



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 217 437** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) МПК⁷ **C 07 K 5/10, A 61 K 38/07, A 61 P 25/04**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

(21), (22) Заявка: 2000119773/04, 22.12.1998
(24) Дата начала действия патента: 22.12.1998
(30) Приоритет: 23.12.1997 US 08/997,208
(43) Дата публикации заявки: 10.08.2002
(46) Дата публикации: 27.11.2003
(56) Ссылки: RU 2067000 C1, 27.09.1996. WO 96/40206 A1, 19.12.1996. US 5367053 A, 22.11.1994. GB 2013689 A, 15.08.1979.
(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу: 24.07.2000
(86) Заявка РСТ: US 98/27282 (22.12.1998)
(87) Публикация РСТ: WO 99/32510 (01.07.1999)
(98) Адрес для переписки: 129010, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр.3, ООО "Юридическая фирма Городисский и Партнеры", пат.пов. Н.Г.Лебедевой

(72) Изобретатель: ЖЮНЬЕН Жан Луи (FR), РИВЬЕР Пьер Ж. М. (US), ШТЕЙНГАРТ Клаудио Д. (US), ДИАС Хавьер Суэйрас (US), ТРОЙНАР Ежи А. (US), ВАНДЕРА Тодд В. (US)
(73) Патентообладатель: ФЕРРИНГ Б.В. (NL)
(74) Патентный поверенный: Лебедева Наталья Георгиевна

(54) **ПЕПТИДЫ-АГОНИСТЫ К-ОПИОИДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ**

(57)
Изобретение относится к синтетическому амиду опиоидного пептида или его фармацевтически приемлемой соли, обладающим аффинностью в отношении к-опиоидного рецептора, которая по меньшей мере в 1000 раз превышает его же аффинность в отношении μ-опиоидного рецептора, и который проявляет длительное действие при введении in vivo, причем этот пептид имеет следующую формулу:

$\text{H-Xaa}_1\text{-Xaa}_2\text{-Xaa}_3\text{-Xaa}_4\text{-Q}$,
где Xaa₁ представлен (A)D-Phe, (C_αMe)D-Phe, D-Tyr, D-Tic или D-Ala (циклопентил или тиенил), причем A - H, NO₂, F, Cl или CH₃; Xaa₂ - (A')D-Phe, D-1NaI, D-2NaI, D-Tyr или D-Trp, где A' - A или 3,4Cl₂; Xaa₃ - D-Nle, (B)D-Leu, D-Hle,

D-Met, D-Val, D-Phe или D-Ala (циклопентил), причем B - H или C_αMe; Xaa₄ представляет собой D-Arg, D-Har, D-nArg, D-Lys, D-Ily, D-Arg (Et₂), D-Har(Et₂), D-Amf, D-Gmf, D-Dbu, D-Orn или D-Ior; а Q - NR₁R₂, морфолинил, тиоморфолинил, (C)пиперидинил, пиперазинил, 4-одно- или 4,4-двузамещенный пиперазинил или ε-лизил, где R₁ является низшим алкилом, замещенным низшим алкилом, бензилом, замещенным бензилом, аминокциклогексиллом, 2-тиазолиллом, 2-пиколиллом, 3-пиколиллом, 4-пиколиллом, ω-(ациламино)-полиметиленовой или 4-полиоксиэтиленовой группой, а R₂ является H или низшим алкилом; C - H, 4-гидрокси или 4-оксо. Технический результат - повышение аффинности в отношении к-опиоидных рецепторов, длительное обезболивающее действие in vivo. 3 с. и 20 з.п. ф-лы, 9 табл.



RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 217 437** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) Int. Cl.⁷ **C 07 K 5/10, A 61 K 38/07, A 61 P 25/04**

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 2000119773/04, 22.12.1998
(24) Effective date for property rights: 22.12.1998
(30) Priority: 23.12.1997 US 08/997,208
(43) Application published: 10.08.2002
(46) Date of publication: 27.11.2003
(85) Commencement of national phase: 24.07.2000
(86) PCT application:
US 98/27282 (22.12.1998)
(87) PCT publication:
WO 99/32510 (01.07.1999)
(98) Mail address:
129010, Moskva, ul. B. Spasskaja, 25, str.3,
OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij i
Partnery", pat.pov. N.G.Lebedevoj

(72) Inventor: ZhJuN'EN Zhan Lui (FR),
RIV'ER P'er Zh. M. (US), ShTEJNGART Klaudio
D. (US), DIAS Khav'er Suehjas (US), TROJNAR
Ezhi A. (US), VANDERA Todd V. (US)
(73) Proprietor:
FERRING B.V. (NL)
(74) Representative:
Lebedeva Natal'ja Georgievna

(54) **PEPTIDE-AGONISTS OF κ - OPIOID RECEPTORS**

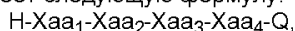
(57) Abstract:

FIELD: organic chemistry, peptides, medicine, pharmacy. SUBSTANCE: invention relates to synthetic amide of opioid peptide or its pharmaceutically acceptable salt eliciting affinity with respect to κ -opioid receptor that at least by 1 000 times exceeds its affinity with respect to μ -opioid receptor and elicits permanent effect in administration in vivo. This peptide has the following formula: H-Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Xaa₄-Q wherein Xaa₁ represents (A)D-Phe, (C α Me)D-Phe, D-Tyr, D-Tic or D-Ala (cyclopentyl or thienyl) being A represents H, NO₂, F, Cl or CH₃; Xaa₂ represents (A')D-Phe, D-1Nal, D-2Nal, D-Tyr or T-Trp wherein A' represents A or 3,4-Cl₂; Xaa₃ represents D-Nle, (B)D-Leu, D-Hle, D-Met, D-Val, D-Phe or D-Ala (cyclopentyl)

being B represents H or C α Me; Xaa₄ represents D-Arg, D-Har, D- nArg, D-Lys, D-Arg-(Et₂), D-Har-(Et₂), D-Amf, D-Gmf, D-Dbu, D-Om or D-Ior and Q represents NR₁R₂, morpholinyl, thiomorpholinyl, (C)piperidinyl, piperazinyl, 4-mono- or 4,4-disubstituted piperazinyl or ϵ - lysyl wherein R₁ is lower alkyl, substituted lower alkyl, benzyl, substituted benzyl, aminocyclohexyl, 2-thiazolyl, 2-picolyl, 3-picolyl, 4-picolyl, ω -(acylamino)-polymethylene or 4-polyoxyethylene group; R₂ is hydrogen atom or lower alkyl; C is hydrogen atom, 4-hydroxy- or 4-oxo-group. Proposed peptides enhance affinity with respect to κ - opioid receptors and permanent analgetic activity in vivo. EFFECT: valuable medicinal properties of peptides. 23 cl, 9 tbl, 9 ex

Формула изобретения:

1. Синтетический амид опиоидного пептида или его фармацевтически приемлемая соль, обладающие аффинностью в отношении κ -опиоидного рецептора, которая по меньшей мере в 1000 раз превышает его же аффинность в отношении μ -опиоидного рецептора, и который проявляет долговременное действие при введении in vivo, причем этот пептид имеет следующую формулу:



где Xaa₁ представлен (A')D-Phe, (C α Me)D-Phe, D-Tyr, D-Tic или D-Ala (циклопентил или тиенил), причем A - H, NO₂, F, Cl или CH₃;

Xaa₂ представляет собой (A')D-Phe, D-1Nal, D-2Nal, D-Tyr или D-Trp, где A' - A или 3,4Cl₂;

Xaa₃ представляет собой D-Nle, (B)D-Leu, D-Hle, D-Met, D-Val, D-Phe или D-Ala (циклопентил), причем B - H или C α Me;

Xaa₄ представляет собой D-Arg, D-Har, D-nArg, D-Lys, D-Ily, D-Arg (Et₂), D-Har(Et₂), D-Amf, D-Gmf, D-Dbu, D-Orn или D-Ior;

Q - NR₁R₂, морфолинил, тиоморфолинил, (C)пиперидинил, пиперазинил, 4-одно- или 4,4-двузамещенный пиперазинил или ϵ -лизил, где R₁ является низшим алкилом, замещенным низшим алкилом, бензилом, замещенным бензилом, аминокислотным, 2-тиазолилом, 2-пиколилом, 3-пиколилом, 4-пиколилом, ω -(ациламино)-полиметиленовой или 4-полиоксиэтиленовой группой, а R₂ является H или низшим алкилом; C - H, 4-гидрокси или 4-оксо.

2. Синтетический пептид по п.1, причем Xaa₂ представляет собой D-Phe, Xaa₃ - D-Leu или D-Nle, а Xaa₄ - D-Arg или D-Orn.

3. Синтетический пептид по п.1 или 2, причем Q является NHR₁, а R₁ является этилом, пропилом, бутилом, циклопропилом или циклобутилом.

4. Синтетический пептид по п.1 или 2, причем Q является морфолинилом или тиоморфолинилом.

5. Синтетический пептид по п.1 или 2, причем Q представляет собой NHR₁, где R₁ - 4-пиколил.

6. Синтетический пептид по п.1 или 2, причем Q представляет собой N(Et)₂, NH(Aeb), Prz или Pcr.

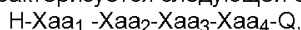
7. Синтетический пептид по п.1 или 2, причем Q представляет собой NHR₁, где R₁ - Aao, Aoo, Hoh, Ghx или Gao.

8. Синтетический пептид по любому из пп.1-7, причем Xaa₁ - D-Phe, D-Ala(2-тиенил) или D-4Fpa.

9. Синтетический пептид по п.1, причем Xaa₄ - D-Gmf.

10. Синтетический пептид по п.1, причем Xaa₂ - D-4Cpa или D-3,4Cpa.

11. Синтетический пептид по п.1, характеризующийся значением WT-ED₅₀ приблизительно 0,5 мг/кг или меньше, причем данный пептид характеризуется следующей формулой:



где Xaa₁ представляет собой D-Phe

(незамещенный или замещенный C α Me, 2F, 4F или 4Cl) или D-Ala (циклопентил или тиенил);

Xaa₂ - (A')D-Phe, D-1Nal, D-2Nal или D-Trp, где A' - H, 4F, 4Cl, 4NO₂ или 3,4Cl₂;

Xaa₃ - D-Nle, D-Leu, D-CML, D-Met или D-Asp;

Xaa₄ - D-Arg, D-Arg(Et₂), D-Lys, D-Ily, D-Har, D-Har(Et₂), D-nArg, D-Orn, D-Ior, D-Dbu, D-Amf и D-Gmf;

Q - NR₁R₂, Mor, Tmo, Pip, 4-HyP, Oxp или Prz, где R₁ представляет собой Me, Et, Pr, Bu, hEt, Cyp, Bzl или 4-пиколил, а R₂ - H или Et.

