SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19)

ÚRAD PRIEMYSELNÉHO VLASTNÍCTVA

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(21) 1061-93

(13) A3

5(51) A 61 K 37/42,
C 07 K 7/18

(22) 01.10.93

(32) 01.01.91, 27.03.92

(31) 677 391, 859 582

(33) US, US

(40) 11.05.94

(71) CORTECH INC., Denver, CO, US;

(72) CHERONIC John C., Lakewood, CO, US; BLOGETT James K., Broomfield, CO, US; WHALLEY Eric T., Golden, CO, US; EUBANKS Shadrach R., Arvada, CO, US; ALLEN Lisa Gay, Parker, CO, US; NGUYEN Khe Thanh, Arvada, CO, US;

(54) Antagonisti bradykinínu

(57) Antagonisti bradykinínu majú vzorec X(BKA)n, kde BKA je peptidový reťazec antagonistu bradykinínu, X je spájajúca skupina a n je celé číslo väčšie ako 1. BKA substituenty môžu byť rovnaké, alebo rozdielne. Tiaž sú popísané monomérne zlúčeniny antagonistov vzorca X(BKA) a dimérne zlúčeniny antagonistov bradykinínu vzorca (Y)(X)(BKA), kde X je spájajúca skupina, BKA peptidový reťazec bradykinínového antagonistu a Y je peptidový reťazec antagonistu alebo agonistu nebradykinínového receptora.

PV 1061-93

ANTAGONISTI BRADYKINÍNU

Oblasť techniky

Predložený vynález sa týka antagonistov bradykinínu.

Doterajší stav techniky

Bradykinín (BK) je peptid zložený z deviatich aminokyselín (Arg^1-Pro^2-Pro^3-Gly^4-Phe^5-Ser^6-Pro^7-Phe^8-Arg^9), ktorý je spolu s lyzyl-BK (kalidínom) uvoľňovaný z kinínogénových prekurzorov proteázami štiepiacimi kalikreín. Plazmový kalikreín cirkuluje ako aktívny zymogén, z ktorého sa aktívny kalikreín uvoľňuje Hagemanovým faktorom. Tkanivový kalikreín sa javí ako umiestnený predovšetkým na vonkajší povrch membrán epiteliálnych buniek na miestach predpokladaných, že sú zahrnuté do transcelulárneho elektrolytového transportu.

Dva hlavné kinínové prekurzorové proteíny, kinínogén s vysokou molekulovou hmotnosťou a s nízkou molekulovou hmotnosťou, sú syntetizované v pečeni, cirkulujú v plazme a boli nájdené v sekrétoch ako je moč a nosová tekutina. Kinínogén s vysokou molekulovou hmotnosťou sa štiepi plazmovým kalikreínom, poskytuje BK alebo tkanivovým kalikreínom, čo poskytuje kalidín. Kinínogén s nízkou molekulovou hmotnosťou je substrátom len pre tkanivový kalikreín. Ďalej sa môže objavovať určitá konverzia kalidínu na BK, pretože aminotreminálny lyzínový zvyšok kalidínu sa odstraňuje plazmovými aminopeptidázami. Polčas životnosti v plazme pre kiníny je približne 15 s, s jedným priechodom pulmonárnym vaskulárnym lôžkom, vedúcim k 80 až 90 % deštrukcii. Základný katabolický enzým vo vaskulárnych lôžkach je dipeptidylkarboxypeptidáza kininása II. alebo angiotenzín - konvertujúci enzým (ACE). Slabšie pôsobiaci enzým, kininása I alebo karboxypeptidáza N, ktoré odstraňujú karboxyl terminujúci Arg, cirkulujú v plazme vo veľkom množstve. To potvrdzuje, že môže ísť o fyziologicky najdôležitejší katabolický enzým. Des-Arg^9-bradykinín ako i des-Arg^{10}-kalidín vzniknutý pôsobením

kininázy I na BK alebo kalidín, sú aktívne ako BK_1 receptorové agonisty, ale sú relatívne inaktívne pri väčšom množstve BK_2 receptoru, pri ktorom sú ako BK, tak kalidín účinnými agonistami.

O bradykiníne je známe, že je jedným z najúčinnejších prirodzene sa vyskytujúcich stimulátorov C-vlákien sprostredkujúcich prenos bolesti. Je tiež účinným vazodilatátorom, činidlom, produkujúcim edém a stimulátorom rôznych vaskulárnych a nevaskulárnych hladkých svalov v tkanivách ako je maternica, črevo a branchioly. Dráha aktivácie kinín/kinínogén bola tiež popísaná ako hrajúca podstatnú úlohu v rôznych fyziologických a patofyziologických procesoch, pretože je jedným z prvých systémov, ktoré sa aktivujú v zápalovej odozve a jedným z najúčinnejších stimulátorov: i) fosfolipázy A_2, a preto tvorbou prostaglandínov a leukotrientov a ii) fosfolipázy C, a tak uvoľnenia inozitol fosfátov a diacylglycerolu. Tieto účinky sú sprostredkované predovšetkým cez aktiváciu BK receptorov typu BK_2.

Priama aplikácia bradykinínu na nahú kožu alebo intraarteriálna alebo viscerálna injekcia vedie k zdaniu bolesti u zvierat a u ľudí. Kinínu podobné materiály boli izolované zo zápalových miest získaných rôznymi stimulmi. Ďalej bradykinínové receptory boli lokalizované k nociceptívnym dráham periférnych nervov a BK demonštrovaný ako stimulujúce centrálne vlákno sprostredkujúce vnem bolesti. Bradykinín bol tiež preukázaný ako schopný vyvolať hyperalgéziu na zvieracích modeloch bolesti (viď Burch a spol., "Bradikinin Receptor Antagonists", J. Med. Chem., 30:237-269 (1990) a Clark W. G., "Kinins and the Peripheral and Central Nervous Systems", Handbook of Experimental Pharmacology, vol. XXV; Bradykinin, kallidin and kallikrein. Erdo E. G. (vyd.), 311-322 (1979).

Tieto zistenia spôsobili, že pozornosť sa obrátila na použitie BK antagonistov ako analgetík. Mnoho štúdií demonštruje, že antagonisty bradykinínu sú schopné blokovať alebo zmierňovať ako bolesť, tak hyperalgéziu ako u zvierat, tak u ľudí. Viď

Ammons, W. S. a spol., "Effects of intracardiac bradykinin on T_2-T_5 medial spinothalamic cells", The American Physiological Society, 0363-6119 (1985); Clark W. G., "Kinins and the Peripheral and Central Nervous Systems", Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. XXV; Bradykinin, kallidin and kallikrein. Erdo E. G. (vyd.) 311-322 (1979); Costello A. H. a spol., "Suppression of carragenan-induced hyperalgesia, hyperthermia and edema by bradykinin antagonist", European Journal of Pharmacology, 171:259-263 (1989); Laneuville a spol., "Bradykinin analogue blocks bradykinin-induced inhibition of spinal nociceptive reflex in the rat", European Journal of Pharmacology, 137:281-285 (1987); Steranka a spol., "Antinociceptive effects of bradykinin", European Journal of Pharmacology, 16:261-262(1987); Steranka a spol., "Bradykinin as pain mediator: Receptors are localized to sensory neurons, and antagonists have analgesic actions", Neurobiology, 85:3245-3249 (1987).

Bežne akceptované terapeutické priblíženia k analgézii majú významné obmedzenia. Zatiaľ čo miernu až strednú bolesť možno zmierniť použitím nesteroidných protizápalových liečiv a iných miernych analgetík, kruté bolesti ako sú tie, ktoré sú spojené s chirurgickými postupmi, popáleninami a určitými traumami, vyžadujú použitie narkotických analgetík. Tieto liečivá sú obmedzené možným zneužitím, fyzickou a psychologickou závislosťou, meniacou mentálny stav a potlačením respirácie, čo výrazne obmedzuje ich použiteľnosť.

Predchádzajúce výskumy v oblasti BK antagonistov indikujú, že takéto antagonisty môžu byť vhodne použité v rôznych funkciách. Tieto zahrňujú použitie pri liečení popálenín, pooperačnej bolesti, migrény a iných foriem bolesti, šoku, poškodenia centrálneho nervového systému, astmy, nádchy, presilenia, zápalovej artritídy, zápalových črevných chorôb atď.

Napríklad Whalley a spol., v Naunyn Schmiederberg's Arch. Pharmacol., 336:652-655 (1987) demonštrujú, že BK antagonisty sú schopné blokovať BK-indukovanú bolesť v ľudskom blisterovom

modeli. To potvrdzuje, že topická aplikácia takýchto antagonistov by mala byť schopná inhibovať bolesť v spálenej koži napr. u ťažko popálených pacientov, u ktorých sa vyžadujú veľké dávky narkotík v priebehu dlhej doby a na lokálne ošetrenie relatívne malých spálenín alebo iných foriem lokálneho poškodenia kože.

Ošetrovanie pooperačnej bolesti vyžaduje použitie adekvátnych dávok narkotických analgetík na zmiernenie bolesti a nevyvolávanie nadmernej respiračnej depresie. Pooperačná narkotikom vyvolaná hypoventilácia predurčuje pacientov ku kolapsu segmentov pľúc, zvyčajnému prípadu postoperačnej horúčky a často zdržiava prerušenie mechanickej ventilácie. Dostupnosť schopných nenarkotických parenterálnych analgetík by mala byť významným príspevkom na ošetrenie pooperačnej bolesti. I keď žiaden predchádzajúci dostupný BK antagonista nemá vhodný farmakodynamický profil na použitie pri ošetrovaní chronickej bolesti, sú časté dávky a kontinuálna infúzia bežne používané anesteziológmi a chirurgmi pri ošetrení pooperačnej bolesti.

Niektoré dôkazy svedčia o tom, že dráha kalikreín/kinín môže byť zahrnutá do počiatku alebo amplifikácie vaskulárnej reaktivity a sterilného zápalu pri migréne. (Viď Back a spol., "Determination of components of the kallikrein-kinin system in the cerebrospinal fluid of pacients with various diseases", Res. Clin. Stud. Headaches, 3:219-226 (1972). Pretože obmedzený úspech ako profylaktických tak nenarkotických terapeutických režimov pre migrénu, ako i potenciálna narkotická závislosť u týchto pacientov, javí sa použitie BK antagonistov vysoko žiaducim alternatívnym riešením pri terapii migrény.

Bradykinín je produkovaný v priebehu tkanivového poškodenia a môže sa nachádzať v koronárnej sínusovej krvi po experimentálnej oklúzii koronárnych artérií. Ďalej, ak sa priamo injektuje do peritoneálnej dutiny, produkuje BK viscerálny typ bolesti. (Viď Ness a spol., "Visceral pain: a review of experimental studies", Pain, 41:167-234 (1990)). I keď je veľa iných mediátorov jasne zahrnutých v produkcii bolesti

a hyperalgézie v iných spojeniach ako sú popísané vyššie, očakáva sa, že antagonisty BK hrajú úlohu pri zmiernení takýchto foriem bolesti.

Šok spojený s bakteriálnymi infekciami je majoritným zdravotným problémom. V Spojených štátoch dochádza ročne k 400 000 prípadom bakteriálnych sepsií, z ktorých 200 000 pokračuje do šoku a 50 % z týchto pacientov zomiera. Bežná terapia je podporná, s určitým odporučením v štúdiách z posledných rokov, že monoklonálne protilátky k gram-negatívnemu endotoxínu môžu mať pozitívny účinok na odznenie choroby. Mortalita je stále ešte vysoká, pretože vzhľadom k tejto špecifickej terapii je treba uviesť, že výrazné percento pacientov so sepsou je infikované gram-pozitívnymi organizmami, ktoré nie sú prístupné anti-endotoxínovej terapii.

Mnoho štúdií potvrdilo úlohu systému kalikreín/kinín pri vzniku šoku spojeného s endotoxínom. Viď Aasen a spol., "Plasma Kallikrein Activity and Prekallikrein Levels during Endotoxin Shock in Dogs", Eur. Surg., 10:50-62 (1977); Aasen a spol., "Plasma Kallikrein-Kinin System in Septicemia", Arch. Surg., 118:343-346 (1983); Katori a spol., "Evidence for the involvement of plasma kallikrein/kinin system in the immediate hypotension produced by endotoxin in anaesthetized rats", Br. J. Pharmacol., 98:1383-1391 (1989); a Marceau a spol., "Pharmacology of Kinins: Their Relevance to Tissue Injury and Inflammation", Gen. Pharmacol., 14:209-229 (1982). Štúdia urobené v poslednej dobe s použitím novo dostupných BK antagonistov demonštrovali na zvieracích modeloch, že tieto zlúčeniny môžu hlboko ovplyvniť progres endotoxického šoku. (Viď Weipert a spol., "Attenuation of Arterial Blood Pressure Fall in Endotoxic Shock in the Rat Using the Competitive Bradykinin Antagonist Lys-Lys-/Hyp^{2},$Thi^{5,8}$, D-Phe^{7}/-BK", Brit. J. Pharm., 94, 282-284 (1988). Menej údajov je dostupných, čo sa týka úlohy BK a iných mediátorov pri vzniku septického šoku spôsobeného gram-pozitívnymi organizmami. Je však pravdepodobné, že sú tu zahrnuté podobné mechanizmy. Šok sekundárny k traume, často spôsobený stratou krvi, je tiež

spojený s aktiváciou systému kalikreín/kinín. (Viď Haberland, "The Role of Kininogenases, Kinin Formation and Kininogenase Inhibitor in Post Traumatic shock and Related Conditions", Klinische Woochen-schrift, 56:325-331 (1978)).

Veľa štúdií tiež demonštruje signifikantné hladiny aktivity systému kalikreín/kinín v mozgu. Ako kalikreín, tak BK dilatujú cerebrálne komory vo zvieracích modeloch poškodenia CNS. (Viď Ellis a spol., "Inhibition of Bradykinin- a Kallikrein-Induced Cerebral Arteriolar Dilation by Specific Bradykinin Antagonist", Stroke, 18:792-795 (1987) a Kamitani a spol., "Evidence for a Possible Role of the Brain Kallikrein-Kinin System in the Modulation of the Cerebral Circulation", Circ. Res., 57:545-552 (1985)). Antagonisti bradykinínu tiež znižujú cerebrálny edém u zvierat po mozgovej traume. Vzhľadom k týmto údajom sa očakáva, že by BK antagonisty mali byť užitočné pri ošetrení rán a traumy hlavy.

Iné štúdie demonštrujú, že BK receptory sú prítomné v pľúcach, že BK môže pôsobiť bronchokonštrikcie u zvierat i ľudí a že zvyšujúca sa citlivosť k bronchokonštriktívnemu účinku BK je prítomná u astmatikov. Niektoré štúdie boli schopné demonštrovať inhibíciu ako BK tak alergénom indukovanou bronchokonštrikciou u zvieracích modelov použitím BK antagonistov. Tieto štúdie indikujú potenciálnu úlohu použitia BK antagonistov ako klinických činidiel pri ošetrovaní astmy. (Viď Barnes, "Inflammatory Mediator Receptors and Asthma", Am. rev. Respir. Dis.,135:S26-S31 (1987); Burch a spol., "Bradykinin Receptor Antagonists", J. Med. Chem., 30:237-269 (1990); Fuller a spol., "Bradykinin-induced Bronchoconstriction in Humans", Am. Rev. Respir. Dis., 135:176-180 (1987); Jin a spol., "Inhibition of bradykinin-induced bronchoconstriction in the Guinea-pig by synthetic B_2 receptor antagonist", Br. J. Pharmacol., 97:598-602 (1989) a Polosa a spol., "Contribution of histaine and prostanoids to bronchoconstriction provoked by inhaled bradykinin in atopic asthma", Allergy, 45:174-182 (1990)). Bradikinín bol tiež implikovaný pri vzniku symptómov ako alergickej, tak

vírusovej nádchy. Tieto štúdie zahrňujú doloženie ako kalikreínu, tak BK v nosových tekutinách a že hladiny týchto substancií korelujú dobre so symptómami nádchy. (Viď Baumgarten a spol., "Concentrations of Landular Kallikrein in Human Nasal Secretions Increase During Experimentally Induced Allergic Rhinitis", J. Immunology, 137:1323-1328 (1986); Jin a spol., "Inhibition of bradykinin-induced bronchoconstriction in the guinea-pig by a synthetic B_2 receptor antagonist", Br. J. Pharmacol., 97:598-602 (1989) a Proud a spol., "Nasal Provocation with Bradykinin induces Symptoms of Rhinitis and a Sore Throat", Am. Rev. Respir. Dis., 137:613-616 (1988).

Ďalej štúdie demonštrujú, že BK samotný môže spôsobiť symptómy nádchy.

Stewart a Vavrek v "Chemistry of Peptide Bradykinin Antagonists", Bradykinin Antagonists: Basic and Chemical Research, R. M. Burch (vad.) str. 51-96 (1991) uvádzajú peptidových BK antagonistov a ich možné použitie voči účinkom BK. Značný podiel výskumu bol zameraný na vývoj takýchto antagonistov so zlepšenými vlastnosťami. Nebolo však nikde zmienené o nájdení takých zlepšených BK antagonistov, čo neustále predstavuje potrebu účinnejších BK antagonistov.

Dva hlavné problémy spojené so súčasnými BK antagonistami sú ich nízke hladiny účinnosti a ich extrémne nízke doby trvania aktivity. V súlade s tým sú dôležitými objektmi predloženého vynálezu poskytnutia nových BK antagonistov peptidov, ktoré sú charakterizované zvýšenou účinnosťou a dobou trvania pôsobenia. Iné objekty budú zrejmé ďalej.

Podstata vynálezu

Vynález je založený, v jednom dôležitom uskutočnení, na nájdení takých zlúčenín, zahrňujúcich dva alebo viac bradykinín antagonistických (BKA) peptidov, ktoré sú spolu chemicky spojené za vzniku dimérov alebo vyšších oligomérov ("mérov")

demonštrujúcich vyššiu účinnosť a/alebo trvanie pôsobenia, ako pôvodný bradykinín antagonistický peptid samotný.

Zoširoka vyjadrené, zlúčeniny podľa vynálezu, v súlade s týmto uskutočnením, môžu byť ilustrované vzorcom I

$$X(BKA)_n \qquad (I)$$

kde BKA je jadro akéhokoľvek bradykinín antagonistického peptidu, X je spájajúca skupina a n je celé číslo väčšie ako 1. Výhodne je n 2, čo poskytuje dimér. Jednako však môže zlúčenina obsahovať viac ako dva BKA substituenty, t. j. zlúčenina môže byť trimér alebo i vyšší "mér", až do obmedzenia daného charakterom spájajúcej skupiny.

BKA substituenty môžu byť rovnaké, takže poskytujú homogénnu zlúčeninu. Naopak, môže byť v niektorých situáciách výhodné, keď zlúčenina zahrňuje rôzne substituenty, t. j. zlúčenina môže byť heterogénna vzhľadom k BKA substituentom alebo môže obsahovať jeden alebo viac BKA a ligand alebo ligandy rôzneho charakteru. Ako homogénne tak heterogénne vyhotovenia sú zahrnuté v predloženom vynáleze, ako je popísané ďalej.

Návrh poskytnutia dimérov farmaceuticky aktívnych materiálov na zlepšenie takých charakteristík ako je metabolická stabilita, selektivita a receptorová väzobnosť, boli už popísané pre iné systémy. Skoršie práce zahrnuli dimerizáciu peptidových agonistov a antagonistov za účelom zvýšenia účinnosti a/alebo trvania pôsobenia. (Viď Caporale a spol. Proc. 10 American Peptide Symp., Pierce Chemical Co., Rockford, IL, 449-451 (1988) a Rosenblatt a spol., európska patent. prihláška č. EP 2931 30 A2). Dimerizácia peptidových agonistov bola popísaná pre enkefalíny/endorfíny (Shinohigashi Y., a spol., BBRC, 146, 1109-1115, 1987); substancia P (Higuchi Y., a spol., E. J. P., 160, 413-416, (1989); bradykinín (Vavrek R. a Stewart J., J. Proc. 8th Amer. Pept. Symp., 381-384, 1983); Neurokinín A and B (Kodama H., a spol., E. J. P.,151, 317-320, 1988); inzulín

(Roth R. A. a spol., FEBS, 170, 360-364, 1984) a atriálny nátriuretický peptid (Chino N. a spol., BBRC, 141, 665-672, 1986). Dimerizácia antagonistov bola uvedená pre paratyroidný hormón (Caproale, L. H. a spol., Proc. 10 th Amer. Pept. Symp., 449-451, 1987). Literatúra však nepopisuje BK antagonistické diméry alebo vyššie "méry" ako sú zahrnuté v tomto vynáleze.

Naviac, predchádzajúce dimerizácie vo veľkej miere preferovali dimerizáciu z jedného alebo oboch koncov prítomných zlúčenín, zatiaľ čo podľa predloženého vynálezu a ako jeho časť bolo zistené, že dimerizácia rôznych BK antagonistov z vonkajšej polohy za použitia buď voľných alfa amino alebo karboxylových skupín na konci týchto ligandov neposkytuje zvýšenie a vo veľa prípadoch znižuje aktivitu týchto činidiel. Podľa predloženého vynálezu je ako výhodné vyhotovenie zahrnuté spojenie BKA peptidových ligandov v polohe medzi koncami peptidu.

Ďalšie vyhotovenie vynálezu poskytuje novú skupinu "monomérnych" zlúčenín vzorca II

X(BKA) (II)

t. j. zlúčenín vzorca I, kde n je 1 a modifikované X pôsobí zlepšenie antagonistických vlastností pôvodného BKS peptidu predstavujúceho BKA substituent. Toto zlepšenie môže byť napríklad predstavené zvýšenou schopnosťou a/alebo trvaním pôsobenia. Opäť je tu modifikovaný X výhodne umiestnený v peptidovom reťazci, t. j. nie na jeho zakončení.

V inom vyhotovení vynález zahrňuje diméry vzorca III

(Y)(X)(BKA) (III)

kde X a BKA majú významy uvedené vyššie a Y je ligand, ktorý demonštruje antagonistickú alebo agonistickú aktivitu nebradykinínového receptoru.

Zhrnúc, týka sa vynález a) bradykinín antagonistických peptidov vzorca I, ktoré môžu byť homogénne alebo heterogénne diméry alebo vyššie "méry", b) monomérov vzorca II, kde BKA je modifikovaný zahrnutím skupiny X a c) heterodimérov vzorca III, demonštrujúcich ako bradykinín antagonistickú aktivitu, tak ne-BK receptorovú aktivitu (antagonistickú alebo agonistickú).

V odbore je známych veľa BK antagonistických peptidov a ktorýkoľvek z nich môže byť použitý pre uvedený účel pre poskytnutie BK substituentov. Jedným z najúčinnejších BKA in vitro je peptid, majúci vzorec

$$DARG^{0}\text{-}Arg^{1}\text{-}Pro^{2}\text{-}Hyp^{3}\text{-}Gly^{4}\text{-}Phe^{5}\text{-}Ser^{6}\text{-}(D)Phe^{7}\text{-}Leu^{8}\text{-}Arg^{9}$$

(viď Regoli a spol., Trends in Pharmacological Science, 11:156-161 (1990)). Tento peptid je tu označený ako CP-0088 a pre účely predloženého vynálezu môže byť použitý pre spojenie buď s tým istým alebo iným peptidom, majúcim BKA aktivitu na poskytnutie antagonistov vzorca I.

Ak sa použije CP-0088 na ilustráciu rôznych aspektov vynálezu, je treba uviesť, že vynález zahŕňa použitie akéhokoľvek dostupného alebo známeho BK antagonistického peptidu pre predložený účel. Napríklad bolo v patentovej literatúre posledných rokov navrhnuté veľké množstvo modifikácií BK antagonistických peptidov a tieto môžu byť použité na poskytnutie BKA zložky alebo zložiek pre produkty podľa vynálezu. (Viď napr. EP-A-033244 (Procter and Gamble), ktorý popisuje nona- a ďalšie BK antagonistické peptidy, v ktorých sú určité zvyšky aminokyselín modifikované). EP-A-0370453 (Hoechst) a WO 89/01780 a WO 89/01781 (Stewart a spol.) tiež popisujú BK antagonistické peptidy. Žiadna z týchto patentových publikácií nepopisuje homogénne alebo heterogénne diméry alebo vyššie "méry" alebo linkerom modifikované monoméry, ako sú uvedené v predloženom vynáleze. Jednakov však peptidy z týchto publikácií môžu byť použité v praktickom vyhotovení predloženého vynálezu. V súlade s tým, že sa použije CP-0088 na účely ilustrácie, nie je naň

vynález obmedzený.

V súlade s jedným vyhotovením vynálezu je linker X výhodne pripojený k pôvodnému peptidovému antagonistovi cez cysteínový (Cys) zvyšok peptidového reťazca. Toto môže vyžadovať počiatočnú modifikáciu východiskového peptidu, takže zahrňuje Cys zvyšok vo vhodnej polohe peptidového reťazca.

