

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2003-2798

(13) Druh dokumentu: **A3**

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **19.03.2002**
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **21.03.2001**
(31) Číslo prioritní přihlášky: **2001/01107026**
(33) Země priority: **EP**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **20.06.2007**
(Věstník č. 25/2007)
(86) PCT číslo: **PCT/EP2002/003032**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2002/074297**

(51) Int. Cl.:

A61K 38/05 (2006.01)
A61P 23/00 (2006.01)

(71) Přihlašovatel:

SCHWARZ PHARMA AG; Monheim, DE

(72) Původce:

Selve Norma, Troisdorf, DE

(74) Zástupce:

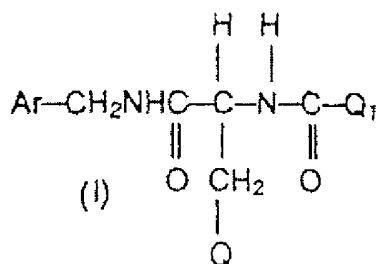
jr., JUDr. Ph.D. Karel Čermák, Národní 32, Praha 1,
11000

(54) Název přihlášky vynálezu:

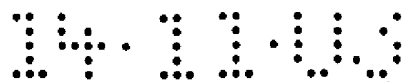
**Nové použití sloučeniny peptidové třídy pro
léčbu allodynie nebo dalších odlišných typů
chronické nebo fantomové bolesti**

(57) Anotace:

Řešení se týká použití sloučenin vzorce I pro léčbu alodynie, jako hlavního a jedinečného symptomu bolesti, nezávislé na původu základního onemocnění, ale často spojenou s neuropatickou bolestí nebo jinými odlišnými typy chronické nebo fantomové bolesti.



CZ 2003 - 2798 A3



Nové použití sloučeniny peptidové třídy pro léčbu alodynie nebo dalších odlišných typů chronické nebo fantomové bolesti.

Dosavadní stav techniky

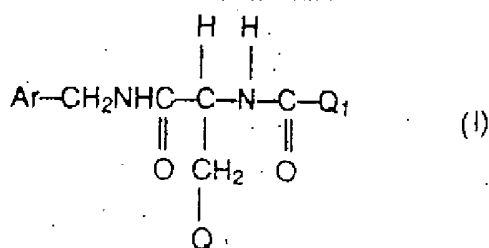
Předkládaný vynález souvisí s novým použitím skupiny specifických aminokyselinových derivátů podle vzorce I pro přípravu farmaceutických směsí, užitečných pro léčbu alodynie, jako hlavního a jedinečného symptomu bolesti, nezávislé na původu základního onemocnění, ale často spojenou s neuropatickou bolestí nebo jinými odlišnými typy chronické nebo fantomové bolesti. Předkládaný vynález zejména souvisí s novým použitím harkoseridu a jeho derivátů pro přípravu farmaceutických směsí, užitečných pro léčbu alodynie, jako hlavního a jedinečného symptomu bolesti, nezávislé na původu základního onemocnění, ale často spojenou s neuropatickou bolestí nebo jinými odlišnými typy chronické nebo fantomové bolesti.

Chemický název SPM 927, který je zde také označován jako harkoserid, je (R)-2-acetamido-N-benzyl-3-methoxypropionamid.

Sloučeniny vynálezu jsou známá činidla, užitečná v protizáchvatové léčbě u poruch centrálního nervového systému, takových, jako epilepsie, mrtvice a mozková ischemie.

Tento vynález se zabývá novým použitím sloučeniny Vzorce I, níže, pro přípravu farmaceutických směsí, užitečných pro léčbu bolesti, hlavně pro poruchy chronické bolesti a zejména pro léčbu alodynie, jako hlavního a jedinečného symptomu bolesti, nezávislé na původu základního onemocnění, ale často spojenou s neuropatickou bolestí nebo jinými odlišnými typy chronické nebo fantomové bolesti a ušního šelestu.

Podle vynálezu, jsou to ty sloučeniny, mající Vzorec I



Vzorec I

nebo jejich farmaceuticky přijatelná sůl, kde

Ar je fenyl, který je nesubstituovaný nebo substituovaný alespoň jednou halo skupinou;

Q je nižší alkoxy obsahující 1-3 uhlíkové atomy a Q₁ je methyl;

ve vynálezu jsou zahrnuty diastereomery a enantiomery sloučenin Vzorce I.

Přednostní sloučeniny vynálezu jsou ty, podle Vzorce I, kde sloučeniny jsou (R), (S) nebo (R,S) isomer.

Nejpřednostnější sloučenina vynálezu je (R)-2-acetamido-N-benzyl-3-methoxypropionamid nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl.

Bolest je subjektivní zkušenost a vnímání bolesti je zprostředkováno ve specifických částech centrálního nervového systému (CNS).

Obvykle škodlivé (periferní) stimuly jsou předem přeneseny do centrálního nervového systému, ale bolest není vždy spojena s nocicepcí.

Existuje značná rozmanitost různých typů klinické bolesti, která je odvozena od odlišných základních patofyziologických

mechanismů a která bude potřebovat odlišné léčebné přístupy.

Vnímání bolesti může být charakterizováno třemi hlavními typy klinické bolesti:

- akutní bolest
- chronická bolest
- neuropatická bolest

Akutní bolest většinou pochází ze zánětu nebo poranění měkké tkáně. Tento typ bolesti je přizpůsobivý a má příslušnou biologickou funkci varování a umožnění uzdravení a obnovení již poškozené části těla, aby byla neporušená. Ochranné funkce je dosaženo tak, že zraněná/zanícená plocha a okolní tkáň je hypersenzitivní ke všem stimulům, takže se vyhýbá kontaktu s jakýmkoliv vnějším stimulem. Neuronální mechanismy, tvořící základ tohoto typu klinické bolesti, jsou velmi dobře známé a farmakologická kontrola akutní klinické bolesti je dostupná a účinná, použitím např. od nesteroidních protizánětlivých léků (NSAID) až k opioidům v závislosti na typu a rozšíření vjemu.

