

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2003-900**
(22) Přihlášeno: **19.10.2001**
(30) Právo přednosti: **20.10.2000 US 2000/241896**
19.10.2001 WO 2001US/0150724
(40) Zveřejněno: **17.12.2003**
(Věstník č. 12/2003)
(47) Uděleno: **04.06.2008**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **16.07.2008**
(Věstník č. 29/2008)
(86) PCT číslo: **PCT/US2001/050724**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2002/032932**

(11) Číslo dokumentu:

299 402

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

C07K 7/06 (2006.01)
A61K 38/10 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

FR 2786489.

Hocart S.J. et al.: „Potent Antagonists of Somatostatin: Synthesis and Biology“, JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, 41(7), 1146-1154;
Hocart S.J. et al.: „Highly Potent Cyclic Disulfide Antagonists of Somatostatin“, JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, 42(11), 1863-1871,
1999.

(73) Majitel patentu:

THE ADMINISTRATORS OF THE TULANE
EDUCATIONAL FUND, New Orleans, LA, US
SOCIETE DE CONSEILS DE RECHERCHES ET
D'APPLICATIONS SCIENTIFIQUES, S.A.S., Paris,
FR

(72) Původce:

Coy David H., New Orleans, LA, US
Rossowski Wojciech J., Kenner, LA, US

(74) Zástupce:

Ing. Pavel Reichel, Lopatecká 14, Praha 4, 14700

(54) Název vynálezu:

Agonisté a antagonisté urotensinu-II

(57) Anotace:

Řešení se týká nové třídy polypeptidů, které vykazují aktivitu antagonistů a agonistů U-II. Jsou využitelné při přípravě léčiva pro léčení fyziologických nebo psychologických stavů, charakterizovaných nadměrnou nebo nedostatečnou expresí urotensinu-II.

CZ 299402 B6

Agonisté a antagonisté urotensinu-II

Oblast techniky

5

Tento vynález se týká agonistů a antagonistů polypeptidu urotensinu-II a způsobů jejich použití.

Dosavadní stav techniky

10

Urotensin-II (U-II) je cyklický neuropeptid se silnými kardiovaskulárními účinky. Původně byl izolovaný z kaudálního neurosekrečního systému ryby patřící do nadřádu kostnatých, přičemž primární struktura U-II byla stanovena pro několik druhů obratlovců, včetně několika druhů ryb, žab a lidí. Sekvenční analýza různých peptidů U-II, pocházejících z různých druhů, odhalila, že

15 zatímco oblast N-zakončení je vysoce variabilní, cyklická oblast C-zakončení U-II je silně zakon-

zervována. Skutečně, tato cyklická oblast, která je zodpovědná za biologickou aktivitu U-II, je plně zakonzervována od ryb po lidi (Coulouran a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (fyzilogie),

20 95, 15803 až 15808 (1998). Skutečnost, že evoluční tlak působil k plnému zakonzervování biologicky aktivní sekvence U-II naznačuje, že tento polypeptid hraje důležitou roli v lidské fyziologii.

Cyklická oblast U-II zahrnuje zbytky šesti aminokyselin [-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-] a je strukturně podobná biologicky důležité centrální oblasti somatostatinu-14 [-Phe-Trp-Lys-Thr]. Avšak molekulární klonování a sekvenční analýza genu kapřího preprourotensinu II naznačuje,

25 že U-II a somatostatin nejsou odvozeny od společného předchůdce (Ohsako S. a kol., J. Neurosci., 6, 2730 až 2735 (1986)).

Ukázalo se, že peptidy U-II u ryby vykazují několik aktivit, včetně obecné aktivity kontrakce hladkých svalů, ačkoliv reakce se liší mezi dvěma živočišnými druhy a cévními loži (Davenport

30 A. a Maquire J., Trends in Pharmacological Sciences, 21, 80 až 82 (2000), Bern H. A. a kol., Recent Prog. Horm. Res., 45, 533 až 552 (1995)). Ukázalo se také, že rybí U-II vykazuje v savcích konstriční aktivitu, včetně hlavních arterií u krys, ale receptory přenášející působení těchto peptidů nejsou plně popsány.

Nové studie popisují, že sirotčí lidský receptor vázaného G-proteinu, homologický ke krysímu GPR14 a převážně exprimovaný v kardiovaskulární tkáni, funguje jako receptor U-II (Ames H. a kol., Nature, 401, 282 až 286 (1999)). Rybí (kapkovitý) a lidský U-II se údajně váží k rekombinantnímu lidskému GPR14 s vysokou afinitou a vázání je funkčně spřaženo s mobilizací vápníkem. Lidský U-II se nalézá jak ve vaskulární, tak srdeční tkáni (včetně koronárního ateromu) a

40 účinně zužuje arterie izolované z primátů, kteří nejsou lidmi (Ames H. a kol., viz výše). Síla vazokonstrikce působená U-II je podstatně větší než síla endothelinu-1, což činí lidský U-II jedním z nejsilnějších současně známých savčích vazokonstriktorů. In vivo lidský U-II výrazně zvyšuje celkovou periferní resistenci u anestezovaných primátů, kteří nejsou lidmi, přičemž reakce je spojena s hlubokou kardiálně-kontrakční dysfunkcí (Ames H. a kol., viz výše).

45

Jelikož imunoreaktivita podobná lidskému U-II byla zjištěna v srdeční a vaskulární tkáni (včetně koronárního ateromu), věří se, že U-II ovlivňuje kardiovaskulární homeostázu a patologii (např. ischemické onemocnění srdce a městnavé selhání srdce). Mimoto zjištění imunoreaktivity U-II v míše a endokrinních tkáních naznačuje, že U-II může vykazovat další aktivity, včetně

50 ovlivňování centrálního nervového systému a endokrinní funkce u lidí (Ames H. a kol., viz výše). A skutečně, počet poruch je silně spjat s nadměrnou nebo podlimitní expresí aktivity U-II, včetně ischemického selhání srdce, hypotenze, portální hypertenze, anginy pectoris, jícnového krvácení, infarktu myokardu, vředů a určitých psychologických a neurologických poruch. Tudíž existuje silná potřeba vývoje potentních sloučenin schopných ovlivňovat aktivitu U-II, včetně inhibitorů

55 nebo antagonistů U-II.

Hocart S.J. a kol. (1999), Journal of Medicinal Chemistry, 42 (11), str. 1863-181 popisuje určité velmi silné cyklické disulfid antagonisty somatostatinu.

- 5 Ve francouzském patentovém spisu FR 2 786 489 je popisováno použití peptidů, majících na svém C-konci specifický heptapeptid, pro léčení neurogenerativních nemocí traumatu míchy.