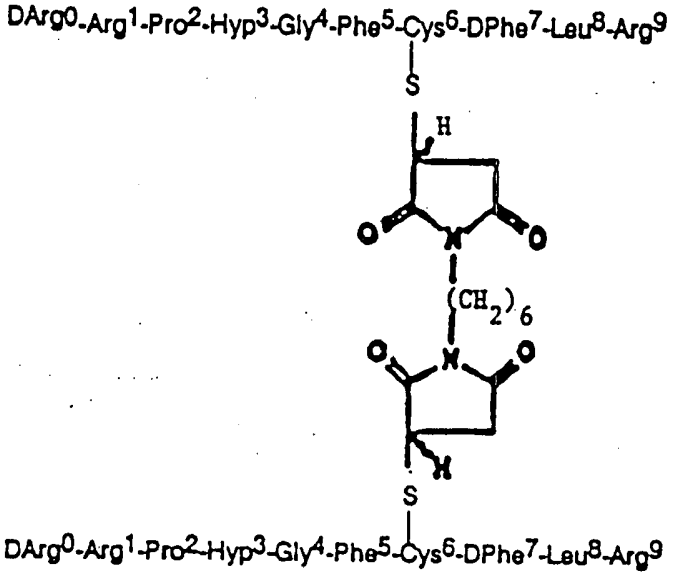
Vynález je ilustrovaný pri použití rôznych Cys derivátov CP-0088, kde Cys nahrádza Ser alebo niektorú inú aminokyselinu v CP-0088 peptidovom reťazci. Bolo zistené, že cysteín Cys zvyčajne poskytuje kovalentné napojenie k vhodnému linkeru X cez jeho tiolovú skupinu, produkujúcu stabilnú tioéterovú väzbu. Podľa tohto aspektu vynálezu je výhodné inkorporovať cysteínový zvyšok do 6 polohy CP-0088. Táto poloha bola prv považovaná za relatívne nedôležitú. (Viď Stewart J. M. a Vavrek R.J., (1991), "Chemistry of peptide bradykinin antagonists", v Bradykinin Antagonists: Basic and Clinical Research, R. M. Burch (vad.), Marcel Dekkar Inc., NY, str. 51-96). Ničmenej dôležitý aspekt vynálezu je založený na zistení, že na rozdiel od všeobecne prijímaného pohľadu na polohu 6 je toto špecifické miesto dôležité ako pre dimeráciu, tak pre modifikáciu monoméru pri poskytnutí optimálnych vlastností výsledných produktov. Jednako však vynález nie je obmedzený len na modifikáciu v polohe "6".

Ako bude uvedené ďalej, akýkoľvek z veľkého množstva linkerov X môže byť použitý na účely podľa vynálezu. Tento pôsobí chemické spojenie dvoch alebo viacerých peptidov, z ktorých jeden alebo oba sú BKA. Môžu mať len funkciu linkeru. Ničmenej linker samotný sa môže tiež podieľať na zlepšení celkových antagonistických vlastností, ako bude uvedené ďalej. Výhodne je linker flexibilná, lineárna skupina, ktorá je ľahko reaktívna s požadovanými ligandami. Výhodné linkery zahrňujú bismaleimidoalkány (BMA) ako je bismaleimidohexán (BMH). Reakcia s takým linkerom prebieha medzi jeho maleidoskupinami a tiolovou skupinou cysteínového zvyšku v peptidovom reťazci za vzniku S-sukcinimidoderivátu. Napríklad 1,6-bis-S-sukcinimidohexán (BSH)

dimér môže byť pripravený reakciou 2 ekvivalentov Cys-obsahujúceho peptidového antagonistu a 1 ekvivalent bismaleimidohexánu (BMH). ďalšie vhodné spájajúce skupiny X sú popísané ďalej.

Jeden z preferovaných dimérnych antagonistov vzorca I podľa vynálezu je tu označený, kvôli zjednodušeniu, ako CP-0127. Táto zlúčenina je označená ako majúca výrazne väčšiu účinnosť a polčas životnosti ako najznámejšia zo známych BKA, včítane CP-0088, ktorý, ako bolo uvedené, je pokladaný za jedného z najúčinnejších BK antagonistov známych v odbore. Zlepšené antagonistické vlastnosti CP-0127 sú celkom neočakávané, pretože prinášajú vyšší účinok, ako by bolo možné očakávať ako aditívny efekt spojenia dvoch alebo viac peptidových antagonistov.

Zlúčenina CP-0127, ktorá demonštruje všetky charakteristiky vyžadované na farmaceutickú aplikáciu ako BKA, napr. zlúčenina je vhodná na parenterálne použitie pri ošetrovaní akútnych indikácií ako je septický šok a pooperačná oblasť, môže byť štruktúrne znázornená nasledovne:



CP-0127

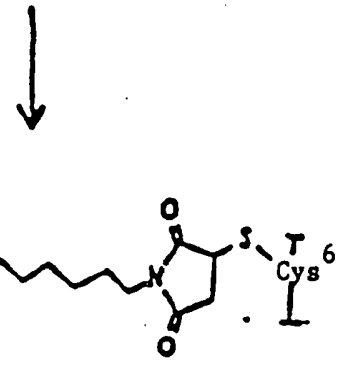
Ako bude zrejmé, je CP-0127 homogénny dimér v tom zmysle, že dva peptidové reťazce pripojené k linkeru sú rovnaké. Zlúčenina obsahuje dva ekvivalenty Cys^6 derivátov BKA CP-0088, t. j. CP-0088, kde Ser v "6" polohe bol nahradený cysteínom (Cys), kovalentne spojeným s reakciou medzi tiolovou skupinou Cys a bismaleiimidohexánom (BMH). Výsledný produkt je 1,6-bis-S-sukcinimidohexánový (BSH) dimér Cys^6 CP-0088.

Cysteínový derivát (Cys^6) CP-0088 môže byť pripravený zvyčajným spôsobmi. Tento Cys^6 derivát, ktorý je tu označený ako CP-0126 pre jednoduchosť, môže potom reagovať s požadovaným bismaleimido činidlom. V prípade CP-0127, kde je bismaleimido činidlo bismaleimidohexán (BMH), je dimér (CP-0127) získaný podľa nasledujúcej reakčnej schémy:



CP-0126

BMH



CP-0127

Táto schéma len ilustruje možnú cestu prípravy produktov vzorca I. V akejkoľvek alternatívnej metóde môže byť linker pripojený k fragmentu BKA peptidu, ďalší peptidový fragment pripojený k inému koncu linkeru a rovnováha prípadných peptidov (BKA) ukončená prídavkom akýchkoľvek iných fragmentov peptidu, ako je to vyžadované. Pre odborníkov bude jasne rozpoznať, kedy použiť aké stupne, kedy chrániť rôzne funkčné skupiny, hlavne amino a karboxy-terminálne skupiny v peptidoch alebo ich fragmentoch, pred nežiaducimi reakciami.

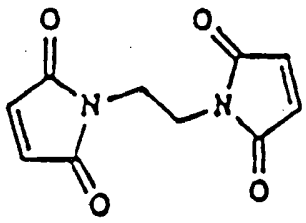
Keď BMH poskytuje výhodnú spojovaciu skupinu X, iný bismaleimidalkán (BMA), napríklad akékoľvek bismaleidočinidlá, kde alkán obsahuje 1 až 12 atómov uhlíka alebo viac, môžu byť použité. Alkánová skupina môže byť tiež substituovaná alebo prerušená napríklad karbonylovou a/alebo aminoskupinou. I keď dĺžka a charakter alkylového reťazca v BMA môže byť podľa potreby menený, je zrejmé, že ako sa dĺžka zvyšuje od 1 do 12, nemení podstatne pA_2. Ničmenej sa zvyšuje inhibícia získania. Ďalej, ako sa alkylový reťazec zvyšuje nad 8 atómov uhlíka, môže byť zaznamenaný parciálny agonizmus. Všeobecne povedané, ak sa použije BMA linker s CP-0126 ako BK zložkou, najvyššie pA_2 hodnoty sa získajú s dĺžkami alkylového reťazca v rozmedzí od 6 do 9 atómov uhlíka a je zrejmé, že u takých linkerov sa získajú najlepšie výsledky použitím BMH (bismaleimidohexánu) na poskytnutie uvedeného BSH spojenia. Avšak, ako je uvedené, efektívne výsledky môžu byť získané za použitia iných typov linkerov. Tak nie je podstatné, že skupina X zahrňuje sukcinimido substituent s tou podmienkou, že modifikácia je účinná pre spojenie s BKA peptidovými substituentami bez nežiaduceho ovplyvnenia antagonistických vlastností.

Reprezentatívne alternatívy k BMH ako spájajúce skupiny sú uvedené ďalej s označením výsledného diméru, ako bude používané ďalej (uvedené vľavo od linkerovej štruktúry) a je treba uviesť, že v každom prípade je BKA zložka diméru/triméru rovnaká ako v CP-0126.

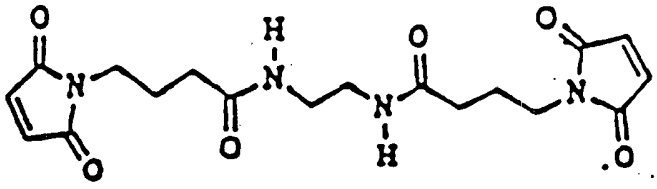
DIMER/TRIMER

LINKER

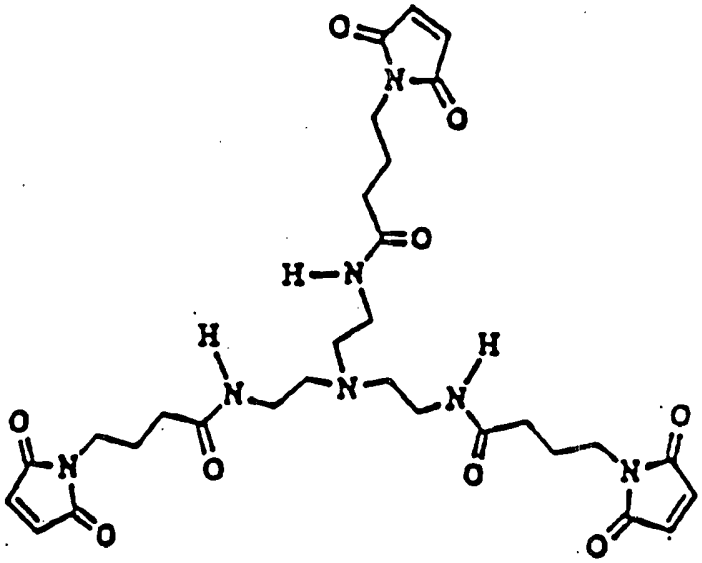
CP-0162



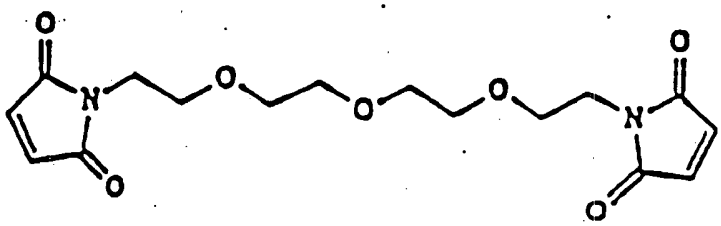
CP-0163



CP-0164

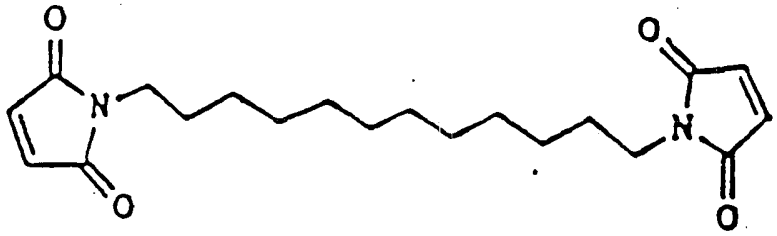


CP-0165

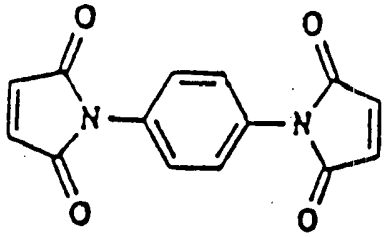


DIMER/TRIMER LINKER

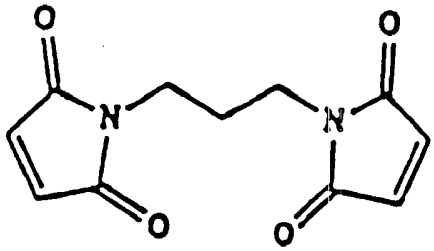
CP-0166



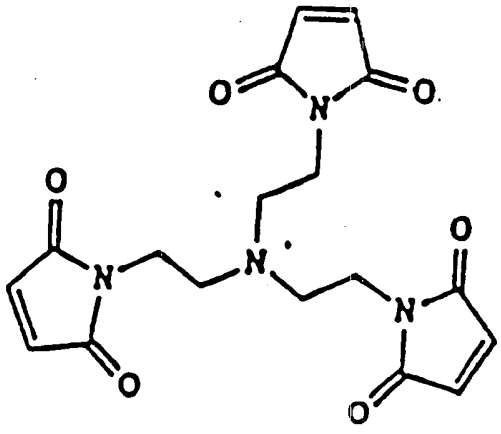
CP-0170



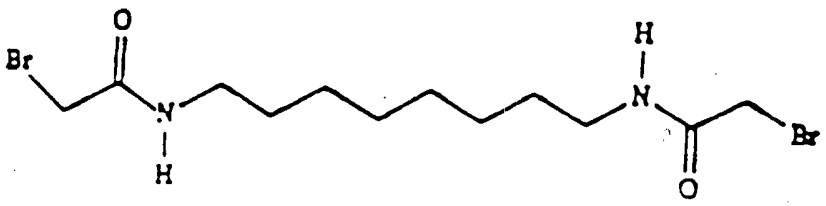
CP-172



CP-0176

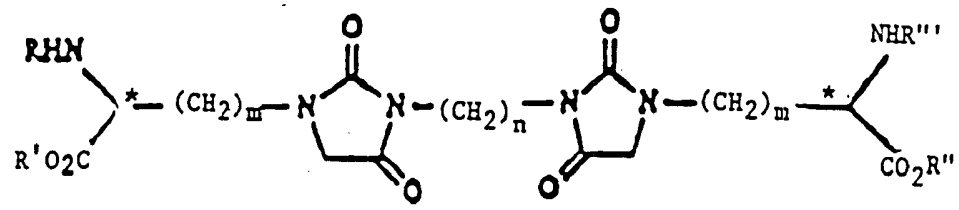


CP-0177

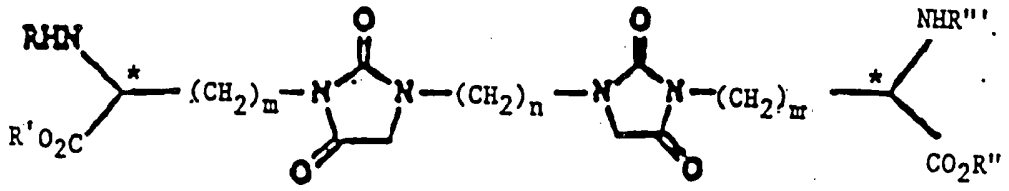


Ako bude zrejmé, vynález zahŕňa použitie širokého rozsahu linkerov X s alebo bez Cys-modifikácie pôvodného BK antagonistického peptidu (BKA). Ďalšia alternatíva linkerov vyššie uvedeného typu, ktorá umožňuje zaviesť cysteínovú modifikáciu, ako je popísaná u BSH typu zlúčenín, popísaných skôr, je uvedená ďalej:

I)



II)



n = 2-12
m = 1-12

* Chiralita môže byť ekvivalentná buď k "D" alebo "L" aminokyselinám

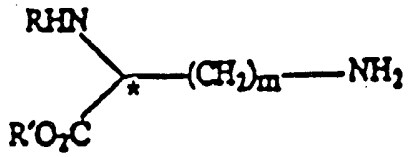
R/R"' môže byť akákoľvek kombinácia chrániacich skupín ako N-t-Boc- Fmoc-Npys

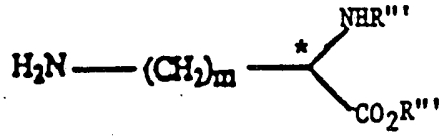
R'/R" môže byť akákoľvek kombinácia chrániacich skupín ako je metylester, etylester alebo benzylester, chrániace skupiny R, R',

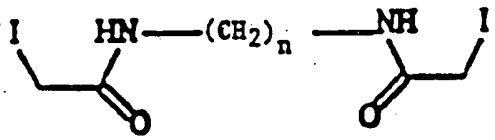
R" a R"' sú také, že môžu byť rôzne odstránené za účelom kovalentného pripojenia peptidových fragmentov ako je to potrebné, napríklad účinného BK_1, BK_2, NK_1, NK_2 receptorového antagonistu alebo μ-opioidného receptorového antagonistu.

Všeobecne syntéza linkerov typu I a II môže byť vykonaná nasledujúcim spôsobom. Pripravia sa niektoré separátne fragmenty, obsahujúce organické linkery a vhodne chránené aminokyseliny a vzájomne sa spoja. Výsledné fragmenty sa potom cyklizujú intramolekulárne na všeobecne hydantoínové štruktúry s použitím podmienok báz katalyzovanej cyklizácie.

Špecifickejšie zahrňuje syntéza linkerov typu I prípravu nasledujúcich separátnych fragmentov:

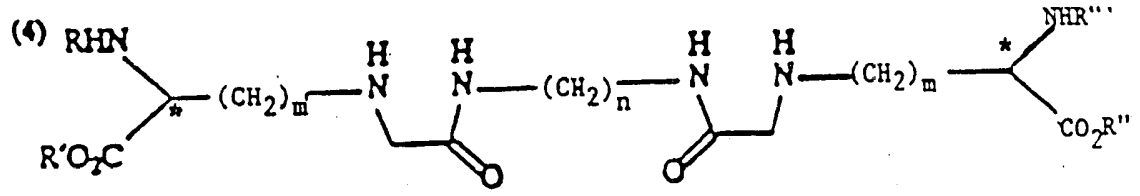
(1) 

(2) 

(3) 

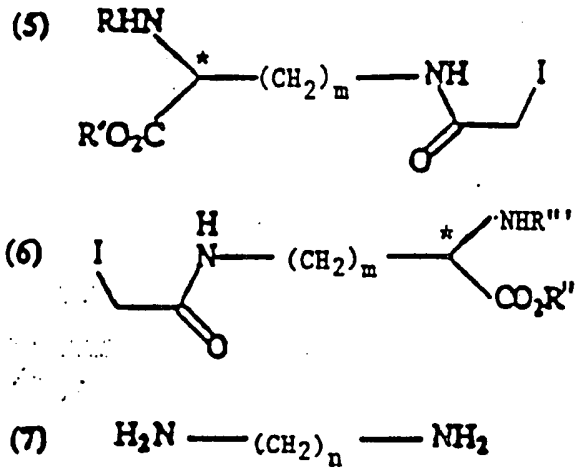
Fragmenty (1), (2)a (3) sú spolu spojené za vzniku:

(4)



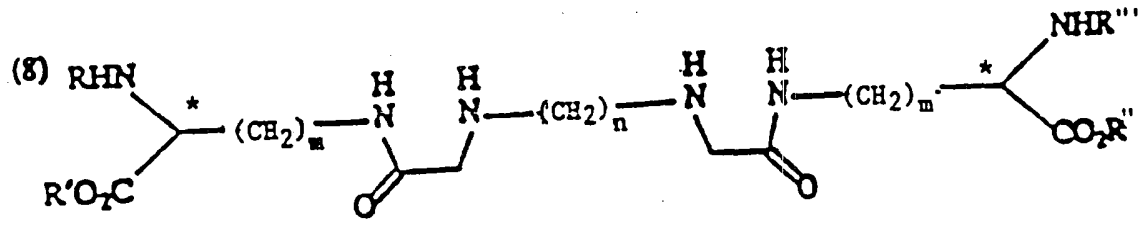
Fragment (4) sa potom spracuje s etylchlórformiátom s nasledujúcou bázou katalyzovanou cyklizáciou za vzniku požadovaného typu I alternatívneho linkera.

Syntéza typu II zahrňuje prípravu nasledujúcich separátnych fragmentov:



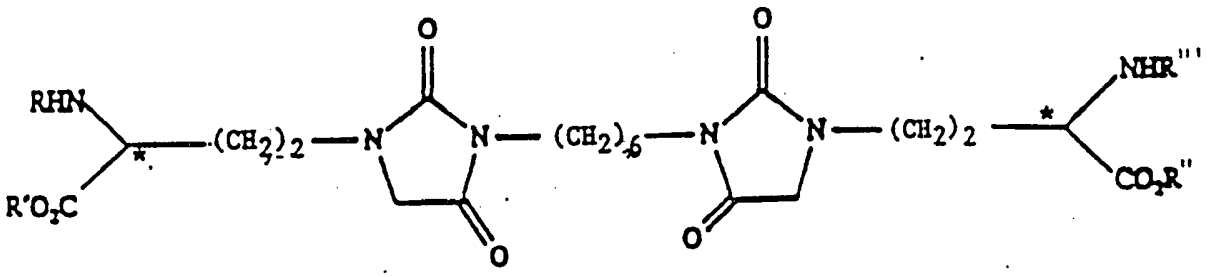
Fragmenty (5), (6) a (7) sú spojené za vzniku:

(8)

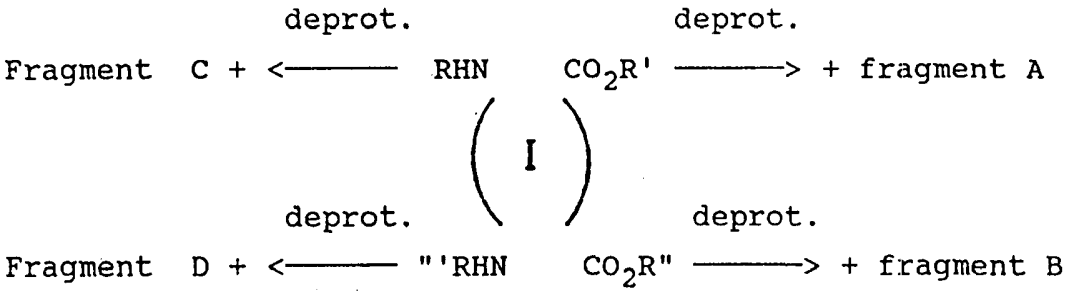


Fragment (8) sa potom spracuje s etylchlórformiátom a nasledujúcou cyklizáciou katalyzovanou bázou za vzniku požadovaného alternatívneho linkeru typu II.

Po príprave môžu byť požadované linkery buď zo skupiny I alebo II kondenzované s vhodnými peptidovými fragmentmi za vzniku požadovaného hetero- alebo homo-diméru. Ďalej je uvedená schéma, predstavujúca takú syntézu:



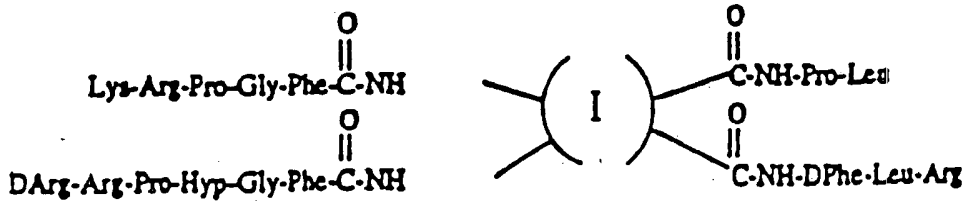
*="L" chiralita aminokyseliny



Príklad: R' = metyl alebo etylester
R" = benzylester
R = 3-nitropyridylsulfid (NPYS)
R"' = FMOC

Fragment A = NH_2-Pro-Leu
B = NH_2-DPhe-Leu-Arg
C = Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-CO_2H
D = DArg-Arg-Pro-Hyp-Gly-Phe-CO_2H

Konečný produkt:



BK_1 selektívny antagonista

BK_2 selektívny antagonista

Vyššie uvedená syntéza ilustruje prípravu heterodiméru, kde každá z reaktívnych skupín linkeru je schopná byť rôzne chránená tak, že môžu byť všetky štyri fragmenty heterodiméru pridávané oddelene.

