(19) SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 963252 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS**
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE PUBLIC

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 963252

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
C07K 5/107

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **15.02.1995**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **20.08.1996**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **20.08.1996**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - Internationell ansökan - International application **15.02.1995 PCT/SE1995/000158**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

21.02.1994 GB 9403263
03.05.1994 SE 9401519
25.04.1994 GB 9408179

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • **Astra Aktiebolag,** 151 85 Södertälje, SVERIGE, (SE)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • **Brown, William,** Canada, KANADA, (CA)
2 • **Dimaio, John,** Canada, KANADA, (CA)
3 • **Schiller, Peter,** Canada, KANADA, (CA)
4 • **Martel, Rene,** Canada, KANADA, (CA)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Berggren Oy Ab, Antinkatu 3 C, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Kivun hoitoon tarkoitetut uudet opioidipeptidit ja niiden käyttö

Nya opioidpeptider för behandling av smärta samt deras användning

Kivun hoitoon tarkoitetut uudet opioidipeptidit ja niiden käyttö - Nya opioidpeptider för behandling av smärta samt deras användning

Keksinnön tausta

Monet nisäkäs- ja sammakkoeläinperäiset endogeeniset peptidit sitoutuvat spesifisiin opioidireseptoreihin ja aiheuttavat kivunlievitysvasteen, joka on samanlainen kuin klassisilla narkoottisilla opiaateilla. Monia erityyppisiä opioidireseptoreita on osoitettu esiintyvän yhdessä korkeammissa eläimissä. Katso esimerkiksi julkaisuja: W. Martin et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 197, s. 517 (1975); ja J. Lord et al., Nature (Lontoo), 257. s. 495 (1977). On tunnistettu kolme eri opioidireseptorityyppiä. Ensimmäisellä, δ:lla, nähdään differentioivaa affiniteettia enkefaliinityyppisille peptideille. Toisella, μ:llä, nähdään lisääntynyt selektiivisyys morfiinille ja muille polysyklisille alkaloideilla. Kolmannella, κ, on yhtäsuuri affiniteetti kummallekin edellä mainittujen ligandien ryhmille ja suosiva affiniteetti dynorfiinille. Yleensä δ-reseptorit vaikuttavat liittyvän enemmän kivunlievitysvaikutuksiin. δ-reseptorit vaikuttavat olevan tekemisissä käyttäytymisvaikutusten kanssa, vaikka δ- ja κ-reseptorit voivat myös välittää kivunlievitystä.

Jokainen opioidireseptori aiheuttaa opiaatin kanssa yhdistettäessä spesifisen biologisen vasteen, joka on tuolle reseptorityypille ainutlaatuinen. Kun opiaatti aktivoi useampaa kuin yhtä reseptoria, vaikutetaan jokaisen reseptorin biologiseen vasteeseen, jolloin syntyy sivuvaikutuksia. Mitä vähemmän spesifinen ja selektiivinen opiaatti voi olla, sitä suurempi on mahdollisuus lisääntyvien sivuvaikutusten aiheuttamiseen optiaattia antamalla.

Tekniikan tasolla opiaatit, opioidipeptidit ja niiden analogit ovat joko epäonnistuneet osoittamaan, tai niillä on

nähty rajallinen spesifisyys- ja selektiivisyysaste reseptorityypille, tai reseptoreille, joihin ne sitoutuvat.

Kipua lievittävien opioidien pääasiallinen vaikutuskohta on keskushermosto (CNS). Tavanomaiset narkoottiset kipulääkkeet ovat normaalisti melko hydrofobisia ja soveltuvat täten äärimmäisen hyvin lipidimembraanien, kuten veri-aivoesteen läpäisyyn. Tästä fysikaalisesta kyvystä johtuen kipulääkkeillä on taipumus sitoutua opioidireseptorien kanssa keskushermostossa aivoissa. Ne eivät kuitenkaan välttämättä sitoudu homogeenisen reseptorialatyypin kanssa. Tämä sitoutuminen aiheuttaa lääketieteellisesti ei-toivottavien sivuvaikutusten tapahtumisen.

Opiaatit voivat aiheuttaa vakavia ja mahdollisesti kohtalokkaita sivuvaikutuksia. Sivuvaikutuksia, kuten hengityksen heikkenemistä, toleranssia, fysikaalista riippuvuuskapasiteettia, ja nopeasti alkavaa vieroitusoireyhtymää aiheuttavat epäspesifiset vuorovaikutukset keskushermoston reseptorien kanssa. Katso K. Budd teoksessa International Encyclopedia of Pharmcology and Therapeutics; N.E. Williams ja H. Wilkinson, toimittajat, Pergammon: (Oxford), 112, s. 51 (1983). Sen vuoksi opioidikipulääkkeiden, jotka vaikuttavat pääasiassa ääreishermostossa olevien opioidireseptorien kanssa, ei odotettaisi aiheuttavan samanlaisia ei-toivottavia sivuvaikutuksia kuin sivuvaikutukset, jotka liittyvät keskushermostoon vaikuttaviin opioidikipulääkkeisiin. Keksinnön mukaiset opioidipeptidit vaikuttavat oleellisesti ääreishermostoon ja voittavat sen vuoksi joitakin tavanomaisten opiaattien haitoista estämällä ei-toivottavien sivuvaikutusten esiintymisen oleellisesti.

Tähän mennessä yksi harvoista aineiden luokista, joiden tiedetään aiheuttavan ääreiskivunlievitysvaikutuksia, ovat ei-steroidiset tulehduslääkkeet, kuten aspiriini, ibuprofeeni ja ketorolaakki. Nämä aineet eivät ole vuorovaikutuksessa opioidireseptorien kanssa, mutta niiden tiedetään estävän

syklo-oksygenaasia ja heikentävän prostaglandiinisynteesiä. Näillä heikoilla kipulääkkeillä ei ole sentraalisesti välitettyjä sivuvaikutuksia, mutta ne voivat aiheuttaa muita sivuvaikutuksia, kuten ruoansulatuskanavan haavautumia. Keksinnön eräänä kohteena on aikaansaada opioidimaisia peptidejä, jotka vaikuttavat perifeerisesti mutta välttävät oleellisesti ei-toivotut sivuvaikutukset, jotka liittyvät tavanomaisiin perifeerisesti vaikuttaviin kipulääkkeisiin.

Tekniikan alalla on osoitettu hiljattain, että opiaattilääkkeillä on merkittävää perifeeristä kivunlievitysaktiivisuutta. Katso julkaisuja: A. Barber ja R. Gottschlich, Med. Res. Rev., 12, s. 525 (1992); ja C. Stein, Anasth. Analg., 76, s. 182 (1993). Tunnettujen sentraalisesti vaikuttavien opioidialkaloidien kvaternäärisiä suoloja on käytetty farmakologisina koettimina perifeeristen ja sentraalisten kivunlievitysvasteiden erottamiseksi toisistaan. Vahvojen opiaattien kvaternäärisillä suoloilla on pysyvä positiivinen varaus, ja niillä nähdään rajallista veri-aivoesteen läpi tunkeutumista. See T.W. Smith et al., Life Sci, 31, s. 1205 (1982); T.W. Smith et al., Int. J. Tiss. Reac., 7, p. 61 (1985); B.B. Lorenzetti ja S.H. Ferreira, Braz. J. Med. Biol. Res, 15, s. 285 (1982); D.R. Brown ja L.I. Goldberg, Neuropharmacol., 24, s. 181 (1985); G. Bianchi et al.. Life Sci., 30, s. 1875 (1982); ja J. Russel et al., Eur. J. Pharmacol., 78, s. 255 (1982). On valmistettu enkefaliinien ja dermorfiinien hyvin polaarisia analogeja, joilla säilyy suuri antinosiseptinen aktiivisuus mutta joilla on rajallinen keskushermostoon tunkeutuminen. Katso julkaisuja: R.L. Follenfant et al., Br. J. Pharmacol., 93, s. 85 (1988); G.W. Hardy et al., J. Med. Chem. 32, s. 1108 (1989). Käänteisesti, lipofiilisten opioidipeptidien ajateltiin tekniikan tasolla helpommin läpäisevän veri-aivoesteen. Hämmästyttävällä tavalla, keksinnön mukaiset opioidipeptidit ovat hyvin lipofiilisiä, mutteivät merkittävästi läpäise veri-aivoestettä.

Toisin kuin tavanomaiset opiaatit, opioidipeptidit ovat hydrofobisia. Niiden hydrofobisuudella on taipumus lisätä niiden nisäkäskehosta poistumisen nopeutta. Hydrofobisuus lisää näiden peptidien kapasiteettia epiteelisulkujen läpi kulkemiseen. Siitä huolimatta opioidipeptidien annon nisäkäskehoon on osoitettu vaikuttavan keskushermostoon. Sen vuoksi on suoritettu paljon ponnisteluja näiden yhdisteiden imeytymisominaisuuksien parantamiseksi. Tiedemiehet ovat yrittäneet vähentää peptidin keskushermostoon tunkeutumista erityisesti jos kehon pitkäaikainen altistus näille kemikaaleille saattaisi aiheuttaa ei-toivottavia sivuvaikutuksia tai jopa olla toksista.

Ajateltiin, että ei-polaariset peptidit kulkevat helpommin keskushermostoon kuin polaariset peptidit kulkemalla aivoveri-esteen läpi. On julkaistu, että TAPP:llä (H-Tyr-D-Ala-Phe-Phe-NH_2) oli antinosiseptiivisiä ominaisuuksia sekä perifeerisesti että sentraalisesti (P. Schiller et al., Proceedings of the 20th European Peptide Symposium, 1988). Vastaväitteenä, tämän keksinnön keksijät ovat havainneet, että tämä tetrapeptidi TAPP (H-Tyr-D-Ala-Phe-Phe-NH_2) ei vaikuta sentraalisesti. Tämä tulos osoitettiin kipua lievittävän vaikutuksen puutteella jopa annopksilla 100 mg/kg hiiren kuumalevytestissä. Tämä testi on standardi, ja ammattimiesten tuntema. Testi hylkää kemikaalit, jotka aikaansaavat sentraalisesti välitetyn analgeettisen vasteen.

Käsite "spesifisyys" tässä patenttihakemuksessa käytettäessä viittaa opiaatin tai opioidipeptidin erityiseen tai määrättyyn sitoutumiseen yhteen erityiseen opioidireseptoriin toiseen opioidireseptoriin verrattuna. Opoidipeptidin spesifisyys ilmaistaan sitoutumisenestovakiolla, K_i. Käsite "selektiivisyys" viittaa opiaatin tai opioidipeptidin kykyyn tehdä ero udeiden opioidireseptorien välillä ja sitoutua vain yhteen erityiseen reseptoriin. Opioidipeptidin selektiivisyys μ-reseptorille ilmaistaan sitoutumisenestovakioiden suhteella. Esimerkiksi sitoutumisenestovakioiden suhde,

K_i^{δ}/K_i^{μ}, on arvo, jota voidaan käyttää selektiivisyyden mittaamiseen. Tämä suhde edustaa μ- ja δ-reseptoreihin sitoutumisen affiniteettien välistä suhdetta. Tämän suhteen korkeampi arvo ilmaisee ligandin suuremman mieltymyksen μ-kanssa sitoutumisen kanssa δ-reseptoriin verrattuna. Yhden tavanomaisen opioidipeptidianalogin, H-Tyr-D-Ala-Gly-Phe(NMe)-Gly-oli (DAGO), tiedetään olevan yhden μ-selektiivisimmistä opioidipeptidianalogeista. Tällä peptidillä nähdään Kiδ/Kiμ-arvo 1050. Toisaalta Leu-enkefaliinilla nähdään K_i^{δ}/K_i^{μ}-arvo 0,2. Tämä aivan pieni arvo viittaa selvään affiniteettiin δ-reseptoria kohtaan δ-reseptoriin verrattuna.

