

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

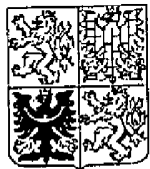
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

401-98

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **14. 08. 96**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **18.08.95, 07.11.95**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **95/9502877, 95/9503924**

(33) Země priority: **SE, SE**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **12. 08. 98**
(Věstník č. 8/98)

(86) PCT číslo: **PCT/SE96/01011**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 97/07130**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 07 K 5/107
A 61 K 38/07

(71) Přihlášovatel:

ASTRA AKTIEBOLAG, Sodertalje, SE;

(72) Původce:

Wang Wuyi, St.Laurent, CA;

(74) Zástupce:

**Koreček Ivan JUDr., Na baště sv. Jiří 9,
Praha 6, 16000;**

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Derivát oploidního peptidu, způsob jeho
přípravy a farmaceutický prostředek,
který ho obsahuje**

(57) Anotace:

Oploidní peptidy určené k léčbě bolestí, stejně tak jako metody jejich přípravy a farmaceuticky přijatelné složky obsahující tyto peptidy apoužití řečených sloučenin v přípravě léčivého přípravku účinného v léčbě bolesti. Peptidy tohoto vynálezu mají vysoký stupeň selektivity k .mi.-oploidním receptorům a jsou zejména vhodné jako analgetické látky působící převážně na .mi.-oploidních receptorech. Protože tyto peptidy působí periferně, vyvarovávají se podstatně nežádoucím účinkům normálně vznikajících při centrální analgezií.

CZ 401-98 A3

Derivat opioridického peptidu, zprůběh jeho přípravy a
farmaceutický prostředek, který ho obsahuje
Nové opioidní peptidy

11.05.98

10.7.76

28624

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká peptidových sloučenin podobných opioidům. Zejména pak k těm, které vykazují periferní analgetickou aktivitu a selektivitu pro μ podtyp opioidních receptorů.

Dosavadní stav techniky

Mnoho endogenních peptidů savčího i obojživelníčího původu se váže ke specifickým opioidním receptorům a vyvolává analgetickou odpověď podobnou klasickým narkotickým opiátům. Bylo prokázáno, že u vyšších živočichů koexistuje mnoho odlišných typů opioidních receptorů. Příklady viz W. Martin et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 197, p. 517 (1975); a J. Lord et al., Nature (London), 257, p. 495 (1977). Byly identifikovány tři odlišné typy opioidních receptorů. První typ, δ , vykazuje diferencovanou afinitu k peptidům podobným enkefalinu. Druhý typ, μ , vykazuje zvýšenou selektivitu pro morfin a jiné polycyklické alkaloidy. Třetí typ, κ , vykazuje stejnou afinitu ke každé skupině výše zmíněných ligandů a preferenční afinitu pro dynorfin. Obecně řečeno, μ receptory se zdají býti více zapojeni do analgetických účinků, δ receptory mají účinky na chování, ačkoli δ a κ receptory zprostředkovávají také analgetické účinky.

Každý opioidní receptor, je-li k němu navázán opiát, způsobuje specifickou biologickou odpověď podle typu receptoru. Pokud opiát aktivuje více než jeden receptor, je ovlivněna biologická odpověď každého receptoru, čímž vznikají nežádoucí účinky. Čím je opiát méně specifický a selektivní, tím je po podání opiátu větší riziko objevení se nežádoucích účinků.

V předchozích studiích s opiáty, opioidními peptidy a jejich analogy nebyla prokázána, anebo jen v omezené míře, selektivita k receptoru či receptorům, ke kterým se váží.

Opiáty mohou způsobit vážné a potenciálně fatální vedlejší účinky. Vedlejší účinky jako útlum dýchání, tolerance, fyzikální závislost a syndrom z rychlého vysazení jsou způsobeny nespecifickými interakcemi s receptory centrálního nervového systému. Více viz K. Budd, v International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics; N.E. Williams a H. Wilkinson, Eds., Pergamon: (Oxford), 112, str. 51 (1983). Z tohoto důvodu není předpokládáno, aby mohli opioidní analgetika účinkující především prostřednictvím opioidních receptorů periferního nervového systému způsobovat podobné nežádoucí účinky, jaké jsou spojené s podáváním opioidních analgetik ovlivňujících centrální nervový systém.

Nesteroidní protizánětlivé látky, jako aspirin, ibuprofen a ketorolak patří doposud do jedné z mála skupin látek, o kterých je známo, že mají periferní analgetické účinky. Tyto látky neinteragují s opioidními receptory, ale je známo, že inhibují cyklooxygenázu a snižují syntézu prostaglandinů. Tato slabá analgetika nemají nežádoucí účinky na centrální nervový systém, ale mohou způsobit jiné nežádoucí účinky, jako například vznik ulcerací gastrointestinálního traktu.

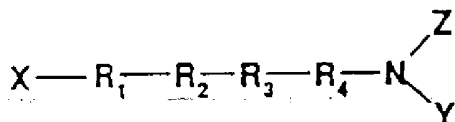
Dříve bylo míněno, že napolární peptidy pronikají do centrálního nervového systému přes hematoencefalickou bariéru mnohem snadněji než polární peptidy. Bylo publikováno, že peptid TAPP (H-Tyr-D-Ala-Phe-Phe-NH₂) vykazuje antinociceptivní vlastnosti jak periferně, tak centrálně (P.Schiller et al., Proceedings of the 20th European Peptide Symposium, 1988). V protikladu s touto informací bylo prokázáno vynálezcem předkládaného vynálezu, že tento tetrapeptid neúčinkuje centrálně dokonce ani v dávkách 100 mg/kg.

Předmětem vynálezu jsou peptidové sloučeniny podobné opioidům, které účinkují periferně, ale podstatně omezují nechtěné vedlejší účinky konvenčních periferně působících analgetik. Dalším předmětem vynálezu jsou peptidové sloučeniny, které se selektivně váží k μ -opioidnímu receptoru.

Podstata vynálezu

Shrnutí vynálezu

Předkládaný vynález představuje nové peptidové sloučeniny, které účinkují periferně a jsou selektivní k μ -opioidním receptorům; sloučeninu reprezentovanou vzorcem (1)



(1)

a její soli, deriváty a analogy,

kde

R_1 je Tyr nebo 2',6'-dimetyltirosin, nebo jeho analog či derivát;

R_2 je D-Ala nebo D-Arg;

R_3 je Phe(p-F);

R_4 je Phe nebo Phe (p-F);

X je H nebo C_{1-6} alkyl; a

Y a Z jsou nezávisle H, aralkyl nebo C_{1-6} alkyl.