Je treba si uvedomiť, že vyššie uvedený typ linkeru umožňuje "offsetting" ligandov, t. j. diferencované pripojenie ligandov k linkeru. Napríklad je možné pripraviť ligand, ktorý je pripojený z polohy "6" na jedno miesto a z polohy "5" na iné, ak sa to považuje za žiaduce z farmakologického hľadiska. Príkladom takéhoto typu preferovaného typu heterodiméru je BK_2 antagonista/NK_1 antagonista, ktorého príklady sú uvedené neskôr, kde polohy 4, 5 a 6 NK_1 antagonistického ligandu sú preferované. Alternatívne μ-opioidové antagonisty, tiež popísaní ďalej v súvislosti so zložkami vzorca II, môžu využiť tento typ linkeru s tou výnimkou, že len jeden fragment je treba kopulovať k linkeru, pretože kopulácia z C-konca je výhodnou stratégiou pre tento typ heterodimérov.

Z predchádzajúceho je zrejmé, že zlúčeniny vzorcov I - II podľa vynálezu môžu byť pripravené za použitia ľahko dostupných postupov. Podiely antagonistických peptidov sú ľahko dostupné alebo môžu byť pripravené vo fragmentoch s využitím techniky syntézy peptidov v pevnej fáze alebo roztoku. Môžu byť použité známe postupy na poskytnutie Cys zvyšku v požadovanej polohe v peptidovom reťazci a pri pridaní linkerovej modifikácie a pri akejkoľvek nasledujúcej tvorbe "mérov" sa využije bežná chémia.

Vynález je ilustrovaný nasledujúcimi príkladmi a obrázkami 1A, 1B, 2A, 2B, 2C, 3, 4, 5A, 5B, 6, 7 a 8 (a)-8(c), ktoré predstavujú rôzne aspekty vynálezu.

Príklady vyhotovenia vynálezu

Príklad 1

Príprava CP-0127

Peptid, CP-0126, ktorý v dimerizovanom bismaleimidohexáne (BMH) poskytuje CP-0127, bol generovaný syntézou peptidov v pevnej fáze za použitia štandardného postupného predlžovania peptidového reťazca, zvyčajného v oblasti peptidov (J. W. Stewart a J. D. Young, Solid Phase Peptide Synthesis, Pierce Chemical Cl., 1984). Stručne vyjadrené, syntéza peptidov v pevnej fáze začína s deprotekciou N.. aminokyseliny pripojenej k syntéznej živici. Tento stupeň je nasledovaný neutralizáciou a premývaním živice, obsahujúcej aminokyselinu zbavenú chrániacej skupiny, ktorým je táto pripravená na reakciu s ďalšou aminokyselinou, aktivovanou dicyklohexylkarboimidom a 1-hydroxybenzotriazolom na uľahčenie tvorby prvej peptidovej väzby (-CO-NH-). Následné premytie živice teraz obsahujúcej (di)peptid sa potom vykoná rovnako a pokračuje sa, až sa získa požadovaný peptid. Konečný peptid sa potom odštiepi zo živice za podmienok, ktoré súčasne odstránia všetky individuálne chrániace skupiny vo vedľajších reťazcoch aminokyseliny.

Všetky činidlá použité pri vyššie popísanej syntéze sú dostupné z komerčných zdrojov.

Syntéza peptidov v pevnej fáze sa vykonáva manuálne pri použití prebublávania dusíkom ako agitačného zdroja miešania. N.. -terc.butylxykarbonylová (N-t-boc) ochrana bola použitá ako dočasná chrániaca skupina vo všetkých peptidových kopuláciách. Špecifickejšie boli v po sebe idúcich postupoch použité nasledujúce živice a chránené aminokyseliny: N-t-BOC-L-Arg(Tos)-PAM živica, N-t-BOC-L-Leu, N-t-BOC-D-Phe, N-t-BOC-L-Cys(4-Meb), N-t-BOC-L-Phe, N-t-BOC-Gly, N-t-BOC-L-Hyp(Bzl), N-t-BOC-L-Pro, N-t-BOC-L-Arg(Tos), N-t-BOC-D-Arg(Tos).

Konečná peptidová živica bola sušená vo vákuu a potom umiestnená do reaktora Peninsula Laboratories Type I HF apparatus. CP-0126 bol odštiepený zo živice za použitia štandardných HF postupov bez akýchkoľvek karbonačných odpadov. Po odstránení HF vo vákuu sa živica premyje dietyléterom a peptid sa extrahuje zo živice deionizovanou vodou.

Dva ekvivalenty výsledného peptidu (CP-0126) sa nechajú reagovať s 1 ekvivalentom (0,5 molárny pomer) bismaleimidohexánu (Pierce) v 0,05 M pufra hydrogénuhličitanu amonného (pH 8,4) a miešajú sa 1 hodinu. Reakčná zmes sa potom zahustí vo vákuu a výsledný koncentrát sa znova rozpustí v 0,1 M hydrogénuhličitanu amonného (pH 5). Roztok sa potom vloží ako taký na stĺpec sulfopropyl (SP) Sephadexu (Sigma) a stĺpec sa eluuje gradientom pH 5-9 v priebehu jednej hodiny. Frakcia, obsahujúca peptidový dimér, sa potom spojí, zahustí sa vo vákuu, znova sa rozpustí v deionizovanej vode a lyofilizuje.

Konečný peptidový dimér CP-0127 je hodnotený na svoju čistotu pomocou HPLC s reverznou fázou, je vykonaná analýza aminokyselín, analýza peptidových sekvencií a Electro-Spray hmotová spektrometria.

Príklad 2

Zlúčenina CP-0127 môže byť tiež pripravená nasledujúcim spôsobom, v ktorom sa pripravia niektoré separátne fragmenty, pridá sa spájajúca skupina (BSH) na spojenie dvoch fragmentov a výsledný fragmentový dimér sa potom kompletuje pridaním iných požadovaných peptidových fragmentov.

Špecifickejšie tento spôsob zahrňuje prípravu nasledujúcich separátnych peptidových fragmentov:

1) Phe-Cys-DPhe
2) Leu-Arg
3) DArg-Arg-Pro

4) Hyp-Gly

kde vhodné chrániace skupiny sú diskutované ďalej. Fragmenty 1) a 2) sa navzájom spoja za vzniku:

5) NH_2-Phe,Cys,DPhe,Leu-Arg-OFm

kde OFm je α-fluórmetyl a Cys je chránený Acm skupinou. Dve molekuly medziproduktu 5) môžu byť navzájom spojené cez ich Cys tiolové skupiny pri použití BMH za vzniku:

6) NH_2-Phe-Cys-DPhe-Leu-Arg-OFm
|
BSH
|
NH_2-Phe-Cys-DPhe-Leu-Arg-OFm

Fragmenty 3) a 4) sa spoja spolu za vzniku

7) (BOC)-DArg-Arg-Pro-Hyp-Gly-OH

kde BOC je terc. butyloxykarbonyl a potom sa dve molekuly 7) pripoja k 6) za vzniku:

BOC-DArg-Arg-Pro-Hyp-Gly-Phe-Cys-DPhe-Leu-Arg-OFm
|
BSH
|
BOC-DArg-Arg-Pro-Hyp-Gly-Phe-Cys-DPhe-Leu-Arg-OFm

Potom nasleduje odstránenie N- a C-koncových chrániacich skupín za vzniku diméru CP-0127.

Tento postup je podrobnejšie popísaný ďalej:

Fragment 2) sa pripraví nasledovne:

N-T-BOC-Leu (16,68 g, 67 mmol) a Arg-OFm.2 HCl (29,68 g, 70 mmol) sa rozpustí v 140 ml N,N-dimetylformamidu a potom sa pridá 16 ml difenylfosforylazidu (20,43 g, 74 mmol) a 25 mmol diizopropyletylamínu (18,55, 143 mmol). Reakcia sa vykoná pri teplote miestnosti až do konca podľa chromatografie na tenkej vrstve (n-butanol : kyselina octová : voda 4:1:1) na silikageli.

Po skončení sa reakčná zmes zahustí za vákua na asi 10 % pôvodného objemu. Výsledná kašovitá suspenzia sa rozpustí v etylacetáte (150 ml) a premyje sa v 250 ml deliacej nálevke 10 % hydrogénuhličitanom sodným (3 x 100 ml), vodou (2 x 100 ml), 0,1 M kyselinou chlorovodíkovou (3 x 100 ml) a vodou (2 x 100 ml). Finálna organická vrstva sa suší nad síranom sodným a zahustí sa do sucha vo vákuu.

Pevná látka alebo olej sa rozpustí v malom množstve etylacetátu a kryštalizuje sa za použitia hexánu. Pevná látka sa odfiltruje vákuovou filtráciou a suší sa vo vákuu.

N-t-BOC skupina sa odstráni za použitia 4N HCl v dioxane (100 ml) počas 1 hodiny pri teplote miestnosti. Rozpúšťadlo sa potom odstráni vo vákuu a výsledná pevná látka (alebo olej) sa rozpustí v malom množstve metanolu (20 ml). Vyvolá sa kryštalizácia prídavkom etyléteru a výsledná pevná látka sa izoluje vákuovou filtráciou, premyje sa etyléterom (2 x 50 ml) a suší sa vo vákuu.

Estery (metyl alebo etyl) sa odstránia rozpustením peptidu v 100 ml metanolu a pridaním 1,5 ekvivalentu hydroxidu sodného; reakčná zmes sa potom mieša 1 hodinu pri 0 °C. Reakčná zmes sa neutralizuje 1N HCl a zahustí vo vákuu na objem asi 30 ml. Pridá sa voda (100 ml) a potom 1N HCl, až roztok dosiahne pH asi 1. Peptid sa extrahuje z vodného roztoku etylacetátom (2 x 100 ml) a spojený etylacetátový extrakt sa suší nad síranom sodným, filtruje a zahustí vo vákuu. Výsledný olej sa rozpustí v malom objeme etylacetátu a kryštalizuje sa za použitia hexánu.

Fragmenty 1) a 2) sa spolu kopulujú rovnakým spôsobom, ako je popísané vyššie, za vzniku N-terminálneho pentapeptidu. Fragmenty 3) a 4) sa spolu kopulujú a spracujú rovnakým spôsobom, ako je popísané vyššie, za vzniku C-terminálneho peptapeptidu.

C-terminálny pentapeptid (10 g) sa zbaví chrániacich skupín použitím 100 ml 4N HCl v dioxane počas 1 hodiny. Dioxán sa odstráni vo vákuu a poskytne olej, ktorý sa rozpustí v 20 ml metanolu a spracuje sa s prebytkom etyléteru za vzniku bieleho prášku. Takto získaný prášok sa rozpustí v 90 ml vody a potom sa pridá 10 ml metanolu a ďalej 30 ml octovej kyseliny nasýtenej jódom (I_2). V miešaní sa pokračuje 1 hodinu. Reakčná zmes sa extrahuje dvoma rovnakými objemami chloroformu a vodná vrstva sa lyofilizuje. Výsledný špinavo biely prášok sa rozpustí v 20 ml vody a spracuje sa s aktivovanou živicou Reductacryl (CALBIOCHEM) počas 20 minút. Reductacryl sa odstráni filtráciou a živica sa premyje 20 ml 0,1M pufra hydrogénuhličitanu amonného (pH 8). Spojené filtráty, obsahujúce peptid, sa spracujú s 1,6 g bismaleiimidohexánu (Pierce) v 3 ml N,N-dimetylformamidu a miešajú sa 2 hodiny. Reakčná zmes sa potom zahustí vo vákuu a výsledný koncentrát sa znova rozpustí v 50 ml 0,1M pufra hydrogénuhličitanu amonného (pH 5). Roztok sa vloží in toto na 50 g stĺpec sulfopropyl (SP) Sephadexu (Sigma) a stĺpec sa eluuje gradientom pH 5-9 v priebehu jednej hodiny pri 3 ml za minútu. Frakcia obsahujúca peptid sa spojí, zahustí sa vo vákuu, znova sa rozpustí v 100 ml vody a lyofilizujú.

2 ekvivalenty N-terminálneho peptidu (fragment 7) sa kopulujú k 1 ekvivalentu C-terminálneho dimerického peptidu (fragment 6) za použitia rovnakého postupu ako je vyššie popísaný pre fragment 2.

Odstránenie chrániacich skupín z finálneho peptidu sa vykoná rozpustením 5 g peptidu v 75 ml N,N-dimetylformamidu, obsahujúceho 30 % piperidínu a potom miešaním počas 20 minút. Rozpúšťadlá sa odstránia vo vákuu a výsledný olej sa rozpustí v 100 ml vody. pH sa potom zníži na asi 1 1N HCl a produkt sa

extrahuje do etylacetátu (3 x 100 ml). Spojené etylacetátové vrstvy a zahustia vo vákuu, zostane olej, ktorý sa potom rozpustí v 4N HCl v dioxane a mieša sa 1 hodinu. Dioxan sa odstráni vo vákuu a výsledný olej sa rozpustí v 30 ml metanolu. Prebytok etyléteru sa potom pridá a získa sa produkt ako biely prášok.

Konečné čistenie peptidového diméru sa vykonáva rozpustením 5 g v 0,1N pufra hydrogénuhličitanu amonného (pH 5), nanesením roztoku na 50 g stĺpec sulfopropyl (SP) Sephadexu (Sigma) a gradientom od pH 5 do pH 9 v priebehu 1 hodiny pri odberaní 10 ml frakcií. Každá frakcia sa skúša pomocou HPLC a čisté frakcie sa spoja a 3 x lyofilizujú s vodou.

Pri konečnom produkte sa hodnotí čistota pomocou HPLC s reverznou fázou, vykonáva sa analýza aminokyselín, analýza peptidových sekvencií a Electro-Spray hmotová spektrometria.

Pri vykonávaní vyššie popísanej syntézy je treba uviesť, že aminoskupina každej aminokyseliny je chránená N-terc.butoxykarbonyl (N-t-BOC) alebo podobnou skupinou podľa potreby. Karboxylová skupina aminokyselín je tiež chránená, v tomto prípade esterovou funkciou (napr. etyl, metyl alebo 9-fluorénmetylester). Guanidíno-vedľajší reťazec arginínu (Arg) je chránený ako hydrochloridová (HCl) soľ a atóm síry v cysteíne (Cys) je chránená za použitia acetoamidometylovej skupiny (Acm).

Príklad 3

Zlúčenina CP-0127 sa pripravila ako je popísané v príklade 1 a bola porovnávaná s Cys^6-modifikovaným peptidom CP-0126 a pôvodným peptidom CP-0088 na biologickú aktivitu za použitia testov, ktoré sú v odbore dobre známe. In vitro štúdie boli vykonané na štandardných skúšobných systémoch, menovite ileu morčiat (GPI), maternici potkana (RU) a králičej jugulárnej véne (RJV). Je dobre známe, že každé z týchto tkanív má BK receptor, ktorý je triedy BK_2, ale každý je iného podtypu. Účinnosť každej zlúčeniny bola vyjadrená ako pA^2 hodnota podľa metódy

Arunlakshana a Schilda, Br. J. Pharmacol. Chemother., 14:48-58 (1959). pA_2 môže byť definované ako záporný logaritmus molárnej koncentrácie antagonistu, v prítomnosti ktorého je účinnosť agonistu dvojnásobne znížená, t. j. dvojnásobok množstva agonistu je vyžadovaný na poskytnutie danej odozvy za prítomnosti, ako za neprítomnosti antagonistu. Vysoká účinnosť antagonizmu je indikovaná vyššou pA_2 hodnotou, t. j. je účinná nízka koncentrácia antagonistu.

Percentá regenerácie (% Rec) boli tiež stanovené u zlúčenín v každej skúške. Percento regenerácie je meranie trvania pôsobenia, čím nižšia hodnota percent regenerácie, tým je dlhšie trvanie pôsobenia zlúčeniny.

pA_2 a percentá regenerácie (% Rec) v hodnotách získaných pre CP-0088, CP-0126 a CP-0127 v štúdiách s GPI, RU a RJV, sú uvedené v tabuľke A:

Tabuľka A

Zlúčenina	GPI		RU		RJV	
	pA_2	% REC	pA_2	% REC	pA_2	% REC
CP-0088	6.6	100	7.4	100	8.5	90
CP-0126	6.4	100	7.1	100	8.8	60
CP-0127	7.7	100	8.8	50	10.5	10

Možno vyvodiť, že v každom tkanive je pôvodne peptid CP-0088 približne rovnako účinný ako Cys^6-modifikovaný peptid (CP-0126). Naopak, dimér CP-0127, je výrazne účinnejší ako CP-0126, tak CP-0088. Zvýšenie účinnosti CP-0127 je výrazne vyššie ako CP-0126 v každom tkanive s najvyšším zvýšením u RJV skúšky. Zvýšenie účinnosti pre CP-0127 vs. CP-0126 na GPI a RU boli menej markantné, ale ešte podstatné.

Je treba uviesť, že CP-0127 vykazuje podstatne nižšie % Rec v RU a RJV skúškach ako CP-0088 a CP-0126. % Rec pre CP-0126 v RJV skúške bolo tiež výrazne lepšie ako hodnoty získané s CP-0088.

S ohľadom na trvanie aktivity je treba viesť, že po vystavení najvyššej koncentrácii antagonistu bolo každé tkanivo intenzívne premyté a potom sledované, pokiaľ ide o znovudosiahnutie antagonistického efektu. Obr. 1A a 1B predstavujú krivku vplyvu koncentrácie na BK na potkanej maternici in vitro za použitia (1 A) CP-0126 a (1B) CP-0127. Rozdiely v krivkách regenerácie BK by mali byť zaznamenané. Ako je zrejmé z obrázku 1 A, krivka vplyvu koncentrácie na BK po vystavení CP-0126 sa takmer vracia k hodnote získanej na kontrolu. Naopak, s CP-0127 je ešte významný antagonizmus BK i po opakovanom premytí (obr. 1B). Toto indikuje, že CP-0127 má dlhšie trvanie aktivity ako CP-0126.

Príklad 4

Boli použité tri in vivo modely pre štúdie porovnávania vplyvov CP-0126 a CP-0127. Boli nimi a) vaskulárna permeabilita králičej kože, b) BK-indukovaná hypotenzia u potkanov a c) LPS-indukovaná hypotenzia u anestetizovaných potkanov (CO-0127 len).

a) Vaskulárna permeabilita králičích koží

V týchto pokusoch boli použité dva postupy. Prvý sa použije v klasickom pokuse, pri ktorom sa BK injikuje intradermálne buď samotný alebo v kombinácii so zlúčeninou s hodnotením po nasledujúcom podaní farbiva Evans Blue. Tridsať minút po intradermálnej injekcii BK a bez zlúčeniny sa zvieratá usmrtia, ich koža sa odstráni a plocha "namodrenia" (t. j. vaskulárna permeabilita alebo edém) sa meria. Výsledky tohto pokusu sú uvedené na obr. 2A. Je zrejmé, že CP-0126 je účinnejší ako CP-0127 na použitie tohto postupu.

Druhý postup zahrňuje injekciu testovanej zlúčeniny buď 15 alebo 30 minút pred injekciou BK na to isté miesto. Výsledky sú uvedené na obr. 2B a 2C. Je zjavné, že CP-0127 má úplne inhibované odozvy na bradykinín, zatiaľ čo CP-0126 je výrazne menej účinný.

b) Krvný tlak potkanov

Porovnanie antagonistickej účinnosti CP-0126 a CP-0127 bola vykonaná u anestetizovaných potkanov. Následne po výpočte krivky odozvy na hypotenznú dávku k BK u týchto zvierat minimálna dávka produkujúca maximálne zníženie krvného tlaku bola opakovaná v asi trojminútových intervaloch pred, v priebehu a po intravenóznej infúzii buď CP-0126 alebo CP-0127 v dávke 9 $nmol.kg^{-1}.min^{-1}$. Obr. 3 ukazuje výsledky získané a vyjadrené v percentách zmeny stredného arteriálneho krvného tlaku u potkanov k BK (4×10^{-9} mól) pred, v priebehu a po intravenóznej infúzii buď CP-0126 alebo CP-0127 v dávke 9 $nmol.kg^{-1}.min^{-1}$. Z obrázku 3 je zrejmé, že CP-0127 takmer úplne inhibuje odozvy na túto veľkú dávku BK, zatiaľ čo CO-0126 je takmer celkom neúčinný. Po skončení infúzie CP-0127 je zrejmé, že odozvy na BK sa pomaly navracajú a plne sú regenerované po približne 20 minútach.

c) Lipopolysacharidy (LPS) indukovanej hypotenzie u anestetizovaných potkanov

LPS-indukovaná hypotenzia u potkanov je štandardný zvierací model septického šoku. V tomto modeli sa anestetizované potkany injektujú intravenózne LPS s Escherichia coli v dávke 15 $mg.kg^{-1}$. Toto vyvolá bezprostredný a hlboký pokles (50 až 60 % zmena) stredného arteriálneho krvného tlaku (obr. 4). Ak sa CP-0127 infunduje pri 18 nmol/kg/min. intravenózne 60 minút pred, v priebehu a po injekcii LPS, je tu významné oslabenie bezprostredného poklesu krvného tlaku, ktorý sa potom rýchle vracia k normálnemu. Normotenzia sa potom udržiava počas doby trvania pokusu (približne 3 až 4 hodiny). Toto je v kontraste

s kontrolnou skupinou, v ktorej sa udržala hlboká hypotenzia. Je skutočnosťou, že 3 zvieratá uhynuli po podaní LPS injekcie v priebehu 20 minút. Viď obr. 4, ktorý ilustruje percentá zmien v strednom arteriálnom krvnom tlaku u anestetizovaných potkanov k injekcii intravenózneho bolusu LPS, 15 $mg.kg^{-1}$.

Získané hodnoty ukazujú, že dimérny BK antagonista (CP-0127) je výrazne účinnejší ako Cys^6 monomérny antagonista (CP-0126) ako v modeli in vitro, tak in vivo BK aktivity za použitia štandardných systémov skúšok pre hodnotenie účinnosti antagonistov voči špecifickému stimulu (t. j. BK) a voči nešpecifickému stimulu (LPS) u skúmaného zvieracieho modelu septického šoku.

Dáta in vitro demonštrujú výnimočnú účinnosť CP-0127, v každom skúšanom tkanive najbadateľnejšia aktivita je zrejmá na králičej jugulárnej véne. Ako bolo uvedené, bola zlúčenina CP-0088 vybraná z literatúry na účely testov, pretože je najúčinnejšia (hodnotené štandardným stanovením pA_2) BKA v klasických in vitro skúšobných systémoch. Za použitia rovnakého kritéria (stanovenie pA_2) sa účinnosť CP-0127 javí ako presahujúca väčšinu, pokiaľ nie všetky skoršie BKA, ktoré boli uvedené, hlavne na králičej jugulárnej véne.

Najvyššia pA_2 hodnota pre CP-0127 bola získaná na vaskulárnom preparáte králičej jugulárnej vény a zdá sa, že táto trieda BKA by mala byť vhodná na ošetrovanie vaskulárnych procesov, kde je zahrnutý BK. Z hľadiska úlohy BK pri zápale sú účinky CP-0127 na permeabilitu/edém a vazodilatáciu zvlášť významné. Údaje zo štúdia kožnej vaskulárnej permeability sú zaujímavé, pretože CP-0126 bol považovaný za účinnejší ako CP-0127, ak oba antagonisty boli koinjektované s BK. Avšak, ak CP-0127 a CP-0126 boli injektované vopred buď 15 alebo 30 minút pred BK podnetom, inhibuje CP-0127 plne odozvy na BK, zatiaľ čo CP-0126 je oveľa menej účinný ako keď bol súčasne injektovaný s BK. Tento rozdiel nebol vysvetlený, ale môže byť spôsobený tým, že dimér vyžaduje viac času pre ekvilibráciu s receptorom a jednu

väzbu je ťažšie nahradiť v porovnaní s monomérom. Ďalej sa zdá, že CP-0127 bude metabolicky stabilnejší ako CP-0126.

Ako bolo uvedené, je úplne zjavné, že BK je výrazne zahrnutý v septickom šoku spôsobenom gramnegatívnou bakteriálnou infekciou. V tejto súvislosti je treba uviesť, že predložený dimér (CP-0127) úplne obracia odozvu na LPS po dávke, ktorá účinne blokuje hypotenzívne odozvy k maximálnym dávkam BK u anestetizovaných potkanov. I keď CP-0126 nebol zahrnutý v LPS septickom modele šoku, očakáva sa, že by v rovnakej dávke mohol byť oveľa menej účinný ako CP-0127, stratou účinku tejto zlúčeniny (CP-0126) voči vysokým dávkam BK.

Takto, stručne vyjadrené, hodnoty poskytnuté z in vitro a in vivo skúšok predstavujú významné kvantitatívne rozdiely medzi monomérnymi (CP-0126) a dimérnymi (CP-0127) BK antagonistu vzhľadom k absolútnej účinnosti, odolnosti na vymytie a priebehu pôsobenia.

