinud valu ravimiseks.

Järgnevad näited on mõeldud leiutist selgitamiseks, kuid neid ei tohi tõlgendada piiravatena.

- 15 Järgnevate näiteühendite stereokeemilises nomenklatuuris viitab "(E)" asendusele kaksiksideme juures, näiteks kaneelhappe derivaadis, ning "cis" ja "trans" viitavad vastavale asendusele tsükloheksüültoomas.

### **Indool-struktuuriühikute (H) süntees**

#### Struktuuriühik H-1:

- 20 2-(1H-indool-3-üül)etaanamiin (H-1)

Sünteesi ajal oli kommertsiaalselt kättesaadav firmalt Aldrich.

#### Struktuuriühik H-2:

2-(5-fluoro-1H-indool-3-üül)etaanamiin (H-2)

Sünteesi ajal oli kommertsiaalselt kättesaadav firmalt Fluorochem.

### **Ketoon-struktuuriühikute (E) süntees**

#### Struktuuriühik E-1:

Dimetüül(8-fenüül-1,4-dioksaspiro[4,5]dets-8-üül)amiin hüdrokloriid (D-1)

- 5 THF-s (210 ml) lahustatud aminonitriil B-1 (21 g, 0,1 mol) lisati 15 minuti jooksul argooni atmosfääris, jääga jahutades 1,82 M fenüülmagneesiumkloriidi lahusele THF-s (109 ml, 0,198 mol) ning segati seejärel 16 tundi toatemperatuuril. Reaktsioonisegu töötlemiseks lisati 150 ml küllastatud ammoniumkloriidi lahust, jahutades samal ajal jääga, ning ekstraheeriti dietüüleetriga (3 x 100 ml). Orgaanilist
- 10 faasi ekstraheeriti raputamisel veega (100 ml) ning küllastatud NaCl lahusega (100 ml) ning kontsentreeriti. Alles jäi kollane õli (25,2 g). Toorprodukt lahustati etüülmetüülketoonis (280 ml) ning lisati  $\text{ClSiMe}_3$  (18,8 ml, 0,15 mol), jahutades samal ajal jääga. Pärast 6-tunnilist reaktsiooni eraldati hüdrokloriid D-1 valge tahke ainaena saagisega 35% (10,5 g).

- 15 4-dimetüülamino-4-fenüültsükloheksanoon (E-1)

- Vesinikkloriid D-1 (10,5 g, 35,2 mmol) lahustati 7,5 N vesinikkloriidhappes (36 ml) ja segati 96 tundi toatemperatuuril. Kui hüdroolüüs oli lõppenud, ekstraheeriti reaktsioonisegu dietüüleetriga (2 x 50 ml). Jääga jahutades reguleeriti vesifaas 5 N naatriumhüdroksiidi lahusega leeliseliseks, ekstraheeriti diklorometaaniga
- 20 (3 x 50 ml) ja kontsentreeriti. Ketooni 6 võis seejärel eraldada kollase tahke ainaena, sulamistemperatuuriga 104-108 °C, saagisega 97% (7,4 g).

#### Struktuuriühik E-2:

##### *Variant 1:*

[8-(3-fluorofenüül)-1,4-dioksaspiro[4,5]dets-8-üül]dimetüülamiin hüdrokloriid (D-2)

Aminonitriili B-1 (19,8 g, 94 mmol) lahusele THF-s (100 ml) lisati 15 minuti jooksul, argooni atmosfääris ja jääga jahutades 0,5 M 3-fluorofenüülmagneesiumbromiidi lahust THF-s (3, 750 ml, 375 mmol) ning segati 16 tundi toatemperatuuril. Reaktsioonisegu töötlemiseks lisati jääga jahutades küllastatud ammooniumkloriidi lahust (150 ml) ja vett (60 ml) ning ekstraheeriti dietüüleetriga (3 x 100 ml). Orgaanilist faasi ekstraheeriti raputamisel veega (50 ml) ja küllastatud NaCl lahusega (50 ml) ning kontsentreeriti. Alles jäi pruun õli (26,5 g), mis lisaks fenüülühendile 4 sisaldas ka ketaali 2. Toorprodukt lahustati etüülmetüülketoonis (156 ml) ja lisati, jääga jahutades, ClSiMe<sub>3</sub> (17,8 ml, 141 mmol). Pärast 6-tunnilist reaktsiooni võis eraldada vesinikkloriidi D-2 valge tahke aine sulamistemperatuuriga 275-278 °C, saagisega 55% (16,3 g).

*Variant 2:*

[8-(3-fluorofenüül)-1,4-dioksaspiro[4,5]dets-8-üül]dimetüülamiin hüdrokloriid (e vesinikkloriid sool) (D-2)

15 Magneesiumi (694 mg, 28,6 mmol) suspensioonile absoluutses eetris (10 ml) lisati tilkhaaval 1-bromo-3-fluorobenseeni (5,00 g, 28,6 mmol) lahust absoluutses eetris (15 ml) nii, et eeter keeks. Kui lisamine oli lõppenud, segati 10 minutit toatemperatuuril, pärast mida oli magneesium täielikult lahustunud. Reaktsioonilahust jahutati jäävannis ja lisati tilkhaaval temperatuuril 10 °C aminonitriili B-1 (3,00 g, 14,3 mmol) absoluutses THF-s (30 ml). Segu segati üleöö toatemperatuuril; reaktsioonisegule lisati, jääga jahutades, 20% NH<sub>4</sub>Cl lahust (20 ml) ning vett (30 ml) ja ekstraheeriti eetriga (3 x 50 ml). Orgaanilist faasi pesti veega (50 ml) ja seejärel küllastatud NaCl lahusega (50 ml), kuivatati Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-ga ja kontsentreeriti vaakumis. Toorprodukt lahustati etüülmetüülketoonis (25 ml); lisati, jääga jahutades, ClSiMe<sub>3</sub> (3,2 ml, 25 mmol) ja segati 5 tundi toatemperatuuril. Saadud sade filtriti ja kuivatati vaakumis.

D-2 saagis: 2,8 g (62%)

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-D<sub>6</sub>): 1,91 (8 H, m); 2,54 (6 H, s); 3,91 (4 H, d); 7,37 (1 H, m); 7,61 (3 H, m).



*Variant 1:*

## 4-dimetüülamino-4-(3-fluorofenüül)tsükloheksanoon (E-2)

Hüdrokloriid D-2 (7,2 g, 22,75 mmol) lahustati vees (9,6 ml); lisati kontsentreeritud vesinikkloriidhapet (14 ml, 455 mmol) ja segati 4 päeva toatemperatuuril. Kui hüdrolüüs oli lõppenud, ekstraheeriti reaktsioonisegu dietüüleetriga (2 x 50 ml) ja vesifaas reguleeriti, jääga jahutades, 5 N naatriumhüdroksiidi lahusega leeliseliseks, mille käigus sadenes produkt välja. Ketooni E-2 võis eraldada kollase tahke aina sulamistemperatuuriga 83-88 °C saagisega 50% (6,05 g).

*Variant 2:*

## 10 4-dimetüülamino-4-(3-fluorofenüül)tsükloheksanoon (E-2)

Hüdrokloriid D-2 (2,80 g, 8,86 mmol) lahustati vees (3,7 ml); lisati kontsentreeritud vesinikkloriidhapet (5,5 ml) ja segati 4 päeva toatemperatuuril. Kui hüdrolüüs oli lõppenud, ekstraheeriti reaktsioonisegu eetriga (2 x 10 ml), vesilahus reguleeriti, jääga jahutades, 5 N naatriumhüdroksiidi lahusega leeliseliseks, reaktsioonisegu ekstraheeriti diklorometaaniga (3 x 50 ml) ja orgaaniline faas kuivatati naatriumsulfaadiga ning kontsentreeriti vaakumis. Toorprodukt puhastati flash-kromatograafia abil CHCl<sub>3</sub>/MeOH-ga (20:1).

E-2 saagis: 676 mg (32%), värvitu tahke aine

Sulamistemperatuur: 62–67 °C

20 <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-D<sub>6</sub>): 2,02 (6 H, s); 2,12 (5 H, m); 2,45 (3 H, m); 7,24 (3 H, m); 7,43 (1 H, m).

Struktuuriühik E-3:

## [8-(4-fluorofenüül)-1,4-dioksaspiro[4,5]dets-8-üül]dimetüülamiin hüdrokloriid (D-3)

25 Aminonitriili lahusele B-1 (10,5 g, 50 mmol) THF-s (150 ml) lisati 15 minuti jooksul, argooni atmosfääris ja jääga jahutades 1 M 4-fluorofenüülmagneesiumbromiidi lahust THF-s (3, 125 ml, 125 mmol) ja segati 16 tundi toatemperatuuril. Reaktsioonisegu töötlemiseks lisati, jääga jahutades, küllastatud ammooniumkloriidi

lahust (37 ml) ning vett (50 ml) ja ekstraheeriti dietüületriga (3 x 100 ml). Orgaanilist faasi ekstraheeriti raputamisel veega (50 ml) ja küllastatud NaCl lahusega (50 ml) ning kontsentreeriti. Alles jäi pruun õli (12,55 g), mis sisaldas lisaks fenüülühendile C-3 ka ketaali B-1. Toorprodukt lahustati etüülmetüülketoonis (75 ml) ja lisati jääga jahutades  $\text{ClSiMe}_3$  (9,5 ml, 75 mmol). Pärast 6-tunnilist reaktsiooni võis eraldada vesinikkloriidi D-3 valge tahke aina saagisega 47% (7,48 g).

#### 4-dimetüülamino-4-(4-fluorofenüül)tsükloheksanoon (E-3)

Hüdrokloriid D-3 (7,2 g, 22,75 mmol) lahustati vees (9,6 ml); lisati kontsentreeritud vesinikkloriidhapet (14 ml, 455 mmol) ja segati 4 päeva toatemperatuuril. Kui hüdrolüüs oli lõppenud, ekstraheeriti reaktsioonisegu dietüületriga (2 x 50 ml) ja jääga jahutades reguleeriti vesifaas 5 N naatriumhüdrosiidi lahusega leeliseliseks, ekstraheeriti diklorometaaniga (3 x 50 ml) ning kontsentreeriti. Ketooni E-3 võis eraldada kollase tahke aina sulamistemperatuuriga 128-133 °C saagisega 76% (4,05 g).

#### Struktuuriühik E-4:

#### Dimetüül-(8-tiofeen-2-üül-1,4-dioksaspiro[4,5]dets-8-üül)amiin hüdrokloriid (D-4)

2-jodotiofeen (1, 22,9 g, 109 mmol) lahustati, argooni atmosfääris, THF-s (80 ml) ja lisati temperatuuril 0 °C 30 minuti jooksul 2 M isopropüülmagneesiumkloriidi (2, 35,7 ml, 72 mmol) THF-s. Pärast 1-tunnilist reaktsiooni temperatuuril 3-5 °C lisati tetrahüdrofuraanis (20 ml) lahustatud aminonitriili B-1 (10 g, 47,6 mmol) ja segati 20 tundi toatemperatuuril. Segu töötlemine viidi läbi küllastatud  $\text{NH}_4\text{Cl}$  lahuse lisamise (85 ml) ja dietüületriga ekstraheerimise (3 x 100 ml) abil. Orgaanilist faasi ekstraheeriti raputamisel veega (50 ml) ja küllastatud NaCl lahusega (50 ml) ning kontsentreeriti. Oli võimalik saada tumepruun õli (21,3 g), mis sisaldas lisaks soovitud ketaalile, aminonitriili B-1 ja 2-jodotiofeeni. Toorprodukt lahustati etüülmetüülketoonis (140 ml) ja lisati  $\text{ClSiMe}_3$  (9,1 ml, 71,4 mmol). Pärast 6-tunnilist

reaktsiooni eraldati vesinikkloriid D-4 valge kristallilise ühendina saagisega 60% (8,74 g).

#### 4-dimetüülamino-4-tiofeen-2-üültsükloheksanoon (E-4)

5 Hüdrokloriid D-4 (8,68 g, 28,6 mmol) lahustati 7,5 N vesinikkloriidhappes (29 ml) ja segati 48 tundi toatemperatuuril. Kui hüdrolüüs oli lõppenud, ekstraheeriti reaktsioonisegu dietüüleetriga (2 x 50 ml). Jääga jahutades reguleeriti vesifaas 5 N naatriumhüdrosiidi lahusega leeliseliseks, ekstraheeriti diklorometaaniga (3 x 50 ml) ning kontsentreeriti. Ketoon E-4 saadi kollase tahke aienena sulamistemperatuuriga 108-110 °C, saagisega 89% (5,66 g).

#### 10 Struktuuriühik E-5:

#### N,N-dimetüül-8-(tiofeen-3-üül)-1,4-dioksaspiro[4,5]dekaan-8-amiin (D-5)

3-jodotiofeen (1, 5 g, 23,8 mmol) lahustati, argooni atmosfääris, THF-s (18 ml) ja lisati 8 minuti jooksul temperatuuril 0 °C 2 M isopropüülmagneesiumkloriidi (2, 7,8 ml, 15,5 mmol) THF-s. Pärast 1-tunnilist reaktsiooni temperatuuril 3-5 °C, lisati 15 tetrahüdrofuraanis (20 ml) lahustatud aminonitriil B-1 (2, 16 g, 10,3 mmol). Segati 20 tundi toatemperatuuril. Segu töötlemine viidi läbi küllastatud NH<sub>4</sub>Cl lahuse lisamise (20 ml) ja dietüüleetriga ekstraheerimise (3 x 50 ml) abil. Orgaanilist faasi ekstraheeriti raputamisel veega (20 ml) ja küllastatud NaCl lahusega (20 ml) ning kontsentreeriti. Saadi helepruun õli (3,95 g). Toorprodukt lahustati 20 etüülmetüülketoonis (40 ml) ja lisati ClSiMe<sub>3</sub> (1,95 ml, 15,5 mmol). Pärast 3-tunnilist reaktsiooni võis eraldada soovitud hüdrokloriidi valge kristallilise ühendina saagisega 60% (1,86 g) sulamistemperatuuriga 250-251 °C.

#### 4-(dimetüülamino)-4-(tiofeen-3-üül)tsükloheksanoon (E-5)

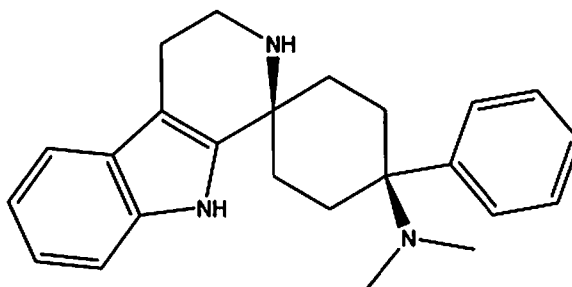
25 Hüdrokloriid D-5 (1,8 g, 5,9 mmol) lahustati 7,5 N vesinikkloriidhappes (7 ml) ja segati 48 tundi toatemperatuuril. Kui hüdrolüüs oli lõppenud, ekstraheeriti reaktsioonisegu dietüüleetriga (2 x 30 ml); jääga jahutades reguleeriti vesifaas 5 N

naatriumhüdrosiidi lahusega leeliseliseks, ekstraheeriti diklorometaaniga (3 x 30 ml) ning kontsentreeriti. Ketooni E-5 võis eraldada kollase tahke aina sulamistemperatuuriga 147-150 °C, saagisega 98% (1,27 g).

### Spiroamiin-struktuuriühikute (AMN<sup>cis</sup> / AMN<sup>trans</sup>) süntees

#### 5 Võrdlusnäide AMN-1<sup>cis</sup>:

2',3',4',9'-tetrahüdron-N,N-dimetüül-4-(fenüül)-spiro[tsükloheksaan-1,1'(1'H)-pürido[3,4-b]indool]-4-amiin (cis-diastereoisomeer)



*Märkus:* Vastavalt sellele meetodile saadi peamiselt cis-produkt AMN-1<sup>cis</sup>. Trans-produkt AMN-1<sup>trans</sup> saadi ainult kõrvalproduktina või mittepuhtal kujul.

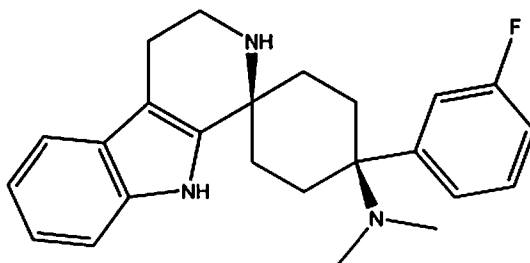
- 10 Ketooni E-1 (3,26 g, 15 mmol) ja trüptamiin H-1 (2,4 g, 15 mmol) lahustati kuivas MeOH-s (100 ml) ilma hapniku juurdepääsuta. Sellele segule lisati naatriumsulfaati (3 g). Pärast 17-tunnilist reaktsiooni destilleeriti lahusti rotatsioonaurutis pealt ära ja jääk võeti üles 1,2-dikloroetaanis (100 ml). Reaktsioonisegule lisati trifluoroäädikhapet (15 ml) ja segati 1 tund toatemperatuuril. Reaktsiooni kulgemist
- 15 jälgiti TLC abil. Töötlemiseks lisati segule H<sub>2</sub>O (40 ml) ja pH reguleeriti NaOH-ga (5 mol/l) väärtuseni 11. Valge tahke aine sadestati ja vaakumfilteeriti läbi klaasfiltri. Tahket ainet pesti H<sub>2</sub>O-ga (3 x 5 ml) ja kuivatati. See oli cis-produkt AMN-1<sup>cis</sup>, mis saadi valge tahke aina sulamistemperatuuriga 214-218 °C, saagisega 4 g (74%). Emalahust (vesifaasi) ekstraheeriti 1,2-dikloroetaaniga (3 x 25 ml). Orgaaniline faas
- 20 kuivatati Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-ga ning kontsentreeriti. Tahke pruun jääk ümberkristalliseeriti MeOH-st (10 ml) ja saadi cis-AMN-1<sup>cis</sup> ja trans-AMN-1<sup>trans</sup> spiroamiinide segu (1:1). Segu saadi valge tahke aina saagisega 940 mg (17%).

