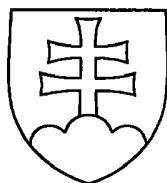


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19)

SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU

- (22) Dátum podania: 16.08.1990
(31) Číslo prioritnej prihlášky: 394 727
(32) Dátum priority: 16.08.1989
(33) Krajina priority: US
(40) Dátum zverejnenia: 11.07.2000
(86) Číslo PCT:

(21) Číslo dokumentu:

4028-90

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl.⁷ :

C 07K 7/02
C 07K 7/22
A 61K 38/08

(71) Prihlasovateľ: The Administrators of the Tulane Educational Fund, New Orleans, LA, US;

(72) Pôvodca vynálezu: Coy David H., New Orleans, LA, US;
Moreau Jacques-Pierre, Upton, MA, US;

(74) Zástupca: Patentservis Bratislava, a. s., Bratislava, SK;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Analóg substancie P**

(57) Anotácia:

Lincárny peptid, ktorý je analógom prírodne sa vyskytujúcej biologicky účinnej substancie P, má aktívnu polohu väzbovú polohu, ktorá zabezpečuje viazanie tohto peptidu na receptor príslušnej bunky. Analóg má nepeptidovú väzbu namiesto peptidovej väzby medzi aminokyselinovým zvyškom aktívnej polohy a príľahlým aminokyselinovým zvyškom alebo syntetický b-alebo g-aminokyselinový zvyšok nahradzujúci dva aminokyselinové zvyšky aktívnej polohy.

Analóg substancie P

Oblasť techniky

Vynález sa týka analógu substancie P na terapeutické účely a najmä analógu prírodne sa vyskytujúcej substancie peptidu P.

Doterajší stav techniky

Peptidová látka P (SP) má početné farmakologické pôsobenie vrátane vazodilatačného a tlak znižujúceho pôsobenia, kontrahuje nevaskulárne hladké svaly, stimuluje sekréciu slinivky a pankreasu, depolarizuje rôzne neuróny a uvoľňovanie histamínu z buniek. Taktiež existuje domienka, že sa SP podieľa na rôznych fyziologických funkciách, z ktorých sú mnohé spojené s novým vyvolávaním bolestí. Tieto funkcie zahrňujú reguláciu peristaltiky a aktivity hladkých svalov v gastrointestinálnom trakte, reguláciu sekrécie slinivky a pankreasu, reguláciu zápalovej odozvy zlej funkcie periférneho tkaniva, neurotransmisiu a reguláciu neuroimunomodulácie. Mantyh a kol., (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 : 5193, opisuje prítomnosť analógov substancie P receptorov na strane zranenia v centrálnom nervovom systéme a domnieva sa, že SP môže byť zahrnutá v regulácii odozvy poškodenia centrálného nervového systému ako aj v perifernom tkanive. Látka P je taktiež proliferatívnym činidlom, stimulujúcim proliferáciu fibroblastov, T-lymfocytov, endoteliálnych buniek, buniek hladkých svalov a astrocytov.

Látka SP patrí do rodiny bioaktívnych peptidov známych ako tachykiníny. Štruktúra, účinnosť a funkcia látky SP a iných tachykinínov sa diskutujú v práci Payana, (1989) Ann. Rev. Med. 40 : 341. Ako uvádza Payan, látka SP sa podieľa na všeobecných farmakologických vlastnostiach a konzervuje koncovú karboxylovú sekvenciu (Phe-X-Gly-Leu-Met-NH₂, kde X

znamená rozvetvený alifatický alebo aromatický aminokyselinový zostatok) s inými tachykinínmi. Základná biologická účinnosť a schopnosť viazať sa na receptor spočíva v karboxylovej koncovej sekvencii týchto peptidov. Selektivita na špecifický receptor tachykinínu je stanovená aminokyselinovou koncovou sekvenciou peptidov, ako uvádza Iverson a kol., (1989) The Tachykinin systém (Tachykinínový systém); Abstrakt zverejnený na 11. americkom sympóziu o peptidoch. Konzervácia karboxylovej koncovej sekvencie siaha cez látku SP a iné cicavčie tachykiníny k ostatným bioaktívnym peptidom, ako sa uvádza v tabuľke I.

Mnohé deriváty SP, vytvárané modifikáciou postranného reťazca a/alebo D-aminokyselinovou substitúciou, pôsobia ako SP receptorové antagonisy. Folkers v americkom patentovom spise číslo 4 481 139 opisuje P antagonisy, pripravené D alebo L aminokyselinovou substitúciou. Tieto antagonisy zahrňujú undekapeptidový analóg spantid (D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-D-Trp-Phe-D-Trp-leu-Leu-NH₂), ako i analógy látky P. Jensen a kol., (1988) Am. J. of Physiol. 254 : G883, charakterizuje schopnosť rôznych SP antagonistov inhibovať pôsobenie bombezínu. Jensen a kol. študovali štyri SP analógy :

Arg-D-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Phe-Phe-D-Trp-Leu-Met-NH₂,

Arg-D-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp-Phe-D-Trp-Leu-Met-NH₂,

D-Arg-D-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp-Phe-D-Trp-Leu-Leu-NH₂ a

D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp-Phe-D-Trp-Leu-Leu-NH₂.

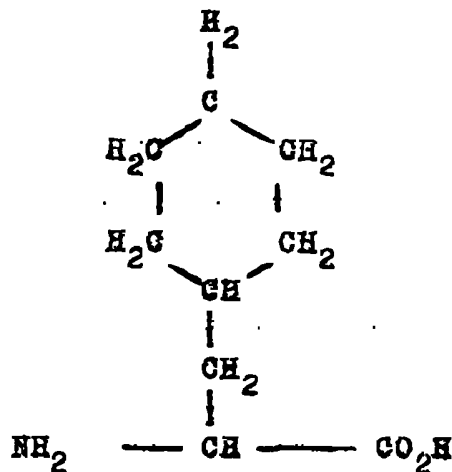
Jensen a kol. taktiež študoval dva analógy SP a prvé tri aminokyselinové zvyšky vypustené, D-Pro-Gln-Gln-D-Trp-Phe-D-Trp-Leu-Met-NH₂ a D-Pro-Gln-Gln-D-Trp-Phe-D-Trp-D-Trp-Met-NH₂. Žiadny z týchto receptor viažúcich peptidov však nie je špecifický k SP receptoru. Všetky inhibujú bombezínom stimulované uvoľňovanie amylázy. Jensen a kol. usúdili, že „schopnosť inhibovať pôsobenie bombezínu je všeobecnou vlastnosťou SP analógov, majú tiež funkciu ako SP receptorové antagonisy a že SP receptorové antagonisy sú každý

inhibovaný pôsobením bombezínu funkciou ako bombezínové receptorové antagonisty".