Peptidillä on oltava määrätyt ominaisuudet ollakseen farmakologisesti käyttökelpoinen. Ensiksi, peptidin pitäisi olla kestävä proteolyyttistä hajoamista vastaan. Toiseksi, peptidin pitäisi aiheuttaa parantuneen biologisen vasteen. Kolmanneksi, peptidin on oltava turvallinen ihmisen käytössä. Neljänneksi, peptidiä olisi pystyttävä syntetisoimaan riittävän suuret määrät käytettäväksi kliinisissä tutkimuksissa, joissa tarkkaillaan sen toksisuutta, ja myöhemmin kaupallistamista varten. Nykyisessä tilanteessa vähäisempi lipidiliukoisuus ja suurempi vesiliuokoisuus ovat myös haluttavia peptidien ominaisuuksia, jotta estettäisiin aivo-veri-esteen läpäisy ja sallittaisiin ylimääräisen peptidin ja sen metaboliatuotteiden nopea erittyminen. Lisäksi, olisi toivottavaa että peptidi aiheuttaisi selektiivisen ja spesifisen reseptoriinsitoutumisaktiivisuuden, jotta minimoitaisiin mahdolliset sivuvaikutukset.

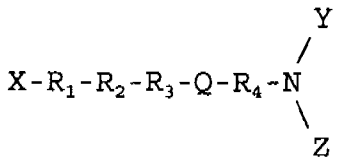
On tarvetta peptideille, jotka vaikuttavat yhdessä spesifisessä opioidireseptorissa, erityisesti μ-reseptorissa. Olisi toivottavaa löytää peptidejä, joilla on vähäisempi lipidiliukoisuus kuin tavanomaisilla opiaateilla niin, ettei veriaivoestettä läpäistäisi. Edelleen suuremman poolisuuden omaavat peptidit olisivat normaalisti fysiologisen pH-arvon omaaviin vesipohjaisiin väliaineisiin liukoisempia, lisäten

täten niiden erittymistä ja niiden metaboliatuotteiden erittymistä.

Keksinnön yhteenveto

Tämä keksintö aikaansaa uudia yhdisteitä, jotka ovat selektiivisiä ja spesifisiä oleellisesti yhtä opioidireseptoria kohtaan. Tämä keksintö aikaansaa peptidejä, joilla on suosiva selektiivisyys ja spesifisyys μ-opioidireseptoria kohtaan. Keksintö aikaansaa myös peptidejä, jotka ovat pääasiassa vuorovaikutuksessa ääreishermopäätteissä olevien opioidireseptorien kanssa eivätkä oleellisesti läpäise veriaivoestettä. Tämän vuoksi keksintö vähentää sivuvaikutuksien vakavuutta ja lukumäärää verrattuna tähän mennessä kuvattuihin tavanomaisiin opiaatteihin ja opioidipeptideihin liittyviin sivuvaikutuksiin.

Keksinnön mukaiset yhdisteet ovat kaavan 1 mukaisia:



(1)

ja sen johdannaisia ja analogeja,
jossa
X on H tai C_{1-6}-alkyyli;
Y ja Z ovat toisistaan riippumatta H, syklinen aralalkyyli tai C_{1-6}-alkyyli;
R_1 on tyrosyylitähde, 2',6'-dimetyylityrosyylitähde, tai sen analogi tai johdannainen;
R3 on aromaattinen aminohappo;
R_4 on aromaattinen aminohappotähde;
R_2 on aminohappo, jolla on R-konfiguraatio, niillä ehdoilla, että kun R_1 on tyrosyylitähde, R_2 on D-alaniini, X, Y, ja Z ovat H, ja R_3 on fenyylialaniini, niin R_4 ei ole fenyylialaniini, joka on substituoimaton tai substituoitu $4NO_2$:lla tai $4N_3$:lla;

kun R_1 on tyrosyylitähde, R_2 on D-alaniini, X, Y, ja Z ovat H, ja R_4 on fenyylialaniini, niin R_3 ei ole fenyylialaniini, joka on substituoimaton tai substituoitu $4NO_2$:lla;
kun R_1 on tyrosyylitähde, R_2 on D-alaniini, X, Y, ja Z ovat H, ja R_4 on 1'-naftyylialaniini, niin R_3 ei ole 1'-naftyylialaniini tai 2'-naftyylialaniini; ja
kun R_1 on tyrosyylitähde, R_2 on D-alaniini, ja X, Y, ja Z ovat H, niin sekä R_3 että R_4 eivät ole tryptofaaneja; ja
Q on amidisidos tai väliin pantu amidisidoksen jäljittelijä.

Keksintö aikaansaa myös kivun hoitoon tarkoitettuja, farmaseuttisesti hyväksyttäviä koostumuksia, jotka sisältävät näitä peptidejä.

Keksintö aikaansaa myös näiden peptidien käytön valmistettaessa kivun hoitoon tarkoitettuja perifeerisesti vaikuttavia kipulääkkeitä.

Edelleen keksintö aikaansaa kaavan H-Tyr-D-Ala-Phe-Phe-NH_2 mukaisen peptidsin käytön valmistettaessa kivun hoitoon tarkoitettua perifeerisesti vaikuttavaa kipulääkettä.

Taulukot ja kuviot

Taulukossa 1 luetellaan hydrofobisen dermorfiinin sukuisten tetrapeptidien in vivo- ja in vitro-aktiivisuus.

Kuviossa 1 esitetään morfiinin (10 $mgkg^{-1}$) (kuvio A) ja esimerkinomaisten testiyhdisteiden (kuvio B: BCH2463; C: BCH2462; D: BCH2687) kivunlievitysvaikutus ajan funktiona

Kuviossa 2 esitetään annos/vaste -käyrät BCH2463:lle fenyylikinoni-indusoidussa vääntelehtimismäärityksessä (hiiressä s.c.) ED_{50} = 0,5 $mgkg^{-1}$ ajankohdalla 20 min annon jälkeen.

Kuviossa 3 vertaillaan BCH1774:n ja BCH2463:n kivunlievitystä ajan funktiona fenyylikinoni-indusoidussa vääntelehtimismäärityksessä (hiiri s.c.)

Keksinnön kuvaus

Koko selityksessä ja patenttivaatimuksissa käytetään seuraavia tavallisia lyhenteitä:

Abu - aminovoihappo	Aib - aminoisovoihappo
Ala - alaniini	Chl - syklohomoleusiini
Arg - arginiini	Cys (Bzl) - kysteiini (bentsyyli)
Cle - sykloleusiini	Dmt - 2'6'-dimetyylityrosyyli
Gln - glutamiini	Glu - glutamiinihappo
Gly - glysiini	GPI - marsun sykkyräsuoli
His - histidiini	Ile - isoleusiini
Hph - homofenyylialaniini	Met - metioniini
Leu - leusiini	MVD - hiiren siemenjohdin
Nle - norleusiini	Nva - norvaliini
Phe - fenyylialaniini	Pro - proliini
Phg - fenyyliglysiini	
Ser - seriini	Thr - treoniini
Trp - tryptofaani	Tyr - tyrosiini

Nal - 1'-, tai 2-naftyylialaniini

PBQ - fenyyli-p-bentsokinoni

Tic - tetrahydroisokinoliini-3-karboksyylihappo

TAPP - H-Tyr-D-Ala-Phe-Phe-NH_2

TSPP - H-Tyr-D-Ser-Phe-Phe-NH_2

Käsitteisiin "aminohappo", ja "aromaattinen aminohappo", tässä käytettäessä, luetaan mukaan luonnollisesti esiintyvät aminohapot samoin kuin ei-luonnolliset aminohapot, niiden johdannaiset, ja analogit, jotka ovat kemiallisen synteesin ja peptidikemian ammattimiesten tavallisesti käyttämiä. Mukaan luetaan myös TAPP-analogit, joissa fenyylialaniini on para-substituoitu 4-asemaan nitro- tai atsidotähteellä. Luettelo ei-luonnollisista ja ei-proteogeenisistä aminohapoista voidaan löytää teoksesta "The Peptide", vol 5, 1983, Academic Press, luku 6, kirjoittaneet D.C. Roberts ja F. Vellaccio, joka liitetään tähän viitteeksi. Esimerkkejä aromaattisista aminohapoista ovat mm. tyrosiini, tryptofaani, phenylglysiini, histidiini, naftyylialaniini, tetrahyd-

roisokiniliini-3-karboksyylihappo ja bentsyylikysteiini. Muita esimerkkejä aromaattisista aminohapoista ovat mm. fenyylialaniini, joka on substituoitu aromaattiseen renkaaseensa esimerkiksi ryhmällä CH_3, C_2H_5, F, Cl, Br, NO_2, OH, SH, CF_3, CN, COOH ja/tai CH_2COOH, tai substituoitu ß-hiileen alemmalla alkyyliradikaalilla, ryhmällä OH, SH, tai bentseeniryhmällä. Aromaattisessa renkaassa voi olla useita substituentteja. Aromaattisia aminohappoja voivat myös olla mm. fenyyliglysiinityyppiset aromaattiset hiilisykliset yhdisteet, joissa fenyyliglysiinin aromaattinen rengas on substituoitu ryhmällä CH_3, C_2H_5, F, Cl, Br, NO_2, OH, SH, CF_3, CN, COOH ja/tai CH_2COOH. Nämä esimerkit on tarkoitettu vain esimerkeiksi, eikä niitä ole tarkoitettu millään lailla keksintöä rajoittaviksi.

Käsite "ED_{50}" esitettynä taulukossa 1 PBQ-vääntelehtimismäärityksille määritellään lääkkeen annokseksi, joka aiheuttaa vääntelehtimisten lukumäärän 50-%:isen vähenemisen verrattuna kontrolliin. Käsite "ED_{50}" käytettynä kuumalevymäärityksissä määritellään lääkkeen annokseksi, joka vaaditaan vasteen viiveen kasvattamiseksi 2-kertaiseksi verrattuna kontrolleihin, ja se määritettiin yhdensuuntaisen viivan probittianalyysillä.

Käsite "väliin pantu amidisidoksen jäljittelijä" on sidos, jossa amidisidoksen karbonyyliryhmä ja NH-ryhmä on vaihdettu keskenään.

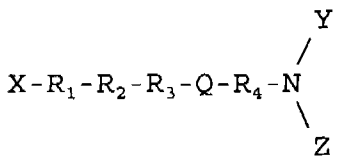
Käsite "K_i" on sitoutumisenestovakio. Käsite "K_i^{δ}/K_i^{μ}" on arvo, jota voidaan käyttää selektiivisuuden mittaamiseen. Tämä suhde edustaa opioidipeptidien μ- ja δ-reseptoreihin sitoutumisen affiniteettien suhdetta.