Chronická klinická bolest se jeví jako vytrvalé smyslové abnormality, pocházející z trvajících periferního patologického stavu, způsobeného onemocněním, takovým, jako rakovina nebo chronický zánět (např. artritida) nebo může být nezávislá na počátečních příčinách. Ta posledně jmenovaná bývá maladaptivní, neposkytuje žádné výhody pro přežití a velmi často není dostupná žádná účinná léčba.

Neuropatická bolest je způsobena zraněním nebo infekcí periferních smyslových nervů. To zahrnuje, ale není to omezeno na, bolest z trauma periferního nervu, infekce herpes virem, cukrovky, kausalgie, avulze nervového svazku, neuronu, amputace končetiny a vaskulitidy. Neuropatická bolest je také způsobena poškozením nervu z chronického alkoholismu, infekce virem

lidské imunodeficiencie, hypotyreózy, uremie nebo nedostatku vitaminů. Neuropatická bolest zahrnuje, ale není omezena na, bolest způsobenou zraněním nervu, takovou, jako například bolest, kterou trpí diabetici.

Neuropatická bolest vykazuje dva odlišné patofyziologické mechanismy, které musí být vzaty do úvahy:

Za prvé, zvýšená aktivita aferentních nociceptivních neuronů následující sensitizace (spících) neuronů (např., bolest při zánětu, bolest při rakovině, bolest hlavy, bolest ve spodní části zad, viscerální bolest, migréna) s tím, že primární aferentní nociceptivní neuron zůstává intaktní, ačkoliv aktivita receptoru je změněna a je snížen práh, typicky je zjištěno zvýšení rychlosti pálení a počátek nebo zvýšení spontánní aktivity.

Za druhé, ektopická aktivita aferentních nociceptivních neuronů následující po poruchách svých axonů (např., periferní a centrální neuropatická bolest), s poškozeným primárním aferentním neuronem. Toto vede k nevratným periferním a centrálním biochemickým, morfologickým a funkčním změnám. (Periferní) neuropatie je tedy proto zhruba definována jako onemocnění (periferního) nervového systému.

Existuje několik příčin lidské neuropatie se značnou variabilitou v symptomech a neurologických deficitech. Bolestivé neuropatie jsou definovány jako neurologické poruchy, charakterizované vytrvalou bolestí a přecitlivělostí v oblasti těla, ve které byla poškozena smyslová inervace, ale poškození smyslových nervů většinou nevytváří neuropatickou bolest, obvykle je pozorována ztráta vjemu spíše než přecitlivělost nebo bolest.

Specifické poruchy somatosenzoru jsou označovány jako alodynzie

(neškodná stimulace somatosenzoru vyvolává pocity abnormální intenzivní bolesti s prudkým, sálajícím charakterem, často přetrvávající po dobu trvání stimulu jako příčiny), hyperalgezie (škodlivá stimulace vyvolává intenzivnější a déle trvající pocity bolesti), parestesie (spontánní aversní ale nebolestivé pocity, popsané jako bodání nebo "špendlíky a jehly"), dysestesie (vyvolaná stejně jako spontánní abnormální pocity).

Několik klíčových událostí je chápáno jako běžné patofyziologické události abnormálních bolestivých stavů, zejména těch, které následují po periferním zranění nervu.

Vysoká frekvence spontánního discharge z ektopického místa je tedy následovaná zvýšenou citlivostí dorzálních rohů neuronů a rozšířením pole vnímání, často definovaného jako centrální sensitizace.

Běžná analgetika jako opioidy a nesteroidní protizánětlivé léky (NSAID-non-steroidal anti-inflammatory drugs) zlepšují, i když pouze nedostatečně, syndromy chronické abnormální bolesti. Během hledání alternativních léčebných režimů pro vyvolání uspokojivé a trvalé úlevy od bolesti byly zkoušeny kortikosteroidy, blokáda vedení, glycerol, antidepresiva, lokální anestetika, gangliosidy a elektrostimulace, ale především bylo zjištěno, že anti-konvulzanty jsou užitečné proti různým typům stavů neuropatické bolesti, ale jsou neúčinnější v případech paroxyzmálních, řezavých událostí, např. bolest trojklaného nervu.

Je-li obecná hyperaktivita a nízká prahová aktivace smyslových neuronů považována jako jeden z hlavních syndromů neuropatie a pocitu neuropatické bolesti se zřetelnou mechanoalodynii, jako nejzávažnější klinický symptom, poskytuje zřejmě výhody selektivní inhibice tohoto patofyziologického případu místo obecné inhibice škodlivého stimulu s vysokým prahem (pomoci

např. lokálních anestetik) normálních smyslových nocicepcí.

Stavy uvedené shora jsou známy jako špatně léčitelné pomocí v současné době na trhu dostupných analgetik, takových, jako opioidy nebo nesteroidní protizánětlivé léky (NSAID), a to z důvodu nedostatečné účinnosti nebo omezení vedlejšími účinky.

Předmětem tohoto vynálezu je poskytnutí nového použití sloučenin podle výše uvedeného Vzorce I a jeho derivátů, pro přípravu farmaceutických směsí, užitečných pro léčbu alodynies, jako hlavního a jedinečného symptomu bolesti, nezávislé na původu základního onemocnění, ale často spojenou s neuropatickou bolestí nebo jinými odlišnými typy chronické nebo fantomové bolesti.