Woll a kol., (1988) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85 :1857 zistili, že P antagonista D-Arg-Pro-Lys-Pro-D-Phe-Gln-D-Trp-Phe-D-Trp-Leu-Leu-NH₂ je silným bombezínovým antagonistom v bunkách „murine Swiss 3T3“.

Agonisty a antagonisty širokého spektra biologicky účinných peptidových hormónov, vrátane látky P, boli syntetizované zavedením modifikácie peptidových väzieb do peptidového hormónu, pozri Spatola (1983), v publikácii Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins (Chémia a biochémia aminokyselín, peptidov a bielkovín) (B. Weinstein vyd.), M. Dekker, New York a Basel, str. 267 až 357.

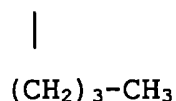
Ďalej používané (neobvyklé) skratky majú tento význam :
Cyklohexyl-Ala = cyklohexylalanín



identifikačná skupina

Lys-Σ-NHR = lyzín, kde Σ-N atóm nesie skupinu R, kde R znamená atóm vodíka, alkylovú skupinu s 1 až 12 atómami uhlíka, fenylalkylovú skupinu so 7 až 10 atómami uhlíka, skupinu COE, kde E znamená alkylovú skupinu s 1 až 20 atómami uhlíka, alkenylovú skupinu s 3 až 20 atómami uhlíka, alkinylovú skupinu s 3 až 20 atómami uhlíka, fenylovú skupinu, naftylovú skupinu alebo fenylalkylovú skupinu so 7 až 10 atómami uhlíka alebo R znamená acylovú skupinu s 1 až 12 atómami uhlíka.

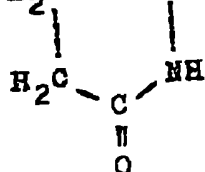
Nle = $\text{H}_2\text{N} - \text{CH} - \text{COOH}$ (norleucín)



identifikačná skupina

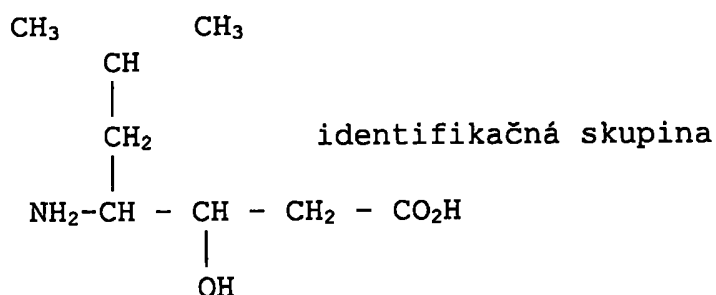
Nal = naftylalanín

PGlu = $\text{H}_2\text{C} - \text{CH} - \text{COOH}$ (pyroglutamová kyselina)

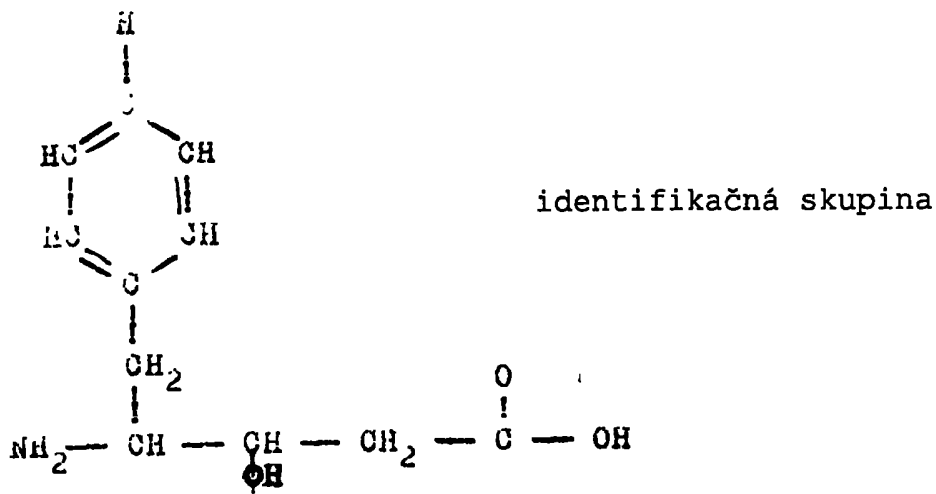


Sar = sarkozín

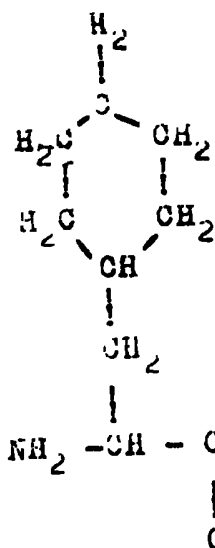
Sta (statín) = (3S,4S)-4-amino-3-hydroxy-6-metylheptynová kyselina, ktorá má chemickú štruktúru :



AHPPA - (3S,4S)-4-amino-3-hydroxy-5-fenylpentanoová kyselina, ktorá má chemickú štruktúru :



ACHPA = (3S, 4S)-4-amino-5-cyklohexyl-3-hydroxypentanoová kyselina, ktorá má chemickú štruktúru :



identifikačná štruktúra

SP = Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂ (analóg substance P).