Käsite "R-konfiguraatio" viittaa substituenttien kolmiulotteiseen järjestykseen kiraalisen elementin ympärillä. Eräs yleinen absoluuttisen konfiguraation merkitsemisjärjestelmä perustuu ammattimiesten hyvin tuntemaan prioriteettijärjes-

telmään, ja se kuvataan lyhyesti tämän jälkeen. Kullekin kiraaliseen keskukseen kiinnittyneelle ryhmälle annetaan prioriteetin mukainen numero. Molekyyliä katsotaan alhaisimpaan prioriteettiin nähden vastakkaiselta puolelta. Konfiguraatio määritellään "R"-konfiguraatioksi, jos silmä etenee myötäpäivään siirryttäessä suurimman prioriteetin omaavasta ryhmästä pienimmän prioriteetin omaavaan ryhmään.

Käsite "tähde" käytettäessä aminohapolle, tarkoittaa radikaalia, joka on johdettu vastaavasta aminohaposta poistamalla karboksyyliryhmän hydroksyylin, ja yhden vedyn aminoryhmästä.

Keksinnön yhdisteet ovat kaavan (1) mukaisia:



(1)

ja niiden johdannaisia ja analogeja,
joissa
X on H tai C_{1-6}-alkyyli;
Y ja Z ovat toisistaan riippumatta H, syklinen aralkyyli tai C_{1-6}-alkyyli;
R_1 on tyrosyylitähde, 2',6'-dimetyylityrosyylitähde, tai sen analogi tai johdannainen;
R_3 on aminohappotähde, joka on aromaattisia aminohappoja;
R_4 on aromaattinen aminohappotähde
R_2 on aminohappo, jolla on R-konfiguraatio, sillä ehdolla, että kun R_1 on tyrosyylitähde, R_2 on D-alaniini, X, Y, ja Z ovat H, ja R_3 on fenyylialaniini, niin R_4 ei ole fenyylialaniini, joka on substituoimaton $4NO_2$:lla tai $4N_3$:lla;
kun R_1 on tyrosyylitähde, R_2 on D-alaniini, X, Y, ja Z ovat H, ja R_4 on fenyylialaniini, niin R_3 ei ole fenyylialaniini, joka on substituoimaton tai substituoitu $4NO_2$:lla;

kun R_1 on tyrosyylitähde, R_2 on D-alaniini, X, Y, ja Z ovat H, ja R_4 on 1'-naftyylialaniini, niin R_3 ei ole 1'-naftyylialaniini tai 2'-naftyylialaniini; ja
kun R_2 on D-alaniini, R_1 on tyrosyylitähde, ja X, Y, ja Z ovat H, niin sekä R_3 että R_4 eivät ole tryptofaaneja; ja
Q on amidisidos tai väliin pantu amidisidoksen jäljittelijä.

Edullisia yhdisteitä ovat kaavan 1 mukaiset yhdisteet ja niiden johdannaiset ja analogit, joissa X on H.

Muita edullisia yhdisteitä ovat kaavan 1 mukaiset yhdisteet ja niiden johdannaiset ja analogit,
joissa
R_2 on aminohappotähde, jolla on R-konfiguraatio, sillä ehdolla, että
kun R_1 on tyrosyylitähde, R_2 on D-alaniini, ja X, Y, ja Z ovat H, niin R_3 ja R_4 ovat erilaisia ja ovat fenyylialaniini tai tryptofaani.

Muita edullisia yhdisteitä ovat kaavan 1 mukaiset yhdisteet ja niiden johdannaiset ja analogit,
joissa
Q on amidisidos tai väliin pantu amidisidoksen jäljittelijä, jolla on kaava Q_1-Q_2, jossa Q_1 on CH_2, CHOH, C=O, C=S tai CH=, ja Q_2 on CH_2, NH, S, SO, SO_2, O tai CH=, sillä ehdolla, että kun Q_1 on CH=, niin Q_2 on CH=.

Edelleen edullisia yhdisteitä ovat kaavan 1 mukaiset yhdisteet ja niiden johdannaiset ja analogit,
joissa
Y ja Z ovat H;
R_3 ja R_4 ovat toisistaan riippumatta aromaattisia aminohappoja; ja R_2 on aminohappo, jolla on R-konfiguraatio, sillä ehdolla, että kun R_1 on tyrosyylitähde, ja R_2 on D-alaniini, niin R_3 ja R_4 ovat erilaisia ja ovat fenyylialaniini tai tryptofaani.

Yhä edelleen edullisia yhdisteitä ovat kaavan 1 mukaiset yhdisteet ja niiden johdannaiset ja analogit,
joissa
R_2 on aminohappo, jolla on R-konfiguraatio, sillä ehdolla, että R_2 ei ole D-alaniini; ja
R_3 ja R_4 ovat fenyylialanyylitähteitä.

Yhä edelleen edullisia yhdisteitä ovat kaavan 1 mukaiset yhdisteet ja niiden johdannaiset ja analogit,
joissa
R_1 on tyrosyylitähde;
R_2 on D-norvaliini, D-seriini tai D-arginiini;
R_3 ja R_4 ovat fenyylialanyylitähteitä; ja
Q on peptidesidos.

Edullisempia yhdisteitä ovat kaavan 1 mukaiset yhdisteet ja niiden johdannaiset ja analogit,
joissa
X on H,
Y ja Z ovat toisistaan riippumatta H, aralkyyli tai C_{1-6}-alkyyli,
R_1 on tyrosyylitähde, 2',6'-dimetyylityrosyylitähde, tai niiden analogi tai johdannainen,
R_3 on aromaattinen happo,
R_4 on muista riippumatta aromaattinen tai alifaattinen aminohappo, ja
R_2 on aminohappotähde, jolla on R-konfiguraatio, sillä ehdolla, että kun R_2 on D-alaniini, R_1 on tyrosyylitähde, ja Y ja Z ovat H, niin R_3 ja R_4 ovat toisistaan riippumatta fenyylialaniini tai tryptofaani, mutteivät ole samoja, Q on amidisidos tai väliin pantu amidisidoksen jäljittelijä, jolla on kaava Q_1-Q_2, jossa Q_1 on CH_2, CHOH, C=O, C=S tai CH=, ja Q_2 on CH_2, NH, S, SO, SO_2, O tai CH=, sillä ehdolla, että kun Q_1 on CH=, niin Q_2 on CH=.

Edullisempia yhdisteitä ovat kaavan 1 mukaiset yhdisteet ja niiden johdannaiset ja analogit,

joissa
X on H,
Y ja Z ovat H,
R_1 on tyrosyylitähde, 2',6'-dimetyylityrosyylitähde tai näiden analogi tai johdannainen,
R_3 ja R_4 ovat toisistaan riippumatta aromaattisia aminohappoja,
R_2 on aminohappo, jolla on R-konfiguraatio, sillä ehdolla, että kun R_2 on D-alaniini ja R_1 on tyrosyylitähde, niin R_3 ja R_4 ovat toisistaan riippumatta fenyylialaniini tai tryptofaani, mutteivät ole samoja,
Q on amidisidos tai väliin pantu amidisidoksen jäljittelijä, jolla on kaava Q_1-Q_2, jossa Q_1 on CH_2, CHOH, C=O, C=S tai CH=, ja Q_2 on CH_2, NH, S, SO, SO_2, O tai CH=, sillä ehdolla, että kun Q_1 on CH=, niin Q_2 on CH=.

Edullisempia yhdisteitä ovat kaavan 1 mukaiset yhdisteet ja niiden johdannaiset ja analogit,
jossa
X on H,
Y ja Z ovat H,
R_1 on tyrosyylitähde, 2',6'-dimetyylityrosyylitähde, tai niiden analogi tai johdannainen,
R_2 on aminohappo, jolla on R-konfiguraatio, sillä ehdolla, että R_2 ei ole alaniini,
R_3 ja R_4 ovat fenyylialanyylitähteitä,
Q on amidisidos tai amidisidoksen jäljittelijä, jolla on kaava Q_1-Q_2, jossa Q_1 on CH_2, CHOH, C=O, C=S tai CH=, ja Q_2 on CH_2, NH, S, SO, SO_2, O tai CH=, sillä ehdolla, että kun Q_1 on CH=, niin Q_2 on CH=.

Edullisimpia yhdisteitä ovat kaavan 1 mukaiset yhdisteet ja niiden johdannaiset ja analogit,
joissa
X on H,
Y ja Z ovat H,
R_1 on tyrosyylitähde,

R_2 on D-norvaliini, D-seriini tai D-arginiini,
R_3 ja R_4 ovat fenyylialanyylitähteitä, ja
Q on peptidisidos.

Seuraavaksi luetellaan keksinnön mukaisia edullisia yhdisteitä:

H-Tyr-D-Phe-Phe-Phe-NH_2
H-Tyr-Aib-Phe-Phe-NH_2
H-Tyr-D-Nle-Phe-Phe-NH_2
H-Tyr-Pro-Phe-Phe-NH_2
H-Tyr-D-Ala-Phe-2'-Nal-NH_2
H-Tyr-D-Ala-D-Phe-Phe-NH_2
H-Tyr-D-Ala-Phe(4NO_2)-Phe(4NO_2)-NH_2
H-Tyr-D-Ala-Phe-Tic-NH_2 H-Tyr-D-Ala-Phe-Phe(NMe)-NH_2
H-Tyr-D-Ala-Phe-1'Nal-NH_2
H-Tyr-D-Ala-Trp-Phe-NH_2
H-Tyr-D-Ala-Phe-Trp-NH_2
H-Tyr-VAla-Phe-Phe-NH_2
VCH2-Tyr-D-Ala-Phe-Phe-NH_2
H-Tyr-D-Nle-Phe-Trp-NH_2
H-Tyr-D-Nle-Phe-2'-Nal-NH_2
H-Tyr-D-Nle-Trp-Phe-NH_2
H-Tyr-D-Ala-Trp-2'-Nal-NH_2
H-Tyr-D-Nle-Trp-2'-Nal-NH_2
H-Tyr-D-Nle-Trp-Trp-NH_2
H-Tyr-D-Nva-Phe-Phe-NH_2
H-Tyr-D-Ser-Phe-Phe-NH_2
H-Tyr-D-Val-Phe-Phe-NH_2
H-Tyr-D-Leu-Phe-Phe-NH_2
H-Tyr-D-Ile-Phe-Phe-NH_2
H-Tyr-D-Abu-Phe-Phe-NH_2
H-Tyr-Chl-Phe-Phe-NH_2
H-Tyr-Cle-Phe-Phe-NH_2
H-Tyr-D-Arg-Phe-Phe-NH_2
H-Tyr-D-Cys-Phe-Phe-NH_2
H-Tyr-D-Thr-Phe-Phe-NH_2
H-DMT-D-Ser-Phe-Phe-NH_2