12. Синтетический пептид по п.11, причем Xaa₂ - D-Phe, D-4Cpa или D-3,4Cpa; Xaa₃ - D-Leu или D-Nle; Xaa₄ - D-Arg, D-Orn или D-Gmf.

13. Синтетический пептид по п.11 или 12, причем Q представляет собой NHR₁, где R₁ является Et, hEt, Pr или 4-пиколилом.

14. Синтетический пептид по п.11 или 12, причем Q - N(Et₂) или NH(Aeb).

15. Синтетический пептид по п.11 или 12, причем Q - морфолинил или тиоморфолинил.

16. Синтетический пептид по п.11 или 12, причем Q - NHR₁, где R₁ является этилом или 4-пиколилом.

17. Синтетический пептид по п.11 или 12, причем Q - Prz, Pcr или NH(Hoh).

18. Синтетический пептид по любому из пп.11-17, причем Xaa₁ - D-Phe или D-Ala(2-тиенил) или D-Fpa.

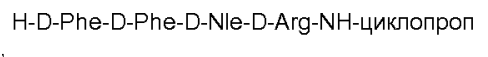
19. Синтетический пептид по п.1, характеризующийся одной из следующих формул:



л,



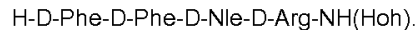
,



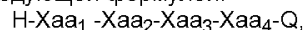
ил,



и

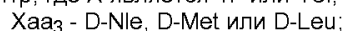


20. Синтетический пептид по п.1, характеризующийся значением ED₅₀ приблизительно 0,5 мг/кг или меньше, причем данный пептид характеризуется следующей формулой:



где Xaa₁ - D-Phe, D-4Fpa, D-2Fpa, D-Asp или D-Ala(2Thi);

Xaa₂ - (A)D-Phe, D-1Nal, D-2Nal или D-Trp, где A является 4F или 4Cl;



Xaa₄ - D-Arg, D-Har, D-nArg, D-Lys, D-On или D-Gmf;

Q - NHR₁, Mor, Tmo, Pip или Prz, причем R₁ представляет собой Et, Pr или 4

Pic.

21. Синтетический пептид по п.1, характеризующийся значением ED_{50} приблизительно 0,5 мг/кг или меньше, причем данный пептид характеризуется следующей формулой:

$H\text{-Xaa}_1\text{-Xaa}_2\text{-Xaa}_3\text{-Xaa}_4\text{-Q}$,

где Xaa_1 представляет собой D-Phe, D-4Fpa, D-2Fpa или D-Ala(2Thi);

Xaa_2 - (A)D-Phe, D-INal, D-2Nal или D-Trp, где A - 3,4Cl₂ или 4Cl;

Xaa_3 - D-Nle или D-Leu;

Xaa_4 - D-Arg, D-Orn или D-Gmf;

Q -NHR₁, Mor, Tmo, Pcp, Ppz или N(Et)₂,

причем R₁ - Et, Pr, Cyp, 4Pic, Aeb или Hoh.

22. Фармацевтическая композиция, обладающая агонистической активностью в отношении κ-опиоидных рецепторов, которая содержит обезболивающее количество синтетического пептида, охарактеризованного в любом из пп.1-21, и фармацевтически приемлемый жидкий или твердый носитель.

23. Способ лечения висцеральных болей, ревматоидного артрита, симптомов после операций на брюшной полости или острых или хронических болей, отличающийся тем, что указанный способ предусматривает введение обезболивающего количества фармацевтической композиции, охарактеризованной в п.22.

RU 2 2 1 7 4 3 7 C 2

RU 2 2 1 7 4 3 7 C 2

Настоящее изобретение в целом касается синтетических опиоидных пептидов, в частности, опиоидных пептидов, которые являются чрезвычайно селективными агонистами к-опиоидных рецепторов, а более конкретно касается тех агонистов, которые (а) не попадают в головной мозг и (б) проявляют долговременную обезболивающую активность *in vivo*.

Предпосылки для изобретения

к-Опиоидные рецепторы (KOR) присутствуют в головном мозге, спинном мозге и в центральных и периферических нервных окончаниях и телах нейронов первичных сенсорных афферентных путей (соматических и висцеральных), равно как и на иммуннокомпетентных клетках. Молекулы, которые активируют рецепторы KOR, обычно обозначают как к-агонисты.

Активация KOR, которые локализованы в головном мозге, как было показано, обуславливает обезболивающий эффект. Этот факт стал основой попытки разработать проникающие в головной мозг к-агонисты небелковой природы, предназначенные для применения в качестве оригинальных анальгетиков, которые бы были свободны от неблагоприятных побочных действий (запор, подавление дыхания, зависимость и пристрастие) аналогов морфина, которые активны в отношении μ -опиоидных рецепторов (MOR). Обезболивающая активность, равно как отсутствие побочных эф-

фектов « μ -опиоидного типа» для этого класса соединений была продемонстрирована и у животных, и у человека. Однако разработка системных κ -агонистов была приостановлена из-за того, что была установлена параллельная индукция специфических побочных эффектов, таких как диурез, седативный эффект и дисфория, которые обуславливаются κ -рецепторами, локализованными в головном мозге.

Помимо супраспинальных KOR, рецепторы этого типа, локализованные либо в периферических отделах, либо в спинном мозге, также могут обуславливать обезболивание. Однако ни периферические, ни спинномозговые KOR не ассоциированы с какими-либо побочными эффектами активности системных κ -агонистов. Следовательно, как только станет возможным создать агонисты κ -опиоидных рецепторов, которые бы не попадали в головной мозг (вследствие либо периферического, либо спинномозгового введения), так станет возможным и получение безопасных и оригинальных обезболивающих средств (анальгетиков).

κ -Агонисты обуславливают периферическое обезболивание в моделях тонкокишечной, равно как и связанной с толстым кишечником гипералгезии, обуславливаемой средним по интенсивности локальным воспалением; а также синдром раздражения кишечника (IBS), для которого характерны усиленные болевые ощущения в области внутренних органов из-за висцеральной гиперчувствительности, связанной, как считается, с локальными воспалительными процессами, является мишенью для перифериче-

ского к-агониста. Помимо пищеварительного тракта, и другие внутренние органы, характеризующиеся патологическим состоянием, которое связано с участием активации и (или) сенсibilизации (т.е. локального воспаления) первичных сенсорных афферентных путей, предположительно могут являться мишенями для таких агонистов к-опиоидных рецепторов. к-Агонисты также блокируют нейrogenное воспаление в соматических тканях за счет подавления выхода из первичных сенсорных афферентных путей вещества-Р, а также известно, что они действуют на иммунную систему и обладают первичной ингибиторной активностью в отношении иммунокомпетентных клеток.

Пептиды, которые не проникают в головной мозг, которые проявляют высокий уровень аффинности в отношении KOR по сравнению с рецепторами MOR, которые характеризуются высоким потенциалом и эффективностью и которые проявляют долговременную активность *in vivo*, являются особенно необходимыми пептидами. В патенте США № 5610271 представляются тетрапептиды, включающие по четыре остатка D-аминокислот, которые связываются с рецепторами KOR, однако эти пептиды не проявляют все те желаемые свойства, которые были обозначены выше.

Сущность изобретения

Был установлен тип пептидов, которые проявляют высокий уровень селективности в отношении рецепторов KOR и долговременную активность *in vivo* и которые не характеризуются сколько-нибудь существенным проникновением в головной мозг. Эти пептиды включают последовательность из четырех остатков

D-аминокислот, у которых на C-конце находится одно- или двухзамещенный амид. Эти соединения характеризуются следующей общей формулой:

H-Хаа₁-Хаа₂-Хаа₃-Хаа₄-замещенный амид,

где Хаа₁ представлен (A)D-Phe, (C_αMe)D-Phe, D-Tyr, D-Tic или D-Ala (циклопентил или тиенил), при том, что A представлен H, NO₂, F, Cl или CH₃; Хаа₂ представлен (A')D-Phe, D-1Nal, D-2Nal, D-Tyr или D-Trp, где A' представлен A или 3,4Cl₂; Хаа₃ представлен D-Nle, (B)D-Leu, D-Hle, D-Met, D-Val, D-Phe или D-Ala (циклопентил), при том, что B представлен H или C_αMe; Хаа₄ представлен D-Arg, D-Har, D-nArg, D-Lys, D-Ily, D-Arg(Et₂), D-Har(Et₂), D-Amf, D-Gmf, D-Dbu, D-Orn или D-Ior. Предпочтительными амидами являются этиламид, морфолид, тиоморфолид, 4-пиколиламид, пиперазид, пропиламид, циклопропиламид, диэтиламид и замещенный бензиламид.

В одном конкретном аспекте настоящее изобретение представляет синтетический амид опиоидного пептида или его фармацевтически приемлемую соль, характеризующиеся таким уровнем аффинности в отношении κ-опиоидного рецептора, который по крайней мере в 1000 раз выше уровня его аффинности в отношении μ-опиоидного рецептора, и проявляющий долговременную активность при введении *in vivo*, при том, что такой пептид имеет общую формулу:

H-Хаа₁-Хаа₂-Хаа₃-Хаа₄-Q,

где Хаа₁ представлен (A)D-Phe, (C_αMe)D-Phe, D-Tyr, D-Tic или D-Ala (циклопентил или тиенил), при том, что A представ-

лен Н, NO₂, F, Cl или CH₃; Xaa₂ представлен (A')D-Phe, D-1Nal, D-2Nal, D-Tyr или D-Trp, где A' представлен А или 3,4Cl₂; Xaa₃ представлен D-Nle, (B)D-Leu, D-Hle, D-Met, D-Val, D-Phe или D-Ala (циклопентил), при том, что В представлен Н или C_αMe; Xaa₄ представлен D-Arg, D-Har, D-nArg, D-Lys, D-Ily, D-Arg (Et₂), D-Har (Et₂), D-Amf, D-Gmf, D-Dbu, D-Orn или D-Ior; а Q представлен NR₁R₂, морфолинилом, тиоморфолинилом, (C)пиперидинилом, пиперазинилом, 4-одно- или 4,4-двухзамещенным пиперазинилом или ε-лизилом, где R₁ является низшим алкилом, замещенным низшим алкилом, бензилом, замещенным бензилом, аминоциклогексилом, 2-тиазолилом, 2-пиколилом, 3-пиколилом, 4-пиколилом, ω-(ациламино)-полиметиленовой или 4-полиоксиэтиленовой группой, а R₂ является Н или низшим алкилом; С является Н, 4-гидроксилом или 4-оксогруппой.

