

(12) МЕЖДУНАРОДНАЯ ЗАЯВКА, ОПУБЛИКОВАННАЯ В СООТВЕТСТВИИ С
ДОГОВОРом О ПАТЕНТНОЙ КООПЕРАЦИИ (РСТ)

(19) Всемирная Организация
Интеллектуальной Собственности
Международное бюро



(10) Номер международной публикации
WO 2013/141750 A1

(43) Дата международной публикации
26 сентября 2013 (26.09.2013)

WIPO | PCT

- (51) Международная патентная классификация:
C07K 7/06 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)
A61K 38/08 (2006.01)
- (21) Номер международной заявки: PCT/RU2012/001036
- (22) Дата международной подачи:
07 декабря 2012 (07.12.2012)
- (25) Язык подачи: Русский
- (26) Язык публикации: Русский
- (30) Данные о приоритете:
2012110908 22 марта 2012 (22.03.2012) RU
- (71) Заявитель: КОТИН, Олег Аркадьевич (KOTIN, Oleg Arkadyevich) [RU/RU]; ул. Коли Подрядчиково, 12, кв. 7 Ленинградская область, Гатчина, 188300, Gatchina (RU).
- (72) Изобретатели; и
- (71) Заявители (только для US): ВЛАСОВ, Геннадий Петрович (VLASOV, Gennady Petrovich) [RU/RU]; Проспект Мориса Тереза, 9, кв. 73, Санкт-Петербург, 194021, St.Petersburg (RU). КОТИН, Аркадий Михайлович (KOTIN, Arkadiy Mihajlovich) [RU/RU]; Площадь Чернышевского, 7, кв. 33, Санкт-Петербург, 196128, St.Petersburg (RU).
- (74) Агент: ЗАКРЫТОЕ АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО УНИВЕРСАЛЬНАЯ КОНСАЛТИНГОВАЯ ФИРМА НЕЗАВИСИМЫХ ПАТЕНТНЫХ ПОВЕРЕННЫХ И ЮРИСТОВ "ЛЕВ КЛИМЕНКО" (CLOSED CORPORATION THE UNIVERSAL CONSULTING COMPANY OF INDEPENDENT PATENT ATTORNEYS AND LAWYERS "LEV KLIMENKO"); Сосинская, 43, стр. 1, Москва., 109316, Moscow (RU).
- (81) Указанные государства (если не указано иначе, для каждого вида национальной охраны): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Указанные государства (если не указано иначе, для каждого вида региональной охраны): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), евразийский (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), европейский патент (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Опубликована:

— с отчётом о международном поиске (статья 21.3)

[продолжение на следующей странице]

(54) Title: SYNTHETIC PEPTIDES WITH A NON-NARCOTIC TYPE OF ANALGESIC EFFECT

(54) Название изобретения : СИНТЕТИЧЕСКИЕ ПЕПТИДЫ С НЕНАРКОТИЧЕСКИМ ТИПОМ АНАЛЬГЕТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ

(57) Abstract: What are proposed are: synthetic peptides having a non-narcotic type of analgesic effect, of general formula 1 [SEQ ID NO:1], where: H is hydrogen, XDL is an omission of an amino acid or is L-Tyr, XDL1 is one of the following amino acids: L-Leu, L-Ala or D-Ala, XDL2 is one of the following amino acids: L-His, D-His, L-Ala or D-Ala, XDL3 is one of the following amino acids: L-Gln, L-Ala or D-Ala; R2 is OMe or NH2, and also retro-inversion peptides of formula (I), having a reverse sequence of amino acids with L-shaped amino acids being substituted by D-shaped amino acids, and D-shaped amino acids being substituted by L-shaped amino acids, of general formula 2 [SEQ ID NO:2], where: H is hydrogen, XDL4 is one of the following amino acids: D-Gln, D-Ala or L-Ala, XDL5 is one of the following amino acids: D-His, L-His, D-Ala or L-Ala, XDL6 is one of the following amino acids: D-Leu, D-Ala or L-Ala, XDL7 is an omission of an amino acid or is D-Tyr, R2 is OMe or NH2.

(57) Реферат: Предложены синтетические пептиды, обладающие ненаркотическим типом анальгетического действия, общей формулы 1 [SEQ ID NO:1], где: H - водород, XDL - отсутствие аминокислоты или L-Тир, XDL1 - одна из аминокислот: L-Leu, L-Ala или D-Ala, XDL2 - одна из аминокислот: L-His, D-His, L-Ala или D-Ala, XDL3 - одна из аминокислот: L-Gln, L-Ala или D-Ala; R2 - OMe или NH2, а также пептиды - ретроинверсии формулы (I), имеющие обратную последовательность аминокислот с заменой L-формы аминокислот на D-форму и D-формы аминокислот на L-форму, общей формулы 2 [SEQ ID NO:2], где: H - водород, XDL4 - одна из аминокислот: D-Gln, D-Ala или L-Ala, XDL5 - одна из аминокислот: D-His, L-His, D-Ala или L-Ala, XDL6 - одна из аминокислот: D-Leu, D-Ala или L-Ala, XDL7 - отсутствие аминокислоты или D-Тир, R2 - OMe или NH2.

WO 2013/141750 A1

— с перечнем последовательностей в соответствии с
Правилом 5.2(a)

СИНТЕТИЧЕСКИЕ ПЕПТИДЫ С НЕНАРКОТИЧЕСКИМ ТИПОМ АНАЛЬГЕТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ

Область техники

5 Изобретение относится к биохимии, конкретнее, к биологически активным пептидам, обладающим ненаркотическим типом анальгетического действия, которые могут найти применение в медицине и фармакологии в качестве обезболивающих анальгетических препаратов.

Предшествующий уровень техники

10 Известны различные обезболивающие препараты, которые по своей химической природе и механизму действия подразделяются на наркотические (морфин и близкие к нему структуры) и ненаркотические анальгетики (производные салициловой кислоты, пиразолона, анилина и др.). Все вышеперечисленные анальгетики обладают теми или иными недостатками, которые резко сужают возможности их применения в медицине

15 (М. Д. Машковский. Лекарственные средства, Харьков: из-во «Торсинг», 1997, издание 13, с.144-145).

Известны пептидные анальгетики - синтетические аналоги природных энкефалинов и эндорфинов, – опиоидные пептиды (Casy A.F., Parfitt A.C., Opioid analgesics: Chemistry and receptors. New York, Plenum Press, 1986,445-502; Lierz P.,

20 Stefan Punsmann S., 2008). Их основным недостатком является то, что обезболивающая активность сопровождается привыканием и наркотическим действием. Кроме того наркотические анальгетики эффективны не при всех болевых синдромах (Fallon M. When morphine does not work. Support Care Cancer. 2008 Feb 15).

Также известны пептидные анальгетики, обладающие ненаркотическим типом

25 обезболивания, не вызывающие привыкания и наркотического действия. Их обезболивающее действие развивается через неопиоидные рецепторы и нейромедиаторы. В этой группе препаратов самое широкое распространение получили синтетические и, в последнее время, рекомбинантные кальцитонины, обезболивающее действие которых реализуется через специфические

30 кальцитониновые рецепторы и серотонинэргическую систему мозга (Yasushi Kuraishi /Neuropeptide action of calcitonin-analgesic effect/ in Magazine Kidney and Metabolic Bone Disease,V.14 No03). Наиболее часто используют синтетическую

последовательность, соответствующую кальцитонину лосося, как наиболее активному из всех известных кальцитонинов. Кальцитонин лосося - полипептидный гормон, состоящий из 32 остатков аминокислот с молекулярным весом 3454,93 дальтон. Его структура представляет собой альфа-спираль (Andreotti G. et al, 2006).

