(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102307877 B
(45)授权公告日 2015.12.16

(21)申请号 200980156324.1
(22)申请日 2009.12.04
(30)优先权数据
0822342.2 2008.12.08 GB
0920699.6 2009.11.26 GB
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2011.08.08
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/GB2009/051655 2009.12.04
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2010/067101 EN 2010.06.17
(73)专利权人 欧洲凯尔特公司
地址 卢森堡卢森堡
(72)发明人 史蒂夫·怀特洛克
德博拉·菲莉丝·哈丁
卡尔·戴维·特纳
(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司 11021
代理人 吴小明
(51)Int.Cl.
C07D 489/12(2006.01)
A61K 31/4353(2006.01)
A61P 29/00(2006.01)
审查员 黄凯

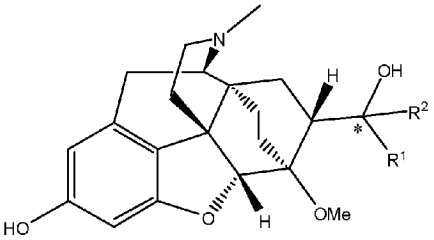
权利要求书4页 说明书55页 附图17页

(54)发明名称

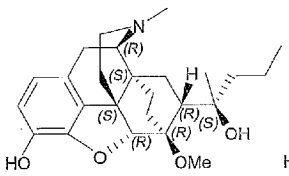
二氢埃托啡及其制备

(57)摘要

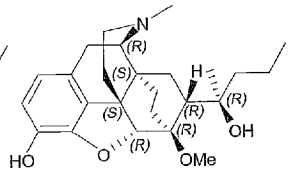
本发明提供了制备式(VI)的化合物或其盐或衍生物的方法，其中R^1和R^2独立地是C_{1-8}烷基以及*表示立构中心。



(VI)



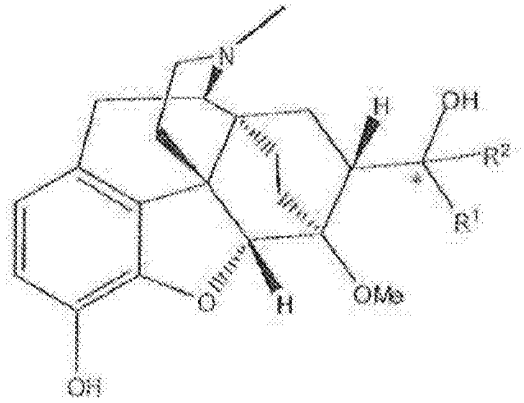
(S)-DHE（非对映异构体）



(R)-DHE

CN 102307877 B

1. 一种制备式 (VI) 的化合物或其盐的方法，

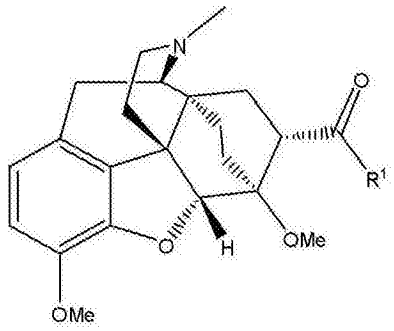


(VI)

其中 R^1 和 R^2 独立地是 C_{1-8} 直链烷基以及 * 表示 (S) 立构中心，

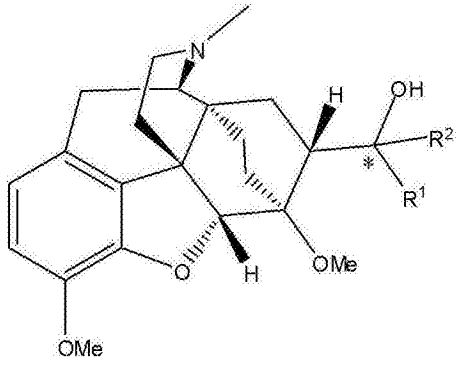
所述方法包括

将式 (IV) 的化合物，



(IV)

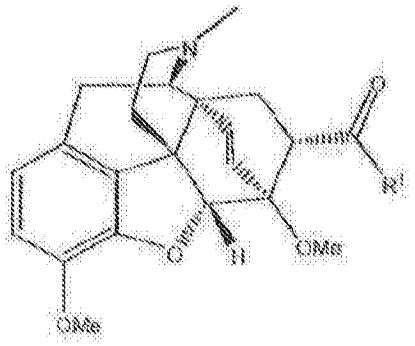
其中 R^1 如上定义；与式 $R^2M(X)_p$ 的化合物反应，其中 R^2 是 C_{1-8} 直链烷基，M 是碱金属或碱土金属，X 是 Cl、Br 或 I 以及 p 是 1 或 0，以产生式 (V) 的化合物，



(V)

其中 R^1、R^2 和 * 如上定义；并水解所述式 (V) 的化合物以产生式 (VI) 的化合物。

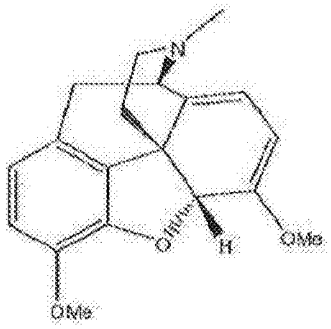
2. 权利要求 1 所述的方法，其中所述的式 (IV) 的化合物通过将式 (III) 的化合物还原而制备，



(III)

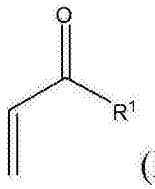
其中 R^1 如上定义。

3. 权利要求 2 所述的方法，其中所述的式 (III) 的化合物通过将式 (I) 的化合物



(I)

与式 (II) 化合物反应而制备，



(II)

其中 R^1 是 C_{1-8} 直链烷基。

4. 权利要求 1 到 3 的任一项所述的方法，其中 M 是镁或锂。

5. 权利要求 4 所述的方法，其中 $R^2M(X)_p$ 是 R^2MgCl、R^2MgBr、R^2MgI 或 R^2Li。

6. 权利要求 1 到 3 的任一项所述的方法，进一步包括结晶所述式 (VI) 的化合物的步骤。

7. 如权利要求 1 到 3 的任一项所述的方法，其中 R^1 是 C_{3-5} 烷基。

8. 如权利要求 1 到 3 的任一项所述的方法，其中 R^1 是丙基。

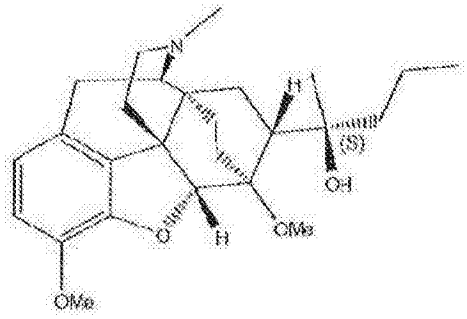
9. 如权利要求 1 到 3 的任一项所述的方法，其中 R^1 是正丙基。

10. 如权利要求 1 到 3 的任一项所述的方法，其中 R^2 是 C_{1-2} 烷基。

11. 如权利要求 1 到 3 的任一项所述的方法，其中 R^2 是甲基。

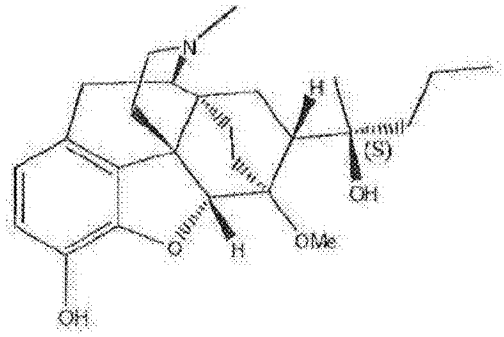
12. 如权利要求 1 到 3 的任一项所述的方法，其中以至少 90％的非对映体过量生成式 (V) 的化合物。

13. 如权利要求 1 到 3 的任一项所述的方法，其中式 (V) 的化合物是：



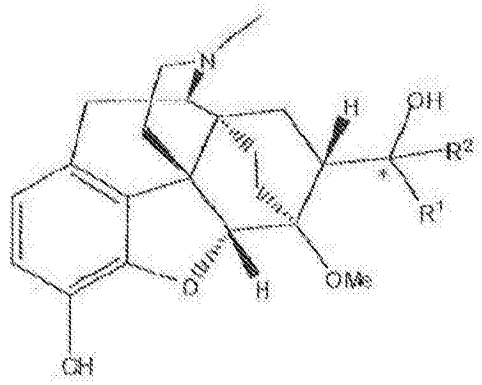
(V-a)。

14. 如权利要求 1 到 3 的任一项所述的方法，其中式 (VI) 的化合物是：



(VI-a)。

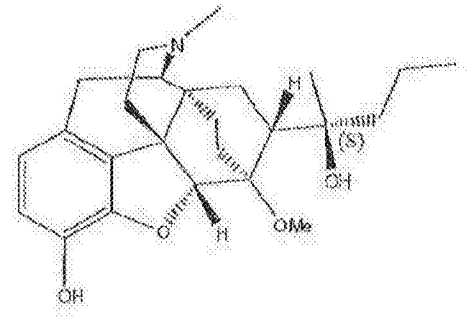
15. 式 (VI) 的化合物或其盐，



(VI)

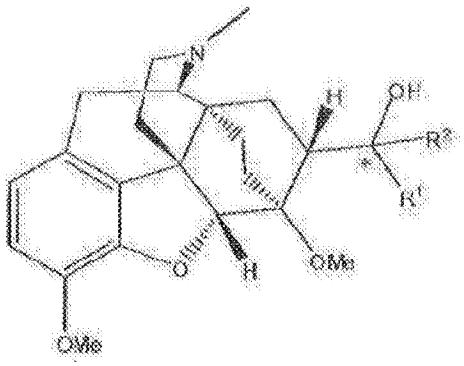
其中 R^1 和 R^2 独立地是 C_{1-8} 直链烷基以及 * 表示 (S) 立构中心。

16. 式 (VIa) 的权利要求 15 所述的化合物，或其盐，



(VIa)。

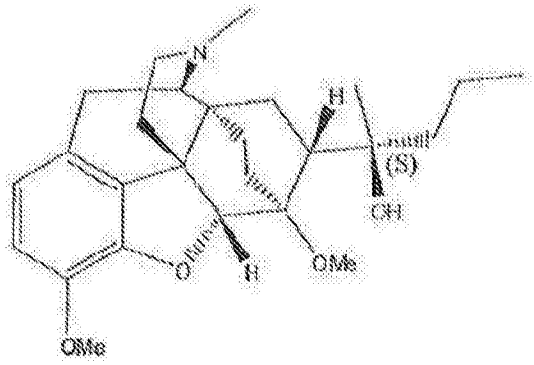
17. 式 (V) 的化合物或其盐，



(V)

其中 R^1 和 R^2 独立地是 C_{1-8} 直链烷基以及 (*) 表示 (S) 立构中心。

18. 式 (Va) 的权利要求 17 所述的化合物，或其盐，



(Va)。

19. 如权利要求 15 或权利要求 16 所述的化合物，其为游离碱形式。

20. 如权利要求 15 或权利要求 16 所述的化合物，其为药用盐。

21. 如权利要求 20 所述的化合物，其为盐酸盐。

22. 如权利要求 17 或权利要求 18 所述的化合物，其为游离碱形式。

23. 如权利要求 17 或权利要求 18 所述的化合物，其为药用盐。

24. 如权利要求 23 所述的化合物，其为盐酸盐。

25. 包括如权利要求 15 或权利要求 16 所述的化合物的药物组合物。

26. 包括如权利要求 19 所述的化合物的药物组合物。

27. 包括如权利要求 20 所述的化合物的药物组合物。

28. 包括如权利要求 21 所述的化合物的药物组合物。

29. 权利要求 25 所述的组合物，其为适于透皮给药的剂型。

30. 权利要求 15 或权利要求 16 所述的化合物用于制备止痛药的用途。

31. 权利要求 19 所述的化合物用于制备止痛药的用途。

32. 权利要求 20 所述的化合物用于制备止痛药的用途。

33. 权利要求 21 所述的化合物用于制备止痛药的用途。

34. 权利要求 15 或权利要求 16 所述的化合物用于制造治疗疼痛的药物的用途。

35. 权利要求 19 所述的化合物用于制造治疗疼痛的药物的用途。

36. 权利要求 20 所述的化合物用于制造治疗疼痛的药物的用途。

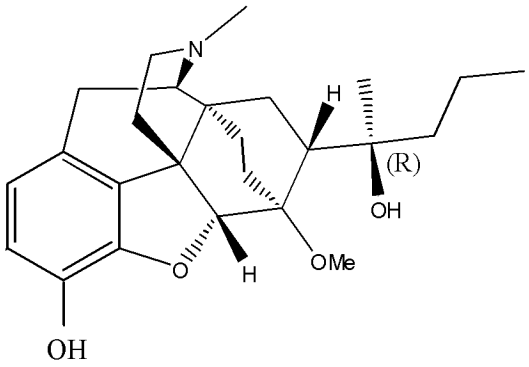
37. 权利要求 21 所述的化合物用于制造治疗疼痛的药物的用途。

二氢埃托啡及其制备

[0001] 本发明涉及一种制备二氢埃托啡的新方法、(S)- 二氢埃托啡本身以及在其合成中制备的中间体。

[0002] (R)- 二氢埃托啡（显示如下）是有效的止痛药物。

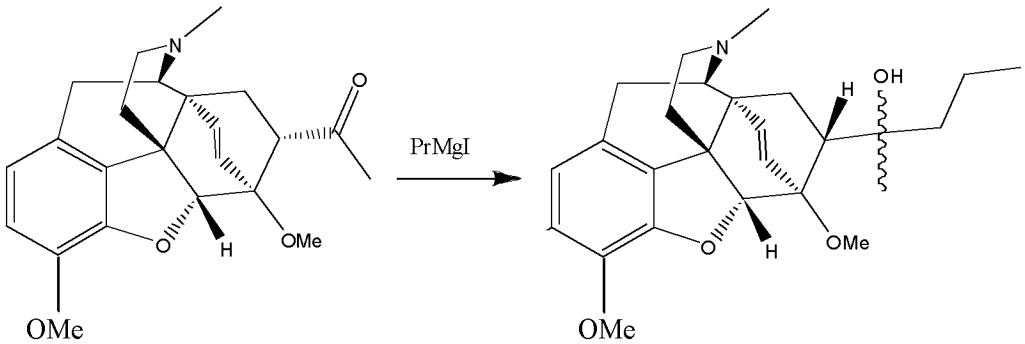
[0003]



[0004] 其以从 20 到 180 μg 的剂量以舌下形式主要在中国使用。与其他止痛药物相比，据报道产生强烈的止痛且相对轻微的副作用。在透皮贴片中使用 (R)- 二氢埃托啡也公开在 JP-10-231248 中。然而，就申请人所知，没有这样的贴片可商购。

[0005] 二氢埃托啡是埃托啡的变体。(R)- 埃托啡是用于麻醉动物例如大象的极为有效的阿片样物质。其于二十世纪六十年代开发，其制备的合成路线是熟知的。例如 GB 925,723 的实施例 12 公开了埃托啡的合成，其中将格利雅试剂（丙基碘化镁）加入下面所示的蒂巴因衍生物；

[0006]



[0007] 实施例 12 中给出的结果说明了 α- 异构体在由甲醇研磨粗反应产物后而生产，以及当它们用水稀释并将液体滗去时 β- 异构体可由甲醇的溶液中结晶。因此申请人预期描述在 GB 925,723 中的合成路线可用于二氢埃托啡，将同时产生 (R) 和 (S) 非对映体。然而，发现这不是事实。相反地丙基镁卤化物到二氢蒂巴因衍生物的加成以预料不到的高立体选择性进行，仅获得 (R) 非对映体。

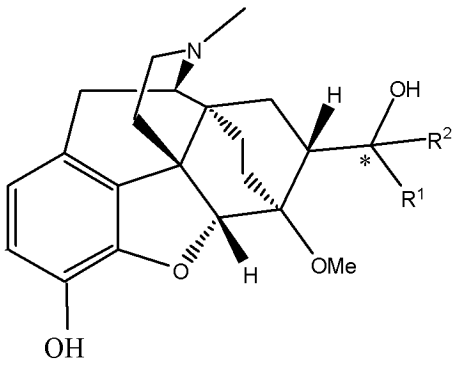
[0008] 就申请人已知，二氢埃托啡的 (S) 异构体从未制备过。因此存在对于提供 (S)- 二氢埃托啡的替代合成路线以及尤其是对于以高的非对映体过量产生 (S)- 二氢埃托啡的方法的需求。要求该异构体证实已知立体异构体的立体化学。

[0009] 申请人已经发现满足这些需求的方法。此外申请人已经发现二氢埃托啡的 (S) 异

构体具有有用的药理学性质以及特别是止痛作用。

[0010] 因此从一个方面看本发明涉及制备式 (VI) 的化合物或其盐或衍生物的方法，

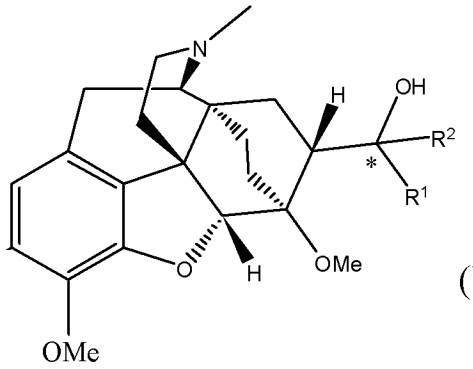
[0011]



(VI)

[0012] （其中 R^1 和 R^2 独立地是 C_{1-8} 烷基并且 * 表示立构中心，优选 S 立构中心），所述方法包括水解式 (V) 的化合物

[0013]

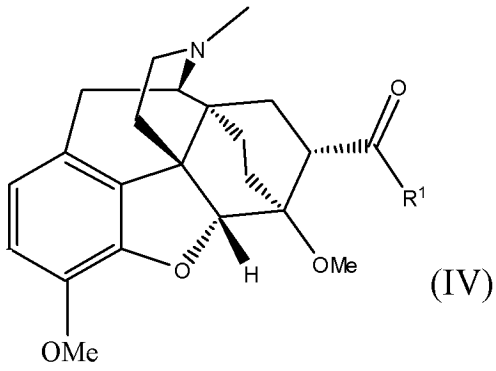


(V)

[0014] 其中 R^1、R^2 和 * 如上定义。

[0015] 在本发明优选的方法中，式 (V) 的化合物通过将式 (IV) 的化合物

[0016]



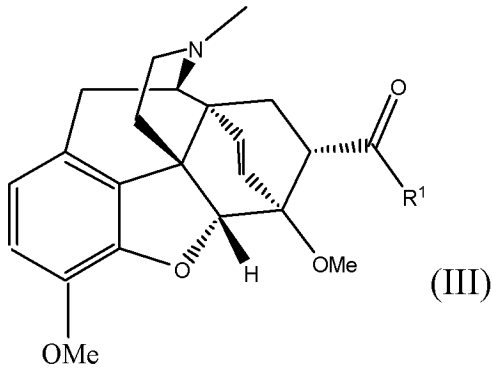
(IV)

[0017] （其中 R^1 如上定义）；

[0018] 与式 $R^2M(X)_p$ 的化合物反应而制备，其中 R^2 是 C_{1-8} 烷基，M 是金属，X 是卤化物以及 p 是 1 或 0)。

[0019] 在本发明进一步优选的方法中，式 (IV) 的化合物通过还原式 (III) 的化合物而制备

[0020]

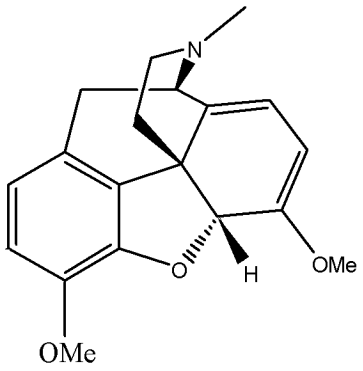


(III)

[0021] （其中 R^1如上定义）；

[0022] 在本发明仍然进一步优选的方法中，式（III）的化合物通过将式（I）的化合物

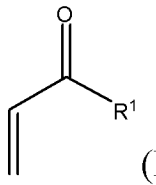
[0023]



(I)

[0024] 与式（II）的化合物反应而制备

[0025]

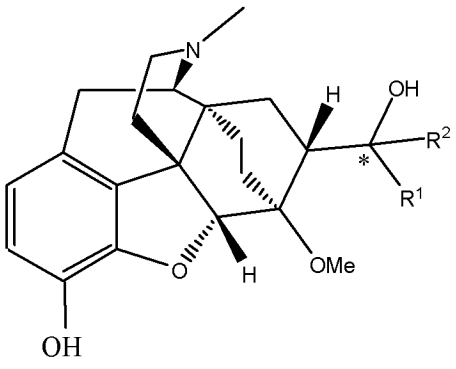


(II)

[0026] （其中 R^1是 $C_{1\ 8}$烷基）。

[0027] 因此，从另一方面看，本发明提供了制备式（VI）的化合物或其盐或衍生物的方法，

[0028]

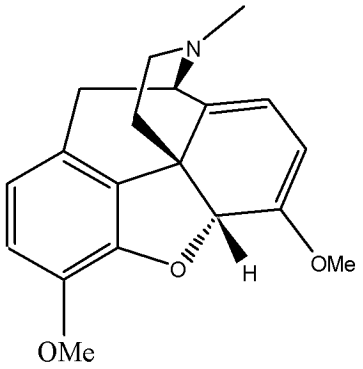


(VI)

[0029] （其中 R^1和 R^2独立地是 $C_{1\ 8}$烷基并且＊表示立构中心，优选 S 立构中心），所述方法包括：

[0030] 将式（I）的化合物

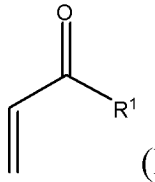
[0031]



(I)

[0032] 与式 (II) 的化合物反应

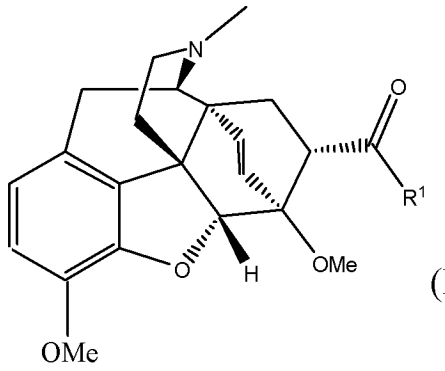
[0033]



(II)

[0034] (其中 R^1是 C_{1-8}烷基) 以产生式 (III) 的化合物

[0035]

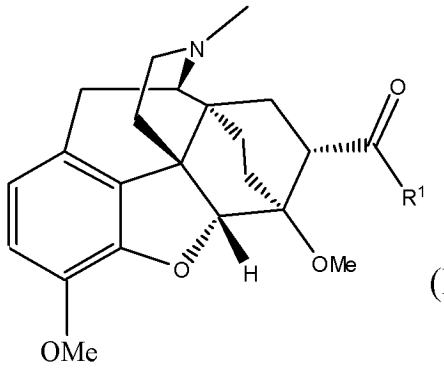


(III)

[0036] (其中 R^1如上定义);

[0037] 还原所述式 (III) 的化合物以产生式 (IV) 的化合物

[0038]

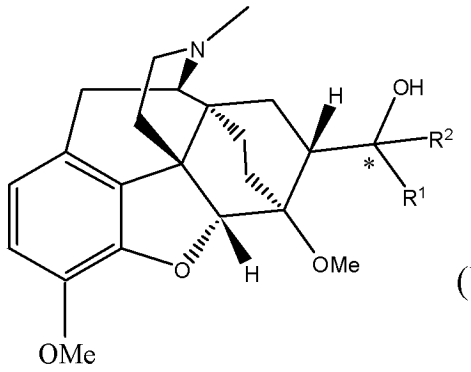


(IV)

[0039] (其中 R^1如上定义);

[0040] 将所述式 (IV) 的化合物与式 $R^2M(X)_p$的化合物反应 (其中 R^2是 C_{1-8}烷基, M 是金属, X 是卤化物以及 p 是 1 或 0) 以产生式 (V) 的化合物

[0041]



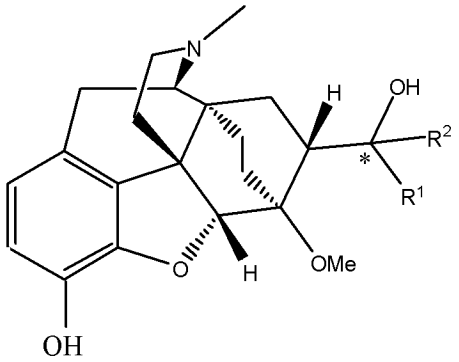
(V)

[0042] （其中 R^1，R^2和＊如上定义）；

[0043] (iv) 水解所述式 (V) 的化合物以生产式 (VI) 的化合物。

[0044] 从进一方面看，本发明涉及式 (VI) 的化合物或其盐或衍生物，

[0045]

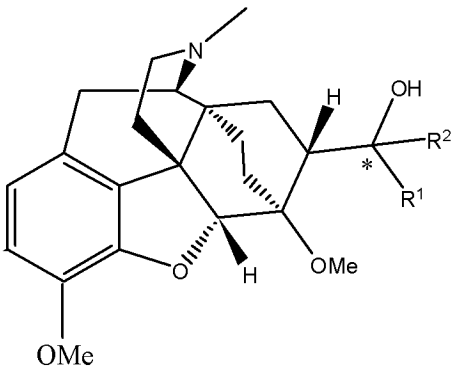


(VI)

[0046] 其中 R^1和 R^2独立地是 C_{1-8}烷基以及＊表示 (S) 立构中心。

[0047] 从仍然进一方面看，本发明涉及为上述方法的中间体的化合物，即式 (V)、(IV) 和 (III) 的化合物，或当适用时其盐或衍生物，如下所示：

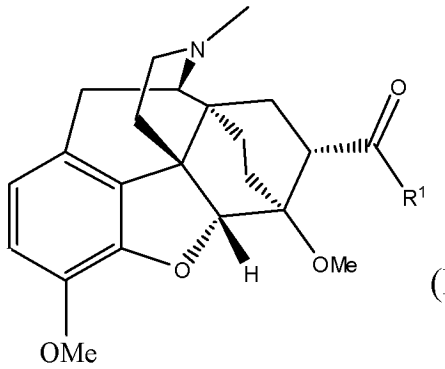
[0048]



(V)

[0049] 其中 R^1和 R^2独立地是 C_{1-8}烷基以及＊表示 (S) 或 (R) 立构中心，优选 (S) 立构中心。

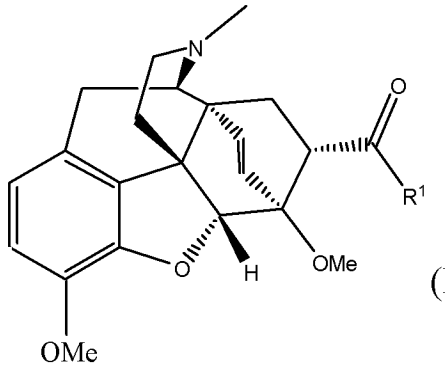
[0050]



(IV)

[0051] 其中 R^1 是 C_{1-8} 烷基。

[0052]

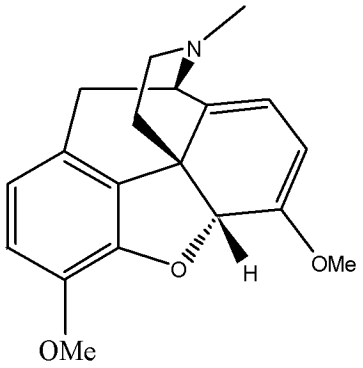


(III)

[0053] 其中 R^1 是 C_{1-8} 烷基。

[0054] 从仍然进一方面看，本发明涉及制备式 (III) 的化合物的方法，其包括将式 (I) 的化合物

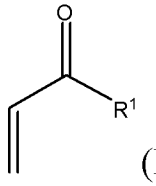
[0055]



(I)

[0056] 与式 (II) 的化合物反应

[0057]



(II)

[0058] (其中 R^1 是 C_{1-8} 烷基)。

[0059] 从另一方面看，本发明涉及组合物，优选药物组合物，其包括如上所述的新型化合物。

[0060] 从另一方面看，本发明涉及用于医药 (例如作为止痛剂) 的如上所述的化合物。

[0061] 从又一方面，本发明涉及如上所述的化合物用于制造用于治疗疼痛的药物的用途。

[0062] 如此处所用的术语“烷基”用来指直链、环状或支链的饱和脂肪族烃。存在于化合物 (II)-(VI) 的优选烷基是直链烷基。优选的烷基是其中 n 为 1 到 8 的式 C_nH_{2n+1} 的烷基。典型的烷基包括甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基、庚基以及辛基。在化合物 (II)-(VI) 中的优选的烷基是未取代的。

[0063] 式 (I) 的化合物是蒂巴因并且是例如从 Tasmanian Alkaloids,Pty 可商购的。或者式 (I) 的化合物可根据描述在文献中的步骤来制备。

[0064] 在本发明优选的方法中，在式 (II) 的化合物中的 R^1 优选是 $C_{2\text{-}7}$ 的烷基，更优选 $C_{3\text{-}5}$ 的烷基，尤其是 C_3 烷基（例如正 - 丙基）。式 (II) 的尤其优选的化合物是己烯 -3- 酮。其是例如从 Sigma-Aldrich 可商购的。

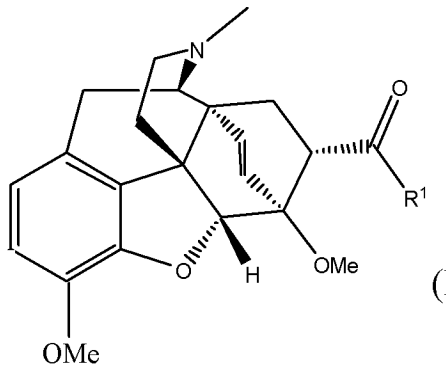
[0065] 将式 (I) 的化合物与式 (II) 的化合物反应以产生式 (III) 的化合物。这些化合物进行的反应一般称为狄尔斯 - 阿尔德 (Diels-Alder) 反应。狄尔斯 - 阿尔德反应可在现有技术中已知的常规条件下进行。例如式 (I) 和 (II) 的化合物的反应可在任何常规溶剂中进行。优选沸点超过 60℃的溶剂（例如甲醇和乙醇）。乙醇是尤其优选的溶剂。