В другом своем аспекте настоящее изобретение включает использование данных соединений для лечения пациентов, страдающих от висцеральных болей и подобного, нарушений мочеиспускания и подобного, или от IBD, или от аутоиммунных заболеваний, равно как и для аналогичного лечения не являющихся человеком млекопитающих.

Краткое описание предпочтительных вариантов

Номенклатура, применяемая в описании пептидов, соответствует монографии Schroder & Lubke, 1965, "The Peptides", Acad. Press, при том, что, в соответствии со стандартным представлением, N-концевая часть располагается слева, а C-

концевая часть - справа. В тех случаях, когда аминокислотный остаток имеет изомерные формы, то при отсутствии какого-либо специального пояснения в данном тексте имеется в виду L-изомер данной аминокислоты.

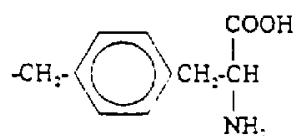
Как отмечалось выше, настоящее изобретение представляет пептиды, которые характеризуются селективностью в отношении рецепторов KOR и при этом не только проявляют высокий уровень аффинности в отношении KOR, но и характеризуются существенной длительностью своей активности *in vivo*. Эти селективные к-опиоидные пептиды характеризуются по крайней мере в 1000 раз большей аффинностью по связыванию на рецепторах KOR в сравнении со связыванием на рецепторах MOR, при том, что значительная часть таких соединений имеет в 10000 раз более высокий уровень аффинности, а некоторые из этих соединений проявляют уровень аффинности, больший в 20000 раз и выше. Однако, для многих определений важным является то, что наряду с таким высоким уровнем селективности, к-агонисты будут проявлять как отсутствие существенного проникновения в головной мозг, так и продолжительную обезболивающую активность *in vivo*. Следовательно, в дополнение к обозначенной выше селективности, предпочтительные соединения не проявляют существенного проникновения в головной мозг, но сохраняют существенную активность на протяжении по крайней мере одного часа при том, что более предпочтительные соединения остаются в существенной степени активными на протяжении по крайней мере 2 часов, а наиболее предпочтительные соединения проявляют

такую существенную активность в течение трех часов и дольше.

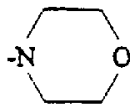
На протяжении всего настоящего описания используются расшифрованные ниже аббревиатуры. D-Nle обозначает D-норлейцин, а D-Hle представляет D-гомoleyцин. D-Nar представляет D-гомоаргинин, а D-nArg представляет D-нораргинин, углеродная цепь которого короче на 1 атом по сравнению с D-Arg. D-Nal обозначает D-изомер аланина, который замещен нафтилом по β -атому углерода. Предпочтительно используется аминокислота D-2Nal, в которой присоединение нафталина происходит по 2-му положению кольцевой структуры; однако также может быть использована и аминокислота D-1Nal. D-Cpa и D-Fpa используются для представления, соответственно, хлор-D-Phe и фтор-D-Phe, при том, что предпочтительными являются аминокислоты D-4Cpa, D-2Fpa, D-3Fpa и D-4Fpa. D-Npa обозначает нит-ро-D-Phe, а D-Mpa используется для представления метил-D-Phe. D-3,4Cpa обозначает 3,4-дихлор-O-Phe. D-Acp представляет D-Ala(циклопентил). D-Orn представляет D-орнитин, а D-Dbu представляет α,γ -диаминобутировую кислоту. CML представляет C^α -метиллейцин, а CMP представляет C_α -MePhe. D-4Amf обозначает D-4(NH₂CH₂)Phe, а D-Gmf обозначает D-Amf(амидино) - т.е. D-Phe, в котором имеется замещение по 4-му положению на CH₂NHC(NH)NH₂. D-Tic обозначает D-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-3-карбоновую кислоту. В аббревиатуре Ala(Thi) Thi обозначает тиенильную группу, которая предпочтительно присоединена по 2-му положению к аланину, хотя эквивалентным вариантом является и 3-тиенильное производное.

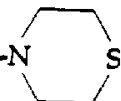
Ily и Ior обозначают, соответственно, изопропиллизин и изопропилорнитин, у которых аминогруппа боковой цепи алкилирована изопропилом.

Понятие «низший алкил» обозначает C₁-C₆-алкилы, включая при этом циклоалкилы, предпочтительными из которых являются C₁-C₄-циклоалкилы, включая циклопропил и циклобутил. Аббревиатуры Me, Et, Pr, Ipr, Bu, Pn и Bzl используются для представления, соответственно, метила, этила, пропила, изопропила, бутила, пентила и бензила. Cyp обозначает циклопропил, а Cyb - циклобутил. Хотя предпочтительно связь имеется с одним концом алкильной цепочки, она может иметься и по любому ее участку, например, в виде 3-пентила, который также может быть определен как этилпропил. Ahx обозначает 6-аминогексил, т.е. (CH₂)₆-NH₂. 4Asx используется для представления 4-аминоциклогексила, а hEt обозначает гидроксиэтил, т.е. -CH₂CH₂OH. Замещенные бензилы включают 4Nbz и 4Abz, которые, соответственно, представляют 4-нитробензил и 4-аминобензил, в то время как Aeb используется для обозначения 4-(2-амино-2-карбоксиэтил)бензила, т.е.

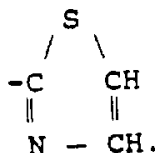


Под 2-, 3- и 4-пиколилом (2Pic, 3Pic и 4Pic) понимаются метилпиридиновые группы, которые присоединены через метиленовую группу по 2-му, 3-му или 4-му положению. Mor обозначает морфолинил, т.е.



а Tmo обозначает тиоморфолинил, .

Pip обозначает пиперидинил (пиперидил), а 4-Нур и ОхР обозначают, соответственно, 4-гидроксипиперидин-1-ил и 4-оксопиперидин-1-ил. Prz обозначает пиперазинил. Еср представляет 4-этилкарбамоилпиперазин-1-ил; Рср представляет 4-фенилкарбамоилпиперазин-1-ил. Также могут быть использованы соединения четвертичного аммония, такие как 4,4-диметилпиперазин-1-ил (Dmp) или другие низшие алкильные дизаместители. 2Tzl обозначает 2-тиазолил, т.е.



Ely обозначает ε-лизил, в котором аминогруппа боковой цепи L-лизина соединена с С-концом амидной связью.

Как отмечалось выше, R_1 может являться ω (ациламино) полиметиленовой группой или полиоксиэтиленовой группой, такой как Aao, Aoo, Hoh, Ghx или Gao. Aao представляет 8-(ацетиламино)-3,6-диоксоокт-1-ил, т.е. $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-NH-Ac}$. Aoo представляет 8-амино-3,6-диоксоокт-1-ил, т.е. $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-NH}_2$. Hoh представляет 6-(L-

гидрооротиламино)-гекс-1-ил, т.е. $(\text{CH}_2)_6\text{-NH-(L-гидрооротил)}$, где L-гидрооротовая кислота - это $\text{C}_4\text{N}_2\text{H}_5(\text{O})_2\text{-COOH}$. Ghx представляет 6-(D-глюкониламино)-гексил, т.е. $(\text{CH}_2)_6\text{-NH-CO-(CHOH)}_4\text{-CH}_2\text{OH}$. Gao обозначает 6-(D-глюкониламино)-3,6-диоксоокт-1-ил, т.е. $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-NH-CO-(CHOH)}_4\text{-CH}_2\text{OH}$.

D-Phe или замещенный D-Phe предпочтительны по 1-му положению (пептида). Фенильное кольцо может быть замещено по 2-му, 3-му и (или) 4-му положениям, а обычно предпочтительными являются замещения хлором или фтором по 2-му или 4-му положениям. Также может быть метилирован атом C α . Также могут быть использованы другие эквивалентные остатки, которые напоминают D-Phe: они включают D-Ala(тиенил), D-Ala(циклопентил), D-Tyr и D-Tic. Также предпочтительными являются D-Phe или замещенные D-Phe по 2-му положению пептида, при том, что такие заместители предпочтительно включают заместитель по атому C4 фенильного кольца или по 3-му и 4-му положениям. С другой стороны, может быть использован замещенный нафтилом D-аланин, например, D-Trp и D-Tyr. В 3-м положении пептида предпочтительно нахождение такого остатка, как D-Nle, D-Leu, D-CML, D-Hle, D-Met или D-Val; однако также могут быть использованы D-Ala(циклопентил) или D-Phe. В 4-м положении пептида в принципе предпочтительными являются D-Arg (который может быть замещен диэтилом) и D-Orn (который может быть алкилирован по своей δ -аминогруппе или замещен изопропилом); однако могут быть использованы D-nArg и другие эквивалентные остатки, такие как D-Lys (который может быть

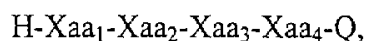
также алкилирован по своей ϵ -аминогруппе) и D-Nar (который может быть замещен диэтилом). Более того, также могут быть использованы остатки D-Gmf, D-Dbu, D-4Amf и D-His.

Хотя можно было ожидать существенной продолжительности биологического действия в ответ на применение последовательности, состоящей из четырех D-аминокислот, было удивительно обнаружить, что продолжительность действия в целом оказалась довольно кратковременной при наличии незамещенного амида, в то время как долговременное действие выявлялось только в вариантах внесения замещенного амида по С-концу пептида. Одиночные заместители могут иметь форму метила, этила, пропила, циклопропила и пиколила, равно как и других эквивалентных составляющих, таких как гидроксипропил, тиазолил, аминокислоты, бензил и замещенный бензил. В целом, для формирования однозамещенных амидов предпочтительными являются заместители в виде низших алкилов или пиколила. Альтернативой однозамещенного амида являются диалкильные заместители, например, диэтиламиногруппа; однако, предпочтительным является занятие такого двухзамещенного С-конца морфолинилом, тиоморфолинилом или пиперидинилом, при том, что последний из перечисленных является незамещенным или замещенным 4-гидроксипропилом или 4-оксогруппой. Также могут быть использованы пиперазинил или 4-одно- или 4,4-двухзамещенный пиперазинил, например, ϵ -лизил.