Předkládaný vynález zejména souvisí s novým použitím harkoseridu pro přípravu farmaceutických směsí, užitečných pro léčbu alodynies, jako hlavního a jedinečného symptomu bolesti, nezávislé na původu základního onemocnění, ale často spojenou s neuropatickou bolestí nebo jinými odlišnými typy chronické nebo fantomové bolesti.

Harkoserid, jehož chemický název je (R)-2-acetamido-N-benzyl-3-methoxypropion-amid je jeden derivát vybraný ze skupiny specifických derivátů aminokyselin.

Tato skupina látek je uvedena v US 5,378,729; US 5,654,301 a 5,773,475. Ukazují aktivitu při léčbě epilepsie a mrtvice. Ve shora uvedených referencích však není žádný popis, který by ozřejmil předkládaný vynález.

Sloučeniny předkládaného vynálezu mohou tvořit farmaceuticky přijatelné soli, jak s organickými, tak i s anorganickými kyselinami a zásadami.

Například, kyselé soli bazických sloučenin jsou připraveny buď rozpuštěním volné báze ve vodném nebo vodném alkoholovém roztoku nebo v jiných vhodných rozpouštědlech, obsahujících vhodnou kyselinu, a izolací soli odpařením roztoku.

Příklady farmaceuticky přijatelných solí jsou hydrochloridy, hydrobromidy, hydrosulfáty, atd., stejně jako sodné, draselné, hořečnaté, a další soli.

Sloučeniny předkládaného vynálezu mohou obsahovat jeden nebo několik asymetrických uhlíkových atomů. Vynález zahrnuje jednotlivé diastereomery nebo enantiomery a jejich směsi.

Jednotlivé diastereomery nebo enantiomery mohou být připraveny nebo izolovány způsoby, dobře známými v oboru.

Podle vynálezu je přednostní, jsou-li sloučeniny v (R) konfiguraci. Nejpřednostnější je sloučenina (R)-2-acetamido-N-benzyl-3-methoxypropionamid.

Sloučeniny tohoto vynálezu mohou být syntetizovány, jak je uvedeno v dokumentech U.S. P. 5,378,729; U.S. P. 5,654,301 a U.S.P. 5,773,475.

Sloučeniny připravené syntetickými způsoby mohou být použity jako farmaceutické směsi jako činidlo při léčbě bolesti, když je použito účinné množství sloučeniny Vzorce I, společně s farmaceuticky přijatelným nosičem. Léčivo může být použito ve způsobu léčby takových poruch u savců, včetně člověka, poruchami trpícího, podáváním těmto savcům účinného množství sloučenin, popsaných shora, v jednotkové dávkovací formě.

Farmaceutická sloučenina, vytvořená v souladu s předkládaným vynálezem, může být připravena a podávána různými druhy dávkovacích forem buď orálními nebo parenterálními cestami podávání. Například, tyto farmaceutické směsi mohou být



vytvořeny v inertních, farmaceuticky přijatelných nosičích, které jsou buď pevné nebo kapalné. Pevné formy preparátů zahrnují prášky, tablety, dispersní granule, kapsle, tobolky a čípky. Další pevné a kapalné formy preparátů mohou být vytvořeny podle způsobů, známých v oboru, a mohou být podávány orální cestou ve vhodné formě nebo parenterální cestou takovou, jako intravenosní, intramuskulární nebo subkutánní injikování kapalné formy.

Množství aktivní sloučeniny v jednotkové dávce přípravku může být různé nebo upravené na od přibližně 1 mg do přibližně 2 x 300 mg na den na pacienta. Rozmezí denní dávky od přibližně 1 mg do přibližně 300 mg je přednostní. Dávky se však mohou lišit v závislosti na požadavcích pacienta, vážnosti léčeného stavu a použité sloučenině. Stanovení vhodné dávky pro konkrétní situace je v rámci dovednosti v oboru.

Následující pracovní příklady, vybrané ze specifických živočišných modelů, ukazují aktivitu harkoseridu a jeho derivátů proti neuropatické bolesti obecně a zejména účinnost harkoseridu a jeho derivátů proti alodynii.

1. Příklad 1:

Formalinový test, krysa

Značná a na dávce závislá účinnost harkoseridu může být demonstrována v pozdní fázi krysího formalinového testu.

Formalinový test je model chemicky indukované svalové bolesti, ve kterém jsou stanoveny dvoufázové změny nociceptivního chování a spinální/supraspinální plasticita nocicepce je považována za molekulární základ neuropatické bolesti, zejména během druhé (=pozdní) fáze testu, během které je většina klinicky používaných léků proti neuropatické bolesti aktivní. Tyto znaky vedly k tomu, že formalinový test je akceptován jako platný model vytrvalé klinické bolesti.

Sloučenina byla testována pro anti-nociceptivní vlastnosti použitím metody váženého behaviorálního skóre : volně pohybující se zvířata byla podrobena pozorovacímu ohodnocení polohy levé zadní tlapy podle hodnotícího skóre o rozmezí 0-3 před a 10, 20, 30 a 40 min po injikování 0,05 ml sterilního 2,5% formalinu pod kůži na dorzálním povrchu tlapy. Harkoserid, podávaný i.p. těsně před formalinovou injekcí, vytvořil na dávce závislé snížení formalinem indukovaného svalového zánětlivého nociceptivního chování, jak je ukázáno v tabulce 1 (vážené skóre bolesti \pm SEM, .n=11-12/skupina).