Podstata vynálezu

Všeobecne je predmetom vynálezu lineárny (necyklický peptid), ktorý je analógom prírodne sa vyskytujúcej biologicky účinnej substance P, ktorá má aktívnu polohu a väzobnú polohu zodpovednú za viazanie peptidu na receptor na cieľovej bunke. Analóg má jednu z nasledujúcich modifikácií : (a) nepeptidovú väzbu namiesto peptidovej väzby medzi aminokyselinovým zostatkom aktívnej polohy a susedným aminokyselinovým zostatkom, (b) náhradu dvoch aminokyselinových zostatkov vo vnútri aktívnej polohy syntetickým aminokyselinovým zostatkom, napríklad statinom, AHPPA, ACHPA, β-aminokyselinovým alebo γ-aminokyselinovým zostatkom, (c) vypustenie aminokyselinového zostatku v aktívnej polohe a modifikácia aminokyselinového zostatku mimo aktívnej polohy alebo (d) prítomnosť N-koncového aminokyselinového zostatku, ktorý nie je prírodne sa vyskytujúcim aminokyselinovým zostatkom uvedeného prírodne sa vyskytujúceho peptidu (kde β- alebo γ- nie je stanovenou aminokyselinou, ale je to α-aminokyselina).

V prípade výhodného uskutočnenia je analóg schopný pôsobiť ako konkurenčný inhibítor prírodne sa vyskytujúcej substance P viazaním na receptor a uskutočnením jednej z modifikácií

zlyháva in vivo biologická účinnosť prírodne sa vyskytujúceho peptidu.

Vo výhodnom uskutočnení je aktívnou polohou lineárneho peptidu karboxylový koncový polovičný lineárny peptid. Lineárny peptid má jednu z nasledujúcich modifikácií: nepeptidovú väzbu namiesto peptidovej väzby medzi aminokyselinovým zostatkom aktívnej polohy a príľahlým aminokyselinovým zostatkom, (b) náhradu dvoch aminokyselinových zostatkov vo vnútri aktívnej polohy syntetickým aminokyselinovým zostatkom, napríklad statinom, AHPA, AGHPA, β -aminokyselinovým zostatkom alebo γ -aminokyselinovým zostatkom, (c) vypustenie aminokyselinového zostatku v aktívnej polohe a modifikácia aminokyselinového zostatku mimo aktívnej polohy alebo (d) prítomnosť N-koncového aminokyselinového zostatku, ktorý nie je prírodne sa vyskytujúcim aminokyselinovým zostatkom uvedeného prírodne sa vyskytujúceho, biologicky účinného peptidu.

Podľa výhodného uskutočnenia je aktívnou polohou lineárneho peptidu karboxylový koncový polovičný lineárny peptid. Lineárny peptid má jednu z nasledujúcich modifikácií: (a) nepeptidovú väzbu namiesto peptidovej väzby medzi karboxylovým koncovým aminokyselinovým zostatkom a príľahlým aminokyselinovým zostatkom alebo (b) statín alebo AHPPA alebo ACHPA, β -aminokyselinový alebo γ -aminokyselinový zostatok namiesto prírodne sa vyskytujúceho karboxylového koncového zostatku a príľahlého aminokyselinového zostatku.

Podľa výhodného uskutočnenia má analóg substancie P jednu z nasledujúcich modifikácií: (a) nepeptidovú väzbu namiesto peptidovej väzby medzi karboxylovým koncovým aminokyselinovým zostatkom a príľahlým aminokyselinovým zostatkom alebo (b) statín alebo AHPPA alebo ACHPA, β -aminokyselinový alebo γ -aminokyselinový zostatok namiesto prírodne sa vyskytujúceho karboxylového koncového zostatku a príľahlého aminokyselinového zostatku.

Podľa výhodných uskutočnení je lineárny peptid analógom substancie P s aktívnou polohou v karboxylovej koncovej polovici lineárneho peptidu. Analóg substancie P má jednu z nasledujúcich modifikácií: (a) nepeptidovú väzbu namiesto peptidovej väzby medzi karboxylovým aminokyselinovým zostatkom a priliehajúcim aminokyselinovým zostatkom alebo (b) statín alebo AHPA alebo ACHPA alebo β -aminokyselinový alebo γ -aminokyselinový zostatok namiesto prírodne sa vyskytujúcej karboxylovej koncovej skupiny a prilahlej aminokyselinovej skupiny.

Lineárnymi peptidmi na zavedenie nepeptidovej väzby medzi dve prírodné aminokyselinové zostatky alebo na náhradu dvoch prírodných aminokyselinových zostatkov syntetickými aminokyselinovými zostatkami β -aminokyselinovými alebo γ -aminokyselinovými zostatkami alebo na vypustenie („des“) C-koncového aminokyselinového zostatku, vhodnými na vytvorenie alebo na podporu antagonistickej účinnosti sú lineárne peptidy, u ktorých je účinnosť spojená s dvoma C-koncovými aminokyselinovými zostatkami aminokyselinového reťazca. Preto aktívna poloha prírodne sa vyskytujúceho peptidu, ktorého analógom je substancia podľa vynálezu, zahrňuje s výhodou aspoň β -aminokyselinový alebo γ -aminokyselinový zostatok v karboxylovej koncovej polovici peptidu a analóg substancie P podľa vynálezu má aminokyselinový zostatok vo svojej karboxylovej koncovej polovine. Modifikácia môže byť zavedená v oblasti zahrnutej vo viazaní receptora alebo neviažúcej oblasti.

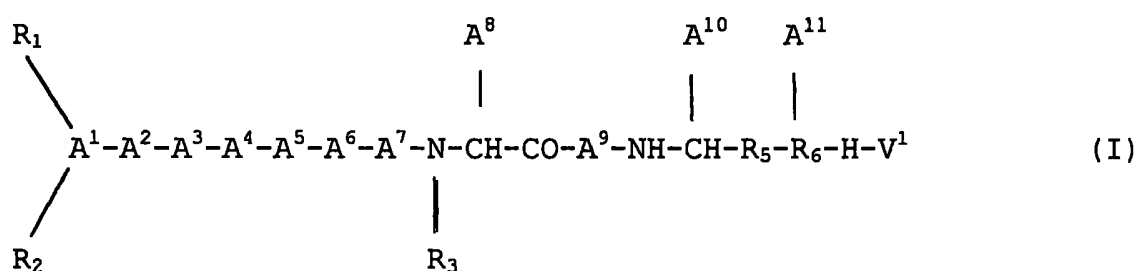
Výrazom „nepeptidová väzba“ sa rozumie, že atóm uhlíka, podieľajúci sa na väzbe medzi dvoma zostatkami, je redukovaný z karbonylového uhlíka na metylénový uhlík, to je $\text{CH}_2\text{-NH}$; alebo menej výhodnejšie $\text{CH}_2\text{-S}$, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$, $\text{CH}_2\text{-CO}$ alebo CO-CH_2 . (Podrobnejšie o chémii nepeptidových väzieb pojednáva Coy a kol., (1988) Tetrahedron 44, 3 : 835 až 841, Tourwe, (1985) Janssen Chim. Acta 3 : 3-15, 17-18 a Spatola (1983), Chemistry

and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins (B. Weinstein, vyd./ M. Dekker, New York and Basel, str. 267 až 357).