Установлено, что процесс связывания в целом характерен для аминокислотной последовательности тетрапептида, а пред-

почтительно пептиды, селективные по отношению к к-опиоидным рецепторам, проявляют такой уровень аффинности по связыванию с к-рецептором, который характеризуется величиной K_1 , равной примерно 2 нМ или меньше. Долговременность действия, которая, как считается, обеспечивается структурой амида, присоединенного с С-конца, может быть эффективно протестирована в тесте на обезболивание, описанном здесь далее, а наиболее предпочтительные пептиды проявляют существенную биологическую активность в течение двух-трех часов и не оказывают сколько-нибудь существенного влияния на головной мозг.

Пептиды предпочтительного подтипа данного типа опиоидных пептидов, описанных выше, характеризуются общей формулой:



где Xaa_1 представлен D-Phe (незамещенным или замещенным C_αMe , 2F, 4F или 4Cl) или D-Ala (циклопентил или тиенил); Xaa_2 представлен (A')D-Phe, D-lNal, D-2Nal или D-Trp, где A' представлен H, 4F, 4Cl, 4NO₂ или 3,4Cl₂; Xaa_3 представлен D-Nle, D-Leu, D-CML, D-Met или D-Asp; Xaa_4 представлен D-Arg, D-Arg(Et₂), D-Lys, D-Ily, D-Har, D-Har(Et₂), D-nArg, D-Orn, D-Ior, D-Dbu, D-Amf или D-Gmf; а Q представлен NR₁R₂, Mor, Tmo, Pip, 4-Hyp, Oxp или Prp, где R₁ представлен Me, Et, Pr, Bu, hEt, Cyp, Bzl или 4-пиколилом, а R₂ представлен H или Et.

Дополнительный предпочтительный подтип к-опиоидных пептидов характеризуется формулой:

$\text{H-Xaa}_1\text{-Xaa}_2\text{-Xaa}_3\text{-Xaa}_4\text{-Q,}$

где Xaa_1 представлен D-Phe, D-4Fpa, D-2Fpa, D-4Cpa, D-Asp или D-Ala(Thi); Xaa_2 представлен D-Phe, D-4Fpa, D-4Cpa, D-3,4Cpa, D-1Nal, D-2Nal или D-Trp; Xaa_3 представлен D-Nle, D-Met, D-CML или D-Leu; Xaa_4 представлен D-Arg, D-Lys, D-Har, D-nArg или D-Orn; Q представлен NR_1R_2 , Mor, Tmo, Pip, 4-HyP, или Prz, где R_1 представлен Et, Pr, Bu, hEt, Cyp, Bzl или 4-Pic, а R_2 представлен H или Et.

Другой предпочтительный подтип к-опиоидных пептидов характеризуется формулой:

$\text{H-Xaa}_1\text{-Xaa}_2\text{-Xaa}_3\text{-Xaa}_4\text{-Q,}$

где Xaa_1 представлен D-Phe, D-4Fpa, D-2Fpa, D-Asp или D-Ala(2Thi); Xaa_2 представлен (A)D-Phe, D-1Nal, D-2Nal или D-Trp, где A является 4F или 4Cl; Xaa_3 представлен D-Nle, D-Met или D-Leu; Xaa_4 представлен D-Arg, D-Har, D-nArg, D-Lys, D-Orn или D-Gmf; Q представлен NHR_1 , Mor, Tmo, Pip или Prz, при том, что R_1 представлен Et, Pr или 4-Pic.

Еще один предпочтительный подтип к-опиоидных пептидов характеризуется формулой:

$\text{H-Xaa}_1\text{-Xaa}_2\text{-Xaa}_3\text{-Xaa}_4\text{-Q,}$

где Xaa_1 представлен D-Phe, D-4Fpa, D-2Fpa или D-Ala(2Thi); Xaa_2 представлен (A)D-Phe, D-1Nal, D-2Nal или D-Trp, где A представлен 3,4Cl₂ или 4Cl; Xaa_3 представлен D-Nle или D-Leu; Xaa_4 представлен D-Arg, D-Orn или D-Gmf; Q представлен NHR_1 , Mor, Tmo, Pcp, Prz или N(Et)_2 , при том, что R_1 представлен Et, Pr, Cyp, 4Pic, Aeb или Hoh.

Для перечисленных выше типов и подтипов опиоидных пептидов была установлена увеличенная продолжительность обезболивающей активности *in vivo*, что является результатом внесения замещенного амида по С-концу, т.е. аминокислоте по 4-му положению пептида. Это конкретное неожиданное свойство делает данные пептиды особенно ценными, потому что некоторые из них сохраняют активность *in vivo* на протяжении трех часов и больше. Некоторые тетрапептиды, характеризующиеся вышеприведенными последовательностями, но имеющие «простой» С-концевой амид, также проявляют высокий уровень селективности в отношении рецепторов по сравнению с рецепторами MOR: однако, они в целом проявляют лишь кратковременную активность. Есть полные основания ожидать, что такие пептиды проявят увеличенную продолжительность действия тогда, когда они будут синтезированы так, чтобы включать по своему С-концу замещенный амид, такой как морфолид. По сути было установлено, что, когда тетрапептид с первичным амином проявляет высокий уровень и селективность связывания с KOR, тогда соответствующие замещенные амиды, такие как, например, этиламид и морфолид, будут, будучи синтезированными в такой форме, проявлять обезболивающие свойства в течение увеличенного периода времени, измеряемого часами, например, по крайней мере 1 час, причем без сколько-нибудь существенного проникновения в головной мозг.

Хотя предпочтительные аминокислотные последовательности были определены вышеприведенными формулами, тем не менее специалистам в области химии белков должно быть понятно, что

один или несколько обозначенных аминокислотных остатков могут быть заменены с учетом принципа консервативной аминокислотной замены, например, замены одной основной аминокислоты на другую основную или одной гидрофобной аминокислоты на другую гидрофобную, например, D-Ile вместо D-Leu. Таким же образом различные аминокислотные остатки могут быть также модифицированы в соответствии с известным в данной области техники: например, D-Phe (в соответствии с определенным выше) может быть модифицирован путем внесения галогена или нитрогруппы, обычно по 3-му или 4-му положению или по обоим этим положениям, или же может быть метилирован атом углерода C α . Такие модификации, как считается, позволяют получить эквивалентные пептиды-агонисты к-опиоидных рецепторов.

Пептиды могут быть синтезированы с применением любого подходящего метода, такого как методы твердофазного синтеза или классического синтеза в растворе, или, в свою очередь, с помощью синтеза в частичной твердой фазе, или с использованием метода последовательного соединения фрагментов. Например, методы твердофазного пептидного синтеза описаны в руководстве Stewart & Young, 1984, "Solid-Phase Peptide Synthesis", 2d ed., Pierce Chem. Co., Rockford, IL, а их примеры представлены в патенте США № 4105603. Метод соединения фрагментов подробно описан в патенте США № 3972859, а другие доступные методы синтеза - в патентах США №№ 3842067 и 3862925. Метод классического синтеза в растворе подробно описан в руководстве Bodanzsky et al., 1976, "Peptide Synthesis", 2d ed., J.Wiley & Sons, NY.

Обычным в методах химического синтеза пептидов путем реакций сочетания является использование защиты любой реакционноспособной боковой цепи аминокислоты, которая предназначена для сочетания, а также обычно защите подлежит α -аминогруппа, потому что присоединение имеет место по карбоксильной группе отдельной аминокислоты или дипептида или трипептида, к которому происходит присоединение. Такие защитные группы хорошо известны в данной области техники, а группы трет-бутилоксикарбонил (Boc), бензилоксикарбонил (Z) и 9-флуоренилметоксикарбонил (Fmoc) часто используются в качестве предпочтительных групп для защиты α -аминогрупп при проведении твердофазного синтеза или классического синтеза в растворе, хотя существует и большое количество других защитных групп для α -аминогрупп, которые, в свою очередь, могут быть использованы.

Когда применяется твердофазный синтез, С-конец аминокислотного остатка присоединяют к твердой полимерной подложке, такой как $O-CH_2$ -полистиреновая подложка, $O-CH_2$ -бензилполиамидная полимерная подложка, $-NH$ -бензгидриламиновая (БГА) полимерная подложка или $-NH$ -пара-метилбензгидриламиновая (МБГА) полимерная подложка. Применение полимеров БГА и МБГА обычно является предпочтительным тогда, когда желательным является использование незамещенного амида, поскольку при расщеплении напрямую получается С-концевой амид. Когда желательным является получение N-метиламида, этого можно достичь путем использования полимера

N-метил-БГА. Другие однозамещенные амиды могут быть синтезированы с помощью процедур, описанных у W.Komreich et al., 1985, Int. J. Peptide Protein Res., 25, 414-420, а также в патенте США № 4701499. Пептиды, на С-конце которых находится двухзамещенный амид, такой как N-морфолинил или N-пиперидинил, предпочтительно получают с помощью классического синтеза в растворе или путем соединения фрагментов в растворе.

Будучи синтезированы, эти тетрапептиды очищают с применением хорошо известных в современной науке методов, предназначенных для очистки коротких пептидов, например, метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с обращенной фазой или других подходящих методов. Такая очистка подробно описана у J.Rivier et al., 1984, J. Chromatography, 288, 303-328 и у C.Miller & J.Rivier, 1996, Peptide Sci. Biopolymers, 40, 265-317, а конкретные примеры такой очистки после проведения твердофазного синтеза или подобного показаны в патенте США № 5098995.