$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{DMSO-D}_6$ ): 1,61 (m, 2 H) 1,63 (m, 2 H) 1,92 (s, 6 H) 2,12 (m, 2 H) 2,39 (m, 2 H) 2,53 (t,  $J = 5,36$  Hz, 2 H) 2,99 (t,  $J = 5,35$  Hz, 2 H) 6,86 (m, 1 H) 6,91 (m, 1 H) 7,16 (d,  $J = 7,52$  Hz, 1 H) 7,28 (d,  $J = 7,52$  Hz, 1 H) 7,31 (m, 1 H) 7,43 (m, 4 H) 10,21 (s, 1 H)

5

Võrdlusnäide AMN-2<sup>cis</sup>.

2',3',4',9'-tetrahüdرو-N,N-dimetüül-4-(3-fluorofenüül)-spiro[tsükloheksaan-1,1'(1'H)-pürido[3,4-b]indool]-4-amiin (cis-diastereoisomeer)

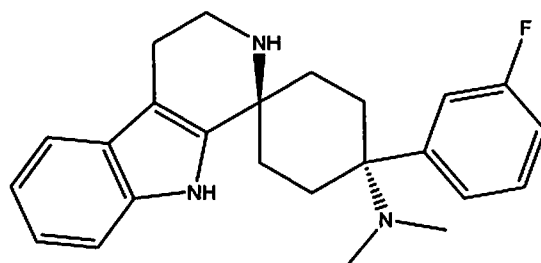


Ketoon E-2 (4,71 g, 20 mmol) ja trüptamiin H-1 (3,2 g, 20 mmol) lahustati kuivas  
 10 MeOH-s (200 ml), argooni atmosfääris. Pärast 24-tunnilist reaktsiooni destilleeriti  
 MeOH pealt ära ja kollane, õline jääk suspendeeriti 1,2-dikloroetaanis (200 ml).  
 Reaktsioonisegule lisati trifluoroäädikhapet (20 ml) ja segati 2 tundi  
 toatemperatuuril. Reaktsiooni kulgemist jälgiti TLC abil. Töötlemiseks lahjendati  
 segu  $\text{H}_2\text{O}$ -ga (100 ml) ja reguleeriti pH NaOH-ga (5 mol/l) väärtuseni 11. Pärast  
 15 etüülatsetaadi (50 ml) lisamist sadestati valge tahke aine segamise abil ja  
 vaakumfilteriti läbi klaasfiltrit. Tahket ainet pesti  $\text{H}_2\text{O}$ -ga (3 x 25 ml) ja seejärel  
 kuivatati. See oli cis-diastereoisomeer AMN-2<sup>cis</sup>, mis saadi valge tahke aine  
 sulamistemperatuuriga 220-225 °C, saagisega 5,5 g (73%).

$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{DMSO-D}_6$ ): 1,61 (m, 2 H) 1,62 (m, 2 H) 1,93 (s, 6 H) 2,11 (m,  
 20 2 H) 2,38 (m, 2 H) 2,53 (t,  $J = 5,56$  Hz, 2 H) 2,99 (t,  $J = 5,56$  Hz, 2 H) 6,87 (m, 1 H)  
 6,92 (m, 1 H) 7,14 (m, 1 H) 7,17 (d,  $J = 8,34$  Hz, 1 H) 7,20 (m, 1 H) 7,25 (d,  $J = 7,82$   
 Hz, 1 H) 7,28 (d,  $J = 7,47$  Hz, 1 H) 7,47 (m, 1 H) 10,26 (s, 1 H)

Võrdlusnäide AMN-2<sup>trans</sup>.

2',3',4',9'-tetrahüdرو-N,N-dimetüül-4-(3-fluorofenüül)-spiro[tsükloheksaan-1,1'(1'H)-  
 25 pürido[3,4-b]indool]-4-amiin (trans-diastereoisomeer)



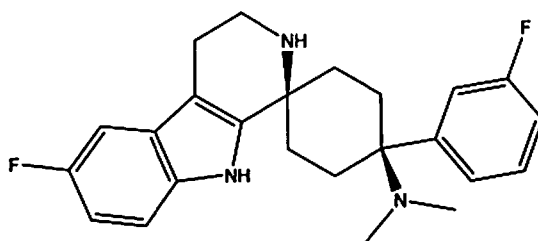
Trüptamiin H-1 (2,03 g, 12,7 mmol) ja ketoon (E-2, 3,0 g, 12,7 mmol) lahustati absoluutses metanoolis (130 ml) ja segati 16 tundi toatemperatuuril, argooni atmosfääris. Seejärel reaktsioonisegu kontsentreeriti. Jääk lahustati absoluutses 1,2-dikloroetaanis (130 ml); lisati kiiresti trifluoroäädikhapet (12,7 ml) ja segati 2 tundi toatemperatuuril. Jääga jahutades lisati vett (120 ml) ja 5 N naatriumhüdrosiidi lahust (40 ml) ning segati 1 tund. Seejuures moodustunud värvitu tahke aine eraldati filtrimisel ja pesti 1,2-dikloroetaaniga (30 ml) ning veega (4 x 25 ml). Cis-spiroamiin AMN-2<sup>cis</sup> saadi saagisega 77% (3,7 g) trans-spiroamiin AMN-2<sup>trans</sup> jälgedega. Filtraadi faasid eraldati. Orgaaniline faas kuivatati naatriumsulfaadiga ning kontsentreeriti, lisati metanool (3 ml) ja segati 1 tund toatemperatuuril. Valge tahke aine sadestati ja eraldati filtrimisel ning pesti metanooliga (4 x 3 ml). The trans-spiroamiin AMN-2<sup>trans</sup> saadi saagisega 5% (250 mg) cis-spiroamiini AMN-2<sup>cis</sup> jälgedega. Pärast puhastamist kromatograafia abil [silikageel 60 (20 g); metanool (200 ml)], saadi trans-spiroamiin AMN-2<sup>trans</sup> (170 mg) sulamistemperatuuriga 296-299 °C.

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>): 1,55 (m, 2 H) 1,62 (m, 2 H) 1,88 (s, 6 H) 2,26 (m, 2 H) 2,43 (m, 2 H) 2,55 (t, J = 5,49 Hz, 2 H) 2,96 (t, J = 5,25 Hz, 2 H) 6,91 (m, 1 H) 6,99 (m, 1 H) 7,08 (m, 1 H) 7,14 (m, 1 H) 7,20 (d, J = 7,64 Hz, 1 H) 7,32 (m, 2 H) 7,40 (m, 1 H) 10,63 (s, 1 H)

## 20 Võrdlusnäide AMN-3<sup>cis</sup>:

6'-fluoro-2',3',4',9'-tetrahüdرو-N,N-dimetüül-4-(3-fluorofenüül)-spiro[tsükloheksaan-1,1'(1'H)-pürido[3,4-b]indool]-4-amiin (cis-diastereoisomeer)

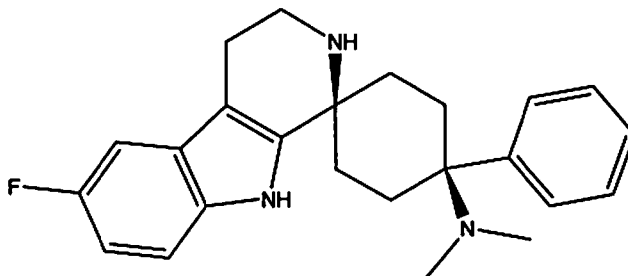
46



- Ketoon E-2 (9,6 g, 41,2 mmol) ja fluorotrüptamiin H-2 (7,3 g, 41,2 mmol) lahustati etanoolis (200 ml) ja kuumutati 12 tundi tagasivoolul. Etanool destilleeriti seejärel pealt ära ja toorprodukt suspendeeriti 1,2-dikloroetaanis (100 ml). Reaktsioonisegule lisati trifluoroäädikhapet (90 ml) ja segati 12 tundi
- 5 toatemperatuuril. Reaktsiooni kulgemist jälgiti TLC abil. Töötlemiseks viidi segu 500 ml 1 N NaOH lahusega temperatuuril 0 °C aluseliseks ja seejärel ekstraheeriti 3x 500 ml etüülatsetaadiga. Ühendatud orgaanilised faasid kuivatati magneesiumsulfaadiga ning kontsentreeriti vähendatud rõhul. Pärast metanooli (100 ml) lisamist sadestati valge tahke aine segamise abil ja vaakumfilteriti läbi
- 10 klaasfiltrit. Tahket ainet pesti metanooliga (2 x 25 ml) ja seejärel kuivatati. See oli cis-diastereoisomeer AMN-3<sup>cis</sup>, mis saadi valge tahke aine saagisega 3,6 g (22%).
- <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-D<sub>6</sub>, 400 MHz): δ 10,39 (s, 1H), 7,44-7,49 (m, 1H), 7,11-7,24 (m, 4H), 7,00-7,04 (m, 1H), 6,72-6,78 (m, 1H), 2,95-2,98 (t, 2H), 2,48-2,50 (m, 1H), 2,36-2,39 (d, 2H), 1,98- 2,11 (m, 2H), 1,91 (s, 6H), 1,51-1,67 (m, 5H)
- 15 MS m/z (M+1): 396,4; Puhtus (HPLC): 95,03%

Võrdlusnäide AMN-4<sup>cis</sup>:

6'-fluoro-2',3',4',9'-tetrahydro-N,N-dimetüül-4-(fenüül)-spiro[tsükloheksaan-1,1'(1'H)-pürido[3,4-b]indool]-4-amiin (cis-diastereoisomeer)



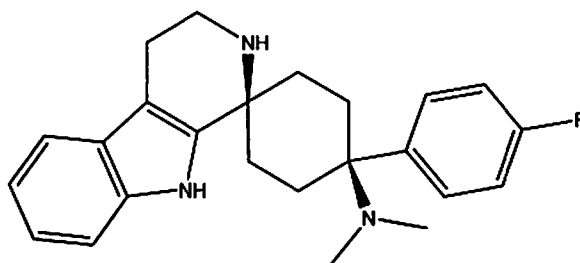
- Ketoon E-1 (8,4 g, 47 mmol) ja fluorotrüptamiin H-2 (10,2 g, 47 mmol) lahustati etanoolis (200 ml) ja kuumutati 12 tundi tagasivoolul. Etanool destilleeriti seejärel
- 20

pealt ära ja toorprodukt suspendeeriti 1,2-dikloroetaanis (120 ml). Reaktsioonisegule lisati trifluoroäädikhapet (100 ml) ja segati 12 tundi toatemperatuuril. Reaktsiooni kulgemist jälgiti TLC abil. Töötlemiseks viidi segu 1 N NaOH lahusega temperatuuril 0 °C aluseliseks ja seejärel ekstraheeriti 3 x 500 ml etüülatsetaadiga. Ühendatud orgaanilised faasid kuivatati magneesiumsulfaadiga ning kontsentreeriti vähendatud rõhul. Pärast metanooli (100 ml) lisamist sadestati valge tahke aine segamise abil ja vaakumfilteriti läbi klaasfiltri. Tahket ainet pesti metanooliga (2 x 25 ml) ja seejärel kuivatati. See oli cis-diastereoisomeer AMN-4<sup>cis</sup>, mis saadi valge tahke aine saagisega 4 g (28%).

- 10 <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-D<sub>6</sub>, 400 MHz): δ 10,36 (s, 1H), 7,45-7,42 (t, 4H), 7,32-7,29 (m, 1H), 7,14-7,10 (m, 1H), 7,03-7,00 (m, 1H), 6,76-6,71 (m, 1H), 2,99-2,96 (t, 2H), 2,40-2,37 (d, 2H), 2,13-2,04 (m, 2H), 1,91 (s, 6H), 1,88 (s, 1H), 1,65-1,54 (m, 4H), 1,23 (s, 1H).

Võrdlusnäide AMN-5<sup>cis</sup>:

- 15 2',3',4',9'-tetrahüdرو-N,N-dimetüül-4-(4-fluorofenüül)-spiro[tsükloheksaan-1,1'(1'H)-pürido[3,4-b]indool]-4-amiin (cis-diastereoisomeer)



- Ketoon E-3 (2800 mg, 11,90 mmol) ja trüptamiin (H-1, 1910 mg, 11,90 mmol) lahustati, argooni atmosfääris, kuivas metanoolis (119 ml) ja segati 18 tundi. Metanool destilleeriti seejärel vaakumis pealt ära ja jääk suspendeeriti 1,2-dikloroetaanis (119 ml). Reaktsioonisegule lisati trifluoroäädikhapet (11,9 ml) ja segati 2 tundi toatemperatuuril. Seejärel lahjendati reaktsioonisegu 1,2-dikloroetaaniga (119 ml) ja reguleeriti pH 1 N naatriumhüdroksiidi lahusega, jääga jahutades, väärtuseni 11. Moodustus kahvatu sade. Segu segati üleöö toatemperatuuril. Sade vaakumfilteriti, pesti veega ja kuivatati vaakumis. Cis-diastereoisomeeri AMN-5<sup>cis</sup> (s.p. 249-250 °C, mõningail juhtudel 225-230 °C)



eraldati saagisega 80% (3610 mg, 9,56 mmol). Faasid eraldati. Orgaaniline faas kuivatati naatriumsulfaadiga, filtriti ja vabastati lenduvatest komponentidest vaakumis. Kahvatu jääk (trans-dia stereoisomeer AMN-5<sup>trans</sup>) võeti üles metanoolis (5 ml) ja segati 48 tundi. Sade filtriti ja kuivatati vaakumis. Trans-dia stereoisomeeri

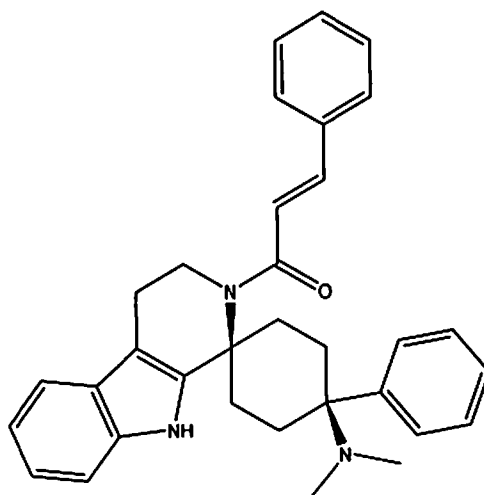
5 AMN-5<sup>trans</sup> (268-271 °C) eraldati saagisega 6% (279 mg, 0,74 mmol).

<sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H}-NMR (101 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>) δ ppm: 22,8 (1 C), 27,3 (2 C), 32,6 (2 C), 37,8 (2 C), 38,6 (1 C), 51,2 (1 C), 60,5 (1 C), 106,7 (1 C), 110,8 (1 C), 114,2 (2 C, d, J = 21 Hz), 117,2 (1 C), 117,9 (1 C), 120,0 (1 C), 126,9 (1 C), 129,7 (2 C, d, J = 8 Hz), 132,8 (1 C, d, J = 3 Hz), 135,4 (1 C), 141,4 (1 C), 160,7 (1 C, d, J = 242 Hz)

## 10 Cis-spiroamiidnäidete (AMD<sup>cis</sup>) süntees

### Näide AMD-1<sup>cis</sup>:

(E)-2',3',4',9'-tetrahüdron-N,N-dimetüül-4-fenüül-2'-(2-fenüülvinüül)karbonüülspiro-[tsükloheksaan-1,1'(1'H)-pürido[3,4-b]indool]-4-amiin metaansulfonaat (1:1) (cis-dia stereoisomeer)



15 AMN-1<sup>cis</sup> lahustati THF-s (8 ml). Seejärel lisati kaneelhape kloriidi (254 mg, 1,53 mmol) ja diisopropüületüülamiini (216 mg, 1,67 mmol) ning segati 2 päeva toatemperatuuril. Kui reaktsioon oli lõppenud, tahke aine filtriti ja filtraadile lisati Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> küllastatud lahust. Vesifaas ekstraheeriti kolm korda, igal korral 10 ml etüülatsetaadiga. Seejärel kuivatati orgaaniline faas MgSO<sub>4</sub>-ga ning kontsentreeriti

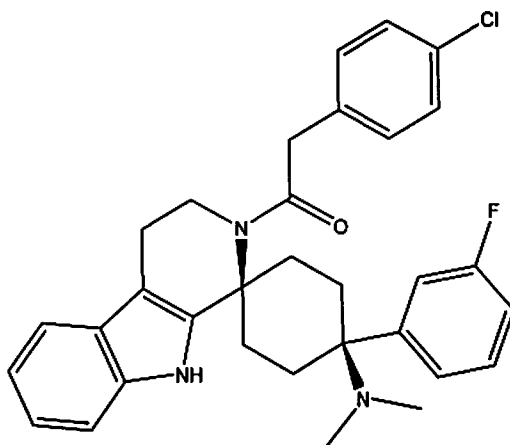
20 rotatsioonaurutis. Toorprodukt puhastati kolonnkromatograafiliselt [silikageel 60;

DCM/metanool (19:1, 570 ml)]. Produkt saadi saagisega 174 mg (26%). Selleks, et valmistada metaansulfonaat, suspendeeriti äsja saadud spiroamiid (174 mg, 0,355 mmol) DCM-s (6 ml) ja lisati toatemperatuuril metaansulfoonhapet (23,7 ml, 0,355 mmol). Seejärel lisati atsetooni (0,8 ml) ja siis lisati piisav kogus dietüületrit, et hajutada raputamisel tekkinud hägu. Segati veel 30 minutit ja seejärel saadud tahke aine vaakumfiltreeriti, ilma õhu juurdepääsuta, pesti dietüületriga ja kuivatati 3 tundi temperatuuril 50 °C õlipumba poolt tekitatud vaakumis. Produkt AMD-1<sup>cis</sup> saadi saagisega 159 mg (76%).