Tabulka 1: vážené skóre bolesti, formalinový test, krysa

Čas po injikování formalinu a SPM 927						
Dávka mg/kg	Počet zvířat	Výchozí hodnota	10 MIN	20 MIN	30 MIN	40 MIN
0	11	0,00 \pm 0,00	0,30 \pm 0,16	0,93 \pm 0,21	1,84 \pm 0,19	2,10 \pm 0,24
5	12	0,01 \pm 0,01	0,31 \pm 0,11	0,78 \pm 0,23	1,47 \pm 0,20	1,46 \pm 0,19*
10	11	0,00 \pm 0,00	0,42 \pm 0,17	0,33 \pm 0,16*	1,02 \pm 0,27*	1,05 \pm 0,19*
20	12	0,00 \pm 0,00	0,48 \pm 0,18	0,57 \pm 0,14	0,78 \pm 0,18*	1,02 \pm 0,24*
40	12	0,00 \pm 0,00	0,12 \pm 0,05	0,10 \pm 0,04*	0,09 \pm 0,06*	0,12 \pm 0,06*

* = Značné odlišnosti od vehikula (ANOVA opravena pro mnohonásobné srovnání $p \leq 0,05$).

Výraz ANOVA je pro Analýzu rozptylu.

Tyto výsledky podporují a potvrzují předpokládanou aktivitu sloučeniny proti neuropatické bolesti.

Zde ukázaná data podporují a dodávají nezbytný vědecký základ pro dříve pozorovanou aktivitu ve writhing testu

(peritoneálního dráždění) a v myším formalinovém testu. Dříve získaná data byla omezena kvůli faktu, že writhing test je považován za velmi nespecifický test s určitými svalovými chemicky indukovanými nociceptivními aspekty, které obvykle poskytují pozitivní výsledky pro všechny psychoaktivní léky uvolňující svaly, atd. a proto není dostatečně specifický pro průkaz specifické aktivity. Kromě toho, dříve obdržené výsledky v myším formalinovém testu, neměly jasný důkaz o vztahu dávkování a tedy ani o specifitě pozorovaných účinků harkoseridu. Navíc, bylo již v prvním pokusu zjištěno, že jediná a nejvyšší dávka, vykazující značné účinky, způsobuje jasné behaviorální vedlejší účinky. Protože tyto léky zahrnují změny v chování, nemohou být tyto změny spojené s léky nadále považovány jako antinociceptivní.

Pouze zde poskytnutá nově ukázaná data tedy mohou být pokládána za in vivo průkaz antinociceptivního účinku harkoseridu, v závislosti na dávce podávání, jako míra specifity a zlepšení antinociceptivního chování, které nesouvisí s toxickými účinky.

Příklad 2:

Chronické konstriční poranění (CCI, Bennettův model)

Účinnost harkoseridu na snížení spontánní chronické bolesti, mechanické alodynzie a teplotní hyperalgezie byla testována použitím modelu chronického konstričního poranění (CCI) periferní neuropatie, jednoho z nejlépe charakterizovaných in vivo zvířecích modelů, používaných pro studium chronické bolesti, způsobené poraněním periferního nervu. V tomto modelu jsou ischiatické nervy volně podvázány, což vytváří axonální otok a částečnou deafferentaci, která se projevuje jako značná ale neúplná ztráta axonů v distální části periferního nervu. Jedno z pozorovaných význačných chování, následující podvázání ischiatického nervu, je objevení se

vedení zadní tlapkou, považované za indikaci pokračující spontánní chronické bolesti. Podpora pro tuto myšlenku je odvozena z publikací, tykající se míšní neurální aktivity a zvýšené spontánní depolarizace neuronů v neuronech spinothalamického traktu a ve ventrobazálním thalamu za nepřítomnosti zjevné periferní stimulace. Kromě vzniku spontánního chování při bolesti, se vyskytovalo několik abnormalit v bolesti evokované stimuly jako výsledek CCI, včetně teplotní hyperalgezie a mechanickou alodynii. Vývoj těchto abnormálních bolestí evokovaných stimuly byl také popsán, že se vyskytuje v oblastech mimo inervaci poškozeným nervem, oblastí inervované neporaněnými nervy.

Behaviorální testy na spontánní bolest, teplotní hyperalgezie a mechanickou alodynii byly provedeny pro ohodnocení odlišných složek neuropatické bolesti. Údaj výchozí hodnoty pro každý test byl odebrán před experimentálním postupem; kromě toho, byla všechna zvířata testována na vývoj chování při chronické bolesti 13-25 dnů po CCI operaci, 1 den před dnem podání vehikula (0,04 ml sterilní vody/10 g tělesné váhy) nebo léku a po podání vehikulum/lék. Pořadí testů bylo (1) spontánní s bolestí spojené chování (2) mechanická alodynii, (3) teplotní hyperalgezie, za účelem minimalizovat vliv jednoho testu na výsledek testu následujícího. Testovací postupy a výsledky jsou předkládány odděleně pro každý aspekt chronické bolesti. Bylo podáváno buď 0 (vehikulum, 0,04 ml/10 g tělesné váhy), 5, 10, 20 nebo 40 mg/kg SPM 927 (n=7-23/skupina) i.p. 15 minut před prvním behaviorálním testem.

Spontánní bolest (pokračující bolest bez zjevného vnějšího podnětu) podvázané tlapky byla stanovena po 5 min následovaná 10 min aklimatizační periodou, použitím hodnotícího skóre (váženého behaviorálního skóre stupňů 0-5).

Harkoserid nezměnil hladinu spontánní bolesti, indukované

unilaterálním chronickým konstriktivním zraněním, jak je ukázáno v tabulce 2 (vážená skóre bolesti \pm SEM).