Различный круг тестов может быть применен для оценки того, проявляют ли данные тетрапептиды высокий уровень селективности в отношении KOR, эффективную обезболивающую активность, долговременную биологическую активность *in vivo* и отсутствие проникновения в головной мозг. Рецепторные тесты хорошо известны в данной области техники, сами рецепторы KOR были недавно клонированы у мыши, крысы, морской свинки и человека. За исключением KOR морской свинки клонированные KOR характеризуются существенным сходством друг с другом - все

они состоят из 380 аминокислот. Аминокислотная последовательность KOR человека на 93,9% и 93,4% гомологична последовательностям полипептидов KOR крысы и мыши, соответственно. Напротив, KOR человека в существенной степени отличается от MOR человека и δ -опиоидного рецептора (DOR) человека, проявляя идентичность на уровне лишь 60,2% и 59,1%, соответственно. Рецепторы KOR, равно как и другие опиоидные рецепторы являются классическими рецепторами G-белков с 7 трансмембранными доменами (Gi). Указанные клонированные рецепторы легко могут быть использованы в качестве белков-мишеней для проведения скрининга: например, скрининг в отношении обоих типов рецепторов - KOR и MOR - может быть осуществлен с целью оценки уровня селективности. Рецепторы KOR, MOR и DOR человека стабильно экспрессируются линией мышечных опухолевых клеток, производных от нейробластомы гиппокампа (линия HN.9.10) и таким образом доступны для проведения скрининга *in vitro*. Существует также ряд хорошо отработанных тестов *in vitro*, которые уже стали стандартными при определении обезболивающей активности опиоидного соединения. Эти тесты в принципе связаны с использованием мышей и включают тесты на удар хвостом, тест на придавливание лапы, тест с нанесением уксусной кислоты, тест на шипок хвоста и тест на погружение хвоста. Ряд подобных тестов, предназначенных для анализа опиоидных соединений, описан у P.F.Vonvoigtlander et al., 1983, J. Pharm. Exper. Therapeutics, 224, 7-12.

Аффинность по связыванию определяет силу взаимодействия лиганда и соответствующего рецептора. Для оценки аффинности

связывания для опиоидных рецепторов пептиды по настоящему изобретению были подвергнуты оценке с использованием тестов на конкурентное связывание. Эти исследования проводят с использованием клонированных κ -(hKOR) и μ -(hMOR) опиоидных рецепторов, экспрессируемых стабильно трансфицированными клеточными линиями (линией HN.9.10, производной от мышинной нейробластомы гиппокампа). В этих исследованиях тестируемое соединение (непомеченный или «холодный» лиганд) используют в повышающейся концентрации с целью вытеснения специфического связывания радиоактивно помеченного («горячего») лиганда, характеризующегося известной высокой степенью аффинности и селективности в отношении анализируемого рецептора. В качестве лигандов рецепторов hKOR и hMOR, соответственно, в анализе использовали препараты ^3H -U-69593 и ^3H -DAMGO. Оба лиганда являются коммерчески доступными (NEN-Dupont). DAMGO - это аббревиатура олигопептида [D-Ala², MePhe⁴, Gly-ол⁵]-энкефалина. Аффинность этих радиоактивных лигандов определяется как концентрация радиоактивного лиганда, которая обуславливает половину от максимального специфического связывания (K_D) в насыщающем анализе. Величины K_D для ^3H -U-69593 в отношении hKOR и для ^3H -DAMGO в отношении hMOR составили примерно 0,3 нМ и 3,0 нМ, соответственно. Аффинность тестируемого соединения (непомеченного, или «холодного» лиганда) определяется в анализе на конкурентное связывание путем расчета константы ингибирования (K_i) в соответствии со следующей формулой:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + (F/K_D)},$$

где IC_{50} – концентрация «холодного» лиганда, которая обуславливает 50%-ное подавление связывания радиоактивно помеченного лиганда; F – концентрация свободного радиоактивного лиганда; K_D – аффинность радиоактивного лиганда, определенная в насыщающем анализе.

При проведении данных тестов при специфических условиях относительно низких концентраций рецептора расчетная величина K_i для тестируемого соединения является хорошим приближением к соответствующей константе диссоциации K_D , которая представляет ту концентрацию лиганда, которая необходима для занятия половины (50%) сайтов связывания. Низкое значение K_i , находящееся в наномолярном или субнаномолярном диапазоне, как считается, указывает на высокий уровень аффинности лиганда, относящегося к опиоидному семейству. Предпочтительные аналоги характеризуются величиной K_i в отношении рецепторов KOR на уровне примерно 2 нМ (наномоль) или меньше, в то время как наиболее предпочтительные аналоги характеризуются величиной K_i на уровне примерно 1 нМ или меньше. Поскольку рецепторы семейства KOR широко распределены по органам и тканям тела, то пептиды-лиганды к-опиоидных рецепторов будут обуславливать существенный эффект в модулировании многих периферических функций, а если они будут высокоселективными в отношении KOR, то они будут обладать минимальными побочными эффектами и станут физиологически эффективными лекарственными средствами.

Данные тесты на связывание, основывающиеся на использовании рецепторов KOR и MOR, применимы «напрямую» и могут

быть легко осуществлены в отношении исходно идентифицированных или синтезированных пептидов с целью определения того, селективны ли эти пептиды в отношении рецепторов KOR и обладают ли они высоким уровнем аффинности. Такие тесты на связывание могут быть осуществлены с помощью различных подходов, известных в данной области техники, а один из подробно описанных примеров такого теста, относящегося к такому базовому типу, можно найти у M.Perrin et al., 1986, Endocrinology, 118, 1171-1179.

Далее настоящее изобретение описывается в виде нижеследующих примеров. Эти примеры, однако, не сформированы таким образом, чтобы в чем-либо ограничить дух или масштаб настоящего изобретения, которое представлено в виде формулы изобретения в конце настоящего текста.

Пример 1

Пептид, характеризующийся формулой H-D-Phe-D-Phe-D-Nle-D-Arg-NHEt, был синтезирован в соответствии с хорошо известными приемами пептидного синтеза. Например, трипептид (защитная группа α -амин) -D-Phe-D-Phe-D-Nle-(защитная группа карбоксила) исходно синтезируют с применением классического синтеза в растворе. Например, данный трипептид может быть получен путем растворения H-D-Nle-OMe в DMF и добавления N-этилморфолина (NEM) или подобного для доведения величины pH. Этот раствор затем объединяют с раствором Вос-защищенного D-Phe-OH в DMF, содержащим NEM. К этой реакционной смеси добавляют активирующий или сочетающий агент, такой как гексафторфосфат бензотриазол-1-илоксо-трис-(диметиламино)-фосфония

(BOP) или смесь N,N'-диизопропилкарбодиимида (DIC) и N-гидроксibenзотриазола (HOBT). По завершении этой реакции ее упаривают досуха и затем полученный продукт подходящим образом очищают и перекристаллизируют. Затем защитную группу Boc удаляют путем обработки трифторуксусной кислотой (TFA) и полученный дипептид вновь растворяют в DMF. Добавляют раствор Boc-защищенного D-фенилаланина, растворенного в DMF, содержащем NEM. Реакцию повторяют с использованием BOP в соответствии с описанным выше с получением трипептида, который после упаривания раствора досуха очищают и перекристаллизируют. Полученный в результате продукт имеет формулу Boc-D-Phe-D-Phe-D-Nle-OCH₃. Затем метиловый эфир подходящим образом конвертируют в свободную кислоту, например, путем растворения в смеси диоксана или ДМСО и воды и добавления гидроксида натрия. По завершении этой реакции проводят разделение, очистку и перекристаллизацию с получением трипептида Boc-D-Phe-D-Phe-D-Nle-OH.

Этот трипептид растворяют в DMF, содержащем NEM, проводят реакцию с D-Arg(Tos)-NH₂Et, где снова в качестве агента реакции сочетания используют BOP. С другой стороны, метиловый эфир трипептида может быть конвертирован в азид, если это желательно, путем обработки 80%-ным раствором гидразингидрата с получением гидразида, который выделяют и затем обрабатывают нитритом натрия и минеральной кислотой в DMF. Полученный азид немедленно реагируют с D-Arg(Tos)-NH₂Et, растворенным в DMF, содержащем триэтиламин. По завершении данной реакции смесь упаривают досуха, а затем подходящим

образом очищают и перекристаллизируют. Затем снимают защиту с N-конца и боковой цепи D-Arg и вновь осуществляют очистку и перекристаллизацию, получая в результате желаемый этиламид тет/рапептида (пептид № 1).

Полученный пептид оценивают как гомогенный с применением метода ВЭЖХ с обращенной фазой с использованием двух различных подвижных фаз: градиента ацетонитрила в воде, содержащего 0,1% трифторуксусной кислоты, и градиента ацетонитрила в триэтиламинном фосфатном буфере (pH 7), а также с использованием химерного силикагеля и капиллярного электрофоре́за с фосфатным буфером (pH 2,5). Чистота данного пептида, оцениваемая данными методами, составляет более 98%. При применении масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением и анализом захваченных ионов величина псевдомолекулярного иона $[MH]^+$ была определена при $m/z=609,4$, что хорошо согласуется с расчетной молекулярной массой m/z для этого тетрапептида (609,5). Фрагментационный анализ псевдомолекулярного иона показал наличие серии ионов, соотношение m/z которых соответствует той последовательности аминокислот, которое ожидается для сформированной структуры.

Тесты на связывание клетками, экспрессирующими рецепторами KOR и MOR, осуществляют в соответствии с описанным здесь выше. Уровни аффинности тестируемого пептида в отношении hKOR и hMOR, стабильно экспрессируемых клетками мышинной нейробластомы гиппокампа (линия HN.9.10), определяют путем оценки конкурентного вытеснения соединения 3H -U-69593 для

hKOR или соединения ^3H -DAMGO для hMOR в соответствии с описанным. Обобщают данные по крайней мере трех экспериментов, а величины константы ингибирования диссоциации (K_1) (в 95%-ном доверительном интервале) рассчитывают с использованием подходящей компьютерной программы, такой как программа LIGAND, описанная у Munson & Rodbard, 1980, Anal. Biochem., 107, 220-239. Клонированный рецептор KOR связывает пептид №1 с высоким уровнем аффинности, что определяется по параметрам конкурентного вытеснения связанного радиоактивно помеченного лиганда, а величина K_1 определяется на уровне примерно $0,05 \pm 0,02$ нМ. Разница в уровне аффинности оказывается очень резкой при сравнении со сходными стабильно трансфицированными опухолевыми клетками, экспрессирующими MOR человека, где величина K_1 составляет 1890 ± 990 нМ. Следовательно, пептид № 1 связывается с hKOR с большей силой, чем с hMOR, примерно в 38000 раз.