5 Первичная структура (последовательность аминокислотных остатков) кальцитонина лосося выглядит следующим образом:

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18
Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-Glu-Lys-Leu-Ser-Gln-Asp-Leu-His-Lys-
19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32
10 Leu-Gln-Thr-Phe-Pro-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ala-Gly-Val-Pro-NH₂

Кальцитонин лосося обладает длительным обезболивающим действием и существует сейчас в различных лекарственных формах: в виде спрея или капель для интраназального использования, для орального и внутримышечного введения, а также
15 в виде свечей.

Однако полноразмерные кальцитонины обладают рядом принципиальных недостатков, в том числе:

1) Гормональная активность, влияние на кальциевый и фосфорный обмены. В этой связи кальцитонины не могут быть использованы во время беременности и
20 обезболивания родов, так как возможны тератогенные эффекты и отдаленные последствия на потомство.

2) Иммунологическая активность. В силу этого при длительном использовании кальцитонина, как это имеет место при лечении и профилактике остеопороза, образуются нейтрализующие антитела, что снижает эффективность использования
25 кальцитонина (Levy F et al., Formation of Neutralizing Antibodies During Intranasal Synthetic Salmon Calcitonin Treatment of Pagets Disease. 1988,67,3,541-545).

3) Полноразмерные кальцитонины содержат амилоидобразующую последовательность Gly²-Gln¹⁴, общую для многих амилоидобразующих белков (Steven S.-S. Wang¹, Theresa A. Good² and Dawn L. Rymer³).

30 4) Стоимость синтеза полноразмерного кальцитонина и стоимость лечения этим препаратом очень велика. Поэтому кальцитонины относят к орфановым лекарствам, к которым обращаются только тогда, когда нет альтернативных путей лечения, например, при болезни Пейджета (Maresca V. Human calcitonin in the Manangement of osteoporosis: A multicenter Study.- J.Int.Med.Res.,1985,13,311-316).

С целью устранения отмеченных недостатков нами был выделен фрагмент кальцитонина лосося, состоящего из 16-21 аминокислот кальцитонина лосося (далее *CT₁₆₋₂₁*), названный «активный центр» кальцитонина (G. P. Vlasov, V. R. Glushenkova, A. M. Kotin et al (1989) “ Search of Active Centre of Calcitonin”, Chemistry of Peptides and Proteins 4, 89):

16 17 18 19 20 21
Leu -His-Lys-Leu-Gln-Thr

Было показано, что природный фрагмент кальцитонина лосося - пептид *CT₁₆₋₂₁* обладает высокой анальгетической активностью в формалиновом тесте на крысах, позволяющем выявить ненаркотический тип обезболивания, и при этом не обладает иммунологической активностью, не влияет на кальциевый обмен и не содержит амилоидообразующей последовательности. Сравнение с аналогичными последовательностями (16-21) кальцитонинов человека, свиньи, быка, крысы выявило большую активность, по сравнению с последними. (А. М. Котин, Г. П. Власов и др. (1988) «Поиск «активного центра» и сравнительное изучение полноразмерного кальцитонина и последовательности 16-21 различных кальцитонинов в разных физиологических тестах» Тезисы докладов симпозиума «Физиология пептидов» Ленинград, 106).

Раскрытие изобретения

Задача, на решение которой направлено предлагаемое изобретение, состоит в расширении ассортимента эффективных средств, обладающих ненаркотическим типом анальгетического действия, и получаемых простым синтезом.

Поставленная задача решается тем, что предложены синтетические пептиды общей формулы 1 [SEQ ID NO:1]

H- XDL-XDL1-XDL2 - L- Lys - L-Leu - XDL3 - L-Thr -R2 (I), где:

H - водород,

XDL - отсутствие аминокислоты или L-Тур,

XDL1 - одна из аминокислот: L-Leu, L-Ala или D-Ala,

XDL2 - одна из аминокислот: L-His, D-His, L-Ala или D-Ala,

XDL3 - одна из аминокислот: L-Gln, L-Ala или D-Ala;

R2 - OMe или NH₂,

или пептиды - ретроинверсии формулы (I), имеющие обратную последовательность аминокислот с заменой L-формы аминокислот на D-форму и D-формы аминокислот на L-форму, общей формулы 2 [SEQ ID NO:2]

H- D-Thr –XDL4– D-Leu – D- Lys – XDL5– XDL6 - XDL7 –R2 (II), где:

- 5 H – водород,
 XDL4 - одна из аминокислот: D-Gln, D-Ala или L-Ala;
 XDL5 - одна из аминокислот: D-His, L-His, D-Ala или L-Ala,
 XDL6 - одна из аминокислот: D-Leu, D-Ala или L-Ala,
 XDL7 - отсутствие аминокислоты или D-Тур,
 10 R2 - OMe или NH₂,
 в качестве обезболивающих препаратов с ненаркотическим типом анальгетического действия.

Предложенные пептиды обладают обезболивающим действием, в том числе при системном или интраназальном введении.

- 15 Сущность изобретения заключается в том, что экспериментальным путем было установлено, что заявляемые пептиды, имеющие простую структуру, что облегчает их получение химическим путем, обладают высокой обезболивающей активностью, проверенной анальгетическими тестами, проведенными на животных.

Некоторые пептиды общей формулы I, II представлены в таблице 1:

- 20 **Таблица 1. Некоторые последовательности аминокислот для заявленных пептидов, отвечающие общей формуле I или II.**

SEQ ID NO:1							
H-	L-Leu-	L-His-	L-Lys-	L-Leu-	L-Gln-	L-Thr-	OMe
H-	L-Leu-	L-His-	L-Lys-	L-Leu-	L-Gln-	L-Thr-	NH ₂
H-	L-Ala-	L-His-	L-Lys-	L-Leu-	L-Gln-	L-Thr-	OMe
H-	L-Ala-	L-His-	L-Lys-	L-Leu-	L-Gln-	L-Thr-	NH ₂
H-	D-Ala-	L-His-	L-Lys-	L-Leu-	L-Gln-	L-Thr-	OMe
H-	D-Ala-	L-His-	L-Lys-	L-Leu-	L-Gln-	L-Thr-	NH ₂
H-	L-Leu-	D-His-	L-Lys-	L-Leu-	L-Gln-	L-Thr-	OMe
H-	L-Leu-	D-His-	L-Lys-	L-Leu-	L-Gln-	L-Thr-	NH ₂
H-	L-Ala-	D-His-	L-Lys-	L-Leu-	L-Gln-	L-Thr-	OMe
H-	L-Ala-	D-His-	L-Lys-	L-Leu-	L-Gln-	L-Thr-	NH ₂
H-	D-Ala-	D-His-	L-Lys-	L-Leu-	L-Gln-	L-Thr-	OMe