Pri hodnotení biovyužiteľnosti CP-0127 bolo doložené použitím jednej dávky (3,6 μmol/kg) podanej subkutánne (s.c.), že odozvy krvného tlaku a bolesti na BK môžu byť úplne blokované aspoň 2 hodiny (priebeh pokusu). Užitím anestetizovaných potkanov boli konštruované krivky dávkovej odozvy na BK a stanovená ED_{50} (viď obr. 5a). ED_{50} bola potom injektovaná pred a 15 minút po jedinom podaní s.c. injekcie CP-0127. Z obr. 5b je možné vidieť, že odozva na BK je úplne blokovaná v priebehu pokusu (2 hodiny).

V oddelene vykonanom súbore pokusov bola hodnotená bolesť v odpovedi na intraarteriálnu injekciu BK u potkanov pri vedomí, ktorým bola vopred (48 hodín pred) implantovaná dočasnou kanylou do arteria carotis. Bradykinín (20 $nmol.kg^{-1}$) bol injektovaný intraarteriálne, čím sa dosahuje charakteristická kontralaterálna elevácia tlapky a rotácie hlavy a tela s nasledujúcou periódou upokojenia. Odozva bola hodnotená stupnicou 0 až 5 vzhľadom na stupeň pozorovanej odozvy v správaní.

Údaje zrejmé z obr. 6 demonštrujú, že jediná s.c. injekcia CP-0127 v dávke 3,6 $\mu mol.kg^{-1}$ úplne odstraňuje odozvu na BK s inhibíciou trvajúcou počas doby vykonávania pokusu (približne 2 hodiny). Kontroly ukazujú stabilnú odozvu v priebehu celého trvania pokusu.

Príklad 5

Tento príklad ilustruje účinok zavedenia Cys zvyšku a následne linkeru do rôznych polôh reťazca CP-0088. Rôzne zlúčeniny označené v tabuľke B boli pripravené postupom podľa príkladu 1 s Cys skupinou zavedenou do pôvodného CP-0088 v polohe, ktorá je označená s nasledujúcou reakciou medzi tiolovou skupinou Cys zvyšku a BMH za vzniku uvedených dimérov. Cys-modifikované monoméry a výsledné diméry boli testované na aktivitu na ileu morčiat in vitro v štandardnom tkanivovom kúpeli (hodnotenie správania systému ako prv). Výsledky sú vyjadrené v pA_2 spolu s výsledkami pre CP-0088, CP-0126 a CP-0127 sú uvedené v tabuľke B. Na označenie optických izomérov sú použité symboly "L" a "D".

Tabuľka B

Zlúč. č.	Zloženie	Popis	Morč. pA_2,PIG ILEUM
CP-0088	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 DR-R-P-J-G-F-S-DF-L-R	mono- mér	6.5 ± 0.2
CP-0126	L-CYS^6	monomér	6.6 ± 0.1
CP-0127	L-CYS^6	dimér	7.7 ± 0.2
CP-0140	L-CYS^0	monomér	6.7 ± 0.1
CP-0152	L-CYS^0	dimér	< 6
CP-0149	D-CYS^0	monomér	6.7 ± 0.5
CP-0161	D-CYS^0	dimér	6.5 ± 0.1
CP-0141	L-CYS^1	monomér	6.1 ± 0.1
CP-0153	L-CYS^1	dimér	7.6 ± 0.6
CP-0142	L-CYS^2	monomér	< 6
CP-0154	L-CYS^2	dimér	6.9 ± 0.3
CP-0143	L-CYS^3	monomér	6.7 ± 0.4
CP-0155	L-CYS^3	dimér	7.7 ± 0.2
CP-0136	L-CYS^4	monomér	inaktiv.
CP-0137	L-CYS^4	dimér	inaktiv.
CP-0173	D-CYS^4	monomér	inaktiv.
CP-0203	D-CYS^4	dimér	inaktiv.
CP-0144	L-CYS^5	monomér	6.4 ± 0.2
CP-0156	L-CYS^5	dimér	7.9 ± 0.1
CP-0145	L-CYS^7	monomér	inaktiv.
CP-0157	L-CYS^7	dimér	inaktiv.
CP-0146	D-CYS^7	monomér	inaktiv.
CP-0158	D-CYS^7	dimér	inaktiv.
CP-0147	L-CYS^8	monomér	inaktiv.
CP-0159	L-CYS^8	dimér	inaktiv.
CP-0148	L-CYS^9	monomér	inaktiv.
CP-0160	L-CYS^9	dimér	inaktiv.

Vyššie uvedené výsledky ukazujú, že rozsah rádu účinnosti dimérov uvedených v tabuľke B podľa polohy spojenia je:

$$5 \geq 6 \geq 1 \geq 2 > 3 > 0 >>> 4, 7, 8, 9$$

s dimérmi v polohe 4, 7, 8 a 9 inaktívnymi. Tabuľka B ďalej ukazuje, že všetky aktívne diméry s Cys v polohe 1, 2, 3, 5 a 6 sú oveľa účinnejšie ako zodpovedajúci monomér. Toto platí ako pre L-, tak pre D-izomérne formy, kde bolo vykonané stanovenie.

Príklad 6

pA_2 a % regenerácie pre model potkanej maternice BK aktivity boli stanovené pre rôzne monoméry a diméry uvedené v príklade 5 a porovnané so zodpovedajúcimi hodnotami získanými s referenčnou zlúčeninou CP-0088, CP-0127 a pôvodným Cys^6-obsahujúcim monomérom (CP-0126). Výsledky sú uvedené ďalej v tabuľke C.

Tabuľka C

Monomér		Dimér	pA_2 Monomér	pA_2 Dimér	% Rec. Monomér	% Rec. Dimér
CP-0088		--	7.4±0.2	--	100	-
CP-0126	(L-CYS^6)	CP-0127	7.1±0.1	8.8±0.3	100	50
CP-0144	(L-CYS^6)	CP-0156	7.1±0.1	8.1±0.1	95	75
CP-0136	(L-CYS^4)	CP-0137	Inaktive	Inaktive	-	-
CP-0173	(D-CYS^4)	CP-0203	Inaktive	Inaktive	-	-
CP-0143	(L-CYS^3)	CP-0155	P.A.*	6.4±0.1	-	100
CP-0142	(L-CYS^2)	CP-0154	6.4±0.2	P.A.*	80	90
CP-0141	(L-CYS^1)	CP-0153	< 6	7.7±0.2	100	100
CP-0140	(L-CYS^0)	CP-0152	7.1±0.4	7.9±0.1	50	50
CP-0149	(D-CYS^0)	CP-0161	7.1	6.5	75	100
CP-0145	(L-CYS^7)	CP-0157	Inaktive	Inaktive	-	-
CP-0146	(D-CYS^7)	CP-0158	Inaktive	Inaktive	-	-
CP-0147	(L-CYS^8)	CP-0159	Inaktive	Inaktive	-	-
CP-0148	(L-CYS^9)	CP-0160	Inaktive	Inaktive	-	-

* = P.A. = parciálny antagonista

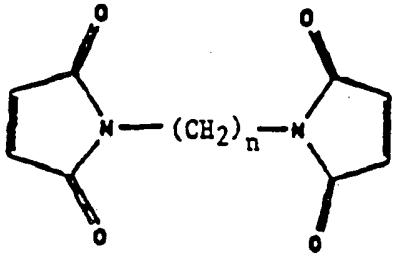
I keď sa relatívne účinnosti uvedené v tabuľke C pre model potkanej maternice o niečo líšia od hodnôt získaných v príklade 5 na ileu morčiat, je isté, že zlúčeniny s Cys-modifikáciou v polohách 4, 7, 8 a 9 CP-0088 sú opäť neaktívne. Ďalej výsledky na potkanej maternici zaznamenávajú výhodnosť "6" polohy pre modifikáciu, i keď bude možné, že iné polohy môžu byť preferované pre iné spojenia a modifikácie v závislosti napríklad na typoch alebo subtypoch zahrnutých receptorov.

Príklad 7

I keď údaje získané z homodiméru CP-0127 indikujú, že táto zlúčenina je výrazným zlepšením v porovnaní s inými zlúčeninami z literatúry, pre realizáciu je dôležité, že účinky dimerizácie nie sú jedinečným aspektom špecifického zvoleného linkeru, BMH. V tabuľke D je uvedený rad dimérov, ktoré sú odvodené zo základnej zlúčeniny CP-0126 a rôznych bismaleimidoalkánových linkerov. Tieto údaje zreteľne indikujú, že rôzne bismaleiimidoalkány môžu byť použité na prípravu účinných BK antagonistických dimérov. Voľba výhodnej zlúčeniny bude závisieť na zamýšľanej aplikácii podľa požadovanej farmakodynamickej kvality.

Tabuľka D

Vplyv dĺžky linkera

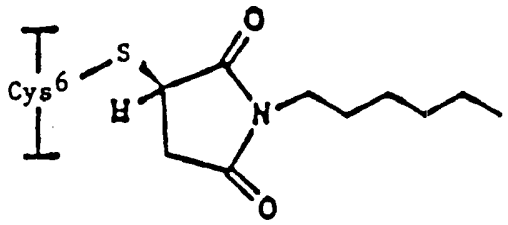


Počet C atómov	Zlúčenina č.	pA_2 (uterus)	% Rec. (40 min.)
n = 2	CP-0162	8.4 ± 0.2	90
n = 3	CP-0172	8.6 ± 0.2	90
n = 4	CP-0209	8.2 ± 0.2	50
n = 6	CP-0127	8.8 ± 0.3	50
n = 8	CP-0211	8.4	25
n = 9	CP-0229	9.3 ± 0.4	0-10
n = 10	CP-0230	8.6 ± 0.2	0
n = 12	CP-0166	8.2 ± 0.3	0*

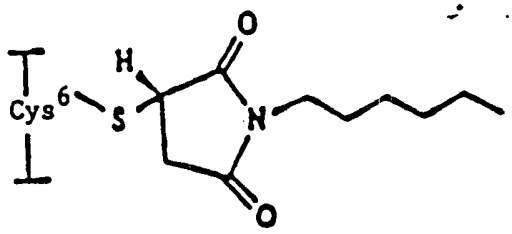
Príklad 8

Boli tiež pripravené nasledujúce zlúčeniny podľa vynálezu ako modifikácia CP-0126:

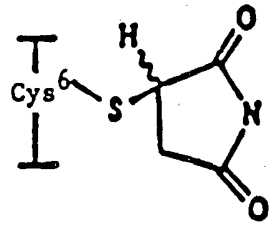
CP-0174



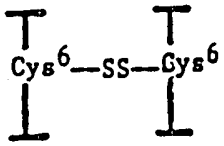
CP-0175



CP-0139

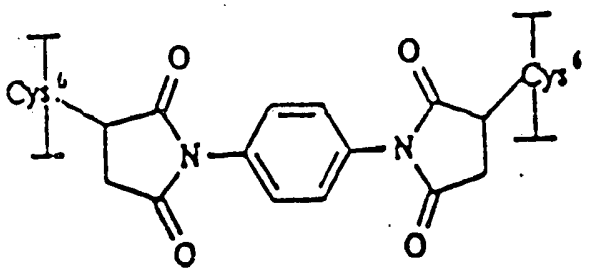


CP-0138

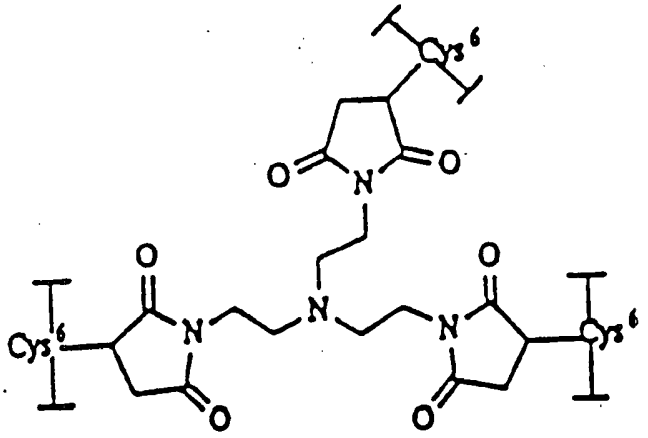


(Disulfide Dimer)

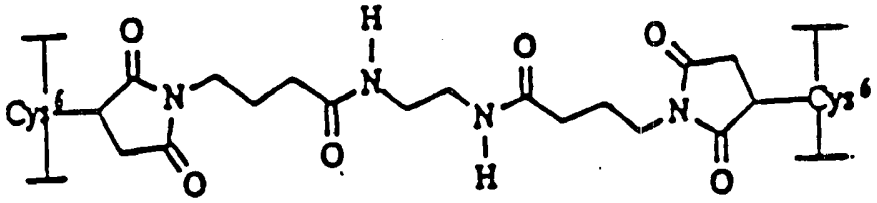
CP-0170



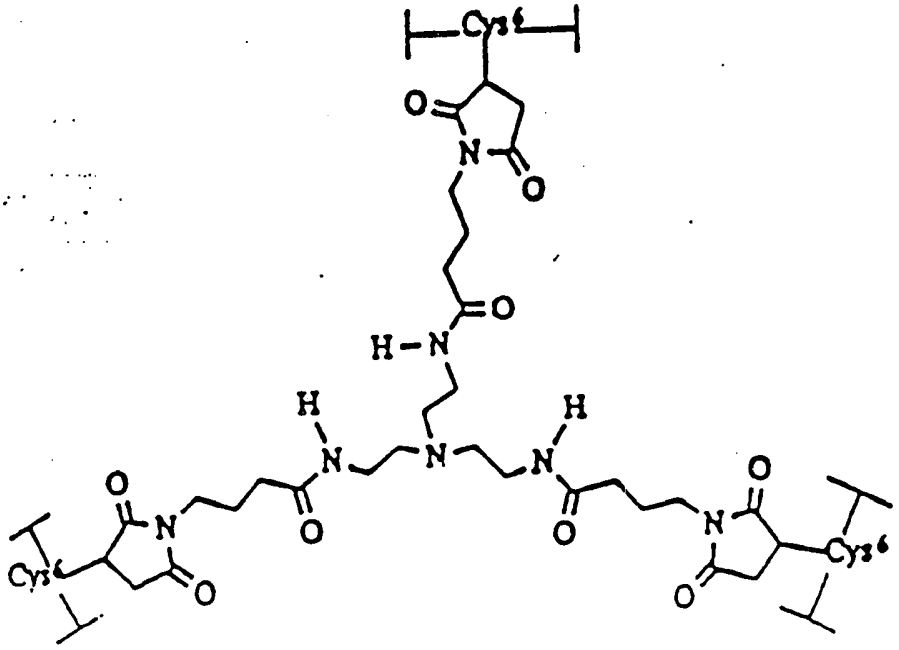
CP-0176



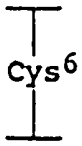
CP-0163



CP-0164



kde



predstavuje CP-0126. Tieto zlúčeniny boli pripravené reakciou CP-0126, t.j.

DArg-Arg-Pro-Hyp-Gly-Phe-Cys-DPhe-Leu-Arg
|
SH

s uvedenou linkerovou zlúčeninou v podstate spôsobom popísaným v príklade 1.

Uvedené zlúčeniny zahrňujú modifikované peptidové monoméry (CP-0174, - 0175, -0139), diméry (CP-9138, -0163 a 0170) a triméry (CP-0164 a -0176).

Tabuľka E uvádza pA_2 hodnoty získané testovaním vyššie uvedených zlúčenín na aktivitu v ileu morčiat (GPT) a maternici potkanov s CP-0126 a CP-0127:

Tabuľka E

Zlúčenina	GPI pA_2	Maternica potkana pA_2	% regenerácie
CP-0126	6.6 ± 0.2	7.1 ± 0.1	100
CP-0127	7.7 ± 0.2	8.8 ± 0.3	50
CP-0174	7.2	8.4	50
CP-0175	7.2	8.5	30
CP-0139	6.2 ± 0.2	7.2 ± 0.2	100
CP-0138	7.2 ± 0.1	8.0 ± 0.1	100
CP-0163	8.2 ± 0.2	7.6 ± 0.3	100
CP-0164	7.5	7.6	50
CP-0170	6.3	7.1 ± 0.4	100
CP-0176	7.0	8.6	50

Hodnoty uvedené v tabuľkách D a E ukazujú nasledujúce:

1. Reakcia cysteínu v "6" polohe s voľným maleimidom a tak jeho prevedenie na S-sukcinimido-L-cysteínový zvyšok zlepšuje účinnosť (porovnaj CP-0126 s CP-0139, - 0174, - 0175). Bolo však tiež zistené, že monoméry ako trieda sa správajú rozdielne od dimérov ako triedy s ohľadom na ich odolnosť k "vypraniu" vzhľadom na ich štruktúru. Monoméry môžu byť odstránené a profil dávka/odpoveď tkaniva sa vracia na stav pred ošetrením s jednou výmenou pufra, zatiaľ čo diméry vyžadujú násobné premývanie kvôli navráteniu ich aktivity a vrátenie systému do východiskového stavu. Toto hľadisko aktivity monomér vs. dimér v in vitro modeloch BK antagonizmu je znamením predĺženej doby pôsobenia pre diméry in vivo.

2. Zlepšená účinnosť pomocou dimerizácie sa nejaví byť dramaticky ovplyvnená linkerom, pokiaľ je linker lineárny a flexibilný. Avšak rigidnejší alebo bránený linker (CP-0170) neposkytuje zlepšenie účinnosti s ohľadom na zodpovedajúci monomér (CP-0126). Kvôli potvrdeniu tohto názoru disulfidový dimér (CP-0138), ktorý je pravdepodobne najviac bráneným a rigidným z testovaných dimérov, je tiež relatívne menej aktívny. V skutočnosti sa nelíši v inhibičnej aktivite od CP-0126 monoméru v tomto systéme.

3. Trimerizácia (CP-0164 a CP-0176) sa nejaví ako zlepšujúca účinnosť vzhľadom k účinnosti získanej dimerizáciou (CP-0127, -0163, -0166).

Príklad 9

Na preukázanie všeobecnej platnosti tohto hodnotenia vzhľadom k ligandu bol iný reprezentatívny BKA (CP-0181):

$DArg^0$-Arg^1-Pro^2-Hyp^3-Gly^4-Phe^5-Ser^6-$DPhe^7$-Phe^8-Arg^9

modifikovaný zavedením Cys do polohy "6" a dimerizáciou s BMH za vzniku BSH diméru (CP-0215).

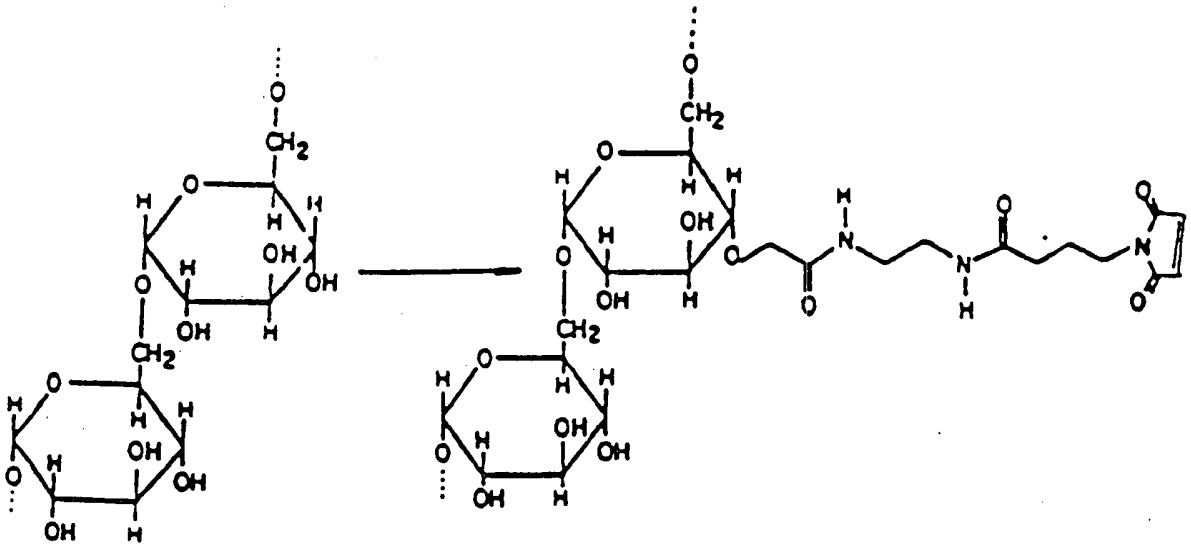
pA_2 hodnoty na potkanej maternici a percentá regenerácie sú stanovené pre tento BSH dimér a porovnané s CP-0088 a CP-0127. Výsledky sú uvedené ďalej v tabuľke F a je treba uviesť, že zlepšené pA_2 výsledky a percentá regenerácie boli dosiahnuté pre oba diméry v porovnaní s ich zodpovedajúcimi referenčnými monomérmi:

Tabuľka F

Zlúčenina	Potkania maternica pA_2	% regen.
CP-0088 $DArg^0$-Arg^1-Pro^2-Hyp^3-Gly^4-Phe^5- Ser^6-$DPhe^7$-Leu-Arg	7.4	100
CP-0127 BSH(Cys^6)dimér CP-0088	8.8	50
CP-0181 $DArg^0$-Arg^1-Pro^2-Hyp^3-Gly^4-Phe^3- Ser^4-$DPhe^7$-Phe^8-Arg^9	7.9	100
CP-0215 BSH(Cys^6)dimér CP-0181	8.2	40

Vyššie uvedené výsledky (príklady 3-9) ukazujú, že diméry sú účinnejšie ako pôvodný alebo modifikovaný antagonista a že triméry, i keď sú lepšie ako monomér, nevykazujú voči dimérom zlepšenie. Takto sa očakáva, že najlepšie výsledky sa dosiahnu za použitia reaktívnych bismaleimido skupín, ktoré sú samotné výhodne spojené jednoduchým rozvetveným uhľovodíkom reťazcom, ako peptidovou spájajúcou skupinou. Zavedenie dvoch nových chirálnych centier s nasledujúcim prídavkom peptidu poskytuje opticky rozdielne zlúčeniny (t.j. diasteroméry), ktoré sa nejavia ako nežiaducim spôsobom ovlyvňujúce antagonistickú aktivitu.

Z predchádzajúceho je zrejmé, že rôzne modifikácie môžu byť vyhotovené bez vybočenia z myšlienky a rozsahu vynálezu. Napríklad, ak sa BK antagonista označený ako CP-0088 modifikuje zavedením Cys do rôznych polôh pri príprave uvedených dimérov, môže byť použitý akýkoľvek pôvodný antagonista pre tvorbu vhodných dimérov alebo podobne, bez akejkoľvek modifikácie alebo s rôznym typom modifikácie. Ako bolo uvedené prv, môže sa tiež meniť linker použitý na tvorbu zlúčenín podľa vynálezu. Kvôli ďalšej ilustrácii tohto aspektu vynálezu sa uvádza, že linker môže obsahovať dextrán, ktorý môže byť modifikovaný náhodne pozdĺž dĺžky dextranovej molekuly tak, že vykazuje reaktívne maleimidové zvyšky, ako je uvedené ďalej:



dextrán

maleimidom modifikovaný dextrán

Výsledný maleimidom substituovaný dextrán potom môže reagovať s peptidom, obsahujúcim voľnú tiolovú skupinu, spôsobom analogickým vyššie popísanému pri zmenách molárnych pomerov za vzniku konjugátov peptid - dextrán s rôznymi hustotami substitúcie a celkovou veľkosťou.

Ako bolo uvedené skôr, dôležitým aspektom vynálezu je poskytnutie heterodimérov alebo vyšších hetero-"mérov", kde sa použijú rôzne BKA pre poskytnutie zlúčenín vzorca I. Toto "hetero" vyhotovenie umožňuje tvoriť diméry, napríklad, ktoré sú účinné voči dvom alebo viac rôznym bradykinínovým receptorom, napr. BK_1 a BK_2 receptorom. Tieto dva receptory sa javia ako najhojnejšie a zrejme majú najväčšiu distribúciu v rôznych tkanivách. Všeobecne BK_1 receptorové ligandy (ako agonisty tak antagonisty) sú tvorené, ak sa C-zakončujúci arginín odstráni zo zodpovedajúceho BK_2 receptorového ligandu buď cirkuláciou alebo karboxypeptidázami spojenými s tkanivami.

Príklady tejto konverzie z BK_2 na BK_1 selektivitu sú zrejmé z konverzie bradykinínu na des-Arg^9-BK a kalidínu na des-$Arg^9$0-kalidín. Toto potvrdzuje, že by bolo výhodné pre BK antagonistov všeobecne, aby obsahovali ako BK_1, tak BK_2 receptorovú antagonistickú aktivitu. Na druhej strane môže dôjsť k situáciám, kde antagonista by mal byť selektívne účinný proti BK_1 alebo BK_2 receptorom samotným.