Z jiného pohledu na vynález je zde prezentováno farmaceutické složení obsahující sloučeninu definovanou vzorcem (1) s farmaceuticky přijatelným nosičem a/nebo druhou terapeuticky účinnou látkou.

Dalším aspektem vynálezu je metoda léčby bolesti zahrnující podání farmaceuticky účinného množství sloučeniny definované

vzorcem (1) jedinci potřebující takovou léčbu.

Dalším aspektem vynálezu je použití sloučeniny definované vzorcem (1) pro výrobu léku na léčení bolesti.

Stručný popis obrázků

Obrázky 1, 2 a 4 ilustrují inhibiční účinek sloučenin předkládaného vynálezu ve dvou odlišných testech s horkou plotýnkou.

Obrázek 3 ilustruje inhibiční účinek H-Tyr-D-Ala-Phe-Phe-NH₂ v testu s horké plotýnkou.

Obrázek 5 ilustruje inhibiční účinek sloučenin předkládaného vynálezu v tail-flick testu.

Popis vynálezu

Ve specifikacích a v patentových nárocích jsou použity následující běžné zkratky:

Ala - alanin

Arg - arginin

Phe - phenylalanin

Ser - serin

Tyr - tyrosin

TAPP - H-Tyr-D-Ala-Phe-Phe-NH₂

GPI - morčecí ileum

MVD - myši vas deferens

Phe(p-F) - para-fluoro fenylalanin

HOBT - N-hydroxybenzothiazol

BOP - benzotriazolyl -N- oxy-tris (dimetylamino)
fosfóniumhexafluorofosfát

DMF - dimetylformamid

TFA - trifluorooctová kyselina

tBU - tert-butyl

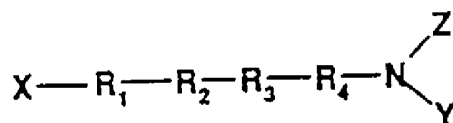
Pmc - 2,2,5,7,8 pentametylchroman -6- sulfonyl

FMOC - 9-fuorenylmetyloxykarbonyl

PBQ - fenyl-p-benzoquinon

Termín "ED₅₀" v tabulce 1 pro PBQ analýzy je definován jako dávka léku, která vyvolává 50% snížení počtu záškubů ve srovnání s kontrolní skupinou. Termín "Ki" v tabulce 1 vazebné analýzy je inhibiční konstanta známého ligandu μ receptoru DAMGO a ligandu δ receptoru DADLE. Termín " ki^{δ}/Ki^{μ} " je hodnota užívaná jako indikátor selektivity. Tento poměr reprezentuje vztah afinitních vlastností opioidních peptidů k vazbě na μ a δ receptory.

Sloučeniny předkládaného vynálezu jsou reprezentovány vzorcem (1):



(1)

a odvozenými solemi, deriváty a analogy.

X je H, nebo metyl (preferenčně H).

R₁ je Tyr nebo 2',6'-dimetyltirosin (preferenčně Tyr). Alfa-amino skupina radikálu R₁ je nahrazena pomocí X a vzniká aminoskupina, kde X je H, nebo alkylaminoskupina, kde X je metyl.

R₂ je D-Ala nebo D-Arg, (preferenčně D-Ala).

R₃ je Phe(p-F).

R₄ je Phe nebo Phe(p-F), (preferenčně Phe).

Y a Z jsou nezávisle H; aralkyl, jako například benzyl; a C₁₋₆ alkyl, jako například metyl. Y a Z jsou preferenčně oba H.

Sloučeniny předkládaného vynálezu zahrnují (ale nejsou tímto omezeny) :

Sloučenina #1B	H-Tyr-D-Ala-Phe (p-F) -Phe (p-F) -NH ₂ ;
Sloučenina #1C	H-Tyr-D-Ala-Phe (p-F) -Phe-NH ₂ ;
Sloučenina #2B	H-Tyr-D-Arg-Phe (p-F) -Phe (p-F) -NH ₂ ; a
Sloučenina #2C	H-Tyr-D-Arg-Phe (p-F) -Phe-NH ₂ .

Preferované konkrétní formy sloučenin předkládaného vynálezu jsou vybrány ze skupin skládajících se z

Sloučenina #1C	H-Tyr-D-Ala-Phe (p-F) -Phe-NH ₂ ;
Sloučenina #2C	H-Tyr-D-Arg-Phe (p-F) -Phe-NH ₂ .

Nejvíce preferovaná sloučenina předkládaného vynálezu je

Sloučenina #1C	H-Tyr-D-Ala-Phe (p-F) -Phe-NH ₂ .
----------------	--

Aminokyselinový derivát 2',6'-dimetyltirosin (Dmt) může být nahrazen tyrosinem ve sloučeninách opioidních peptidů. Experimenty prokázaly, že substituce Dmt tyrosinem v R₁ pozici prvního aminokyselinového rezidua v obecném vzorci 1, zvyšuje účinnost opioidního peptidu na μ receptoru o 2 řády. Selektivita k μ receptoru se zvyšuje, pokud sloučenina obsahuje Dmt v pozici R₁. Tato substituce způsobuje korespondující posun v poměru vazebných inhibičních konstant ke zvýšené selektivitě k μ receptoru.

Opioidní aktivita peptidů byla posuzována *in vitro* za použití longitudinálního svalstva morčecího ilea (GPI) a jejich antinociceptivní aktivita byla určena *in vivo* na hlodavcích na modelech pomocí PBQ vyvolaných záškubů (periferní aktivita) a na 2 testech s horkou plotýnkou (centrální aktivita). Analgetická aktivita sloučeniny předkládaného vynálezu byla také hodnocena pomocí tail-flick testu. Tento test je používán k hodnocení centrální analgetické aktivity sloučeniny. Srovnání aktivit sloučenin předkládaného vynálezu v testech

vyvolání záškubů, s horkou plotýnkou a v tail-flick testu prokázala, že analgetické účinky byly převážně zprostředkovány na periférii. Periferní analgezie byla prokázána vysokou účinností v testu vyvolání záškubů spolu s nízkou účinností v testech s horkou plotýnkou nebo v tail-flick testu.