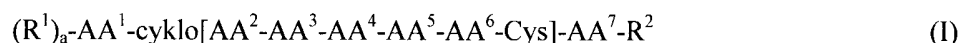
Newby D.E. & Jalan R. (2000), Hematology 31, str. 1201 až 1202 popisují identifikaci sirotčího lidského na G-protein vázaného receptoru, homologického s krysím GPR14 a projevujícího se
10 převážně v kardiovaskulární tkáni, který slouží jako receptor U-II.

Nishiki M. a kol. (1997) Endocrine Journal 44, str. 655 až 660 popisuje použití podkožní infuze octreotidu při léčení akromegální kardiomyopatie.

15

Podstata vynálezu

Předložený vynález představuje novou třídu cyklických polypeptidů, které vykazují aktivitu antagonisty nebo agonisty U-II. Těmito polypeptidy jsou oktapeptidy, které mají obecný vzorec
20 (obecný vzorec I)



ve kterém

- 25 AA¹ je L isomer aromatické aminokyseliny;
AA² je L nebo D isomer Cys;
AA³ je L isomer aromatické aminokyseliny;
AA⁴ je L nebo D isomer Trp;
AA⁵ je L nebo D isomer Lys, N-Me-Lys nebo Orn;
30 AA⁶ je L nebo D isomer Val, Thr, Leu, Ile, terc-Leu, Abu, Nle;
AA⁷ je L nebo D isomer Val, Thr, Leu, Ile, terc-Leu, Abu, Nle nebo aromatické aminokyseliny;

R¹ je vodík, nižší alkyl, nižší alkanoyl nebo nižší acyl;

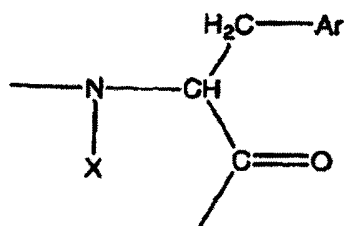
a je 1 nebo 2; a

- 35 R² je skupina OH, OR³, N(R³)₂ nebo NHR³, kde R³ je vodík, nižší alkyl nebo arylalkyl;
nebo

farmaceuticky přijatelná sůl uvedeného oktapeptidu.

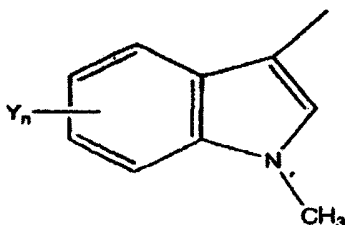
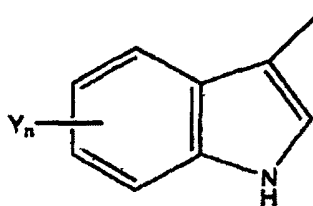
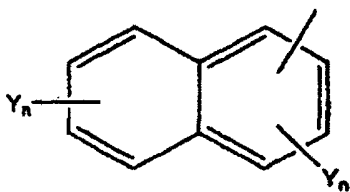
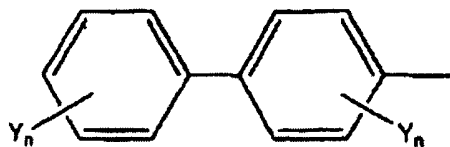
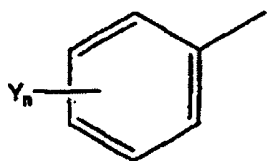
Uvedená aromatická aminokyselina v tomto oktapeptidu může mít obecný vzorec

40

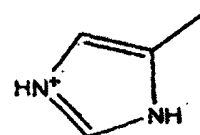


ve kterém X je vodík nebo vazba a Ar představuje částici vybranou ze souboru skládajícího se z

45



a



5

ve kterém n je 0, 1, 2 nebo 3 a každý substituent Y nezávisle představuje skupiny NO_2 , CN , chlor, brom, jod, fluor, skupiny Me , COR^4 , COOR^4 nebo OR^4 , kde R^4 je vodík nebo $\text{C}_1\text{-C}_8$ alkyl.

10

AA^3 je vybrán ze skupiny skládající se z Phe, Trp, Pal, His, $\beta\text{-Nal}$, 3-pyridyl-alaninu (3-pyridyl-Ala), 4-pyridylalaninu (4-pyridyl-Ala), 2,4-dichlorfenylalaninu (2,4-dichlor-Phe), pentafluor-fenyl-alaninu (pentafluor-Phe), p-Z-fenylalaninu (p-Z-Phe) a o-Z-fenylalaninu (o-Z-Phe), ve které Z je vybrán ze souboru skládajícího se ze skupiny Me , chloru, bromu, fluoru, hydroxy-skupiny, skupiny OMe a NO_2 .

15

AA^2 může být D-Cys, AA^3 je Phe, AA^5 je Lys, AA^6 je Thr, AA^7 je Val a AA^1 je Cpa. Uvedený polypeptid má vzorec Cpa-cyklo[D-Cys-Phe-Trp-Lys-Thr-Cys]-Val- NH_2 (identifikační číslo sekvence: 5).

20

Předmětem vynálezu je dále farmaceutický prostředek, který obsahuje výše uvedený oktapeptid, mající aktivitu antagonisty urotensin II a farmaceuticky přijatelný nosič. Tento farmaceuticky přijatelný nosič je vybrán ze skupiny, zahrnující fyziologický roztok, pufrovaný fyziologický roztok, dextrózu, vodu, glycerol, ethanol a jejich kombinace.

Dalším předmětem vynálezu je použití výše uvedeného okapeptidu, majícího aktivitu antagonisty urotensin II, při přípravě léčiva pro léčení nenormálních stavů charakterizovaných nadměrnou

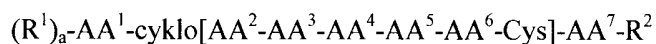
aktivitou urotensinu-II. Nenormální stav je vybrán ze skupiny, zahrnující ischemickou nemoc srdce, městnavé selhání srdce, portálové hypertenze, jícnové krvácení, hypotenze, anginu pectoris, infarkt myokardu, vředy, pocity úzkosti, schizofrenii, maniakální depresi, delirium, demenci, mentální zaostalost a dyskinézi.

5

Nenormálním stavem může být ischemická nemoc srdce, městnavé selhání srdce, portálová hypertenze, jícnové krvácení.