Tabulka 2 Spontánní nocicepce, CCI model, krysa

Dávka [mg/kg]	Počet zvířat	Výchozí hodnota	pooperační	pooperační + lék
0	23	0 \pm 0	1,4 \pm 0,15	1,2 \pm 0,14
5	9	0 \pm 0	2,0 \pm 0,10	1,8 \pm 0,18
10	20	0,0019 \pm 0,0019	1,5 \pm 0,10	1,5 \pm 0,11
20	8	0 \pm 0	1,1 \pm 0,17	0,9 \pm 0,14
40	10	0,0004 \pm 0,0004	1,3 \pm 0,12	0,8 \pm 0,28

Teplotní hyperalgezie byla stanovena způsobem ukončení latence v odezvě na teplo aplikované na subplantární povrch podvázané zadní tlapky krysy. Jak je porovnáno s výchozí hodnotou latence (latencí) bylo značné snížení v (postoperační) latenci po odstranění teplotního podnětu působícího na tlapku interpretováno jako indukující přítomnost teplotní hyperalgezie následující chronické konstriktivní zranění.

Dávka Harkoseridu závisle snižovala chronické konstriktivní zranění-indukované teplotní hyperalgezie, jak je ukázáno v tabulce 3 [latence \pm SEM]. Značné účinky byly pozorovány pouze u nejvyšších testovaných dávek (20 a 40 mg/kg i.p.) s maximálním účinkem, který byl již pozorovatelný při 20 mg/kg i.p.

Tabulka 3: Teplotní hyperalgezie, CCI model, krysa

Dávka [mg/kg]	Počet zvířat	Výchozí hodnota	Pooperační	Pooperační+ lék
0	13	9,8±0,74	7,0±0,29	7,3±0,43
5	7	10,5±0,68	8,1±0,59	9,2±0,98
10	7	9,2±0,68	7,1±0,60	8,1±0,59
20	8	10,0±0,70	7,0±0,56	9,7±0,96*
40	8	8,3±0,57	7,4±0,48	10,2±0,75*

* = Značné odlišnosti od vehikula (ANOVA opravena pro mnohonásobná srovnání $p \leq 0,05$).

Mechanická citlivost a alodyně podvázané krysí zadní tlapy byla kvantifikována rychlým stažením tlapy v odezvě na normálně neškodné mechanické stimuly, jak je popsáno dříve. Citlivost k mechanickému stimulu byla testována kalibrovaným elektronickým Von Freyovým tlakovým algometrem, připojeným k síťovému počítačovému systému, pro sběr dat. Mechanická alodyně je interpretována jako značný pokles v pooperační ve srovnání s výchozí hodnotou tlaku (g/mm^2), nutného k vyvolání rychlého stažení tlapy v odezvě na tento mechanický stimul.

Harkoseridová dávka závisle snižuje intenzitu mechanické alodyně indukované podvázáním unilaterálního nervu, jak je ukázáno v tabulce 4 [tlak (g/mm^2) \pm SEM]. Regresní analýza ukázala pozitivní lineární korelaci mezi dávkou Harkoseridu a zvýšením množství síly, nutné k vytvoření stažení tlapy.



Tabulka 4: Mechanická alodynie, CCI model, krysa

Dávka [mg/kg]	Počet zvířat	Výchozí hodnota	Pooperační	Pooperační + lék
0	20	41,6±2,20	18,8±2,09	20,2±1,90
5	11	53,6±3,35	16,4±2,56	21,8±2,34
10	17	42,9±2,55	21,2±2,13	29,2±2,85*
20	8	46,1±2,62	24,7±2,78	39,6±3,62*
40	9	48,4±3,84	23,9±2,23	43,0±5,48*

* = Značné odlišnosti od vehikula (ANOVA opravena pro mnohonásobná srovnání $p \leq 0,05$).

Tyto výsledky podporují a potvrzují předpokládanou účinnost Harkoseridu proti alodynii. Kromě toho, tento účinek navíc souvisí s neuropatickou bolestí a proto podporuje možné klinické použití sloučeniny, napodobením klinické situace léčby příslušných symptomů, co nejlépe.

Další průkaz specifity účinku harkoseridu proti alodynii byl dán negativními výsledky v tail-flick testu (test švihnutí ocasem), vylučujícím typickou opioidům podobnou analgesii sloučeniny. Dřívější data, získaná na myších, mohla být opakována a potvrzena v druhém druhu, kryse, dalšími prostředky vhodnějšího výběry testovaných dávek:

Příklad 3

Tail-flick test, krysa

Harkoserid byl dále testován pro možnou aktivitu při akutní spinální teplotní nocicepci, použitím tail-flick testu. V tomto modelu akutní teplotní spinální/reflexní hyperalgezie je aplikováno sálavé teplo na ocas zvířete, přibližně 2 cm od špičky a čas latence pro reakci stažení je automaticky stanoven pomocí algometru, definovaný maximální

čas stimulu zabraňuje poškození tkáně. Tento test je hodně používán jako stanovení pro antinociceptivní účinnost farmakologických činidel a je vysoce prediktivní v akutní analgetické účinnosti u lidí. Neaktivnější jsou většinou čistá analgetika opioidního typu; ani adjuvans jako amitryptilin nebo anti-epileptika nebo NSAID (nesteroidní protizánětlivé léky) nejsou aktivní.