[0066] 在式 (I) 和 (II) 的化合物之间的一般反应中，将化合物在过量的溶剂中加热回流例如 10-24 小时。反应的过程可采用例如 TLC 和 / 或 ^1H NMR 来监测。在优选的反应中，相对于式 (I) 的化合物使用 1.2-15 摩尔当量，更优选 1.5-10 摩尔当量或 2-8 摩尔当量的式 (II) 的化合物。在尤其优选的反应中，相对于式 (I) 的化合物使用约 1.2-2 摩尔当量，更优选 1.3-1.8 摩尔当量，例如约 1.5 摩尔当量的式 (II) 的化合物。

[0067] 然后将反应混合物冷却并浓缩，产生的产物即式 (III) 的化合物可通过常规的后处理步骤获得并任选进行提纯。提纯例如可通过从甲醇或异丙醇结晶而进行。更优选式 (III) 的化合物直接从反应溶剂结晶。可将其任选重结晶。反应的产率优选为至少 60%，更优选至少 65%，例如至少 80%。最大产率为 100%。式 (III) 的化合物的纯度优选是至少 95%，更优选至少 97%，仍更优选至少 99%，例如 99.5%。最大纯度为 100%。纯度优选使用 HPLC 来测定。

[0068] 在本发明的优选的工艺中，式 (III) 的化合物具有下式：

[0069]



(III)

[0070] 其中 R^1 如上定义，例如 R^1 是 $C_{2\text{-}7}$ 的烷基，更优选 $C_{3\text{-}5}$ 的烷基，特别是 C_3 的烷基（例如正 - 丙基）。

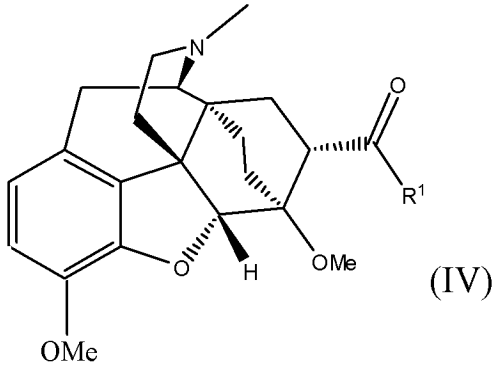
[0071] 式 (III) 的化合物可通过任何合适的已知的还原反应还原，但优选使用氢化反应

还原（例如在 Parr 容器中使用 H_2 或氢转移）。式（III）的化合物例如可在溶剂（例如乙醇）中在氢压力（例如直至 50psi H_2）下用催化剂（例如披钯碳）氢化。反应的体积优选在 5-80L 的范围内，更优选 10-20L，例如约 12L。所用的催化剂的量优选在 10-60wt％，更优选 30-55wt％范围内，例如约 50wt％。反应可在 30-100℃的温度下进行，优选在 40-60℃的温度下，例如在 50℃或 65℃下。

[0072] 在反应结束时，可将其中所用的任何催化剂（例如钯）通过过滤而除去。然后可将产物式（IV）的化合物通过常规的后处理步骤来分离。可将式（IV）的化合物任选提纯。例如，用 C_{1-8} 的烷烃如庚烷洗涤以除去乙醇。然而氢化反应的优点在于可将式（IV）的化合物在不进行色谱提纯和／或结晶的情况下使用。反应的产率优选为至少 50％，更优选至少 65％，仍更优选 85％，仍更优选至少 90％。最大产率是 100％。式（IV）的化合物优选以至少 95％，更优选至少 99％，例如至少 99.5％的纯度获得。最大纯度是 100％。纯度优选使用 HPLC 测定。

[0073] 在本发明的优选的工艺中，式（IV）的化合物具有下式：

[0074]



(IV)

[0075] 其中 R^1 如上定义，例如 R^1 是 C_{2-7} 的烷基，更优选 C_{3-5} 的烷基，特别是 C_3 的烷基（例如正－丙基）。

[0076] 将式（IV）的化合物与式 $R^2M(X)_p$ 的化合物反应，其中 R^2 是 C_{1-8} 烷基，M 是金属（例如碱或碱土金属）、X 是卤化物以及 p 是 1 或 0，以生产式（V）的化合物。在式 $R^2M(X)_p$ 的优选化合物中，R^2 是 C_{1-3} 烷基，更优选 C_{1-2} 烷基，例如甲基。

[0077] 在式 $R^2M(X)_p$ 的进一步优选的化合物中，M 是镁或锂，优选镁。当 M 是 Mg 时，p 优选是 1。当 M 是锂时，p 优选是 0。当存在的 X 优选是 Cl、Br 或 I 时，卤化甲基镁、特别是溴化甲基镁以及碘化甲基镁是式 $R^2M(X)_p$ 的优选的化合物，尤其是溴化甲基镁。

[0078] 式（IV）的化合物与式 $R^2M(X)_p$ 的化合物的反应一般称为亲核加成反应。当 M 是 Mg 以及 X 是卤化物时，该反应常称作 Grignard 加成。该加成反应可在任何常规溶剂中进行。优选的溶剂是无水的（例如无水溶剂）。优选的溶剂的实例是醚例如 MTBE、THF 或二乙醚。优选 MTBE 或二乙醚。二乙醚是尤其优选的溶剂。当使用其中 M 是 Mg、X 是 Cl 以及 p 是 2 的式 $R^2M(X)_p$ 的化合物时，THF 是尤其优选的。

[0079] 加成反应优选在 20 到 60℃范围的温度下进行，更优选 30 到 45℃，例如大约 35℃。优选使用过量的式 $R^2M(X)_p$ 的化合物。特别是相对于式（IV）的化合物优选使用 1.2-4 当量，更优选 1.5-3 当量的式 $R^2M(X)_p$ 的化合物。

[0080] 式（V）的化合物可使用常规技术分离。其任选例如用甲醇研磨。另外或者替代

地，可将式 (V) 的化合物通过柱层析提纯。还可将式 (V) 的化合物结晶。优选将式 (V) 的化合物用甲醇结晶。该反应的产率优选为至少 20％，更优选至少 30％，例如 20-60％，仍更优选至少 65％。最大产率是 100％。式 (V) 的化合物的纯度优选是至少 95％，仍更优选至少 99％，例如至少 99.5％。最大纯度是 100％。纯度优选使用 HPLC 测定。

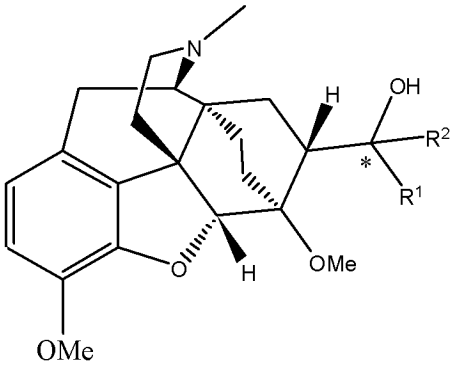
[0081] 加成反应在式 (V) 的化合物在碳 19 处产生新的立构中心。该立构中心的构型至少部分地取决于 R^1和 R^2的性质。因此均可产生 (R) 和 (S) 立构中心。本发明的方法因此可提供式 (V) 的化合物的外消旋混合物。相应地本发明提供式 (VI) 的化合物的外消旋混合物，例如 19-(R) 和 (S)- 二氢埃托啡。

[0082] 在本发明优选的方法中，(S) 立构中心在碳 19 产生。在特别优选的方法中，以至少 85％，更优选至少 90％，例如至少 95％或至少 99％的非对映体过量，在碳 19 形成 (S) 立构中心。因此，在优选的方法中，在没有或基本上没有 (R)- 异构体的情况下提供式 (V) 的化合物。优选式 (V) 的化合物以小于 1wt％，仍更优选小于 0.5wt％的 (R)- 异构体提供。

[0083] 在尤其优选的本发明的方法中，R^1是 C_{3-6}烷基（例如丙基），R^2是 C_{1-2}烷基（例如甲基），以及 (S) 立构中心以至少 85％，更优选至少 90％，例如至少 95％或至少 99％的非对映体过量在加成反应中在碳 19 产生。

[0084] 因此在本发明的优选的工艺中，式 (V) 的化合物具有下式：

[0085]

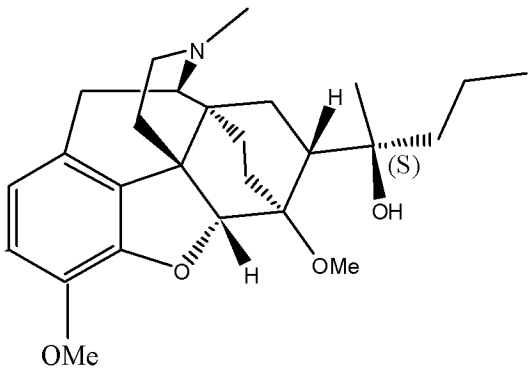


(V)

[0086] 其中 R^1和 R^2如上所述，例如 R^1是 C_{2-7}烷基，更优选 C_{3-5}烷基，特别是 C_3烷基（例如正 - 丙基），R^2是 C_{1-3}烷基，更优选 C_{1-2}烷基，例如甲基和 (*) 表示立构中心，优选 S 立构中心。

[0087] 在本发明尤其优选的方法中，式 (V) 的化合物是：

[0088]



(Va)

[0089] 如上所述，式 (V) 的化合物可以任选结晶。在本发明的优选方法中，将式 (V) 的化合物结晶。可将任何常规溶剂用于结晶工艺，例如 C_{1-4}醇、水、丙酮、乙腈、DCM 和 MTBE。甲

醇、乙醇、水及其混合物是优选的结晶溶剂，尤其是乙醇 / 水和乙醇。在一般的结晶方法中，将从加成反应获得一定量的式 (V) 的化合物溶于选定的溶剂，优选以其最低用量。使得溶液静置例如 3-4 天。优选结晶在 -5 到 5℃例如 0-4℃下进行。

[0090] 优选将式 (V) 的化合物用碱金属氢氧化物水解以形成式 (VI) 的化合物。优选的碱金属氢氧化物是 KOH。优选将过量的碱金属氢氧化物用于该水解反应，例如相对于式 (V) 的化合物的过量的 10-40 当量。该反应可在任何常规的溶剂中进行。二甘醇是优选的溶剂。

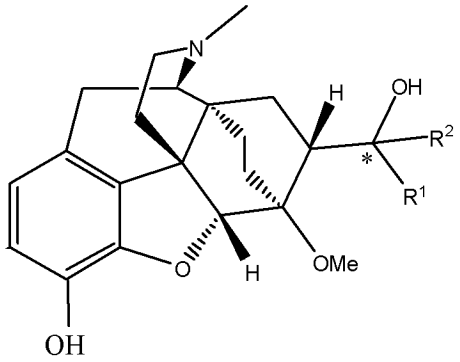
[0091] 水解反应优选在 150-220℃范围的温度下进行，例如约 180-200℃。反应的进程可通过常规方法例如 TLC 来监测，但一般将花 10-20 个小时，例如 12-18 小时。在反应完成后，可将式 (VI) 的化合物使用常规技术来分离。可将式 (VI) 的化合物研磨。反应的产率优选为至少 40％，更优选至少 45％，仍更优选 85％，仍然更优选至少 90％。最大产率是 100％。式 (VI) 的化合物的纯度优选是至少 90％，仍更优选至少 95％。最大纯度是 100％。纯度优选使用 HPLC 测定。

[0092] 还可将式 (VI) 的化合物结晶。用于结晶的优选溶剂是 AcCN 和 MTBE。更优选式 (VI) 的化合物从 C_{1-4}的醇和 / 或水例如乙醇和 / 或乙醇 / 水结晶。

[0093] 在优选的水解反应中，保持存在于式 (V) 的化合物中的每个立构中心的立体化学。优选在没有或基本上没有 (R)- 异构体的情况下提供式 (VI) 的化合物，例如 19-S- 二氢埃托啡。优选存在小于 1wt％，更优选小于 0.5wt％，仍更优选小于 0.01wt％的 (R)- 异构体。

[0094] 因此在优选的方法中，式 (VI) 的化合物是 ：

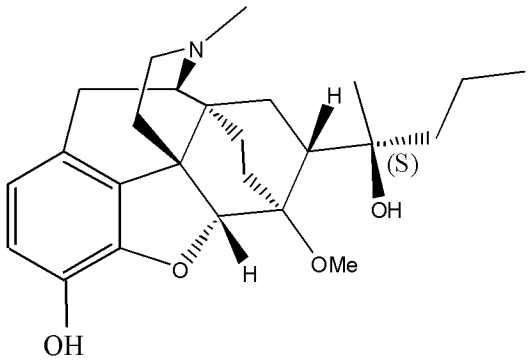
[0095]



[0096] 其中 R^1和 R^2如上所述，例如 R^1是 C_{2-7}烷基，更优选 C_{3-5}烷基，特别是 C_3烷基 (例如正 - 丙基)，R^2是 C_{1-3}烷基，更优选 C_{1-2}烷基，例如甲基和 (*) 表示立构中心，优选 S 立构中心。优选式 (VI) 的化合物具有至少 99％的纯度，例如如通过 HPLC 测定。

[0097] 在特别优选的方法中，式 (VI) 的化合物是 ：

[0098]



(VIa)

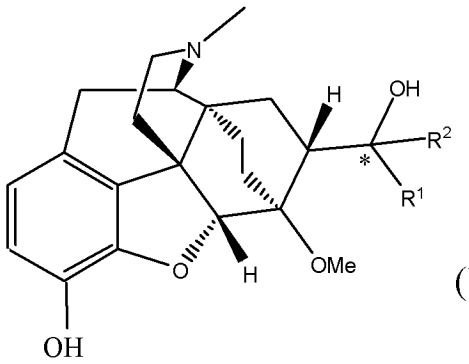
[0099] 可将如上所述的化合物(V)和(VI)通过本领域公知技术转化为其盐和衍生物。优选的盐是药学上可接受的盐。优选的衍生物是药学上可接受的衍生物。有时以少量(例如＜5wt％)存在的衍生物是6-羟基化合物。若水解反应附加地水解6-甲氧基,其从而产生。6-羟基衍生物可通过重结晶分离。

[0100] 优选的盐是那些保持本发明的化合物的生物有效性和性质的那些,由合适的无毒有机或无机酸形成。优选Adid加成盐。盐的代表性实例包括衍生自无机酸如盐酸、氢溴酸、氢碘酸、硫酸、氨基磺酸,磷酸和硝酸的那些,以及衍生自有机酸如对甲苯磺酸、水杨酸、甲磺酸、草酸、丁二酸、柠檬酸、苹果酸、乳酸、富马酸、三氟乙酸的那些。将化合物改变为盐是化学工作者熟知的获得化合物的改善的物理和化学稳定性、吸湿性、流动性和溶解性的方法。

[0101] 本发明的优选化合物是如上所述式(VI)、(V)、(IV)和(III)的化合物,其中R^1优选是C_{2-7}烷基,更优选C_{3-5}烷基,特别是C_3烷基(例如正-丙基)。在式(VI)和(V)的优选化合物中,R^2是C_{1-3}烷基,更优选C_{1-2}烷基,例如甲基。在本发明的化合物(VI)和(V)中,在碳19的立构中心是(S)。

[0102] 式(VI)的优选化合物是下式的化合物:

[0103]

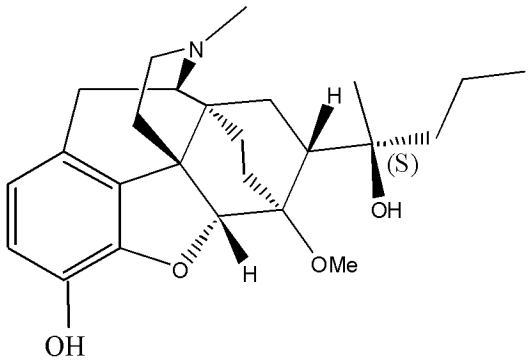


(VI-S)

[0104] 其中R^1和R^2如上所述,例如R^1是C_{2-7}烷基,更优选C_{3-5}烷基,特别是C_3烷基(例如正-丙基),R^2是C_{1-3}烷基,更优选C_{1-2}烷基,和(*)表示(S)立构中心。

[0105] 式(VI)的尤其优选化合物是下式的化合物:

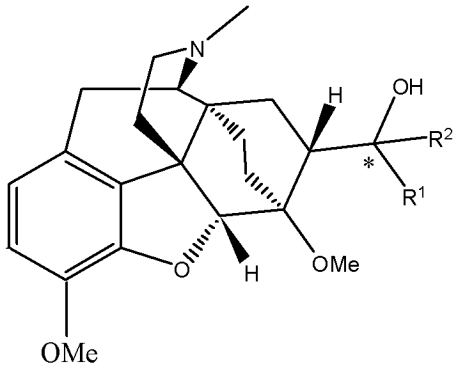
[0106]



(VIa)

[0107] 本发明的进一步优选的化合物是那些制备式 (VI) 的化合物的中间体。因此本发明其它优选的化合物是式 (V-S) 的化合物 :

[0108]

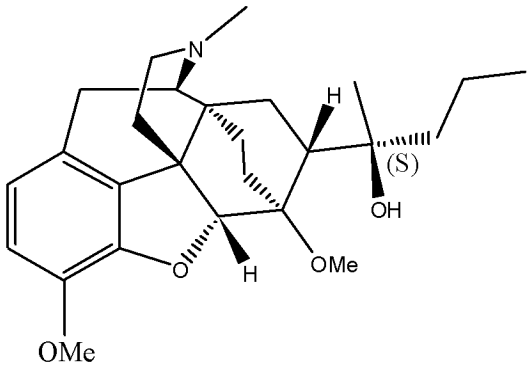


(V-S, V-R)

[0109] 其中 R^1和 R^2如上所述 (例如 R^1是 C_{2-7}烷基,更优选 C_{3-5}烷基,特别是 C_3烷基 (例如正 - 丙基),R^2是 C_{1-3}烷基,更优选 C_{1-2}烷基),和 (*) 表示 (S) 或 (R) 立构中心,优选 (S) 立构中心。

[0110] 尤其优选的式 (V) 的化合物是 :

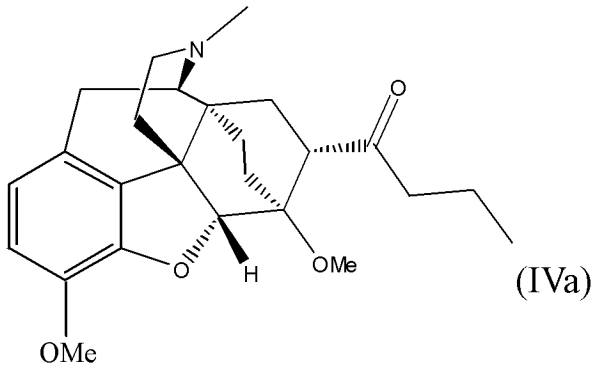
[0111]



(Va)

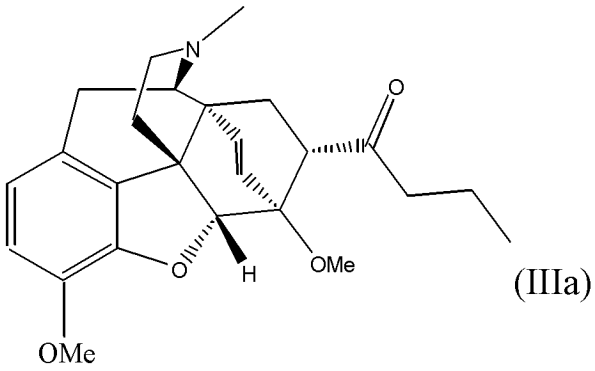
[0112] 进一步优选的中间体是如下所示的式 (IVa) 和 (IIIa) 的化合物 :

[0113]



(IVa)

[0114]



(IIIa)

[0115] 如上所述，式 (III) 的化合物如上述的 (IIIa) 可通过与式 (II) 的狄尔斯 - 阿尔德反应而形成。该反应形成本发明的进 - 方面。优选如上所述的 R^1。

[0116] 本发明的化合物具有各种用途。化合物 (VI-S) 例如可用于证实已知的二氢埃托啡产物的 (R) 手性。本发明的化合物以这样的方式的用途在下文中的实施例中说明。本发明的化合物 (III) 和 (IV) 也可用于制备 (R)- 二氢埃托啡，其已知具有有用的药学性质。

[0117] 此外，可将式 (VI-S)、(V-S)、(V-R)、(IV) 和 (III) 的化合物，尤其是式 (VI-S) 的化合物结合到组合物中，优选药物组合物。因此，本发明还包括药物组合物，其包括如上所述的发明的化合物（例如式 (VI-S)、(V-S)、(V-R)、(IV) 和 (III) 特别是 (VI-S) 的化合物）和一种或多种药学上可接受的载体。本发明的化合物例如式 (VI-S) 的化合物可单独或者与另一种活性组分结合在组合物中。

[0118] 本发明的组合物例如药物组合物可采用任何常规形式。优选，本发明的组合物以适于透皮给药的剂型制备。本发明替代的优选组合物以适于肠胃外例如静脉给药的剂型制备。

[0119] “透皮”递送指的是如上所述的化合物对个体的皮肤表面给药以使得试剂穿过皮肤组织并进入个体的血液流中。术语“透皮”是用来包括跨粘膜给药，即将化合物给药到个体的粘膜（例如舌下的、口腔的、阴道的、直肠的）表面以使得它穿过粘膜组织并进入个体的血液流中。

[0120] 本发明的透皮剂型包括但不限于口腔锭剂、喷雾剂、气溶胶、乳膏剂、洗剂、软膏剂、凝胶剂、溶液剂、乳剂、混悬剂或本领域熟练技术人员已知的其它形式。适于处理在口腔内的粘膜组织的剂型可以作为嗽口水或口腔的凝胶剂配制。此外，透皮剂型包括“储藏类型 (reservoir type)”或“基质类型 (matrix type)”贴片，其可施用于皮肤并保持一段时间以使得容许要求用量的活性成分的透入。

[0121] 合适的赋形剂（例如载体和稀释剂）和其它可用于提供包括在本发明内的透皮剂

型的材料对药学领域的熟练技术人员是熟知的，且取决于给定的药物组合物或剂型将施用的具体组织。考虑该事实的情况下，一般的赋形剂包括但不局限于水、丙酮、乙醇、乙二醇、丙二醇、丁 -1,3- 二醇、豆蔻酸异丙酯、棕榈酸异丙酯、矿物油及其混合物以形成洗剂、酊剂、乳膏剂、乳剂、凝胶剂或软膏剂，其为无毒且药学可接受的。如果需要，还可将保湿剂或湿润剂加入药物组合物和剂型。这样的另外的组分的实例在本领域是熟知的。

[0122] 取决于要治疗的具体组织，另外的组分可在用本发明的化合物处理之前、一起或之后使用。例如可将渗透增强剂可用于辅助将化合物递送到组织。合适的渗透增强剂包括但不限于：丙酮；各种醇如乙醇、油醇 (oleyl) 和四氢化呋喃甲醇 (tetrahydrofuryl)；烷基亚砜如二甲基亚砜；二甲基乙酰胺；二甲基甲酰胺；聚乙二醇；吡咯烷酮如聚乙烯吡咯烷酮；Kollidon 等级 (Povidone，Polyvidone)；脲；以及各种水溶性和不溶糖酯如吐温 80（聚山梨酸酯 80）和司盘 60（单硬脂酸山梨糖醇酐酯）。

[0123] 药物组合物或剂型的 pH 或者药物组合物或剂型施用的组织的 pH 也可调节改善一种或多种活性组分的递送。同样地，溶剂载体的极性、其离子强度或张力可调节以改善递送。可将化合物如硬脂酸酯加入药物组合物或剂型以有利地改变一种或多种活性组分的亲水性或亲油性以改善释放。在这方面，可将硬脂酸盐用作用于配方作为类脂物载体、有作为乳剂或表面活性剂，以及作为释放提高或渗透提高剂。可将有效组分的不同盐、水合物或溶剂化物用于进一步调节得到的组合物的性质。

[0124] 用于本发明的化合物（例如式 (VI-S) 的化合物）的舌下给药的口腔凝胶剂能通过将该化合物与一种或多种包括调味剂的合适的赋形剂混合而制备。用于本发明的化合物（例如式 (VI-S) 的化合物）的直肠给药的栓剂可通过将该化合物与合适的赋形剂如可可脂、水杨酸盐以及聚乙二醇混合而制备。用于阴道给药的配方可为阴道栓剂、棉塞、乳膏剂、凝胶、糊剂、泡沫或喷雾剂配方形式，其除了有效成分外可包含本领域中已知的这样的合适载体。

[0125] 对于局部给药，包含本发明的化合物的药物组合物可为适于皮肤、眼睛、耳朵或鼻给药的乳膏剂、软膏剂、擦剂、洗剂、乳剂、混悬剂、凝胶剂、溶液、糊剂、粉末、喷雾剂以及滴剂的形式。局部给药还可包括通过诸如透皮贴片的方式透皮给药。以这种形式的递送是尤其优选的。

[0126] 静脉给药指的是上述化合物以液体形式直接进入静脉的给药。适于静脉给药的剂型包括但不限于溶液、乳剂和混悬剂。

[0127] 因此从进一方面看，本发明提供如上所述的化合物以及尤其是式 (VI-S) 的化合物用于止痛剂，其中所述的化合物静脉给药。

[0128] 一般，用于静脉给药的组合物包括无菌等渗压的含水缓冲液。必要时，该组合物还可以包括增溶剂。该组分可分别或混合在一起在单元剂型中提供。例如组分可在密闭容器（例如显示活性剂用量的安瓿或小药囊 (sachette)）中分别作为干燥冻干粉末或无水浓缩物或者作为在给药前用以混合的安瓿无菌水或缓冲液提供。或者该组合物可以预混合形式提供。

[0129] 发明的化合物（例如式 (VI-S) 的化合物）可用于医药例如以提供痛觉消失。要求的化合物的剂量例如将取决于要处理的受试者、要处理的疼痛的严重程度、所用的化合物、给药方式等，但将容易地由本领域的熟练技术人员决定。

[0130] 从进一方面看，本发明提供了治疗需要疼痛减轻的受试者（例如哺乳动物）的方法，其包括向所述受试者施用治疗有效量的如上所述的化合物（例如式(VI-S)的化合物）。也令人惊讶地发现在白鼬(ferrets)在恶心和呕吐的标准试验中R-DHE或S-DHE都不会如用于如下所述的试验中以类似的剂量范围诱发恶心或呕吐。

[0131] 本发明的化合物尤其适用于治疗伤害感受性的和神经性的疼痛。

[0132] 本发明现在将参照以下非限制性实施例和图描述，其中：

[0133] 图1显示对于(R)和(S)-19Propyldihydrothevinol的1H NMR光谱

[0134] 图2和3显示了(R)-19Propyldihydrothevinol的X-射线结构

[0135] 图4和5显示了(S)-19Propyldihydrothevinol的X-射线结构

[0136] 图6和7显示了(R)-二氢埃托啡的X-射线结构

[0137] 图8和9显示了(S)-二氢埃托啡的X-射线结构

[0138] 图10显示了存在于(R)和(S)-二氢埃托啡中的所有手性碳的立体化学

[0139] 图11显示了在(R)或(S)DHE或参照或比较物质的静脉给药之后的时间-过程曲线

[0140] 图14到17显示了在(R)或(S)DHE或参照或比较物质的静脉给药之后的剂量反应曲线

[0141] 图18到23显示了在神经性疼痛的脊神经结扎模型中的(R)或(S)DHE或参考或比较物质的静脉给药的效果

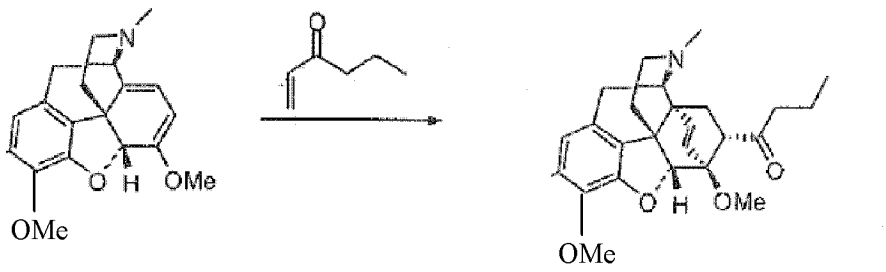
实施例

[0142] (S)-二氢埃托啡的制备

[0143] 第1阶段-狄尔斯-阿尔德反应

[0144] 反应流程

[0145]



蒂巴因

[0146] 方法

[0147] 将蒂巴因用己烯-3-酮在如下表中所示的溶剂中处理并加热以回流。在适量的时间（隔夜）之后，使反应冷却并使混合物蒸发。将产生的油溶于乙酸异丙酯(IPAc)且用1M盐酸溶液洗涤。将酸性层合并并用IPAc洗涤，然后用碳酸氢钠溶液碱化以及最后萃取入二氯甲烷(DCM)。将DCM层蒸发以给出黄色固体。

[0148] 表1-试验总结，第1阶段

[0149]

规格	条件	温 度 (℃)	说明
500mg	苯 (20 体积) 己烯-3-酮 (2.0 mol 当量)	回流	回流过夜以给出大约 40% 完成

[0150]

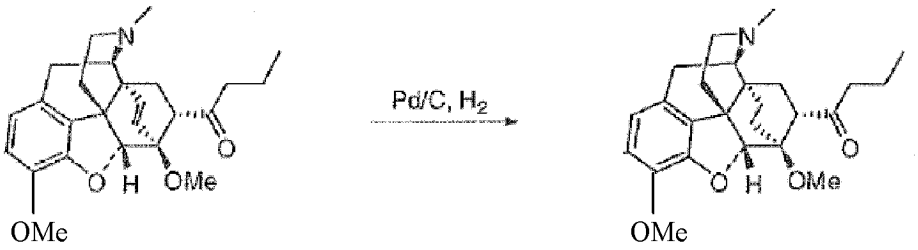
4.5g	甲醇 (10 体积) 己烯-3-酮 (2.0 mol 当量)	回流	由 NMR 68% 完成
4.5g	乙醇(10 体积) 己烯-3-酮(7.5 mol 当量)	回流	由 NMR>95% 完成， 70% 分离产出