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>) 1,65 (t, J = 13,22 Hz, 2 H) 2,20 (t, J = 12,84 Hz, 2 H) 2,51 (d, J = 4,53 Hz, 9 H) 2,87 – 3,16 (m, 4 H) 4,13 (lai s., 2 H) 6,92 (t, J = 7,55 Hz, 1 H) 6,99 (t, J = 7,55 Hz, 1 H) 7,20 (d, J = 8,31 Hz, 1 H) 7,31 (d, J = 7,55 Hz, 1 H) 7,36 – 7,51 (m, 5 H) 7,56 – 7,69 (m, 3 H) 7,74 (d, J = 7,55 Hz, 2 H) 7,82 (d, J = 7,55 Hz, 2 H) 9,62 (br, s, 1 H)

#### Võrdlusnäide AMD-2<sup>cis</sup>

15 2',3',4',9'-tetrahüdرو-N,N-dimetüül-4-(3-fluorofenüül)-2'-(4-klorobensüül)-karbonüül-spiro[tsükloheksaan-1,1'-(1'H)-pürido[3,4-b]indool]-4-amiin (cis-diaastereoisomeer)



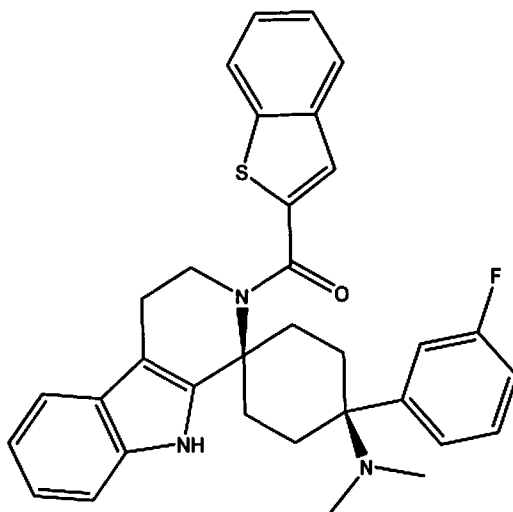
20 Spiroamiin (AMN-2<sup>cis</sup>; 396 mg, 1,05 mmol) suspendeeriti DCM-s (15 ml), mikrolainetele sobivas reaktsioonianumas ja lisati 2-(4-klorofenüül)atsetüülkloriidi (397 mg, 2,1 mmol) ja diisopropüületüülamiini (269 mg, 2,1 mmol). Reaktsioonisegu kiiritati mikrolaineahjus (Initiator Eight, Biotage) 10 minutit temperatuuril 120 °C. Kui reaktsioon oli lõppenud (TLC-jälgimine), siis reaktsioonisegu esmalt filtriti, lisati dietüületrit (15 ml) ja filtriti uuesti. Lisati küllastatud Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> lahust (8 ml). Pärast

faaside eraldamist pesti vesifaasi uuesti DCM-ga. Ühendatud orgaanilised faasid kuivatati  $MgSO_4$ -ga ning kontseentreeriti rotatsioonaurutis. Toorprodukt puhastati kolonnkromatograafiliselt [silikageel 60; DCM/metanool (19:1)]. Produkt AMD-2<sup>cis</sup> saadi saagisega 91 mg (16%).

- 5 <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>) δ ppm 1,55 (t, J = 13,60 Hz, 2 H) 1,79 (t, J = 12,84 Hz, 2 H) 1,92 (lai s., 6 H) 2,60 – 2,70 (m, 2 H) 2,73 – 2,87 (m, 2 H) 3,17 (d, J = 5,29 Hz, 2 H) 3,89 – 4,01 (m, 4 H) 6,90 (t, J = 7,55 Hz, 1 H) 6,97 (t, J = 7,55 Hz, 1 H) 7,08 – 7,16 (m, 1 H) 7,18 (d, J = 8,31 Hz, 1 H) 7,21 – 7,30 (m, 3 H) 7,34 (kv, J = 8,31 Hz, 4 H) 7,46 (kv, J = 7,30 Hz, 1 H) 10,53 (s, 1 H)

## 10 Võrdlusnäide AMD-3<sup>cis</sup>

2',3',4',9'-tetrahüdرو-N,N-dimetüül-4-(3-fluorofenüül)-2'-(bensotiofeen-2-üül)-karbonüülspiro[tsükloheksaan-1,1'(1'H)-pürido[3,4-b]indool]-4-amiin (cis-diastereoisomeer)



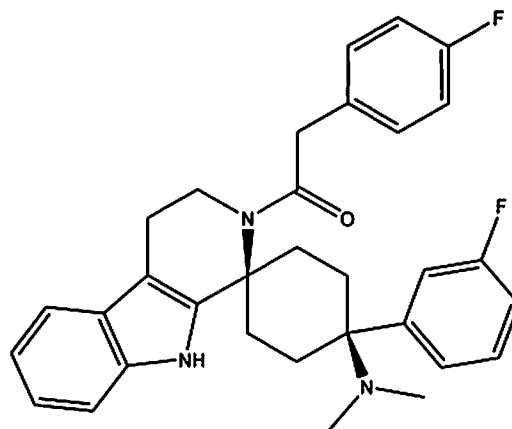
- Spiroamiin (AMN-2<sup>cis</sup>; 264 mg, 0,7 mmol) suspendeeriti DCM-s (7 ml),  
 15 mikrolainetele sobivas reaktsioonianumas ja lisati benso[b]tiofeen-2-  
 karbonüülkloriidi (239 mg, 1,21 mmol) ja diisopropüületüülamiini (180 mg,  
 1,4 mmol). Reaktsioonisegu kiiritati mikrolaineahjus (Initiator Eight, Biotage) 10  
 minutit temperatuuril 100 °C. Kui reaktsioon oli lõppenud (TLC-jälgimine), lahjendati  
 reaktsioonisegu DCM-ga (15 ml) ja filtriti. Emalahusele lisati küllastatud  $Na_2CO_3$   
 20 lahust (8 ml). Pärast faaside eraldamist pesti vesifaasi veel kaks korda DCM-ga.  
 Ühendatud orgaanilised faasid kuivatati  $MgSO_4$ -ga ning kontseentreeriti

rotatsioonaurutis. Toorprodukt puhastati kolonnkromatograafiliselt [silikageel 60; DCM/metanool (19:1)]. Produkt AMD-3<sup>cis</sup> saadi saagisega 125 mg (33%).

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>) δ ppm 1,63 – 1,79 (m, 2 H) 1,83 – 1,93 (m, 2 H) 1,95 (s, 6 H) 2,60 (d, J = 13,60 Hz, 2 H) 2,65 (t, J = 5,67 Hz, 2 H) 2,78 – 2,94 (m, 2 H)  
 5 4,08 – 4,22 (m, 2 H) 6,92 (t, J = 7,55 Hz, 1 H) 6,99 (t, J = 7,55 Hz, 1 H) 7,16 (t, J = 8,31 Hz, 1 H) 7,23 (d, J = 8,31 Hz, 1 H) 7,26 – 7,36 (m, 3 H) 7,44 – 7,54 (m, 3 H) 7,95 (s, 1 H) 8,03 (d, J = 7,55 Hz, 1 H) 8,07 (d, J = 8,31 Hz, 1 H) 10,66 (s, 1 H)

### Võrdlusnäide AMD-4<sup>cis</sup>

2',3',4',9'-tetrahüdro-N,N-dimetüül-4-(3-fluorofenüül)-2'-(4-fluorobensüül)-karbonüül-  
 10 spiro[tsükloheksaan-1,1'(1'H)-pürido[3,4-b]indool]-4-amiin metaansulfonaat (cis-diaastereoisomeer)



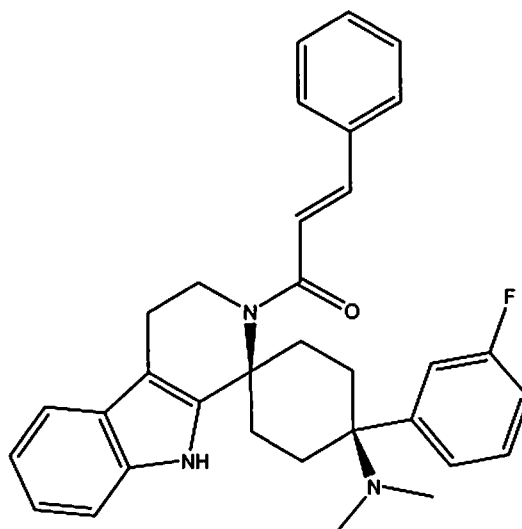
Spiroamiin (AMN-2<sup>cis</sup>; 600 mg, 1,59 mmol) suspendeeriti DCM-s (15 ml), mikrolainetele sobivas reaktsioonianumas ja lisati 2-(4-fluorofenüül)atsetüülkloriidi (548 mg, 3,18 mmol) ja diisopropüületüülamiini (408 mg, 3,18 mmol).  
 15 Reaktsioonisegu kiiritati mikrolaineahjus (Initiator Eight, Biotage) 10 minutit temperatuuril 130 °C. Kui reaktsioon oli lõppenud (TLC-jälgimine), siis reaktsioonisegu esmalt filtriti, emalahust lahjendati DCM-ga (45 ml) ja lisati küllastatud Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> lahust (25 ml). Pärast faaside eraldamist pesti orgaanilist faasi uuesti Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> küllastatud lahusega. Orgaaniline faas kuivatati MgSO<sub>4</sub>-ga ning  
 20 kontsentreeriti rotatsioonaurutis. Toorprodukt puhastati kolonnkromatograafiliselt [silikageel 60; DCM/metanool (4:1)]. Produkt saadi saagisega 150 mg (18%). Selleks, et valmistada metaansulfonaat, lahustati spiroamiid (150 mg, 0,29 mmol)

DCM-s (1 ml) ja lisati toatemperatuuril metaansulfoonhapet (18,9 ml, 0,29 mmol). Segu lahjendati dietüületriga, nii et moodustus segatav segu. Tahke aine vaakumfiltreeriti ilma õhu juurdepääsuta, pesti dietüületriga ja kuivatati temperatuuril 50 °C õlipumba poolt tekitatud vaakumis. Produkt AMD-4<sup>cis</sup> saadi saagisega 148 mg (83%).

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>) δ ppm 1,58 (t, J = 12,84 Hz, 2 H) 2,16 (t, J = 12,09 Hz, 2 H) 2,31 (s, 3 H) 2,53 – 2,58 (m, 6 H) 2,58 – 2,68 (m, 2 H) 2,83 – 3,03 (m, 4 H) 3,98 (s, 2 H) 3,99 – 4,06 (m, 2 H) 6,92 (t, J = 7,18 Hz, 1 H) 6,99 (t, J = 7,18 Hz, 1 H) 7,14 (t, J = 8,31 Hz, 2 H) 7,18 (d, J = 8,31 Hz, 1 H) 7,29 (d, J = 7,55 Hz, 1 H) 7,36 (t, J = 6,42 Hz, 2 H) 7,45 (t, J = 7,93 Hz, 1 H) 7,58 – 7,75 (m, 3 H) 9,65 (br. s., 1 H)

#### Näide AMD-5<sup>cis</sup>

(E)-2',3',4',9'-tetrahüdro-N,N-dimetüül-4-(3-fluorofenüül)-2'-(2-fenüülvinüül)-karbonüülspiro[tsükloheksaan-1,1'(1'H)-pürido[3,4-b]indool]-4-amiin (cis-diastereoisomeer)



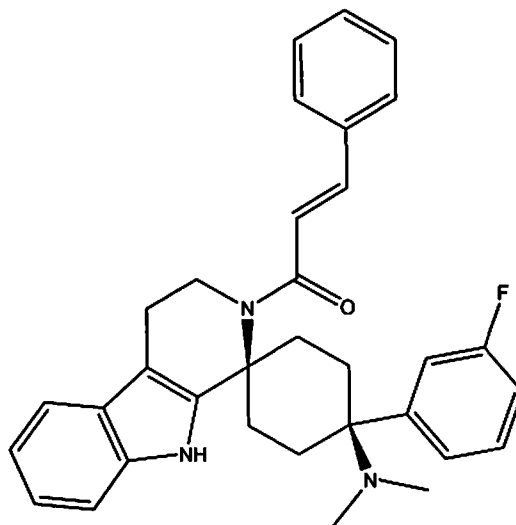
Spiroamiin (AMN-2<sup>cis</sup>; 378 mg, 1,0 mmol) lahustati kuivas aprotoonses lahustis (6 ml); lisati tsinnamoüülkloriidi (kaneelhape kloriidi) (183 mg, 1,1 mmol) ja diisopropüületüülamiini (155 mg, 1,2 mmol) ning segati üleöö toatemperatuuril. Kui reaktsioon oli lõppenud (TLC-jälgimine), lahusti eemaldati, jääki töödeldi veega ja ekstraheeriti halogeenitud lahustiga. Ühendatud orgaanilised faasid kuivatati

Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-ga ning kontsentreeriti. Toorprodukt puhastati kolonnkromatograafiliselt. Kontsentreerimisel tahke aine sadestati ja filtriti ning seejärel kuivatati. Produkt saadi saagisega 220 mg (43%).

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>) δ ppm 1,63 (t, J = 13,60 Hz, 2 H) 1,84 (t, J = 13,22 Hz, 2 H) 1,91 (s, 6 H) 2,54 – 2,63 (m, 2 H) 2,65 (t, J = 5,67 Hz, 2 H) 2,82 – 3,02 (m, 2 H) 3,17 (d, J = 5,29 Hz, 2 H) 4,00 – 4,22 (m, 2 H) 6,90 (t, J = 7,18 Hz, 1 H) 6,97 (t, J = 7,55 Hz, 1 H) 7,11 – 7,18 (m, 1 H) 7,20 (d, J = 8,31 Hz, 1 H) 7,23 – 7,33 (m, 3 H) 7,35 – 7,54 (m, 5 H) 7,72 (d, J = 6,80 Hz, 2 H) 10,59 (s, 1 H)

#### Näide AMD-6<sup>cis</sup>.

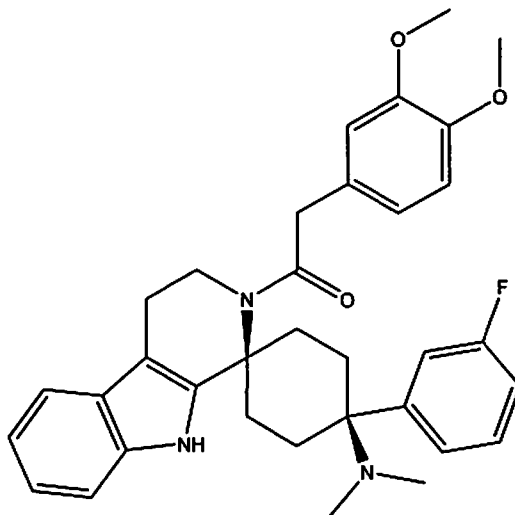
- 10 (E)-2',3',4',9'-tetrahüdro-N,N-dimetüül-4-(3-fluorofenüül)-2'-(2-fenüülvinüül)-karbonüülspro[tsükloheksaan-1,1'(1'H)-pürido[3,4-b]indool]-4-amiin tsitraat (cis-dia stereoisomeer)



- 15 Selleks, et valmistada sool, lahustati amiid AMD-5<sup>cis</sup> (220 mg, 0,43 mmol) kuivas aprotoonses lahustis (1,5 ml), ja lisati sidrunhape (83 mg, 0,43 mmol), mis oli lahustatud nii väheses protoonses lahustis kui võimalik. Produkti sadestamiseks lisati tilkhaaval mittepolaarset lahustit. Seejärel tahke aine vaakumfiltreeriti, ilma õhu juurdepääsuta, ja kuivatati temperatuuril 50 °C õlipumba poolt tekitatud vaakumis. Produkt AMD-6<sup>cis</sup> saadi saagisega 100 mg (33%).

#### Võrdlusnäide AMD-7<sup>cis</sup>

2',3',4',9'-tetrahüdرو-N,N-dimetüül-4-(3-fluorofenüül)-2'-(3,4-dimetoksübensüül)-karbonüülspiro[tsükloheksaan-1,1'(1'H)-pürido[3,4-b]indool]-4-amiin (cis-diastereo-isomeer)



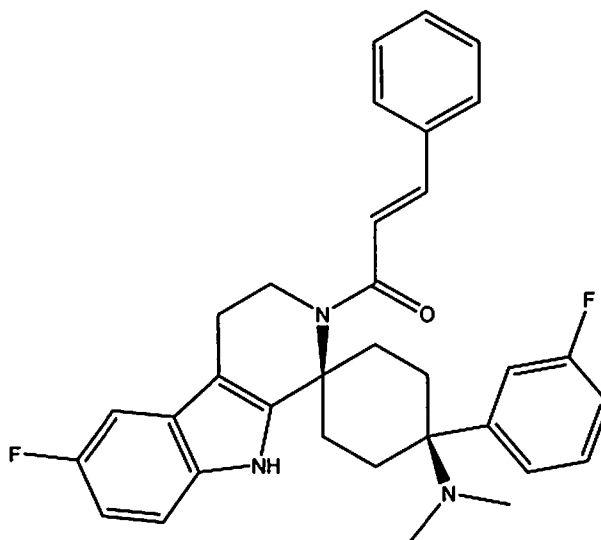
5 Spiroamiin (AMN-2<sup>cis</sup>; 200 mg, 0,54 mmol) suspendeeriti halogeenitud lahustis (5 ml), mikrolainetele sobivas reaktsioonianumas ja lisati 2-(3,4-dimetoksüfenüül)atsetüülkloriidi (230 mg, 1,1 mmol) ja diisopropüületüülamiini (138 mg, 1,1 mmol). Reaktsioonisegu kiiritati mikrolaineahjus (Initiator Eight, Biotage) 10 minutit temperatuuril 120 °C. Kui reaktsioon oli lõppenud (TLC-jälgimine), siis reaktsioonisegu esmalt filtriti ja seejärel lisati emalahusele NaOH

10 lahust (5 N, 10 ml). Pärast faaside eraldamist ekstraheeriti vesifaasi kolm korda polaarse, aprotonse lahustiga (iga kord 5 ml). Ühendatud orgaanilised faasid kuivatati MgSO<sub>4</sub>-ga ning kontsentreeriti. Toorprodukt puhastati kolonnkromatograafiliselt. Produkt AMD-7<sup>cis</sup> saadi saagisega 140 mg (47%).