Výsledky pro 20 a 40 mg/kg harkoseridu i.p jsou ukázány v tabulce 5 [procenta anti-nocicepce, spočítána jako $\frac{((\text{latence po podání léku}) - (\text{latence před podáním léku}))}{((\text{max. latence}) - (\text{latence před podáním léku}))} \times 100 \pm \text{SEM}$, n=12/skupina]. Výchozí hodnota nebo latence tail-flick před podáním léku byla stanovena zprůměrováním 5 následných měření, prováděných po 2 minutách. Vehikulum (sterilní voda 0,04 ml/10 g tělesná váha) nebo harkoserid byly podány a tail-flick latence byly zaznamenávány v 10-minutových intervalech po následujících 60 minut. Dokonce i při dávkách, poskytujících maximální účinek v krysím formalinovém testu (viz výše), měl harkoserid malý nebo žádný účinek na latenci tail-flick reflexu.



Tabulka 5: Akutní teplotní hyperalgezie, tail-flick; krysa

Čas po SPM 927 [min]	Anti-nociceptivní účinek [%] různých dávek [mg/kg] i.p. Harkoseridu		
	0	20	40
10	-2,1 ± 3,08	5,0 ± 3,94	-1,6 ± 12,82
20	-0,5 ± 3,19	9,7 ± 7,51	-4,3 ± 14,04
30	4,4 ± 4,71	9,7 ± 2,37	-2,3 ± 9,14
40	10,4 ± 5,91	1,7 ± 7,42	-4,4 ± 11,44
50	7,6 ± 4,58	5,4 ± 4,12	0,3 ± 15,50
60	7,4 ± 6,07	8,1 ± 5,20	-5,5 ± 14,11

Jelikož v tail-flick testu nebyl detekován žádný antinociceptivní účinek harkoseridu potvrzuje to předpokládaný profil harkoseridu s vysoce specifickými antialodinickými vlastnostmi a bez aktivity ve stavech akutní bolesti.

Příklad 4

Anti-nociceptivní aktivita harkoseridu v porovnání s gabapentinem

V následující vysvětlené studii je zde použitý harkoserid zkracován jako SPM 927 a gabapentin je zde zkracován jako GBP.

CÍL:

Hlavním cílem této studie je stanovit anti-nociceptivní aktivitu SPM 927 a gabapentinu (GBP) v modelech hlodavců pro zánětlivou bolest a porovnat navzájem in vivo účinky léku jeden s druhým.

ZPŮSOBY:

Karagenanem indukovaná mechanická hyperalgezie v krysách byla indukována subplantární injekcí 0,1 ml suspenze 2% carrageenanu

a po 3h byla měřena testem tlaku tlapky (Randall-Sellito).

Subchronická zánětlivá nocicepce v myších byla indukována subplantární injekcí formalinu (0,02 ml 5% roztoku). Nocicepční chování (lízání tlapky) bylo měřeno a kvantifikováno mezi 0 a 5 min (akutní bolest) a mezi 20 a 30 min (subchronická zánětlivá bolest) po formalinu.

Léky a návrh experimentu: SPM 927 a GBP byly resuspendovány v 1% methylcelulose a podávány i.p. v dávkách 10 mg/kg, 20 mg/kg a 40 mg/kg. Čas předléčby byl 30min, před tím, než byla měřena bolest. Jedna skupina zvířat sloužila jako kontroly a postupně ~~obdržela injekci rozpouštědla (10 ml/kg) a další skupina zvířat~~ obdržela referenční sloučeninu (Karagenanový test: 10 mg/kg indomethacinu; Formalinový test: 10 mg/kg morfinu). Každá sloučenina byla testována v odděleném experimentu a každý experiment zahrnoval kontrolní a referenční skupinu. V Karagenanovém testu bylo použito 10 krys na skupinu a ve formalinovém testu bylo použito 6 myší na skupinu.

VÝSLEDKY:

Karagenanem-indukovaná mechanická hyperalgezie v kryších:
Výsledky jsou shrnuty v následující tabulce 6.

Tabulka 6

	VEHIKULUM nezaníčená tlapka	VEHIKULUM zaníčená tlapka	SPM 927 [10]	SPM 927 [20]	SPM 927 [40]	Indomethacin [10]
nociceptivní práh	330±16	164±15 ^a	324±15 ^b	426±24 ^b	444±13 ^b	384±11 ^b
	VEHIKULUM nezaníčená tlapka	VEHIKULUM zaníčená tlapka	GBP [10]	GBP [20]	GBP [40]	Indomethacin [10]
nociceptivní práh	396±15	204±10 ^a	254±39	296±31	282±33	370±15 ^b

^a označuje značný rozdíl ve srovnání s nezaníčenou tlapkou (p<0,05; Studentův t-test)

^b označuje značný rozdíl ve srovnání s vehikulem léčenou skupinou (p<0,05; Dunnettův test)

445

Ve všech třech experimentech se vyvinula značná mechanická hyperalgezie, jak je ukázáno značnými rozdíly v nociceptivním prahu v zanícené v porovnání s nezanícenou tlapkou.

Všechny dávky SPM 927 vedly k plné změně Karagenanem-indukované mechanické hyperalgezií.

Antinociceptivní SPM 927 bylo porovnáno s tím, které bylo získáno pro referenční sloučeninu Indomethacin.

GBP neměl žádný význačný účinek na Karagenanem indukovanou mechanickou hyperalgezií při testovaných dávkách.

Subchronická zánětlivá nocicepce u myší (formalinový test):

Výsledky jsou shrnuty v následující tabulce 7.