10

Předmětem vynálezu je dále agonista oktapeptidu urotensin II, mající obecný vzorec



ve kterém

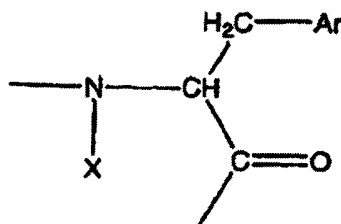
- 15 AA^1 je L isomer aromatické aminokyseliny;
 AA^2 je L nebo D isomer Cys;
 AA^3 je L isomer aromatické aminokyseliny;
 AA^4 je L isomer Trp;
 AA^5 je L nebo D isomer Lys, N-Me-Lys nebo Orn;
 AA^6 je L nebo D isomer Val, Thr, Leu, Ile, terc-Leu, Abu, nebo Nle;
20 AA^7 je L nebo D isomer Val, Thr, Leu, Ile, terc-Leu, Abu, Nle nebo aromatické aminokyseliny;
 R^1 je vodík, nižší alkyl, nižší alkanoyl nebo nižší acyl;
a je 1 nebo 2; a
 R^2 je skupina OH, OR^3 , $N(R^3)_2$ nebo NHR^3 , kde R^3 je vodík,
25 nižší alkyl nebo arylalkyl;

nebo

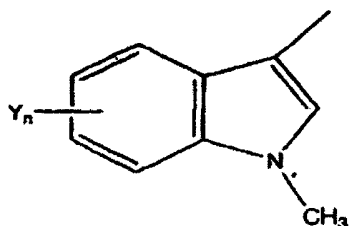
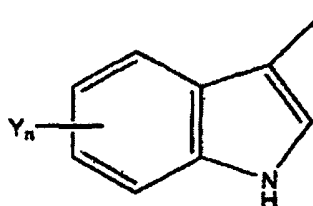
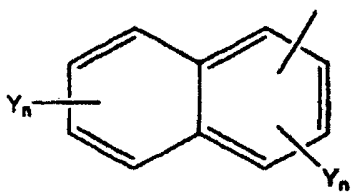
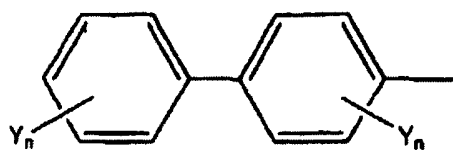
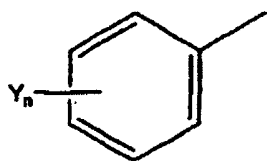
farmaceuticky přijatelná sůl uvedeného polypeptidu.

30

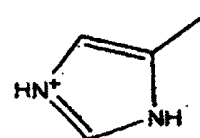
Aromatická aminokyselina v uvedeném oktapeptidu má obecný vzorec



ve kterém X je vodík nebo vazba a Ar představuje částici, vybranou ze souboru skládajícího se z



a



ve kterém n je 0, 1, 2 nebo 3 a každý substituent Y nezávisle představuje skupiny NO_2 , CN , chlor, brom, jod, fluor, skupiny Me , COR^4 , COOR^4 nebo OR^4 , kde R^4 je vodík nebo $\text{C}_1\text{-C}_8$ alkyl.

5

AA^3 v tomto oktapeptidu je vybrán ze skupiny, skládající se z Phe, Trp, Pal, His, $\beta\text{-Nal}$, 3-pyridyl-alaninu (3-pyridyl-Ala), 4-pyridylalaninu (4-pyridyl-Ala), 2,4-dichlorfenylalaninu (2,4-dichlor-Phe), pentafluorfenyl-alaninu (pentafluor-Phe), p-Z-fenylalaninu (p-Z-Phe) a o-Z-fenylalaninu (o-Z-Phe), ve které Z je vybrán ze souboru skládajícího se ze skupiny Me, chloru, bromu, fluoru, hydroxyskupiny, skupiny OMe a NO_2 . AA^2 je D-Cys, AA^3 je Phe, AA^5 je Lys, AA^6 je Thr, AA^7 je Val a AA^1 je Cpa.

10

Předmětem vynálezu je rovněž farmaceutický prostředek, který obsahuje předcházející oktapeptid, mající aktivitu agonisty urotensin II a farmaceuticky přijatelný nosič. Farmaceuticky přijatelný nosič je vybrán ze skupiny, zahrnující fyziologický roztok, pufrovaný fyziologický roztok, dextrózu, vodu, glycerol, ethanol a jejich kombinace.

15

Vynálezem je dále použití předcházejícího oktapeptidu, majícího aktivitu agonisty urotensin II při přípravě léčiva pro léčení nenormálních stavů, charakterizovaných podlimitní expresí aktivity urotensinu-II. Nenormální stav je vybrán ze skupiny, zahrnující ischemickou nemoc srdce, městnavé selhání srdce, portálové hypertenze, jícnové krvácení, hypotenze, anginu pectoris, infarkt myokardu, vředy, pocity úzkosti, schizofrenii, maniakální depresi, delirium, demenci, mentální zaostalost a dyskinezi.

20

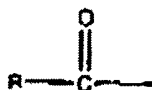
Dále následují definice.

„Polypeptidem“ se rozumí jakýkoli peptid (včetně cyklických peptidů) nebo protein, obsahující dvě nebo více aminokyseliny, spojené navzájem peptidovými vazbami nebo modifikovanými peptidovými vazbami. „Polypeptid“ se týká jak krátkých řetězců, obecně označovaných jako peptidy, oligopeptidy nebo oligomery, tak i delších řetězců, obecně označovaných jako proteiny. Polypeptidy mohou obsahovat jiné aminokyseliny než je 20 geneticky-kódovaných aminokyselin. „Polypeptidy“ obsahují aminokyselinové sekvence modifikované buď pomocí přírodních procesů nebo technikami chemické modifikace, které jsou v oboru dobře známé. K modifikaci může v polypeptidu dojít kdekoliv, včetně hlavního řetězce peptidu, postranních řetězců aminokyseliny a amino- nebo karboxylového zakončení.

Označeními, používanými zde pro polypeptidové zbytky aminokyselin, jsou takové zkratky, které jsou běžně používány v oboru. Méně běžné zkratky Abu, Cpa, Nle, Pal, Tle, Dip, 4-Fpa a Nal zastupují každá zvlášť 2-aminobutyrovou kyselinu, p-chlorfenylalanin, norleucin, 3-pyridyl-2-alanin, terc-leucin, 2,2-difenylalanin, 4-fluorfenylalanin a 3-(2-naftyl)-alanin nebo 3-(1-naftyl)-alanin.