Distribúcia a relatívna dôležitosť týchto dvoch receptorových systémov mení tkanivo od tkaniva a druh od druhu. Ďalej môžu rôzne patofyziologické procesy meniť distribúciu a dôležitosť týchto dvoch receptorových systémov v priebehu času u toho istého zvieraťa. Inými slovami, receptorová distribúcia u naivného zvieraťa sa môže výrazne líšiť od receptorovej distribúcie u toho istého zvieraťa po patofyziologickom procese (napríklad sepsii), počas určitej doby (viď Marceua F. a spol., v "Pharmacology of Kinins: Their Relevance to Tissue Injury and Inflammation", General Pharmacology, 14, str. 209-229). Výsledkom

je, že je ťažké zistiť, aký typ antagonistu je najvhodnejší pre akúkoľvek danú aplikáciu a uskutočnenie in vivo konverzie BK_2 antagonistu na BK_1 antagonistu nemôže byť uskutočniteľné za určitých okolností. Poskytnutie heterodimérov podľa vynálezu ponúka možnosť uplatnenia v takých situáciách, kde napríklad sú zahrnuté ako BK_1 tak BK_2 receptory.

Príklady heterodimérov podľa vynálezu, založené na uvedených BK_1 a BK_2 antagonistických monoméroch sú uvedené ďalej:

BK_2 antagonist. monoméry

CP-0126: DARG-ARG-PRO-HYP-GLY-PHE-CYS-DPHE-LEU-ARG
|
SH

CP-0185: DARG-ARG-PRO-HYP-GLY-PHE-CYS-D(Tic)-Oic-ARG
|
SH

BK_1 antagonist. monoméry

CP-0254: DARG-ARG-PRO-HYP-GLY-PHE-CYS-DPHE-LEU
|
SH

CP-0268: DARG-ARG-PRO-HYP-GLY-PHE-CYS-D(Tic)-Oic
|
SH

$\underline{BK_1/BK_2}$antagonist. BSH heterodiméry

CP-0273: DARG-ARG-PRO-HYP-GLY-PHE-CYS-DPHE-LEU
|
(BSH)
|
DARG-ARG-PRO-HYP-GLY-PHE-CYS-DPHE-LEU-ARG

CP-0272: DARG-ARG-PRO-HYP-GLY-PHE-CYS-DPHE-LEU
|
(BSH)
|
DARG-ARG-PRO-HYP-GLY-PHE-CYS-D(Tic)-Oic-ARG

CP-0290: DARG-ARG-PRO-HYP-GLY-PHE-CYS-D(Tic)-Oic
|
(BSH)
|
DARG-ARG-PRO-HYP-GLY-PHE-CYS-DPHE-LEU-ARG

CP-0291: DARG-ARG-PRO-HYP-GLY-PHE-CYS-D(Tic)-Oic
|
(BSH)
|
DARG-ARG-PRO-HYP-GLY-PHE-CYS-D(Tic)-Oic-ARG

Pri použití týchto heterodimérov je možné pre každú "stranu" diméru, že pôsobí na svoj prípadný receptor, t.j. BK_1, antagonistická strana bude blokovať BK_1 receptory a BK_2 antagonista bude blokovať BK_2 receptory. Toto je ilustrované nasledovne.

Príklad 10

Niektoré heterodiméry boli hodnotené na svoju antagonistickú účinnosť voči BK v potkanej maternici (BK_2-receptor) alebo voči des-Arg^9-BK (BK_1-receptorový selektívny agonista) na králičej aorte (BK_1-receptor) in vitro. Účinnosť v potkanej maternici bola hodnotená ako je popísané vyššie a boli stanovené hodnoty pA_2. Tieto sú uvedené v tabuľke G.

Účinnosť v králičej aorte bola skúšaná nasledujúcim spôsobom: Krivky vplyvu koncentrácie boli konštruované pre des-Arg^9-BK 1 hodinu a 3 hodiny po podaní prípravkov. Po 5 hodinách bola pridaná jedna koncentrácia (10^{-7}M) des-Arg^9-BK pre vznik udržiavanej kontrakcie. Potom bol pridaný každý antagonista, kumulatívnym spôsobom, na vrchol kontrakcie a bol meraný negatívny logaritmus molárnej koncentrácie antagonistu, vyvolávajúcej 50 % reverziu (IC_{50}) koncentrácie. Výsledky sú uvedené v tabuľke G.

Tabuľka G

BK_1An/BK_2An monoméry, homodiméry a heterodiméry

Zlúčenina č.	BK_2 potkania maternica pA_2	BK_1 králičia aorta IC_{50}
	Monoméry	
CP-0126	7.1 ± 0.1	Inakt.
CP-0185	10.7 ± 0.9	4.1 ± 0.2
CP-0254	Inakt.	6.4 ± 0.1
CP-0268	6.0	6.3 ± 0.1
	Diméry	
CP-0127	8.5 ± 0.2	Inakt.
CP-0273	8.2 ± 0.1	5.7 ± 0.1
CP-0272	8.1 ± 0.2	5.9 ± 0.1
CP-0291	8.0 ± 0.2	6.2 ± 0.1

Z údajov v tabuľke G je zrejmé, že každá časť heterodiméru môže pôsobiť nezávisle na iných na svoj zodpovedajúci receptor. Je tak vhodný na liečenie chorôb, v ktorých hrajú úlohu ako BK_1, tak BK_2 receptory.

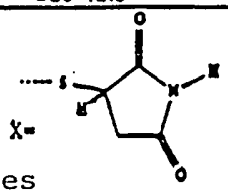
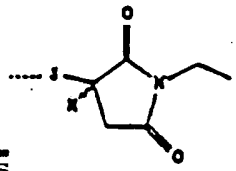
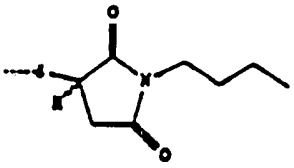
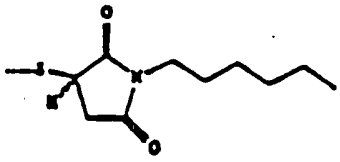
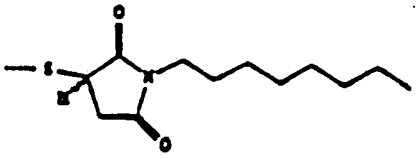
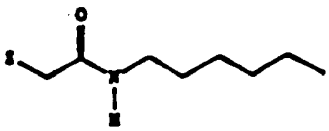
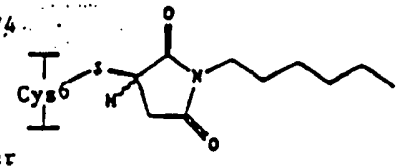
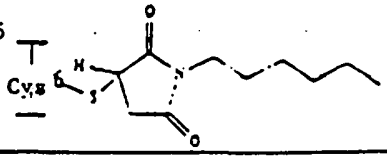
Údaje v tabuľke G tiež ukazujú, že keď sú syntetizované BK_1/BK_2 antagonistické heterodiméry, výsledná aktivita každého zo susediacich ligandov sa líši od aktivity buď homodimérov alebo uvedených monomérov. To znamená, že aspoň časť zlepšenia aktivity dimérov (homo- alebo hetero-) môže byť prirátaná spájajúcemu prvku a že hodnotenie optimálnej linkerovej polohy a chémie môže byť skúmané pre každý z geminálnych ligandov nezávisle syntézou a testovaním linker modifikujúcich monomérov. Príklady vyrobených zlúčenín a ich testov sú popísané ďalej v príklade 11.

Príklad 11

Štúdie linkerovej chémie za použitia modifikovaných monomérov:

Pre optimalizáciu linkerovej chémie pred syntézou požadovaného homo- alebo heterodiméru je výhodné preskúmať sériu linkerov za použitia jedného referenčného ligandu bez prípravy čistých dimérnych zlúčenín. Ako je ilustrované ďalej (tabuľka H), je séria modifikovaných BK_2 antagonistických monomérov vytvorená z referenčného ligandu CP-0126 a rôznych modifikátorov, slúžiacich na priblíženie sa chémii jedného z geminálnych ligandov plus linkera pre použitie v homo- alebo heterodimérnych konštrukciách. V tejto sérii sú zahrnuté rôzne mono-maleimidoalkánmi modifikované zlúčeniny, ktoré môžu byť porovnávané so svojimi zodpovedajúcimi homodimérmi popísanými vyššie.

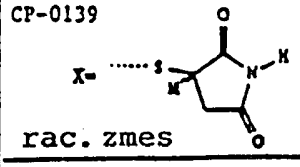
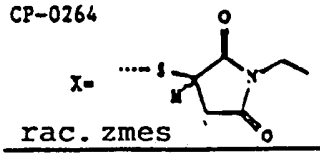
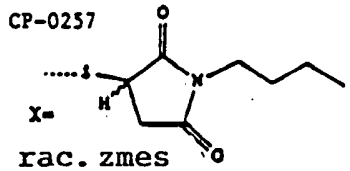
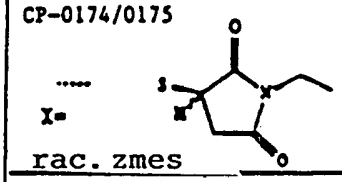
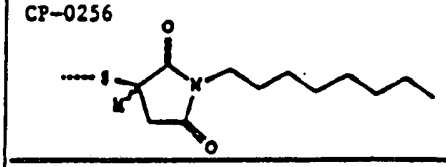
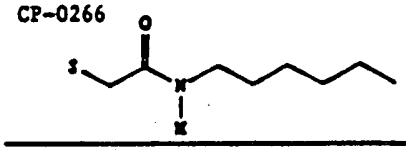
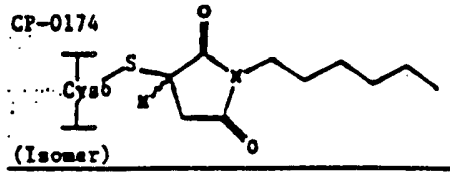
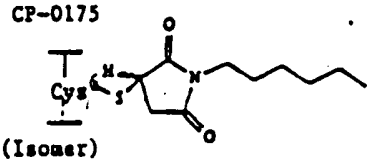
Tabuľka H

Zlúč. čís.	štruktúra	potkania mat. pA_2	% reg.
CP-0126	DARG-ARG-PRO-HYP-GLY-PHE-CYS-PHE-X-SH LEU-ARG	7.1	100
CP-0139	 X= rac. zmes	7.9	100
CP-0264	 X= rac. zmes	7.5	100
CP-0257	 X= rac. zmes	8.4	80
CP-0174/0175	 X= rac. zmes	8.8	50
CP-0256		9.2	0
CP-0266		8.2	70
CP-0174	 Isomer	8.4	50
CP-0175	 Isomer	8.5	30

Modifikované monoméry uvedené v tabuľke H zahrňujú S-(N-alkylsukcinimido)-L-cysteínové deriváty CP-0126 a boli pripravené nasledovne:

K zmesi CP-0126 (1 ekv.) a N-alkylmaleimidu (1,5 ekv.) v DMF (asi 21 ml na mmol peptidu) bolo pridaných 10 objemov PBS (pH 7,5). Reakčná zmes bola miešaná cez noc pri teplote miestnosti (sledované periodicky analýzou pomocou HPLC s reverznou fázou) a výsledný S-(N-alkylsukcinimido)-modifikovaný peptid bol čistený preparatívnou HPLC s reverznou fázou. Lyofilizáciou bol potom získaný čistý peptid v 60 až 80 % výťažku ako páperovitá, biela pevná látka. Deriváty CP-0126 pripravené týmto všeobecným postupom zahrňujú: CP-0139, 264, 257, 174, 175, 256 a 266. Charakterizácia (hmotovo spektrálna) je pre tieto peptidy uvedená v tabuľke I.

Tabuľka I Hmotovospektrálne charakteristiky cysteínom modifikovaných derivátov CP-0126

Zlúč. čís.	štruktúra	vyp. hm.	m/e hodnota
CP-0126	D-ARG-ARG-PRO-HYP-GLY-PHE-CYS-D-PHE-LEU-ARG	1264	NT[b]
CP-0139	 rac. zmes	1361	1361
CP-0264	 rac. zmes	1389	1389
CP-0257	 rac. zmes	1417	1417
CP-0174/0175	 rac. zmes	1445	NT[b]
CP-0256		1473	1473
CP-0266		1420	1420
CP-0174	 (Isomer)	1445	1445
CP-0175	 (Isomer)	1445	1445

[a] elektrorozprašovací alebo plazmový popis hm. spektra

[b] netestované

Údaje v tabuľke H znamenajú, že všeobecne pA_2 daného monoméru sa zvyšuje so zväčšovaním dĺžky alkylového reťazca a je dobre v súlade s pA_2 jeho zodpovedajúceho homodiméru. Údaje tiež ukazujú, že S-(N-alkylsukcinimido)-cysteín-modifikované monoméry sú účinnejšie ako S-(N-hexylacetamido)-cysteínom modifikovaný monomér. Ďalej výsledky ukazujú, že racemické zmesi, ako i individuálne optické izoméry sú oba funkčne vhodné s možnosťou, že racemické zmesi môžu byť výhodné z hľadiska možnosti heterogenity receptorovej interakcie.

I keď údaje v tabuľke H indikujú, že i keď sú modifikované monoméry samotné účinné a vhodné na použitie podľa vynálezu, je zvyčajne výhodne použitie dimérov alebo vyšších "mérov" (homo- alebo hetero-), pretože tieto druhé zlúčeniny, všeobecne povedané, vykazujú i vyšší stupeň aktivity proti nemodifikovanému peptidovému monoméru ako zodpovedajúci linkerom modifikovaný monomér. Je treba uviesť, že heterodiméry schopné interakcie s rôznymi typmi receptorov sa budú kategoricky líšiť v aktivite a použiteľnosti ako akýkoľvek daný modifikovaný monomér.

Práve tak, ako je možno účinnejšie hodnotiť linkerovú chémiu vhodnú pre zahrnutie v požadovanej homo- a heterodimérnej konštrukcii za pomoci jediného referenčného ligandu a série rôznych modifikátorov, je tiež možno skúšať série potenciálne žiaducich geminálnych ligandov s obmedzeným počtom reprezentatívnych modifikátorov na účely najúčinnejšej optimalizácie homo- a heterodimérnych konštrukcií. Jedna z takýchto sérií modifikovaných BK_1 antagonistických monomérov je uvedená v príklade 12 s výsledkami, ktoré boli dosiahnuté, uvedenými v grafickej forme na obr. 7.

Príklad 12

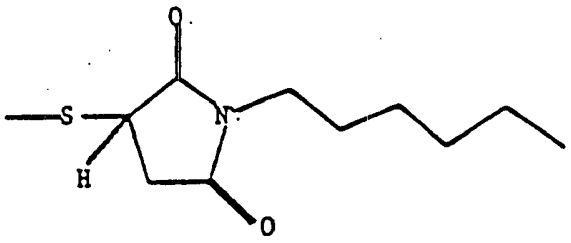
Tento príklad ilustruje prípravu S-(N-hexylsukcín-imido)-L-cysteínových analógov CP-0298, kde je S-(N-hexylsukcinimido) skupina posunovaná pozdĺž peptidového reťazca zmenou polohy Cys od 0 do 8.

K zmesi Cys- obsahujúceho BK_1 peptidového antagonista (1 ekv.) a N-hexylmaleimidu (1,5 ekv.) v DMF (asi 21 ml na mmol peptidu) sa pridá 10 objemov 0,1M hydrogénuhličitanu amonného (pH 8). Reakčná zmes sa cez noc mieša pri teplote miestnosti (monitorované periodicky pomocou analýzy HPLC s reverznou fázou) a výsledný S-(N-hexylsukcínimido)-L-cysteínový analóg CP-0298 sa čistí preparatívnou HPLC s reverznou fázou. Lyofilizáciou sa potom získa čistý peptid v 60 - 80 % výťažku ako páperovitá, biela pevná látka. Analógy CP-0298 pripravené týmto všeobecným postupom zahrňujú CP-0311, 322, 324, 326, 328, 307, 305, 309 a 313. Charakteristiky (hmotové spektrum) týchto peptidov sú uvedené v tabuľke J.

Tabuľka J Hmotospektrálne charakteristiky S-(N-hexylsukcinimido[a])
-L-cysteínových analógov CP-0298

Zlúčenina č.	Štruktúra	Vyp. MH	Hodnota m/s[b]
CP-0298	Lys^{a}-Arg^{1}-Pro^{2}-Pro^{3}-Gly^{4}-Phe^{5} -Ser^{4}-Pro^{7}-Leu^{8}	978	978
CP-0311	Cys^{0}-S-(N-hexylsukcinimido-CP-0298	1154	1154
CP-0322	Cys^{1}-S-(N-hexylsukcinimido-CP-0298	1126	1126
CP-0324	Cys^{2}-S-(N-hexylsukcinimido-CP-0298	1185	1185
CP-0326	Cys^{3}-S-(N-hexylsukcinimido-CP-0298	1185	1185
CP-0328	Cys^{4}-S-(N-hexylsukcinimido-CP-0298	1225	1225
CP-0307	Cys^{5}-S-(N-hexylsukcinimido-CP-0298	1134	1134
CP-0305	Cys^{6}-S-(N-hexylsukcinimido-CP-0298	1193	1194
CP-0309	Cys^{7}-S-(N-hexylsukcinimido-CP-0298	1185	1185
CP-0313	Cys^{8}-S-(N-hexylsukcinimido-CP-0298	1169	1169

[a] S-(N-hexylsukcinimido) =



[b] elektrorozprašovanie pri získaní hmotového spektra

Účinnosť GP-0298 ako referenčného ligandu a jeho analógov uvedených v tabuľke J boli porovnávané in vitro v skúške na králičej aorte a výsledky sú graficky znázornené na obr. 7.

Veľa dôležitých hodnôt môže byť získaných z údajov poskytnutých príkladmi 11 a 12, včítane skutočnosti, že použitím modifikovaného monoméru môže byť rýchlo získaná dôležitá informácia vzhľadom k ako preferovanému typu chémie spojenia, tak k výhodnej polohe, z ktorej sa tvorí požadovaný homo- alebo heterodimér. Rovnako ako v prípade BK_2 sérií, je tu výrazný vplyv linker/modifikovanej polohy na aktivitu výslednej BK_1 zlúčeniny. Vzťah polohy modifikátora a aktivity pre sériu BK_1 antagonistov zlúčenín, uvedený na obr. 7, je výrazne odlišný od vzťahu poloha linkeru - aktivita, nájdeného pre BK_2 antagonistickú sériu homodimérov. Toto je najzreteľnejšie pri porovnávaní účinku modifikácie alebo spojenia zodpovedajúceho referenčného ligandu v polohe "6". V BK_2 antagonistickom homodimére a modifikovanej monomérnej sérii zlúčenín bola táto poloha považovaná ako výhodná poloha ako pre zvýšenie aktivity, tak pre zlepšenie doby trvania výsledných zlúčenín. V BK_1 sériách ničmenej je homológna poloha v skutočnosti jednou z najpreferovanejších polôh, pri ktorej vznikajú podobné modifikácie.

Príklad 13

BK_2 antagonistické/BK_1 antagonistické heterodiméry (BK_2 An/BK_1An)

Tento príklad popisuje sériu BK_2 An/BK_1An heterodimérov, ktoré boli syntetizované a testované na základe vzťahov štruktúry a aktivity popísaných v príklade 12. Tabuľka K predstavuje zoznam reprezentatívnych monomérov použitých v týchto štúdiách, ich štruktúr a ich účinností meraných skúškou na králičej aorte pre BK_1 receptorom sprostredkovanú aktivitu. Tabuľka L je tabeláciou reprezentatívnych BK_2 An/BK_1An heterodimérov odvodených od týchto monomérov, ilustrujúca schopnosť pripraviť účinné, duálne

pôsobiace aktívne zlúčeniny, na báze princípov popísaných v predchádzajúcom príklade.

Tabuľka K BK_1 receptorové antagonistické monoméry

Zlúčenina č.	Štruktúrna poloha 0--1--2--3--4--5--6--7--8--9	BK_2 (potkaní uterus) pA^2	BK_1 (králičia aorta) IC_{50}
CP-0298	K--R--P--P--G---F---S---P--L	inaktívny	7.9 ± 0.1
CP-0253	DR--R--P--J--G--F--S--DF--L	inaktívny	6.9 ± 0.1
CP-0254	DR--R--P--J--G--F--C--DF--L	inaktívny	6.4 ± 0.1
CP-0267	DR--R--P--J--G--F--S--DTic-Oic	5.7 ± 0.1	7.5 ± 0.2
CP-0345	DR--R--P--J--G-Thi-S--DTic-Oic	7.6 ± 0.4	7.1 ± 0.1
CP-0362	DR--C--P--J--G--F--S--P--L	inaktívny	6.0 ± 0.2
CP-0363	DR--C--P--J--G--F--S-DTic-Oic	inaktívny	6.2 ± 0.3
CP-0374	K--C--P--J--G--F--S--P--L	inaktívny	6.5 ± 0.3
CP-0375	K--C--P--P--G--Thi--S--P--L	inaktívny	6.5 ± 0.3
CP-0376	DR--C--P--J--G--F--S--DF--L	inaktívny	4.9 ± 0.3
CP-0388	DR--K--P--J--G--F--S--P--L	inaktívny	6.5 ± 0.1

Cys-(bis-sukcinimidohexán)-Cys BK_2/BK_1 antagonistické heterodiméry uvedené v tabuľke L boli pripravené nasledujúcim spôsobom:

K zmesi CP-0126 (1 ekv.) a bismaleimidohexánu (BMH, 2 ekv.) v DMF (asi 21 ml na mmol peptidu) bolo pridaných 10 objemov 0,1M hydrogénuhličitanu amonného (pH 8). Reakčná zmes bola miešaná pri teplote miestnosti asi 1 hodinu (sledované periodicky analýzou HPLC s reverznou fázou) a výsledný S-(N-hexylmaleimido)sukcinimidoderivát CP-0126 bol čistený preparatívnou HPLC s reverznou fázou. Výsledný peptid izolovaný v asi 70 % výťažku po lyofilizácii bol potom spojený s Cys-obsahujúcim BK_1 peptidovým antagonistom (1,5 ekv.) v DMF (rovnako ml/mmol ako je uvedené vyššie). 10 objemov 0,1M hydrogénuhličitanu amonného (pH 8) bolo pridaných a dimerizácia prebiehala asi 1 hodinu pri teplote miestnosti. Výsledný Cys (bissukcinimidohexán)-Cys-peptidový dimér bol čistený preparatívnou HPLC s reverznou fázou a fyofilizáciou poskytol

bielu, perovitú pevnú látku. Výťažky sa pohybujú v rozmedzí 40 až 50 %. heterodiméry pripravené týmto všeobecným postupom zahrňujú: CP-0273, 364, 365, 386, 382 a 383, ako je uvedené v tabuľke L.

Tabuľka L $\underline{BK_1An/BK_2An}$ heterodiméry

Zlúčenina č.	Štruktúra	BK_2 potkaní uterus pA^2	BK_1 králičia aorta IC_{50}
CP-0273	CP-0126-(BSH)[a]-CP-0254	8.2 ± 0.1	5.7 ± 0.1
CP-0364	CP-0126-(BSH)[a]-CP-0362	8.3 ± 0.2	7.5 ± 0.1
CP-0365	CP-0185-(BSH)[a]-CP-0363	8.4 ± 0.1	7.4 ± 0.5
CP-0386	CP-0126-(BSH)[a]-CP-0376	7.6 ± 0.1	7.1 ± 0.2
CP-0389	CP-0126-(ESC)[b]-CP-0388	7.4 ± 0.1	6.5 ± 0.1
CP-0382	CP-0126-(BSH)[a]-CP-0374	Agonista	6.2 ± 0.3
CP-0383	CP-0126-(BSH)[a]-CP-0375	Agonista	7.8 ± 0.1

[a] BSH - bissukcinimidohexán

[b] ESC = epsilon sukcinimido-n-kaproyl

Charakteristika (hmotn. spektrum) peptidov uvedených v tabuľke M.

Tabuľka M Charakterizácia (hmotn. spektrum) BK_2An/BK_1An heterodimérov

Zlúčenina č.	Štruktúra	Vyp. MH	(M+H) hodnota[c]
CP-0273	CP-0126-(BSH)[a]-CP-0254	2647	2648
CP-0364	CP-0126-(BSH)[a]-CP-0362	2529	2530
CP-0365	CP-0185-(BSH)[a]-CP-0363	2681	2682
CP-0386	CP-0126-(BSH)[a]-CP-0376	2579	2580
CP-0389	CP-0126-(ESC)[b]-CP-0388	2470	2471
CP-0382	CP-0126-(BSH)[a]-CP-0374	2502	2503
CP-0383	CP-0126-(BSH)[a]-CP-0375	2492	2493

[a] BSH - bissukcinimidohexán

[b] ESC = epsilon sukcinimido-n-kaproyl

[c] Plazmové desorpčné hmotové spektrum

In vitro screening:

Zlúčeniny CP-0273 a CP-0386 boli vybrané pre porovnávacie účely, pretože tieto heterodiméry používajú rovnaký BK_2 antagonistický ligand (CP-0126) a rovnaký linker (BSH) s dvoma geminálnymi ligandmi (CP-0254 a CP-0376), ktoré sa líšia len v polohe dimerizácie. Prvá zlúčenina je dimerizovaná v polohe "6" oboch reťazcov diméru (najpreferovanejšie a aspoň preferované polohy pre BK_2 a BK_1 antagonistov), zatiaľ čo druhá zlúčenina využíva najpreferovanejšie polohy pre každý z geminálnych ligandov, ako bolo stanovené analýzou modifikovaného monoméru (polohy "6" a "1"). Z údajov v tabuľke L je zrejmé, že účinnosti dvoch zlúčenín vzhľadom k BK_2 receptorovému antagonizmu sú identické v rozsahu experimentálnej chyby skúšobného systému, i keď ich BK_1 antagonistické aktivity sú väčšinou 100 krát rozdielne, podľa ich zodpovedajúcich monomérov.