PBQ (fenyl-p-benzochinon) indukoval u myši záškuby v posuzování jak centrální, tak periferní analgezie. Experimentální protokol viz Sigmund et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 95, str. 729 (1957), začleněný zde jako reference. Centrální analgezie je určena inhibicí odpovědi na horkou plotýnku u myši. Experimentální protokol viz G. Wolfe a A. MacDonald, J. Pharmacol. Exp. Ther., 80, str. 300 (1944), začleněný zde jako reference. Analýza měření vazebných afinit opioidních receptorů μ a δ , právě tak jako GPI test byly provedeny podle experimentálního protokolu viz Schiller et al., Biophys. Res. Commun., 85, str. 1322 (1975), začleněného zde jako reference.

Sloučeniny předkládaného vynálezu mohou být připraveny metodami dobře známými v peptidové chemii. Například viz *Principle of Peptide synthesis*, Bodansky M., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo 1984 nebo viz *The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology*, vydaného Erhardem Grossem a Johannesem Meienhoferem, Academic Press 1979.

Sloučeniny předkládaného vynálezu byly připraveny za použití syntézy solidní fáze, jak je popsáno níže, podle zavedených postupů v peptidové chemii. V příslušném kroku syntézy byl použit komerčně dostupný para-fluoro-fenylalanin (Phe(p-F)). 2',6'-dimetyltirosin může být v syntéze také použit a je připraven podle zavedených technik chemické syntézy.

Farmaceuticky přijatelné soli peptidů tohoto vynálezu mohou být vytvořeny konvenčně reakcí s příslušnou kyselinou. Vhodné soli kyselin mohou být připraveny přidáním kyselin jako jsou

kyseliny chlorovodíková, bromovodíková, fosforečná, octová, fumarová, salicylová, citrónová, mléčná, mandlová, vinná, šťavelová, metansulfonová, či jiné vhodné kyseliny, které mohou být použity zkušeným biochemikem.

Předkládaný vynález také zahrnuje farmaceutické složení. Vhodné složení má farmaceuticky účinné množství sloučenin předkládaného vynálezu, nebo jejich farmaceuticky přijatelných solí, ve směsi s farmaceuticky přijatelným nosičem nebo adjuvans. Terapeuticky účinné množství peptidu předkládaného vynálezu a farmaceuticky přijatelný nosič (např. uhličitán hořečnatý nebo laktóza) mohou být navrženy tak, aby vytvořily terapeutickou formu, jako například (i) pilulku, tabletu, kapsli, nebo tekutinu k perorálnímu podání; (ii) tekutinu nebo mast, které mohou být podány inhalací, transdermálně, nazálně, rektálně nebo sublingválně; (iii) tekutinu, která může být podána intravenózně, parenterálně, subkutánně, nebo intraperitoneálně; nebo (iv) perorální či parenterální formu s postupným uvolňováním.

Předkládaný vynález také obsahuje metodu léčby bolesti u savců, včetně člověka. Metoda zahrnuje podání farmaceuticky účinného množství peptidu definovaného vzorcem 1, nebo farmaceuticky účinnou sůl či její složení v jedné z tradičních forem pro podání např. orálně, parenterálně, transdermálně, transmukosálně, ve formě postupného uvolňování za použití biodegradabilního biokompatibilního polymeru, nebo ve formě pro doručení léku na specifické místo za použití micel, gelů a lipozomů. Peptidy mohou podány lidskému pacientovi v dávce 0,01 až 100 mg/kg, nejlépe 0,05 až 20 mg/kg a zcela nejlépe v dávce 0,1-1 mg/kg.

Následující příklady jsou použity pro lepší popis vynálezu. Tyto příklady mají pouze ilustrační účel a není tímto v úmyslu vynález žádným způsobem omezovat.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Příprava sloučeniny 1C H-Tyr-D-Ala-Phe(p-F)-Phe-NH₂

Syntetický peptid byl připraven za použití Knorrovovy pryskyřice. Použité aminokyseliny měly aminoskupiny chráněny pomocí Fmoc a tyrosinový vedlejší řetězec chráněný pomocí tBu. Dimethylformamid použitý ve spojovacím kroku byl zbaven dimethylaminu. DMF použitý v promývacích krocích a TFA měly čistotu Biograde. Pro purifikační krok byla použita voda purifikovaná pomocí USP a acetonitril pro HPLC. Všechna zbývající rozpouštědla měla čistotu ACS a byla použita bez další purifikace.

Syntéza solidní fáze byla provedena manuálně na pryskyřici o zátěži 0,84 mmol/g. Kondenzace peptidů byla provedena za použití 1,5 až 2 ekvivalentů každé Fmoc aminokyseliny, HOBT a BOP v DMF po dobu 3-24 hodin při pokojové teplotě. Alfa amino Fmoc deprotekční kroky byly provedeny za použití 20% (v/v) piperidinu v DMF po dobu 25 minut. Štěpení peptidu a deprotekce vedlejšího řetězce byly dosaženy reakcí s TFA/CH₂Cl₂/anizolem. Peptidová pryskyřice byla podrobena reakci s TFA po dobu 2 x 90 minut, při pokojové teplotě a v dusíkové atmosféře. Po promytí CH₂Cl₂ a odpaření bylo reziduum podrobeno reakci s etyléterem, precipitát byl zfiltrován a vysušen ve vakuu.

Získaný surový peptid byl purifikován pomocí HPLC na C₁₈ 10μ-15μ 300A reverzním sloupci s gradientovou elucí za použití 0,06% směsi TFA/H₂O a 0,06% směsi TFA/acetonitril. Monitorace byla prováděna při 220 nm. Čisté frakce byly sbírány a lyofilizovány. Purifikovaný materiál byl převeden do formy hydrochloridní soli tak, že vznikla čistá sloučenina uvedená v titulku.