[0151] 使用乙醇作为溶剂，产物最终分离产出作为淡黄固体 70％，在后处理之后，通过 ^{1}H NMR 的质量显示非常好。

[0152] 第 2 阶段 - 氢化

[0153] 反应流程

[0154]



[0155] 方法

[0156] 将来自第 1 阶段的 19-propylthevinone(4.1g) 中间体在乙醇 (60ml) 中使用披钯碳 (1g ;10％) 在直至 50psi 的氢压力下氢化。容器的温度保持在～ 50℃以及压力保持在 50psi，直到未见氢进一步的吸收。将催化剂过滤并在真空下通过蒸馏除去溶剂。分离的产率总计为 91％，产生 3.8g 的产物

[0157] 表 2- 试验总结，第 2 阶段

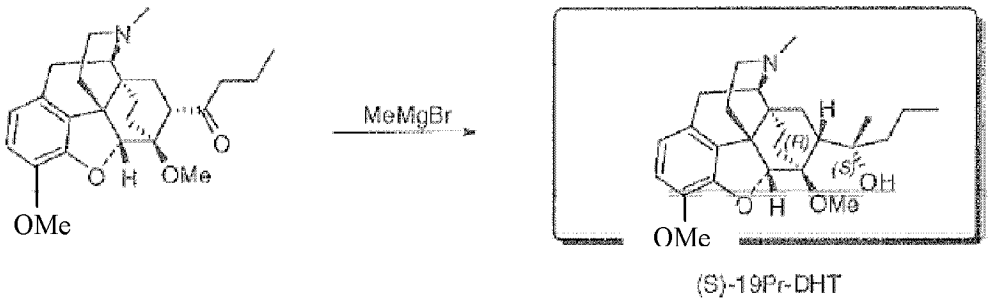
[0158]

规格	条件	温 度 (℃)	说明
4.1g	乙醇 (60ml) 1g Pd/C (10%) 氢 (50psi)	50℃	-91% 分离的产率

[0159] 第 3 阶段 -Grignard 加成

[0160] 反应流程

[0161]



(S)-19Pr-DHT

[0162] 方法

[0163] 将 19-propyldihydrothevinone(第 2 阶段产物)溶于二乙醚 (35 体积)。将溴化甲基镁 (92.6mol. 当量)在 5 分钟内在 20-25℃(小的放热)下加入该溶液。然后将产生的混合物加热到～ 40℃内部温度～ 2 小时,接着冷却和用氯化铵溶液急冷。将混合物用 2- 甲基 THF 萃取以及将有机层在真空中蒸发以产生粘性油。

[0164] 表 3- 试验总结,第 3 阶段

[0165]

规格	条件	温度 (℃)	说明
0.13g	2-二乙醚(25 体积) 3M MeMgBr (1.5 当量)	40℃	产生优质的物质
0.79g	2-二乙醚(25 体积) 3M MeMgBr (1.5 当量)	35 ℃	搅拌过夜。后处理之后 93%纯度。在甲醇中研磨粗产物以产生 0.32g 纯物质以及 0.5g 不纯的残余物。
2.2g	2-二乙醚(35 体积) 3M MeMgBr (2.6 当量)	35℃	分离的 2.6g 粗产物(~ 90%纯)。在甲醇中研磨以产生 1.6g 的纯物质。

[0166] Grignard 加成的唯一产物是 (S)- 对映体。未检测到 (R)- 对映体。

[0167] 第 4 阶段 -(R) 和 (S)-19-propyldihydrothevinol 的结晶

[0168] 为了制备用于 X- 射线晶体衍射的高质量单晶,将一系列试验在许多溶剂中进行以确定用于 19-propyldihydrothevinol 的生长单晶的最佳溶剂体系。将试验概括在下面的表 4 中。R- 对映体使用交替法制备。

[0169] 通常,所用的结晶方法如下 :将少量的固体 19-propyldihydrothevinol(从第 3 阶段获得的)溶于刚好高于最低量的溶剂。使溶液静置 3-4 天,通过过滤或滗析除去溶剂以分离单晶。

[0170] 表 4- 重结晶的概述

[0171]

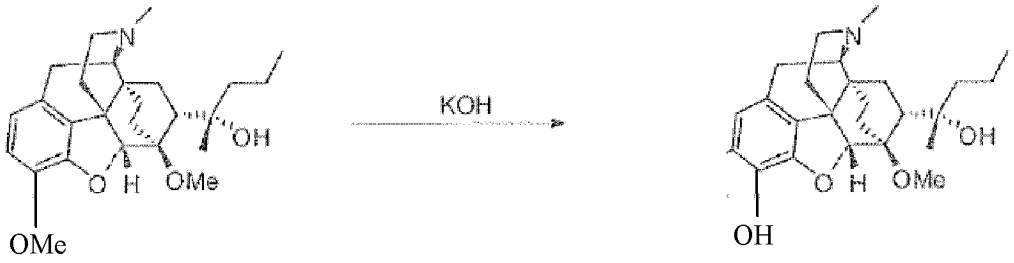
溶剂	共溶剂	非对映异构体	温度	结晶	说明
MTBE	无	(S)	RT	是	高质量-提交供X-射线的
AcCN	无	(S)	RT	是	高质量
DCM	无	(R)	溶解热	是	高质量-提交供X–射线的
丙酮	无	(R)	溶解热	是	高质量-提交供X-射线的
乙醇	无	(R)	溶解热	是	高质量-提交供X-射线的

[0172] 对于每个非对映体的 ^{1}H NMR 光谱示于图 1 中。

[0173] 第 5 阶段 -(S)-19-propyldihydrothevinol 的水解

[0174] 反应流程

[0175]



[0176] 方法

[0177] 将 (S)-19-propyldihydrothevinol（来自第 3 阶段）溶于二甘醇 (17 体积 (vols)) 以及用氢氧化钾（～ 20 当量）处理并加热到～ 195℃ 12-18 小时。在该时间之后，将反应混合物冷却到室温并急冷入水中 (40 体积)。将产生的溶液使用固体氯化铵酸化到 pH 9-10，以及用 DCM(3x50 体积）萃取混合物。将结合的有机萃取物在真空中蒸发至粗产物油（大约 40％纯度）。纯度通过在甲醇中重复研磨而提高直到形成黄色固体以及以良好的纯度（＞ 95％）分离。

[0178] 将产物从几种溶剂中重结晶，结晶由乙腈获得。将这些用于 X- 射线结晶研究。

[0179] R- 对映体使用类似的反应获得。

[0180] X- 射线晶体衍射研究

[0181] 所有的 X- 射线晶体衍射试验在 Oxford Xcalibur 单晶衍射计或 Nonius Kappa 衍射计中进行。两种机器均使用钼 K α X 射线源以及 CCD 检测器。

[0182] (R) 和 (S)19-propyldihydrothevinol

[0183] 将几批 (R) 和 (S)19-propyldihydrothevinol 均提交供 X- 射线晶体衍射。

[0184] X 射线结构显示于图 2-5 中。

[0185] 图 2 和 3 显示 (R)-19Propyldihydrothevinol 的 X 射线结构。从 X- 射线，可明显看出其在碳 19 具有 (R)- 构型。这可关于手性甲醚分配，其保持从蒂巴因起始材料的 (R)- 构型。

[0186] 另外从图 3，其中显示了氢原子，可看出在 7 位的氢与在 5 位（紧挨着呋喃环）的氢在同一面，给出作为 (R) 的构型。

[0187] 这样所有的手性碳现在已经分配并描述在图 10 中。

[0188] 表 6- 其它的信息 (R)-19-propyldihydrothevinol

[0189]

性质	值
对称晶胞设置	单斜晶的
对称晶架群名称(Symmetry space group name)	H-M P2(1)
环线对称当量 pos 作为 xyz(Loop symmetry equiv pos as xyz)	‘x, y, z’ ‘-x, y+1/2, -z’
晶胞长度 a	11.0464(6)
晶胞长度 b	12.4554(7)
晶胞长度 c	16.2271(7)
晶胞角度 α	90.00
晶胞角度 β	98.481(5)
晶胞角度 γ	90.00
晶胞体积	2208.2(2)

[0190] 图 4 和 5 显示了 (S)-19Propyldihydrothevinol 的 X- 射线结构。

[0191] 从图 4 可明显看出其在碳 19 的 (S)- 构型的立体化学与显示在图 3 中的结晶相反。这可分配手性甲醚，其保持了从蒂巴因起始材料的 (R)- 构型。

[0192] 7- 碳氢（示于图 5 中）再次显示了在这个碳的构型也是 (R)，如同第一非对映异构物。

[0193] 因此我们现在可以确实地作结论 :通过 X- 射线晶体衍射的 2 种化合物之间的区别是在碳 19 的立体构型。

[0194] 表 7- 其它的信息 (S)19-Propyldihydrothevinol

[0195]

性质	值
对称晶胞设置	单斜晶的
对称晶架群名称(Symmetry space group name)	H-M P2(1)
环线对称当量 pos 作为 xyz(Loop symmetry equiv pos as xyz)	‘x, y, z’ ‘-x, y+1/2, -z’
晶胞长度 a	13.8650(3)
晶胞长度 b	10.8560(2)
晶胞长度 c	15.4030(4)
晶胞角度 α	90.00
晶胞角度 β	99.7500(8)
晶胞角度 γ	90.00
晶胞体积	2284.95(9)

[0196] (R) 和 (S)- 二氢埃托啡

[0197] X 射线结构显示于图 6-9 中。

[0198] 图 6 和 7 显示 (R)- 二氢埃托啡的 X 射线结构。从这些图可明显看出其在碳 19 具有 (R)- 构型。这可分配给手性甲醚，其保持从最初的起始材料蒂巴因的 (R)- 构型。

[0199] 表 8- 其它的信息 (R)- 二氢埃托啡

[0200]

性质	值
对称晶架群名称(Symmetry space group name)	P 2_1 2_1 2
环线对称当量 pos 作为 xyz(Loop symmetry equiv pos as xyz)	‘x, y, z’ ‘, ‘-x, ½+y, -z’
晶胞长度 a	16.3405(7)
晶胞长度 b	35.605(2)
晶胞长度 c	7.5209(3)
晶胞角度 α	90.00
晶胞角度 β	90.00
晶胞角度 γ	90.00
晶胞体积	4375.69

[0201] 图 8 和 9 显示了 (S)- 二氢埃托啡的 X 射线结构。从这些图可明显看出其在碳 19 具有 (S)- 构型。这可分配给手性甲醚，其保持从最初的起始材料蒂巴因的 (R)- 构型。

[0202] 另外 7- 碳氢（示于图 9 中）显示了在这个碳的构型也是 (R)，如同第一非对映异构物。

[0203] 因此可以确实地作结论：通过 X- 射线晶体衍射的 2 种化合物之间仅有的区别是在碳 19 的立体构型。

[0204] 表 9- 其它的信息 (S)- 二氢埃托啡

[0205]

性质	值
对称晶架群名称(Symmetry space group name)	H-M P2(1)
环线对称当量 pos 作为 xyz(Loop symmetry equiv pos as xyz)	‘x, y, z’ ‘, 旋转轴(2 倍): ‘-x, -y, z’ 螺旋轴 (2 倍): ‘½-x, ½+y, -z’ 螺旋轴 (2 倍): ‘½+x, ½-y, -z’
晶胞长度 a	7.2310(3)
晶胞长度 b	14.0795(6)
晶胞长度 c	10.6984(5)
晶胞角度 α	90.00
晶胞角度 β	96.226(4)
晶胞角度 γ	90.00
晶胞体积	1082.77

[0206] 工艺的优化

[0207] 使用以下方法和设备 :

[0208] Method 38XB 和 UFC-LC-MUN-1 是使用 Xbridge C18 柱和 pH 9.2 的由乙腈和 0.01M 乙酸铵组成的流动相的反相、梯度 HPLC 方法。

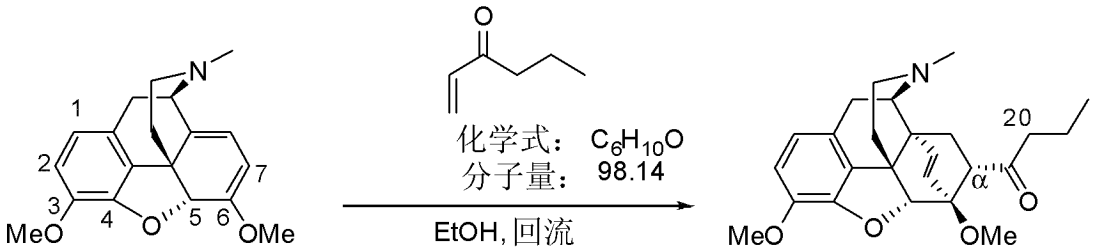
[0209] NMR 使用 Bruker Avance 400MHz 分光计进行

[0210] MS 使用 ZMD Micromass 质谱仪进行

[0211] LC 使用 Agilent 1100HPLC 体系进行

[0212] 第 1 阶段 :狄尔斯 - 阿尔德反应

[0213]



蒂巴因(1)

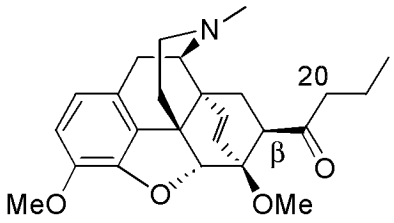
化学式： $C_{19}H_{21}NO_3$
分子量： 311.37

20-α-ethylthevinone (2)

化学式： $C_{25}H_{31}NO_4$
分子量： 409.52

[0214] 最初使用的方法如上所述。主要的污染物作为如下所示的 7β - 异构体确定。

[0215]



20-β–ethylthevinone (2β)

[0216] 接着发现 20-α-ethylthevinone 的纯度和回收可通过将 1- 己烯 -3- 酮进料从 2.8 当量降低到 1.8 当量而改善，表 10。进一步的改善可通过使用 1.5 当量的 1- 己烯 -3- 酮（以两部分 (1.4eq 和 0.1eq) 加入）以及在反应结束时通过蒸馏除去 0.5 体积的溶剂而实现。在冷却产生的溶液时产物作为固体（陈化 1 小时）沉淀并过滤。

[0217] 步骤：往装有悬吊的搅拌器以及回流冷凝器的 1L(3- 颈）烧瓶进料以下物质：蒂巴因 (0.32M，100g，1eq)、EtOH(250mL) 以及 1- 己烯 -3- 酮 (90％，0.45M，58mL，1.4eq)。将混合物在回流下加热 13 小时并通过 ^{1}H NMR 分析，发现包含起始材料（～ 4.5 摩尔％）。将另外的 0.1eq 的 1- 己烯 -3- 酮加入并将混合物在室温下搅拌过夜之前加热进一步的 2 小时。分析显示起始材料（～ 2.8 摩尔％）。将材料转入圆底的烧瓶 (500mL)（烧瓶用 20mL EtOH 洗涤）。EtOH（～ 65mL) 在真空中在 50℃下除去，将产生的沉淀的固体在 5℃下在过滤之前搅拌 1 小时。将固体用冰冷的 EtOH 洗涤 (4x20mL) 以及在过滤器中抽吸干燥～ 1.5 小时。白色固体 (105.4g，80％）。

[0218] 表 10

[0219]

规格	条件	温度 (℃)	说明
10g	1 当量蒂巴因 2.8 当量 1-己烯-3-酮 2.5 体积 EtOH	回流 (浴温 94℃)	产率 69%，9.03g，包含 6% 的 7β-异构体 –92%纯度
2g	1 当量蒂巴因 1.8 当量 1-己烯-3-酮 2.5 体积 EtOH	回流 (浴温 94℃)	产率 55%，1.44g。物质在冷却下沉淀 - >99.5%纯度
100g	1 当量蒂巴因 1.5 当量 1-己烯-3-酮 2.5 体积 EtOH	回流 (浴温 101℃)	产率 80%，105.4g。沉淀的物质. >99.5%纯度

[0220] 分析方法以及生产中 - 检测 (IPCs)

[0221] 将 ^{1}H NMR(400MHz) 在实验室研究中用于附加的 HPLC 方法 38XB 以进行 IPCs。当通过基于在 δ 5.05ppm 和 5.3ppm($CDCl_3$) 的信号的 ^{1}H NMR 残留＜ 5 摩尔％的起始材料时，反应被认为是完全的。

[0222] 为了确认纯度以及为了 LC-MS，将操作法 UFC-LC-MUN-1 用于分析实验。

[0223] TLC(5% MeOH/95% DCM) 碘铂酸盐 (Iodoplatinate) 染色 :R_f= 0.25 蒂巴因, R_f = 0.66(7α)-20-ethylthevinone。

[0224] 分析概述

[0225]

外观	HPLC (%a/a)		
	7α 20-ethylthevinone	蒂巴因	**7β 20-ethylthevinone**
RT/RRT	**10.69 / 1.0**	**5.82 / 0.54**	**11.67 / 1.09**
白色固体	>99.5	无	无

[0226] ^{1}H NMR($CDCl_3$;400MHz) ; δ = 0.80(3H, t), 1.4(1H, m), 1.6(3H, sext.), 1.9(1H, d), 2.0(1H, br), 2.4-2.6(8H, m), 2.9(2H, br), 3.35(2H, d), 3.6(3H, s), 3.85(3H, s), 4.6(1H, s), 5.6(1H, d), 6.0(1H, d), 6.55(1H, d), 6.7(1H, d)

[0227] ^{13}C NMR($CDCl_3$;75MHz) ; δ = 13.71, 16.89, 22.49, 30.25, 43.26, 43.51, 45.57, 45.72, 47.40, 49.94, 53.78, 56.68, 60.06, 81.52, 95.84, 113.61, 119.36, 125.89, 134.07, 135.53, 141.87, 148.07

[0228] MS ; $[M+H]^+$ = 410.3

[0229] LC ; > 99.5%纯度

[0230] TLC ;5 :95 ;MeOH :DCM ;单点 rf = 0.66

[0231] 优化的方法的优点

[0232] 增加的产率至 80%

[0233] 1- 己烯 -3- 酮的量已经降低到 1.5 当量,而没有转化率或产率的降低。

[0234] 1- 己烯 -3- 酮的当量的减少使得容许改善的分离 (由反应溶剂直接结晶),其产生非常高的纯度的物质。

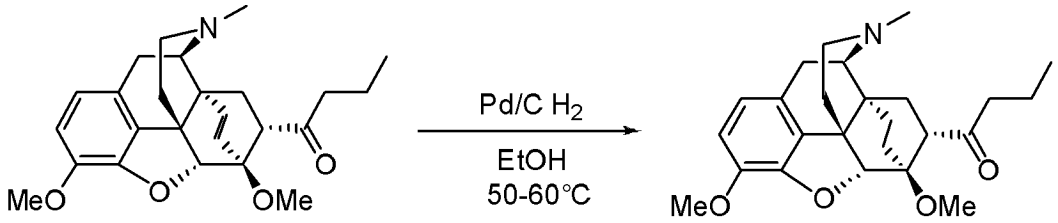
[0235] 体积效率非常高 (最大量～总计 4 体积)。

[0236] 纯度提高到 > 99% (通过 HPLC)。

[0237] 通过 ^{1}H NMR, IPC 显示以 > 97%的转化率完成 (< 3%蒂巴因)。

[0238] 第 2 阶段氢化

[0239]



20-ethylthevinone (2)

化学式: $C_{25}H_{31}NO_4$
分子量: 409.52

20-ethyldihydrothevinone (3)

化学式: $C_{25}H_{33}NO_4$
分子量: 411.53

[0240] 对于氢化阶段的研究工作的结果概括在下面的表 11 中。反应在催化剂装载和反应温度两方面都已经'加强'。此外,通过将反应体积从 17 体积降低到 12 体积,产物的质量和产物的分离已经改善。

[0241] 有趣地,起始材料和产物在～ 80℃下 1-2 小时是热稳定,这使得容许在反应期间

更高的反应温度，起始材料和产物溶解度得到提高。发现在这种情况下溶解度对良好的反应性是关键的，在规模扩大期间使用较高的温度以实现反应完全。

[0242] 在最终规模扩大反应中，在反应容器的初始加热期间温度增加超出“正常”范围，观察到快速反应（氢吸收）。当温度降低到 55℃时，反应显著降低，仅进一步加入催化剂以及温度升高到～ 65℃使反应实现完全。

[0243] 通过将反应混合物温热到 77℃，使得出现亚回流温度以及然后由反应混合物过滤催化剂而简化产物的分离。首先使产生的溶液通过蒸馏而减少体积，然而发现该溶液可在冰浴中冷却，高纯度物质通过过滤结晶固体而以良好的产率（72％）而分离。

[0244] 方法：将 20-Ethylthevinone(0.244M,100g) 进料到 2L Parr 氢化容器中。将 10％ Pd/C(50％湿，10g) 在 EtOH(200mL) 中淤浆化并进料到氢化容器中。将 EtOH(1L) 进料到容器中，将容器密封并用氩气 (x4) 使得惰性化。使容器用氢再填充至 50psi(x2) 以及最后留在 50psi。将温度设在 35℃。内部温度在 82℃达到峰值并使得冷却至室温过夜（釜放热）。将该容器用 H2 再充满，取样并通过 LC 分析并发现不完全。将容器加热到内部温度 55-65℃，反应进程通过 LC 监测－将氢气压力通过定期再装满而保持在 50psi。24 小时之后，制备另外的催化剂装料 (5g)，反应继续。在另外的 16 小时之后，通过 LC 和 ^{1}H NMR 证实反应完全。内部温度升至 68℃，将混合物在真空下转移到 3L rbf。将 Parr 容器用热 EtOH(200mL) 冲洗并将洗涤液转移到 rbf。混合物在过滤 (GF/F 纸）之前加热到 77℃。将催化剂床用热 EtOH(1x300mL) 洗涤并使得滤液冷却到室温。在过滤前将滤液在冰－水浴中冷却 50min。将收集的固体用冰冷的 EtOH(1x100mL)、庚烷 (1x300mL) 洗涤并抽吸干燥 1.5 小时。白色固体 (72g,72％）。

[0245] 表 11

[0246]

规格	条件	温度(℃)	说明
4.5g	1 当量 20-ethylthevinone, Pd/C (50% 湿, 2.71g), 14 体积 EtOH, 25psi H_2	釜温 55℃	16 小时之后，将 1g 样品(0.7%SM 留下)除去。反应继续直至完全。产率 90%，3.4g
0.680 g	1 当量 20-ethylthevinone, Pd/C (50% 湿, 0.034g), 70 体积 EtOH, 50psi H_2	釜温 55℃	产率 85%, 0.580g
2.32g	1 当量 20-ethylthevinone (547-089-1), Pd/C (50% 湿, 0.232g), 17 体积 EtOH, 50psi H_2	釜温 55℃	16 小时之后反应完全。反应过滤、浓缩到～1/3 体积以及收集沉淀物。产率 64%，1.494g
0.6g	1 当量 20-ethylthevinone (547-090-1), Pd/C (50% 湿, 0.60g), 17 体积 EtOH, 50psi H_2	釜温 55℃	16 小时之后反应完全。后处理不完全。
100g	1 当量 20-ethylthevinone, Pd/C (50% 湿, 15g), 12 体积 EtOH, 50psi H_2	最大釜温 82℃ 优化温度 ~60℃.	在除去催化剂之后由反应混合物结晶产物。产率 72%，纯度>99%

[0247] 分析方法以及生产中－检测

[0248] 将 ^{1}H NMR(400MHz) 用于实验室研究期间附加的 HPLC 方法 38XB 以进行 IPCs。反应进程由 LC 分析监测：反应以 100g 规格进行，未显示 20-ethylthevinone 以及 96％的 20-ethyldihydrothevinone。

[0249] 为了确认纯度以及为了 LC-MS 操作法，将由 100g 规格反应的产物用于分析实验。

[0250] 分析结果

[0251]

外观	HPLC (a/a%)	说明
白色	>99	没有 20-ethylthevinone 残留，未检测到其它杂质

[0252] 分析

[0253] ^{1}H NMR($CDCl_3$;400MHz)；δ = 0.75(1H, t, t),0.9(1H, t),1.35(1H, t, d), 1.5-1.75(7H, m),2.1(1H, t, d),2.3(5H, m),2.5(2H, q),2.6-2.7(3H, m),3.0(1H, q, t), 3.1(1H, d),3.5(3H, s),3.9(3H, s),4.5(1H, d),6.6(1H, d),6.7(1H, d).

[0254] ^{13}C NMR($CDCl_3$;75MHz)；δ = 13.73,16.99,17.31,21.98,28.67,30.70,35.17, 35.66,43.51,45.24,45.78,48.28,48.91,52.26,56.76,61.35,94.96,114.01,119.16, 128.71,132.47,141.76,146.80

[0255] LC；＞ 99％

[0256] 剩余溶剂（由 ^{1}H NMR）;没有剩余的乙醇

[0257] 优化的方法的优点

[0258] 将反应体积从 17 体积减少到 12 体积使得产物能直接结晶。

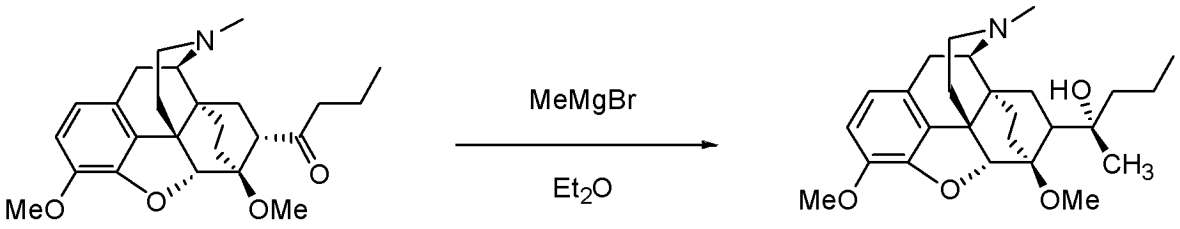
[0259] 以 72％产率以纯度＞ 99％分离产物。

[0260] 约 65℃的温度似乎对于溶解度和反应性是最佳的。

[0261] 在滤床上干燥固体并用庚烷洗涤除去微量乙醇至可用于下一阶段的可接受的程度。

[0262] 第三和四阶段 :Grignard 和结晶

[0263]



20-ethyldihydrothevinone (3)

(S)-19-Propyldihydrothevinol (4)

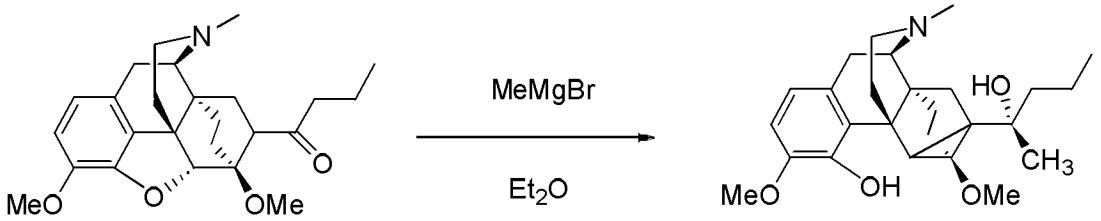
化学式：$C_{25}H_{33}NO_4$
分子量： 411.53

化学式： $C_{26}H_{37}NO_4$
分子量： 427.58

[0264] 研究结果概括在下面的表 12 中。研究了不同的醚类溶剂，二乙醚给出最佳质量的物质，尽管二乙醚和 MTBE 之间的差异发现是相对小的。

[0265] 通常，从Grignard反应获得的粗产物包含两种主要的杂质（每种～ 10％，LC-MS）。两种杂质具有相同的质量 $[M+H]^+$ = 428.4）作为产物）。两种杂质中的一种已经作为结构的异构体试验性地分配，这是由于过量的 Grignard 试剂在 20-ethyldihydrothevinone 上的闭环开环反应引起。

[0266]



(3)

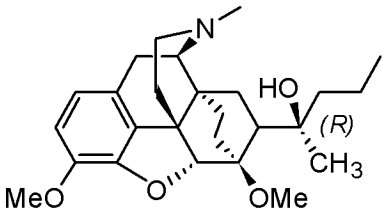
(5)

化学式：$C_{25}H_{33}NO_4$
分子量： 411.53

化学式：$C_{26}H_{37}NO_4$
分子量： 427.58

[0267] 具有类似于产物的保留时间 (LC-MS) 的第二杂质被认为是非对映异构物 (R)-19-propyldihydrothevinol。

[0268]



(R)-19-Propyldihydrothevinol (6)

化学式：$C_{26}H_{37}NO_4$
分子量：427.58

[0269] 两种杂质通过甲醇重结晶有效地除去。

[0270] 反应温度的作用用二乙醚研究，发现反应曲线在反应进程和杂质（LC 分析）方面在室温下和回流温度下都是类似的。

[0271] 因此，在反应中表明观察到的纯度差异被认为是由于不同的提纯方法产生（使用油浴和具有磁性搅拌器的回流冷凝器重结晶，或在用甲醇的旋转蒸发器上通过旋转而研磨）。

[0272] 也使用甲基碘化镁并给出与溴化物类似的结果。

[0273] 方法：将 20-Ethyldihydrothevinone(0.073M,30g) 溶于（浑浊的溶液）无水二乙醚 (1050mL ;35 体积）。将甲基溴化镁 (0.189M,63mL) 在 1 小时内滴入，保持内部温度低于 28℃。将得到的白色悬浮液在回流下加热 5 小时，冷却到室温并在氮气氛下搅拌过夜。将试样量（～ 0.3mL) 除去并用饱和的 NH_4Cl（～ 1.0mL) 急冷并用 LC 分析（来自用 MeCN(～ 1mL) 稀释的试样量的上层）。继续反应直至起始材料的水平小于 5%。将反应通过加入饱和的 NH_4Cl (138mL) 急冷至反应混合物，保持内部温度低于 30℃。将混合物进行相分离，将水相用二乙醚 (1x200mL) 萃取以及将合并的有机相干燥 ($MgSO_4$)。将溶液在真空中浓缩以产生粘性油 (33.4g)。将甲醇 (100mL) 加入并在冷却到室温之前将混合物加热到浴温 60℃。过滤固体，用冰冷的甲醇 (3x25mL) 洗涤，用庚烷 (1x25mL) 洗涤并抽吸干燥。白色固体 (21g, 68%）

[0274] 表 12

[0275]