15 <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>) δ ppm 1,54 (t, J = 12,46 Hz, 2 H) 1,79 (t, J = 13,22 Hz, 2 H) 1,85 – 1,96 (m, 6 H) 2,52 – 2,60 (m, 2 H) 2,62 – 2,72 (m, 2 H) 2,73 – 2,89 (m, 2 H) 3,74 (s, 3 H) 3,77 (s, 3 H) 3,82 (lai s., 2 H) 3,90 (lai s., 2 H) 6,83 – 6,93 (m, 4 H) 6,97 (t, J = 7,55 Hz, 1 H) 7,13 (t, J = 7,18 Hz, 1 H) 7,19 (d, J = 8,31 Hz, 1 H) 7,20 – 7,32 (m, 3 H) 7,41 – 7,54 (m, 1 H) 10,53 (s, 1 H)

Näide AMD-8<sup>cis</sup>

(E)-2',3',4',9'-tetrahüdron-N,N-dimetüül-6'-fluoro-4-(3-fluorofenüül)-2'-(2-fenüül-vinüül)karbonüülspiro[tsükloheksaan-1,1'(1'H)-pürido[3,4-b]indool]-4-amiin (cis-dia stereoisomeer)

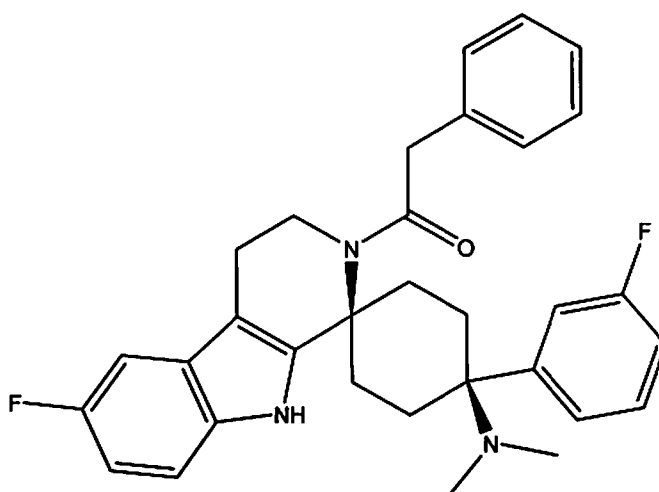


- Spiroamiini AMN-3<sup>cis</sup> (0,197 g; 0,5 mmol; 1 ekv.) suspensioon 15 ml-s absoluutses
- 5 DCM-s asetati mikrolainetele sobivasse anumasse. Sellele suspensioonile lisati järjepanu etüüldiisopropüülamiini (0,129 g; 1 mmol; 2 ekv.) ja kaneelhape kloriidi (0,166 g; 1 mmol; 2 ekv.). Mikrolaine anum suleti ja kuumutati 10 minutit temperatuuril 120 °C mikrolaineahjus (Initiator Eight, Biotage). Töötlemiseks lisati reaktsioonisegule 4 ml vett ja 4 ml 1 N naatriumhüdrosiidi lahust. Segu segati 2
- 10 tundi toatemperatuuril. Seejärel faasid eraldati ja vesifaas ekstraheeriti 3x DCM-ga. Ühendatud orgaanilised faasid pesti veega ja kuivatati naatriumsulfaadiga. Pärast lahusti eemaldamist vähendatud rõhul, jääk puhastati kolonnkromatograafiliselt (silikageel; etüülatsetaat/tsükloheksaan 1:2 → 1:0). Saadi 0,087 g produkti AMD-8<sup>cis</sup> (33%).
- 15 HPLC/MS analüüs: R<sub>t</sub> = 4,2 min; Puhtus (UV 200-400 nm) 97%; m/z = 526,1

#### Võrdlusnäide AMD-9<sup>cis</sup>

2',3',4',9'-tetrahüdron-N,N-dimetüül-6'-fluoro-4-(3-fluorofenüül)-2'-(bensüül)karbonüülspiro[tsükloheksaan-1,1'(1'H)-pürido[3,4-b]indool]-4-amiin (cis-dia stereoisomeer)





Spiroamiini AMN-3<sup>cis</sup> (0,25 g; 0,63 mmol; 1 ekv.) suspensioon 19 ml-s absoluutses DCM-s asetati mikrolainetele sobivasse anumasse. Sellele suspensioonile lisati järjepanu etüüldiisopropüülamiini (0,163 g; 1,26 mmol; 2 ekv.) ja 2-fenüülatsetüülkloriidi (0,195 g; 1,26 mmol; 2 ekv.). Mikrolaine anum suleti ja

5 kuumutati 10 minutit temperatuuril 120 °C mikrolaineahjus (Initiator Eight, Biotage). Töötlemiseks lisati reaktsioonisegule 5 ml vett ja 5 ml 1 N naatriumhüdrosiidi lahust. Segu segati 2 tundi toatemperatuuril. Seejärel faasid eraldati ja vesifaas ekstraheeriti 3x DCM-ga. Ühendatud orgaanilised faasid pesti veega ja kuivatati naatriumsulfaadiga. Pärast lahusti eemaldamist vähendatud rõhul, jääk puhastati

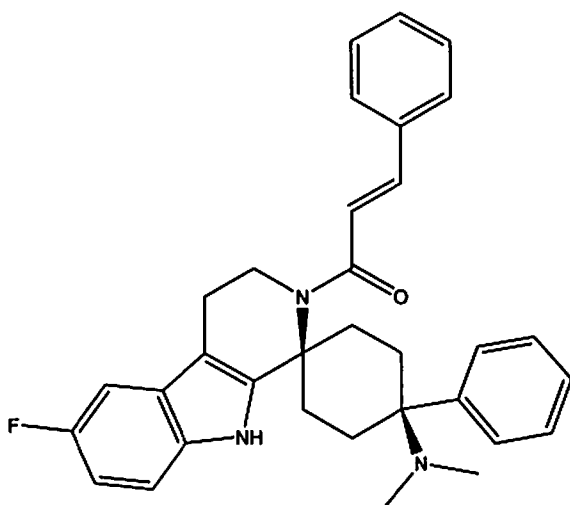
10 kolonnkromatograafiliselt (silikageel; etüülatsetaat → etüülatsetaat/metanool 9:1). Saadi 0,145 g produkti AMD-9<sup>cis</sup> (45%).

HPLC/MS analüüs:  $R_t = 3,9$  min; Puhtus (UV 200-400 nm) 98%;  $m/z = 514,1$

#### Näide AMD-10<sup>cis</sup>

(E)-2',3',4',9'-tetrahüdro-N,N-dimetüül-6'-fluoro-4-fenüül-2'-(2-fenüülvinüül)-

15 karbonüülspiro[tsükloheksaan-1,1'(1'H)-pürido[3,4-b]indool]-4-amiin (cis-diastereoisomeer)

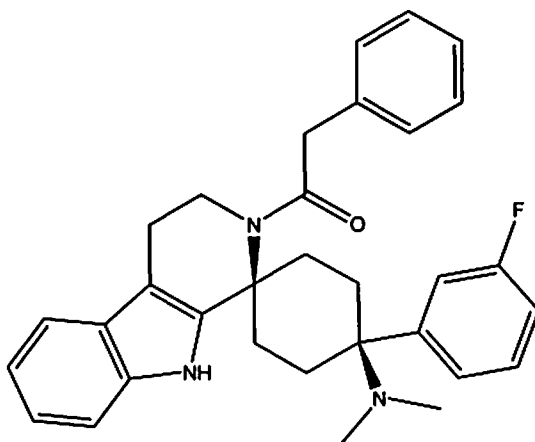


Kaneelhappe kloriidi (0,198 g; 1,192 mmol; 3 ekv.) lahusele 4,5 ml-s absoluutses THF-s lisati lämmastiku atmosfääris toatemperatuuril spiroamiini AMN-4<sup>cis</sup> (0,15 g; 0,397 mmol; 1 ekv.) lahus 9 ml-s absoluutses THF-s. Pärast segamist 1 tund toatemperatuuril, lisati esmalt 3 ml vett ja, jääga jahutades, 3 ml 1 N naatriumhüdrosiidi lahust kuni lahuse hägustumiseni. Segati 1,5 tundi. Pärast lahusti eemaldamist vähendatud rõhul saadud tahke aine filtriti ja pesti veega. Toorprodukt puhastati kolonnkromatograafiliselt (silikageel; etüülatsetaat). Saadi 0,043 g produkti AMD-10<sup>cis</sup> (21%).

HPLC/MS analüüs:  $R_t = 4,2$  min; Puhtus (UV 200-400 nm) 98%;  $m/z = 508,2$

#### 10 Võrdlusnäide AMD-11<sup>cis</sup>

2',3',4',9'-tetrahüdro-N,N-dimetüül-4-(3-fluorofenüül)-2'-bensüülkarbonüülspiro-[tsükloheksaan-1,1'(1'H)-pürido[3,4-b]indool]-4-amiin (cis-diaastereoisomeer)

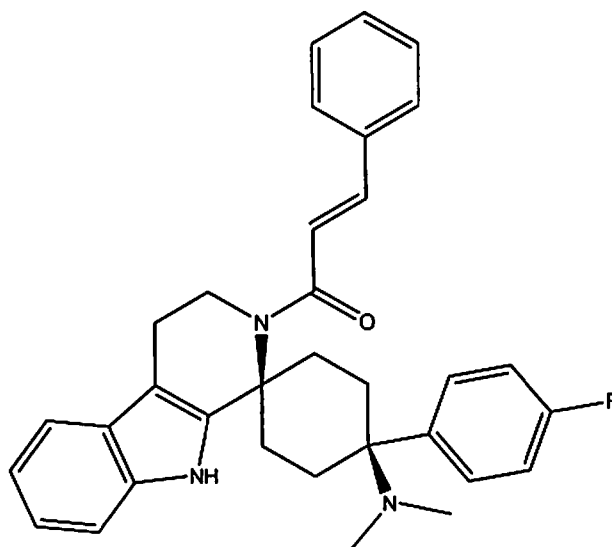


Cis-spiroamiin AMN-2<sup>cis</sup> (1,29 g, 3,4 mmol) lahustati, ilma hapniku juurdepääsuta, absoluutses tetrahüdrofuraanis (20 ml) ja lisati absoluutset diklorometaani (120 ml); toatemperatuuril lisati Hünig'i alust (1,167 ml, 6,8 mmol) ja 2-fenüülatsüülkloriidi (900 ml, 6,8 mmol). Pärast 30-minutilist reaktsiooni lisati segule 5 N naatriumhüdroksiidi lahust (100 ml) ja segati 2 tundi. Vesifaas eraldati ja ekstraheeriti diklorometaaniga (3 x 10 ml). Ühendatud orgaanilised faasid kuivatati Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-ga ja seejärel kontsentreeriti. Toorprodukt eraldati ja lahutati kromatograafiliselt [silikageel 60 (100 g); EtOAc (1000 ml)]. cis-amiid AMD-11<sup>cis</sup> saadi värvitu tahke ainena, saagisega 820 mg (49%) sulamistemperatuuriga 10 95-100 °C.

<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>) δ ppm: 22,1, 29,1, 33,0, 38,0, 40,8, 43,1, 60,0, 60,3, 105,5, 111,1, 113,7, 113,2, 114,5, 114,7, 117,3, 118,4, 120,5, 123,8, 126,2, 126,5, 128,2, 129,0, 129,2, 129,3, 135,3, 136,5, 139,5, 140,6, 161,1, 163,5, 173,4

#### Näide AMD-12<sup>cis</sup>

15 (E)-2',3',4',9'-tetrahüdro-N,N-dimetüül-4-(4-fluorofenüül)-2'-(2-fenüülvinüül)-karbonüülspiro[tsükloheksaan-1,1'(1'H)-pürido[3,4-b]indool]-4-amiin (cis-diaastereoisomeer)



Cis-spiroamiin AMN-5<sup>cis</sup> (500 mg, 1,32 mmol) suspensioonile absoluutses diklorometaanis (40 ml) lisati tilkhaaval, järjepanu, 10 minuti jooksul, argooni

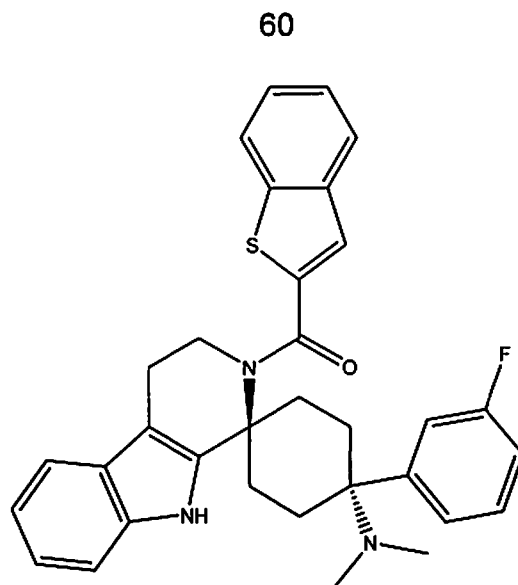
atmosfääris, absoluutses diklorometaanis (12 ml) lahustatud Hünig'i alust (0,45 ml, 342 mg, 2,64 mmol) ja kaneelhappe kloriidi (440 mg, 2,64 mmol). Reaktsioonisegu segati 1 tund toatemperatuuril ning lisati seejärel vett (30 ml) ja 1 N naatriumhüdroksiidi lahust (5 ml) ja segati 1,5 tundi. Seejärel eemaldati diklorometaan vaakumis. Kahvatu tahke aine sadestati ja eraldati filtrimisel ning seejärel pesti veega (3 x 30 ml). Nii saadud toorprodukt puhastati kromatograafia abil [silikageel 60 (70 g), etüülatsetaat/tsükloheksaan 1:1 (500 ml), etüülatsetaat (1000 ml), etüülatsetaat/metanool 10:1 (330 ml), etüülatsetaat/metanool 4:1 (800 ml), metanool (300 ml)]. Toorprodukti kolonni viimiseks oli vaja lahustada reaktsiooniprodukt etüülatsetaat/tsükloheksaanis 1:1 koos väikese koguse tetrahüdrofuraaniga. Cis-amiid AMD-12<sup>cis</sup> (s.p. 145-155 °C) saadi värvitu tahke aine saagisega 31% (204 mg, 0,40 mmol).

<sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H}-NMR (101 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>) δ ppm: 22,5 (1 C), 29,3 (2 C), 32,6 (2 C), 37,8 (2 C), 41,3 (1 C), 59,5 (1 C), 60,3 (1 C, lai), 105,4 (1 C), 111,1 (1 C), 114,3 (2 C, d, J = 20 Hz), 117,3 (1 C), 118,4 (1 C), 120,5 (1 C), 123,1 (1 C), 126,6 (1 C), 127,9 (2 C), 128,7 (2 C), 129,3 (2 C), 129,8 (2 C, d, J = 8 Hz), 132,4 (1 C, lai), 135,1 (1 C), 135,4 (1 C), 139,4 (1 C), 140,4 (1 C), 160,9 (1 C, d, J = 243 Hz), 170,3 (1 C)

### Trans-spiroamiidi võrdlusnäidete (AMD<sup>trans</sup>) süntees

#### Võrdlusnäide AMD-3<sup>trans</sup>

20 2',3',4',9'-tetrahüdro-N,N-dimetüül-4-(3-fluorofenüül)-2'-(bensotiofeen-2-üül)-karbonüülspiro[tsükloheksaan-1,1'(1'H)-pürido[3,4-b]indool]-4-amiini tsitraat (1:1) (trans-diastereoisomeer)



2',3',4',9'-tetrahüdron-N,N-dimetüül-4-(3-fluorofenüül)-2'-(bensotiofeen-2-üül)-  
 karbonüülspiro[tsükloheksaan-1,1'(1'H)-pürido[3,4-b]indool]-4-amiin (trans-  
 diastereoisomeer)

Benso[b]tiofeen-2-karboksüülhappe kloriid (728 mg, 3,96 mmol) lahustati, argooni  
 5 atmosfääris, absoluutses tetrahüdrofuraanis (30 ml) ja lisati 75 minuti jooksul,  
 toatemperatuuril, absoluutses tetrahüdrofuraanis (60 ml) lahustatud trans-spiroamiin  
 AMN-2<sup>trans</sup> (500 mg, 1,32 mmol). Moodustus kerge sade. Pärast 2-tunnilist  
 reaktsiooni lahjendati reaktsioonisegu veega (15 ml); lisati, jääga jahutades, 1 N  
 naatriumhüdrosiidi lahust (15 ml) ja segati 2,5 tundi. Tetrahüdrofuraan eemaldati  
 10 vaakumis. Moodustus tahke aine, mis eraldati filtrimisel ja pesti veega (3 x 20 ml).  
 Toorprodukt (587 mg) lahutati kromatograafiliselt [silikageel 60 (80 g);  
 etüülatsetaat/tsükloheksaan 1:1 (1 l), etüülatsetaat/metanool 4:1 (500 ml)]. Trans-  
 amiid saadi värvitu tahke ainena saagisega 12% (82 mg), sulamistemperatuuriga  
 219-221 °C.