„Alkylem“ se rozumí alifatická uhlovodíková skupina s rozvětveným nebo přímým řetězcem. Alkyl je popřípadě substituován jedním nebo více substituenty, které mohou být stejné nebo různé, a zahrnují, ale nejsou na ně omezeny, halogenové skupiny, cykloalkylové skupiny, hydroxyskupiny, alkoxyskupiny, aminoskupiny, karbamoylové skupiny, acylamino-skupiny, aroylaminoskupiny, karboxyskupiny, alkoxykarbonylové skupiny, aralkyloxykarbonylové nebo heteroaralkyloxykarbonyl-ové skupiny. Představitelé alkylových skupin zahrnují, ale nejsou na ně omezeny, methyl, trifluormethyl, cyklopropyl-methyl, cyklopentylmethyl, ethyl, n-propyl, isopropyl, n-butyl, terc-butyl, n-pentyl, 3-pentyl, methoxyethyl a karboxymethyl. „Nižším alkylem“ je míněna alkylová skupina s přímým nebo rozvětveným řetězcem, která má méně než 11 atomů uhlíku, s výhodou C₁-C₈ alkyl.

„Acylem“ je míněna skupina, která má strukturu



ve které R je vodík nebo alkylová skupina, jak je zde popsána. „Nižším acylem“ se rozumí acylová skupina, která má méně než 11 atomů uhlíku (jak v rozvětveném tak přímém řetězci), výhodně mezi 1 až 8 atomy uhlíku (tj. R je vodík nebo nižší alkyl).

„Nižším alkanoylem“ je míněna acylová skupina podle výše uvedeného popisu, ve které R je nižší alkyl.

„Arylem“ je míněna monocyklická nebo bicyklická aromatická skupina obsahující od 6 do 12 atomů uhlíku v kruhové části, výhodně 6 až 10 uhlíků v kruhové části, jako je fenyl, naftyl nebo tetrahydronaftyl. „Arylalkylem“ je míněna alkylová skupina podle zde uvedeného popisu, obsahující arylový substituent, jako je benzyl, fenethyl nebo 2-naftyl-methyl.

„Farmaceuticky přijatelnou solí“ jsou míněny netoxické adiční soli s kyselinou nebo kovové komplexy, které jsou běžně používány ve farmaceutickém průmyslu. Příklady adičních solí s kyselinou obsahují organické kyseliny, jako jsou kyseliny octová, mléčná, pamová, maleinová, citrónová, jablečná, askorbová, jantarová, benzoová, palmitová, korková, salicylová, vinná, methansulfonová, toluensulfonová nebo trifluoroctová nebo podobné; polymerní kyseliny jako je kyselina tříslivá, karboxymethylcelulóza nebo podobné; a anorganické kyseliny jako jsou kyseliny chlorovodíková, bromovodíková, sírová, fosforečná nebo podobné. Kovové komplexy obsahují komplexy zinku, železa a podobné.

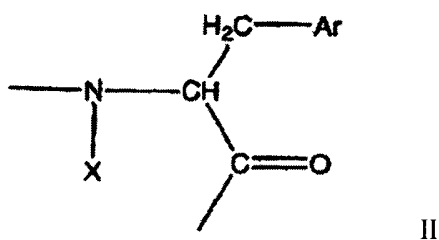
„Variantou“ je míněn polypeptid, který se liší od referenčního polypeptidu, ale zachovává si podstatné vlastnosti. Obecně jsou odlišnosti omezeny tak, že sekvence referenčního polypeptidu a varianta jsou celkově blíže příbuzné a v mnoha oblastech identické. Varianta a referenční polypeptid se mohou lišit v aminokyselinové sekvenci jednou nebo více substitucemi, adicemi a/nebo delecemi v jakékoliv kombinaci. Substituovaný nebo vložený aminokyselinový zbytek může nebo nemusí být kódován genetickým kódem. Varianta polypeptidu se může vyskytovat přírodně, tak jako allelická varianta, nebo může být variantou, o které není známo, že se vyskytuje přírodně. Varianty polypeptidů nevyskytující se přírodně mohou být připraveny mutagenními způsoby nebo přímou syntézou.

Obecně se varianta liší od referenčního polypeptidu substitucemi konzervativní aminokyseliny, čímž je zbytek substituován jiným s podobnými vlastnostmi (např. kyselým, bazickým, aromatickým atd.). Typické jsou substituce mezi Ala, Val, Leu a Ile; mezi Ser a Thr; mezi kyselými zbytky Asp a Glu; mezi Asn a Gln a mezi bazickými zbytky Lys a Arg nebo aromatickými zbytky Phe a Tyr.

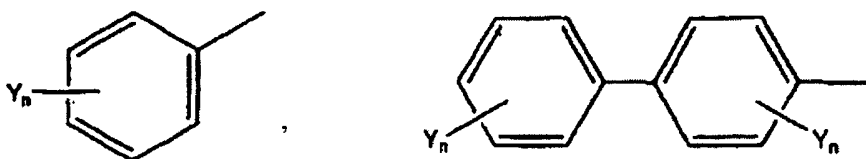
„Postiženým“ je míněn živočich nebo člověk trpící fyziologickým nebo psychologickým stavem spojeným s U-II. Postiženým může být savec, včetně, ale bez omezení na ně, lidí a savců, kteří nejsou lidmi, jako jsou primáti, psi, kočky, prasata, krávy, ovce, kozy, koně, krysy, myši a podobní.

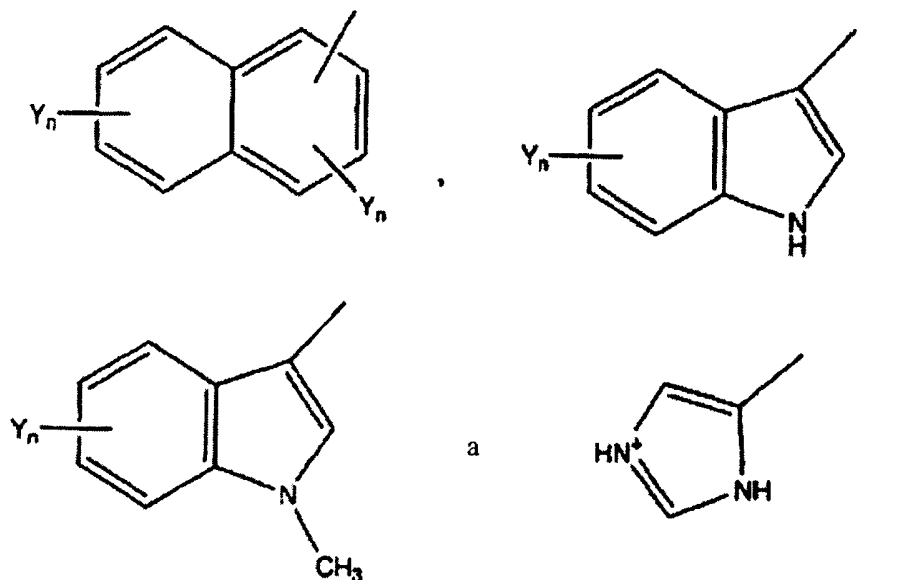
„Farmaceuticky přijatelným nosičem“ je míněn nosič, který je fyziologicky přijatelný pro podávání živočichovi, při zachování léčebných vlastností sloučeniny s kterou je podáván. Jedním příkladem farmaceuticky přijatelného nosiče je fyziologický roztok. Jiné fyziologicky přijatelné nosiče a jejich formulace jsou známy odborníkovi v oboru a popsány, například v Remington's Pharmaceutical Sciences, (18. vydání), vydavatel A. Gennaro, 1990, Mack Publishing Company, Easton, PA.