S výhodou predstavujú analógy podľa tohoto vynálezu 25% homológy a najmä 50% homológy s prírodne sa vyskytujúcimi peptidmi.

Jednou modifikáciou prírodne sa vyskytujúceho peptidu na vytvorenie antagonistu je použitie aminokyselinového koncového zostatku aromatického D-izoméru aminokyseliny alebo alkylovanej aminokyseliny (kde „D“ nie je určené konfiguráciou aminokyseliny, „L“ je uvedené).

Jedna skupina peptidov podľa vynálezu zahrňuje analógy substancie P vzorca I



kde

A^1 je D alebo L izomér Arg alebo Lys

A^2 je D alebo L izomér Pro

A^3 je D alebo L izomér Lys

A^4 je D alebo L izomér Pro

A^5 je D alebo L izomér Gln

A^6 je D alebo L izomér Gln

A^7 je D alebo L izomér Phe, Trp, β -Nal, o-X-Phe, v ktorom X je F, Cl, Br, NO_2 , OH alebo CH_3 , alebo p-X-Phe, v ktorom X je F, Cl, Br, NO_2 , OH alebo CH_3

A^8 je identifikačná skupina D alebo L izoméru Trp, β -Nal, o-X-Phe, v ktorom X je F, Cl, Br, NO_2 , OH alebo CH_3 , alebo p-X-Phe, v ktorom X je F, Cl, Br, NO_2 , OH alebo CH_3

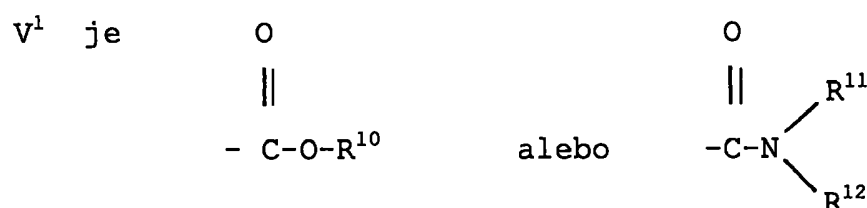
A^9 je Gly alebo D alebo L izomér Trp, β -Nal, o-X-Phe, v ktorom
X je F, Cl, Br, NO_2 , OH alebo CH_3 , alebo p-X-Phe,
v ktorom X je F, Cl, Br, NO_2 , OH alebo CH_3

A^{10} je identifikačná skupina D alebo L izoméru Leu, Nle, Ala,
Val alebo Ile

A^{11} je identifikačná skupina D alebo L izoméru Leu, Nle, Ala,
Val alebo Ile

R^3 je H alebo C_{1-12} alkyl

R^5 je $\text{CH}_2\text{-NH}$ a



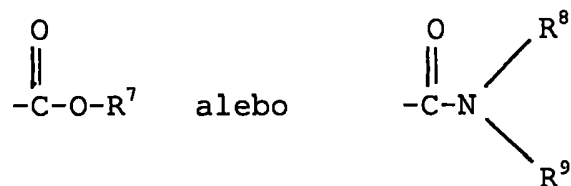
v ktorých každý R^{10} , R^{11} a R^{12} je nezávisle H, C_{1-12} alkyl,
 C_{7-10} fenylalkyl alebo C_{12-20} naftylalkyl a

R^1 a R^2 , ktoré sú viazané na α -aminodusíkový atóm N-koncovej
aminokyseliny sú nezávisle H, C_{1-12} alkyl, C_{7-10} fenylalkyl
alebo COE_{14} , kde E_{14} je C_{1-20} alkyl, C_{3-20} alkenyl, C_{3-20}
alkynyl, fenyl, naftyl alebo C_{7-10} fenylalkyl za
podmienky, že ak jeden zo symbolov R^1 alebo R^2 je COE_{14} ,
druhý musí byť atóm vodíka,
alebo jeho farmaceuticky prijateľné soli.

A^1 môže byť D alebo L izomér aminokyseliny zo súboru Arg,
Lys alebo Lys - $\Sigma\text{-NH-R}^{20}$ (kde R^{20} znamená atóm vodíka, alkylovú
skupinu s 1 až 20 atómami uhlíka, skupinu COE_{10} , kde E_{10} znamená
alkylovú skupinu s 1 až 20 atómami uhlíka, alkenylovú skupinu
s 3 až 20 atómami uhlíka, alkynylovú skupinu s 3 až 20 atómami
uhlíka, fenylovú skupinu, naftylovú skupinu alebo
fenylalkylovú skupinu so 7 až 10 atómami uhlíka alebo R^{20}
znamená acylovú skupinu s 1 až 12 atómami uhlíka, alebo je
táto skupina vypustená, A^2 môže byť D alebo L izomér
aminokyseliny Pro alebo je táto skupina vypustená, A^3 D alebo