Tabulka 7

	Fáze	VEHIKULUM	SPM 927 [10]	SPM 927 [20]	SPM 927 [40]	Morfin [10]
Nociceptivní práh [s]	časná	84±16	67±15	69±8	8±8 ^a	6±3 ^a
	pozdní	119±18	58±16 ^a	128±16	17±17 ^a	10±8 ^a
Nociceptivní práh [s]		VEHIKULUM	GBP [10]	GBP [20]	GBP [40]	Morfin [10]
	časná	106±15	98±20	102±17	72±10	8±6 ^a
	pozdní	111±24	133±30	118±13	73±13	0±0 ^a

^a označuje značný rozdíl ve srovnání s vehikulem léčenou skupinou ($p < 0,05$; Dunnettův test)

Jasná nociceptivní odezva byla indukována formalinem. Nociceptivní odezva byla potlačena v závislosti na dávce SPM-927. Účinnost SPM 927 byla podobná účinnosti morfinu tj. téměř úplná změna formalinem indukované nocicepce. GBP inhibovalo nociceptivní odezvu indukovanou formalinem pouze mírně, nikoliv však značně.

Příklad 5

Následující Tabulky 8 a 9 ukazují účinnost harkoseridu (označovaného zde jako SPM 927), karbamazepinu, levetiracetamu, gabapentinu a morfinu v testu neuropatické bolesti (CHUNG) u krysy. Bylo použito osm (8) krys na skupinu.

Tabulka 8 ukazuje zkoumané účinky pomocí dotykové stimulace na zraněné tlapce.

Tabulka 9 ukazuje zkoumané účinky pomocí teplotní stimulace na zraněné tlapce.

Obecně, všechny sloučeniny vykázaly zřetelnější účinky na dotykovou nociceptivní stimulaci než na teplotní nociceptivní stimulaci, a SPM 927 byl minimálně srovnatelný, ale obvykle silnější, než referenční sloučeniny.

TABULKA 8

Účinky SPM 927, KARBAMAZEPINU, LEVETIRACETAMU,

GABAPENTINU A MORFINU

V TESTU NEUROPATICKÉ BOLESTI

V KRYSE

(8 KRYSE NA SKUPINU)

DOTYKOVÁ STIMULACE

(zraněná tlapka)

LÉČBA (mg/kg)	SILOU INDUKOVANÉ ODTAŽENÍ TLAPKY (g)		
	průměr ± s.e.m.	P hodnota	% změny
pr: -30 min.			
Kontrola	63,3 ± 4,5	-	-
Zraněná kontrola	17,4 ± 2,2*** (a)	0,000	-73% (a)
SPM 927 (8)	27,2 ± 4,9 NS (b)	0,094	+56% (b)
SPM 927 (16)	24,4 ± 3,0 NS (b)	0,086	+40% (b)
SPM 927 (32)	37,6 ± 6,1 ** (b)	0,008	+116% (b)
Karbamazepin (16)	21,0 ± 2,3 NS (b)	0,275	+21% (b)
Karbamazepin (32)	38,4 ± 8,1 * (b)	0,026	+121% (b)
Karbamazepin (64)	39,2 ± 9,1 * (b)	0,036	+125% (b)
Levetiracetam (16)	23,0 ± 4,0 NS (b)	0,243	+32% (b)
Levetiracetam (32)	25,0 ± 5,2 NS (b)	0,199	+44% (b)
Levetiracetam (64)	19,8 ± 4,1 NS (b)	0,612	+14% (b)
Gabapentin (32)	17,2 ± 3,0 NS (b)	0,959	-1% (b)
Gabapentin (64)	23,5 ± 4,2 NS (b)	0,219	+35% (b)
Gabapentin (128)	33,6 ± 6,7* (b)	0,038	+93% (b)
Morfin (16)	45,9 ± 8,8** (b)	0,007	+164% (b)

Studentův t test (nepárový): NS = nevýznamné; * = $p < 0,05$;

** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$;

- * (a) porovnáno s kontrolou
- (b) porovnáno se zraněnou kontrolou

TABULKA 9

Účinky SPM 927, KARBAMAZEPINU, LEVETIRACETAMU,

GABAPENTINU A MORFINU

V TESTU NEUROPATICKÉ BOLESTI (CHUNG)

V KRYSE

(8 KRYŠ NA SKUPINU)

TEPLOTNÍ STIMULACE

(zraněná tlapka)

LÉČBA (mg/kg) i.p. -30 min	LATENCE ODTAŽENÍ TLAPKY (s)		
	Průměr ± s,e,m,	P hodnota	% změny
kontrola	40,6 ± 2,2	-	-
Zraněná kontrola	16,3 ± 4,4*** (a)	0,000	-60% (a)
SPM 927 (8)	26,1 ± 5,4 NS(b)	0,180	+60% (b)
SPM 927 (16)	16,8 ± 4,5 NS(b)	0,933	+3% (b)
SPM 927 (32)	21,1 ± 5,6 NS(b)	0,512	+29% (b)
Karbamazepin (16)	35,6 ± 4,1 ** (b)	0,006	+118% (b)
Karbamazepin (32)	22,7 ± 4,3 NS(b)	0,315	+39% (b)
Karbamazepin (64)	28,8 ± 6,9 NS(b)	0,147	+77% (b)
Levetiracetam (16)	19,0 ± 3,6 NS(b)	0,641	+17% (b)
Levetiracetam (32)	17,1 ± 2,9 NS(b)	0,882	+5% (b)
Levetiracetam (64)	26,6 ± 6,0 NS(b)	0,187	+63% (b)
Gabapentin (32)	19,3 ± 3,6 NS(b)	0,611	+18% (b)
Gabapentin (64)	28,5 ± 5,4 NS(b)	0,101	+75% (b)
Gabapentin (128)	27,1 ± 5,2 NS(b)	0,135	+66% (b)
Morfin (16)	42,4 ± 1,9 *** (b)	0,000	+160% (b)

Studentův test (nepárový): NS = nevýznamné; ** = $p < 0,01$;