„Aromatickou aminokyselinou“ je míněna aminokyselina, která obsahuje aromatickou skupinu. Ve výhodných ztěsňeních má aromatická aminokyselina následující obecný vzorec (obecný vzorec II)



kde X představuje vazbu nebo vodík a Ar je částice obsahující popřípadě substituovaný aromatický kruh. Příklady Ar zahrnují, ale bez omezení na ně, následující obecné strukturní vzorce, ve kterých Y_n představuje n případných substituentů a n je 0, 1, 2 nebo 3



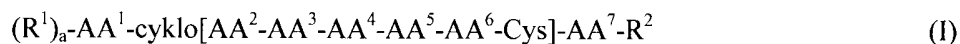


Ve výhodných ztěsňeních, každý substituent Y nezávisle představuje skupiny NO₂, CN, chlor, brom, jod a fluor, skupiny Me, COR⁴, COOR⁴ nebo OR⁴, kde R⁴ je vodík nebo C₁-C₈alkyl. Příklady aromatických aminokyselin zahrnují, ale nejsou na ně omezeny, Phe, Cpa, Trp, Pal, His, β-Nal, 3-pyridylalanin (3-pyridyl-Ala), 4-pyridylalanin (4-pyridyl-Ala), 2,4-dichlor-fenylalanin (2,4-dichlor-Phe), pentafluorfenylalanin (pentafluor-Phe), p-Z-fenylalanin (p-Z-Phe), ve kterých Z je vybrán ze skupiny skládající se z Me, chloru, bromu, fluoru, skupin OH, OMe a NO₂.

Příklady provedení vynálezu

Původci předloženého vynálezu zjistili, že minimální částí sekvence U-II, která si zachovává plnou biologickou aktivitu, je oktapeptid Asp-cyklo[Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys]-Val-OH (identifikační číslo sekvence (SEQ ID NO): 3), který odpovídá hUII(4-7). Tento oktapeptid skutečně má větší potenci, než úplné sekvence lidského a rybího U-II, při vyvolání kontrakce aorty krysy a při vázání k této tkáni.

Na základě této výchozí sekvence byla syntetizována řada cyklických oktapeptidů, které vykazují aktivitu antagonisty U-II. Bylo zjištěno, že tyto peptidy vykazují mírnou afinitu k receptorům U-II a jsou schopny blokovat fázové kontrakce v kruhových pásech torakální aorty krysy vyvolané U-II. Polypeptidy podle předkládaného vynálezu mají obecný vzorec (obecný vzorec I)



ve kterém

AA¹ je L isomer aromatické aminokyseliny;

AA² je L nebo D isomer Cys;

AA³ je L isomer aromatické aminokyseliny;

AA⁴ je L nebo D isomer Trp;

AA⁵ je L nebo D isomer Lys, N-Me-Lys nebo Orn;

AA⁶ je L nebo D isomer Val, Thr, Leu, Ile, terc-Leu, Abu, Nle nebo aromatické aminokyseliny;

AA⁷ je L nebo D isomer Val, Thr, Leu, Ile, terc-Leu, Abu, Nle nebo aromatické aminokyseliny;

R¹ je vodík, nižší alkyl, nižší alkanoyl nebo nižší acyl;

a je 1 nebo 2; a

R^2 je skupina OH, OR³, N(R³)₂ nebo NHR³, kde R³ je vodík, nižší alkyl nebo arylalkyl.

Terapeuticky účinné množství polypeptidu obecného vzorce I nebo jeho varianty nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli, může být podáváno orálně, parenterálně (např. nitrosvalovou, nitro-pobřišnicovou, nitrožilní nebo subkutánní injekcí nebo implantátem), nasálně, vaginálně, rektálně, sublingválně nebo lokálně, ve směsi s farmaceuticky přijatelným nosičem upraveným pro způsob podávání.

Způsoby pro přípravu prostředků dobře známé v oboru je možno nalézt například v Remington's Pharmaceutical Sciences, (18. vydání), vydavatel A. Gennaro, 1990, Mack Publishing Company, Easton, PA. Prostředky určené pro orální použití mohou být připraveny ve formách pevných látek nebo kapalných formách podle jakéhokoli způsobu známého v oboru pokud jde o přípravu farmaceutických prostředků. Prostředky mohou popřípadě obsahovat sladidla, příchuti, barviva, vonné látky a/nebo konzervační činidla pro zajištění chutnější kompozice. Dávky ve formě pevných látek pro orální podávání zahrnují kapsle, tablety, pilulky, prášky a granule. V takových formách v podobě pevných látek je aktivní sloučenina smíchána s nejméně jedním inertním farmaceuticky přijatelným nosičem nebo excipientem. Ty mohou například zahrnovat inertní ředidla, jako je uhličitán vápenatý, uhličitán sodný, laktóza, sacharóza, škrob, fosforečnan vápenatý, fosforečnan sodný nebo kaolin. Pojiva, pufrovací činidla a/nebo mazadla (např. stearát hořečnatý) mohou být také použity. Tablety a pilulky mohou být navíc připraveny s enterickými povlaky.

Dávky v kapalně formě pro orální podávání zahrnují farmaceuticky přijatelné emulze, roztoky, suspenze, sirupy a měkké želatinové kapsle. Tyto formy obsahují inertní ředidla běžně používaná v oboru, jako je voda nebo olejové médium. Kromě takových inertních ředidel, mohou prostředky také obsahovat adjuvans, jako jsou zvlhčovačla, emulgátory a suspenzační činidla.

Prostředky pro parenterální podávání zahrnují sterilní vodné nebo nevodné roztoky, suspenze nebo emulze. Příklady vhodných vehikul zahrnují propylenglykol, polyethylenglykol, rostlinné oleje, želatinu, hydrogenované naftaleny a injektáže schopné organické estery, jako je ethyl-oleát. Takové prostředky mohou také obsahovat adjuvans, jako jsou konzervační, smáčecí, emulgační a dispergační činidla. Biokompatibilní, biologicky degradovatelný laktidový polymer, laktid/glykolidový kopolymer nebo polyoxyethylen-polyoxypropylenové kopolymery mohou být použity pro řízení uvolňování sloučenin. Jiné potenciálně využitelné parenterální doručovací systémy pro polypeptidy podle tohoto vynálezu zahrnují částice ethylen-vinylacetátového kopolymeru, osmotické pumpy, implantovatelné infuzní systémy a liposomy.