Je nutné poznamenať, že použitie modifikovaného monoméru ako základného článku aktivity s ohľadom na receptorovú špecifickú

aktivitu heterodiméru má svoje obmedzenia. Tieto obmedzenia ďalej ilustrujú dôležitosť interakcií geminálneho ligandu s ligandom v otázke stanovenia konečnej aktivity dimérnej konštrukcie. Príkladmi dôležitosti tejto interakcie sú zlúčeniny CP-0382 a CP-0383, kde bol BK_1 antagonizmus zachovaný, ale BK_2 aktivita bola zmenená zo striktného antagonizmu na v podstate čiastočný antagonizmus. BK_1 antagonistické ligandy (CP-0374 a CP-0375) pri testovaní ako monoméry nemajú merateľnú aktivitu ani ako agonisty ani ako antagonisty v receptorovom BK_2 systéme potkanej maternice.

a prítomnosti BK_2 antagonistu CP-0088. Obr. 8b ilustruje profily odozvy podobných skupín zvierat za prítomnosti selektívneho BK_1 antagonistu CP-0298. Konečne obr. 8c je profil odozvy skupiny podobne ošetrených zvierat na BK_1 a BK_2 agonistami za neprítomnosti a prítomnosti BK_2An/BK_1An heterodiméru CP-0364. Ako je zrejmé z týchto záznamov, selektívne antagonisty budú len ovplyvňovať odozvy na svojich zodpovedajúcich agonistov, zatiaľ čo dimér (hetero) je schopný blokovať profil odozvy oboch agonistov súčasne. Toto neznamená, že akokoľvek daná heterodimérna molekula pôsobí na receptory dvoch rozdielnych tried súčasne, ale že populácia heterodimérnych molekúl môže antagonizovať obe populácie BK_1 a BK_2 receptorov u rovnakých zvierat v rovnakej dobe. Dáta z reprezentatívnej skupiny monomérov, homodimérov a heterodimérov sú zhrnuté v tabuľke N.

Očakávaná antagonistická aktivita je založená na údajoch zhrnutých v tabuľkách K a L. In vivo experimentálne dáta, ktoré sú uvádzané, sú kvalitatívne merania antagonistickej aktivity pri troch rôznych dávkach (1,3 a 10 $\mu g.kg^{-1}min^{-1}$) u králikov, ktorí dostali subletálnu dávku LPS (10 µg) 20 hodín pred začiatkom pokusu. Symbol "+" označuje úplnú blokádu odozvy krvného tlaku na vhodného agonistu (ako je zrejmé na obr. 8), zatiaľ čo "+/-" indikuje čiastočnú blokádu a "-" označuje nepozorovateľný účinok pri uvedenej dávke. Z týchto dát je zrejmé, že in vitro charakterizácia antagonistickej aktivity týchto zlúčenín je relatívne precíznym meraním ich in vivo aktivity a je to vhodná technika pre screening heterodiméru na jeho požadovanú aktivitu.

Tabuľka N In vivo aktivita rôznych monomérov, homodimérov a heterodimérov

Zlúčenina	Očakávaná antagonistická aktivita	Pozorovaná antagonistická aktivita					
		BK_1			BK_2		
		1	3	10	1	3	10
CP-0088	BK_2	-	-	-	+	+	+
CP-0126	BK_2	-	-	-	+	+	+
CP-0127	BK_2	-	-	-	+	+	+
CP-0184	BK_2	-	-	-	+	+	+
CP-0298	BK_1	+	+	+	-	-	-
CP-0267	BK_1/BK_2	-	-	+	-	-	+/-
CP-0345	BK_1/BK_2	-	+	+	-	+/-	+
CP-0364	BK_1/BK_2	+	+	+	+	+	+
CP-0365	BK_1/BK_2	-	+	+	-	+	+
CP-0386	BK_1/BK_2	+	+	+	+	+	+

Ako bolo uvedené prv, je ďalším vyhotovením vynálezu poskytnutie zlúčenín vzorca III

(Y)(X)(BKA) (III)

kde X a BKA majú prv uvedené významy a Y predstavuje peptidový reťazec, ktorý demonštruje antagonistickú alebo agonistickú aktivitu vzhľadom k ne-BK receptoru, t. j. heterodiméry cielené k BK (napr. BK_2) a nie-BK receptorovú populáciu. Pretože prv bolo uvedené, že BK_1/BK_2 antagonistické heterodiméry podľa vynálezu môžu poskytovať účinnú duálnu aktivitu cielenú k obom typom receptorov, je treba si uvedomiť, že i iné účinné heterodiméry môžu byť pripravené podľa predloženého popisu a poznatkov. Toto je zvlášť dôležité v prípade, že existuje blízky vzťah medzi zahrnutými aktivitami.

Je známe, že mnoho patofyziologicky dôležitých procesov je v blízkej súvislosti so zápalovými a neurogénnymi mediátormi. Toto sa prejavuje napríklad ako v sekundárnej bolesti tkanivovej traumy (acidentálna a postoperačná), tak v astme. V oboch situáciách je tu existujúci komplex súčinnosti tkanivových a plazmových mediátorov (kiníny pôsobiace ako BK_2 receptory) a neuronálnych odvodených faktorov ako je substancia P (NK_1 receptory) a neurokinín A (NK_2 receptory). Konečne sú tu lokálne pôsobiace neuronálne receptory μ-opioidové triedy, ktoré môžu pri stimulácii inhibovať uvoľňovanie neurogénnych peptidov bez ohľadu na typ (substancia P, neurokinín A, neurokinín B, cholecystokinín, GGRP atď.).

Vzhľadom na interakcie týchto ako i iných zápalových a neurogénnych mediátorov nie je žiadne jediné činidlo pravdepodobne univerzálne účinné v zmierňovaní symptómov vedúcich k patofyziológii. Avšak heterodiméry podľa vynálezu by mali byť zvlášť vhodné pre tieto problémy s použitím jednotlivých činidiel, vykazujúcich dvojakú selektivitu. Ďalej sa javí, že heterodiméry podľa vynálezu môžu byť použité na potlačenie množstva takýchto limitujúcich problémov v porovnaní s vývojom

jedinečne selektívnych činidiel. Napríklad ako v prípade BK antagonistov, substancia P a neurokinín A antagonisty ako i μ-opioidové agonistické peptidy všetky trpia zvyčajným problémom rýchlej inaktivácie množstvom spojených tkanív, ako i rozpustnými endo- a exopeptidázami. Predpokladá sa, že predložené heterodiméry znamenajú cestu, v ktorej môže byť zabránené rýchlej inaktivácii bez straty ako účinnosti, tak špecifičnosti, ako bolo zistené u BK_2 homodimérov, ktoré sú tu popísané. Enkefalinové alebo opioidové agonisty majú ďalší problém, tým, že majú značnú možnosť zneužitia alebo vzniku závislosti a kognitívne vedľajšie účinky, ak zasahujú do centrálneho nervového systému. Opäť sa predpokladá, že heterodiméry by mali vykazovať adekvátnu, ak nie neobyčajnú, periférnu aktivitu bez neočakávaných a obmedzujúcich vedľajších účinkov na centrálny nervový systém tým, že μ-opioidový receptorový agonista bude kovalentne pripojený k vysoko katiónovému BK antagonistovi, ktorý neprestupuje krvnú mozgovú bariéru v akomkoľvek výraznom množstve.

Nasledujúce príklady popisujú rôzne heterodiméry vytvorené dimerizáciou referenčného BK_2 ligandu, CP-0126 a rôznymi NK_1 a NK_2 antagonistami, ako i sériou μ-opioidných agonistických peptidov. Ako bude odborníkom zrejmé, skladba, syntéza a použitie takých heterodimérov nie sú žiadnym spôsobom obmedzené na špecifické zlúčeniny ilustrované v tomto popise, ale môžu byť vyhotovené spárovaním akýchkoľvek dvoch z mnohých vhodných ligandov za použitia štandardných chemických reakcií a bez prehnaného experimentovania.

Príklad 14

BK_2antagonistické/NK_1antagonistické heterodiméry (BK_2 An/NK_1 An)

Za účelom ilustrácie potenciálu blokovania dvoch rôznych receptorových populácií jednou zlúčeninou bol skonštruovaný NK_1 receptorový antagonista (DArg-DPro-Lys-Pro-Gln-Asn-DPhe-Phe-DTrp-Leu-Nle). U antagonistu bolo zistené, že má pA_2 pri teste proti

substancii P v skúške na ileu morčiat na NK_1 receptorovú aktivitu. Bola stanovená aktivita tohto referenčného ligandu a bola syntetizovaná séria lyzín obsahujúcich monomérov systematickou náhradou lyzínového zvyšku postupne referenčným peptidom. Tieto zlúčeniny boli potom spojené k CP-0126 za použitia heterobifunkčného spájajúceho činidla: epsilon maleimido-n-kaproyl-N-hydroxysukcinimidoesteru (EMCS), za tvorby radu epsilonsukcinimido-n-kaproyl (ESC) heterodimérov (tabuľka O).

Tabuľka O BK_2 An/NK_1 An heterodiméry

Zlúčenina	Štruktúra	NK_1:GPI pA_2 (±s.e.m.)	BK_2:RU pA_2 (±s.e.m.)
CP-0390	CP-0126-(ESC)[a]-LYS[1][CT-0008][b]	4.8±0.2	7.2±0.2
CP-0391	CP-0126-(ESC)[a]-LYS[2][CT-0008][b]	5.0±0.1	7.1±0.2
CP-0392	CP-0126-(ESC)[a]-LYS[3][CT-0008][b]	5.3±0.1	7.0±0.2
CP-0393	CP-0126-(ESC)[a]-LYS[4][CT-0008][b]	5.5±0.2	7.4±0.1
CP-0394	CP-0126-(ESC)[a]-LYS[5][CT-0008][b]	5.8±0.3	7.9±0.1
CP-0395	CP-0126-(ESC)[a]-LYS[6][CT-0008][b]	6.3±0.1	7.3±0.1
CP-0396	CP-0126-(ESC)[a]-LYS[7][CT-0008][b]	Inakt.	8.0±0.1
CP-0397	CP-0126-(ESC)[a]-LYS[8][CT-0008][b]	Inakt.	7.7±0.2
CP-0398	CP-0126-(ESC)[a]-LYS[9][CT-0008][b]	Inakt.	6.4±0.2
CP-0399	CP-0126-(ESC)[a]-LYS[10][CT-0008][b]	4.9±0.2	7.4±0.1
CP-0400	CP-0126-(ESC)[a]-LYS[11][CT-0008][b]	Inakt.	7.6±0.3

[a] ESC = epsilon sukcinimido-n-kaproyl

[b] CT-0008 - D-Arg-D-Pro-Lys-Pro-Gln-Asn-D-Phe-Phe-D-Trp-Leu-Nle-$CONH_2$

Cys-(epsilon sukcinimido-n-kaproyl)-Lys- BK_2 An/NK_1 An heterodiméry uvedené v tabuľke O boli pripravené nasledovne:

Na prípravu L-Lys (FMOC) - obsahujúci NK_1 peptidový antagonista- živica (MBHA, 0,5 mmol peptidu) bolo pridaných 50 % v DMF (asi 20 ml). Výsledná zmes bola šetrne prebublávaná dusíkom (g) 20 minút na dosiahnutie úplného odstránenia (Lys) FMOC chrániacej skupiny a potom bola živica s peptidom dobre premytá DMF. Živica s peptidom bola resuspendovaná v DMF a bolo pridaných 1,5 ekv. EMCS (N-hydroxysukcinimidoester epsilon maleimido-n-kaprovej kyseliny). Acylačná reakcia prebiehala pri teplote miestnosti 2 - 3 hodiny (overenie úplnej acylácie bolo urobené Kaiserovým testom) a potom bola peptid - živica dobre premytá DMF, potom 10 % (obj./obj.) NH_4HCO_3/DMF v koncentrácii: 0,1 pH 8). K živici, obsahujúcej peptid, obsahujúci maleimidoskupinu, bol pridaný CP-0126, 3 ekv. v 10 % (obj./obj.) NH_4HCO_3/DMF a nasledujúca adícia konjugátu (1,4 - adícia) prebiehala pri teplote miestnosti niekoľko hodín. Peptid-živica potom boli premyté (postupne) dobre 10 % NH_4HCO_3/DMF, DMF a dichlórmetánom. Po usušení vo vákuu bol heterodimér zbavený chrániacich skupín (odštiepený zo systému peptid-živica bezvodým HF pri 0 °C) a potom bol purifikovaný preparatívnou HPLC s reverznou fázou. Lyofilizáciou bol získaný čistý peptid v 50 - 60 % výťažku ako páperovitá, biela pevná látka. Heterodiméry pripravené týmto všeobecným postupom zahrňujú: CP-0390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399 a 400. Charakterizácia (hmotové spektrá) pre tieto údaje sú uvedené v tabuľke P.

Tabuľka P Hmotové spektrálne charakteristiky BK_2An/NK_1 An heterodimérov

Zlúčenina č.	Štruktúra	Vyp. MH	(M+H) hodnota[c]
CP-0390	CP-0126-(ESC)[a]-Lys^1[CP-0008][b]	2874	2875
CP-0391	CP-0126-(ESC)[a]-Lys^2[CP-0008][b]	2933	2934
CP-0392	CP-0126-(ESC)[a]-Lys^3[CP-0008][b]	2903	2904
CP-0393	CP-0126-(ESC)[a]-Lys^4[CP-0008][b]	2933	2934
CP-0394	CP-0126-(ESC)[a]-Lys^5[CP-0008][b]	2902	2903
CP-0395	CP-0126-(ESC)[a]-Lys^6[CP-0008][b]	2916	2917
CP-0396	CP-0126-(ESC)[a]-Lys^7[CP-0008][b]	2883	2884
CP-0397	CP-0126-(ESC)[a]-Lys^8[CP-0008][b]	2883	2884
CP-0398	CP-0126-(ESC)[a]-Lys^9[CP-0008][b]	2844	2845
CP-0399	CP-0126-(ESC)[a]-Lys^{10}[CP-0008][b]	2918	2919
CP-0400	CP-0126-(ESC)[a]-Lys^{11}[CP-0008][b]	2918	NT

[a] ESC = epsilon sukcinimido-n-kaproyl

[b] CT-0008 - D-Arg-D-Pro-Lys-Pro-Gln-AsnD-Phe-D-Trp-Leu-Nle-$CPNH_2$

[c] Získaná plazma desorpčné hmotové spektrum

[d] NT - netestované

V súvislosti s vyššie uvedeným je treba uviesť, že maleimido-obsahujúci NK_1 peptidový antagonista môže byť štiepený z peptid-živice, čistený a potom kondenzovaný s CP-0126 v roztoku, ak je to nevyhnutné alebo žiaduce.

Je tiež dôležité poznamenať, že pre túto sériu zlúčenín môže byť použitá rozdielna stratégia spojenia za účelom zdôraznenia, že chémia založená na cysteíne nie je nevyhnutná pre vyhotovenie vynálezu a pre ilustráciu rozsahu potenciálnych chemických reakcií, ktoré môžu byť použité na tvorbu dimérnych štruktúr. Ako je zrejmé z predložených údajov, sú heterodiméry schopné antagonizovať ako BK_2, tak NK_1 receptorovú aktivitu, zatiaľ čo si udržiavajú alebo zlepšujú aktivitu vodného geminálneho ligandu pre špecifický receptor možným použitím takéhoto typu stratégie syntézy. V tomto príklade sa javia polohy 4, 5 a 6 v NK_1 antagonistickom geminálnom ligande ako optimálne pre zachovanie alebo zlepšenie ako NK_1 antagonistu, tak BK_2 antagonistu, pokiaľ ide o ich aktivitu. Cys/cys heterodiméry tohto typu sú tiež možné a môžu byť i v určitých aplikáciách preferované.

Príklad 15

BK_2 antagonista/NK_2 antagonistické heterodiméry (BK_2 An/NK_2 An)

Pre účely ilustrácie a ďalšieho doloženia, že BK_2 An-heterodiméry sú schopné účinne blokovať dve rôzne receptorové populácie, boli pripravené série BK_2 An/NK_2 An heterodimérov spôsobom popísaným vyššie pre heterodimérne štruktúry. V tomto prípade bola použitá Cys/Cys spájajúca stratégia, ale predpokladá sa, že Cys/Lys alebo alternatívna stratégia by mohli byť použité tiež ľahko.

Cys-(bissukcinimidohexán)-Cys BK_2/NK_2 antagonistické heterodiméry uvedeného ligandu CT-0022 (Asp-Tyr-dTrp-Val-DTrp-Arg-$CONH_2$ boli pripravené nasledovne:

K zmesi Cys-obsahujúceho BK_2 peptidového antagonistu (1 ekv.) a bismaleimidohexánu (BMH, 2 ekv.) v DMF (asi 21 ml na mól peptidu) sa pridá 10 objemov 0,1M NH_4HCO_3 (pH 8). Reakčná zmes sa mieša pri teplote miestnosti niekoľko hodín (sleduje sa občas analýzou za pomoci HPLC s reverznou fázou) a výsledný S-(N-hexylmaleimido)sukcinimido derivát BK_2 antagonistu sa čistí preparatívnou HPLC s reverznou fázou. Výsledný peptid, izolovaný v približne 70 % výťažku po lyofilizácii sa potom spojí s CP-0126 (1,5 ekv.) v DMF (rovnako ml/mmol ako je uvedené vyššie). Pridá sa desať objemov NH_4HCO_3 (pH 8) a dimerizácia prebieha niekoľko hodín pri teplote miestnosti. Výsledný Cys-(bissukcinimidohexán)- Cys peptidový dimér bol čistený preparatívnou HPLC s reverznou fázou a lyofilizáciou bola získaná biela, páperovitá látka. Všetky výsledky boli v rozmedzí 40- 50 %. Heterodiméry pripravené týmto všeobecným postupom zahrňujú: CP-0411, 412, 413, 414, 415, 416 a 417. Charakterizácia (hmotové spektrum) týchto peptidov sú uvedené v tabuľke Q.

Tabuľka Q Hmotové spektrálne charakteristiky BK_2An/NK_2 An heterodimérov

Zlúčenina č.	Štruktúra	Vyp. MH	(M+H) hodnota[c]
CP-0411	CP-0126-(BSH)[a]-Cys[1][CP-0022][b]	2639	2640
CP-0412	CP-0126-(BSH)[a]-Cys[2][CP-0022][b]	2591	2592
CP-0413	CP-0126-(BSH)[a]-Cys[3][CP-0022][b]	2568	2569
CP-0414	CP-0126-(BSH)[a]-Cys[4][CP-0022][b]	2655	2656
CP-0415	CP-0126-(BSH)[a]-Cys[5][CP-0022][b]	2568	2569
CP-0416	CP-0126-(BSH)[a]-Cys[6][CP-0022][b]	2568	2569
CP-0417	CP-0126-(BSH)[a]-Cys[7][CP-0022][b]	2598	2598

[a] BSH = bissukcinimidohexán

[b] CT-0022 - Asp-Tyr-D-Trp-Val-D-Trp-D-Trp-Arg-$CONH_2$

[c] Plazmovou desorpciou získané hmotové spektrum

Heterodiméry takto získané boli testované na aktivitu ako bolo už popísané a výsledky sú uvedené v tabuľke R. V tejto tabuľke -log(M) predstavuje záporný log molárnu koncentráciu antagonistu nevyhnutnú na zníženie trvalej kontrakčnej odozvy získanej neurokinínom A na 50 %.

Tabuľka R $\underline{BK_2An/NK_2An}$ heterodiméry

Zlúčenina	Štruktúra	BK_2 potkaní uterus pA^2	BK_1 králičia aorta IC_{50}
CP-0411	CP-0126-(BSH)[a]-Cys[1][CT-0022][b]	7.5 ± 0.1	5.5 ± 0.3
CP-0412	CP-0126-(BSH)[a]-Cys[2][CT-0022][b]	7.9 ± 0.1	Inakt.
CP-0413	CP-0185-(BSH)[a]-Cys[3][CT-0022][b]	8.5 ± 0.3	Inakt.
CP-0414	CP-0126-(BSH)[a]-Cys[4][CT-0022][b]	7.8 ± 0.1	5.2 ± 0.2
CP-0415	CP-0126-(ESC)[b]-Cys[5][CT-0022][b]	7.8 ± 0.1	5.2 ± 0.1
CP-0416	CP-0126-(BSH)[a]-Cys[6][CT-0022][b]	8.7 ± 0.2	5.6 ± 0.2
CP-0417	CP-0126-(BSH)[a]-Cys[7][CT-0022][b]	8.0 ± 0.2	5.6 ± 0.1

[a] BSH - bissukcinimidohexán

[b] CT-0022 = Asp-Tyr-D-Trp-Val-Trp-D-Trp-Arg-$CONH_2$

Údaje uvedené v tabuľke R zreteľne ukazujú, ako v prípade BK_2 An/BK_1 An a BK_2 An/NK_1 An heterodimérov, sú možné vhodné BK_2 An/NK_2 An heterodiméry. Vzhľadom k týmto výsledkom a skôr uvedeným poznatkom je zrejmé, že iné typy heterodimérov vzorca III môžu byť pripravené, kde ligandy použité pre tri série heterodimérnych antagonistov, ktoré sú tu ilustrované, sú reprezentantmi antagonistov uvedených v literatúre.

Príklad 16

Tento príklad ilustruje prípravu BK_2 antagonistu/μ-opioidový receptor agonistických heterodimérov (BK_2 An/μAg). Pretože je z vyššie uvedeného zrejmé, že antagonista/antagonista heterodiméry sú schopné interakcie so svojimi prípadnými receptorovými populáciami, heterodiméry antagonista/antagonista môžu byť tiež pripravené, ktoré sú schopné interakcie so svojimi prípadnými receptormi.

Pre ilustráciu tohto hľadiska vynálezu boli pripravené série monomérnych μ-opioidových receptorových agonistov, v ktorých karboxylový terminálny zvyšok cysteínu bol pridaný k známemu inhibičnému peptidu. Tieto nové antagonisty boli potom spojené s CP-0126 so sériami bismaleimidoalkánových linkerov a testované štandardnou skúškou na μ-opioidovú receptorovú aktivitu, ako i v štandardnom BK_2 skúšobnom systéme použitom pre skôr zmienené heterodiméry.

Cys-(bissukcinimidoalkán)-Cys BK_2 antagonistické μ-opioidné receptorantagonistické heterodiméry v tomto príklade boli pripravené nasledovne:

K zmesi Cys-obsahujúceho μ-opioidného receptorového agonistu (1 ekv.) a bismaleimidoalkánu (2 ekv.) v DMF (asi 21 ml na mmol peptidu) bolo pridaných 10 objemov 0,1M NH_4HCO_3 (pH 8). Reakčná zmes bola miešaná pri teplote miestnosti asi 1 hodinu (sledované periodicky pomocou analýzy HPLC s reverznou fázou) a výsledné S-(N-alkylmaleimido)sukcinimido deriváty μ-opioidového

receptorového agonistu čistené preparatívnou HPLC s reverznou fázou. Výsledný peptid izolovaný v približne 70 % výťažku po lyofilizácii potom bol spojený s CP-0126 (1,5 ekv.) v DMF (rovnako ml/mmol ako je špecifikované vyššie). Bolo pridaných desať objemov 0,1M NH_4HCO_3 (pH 8) a dimerizácia prebiehala niekoľko hodín pri teplote miestnosti. Výsledný Cys-(bissukcinimidoalkán)-Cys peptidový dimér bol čistený preparatívnou HPLC s reverznou fázou a lyofilizáciou poskytol bielu, páperovitú pevnú látku. Všetky výťažky sa pohybovali medzi 40 a 50 %. Heterodiméry pripravené týmto všeobecným postupom zahrňujú CP-0427 až CP-0432.

Charakteristiky (hmot. spektrálne) pre tieto peptidy sú uvedené v tabuľke S.