H-	D-Ala-	D-His-	L-Lys-	L-Leu-	L-Gln-	L-Thr-	NH ₂
H-	L-Leu-	L-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	L-Gln-	L-Thr-	OMe
H-	L-Leu-	L-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	L-Gln-	L-Thr-	NH ₂
H-	L-Ala-	L-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	L-Gln-	L-Thr-	OMe
H-	L-Ala-	L-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	L-Gln-	L-Thr-	NH ₂
H-	D-Ala-	L-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	L-Gln-	L-Thr-	OMe
H-	D-Ala-	L-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	L-Gln-	L-Thr-	NH ₂
H-	L-Leu-	D-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	L-Gln-	L-Thr-	OMe
H-	L-Leu-	D-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	L-Gln-	L-Thr-	NH ₂
H-	L-Ala-	D-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	L-Gln-	L-Thr-	OMe
H-	L-Ala-	D-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	L-Gln-	L-Thr-	NH ₂
H-	D-Ala-	D-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	L-Gln-	L-Thr-	OMe
H-	D-Ala-	D-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	L-Gln-	L-Thr-	NH ₂
H-	L-Leu-	L-His-	L-Lys-	L-Leu-	L-Ala-	L-Thr-	OMe
H-	L-Leu-	L-His-	L-Lys-	L-Leu-	L-Ala-	L-Thr-	NH ₂
H-	L-Ala-	L-His-	L-Lys-	L-Leu-	L-Ala-	L-Thr-	OMe
H-	L-Ala-	L-His-	L-Lys-	L-Leu-	L-Ala-	L-Thr-	NH ₂
H-	D-Ala-	L-His-	L-Lys-	L-Leu-	L-Ala-	L-Thr-	OMe
H-	D-Ala-	L-His-	L-Lys-	L-Leu-	L-Ala-	L-Thr-	NH ₂
H-	L-Leu-	D-His-	L-Lys-	L-Leu-	L-Ala-	L-Thr-	OMe
H-	L-Leu-	D-His-	L-Lys-	L-Leu-	L-Ala-	L-Thr-	NH ₂
H-	L-Ala-	D-His-	L-Lys-	L-Leu-	L-Ala-	L-Thr-	OMe
H-	L-Ala-	D-His-	L-Lys-	L-Leu-	L-Ala-	L-Thr-	NH ₂
H-	D-Ala-	D-His-	L-Lys-	L-Leu-	L-Ala-	L-Thr-	OMe
H-	D-Ala-	D-His-	L-Lys-	L-Leu-	L-Ala-	L-Thr-	NH ₂
H-	L-Leu-	L-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	L-Ala-	L-Thr-	OMe
H-	L-Leu-	L-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	L-Ala-	L-Thr-	NH ₂
H-	L-Ala-	L-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	L-Ala-	L-Thr-	OMe
H-	L-Ala-	L-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	L-Ala-	L-Thr-	NH ₂
H-	D-Ala-	L-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	L-Ala-	L-Thr-	OMe
H-	D-Ala-	L-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	L-Ala-	L-Thr-	NH ₂
H-	L-Leu-	D-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	L-Ala-	L-Thr-	OMe
H-	L-Leu-	D-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	L-Ala-	L-Thr-	NH ₂
H-	L-Ala-	D-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	L-Ala-	L-Thr-	OMe
H-	L-Ala-	D-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	L-Ala-	L-Thr-	NH ₂
H-	D-Ala-	D-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	L-Ala-	L-Thr-	OMe
H-	D-Ala-	D-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	L-Ala-	L-Thr-	NH ₂
H-	L-Leu-	L-His-	L-Lys-	L-Leu-	D-Ala-	L-Thr-	OMe
H-	L-Leu-	L-His-	L-Lys-	L-Leu-	D-Ala-	L-Thr-	NH ₂
H-	L-Ala-	L-His-	L-Lys-	L-Leu-	D-Ala-	L-Thr-	OMe
H-	L-Ala-	L-His-	L-Lys-	L-Leu-	D-Ala-	L-Thr-	NH ₂
H-	D-Ala-	L-His-	L-Lys-	L-Leu-	D-Ala-	L-Thr-	OMe
H-	D-Ala-	L-His-	L-Lys-	L-Leu-	D-Ala-	L-Thr-	NH ₂
H-	L-Leu-	D-His-	L-Lys-	L-Leu-	D-Ala-	L-Thr-	OMe
H-	L-Leu-	D-His-	L-Lys-	L-Leu-	D-Ala-	L-Thr-	NH ₂
H-	L-Ala-	D-His-	L-Lys-	L-Leu-	D-Ala-	L-Thr-	OMe
H-	L-Ala-	D-His-	L-Lys-	L-Leu-	D-Ala-	L-Thr-	NH ₂
H-	D-Ala-	D-His-	L-Lys-	L-Leu-	D-Ala-	L-Thr-	OMe
H-	D-Ala-	D-His-	L-Lys-	L-Leu-	D-Ala-	L-Thr-	NH ₂

H-	L-Tyr-	L-Leu-	L-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	L-Ala-	L-Thr-	NH ₂
H-	L-Tyr-	L-Ala-	L-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	L-Ala-	L-Thr-	OMe
H-	L-Tyr-	L-Ala-	L-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	L-Ala-	L-Thr-	NH ₂
H-	L-Tyr-	D-Ala-	L-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	L-Ala-	L-Thr-	OMe
H-	L-Tyr-	D-Ala-	L-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	L-Ala-	L-Thr-	NH ₂
H-	L-Tyr-	L-Leu-	D-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	L-Ala-	L-Thr-	OMe
H-	L-Tyr-	L-Leu-	D-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	L-Ala-	L-Thr-	NH ₂
H-	L-Tyr-	L-Ala-	D-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	L-Ala-	L-Thr-	OMe
H-	L-Tyr-	L-Ala-	D-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	L-Ala-	L-Thr-	NH ₂
H-	L-Tyr-	D-Ala-	D-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	L-Ala-	L-Thr-	OMe
H-	L-Tyr-	D-Ala-	D-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	L-Ala-	L-Thr-	NH ₂
H-	L-Tyr-	L-Leu-	L-His-	L-Lys-	L-Leu-	D-Ala-	L-Thr-	OMe
H-	L-Tyr-	L-Leu-	L-His-	L-Lys-	L-Leu-	D-Ala-	L-Thr-	NH ₂
H-	L-Tyr-	L-Ala-	L-His-	L-Lys-	L-Leu-	D-Ala-	L-Thr-	OMe
H-	L-Tyr-	L-Ala-	L-His-	L-Lys-	L-Leu-	D-Ala-	L-Thr-	NH ₂
H-	L-Tyr-	D-Ala-	L-His-	L-Lys-	L-Leu-	D-Ala-	L-Thr-	OMe
H-	L-Tyr-	D-Ala-	L-His-	L-Lys-	L-Leu-	D-Ala-	L-Thr-	NH ₂
H-	L-Tyr-	L-Leu-	D-His-	L-Lys-	L-Leu-	D-Ala-	L-Thr-	OMe
H-	L-Tyr-	L-Leu-	D-His-	L-Lys-	L-Leu-	D-Ala-	L-Thr-	NH ₂
H-	L-Tyr-	L-Ala-	D-His-	L-Lys-	L-Leu-	D-Ala-	L-Thr-	OMe
H-	L-Tyr-	L-Ala-	D-His-	L-Lys-	L-Leu-	D-Ala-	L-Thr-	NH ₂
H-	L-Tyr-	D-Ala-	D-His-	L-Lys-	L-Leu-	D-Ala-	L-Thr-	OMe
H-	L-Tyr-	D-Ala-	D-His-	L-Lys-	L-Leu-	D-Ala-	L-Thr-	NH ₂
H-	L-Tyr-	L-Leu-	L-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	D-Ala-	L-Thr-	OMe
H-	L-Tyr-	L-Leu-	L-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	D-Ala-	L-Thr-	NH ₂
H-	L-Tyr-	L-Ala-	L-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	D-Ala-	L-Thr-	OMe
H-	L-Tyr-	L-Ala-	L-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	D-Ala-	L-Thr-	NH ₂
H-	L-Tyr-	D-Ala-	L-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	D-Ala-	L-Thr-	OMe
H-	L-Tyr-	D-Ala-	L-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	D-Ala-	L-Thr-	NH ₂
H-	L-Tyr-	L-Leu-	D-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	D-Ala-	L-Thr-	OMe
H-	L-Tyr-	L-Leu-	D-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	D-Ala-	L-Thr-	NH ₂
H-	L-Tyr-	L-Ala-	D-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	D-Ala-	L-Thr-	OMe
H-	L-Tyr-	L-Ala-	D-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	D-Ala-	L-Thr-	NH ₂
H-	L-Tyr-	D-Ala-	D-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	D-Ala-	L-Thr-	OMe
H-	L-Tyr-	D-Ala-	D-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	D-Ala-	L-Thr-	NH ₂
SEQ ID NO:2								
H-	D-Thr-	D-Gln-	D-Leu-	D-Lys-	D-His-	D-Leu-	OMe	
H-	D-Thr-	D-Gln-	D-Leu-	D-Lys-	D-His-	D-Leu-	NH ₂	
H-	D-Thr-	D-Gln-	D-Leu-	D-Lys-	D-His-	D-Ala-	OMe	
H-	D-Thr-	D-Gln-	D-Leu-	D-Lys-	D-His-	D-Ala-	NH ₂	
H-	D-Thr-	D-Gln-	D-Leu-	D-Lys-	D-His-	L-Ala-	OMe	
H-	D-Thr-	D-Gln-	D-Leu-	D-Lys-	D-His-	L-Ala-	NH ₂	
H-	D-Thr-	D-Gln-	D-Leu-	D-Lys-	L-His-	D-Leu-	OMe	
H-	D-Thr-	D-Gln-	D-Leu-	D-Lys-	L-His-	D-Leu-	NH ₂	
H-	D-Thr-	D-Gln-	D-Leu-	D-Lys-	L-His-	D-Ala-	OMe	
H-	D-Thr-	D-Gln-	D-Leu-	D-Lys-	L-His-	D-Ala-	NH ₂	
H-	D-Thr-	D-Gln-	D-Leu-	D-Lys-	L-His-	L-Ala-	OMe	