Tyr-D-Ala-Phe-Phe-OH trifluoriasetaatti
H-Tyr-D-Ala-Phe-Phg-NH_2 trifluorietikkahapposuola
H-Tyr-D-Arg-Phe-Hph-NH_2 bis-trifluorietikkahappo
H-DMT-D-Ala-Phe-Phe-NH_2 trifluorietikkahappo
H-D-DMT-D-Ala-Phe-Phe-NH_2 trifluorietikkahapposuola
H-Tyr-D-Ala-Phe-Hph-NH_2 trifluorietikkahapposuola
H-Tyr-D-Ala-Phe-Cys(Bzl)-NH_2 trifluorietikkahapposuola
H-Tyr-D-Arg-Hph-Phe-NH_2 bis-trifluorietikkahapposuola
H-Tyr-D-Arg-Phg-Phe-NH_2 bis-trifluorietikkahapposuola
Tyr-D-Ala-Phe-Phe-CH_2OH hydrokloridisuola
H-Tyr-D-Ala-Hph-Phe-NH_2 trifluorietikkahapposuola
H-Tyr-D-Met-Phe-Phe-NH_2 trifluorietikkahapposuola
H-Tyr-D-Arg-Phe-D-Phe-NH_2 bis-trifluorietikkahapposuola
H-Tyr-D-Ala-Phg-Phe-NH_2 trifluorietikkahapposuola
H-Tyr-(D)-Ala-(D)-Phg-Phe-NH_2 trifluorietikkahapposuola
H-Tyr-D-Arg-Phe-Phe(pf)-NH_2 bis-trifluorietikkahapposuola
H-Tyr-D-Arg-Phe-D-Phe(pf)-NH_2 ditrifluorietikkahapposuola
H-Tyr-D-Ala-Phe-Phe(pf)-NH_2 trifluorietikkahapposuola
H-Tyr-D-Ala-Phe-D-Phe(pf)-NH_2 trifluorietikkahapposuola

Seuraavaksi luetellaan keksinnön mukaisia edullisempia yhdisteitä:

H-Tyr-D-Nva-Phe-Phe-NH_2
H-Tyr-D-Ser-Phe-Phe-NH_2
H-Tyr-D-Arg-Phe-Phe-NH_2

Nykyisin tunnettu paras tapa keksinnön suorittamiseksi on käyttää yhdistettä H-Tyr-D-Arg-Phe-Phe-NH_2

Keksintö sisältää myös yhdisteen TAPP H-Tyr-D-Ala-Phe-Phe-NH_2 käytön perifeerisesti vaikuttavana kipulääkkeenä.

On valmistettu joukko yleiseen kaavaan 1 perustuvia tetrapeptidejä ja arvioitu opioidireseptoriligandeina ja systeemisesti vaikuttavina kipua lievittävinä aineina. Nämä yhdis-

teet luetellaan taulukossa 1 niiden vastaavien sitoutumisenestovakioiden ja reseptoriselektiivisyyssuhteiden kanssa.

Tyrosiini voidaan korvata 2',6'-dimetyylityrosiinilla (Dmt) opioidipeptidiyhdisteissä. Kokeet ovat osoittaneet, että tyrosiinin korvaus Dmt'llä R_1-asemassa, ensimmäisessä aminohappotähteessä yleisessä kaavassa 1, lisää opioidipeptidin tehokkuutta μ-reseptorilla joka kaksi kertaluokkaa. Selektiivisyys μ-reseptorille kasvaa kun yhdiste sisältää Dmt'n R_1-asemassa. Tämä korvaus aiheuttaa sitoutumisenesatovakioiden suhteen vastaavan siirtymän, mikä heijastaa kasvanutta μ-reseptoriselektiivisyyttä.

Useilla taulukossa 1 luetelluista yhdisteistä nähdään hyvä μ-reseptoriinsitoutuminen mutta nähdään heikko kivunlievitysteho hiiren vääntelehtimismäärityksessä. Tämä poikkeavuus voi johtua nopeasta proteolyysistä ja/tai nopeasta puhdistumasta. Esimerkiksi kun lipofiilinen prototyyppidermorfiinipeptidi TAPP (BCH1774) altistettiin munuaistiehyeiden solujen ulokkeiden membraaneille, sen havaittiin hajoavan nopeasti 15 - 30 min sisällä. Taulukossa 1 luetelluista yhdisteistä kolmella muulla edullisella yhdisteellä kuin itse TAPP:llä on parantunut kivunlievitysteho in vivo. Nämä kolme yhdistettä ovat H-Tyr-D-Nva-Phe-Phe-NH_2 (BCH2462), H-Tyr-D-Ser-Phe-Phe-NH_2 (BCH2463) ja H-Tyr-D-Arg-Phe-Phe-NH_2 (BCH2687). BCH2462:lla, BCH2463:lla ja BCH2687:lä on osoitettu olevan perifeeristä kivunlievitystä. Näitä peptidejä käytettäessä ei havaittu sentraalista analgeettista vaikutusta edes annoksilla 100 mg/kg hiiren kuumalevytestissä.

Kuten taulukossa 1 osoitetaan, TAPP:n (BCH1774) ED_{50}-arvo on 1,4. H-Tyr-D-Nva-Phe-Phe-NH_2:n (BCH2462), H-Tyr-D-Ser-Phe-Phe-NH_2:n (BCH2463) ja H-Tyr-D-Arg-Phe-Phe-NH_2:n (BC1U687) vastaavat arvot ovat 2,7, 0,5, ja 0,5 vastaavasti. Muiden taulukossa 1 esitettyjen yhdisteiden ED_{50}-arvot ovat näitä arvoja suuremmat. Vaikka BCH2813:n ED_{50}-arvo oli vain 0,15,

sen havaittiin vaikuttavan sentraalisesti annoksilla noin 40 mg/kg kuumalevytestissä.

Nämä tulokset osoittavat, että yhdisteillä BCH1774, BCM462 ja BCH2463 edelleen tapahtuu proteolyysiä, mutta niillä on pitempi puoliintumisaika, ja ne ovat sen vuoksi tehokkampia kipua lievittävinä aineina. Kuviossa 6 verrattiin BCH1774:n (TAPP) ja BCFU463:n (TSPP) aiheuttamien kivunlievitysvaikutusten kestoa in vivo. Käytettäessä 30 mg/kg s.c. BCH2463:a ja 20 mg/kg s.c. BCH1774:ää kuviossa 3 osoitetaan, että BCH1774:n kivunlievitysvaikutus kesti pitempään kuin BCH2463:n, mikä mahdollisesti osoittaa BCH2463:n hieman nopeutuneen in vivo-proteolyysin BCH1774:ään verrattuna.

Kuvioissa 1A-D esitetään morfiinin, BCH2463:n (TSPP), BCH2462:n (TNPP) ja BCFU687:n vaikutukset hiirillä arvioimalla hiirten reaktion kuumalevytestissä. Kuten kuviossa 1A esitetään, annoksella 10 mg/kg morfiinia käsiteltyjen hiirten reaktioaika on noin 17 s. Annoksella 100 mg/kg BCH2463:a käsiteltyjen hiirten reaktioaika (Fig 1B) on noin 9 s verrattuna kontrolliarvoon noin 7 s. Nämä tulokset osoittavat, että vaikka morfiini estää nosiseptiivistä lämpöärsykettä, BCH2463 ei; mutta BCH2463 on tehokas kipua lievittävä aine, mikä nähdään kemiallisesti aiheutetun vääntelehtimisen estolla (kuvio 2). BCH2462:lla ja BCH2687:llä käsiteltyjen hiirten reaktioaika (kuviot 1C, 1D) on noin 8 s, mikä ilmaisee samanlaiset tulokset kuin BCH2463:lla.

On tutkittu BCH2463:n proteolyyttisen metabolian estäjällä DL-tiorfaani eston vaikutuksia, ja myös munuaistiehyeiden solujen ulokkeiden membraanien välittämää BCH2463:n metabolista hajoamista. Saadut tiedot osoittavat, että munuainen voi olla yhdisteen BCH2463 pääasiallinen puhdistuma- ja metaboliapaikka. Kuviosta 2 käy ilmi, että endopeptidaasientsyymi EC24-11, jota DL-tiorfaani estää, on munuaistiehyeiden solujen ulokkeiden uutteen aiheuttaman BCH2463:n proteolyysin alustava välittäjä.

Sekä BCH1774:llä (TAPP) että BCH2462:lla (TNPP) oli tappavat vaikutukset hiiriin annettaessa lääkkeen bolusannostasolla 1 - 5 $mgkg^{-1}$ i.v.. Vastakohtana BCH2463:lla (TSPP) ei hämmästyttävästi ollut lainkaan tappavia vasikutuksia annoksilla jopa 20 $mgkg^{-1}$ i.v.. Lisäksi peptidit olivat turvallisia annettaessa ihonalaisesti (s.c.) annoksilla yli 100 $mgkg^{-1}$. Siksi näiden yhdisteiden haluttu antoreitti on ihonalainen. Täten BCH1774:llä esimerkkinä esitettyä rakennemuotosarjaa voidaan modifioida samalla kun säilytetään keskushermostosta pois sulkeminen jopa niin korkeilla annoksilla kuin 100 $mgkg^{-1}$ s.c. ja voidaan minimoida turmiollinen i.v.-toksisuus. Täten BCH2463 ei ole hiirille tappava annoksilla ainakin jopa 20 $mgkg^{-1}$ (i.v.).

Keksinnön mukaisten peptidien farmaseuttisesti hyväksyttäviä suoloja voidaan muodostaa tavanomaisesti reaktiolla sopivan hapon kanssa. Sopivia happoadditiosuoloja voidaan muodostaa happoja kuten suola-, bromivety-, fosfori-, etikka-, fumaari-, salisyyli-, sitruuna-, maito-, manteli-, viini-, oksaali-, metaanisulfoni- ja muita ammattimiesten tuntemia sopivia happoja lisäämällä.

Keksintö aikaansaa myös farmaseuttisia koostumuksia. Sopivissa koostumuksissa on farmaseuttisesti tehokas määrä keksinnön mukaista peptidiä tai sen farmaseuttisesti hyväksyttäviä suoloja, ja farmaseuttisesti hyväksyttävää väliainetta tai adjuvanttia.

Keksintö aikaansaa myös menetelmän kivun hoitamiseksi eläimillä, kuten nisäkkäillä, mukaan lukien ihmisillä. Menetelmä käsittää vaiheet, joissa potilaalle annetaan farmaseuttisesti tehokas määrä kaavan 1 mukaista peptidiä tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävää suolaa. Voidaan myös käyttää edellä kuvattua farmaseuttista koostumusta.

Seuraavia esimerkkejä käytetään keksinnön paremmin kuvaamiseksi. Nämä esimerkit ovat vain kuvaustarkoituksiin, eikä

niitä ole tarkoitettu keksintöä millään lailla rajoittaviksi.

Esimerkit

Peptidien opioidiaktiivisuus määritettiin in vitro käyttämällä marsun sykkyräsuolen (GPI) pitkittäislihaspreparaattia, ja määritettiin yhdisteiden antinosiseptiivinen aktiivisuus in vivo PBQ-indusoiduilla vääntelehtimismalleilla (perifeerinen aktiivisuus) ja kuumalevytestissä (sentraalinen aktiivisuus) jyrsijöillä. Antinosiseptisyyden antagonia perifeerisellä opioidiantagonistilla N-metyylinalorfiini ja aktiivisuuksien vertailu vääntelehtimis- ja kuumalevytesteissä osoitti, että kivunlievitysvaikutukset olivat pääasiassa perifeerisesti välitettyjä. Perifeerinen kivunlievitys osoitettiin suurella tehokkuudella vääntelehtimistestissä yhdistyneenä alhaiseen tehokkuuteen kuumalevytestissä.