Тестирование данного пептида в тесте на воздействие на мышечной уксусной кислотой (в соответствии с описанным здесь ниже) показывает, что величина IC_{50} составляет примерно 0,09 мг/кг и что данный пептид проявляет обезболивающий эффект на уровне свыше 50% после 3 часов. Следовательно, пептид № 1 рассматривается как обладающий долговременным действием.

Пример 2

Опиоидные пептиды, характеризующиеся общей формулой $\text{H-D-Phe-D-Phe-D-Nle-D-Arg-Q}$ в соответствии с определениями табл. А, были синтезированы и протестированы в соответствии с описанным в примере 1.

Таблица А							
No	Q	K _{KOR} (нМ)	K _{MOR} (нМ)	Соотно- шение μ/κ	Масс-спектроскопия		Тест с уксусной кислотой ED ₅₀ , мг/кг
					расчетная	измеренная	
2	NHMe	0.06	3,620	60,000	393.4	393.3	0.14
3	NHPr	0.09	1,640	18,000	623.4	623.3	0.078
4	NHBu	0.19	1,370	7,200	637.4	637.3	0.30
5	NH(Cyp)	0.18	3,520	20,000	621.4	621.3	0.04
6	Mor	0.06	2,510	42,000	651.4	651.4	0.014
7	N(EL)	0.11	1,900	17,000	637.4	637.3	0.02
8	NH(4Pic)	0.14	3,640	26,000	672.4	672.4	0.01
9	NHEt	0.40	1,010	2,500	623.4	623.3	0.03
10	Tmo	0.09	2,260	23,000	667.4	667.3	0.067
11	4-HyP	0.06	3,700	62,000	663.4	663.4	0.073
12	Pip	0.15	1,030	7,000	649.4	649.3	0.07
13	NH(2Tzl)	0.39	1,590	2,700	664.3	664.4	0.44
14	NHBzl	0.44	890	2,000	671.4	671.4	0.14
15	Ppz	0.16	9,100	57,000	630.4	630.3	0.017

Пептиды 2-15, как считается, проявляют долговременное действие с точки зрения биологической активности по обезболиванию.

Пример 3

Опиоидные пептиды, характеризующиеся общей формулой Н-Хаа₁-Хаа₂-Хаа₃-Хаа₄-Q в соответствии с описанным в табл. В, были синтезированы и протестированы в соответствии с описанным в примере 1.

Таблица В					
№	Xaa ₁	Xaa ₂	Xaa ₃	Xaa ₄	Q
16	D-4Fpa	D-Phe	D-Nle	D-Arg	NHEt
17	D-Asp	D-Phe	D-Nle	D-Arg	NHEt
18	D-Ala(2Thi)	D-Phe	D-Nle	D-Arg	NHEt
19	D-Tyr	D-Phe	D-Nle	D-Arg	Mor
20	D-Phe	D-Trp	D-Nle	D-Arg	Mor
21	D-Phe	D-4Npa	D-Nle	D-Arg	Mor
22	D-Phe	D-4Cpa	D-Nle	D-Arg	Mor
23	D-Phe	D-1Nal	D-Nle	D-Arg	NH(4Pic)
24	D-Phe	D-2Nal	D-Nle	D-Arg	NH(4Pic)
25	D-Phe	D-Tyr	D-Nle	D-Arg	NH(4Pic)
26	D-Phe	D-Phe	D-Leu	D-Arg	Mor
27	D-Phe	D-Phe	D-Val	D-Arg	Mor
28	D-Phe	D-Phe	D-Asp	D-Arg	Mor
29	D-Phe	D-Phe	D-Nle	D-Lys	Mor
30	D-Phe	D-Phe	D-Nle	D-Har	NHEt
31	D-Phe	D-Phe	D-Nle	D-Har(Et ₂)	NHEt
32	D-Phe	D-Phe	D-Nle	D-Orn	NHEt
33	D-Phe	D-Phe	D-Nle	D-Amf	NH(4Pic)
34	D-Phe	D-Phe	D-Nle	D-Dbu	NH(4Pic)
35	D-Phe	D-Phe	D-Leu	D-Orn	Ppz
36	D-Phe	D-Phe	D-Phe	D-Arg	NH(4Pic)
37	D-Phe	D-Phe	D-Nle	D-Ily	NH(4Pic)
38	D-Phe	D-Phe	D-Nle	D-Ior	NH(4Pic)
39	D-Phe	D-4Mpa	D-Nle	D-nArg	Mor

Пептиды 16-39, как считается, проявляют долговременное действие с точки зрения биологической активности по обезболиванию.

Пример 4

Опиоидные пептиды, характеризующиеся общей формулой $H\text{-}Xaa_1\text{-}Xaa_2\text{-}Xaa_3\text{-}Xaa_4\text{-}Q$ в соответствии с описанным в табл. С, были синтезированы и протестированы в соответствии с описанным в примере 1.

Таблица С						Масс-спектропия		Связывание (соотноше- ние $\mu\kappa$)
№	Xaa_1	Xaa_2	Xaa_3	Xaa_4	Q	расчетная	измеренная	
40	D-Phe	D-Phe	D-Nle	D-Arg	NH(4Nbz)	716.4	716.5	3,800
41	D-Phe	D-Phe	D-Nle	D-Arg	NH(4Abz)	686.4	686.4	12,000
42	D-Phe	D-Phe	D-Nle	D-Arg	Ecp	721.4	721.5	27,000
43	D-CMP	D-Phe	D-Nle	D-Arg	NH(4Pic)	686.4	686.5	2,500
44	D-Phe	D-Phe	D-Asp	D-Arg	NH(4Pic)	698.4	698.5	8,300
45	D-Phe	D-Phe	D-Hle	D-Arg	NH(4Pic)	686.4	686.5	11,000
46	D-Phe	D-Phe	D-CML	D-Orn	Mor	623.4	623.4	14,000
47	D-Phe	D-Phe	D-Leu	D-Lys	NH(4Pic)	644.4	644.3	30,000
48	D-Phe	D-Phe	D-Leu	D-Lys	NHPr	595.4	595.3	18,000
49	D-Phe	D-Phe	D-Leu	D-Lys	Mor	623.4	623.3	92,000
50	D-Phe	D-Phe	D-Nle	D-Har	NH(4Pic)	686.4	686.5	9,300
51	D-Phe	D-Phe	D-Nle	D-Har	Mor	665.4	665.5	12,000
52	D-Phe	D-Phe	D-Leu	D-Dbu	NH(4Pic)	616.4	616.3	92,000
53	D-Phe	D-Phe	D-Leu	D-Dbu	Mor	595.4	595.3	85,000

Пептиды 40-53, как считается, проявляют долговременное действие с точки зрения биологической активности по обезболиванию.

Пример 5

Опиоидные пептиды, характеризующиеся общей формулой $H\text{-}D\text{-Phe-}Xaa_2\text{-}Xaa_3\text{-}Xaa_4\text{-}Q$ в соответствии с описанным в табл. D, были синтезированы и протестированы в соответствии с описанным в примере 1.

Таблица D										
№	Xaa ₁	Xaa ₂	Xaa ₃	Q	K ₁ KOR (нМ)	K ₁ MOR (нМ)	Соотно- шение μ/κ	Масс-спектроскопия		Тест с уксусной кислотой: ED ₅₀ , мг/кг
								расчетная	измеренная	
54	D-Phe	D-Nle	D-Arg	NH(3Pic)	0.39	1,220	3,100	672.4	672.5	
55	D-Phe	D-Nle	D-Amf	NHEt	0.14	1,750	12,500	629.4	629.3	0.083
56	D-Phe	D-Leu	D-Orn	NHEt	0.31	4,150	13,000	567.4	567.4	0.057
57	D-Phe	D-Leu	D-Orn	Mor	0.19	5,260	28,000	609.4	609.3	0.026

Пептиды 54-58, как считается, проявляют долговременное действие с точки зрения биологической активности по обезболиванию.

Пример 6

Опиоидные пептиды, характеризующиеся общей формулой H-Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-D-Arg-Q в соответствии с описанным в табл. E, были синтезированы и протестированы в соответствии с описанным в примере 1.

Таблица E										
№	Xaa ₁	Xaa ₂	Xaa ₃	Q	K ₁ KOR (нМ)	K ₁ MOR (нМ)	Соотно- шение μ/κ	Масс-спектроскопия		Тест с уксусной кислотой: ED ₅₀ , мг/кг
								расчетная	измеренная	
59	D-Ala(2Thi)	D-4Cpa	D-Leu	Mor	0.25	3,360	13,000	691.3	691.1	0.052
60	D-Ala(2Thi)	D-3,4Cpa	D-Leu	NH(4Pic)	0.4	769	1,900	746.3	746.3	0.083
61	D-Ala(2Thi)	D-3,4Cpa	D-Leu	Mor	0.15	1,560	10,400	725.3	725.4	0.019
62	D-Phe	D-Phe	D-Nle	OxP	0.11	2,970	27,000	663.4	663.5	0.18
63	D-Ala(2Thi)	D-2Nal	D-Leu	Mor	0.2	3,170	16,000	707.4	707.4	0.04
64	D-Phe	D-Phe	D-Nle	Dmp	0.21	7,680	37,000	678.4	678.5	0.032
65	D-4Fpa	D-4Cpa	D-Leu	Mor	0.17	1,900	11,000	703.4	703.4	0.15

Пептиды 59-65, как считается, проявляют долговременное действие с точки зрения биологической активности по обезболиванию.

Пример 7

Опиоидные пептиды, характеризующиеся общей формулой $\text{H}-\text{Xaa}_1-\text{Xaa}_2-\text{Xaa}_3-\text{Xaa}_4-\text{Q}$ в соответствии с описанным в табл. F, были синтезированы и протестированы в соответствии с описанным в примере 1.