Podobným způsobem byly syntetizovány také následující peptidy:

- 1A H-Tyr-D-Ala-Phe-Phe-NH₂;
 1B H-Tyr-D-Ala-Phe(p-F)-Phe(p-F)-NH₂;

Příklad 2

Příprava sloučeniny 2C H-Tyr-D-Arg-Phe(p-F)-Phe-NH₂

Syntetický peptid byl připraven za použití Knorrový pryskyřice. Použité aminokyseliny měly aminoskupiny chráněny pomocí Fmoc a následující vedlejší řetězce byly chráněny takto: (Pmc) pro D-Arginin, tBu pro Tyrosin. Dimetylformamid použitý ve spojovacím kroku byl zbaven dimetylaminu. DMF použitý v promývacích krocích a TFA měly čistotu Biograde. Pro purifikační krok byly použity voda purifikovaná pomocí USP a acetonitril pro HPLC. Všechna zbývající rozpouštědla měla čistotu ACS a byla použita bez další purifikace.

Syntéza solidní fáze byla provedena manuálně na pryskyřici o zátěži 0,84 mmol/g. Kondenzace peptidu byla provedena za použití 2 ekvivalentů každé Fmoc aminokyseliny, HOBt a BOP v DMF po dobu 2-5 hodin při pokojové teplotě. Alfa amino Fmoc deprotekční kroky byly provedeny za použití 20% (v/v) piperidinu v DMF po dobu 25 minut. Štěpení peptidu a deprotekce vedlejšího řetězce byly dosaženy reakcí s TFA/CH₂Cl₂/anizolem. Peptidová pryskyřice byla podrobena reakci s TFA po dobu 2 x 90 minut, při pokojové teplotě a v dusíkové atmosféře. Po promytí CH₂Cl₂ a odpaření bylo reziduum podrobeno reakci s etyléterem, precipitát byl zfiltrován a vysušen ve vakuu.

Získaný surový peptid byl purifikován pomocí HPLC na C₁₈ 10μ-15μ 300A reverzním sloupcem s gradientovou elucí za použití 0,06% směsi TFA/H₂O a 0,06% směsi TFA/acetonitril. Monitorace byla prováděna při 220 nm. Čisté frakce byly sbírány a lyofilizovány.

Podobným způsobem byly syntetizovány také následující peptidy:

- 2A H-Tyr-D-Arg-Phe-Phe-NH₂
 2B H-Tyr-D-Arg-Phe(p-F)-Phe(p-F)-NH₂

Příklad 3

Analýza vazby radioligandu

PŘÍPRAVA MEMBRÁNY

Samci Sprague-Dawleyho krys vážící mezi 350-450 g byly usmrceni inhalací CO₂. Krysy byly dekapitovány a mozky bez mozečku vyjmuty a umístěny do ledového fyziologického roztoku a poté homogenizovány v ledovém 50 mM Tris pufru o pH 7,4 (10 ml/mozek). Membrány byly centrifugovány při 14000 ot/min po dobu 30 minut při teplotě 4°C. Pelety byly resuspendovány v přibližně 6 ml/mozek ledového Tris pufru 50 mM, pH 7,4 a skladovány při -78°C až do doby, kdy byly připraveny k použití. Kvantifikace proteinu homogenátu mozku byly provedena podle zakoupeného kitu na stanovení proteinů (Bio-Rad).

INHIBICE RADIOLIGANDŮ

(³H)- DAMGO a (³H)- DAGLE byly použity jako radioligandy pro μ a δ receptory, respektive. 50 μ l radioligandu, 100 μ l membrán a sériově naředěná testovaná sloučenina byly inkubovány po dobu 1 hodiny při 22°C. Nespecifická vazba byla určena za použití 500 násobného nadbytku neznačeného ligandu za přítomnosti značené látky a membrán. Volný ligand byl odseparován od navázaného ligandu filtrací přes Whatman GF/B filtrační papír (předem nasáknutý 1% vodným roztokem polyetyleniminu) a promytím ledovým 50 mM Tris pufrem o pH 7,4 za použití Brandelova buněčného sběrače. Filtry byly vysušeny a radioaktivita spočítána v 24 jamkové mikrodesece za přítomnosti 500 ml scintilační látky na jednu jamku. Radioaktivita byla měřena za použití počítače Wallac 1450 Microbeta.

Ki's pro různé sloučeniny byly určeny z IC_{50} podle rovnice Chenga a Prusoffa. Výsledky vazebné analýzy jsou shrnuty v tabulce 1.

Aktivita peptidových sloučenin vůči μ receptorům byla určena za použití testu s morčecím ileem (GPI) (preparát podélného svaly) podle postupů popsaných v Schiller et al., Biophys. Res. Commun., 85, str. 1322 (1975). Výsledky aktivity jsou shrnuty v tabulce 1.

Příklad 4

Test s horkou plotýnkou (měření analgetické aktivity) byl prováděn při 55°C. Pro tento test byly použity CD #1 samci myši vážící mezi 20 a 25 g. Myši byla zváženy, označeny a rozděleny do skupin po 10.

Myším byla aplikována subkutánní injekcí sloučenina (nebo standarda nebo medium) v injekčním objemu ekvivalentnímu 0,1 ml/10 g p.c. (10 ml/kg).

Reakční čas na horké plotýnce byl individuálně vyhodnocen pro každou myš. Teplota plotýnky (Sorel, model DS 37) byla nastavena na 55°C. U myši byly pozorovány příznaky diskomfortu, jako například lízání nebo třesení tlapek, pokus utéci (vyskakování z plotýnky) nebo chvění. Reakční čas byl započítán po objevení se prvního z těchto příznaků a byl zaznamenán v "sekundách". Každá myš byla pozorována po dobu maximálně 30 sekund, aby se zabránilo poškození tkáně tlapek.

Při každém odečítání byl průměrný reakční čas kontrolní skupiny násoben faktorem 1,5. Reakční čas každé zkoumané myši byl porovnán s hodnotou "průměru kontrol x 1,5". Pokud byl reakční čas pod hodnotou "průměr kontrol x 1,5", byla myš považována, že u ní analgetický efekt nenastal. Pokud byl reakční čas nad hodnotou "průměr kontrol x 1,5", byla myš

považována, že u ní analgetický efekt nastal. Podle počtu myši s analgetickým účinkem bylo pro každou skupinu vypočítáno procento analgezie pro danou sloučeninu. Pokud bylo procento analgezie pod 30%, byla sloučenina považována za neaktivní. Výsledky jsou ukázány na obrázcích 1 a 3.