规格	条件	温度 (℃)	说明
1.0g	1 当量 20-EtDHT，1.2 当量 MeMgBr 6.1 体积 2-MeTHF	60℃	通过柱层析提纯原料以产生两个主要部分：180mg 的不纯产物加未鉴定的材料(140mg)
0.5g	1 当量 20-EtDHT，2.6 当量 MeMgBr 35 体积 Et_2O	回流	由 ^1H NMR 显得好的 0.44g 的油性胶质。由 MeOH 的研磨产生两个样品：160mg (96%)和 150mg (90%)
0.6g	1 当量 20-EtDHT，2.6 当量 MeMgI 35 体积 Et_2O	回流	0.45g 的油性胶质。纯度= 77% (由 LC)。研磨产生 110mg 的 94.1%纯度。
30.0g	1 当量 20-EtDHT 2.6 当量 MeMgBr 35 体积 Et_2O	回流	<2% SM 和 81%产物。在由甲醇的后处理和重结晶之后：产率 68%，21g，>99%纯度。
1g	1 当量 20-EtDHT 2.6 当量 MeMgBr 35 体积 TBME	快速加入然后加热 45℃/ 4h	在用 MeOH 的后处理和研磨之后：产率 54%，0.56g，96%纯度
1g	1 当量 20-EtDHT 2.6 当量 MeMgBr 35 体积 CPME	快速加入然后加热 45℃ / 4h	在用 MeOH 的后处理和研磨之后：产率 52%，0.54g，95.7%纯度
10g	1 当量 20-EtDHT 2.6 当量 MeMgBr 35 体积 TBME	快速加入然后加热 35℃ / 4h	在 MeMgBr 加入完成之后：1.2% 20-EtDHT，85%产物(HPLC)。在加热、用 MeOH 后处理和研磨之后：产率 75%，7.79g，96.4%纯度
1g	1 当量 20-EtDHT 2.6 当量 MeMgBr 35 体积 Et_2O	快速加入，不加热搅拌 4h	在 MeMgBr 加入完成之后：0.3% 20-EtDHT，84%产物(HPLC)。在用 MeOH 后处理和研磨之后：产率 58%，0.60g，94.8%纯度

[0276] 分析方法以及生产中－检测

[0277] 在实验室研究期间将 ^1H NMR(400MHz) 用于附加的 HPLC 方法 38XB。反应通过急冷（饱和 NH_4Cl）的反应试样量的 LC 分析而检测：< 2.0% 20- 乙基二氢 thevinol 和 71% (S)-19- 丙基二氢 thevinol。

[0278] 为了确认纯度以及为了 LC-MS，将操作法 UFC-LC-MUN-1 用于分析实验室。

[0279] 分析结果

[0280]

外观	HPLC (a/a%)	说明
白色固体	94.1	来自 MeMgI
白色固体	>99	原料具有 81%的整体纯度并包括<2%起始材料

[0281] ^{1}H NMR($CDCl_3$;400MHz) ;δ = 0.75(1H,m),0.85(3H,t),0.95-1.1(6H,m),1.3(1H,m),1.5-1.7(7H,m),1.8(1H,t),2.0(1H,t,d),2.1-2.4(6H,m),2.6(1H,d),2.7(1H,t,d),3.0(1H,d),3.5(3H,s),3.8(3H,s),4.3(1H,s),4.7(1H,s),6.5(1H,d),6.7(1H,d)

[0282] ^{13}C NMR($CDCl_3$;75MHz) ;δ = 15.12,16.96,18.04,21.91,25.55,29.88,31.99,35.53,36.05,38.97,43.53,45.17,46.19,49.09,50.77,52.72,56.93,61.32,80.34,97.05,114.21,119.06,128.84,132.48,141.63,146.97

[0283] LC ;> 99%

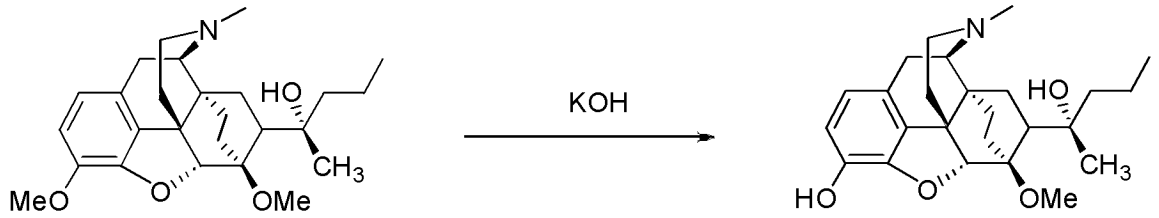
[0284] 优化的方法的优点

[0285] 反应在醚类溶剂的范围内进行,尽管二乙醚似乎提供了最干净的粗品。

[0286] 纯度极好的物质在从甲醇重结晶后获得。

[0287] 第五阶段 :水解

[0288]



(S)-19-Propyldihydrothevinol (4)

化学式： $C_{26}H_{37}NO_4$
分子量： 427.58

(S)-Dihydroetorphine

化学式： $C_{25}H_{35}NO_4$
分子量： 413.55

[0289] 反应在没有显著的变化下运行 (表 13)。从乙醇 / 水混合物然后从乙醇中进行重结晶。

[0290] 方法 :将 (S)-DHE(10g) 加入 EtOH(60mL) 以及在回流下加热直到溶解。水 (32mL) 形成浑浊的溶液,使得其冷却到室温～ 2 小时。将白色固体通过过滤收集。(4.26g,42wt% 回收)。纯度 98%。整体 wt% 产率= 45%

[0291] 表 13

[0292]

规格	条件	温度 (℃)	说明
15g	(S)-19 丙基二氢 thevinol (1 当量), KOH (20.85 当量), 二甘醇 (16.6 体积)	185	在空气冷凝器下在 185℃将反应加热~18 小时。产出粗产物 107%，纯度 95%

[0293] 分析方法以及生产中 - 检测

[0294] 在实验室研究期间将 ^{1}H NMR(400MHz) 用于附加的 HPLC 方法 38XB 以进行 IPCs。反应由 LC 分析监测,当没有 (S)-19- 丙基二氢 thevinol 残留时急冷。反应 92% 完成。

[0295] 为了确认纯度以及为了 LC-MS,将操作法 UFC-LC-MUN-1 用于分析实验室。

[0296] 分析结果

[0297]

外观	HPLC(a/a%)
褐色固体	95.0

[0298] ^{1}H NMR($CDCl_3$;400MHz) ;δ = 0.7(1H, m),0.8(3H, t),1.0-1.1(5H, m),1.3(1H, m),1.5-1.8(6H, m),1.85(1H, t),1.95(1H, t, d),2.1-2.3(5H, m),2.6(1H, d),2.7(1H, t),3.0(1H, d),3.5(3H, s),4.3(1H, s),4.8(1H, s),6.0(1H, br),6.4(1H, d),6.7(1H, d)

[0299] ^{13}C NMR($CDCl_3$;75MHz) ;δ = 15.10,16.95,18.00,21.99,25.37,29.82,31.96,35.43,36.15,38.93,43.51,45.22,46.50,49.04,52.72,61.33,80.42,97.38,116.61,119.46,127.92,132.07,137.56,145.67

[0300] LC ;98.8%

[0301] 手性 LC ;99.44% (S)-DHE,0.554(R)-DHE

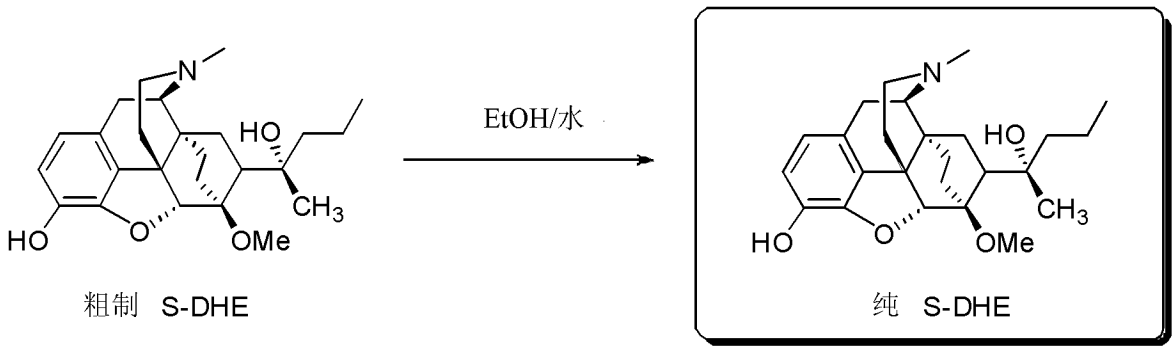
[0302] 优化的方法的优点

[0303] 从反应获得粗产物的纯度显著改善至 95%。

[0304] 从由乙醇 / 水和乙醇重结晶的研磨 - 材料去除甲醇。

[0305] 第六阶段 :重结晶

[0306]



粗制 S-DHE 纯 S-DHE

[0307] 含水量增加到～ 35%（总体积 9.2 体积）导致形成白色固体。从乙醇和乙醇 / 水混合物的进一步重结晶提高了物质的纯度（表 14)。

[0308] 方法 :

[0309] (1) 将 (S)-DHE(3.0g) 加入 EtOH(10mL),以及将悬浮液在回流下加热以产生橙色溶液。使溶液冷却至室温 16 小时。通过过滤收集产生的白色固体 (2.1g,70wt%)。纯度 > 99%。

[0310] (2) 将 (S)-DHE(1.8g) 加入 EtOH(7mL) 以及在回流下加热混合物直到在溶解状态中。加入水 (2mL) 以及使浑浊的溶液冷却到室温 2 小时。将产生的白色固体通过过滤收集 (1.29g,72wt%)。

[0311] 表 14

[0312]

规格	条件	温度 (℃)	说明
10g	9.2 体积的~ 65/35 EtOH/水	回流	物质在 EtOH 中加热，然后加入水。白色固体，42wt%回收，98%纯度
3.0g	3.3 体积 (EtOH)	回流	白色固体，70wt%回收，>99%纯度
1.8g	4.5 体积 (20%水/80% EtOH)	回流	回流下加入水，然后使得冷却，72wt%回收，>99%

[0313] 分析方法以及生产中 - 检测

[0314] 在实验室研究期间将 ^{1}H NMR(400MHz) 用于附加的 HPLC 方法 38XB 以进行 IPCs。

[0315] 为了确认纯度以及用于 LC-MS 将操作方法 UFC-LC-MUN-1 用于分析实验室。用于确认手性纯度，将方法 UFC-LC-MUN-2 用于分析实验室。

[0316] 分析结果

[0317]

外观	HPLC (a/a%)	手性 % 纯度 (HPLC)
白色固体	>99%	99.98

[0318] 优化的方法的优点

[0319] 从乙醇 / 水或乙醇重结晶产生了整体纯度良好和＜ 0.02% (R)-DHE 的物质。

[0320] (R) 和 (S) 二氢埃托啡在治疗疼痛中的用途

[0321] (R) 和 (S)- 二氢埃托啡在大鼠伤害感受 (Nociception) 甩尾试验中的效果

[0322] 所用试验模型在本领域中是熟知的且描述在 J.Pharmacol Exp Ther,1941,72,74-79(D'Amour et al,A method for determining loss of pain sensation))。

[0323] 本研究的目的在于评价在设计用来检测对大鼠伤害感受的作用的甩尾试验中以 0.1、0.3 和 0.5 μg/kg(R-DHE) 和 3、10 和 30 μg/kg(S-DHE) 的剂量的二氢埃托啡的 R- 和 S- 异构体 (R-DHE 和 S-DHE) 的潜在止痛作用。将盐酸吗啡用作参比物质以及将枸橼酸芬太尼用作比较物质。

[0324] 试验物质以及材料

[0325] 试验物质、参比物质和载体

[0326] 试验物质 :二氢埃托啡 (R-DHE 无色液体，作为游离碱使用) 和二氢埃托啡 (S-DHE 液体 ;作为游离碱使用)

[0327] 用于试验物质的载体 :柠檬酸盐缓冲液 (柠檬酸一水化物 : 柠檬酸钠 : 氯化钠 : 冲洗水，以比例 0.03 : 0.10 : 0.86 : 90.01(g : g : g : mL))[柠檬酸一水化物 (白色粉末，Sigma，UK)，柠檬酸钠 (Sigma，UK)，氯化钠 (白色固体 ;Merck)，用于冲洗的无菌水 (澄清液 ;Baxter Healthcare，UK)]

[0328] 参比物质 :盐酸吗啡 (白色粉末 ;Macfarlan Smith，Edinburgh，UK)

[0329] 比较物质 :枸橼酸芬太尼 (白色粉末 ;Sigma，UK)

[0330] 试验、参比和比较物质贮存

[0331] 将试验物质在室温下避光贮存，以及将参比和比较物质贮存在室温下。

[0332] 给药途径和剂量水平

[0333] R- 和 S- 异构体形式的 DHE 和载体的给药途径是静脉内。在人体的可能给药途径是静脉内。R-DHE 的剂量为 0.1、0.3 和 0.5μg/kg。S-DHE 的剂量为 3、10 和 30μg/kg。

[0334] 吗啡的剂量是 5mg/kg。吗啡的给药途径是静脉内。

[0335] 芬太尼的剂量是 0.5、2 和 6μg/kg。芬太尼的给药途径是静脉内。

[0336] 动物

[0337] 种类： 大鼠

[0338] 品种： Sprague-Dawley

[0339] 性别： 雄性

[0340] 动物数目： 将 111 只动物分配用于研究；将剩余的 9 只动

[0341] 物退回

[0342] 年龄范围： 9 到 11 周（基于平均体重）

[0343] 重量范围： 198 到 258g

[0344] 适应环境： 送货之后 6 天，在研究试验开始之前

[0345] 来源 Harlan UK Ltd

[0346] 动物鉴别和随机化

[0347] 每个动物随机分派唯一标识号，其出现在数据表和笼卡片上。动物通过防水的尾部标记识别。

[0348] 动物健康和福利

[0349] 所有研究按照在 Animals(Scientific Procedures)Act 1986（在实施 Act 时以 UK Home Office Guidance 以及所有关于实验动物的养护和居留的使用的 Codes of Practice）之下的法律进行。在该研究中采取的方法发表在方法号 213N，其具有中等严格程度的限度。

[0350] 居留和环境

[0351] 将动物以至多 5 只的组放入锯屑填充固体-底部的笼中。在适应环境期间，使房间和笼子定期清洁以保持卫生。如 Home Office Animals(Scientific Procedures)Act 1986 推荐，房间通过设定在 12h 明-暗周期（07.00 开，19.00 关）的日光灯照明。房间有空调并测量气温和相对湿度。在适应环境期间，保持室温（从 19℃到 22℃）以及湿度水平在 22％到 44％范围。保持室温（从 20℃到 21℃）以及湿度水平在 22％到 26％范围。

[0352] 调养饲料和水

[0353] 不限量提供 RM1(E)SQC(Special Diets Services,Witham,UK) 的调养饲料以及主干线自来水。每批调养饲料以附上的详细描述营养组成和指定污染物（例如重金属、黄曲霉毒素和杀虫剂）水平的分析证明书交付。定期分析水的杂质和污染物。在现成的调养饲料和水中污染物供给的可接受水平的标准在分别由调养饲料制造商和水分析服务建立的分析说明的范围内。

[0354] 健康状况

[0355] 动物在到达时和研究前进行检查。所有的动物都是健康的，被认为适于实验用途。

[0356] 实验设计

[0357] 试验、参比和比较物质的配方

[0358] 通过精确地称重每种组分合适的用量并将它们溶解在用于冲洗的无菌水中而制备柠檬酸盐缓冲液。当组分完全溶解时，测量溶液的渗透压度和 pH。当 pH 为 5.01（其在范围 pH 4.8 到 5.2 内），以及渗透压度是 296mOsmol/kg，在范围 280 到 300mOsmol/kg 之间时，载体被认为是可接受的。然后最终将载体在无菌条件下滤过 Millex GV 杯式过滤器，在使用前贮存在 2℃到 8℃。

[0359] 将试验物质、DHE(R-和 S-异构体）作为在柠檬酸盐缓冲液中的溶液配制用于剂量给药。用于剂量给药的要求的浓度（对于 R-DHE 0.02，0.06 和 0.10 μg/mL，以及对于 S-DHE 0.6，2 和 6 μg/mL）通过连续稀释以近似 20 μg/mL 的浓度提供的合适的原液而实现。原液通过 Millex GV 0.22 μmDurapore 无菌的过滤装置进入小玻璃管，用无菌柠檬酸盐缓冲液的每个随后的稀释通过无菌操作而完成。配方在对于 (R)DHE 已知的稳定周期内制备并冷藏贮存在大约 4℃直到要求用于剂量给药时。

[0360] 通过将已知数量溶解在柠檬酸盐缓冲液中以提供 1mg/mL 溶液而配制参照物质盐酸吗啡用于剂量给药。应用 1.32 的校正因子以使得吗啡的剂量按照游离碱表示。溶液是新制的且避光保存。

[0361] 通过将已知数量溶解在柠檬酸盐缓冲液中以提供浓度为 0.36mg/mL 的原液而配制比较物质、枸橼酸芬太尼，用于剂量给药。然后将该原液连续地用柠檬酸盐缓冲液稀释以提供 0.1、0.4 和 1.2 μg/mL 的最终浓度。应用 1.57 的校正因子使得芬太尼的剂量能以游离碱表示。溶液是新制的并避光保存

[0362] 组规模、剂量和标识号

[0363] 存在 11 个试验组，每组有至多 10 个大鼠。每个试验组给定字母 (A 到 K)。在剂量给药之前一天，基于用于甩尾试验的剂量给药前基准值，将大鼠随机地分配给治疗组。

[0364]

D	载体	5 mL/kg
F	R-DHE	0.1 μg/kg
E	R-DHE	0.3 μg/kg
K	R-DHE	0.5 μg/kg
I	S-DHE	3 μg/kg
H	S-DHE	10 μg/kg
G	S-DHE	30 μg/kg
J	芬太尼	0.5 μg/kg
C	芬太尼	2 μg/kg
B	芬太尼	6 μg/kg
A	吗啡	5 mg/kg

[0365] 载体为柠檬酸盐缓冲液。动物使用剂量体积 5mL/kg 和具有 BectonDickinson 25G(0.5x16mm) 针的聚丙烯注射器静脉注射入尾部静脉。5mL/kg 的总体积以尽可能恒定的速率在 2min±10s 期间内输送。对于缓慢推注，记录起始和停止时间。剂量给药的时间以

原始数据记录。

[0366] 隐蔽处理

[0367] 将剂量给药溶液编码 (A 到 K) 以使得观察者不知道处理组的标识。

[0368] 体重

[0369] 在试验前称量动物，在物质给药当天记录体重。

[0370] 方法

[0371] 1. 适应环境

[0372] 在行为试验之前的一个场合，使每个动物受到常规控制以及适应行为试验环境。

[0373] 2. 基线行为试验

[0374] 在试验之前一天将大鼠移到操作房间。然后在操作房间中将大鼠装入、剂量给药以及观察。甩尾试验（见下文）在所有大鼠上在剂量给药之前三个单独的场合进行以建立基准值。剂量给药前基准值作为最终试验读数（不包括来自第一和第二试验的数据，但列为适应环境的一部分）。

[0375] 甩尾试验：让每只大鼠轻轻地保持在甩尾设备 (Ugo Basile, Italy) 的表面上以使得其尾部直接定位在红外光源上。然后将红外光源施加到尾部的腹面的小区域。红外光源的活化同时起动定时器，其自动记录使尾部偏离（撤回或弹开）所花的时间。对每个动物记录甩尾潜伏期。红外辐射强度设置在 IR50 以及暴露于 IR 源的最长时间长度为 10s。因此将未反应的动物指定 10s 缩回潜伏期。

[0376] 3. 组分配和排除标准

[0377] 将动物在剂量给药之前一天，基于对于甩尾试验的剂量给药前基准值任意地分配到处理组 (A 到 K)。

[0378] 4. 剂量给药以及行为试验

[0379] 动物没有针对该研究禁食。甩尾试验在给药后大约 5、10、20、30、60 和 120min（相对于剂量给药的开始）进行以研究治疗效果。

[0380] 5. 终止

[0381] 没有分配给处理组的任何动物通过在研究结束时的颈部脱臼而终止。将剩余的动物返回以做最后测试时间的结论。

[0382] 统计分析

[0383] 统计比较在 DHE(R- 和 S- 异构体）、吗啡、芬太尼组与载体组之间采用参数或非参数的统计程序进行。参数（单向方差分析 (ANOVA)、Dunnett's t- 检验）或非参数的 (Kruskal-Wallis 统计量、Dunn's 检验和 Mann-Whitney U- 检验）统计程序的选择是基于要比较的组是否满足方差的同质性标准（通过 F 检验的 Levene Mean 试验评价）。当 $P < 0.05$ 时假定统计显著性。

[0384] 此外，将数据转化为 % MPE（最大可能作用 (Maximum Possible Effect)），定义为 100x（试验 - 对照 (test-control)/（切断 - 对照 (cut-off-control)，其中‘对照’是载体组观察，‘试验’是给药后观测，以及‘切断’是允许的刺激的最大时间（对于甩尾 10s)。对于 DHE 的每种异构体 (R- 和 S- 异构体）和芬太尼的剂量反应曲线由第一 4 个观察时间点产生，并计算 ED_{50}(50 % MPE 剂量）。分析使用非线性回归（最吻合线），反曲的剂量 - 反应在 $\log_{10}$（剂量 $x10^3$) 上进行。因为给药后数据在 60 和 120min 时间点已经回归到基线，在

这些数据上不要求计算。

[0385] 结果

[0386] 对于甩尾缩回潜伏期的组平均值 ±s.e. 平均数据概括在表 15 中。比较对于 R-DHE、S-DHE 和芬太尼计算的 ED_{50}值以估计其相对效能（表 11）。时间 - 过程图表曲线图显示于图 11 到图 13 以及 ED_{50}(50％ MPE 剂量）剂量反应曲线和数据显示于图 14 到图 17。

[0387] 表 15：二氢埃托啡 (R- 和 S- 异构体）、芬太尼以及吗啡在大鼠甩尾缩回潜伏期上的作用

[0388]

		在剂量给药后时间(min)的甩尾潜伏时间					
处理	剂量给药前	**5**	**10**	**20**	**30**	**60**	**120**
载体 **5 mL/kg i.v.**	4.2 ± 0.3	5.2 ± 0.6	5.0 ± 0.2	5.1 ± 0.2	4.9 ± 0.4	5.6 ± 0.4	5.1 ± 0.6 (9)
DHE (R-异构体) 0.1 μg/kg i.v.	4.2 ± 0.3	7.9 ± 0.7*	6.1 ± 0.6	6.3 ± 0.9	4.7 ± 0.4	4.6 ± 0.5	4.8 ± 0.3
DHE (R-异构体) 0.3 μg/kg i.v.	4.2 ± 0.3	9.2 ± 0.5**	7.7 ± 0.7[s]	7.6 ± 0.8	6.1 ± 0.9	5.2 ± 0.4	4.6 ± 0.6

[0389]

DHE (R-异构体) 0.5 μg/kg i.v.	4.4 ± 0.3	9.4 ± 0.6**	9.7 ± 0.3$^{\$\$\$}$	8.8 ± 0.5$^{\$\$}$	8.2 ± 0.8$^{\$}$	3.6 ± 0.4**	4.8 ± 0.6 (8)
DHE (S-异构体) 3 μg/kg i.v.	4.2 ± 0.3	8.3 ± 0.8	7.0 ± 0.9	7.0 ± 0.7	5.7 ± 0.5	5.8 ± 0.6	4.9 ± 0.4 (9)
DHE (S-异构体) 10 μg/kg i.v.	4.2 ± 0.3	9.7 ± 0.3$^{\$\$}$	9.3 ± 0.3$^{\$\$}$	7.3 ± 0.8	5.8 ± 0.5	4.0 ± 0.4*	3.9 ± 0.4
DHE (S-异构体) 30 μg/kg i.v.	4.2 ± 0.3	10.0 ± 0.0$^{\$\$\$}$	9.2 ± 0.8$^{\$\$}$	9.1 ± 0.6$^{\$\$\$}$	8.3 ± 0.7**	4.9 ± 0.3	3.5 ± 0.5 (8)
芬太尼 **0.5 μg/kg i.v.**	4.2 ± 0.3	5.8 ± 0.6	5.3 ± 0.6	5.2 ± 0.6	4.6 ± 0.4	4.8 ± 0.4	4.6 ± 0.4 (9)
芬太尼 **2 μg/kg i.v.**	4.2 ± 0.3	9.0 ± 0.7$^{\$\$}$	9.1 ± 0.4$^{\$\$\$}$	7.5 ± 0.9	7.1 ± 0.7	4.9 ± 0.7	4.2 ± 0.8
芬太尼 **6 μg/kg i.v.**	4.2 ± 0.3	10.0 ± 0.0$^{\$\$\$}$	8.4 ± 0.7$^{\$\$}$	8.1 ± 0.7$^{\$}$	6.5 ± 1.0	6.0 ± 1.0	6.3 ± 0.7
吗啡 **5 μg/kg i.v.**	4.2 ± 0.3	10.0 ± 0.0$^{\#\#\#}$	10.0 ± 0.0$^{\#\#\#}$	10.0 ± 0.0$^{\#\#\#}$	10.0 ± 0.0$^{\#\#\#}$	8.7 ± 0.9$^{\#}$	6.2 ± 0.9 (8)

[0390] 载体是柠檬酸盐缓冲液[以比例 0.03 ： 0.10 ： 0.86 ： 99.01(g ： g ： g ： mL)的柠檬酸一水化物：柠檬酸钠：氯化钠：冲洗水]

[0391] 数据作为平均 ±SEM 表示。

[0392] N = 10 个动物每组,除非在括号中另有说明。

[0393] 当与载体 (ANOVA) 和 Dunnett's 的 t- 检验相比时 $^{*}P < 0.05$ 以及 $^{**}P < 0.01$。

[0394] 当与载体相比时 ((Kruskal-Wallis 和 Dunn's 检验)$^{\$}p < 0.05$,$^{\$\$}p < 0.01$ 和 $^{\$\$\$}p < 0.001$。

[0395] 当与载体相比时 (Mann-Whitney U- 检验)$^{\#}P < 0.05$ 和 $^{\#\#\#}P < 0.001$。

[0396] 二氢埃托啡 (R-DHE) 对甩尾缩回潜伏期的作用 (图 11)

[0397] 以剂量 0.1 μg/kg 的 R-DHE 的静脉给药导致当与载体组数据 (5.2±0.6s) 相比时在给药 5min 后甩尾潜伏时间的显著增加 (7.9±0.7s ;P < 0.05 ;ANOVA 和 Dunnett's t- 检验)。以 0.3 μg/kg 的 R-DHE 的静脉给药导致当与载体组数据 (分别地 5.2±0.6 和

5.0±0.2s) 相比时在给药后 5 和 10min(9.2±0.5s ;P ＜ 0.01 ;ANOVA 和 Dunnett’s t- 检验 ;7.7±0.7s ;P ＜ 0.05 ;分别地 Kruskal-Wallis 和 Dunn’s 检验）甩尾缩回潜伏期的显著增加，但在任何其它时间点没有效果。以剂量 0.5μg/kg 的 R-DHE 的静脉给药导致与载体组数据（分别 5.2±0.6、5.0±0.2、5.1±0.2 和 4.9±0.4s) 相比时在给药后 5、10、20 和 30min(9.4±0.6s ;P ＜ 0.01 ;ANOVA 和 Dunnett’s t- 检验 ;9.7±0.3s ;P ＜ 0.001 ;8.8±0.5s P ＜ 0.01 ;8.2±0.8s ;P ＜ 0.05 ;分别地全部 Kruskal-Wallis 和 Dunn’s 检验）的甩尾缩回潜伏期的显著增加。在 0.5μg/kg 组在给药后 60min 观察到的甩尾潜伏时间的显著降低不认为是药理学有关的。在给药后 120min 未注意到效果。这些数据表明立即的止痛开始，在给药后大约 5 和 10min 有峰值效应，在给药后 60min 时间点回到基准值（与载体对照相当）。

[0398] R-DHE 的估计 ED_{50}即 50％ MPE 在给药后 5、10、20 和 30min 分别为 0.08、0.23、0.25 和 0.42μg/kg。在给药后 60 和 120min 时间点没有剂量反应。

[0399] 二氢埃托啡 (S-DHE) 对甩尾缩回潜伏期的作用（图 12)

[0400] 当与载体组数据相比时，以 3μg/kg 的剂量静脉给药 S-DHE 在任何时间点都未显著影响甩尾缩回潜伏期。当与载体组数据（分别地 5.2±0.6 和 5.0±0.2s) 相比时，以 10μg/kg 的 S-DHE 的静脉给药导致在给药后 5 和 10min（分别地 9.7±0.3 和 9.3±0.3s ;均为 P ＜ 0.01 ;Kruskal-Wallis 和 Dunn’s 检验）处甩尾缩回潜伏期的显著增大。观察到的给药后 60min 处甩尾缩回潜伏期的显著降低不认为是药理学相关的。当与载体组数据（分别地 5.2±0.6、5.0±0.2、5.1±0.2 和 4.9±0.4s) 相比时，以剂量 30μg/kg 的 S-DHE 的静脉给药导致给药后 5、10、20 和 30min 处甩尾缩回潜伏期的显著增加（分别地 10.0±0.0s ;P ＜ 0.001 ;9.2±0.8s ;P ＜ 0.01 ;9.1±0.6s ;P ＜ 0.001 ;Kruskal-Wallis 和 Dunn’s 检验和 8.3±0.7s ;P ＜ 0.01 ;ANOVA 和 Dunnett’s t- 检验）。这些数据表明立即的止痛开始，在给药后 5min 的时间点有峰值效果，在给药后 60min 的时间点回到基准值（与载体对照相当）。

[0401] 在给药后 5、10、20 和 30min 估计的 DHE(S- 异构体）的 ED_{50}即 50％ MPE 分别是 2.17、3.80、7.52 和 20.95μg/kg。在给药后 60 和 120min 的时间点没有剂量反应。

[0402] 芬太尼在甩尾缩回潜伏期上的作用（图 13)