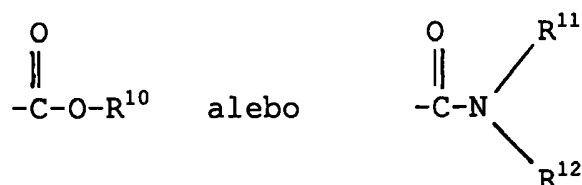
L izomér aminokyseliny zo súboru zahrňujúceho Lys a Lys- Σ -NH- R^{22} , kde R^{22} znamená atóm vodíka, akylovú skupinu s 1 až 12 atómami uhlíka, fenylalkylovú skupinu so 7 až 10 atómami uhlíka, skupinu COE₁₂, kde E₁₂ znamená alkylovú skupinu s 1 až 20 atómami uhlíka, alkenylovú skupinu s 3 až 20 atómami uhlíka, alkinylovú skupinu s 3 až 20 atómami uhlíka, fenylovú skupinu, naftylovú skupinu alebo fenylalkylovú skupinu so 7 až 10 atómami uhlíka alebo R^{22} znamená acylovú skupinu s 1 až 12 atómami uhlíka alebo je táto skupina vypustená, A⁴ D alebo L izomér aminokyseliny Pro alebo je táto skupina vypustená, A⁵ D alebo L izomér aminokyseliny zo súboru zahrňujúceho Asp, Gln, β -Nal, Trp, Phe, o-X-Phe, kde X znamená atóm fluóru, chlóru alebo brómu, nitroskupinu, hydroxylovú skupinu alebo metylovú skupinu, p-X-Phe, kde X znamená atóm fluóru, chlóru alebo brómu, nitroskupinu, hydroxylovú skupinu alebo metylovú skupinu, alebo je táto skupina vypustená, A⁶ D alebo L izomér aminokyseliny zo súboru zahrňujúceho Ala, Arg, Ser, Pro, Gln, pGlu, Asn, β -Nal, Trp, Phe, o-X-Phe, kde X znamená atóm chlóru, fluóru alebo brómu, nitroskupinu, hydroxylovú skupinu alebo metylovú skupinu, alebo p-X-Phe, kde X má už uvedený význam, A⁷ alebo L izomér aminokyseliny zo súboru zahrňujúceho Val, Thr, Phe, Trp, β -nal, o-X-Phe, kde X znamená atóm fluóru, chlóru alebo brómu, nitroskupinu, hydroxylovanú skupinu alebo metylovú skupinu alebo p-X-Phe, kde X znamená atóm fluóru, chlóru alebo brómu, nitroskupinu, hydroxylovú skupinu alebo metylovú skupinu, A⁸ identifikačná skupina D alebo L izoméru aminokyseliny zo súboru zahrňujúceho Gly, Val, Trp, β -nal, Phe, o-X-Phe, kde X znamená atóm fluóru, chlóru alebo brómu, nitroskupinu, hydroxylovú skupinu alebo metylovú skupinu, alebo p-X-Phe, kde X znamená atóm fluóru, chlóru alebo brómu, nitroskupinu, hydroxylovú skupinu alebo metylovú skupinu, A⁹ D alebo izomér aminokyseliny zo súboru zahrňujúceho Ser, His, Gly, Trp, β -Nal, Phe, o-X-Phe, kde X znamená atóm fluóru,

chlóru alebo brómu, nitroskupinu, hydroxylovú skupinu alebo metylovú skupinu alebo p-X-Phe, kde X znamená atóm fluóru, chlóru alebo brómu, nitroskupinu, hydroxylovú skupinu alebo metylovú skupinu, A¹⁰ identifikačnú skupinu D alebo L izoméru aminokyseliny zo súboru zahrňujúceho Trp, β-Nal, Leu, Nle, Ala, cyklohexyl-Ala, val, Ile, Met, Gly, Phe, o-X-Phe, kde X znamená atóm fluóru, chlóru alebo brómu, nitroskupinu, hydroxylovú skupinu alebo metylovú skupinu alebo p-X-Phe, kde X znamená atóm fluóru, chlóru alebo brómu, nitroskupinu, hydroxylovú skupinu alebo metylovú skupinu, A¹¹ identifikačnú skupinu D alebo L izoméru aminokyseliny zo súboru zahrňujúceho Trp, β-Nal, Leu, Nle, Ala, Val, Ile, Met, Gly, Phe, o-X-Phe, kde X znamená atóm fluóru, chlóru alebo brómu, nitroskupinu, hydroxylovú skupinu alebo metylovú skupinu, alebo p-X-Phe, kde X znamená atóm fluóru, chlóru alebo brómu, nitroskupinu, hydroxylovú skupinu alebo metylovú skupinu, alebo je táto skupina vypustená, každé R¹ a R² sú nezávisle od seba atóm vodíka, alkylová skupina s 1 až 12 atómami uhlíka, fenyalkylová skupina so 7 až 10 atómami uhlíka, skupina COE₁₄, kde E₁₄ znamená alkylovú skupinu s 1 až 20 atómami uhlíka, alkynylovú skupinu s 3 až 20 atómami uhlíka, fenylová skupina, naftylová skupina alebo fenylalkylová skupina so 7 až 10 atómami uhlíka alebo R¹ a R² znamenajú nezávisle od seba acylovú skupinu s 1 až 12 atómami uhlíka alebo sú tieto skupiny vypustené a R¹ a R² sú viazané na α-aminodusíkový atóm N-koncovej aminokyseliny peptidu, za podmienky, že keď jeden zo symbolov R¹ a R² znamená skupinu COE₁₄, druhý musí znamenať atóm vodíka, R³ znamená atóm vodíka alebo alkylovú skupinu s 1 až 12 atómami uhlíka, R⁵ znamená skupinu zo súboru zahrňujúceho COH-Z¹⁰₁₀-(CH₂)_{n1}-V², CH₂-NH, CH₂-S, CH₂-CH₂-CH₂-CO alebo CO-CH₂, kde V² znamená jednu zo skupín všeobecného vzorca

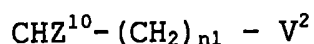


kde

R^7 , R^8 a R^9 znamenajú nezávisle od seba atóm vodíka, alkylovú skupinu s 1 až 12 atómami uhlíka, fenylalkylovú skupinu so 7 až 10 atómami uhlíka alebo naftylalkylovú skupinu s 12 až 20 atómami uhlíka, n_1 buď číslo 1 alebo 0 a Z^{10} buď atóm vodíka alebo hydroxylovú skupinu, R^6 znamená atóm a V^1 znamená jednu zo skupín vzorca



alebo je táto skupina vypustená, pričom každé R^{10} , R^{11} a R^{12} znamená nezávisle od seba atóm vodíka, alkylovú skupinu s 1 až 12 atómami uhlíka, fenylalkylovú skupinu so 7 až 10 atómami uhlíka alebo naftylalkylovú skupinu s 12 až 20 atómami uhlíka, za podmienky, že v prípade, keď R^5 znamená skupinu vzorca



musia byť skupiny A^{11} , R^6H a V^1 vypustené, pri ďalšej podmienke, že v prípade, keď A^{11} , R^6H a V^1 sú vypustené, musí R^5 znamenať skupinu vzorca $\text{CHZ}^{10}-(\text{CH}_2)_{n_1}-\text{V}^2$, ďalej pri podmienke, že v prípade, keď A^5 znamená Asp, R^6 znamená Ser, A^7 Phe, A^8 Val, A^9 Gly, A^{10} Leu, A^{11} Leu a R^5 CH_2NH , musí byť obsiahnutá aspoň jedna skupina symbolov A^1 , A^2 , A^3 alebo A^4 alebo jej farmaceutické prijateľné vhodné soli.