Příklad 5

Test vyvolání svíjení

Test byl proveden na CD #1 samcích myši vážících mezi 18 a 22 g. Myši byla zváženy a označeny. Intraperitoneální cestou jim byl injikován roztok 0,02% fenylchinonu v množství 0,3 ml/20 g váhy. Bylo počítáno objevení se zkroucení částí těla v průběhu 15 minut. Fenylchinon byl injikován v časových intervalech 5, 20 anebo 60 minut po podání sloučeniny (nebo média či standardy) subkutánní cestou.

Roztok 0,02% fenylchinonu (2-fenyl-1,4-benzochinon, Sigma) byl připraven následujícím způsobem. 20 mg fenylchinonu bylo rozpuštěno v 5 ml 90% etanolu (sigma, reagens, alkohol). Rozpuštěný fenylchinon byl pomalu za stálého míchání přidán k 95 ml předeřáté (ne vařící) destilované vody. Roztok fenylchinonu byl nechán před použitím 2 hodiny stát a za všech okolností byl chráněn proti přístupu světla. Každý den byl připravován k testu nový roztok.

Výsledky testů jsou shrnuty níže v tabulce 1. Je vidět, že peptidové sloučeniny předkládaného vynálezu, kde buď jeden nebo oba R_3 a R_4 jsou Phe(p-F), vykazují vyšší selektivitu pro μ opioidní receptory ve srovnání s korespondující sloučeninou bez Phe(p-F), stejně tak jako vykazují vyšší transdukci receptoru, jak bylo určeno v testu GPI. Dále vykazují sloučeniny předkládaného vynálezu vyšší periferní analgetickou aktivitu, jak bylo prokázáno v testu vyvolání svíjení.

Tabulka 1

Příklad	Vazebná analýza			Svíjení	GPI
	$K_{i\mu}$ (nM)	$K_{i\delta}$ (nM)	$K_{i\delta}/K_{i\mu}$		
1A	1,53	625,8	409	1,4	3
1B	0,2	199,6	998	0,2	0,12
1C	0,36	201,2	559	0,5	
2A	0,68	1 652,6	2 430	0,5	6,7
2B	0,22	>1000		0,3	
2C	0,57	952,5	1 671	0,3	1,52

Příklad 6

Test s horkou plotýnkou (měření analgetické aktivity) byl prováděn při 58°C. Pro tento test byly použity NMRI samci myši vážící mezi 20 a 25 g. Myši byla zváženy, označeny a rozděleny do skupin po 6.

Myším byla aplikována subkutánní injekcí sloučenina (nebo standarda nebo medium) v injekčním objemu ekvivalentnímu 0,1 ml/10 g p.c. (10 ml/kg).

Reakční čas na horké plotýnce byl individuálně vyhodnocen pro každou myš. Teplota plotýnky (IITC, Inc; Model 35-0) byla nastaven na 58°C. U myši byly pozorovány příznaky diskomfortu, jako například lízání nebo třesení tlapek, pokus utéci (vyskakování z plotýnky) nebo chvění. Reakční čas byl započítán po objevení se prvního z těchto příznaků a byl zaznamenán v "sekundách". Každá myš byla pozorována po dobu maximálně 20 sekund, aby se zabránilo poškození tkáně tlapek.

Sloučenina byla hodnocena jako mající analgetický účinek, pokud se reakční čas lišil signifikantně ($p < 0,05$; two way ANOVA, sigma slot) od kontrolní skupiny.

Výsledky jsou uvedeny na obrázku 4.

Příklad 7

Tail-flick test (test trhnutí ocasem)

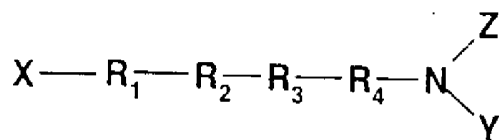
Pro tento test byly použity NMR1 samci myši vážící mezi 20 a 25 g. Myši byla zváženy, označeny a rozděleny do skupin po 6.

Myším byly aplikovány subkutánní injekcí sloučeniny (nebo standardní medium) v injekčním objemu ekvivalentnímu 0,1 ml/10 g p.c. (10 ml/kg).

Reakční čas v tail flick testu byl individuálně vyhodnocen pro každou myš. Latence v trhnutí ocasem byla měřena po namíření reostatem kontrolovaného světelného paprsku na konec ocasu (IITC, Inc; Model 33). Každá myš byla pozorována po dobu maximálně 10 sekund, aby se zabránilo poškození tkáně. Sloučenina byla hodnocena jako mající analgetický efekt, pokud se reakční čas lišil signifikantně ($p < 0,05$; two way ANOVA, Sigma Stat) od kontrolní skupiny.

Výsledky jsou uvedeny na obrázku 5.

1. Sloučenina definovaná vzorcem (1):



a její soli, deriváty a analoga,
kde

R_1 je Tyr nebo 2',6'-dimetyltirosin, nebo jeho analog či derivát;

R_2 je D-Ala nebo D-Arg;

R_3 je Phe(p-F);

R_4 je Phe nebo Phe (p-F);

X je H nebo C_{1-6} alkyl; a

Y a Z jsou nezávisle H, aralkyl nebo C_{1-6} alkyl.