Tabuľka S Hmotové spektrálne charakteristiky BK_2An/μ Ag heterodimérov

Zlúčenina č.	Štruktúra	Vyp. MH	(M+H) hodnota[c]
CP-0427	CP-0126-(BSH)[a]-CO-0001	2200	2201
CP-0428	CP-0126-(BSH)[a]-CO-0003	2101	2102
CP-0429	CP-0126-(BSH)[b]-CO-0001	2172	2173
CP-0430	CP-0126-(BSH)[b]-CO-0003	2073	2074
CP-0431	CP-0126-(BSH)[c]-CO-0001	2283	2284
CP-0432	CP-0126-(BSH)[c]-CO-0001	2184	2185

[a] BSH = bissukcinimidohexán

[b] BSB = bissukcinimidobután

[c] BSD = bissukcinimidododekán

[d] získané plazmové desorpčné hmotové spektrum

Ako je zrejmé z údajov v tabuľke T, tieto typy zlúčenín sú tiež schopné interakcie so svojimi prípadnými receptorovými populáciami predpovedaným spôsobom. U zlúčenín ako sú tieto sa očakáva, že budú vhodné na liečenie radu chorobných stavov, včítane pooperačnej bolesti a astmy.

Tabuľka T In vitro aktivita BK_2 An/μ Ag heterodimérov

Zlúčenina	Popis	BK_2 potk. uterus pA_2	μ-opioid morč.ileum IC_{50}
CO-0001	Y-G-G-F-L-C-$CONH_2$	-	6.0 ± 0.5
CO-0003	Y-(Da)-G-F-C-$CONH_2$	-	6.8 ± 0.2
CP-0427	CO-0001-(BSH)-CP-0126	7.6 ± 0.2	6.4 ± 0.4
CP-0428	CO-0003-(BSH)-CP-0126	8.3 ± 0.5	6.6 ± 0.4
CP-0429	CO-0001-(BSB)-CP-0126	7.6 ± 0.1	6.3 ± 0.3
CP-0430	CO-0003-(BSB)-CP-0126	7.6 ± 0.1	6.7 ± 0.1
CP-0431	CO-0001-(BSD)-CP-0126	8.2 ± 0.1	6.3 ± 0.3
CP-0432	CO-0003-(BSD)-CP-0126	7.5 ± 0.2	6.1 ± 0.3

BK antagonisty podľa vynálezu zahrňujú ako homo- tak heterodiméry, i modifikované monoméry, môžu byť použité vo forme konvenčných farmaceutických prípravkov, obsahujúcich antagonistu a farmaceuticky prijateľný nosič. Takéto prípravky môžu byť upravené pre topické, orálne, aerosolové, intramuskulárne, subkutánne alebo intravenózne podanie. Množstvo antagonistu prítomného v takýchto prípravkoch sa bude pohybovať v rozmedzí napríklad asi 0,001 až 90,0 % hmotnosti v závislosti na aplikácii a spôsobu podania, i keď môže byť použité viac alebo menej aktívnej zložky. Zvyčajné dávky sa budú meniť podľa zamýšľanej aplikácie, napr. 0.1 až 100 mikrogramov na kg telesnej hmotnosti za minútu sú zamýšľané na použitie v súvislosti so septickým šokom.

Rozsah vynálezu je definovaný nasledujúcimi patentovými nárokmi.

PV 1061-93

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Bradykinínový antagonista vzorca

$$X(BKA)_n$$

kde BKA je peptidový reťazec bradykinín angatonistického peptidu, X je spájajúca skupina a n je celé číslo väčšia ako 1.

2. Bradykinínový antagonista podľa nároku 1, kde linker X obsahuje sukcínimidoskupinu.

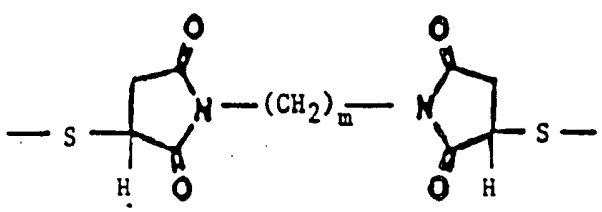
3. Bradykinínový antagonista podľa nároku 2, kde peptidová skupina (BKA) je kovalentne pripojená k linkeru cez tioéterovú väzbu.

4. Bradykinínový antagonista podľa nároku 3, kde peptidová skupina zahrňuje cysteínový zvyšok a sukcínimidoskupina je pripojená ku každému peptidovému reťazcu cez cysteínový zvyšok.

5. Bradykinínový antagonista podľa nároku 4, kde n je 2 a linker je bissukcínimidoalkán.

6. Bradykinínový antagonista podľa nároku 5, kde alkylový reťazec má dĺžku medzi 2 a 14 metylénovými skupinami.

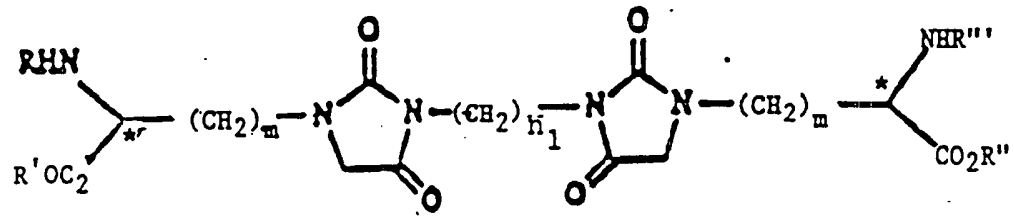
7. Bradykinínový antagonista podľa nároku 6, kde linkerová skupina má vzorec



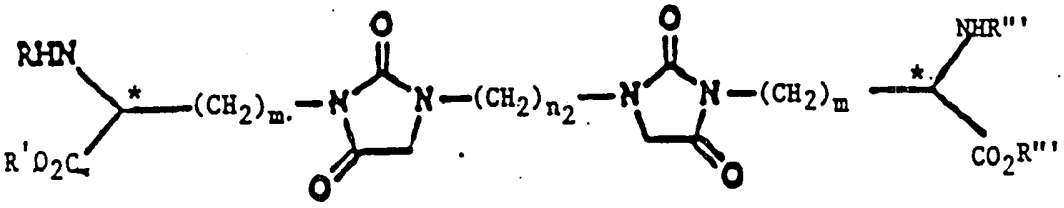
kde m je 2 až 14.

8. Bradykinínový antagonista podľa nároku 1, kde n je 2 a spájajúca skupina je jedna z nasledujúcich skupín I, II

I)



II)



kde m je 2 až 12 a m_1 a n_2 sú 1 až 12 a R, R', R" a R"' sú chrániace skupiny.

9. Bradykinínový antagonista podľa nároku 4, kde peptidom je dekapeptid a cysteínová skupina je v polohe "6" podľa číslovania bradykinínu.

10. Bradykinínový antagonista podľa nároku 9, kde peptidom je $DArg^0$-Arg^1-Pro^2-Hyp^3-Gly^4-Phe^5-Cys^6-$DPhe^7$-Leu^8-Arg^9.

11. Bradykinínový antagonista podľa nároku 10, kde n je 2 a spájajúca skupina je bissukcinimidohexán napojený cez tioéterovú väzbu k Cys^6-skupine.

12. Bradykinínový antagonista podľa nároku 1, obsahujúci aspoň dva rôzne BKA substituenty.

13. Bradykinínový antagonista podľa nároku 12, kde rozdielne BKA substituenty sú antagonistami k rôznym receptorom.

14. Bradykinínový antagonista podľa nároku 13, kde jeden BKA substituent je BK_1 receptorový antagonista a druhý je BK_2 receptorový antagonista.

15. Bradykinínový antagonista vzorca

X(BKA)

kde BKA je peptidový reťazec bradykinín antagonistického peptidu a X je modifikujúca skupina.

16. Bradykinínový antagonista podľa nároku 15, kde X je napojené cez tiolovú skupinu cysteínového zvyšku v peptidovom reťazci BK.

17. Bradykinínový antagonista podľa nároku 16, kde cysteínový zvyšok je v polohe "6" peptidového reťazca.

18. Bradykinínový antagonista podľa nároku 15, kde X je N-alkylsukcínimido skupina.

19. Bradykinínový antagonista podľa nároku 15, kde X je N-alkylsukcínimidoskupina s alkylovým reťazcom, obsahujúcim 1 až 10 metylénových skupín.

20. Bradykinín antagonistický heterodimér vzorca

(Y)(X)(BKA)

kde BKA je peptidový reťazec bradykinín antagonistického peptidu, X je spájajúca skupina a Y je ligand, ktorý je antagonistom alebo agonistom nebradykinínového receptoru.

21. Bradykinínový antagonista podľa nároku 20, kde BKA je peptidový reťazec BK_1 alebo BK_2 selektívneho antagonistu a Y je neuropeptidový receptorový antagonista.

22. Bradykinínový antagonista podľa nároku 21, kde neuropeptidový receptor je NK_1 alebo NK_2 receptor.

23. Bradykinínový antagonista podľa nároku 20, kde linkerom je bissukcinimidoalkán.

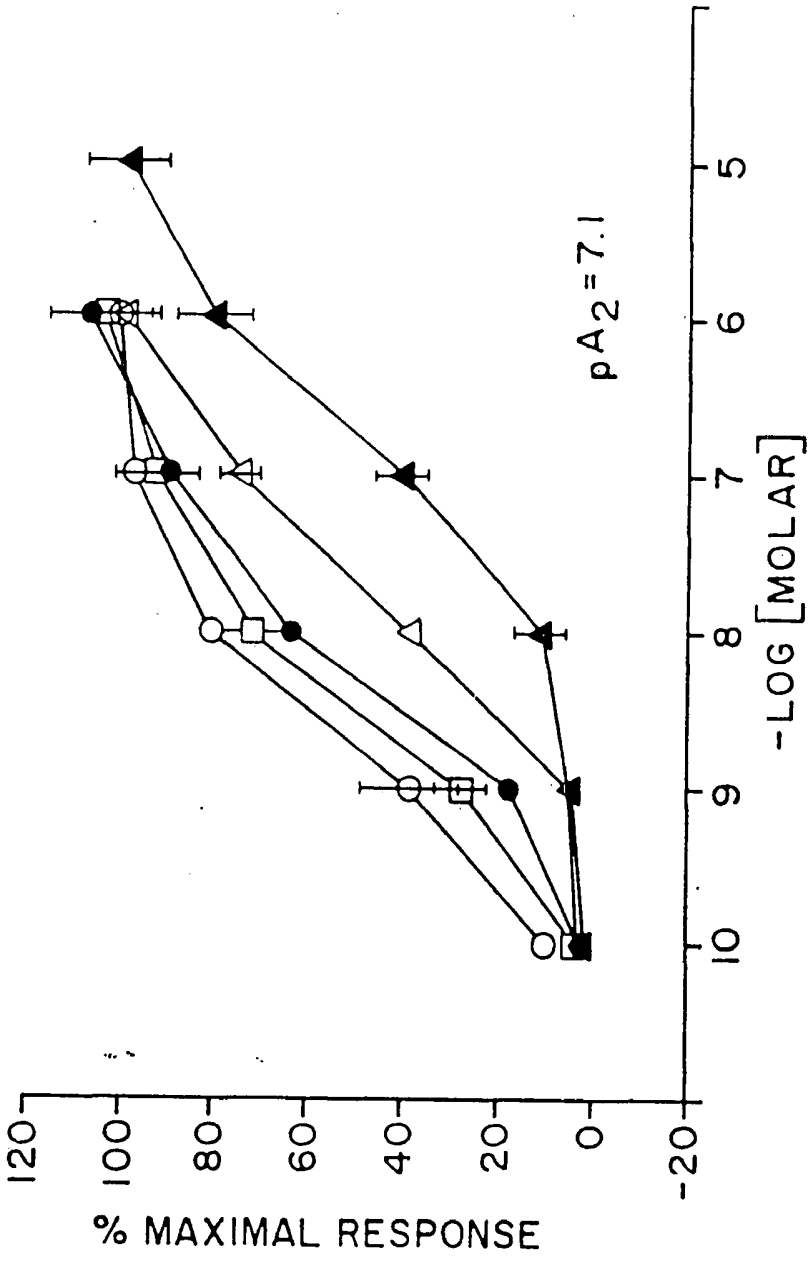
24. Bradykinínový antagonista podľa nároku 23, kde linker je vybraný z linkerov uvedených v nároku 7 alebo nároku 8.

25. Bradykinínový antagonista podľa nároku 20, kde BKA je BK_1 alebo BK_2 receptorový antagonista a Y je opioidový receptorový agonista.

26. Bradykinínový antagonista podľa nároku 25, kde BKA je BK_1 alebo BK_2 receptorový antagonista a Y je μ-opioidový receptorový agonista.

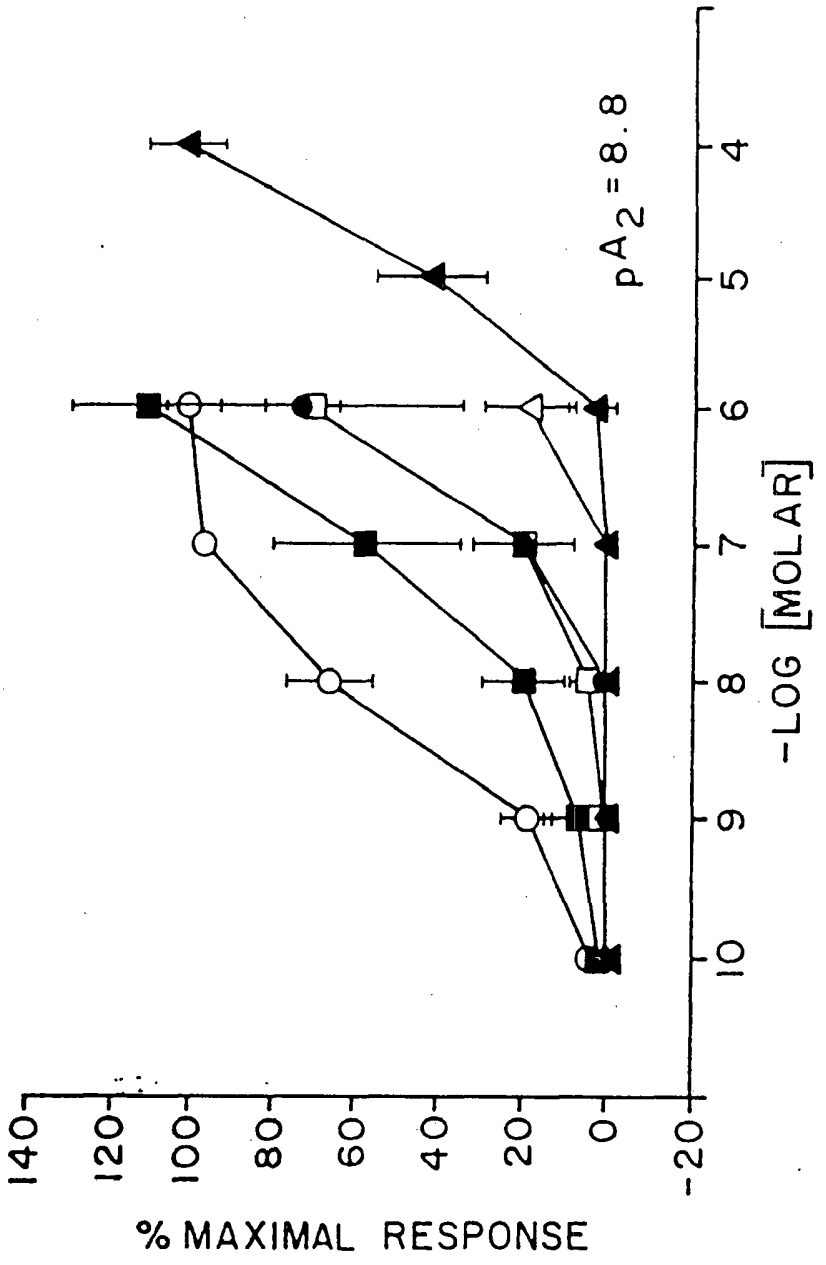
27. Farmaceutický prípravok, vyznačujúci sa tým, že obsahuje antagonistu podľa nárokov 1, 15 alebo 20 a jeho nosič.

29. Metóda vyžadujúca použitie bradykinínového antagonistu, ktorej zlepšenie zahrňuje použitie antagonistu podľa nárokov 1, 15 alebo 20.