H-	D-Thr-	D-Gln-	D-Leu-	D-Lys-	L-His-	L-Ala-	NH ₂
H-	D-Thr-	D-Gln-	D-Leu-	D-Lys-	D-Ala-	D-Leu-	OMe
H-	D-Thr-	D-Gln-	D-Leu-	D-Lys-	D-Ala-	D-Leu-	NH ₂
H-	D-Thr-	D-Gln-	D-Leu-	D-Lys-	D-Ala-	D-Ala-	OMe
H-	D-Thr-	D-Gln-	D-Leu-	D-Lys-	D-Ala-	D-Ala-	NH ₂
H-	D-Thr-	D-Gln-	D-Leu-	D-Lys-	D-Ala-	L-Ala-	OMe
H-	D-Thr-	D-Gln-	D-Leu-	D-Lys-	D-Ala-	L-Ala-	NH ₂
H-	D-Thr-	D-Gln-	D-Leu-	D-Lys-	L-Ala-	D-Leu-	OMe
H-	D-Thr-	D-Gln-	D-Leu-	D-Lys-	L-Ala-	D-Leu-	NH ₂
H-	D-Thr-	D-Gln-	D-Leu-	D-Lys-	L-Ala-	D-Ala-	OMe
H-	D-Thr-	D-Gln-	D-Leu-	D-Lys-	L-Ala-	D-Ala-	NH ₂
H-	D-Thr-	D-Gln-	D-Leu-	D-Lys-	L-Ala-	L-Ala-	OMe
H-	D-Thr-	D-Gln-	D-Leu-	D-Lys-	L-Ala-	L-Ala-	NH ₂
H-	D-Thr-	D-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	D-His-	D-Leu-	OMe
H-	D-Thr-	D-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	D-His-	D-Leu-	NH ₂
H-	D-Thr-	D-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	D-His-	D-Ala-	OMe
H-	D-Thr-	D-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	D-His-	D-Ala-	NH ₂
H-	D-Thr-	D-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	D-His-	L-Ala-	OMe
H-	D-Thr-	D-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	D-His-	L-Ala-	NH ₂
H-	D-Thr-	D-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	L-His-	D-Leu-	OMe
H-	D-Thr-	D-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	L-His-	D-Leu-	NH ₂
H-	D-Thr-	D-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	L-His-	D-Ala-	OMe
H-	D-Thr-	D-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	L-His-	D-Ala-	NH ₂
H-	D-Thr-	D-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	L-His-	L-Ala-	OMe
H-	D-Thr-	D-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	L-His-	L-Ala-	NH ₂
H-	D-Thr-	D-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	D-Ala-	D-Leu-	OMe
H-	D-Thr-	D-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	D-Ala-	D-Leu-	NH ₂
H-	D-Thr-	D-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	D-Ala-	D-Ala-	OMe
H-	D-Thr-	D-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	D-Ala-	D-Ala-	NH ₂
H-	D-Thr-	D-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	D-Ala-	L-Ala-	OMe
H-	D-Thr-	D-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	D-Ala-	L-Ala-	NH ₂
H-	D-Thr-	D-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	L-Ala-	D-Leu-	OMe
H-	D-Thr-	D-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	L-Ala-	D-Leu-	NH ₂
H-	D-Thr-	D-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	L-Ala-	D-Ala-	OMe
H-	D-Thr-	D-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	L-Ala-	D-Ala-	NH ₂
H-	D-Thr-	D-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	L-Ala-	L-Ala-	OMe
H-	D-Thr-	D-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	L-Ala-	L-Ala-	NH ₂
H-	D-Thr-	L-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	D-His-	D-Leu-	OMe
H-	D-Thr-	L-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	D-His-	D-Leu-	NH ₂
H-	D-Thr-	L-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	D-His-	D-Ala-	OMe
H-	D-Thr-	L-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	D-His-	D-Ala-	NH ₂
H-	D-Thr-	L-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	D-His-	L-Ala-	OMe
H-	D-Thr-	L-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	D-His-	L-Ala-	NH ₂
H-	D-Thr-	L-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	L-His-	D-Leu-	OMe
H-	D-Thr-	L-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	L-His-	D-Leu-	NH ₂
H-	D-Thr-	L-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	L-His-	D-Ala-	OMe
H-	D-Thr-	L-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	L-His-	D-Ala-	NH ₂
H-	D-Thr-	L-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	L-His-	L-Ala-	OMe
H-	D-Thr-	L-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	L-His-	L-Ala-	NH ₂