Ako príklady vhodných peptidov sa uvádzajú:

Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu^L ($\text{CH}_2\text{-NH}$)Leu-NH₂,

D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp-Phe-D-Trp^L CH₂-NH)Leu-Nle-NH₂,
 D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp-Phe-D-Trp-Leu^L (CH₂-NH)Nle-NH₂.

Nepeptidové väzby, v ktorých je peptidová väzba redukovaná, sú tu symbolizované výrazom „^L(CH₂-NH)“ alebo „^L“.

Vynález sa taktiež týka antagonistov substancie P vzorca Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly^L [CH₂-NH]Leu-Leu-NH₂.

SP antagonisty podľa vynálezu sú užitočné pri ošetrovaní chorých trpiacich na choroby zahrňujúce neurogénne zápaly, napríklad reumatoídnu artritídu, ulceratívny kolitis, ekzém a Crohnovu chorobu. SP antagonisty podľa vynálezu sú užitočné ako antiproliferačné činidlá, napríklad pri ošetrovaní malých bunkových pľúcnych karcionómov alebo porúch zahrňujúcich proliferáciu fibroblastov. Antiproliferačné vlastnosti SP antagonistov podľa vynálezu taktiež umožňujú ich použitie pri prevencii porúch, keď je potrebné uľahčiť regeneráciu nervov. Pôsobenie antagonistov podľa vynálezu na neurotransmisii umožňuje ich používanie ako neopiátových analgetík. Ich použitie ako neopiátových analgetík umožňuje obnovenie odozvy na opiáty. Antagonisty podľa vynálezu sú taktiež užitočné ako antisekrečné činidlá, pôsobia napríklad na slinivku a na pankreas.

V prípade zlúčenín vyššie uvedených vzorcov, kde R¹, R², R⁷ až R¹³ sú aromatickou, lipofilnou skupinou, môže byť ich účinnosť in vivo dlhodobá a uvoľňovanie zlúčeniny podľa vynálezu na cieľové tkanivo môže byť uľahčené.

Identifikačná skupina α-aminokyseliny (pre prípad pyroglutamátu, pozri nižšie) je atóm alebo skupina atómov iných ako α-aminodusíkový atóm alebo atóm vodíka, viazaná na asymetrický α-uhlíkový atóm. Príkladom na ilustráciu identifikačnej skupiny alanínu je metylová skupina, identifikačnej skupiny valínu skupina (CH₃)₂CH, identifikačnej skupiny lyzínu je H₃N⁺(CH₂)₄ skupina a identifikačnej skupiny fenylalanínu je skupina /C₆H₅)CH₂. Identifikačná skupina β-

alebo γ -aminokyseliny je analógový atóm alebo skupina atómov viazaných na β - alebo γ -uhlíkový atóm. Pokiaľ nie je identifikačná skupina amnikyseliny špecifikovaná, môže to byť α , β alebo γ . V prípade pyroglutamátu je identifikačná skupina $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$.

Ďalšie charakteristiky a prednosti vynálezu sú zrejmé z nasledujúceho popisu vhodných uskutočnení. Vynález taktiež objasňujú obrázky, ktoré ho však niako neobmedzujú.

Prehľad obrázkov na výkresoch

Na obr. 1 je dvojica grafov objasňujúcich vplyv pseudopeptidov spantidu, D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp-Phe-D-Trp-Leu-Leu-NH₂ (ľavý panel) a SP, Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂ (pravý panel) na SP-stimulované uvoľňovanie amylázy z pankreatickej anciny.

Na obr. 2 je graf ukazujúci vplyv Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu¹[CH₂-NH]-Leu-Nle na SP-stimulované uvoľňovanie amylázy z pankreatickej acini.

Na obr. 3 je dvojica grafov objasňujúcich schopnosť rôznych SP a spantidových pseudopeptidov inhibovať viazanie ¹²⁵I-BH-substancie P na pankreatickú acini.

Na obr. 4 je graf ukazujúci schopnosť SP a spantidových pseudopeptidov inhibovať viazanie ¹²⁵I-[Tyr⁴]bombezínu v pankreatickej acini.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Vynález ďalej objasňujú jednotlivé príklady uskutočnenia s opisom štruktúry, prípravy a použitia výhodných foriem analógu substancie P podľa vynálezu.

Analógy substancie P podľa vynálezu majú všetky modifikácie, napríklad nepeptidovú väzbu v aspoň jednej polohe, v ktorej sa atóm uhlíka podieľa na väzbe medzi dvoma

zostatkami a je redukovaný z karbonylového uhlíka na metylénový uhlík. Spôsob redukcie peptidovej väzby, ktorý vedie k nepeptidovej väzbe popísal Coy a kol., americká prihláška vynálezu číslo 879 348. Peptidy podľa vynálezu sa môžu spracovať na formu farmaceuticky vhodných solí. Ako príklady výhodných solí sa uvádzajú soli s farmaceuticky vhodnými kyselinami, ako je napríklad kyselina octová, mliečna, maleínová, citrónová, jablčná, askorbová, jantárová, benzoová, salicylová, metánsulfónová, toluénsulfónová a pamoová a akými sú ďalej polymérne kyseliny, napríklad kyselina trieslová alebo karboxymetylcelulóza a soli s anorganickými kyselinami, ako sú halogenovodíkové kyseliny, napríklad kyselina chlorovodíková a ďalej kyselina sírová alebo fosforečná.

Analóg substancie P, antagonist Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu^L[CH₂NH]Leu-NH₂, sa pripravuje ďalej uvedeným spôsobom. Ostatné analógy substancie P sa môžu pripravovať vhodnými modifikáciami následne opísaného spôsobu prípravy.

Prvým stupňom je príprava Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu^L[CH₂NH]Leu-benzhydrylamínovej živice ako medziproduktu.