[0403] 当与载体组数据相比时，以剂量 0.5μg/kg 的芬太尼静脉给药在任何测试的时间点没有显著影响甩尾缩回潜伏期。当与载体组数据（分别地 5.2±0.6 和 5.0±0.2s) 相比时，以 2μg/kg 的剂量的芬太尼静脉给药在给药后 5 和 10min（分别地 9.0±0.7s ;P ＜ 0.01 和 9.1±0.4s ;P ＜ 0.001 ;均为 Kruskal-Wallis 和 Dunn’s 检验）产生甩尾缩回潜伏期的显著增加。当与载体组数据（分别地 5.2±0.6,5.0±0.2 和 5.1±0.2s) 相比时，以 6μg/kg 的剂量的芬太尼静脉给药导致在给药后 5、10 和 20min（分别地 10.0±0.0s ;P ＜ 0.001 ;8.4±0.7s ;P ＜ 0.01 ;8.1±0.7s ;P ＜ 0.05 ;全为 Kruskal-Wallis 和 Dunn’s 检验）甩尾缩回潜伏期的显著增加。这些数据表明立即的止痛开始，在 5 分钟的时间点具有峰值效应，在给药后 60min 时间点回到基准值（与载体对照相当）。

[0404] 芬太尼的估计的 ED_{50}即 50％ MPE 在给药后 5、10、20、30min 分别为 1.14、1.25、3.11 和 9.68μg/kg。在给药后 60 和 120 时间点没有剂量反应。

[0405] R-DHE、S-DHE 和芬太尼的比较作用

[0406] 将对于 R-DHE、S-DHE 和芬太尼计算的 ED_{50} 值比较以估计其相对效能（表 16）。数据表明在第一个 30min 内，在将每种化合物单一静脉给药到雄性大鼠中之后，R-DHE 具有芬太尼 5- 到 23- 倍的止痛效能，S-DHE 具有芬太尼的 0.3- 到 0.5- 倍的止痛效能，以及 R-DHE 具有 S-DHE 的 17- 到 50- 倍的止痛效能。

[0407] 表 16 ：R-DHE、S-DHE 和芬太尼和 ED_{50} 值和比较比值

[0408]

时间 给药后 (min)	ED_{50} R-DHE (μg/kg)	ED_{50} S-DHE (μg/kg)	ED_{50} 芬太尼 (μg/kg)	ED_{50} 比值 芬太尼/ R-DHE	ED_{50} 比值 芬太尼/ S-DHE	ED_{50} 比值 芬太尼/ S-DHE/ R-DHE
5	0.08	2.17	1.14	14	0.5	28
10	0.23	3.80	1.24	5	0.3	17
20	0.25	7.52	3.11	12	0.4	30
30	0.42	20.95	9.68	23	0.5	50

[0409] 吗啡对甩尾缩回潜伏期的作用

[0410] 当与载体组数据相比时（分别地 5.2±0.6、5.0±0.2、5.1±0.2、4.9±0.4 和 5.6±0.4s）时，吗啡 (5mg/kg) 的静脉给药导致在给药后 5、10、20、30(10.0±0.0s ；P ＜ 0.001 ；Mann-Whitney U- 检验，对所有四个时间点）和 60min(8.7±0.9s ；P ＜ 0.05 ；Mann-Whitney U- 检验）甩尾缩回潜伏期显著的增加。

[0411] 结论

[0412] R-DHE 以 0.1、0.3 和 0.5μg/kg 的剂量以及 S-DHE 以 10 和 30μg/kg 的剂量的单次静脉给药导致雄性大鼠在直至给药后 30min 甩尾缩回潜伏期的显著剂量相关的增加。以 2 和 6μg/kg 的剂量的芬太尼的静脉给药导致在给药后直至 30min 甩尾缩回潜伏期的显著剂量相关增加。

[0413] 将对于 R-DHE、S-DHE 和芬太尼计算的 ED_{50} 值比较以估计其相对效能（表 16）。数据表明，在雄性大鼠中每种化合物单次静脉给药第一个 30min 期间 ；R-DHE 具有 5- 到 23- 倍于芬太尼的止痛效能，S-DHE 具有 0.3- 到 0.5- 倍于芬太尼的止痛效能，以及 R-DHE 具有 17- 到 50- 倍于 S-DHE 的止痛效能。

[0414] 在静脉给药 R-DHE 和 S-DHE 后的鸦片样物质止痛活性的持续时间突出了这些化合物在治疗急性疼痛中潜在的益处和治疗的潜力。

[0415] 在吗啡给药后注意到的作用与其已知的药理学活性一致，因此该试验系统对检测疼痛作用灵敏。

[0416] (R) 和 (S)- 二氢埃托啡在神经性疼痛的脊神经结扎模型 (Spinal NerveLigation Model of Neuropathic Pain) 中的作用

[0417] 所用的测试模型在本领域是熟知的且描述在 Pain 1992 ；50 ：355-363 中 (Kim SH, Chung JM. ,An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat)。

[0418] 研究了在神经性疼痛的脊神经结扎模型中在 0.1、0.3 和 0.5μg/kg(R- 异构体）的单次静脉剂量给药的二氢埃托啡以及 3、10 和 30μg/kg(S- 异构体）的单次静脉剂量给

药的潜在止痛作用。通过紧紧的结扎 L5 和 L6 脊神经，外周的单神经病在左后肢被诱发。机械触诱发痛 (allodynia) 和热痛觉过敏的进展使用建立的行为试验检测（分别地 Von Frey 试验和 Hargreaves Plantar 试验）。将吗啡用作参比物质以及普瑞巴林用作比较物质。

[0419] 试验物质和材料

[0420] 试验物质、参比物质、比较物质和载体

[0421] 试验物质：二氢埃托啡 (R- 异构体）和二氢埃托啡 (S- 异构体）

[0422] 对于试验和参比物质的载体：

[0423] 柠檬酸盐缓冲液（以比例 0.03 ： 0.10 ： 0.86 ： 99.01(g ： g ： g ： mL) 的柠檬酸一水化物：柠檬酸钠：氯化钠：无菌水 [柠檬酸一水化物（白色粉末；Sigma，UK)、柠檬酸钠 (Sigma，UK)、氯化钠（白色固体；Merck)、无菌水（清液；Baxter Healthcare，UK)]

[0424] 参比物质：盐酸吗啡（白色粉末；Macfarlan Smith，Edinburgh，UK)

[0425] 比较物质：普瑞巴林（商品名 Lyrica®；白色囊状物；由 Pfizer 制造以及由 Lindsay&Gilmour Chemist，Juniper Green，Edinburgh 供给）

[0426] 用于比较物质的载体：1％ w/v 羧甲基纤维素 (CMC，粉末；Sigma，UK)

[0427] 检验、参比和比较物质的贮存

[0428] 将检验物质室温避光保存以及参比和比较物质室温下贮存。

[0429] 给药途径和剂量水平

[0430] R- 和 S- 异构体形式的二氢埃托啡和载体（柠檬酸盐缓冲液）的给药途径是静脉内。这是人体可能的给药途径。R-DHE 的剂量为 0.1、0.3 和 0.5 μg/kg 以及 S-DHE 的剂量为 3、10 和 30 μg/kg。

[0431] 吗啡的给药途径是静脉内。吗啡的剂量为 5mg/kg。

[0432] 比较物质普瑞巴林的给药途径是口服。在该研究的第 2 阶段，普瑞巴林的剂量是 30mg/kg。对于第 3 阶段，比较物质普瑞巴林的剂量水平是 30、50 和 100mg/kg。

[0433] 动物

[0434] 种类： 大鼠

[0435] 品种： Sprague-Dawley

[0436] 性别： 雄性

[0437] 动物数目： 将 75 只动物外科用地准备。

[0438] 年龄范围： 6 到 7 周（用于外科）；8 到 9 周（剂量给药第 1 阶段）；9 到 10 周（剂量给药第 2 阶段）；11 到 12 周（剂量给药第 3 阶段）。

[0439] 重量范围： 139 到 183g（用于外科）；190 到 257g（剂量给药第 1 阶段）；

[0440] 210 到 284g（剂量给药第 2 阶段）；243 到 341g（剂量给药第 3 阶段）。

[0441] 适应环境： 送货后 3 天，在开始行为检验之前

[0442] 来源： Harlan UK Ltd

[0443] 动物鉴别和随机化

[0444] 每个动物随机分派唯一标识号，其出现在数据表和笼卡片上。动物通过防水的尾部标记识别。

[0445] 动物健康和福利

[0446] 所有研究按照在 Animals(Scientific Procedures)Act 1986（在实施 Act 时

以 UK Home Office Guidance 以及所有关于实验动物的养护和居留的使用的 Codes of Practice) 之下的法律进行。

[0447] 居留和环境

[0448] 将动物以至多 5 只的组放入锯屑填充固体 - 底部的笼中。在适应环境期间，使房间和笼子定期清洁以保持卫生。如 Home Office Animals(Scientific Procedures)Act 1986 推荐房间通过设定在 12h 明 - 暗周期 (07.00 开，19.00 关）的日光灯照明。房间有空调并测量气温和相对湿度。在适应环境期间，保持室温（从 20℃到 22℃）以及湿度水平在 46％到 59％范围。保持室温（从 19℃到 22℃）以及湿度水平在 26％到 43％范围。

[0449] 调养饲料和水

[0450] 不限量提供 RM1(E)SQC(Special Diets Services，Witham，UK) 的扩大啮齿动物调养饲料以及主干线自来水。每批调养饲料以附上的详细描述营养组成和指定污染物（例如重金属、黄曲霉毒素和杀虫剂）水平的分析证明书 (A 的 C) 交付。定期分析水的杂质和污染物。在现成的调养饲料和水中污染物供给的可接受水平的标准在分别由调养饲料制造商和水分析服务建立的分析说明的范围内。

[0451] 健康状况

[0452] 动物在到达时和研究前进行检查。所有的动物都是健康的，被认为适于实验用途。

[0453] 实验设计

[0454] 试验、参比和比较物质的配方

[0455] 通过精确地称重每种组分合适的用量并将它们溶解在用于注射的无菌水中而制备柠檬酸盐缓冲液。当组分完全溶解时，测量溶液的渗透压度和 pH。当 pH 为 5.03（其在范围 4.8 到 5.2 内），，以及渗透压度是 295mOsmol/kg，在范围 280 到 300mOsmol/kg 之间时，载体被认为是可接受的。然后最终将载体在无菌条件下滤过 Millex GV 杯式过滤器 (0.22μm 滤器），在使用前贮存在 2℃到 8℃。

[0456] 将检验物质、二氢埃托啡 (R- 和 S- 异构体）作为在柠檬酸盐缓冲液中的溶液配制用于剂量给药。用于剂量给药的要求的浓度（对于 R 异构体 0.02，0.06 和 0.10μg/mL，以及对于 S- 异构体 0.6，2 和 6μg/mL) 通过连续稀释以近似浓度 20μg/mL 提供的合适的原液而达到。原液的实际浓度以原始数据记录。在连续稀释之前，使原液通过 Millex GV 0.22μm Durapore 无菌过滤装置进入小玻璃管，以及通过无菌操作进行以无菌柠檬酸盐缓冲液进行的每次后续的稀释。不采用校正因子以及配方作为游离碱制备。配方在研究剂量给药日期前制备且在对于 R-DHE 11 天的已知稳定性内使用（制备之后 1-2 天）。S-DHE 在制备后 1-2 天使用。将二氢埃托啡 (R- 和 S- 异构体）的剂量给药溶液在大约 4℃冷藏贮存直至它们为剂量给药所需要。

[0457] 通过将已知量溶解在柠檬酸盐缓冲液中以提供 1mg/mL 溶液而配制参照物质盐酸吗啡，用于剂量给药。应用 1.32 的校正因子，以使得吗啡的剂量按照游离碱表示。溶液是新制的且避光保存。

[0458] 配制比较物质普瑞巴林用于剂量给药，通过将已知量以 1％ w/v CMC 悬浮以提供 3mg/mL 悬浮液用于第 2 阶段，将 3、5 和 10mg/mL 悬浮液制备用于第 3 阶段。因此不需要校正因子，将普瑞巴林作为游离碱剂量给药。悬浮液是新制备的且避光保存。

[0459] 组规模、剂量和标识号

[0460] 存在五个试验组，每组最多 10 只大鼠。每个试验组赋予字母（第 1 阶段 :A 到 E，第 2 阶段 :F 到 J 以及第 3 阶段 :K 到 O）。基于用于热痛觉过敏试验的剂量给药前基准值，在剂量给药之前一天随机将大鼠分配给处理组（见下文）。

[0461] 第 1 阶段 :

[0462]

C	载体	5 mL/kg, i.v.

[0463]

B	R-DHE	0.1 μg/kg, i.v.
A	R-DHE	0.3 μg/kg, i.v.
E	R-DHE	0.5 μg/kg, i.v.
D	吗啡	5 mg/kg, i.v.

[0464] 第二阶段 :

[0465]

I	载体	5 mL/kg, i.v.
F	S-DHE	3 μg/kg, i.v.
G	S-DHE	10 μg/kg, i.v.
J	S-DHE	30 μg/kg, i.v.
H	普瑞巴林	30 mg/kg, p.o.

[0466] 第 3 阶段 :

[0467]

N	载体	10 mL/kg, p.o.
M	普瑞巴林	30 mg/kg, p.o.
L	普瑞巴林	50 mg/kg, p.o.
K	普瑞巴林	100 mg/kg, p.o.
O	吗啡	5 mg/kg, i.v.

[0468] 将静脉载体柠檬酸盐缓冲液用于第 1 和第 2 阶段以及将口服载体 1％ w/v CMC 用于第 3 阶段。将分配给静脉处理组的动物使用 5mL/kg 的剂量体积以及具有 Becton Dickinson 25G(0.5x16mm) 针剂量给药至尾部静脉。将 5mL/kg 总的静脉注射体积以尽可能恒定的速率在 2min±10s 期间输送。记录用于缓慢静脉推注的开始和停止时间。将分配给口服处理组的动物通过口服填喂法使用 10mL/kg 的剂量体积剂量给药。剂量给药的时间记录在原始数据中。

[0469] 隐蔽处理

[0470] 编码剂量给药溶液（第 1 阶段 :A 到 E，第 2 阶段 :F 到 J 以及第 3 阶段 :K 到 O）以致观测者不知道处理组的身份。因为研究的第 2 阶段的比较物质以不同的剂量给药途径给药，该组对进行剂量给药的人员不是隐蔽的且编码为 H。而且，因为在第 3 阶段的吗啡对照是静脉给药，并且这对载体和比较物质组（口服给药）是不同的途径，所以吗啡组非隐蔽，

因此编码为 0。

[0471] 体重

[0472] 在外科准备前、在手术后 (post-operatively PO) 第一天，以及在给药物质之前给药的每一天称重动物并记录体重。

[0473] 每日观测

[0474] 普通的观测在从第 0 天 PO 往后每天对所有动物进行，特别注意动物的左右后爪的状况。

[0475] 方法

[0476] 1 适应环境

[0477] 在行为试验之前的，使每个动物受到常规控制以及适应行为试验环境。

[0478] 2 基线行为试验

[0479] 在试验之前一天将大鼠移到操作房间。然后在操作房间中将大鼠装入、剂量给药以及观察。行为试验（见下文）在所有大鼠上在外科准备之前 2 个单独的场合进行以建立基准值。外科手术前的基准值作为试验最后（第二）天的数据。（来自试验的第一天的数据归类为适应环境的部分）。试验的顺序是机械触诱发痛，接着是热痛觉过敏，在试验之间容许最低 5min 的时间。

[0480] 机械触诱发痛 (Von Frey 试验）：将每只动物放置丝网笼中以及将一系列的 Von Frey 长丝从下面施加到后爪的脚底表面。将长丝递增排列地施加（以最弱的力量开始），以及评价左和右后肢的缩回阈值。将每个长丝交错在足部的中间脚底表面至其刚开始弯曲的点；以大约 1Hz 的频率每根长丝重复大约 8 到 10 次。缩回阈值定义为两个或多个的接连的 Von Frey 长丝引发反射缩回反应的最低的力（即短暂的爪弹开 (briefpaw flick)）。

[0481] 热痛觉过敏 (Hargreaves 脚底试验）：将每只大鼠放入具有玻璃底板的透明塑料盒并在实验前使得短期适应其环境（大约 1min)。然后将动物从下面直接在其后爪的脚底表面用辐射红外线 (IR) 热源攻击，计算左和右后肢爪的缩回潜伏期。红外辐射强度定在 IR50（设置目的是使供给 250mW cm^3的热通量）以及暴露于红外线源的最长时间为 18s。因此将没有反应的动物分配为缩回潜伏期为 18s。

[0482] 3 外科手术步骤

[0483] 将动物在三天内外科准备。根据需要在 1％到 3％氧中用异氟烷将每只大鼠麻醉。将每只大鼠以俯卧姿势放置，将在切割位置附近的表面剃毛并用医用酒精消毒。在无菌条件下，使左边脊椎旁肌肉以 L4S2 水平从棘状突起分开。然后将 L6 横突小心地用小的骨钳去除并确定 L4L6 脊神经。将左 L5 和 L6 脊神经分离，并用 6-0 丝线紧紧地结扎（在 x40 放大倍数下观察）。然后将覆盖层肌肉和皮肤使用合适的缝合材料在层中密封，一旦完成即停止麻醉。从麻醉中恢复时，大鼠重新与它们的笼 - 伴 (mate) 装入，首先在软填充的床层上过夜以减少传染的风险，以及在完全恢复之后接着在锯屑床层上。在行为试验重新开始前使动物恢复至少四天。

[0484] 4 进展的试验

[0485] 在外科手术之后，在剂量给药日前进行两次行为试验以检测触诱发痛 / 痛觉过敏的进展。还包括另外的任意试验日，以确保充分数量的动物在每个剂量给药阶段之前已经发展出触诱发痛 / 痛觉过敏。

[0486] 5 组分配和排除标准

[0487] 基于剂量给药前的基准值，在剂量给药之前当天将动物随机地分配给处理组用于热痛觉过敏试验。仅发生机械触诱发痛和热痛觉过敏的动物用来研究。若对 Von Frey 长丝的动物左爪缩回阈值为≤ 5g 力（这对应于 4.56 或更少的单丝数量），动物被认为已经产生机械触诱发痛。若动物对热脚底装置的左爪缩回潜伏期显示与剂量给药之前左爪外科手术之前的值≥ 30％的差值，动物被认为已经产生了热痛觉过敏。

[0488] 6 剂量给药以及行为试验

[0489] 对于该研究，不将动物禁食。在剂量给药的每天，使分配的每个动物接受单静脉剂量的试验物质、参比物质或载体；或者口服剂量的比较物质或载体。存在 3 个阶段研究。对于每个阶段的剂量给药在 2 天内分摊以及将来自最少 3 个处理组的动物在每个剂量给药日剂量给药。在每个阶段完成之后，在开始研究的后续阶段之前，使动物进行 1 周的最小冲洗时间。

[0490] 在研究的第 1 和 2 阶段中，在剂量给药之后（从剂量给药开始后大约 5min）以及在剂量给药之后大约 25、50 和 120min，采用 Von Frey 检验评价每只大鼠的左和右后肢的机械触诱发痛。在剂量给药后大约 15、35、60 和 130min，使用 Hargreaves 脚底试验评价左和右后肢爪的热痛觉过敏以研究治疗效果。所有时间点为相对于剂量给药的开始。

[0491] 在研究的第 3 阶段，在剂量给药后大约 60、120、180 和 240min，采用 Von Frey 检验评价每只大鼠的左和右后肢的机械触诱发痛。在剂量给药之后大约 70、130、190 和 250min，采用 Hargreaves 脚底试验来评价每个大鼠的左和右后肢的脚底试验以研究治疗效果。

[0492] 7 终止

[0493] 在得出最终试验时期的结论之后，将所有研究动物通过颈部脱臼而终止。

[0494] 统计分析

[0495] 统计学比较在采用参数（例如方差的单向分析、Dunnett’s t- 检验、Student’s t- 检验）或非参数（例如 Kruskal-Wallis 统计、Dunn’s 检验、Mann-Whitney U- 检验）的统计程序的处理组之间进行。参数或非参数检验的选择是基于要比较的组是否满足方差的同质性标准（由 Levene Mean 检验或 F 检验评价）。在分析之前将 Von Frey 数据对数性地转换（（以克计的力 x10000）的 log10）。在研究的第 2 阶段，作为比较物质，普瑞巴林通过不同的剂量给药途径给药，将关于普瑞巴林的数据采用成对 Student’s t 检验与剂量给药前的值比较。在研究的第 3 阶段，作为参比物质，将吗啡以对于载体和试验物质不同的剂量给药途径给药，以及将吗啡的数据使用成对的 Student’s t- 检验与剂量给药前的值比较。对于所有的检验，当 $P < 0.05$ 时假定统计显著性。尽管在对数转换数据上进行，为了说明目的，关于 vonFrey 检验的统计显著性在结果部分中以克力表示。分析的全部细节在原始数据中给出。

[0496] 结果

[0497] 关于缩回阈值和缩回潜伏期的组平均值 ±s.e 平均数据概括在表 17 到表 22 中。

[0498] 神经性疼痛状态的产生

[0499] 神经性疼痛的两个不同的分量采用建立的行为试验研究，即以测试机械触诱发痛存在的 Von Frey 长丝，以及测试热痛觉过敏存在的 Hargreaves 脚底试验。在伤害后的时期，进行脊神经结扎的大多数动物显示出左后爪对两个行为试验明显增加的敏感度，表明

发生了外周单神经病。右后肢爪外科手术后没有显示敏感度增加。在研究的每个阶段，如在剂量给药前那天使用建立的行为试验所评价，所有剂量给药的动物被认为在左后爪具有神经病。

[0500] R-DHE 对行为试验反应的作用（第 1 阶段）

[0501] 机械触诱发痛：在第 1 阶段，以 0.1 和 0.3μg/kg 的 R-DHE 的静脉给药在对 Von Frey 长丝的左或右爪缩回阈值方面没有产生任何显著的变化。然而，以 0.5μg/kg 的 R-DHE 的静脉给药当与 5.43±2.58g 的载体组的值相比导致剂量给药后大约 5min(21.97±2.30g ;P ≤ 0.01 ;Kruskal-Wallis 和 Dunn's 检验)，以及当与 2.25±0.75g 的载体组的值相比时在剂量给药后大约 25min(13.12±3.41g ;P ＜ 0.05 ;ANOVA 和 Dunnett's t- 检验）左爪缩回阈值的显著增加（表 17，图 18)。

[0502] 热痛觉过敏：R-DHE 的静脉给药当与载体相比时没有对左爪撤回潜伏期产生显著的影响。当与载体值 (10.3±0.9s) 相比时，以 0.3μg/kg 的剂量的静脉给药在剂量给药后大约 35min(14.5±0.7s ;P ＜ 0.05 ;ANOVA 和 Dunnett's t- 检验）导致右爪缩回潜伏期的显著增加；然而，这是生理无关系的，因为右爪缩回阈值与右爪的剂量给药前的值 (14.3±0.6s) 类似（表 18，图 19)。

[0503] S-DHE 对行为检验反应的作用（第 2 阶段）

[0504] 机械触诱发痛：在第 2 阶段，以 3 和 10μg/kg 的静脉给药在对 Von Frey 长丝的左或右爪缩回阈值方面没有产生任何明显的变化。然而，以 30μg/kg 的静脉注射给药当与 6.11±2.39g 的载体组的值相比时在剂量给药后大约 5min(24.56±0.33g ;P ≤ 0.001 ;Kruskal-Wallis 和 Dunn's 检验）以及当与 1.66±0.47g 的载体组值相比时在剂量给药后大约 25min(21.92±1.70g ;P ＜ 0.001 ;Kruskal Wallis 和 Dunn's 检验）导致左爪缩回阈值的显著增加（表 19，图 20)。

[0505] 热痛觉过敏：S-DHE 以 3 和 10μg/kg 的剂量的静脉给药当与载体组值相比时没有显示出对左和右爪缩回潜伏期的显著影响。然而，以剂量 30μg/kg 的 S-DHE 的静脉给药当与分别为 10.3±0.8s 和 13.4±0.8s 的载体值相比时在左 (17.6±0.4s ;P ＜ 0.01 ;Kruskal-Wallis 和 Dunn's 检验）和右 (17.5±0.4s ;P ＜ 0.01 ;Kruskal-Wallis 和 Dunn's 检验）后爪均显示出在剂量给药后大约 15min 产生爪缩回潜伏期的显著增大。右爪潜伏期的增加可能表明了二氢埃托啡 (S- 异构体）在 30μg/kg 剂量水平的中枢作用（表 20，图 21)。

[0506] 吗啡对行为试验反应的作用（第 1 和 3 阶段）

[0507] 在第 1 阶段，将吗啡参照物与载体比较，二者均口服。在第 3 阶段，将吗啡参照物与剂量给药前相比，因为将此与口服载体相比是无关的)。

[0508] 机械触诱发痛：在以 5mg/kg 静脉给药吗啡之后（第 1 阶段)，与载体值 2.25±0.75 和 2.11±0.82g 相比时，左后抓缩回阈值在剂量给药后大约 25min(19.23±2.73g ;P ＜ 0.001 ;不成对的 2- 尾部 Student's t- 检验）和剂量给药后大约 50min(21.55±2.40g ;P ＜ 0.001 ;不成对的 2- 尾部 Student's t 检验）显著增加。当与载体值 (22.26±1.52g) 相比时，存在在右爪剂量给药前数据 (16.37±2.20g ;P ＜ 0.05 ;不成对的 2- 尾部 Student's t- 检验）的显著降低。这是不可避免的，因为分配到处理组是基于来自热痛觉过敏检验的剂量给药前的值（表 17，图 18)。右后爪没有注意到其它明显作用。

[0509] 在第 3 阶段，与剂量给药前的值 1.46±0.37g 相比，吗啡的静脉给药 (5mg/kg) 显著地增加了在给药后大约 60min(21.32±2.56g ;P ＜ 0.001 ;成对 2 尾部 Student’s t- 检验)，120min(11.08±2.85g ;P ＜ 0.01 ;成对 2- 尾部 Student’s t- 检验) 和大约 180min(3.68±0.97g ;P ＜ 0.05 ;成对 2- 尾部 Student’s t 检验) 的左爪缩回阈值 (表 21，图 22)。

[0510] 热痛觉过敏 :在第 1 阶段，以 5mg/kg 的吗啡静脉给药在左爪在所有测试的时间点以及在右爪在剂量给药后大约 15、35 和 60min 导致缩回潜伏期的显著增加。当与载体值 (分别为 7.5±0.5、12.8±1.1、7.0±1.2、10.3±0.9、7.6±0.9、12.4±1.4 和 7.4±0.9s) 相比时，在剂量给药后大约 15min，(左 ;12.0±1.5s ;P ＜ 0.05 ;Mann-Whitney U- 检验)，(右 ;17.5±0.5s ;P ＜ 0.001 ;Mann-Whitney U- 检验)，在剂量给药后 35min(左 ;16.4±0.9s ;P ＜ 0.001 ;不成对的 2 尾部 Student’s t- 检验)，(右 ;16.8±0.7s ;P ＜ 0.001 ;不成对的 2 尾部 Student’s t- 检验)，以及在剂量给药后大约 60min 在两个爪 (左 ;12.8±1.3s ;P ＜ 0.01 ;不成对的 2 尾部 Student’s t- 检验)，(右 ;16.3±1.1s ;P ＜ 0.05 ;不成对的 2- 尾部 Student’s t- 检验) 以及在剂量给药后大约 130min 在左爪 (10.6±0.9s ;P ＜ 0.05 ;不成对的 2- 尾部 Student’s t- 检验)(表 18，图 19)。

[0511] 在研究的第 3 阶段，当与 6.0±0.5s 的剂量给药前的值相比时，吗啡的静脉给药导致在剂量给药后大约 70min(11.8±1.2s ;P ＜ 0.01 ;成对 2- 尾部 Student’s t- 检验)，在剂量给药后大约 190min(8.0±0.8s ;P ＜ 0.05 ;成对 2- 尾部 Student’s t- 检验) 以及在剂量给药后大约 250min(10.6±1.4s ;P ＜ 0.05 ;成对 2- 尾部 Student’s t- 检验) 的左爪缩回潜伏期的显著增加 (表 22，图 23)。

[0512] 普瑞巴林对行为检验反应的作用 (第 2 和 3 阶段)

[0513] 将普瑞巴林在研究的第 2 阶段与剂量给药前相比但在第 3 阶段与载体相比。在研究的第 2 阶段，将普瑞巴林通过与载体 (iv) 不同的途径 (口服) 给药，因此与载体比较不合适。在研究的第 3 阶段，使用 3 个剂量水平的对普瑞巴林的剂量反应与载体而非剂量给药前比较。

[0514] 机械触诱发痛 :在第 2 阶段，当与 1.09±0.35g 的剂量给药前的值相比时，口服普瑞巴林 (30mg/kg) 在剂量给药后大约 50min(10.35±2.51g ;P ＜ 0.001 ;成对 2- 尾部 Student’s t- 检验) 以及在给药后大约 120min(13.90±3.00g ;P ＜ 0.001 ;成对 2- 尾部 Student’s t- 检验) 导致左爪缩回阈值的显著增加 (表 19，图 20)。

[0515] 在第 3 阶段，当分别地与 5.00±2.34g 和 2.57±0.92g 的载体值相比时，以剂量 30mg/kg 口服给药的普瑞巴林在剂量给药后大约 120min(17.06±2.88g ;P ＜ 0.01 ;Kruskal-Wallis 和 Dunn’s 检验) 以及在剂量给药后大约 180min(13.86±3.21g ;P ＜ 0.01 ;ANOVA 和 Dunnett’s 检验) 导致左爪缩回阈值的显著增加。以剂量 50mg/kg 口服普瑞巴林导致当分别地与 2.57±0.92g 和 16.57±1.75g 的载体值相比时在剂量给药后大约 180min(左爪 :15.20±3.31g ;P ＜ 0.01 ;ANOVA 和 Dunnett’s 检验以及右爪 :24.20±0.39g ;P ＜ 0.05 ;Kruskal-Wallis 和 Dunn’s 检验) 左右爪缩回阈值显著的增加，以及当与载体值 (1.48±0.30g) 相比时在给药后大约 240min(12.05±3.41g ;P ＜ 0.05 ;Kruskal-Wallis 和 Dunn’s 检验) 左爪缩回阈值显著的增加。以 100mg/kg 剂量口服普瑞巴林导致当分别地与载体值 2.57±0.92 和 16.57±1.75g 比较时在剂量给药后大约