PBQ:n (fenyyli-roo-benzoquinone) aiheuttama vääntelehtiminen hiirillä on eräs sekä sentraalisen että periferaalisen kivunlievityksen määritys. Katso koeprotokollaa varten julkaisua: Sigmund et al.; Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 95, s. 729 (1957), joka liitetään tähän viitteeksi. Sentraalinen kivunlievitys määritettiin kuumalevyvasteen estolla hiirillä. Katso koeprotokollaa varten julkaisua: G. Woolfe ja A. Macdonald; J. Pharmacol. Exp. Ther., 80, s. 300 (1944), joka liitetään tähän viitteeksi. Määritykset, joissa mitattiin opioidireseptoriinsitoutumisaffiniteetit μ- ja δ-reseptoreille, samoin kuin GPI- ja MVD-määritykset määritettiin koeprotokollalla, joka esitetään julkaisussa: Schiller et al.; Biophys. Res. Commun. 85, s. 1322 (1975), joka liitetään tähän viitteeksi.

Keksinnön mukaiset yhdisteet valmistettiin alla pääpiirteittäin esitettyä ja ammattimiesten yleisesti tuntemaa kiintofaasisynteesiä käyttämällä.

Esimerkki 1

Opioidipeptidien kiintofaasipeptidisynteesit

Synteettiset peptidit valmistettiin käyttämällä Rink*[1] -hartsia, 4-(2',4'-dimetoksi-fenyyli-Fmoc-aminometyyli)-fenoksihartsia (Novabiochem tai Advanced Chemtech) ja kunkin syntetisoitavan peptidin asiaankuuluvaa C-terminaalista Nα-Fmoc-L-aminohappotähdettä.

Kaikkien L- ja D-aminohappojen (Novabiochem yhtiöstä Advanced Chemtech) α-ryhmä oli Fmoc-suojattu (9-fluorenyyli-metyylioksikarbonyyli), ja niissä oli seuraavat sivuketjusuojaryhmät: t-butyylieetteri (tBu) seriinille, treoniinille ja tyrosiinille; t-butyyliesteri (OtBu) asparagiinihapolle ja glutamiinille;

t-butyylioksikarbonyyli (tboc) lysiinille ja 2,2,5,7,8-pentametyylkromaani-6-sulfonyyli (pmc) arginiinille ja trityyli (trt) kysteiinille.

Dimetyyliformamidi (Anachemia) oli dimetyyliamiinittomasti puhdasta, ja se käsiteltiin aktivoiduilla 4 Å molekyyliseuloilla. Piperidiiniä (Advanced Chemtech) käytettiin enempää puhdistamatta. DCC (disykloheksyylikarbodi-imidi) ja HOBT (hydroksibentsotriatsoli) saatiin yhtiöstä Fluka ja Advanced Chemtech, vastaavasti.

Kiintofaasipeptidisynteesit suoritettiin manuaalisesti Rink*[2]-hartsilla. Panosmäärä oli noin 0,6 mmol/g. Peptidikondensointi suoritettiin käyttämällä: 1) Kytkentää: 2 ekvivalenttia kutakin Fmoc-aminohappoa, HOBT:tä ja DCC:tä DMF:ssä 1 - 4 tunnin ajan huoneenlämpötilassa. 2) Uudelleenkytkentä: 1 ekvivalentti kutakin Fmoc-aminohaposta, HOBT:stä ja DCC:stä. 3) Asetylointi: 20-%:ista (tilavuus/tilavuus)

---

* merkitsee tavaramerkkiä

$(CH_3CO)_2O$/DCM:ää 1 tunnin ajan huoneenlämpötilassa. 4) N-α-Fmoc-suojauksenpoisto: 20-%:ista (tilavuus/tilavuus) piperidiiniä DMF:ssä 25 min ajan.

Sivuketjusuojaryhmien (tBu, Boc, Trt, Pmc) poisto ja peptidin katkaisu hartsista suoritettiin TFA:ta sisältävällä koktaililla (tilavuus/tilavuus) 55/5/40 TFA/anisoli/DCM 90 min ajan huoneenlämpötilassa N_2:ssa. Peptidi saostettiin dietyylieetteristä, suodatettiin ja kuivattiin. Raaka peptidi puhdistettiin ja analysoitiin HPLC:llä käänteisfaasikolonnilla gradienttieluoinnilla käyttäen 0,06-%:ista TFA/H_2O:ta ja 0,06-%:ista TFA/asetonitriiliä.

Esimerkki 2

Kuumalevymääritys

Kivunlievitysaktiivisuuden määritys

Tähän testiin käytettiin koiraspuolisia CD #1 -hiiriä, joiden paino oli välillä 20 ja 25 g. Hiiret punnittiin, merkittiin, ja jaettiin 10 eläimen ryhmiin.

Hiiret käsiteltiin tavallisesti yhdisteen (tai standardin tai väliaineen) ihonalaisella injektiolla injektiotilavuudessa, joka vastasi tasoa 0,1 ml/10 g p.c. (10 ml/kg). Antagonistia kuten nalaksoni tai N-metyyli-levallorfaani käytettäessä se annettiin vatsaontelonsisäisesti 20 min ennen yhdistettä (tai standardia tai väliainetta). Injektiotilavuus oli jälleen 0,1 ml/10 g p.c. Antagonistiannos oli 10 mg/kg.

Hiiriä tarkkailtiin yksilöllisesti reaktioajan suhteen kuumalla levyllä. Kuuman levyn (Sorel, malli DS37) lämpötila oli säädetty tasolle 55 °C. Hiirtä tarkkailtiin epämukavuusmerkkien kuten käpälien nuolemisen tai ravistelun, pakoyritysten (levyltä hyppäämisen) tai vapinan suhteen. Reaktioajaksi katsottiin hetki, jolloin nähtiin joku näistä merkeistä, ja se merkittiin muistiin yksikössä "s". Kutakin hiirtä tarkkailtiin enintään 30 s ajan käpälän kudosvaurion

välttämiseksi. Hiiriä voidaan tarkkailla eri aikaväleillä yhdisteen (tai väliaineen tai standardin) annon jälkeen. Aikavälit voivat olla 30, 60 tai 120 min (tai muita).

Kullakin aikalukemalla kontrolliryhmän keskimääräinen reaktioaika kerrottiin 1,5:llä. Kunkin käsitellyn hiiren reaktioaikaa verraattiin "kontrollikeskiarvoon X 1,5.". Jos reaktioaika oli pienempi kuin "kontrollikeskiarvo X 1,5.", katsottiin, ettei hiireen ollut kohdistunut kivunlievitysvaikutusta. Jos reaktioaika oli suurempi kuin "kontrollikeskiarvo X 1,5", niin hiireen katsottiin kohdistuneen kivunlievitysvaikutusta. Kivulievitystä saaneiden hiirten lukumäärä ryhmässä määräsi yhdisteen kivunlievitys-%-osuuden tälle lukemalle. Jos kivunlievitys-%-osuus oli alle 30 %, yhdistettä pidettiin ei-aktiivisena.

Esimerkki 3
Vääntelehtimismääritys
Vääntelyiden mittaus

Testi suoritettiin koiraspuolisilla CD #1 -hiirillä, joiden paino oli välillä 18 ja 22 g. Hiiret punnittiin ja merkittiin. Niille injisoitiin vatsaontelonsisäisesti 0,3 ml/20 g painoa liuosta, jossa oli fenyylikinonia tasolla 0,02 %. Laskjettiin vääntelyt, jotka ilmenivät 15-min ajanjaksolla injektion jälkeen. Fenyylikinoni injisoitiin aikavälein 5, 20 tai 60 min yhdisteen (tai väliaineen tai standardin) ihonalaisen annon jälkeen. Se injisoitiin aikavälein 60 min yhdisteen (tai väliaineen tai standardin) oraalisen annon jälkeen;

0,02-%:inen fenyylikinoni[3]-liuos valmistettiin seuraavalla tavalla. 20 mg fenyylikinonia liuotettiin 5 ml:aan 90-%:ista etanolia (sigma, reagenssi, alkoholi). Liuennut fenyylikinoni lisättiin hitaasti 95 ml:aan tislattua vettä, jota ravis-

---

** 2-fenyyli-1,4-bentsokinoni (Sigma)

teltiin jatkuvasti ja joka oli esikuumennettu (ei keitetty). Fenyylikinoniliuos suojattiin aina valolta, ja jokaisena testipäivänä valmistettiin uusi liuos. On suositeltavaa odottaa 2 tuntia ennen fenyylikinoniliuoksen käyttöä.

Testi voidaan suorittaa samalla kertaa 5 hiirellä. Kukin ryhmä sisälsi tavallisesti 10 hiirtä. Jos käytettiin antagonistia, kuten naloksonia, se annettiin 20 min ennen yhdistettä (tai väliainetta tai standardia) vatsaontelonsisäisesti.

Taulukko I

BCH#	Sekvenssi	K_i^{μ} [nM]	K_i^{δ}/K_i^{μ}	GPI (IC_{50}) [nM]	ED_{50} (PBQ) mg/kg (20min)	Kuuma Levy mg/kg
1774	H-Tyr-D-Ala-Phe-Phe-NH_2	1,53	409	3	1,4	>100
753	H-Tyr-D-Phe-Phe-Phe-NH_2	3,63	37,7	247	>20	
754	H-Tyr-Aib-Phe-Phe-NH_2			73	>20	
755	H-Tyr-D-Nle-Phe-Phe-NH_2	0,968	373	15	2,5 (5 min)	
756	H-Tyr-Pro-Phe-Phe-NH_2	4,10	182	15	>20	
757	H-Tyr-D-Ala-Phe-2'-Nal-NH_2	0,655	119	2	1,1 (5 min)	
758	H-Tyr-D-Ala-2'-Nal-1'-Nal-NH_2	5,61	102	-	>20	
1775	H-Tyr-D-Ala-D-Phe-Phe-NH_2	26,0	82,7	925		
1776	H-Tyr-D-Ala-Phe-Phe(4-NO_2)-NH_2	0,509	129	8	4	
1777	H-Tyr-D-Ala-Phe(4-NO_2)-Phe(4-NO_2)-NH_2	0,826	570	6	>20	