Benzhydrylaminopolystyrénová živica (Vega Biochemicals, Inc.) (0,97 g, 0,5 mmol) vo forme chloridového iónu sa vnesie do reakčnej nádoby Beckmanovho 990B peptidového syntetizéra naprogramovaného na vykonanie nasledujúceho reakčného cyklu:

(a) metylénchlorid; (b) 33% trifluoroctovej kyseliny (TFA) v metylénchloride (2 krát pre 1 a 25 min); (c) metylénchlorid; (d) etanol; (e) metylénchlorid; a (f) 10% trietylamin v chloroforme.

Neutralizovaná živica sa mieša s α -t-butoxykarbonyl-(Boc)-leucínom a s diizopropylkarbodiimidom (1,5 mmol v obidvoch prípadoch) v metylénchloride počas jednej hodiny a vzniknutá aminokyselinová živica sa potom cykluje v stupni (a) až (f) vyššie uvedeným programom premývania. Butoxykarbonyl-leucínaldehyd (1,25mmol), pripravený spôsobom podľa Fehrentza

a Castra, Synteziar str. 679 (1983), sa rozpustí v 5 ml suchého dimetylformamidu (DMF) a pridá sa do živičnej trifluoroctovej soľnej suspenzie, potom sa pridá 100 mg (2 mmol) kyanoborohydridu sodného (Sasaki and Coy, Peptides 8 : 119 - 121 (1987); Coy a kol.). Mieša sa počas jednej hodiny, potom sa zistí negatívna reakcia živičnej zmesi na ninhydrín (1min), dokladajúca dokonalú derivatizáciu voľnej aminokyseliny.

Potom sa postupne kopulujú nasledujúce aminokyseliny (1,5 mmol) v prítomnosti diizopropylkarbodiimidu (1,5 mmol) a získaná aminokyselinová živica sa cykluje stupňom premývania (deblokovanie (a) až (f) rovnakým spôsobom, ako je vyššie opísané: butoxykarbonyl-Gly (Boc-Gly sa kopuluje ako 6M nadbytok p-nitrofenylesteru), Boc-Phe, Boc-Phe, Boc-Gln, Boc-Gln, (Boc-Gln sa kopuluje ako 6M nadbytok p-nitrofenylesteru), Boc-Pro, Boc-Lys, Boc-Pro a Boc-Arg. Hotová živica sa potom premyje metanolom a vysuší sa na vzduchu.

Vyššie pripravená živica (1,6 g, 0,5 mmol) sa zmieša s anizolom (5ml) a s bezvodým fluorovodíkom (35 ml) pri teplote 0 °C a mieša sa počas 45 minút. Nadbytok fluorovodíka sa rýchlo odparí v prúde suchého dusíka, voľný peptid sa vyzráža a premyje sa éterom. Surový peptid sa rozpustí v minimálnom objeme 2M kyseliny octovej a čistí sa na stĺpci (2,5 x 90 cm) Sephadexu G-25, ktorý sa eluuje 2M kyselinou octovou, nasleduje preparatívne strednetlaková chromatografia na stĺpci (1,5 x 45 cm) oxidu kremičitého (Vydac C₁₈, 10 až 15 mikrometrov), ktorý sa eluuje s lineárnymi gradientmi acetonitrilu v 0,1% trifluoroctovej kyseline za použitia kontrolóru gradienta (Eldex Chromatrol/prietoková rýchlosť 1 ml/min). Prípadne sa analógy substancie P ďalej čistia spätnou chromatografiou na tej istej kolóne s miernymi modifikáciami pri prípadných miernych modifikáciách podmienok gradientu. Homogenita peptidov sa dosahuje chromatografiou v tenkej vrstve a analytickou fázovou reverznou vysokotlakovou kvapalinovou chromatografiou; dosahuje sa 97% aj vyššia

čistota. Analytické stanovenie aminokyselín udáva očakávané pomery aminokyselín. Prítomnosť redukovanej peptidovej väzby je demonštrovaná hmotovou spektroskopiou za bombardovania rýchlym atómom. V každom prípade vykazuje dobrý výťažok molekulárneho iónu odpovedajúci vypočítanej molekulovej hmotnosti.

Statínový, AHPPA, ACHPA, β -aminokyselinový alebo γ -aminokyselinový zostatok sa zavádza rovnakým spôsobom ako prírodný α -aminokyselinový zostatok kopuláciou butoxykarbonylamínokyseliny. Statín alebo Boc-statín sa môže pripravovať spôsobom, ktorý popísal Rich a kol. 1978. J. Org. Chem. 43, 3624; Rich a kol., 1988, J. Org. Chem. 53: 869; a Rich a kol., 1980, J. Med. Chem. 23: 27. AHPPA sa môže pripravovať spôsobom, ktorý popísal Hui a kol., 1987 J. Med. Chem. 30: 1287. ACHPA sa môže pripravovať spôsobom, ktorý popísal Schuda a kol., 1988, Journal of Organic Chemistry 53: 873. (Boc-kopulované syntetické aminokyseliny sú dostupné v spoločnosti Nova Biochemicals /Švajčiarsko/, Buchem /Torrance, Kalifornia/ a CalBiochem/San Diego, Kalifornia).

Ďalšie zlúčeniny sa môžu pripravovať a skúšať so zreteľom na účinnosť ako agonisty alebo antagonisty nasledujúcim programom skúšky.

Fáza 1 - Uvoľňovanie amylázy z pankreatickej acini

SP stimuluje uvoľňovanie amylázy v pankreatickom acini. Stimulácie alebo inhibície uvoľňovania amylázy pankreatickými acini sa využíva ako miera prípadnej účinnosti peptidov ako agonistu alebo antagonistu. Dispergovaná acini živočíšneho pankreasu sa suspenduje v 150 ml štandardného inkubačného roztoku. Uvoľňovanie amylázy sa meria spôsobom, ktorý popísal Gardner a kol., 1977, J. Physiol. 270: 459. Aktivita amylázy sa stanovuje spôsobom, ktorý opísal Ceska a kol., 1969, Clin. Chim. Acta 26: 437 a Ceska a kol., 1969, Clin. Chim. Acta 26: 445 použitím Phadebasového činidla. Uvoľňovanie amylázy sa

vypočíta ako percento účinnosti amylázy v acini na začiatku inkubácie, ktorá sa uvoľní do extracelulárneho prostredia v priebehu inkubácie.