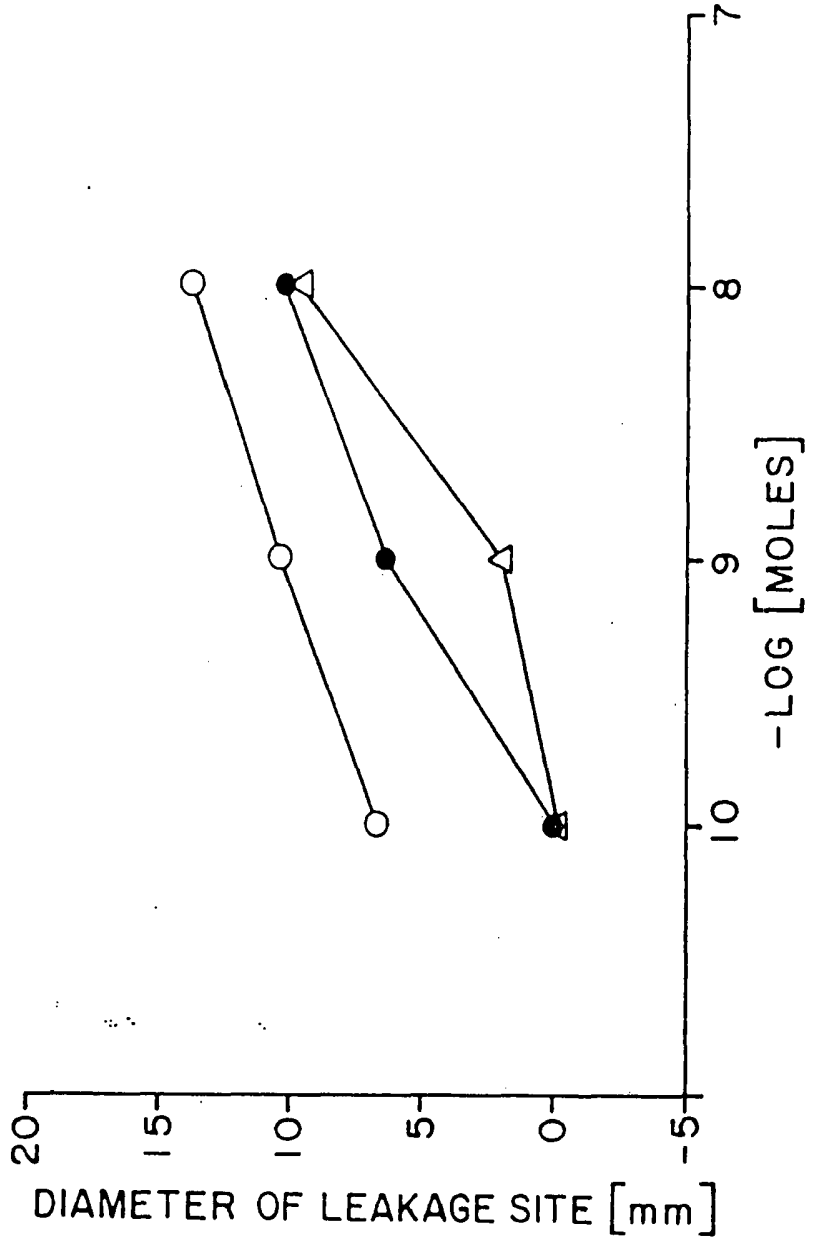

% MAXIMAL RESPONSE
120
100
80
60
40
20
0
-20
-LOG [MOLAR]
5
6
7
8
9
10
pA2 = 7.1

OBR. 1A

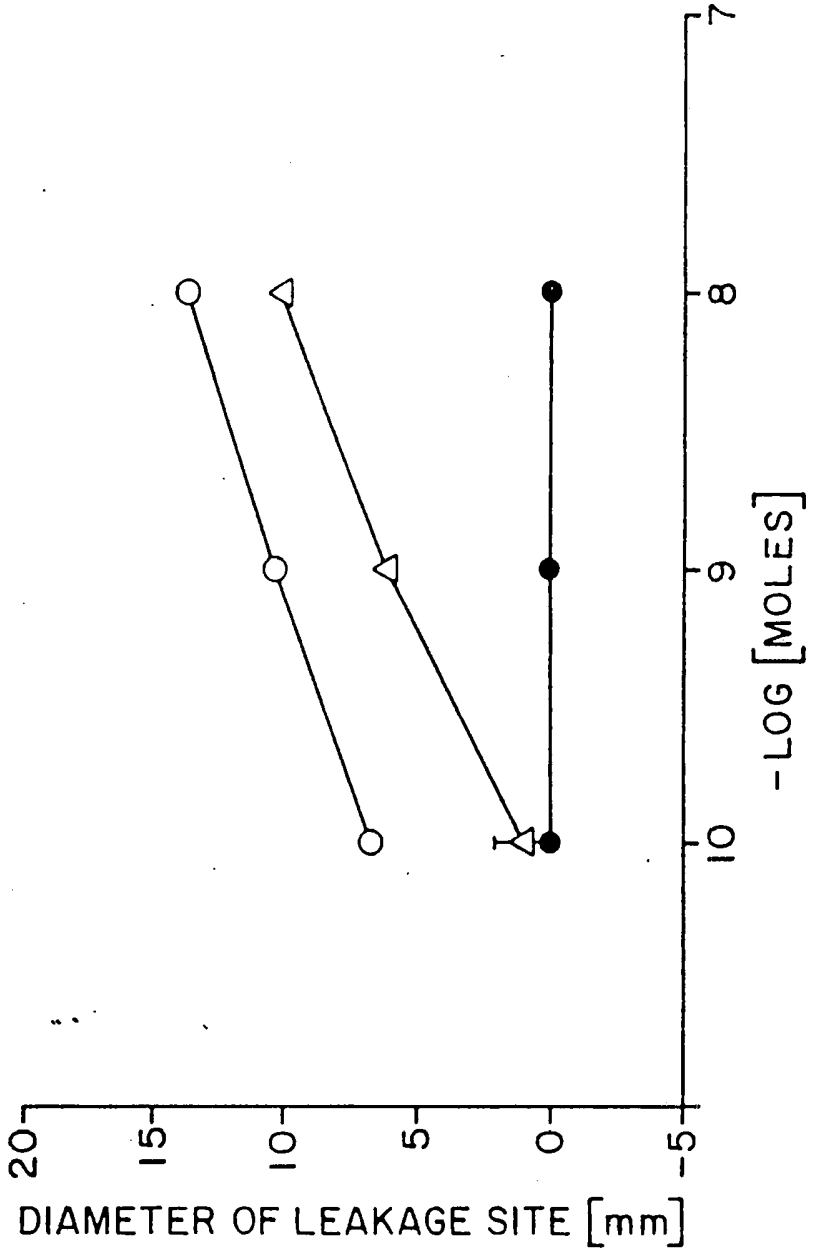
PV 1061 - 93



OBR. 1B

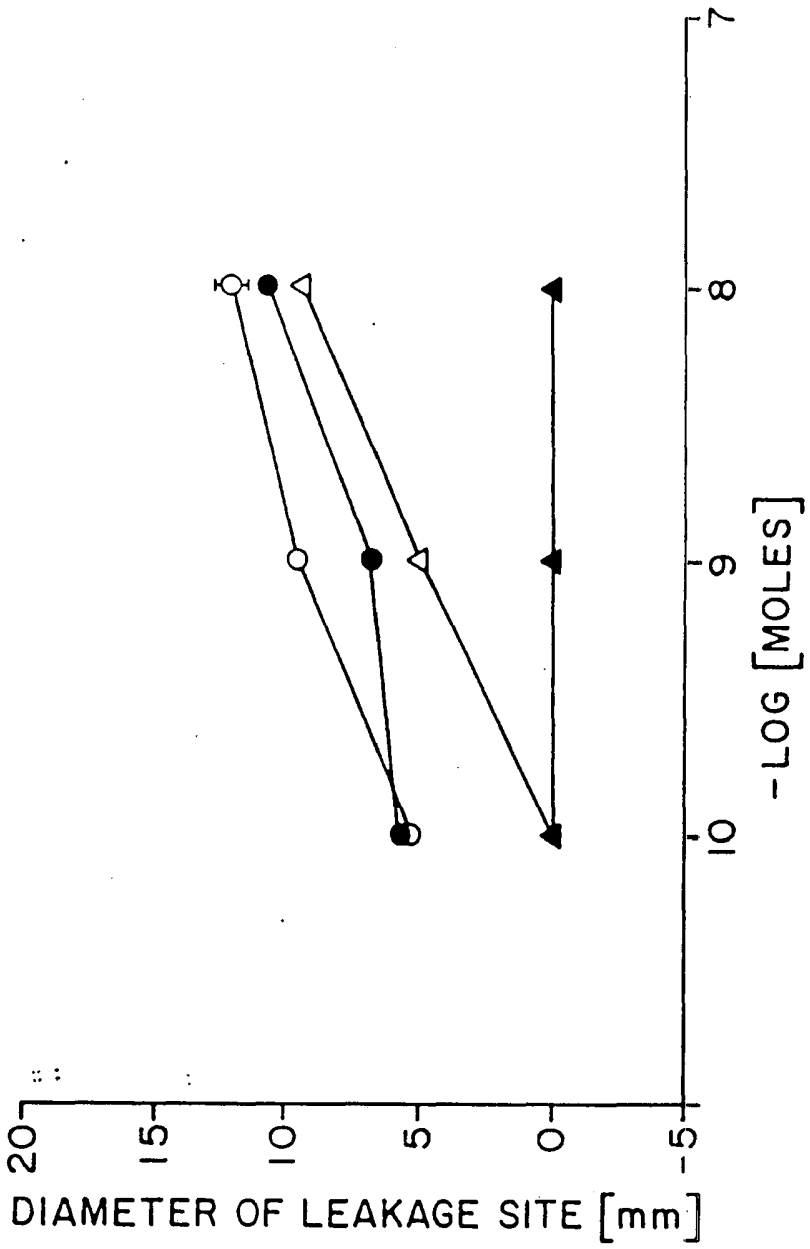


OBR. 2A

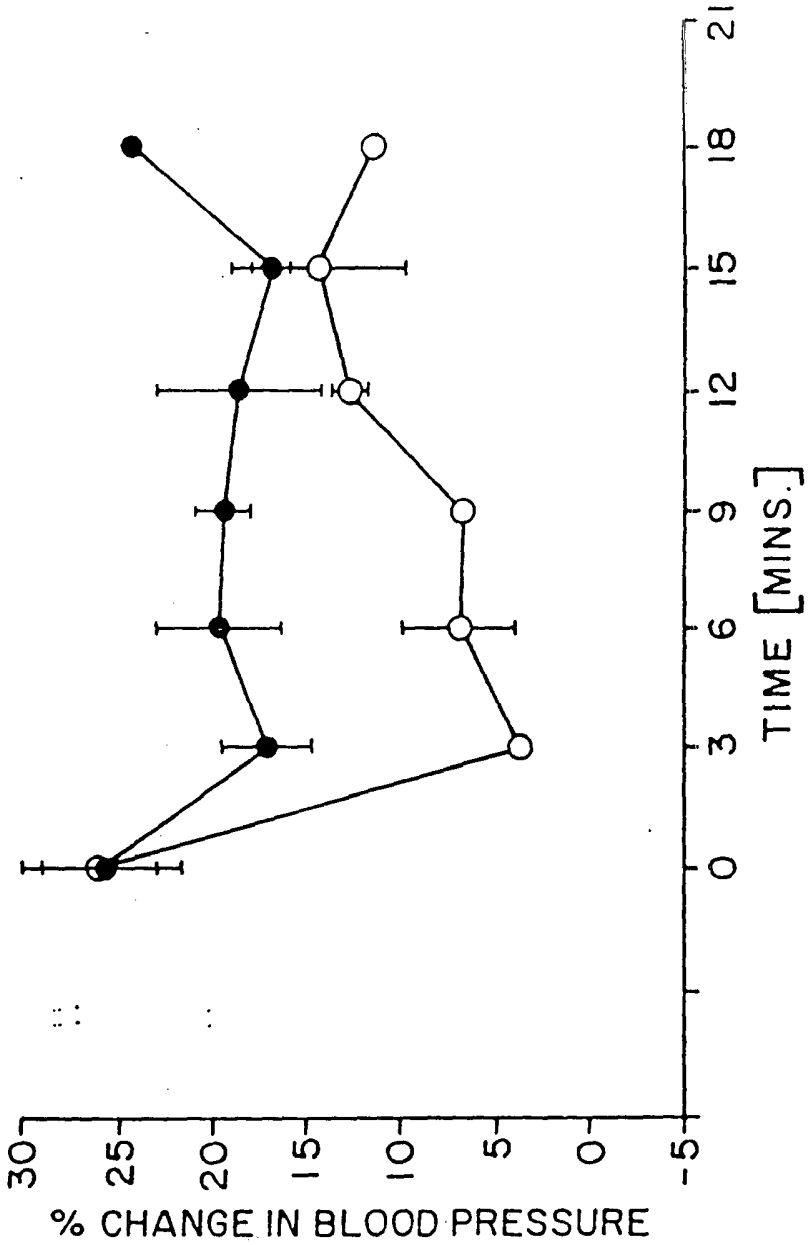


OBR. 2B

PV 1061-93

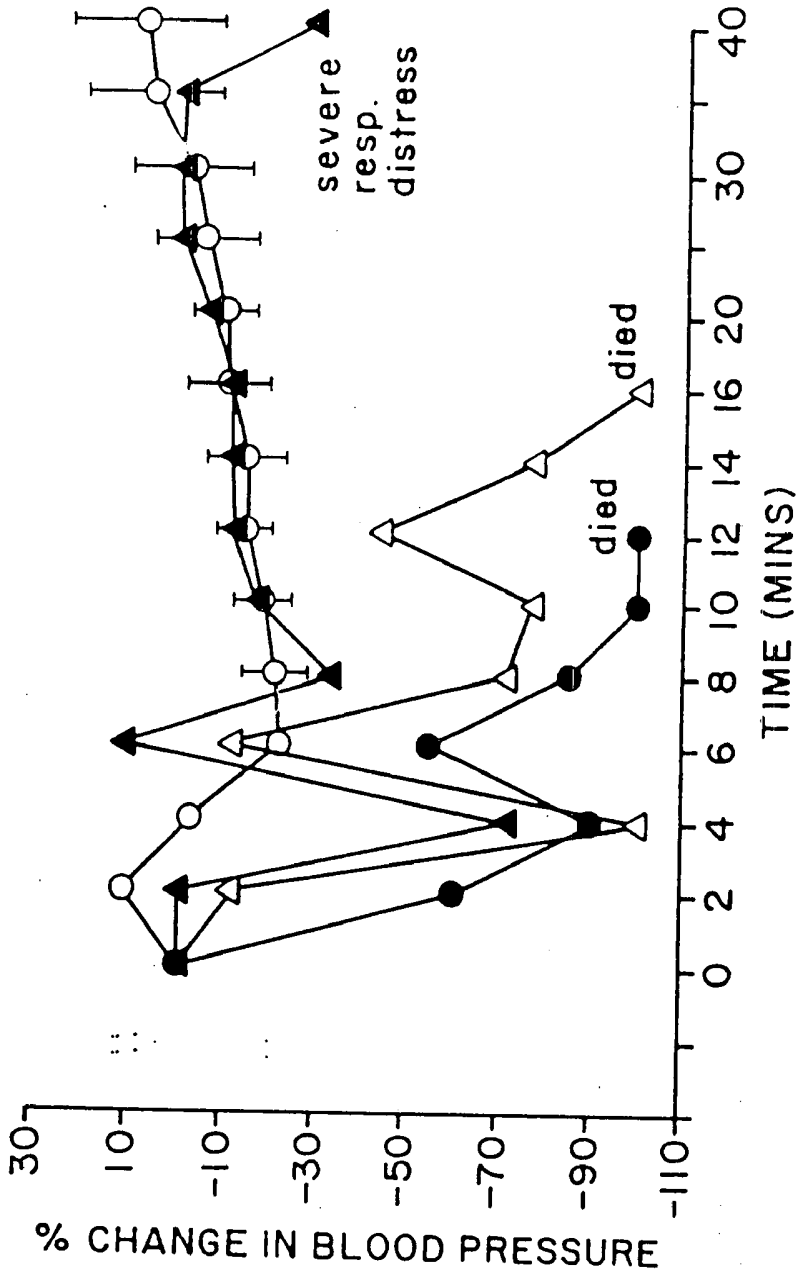


OBR. 2C


% CHANGE IN BLOOD PRESSURE
30
25
20
15
10
5
0
-5
TIME [MINS.]
0
3
6
9
12
15
18
21

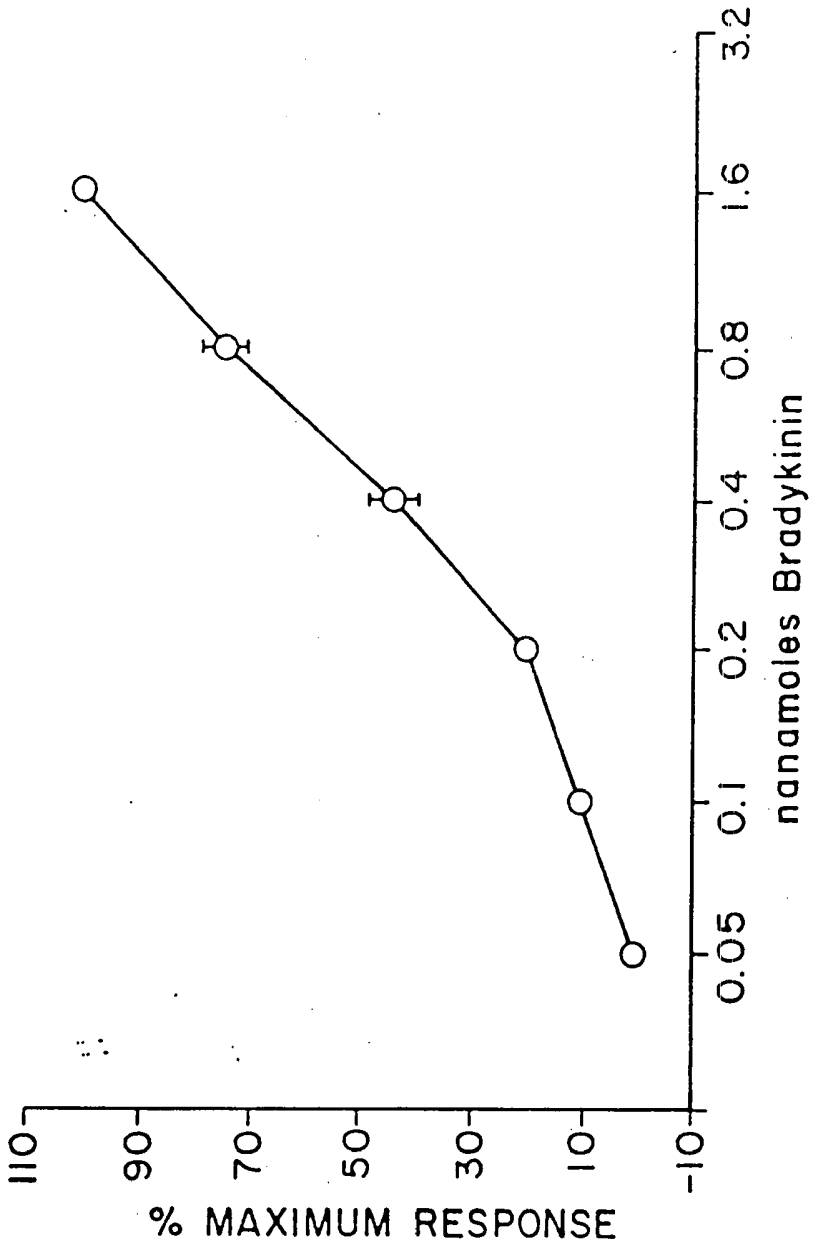
OBR. 3

PV 1061 - 93



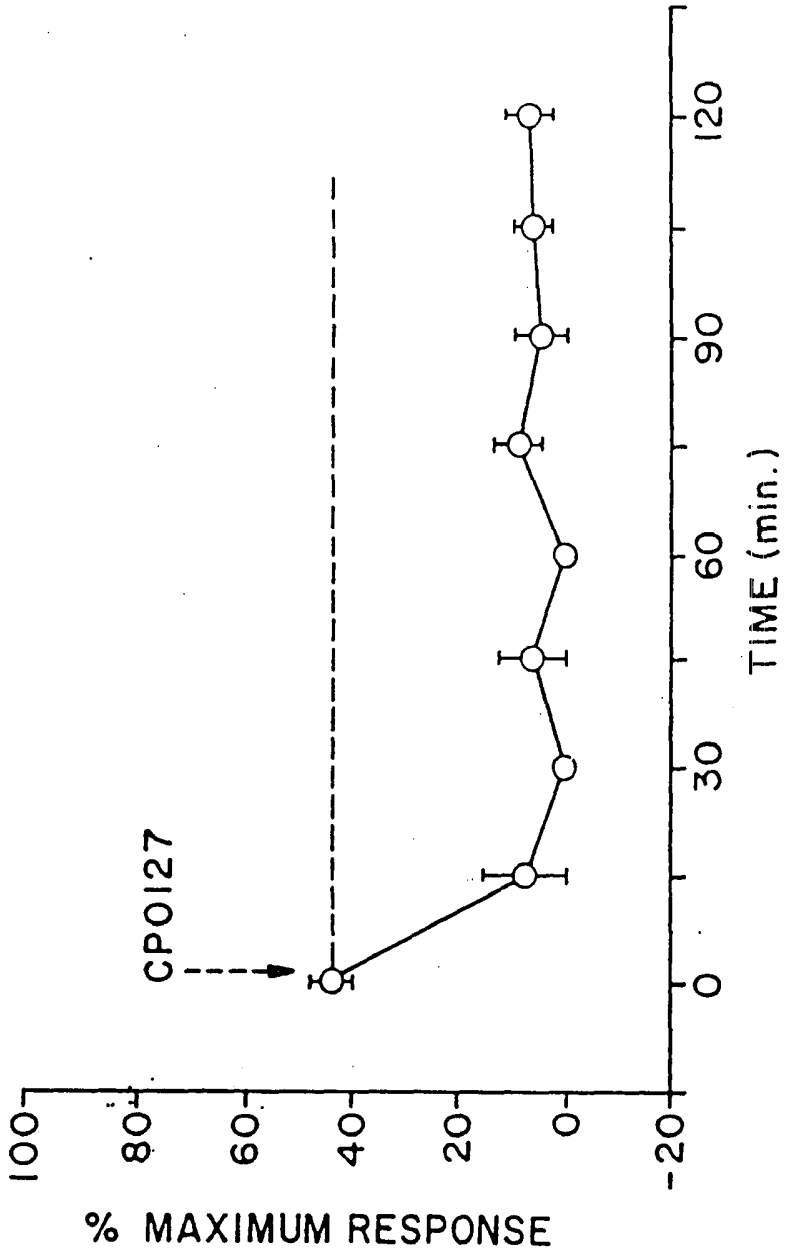
OBR. 4

PV 1061--93



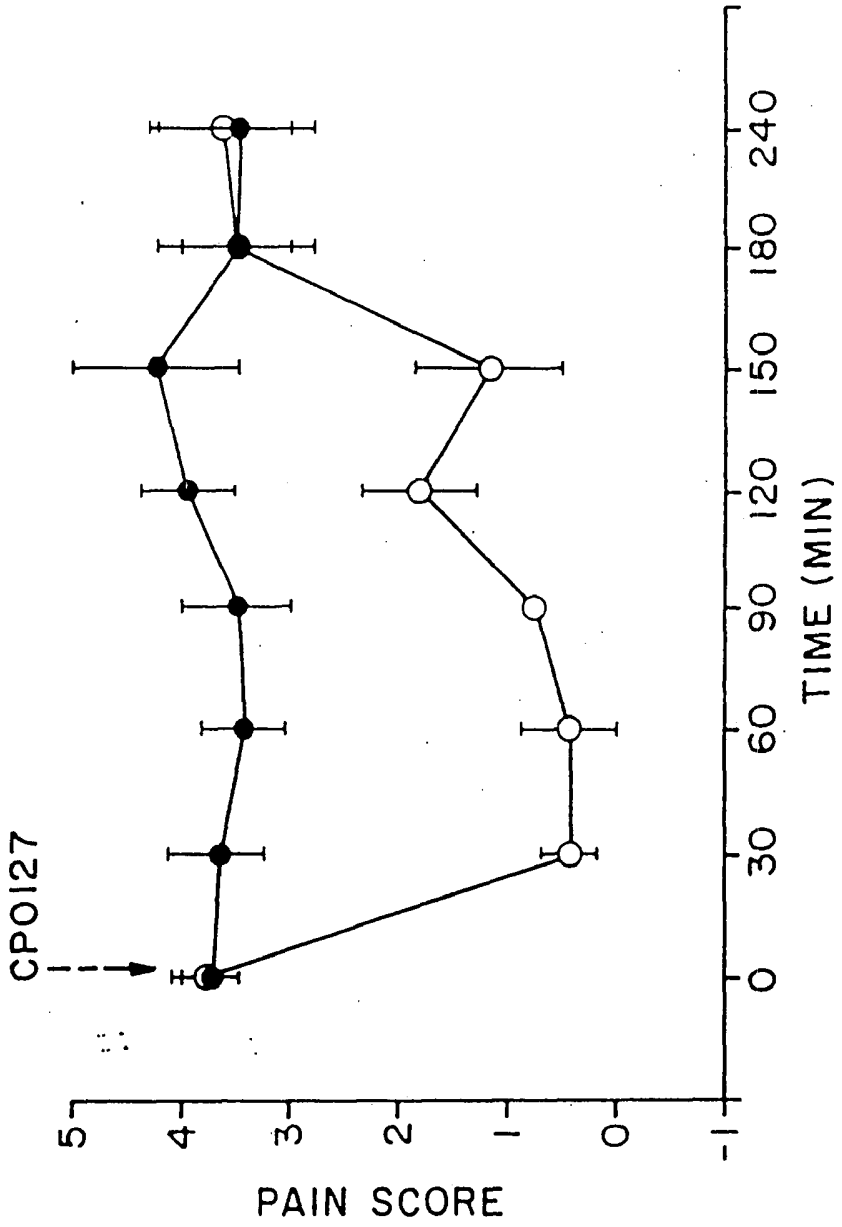
OBR. 5A

PV 1061-93



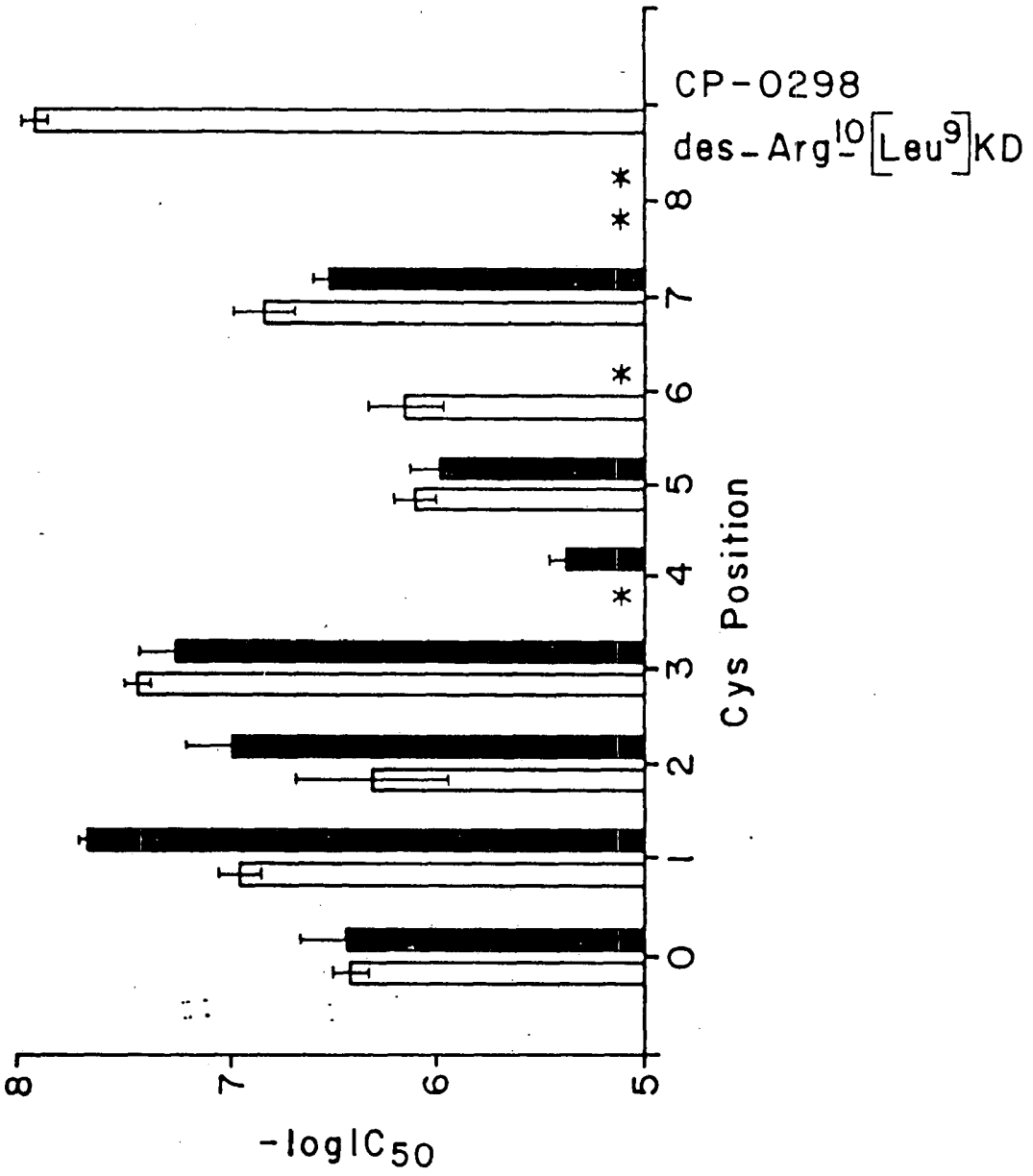
OBR. 5B

PV 1061-93



OBR. 6

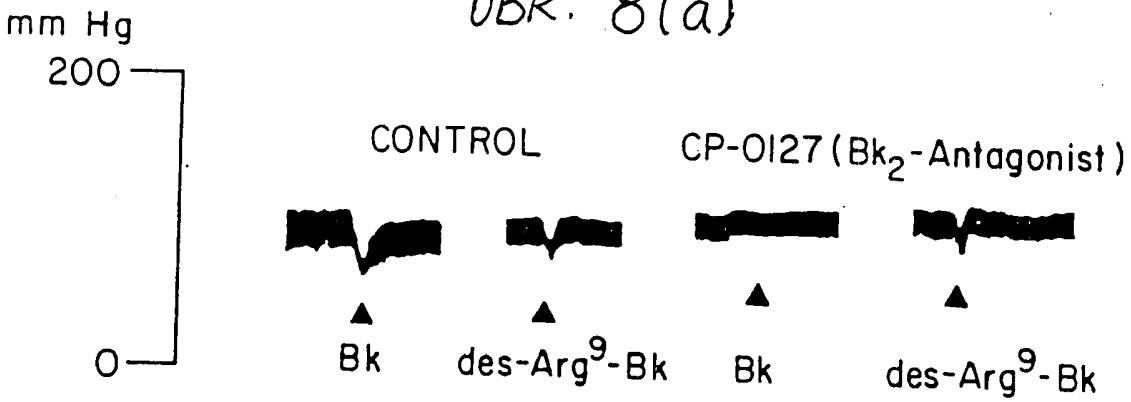
PV 1061-93



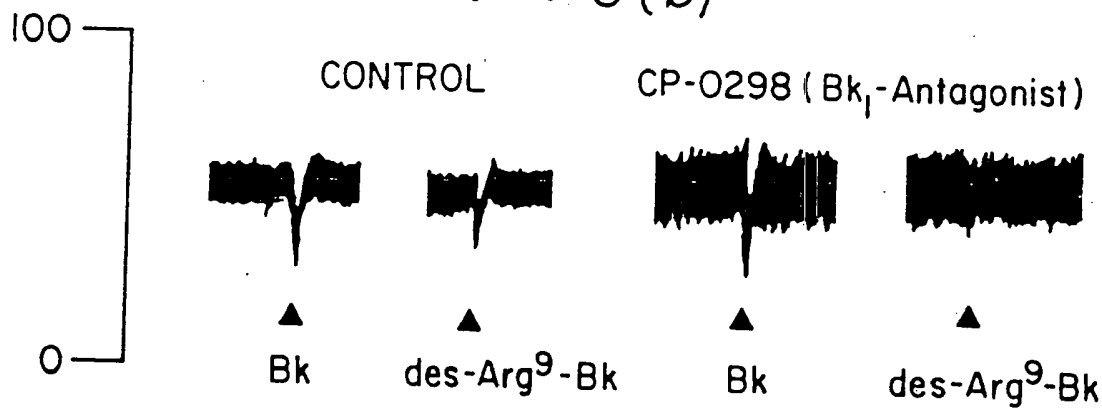
OBR. 7

PV 1061-93

OBR. 8(a)



OBR. 8(b)



OBR. 8(c)