15 <sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 22,4, 30,0, 30,9, 38,2, 46,4, 58,3, 59,5, 106,2,  
 111,0, 113,5, 113,7, 114,4, 114,7, 118,0, 119,1, 121,4, 122,5, 123,1, 124,7, 125,5,  
 125,8, 126,4, 128,7, 136,0, 138,7, 140,1, 140,4, 141,1, 142,1, 161,2, 163,7, 167,1

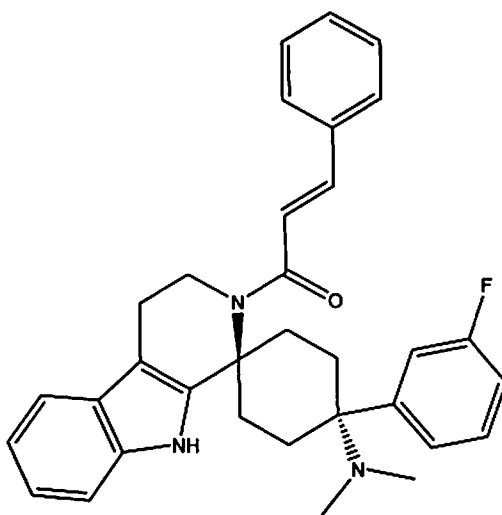
2',3',4',9'-tetrahüdron-N,N-dimetüül-4-(3-fluorofenüül)-2'-(bensotiofeen-2-üül)-  
 karbonüülspiro[tsükloheksaan-1,1'(1'H)-pürido[3,4-b]indool]-4-amiini tsitraat (1:1)  
 20 (trans-diastereoisomeer; AMD-3<sup>trans</sup>)

Äsja valmistatud trans-amiid (82 mg, 0,152 mmol) suspendeeriti temperatuuril 80 °C etanoolis (8 ml) ja lisati sidrunhappe (32 mg, 0,167 mmol) etanoollahust (3 ml). Jahtumisel toatemperatuurini sadenes selgest lahusest tahke aine. 1,5 tunni pärast segu kontsentreeriti ruumalani 2 ml, lisati dietüületrit (20 ml) ja segati 20 minutit.

- 5 Filtrimisel eraldati värvitu tahke aine ja pesti dietüületriga (2 x 3 ml) (64 mg). 3 päeva pärast sadenes filtraadist toatemperatuuril veel täiendavalt tahket ainet, mis vaakumfiltreeriti ja pesti dietüületriga (2 x 2 ml) (35 mg). Kaks fraktsiooni ühendati. Trans-tsitraat AMD-3<sup>trans</sup> saadi saagisega 81% (89 mg), sulamistemperatuuriga 175-185 °C.

10 Võrdlusnäide AMD-6<sup>trans</sup>

(E)-2',3',4',9'-tetrahüdro-N,N-dimetüül-4-(3-fluorofenüül)-2'-(2-fenüülvinüül)-karbonüülspiro[tsükloheksaan-1,1'(1'H)-pürido[3,4-b]indool]-4-amiini tsitraat (1:1) (trans-diastereoisomeer)



- 15 2',3',4',9'-tetrahüdro-N,N-dimetüül-4-(3-fluorofenüül)-2'-(2-fenüülvinüül)karbonüülspiro[tsükloheksaan-1,1'(1'H)-pürido[3,4-b]indool]-4-amiin (trans-diastereoisomeer)

Kaneelhappe kloriid (1,32 g, 7,92 mmol) lahustati argooni atmosfääris absoluutses tetrahüdrofuraanis (30 ml) ja sellele lisati 40 minuti jooksul, toatemperatuuril, absoluutses tetrahüdrofuraanis (60 ml) lahustatud puhastamata spiroamiin AMN-2<sup>cis</sup> (1,0 g, 2,64 mmol, sisaldas peaaegu 10% trans-diastereoisomeeri AMN-2<sup>trans</sup>).

- 20 Pärast 1-tunnilist reaktsiooni lisati vett (20 ml) ja, jääga jahutades, 1 N

naatriumhüdrosiidi lahust (20 ml) kuni reaktsioonilahuse hägustumiseni, ja segati 1,5 tundi. Tetrahüdrofuraan eemaldati vaakumis. Tahke aine sadestati ja eraldati filtrimisel ning pesti veega (3 x 25 ml). Toorprodukt (1,16 g) lahutati kromatograafiliselt [silikageel 60 (200 g); etüülatsetaat/tsükloheksaan 1:1 (1,3 l),  
 5 etüülatsetaat (1,6 l)]. Cis-amiid saadi värvitu tahke ainena saagisega 40% (540 mg) sulamistemperatuuriga 155-158 °C. Trans-amiid eraldati saagisega 7% (93 mg) sulamistemperatuuriga 151-155 °C.

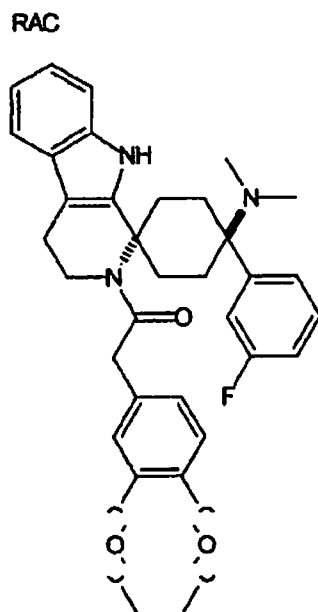
2',3',4',9'-tetrahüdro-N,N-dimetüül-4-(3-fluorofenüül)-2'-(2-fenüülvinüül)karbonüül-  
 spiro[tsükloheksaan-1,1'(1'H)-pürido[3,4-b]indool]-4-amiini tsitraat (1:1) (trans-  
 10 diastereoisomeer; AMD-6<sup>trans</sup>)

Äsja valmistatud trans-amiid (188 mg, 0,37 mmol) lahustati temperatuuril 80 °C etanoolis (35 ml) ja lisati sidrunhappe (77 mg, 0,4 mmol) etanoollahust (2 ml). Segati 2 tundi toatemperatuuril, mille käigus toimus järk-järguline kristallisatsioon. Segu hoiti 1,5 tundi temperatuuril 5 °C ning filtrimisel eraldati värvitu tahke aine,  
 15 mida pesti dietüüleetriga (3 x 3 ml) (146 mg). Filtraat kontsentreeriti ja võeti üles etanoolis (1 ml) ning lisati dietüüleetrit (20 ml). 16 tunni pärast eraldati täiendavalt värvitut soola ja pesti dietüüleetriga (2 x 2 ml) (36 mg). Kaks fraktsiooni ühendati ja trans-tsitraat AMD-6<sup>trans</sup> saadi saagisega 71% (182 mg), sulamistemperatuuriga 161-164 °C.

20 <sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>) δ ppm: (trans-diastereoisomeer) 22,4, 29,2, 30,7, 37,9, 41,5, 43,1, 58,5, 59,6, 72,0, 105,5, 111,3, 113,2, 113,4, 113,5, 113,8, 117,3, 118,4, 120,5, 122,8, 123,1, 126,5, 127,7, 128,6, 129,1, 129,2, 135,0, 135,6, 139,8, 140,1, 160,7, 163,1, 169,9, 171,2, 175,2

#### Võrdlusnäide AMD-7<sup>trans</sup>

25 2',3',4',9'-tetrahüdro-N,N-dimetüül-4-(3-fluorofenüül)-2'-(3,4-dimetoksübensüül)-  
 karbonüülspiro[tsükloheksaan-1,1'(1'H)-pürido[3,4-b]indool]-4-amiin (trans-  
 diastereoisomeer)



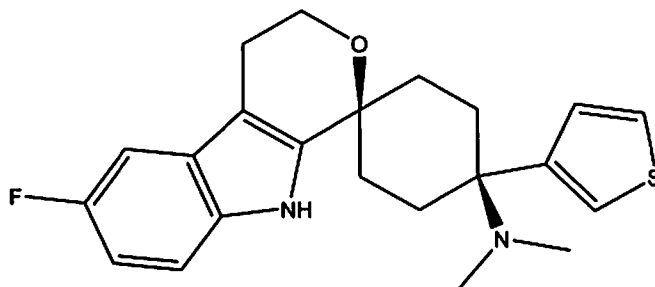
- 3,4-dimetoksüfenüüläädikhape (1 g, 5,1 mmol, 2,2 ekv.) suspendeeriti 25 ml absoluutses toluenis ja lisati tionüülkloriidi (0,84 ml, 11,6 mmol, 5,0 ekv.). Kuumutati 2 tundi tagasivoolul ning seejärel eemaldati lahusti. Jääk destilleeriti koos absoluutse tolueniga (3 x 50 ml) ja toorprodukt lahustati diklorometaanis (37 ml) ning viidi üle mikrolainetega sobivasse anumasse. Lisati spiroamiini AMN-2<sup>trans</sup> (0,875 mg, 2,32 mmol) ja Hünig'i alust (0,78 ml, 580 mmol, 250 ekv.) ning mikrolaine anum suleti ja kuumutati 20 minutit temperatuuril 120 °C mikrolaineahjus (Initiator Eight, Biotage). Töötlemiseks lisati reaktsioonisegule 17 ml vett ja 17 ml 1 N naatriumhüdroksiidi lahust. Seda segu segati 2 tundi toatemperatuuril. Seejärel faasid eraldati ja vesifaasi ekstraheeriti 3x diklorometaaniga. Ühendatud orgaanilised faasid pesti veega ja kuivatati naatriumsulfaadiga. Pärast lahusti eemaldamist vähendatud rõhul puhastati jääk kolonnkromatograafiliselt (silikageel; etüülatsetaat/n-heksaan 2:1). Saadi 0,236 g produkti AMD-7<sup>trans</sup> (18%). HPLC/MS analüüs: R<sub>t</sub> = 5,45 min; Puhtus (UV 200-400 nm) > 99%; m/z = 555,8

## 15 Cis-spiroetri võrdlusnäidete (EETER<sup>cis</sup>) süntees

### Võrdlusnäide EETER-1<sup>cis</sup>



6'-fluoro-4',9'-dihüdro-N,N-dimetüül-4-(3-tienüül)-spiro[tsükloheksaan-1,1'(3'H)-pürano[3,4-b]indool]-4-amiin metaansulfonaat (2:5) (cis-diastereoisomeer)

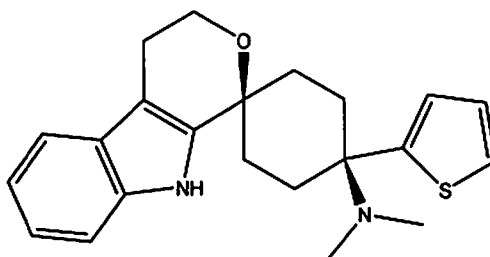


Ketoon E-5 (446,6 mg, 2 mmol) lahustati koos 5-fluorotrüptofooliga (2, 394,4 mg, 2 mmol) absoluutses 1,2-dikloroetaanis (30 ml). Seejärel lisati segule  
 5 metaansulfoonhapet (0,13 ml, 2 mmol), mille juures muutus reaktsioonilahuse värvus punakaspruunist tumehalliks. 5 minuti pärast hakkas sadenema helehall tahke aine. Segu segati 20 tundi toatemperatuuril. Seejärel cis-spiroetri metaansulfonaat vaakumfiltreeriti ja pesti 1,2-dikloroetaaniga (2 x 10 ml). Helehall tahke aine saadi saagisega 76% (733 mg) ja sulamistemperatuuriga 143-145 °C  
 10 (EETER-1<sup>cis</sup>). Seejärel lisati filtraadile 1 N NaOH (30 ml) ja segati 2 tundi toatemperatuuril. Seejuures sadenes trans-spiroeeter värvitu tahke ainena, mis saadi pärast filtrimist saagisega 8% (58,5 mg).

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>): 1,67 (m, 2 H) 1,94 (m, 2 H) 2,24 (m, 2 H) 2,44 (s, 8 H) 2,53 (s, 3 H) 2,54 (s, 3 H) 2,66 (t, J = 5,27 Hz, 2 H) 2,72 (m, 2 H) 3,95 (t, J = 5,28 Hz, 2 H) 6,84 (m, 1 H) 7,14 (m, 1 H) 7,19 (dd, J = 4,50 / 8,70 Hz, 1 H) 7,47 (d, J = 5,10 Hz, 1 H) 7,83 (m, 1 H) 8,07 (m, 1 H) 9,67 (m, 1 H) 10,80 (s, 1 H)  
 15

#### Võrdlusnäide EETER-2<sup>cis</sup>

4',9'-dihüdro-N,N-dimetüül-4-(2-tienüül)-spiro[tsükloheksaan-1,1'(3'H)-pürano[3,4-b]indool]-4-amiin metaansulfonaat (1:2) (cis-diastereoisomeer)



Ketoon E-4 (223 mg, 1 mmol) pandi kokku trüptofooliga (2, 161 mg, 1 mmol) absoluutses diklorometaanis (40 ml). Seejärel lisati metaansulfoonhapet (0,071 ml, 1,1 mmol). Segu segati 16 tundi toatemperatuuril, mille juures sadenes spiroeetri metaansulfonaat. Helehall tahke aine (EETER-2<sup>cis</sup>) vaakumfiltreeriti, pesti 5 diklorometaaniga (2 x 10 ml) ja saadi saagisega 25% (117 mg), sulamistemperatuuriga 132 °C. Filtraadile lisati 1 N NaOH (20 ml) ja segati 16 tundi toatemperatuuril. Orgaaniline faas eraldati ja vesifaasi ekstraheeriti diklorometaaniga (2 x 20 ml). Orgaanilised faasid ühendati, kuivatati ning kontsentreeriti. Saadi ainete segu (274 mg), mis lahutati kromatograafiliselt 10 [silikageel G (20 g); etüülatsetaat/metanool 8:1]. trans-spiroeeter saadi saagisega 54% (196 mg, s.p. 235-238 °C) ja cis-spiroeeter saadi saagisega 10% (38 mg).  
<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>) 1,82 (m, 2 H) 1,98 (m, 2 H) 2,33 (m, 2 H) 2,36 (s, 6 H) 2,60 (s, 3 H) 2,61 (s, 3 H) 2,53 (m, 2 H) 2,70 (t, J = 5,23 Hz, 2 H) 3,96 (t, J = 5,23 Hz, 2 H) 6,94 (m, 1 H) 7,00 (m, 1 H) 7,21 (d, J = 8,29 Hz, 1 H) 7,34 (dd, J = 3,74 / 5,28 Hz, 1 H) 7,37 (d, J = 7,37 Hz, 1 H) 7,59 (d, J = 2,76 Hz, 1 H) 7,95 (d, J = 5,32 Hz, 1 H) 9,78 (m, 1 H) 10,74 (s, 1 H)

Varustus ja meetodid HPLC-MS analüüsiks: HPLC: Waters Alliance 2795 koos PDA Waters 996; MS: ZQ 2000 MassLynx Single Quadrupol MS Detector; Kolonn: Waters Atlantis<sup>TM</sup> dC18, 3 µm, 2,1 x 30 mm; Kolonni temperatuur: 40 °C, Eluent A: 20 puhastatud vesi + 0,1% sipelghape; Eluent B: atsetonitriil (gradiendi puhtus) + 0,1% sipelghape; Gradient: 0% B kuni 100% B 8,8 min jooksul, 100% B 0,4 minutit, 100% B kuni 0% B 0,01 minutit, 0% B 0,8 minutit; Voolukiirus: 1,0 ml/min; Ionisatsioon: ES+, 25 V; Make-up: 100 µl/min 70% metanool + 0,2% sipelghape; UV: 200 – 400 nm.

## 25 Näiteühendite farmakoloogiliste omaduste uuring

A) Analgeetilise efektiivsuse (ED<sub>50</sub> või MPE% spetsiifilise testannuse juures) võrdlus akuutse valu mudelil (*tail-flick*, rott/hiir) ja mononeuropaatilise valu mudelitel (Chung, rott; Bennett, rott) või polüneuropaatilise valu mudelil (STZ polüneuropaatia, rott).

Leiutisekohaste ühendite üllatavaid farmakoloogilisi omadusi on kirjeldatud peamiselt nii, et üksteisega on võrreldud tulemusi, mis on saadud mononeuropaatilise valu mudelist rottidel, vastavalt Chung'ile ja *tail-flick* akuutse valu mudelist rottidel. Seejuures on võimalik näidata, et leiutisekohastel ühenditel ei ole märkimisväärselt anti-notsitseptiivset toimet *tail-flick* mudelis rottidel isegi mitmekordses annuses, millel on märkimisväärsne analgeetiline toime Chung'i mudelis (näiteks ED<sub>50</sub><sup>n</sup>). Tulemused teistel neuropaatilise valu mudelitel nagu Bennett'i mudelil rotil või STZ polüneuropaatia mudelil rotil rõhutavad üldiselt ühendite väga head efektiivsust erinevate neuropaatilise valu vormide korral.

#### 10 *Analgeesia test tail-flick katses rotil*

**Katseloomad:** emased Sprague Dawley rotid (kontrollid CF (SD) aretus; aretaja Charles River, Sulzfeld, Saksamaa); kehakaal: 130-190 g; loomi hoiti standardpuurides (tüüp IV Makrolon puurid, Ebeco, Castrop-Rauxel, Saksamaa), milles kõigil juhtudel ei olnud rohkem kui 8 looma, valguse/pimeduse rütm 12:12 tundi ning toit ja joogivesi vastavalt soovile (*ad libitum*).

**Meetodi kirjeldus.** Testühendite analgeetilist efektiivsust uuriti põletava kiire (*tail-flick*) testis rottidel vastavalt D'Amour ja Smith (J. Pharm. Exp. Ther. 72, 74 79 (1941)) meetodile. Loomad pandi ühekaupa spetsiaalsetesse katsepuuridesse ja sabajuurele lasti kuumuslambist kiir (*tail-flick* tüüp 50/08/1.bc, Labtec, Dr. Hess).

Lambi intensiivsus oli reguleeritud selliselt, et aeg lambi sisselülitamisest kuni saba äkilise äratõmbamiseni (latentsusaeg) oli töötlemata loomadel 2,5-5 sekundit. Enne testühendite manustamist eeltestiti loomi kahel korral 30 minuti jooksul ning arutati nende määramiste keskmine väärtus kui testieelne keskmine väärtus. Valu määramised viidi üldiselt läbi 5, 20, 40, 60, 90, 120, 180 ja 240 minutit pärast testühendi või selle vehiikli intravenoosset manustamist. Antinotsitseptiivne toime määrati latentsusaja suurenemisena vastavalt järgmisele valemile:

$$(\% \text{ MPE}) = [(T_1 - T_0)/(T_2 - T_0)] \times 100,$$

kus  $T_0$  on kontroll-latentsusaeg enne aine manustamist,  $T_1$  - latentsusaeg pärast aine manustamist,  $T_2$  - põletuskiire maksimaalne mõjuaeg (12 sekundit), MPE - maksimaalne võimalik toime (*maximum possible effect*).