2. Sloučenina definovaná patentovým nárokem 1, kde R_2 je D-Ala.

3. Sloučenina definovaná patentovým nárokem 1, kde R_2 je D-Arg.

4. Sloučenina definovaná patentovým nárokem 1, R_4 je Phe.

5. Sloučenina definovaná patentovým nárokem 4, kde R_2 je D-Ala.

6. Sloučenina definovaná patentovým nárokem 4, kde R_2 je D-Arg.

7. Sloučenina definovaná patentovými nároky 1 až 6, kde X je H, a Y a Z jsou H.

8. Sloučenina definovaná patentovým nárokem 1, vybraná z:

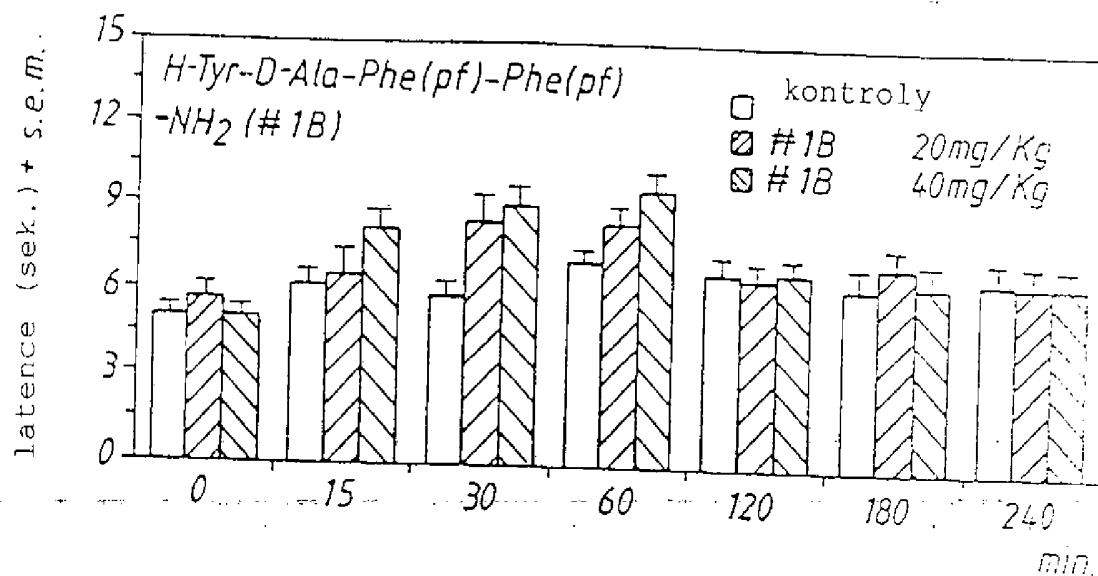
H-Tyr-D-Ala-Phe(p-F)-Phe(p-F)- NH_2 ; a

H-Tyr-D-Ala-Phe(p-F)-Phe-NH₂.

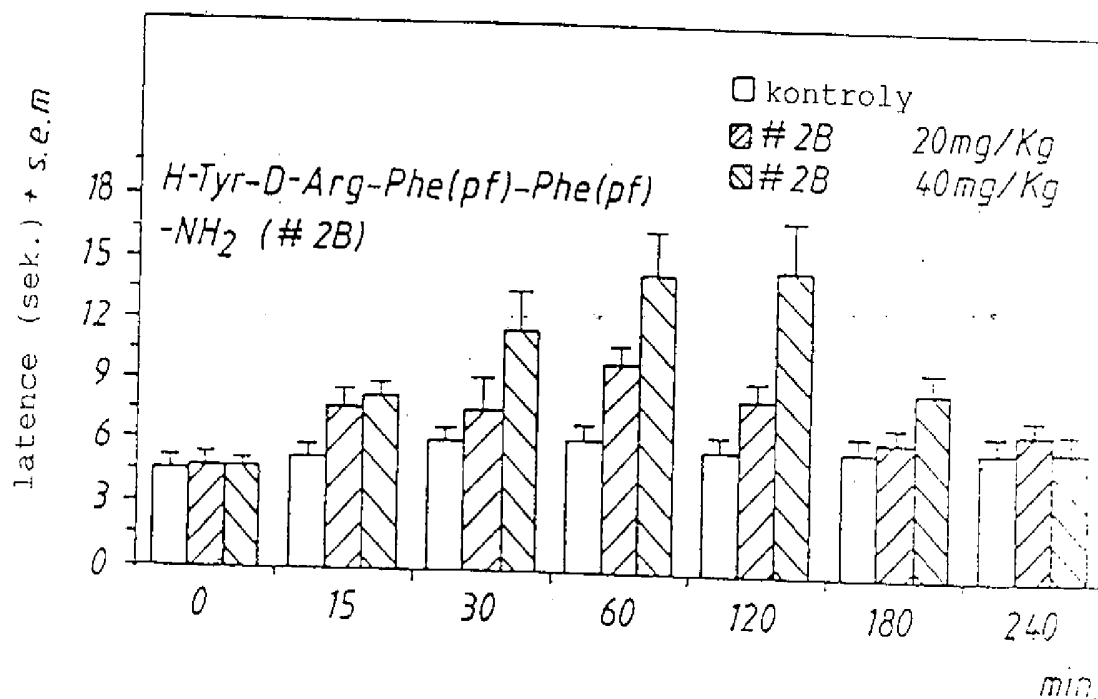
9. Sloučenina H-Tyr-D-Ala-Phe(p-F)-Phe-NH₂.
10. Sloučenina definovaná patentovým nárokem 1, vybraná z:
H-Tyr-D-Arg-Phe(p-F)-Phe(p-F)-NH₂; a
H-Tyr-D-Arg-Phe(p-F)-Phe-NH₂.
11. Sloučenina H-Tyr-D-Arg-Phe(p-F)-Phe-NH₂.
12. Farmaceutické složení zahrnující sloučeninu definovanou patentovými nároky 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 a 11, ve směsi s farmaceuticky přijatelným nosičem.
13. Farmaceutické složení zahrnující sloučeninu definovanou patentovým nárokem 7, ve směsi s farmaceuticky přijatelným nosičem.
14. Použití sloučeniny definované patentovými nároky 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 a 11 v přípravě léku účinného v léčbě bolesti.
15. Použití sloučeniny definované patentovým nárokem 7 v přípravě léku účinného v léčbě bolesti.
16. Metoda přípravy sloučeniny definované patentovým nárokem 1 za použití syntézy solidní fáze.