120min(23.29±1.19g ;P ＜ 0.01 ;ANOVA 和 Dunnett’s 检验）左爪缩回阈值显著的增加，在左右爪在剂量给药后大约 180min（左爪 :19.77±2.70g ;P ＜ 0.01 ;ANOVA 和 Dunnett’s 检验以及右爪 :23.70±1.04g ;P ＜ 0.01 ;Kruskal-Wallis 和 Dunn’s 检验）显著的增加，以及当与载体值 (1.48±0.30g) 值相比时在剂量给药后大约 240min 左爪缩回阈值 (15.91±2.86g ;P ＜ 0.001 ;Kruskal-Wallis 和 Dunn’s 检验）显著的增加。在以 50 和 100mg/kg 给药普瑞巴林之后右爪缩回阈值的增加是普瑞巴林在这些剂量水平上的中枢作用的指示。这与显示在镇静剂临床症状水平上剂量依赖增大的动物一致。（表 21，图 22）。

[0516] 热痛觉过敏 :在第 2 阶段，口服普瑞巴林 (30mg/kg) 当与 6.2±0.5s 的剂量给药前的值相比时导致在剂量给药后大约 15、35、60 和 130min(8.3±0.7s P＜0.05 ;8.6±1.0s P ＜ 0.05 ;8.8±1.0s P ＜ 0.05 ;9.6±0.8s P ＜ 0.001 ;全部成对 2- 尾部 Student’s t- 检验）左爪缩回潜伏期的显著增加。这些显著的增加不认为是药理学相关的，因为在载体对照组 (iv 给药）在第 2 阶段存在类似的缩回潜伏期值的增加（当与 6.2±0.5s 的剂量给药前的值相比时，在剂量给药后大约 15、35、60 和 130min(10.3±0.8s P ＜ 0.01 ;8.1±0.5s P ＜ 0.05 ;9.3±0.7s P ＜ 0.001 ;9.8±1.0s P ＜ 0.01 ;所有成对 2- 尾部 Student’st- 检验），在研究的第 3 阶段，当与载体对照比较时，口服普瑞巴林在所有测试剂量 (30，50 和 100mg/kg) 以及在所有剂量给药后时间点 (60，120，180 和 240min) 对左和右爪缩回潜伏期没有显著作用。（表 20，图 21 和表 22，图 23）。

[0517] 结论

[0518] 通过紧紧地结扎 L5 和 L6 脊神经在大鼠的左后肢引发外周单神经病。机械触诱发痛和热痛觉过敏的发生使用建立的行为试验（分别地 Von Frey 试验和 Hargreaves Plantar 试验）检测。对于左（受影响的）和右（未受影响）后肢均评价响应阈值和潜伏期。在研究的每个阶段，如在剂量给药前一天采用建立的行为试验所评价的，所有动物被认为在左后肢有神经病。

[0519] 以 0.5μg/kg 的 R-DHE 的静脉给药导致剂量给药后多达 25min 缩回阈值（机械触诱发痛）增加，在剂量给药后大约 5min 具有峰值效应。0.5μg/kg 的 R-DHE 在测试的任何时间点对于缩回潜伏期（热痛觉过敏）没有作用。以 0.1 和 0.3μg/kg 的较低剂量的 R-DHE 对机械触诱发痛或热痛觉过敏也没有作用。

[0520] 以 30μg/kg 的剂量的 S-DHE 的静脉给药导致在缩回阈值（机械触诱发痛）（峰值效应在剂量给药后大约 5 到 25min) 以及缩回潜伏期（热痛觉过敏）（峰值效应在剂量给药后大约 15min) 上均产生显著的止痛作用。未注意到 3 和 10μg/kg 的 S-DHE 对机械触诱发痛或热痛觉过敏的影响。

[0521] 鸦片样物质化合物、R-DHE 和 S-DHE 的静脉给药说明了在大鼠中在机械触诱发痛和热痛觉过敏两方面都有止痛活性。这突出了这些化合物在治疗神经性疼痛上的治疗潜力。

[0522] 在以多达 100mg/kg 的剂量给药普瑞巴林（第 3 阶段）之后，存在着缩回阈值的剂量依赖增加，峰值效应在剂量给药后大约 180 和 240min 之间。在热痛觉过敏试验中没有普瑞巴林的作用。在普瑞巴林的给药之后观察到的作用与其已知的药理学活性（基于文献数据）一致，对机械触诱发痛有显著作用，但对热痛觉过敏作用有限。

[0523] 静脉给药吗啡之后注意到的效果与其已知的药理学活性一致，对机械触诱发痛和

热痛觉过敏有显著影响。因此该测试体系对在大鼠中机械触诱发痛和热痛觉过敏试验中检测疼痛影响是灵敏的。

[0524]

表 17：在大鼠中静脉注射 R-DHE 对 Von Frey 单丝激发的左(L)和右(R)爪缩回阈值的作用(第 1 阶段) (a)原始数据

处理	在剂量给药后时间(min)的缩回阈值									
	剂量给药前		第 1 阶段							
			5		25		50		120	
	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R
载体 **5 mL/kg, i.v.**	0.95 ± 0.09 (9)	22.26 ± 1.52 (9)	5.43 ± 2.58 (9)	22.26 ± 1.52 (9)	2.25 ± 0.75 (9)	23.25 ± 1.16 (9)	2.11 ± 0.82 (9)	22.26 ± 1.52 (9)	1.09 ± 0.23 (9)	23.25 ± 1.16 (9)
二氢埃托啡 **(R) 0.1 μg/kg, i.v.**	1.37 ± 0.31	21.07 ± 1.99	5.35 ± 0.79	23.30 ± 1.00	6.55 ± 3.04	19.81 ± 1.97	1.35 ± 0.32	18.11 ± 2.52	1.07 ± 0.16	18.05 ± 1.94
二氢埃托啡 **(R) 0.3 μg/kg, i.v.**	1.27 ± 0.33	17.45 ± 2.01	11.13 ± 3.54	22.20 ± 1.30	2.41 ± 0.59	22.37 ± 1.36	1.14 ± 0.31	18.55 ± 2.25	0.95 ± 0.10	18.25 ± 1.54
二氢埃托啡 **(R) 0.5 μg/kg, i.v.**	1.05 ± 0.18	16.32 ± 1.99	21.97 ± 2.30	24.36 ± 0.34	13.12 ± 3.41	24.36 ± 0.34	6.17 ± 2.33	21.84 ± 1.77	1.80 ± 0.88	20.41 ± 1.63
吗啡 **5 mg/kg, i.v.**	1.69 ± 0.53	16.37 ± 2.20	13.38 ± 3.14	23.50 ± 1.02	19.23 ± 2.73	23.50 ± 1.02	21.55 ± 2.40	24.56 ± 0.33	9.37 ± 3.60	23.46 ± 1.06

数据表示为平均数±SEM。

n= 10 个动物每组，除非在括号中说明。

统计分析仪对 log 数据进行。

载体=柠檬酸盐缓冲液(以比例 0.03:0.10:0.86:99.01 (g:g:g:mL)的柠檬酸一水化物：柠檬酸钠：氯化钠：注射用水)。

[0525]

表 17 (续) (b) Log 数据

	剂量给药后时间(min)的缩回阈值(Log 10 (力(g) x 10 000))									
	剂量给药前		第 1 阶段							
			5		25		50		120	
处理	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R
载体† 5 mL/kg, i.v.	3.96 ± 0.04 (9)	5.34 ± 0.03 (9)	4.48 ± 0.16 (9)$	5.34 ± 0.03 (9)	4.21 ± 0.12 (9)	5.36 ± 0.03 (9)	4.12 ± 0.14 (9)	5.34 ± 0.03 (9)	3.96 ± 0.08 (9)	5.36 ± 0.03 (9)
二氢埃托啡 (R) 0.1 μg/kg, i.v.	4.06 ± 0.08	5.30 ± 0.05	4.65 ± 0.10	5.36 ± 0.02	4.42 ± 0.19	5.27 ± 0.05	4.05 ± 0.08	5.21 ± 0.07	3.99 ± 0.06	5.23 ± 0.05
二氢埃托啡 (R) 0.3 μg/kg, i.v.	4.01 ± 0.09	5.21 ± 0.05	4.71 ± 0.20	5.34 ± 0.03	4.26 ± 0.10	5.34 ± 0.03	3.97 ± 0.08	5.23 ± 0.06	3.95 ± 0.05	5.25 ± 0.04
二氢埃托啡 (R) 0.5 μg/kg, i.v.	3.96 ± 0.07	5.18 ± 0.05	5.26 ± 0.12 ##	5.39 ± 0.01	4.89 ± 0.17 ‡	5.39 ± 0.01	4.50 ± 0.17	5.32 ± 0.05	4.03 ± 0.12	5.30 ± 0.03
吗啡 5 mg/kg, i.v.	4.08 ± 0.11	5.17 ± 0.06 *	4.93 ± 0.16	5.37 ± 0.02	5.20 ± 0.11 ***	5.37 ± 0.02	5.26 ± 0.11 ***	5.39 ± 0.00	4.49 ± 0.23	5.36 ± 0.02

数据表示为平均数±SEM。 n= 10 个动物每组，除非在括号中说明。

† 载体=柠檬酸盐缓冲液(以比例 0.03：0.10：0.86：99.01 (g:g:g:mL)的柠檬酸一水化物：柠檬酸钠：氯化钠：注射用水)。

*P < 0.05，当与载体组数据相比时(不成对的 2-尾部 Student's t-检验)。

***P < 0.001，当与载体组数据相比时(不成对的 2 -尾部 Student's t-检验)。

##P < 0.01，当与载体组数据相比时(Kruskal-Wallis 和 Dunn's 检验)。

‡P < 0.05，当与载体组数据相比时(ANOVA 和 Dunnett's t-检验)。

$P < 0.05 当与剂量给药前数据相比时(成对 2 -尾部 Student's t-检验)。

[0526]

表 18：在大鼠中静脉注射 R-DHE 对热脚底刺激的左(L)和右(R)爪缩回潜伏期的作用(第 1 阶段)

	在剂量给药后的时间(min)的缩回潜伏期(s)									
	剂量给药前		第 1 阶段							
			15		35		60		130	
处理	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R
载体† **5 mL/kg, i.v.**	6.4 ± 0.5 (9)	13.9 ± 1.2 (9)	7.5 ± 0.5 (9)	12.8 ± 1.1 (9)	7.0 ± 1.2 (9)	10.3 ± 0.9 (9)	7.6 ± 0.9 (9)	12.4 ± 1.4 (9)	7.4 ± 0.9 (9)	14.1 ± 1.3 (9)
二氢埃托啡 **(R) 0.1 µg/kg, i.v.**	6.4 ± 0.5	13.5 ± 1.0	6.9 ± 1.0	13.2 ± 1.0	7.4 ± 0.5	12.6 ± 1.1	7.7 ± 1.0	12.9 ± 1.2	8.1 ± 0.6	14.3 ± 0.8
二氢埃托啡 **(R) 0.3 µg/kg, i.v.**	6.3 ± 0.6	14.3 ± 0.6	9.4 ± 0.8	15.1 ± 0.9	9.9 ± 1.1	14.5 ± 0.7 ‡	8.3 ± 0.8	14.6 ± 0.9	7.7 ± 0.8	14.2 ± 0.9
二氢埃托啡 **(R) 0.5 µg/kg, i.v.**	6.4 ± 0.4	14.1 ± 0.9	9.6 ± 1.2	15.9 ± 1.2	9.2 ± 1.2	13.1 ± 1.2	8.4 ± 0.6	13.3 ± 1.2	8.0 ± 1.1	10.9 ± 1.0
吗啡 **5mg/kg, i.v.**	6.4 ± 0.4	15.4 ± 1.0	12.0 ± 1.5 $	17.5 ± 0.5 $$$	16.4 ± 0.9 ***	16.8 ± 0.7 ***	12.8 ± 1.3 **	16.3 ± 1.1 *	10.6 ± 0.9 *	13.8 ± 1.1

数据表示为平均数±SEM。

n= 10 个动物每组，除非在括号中说明。 †载体=柠檬酸盐缓冲液(以比例 0.03：0.10：0.86：99.01 (g:g:g:mL)的柠檬酸一水化物：柠檬酸钠：氯化钠：注射用水)。

$P < 0.05，当与载体组数据相比时(Mann-Whitney U -检验)。

$$$P < 0.001，当与载体组数据相比时(Mann-Whitney U -检验)。

*P < 0.05，当与载体组数据相比时(不成对的 2 尾部 Student's t-检验)。

**P < 0.01，当与载体组数据相比时(不成对的 2 -尾部 Student's t-检验)。

***P < 0.001，当与载体组数据相比时(不成对的 2 -尾部 Student's t-检验)。

‡P < 0.05，当与载体组数据相比时(ANOVA 和 Dunnett's t-检验)。

[0527]

表 19：在大鼠中静脉注射 S-DHE 对 Von FSey 单丝激发的左(L)和右(R)爪缩回阈值的作用(第 2 阶段) (a)原始数据

	在剂量给药后时间(min)的缩回阈值									
	剂量给药之前		第 2 阶段							
			5		25		50		120	
处理	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R
载体[†] **5 mL/kg, i.v.**	1.37 ± 0.31	21.03 ± 1.84	6.11 ± 2.39	23.46 ± 1.06	1.66 ± 0.47	21.67 ± 1.61	1.11 ± 0.15	20.94 ± 1.90	1.35 ± 0.28	19.55 ± 1.69
二氢埃托啡 **(S) 3 µg/kg, i.v.**	0.94 ± 0.11	17.27 ± 2.12	8.69 ± 2.98	21.10 ± 1.46	8.28 ± 2.48	19.15 ± 1.55	0.99 ± 0.12	21.27 ± 1.53	1.19 ± 0.20	19.84 ± 1.94
二氢埃托啡 **(S) 10 µg/kg, i.v.**	1.19 ± 0.31	20.94 ± 1.90	12.15 ± 2.99	23.46 ± 1.06	3.09 ± 1.35	22.57 ± 1.39	1.48 ± 0.42	23.46 ± 1.06	0.83 ± 0.10	21.51 ± 1.55
二氢埃托啡 **(S) 30 µg/kg, i.v.**	0.84 ± 0.10	18.78 ± 1.89	24.56 ± 0.33	24.56 ± 0.33	21.92 ± 1.70	24.56 ± 0.33	7.34 ± 2.47	23.67 ± 1.07	1.20 ± 0.34	20.83 ± 1.99
普瑞巴林 **30 mg/kg, p.o.**	1.09 ± 0.35	18.63 ± 2.21	2.83 ± 0.62	20.42 ± 2.14	3.27 ± 0.97	19.39 ± 1.61	10.35 ± 2.51	21.34 ± 1.49	13.90 ± 3.00	23.26 ± 1.04

数据表示为平均数±SEM。

n =10 个动物每组。

统计分析仪对 log 数据进行。

[†] 载体=柠檬酸盐缓冲液(以比例 0.03：0.10：0.86：99.01 (g:g:g:mL)的柠檬酸一水化物：柠檬酸钠：氯化钠：注射用水)。

[0528]

表 19 (续) (b) Log 数据

	剂量给药后时间(min)的缩回阈值(Log 10 (力(g) x 10 000))									
	剂量给药前		第 2 阶段							
			5		25		50		120	
处理	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R
载体† **5 mL/kg, i.v.**	4.07 ± 0.07	5.30 ± 0.05	4.50 ± 0.16 $	5.36 ± 0.02	4.11 ± 0.10	5.32 ± 0.04	4.01 ± 0.06	5.30 ± 0.05	4.08 ± 0.06	5.28 ± 0.04
二氢埃托啡 **(S) 3 µg/kg, i.v.**	3.95 ± 0.05	5.20 ± 0.06	4.60 ± 0.20	5.31 ± 0.03	4.69 ± 0.17	5.27 ± 0.04	3.96 ± 0.06	5.32 ± 0.03	4.02 ± 0.07	5.27 ± 0.05
二氢埃托啡 **(S) 10 µg/kg, i.v.**	3.99 ± 0.08	5.30 ± 0.05	4.90 ± 0.16	5.36 ± 0.02	4.26 ± 0.13	5.34 ± 0.03	4.05 ± 0.10	5.36 ± 0.02	3.89 ± 0.05	5.32 ± 0.03
二氢埃托啡 **(S) 30 µg/kg, i.v.**	3.90 ± 0.05	5.25 ± 0.05	5.39 ± 0.00 ###	5.39 ± 0.00	5.32 ± 0.04 ###	5.39 ± 0.00	4.60 ± 0.17	5.37 ± 0.02	3.97 ± 0.09	5.29 ± 0.05
普瑞巴林 **30 mg/kg, p.o.**	3.92 ± 0.09	5.24 ± 0.06	4.31 ± 0.13	5.28 ± 0.06	4.35 ± 0.13	5.27 ± 0.04	4.87 ± 0.14 ***	5.32 ± 0.03	5.03 ± 0.11 ***	5.36 ± 0.02

数据表示为平均数±SEM。

n =10 个动物每组。

† 载体=柠檬酸盐缓冲液(以比例 0.03：0.10：0.86：99.01 (g:g:g:mL)的柠檬酸一水化物：柠檬酸钠：氯化钠：注射用水)。

*** P < 0.001 当与剂量给药前数据相比时(成对 2 -尾部 Student's t-检验)。

P < 0.001，当与载体组数据相比时(Kruskal-Wallis 和 Dunn's 检验)。

$ P < 0.05 当与剂量给药前数据相比时(成对 2 -尾部 Student's t-检验)。

[0529]

表 20：在大鼠中静脉注射 S-DHE 对热脚底刺激的左(L)和右(R)爪缩回潜伏期的作用(第 2 阶段)

	在剂量给药后的时间(min)的缩回潜伏期(s)									
	剂量给药前		第 2 阶段							
			15		35		60		130	
处理	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R
载体† **5 mL/kg, i.v.**	6.2 ± 0.5	14.8± 0.6	10.3 ± 0.8$^{\$\$}$	13.4 ± 0.8	8.1 ± 0.5$^{\$}$	11.7 ± 0.7$^{\$}$	9.3 ± 0.7$^{\$\$\$}$	12.1 ± 0.6$^{\$}$	9.8 ± 1.0$^{\$\$}$	13.1 ± 1.0
二氢埃托啡 **(S) 3 µg/kg, i.v.**	6.2 ± 0.6	12.6 ± 0.7	9.8 ± 0.9	15.0 ± 0.7	10.0 ± 0.7	12.1 ± 0.9	9.1 ± 0.9	13.5 ± 0.8	10.4 ± 1.3	14.3 ± 0.8
二氢埃托啡 **(S) 10 µg/kg, i.v.**	6.2 ± 0.6	13.8 ± 0.8	10.4 ± 1.3	14.5 ± 0.9	10.8 ± 1.1	12.5 ± 0.9	11.3 ± 1.1	12.7 ± 0.6	11.3 ± 1.6	13.0 ± 0.8
二氢埃托啡 **(S) 30 µg/kg, i.v.**	6.2 ± 0.5	13.5 ± 0.9	17.6 ± 0.4$^{\#\#}$	17.5 ± 0.4$^{\#\#}$	10.1 ± 1.4	11.8 ± 1.1	8.3 ± 1.0	14.3 ± 1.1	8.7 ± 0.9	14.2 ± 1.3
普瑞巴林 **30 mg/kg, p.o.**	6.2 ± 0.5	13.4 ± 0.9	8.3 ± 0.7*	13.4 ± 0.6	8.6 ± 1.0*	11.9 ± 0.8	8.8 ± 1.0*	12.9 ± 0.6	9.6 ± 0.8***	13.4 ± 0.9

数据表示为平均数±SEM。

n =10 个动物每组。

† 载体=柠檬酸盐缓冲液(以比例 0.03：0.10：0.86：99.01 (g:g:g:mL)的柠檬酸一水化物：柠檬酸钠：氯化钠：注射用水)。

$^{\#\#}$P < 0.01，当与载体组数据相比时(Kruskal-Wallis 和 Dunn's 检验)。

*P < 0.05 当与剂量给药前数据相比时(成对 2 -尾部 Student's t-检验)。

***P < 0.001 当与剂量给药前数据相比时(成对 2 -尾部 Student's t-检验)。

$^{\$}$P < 0.05, $^{\$\$}$P < 0.01 和 $^{\$\$\$}$P < 0.001 当与剂量给药前数据相比时(成对 2 -尾部 Student's t-检验)。

[0530]

表 21　口服普瑞巴林和静脉注射吗啡对神经病的大鼠中对 Von Frey 单丝激发对左(L)和右(R)爪缩回阈值的作用(第 3 阶段) (a)原始数据

	在剂量给药后时间(min)的缩回阈值									
	剂量给药前		第 3 阶段							
			60		120		180		240	
处理	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R
载体† **10 mL/kg, p.o.**	1.87 ± 0.38	22.53 ± 1.97	4.95 ± 0.95	20.30 ± 1.99	5.00 ± 2.34	18.36 ± 2.34	2.57 ± 0.92	16.57 ± 1.75	1.48 ± 0.30	20.54 ± 1.93
普瑞巴林 **30 mg/kg, p.o.**	2.59 + 0.63	23.25 + 1.41	10.53 + 3.25	23.26 + 1.04	17.06 + 2.88	23.02 + 1.01	13.86 + 3.21	22.74 + 0.97	8.02 + 2.65	23.99 + 0.38
普瑞巴林 **50 mg/kg, p.o.**	2.02 ± 0.35	20.61 ± 2.00	18.48 ± 3.27	22.57 ± 1.39	13.69 ± 3.68	21.67 ± 1.61	15.20 ± 3.31	24.20 ± 0.39	12.05 ± 3.41	22.74 ± 0.97
普瑞巴林 **100 mg/kg, p.o.**	1.31 ± 0.18	21.67 ± 1.93	15.53 ± 2.78	22.24 ± 1.82	23.29 ± 1.19	24.28 ± 0.37	19.77 ± 2.70	23.70 ± 1.04	15.91 ± 2.86	23.18 ± 1.00
吗啡 **5 mg/kg, i.v.**	1.46 ± 0.37 (9)	21.26 ± 2.11 (9)	21.32 ± 2.56 (9)	24.02 ± 0.34 (9)	11.08 ± 2.85 (9)	20.04 = 1.81 (9)	3.68 = 0.97 (9)	19.57 ± 1.75 (9)	1.29 ± 0.20 (9)	18.71 ± 1.81 (9)

数据表示为平均数±SEM。

n= 10 个动物每组，除非在括号中说明。

统计分析仅对 log 数据进行。

† 载体= 1 %羧甲基纤维素。

[0531]

表 21（续）（b）Log 数据

	剂量给药前		剂量给药后时间(min)的缩回阈值(Log 10 (力(g) x 10 000))							
			第 3 阶段							
			60		120		180		240	
处理	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R
载体[†] **10 mL/kg, p.o.**	4.20 ± 0.08	5.33 ± 0.05	4.57 ± 0.13 $^{\$\$}$	5.28 ± 0.05	4.43 ± 0.15	5.22 ± 0.07	4.23 ± 0.12	5.20 ± 0.05	4.11 ± 0.07	5.29 ± 0.05
普瑞巴林 **30 mg/kg, p.o.**	4.29 ± 0.11	5.35 ± 0.03	4.70 ± 0.20	5.36 ± 0.02	5.13 ± 0.11 $^{\#\#}$	5.36 ± 0.02	4.95 ± 0.16 **	5.35 ± 0.02	4.68 ± 0.16	5.38 ± 0.01
普瑞巴林 **50 mg/kg, p.o.**	4.25 ± 0.07	5.29 ± 0.05	5.10 ± 0.16	5.34 ± 0.03	4.85 ± 0.19	5.32 ± 0.04	5.00 ± 0.15 **	5.38 ± 0.01 $^{\#}$	4.83 ± 0.18 $^{\#}$	5.35 ± 0.02
普瑞巴林 **100 mg/kg, p.o.**	4.07 ± 0.06	5.31 ± 0.05	5.08 ± 0.12	5.33 ± 0.05	5.36 ± 0.03 **	5.38 ± 0.01	5.23 ± 0.09 **	5.37 ± 0.02 $^{\#\#}$	5.11 ± 0.10 $^{\#\#}$ $^{\#}$	5.36 ± 0.02
吗啡 **5 mg/kg, i.v.**	4.08 ± 0.09 (9)	5.30 ± 0.05 (9)	5.22 ± 0.15 $^{+++}$ (9)	5.38 ± 0.01 (9)	4.89 ± 0.14 $^{-+}$ (9)	5.29 ± 0.04 (9)	4.45 ± 0.11 $^{-}$ (9)	5.28 ± 0.04 (9)	4.07 ± 0.07 (9)	5.26 ± 0.04 (9)

数据表示为平均数±SEM。

n= 10 个动物每组，除非在括号中说明。

[†] 载体= 1%羧甲基纤维素。

$^{-}P < 0.05$, $^{+}P < 0.01$ 和 $^{-++}P < 0.001$， 当与剂量给药前数据相比时(成对 2 -尾部 Student's t-检验)。

$^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$ 和 $^{\#\#\#}P < 0.001$， 当与载体组数据相比时(Kruskal-Wallis 和 Dunn's 检验)。

$^{**}P < 0.01$， 当与载体组数据相比时(ANOVA 和 Dunnett's 检验)。

$^{\$\$}P < 0.01$ ， 当与剂量给药前数据相比时(成对 2 -尾部 Student's t-检验)。

[0532]

表 22　口服普瑞巴林和静脉注射吗啡对神经病的大鼠热脚底刺激的左(L)和右(R)爪缩回潜伏期的作用(第 3 阶段)

	在剂量给药后的时间(min)的缩回潜伏期(s)									
	剂量给药前		第 3 阶段							
			70		130		190		250	
处理	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R
Vehicle[†] 10 mL/kg, p.o.	6.5 ± 0.5	12.4 ± 0.8	9.2 ± 1.0	12.2 = 0.5	9.0 ± 1.0	10.7 ± 0.7	9.3 ± 1.2	12.2 ± 1.0	9.5 ± 0.8 [$$]	11.4 ± 0.6
普瑞巴林 30 mg/kg, p.o.	6.5 ± 0.5	13.1 ± 0.6	9.9 ± 0.8	13.4 = 1.0	9.3 ± 0.8	13.7 ± 0.9	8.3 ± 1.1	12.2 ± 0.4	10.9 ± 0.8	14.0 ± 0.8
普瑞巴林 50 mg/kg, p.o.	6.5 ± 0.6	11.4 ± 0.8	10.6 ± 0.6	12.9 = 0.9	9.7 ± 1.1	13.6 ± 1.1	11.2 ± 1.1	12.7 ± 0.5	9.0 ± 0.7	11.9 ± 0.7
普瑞巴林 100 mg/kg, p.o.	6.6 ± 0.7	11.6 ± 0.5	11.5 ± 0.8	12.6 0.9	9.9 ± 0.9	13.4 ± 1.3	7.6 ± 0.5	13.7 ± 0.7	9.7 ± 0.8	13.7 ± 1.1
吗啡 5 mg/kg, i.v.	6.0 ± 0.5 (9)	11.8 = 0.6 (9)	11.8 ± 1.2 [++] (9)	14.0 ± 1.2 (9)	7.3 ± 0.9 (9)	13.1 ± 1.0 (9)	8.0 ± 0.8 [+] (9)	14.3 ± 1.0 (9)	10.6 ± 1.4 [+] (9)	14.1 ± 0.9 (9)

数据表示为平均数±SEM。

n= 10 个动物每组，除非在括号中说明。

[†] 载体= 1 %羧甲基纤维素。

[+]P < 0.05 和[++]P < 0.01 ，当与剂量给药前数据相比时(成对 2 -尾部 Student's t-检验)。

[$$]P < 0.01,当与剂量给药前数据相比时(成对 2 -尾部 Student's t-检验)。

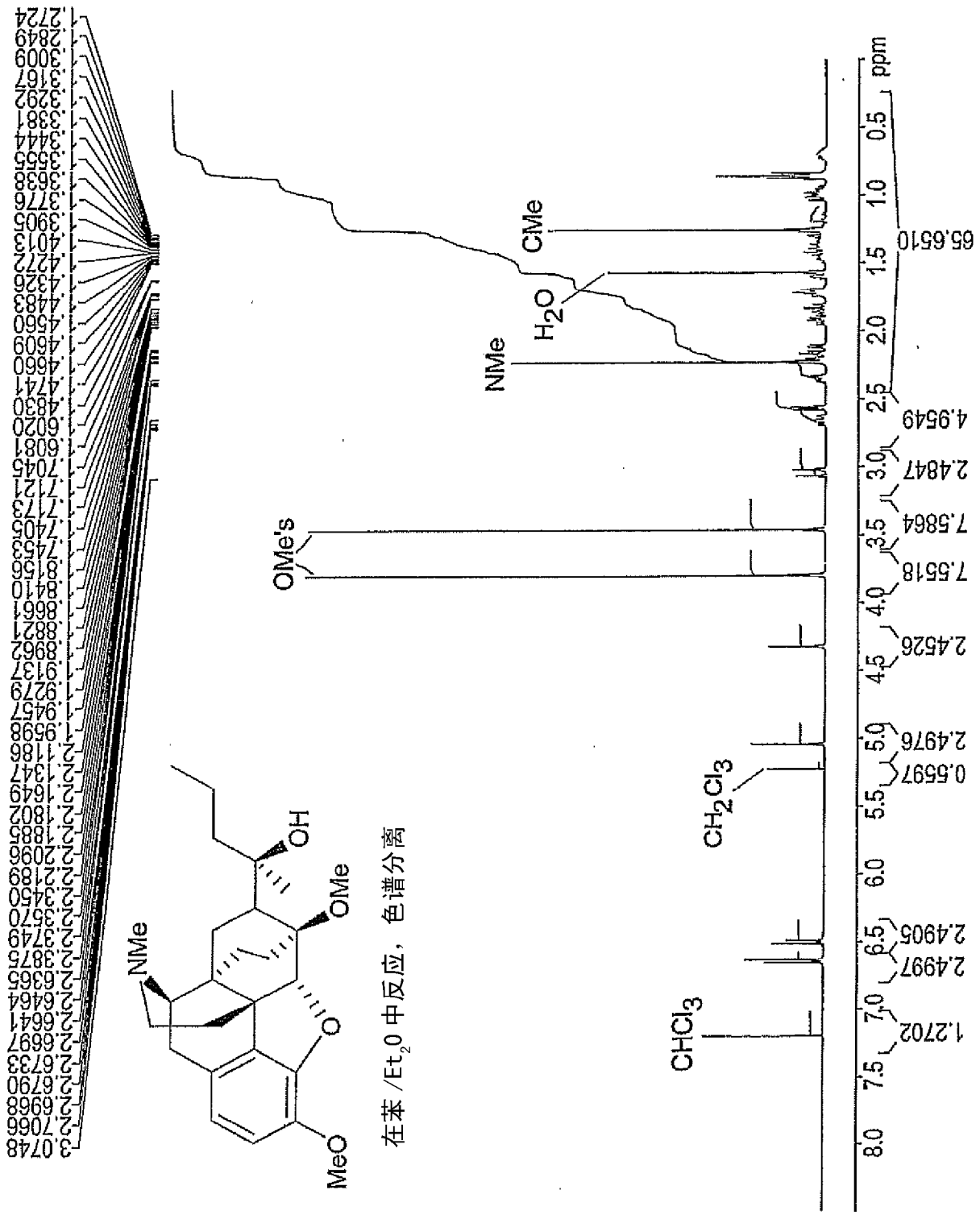

NMe
OH
OMe
MeO
O
在苯 /Et2O 中反应，色谱分离
OMe's
NMe
H2O
CMe
CH2Cl3
CHCl3
ppm
65.6510
4.9549
2.4847
7.5864
7.5518
2.4526
2.4976
0.5597
2.4905
2.4997
1.2702