Antinotsitseptiivse toimega ühenditel määrati annusest sõltuvus, manustades 3-5 logaritmiliselt suurenevat annust, mis hõlmasid läveannust ja maksimaalset efektiivset annust. Poolmaksimaalne efektiivne annus ( $ED_{50}$ ) koos vastavate 95% usalduspiiridega määrati poollogaritmilise regressioonanalüüsi abil maksimaalse toimeaja juures.

Statistiline hinnang: grupi suurus oli tavaliselt  $n=10$ . MPE% andmete statistiliselt märkimisväärsete erinevuste testimiseks annuse saanud grupi ja vehiikel-kontrollgrupi vahel kasutati korduvate mõõtmistega dispersioonanalüüsi (korduvmõõtmistega ANOVA't) nagu ka *post hoc* analüüsi vastavalt Bonferroni'le.

10 Olulisuse tase oli seatud  $p < 0,05$  juurde.

*Tail-flick test rotil vähendatud põletusega kiire korral*

Katseloomad: isased Sprague-Dawley rotid (aretaja: Janvier, Le Genest St. Isle, Prantsusmaa); kehakaal: 200-250 g; loomi hoiti standardpuurides (tüüp IV Makrolon puurid, Ebeco, Castrop-Rauxel, Saksamaa), milles kõigil juhtudel ei olnud rohkem kui 5 looma, valguse/pimeduse rütm 12:12 tundi ning toit ja joogivesi vastavalt soovile (*ad libitum*).

Meetodi kirjeldus. Testainete modulatoorset efektiivsust akuutse, häiriva termaalse stiimuli suhtes uuriti põletava kiire (saba liigutamise) testi abil rottidel vastavalt D'Amour ja Smith (J. Pharm. Exp. Ther. 72, 74 79 (1941)) meetodile. Loomad majutati ühekaupa spetsiaalsetesse testimisruumidesse ja saba juurt eksponeeriti anageesiameetri (mudel 2011, Rhema Labortechnik, Hofheim, Saksamaa) fokuseeritud põletavale kiirele. Põletava kiire intensiivsus oli reguleeritud selliselt, et aeg põletava kiire sisselülitamisest kuni saba äkilise äratõmbamiseni (latentsusaeg) oli töötlemata loomadel 12-13 sekundit. Enne testühendite manustamist eeltestiti loomi kahel korral 5 minuti jooksul ning keskmine väärtus defineeriti kui kontroll-latentsusaeg. Saba äratõmbamise latentsuse määramine viidi läbi 10 minutit pärast testühendi või selle vehiikli intravenoosset manustamist. Kui antinotsitseptiivne toime oli vaibunud (2-4 tunni pärast), siis viidi määramised läbi 30-minutilise intervalliga kuni maksimaalselt 5,6 tunnini pärast aine manustamist.

Anti- ja pro-notsitseptiivne toime määrati äratõmbamise latentsusaja suurenemise või vähenemisena vastavalt järgmisele valemile:

$$(\% \text{ MPE}) = [(T_1 - T_0)/(T_2 - T_0)] \times 100,$$

kus  $T_0$  on kontroll-latentsusaeg enne aine manustamist,  $T_1$  - latentsusaeg pärast  
 5 aine manustamist,  $T_2$  - põletuskiire maksimaalne mõju aeg (30 sekundit), MPE -  
 maksimaalne võimalik toime (*maximum possible effect*). Antinotsitseptiivse toimega  
 ühenditel määrati annusest sõltuvus, manustades 3-5 logaritmiliselt suurenevat  
 annust, mis hõlmasid läveannust ja maksimaalset efektiivset annust.  
 Poolmaksimaalne efektiivne annus ( $ED_{50}$ ) koos vastavate 95% usalduspiiridega  
 10 määrati poollogaritmilise regressioonanalüüsi abil maksimaalse toimeaja juures.

Statistiline hindamine: grupi suurus oli tavaliselt  $n=10$ . MPE% andmete statistiliselt  
 märkimisväärsete erinevuste testimiseks annuse saanud grupi ja vehiikel-  
 kontrolligrupi vahel kasutati korduvate mõõtmistega dispersioonanalüüsi  
 (korduvmõõtmistega ANOVA't) nagu ka *post hoc* analüüsi vastavalt Bonferroni'le.  
 15 Olulisuse tase oli seatud  $p < 0,05$  juurde.

#### *Analgeesia test tail-flick katses hiirtel*

Katseloomad: isased NMRI hiired (aretaja: Charles River, Sulzfeld, Saksamaa);  
 kehakaal: 20-25 g; loomi hoiti standardpuurides (tüüp III Makrolon puurid, Ebeco,  
 Castrop-Rauxel, Saksamaa), milles kõigil juhtudel ei olnud rohkem kui 6 looma,  
 20 valguse/pimeduse rütm 12:12 tundi ning toit ja joogivesi vastavalt soovile (*ad*  
*libitum*).

Meetodi kirjeldus. Testühendite analgeetilist efektiivsust uuriti põletava kiire (*tail-*  
*flick*) testis hiirtel vastavalt D'Amour ja Smith (J. Pharm. Exp. Ther. 72, 74 79 (1941))  
 meetodile. Loomad pandi ühekaupa spetsiaalsetesse katsepuuridesse ja  
 25 sabajuurele lasti elektrilambist fokuseeritud kuum kiir (*tail-flick* tüüp 55/12/10.fl,  
 Labtec, Dr. Hess). Lambi intensiivsus oli reguleeritud selliselt, et aeg lambi  
 sisselülitamisest kuni saba äkilise äratõmbamiseni (latentsusaeg) oli töötlemata  
 loomadel 2,5-5 sekundit. Enne testühendite manustamist eeltestiti loomi kahel korral  
 30 minuti jooksul ning arvutati nende määramiste keskmine väärtus kui testieelne

keskmine väärtus. Valu määramised viidi üldiselt läbi 20, 40 ja 60 minutit pärast testühendi või selle vehiikli intravenoosset manustamist. Antinotsitseptiivne toime määrati latentsusaja suurenemisena vastavalt järgmisele valemile:

$$(\% \text{ MPE}) = [(T_1 - T_0)/(T_2 - T_0)] \times 100,$$

- 5 kus  $T_0$  on kontroll-latentsusaeg enne aine manustamist,  $T_1$  - latentsusaeg pärast aine manustamist,  $T_2$  - põletuskiire maksimaalne mõjuaeg (12 sekundit), MPE - maksimaalne võimalik toime (*maximum possible effect*).

- 10 Antinotsitseptiivse toimega ühenditel määrati annusest sõltuvus, manustades 3-5 logaritmiliselt suurenevad annust, mis hõlmasid läveannust ja maksimaalset efektiivset annust. Poolmaksimaalne efektiivne annus ( $ED_{50}$ ) koos vastavate 95% usalduspiiridega määrati poollogaritmilise regressioonanalüüsi abil maksimaalse toimeaja juures.

- 15 Statistiline hindamine: grupi suurus oli tavaliselt  $n=10$ . MPE% andmete statistiliselt märkimisväärsete erinevuste testimiseks annuse saanud grupi ja vehiikel-kontrollgrupi vahel kasutati korduvate mõõtmistega dispersioonanalüüsi (korduvmõõtmistega ANOVA't) nagu ka *post hoc* analüüsi vastavalt Bonferroni'le. Olulisuse tase oli seatud  $p < 0,05$  juurde.

*Chung'i mudel: mononeuropaatiline valu pärast seljanärvi ligatsiooni*

- 20 Katseloomad: isased Sprague-Dawley rotid (RjHan: SD aretus; aretaja: Janvier, Le Genest St. Isle, Prantsusmaa); kehakaal: 140-160 g; loomi hoiti standardpuurides (tüüp IV Makrolon puurid, Ebeco, Castrop-Rauxel, Saksamaa), milles kõigil juhtudel ei olnud rohkem kui 8 looma, valguse/pimeduse rütm 12:12 tundi ning toit ja joogivesi vastavalt soovile (*ad libitum*). Loomade saabumise ja operatsiooni vaheline intervall oli üks nädal. Pärast operatsiooni testiti loomi mitmel korral 4-5  
25 nädala jooksul, kusjuures puhastumisperiood oli vähemalt üks nädal.

Mudeli kirjeldus: pentobarbitaalse anesteesia all (Narcoren<sup>®</sup>, 60 mg/kg i.p., Merial GmbH, Hallbergmoos, Saksamaa) eksponeeriti vasakpoolsed L5, L6 seljanärvid,

eemaldades osa paravertebraalsest lihasest ja osa L5 nimmelüli vasakust spinaalsest protsessist. Seljanärvid L5 ja L6 eemaldati ettevaatlikult ja seoti tihedalt ligatuuriga (musta värvi NC-siid, USP 5/0, 1 meeter, Braun Melsungen AG, Melsungen, Saksamaa) (Kim ja Chung 1992). Pärast ligatsiooni õmmeldi lihased ja ümbritsev kude kokku ning haav suleti metallklambritega. Pärast ühenädalast taastumisperioodi pandi loomad mehhaanilise allodüünia määramiseks traatpõrandaga puuridesse. Operatsiooniga samapoolse või vastaspoolse tagakäpa äratõmbelävi määrati elektroonilise von Frey hõõglambi (Somedic AB, Malmö, Rootsi) abil. Viie stimulatsiooni keskmine andis andmepunkti. Loomi testiti 30 minutit enne ja mitmed korrad pärast testaine või puhta vehiikel-lahuse manustamist. Andmed määrati maksimaalse võimaliku efekti protsendina (%MPE) individuaalsete loomade eeltestidest (=0%MPE) ja sõltumatute simulatsioonikontrollgruppide testväärtustena (=100%MPE). Alternatiivina toodi äratõmbelävi grammides. Valuvaigistava toimega ühenditel määrati annusest sõltuvus, manustades 3-5 logaritmiliselt suurenevat annust, mis hõlmasid läveannust ja maksimaalset efektiivset annust. Poolmaksimaalne efektiivne annus (ED<sub>50</sub>) koos vastavate 95% usalduspiiridega määrati poollogaritmilise regressioonanalüüsi abil maksimaalse toimeaja juures.

Statistiline hindamine: grupi suurus oli tavaliselt n=10. MPE% andmete statistiliselt märkimisväärsete erinevuste testimiseks annuse saanud grupi ja vehiikel-kontrollgrupi vahel kasutati korduvate mõõtmistega dispersioonanalüüsi (korduvmõõtmistega ANOVA't) nagu ka *post hoc* analüüsi vastavalt Bonferroni'le. Olulisuse tase oli seatud  $p < 0,05$  juurde.

Viide: Kim, S. H. ja Chung, J. M., An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat, *Pain*, 50 (1992) 355-363.

*Bennett'i mudel: mononeuropaatiline valu rottidel*

Katseloomad: isased Sprague-Dawley rotid (RjHan:SD aretus; aretaja: Janvier, Le Genest St. Isle, Prantsusmaa); kehakaal: 140-160 g; loomi hoiti standardpuurides (tüüp IV Makrolon puurid, Ebeco, Castrop-Rauxel, Saksamaa), milles kõigil juhtudel

ei olnud rohkem kui 8 looma, valguse/pimeduse rütm 12:12 tundi ning toit ja joogivesi vastavalt soovile (*ad libitum*). Loomade saabumise ja operatsiooni vaheline intervall oli üks nädal. Pärast operatsiooni testiti loomi mitmel korral 4 nädala jooksul, kusjuures puhastumisperiodod oli vähemalt üks nädal.

- 5 Meetodi kirjeldus. Efektiivsuse uuring neuropaatilise valu korral viidi läbi vastavalt Bennett'i mudelile (krooniline konstriksioonkahjustus; Bennett ja Xie, 1988, Pain 33: 87-107). Narkoreen-anesteesia all pandi ümber rottide parempoolse istmikunärvi neli lõtva ligatuuri. Loomadel tekkis kahjustatud närvi poolt innerveeritud käpa ülitundlikkus, mida pärast ühenädalast taastumisperiodi hinnati ligikaudu nelja  
10 nädala jooksul 4 °C külma metallplaadi abil (külma-allodüünia). Loomi jälgiti plaadil 2 minuti jooksul ning määrati kahjustatud käpa äratõmbamise reaktsioonide arv.

- Hindamine ja statistika. Enne toimeaine manustamist läbiviidud eelmääramiste põhjal määrati aine toime ühe tunni jooksul neljas ajapunktis (näiteks 15, 30, 45 ja  
15 60 minutit pärast manustamist) ning tulemusena saadud kõvera all olevat pindala (*area under the curve* – *AUC*) ning külma-allodüünia inhibitsiooni üksikutes määramispunktides väljendati toimeprotsendina vehiikel-kontrolli (*AUC*) suhtes või vastavalt lähteväärtuse (üksikute määramispunktides) suhtes. Grupi suurus oli  $n=10$ , antiallodüünilise toime olulisus ( $p > 0,05$ ) määrati korduvmõõtmistega dispersioonanalüüsi ja *post hoc* analüüsi abil vastavalt Bonferroni'le.

- 20 *STZ mudel: polüneuropaatiline valu rottil*

- Katseloomad: isased Sprague-Dawley rotid (aretaja: Janvier, Le Genest St. Isle, Prantsusmaa); kehakaal: 140-160 g; loomi hoiti standardpuurides (tüüp IV Makrolon-puurid, Ebeco, Castrop-Rauxel, Saksamaa), milles oli igaühes mitte  
25 rohkem kui 8 looma, valguse/pimeduse rütm 12:12 tundi ning toit ja joogivesi vastavalt soovile (*ad libitum*).

Meetodi kirjeldus. Diabeedi esile kutsumiseks süstiti isaseid Sprague Dawley rotte intraperitoneaalselt streptosototsiiniga (STZ, 75 mg/kg). Diabeediga rottidel oli üks nädal pärast STZ süstimist glükoositaseme veres vähemalt 17 mM. Kontroll-loomi



süstiti vehiikel-lahusega. Mehaanilise notsitseptiivse stiimuli läve (grammides) määramine viidi läbi algesiomeetri abil kápale rõhu avaldamise katses vastavalt Randall & Selitto (1957) testile. Testis rakendati tagakápa dorsaalsele poolele rõhkstiimulit ning registreeriti rõhuváartus, mis viis kápa áratõmbereaktsioonini või (looma) häälitsemiseni. Test viidi läbi kolm nädalat pärast diabeedi esilekutsumist. Mehaanilise notsitseptiivse stiimuli lävi määrati enne ning 15, 30, 45 ja 60 minutit pärast aine manustamist diabeediga loomadele ja kontroll-loomadele.

Viide: Randall L. O., Selitto J. J. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. Arch. Int. Pharamcodyn. 1957; 111: 409-19.

10 B) Analgeetiliselt efektiivse annusevahemiku võrdlemine mononeuropaatilise valu mudeli (Chung, rott) korral annusevahemikuga, mille juures tekivad opioididele tüüpilised kõrvatoimed.

Leiutisekohaste ühendite üllatuslikke farmakoloogilisi omadusi kirjeldatakse esmajoones, võrreldes omavahel Chung'i mudeli abil rottidel (näiteks analgeetiline efektiivsus neuropaatilise valu vastu) ja veregaaside analüüsi mudeli abil rottidel (näiteks hingamisdepressioon kui väga tõsine, kuid kergesti määratav opioididele tüüpiline kõrvatoime) saadud tulemusi. Seejuures on võimalik näidata, et leiutisekohased ühendid ei tekita märkimisväärset hingamisdepressiooni rottidel isegi mitmekordse sellise annuse juures, millel on märkimisväärne analgeetiline aktiivsus Chung'i mudelis (näiteks  $ED_{50}^n$ ). Teistest opioididele tüüpiliste kõrvaltoimete mudelitest, nagu vereringe parameetrid küülikutel, söe gastrointestinaaltrakti läbimine hiirtel, RotaRod test hiirtel, hüppamistest hiirtel ja tingitud kohaelistus rottidel, pärit tulemused ainult rõhutavad leiutisekohaste ühendite üldist opioididele tüüpiliste kõrvaltoimete puudumist või väga kergete kõrvaltoimete esinemist.

*Veregaasi analüüs: meetod arteriaalse  $pCO_2$  ja  $pO_2$  määramiseks rottidel*

Testainete hingamisdepressiooni tekitavat toimet uuriti pärast i.v. manustamist ärkvel, mõõteriistadega varustatud rottidel. Testi parameetriks oli süsinikdioksiidi

partiaalarõhu ( $p\text{CO}_2$ ) ja hapniku partiaalarõhu ( $p\text{O}_2$ ) muutumine arteriaalses rõhus pärast toimeaine manustamist.

Katseloomad: isased Sprague Dawley rotid (kontroll: CF (SD) aretus; aretaja Charles River, Sulzfeld, Saksamaa); kehakaal: 250-275 g; loomi hoiti ühekaupa standardpuurides (tüüp II Makrolon puurid, Ebeco, Castrop-Rauxel, Saksamaa), kus oli valguse/pimeduse rütm 12:12 tundi ning toit ja joogivesi vastavalt soovile (*ad libitum*).

Meetodi kirjeldus. Pentobarbitaalse anesteesia all implanteeriti vähemalt 6 päeva enne testaine manustamist PP-kateeter roti reiearterisse (*arteria femoralis*) ja kägiveeni (*vena jugularis*). Kateetrid täideti hepariini lahusega (4000 I.E.) ja suleti traadist nõelaga. Testaine või vehiikli manustamine viidi läbi veenis oleva kateetri kaudu. Enne testaine või vehiikli manustamist ning defineeritud ajahetkedel pärast aine või vehiikli manustamist avati ja loputati arteriaalne kateeter kõigil juhtudel läbi ligikaudu 500  $\mu\text{l}$  hepariini lahusega. Siis eemaldati kateetri kaudu ligikaudu 100  $\mu\text{l}$  verd ja võeti üles hepariniseeritud klaaskapillaari abil. Kateeter loputati uuesti läbi hepariini lahusega ja suleti taas. Arteriaalset verd analüüsiti kohe veregaasi analüsaatori abil (ABL 5, Radiometer GmbH, Willich, Saksamaa). Pärast minimaalselt ühenädalast puhastusperioodi võis loomad uuesti katsesse lülitada.