Obr. 1

1B Měření analgetické aktivity sloučeniny # 1B a sloučeniny
2B v testu s horkou plotýnkou

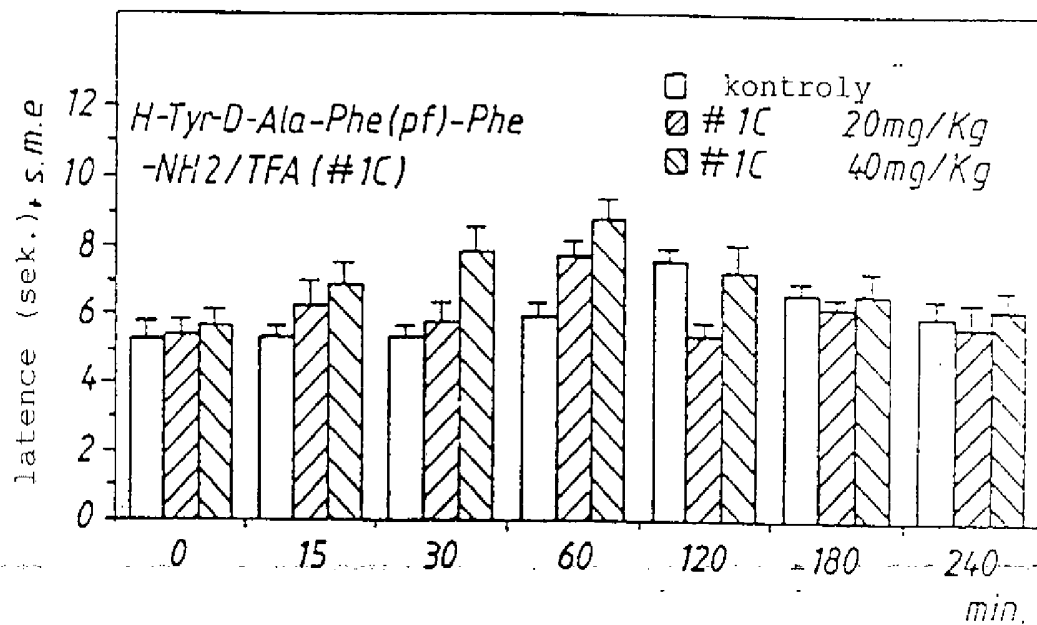


2B

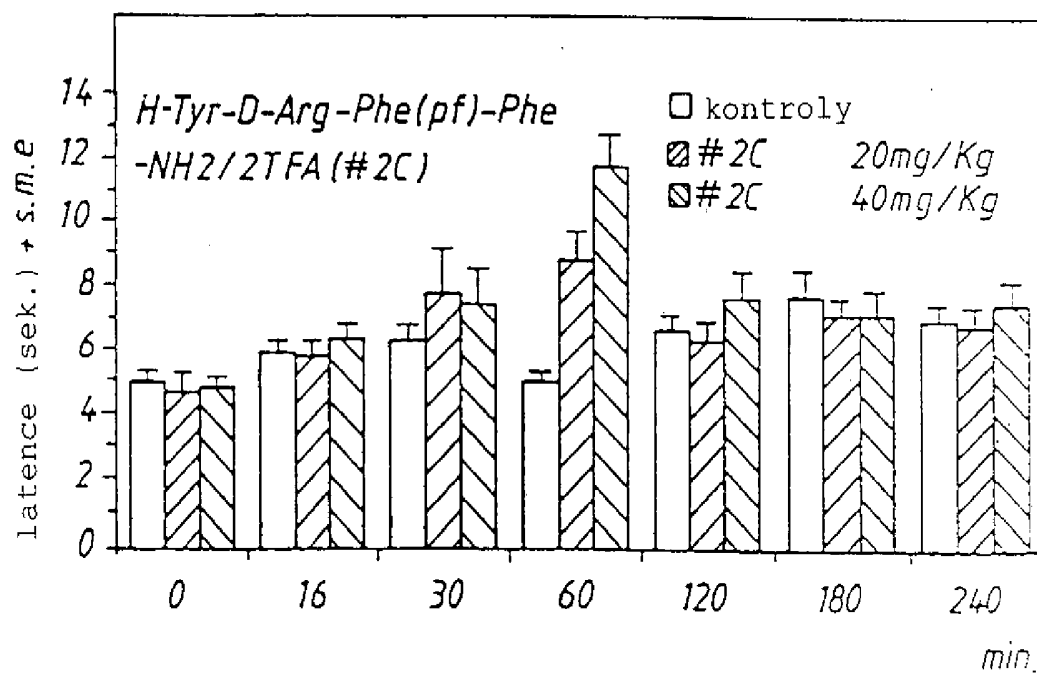


Obr. 2

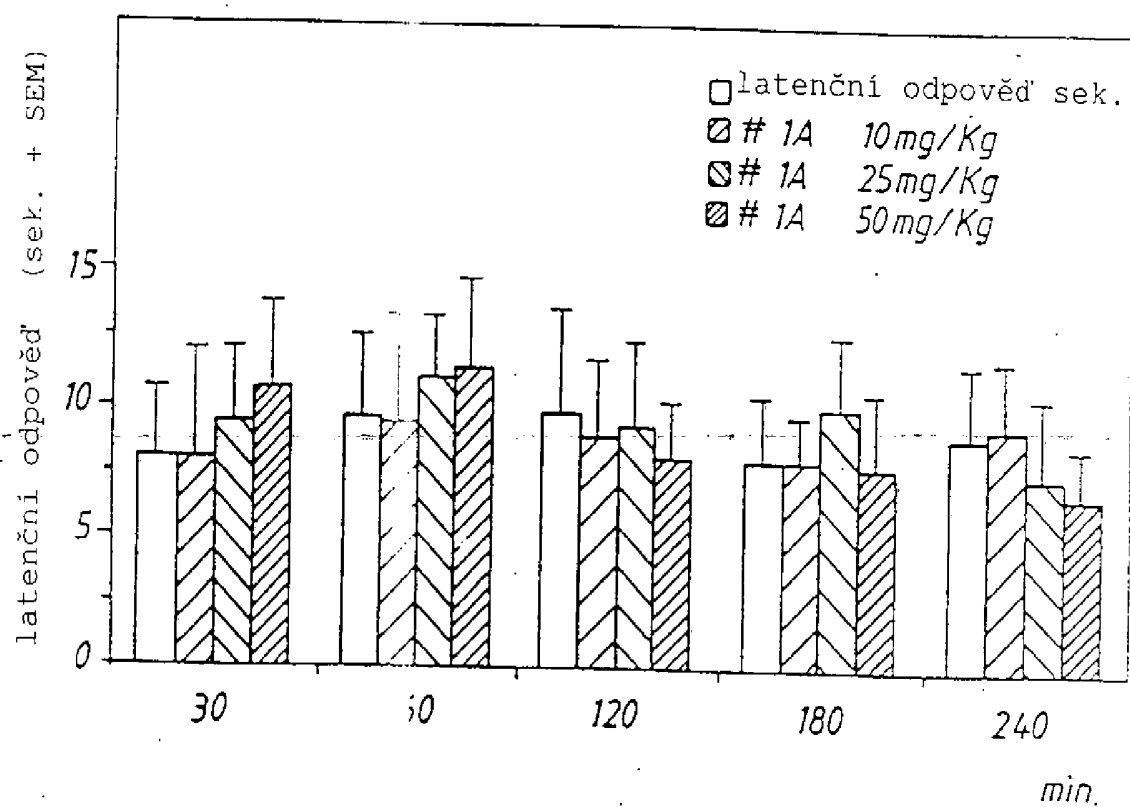
1C Měření analgetické aktivity sloučeniny # 1C a sloučeniny
2C v testu s horkou plotýnkou