Таблица F					
№	Xaa ₁	Xaa ₂	Xaa ₃	Xaa ₄	Q
66	D-4Cpa	D-4Cpa	D-Leu	D-Lys	NHPr
67	D-4Fpa	D-2Nal	D-Met	D-Amf	NHBu
68	D-4Cpa	D-Trp	D-Asp	D-Amf	Pip
69	D-Phe	D-Phe	D-Val	D-Orn	Ecp
70	D-Ala(2Thi)	D-4Fpa	D-Nle	D-Dbu	NH(4Abz)
71	D-Asp	D-Phe	D-Leu	D-Har	4-HyP
72	D-CMP	D-Trp	D-Phe	D-Arg(Et ₂)	NHBzI
73	D-4Cpa	D-3,4Cpa	D-Met	D-Orn	Tmo
74	D-Asp	D-1Nal	D-Nle	D-Har(Et ₂)	NH(3Pic)
75	D-4Fpa	D-4Cpa	D-Leu	D-Omf	NHbEt
76	D-CMP	D-Tyr	D-Asp	D-Dbu	NHlpr
77	D-Phe	D-2Nal	D-Asp	D-Ily	NHPn
78	D-Tic	D-4Fpa	D-Phe	D-Lys	NH(4Pic)
79	D-4Npa	D-Trp	D-CML	D-Ior	N(Et) ₂
80	D-CMP	D-Phe	D-Met	D-Ior	Mor
81	D-Ala(3Thi)	D-1Nal	D-Nle	D-Lys	NH(2Tzl)
82	D-Phe	D-4Npa	D-Nle	D-Arg	NHCyp
83	D-Asp	D-2Nal	D-Hle	D-Har	NHCyb
84	D-Tyr	D-2Nal	D-Phe	D-Lys	Ppz
85	D-Phe	D-1Nal	D-Met	D-Ior	OxP
86	D-Phe	D-Trp	D-Met	D-Arg	Dmp
87	D-Phe	D-Trp	D-Nle	D-Orn	Mor

Опиоидные пептиды, включенные в табл. F, как видно, проявляют высокий уровень селективности в отношении рецептора KOR по сравнению с аффинностью в отношении рецептора MOR и проявляют биологическую активность по обезболиванию *in vivo*.

Пример 8

Опиоидные пептиды, характеризующиеся общей формулой $\text{H}-\text{Xaa}_1-\text{Xaa}_2-\text{Xaa}_3-\text{Xaa}_4-\text{Q}$ в соответствии с описанным в табл. G, были синтезированы и протестированы в соответствии с описанным в примере 1.

Таблица G						Соотношение μ/κ	Тест с уксусной кислотой: ED ₅₀ , мг/кг
№	Xaa ₁	Xaa ₂	Xaa ₃	Xaa ₄	Q		
88	D-4Fpa	D-Phe	D-Nle	D-Arg	NH(4Pic)	16,000	0.04
89	D-3Fpa	D-Phe	D-Nle	D-Arg	NH(4Pic)	24,000	0.11
90	D-2Fpa	D-Phe	D-Nle	D-Arg	NH(4Pic)	38,000	0.14
91	D-4Fpa	D-Phe	D-Nle	D-Har	NH(4Pic)		
92	D-4Cpa	D-Phe	D-Nle	D-Arg	NH(4Pic)	2,900	
93	D-4Fpa	D-4Npa	D-Nle	D-Arg	NH(4Pic)	1,200	
94	D-Phe	D-Phe	D-Nle	D-Arg	Ely	70,000	0.02
95	D-Phe	D-Phe	D-Nle	D-nArg	NH(4Pic)	16,000	0.08
96	D-Phe	D-Phe	D-Nle	D-Arg	Pcp	12,000	0.098
97	D-Phe	D-Phe	D-Nle	D-Arg	NH(4Acx)	6,400	
98	D-Phe	D-Phe	D-Leu	D-Orn	NH(Acb)	24,000	0.014
99	D-Ala(2Thi)	D-3,4Cpa	D-Leu	D-Orn	Mor	19,000	0.083
100	D-Ala(2Thi)	D-2Nal	D-Leu	D-Orn	Mor	31,000	0.079
101	D-Ala(2Thi)	D-4Cpa	D-Leu	D-Orn	Mor	38,000	0.112
102	D-Ala(2Thi)	D-4Cpa	D-Leu	D-Orn	NH(4Pic)	24,000	0.032
103	D-Phe	D-Phe	D-Nle	D-Arg	NH(Aao)	140,000	0.101
104	D-Phe	D-Phe	D-Nle	D-Arg	NH(Aoo)	6,300	
105	D-Phe	D-Phe	D-Nle	D-Arg	NH(Hoh)	66,000	0.015
106	D-Phe	D-Phe	D-Nle	D-Arg	NH(Ahx)	10,000	0.055
107	D-Phe	D-Phe	D-Nle	D-Arg	NH(Ghx)	22,000	0.032
108	D-Phe	D-Phe	D-Nle	D-Arg	NH(Gao)	67,000	0.034

Пептиды 88-108, как считается, проявляют долговременное действие с точки зрения биологической активности по обезболиванию.

Пример 9

Отобранные пептиды, которые показаны в табл. А-Г, дополнительно были подвергнуты специфическому тестированию *in vivo* с целью определения продолжительности проявления их опиоидных свойств, а полученные результаты включены в табл. Н, приведенную здесь ниже. Номера пептидов, соответствующие тем, которые использовались в предыдущих таблицах и фигурах в связи с определением соотношения μ/k , включены для простоты сопоставления. Тестирование *in vivo* осуществляют с использованием теста с нанесением уксусной кислоты, который эффективен с точки зрения определения продолжительности биологической активности по обезболиванию. Подробно этот тест описан в статье G.A.Bentley et al., 1981, Brit. J. Pharmac., 73, 325-332: в этом тесте используют самцов мышей линии ICR, которых приобретали в фирме Harlan; вес тела составлял 20-30 г. Перед началом теста мыши голодали в течение 12-16 часов. «Болевое поведение», т.е. болевые судороги, которое необходимо контролировать в тесте, вызывали путем внутрибрюшинного введения разбавленной уксусной кислоты. Использовали по 10 мл 0,6%-ного раствора уксусной кислоты в расчете на 1 кг веса тела. Судороги наблюдали в течение 15 минут после введения уксусной кислоты. На первом этапе соединения тестировали в 3-4 повышающихся дозах, вводимых внутривенно, в одно строго определенное уникальное время предобработки (за 5 минут

до инъекции уксусной кислоты). Этот этап используют для определения потенциала (ED_{50} в тесте с нанесением уксусной кислоты), равно как и субмаксимальной эффективной дозы (примерно 80-90%-ное обезболивание). На втором этапе эту субмаксимальную эффективную дозу для каждого конкретного пептида вводят на различных по времени моментах предобработки (а именно за 5 минут, за 60 минут, за 120 минут и за 180 минут) до введения уксусной кислоты с целью определения продолжительности действия. В ходе этого теста использовали контрольную группу мышей, которым вводили только наполнитель без тестируемого пептида. Число судорог подсчитывали в течение 15-минутного отрезка времени, начиная с момента инъекции уксусной кислоты, а уровень биологической активности, а именно обезболивание, выражали в процентах, подсчитывая по следующей формуле:

$$\frac{(\text{разница числа судорог в контрольной и опытной группах})}{(\text{число судорог в контрольной группе})} \times 100.$$

Поскольку каждая субмаксимальная доза будет с большой вероятностью варьироваться таким образом, что их будет невозможно сравнивать напрямую, применяли математическую нормализацию полученных результатов в соответствии с известным в данной области техники с целью получения пригодных для сравнения величин, которые включены в табл. Н. В табл. Н обезболивающая активность, сохраняющаяся спустя 1, 2 и 3 часа, выражена в виде процента того уровня активности, который был определен за 5 минут. Значения, превышающие 100%, указывают на более высокий уровень обезболивания по сравнению с началом эксперимента. Как считается, опиоидный пептид, кото-

рый эффективен в снижении уровня болевого поведения по крайней мере примерно на 25%, может рассматриваться как характеризующийся долговременностью действия *in vivo*.

В дополнение к использованию описанного теста с целью определения продолжительности обезболивающей активности также этот тест используют и для определения биологического потенциала конкретного пептида *in vivo* (кратковременное действие). Это значение дано в таблице в колонке, обозначенной «тест с уксусной кислотой: ED₅₀, мг/кг», обозначая количество миллиграммов в расчете на 1 кг веса тела. Это значение является дозой, необходимой для снижения числа судорог у тестируемых мышей на 50% (по сравнению с контрольными мышами) за 15-минутный период.

Таблица Н					
№ пептида	Соотношение μ/к	Тест с уксусной кислотой: ED ₅₀ , мг/кг	Процент обезболивания		
			через 1 час	через 2 часа	через 3 часа
1	38,000	0.09	83.9	75.5	61.3
2	60,000	0.14	70.5	29.8	
3	18,000	0.078	48.6	39.8	
4	7,200	0.3	49.3		
5	20,000	0.04	66.0	34.5	
6	42,000	0.014	105.7	52.7	
7	17,000	0.02	67.5	36.8	
8	26,000	0.01	66.9	45.1	
9	2,500	0.03	72.5	39.5	
10	25,000	0.07	81.6	47.5	
11	62,000	0.07	61.8	36.9	
12	7,000	0.07	60.5	53.6	
13	2,700	0.44	30.7		
14	2,000	0.14	36.0		
15	57,000	0.017	60.0		
42	27,000	0.06	45.3	29.4	
43	2,500	0.2			

Таблица Н (продолжение)					
44	8,300	0.2			
46	14,000	0.083			
47	30,000	0.09			
48	18,000	0.065	53.7		
49	92,000	0.02	65.5	69.2	38.3
50	9,300	0.077	35.6		
51	12,000	0.018	32.5		
52	92,000	0.019	30.6		
53	85,000	0.026	47.7	32.6	
56	13,000	0.057	77.4	59.3	
57	28,000	0.026	100	67.2	58.2
58	6,500	0.04	93.4	45.7	
59	13,000	0.052	83.3	59.7	
60	1,900	0.083	83.8	35.5	
61	10,400	0.019	57.5	60.3	
62	27,000	0.18	38		
63	16,000	0.04	51.8	36.1	
64	37,000	0.032	74.7		
65	11,000	0.031	39.5		
88	16,000	0.04	56.6	28.9	
94	70,000	0.02	58.8		
95	16,000	0.08	45.8		
96	12,000	0.098	56.7		
98	24,000	0.014	85.5	40.8	
99	19,000	0.083	50.3	69.3	
100	31,000	0.079	82.8	27.6	
101	38,000	0.112	89.9	45.6	
102	24,000	0.032	63.9		
103	140,000	0.101	37.1		
105	66,000	0.015	48.2		
106	0.055	46.7			
107	22,000	0.032	29.0		
108	67,000	0.034	84.3	32.9	

Опиоидные пептиды применимы в качестве обезболивающих препаратов (анальгетиков) и для других способов фармакологического применения с целью лечения патологий, в которые вовлечена система рецепторов KOR. Они проявляют преимущества по сравнению с обезболивающими средствами, действие которых опосредовано агонистами μ -опиоидными рецепторами, например, морфином, который обладает нежелательными эффектами, такими как запор, подавление дыхания и зуд. Чрезвычайно желательно, чтобы эти опиоидные пептиды по существу не преодолевали гематоэнцефалический барьер, что обеспечит защиту от потенциальных нежелательных побочных эффектов. Безопасность данных соединений в связи с проникновением в головной мозг оценивается путем сравнения их потенциала по обуславливанию периферических эффектов по сравнению с обуславливанием эффектов в центральной нервной системе. Периферические эффекты оценивают с использованием теста с нанесением уксусной кислоты, описанного выше. Эффекты в ЦНС, опосредованные κ -опиоидными рецепторами, находящимися в головном мозге, измеряют с использованием теста на удар хвостом.