H-	D-Thr-	D-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	D-Ala-	D-Leu-	D-Tyr-	NH ₂
H-	D-Thr-	D-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	D-Ala-	D-Ala-	D-Tyr-	OMe
H-	D-Thr-	D-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	D-Ala-	D-Ala-	D-Tyr-	NH ₂
H-	D-Thr-	D-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	D-Ala-	L-Ala-	D-Tyr-	OMe
H-	D-Thr-	D-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	D-Ala-	L-Ala-	D-Tyr-	NH ₂
H-	D-Thr-	D-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	L-Ala-	D-Leu-	D-Tyr-	OMe
H-	D-Thr-	D-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	L-Ala-	D-Ala-	D-Tyr-	NH ₂
H-	D-Thr-	D-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	L-Ala-	D-Ala-	D-Tyr-	OMe
H-	D-Thr-	D-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	L-Ala-	L-Ala-	D-Tyr-	NH ₂
H-	D-Thr-	D-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	L-Ala-	L-Ala-	D-Tyr-	OMe
H-	D-Thr-	L-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	D-His-	D-Leu-	D-Tyr-	OMe
H-	D-Thr-	L-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	D-His-	D-Leu-	D-Tyr-	NH ₂
H-	D-Thr-	L-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	D-His-	D-Ala-	D-Tyr-	OMe
H-	D-Thr-	L-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	D-His-	D-Ala-	D-Tyr-	NH ₂
H-	D-Thr-	L-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	D-His-	L-Ala-	D-Tyr-	OMe
H-	D-Thr-	L-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	D-His-	L-Ala-	D-Tyr-	NH ₂
H-	D-Thr-	L-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	L-His-	D-Leu-	D-Tyr-	OMe
H-	D-Thr-	L-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	L-His-	D-Leu-	D-Tyr-	NH ₂
H-	D-Thr-	L-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	L-His-	D-Ala-	D-Tyr-	OMe
H-	D-Thr-	L-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	L-His-	D-Ala-	D-Tyr-	NH ₂
H-	D-Thr-	L-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	L-His-	L-Ala-	D-Tyr-	OMe
H-	D-Thr-	L-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	L-His-	L-Ala-	D-Tyr-	NH ₂
H-	D-Thr-	L-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	D-Ala-	D-Leu-	D-Tyr-	OMe
H-	D-Thr-	L-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	D-Ala-	D-Leu-	D-Tyr-	NH ₂
H-	D-Thr-	L-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	D-Ala-	D-Ala-	D-Tyr-	OMe
H-	D-Thr-	L-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	D-Ala-	D-Ala-	D-Tyr-	NH ₂
H-	D-Thr-	L-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	D-Ala-	L-Ala-	D-Tyr-	OMe
H-	D-Thr-	L-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	D-Ala-	L-Ala-	D-Tyr-	NH ₂
H-	D-Thr-	L-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	L-Ala-	D-Leu-	D-Tyr-	OMe
H-	D-Thr-	L-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	L-Ala-	D-Leu-	D-Tyr-	NH ₂
H-	D-Thr-	L-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	L-Ala-	D-Ala-	D-Tyr-	OMe
H-	D-Thr-	L-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	L-Ala-	D-Ala-	D-Tyr-	NH ₂
H-	D-Thr-	L-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	L-Ala-	L-Ala-	D-Tyr-	OMe
H-	D-Thr-	L-Ala-	D-Leu-	D-Lys-	L-Ala-	L-Ala-	D-Tyr-	NH ₂

Все пептиды этого семейства обладали анальгетической активностью.

Примеры осуществления изобретения.

Синтез пептидов формулы I осуществляли методами пептидной химии, твердофазным методом синтеза с использованием L и D аминокислот.

5 Пример 1. Синтез пептида H-Leu-His-Lys-Leu-Gln-Thr-Tyr-NH₂

Пептид H-Leu-His-Lys-Leu-Gln-Thr-Tyr-NH₂ получали методом автоматического твердофазного синтеза по Fmoc-схеме на полимере Ринка (Rink Amide Resin, 0,6 ммоль амино-групп на 1г полимера) с использованием DCC/HOBt (N,N'-дициклогексилкарбодимид/1-гидроксибензотриазол) метода активации аминокислот.

- 5 Деблокирование производили путем обработки раствором piperidine/DMF (пиперидин/N,N-диметилформамид) (1:4) в течении 7 минут. Защиту групп боковых цепей производили следующими группами: tBu (трет-бутиловый эфир) для тирозина, треонина, Trt (тритил или трифенилметил) для глутамина и для гистидина, Boc (т-бутилоксикарбонил) для лизина. Пептиды отщепляли от полимера и деблокировали
- 10 смесью TFA/H₂O/EDT (трифторуксусная кислота/вода/1,2-этандитиол) (90:5:5). Очистку пептидов проводили путем обратнофазовой ВЭЖХ (колонка C18), Элюент - ацетонитрил - вода (0,1М дигидрофосфата калия) в соотношении 6:4. Пептиды были охарактеризованы с помощью масс-спектрометра.

- Была произведена замена аминокислот в отдельных позициях пептида *CT₁₆₋₂₁* и
- 15 выяснено, как это влияет на обезболивающие свойства полученных пептидов. Анальгетическую активность вновь синтезированных пептидов проверяли в «формалином тесте», позволяющем выявить ненаркотический тип обезболивания (Wheeler –Aceto H., Porrea F., A.Cowan. The rat paw formalin test: comparison of noxious agents. Pain, 40 (1990), 229-238).

- 20 **Пример 2.** Проверка анальгетической активности вновь синтезированных пептидов.

- Анальгетическую активность вновь синтезированных пептидов проверяли следующим образом. Крысам массой 180-200г под эфирным наркозом субокципитально при помощи микродозатора в 10 мкл физиологического раствора вводили исследуемый пептид. Контрольным животным сходным образом вводили равное количество
- 25 физиологического раствора. Через 20 минут в дорзальную поверхность правой задней лапы вводили 50 мкл раствора формалина в разведении 1:50. Время введения пептида и разведение формалина был отработаны нами ранее. Каждую крысу использовали только один раз. Наиболее четкие поведенческие показатели болевой реакции выражались в поджатии, вылизывании, покусывании и потряхивании лапы. При этом,
- 30 после первой острой реакции на боль, продолжающейся у контрольных животных 6-7 мин, следует период покоя: крыса опускает лапу, исчезает груминг и покусывание. Затем реакция повторяется с не меньшей экспрессией – вторая фаза болевой реакции.

Для получения количественных данных визуально фиксировали момент поджатия лапы (начало 1-ой фазы болевой реакции), продолжительность этой реакции, продолжительность покоя и время наступления второй фазы реакции – повторного поджатия лапы, либо ее отсутствие. Пептид вводили за 20 мин до формалина при 5 субокципитальном способе введения пептида и за 30 мин при интраназальном.

I. Было произведено «L-аланиновое сканирование», когда последовательно природные аминокислоты в различных положениях пептида *CT₁₆₋₂₁* заменяли на «простую» аминокислоту L-аланин и выясняли, как это влияет на анальгетическую активность пептида. Активность синтезированных в соответствии с Примером 1 синтетических 10 пептидов сравнивали как с контролем (физиологический раствор), так и с *CT₁₆₋₂₁* в соответствии с методикой, описанной в Примере 2. Результаты приведены в Таблицах 2 и 3, где Ala-16, Ala-17, Ala-18 и т.д. – пептиды, аналогичные *CT₁₆₋₂₁*, в которых на соответствующем месте находится аланин.