Kapalné prostředky mohou být sterilizovány například pomocí filtrace přes bakterie zadržující filtr, pomocí začlenění sterilizačního činidla do kompozic nebo ozáření nebo zahřátím kompozic. Alternativně mohou být prostředky připravovány ve formě sterilní kompozice ve formě pevné látky, která může být rozpuštěna v sterilní vodě nebo některých sterilních injektovatelných médiích bezprostředně před použitím.

Prostředky pro rektální a vaginální podávání jsou výhodně ve formě čípků, které mohou obsahovat, navíc k aktivním látkám, excipienty, jako je kakaové máslo nebo čípkový vosk. Prostředky pro nasální nebo sublingvální podávání se také připravují se standardními excipienty známými v oboru. Prostředky pro inhalaci mohou obsahovat excipienty, například laktózu, nebo mohou být vodnými roztoky obsahujícími například polyoxyethylen-9-laurylether, glykocholát a deoxycholát nebo mohou být olejovými roztoky pro podávání ve formě nosních kapek nebo spreje nebo jako gel.

Množství aktivních složek v prostředcích podle tohoto vynálezu se může lišit. Odborník v oboru ocení, že přesné individuální dávky mohou být upraveny tak trochu v závislosti na řadě různých faktorů, včetně polypeptidu, který je podáván, době podávání, způsobu podávání, povaze prostředku, rychlosti exkrece, povaze stavů postiženého a věku, hmotnosti, zdravotním stavu a rodu pacienta. Navíc závažnost stavu spojeného s U-II, který je léčen, bude mít také vliv na úroveň

dávky. Obecně jsou denně podávány úrovně dávky mezi 0,1 µg/kg a 100 mg/kg tělesné hmotnosti jako jedna dávka nebo rozděleně do více dávek. Výhodně je obecný rozsah dávky mezi 250 µg/kg a 5,0 mg/kg tělesné hmotnosti za den. Z hlediska odlišnosti účinností různých způsobů podávání se může očekávat široká různorodost v potřebných dávkách. Například se obecně očekává, že orální podávání vyžaduje vyšší úrovně dávky, než podávání nitrožilní injekcí. Odlišnosti v těchto úrovních dávky mohou být upraveny za použití standardních empirických způsobů optimalizace, které jsou v oboru dobře známé. Obecně, přesná terapeuticky účinná dávka bude stanovena ošetřujícím lékařem při posouzení výše identifikovaných faktorů.

- Polypeptidy podle tohoto vynálezu mohou být podávány v prostředí s prodlouženým uvolňováním, jako jsou prostředky popsané např. v patentech US 5 672 659 a US 5 595 760. Použití prostředků s okamžitým nebo prodlouženým uvolňováním závisí na typu stavu, který je léčen. Pokud je stav tvořen akutní nebo nadakutní poruchou, bude upřednostňováno léčení pomocí formy s okamžitým uvolňováním proti kompozici s prodlouženým uvolňováním. Alternativně pro preventivní nebo dlouhodobá léčení je upřednostňována kompozice s prodlouženým používáním.

- Polypeptidy podle tohoto vynálezu mohou být připraveny jakýmkoliv vhodným způsobem. Polypeptidy mohou být izolovány z přírodně se vyskytujících zdrojů, připraveny rekombinančně nebo připraveny synteticky nebo připraveny pomocí kombinace těchto způsobů. Syntéza krátkých peptidů je v oboru dobře známa. Viz např. Stewart a kol., Solid Phase Peptide Synthesis (Pierce Chemical Co., 2. vydání, 1984). Peptidy podle předkládaného vynálezu mohou být syntetizovány podle způsobů standardních syntéz peptidů známých v oboru a doložených v příkladu 1 uvedeném níže.

Příklad 1

Použití kruhových pásů krysí aorty pro zkoušku antagonistů U-II

- Samci krys z chovu Sprague-Dawley (250 až 350 g), které se umístí do karantény 5 až 7 dní před pokusy se utratí dekapitací (pokusy jsou schváleny Poradním výborem pro zdroje zvířat (Advisory Committee For Animal Resources), fakulta lékařství university v Tulane (Tulane University School of Medicine)). Odpreparuje se torakální aorta zbavená spojovací tkáně a rozřeže se do kroužků o asi 1,5 mm na šířku. Kroužky se suspendují v 15 ml lázni pro orgány, která obsahuje Krebsův roztok s vysokou koncentrací draslíku (9,15 g/l chloridu draselného, 2,1 g/l hydrogenuhličitanu sodného, 1,0 g/l glukózy, 0,16 g/l jednosytného fosforečnanu draselného, 0,14 g/l siranu hořečnatého (bezvodého) a 0,22 g/l chloridu vápenatého (dihydridu)).

- Na tkáň se aplikuje optimální napětí (0,2 g) a médium lázně se udržuje na 37 °C a probublává se směsí 95 % plynného kyslíku/5 % oxidu uhličitého. Před instalováním v lázni pro orgány se pro odstranění vrstvy endotheliálních buněk vybrané preparáty otřou navlhčeným vatovým tampónem a účinek tohoto postupu se zkouší za použití acetylcholinového relaxačního testu. (Gibson A., Br. J. Pharmacol., 91, 205 (1987)). Kroužky z aorty se nechají 90 min přecházet do rovnovážného stavu při optimálním napětí. Během období přechodu do rovnovážného stavu se roztok v lázni vyměňuje každých 15 minut. Kontraktilní reakce kroužků aorty na různé koncentrace peptidů se vyjadřují ve voltech. Změny v napětí arteriálních hladkých svalů se zaznamenává isometricky za použití převaděče posunu vlivem síly (force-displacement transducer) (společnost Radnoti) a systému AcqKnowledge ACK100 verze 3.2 (společnost BIOPAC Systems, Inc., Santa Barbara, CA).