图 1a

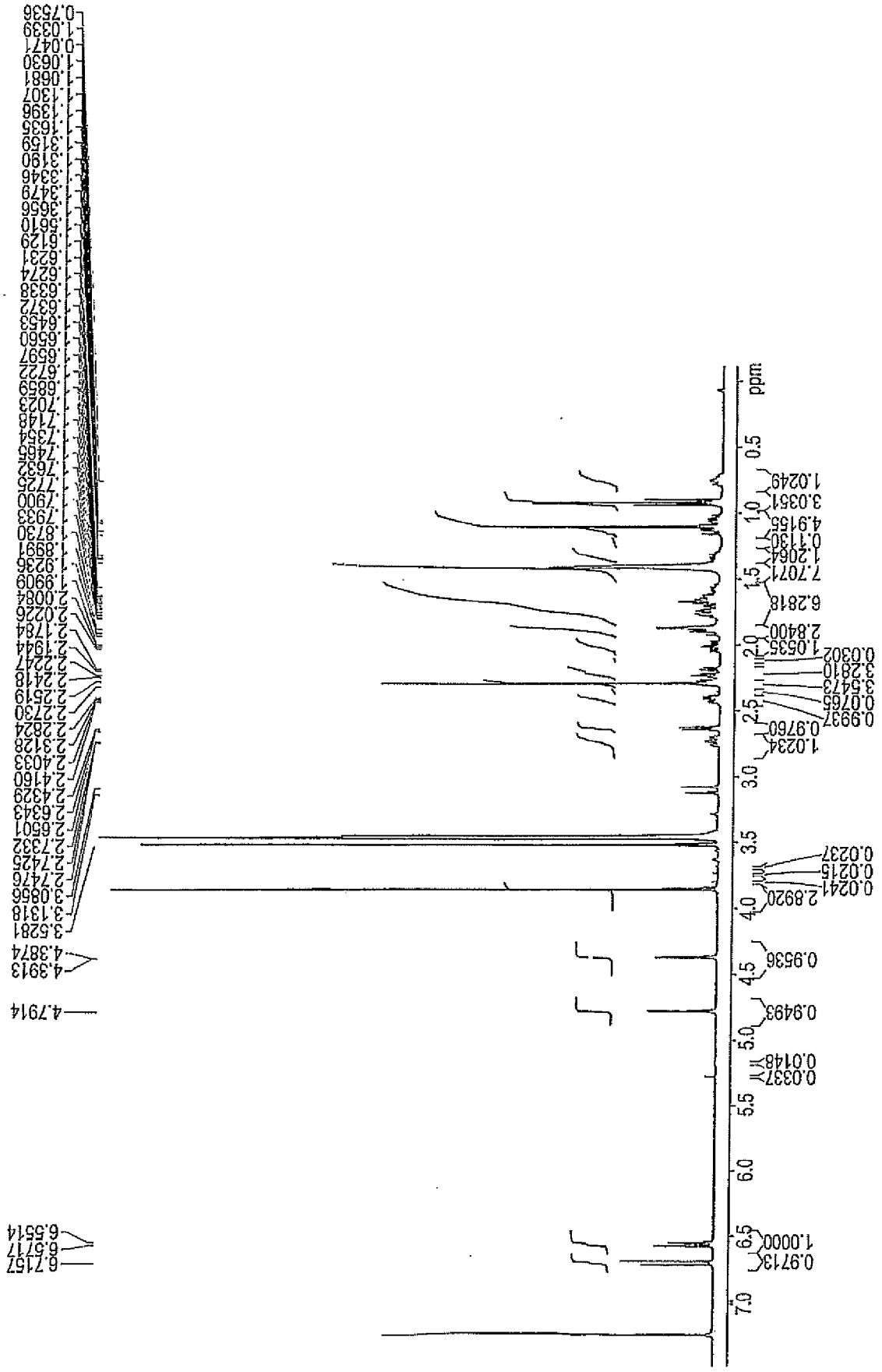
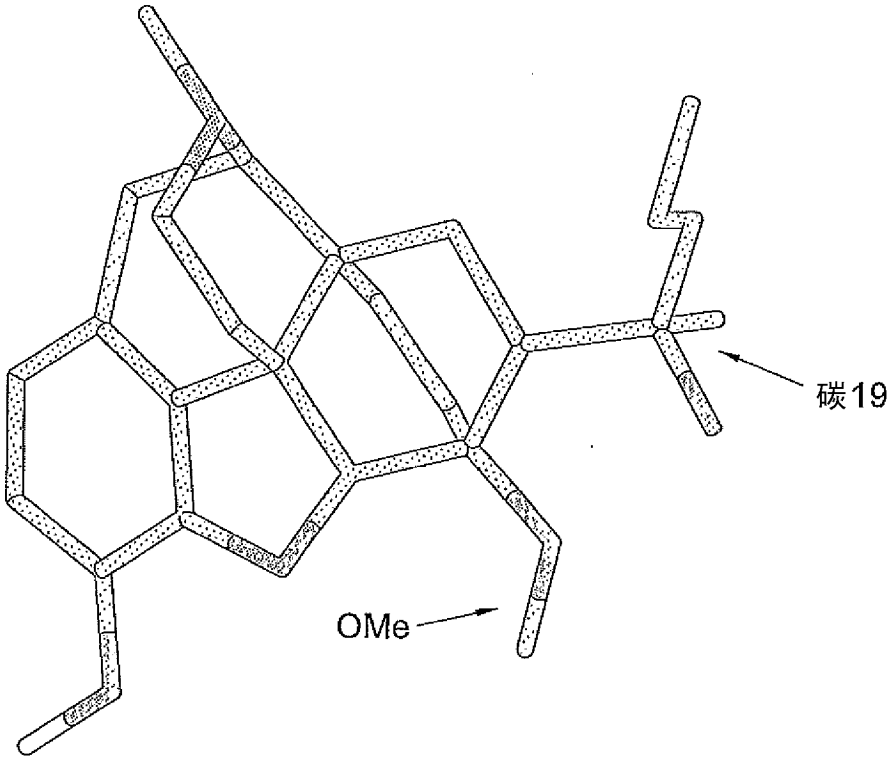
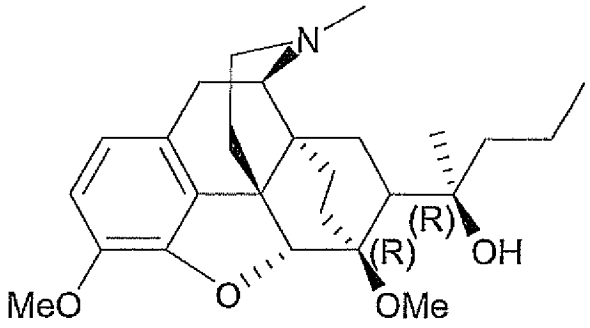

0.7536
1.0339
0.0471
1.0630
1.0681
1.1307
1.1396
1.1635
1.3159
1.3190
1.3346
1.3479
1.3656
1.5610
1.6129
1.6231
1.6274
1.6338
1.6372
1.6453
1.6560
1.6597
1.6722
1.6859
1.7023
1.7148
1.7354
1.7465
1.7632
1.7725
1.7900
1.7933
1.8730
1.8991
1.9236
1.9909
2.0084
2.0226
2.1784
2.1944
2.2247
2.2418
2.2519
2.2730
2.2824
2.3128
2.4033
2.4160
2.4329
2.6343
2.6501
2.7332
2.7425
2.7476
3.0856
3.1318
3.5281
4.3874
4.3913
4.7914
6.2157
6.5717
6.5514
ppm
0.5
1.0249
1.0
3.0351
4.9155
0.1130
1.2064
1.5
7.7071
6.2818
2.8400
2.0
1.0535
0.0302
3.2810
3.5473
0.0765
2.5
0.9937
0.9760
1.0234
3.0
3.5
0.0237
0.0215
0.0241
2.8920
4.0
0.9536
4.5
0.9493
5.0
0.0148
0.0337
5.5
6.0
6.5
1.0000
0.9713
7.0

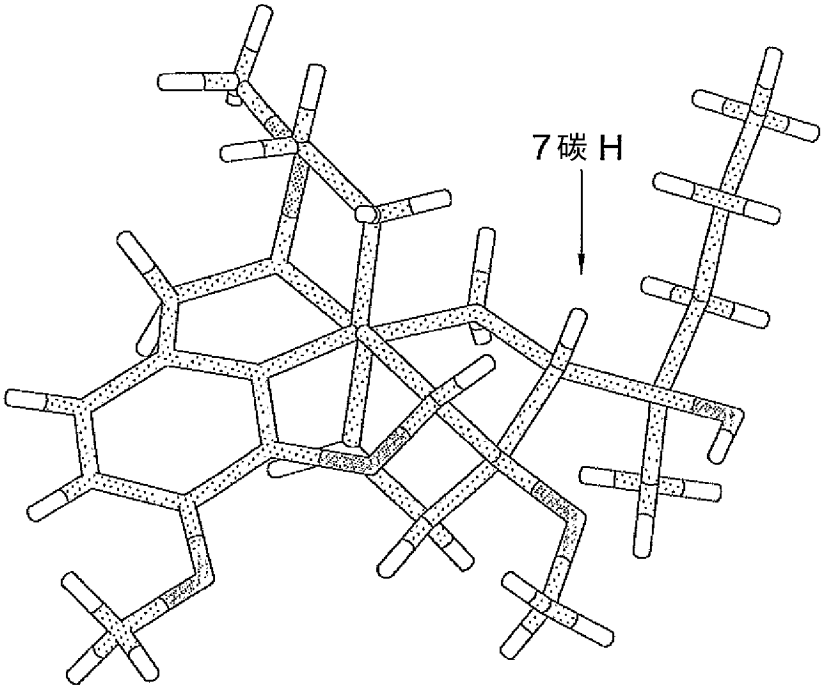
图 1b

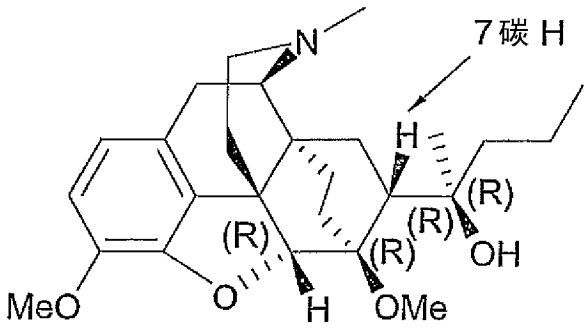




(R)-19-Pr-DHT

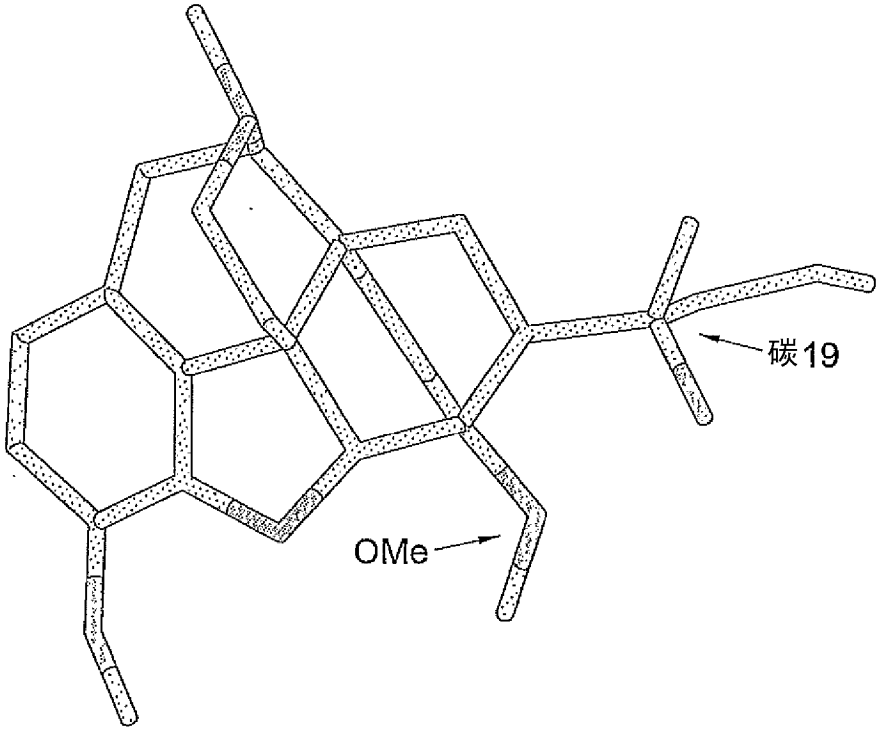
图 2

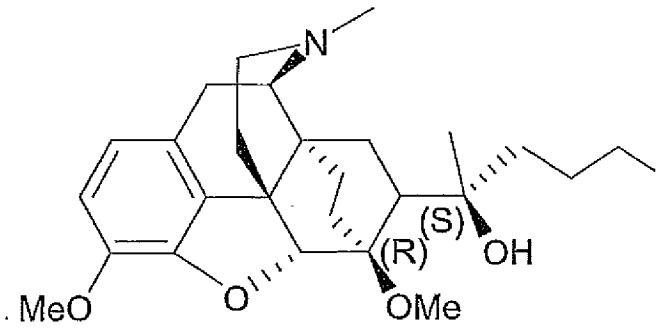




(R)-19-Pr-DHT

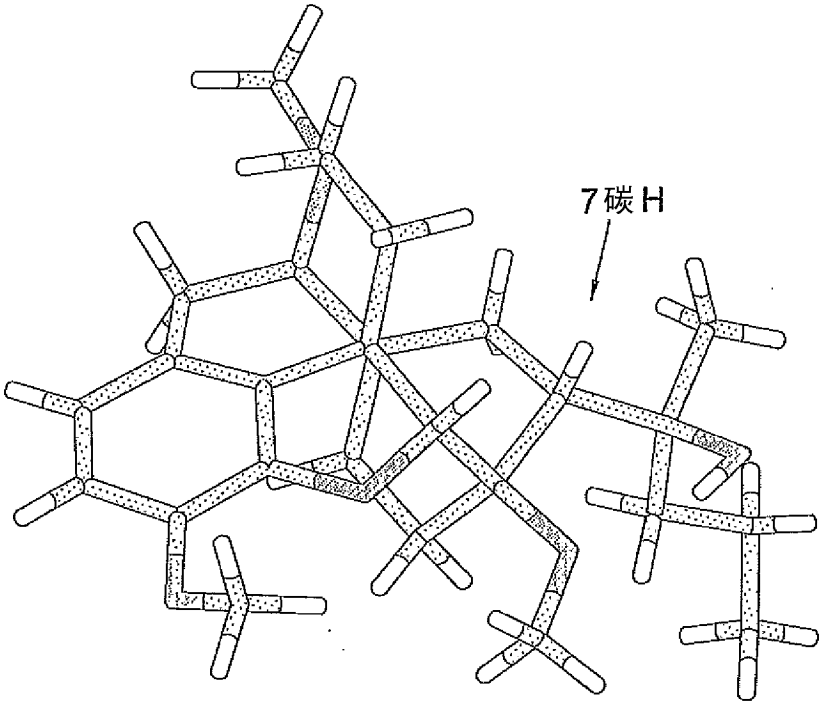
图 3

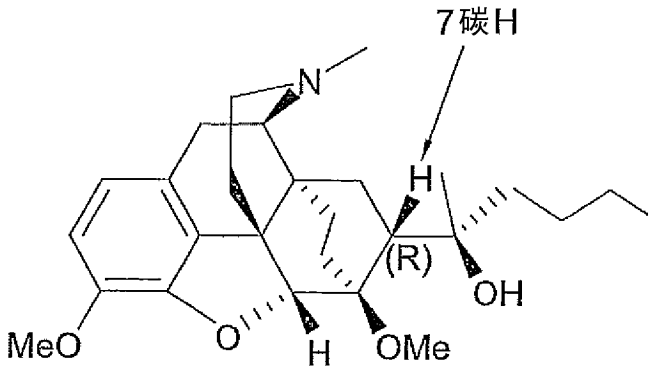




(S)-19-Pr-DHT

图 4





(S)-19-Pr-DHT

图 5

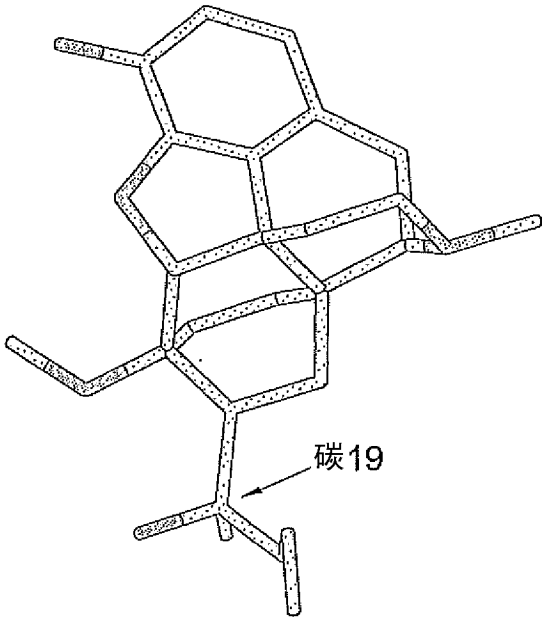


图 6

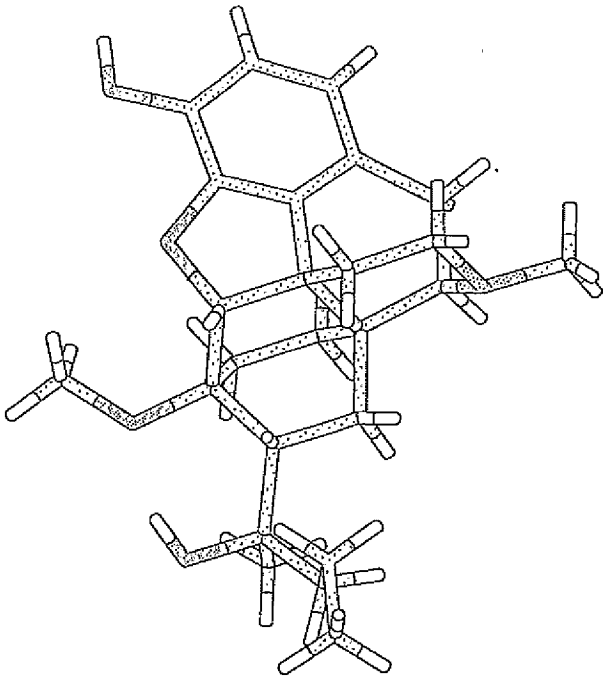


图 7

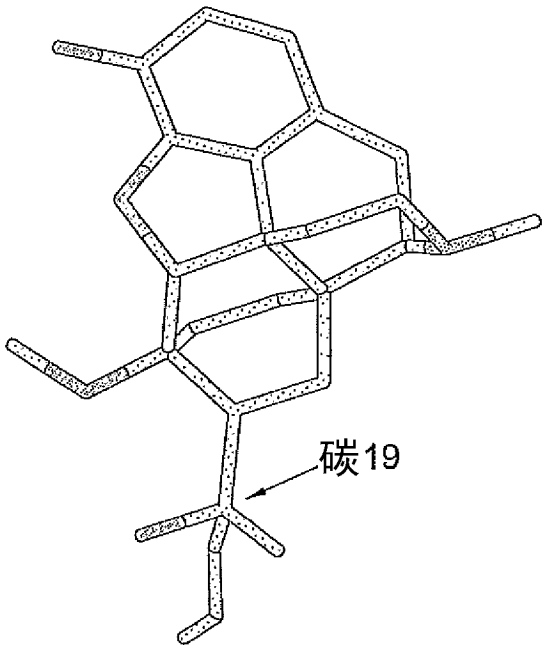


图 8

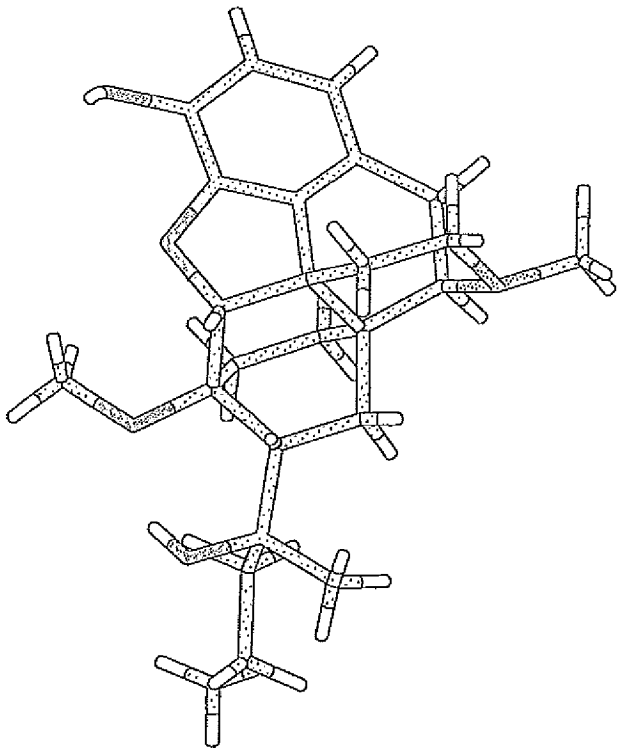


图 9

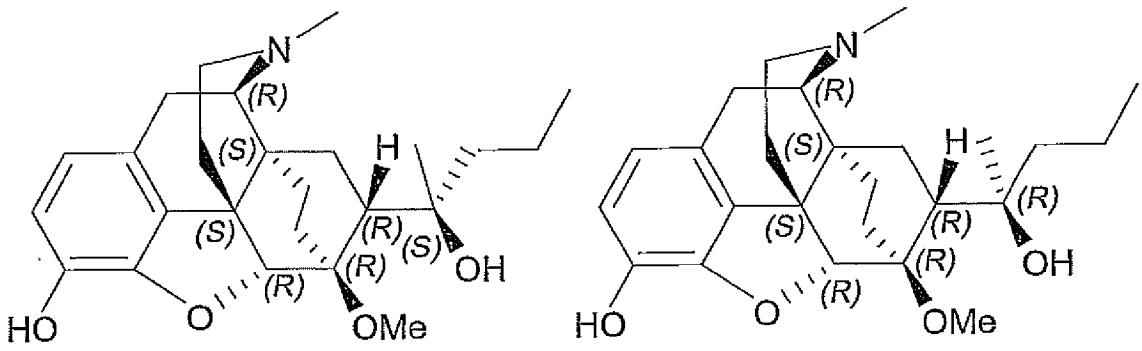
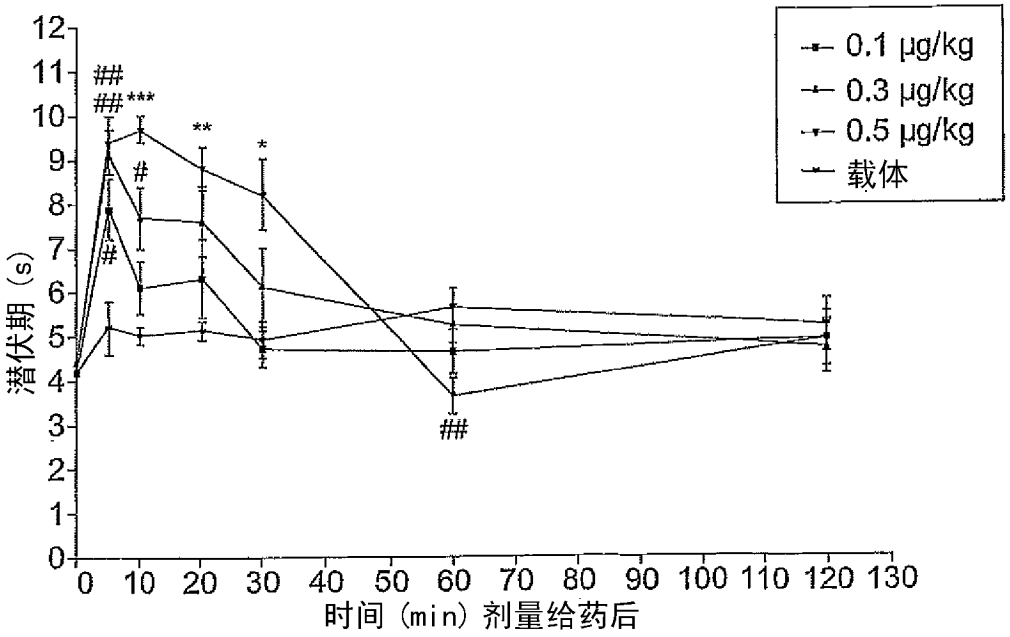
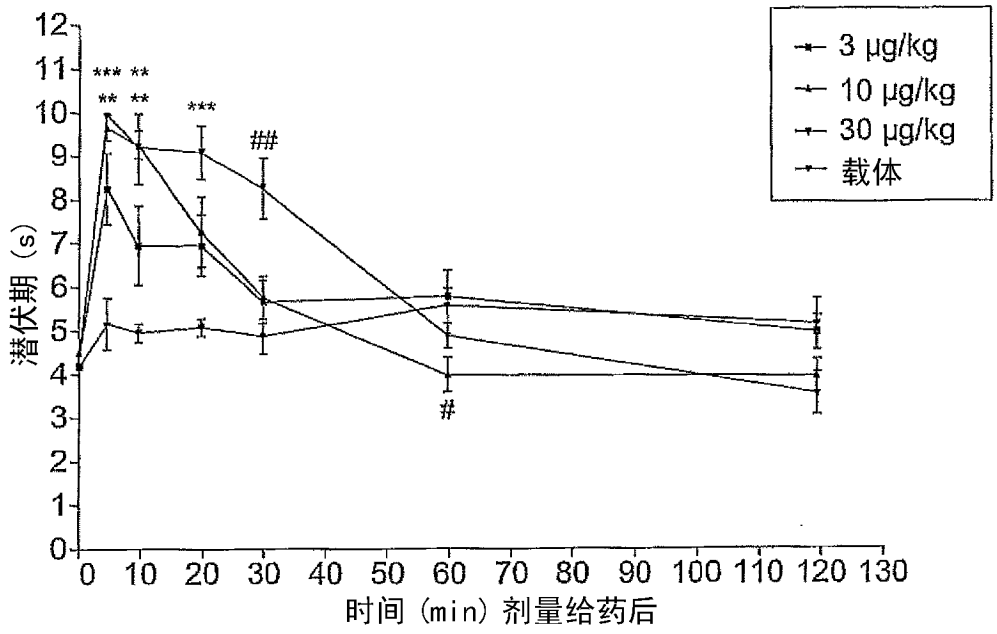


图 10



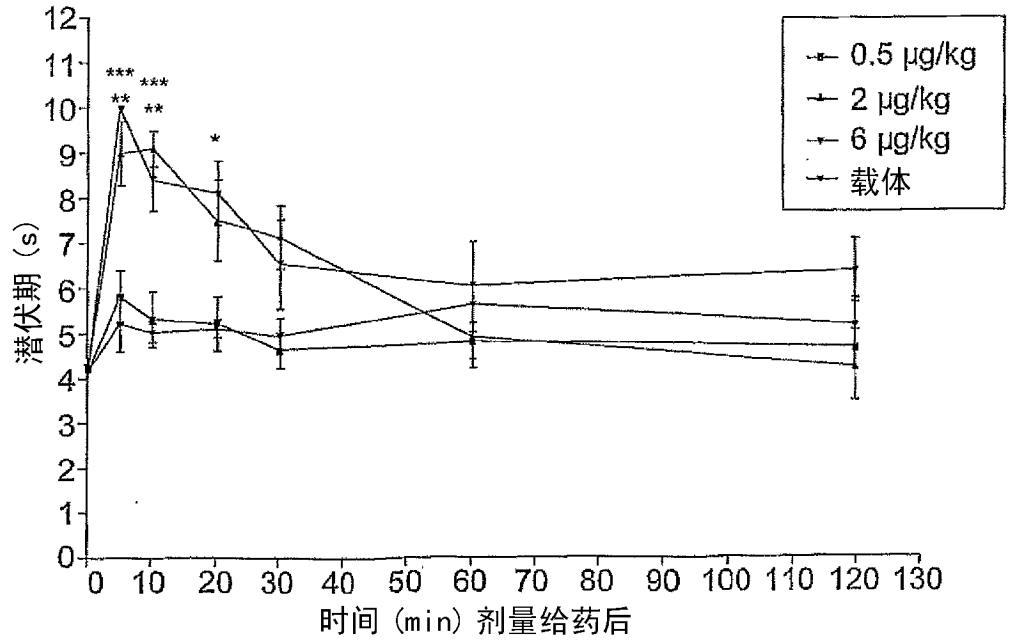
#P<0.05、##P<0.01，当与载体比较时（ANOVA 和 Dunnett’s t-检验）
*P<0.05、**P<0.01 和 ***P<0.001，当与载体比较时（Kruskal-Walls 和 Dunn’s 检验）。