Testi hindamine ja statistika. Veregaasi analüsaator automaatselt andis vere  $p\text{CO}_2$  ja  $p\text{O}_2$  väärtused ühikutes mmHg. Aine toime partiaalarõhule arvutati protsendilise muutusena eelnevalt ilma aine või vehiiklita mõõdetud väärtuste suhtes. Statistiliseks hindamiseks võrreldi pärast aine manustamist mõõdetud väärtusi ja samal ajal pärast vehiikli manustamist mõõdetud väärtusi ühefaktoriline dispersioonanalüüs (*one way ANOVA*) abil ja *post hoc* Dunnetti analüüsi abil. Olulisuse tase oli seatud  $p < 0,05$  juurde. Grupi suurus oli tavaliselt  $n = 6$ .

*Kardiovaskulaarsed parameetrid. Meetod vererõhu ja südame löögisageduse määramiseks ärkvel küülikutel.*

Testaine toimet kardiovaskulaarsele süsteemile uuriti telemeetria abil pärast aine i.v. manustamist ärkvel küülikutele. Testi parameetriteks olid muutused südame löögisageduses ja arteriaalses vererõhus pärast aine manustamist.

Katseloomad: emased küülikud (Uus-Meremaa, Valged (*New Zealand Whites*); aretaja: Charles River, Kisslegg, Saksamaa); kehakaal: ligikaudu 3-5,5 kg; loomi hoiti ühekaupa spetsiaalsetes küülikupuurides (pikkus x laius x kõrgus = 885 x 775 x 600 mm; Ebeco, Castrop-Rauxel, Saksamaa), valguse/pimeduse rütm 12:12 tundi ning toit ja joogivesi vastavalt soovile (*ad libitum*).

Katse ettevalmistus. Vähemalt 21 päeva enne eksperimendi algust implanteeriti loomadele täieliku anesteesia all (isofluraan 2-3%) vererõhu määramiseks ning elektrokardiogrammiks (ECG) telemeetriaühik (TL11M2-D70-PCT, firma DSI, St. Paul, Minnesota, USA). Telemeetriaühiku rõhukateeter viidi reiearterisse ning kaks bipotensiaalset elektroodi kinnitati subkutaanselt rinnaku piirkonda või rindkere seina ülemisse vasakpoolsesse piirkonda. Ülekandeühik õmmeldi loomade vasakpoolsesse küljepiirkonda nahast moodustatud taskusse. Telemeetriliste signaalide salvestamine viidi läbi RMC-1 tüüpi vastuvõtjate (firma DSI) abil. Andmete salvestamiseks, andmete säilitamiseks ja andmete töötlemiseks kasutati Po-Ne-Mah tarkvara paketti (firma DSI).

Katse läbiviimine. Aine või vehiikli manustamine toimus venoosse kateetri abil (kõrvaveeni). Enne aine või vehiikli manustamist ja defineeritud ajahetkedel pärast aine või vehiikli manustamist määrati südame löögisagedus ning arteriaalne vererõhk (süstoolne, diastoolne ja keskmine väärtus) otse kalibreeritud telemeetriasüsteemi abil ning andmed säilitati elektrooniliselt. Pärast minimaalselt nädalast puhastusperioodi võis loomad uuesti katsesse lülitada.

Hindamine ja statistika. Vererõhu (mmHg) ja südame löögisageduse (lööki minutis) määratud väärtustest defineeritud ajahetkedel määrati kõigil juhtudel 10 järjestikulise südamelöögi keskmised väärtused. Aine toime testi parameetritele arvutati protsendilise muutusena eelnevalt ilma aine või vehiiklita mõõdetud väärtuste suhtes. Statistiliseks hindamiseks võrreldi pärast aine manustamist

möödetud väärtusi ja samal ajal pärast vehiikli manustamist möödetud väärtusi, mida teostati ühefaktorilise dispersioonanalüüsi (*one way ANOVA*) abil ja *post hoc* analüüsi abil vastavalt Dunnett'ile. Olulisuse tase oli seatud  $p < 0,05$  juurde. Grupi suurus oli tavaliselt  $n=6$ .

5 *Söe läbimise test: meetod gastrointestinaalse trakti läbimise kiiruse määramiseks hiirtel*

Katseloomad: isased NMRI hiired (aretaja: Charles River, Sulzfeld, Saksamaa); kehakaal: 30-35 g; loomi hoiti standardpuurides (tüüp IV Makrolon puurid, Ebeco, Castrop-Rauxel, Saksamaa), milles kõigil juhtudel ei olnud rohkem kui 18 looma,  
10 valguse/pimeduse rütm - 12:12 tundi ning toit ja joogivesi vastavalt soovile (*ad libitum*).

Katse kirjeldus. Enne katse algust kinnitati loomad 20-24 tunniks traatvõrega puuri osade külge. Loomadele manustati oraalselt aktiivsöe suspensiooni (10% aktiivsütt 0,5%-lises CMC-lahuses, manustamisruumala: 0,1 ml 10 g kehakaalu kohta), kui  
15 markerainet soole läbimise jaoks. Seejärel manustati intravenoosselt testaine või vehiikel-lahus. Kaks tundi pärast aktiivsöe suspensiooni manustamist loomad surmati gaasitamisel CO<sub>2</sub>-ga. Seejärel eemaldati kõhust soolestik koos pimesoolega (umbsool) ning laotati 0,9%-lise NaCl lahusega niisutatud klaasplaadile. Siis  
20 möödeti vahemaa maolukuti ja pimesoole (*pylorus-caecum*) vahel ning möödeti kaugus, milleni söesuspensioon oli jõudnud (kaugeim punkt).

Katse hindamine: selleks, et määrata gastrointestinaalse trakti läbimise suhteline inhibitsioon, moodustati suhe: söe suspensiooni poolt läbitud distants (cm-tes)/maolukuti-pimesoole vaheline kaugus (cm-tes). See andis inhibitsiooni protsent (inhibitsiooni%). Statistiliseks hindamiseks võrreldi pärast aine manustamist  
25 möödetud väärtusi ja samal ajal pärast vehiikli manustamist möödetud väärtusi ühefaktoriline dispersioonanalüüsi (*one way ANOVA*) abil ja *post hoc* Dunnetti analüüsi abil. Olulisuse tase oli seatud  $p < 0,05$  juurde. Grupi suurus oli tavaliselt  $n = 10$ .

*Rota-Rod test: meetod motoorse koordinatsiooni uurimiseks hiirtel*

Katseloomad: isased CD-1 hiired (aretaja: Charles River, Sulzfeld, Saksamaa); kehakaal: 18-25 g; loomi hoiti standardpuurides (tüüp IV Makrolon puurid, Ebeco, Castrop-Rauxel, Saksamaa), milles kõigil juhtudel ei olnud rohkem kui 18 looma, 5 valguse/pimeduse rütm: 12:12 tundi ning toit ja joogivesi vastavalt soovile (*ad libitum*).

Meetodi kirjeldus: meetodi kirjeldust vaata Kuribara H., Higuchi Y., Tadokoro S. (1977), „Effects of central depressants on Rota-Rod and traction performance in mice” Japan. J. Pharmacol. 27, 117-126.

10 Statistiline hinnang. Statistiliseks määramiseks võrreldi pärast aine manustamist mõõdetud väärtusi ja samal ajal pärast vehiikli manustamist mõõdetud väärtusi ühe faktori dispersioonanalüüsi (ühesuunaline ANOVA) abil ja *post hoc* analüüsi abil vastavalt Dunnett'ile. Olulisuse tase oli seatud  $p < 0,05$  juurde. Grupi suurus oli tavaliselt  $n = 10$ .

15 *Hüppamistest (Jumping test): meetod füüsilise sõltuvuse potentsiaali uurimiseks hiirtel*

Katseloomad: isased NMRI hiired (aretaja: Charles River, Sulzfeld, Saksamaa); kehakaal: 20-24 g; loomi hoiti standardpuurides (tüüp III Makrolon puurid, Ebeco, Castrop-Rauxel, Saksamaa), milles kõigil juhtudel ei olnud rohkem kui 6 looma, 20 valguse/pimeduse rütm: 12:12 tundi ning toit ja joogivesi vastavalt soovile (*ad libitum*).

Meetodi kirjeldus. Testaineid manustati intraperitoneaalselt kokku 7x kahe päeva jooksul. 5 manustamist viidi läbi esimesel päeval kell 9:00, 10:00, 11:00, 13:00 ja 15:00 ning teisel päeval kell 9:00 ja 11:00. Esimesed kolm manustamist tehti 25 suurenevas annuses (doseerimisskeem) ning edasised - kolmandas annuses. Võõrutus pretsipiteeriti naloksooniga 30 mg/kg (i. p.) 2 tundi pärast viimast aine manustamist. Kohe pärast seda pandi loomad ühekaupa läbipaistvatesse

jälgimiskastidesse (kõrgus 40 cm, läbimõõt 15 cm) ning 15 minuti jooksul 5-minutiliste intervallidega loeti kokku hüppamisreaktsioonid. Võrdluse/standardina manustati samaaegselt morfiini. Võõrutuse määramine teostati hüpete arvu määramise kaudu 0 kuni 10 minutit pärast naloksooni manustamist. Määrati 5 loomade arv grupi kohta, kes hüppasid rohkem kui 10 hüpet/10 minutit ja dokumenteeriti kui "positiivsete loomade %" Lisaks sellele arvutati keskmine hüppamissagedus grupis.

Statistiline hindamine. Eksperimentaalsete tulemuste hindamine statistilise olulisuse suhtes annuse saanud gruppide ja vehiikel-kontrollgruppide vahel viidi eelistatult 10 läbi Fisher'i täpse testi abil parameetri "positiivsete loomade %" suhtes ja Kruska-Wallis'e testi abil parameetri "hüppamissagedus" suhtes, eelistatult nii, nagu on kirjeldatud eksperimentaalses osas. Olulisuse tase oli seatud  $p < 0,05$  juurde. Grupi suurus oli tavaliselt  $n = 12$ .

Viide: Saelens J. K., Arch Int Pharmacodyn 190: 213-218, 1971

15 *Tinglik kohaelistus: Meetod võimaliku vaimse sõltuvuse/narkosõltuvuse tekke määramiseks*

Meetodi kirjeldus. Kohaelistuse uuringu kohta vaata: Tzschentke, T. M., Bruckmann, W. ja Friderichs, F. (2002) „Lack of sensitization during place conditioning in rats is consistent with the low abuse potential of tramadol” 20 Neuroscience Letters 329, 25-28.

Statistiline hindamine. Eksperimentaalsete tulemuste hindamine statistiliselt oluliste erinevuste suhtes loomade toimeaine või vehiikli eelistamise osas viidi eelistatult läbi paaris t-testi abil. Olulisuse tase oli seatud  $p < 0,05$  juurde. Grupi suurus oli tavaliselt  $n = 8$ .

Tabel 1a. Kokkuvõtte Näite AMD-6<sup>ab</sup> farmakoloogiliste andmete kohta

Testsüsteem	Mõõdetud parameeter	Tulemused <sup>1</sup>	Erinevus-faktor <sup>2</sup>
ORL1 retseptorile sidumine	Sidumisaafiinsus	$K_i = 0,030 \mu\text{M}$	---
$\mu$ -opioidi retseptorile sidumine	Sidumisaafiinsus	$K_i = 0,138 \mu\text{M}$	---
Chung, rott	Neuropaatilise valu inhibeerimine mononeuropaatia korral (antiallodüünilise ja antinotsitseptiivse toime lahutamine)	$ED_{50} = 9 \mu\text{g/kg i.v.}$ ; kuni kõrgeima testannuseni ( $21,5 \mu\text{g/kg i.v.}$ ); antinotsitseptiivne toime terves koos puudus.	---
Bennett, rott	Neuropaatilise valu inhibeerimine mononeuropaatia korral	$ED_{50} = 7 \mu\text{g/kg i.v.}$	---
STZ, rott	Neuropaatilise valu inhibeerimine diabeetilise polüneuropaatia korral	$ED_{50}$ ligikaudu $1 \mu\text{g/kg i.v.}$ ; kuni kõrgeima testannuseni ( $10 \mu\text{g/kg i.v.}$ ); antinotsitseptiivne toime mitteneuropaatilistel kontroll-loomadadel puudus.	---
Tail-flick, rott	Akuutse valu (notsitseptiivse valu) inhibeerimine	NOEL: $1 \text{ mg/kg i.v.}$ või $4,64 \text{ mg/kg i.v.}$ põletuskiire vähendatud intensiivsuse juures	220 – 1000x
Veregaasi analüüs, rott	Hingamisdepressioon, mis on mõõdetud kui arteriaalse $p\text{CO}_2$ tõus ja arteriaalse $p\text{O}_2$ langus	NOEL: $1 \text{ mg/kg i.v.}$	220x
Kardiovaskulaarne süsteem, küülik	Arteriaalne vererõhk ja südame löögisagedus	NOEL: $1 \text{ mg/kg i.v.}$	220x
Sõe läbimine, hiir	Gastrointestinaalse trakti läbimine	NOEL: $3 \text{ mg/kg i.v.}$	660x
RotaRod test, hiir	Motoorne koordineerimine	NOEL: $\geq 10 \text{ mg/kg i.v.}$	>2200x
Hüppamisest, hiir	Füüsiline sõltuvus / võõrutussümptomid	NOEL: $10 \text{ mg/kg i.p.}$	2200x
Kohaeelistus, rott	Vaimne sõltuvus	NOEL: $\geq 13,8 \text{ mg/kg i.p.}$	>3000x

<sup>1)</sup> NOEL – (tase, kus efekti ei täheldatud) tähistab kõrgeimat annust, kus tulemused puudusid (s.o ilma märkimisväärse efektilta annus)

<sup>2)</sup> Erinevusfaktorid arvutati neuropaatia mudelitest kui NOEL ja keskmise  $ED_{50}$  suhe (siin:  $4,5 \mu\text{g/kg}$ )

Tabel 1b. Kokkuvõtte Näite AMD-7<sup>cis</sup> farmakoloogiliste andmete kohta (võrdlusnäide)

Testüsteem	Mõõdetud parameeter	Tulemused <sup>1</sup>	Erinevus-faktor <sup>2</sup>
ORL1 retseptorile sidumine	Sidumisafiinsus	K <sub>i</sub> = 0,070 µM	---
µ-opioid retseptorile sidumine	Sidumisafiinsus	K <sub>i</sub> = 0,450 µM	---
Chung, rott	Neuropaatilise valu inhibeerimine mononeuropaatia korral (antialloduünilise ja antinotsitseptiivse toime lahutamine)	ED <sub>50</sub> = 88 µg/kg i.v.; antinotsitseptiivne toime terves koes puudus. (Testannus: 100 µg/kg i.v.)	---
STZ, hiir	Neuropaatilise valu inhibeerimine diabeetilise polüneuropaatia korral	68% MPE 100 µg/kg i.p. juures; antinotsitseptiivne toime mitteneuropaatilistel kontrolli-loomadel puudus.	---
Tail-flick, rott	Akute valu (notsitseptiivse valu) inhibeerimine	NOEL: ≥10 mg/kg i.v.	>110x
Veregaasi analüüs, rott	Hingamisdepressioon, mis on mõõdetud kui arteriaalse pCO <sub>2</sub> tõus ja arteriaalse pO <sub>2</sub> langus	NOEL: 1 mg/kg i.v.	11x
Kardiovaskulaarne süsteem, küülik	Arteriaalne vererõhk ja südame löögisagedus	NOEL: ≥3 mg/kg i.v.	>34x
Sõe läbimine, hiir	Gastrointestinaalse trakti läbimine	NOEL: 1 mg/kg i.v.	11x
RotaRod test, hiir	Motoorne koordineerimine	NOEL: 10 mg/kg i.v.	110x
Hüppamistest, hiir	Füüsiline sõltuvus / võõrutussümptomid	NOEL: ≥10 mg/kg i.p.	>110x
Kohaeelistus, rott	Vaimne sõltuvus	NOEL: ≥20 mg/kg i.p.	>220x

<sup>1</sup>) MPE (maksimaalne võimalik toime) tähistab maksimaalset võimalikku toimet; NOEL (tase, kus efekti ei täheldatud) tähistab kõrgeimat annust, kus tulemused puudusid (s.o ilma märkimisväärse efekti annus)

<sup>2</sup>) Erinevusfaktorid arvutati neuropaatia mudelitest kui NOEL ja keskmise ED<sub>50</sub><sup>n</sup> suhe (siin: 88 µg/kg)



**Järeldus.** Näide **AMD-6<sup>clis</sup>** valiti illustreerima leiutisekohaste ühendite üllatavaid farmakoloogilisi omadusi. Täheledatai ORL1 retseptori ligandi ja  $\mu$ -opioïdretseptori ligandi kõrget afiinsust, kus ORL1 retseptori afiinsuse ja  $\mu$ -opioïdretseptori afiinsuse suhe on ligikaudu 5 või ligikaudu 6. Näide **AMD-6<sup>clis</sup>** ja võrdlusühend **AMD-7<sup>clis</sup>** näitavad, et leiutisekohased ühendid on väga kõrge efektiivsusega neuropaatilise valu vastu (siin: ED<sub>50</sub><sup>n</sup> vahemikus 1 kuni 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  i.v. või 88  $\mu\text{g}/\text{kg}$  i.v.). Teisest küljest akuutse valu mudelis ei täheldatud märkimisväärset antinotsitseptiivset toimet isegi annustes, mis olid 100 kuni 1000 korda kõrgemad kui efektiivsed annused neuropaatia mudelis. Samamoodi ei täheldatud loomudelites, kus uuriti kõrvaltoimeid, märkimisväärseid opioïdile tüüpilisi kõrvaltoimeid (nagu hingamisdepressioon, vererõhu ja südame löögisageduse langus, kõhukinnisus, toime kesnärvisüsteemile, füüsiline sõltuvus, vaimne sõltuvus/narkosõltuvus) isegi annustes, mis olid 11 kuni enam kui 3000 korda kõrgemad.