- Ve zkumavkách z křemíkového skla se peptidy rozpustí v deionizované vodě při koncentraci 1 µg/1 µl (zásobní roztok) a potom se zředí v poměru 1 : 10 sterilním fyziologickým roztokem BSA (0,1 % BSA, frakce V, od společnosti Sigma, St. Louis, v 0,9% roztoku chloridu sodného). Všechny peptidové roztoky se připraví bezprostředně před pokusy. Peptidy v rozmezích

koncentrací od 10^{-6} do 10^{-12} mol/l v konečném objemu 16 až 80 μ l se přímo zavedou do lázně se zkoušeným orgánem, která obsahuje Krebsův pufr a je nepřetržitě sycena plynem o složení 95 % kyslíku a 5 % oxidu uhličitého, a kroužky aorty se udržují pod optimálním klidovým napětím (od 1 do 0,2 g). Peptidy vyvolané změny v napětí aortových kroužků se zaznamenávají pomocí převaděče posunu vlivem síly (force-displacement transducer) a zpracovávají pomocí počítačového systému od společnosti BIOPAC Inc., jak je popsán výše. Každý kroužek se vystaví působení pouze jedné koncentrace peptidu.

Použitím technik zkoušek známých v oboru se zjistilo, že minimálně plně potentní sekvencí U-II je oktapeptid Asp-cyklo[Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys]-Val-OH (identifikační číslo sekvence (SEQ ID NO): 3), který je při vyvolání stahů krysí aorty skutečně potentnější než úplné lidské a rybí sekvence. Zjistilo se, že různí antagonisté somatostatinu (SRIF) mají schopnost blokovat fázové stahy v kruhových kroužcích krysí torakální aorty vyvolané U-II. Polypeptid Cpa-cyklo[D-Cys-Phe-Trp-Lys-Thr-Cys]-Val-NH₂ byl silným antagonistou U-II s IC₅₀ o velikosti 2 nm. Další sloučeniny, které byly testovány, jsou souhrnně uvedeny v tabulce 1 níže.

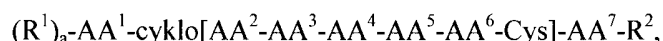
Tabulka 1

Konstanty IC₅₀ (nm) antagonisty SRIF proti stimulaci fázových stahů krysí aorty pomocí U-II

Polypeptid	IC ₅₀
Cpa{-D-Cys-Pal-Trp-Lys-Thr-Cys-}-Cpa-NH ₂ (identifikační číslo sekvence : 11)	2

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Antagonista cyklického oktapeptidu urotensin II, mající obecný vzorec



ve kterém

AA¹ je L isomer aromatické aminokyseliny;

AA² je L nebo D isomer Cys;

AA³ je L isomer aromatické aminokyseliny;

AA⁴ je L isomer Trp;

AA⁵ je L nebo D isomer Lys, N-Me-Lys nebo Orn;

AA⁶ je L nebo D isomer Val, Thr, Leu, Ile, terc-Leu, Abu, Nle;

AA⁷ je L nebo D isomer Val, Thr, Leu, Ile, terc-Leu, Abu, Nle nebo aromatické aminokyseliny;

R¹ je vodík, nižší alkyl, nižší alkanoyl nebo nižší acyl;

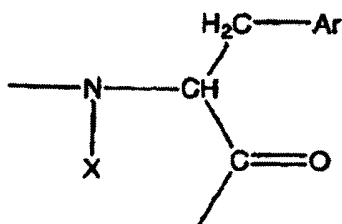
a je 1 nebo 2; a

R² je skupina OH, OR³, N(R³)₂ nebo NHR³, kde R³ je vodík, nižší alkyl nebo arylalkyl;

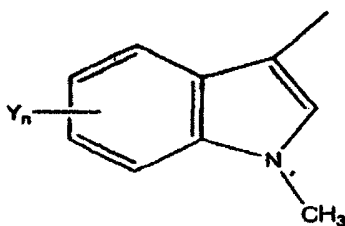
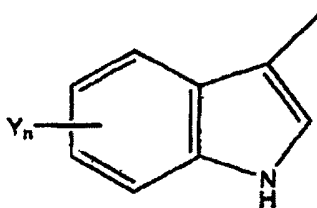
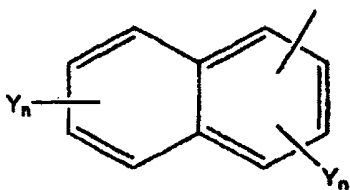
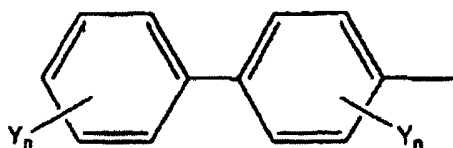
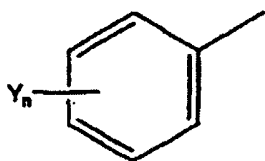
nebo

farmaceuticky přijatelná sůl uvedeného polypeptidu.

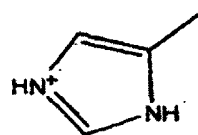
2. Oktapeptid podle nároku 1, ve kterém má uvedená aromatická aminokyselina obecný vzorec



5 ve kterém X je vodík nebo vazba a Ar představuje částici vybranou ze souboru, skládajícího se z



a



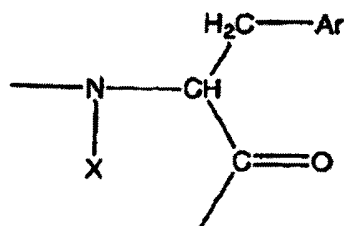
10 ve kterém n je 0, 1, 2 nebo 3 a každý substituent Y nezávisle představuje skupiny NO₂, CN, chlor, brom, jod, fluor, skupiny Me, COR⁴, COOR⁴ nebo OR⁴, kde R⁴ je vodík nebo C₁-C₈ alkyl.

15 3. Oktapeptid podle nároku 1, ve kterém AA³ je vybrán ze skupiny skládající se z Phe, Trp, Pal, His, β-Nal, 3-pyridyl-alaninu (3-pyridyl-Ala), 4-pyridylalaninu (4-pyridyl-Ala), 2,4-dichlorfenyl-alaninu (2,4-dichlor-Phe), pentafluorfenyl-alaninu (pentafluor-Phe), p-Z-fenylalaninu (p-Z-Phe) a o-Z-fenylalaninu (o-Z-Phe), ve které Z je vybrán ze souboru skládajícího se ze skupiny Me, chloru, bromu, fluoru, hydroxyskupiny, skupiny OMe a NO₂.