图 11



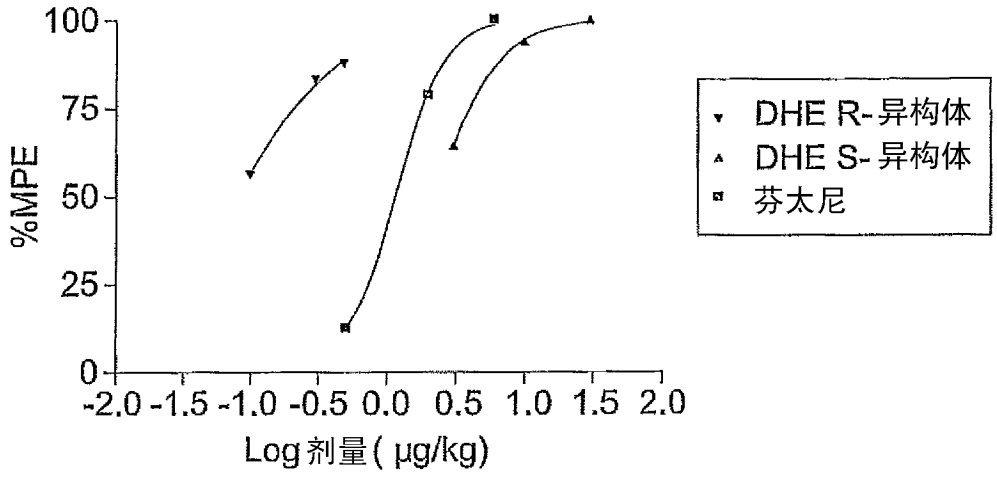
#P<0.05、##P<0.01，当与载体比较时（ANOVA 和 Dunnett’s 检验）
**P<0.01 和 ***P<0.001，当与载体比较时（Kruskal-Walls 和 Dunn’s 检验）。

图 12



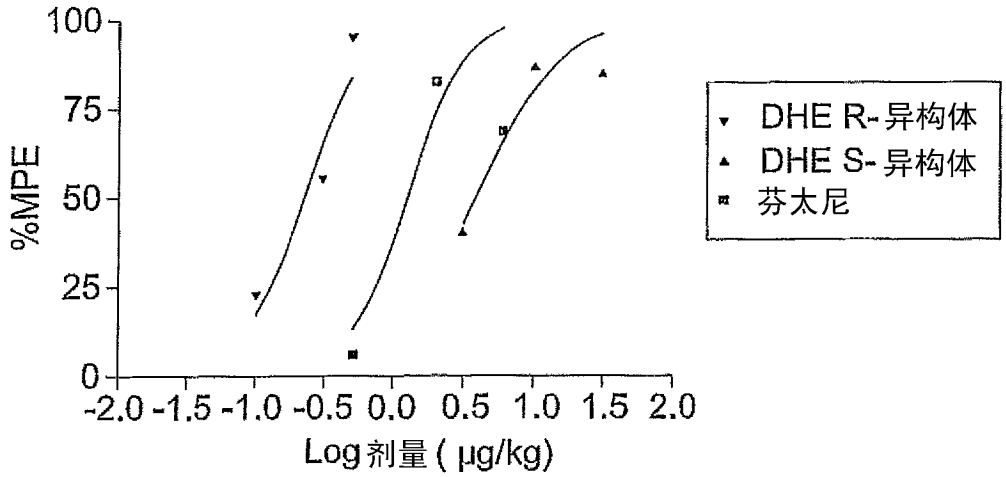
*P<0.05、**P<0.01 和 ***P<0.001，当与载体比较时（Kruskal-Walls 和 Dunn’s 检验）。

图 13



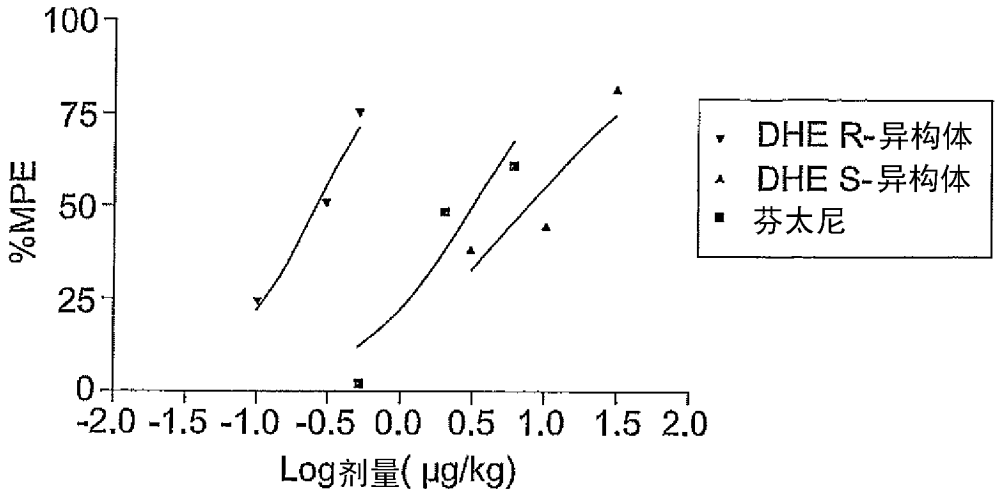
DHE R- 异构体ED50=0.07914 μg/kg
DHE S- 异构体ED50=2.165 μg/kg
芬太尼ED50=1.135 μg/kg

图 14



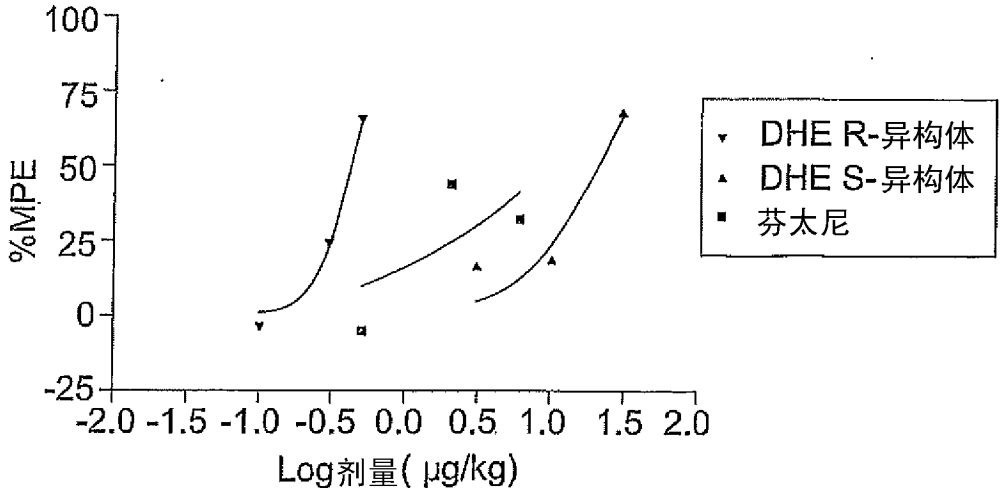
DHE R-异构体 ED50=0.2253 μg/kg
DHE S- 异构体ED50=3.795 μg/kg
芬太尼 ED50=1.239 μg/kg

图 15



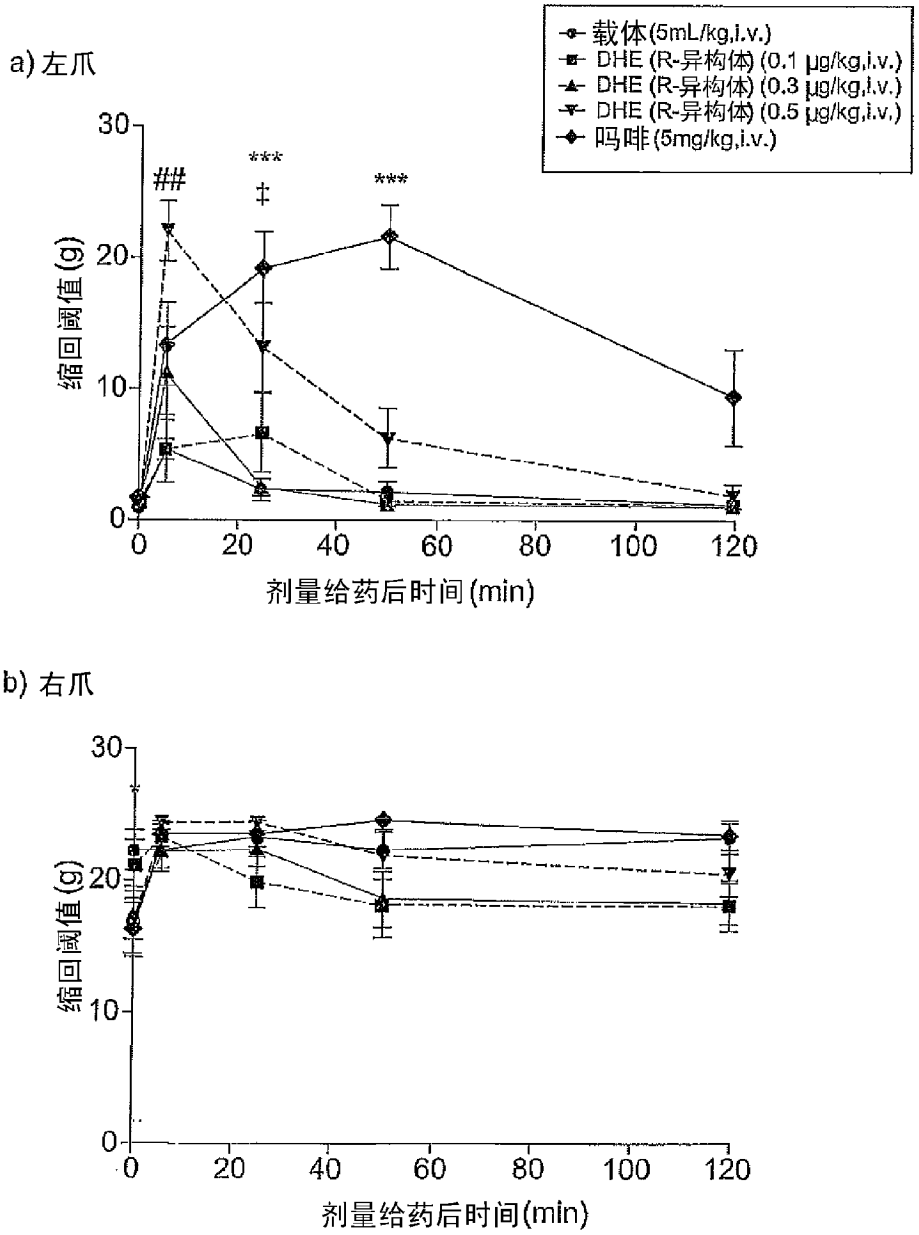
DHE R-异构体ED50=0.2532 μg/kg
DHE S-异构体ED50=7.516 μg/kg
芬太尼ED50=3.111 μg/kg

图 16



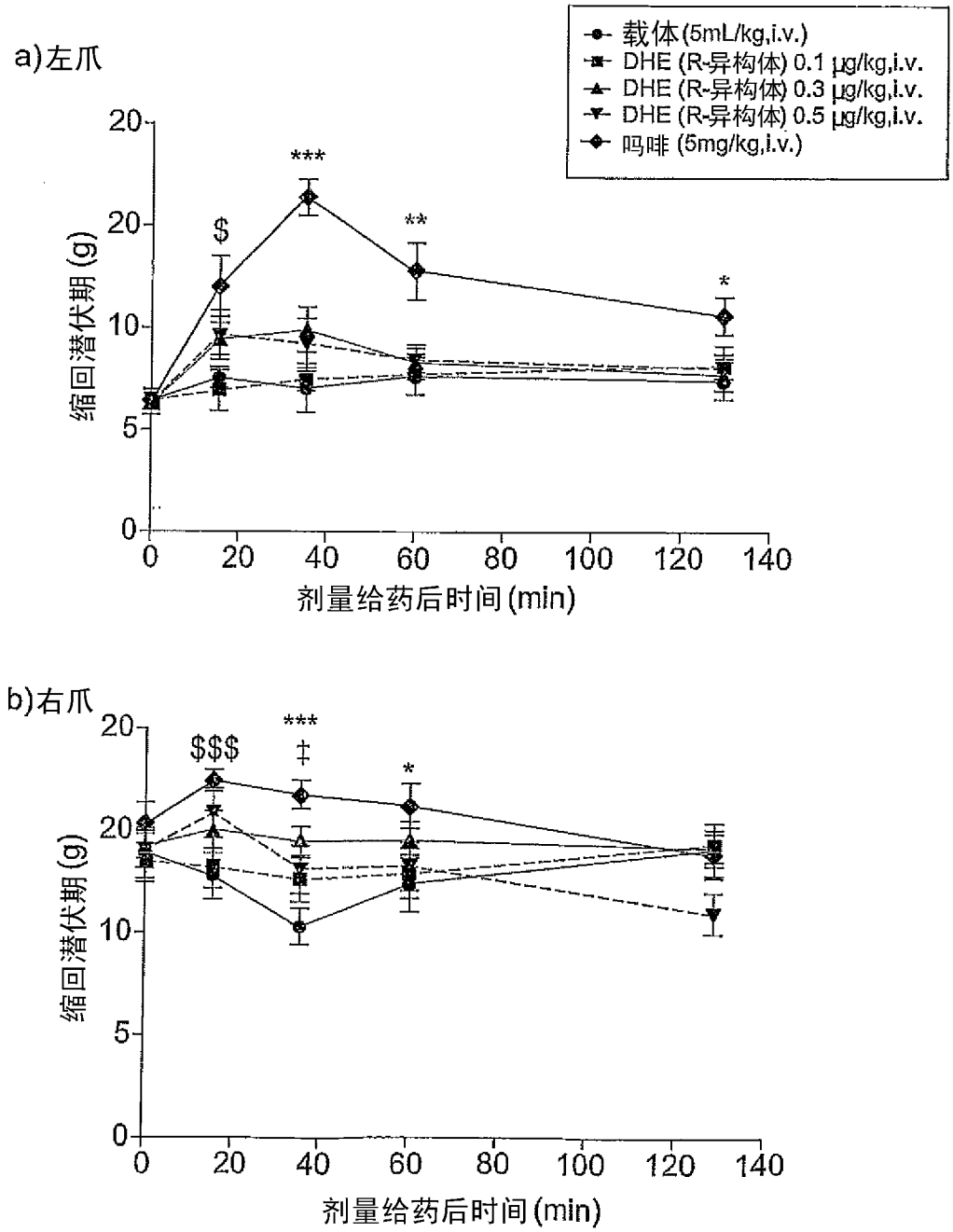
DHE R-异构体ED50=0.4222 μg/kg
DHE S-异构体ED50=20.95 μg/kg
芬太尼ED50=9.681 μg/kg

图 17



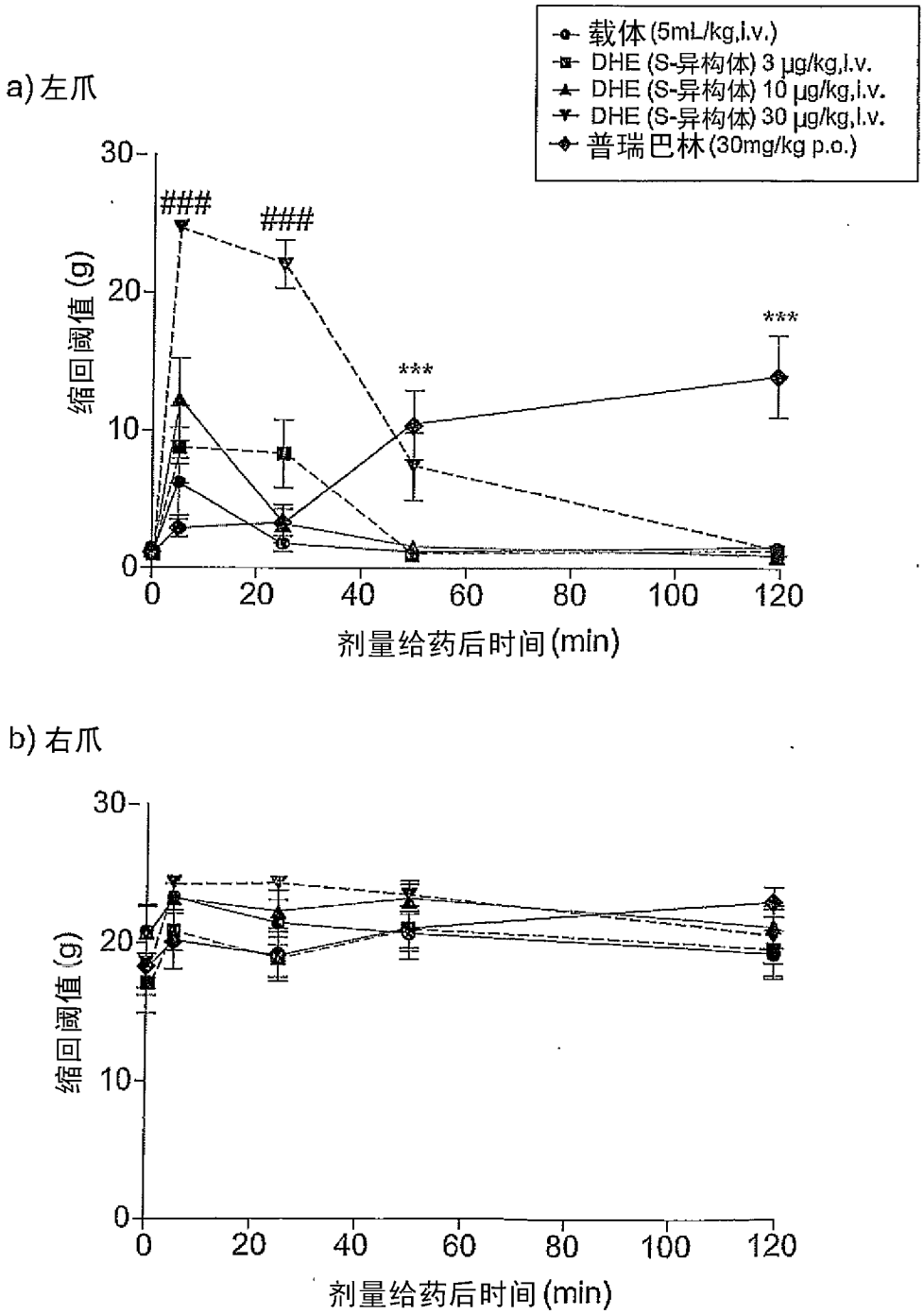
P < 0.01，当与载体组数据相比时（Kruskal-Wallis 和 Dunn's 检验）。
P < 0.05，当与载体组数据相比时（ANOVA 和 Dunnett's t-检验）。
* P < 0.05，*** P < 0.001，当与载体组数据相比时（不成对的 2 - 尾部 Student's t-检验）。

图 18



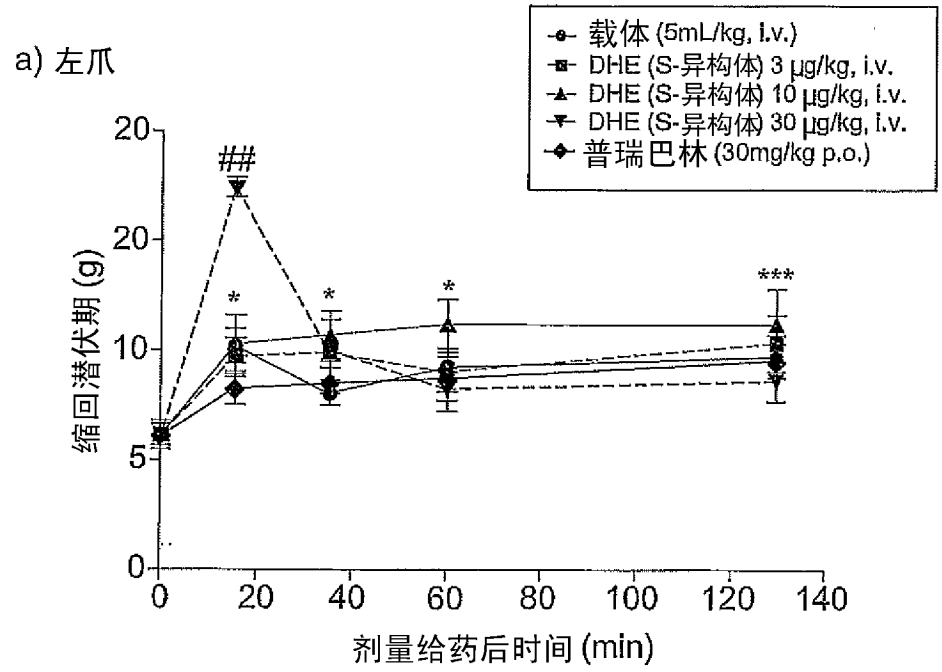
$P < 0.05, $$$ P < 0.001 ，当与载体组数据相比时（Mann-Whitney U - 检验）。
当与载体组数据相比时（不成对的 2 - 尾部 Student’s t- 检验）。
* P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 ，当与载体组数据相比时
（不成对的 2 - 尾部 Student’s t- 检验）。
P < 0.05 当与载体组数据相比时（ANOVA 和 Dunnett’s t- 检验）。

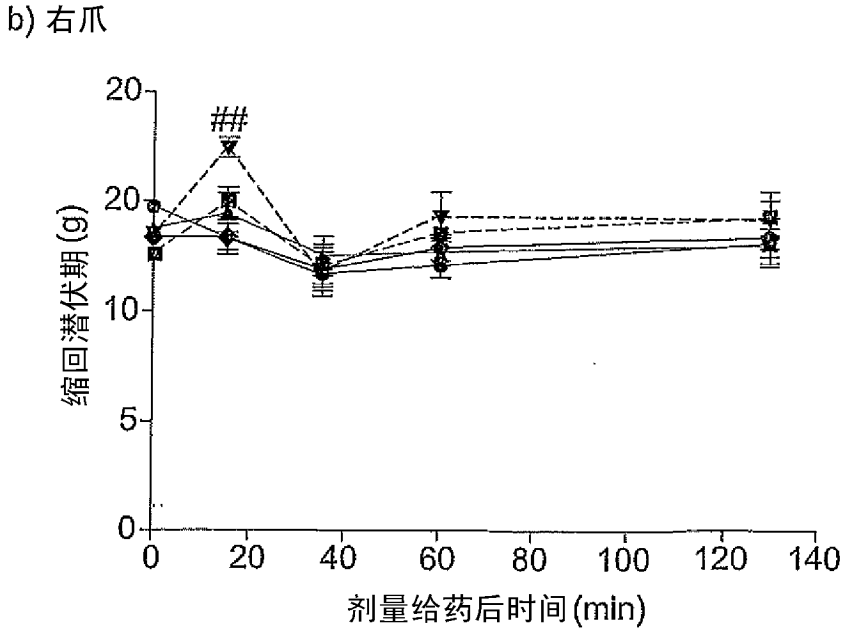
图 19



*** P < 0.001， 当与剂量给药前数据相比时（成对 2 - 尾部 Student’s t- 检验）。
# # # P < 0.001，当与载体组数据相比时（Kruskal-Wallis 和 Dunn’s 检验）。

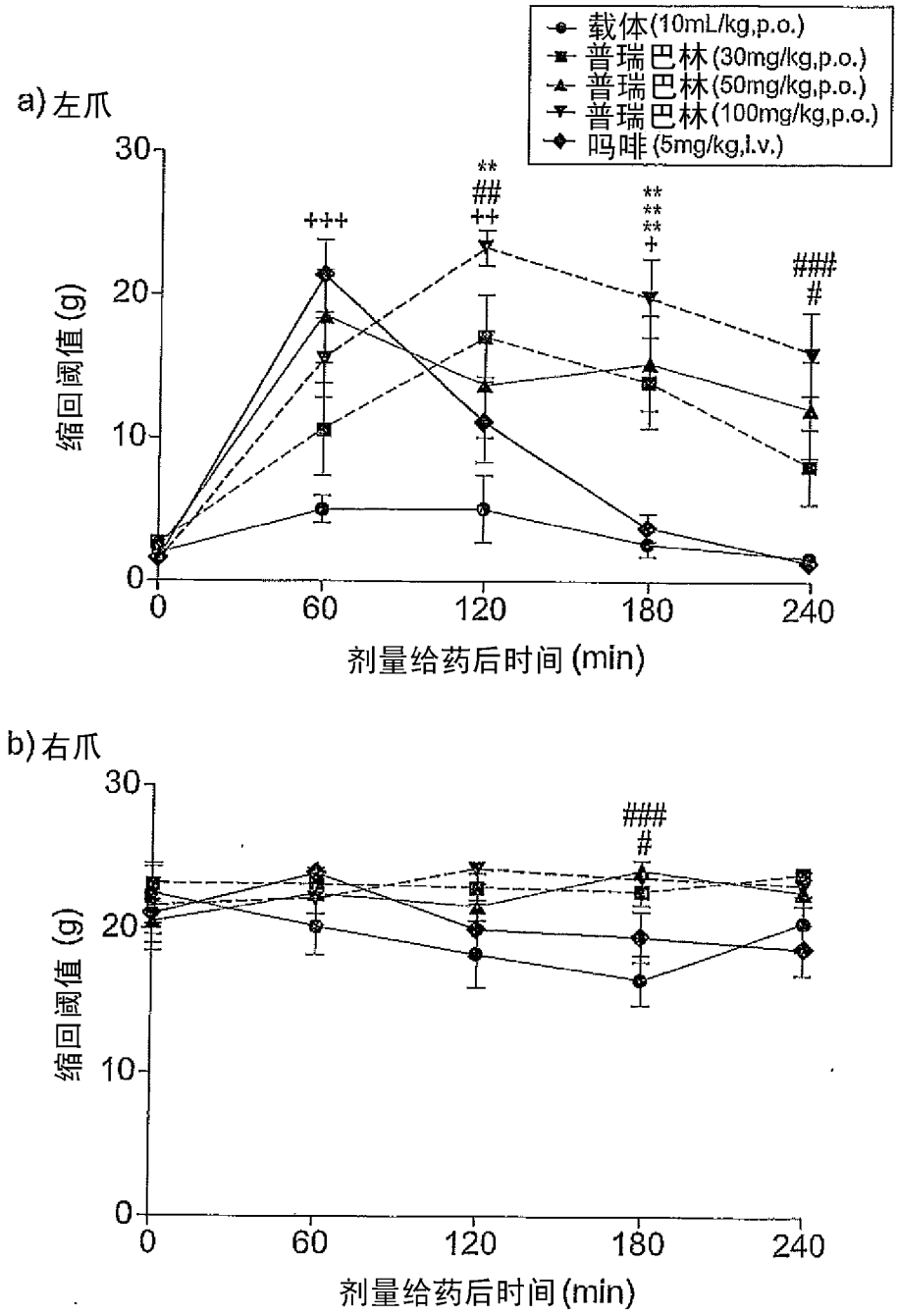
图 20





P < 0.01， 当与载体组数据相比时（Kruskal-Wallis 和 Dunn’s 检验）。
* P < 0.05, *** P < 0.001， 当与剂量给药前数据相比时
（成对 2 - 尾部 Student’s t- 检验）。

图 21



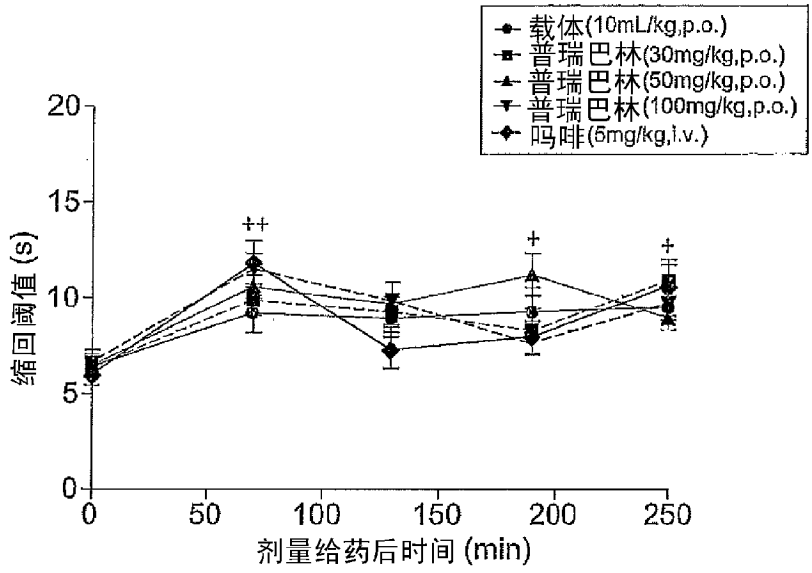
+ P < 0.05, ++ P < 0.01 和 +++ P < 0.001， 当与剂量给药前数据相比时（成对 2 - 尾部 Student’s t- 检验）。

# P < 0.05, # # P < 0.01 和 # # # P < 0.001，当与载体组数据相比时（Kruskal-Wallis 和 Dunn’s 检验）。

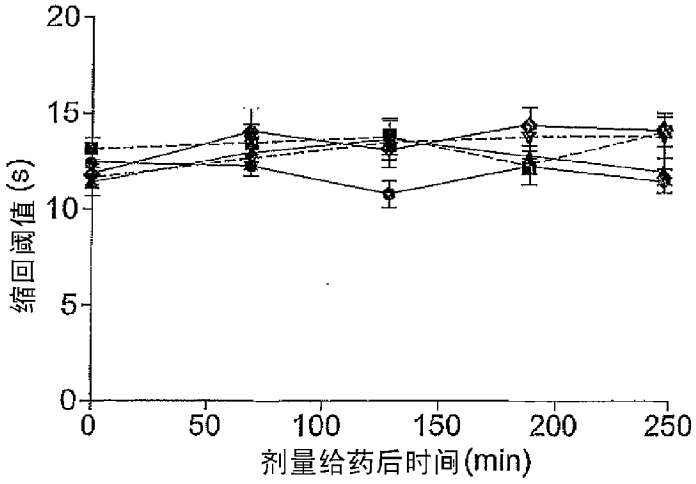
** P < 0.01 ，当与载体组数据相比时（ANOVA 和 Dunnett’s 检验）。

图 22

a) 左爪



a) 右爪



+ P < 0.05, ++ P < 0.01, 当与剂量给药前数据相比时（成对 2 - 尾部 Student's t- 检验）。

图 23