15 **Таблица 2. Анальгетическая активность пептидов, при замещении аминокислот в различных позициях на L-аланин (крысы, субокципитальное введение).**

ПЕПТИД	Доза мкг/ крыса	Количество животных	Начало наступления болевой реакции (сек)	Продолжительность первого пика болевой реакции (сек)
Контроль	-	62*	6(2)	435 (13)
CT ₁₆₋₂₁	0,001	10	17 (6)	394 (34)
CT ₁₆₋₂₁	0,01	11	19 (8)	328 (21)
CT ₁₆₋₂₁	0,1	22	39 (8) $\alpha < 0,001$	263 (20) $\alpha < 0,001$
Ala-16	0,001	18	10 (2)	426 (28)
Ala-16	0,01	9	38 (11) $\alpha < 0,01$	323 (42) $\alpha < 0,02$
Ala-16	0,1	9	52 (14) $\alpha < 0,002$	299 (39) $\alpha < 0,002$
Ala-17	0,001	8	6 (4)	388 (40)
Ala-17	0,01	14	60 (17) $\alpha < 0,05$	282 (43) $\alpha < 0,05$
Ala-17	0,1	10	70 (20) $\alpha < 0,002$	300 (21) $\alpha < 0,002$
Ala-18	0,1	9	39 (15) $\alpha < 0,1$	374 (32) $\alpha < 0,1$
Ala-19	0,1	14	25 (10) $\alpha < 0,1$	294 (26) $\alpha < 0,1$
Ala-20	0,001	13	12 (4) $\alpha < 0,1$	378 (26) $\alpha < 0,1$
Ala-20	0,01	8	46 (13)	338 (56)

			$\alpha < 0,1$	$\alpha < 0,1$
Ala-20	0,1	9	43 (18) $\alpha < 0,001$	206 (43) $\alpha < 0,001$
Ala-21	0,1	7	7 (2)	272 (27) $\alpha < 0,02$

Таблица 3. Сравнение анальгетической активности пептидов при дозе 1 мкг на крысу.

Пептид	К-во крыс	Начало болевой реакции	Продолжительность 1-го пика (сек)	Начало 2-го пика (мин)	Количество животных, у которых 2-й пик реакции отсутствует
Контроль	62*	5± 2	435± 13	18± 3	1
CT ₁₆₋₂₁	28	30± 6 $\alpha < 0,001$	284± 20 $\alpha < 0,001$	21± 2 (n = 24)	4
L-Ala-16	10	80± 22 $\alpha < 0,002$	264 ± 41 $\alpha < 0,001$	21± 2 (n=9)	1
L-Ala-17	9	75± 15 $\alpha < 0,001$	217± 21 $\alpha < 0,001$	21± 4 (n =6)	3
L-Ala-18	9	44± 18 $\alpha < 0,05$	274± 46 $\alpha < 0,002$	19 ± 2 (n=5)	4
L-Ala-19	10	13± 5 $\alpha < 0,05$	330 ± 38 $\alpha < 0,02$	18± 2 (n=7)	3
L-Ala-20	10	56± 20 $\alpha < 0,02$	226± 31 $\alpha < 0,001$	16 ± 20 (n = 7)	3
L-Ala-21	12	24± 9 $\alpha < 0,05$	265 ± 26 $\alpha < 0,001$	16± 2 (n=11)	1

5

Как видно из таблиц 2,3 замена аминокислот в позициях 18 и особенно в 19 и 21 на L-аланин сопровождается некоторым падением активности пептида. Начало болевой реакции уже при дозе 0,1 мкг на крысу достоверно не отличается от контрольной. Тем не менее, продолжительность болевой реакции была меньше, чем у контрольных крыс

10 при дозе 1 мкг при замене на L-аланин в 18-положении и при дозе 0,1 мкг в случае замен в 19 и 20-м положениях пептида. Более того, оказалось что предотвращение второго пика болевой реакции наблюдается в одинаковых пропорциях, как в исходном пептиде, так и в случае замен на аланин в 18, 19 и 21 позициях. Это говорит о неравнозначности механизмов первого и второго пиков болевой реакции и влиянии на

15 них аминокислотных замен в пептиде.

Напротив, замена аминокислот в позициях 16, 17 и 20 на L-аланин существенно не повлияла на анальгетическую активность пептида, а в некоторых случаях (как, например, при замене гистидина на аланин в 17 положении) активность была даже несколько повышена как по критерию задержки начала болевой реакции, так и по

критерию ее продолжительности. Это показывает возможность замены «сложной» и дорогой аминокислоты гистидин на «простую» и дешевую аланин без потери активности. Обнаружена также тенденция увеличения относительного числа животных, у которых отсутствует второй пик реакции при замене природных

5 аминокислот на L-аланин в позициях 17 и 20.

Основные выводы, которые можно сделать из данных представленных в таблицах 2 и 3, следующие:

1. Замена аминокислот в положениях 18, 19 и 21 кальцитонина лосося на L-аланин приводит к существенной потере активности исходного пептида.

10 2. Замена аминокислот в положениях 16, 17 и 20 на L-аланин не сказывается существенно на активности исходного пептида.

3. Прослеживается отчетливая тенденция увеличения активности пептида при замене гистидина на аланин в 17 положении фрагмента.

15 II. Также было произведено «D-аланиновое сканирование», когда последовательно на «простую» аминокислоту D-аланин заменяли природные аминокислоты в различных положениях пептида СТ₁₆₋₂₁ и выясняли, как это влияет на анальгетическую активность пептида. Активность синтезированных в соответствии с Примером 1 синтетических пептидов, имеющих D-аланиновую замену в соответствующем

20 положении, сравнивали как с контролем (физиологический раствор), так и с СТ₁₆₋₂₁ в соответствии с методикой в Примере 2. Результаты приведены в Таблице 4.

Таблица 4. Анальгетическая активность пептидов, при замещении аминокислот в различных позициях на D-аланин.

25

Пептид	Кол-во крыс	Начало болевой реакции (сек)	Продолжительность 1-го пика болевой реакции	Начало 2-го пика (мин)	Количество крыс, у которых 2-й пик отсутствует
Контроль	13	4 (2)	417 (15)	11 (2)	-
16-D-Ala 1мкг	10	52 (9) $\alpha < 0,001$	333 (15) $\alpha < 0.002$	16 (2)	2
17-D-Ala 16,20-L-Ala 1 мкг	16	40 (7) $\alpha < 0,001$	217 (15) $\alpha < 0.001$	18 (2)	2
17-D-Ala 16,20-L-Ala 0,1 мкг	8	11(4) $\alpha < 0,1$	300 (30) $\alpha < 0.01$	13 (1)	-

18-D-Ala 1 мкг	9	32 (8) $\alpha < 0,01$	380 (15) $\alpha < 0,002$	15(2)	2
19-D-Ala 1 мкг	7	68 (17) $\alpha < 0,002$	337 (46) $\alpha < 0,01$	24 (2) $\alpha < 0,001$	4
20 D-Ala 1 мкг	10	27 (6) $\alpha < 0.002$	268(27) $\alpha < 0.001$	15 (2) $\alpha < 0.01$	-
21 D-Ala 1 мкг	11	27 (7) $\alpha < 0.01$	345 (34) $\alpha < 0.1$	15 (2) $\alpha = 0.02$	1 - болевая реакция отсутствует
CGRP 1 мкг	5	5 (2)	402(36)	17 (2)	-

Анализируя данные, представленные в таблице 4, можно отметить, что замена аминокислот в CT_{16-21} на D-аланин не привела к повышению аналгетической активности по сравнению с активностью исходного CT_{16-21} . При этом практически во всех вариантах замен аналгетическая активность в той или иной степени сохраняется. Однако реакция эта является высокоспецифичной, так как, например, фрагмент кальцитонин-ген-родственного белка (CGRP) вовсе не обладает в этом тесте аналгетической активностью. Замена метильного эфира фрагмента 16-21 на диметилгидразид – производное, также лишает способность пептида-фрагмента CT_{16-21} оказывать обезболивающее действие.

Наиболее высокая степень достоверности отличий от контроля всех трех параметров, характеризующих аналгетическое действие, наблюдалась при заменах аминокислоты в положении 17 на D-Ala, а аминокислот в положениях 16, 20 на L-Ala. При этом варианте у ряда животных отсутствовал второй пик реакции, хотя активность и не достигала значений, наблюдаемых при замене в 17 положении природной аминокислоты на D-гистидин. Последняя, однако, является более дорогостоящей формой аналгетического пептида.