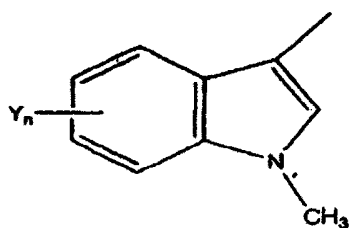
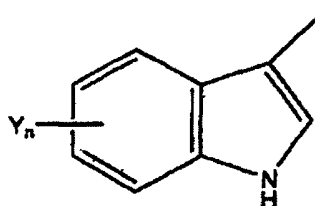
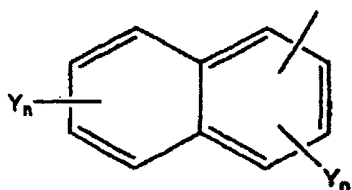
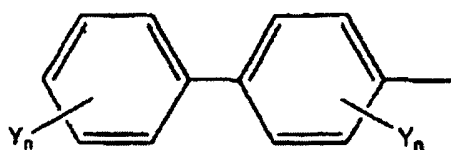
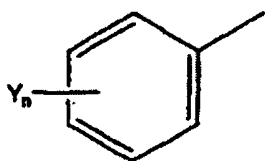
4. Oktapeptid podle nároku 1, ve kterém AA² je D-Cys.

5. Oktapeptid podle nároku 4, ve kterém AA³ je Phe, AA⁵ je Lys, AA⁶ je Thr, AA⁷ je Val a AA¹ je Cpa.
- 5 6. Oktapeptid podle nároku 5, ve kterém má uvedený polypeptid vzorec Cpa-cyklo[D-Cys-Phe-Trp-Lys-Thr-Cys]-Val-NH₂ (identifikační číslo sekvence : 5).
7. Farmaceutický prostředek, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že obsahuje cyklický oktapeptid podle některého z nároků 1 až 6, mající aktivitu antagonisty urotensin II a farmaceuticky přijatelný nosič.
- 10 8. Farmaceutický prostředek podle nároku 7, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že farmaceuticky přijatelný nosič je vybrán ze skupiny, zahrnující fyziologický roztok, pufrovaný fyziologický roztok, dextrózu, vodu, glycerol, ethanol a jejich kombinace.
- 15 9. Použití cyklického oktapeptidu podle některého z nároků 1 až 6, majícího aktivitu antagonisty urotensin II při přípravě léčiva pro léčení nenormálních stavů charakterizovaných nadměrnou aktivitou urotensinu-II.
- 20 10. Použití podle nároku 9, kde nenormální stav je vybrán ze skupiny, zahrnující ischemickou nemoc srdce, městnavé selhání srdce, portálové hypertenze, jícnové krvácení, hypotenze, anginu pectoris, infarkt myokardu, vředy, pocity úzkosti, schizofrenii, maniakální depresi, delirium, demenci, mentální zaostalost a dyskinézi.
- 25 11. Použití podle nároku 10, kde nenormálním stavem je ischemická nemoc srdce.
12. Použití podle nároku 10, kde nenormálním stavem je městnavé selhání srdce.
13. Použití podle nároku 10, kde nenormálním stavem je portálová hypertenze.
- 30 14. Použití podle nároku 10, kde nenormálním stavem je jícnové krvácení.
15. Agonista cyklického oktapeptidu urotensin II, mající obecný vzorec
- 35
$$(R^1)_a-AA^1\text{-cyklo}[AA^2-AA^3-AA^4-AA^5-AA^6\text{-Cys}]\text{-AA}^7\text{-R}^2,$$
- ve kterém
- AA¹ je L isomer aromatické aminokyseliny;
- AA² je L nebo D isomer Cys;
- 40 AA³ je L isomer aromatické aminokyseliny;
- AA⁴ je L isomer Trp;
- AA⁵ je L nebo D isomer Lys, N-Me-Lys nebo Orn;
- AA⁶ je L nebo D isomer Val, Thr, Leu, Ile, terc-Leu, Abu, nebo Nle;
- AA⁷ je L nebo D isomer Val, Thr, Leu, Ile, terc-Leu, Abu, Nle nebo aromatické amino-
- 45 kyseliny;
- R¹ je vodík, nižší alkyl, nižší alkanoyl nebo nižší acyl;
- a je 1 nebo 2; a
- R² je skupina OH, OR³, N(R³)₂ nebo NHR³, kde R³ je vodík, nižší alkyl nebo arylalkyl;
- 50 nebo
- farmaceuticky přijatelná sůl uvedeného polypeptidu.

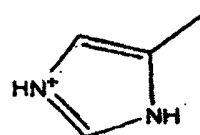
16. Oktapeptid podle nároku 15, ve kterém má uvedená aromatická aminokyselina obecný vzorec



5 ve kterém X je vodík nebo vazba a Ar představuje částici vybranou ze souboru skládajícího se z



a



ve kterém n je 0, 1, 2 nebo 3 a každý substituent Y nezávisle představuje skupiny NO₂, CN, chlor, brom, jod, fluor, skupiny Me, COR⁴, COOR⁴ nebo OR⁴, kde R⁴ je vodík nebo C₁-C₈ alkyl.

10

17. Oktapeptid podle nároku 15, ve kterém AA³ je vybrán ze skupiny skládající se z Phe, Trp, Pal, His, β-Nal, 3-pyridyl-alaninu (3-pyridyl-Ala), 4-pyridylalaninu (4-pyridyl-Ala), 2,4-dichlor-fenylalaninu (2,4-dichlor-Phe), pentafluorfenyl-alaninu (pentafluor-Phe), p-Z-fenylalaninu (p-Z-Phe) a o-Z-fenylalaninu (o-Z-Phe), ve které Z je vybrán ze souboru skládajícího se ze skupiny Me, chloru, bromu, fluoru, hydroxyskupiny, skupiny OMe a NO₂.

15

18. Oktapeptid podle nároku 15, ve kterém AA² je D-Cys.

19. Oktapeptid podle nároku 15, ve kterém AA³ je Phe, AA⁵ je Lys, AA⁶ je Thr, AA⁷ je Val a AA¹ je Cpa.

5 20. Farmaceutický prostředek, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že obsahuje cyklický oktapeptid podle některého z nároků 15 až 19, mající aktivitu agonisty urotensin II a farmaceuticky přijatelný nosič.

10 21. Farmaceutický prostředek podle nároku 20, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že farmaceuticky přijatelný nosič je vybrán ze skupiny, zahrnující fyziologický roztok, pufrovaný fyziologický roztok, dextrózu, vodu, glycerol, ethanol a jejich kombinace.

15 22. Použití cyklického oktapeptidu podle některého z nároků 15 až 19, majícího aktivitu agonisty urotensin II, při přípravě léčiva pro léčení nenormálních stavů, charakterizovaných podlimitní expresí aktivity urotensinu-II.

20 23. Použití podle nároku 22, kde nenormální stav je vybrán ze skupiny, zahrnující ischemickou nemoc srdce, městnavé selhání srdce, portálové hypertenze, jícnové krvácení, hypotenze, anginu pectoris, infarkt myokardu, vředy, pocity úzkosti, schizofrenii, maniakální depresi, delirium, demenci, mentální zaostalost a dyskinézi.

25

Konec dokumentu