Тест на удар хвостом – это тест на индукцию острой соматической боли, призванный оценить потенциал и продолжительность действия действующих на ЦНС обезболивающих средств. Болевые ощущения, обуславливаемые погружением хвоста в горячую воду (52°C), обуславливают быстрое отдергивание хвоста, известное как удар хвостом. Обезболивающие соединения, активные через ЦНС, как следует ожидать, обус-

ловливают увеличение в дозо-зависимом режиме задержки отдергивания хвоста. Данный тест описан у T.W.Vanderah et al., 1992, J. Pharm. Exper. Therapeutics, 262, 190-197.

Безопасность оценивали путем использования индекса проникновения в головной мозг (ИПМ), рассчитываемый по следующей формуле:

$$BPI = TF-ED_{50}/WT-ED_{50},$$

где значения ED_{50} представлены теми дозами, которые обуславливают половину максимального эффекта в тесте с нанесением уксусной кислоты у мышей ($WT-ED_{50}$) и в тесте на удар хвостом у мышей ($TF-ED_{50}$), соответственно, при внутривенном введении. Высокое значение ИПМ свидетельствует о низкой степени проникновения в головной мозг и указывает на то, что такое соединение, по-видимому, проявляет существенный уровень безопасности (отсутствие побочных эффектов в головном мозге) в случае его использования для целей, описанных в данной заявке. Являющиеся предпочтительными опиоидные пептиды характеризуются значениями ИПМ, равными или превышающими 100, а более предпочтительные опиоидные пептиды характеризуются ИПМ, превышающими 300. Системные κ -опиоидные агонисты небелковой природы (например, энадолин и соединение U-69593) характеризуются значениями ИПМ, меньшими 5, а это указывает на существенный уровень проникновения в головной мозг, что также подтверждается побочными эффектами (диурез, дисфория и седация), которые они вызывают в случае их клинического применения. Значения ИПМ для некоторых выборочных

опиоидных пептидов показаны в табл. I.

Таблица I			
№ пептида	WT-ED ₅₀ , мг/кг	TF-ED ₅₀ , мг/кг	BPI
1	0.09	9.7	108
3	0.078	13.82	177
5	0.04	4.4	110
6	0.014	6.4	457
7	0.020	3.1	155
8	0.01	9.84	984
15	0.017	2.86	168
49	0.020	1.62	81
53	0.026	2.1	81
57	0.026	5.6	215
58	0.034	4.34	128
61	0.019	>10	>526
88	0.040	12	300
96	0.098	>10	>102
98	0.014	3.5	250
99	0.083	16	193
102	0.032	>10	>313
105	0.015	12.6	840

Поскольку эти пептиды эффективно связываются с рецепторами KOR, то они также применимы в тестах *in vitro*, предназначенных для изучения рецепторов и для определения того, какие рецепторы могут присутствовать в конкретном тканевом образце. Следовательно, они применимы для диагностики, а также, по-видимому, для прижизненной (*in vivo*) диагностики.

В принципе данные опиоидные пептиды могут быть использованы для достижения обезболивания при лечении болей внут-

ренных органов, а также в лечении ревматоидного артрита. В частности, они применимы при лечении симптомов, проявляющихся после операций на брюшной полости, таких как нарушение пищеварения и болевые ощущения. Также они, как считается, будут эффективными в лечении синдрома раздраженной толстой кишки, нарушений мочеиспускания, недержания и других состояний, при которых локальное воспаление обуславливает болевые ощущения в кишечнике или в других внутренних органах, например, при воспалительных болезнях толстой кишки (ВВТК) и дивертикулезе. Способность опиоидных пептидов обуславливать относительно слабые иммунные ответы может иметь преимущество при лечении ВВК и других состояний, таких как аутоиммунные заболевания. Введение данных пептидов может быть применено с целью обуславливания местного обезболивающего эффекта в отношении как острых, так и хронических воспалительных процессов. Они могут быть использованы для лечения симптомов непроходимости кишечника, таких как метеоризм (вспучивание), тошнота или нарушение движения по кишечнику, связанных с болевыми ощущениями, например, при закупорках кишечника, обуславливаемых сокращениями судорожного типа. Также данные опиоидные пептиды эффективны в обуславливании периферического обезболивания, и они могут являться средством преодоления послеоперационных болей, равно как и хронических болей, таких как те болевые ощущения, которые обуславливаются воспалениями пищеварительных тканей и других тканей внутренних органов, а также для облегчения состояния при выходе из наркотического пристрастия.

Соединения по настоящему изобретению могут быть введены в форме фармацевтически приемлемых нетоксичных солей, таких как кислотно-аддитивные кислые соли, что хорошо известно в данной области техники. Проиллюстрировать эти соли кислот можно такими солями, как гидрохлорид, гидробромид, сульфат, фосфат, нитрат, оксалат, фумарат, глюконат, таннат, памоат, малеат, ацетат, цитрат, бензоат, сукцинат, альгинат, малат, аскорбат, тартрат и подобное. Если активный компонент предназначен для введения в форме таблетки, то такая таблетка может содержать фармацевтически приемлемый нетоксичный растворитель, включая связывающий компонент, такой как трагакант, кукурузный крахмал или желатин. Также эффективным может быть внутривенное введение в составе изотонического раствора, фосфатного буфера, растворов маннитола или глюкозы.

Фармацевтические композиции обычно должны содержать эффективное количество пептида по настоящему изобретению в сочетании со стандартным фармацевтически приемлемым носителем или растворителем. В целом, такая композиция должна содержать «обезболивающее количество» активного компонента, т.е. такое количество, которое будет эффективным в преодолении болевых ощущений. Обычно доза должна варьироваться от примерно 1 мкг до примерно 10 мг пептида на 1 кг веса тела пациента при внутривенном введении. Данные композиции могут быть введены по необходимости: например, они могут быть введены в повторяющемся цикле с интервалами 3-6 часов. Природа этих соединений может обуславливать эффективность перорального введения, однако в этом случае дозы должны быть выше.

Если желательным является попадание опиоидного пептида в организм в течение длительного времени после однократного введения, например, в течение недели или более того, то могут быть использованы такие формы стандартных доз, как капсулы с медленной секрецией, «депо»-капсулы и имплантаты. Например, подходящий для медленного выделения препарат-«депо», предназначенный для инъектирования, может содержать активный пептид или его соль, диспергированные или инкапсулированные в медленно разрушающийся нетоксичный или не вызывающий иммунных ответов полимер, такой как сополимер полимолочной кислоты и полигликолевой кислоты в соответствии с описанным в патенте США № 3773919. Также известно, что введение путем медленного выделения может быть обеспечено с помощью силастического имплантата.

Эти соединения могут быть введены млекопитающим, включая человека, внутривенно, подкожно, внутримышечно, через кожу, интраназально, внутрилегочно, перорально, местно, интаректально, интравагинально или путем спинальных доз с целью достижения обезболивания, например, с целью преодоления подавления проходимости кишечника, обусловленного перитонеальным раздражением. Соответственно, они могут быть использованы для ослабления послеоперационных болей. Эффективные дозы могут варьироваться в зависимости от формы введения и конкретного вида млекопитающего, лечение которого проводится. Примером типичной дозировочной формы является водный раствор с бактериостатическими свойствами при pH, равном примерно от 3 до 8, например, примерно pH=6, содержащий ак-

тивный пептид, при том, что этот раствор вводят парентерально с целью введения дозы, находящейся в диапазоне от примерно 0,3 мкг до 3 мг на 1 кг веса тела в день. Данные соединения рассматриваются как хорошо переносимые *in vivo* и, соответственно, они рассматриваются как, в частности, эффективно применимые для введения подкожными инъекциями в виде противобактериального водного раствора или подобного.

Хотя настоящее изобретение было описано в объеме его предпочтительных вариантов, тем не менее должно быть понятно, что те изменения и модификации, которые могут быть очевидны специалисту в данной области техники, могут быть внесены без отклонения от духа настоящего изобретения, суть которого определена нижеследующей формулой изобретения. Например, другие замены, известные в данной области техники, которые в сколько-нибудь существенной степени не снижают эффективность пептидов, могут быть внесены в пептиды по настоящему изобретению. Другие замещенные остатки D-фенилаланина, такие как (4Br)D-Phe или (2,4Cl₂)D-Phe, могут быть использованы по 2-му положению пептида. И D-Lys(Bu), и D-Arg(Et₂) рассматриваются, как эквиваленты аминокислот D-Ily и D-Arg(Et₂). Если это желательно, N-конец данного тетрапептида может быть перметилирован в соответствии с известным в науке. Диаминовые соединения могут быть использованы в качестве линкеров с целью создания димеров двух амидов тетрапептидов. Линкерами, которые могут быть с успехом использованы, являются 1,6-диаминогексан, 1,5-диамино-3-оксапентан и 1,8-диамино-3,6-диоксооктан. Полученные в результате димеры рассматриваются как эквиваленты соответствующих мономеров.