Основные выводы, которые можно сделать из данных представленных в таблице 4, следующие:

4. Замена природных аминокислот в CT_{16-21} на D - аланин не приводит к существенному изменению активности, по сравнению с природной последовательностью.
5. Пептид с заменами в положении 17 на D-Ala, и в положениях 16, 20 на L-Ala, является наиболее активным соединением.

III. Была установлена возможность увеличения стабильности полученных пептидов (продолжительности действия) заменой природной L-аминокислоты соответствующей D-аминокислотой для уменьшения скорости возможного энзиматического гидролиза пептида. Активность синтезированных в соответствии с Примером 1 синтетических пептидов сравнивали как с контролем (физиологический раствор), так и с природным фрагментом-пептидом *CT₁₆₋₂₁* в соответствии с методикой, описанной в Примере 2. Результаты приведены в Таблице 5.

10 **Таблица 5. Анальгетическая активность пептидов с заменой L – аминокислот на соответствующие D – аминокислоты в различных положениях, соответствующих номеру.**

Пептид	Кол-во крыс	Начало болевой реакции (сек)	Продолжительность 1-го пика болевой реакции	Начало 2-го пика (мин)	Количество крыс, у которых 2-й пик отсутствует
Контроль (физ.р-р)	22	6 (2)	484 (17)	17 (8)	-
16 D-Leu 1 мкг	7	3 (1)	449 (24) 1- отсутствует 1 –парализована	17 (2)	-
17-D-His 1 мкг	15	56(17) $\alpha < 0,01$	296 (41) $\alpha < 0,001$	18 (2) n=8	7
17-D-His 0,1 мкг	7	48 (14) $\alpha < 0,001$	236 (21) $\alpha < 0,001$	-	7
18 –D-Lys 1 мкг	10	91 (30) $\alpha < 0,001$	303 (25) $\alpha < 0,001$	18 (2)	1
19-D-Leu 1 мкг		327 (33) $\alpha < 0,001$	21 (2)	1	
20-D-Gln 1 мкг	9	20 (16)	372 (23) $\alpha < 0,001$	18 (2)	

Из данных, представленных в таблице 5, можно видеть, что наиболее значимые отличия от анальгетической активности контрольного пептида *CT₁₆₋₂₁* достигается при замене в 17 положении природной аминокислоты L-гистидина на D-гистидин: в этом случае практически у половины животных отсутствует второй пик болевой реакции и, что очень важно, подобный ответ сохраняется при уменьшении дозы в 10 раз. В этом же случае отмечалась наименьшая продолжительность первого пика болевой реакции.

20 Из неблагоприятных замен следует отметить замену L-лейцина на D-лейцин в 16-м положении, повлекшую нежелательную побочную реакцию – паралич у одного из животных.

Основные выводы, которые можно сделать из данных представленных в таблице 5, следующие:

6. Замена природных L-аминокислот в CT_{16-21} на соответствующие D-аминокислоты не привела к существенному повышению активности, за исключением 5 замены L-гистидина на D-гистидин в 17 - м положении. В этом случае активность существенно возросла, причем у половины животных отсутствовал второй пик болевой реакции.

IV. Также была установлена возможность увеличения стабильности полученных 10 пептидов путем модификации концевой последовательности пептида. Активность синтезированных в соответствии с Примером 1 синтетических пептидов сравнивали как с контролем (физиологический раствор), так и с CT_{16-21} в соответствии с методикой, описанной в Примере 2. Результаты приведены в Таблице 6.

Таблица 6. Оценка анальгетической активности пептидов, модифицированных по концевой аминокислоте метиловым эфиром или гидразидом.

№№ п/п	Пептиды	Доза (мкг)	Количество крыс	Задержка наступления болевой реакции (сек)	Уменьшение продолжительности 1-й фазы	%% крыс	
						Без 1-й фазы болевой реакции	Без 2-й фазы
1	$CT_{(16-21)H}$	1	10	91 ± 12 $\alpha < 0,01$	158 ± 26 $\alpha < 0,001$		25
		0,1	8	72 ± 14 $\alpha < 0,05$	110 ± 12 $\alpha < 0,01$		
		0,01	4	20 ± 8	20 ± 4		
2	$CT_{(16-21)H}$	10	11	19 ± 3 $\alpha < 0,01$	143 ± 21 $\alpha < 0,01$		
		1	13	17 ± 3 $\alpha < 0,01$	153 ± 12 $\alpha < 0,01$		
		0,1	14	7 ± 2 $\alpha < 0,05$	145 ± 12 $\alpha < 0,01$		14
		0,01	10	4 ± 3	110 ± 17		
3	$CT_{(16-21)OMe}$	10	16	27 ± 11 $\alpha < 0,01$	167 ± 25 $\alpha < 0,001$	18	25
		1	35	22 ± 5 $\alpha < 0,01$	163 ± 20 $\alpha < 0,001$	5	48
		0,1	21	21 ± 8 $\alpha < 0,01$	167 ± 15 $\alpha < 0,001$	33	10
		0,01	19	14 ± 4 $\alpha < 0,1$	150 ± 20 $\alpha < 0,01$		
		10	10	87 ± 23 $\alpha < 0,01$	185 ± 18 $\alpha < 0,001$		14

4	СТ _{(16-21)NH₂}	1	19	91 ± 13 α<0,02	208±28 α<0,001	26	42
		0,1	8	60 ±9 α<0,01	182 ± 23 α<0,001	12	33
		0,001	6	25 ±8	37±12	17	

Как следует из представленных данных, наиболее активными оказались последовательности (пептиды), модифицированные на конце метиловым эфиром и, особенно, гидразидом.

5 Основные выводы, которые можно сделать из данных представленных в таблице 5, следующие:

6. Увеличение стабильности пептидов без ущерба для их активности возможно путем модификации на конце метиловым эфиром или гидразидом.

V. Также были исследованы пептиды - ретроинверсии формулы I, соответствующие 10 формуле II, обладающие обратной последовательностью аминокислот с заменой L-форм аминокислот на D-формы и D-форм аминокислот на L-формы. Такие пептиды отличаются высокой устойчивостью к всевозможным пептидазам (Mariotti и др., European Patent EP0393786). В частности, исследовали последовательности D-Thr- D-Glu- D-Leu- D-Lys- D-His- D-Leu-NH₂ (ретроинверсия СТ₁₆₋₂₁) и D-Thr- D-Glu- D-Leu- D- 15 Lys- L-His- D-Leu- NH₂ (ретроинверсия СТ₁₆₋₂₁ с заменой в 17-м положении L-гистидина на D- гистидин). Активность синтезированных в соответствии с Примером 1 синтетических пептидов сравнивали как с контролем (физиологический раствор), так и с СТ₁₆₋₂₁ в соответствии с методикой, описанной в Примере 2. Результаты приведены в Таблице 7.