2C

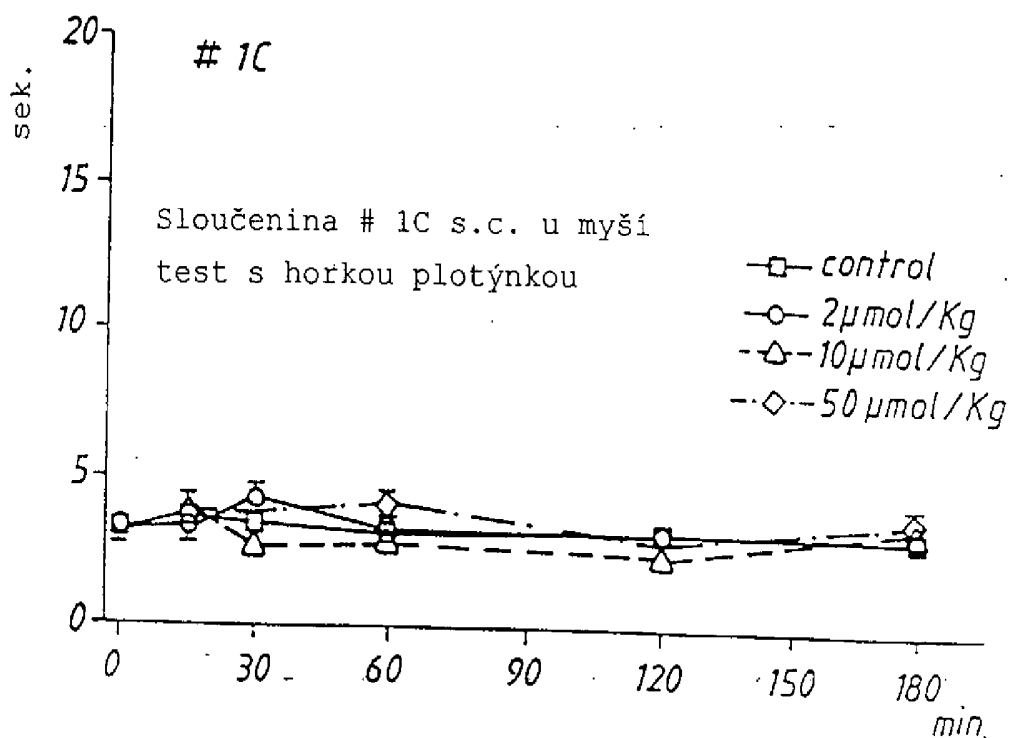
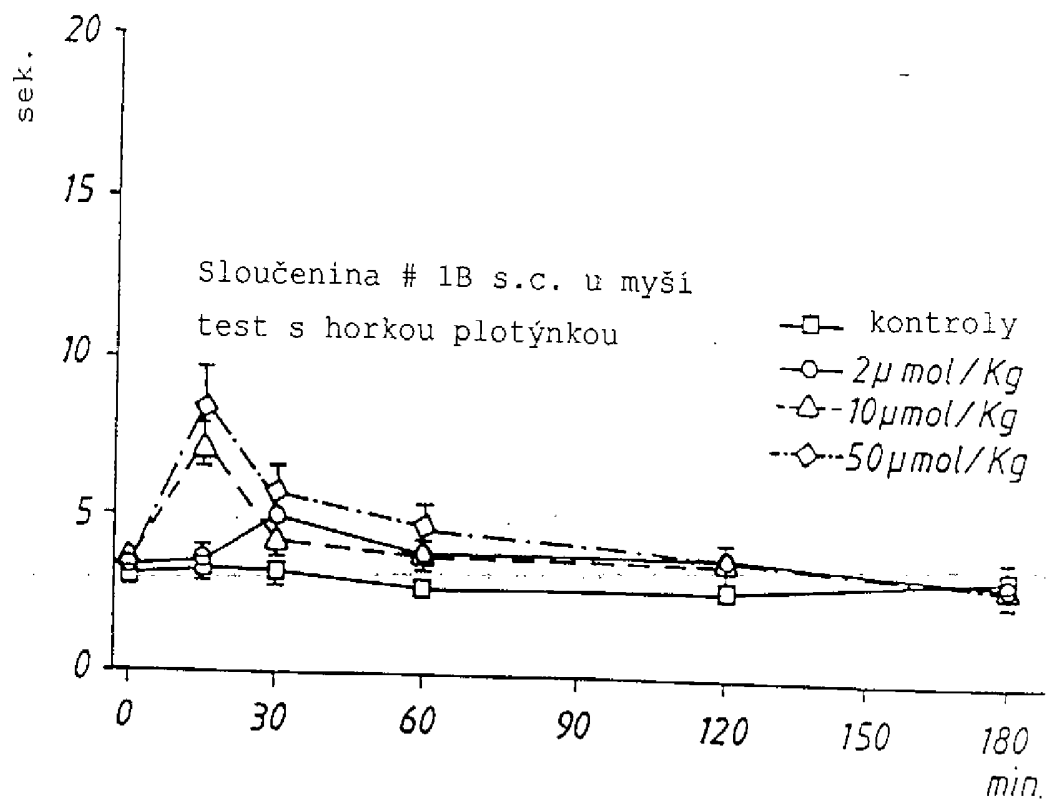


1A Měření analgetické aktivity sloučeniny # 1A v testu s
horkou plotýnkou



Obr. 4

1B Měření analgetické aktivity sloučeniny # 1B a sloučeniny
1C v testu s horkou plotýnkou



Obr. 5

1B Měření analgetické aktivity sloučeniny # 1B a sloučeniny
1C v tail-flick testu