Tabel 2. Ülevaade järgmiste näidete valitud farmakoloogilistest või farmakokineetilistest omadustest

Ühend	Ki (ORL <sub>1</sub> ) [µM]	Ki (µ) [µM]	Chung, rott	Tail-flick, rott	Veregaasi analüüs, rott	Sõe läbi- mine, hiir	RotaRod, hiir	1 <sub>1/2</sub> , rott, 100 µg/kg, i.v. // farmakodünaamiline toime kestvus (annus)
AMD- 6 <sup>cis</sup>	0,030	0,038	ED <sub>50</sub> = 9 µg/kg i.v.	NOEL <sup>2</sup> = 1000 µg/kg i.v.	NOEL = 1000 µg/kg i.v.	NOEL = 3000 µg/kg i.v.	NOEL: ≥10000 µg/kg i.v.	8 h // >> 5 h (10 µg/kg i.v.)
AMD- 1 <sup>cis</sup>	0,018	0,032	18%MPE 100 µg/kg i.v. juures	NOEL > 100 µg/kg i.v.	NOEL = 1000 µg/kg i.v.	Ei viidud läbi	Ei viidud läbi	ei määratud // ei määratud
AMD- 2 <sup>cis</sup> *	0,017	0,05	35%MPE 100 µg/kg i.v. juures	NOEL > 1000 µg/kg i.v.	Ei viidud läbi	NOEL = 4600 µg/kg i.v.	Ei viidud läbi	ei määratud // ca 3 tundi (100 µg/kg i.v.)
AMD- 3 <sup>cis</sup> *	0,016	0,059	42%MPE 100 µg/kg i.v. juures	NOEL > 1000 µg/kg i.v.	Ei viidud läbi	NOEL = 3000 µg/kg i.v.	NOEL: ≥10000 µg/kg i.v.	ei määratud // ca 3 tundi (100 µg/kg i.v.)
AMD- 4 <sup>cis</sup> *	0,003	0,009	20%MPE 100 µg/kg i.v. juures	NOEL > 100 µg/kg i.v.	NOEL = 300 µg/kg i.v.	Ei viidud läbi	Ei viidud läbi	ei määratud // 1-3 tundi (100 µg/kg i.v.)
AMD- 7 <sup>cis</sup> *	0,070	0,450	ED <sub>50</sub> = 88 µg/kg i.v.	NOEL ≥ 10000 µg/kg i.v.	NOEL = 1000 µg/kg i.v.	NOEL = 1000 µg/kg i.v.	NOEL = 10000 µg/kg i.v.	3 tundi // ca 3 tundi (100 µg/kg i.v.)

\*) ORL1/µ afiinsuse suhe defineeriti kui 1/[K<sub>1(ORL1)}/K<sub>1(µ)</sub>]</sub>

\*\*) NOEL - (tase, kus efekti ei täheldatud) tähistab kõrgeimat annust, kus tulemused puudusid (s.o ilma märkimisväärse efekti annus)

\*) Võrdlusühendid

**Järeldus.** Leiutisekohased ühendid on neuropaatilise valu vastu väga suure efektiivsusega. Teisest küljest jällegi ei täheldatud üllatuslikult märkimisväärset antinotsitseptiivset toimet akuutse valu mudelis isegi annustes, mis olid ligikaudu 10 korda kuni rohkem kui 100 korda kõrgemad kui efektiivsed annused neuropaatia mudelis. Samamoodi üllatuslikult ei täheldatud kõrvaltoimete uurimise loomudelites (näiteks veregaasi analüüs, söe poolt gastrointestinaalse trakti läbimine ja RotaRod test) märkimisväärseid opioidile tüüpilisi kõrvaltoimeid, 10 korda või rohkem kui 300 korda kõrgemates annustes.

**Tabel 3.** Cis- ja trans-spiroamiinide võrdlus

Ühend	Ki (ORL <sub>1</sub> ) [µM]	Ki (µ) [µM]	Chung, rott	Tail-flick, rott	Veregaasi analüüs, rott
AMD-6 <sup>cis</sup>	0,030	0,038	ED <sub>50</sub> = 9 µg/kg i.v.	NOEL <sup>2</sup> = 1000 µg/kg i.v.	NOEL = 1000 µg/kg i.v.
AMD-6 <sup>trans*</sup>	0,002	0,008	NOEL ≥ 100 µg/kg i.v.	ED <sub>50</sub> = 640 µg/kg i.v.	NOEL = 300 µg/kg i.v.
AMD-7 <sup>cis*</sup>	0,070	0,450	ED <sub>50</sub> = 88 µg/kg i.v.	NOEL <sup>2</sup> ≥ 10000 µg/kg i.v.	NOEL = 1000 µg/kg i.v.
AMD-7 <sup>trans*</sup>	0,001	0,001	Ei viidud läbi	54% MPE 31,6 µg/kg i.v. juures	Ei viidud läbi
AMN-2 <sup>cis*</sup>	0,012	0,031	ED <sub>50</sub> = 895 µg/kg i.v.	NOEL = 1000 µg/kg i.v.	Ei viidud läbi
AMN-2 <sup>trans*</sup>	0,0004	0,0005	27%MPE 30 µg/kg i.v. juures	60%MPE 100 µg/kg i.v. juures	Ei viidud läbi

10 <sup>1)</sup> ORL<sub>1</sub>/µ afiinsuse suhe defineeriti kui 1/[K<sub>i(ORL<sub>1</sub>)</sub>/K<sub>i(µ)</sub>]

<sup>2)</sup> NOEL - (tase, kus efekti ei täheldatud) tähistab kõrgeimat annust, kus tulemused puudusid (s.o ilma märkimisväärse efektita annus)

\*) Võrdlusnäide

**Järeldus.** Üllatuslikult olid ainult leiutisekohased cis-spiroamiinid (siin Näide **AMD-6<sup>cis</sup>** ja ühend **AMN-2<sup>cis</sup>**) suure efektiivsusega neuropaatilise valu vastu, samal ajal kui neil puudus antinotsitseptiivne toime akuutse valu korral. Samamoodi üllatuslikult ei täheldatud kõrvaltoimete uurimise loomudelites (siin näiteks veregaasi analüüs) 5 märkimisväärseid opioidile tüüpilisi kõrvaltoimeid, isegi mitmekordselt kõrgemates annustes. Teisest küljest trans-spiroamiinidel (siin võrdlusnäide **AMD-6<sup>trans</sup>** ja võrdlusnäide **AMN-2<sup>trans</sup>**) ei olnud vahet annustes, mis olid efektiivsed neuropaatilise valu vastu või akuutse valu vastu. Samamoodi puudus erinevus annuste vahel, mille juures täheldati opioidile tüüpiliste 10 kõrvaltoimete tekkimist (näitena siin veregaasi analüüs). Üldises võrdluses näitasid **AMD-5<sup>cis</sup>** ja **AMD-6<sup>cis</sup>** suurimaid erinevusi maksimaalselt võimaliku analgeetilise toime juures.

Tabel 4. Cis-spiroamiinide ja cis-spirooetrite (võrdlusühendid) võrdlus

Ühend	Ki (ORL <sub>1</sub> ) [µM]	Ki (µ) [µM]	Chung, rott	<i>Tail-flick</i> , rott või hiir*
<b>AMN-2<sup>cis</sup></b>	0,012	0,031	ED <sub>50</sub> = 895 µg/kg i.v.	NOEL <sup>2</sup> = 1000 µg/kg i.v.
<b>Ether-2<sup>cis</sup></b>	0,031	0,092	17%MPE 100 µg/kg i.v juures	78%MPE 1000 µg/kg i.v. juures*
<b>Ether-1<sup>cis</sup></b>	0,06	0,02	28%MPE 100 µg/kg i.v juures	33%MPE 1000 µg/kg i.v. juures

<sup>1</sup>) ORL<sub>1</sub>/µ afiinsuse suhe defineeriti kui 1/[K<sub>i(ORL1)</sub>/K<sub>i(µ)</sub>]

15 <sup>2</sup>) NOEL - (tase, kus efekti ei täheldatud) tähistab kõrgeimat annust, kus tulemused puudusid (s.o ilma märkimisväärse efektita annus)

**Järeldus.** Üllatuslikult leiti, et ainult cis-spiroamiinid, nagu leiutisekohased ühendid (siin võrdlusnäide **AMN-2<sup>cis</sup>**), on suure efektiivsusega neuropaatilise valu vastu, ilma et neil samal ajal oleks antinotsitseptiivne toime akuutse valu korral. Samamoodi ei 20 täheldatud märkimisväärseid opioidile tüüpilisi kõrvaltoimeid ka kõrvaltoimete uurimise loomudelites (siin näiteks veregaasi analüüs) mitmeid kordi kõrgemates annustes. Teisest küljest, cis-spirooetrid (siin võrdlusnäide **Eeter-2<sup>cis</sup>** ja võrdlusnäide **Eeter-1<sup>cis</sup>**) ei näidanud märkimisväärset vahet annustes, mis olid efektiivsed neuropaatilise valu vastu või akuutse valu vastu.

Tabel 5. AMD-5<sup>cis</sup> (vaba alus) ja AMD-6<sup>cis</sup> (tsitraat-sool) võrdlus

Ühend	Ki (ORL <sub>1</sub> ) [μM]	Ki (μ) [μM]	Chung, rott	Tail-flick, rott
AMD-5 <sup>cis</sup>	0,030	0,138	ED <sub>50</sub> = 17 μg/kg i.v.	NOEL <sup>2</sup> = 30000 μg/kg i.p.
AMD-6 <sup>cis</sup>	0,020	0,117	ED <sub>50</sub> = 9 μg/kg i.v.	NOEL > 10000 μg/kg i.v.

1) ORL<sub>1</sub>/μ afiinsuse suhe defineeriti kui  $1/[K_{i(ORL_1)}/K_{i(\mu)}]$

2) NOEL - (tase, kus efekti ei täheldatud) tähistab kõrgeimat annust, kus tulemused puudusid (s. o ilma märkimisväärse efektita annus)

5 **Järeldus:** AMD-5<sup>cis</sup> (vaba alus) ja AMD-6<sup>cis</sup> (tsitraat-sool) võrdlus näitas, et aluse ja soola vahel olulisi farmakoloogiliste omaduste erinevusi ei olnud.

Tabel 6. Afiinsuste võrdlus individuaalsete retseptorite suhtes

	ORL1		µ-Opioid		k-Opioid		d-Opioid		Valu, rott	
	Ki*	EC <sub>50</sub> **	Ki	EC <sub>50</sub>	Ki	EC <sub>50</sub>	Ki	EC <sub>50</sub>	Akuutne (tail flick)	Neuropaatiline (SNL [Chung])
AMD-3 <sup>dis</sup>	16	102/92%	59	1112/82%	160	874/42%	6,7	41/92%	0% (1000) 73% (10000)	106
AMD-3 <sup>trans</sup>	14	16/81%	12	13/66%	49	-/55%	8	-/87%	0% (1000)	20% (100)
AMD-5 <sup>dis</sup>	30	76/106%	138	300/63%	768	1035/30%	38	463/78%	0% (1000) 58% (10000)	9,2
AMD-6 <sup>trans</sup>	3	47/104%	8	79/97%	19	59/88%	6	19/126%	640	400
AMD-7 <sup>dis</sup>	70	50/90%	450	49/94%	542	1170/85%	791	2684/106%	0% (10000)	88
AMD-7 <sup>trans</sup>	1	16/90%	1	3/88%	4	29/64%	1	5/82%	54% (31,6)	ei viidud läbi
	* Radioaktiivse sidumise katse - Ki [nM]									
	** GTPgammaS katse - EC <sub>50</sub> [nM] ja suhteline efektiivsus [%]									

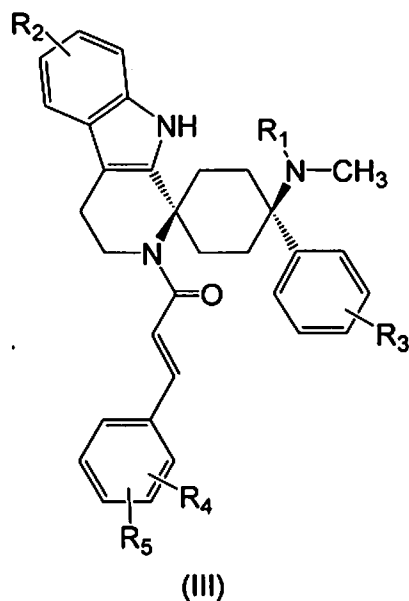
Ki [nM]

EC<sub>50</sub> [ef. %]

§) Võrdlusnäide

## PATENDINÕUDLUS

## 1. Ühendid üldvalemiga (III)



milles

R<sub>1</sub> on -H või -CH<sub>3</sub>;

5 R<sub>2</sub> on -H või -halogeen;

R<sub>3</sub> on -H või -halogeen;

R<sub>4</sub> on -H, -halogeen või -OC<sub>1-3</sub>-alküülrühm;

ja

R<sub>5</sub> on -H, -halogeen või -OC<sub>1-3</sub>-alküülrühm;

10 nende vabade aluste või füsioloogiliselt vastuvõetavate soolade kujul.

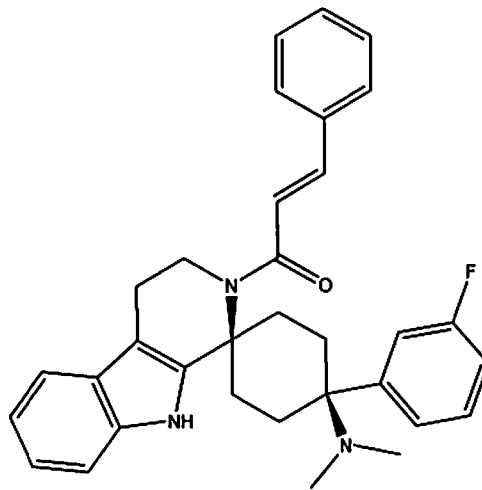
2. Ühendid vastavalt nõudluspunktile 1, milles R<sub>2</sub> on -H ja/või R<sub>3</sub> on -F.

3. Ühendid vastavalt nõudluspunktile 1 või 2, milles R<sub>4</sub> ja R<sub>5</sub> on mõlemad kas -H või mõlemad -OCH<sub>3</sub>.

15 4. Ühendid vastavalt mis tahes eelnenud nõudluspunktile, mis on valitud ühendite grupist:

- (E)-1-((1s,4s)-4-(dimetüülamino)-4-fenüül-3',4'-dihüdrospiro[tsükloheksaan-1,1'-pürido[3,4-b]indool]-2'(9'H)-üül)-3-fenüülprop-2-een-1-oon
  - (E)-1-((1s,4s)-4-(dimetüülamino)-4-(3-fluorofenüül)-3',4'-dihüdrospiro[tsükloheksaan-1,1'-pürido[3,4-b]indool]-2'(9'H)-üül)-3-fenüülprop-2-een-1-oon
  - 5 • (E)-1-((1s,4s)-4-(dimetüülamino)-6'-fluoro-4-(3-fluorofenüül)-3',4'-dihüdrospiro[tsükloheksaan-1,1'-pürido[3,4-b]indool]-2'(9'H)-üül)-3-fenüülprop-2-een-1-oon
  - (E)-1-((1s,4s)-4-(dimetüülamino)-6'-fluoro-4-fenüül-3',4'-dihüdrospiro[tsükloheksaan-1,1'-pürido[3,4-b]indool]-2'(9'H)-üül)-3-fenüülprop-2-een-1-oon
  - 10 • (E)-1-((1s,4s)-4-(dimetüülamino)-4-(4-fluorofenüül)-3',4'-dihüdrospiro[tsükloheksaan-1,1'-pürido[3,4-b]indool]-2'(9'H)-üül)-3-fenüülprop-2-een-1-oon
- nende vabade aluste või füsioloogiliselt vastuvõetavate soolade kujul.

5. Ühend vastavalt mis tahes nõudluspunktile 1 kuni 4 struktuuriga



selle vabade aluste või füsioloogiliselt vastuvõetavate soolade kujul.

- 15 6. Ühend, vastavalt mis tahes nõudluspunktile 1 kuni 4, mis on ette nähtud kasutamiseks ravimina.
7. Farmatseutiline kompositsioon, mis sisaldab füsioloogiliselt vastuvõetavat vehiiklit ning mis tahes nõudluspunktile 1 kuni 5 vastavat ühendit.
8. Kompositsioon vastavalt nõudluspunktile 7, mis



- on tahke, vedel või pastataoline; ja/või
- sisaldab mis tahes nõudluspunktile 1 kuni 5 vastavat ühendit koguses 0,001 massi% kuni 99 massi%, arvestatuna kogu kompositsiooni massist.

**9.** Farmatseutiline manustamisvorm, mis sisaldab nõudluspunktile 7 või 8 vastavat farmatseutilist kompositsiooni.

**10.** Manustamisvorm vastavalt nõudluspunktile 9, mis on teostatud manustamiseks mitte rohkem kui üks kord päevas.

**11.** Manustamisvorm vastavalt nõudluspunktile 9 või 10, mis on teostatud süsteemseks manustamiseks.

**10** **12.** Manustamisvorm vastavalt nõudluspunktile 11, mis on teostatud oraalseks manustamiseks.

**13.** Manustamisvorm vastavalt nõudluspunktile 12, mis sisaldab mis tahes nõudluspunktile 1 kuni 5 vastavat ühendit annuses vahemikus 1,0 µg kuni 10 mg, arvestatuna vaba aluse molekulmassist.

**15** **14.** Ühend vastavalt mis tahes nõudluspunktile 1 kuni 5, mis on ette nähtud kasutamiseks neuropaatilise ja/või kroonilise valu ravimisel.

**15.** Ühend vastavalt nõudluspunktile 14, mille manustamine toimub mitte rohkem kui üks kord päevas.