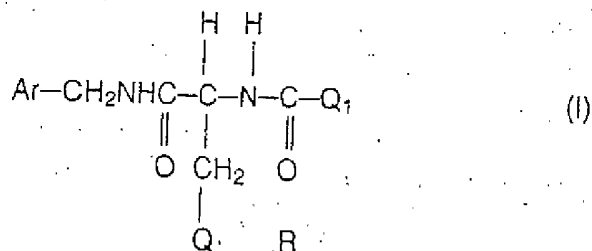
*** = $p < 0,001$;

(a) porovnáno s kontrolou

(b) porovnáno se zraněnou kontrolou

Patentové nároky

1. Použití sloučeniny, která má vzorec (I)



kde

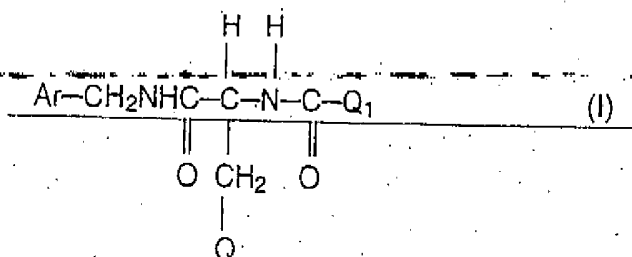
Ar je fenyl, který je nesubstituovaný nebo substituovaný alespoň jednou halo skupinou;

Q je nižší alkoxy obsahující 1-3 uhlíkové atomy a Q₁ je methyl;

nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl pro přípravu farmaceutické směsi pro léčbu alodynie, jako hlavního a jedinečného symptomu bolesti, nezávislé na původu základního onemocnění nebo jinými odlišnými typy chronické nebo fantomové bolesti.

2. Použití sloučeniny podle patentového nároku 1, kde Ar je nesubstituovaný fenyl pro přípravu farmaceutické směsi pro léčbu alodynie, jako hlavního a jedinečného symptomu bolesti, nezávislé na původu základního onemocnění nebo jinými odlišnými typy chronické nebo fantomové bolesti.
3. Použití sloučeniny podle patentových nároků 1 a 2, kde halo je fluoro, pro přípravu farmaceutické směsi pro léčbu alodynie, jako hlavního a jedinečného symptomu bolesti, nezávislé na původu základního onemocnění nebo jinými odlišnými typy chronické nebo fantomové bolesti.

4. Použití sloučeniny podle patentových nároků 1-3, kde Q je alkoxy, obsahující 1-3 atomy uhlíku a Ar je nesubstituovaný fenyl pro přípravu farmaceutické směsi pro léčbu alodyníe, jako hlavního a jedinečného symptomu bolesti, nezávislé na původu základního onemocnění nebo jinými odlišnými typy chronické nebo fantomové bolesti.
5. Použití sloučeniny podle patentových nároků 1-4 pro přípravu farmaceutické směsi pro léčbu tinnitus aureum.
6. Použití sloučeniny v R konfiguraci, která má vzorec (I)



kde

Ar je fenyl, který je nesubstituovaný nebo substituovaný alespoň jednou halo skupinou;

Q je nižší alkoxy obsahující 1-3 uhlíkové atomy a Q₁ je methyl;

nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl pro přípravu farmaceutické směsi pro léčbu alodyníe, jako hlavního a jedinečného symptomu bolesti, nezávislé na původu základního onemocnění nebo jinými odlišnými typy chronické nebo fantomové bolesti.

7. Použití sloučeniny podle patentového nároku 6, která je v podstatě čistý enantiomer, pro přípravu farmaceutické směsi pro léčbu alodyníe, jako hlavního a jedinečného symptomu bolesti, nezávislé na původu základního onemocnění nebo

- jinými odlišnými typy chronické nebo fantomové bolesti.
8. Použití sloučeniny podle patentových nároků 6 a 7, kde Ar je nesubstituovaný fenyl, pro přípravu farmaceutické směsi pro léčbu alodynie, jako hlavního a jedinečného symptomu bolesti, nezávislé na původu základního onemocnění nebo jinými odlišnými typy chronické nebo fantomové bolesti.
 9. Použití sloučeniny podle patentových nároků 6-8, kde halo je fluoro, pro přípravu farmaceutické směsi pro léčbu alodynie, jako hlavního a jedinečného symptomu bolesti, nezávislé na původu základního onemocnění nebo jinými odlišnými typy chronické nebo fantomové bolesti.
 10. Použití sloučeniny podle patentových nároků 6-9, kde Q je alkoxy, obsahující 1-3 atomy uhlíku a Ar je nesubstituovaný fenyl pro přípravu farmaceutické směsi pro léčbu alodynie, jako hlavního a jedinečného symptomu bolesti, nezávislé na původu základního onemocnění nebo jinými odlišnými typy chronické nebo fantomové bolesti.
 11. Použití (R)-2-Acetamid-N-benzyl-3-methoxypropionamidu nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli pro přípravu farmaceutické směsi pro léčbu alodynie, jako hlavního a jedinečného symptomu bolesti, nezávislé na původu základního onemocnění nebo jinými odlišnými typy chronické nebo fantomové bolesti.
 12. Použití sloučeniny podle patentového nároku 11, která je v podstatě čistý enantiomer, pro přípravu farmaceutické směsi pro léčbu alodynie, jako hlavního a jedinečného symptomu bolesti, nezávislé na původu základního onemocnění nebo jinými odlišnými typy chronické nebo fantomové bolesti.
 13. Použití sloučeniny podle patentových nároků 6-12 pro

- přípravu farmaceutické směsi pro léčbu tinnitus aureum.
14. Farmaceutická směs zahrnující účinné množství sloučeniny proti alodynii, podle jakéhokoliv z patentových nároků 1-13, a jejího farmaceutického nosiče.