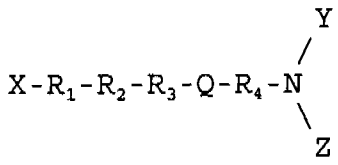
BCH#	Sekvenssi	K_i^{μ} [nM]	K_i^{δ}/K_i^{μ}	GPI (IC_{50}) [nM]	ED_{50} (PBQ) mg/kg (20min)	Kuuma Levy mg/kg
1778	H-Tyr-D-Ala-Phe-Phe(4-N_3)-NH_2	1,49	107	50		
1779	H-Tyr-D-Ala-Phe(4-NO_2)-Phe-NH_2	56,8	24,3	77		
1780	H-Tyr-D-Ala-Phe-Tic-NH_2	12,7	279	-		
1781	H-Tyr-D-Ala-Phe-Phe(NMe)-NH_2	22,6	215	241		
1782	H-Tyr-D-Ala-Phe-1'-Nal-NH_2	0,981	174	2	>20	
1783	H-Tyr-D-Ala-1'-Nal-1'-Nal-NH_2	2,88	410	-	>20	
1784	H-Tyr-D-Ala-Trp-Phe-NH_2	3,57	238	20	>20	
1785	H-Tyr-D-Ala-Phe-Trp-NH_2	2,21	214	16	>20	
1786	H-Tyr-D-Ala-Trp-Trp-NH_2	0,833	783		10	
1787	H-Tyr-∇Ala-Phe-Phe-NH_2				10	
2202	∇CH_2Tyr-D-Ala-Phe-Phe-NH_2				>10	

BCH#	Sekvenssi	K_i^{μ} [nM]	K_i^{δ}/K_i^{μ}	GPI (IC_{50}) [nM]	ED_{50} (PBQ) mg/kg (20min)	Kuuma Levy mg/kg
2208	H-Tyr-D-Nle-Phe-Trp-NH_2				>3	
2211	H-Tyr-D-Nle-Phe-2'-Nal-NH_2				>10	
2212	H-Tyr-D-Nle-Trp-Phe-NH_2				>10	
2213	H-Tyr-D-Ala-Trp-2'-Nal-NH_2				>5	
2214	H-Tyr-D-Nle-Trp-2'-Nal-NH_2				15	
2217	H-Tyr-D-Nle-Trp-Trp-NH_2				>5	
2462	H-Tyr-D-Nva-Phe-Phe-NH_2				2,7	>100
2463	H-Tyr-D-Ser-Phe-Phe-NH_2	2,2		13	0,5	>100
2464	H-Tyr-D-Val-Phe-Phe-NH_2				>10	
2465	H-Tyr-D-Leu-Phe-Phe-NH_2				>10	
2473	H-Tyr-D-Ile-Phe-Phe-NH_2				>10	

BCH#	Sekvenssi	K_i^{μ} [nM]	K_i^{δ}/K_i^{μ}	GPI (IC_{50}) [nM]	ED_{50} (PBQ) mg/kg (20min)	Kuuma Levy mg/kg
2577	H-Tyr-D-Abu-Phe-Phe-NH_2				>10	
2578	H-Tyr-Chl-Phe-Phe-NH_2				>10	
2579	H-Tyr-Cle-Phe-Phe-NH_2				>10	
2687	H-Tyr-D-Arg-Phe-Phe-NH_2	0,88	2480	8,71	0,5	>100
2690	H-Tyr-D-Cys-Phe-Phe-NH_2				6,2	>100
2811	H-Tyr-D-Thr-Phe-Phe-NH_2				12	
2813	H-Dmt-D-Ser-Phe-Phe-NH_2				0,15	-40
3237	H-Dmt-D-Ala-Phe-Phe-NH_2	0,16	26,4	0,34		
3238	H-Dmt-D-Ala-Phe-Phe-NH_2	71,8	3,1			
3240	H-Tyr-D-Ala-Phe-Cys(Bzl)NH_2	5,3	57,3	9,16		
3241	H-Tyr-D-Arg-Phe-Cys(Bzl)NH_2	6,95	46,8	33,05		

Patenttivaatimukset

1. Kaavan (1) mukainen yhdiste:



(1)

ja sen johdannaiset ja analogit, joilla on perifeeristä kivunlievitysvaikutusta,

t u n n e t t u siitä, että

X on H tai C_{1-6}-alkyyli;

Y ja Z ovat tosistaan riippumatta H, syklinen aralkyyli tai C_{1-6}-alkyyli;

R_1 on tyrosyylitähde, 2',6'-dimethyltyrosyylitähde, tai sen analogi tai johdannainen;

R_3 on aromaattinen aminohappo;

R_4 on aromaattinen aminohappotähde;

R_2 on aminohappo, jolla on R-konfiguraatio, sillä ehdolla, että

kun R_1 on tyrosyylitähde, R_2 on D-alaniini, X, Y ja Z ovat H, ja R_3 on fenyylialaniini, niin R_4 ei ole fenyylialaniini, joka on substituoimaton tai substituoitu $4NO_2$:lla tai $4N_3$:lla;

kun R_1 on tyrosyylitähde, R_2 on D-alaniini, X, Y ja Z ovat H, ja R_4 on fenyylialaniini, niin R_3 ei ole fenyylialaniini, joka on substituoimaton tai substituoitu $4NO_2$:lla;

kun R_1 on tyrosyylitähde, R_2 on D-alaniini, X, Y ja Z ovat H, ja R_4 on 1'-naftyylialaniini, niin R_3 ei ole 1'-naftyylialaniini tai 2'-naftyylialaniini; ja

kun R_1 on tyrosyylitähde, R_2 on D-alaniini, ja X, Y ja Z ovat H, niin sekä R_3 että R_4 eivät ole tryptofaani; ja

Q on amidisidos tai väliin pantu amidisidoksen jäljittelijä,

ja jolloin H-Tyr-D-Phe-Phe-Phe-NH_2,

H-Tyr-D-NMePhe-Phe-Phe-NH_2,

H-Tyr-D-Tic-Phe-Phe-NH_2,

H-Tyr-Pro-Phe-Thr(Bzl)-NH_2,

H-Tyr-Pro-Phe-Phe-NH_2,
H-Tyr-Pro-Phe-Apb-NH_2,
H-Tyr-Pro-Phe-App-NH_2,
H-Tyr-Pro-Phe-Aph-NH_2,
H-Tyr-Pro-Apb-Phe-NH_2
jossa Apb tarkoittaa 2-amino-4-fenyylivoihappoa, App 2-amino-5-fenyylipentaanihappoa ja Aph 2-amino-6-fenyyliheksaanihappoa, on suljettu pois.

2. Patenttivaatimuksen 1 kaavan (1) mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että X on H.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 kaavan (1) mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että R_2 on aminohappotähde, jolla on R-konfiguraatio, sillä ehdolla, että kun R_1 on tyrosyylitähde, R_2 on D-alaniini ja Y ja Z ovat H, niin R_3 ja R_4 ovat erilaisia ja ovat fenyylialaniini tai tryptofaani.

4. Patenttivaatimuksen 1 tai patenttivaatimuksen 2 kaavan (1) mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että
Q on amidisidos tai väliin pantu amidisidoksen jäljittelijä, jolla on kaava Q_1-Q_2, jossa Q_1 on CH_2, CHOH, C=O, C=S tai CH=, ja
Q_2 on CH_2, NH, S, SO, SO_2, O tai CH=, sillä ehdolla, että kun Q_1 on CH=, niin Q_2 on CH=.

5. Patenttivaatimuksen 3 kaavan (1) mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että
Q on amidisidos tai väliin pantu amidisidoksen jäljittelijä, jolla on kaava Q_1-Q_2, jossa Q_1 on CH_2, CHOH, C=O, C=S tai CH=, ja
Q_2 on CH_2, NH, S, SO, SO_2, O tai CH=, sillä ehdolla, että kun Q_1 on CH=, niin Q_2 on CH=.

6. Patenttivaatimuksen 1, 2 tai 5 kaavan (1) mukainen yhdiste,
t u n n e t t u siitä, että

Y ja Z ovat H;
R_3 ja R_4 ovat toisistaan riippumatta aromaattisia aminohappoja; ja
R_2 on aminohappo, jolla on R-konfiguraatio, sillä ehdolla, että kun R_1 on tyrosyylitähde, R_2 on D-alaniini, niin R_3 ja R_4 ovat erilaisia ja ovat fenyylialaniini tai tryptofaani.

7. Patenttivaatimuksen 4 kaavan (1) mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että
Y ja Z ovat H;
R_3 ja R_4 ovat toisistaan riippumatta aromaattisia aminohappoja; ja
R_2 on aminohappo, jolla on R-konfiguraatio, sillä ehdolla, että kun R_1 on tyrosyylitähde, R_2 on D-alaniini, niin R_3 ja R_4 ovat erilaisia ja ovat fenyylialaniini tai tryptofaani.

8. Patenttivaatimuksen 6 kaavan (1) mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että
R_2 on aminohappo, jolla on R-konfiguraatio, sillä ehdolla, että R_2 ei ole D-alaniini; ja
R_3 ja R_4 ovat fenyylialanyylitähteitä.

9. Patenttivaatimuksen 7 kaavan (1) mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että
R_2 on aminohappo, jolla on R-konfiguraatio, sillä ehdolla, että
R_2 ei ole D-alaniini; ja
R_3 ja R_4 ovat fenyylialanyylitähteitä.

10. Patenttivaatimuksen 6 mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että
R_1 on tyrosyylitähde;
R_2 on D-norvaliini, D-seriini tai D-arginiini;
R_3 ja R_4 ovat fenyylialanyylitähteitä; ja
Q on amidisidos.

11. Patenttivaatimuksen 7 mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että

R_1 on tyrosyylitähde;

R_2 on D-norvaliini, D-seriini tai D-arginiini;

R_3 ja R_4 ovat fenyylialanyylitähteitä; ja

Q on amidisidos.

12. Patenttivaatimuksen 1 mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että se on:

H-Tyr-D-Phe-Phe-Phe-NH_2;

H-Tyr-Aib-Phe-Phe-NH_2;

H-Tyr-D-Nle-Phe-Phe-NH_2;

H-Tyr-D-Ala-Phe-2'-Nal-NH_2;

H-Tyr-D-Ala-D-Phe-Phe-NH_2;

H-Tyr-D-Ala-Phe($4NO_2$)-Phe($4NO_2$)-NH_2;

H-Tyr-D-Ala-Phe-Tic-NH_2;

H-Tyr-D-Ala-Phe-Phe(NMe)-NH_2;

H-Tyr-D-Ala-Phe-1'Nal-NH_2;

H-Tyr-D-Ala-Trp-Phe-NH_2;

H-Tyr-D-Ala-Phe-Trp-NH_2;

H-Tyr-ψAla-Phe-Phe-NH_2;

ψCH2-Tyr-D-Ala-Phe-Phe-NH_2;

H-Tyr-D-Nle-Phe-Trp-NH_2;

H-Tyr-D-Nle-Phe-2'-Nal-NH_2;

H-Tyr-D-Nle-Trp-Phe-NH_2;

H-Tyr-D-Ala-Trp-2'-Nal-NH_2;

H-Tyr-D-Nle-Trp-2'-Nal-NH_2;

H-Tyr-D-Nle-Trp-Trp-NH_2;

H-Tyr-D-Nva-Phe-Phe-NH_2;

H-Tyr-D-Ser-Phe-Phe-NH_2;

H-Tyr-D-Val-Phe-Phe-NH_2;

H-Tyr-D-Leu-Phe-Phe-NH_2;

H-Tyr-D-Ile-Phe-Phe-NH_2;

H-Tyr-D-Abu-Phe-Phe-NH_2;

H-Tyr-Chl-Phe-Phe-NH_2;

H-Tyr-Cle-Phe-Phe-NH_2;

H-Tyr-D-Arg-Phe-Phe-NH_2;