20 **Таблица 7. Анальгетическая активность последовательности СТ₁₆₋₂₁ с заменой в 17-м положении L-гистидина на D-гистидин, ретроинверсии этой последовательности и ретроинверсии СТ₁₆₋₂₁ при интраназальном способе введения в цитратно-фосфатном буфере. Пептид вводили за 30 мин до подкожного введения 2% формалина.**

№№ п/п	Опыт	Кол-во крыс	Доза (мкг)	Начало Болевой Реакции (сек)	Продолжительность 1-го пика болевой реакции	Начало 2-го Пика (мин)
1	Контроль (цитратно-фосфатный буфер)	6		8±1	341± 23	15,5± 1,5
2	17 D-His	7	10	35 ±10 α< 0,05	228 ± 13 α< 0,002	21,2± 1,1 α< 0,02
		5	1	44± 37	410 ± 54	у 2-х нет 2-го пика 20,5 3,5
3	Полная ретроинверсия СТ ₁₆₋₂₁	4	10	20 ±9	333 ±9	14,4±1,0
		5	1	12 ±6	300 ±46	17,4 ± 2,9
		6	0,1	12 6	249± 20	16,2± 2,6

					$\alpha < 0,02$	
4	17 L-His- при полной ретроинверсии СТ ₁₆₋₂₁	5	10	8 ±3	314 ±32	15,0± 1,6
		6	1	10 ±2	342 ±26	12,5 ± 1,6
		3	0,1	48± 18 $\alpha < 0,1$	300± 10	у 1-й нет 21,0± 5,3

Как следует из представленных данных, возможно использование пептидов - ретроинверсий формулы (I), для анальгезии.

5 Основные выводы, которые можно сделать из данных представленных в таблице 7, следующие:

7. Пептиды - ретроинверсии формулы (II), обладающие обратной последовательностью аминокислот с заменой L-форм аминокислот на D-формы и D-форм аминокислот на L-формы, обладают высокой анальгетической активностью.

10 VI. Были синтезированы также как описано в Примере 1 пептиды с добавлением на N-конце последовательности аминокислоты L-Тур, отсутствующей в природном фрагменте кальцитонина. Активность синтезированных синтетических пептидов сравнивали как с контролем (физиологический раствор), так и с СТ₁₆₋₂₁ в соответствии с методикой, описанной в Примере 2. Результаты приведены в Таблице 8.

15 **Таблица 8. Анальгетическая активность последовательности Тур-16-21ОМе.**

Опыт	Доза мкг	Количество крыс	Задержка Наступления болевой реакции	Уменьшение продолжительности первого пика болевой реакции	%% животных без болевой реакции	%% животных без второго пика болевой реакции
Тур-16-21ОМе	10	4	27 ± 10	155 ± 35 $\alpha < 0,001$		100
	1	11	30 ± 15	134 ± 50 $\alpha < 0,05$		60

Как следует из представленных данных, полученные пептиды эффективны в предотвращении второго пика болевой реакции.

Промышленная применимость

20 Таким образом, приведенные выше примеры доказывают возможность получения предложенных пептидов, обладающих высокой анальгетической активностью. Кроме

того, пептиды с добавлением на N-конце последовательности аминокислоты L-Тур, отсутствующей в природном фрагменте кальцитонина, обладают большей эффективностью в предотвращении второго пика болевой реакции.

Техническим результатом предлагаемого изобретения является высокая
5 аналгетическая активность и устойчивость предложенных пептидов, что позволяет рассматривать их в качестве основы для создания безопасных лекарственных аналгетических средств, с ненаркотическим типом аналгетического действия.

10

15

20

25

30

35

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Синтетические пептиды общей формулы 1 [SEQ ID NO:1]

H- XDL-XDL1- XDL2 - L- Lys - L-Leu - XDL3 - L-Thr -R2 (I) , где:

- 5 H - водород,
XDL - отсутствие аминокислоты или L-Тур,
XDL1 - одна из аминокислот: L-Leu, L-Ala или D-Ala,
XDL2 - одна из аминокислот: L-His, D-His, L-Ala или D-Ala,
XDL3 - одна из аминокислот: L-Gln, L-Ala или D-Ala;
10 R2 - OMe или NH₂,

или пептиды - ретроинверсии формулы (I), имеющие обратную последовательность аминокислот с заменой L-формы аминокислот на D-форму и D-формы аминокислот на L-форму, общей формулы 2 [SEQ ID NO:2]

H- D-Thr -XDL4- D-Leu - D- Lys - XDL5- XDL6 - XDL7 -R2 (II), где:

- 15 H - водород,
XDL4 - одна из аминокислот: D-Gln , D-Ala или L-Ala;
XDL5 - одна из аминокислот: D-His, L-His , D-Ala или L-Ala,
XDL6 - одна из аминокислот: D-Leu , D-Ala или L-Ala,
XDL7 - отсутствие аминокислоты или D-Тур,
20 R2 - OMe или NH₂,

в качестве обезболивающих препаратов с ненаркотическим типом анальгетического действия.

25

30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/RU 2012/001036

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K 7/06 (2006.01) A61K 38/08 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K7/06, A61K 38/08, A61P 29/00 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA on CTN		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	N.A. Patkina i dr. Izuchenie analgeticheskoi aktivnosti fragmentov kaltsitonina, Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal, 1994, vol. 28, N° 10, p.31-34, skhema 1 na p.32, table & CA on CTN, compound c RN 171618-10-3 and 171618-08-9	1
X	I.V. Rogachevskii et al. Sintez i prostranstvennoe stroenie peptidov H-Leu-His-Lys-Leu-Gln-Thr-NH2 i H-Ala-D-Ala-Lys-Leu-Ala-Thr-NH2. ZHurnal obshchei khimii, 2005, vol. 75(137), N°5, p.863-872, abstract	1
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 10 April 2013 (10.04.2013)		Date of mailing of the international search report 25 April 2013 (25.04.2013)
Name and mailing address of the ISA/ Facsimile No.		Authorized officer Telephone No.

ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Номер международной заявки

PCT/RU 2012/001036

A. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ		
<p style="text-align: right;"><i>C07K 7/06 (2006.01)</i> <i>A61K 38/08 (2006.01)</i> <i>A61P 29/00 (2006.01)</i></p>		
Согласно Международной патентной классификации МПК		
B. ОБЛАСТЬ ПОИСКА		
Проверенный минимум документации (система классификации с индексами классификации)		
C07K 7/06, A61K 38/08, A61P 29/00		
Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в поисковые подборки		
Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)		
CA on CTN		
C. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ:		
Категория*	Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	
	Относится к пункту №	
X	Н.А. Паткина и др. Изучение анальгетической активности фрагментов кальцитонина, Химико-фармацевтический журнал, 1994, т.28, №10, стр.31-34, схема 1 на стр.32, таблица & CA on CTN, соединения с RN 171618-10-3 и 171618-08-9	1
X	И.В. Рогачевский и др. Синтез и пространственное строение пептидов H-Leu-His-Lys-Leu-Gln-Thr-NH ₂ и H-Ala-D-Ala-Lys-Leu-Ala-Thr-NH ₂ . Журнал общей химии, 2005, том 75(137), №5, стр.863-872, реферат	1
<input type="checkbox"/> последующие документы указаны в продолжении графы C. <input type="checkbox"/> данные о патентах-аналогах указаны в приложении		
* Особые категории ссылочных документов:	“Т” более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение	
“А” документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным	“Х” документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности	
“Е” более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее	“У” документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста	
“L” документ, подвергающий сомнению притязание(я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано)	“&” документ, являющийся патентом-аналогом	
“O” документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д.		
“P” документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета		
Дата действительного завершения международного поиска	Дата отправки настоящего отчета о международном поиске	
10 апреля 2013 (10.04.2013)	25 апреля 2013 (25.04.2013)	
Наименование и адрес ISA/RU: ФИПС, РФ, 123995, Москва, Г-59, ГСП-5, Бережковская наб., 30-1 Факс: (499) 243-33-37	Уполномоченное лицо: Т.Николаева Телефон № 495 531 65 15	