H-Tyr-D-Cys-Phe-Phe-NH_2;
H-Tyr-D-Thr-Phe-Phe-NH_2;
H-DMT-D-Ser-Phe-Phe-NH_2;
Tyr-D-Ala-Phe-Phe-OH trifluoriasetaatti;
H-Tyr-D-Ala-Phe-Phg-NH_2 trifluorietikkahapposuola;
H-Tyr-D-Arg-Phe-Hph-NH_2 bis-trifluorietikkahappo;
H-DMT-D-Ala-Phe-Phe-NH_2 trifluorietikkahappo;
H-D-DMT-D-Ala-Phe-Phe-NH_2 trifluorietikkahapposuola;
H-Tyr-D-Ala-Phe-Hph-NH_2 trifluorietikkahapposuola;
H-Tyr-D-Ala-Phe-Cys(Bzl)-NH_2 trifluorietikkahapposuola;
H-Tyr-D-Arg-Hph-Phe-NH_2 bis-trifluorietikkahapposuola;
H-Tyr-D-Arg-Phg-Phe-NH_2 bis-trifluorietikkahapposuola;
Tyr-D-Ala-Phe-Phe-CH_2OH hydrokloridisuola;
H-Tyr-D-Ala-Hph-Phe-NH_2 trifluorietikkahapposuola;
H-Tyr-D-Met-Phe-Phe-NH_2 trifluorietikkahapposuola;
H-Tyr-D-Arg-Phe-D-Phe-NH_2 bis-trifluorietikkahapposuola;
H-Tyr-D-Ala-Phg-Phe-NH_2 trifluorietikkahapposuola;
H-Tyr-(D)-Ala-(D)-Phg-Phe-NH_2 trifluorietikkahapposuola;
H-Tyr-D-Arg-Phe-Phe(pf)-NH_2 bis-trifluorietikkahapposuola;
H-Tyr-D-Arg-Phe-D-Phe(pf)-NH_2 ditrifluorietikkahapposuola;
H-Tyr-D-Ala-Phe-Phe(pf)-NH_2 trifluorietikkahapposuola;
H-Tyr-D-Ala-Phe-D-Phe(pf)-NH_2 trifluorietikkahapposuola.

13. Patenttivaatimuksen 1 mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että mainittu yhdiste on H-Tyr-D-Nva-Phe-Phe-NH_2.

14. Patenttivaatimuksen 1 mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että mainittu yhdiste on H-Tyr-D-Ser-Phe-Phe-NH_2.

15. Patenttivaatimuksen 1 mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että mainittu yhdiste on H-Tyr-D-Arg-Phe-Phe-NH_2.

16. Farmaseuttinen koostumus, jolla on kivunlievitysaktiivisuutta, t u n n e t t u siitä, että se sisältää tehokkaan määrän ainakin yhtä patenttivaatimuksen 1, 12, 13, 14 tai 15 mukaista yhdistettä seoksena farmaseuttisesti hyväksyttävän väliaineen kanssa.

17. Farmaseuttinen koostumus, jolla on perifeeristä kivunlievitysaktiivisuutta, t u n n e t t u siitä, että se sisältää tehokkaan määrän ainakin yhtä patenttivaatimuksen 3 mukaista yhdistettä seoksena farmaseuttisesti hyväksyttävän väliaineen kanssa.

18. Farmaseuttinen koostumus, jolla on perifeeristä kivunlievitysaktiivisuutta, t u n n e t t u siitä, että se sisältää tehokkaan määrän ainakin yhtä patenttivaatimuksen 4 mukaista yhdistettä seoksena farmaseuttisesti hyväksyttävän väliaineen kanssa.

19. Farmaseuttinen koostumus, jolla on perifeeristä kivunlievitysaktiivisuutta, t u n n e t t u siitä, että se sisältää tehokkaan määrän ainakin yhtä patenttivaatimuksen 6 mukaista yhdistettä seoksena farmaseuttisesti hyväksyttävän väliaineen kanssa.

20. Patenttivaatimuksen 16 mukainen farmaseuttinen koostumus, t u n n e t t u siitä, että se sisältää edelleen tehokkaan määrän ainakin yhtä muuta terapeuttisesti aktiivista ainetta.

21. Patenttivaatimuksen 17, 18 tai 19 mukainen farmaseuttinen koostumus, t u n n e t t u siitä, että se sisältää edelleen tehokkaan määrän ainakin yhtä muuta terapeuttisesti aktiivista ainetta.

22. Yhdisteen H-Tyr-D-Ala-Phe-Phe-NH_2 tai sen analogien tai sen farmaseuttisten johdannaisten käyttö kivun hoitoon tarkoitetun perifeerisen kipulääkkeen valmistukseen.

23. Patenttivaatimuksen 1, 12, 13, 14 tai 15 mukaisen yhdisteen ja sen farmaseuttisten johdannaisten käyttö kivun hoitoon tarkoitetun ferifeerisen kipulääkkeen valmistukseen.

24. Patenttivaatimuksen 3 mukaisen yhdisteen ja sen farmaseuttisten johdannaisten käyttö kivun hoitoon tarkoitetun perifeerisen kipulääkkeen valmistukseen.

25. Patenttivaatimuksen 4 mukaisen yhdisteen ja sen farmaseuttisten johdannaisten käyttö kivun hoitoon tarkoitetun perifeerisen kipulääkkeen valmistukseen.

26. Patenttivaatimuksen 6 mukaisen yhdisteen ja sen farmaseuttisten johdannaisten käyttö kivun hoitoon tarkoitetun perifeerisen kipulääkkeen valmistukseen.

27. Patenttivaatimuksen 22 mukainen käyttö, t u n n e t t u siitä, että mainittu analogi on:
H-Tyr-D-Ala-Phe-Phe(4-NO_2)-NH_2, tai
H-Tyr-D-Ala-Phe-Phe-(4-N_3)-NH_2.

Fig. 1A

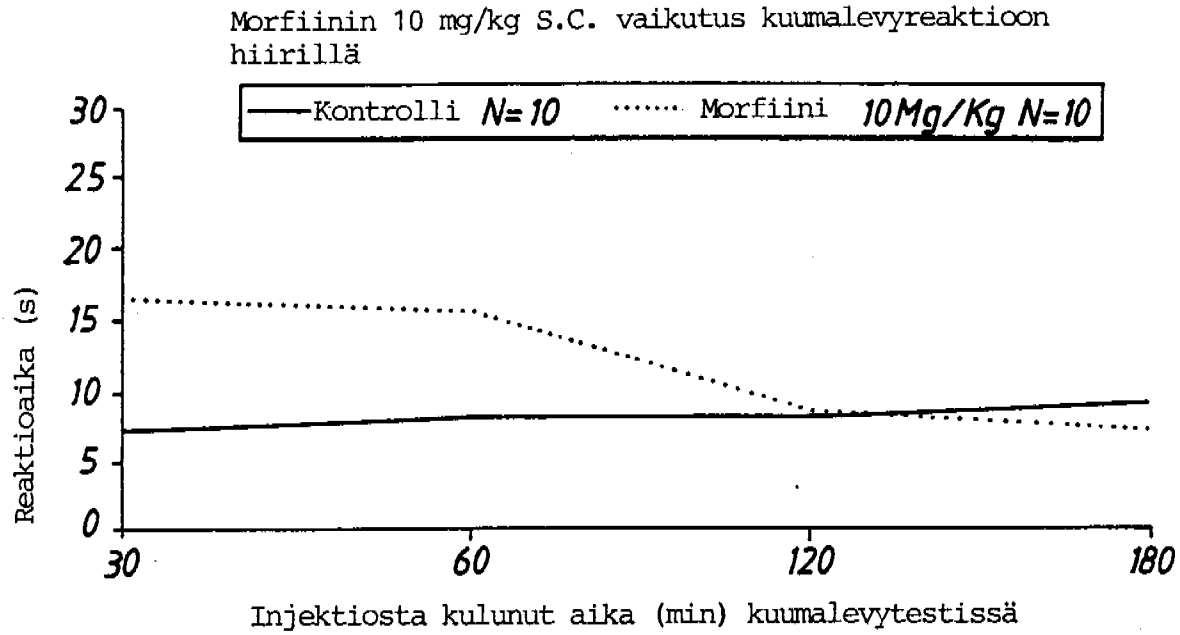

Morfiinin 10 mg/kg S.C. vaikutus kuumalevyreaktioon hiirillä
Kontrolli N=10
Morfiini 10Mg/Kg N=10
Reaktioaika (s)
0
5
10
15
20
25
30
30
60
120
180
Injektiosta kulunut aika (min) kuumalevytestissä

Fig. 1B

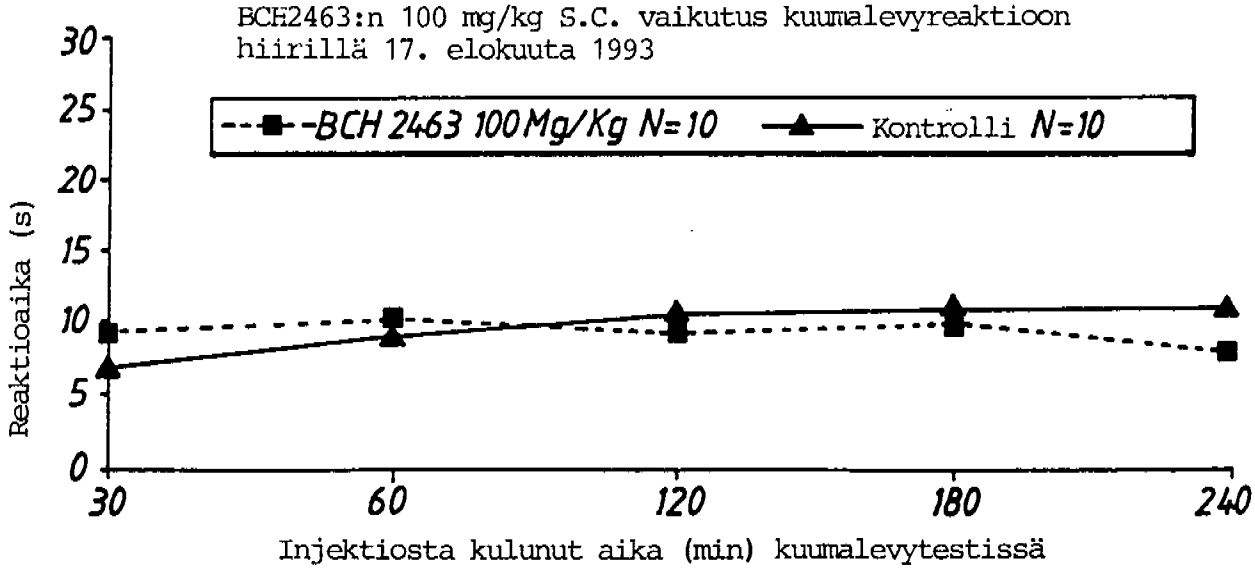

BCH2463:n 100 mg/kg S.C. vaikutus kuumalevyreaktioon hiirillä 17. elokuuta 1993
BCH 2463 100Mg/Kg N=10
Kontrolli N=10
Reaktioaika (s)
0
5
10
15
20
25
30
30
60
120
180
240
Injektiosta kulunut aika (min) kuumalevytestissä

Fig.1C

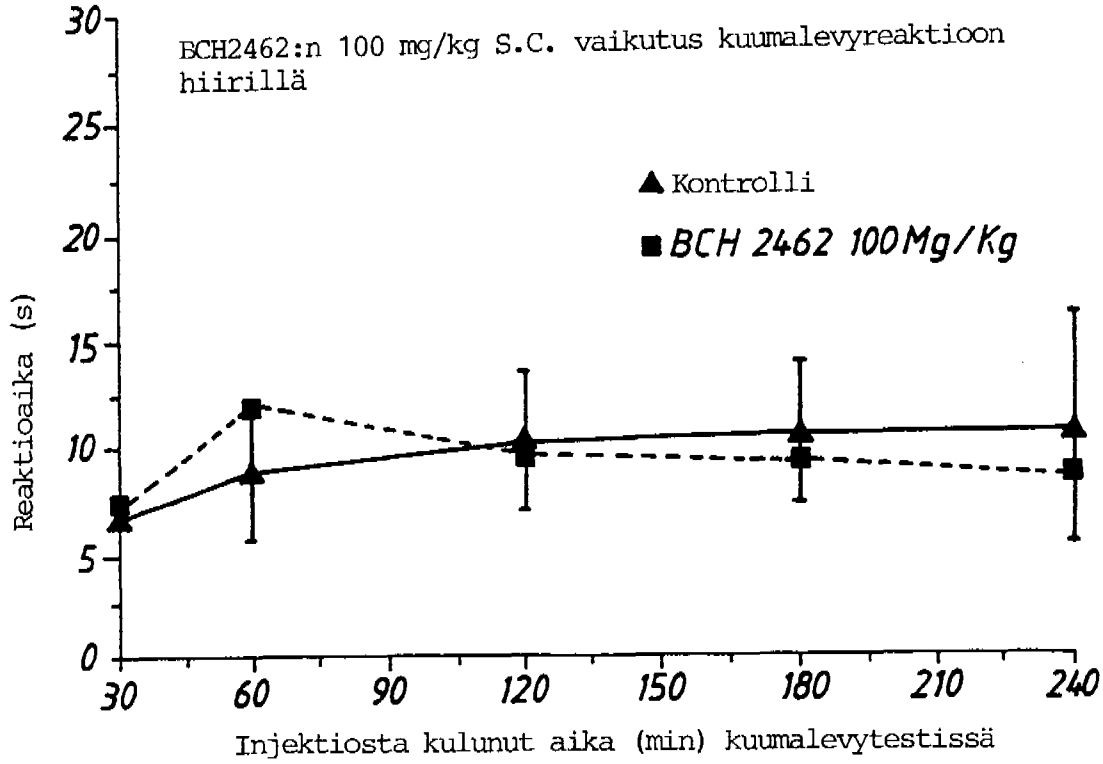

BCH2462:n 100 mg/kg S.C. vaikutus kuumalevyreaktioon hiirillä
Kontrolli
BCH 2462 100Mg/Kg
Reaktioaika (s)
0
5
10
15
20
25
30
30
60
90
120
150
180
210
240
Injektiosta kulunut aika (min) kuumalevytestissä

Fig.1D

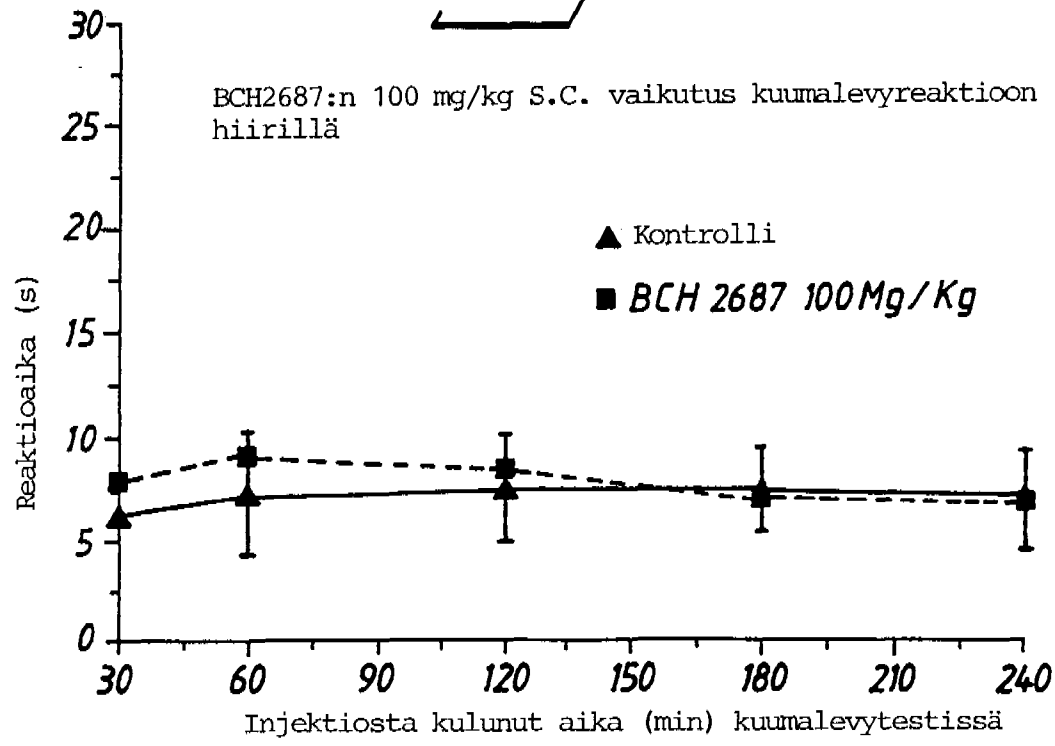

BCH2687:n 100 mg/kg S.C. vaikutus kuumalevyreaktioon hiirillä
Kontrolli
BCH 2687 100Mg/Kg
Reaktioaika (s)
0
5
10
15
20
25
30
30
60
90
120
150
180
210
240
Injektiosta kulunut aika (min) kuumalevytestissä

Fig. 2

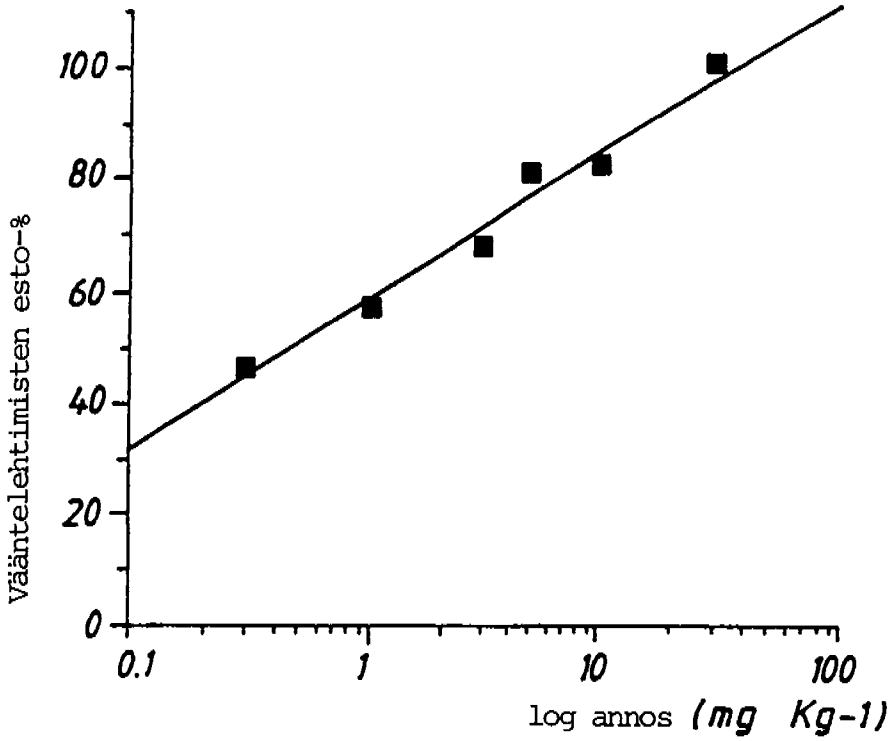
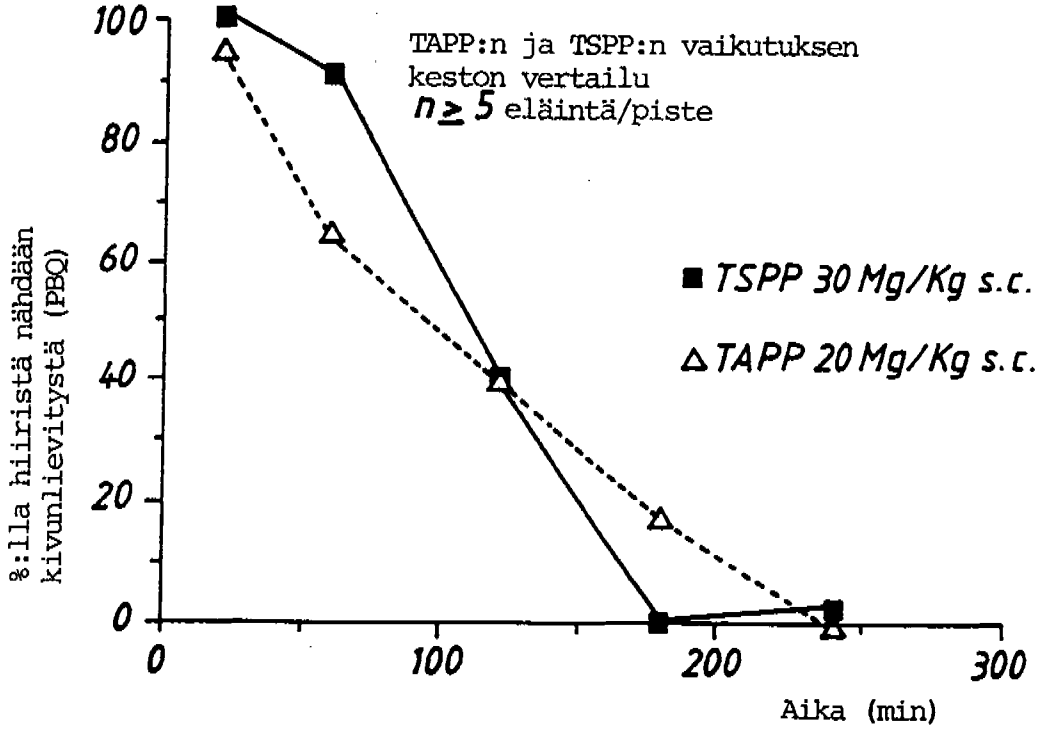

Väänteleh timisten esto-%
100
80
60
40
20
0
0.1
1
10
100
log annos (mg Kg-1)

Fig. 3


TAPP:n ja TSPP:n vaikutuksen
keston vertailu
n ≥ 5 eläintä/piste
%:lla hiiristä nähdään
kivunlievitystä (PBQ)
100
80
60
40
20
0
0
100
200
300
Aika (min)
TSPP 30 Mg/Kg s.c.
TAPP 20 Mg/Kg s.c.