Fáza 2 - Konkurenčná inhibícia ^{125}I -Bolton-Hunter-BP väzby

Viazanie ^{125}I -Bolton-Hunter-SP (^{125}I -BH-SP) na dispergované pankreatické acini sa meria spôsobom, ktorý popísal Jensen a kol., 1984, Biochem. Biophys. Acta 804 : 181 a Jensen a kol., 1988 Am. J. Physiol. 254 : G883. Inkubácia obsahuje 0,125 nM ^{125}I -BH-SP a 0,1 % bacitracínu ako štandardný inkubačný pufor a udržiavajú sa 30 minút na teplote 37 °C. Nenasýtená väzba ^{125}I -BH-SP je množstvo rádioaktivity spojenia s acini v prípade, keď inkubácia obsahuje 0,125 nM ^{125}I -BH-SP plus 1 μM neznáčeného SP. Všetky dané hodnoty sú pre nenasýtenú väzbu, to znamená, že sa väzby merajú so samotným ^{125}I -BH-SP (celková väzba). Vo všetkých prípadoch sa nenasýtená väzba podieľa na celkovej väzbe menej ako 30%.

Fáza 3 - Konkurenčná inhibícia väzby ^{125}I -[Tyr⁴] bombezín

Pripraví sa ^{125}I -[Tyr⁴] bombezín (2200 Ci/mmol) za použitia modifikovaného spôsobu, ktorý popísal Jansen a kol., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75 : 6139. Rozpustí sa jodo-Gen (mg) v 5 ml chloroformu a 5 μl tohto roztoku (1 μg jodo-Genu) sa privedie do nádoby v prúde dusíka. Do tejto nádoby sa pridá 50 μl dihydrogenfosfátu draselného (KH_2PO_4) (hodnota pH 7,4), 6 μg [Tyr⁴] bombezínu v 5 μl vody a 1 mCi Na^{125}I , premieša sa a inkubuje 6 minút pri teplote 4 °C, pridá sa jodačná zmes do nádoby 1M ditiotreitolu a inkubuje sa pri teplote 80 °C 60 minút. Jodačná zmes sa potom vnesie na Seplak a eluuje sa 0,25 tetraetylamóniumfosfátom (TEAP) a potom 50% (objem/objem) systémom acetonitril - 0,25 % tetraetylamóniumfosfát. ^{125}I -[Tyr⁴] bombezín sa čistí reverznou fázovou vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou (HPCL) a eluuje sa.

Ako výsledky vyššie popísaných skúšok peptidov sa uvádza : mnohé analógy substancie P alebo spantidu ako antagonisty substancie P, pričom každý obsahuje nepeptidovú väzbu, sa môžu pripravovať a skúšať jedným alebo niekoľkými spôsobmi, ako je popísané vo fáze 1 až fáze 3. Substancia P má štruktúru Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂. Spantid je analóg SP. Štruktúra spantidu je D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp-Phe-D-Trp-Leu-Leu-NH₂. Stimulácia inhibície uvoľňovania amylázy z dispergovaného pankreatického acini sa používa ako skúška pre Sp agonistovu účinnosť alebo AP antagonistovu účinnosť. Pri koncentrácii 10 μ M, 9 až 10 SP a spentidom odvodené pseudopeptidy zlyhávajú pri stimulácii uvoľňovania amylázy, pokiaľ sú prítomné samotné (tabuľka II). Jeden peptid, Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly^L [CH₂-NH]Leu-Leu-NH₂, /10 μ M/ má účinnosť agonistu, spôsobujúcu trojnásobný vzrast amylázy (tabuľka II). Každý z 9 pseudopeptidov bez agonistovej účinnosti sa skúša so sreteľom na účinnosť ako SP antagonista. Pri koncentrácii 10 μ M každý zo spantidu odvodeného pseudopeptidových analógov inhibuje 1 nM-SP-stimulované uvoľňovanie amylázy (tabuľka II). Tri SP pseudopeptidy, Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu^L[CH₂-NH]Leu-NH₂, Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe^L[CH₂-NH]Gly-Leu-Leu-NH₂ a Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln^L[CH₂-NH]Phe-Phe-Gly-Leu-leu-NH₂ spôsobujú inhibíciu (tabuľka II).

Relatívna schopnosť každého peptidu inhibovať SP-stimulované uvoľňovanie amylázy sa stanoví podľa vplyvu veľkosti dávky peptidov na inhibíciu. Zaistovanie inhibičnej dávky sa robí pre každý z deviatich pseudopeptidov použitím koncentrácie SP (1 nM), ktorá spôsobuje polovinu maximálnej stimulácie (Obr.1).

Výsledky pre päť od spantidu odvodených pseudopeptidov sú uvedené na obr. 1 ľavý diel. D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp-Phe-D-Trp-Leu^L(CH₂-NH)Nle-NH₂ je rovnako účinný ako spantid a

spôsobuje zistiteľnú inhibíciu pri $0,03 \mu\text{M}$ a polovicu maximálnej inhibície pri $1,8 \mu\text{M}$ (tabuľka III). D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp-Phe-D-Trp^L(CH₂-NH)Leu-Nle-NH₂ je dvakrát menej účinný (IC₅₀ $3,5 \mu\text{M}$, tabuľka III) ako spantid. D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln^L(CH₂-NH)D-Trp-Phe-D-Trp-Leu-Nle-NH₂ je 2,6-krát (IC₅₀ $4,7 \mu\text{M}$) menej účinný ako spantid. D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp^L(CH₂-NH)Phe-D-Trp-Leu-Nle-NH₂ je 3,5-krát (IC₅₀ $6,4 \mu\text{M}$) menej účinný a D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp-Phe^L(CH₂-NH)D-Trp-Leu-Nle-NH₂ je 17-krát (IC₅₀ $30 \mu\text{M}$) menej účinný ako spantid (tabuľka III).

Výsledky pre SP pseudopeptidové analógy sú uvedené na obr. 1, pravá časť. Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu^L(CH₂-NH)Leu-NH₂ je najúčinnnejším derivátom, spôsobujúcim zistiteľnú inhibíciu pri $0,03 \mu\text{M}$ a polovicu maximálnej inhibície pri $7,1 \mu\text{M}$ (tabuľka III, vpravo). Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe^L(CH₂-NH)Gly-Leu-Leu-NH₂ a Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln^L(CH₂-NH)Phe-Phe-Gly-Leu-Leu-NH₂ sú menj účinné a spôsobujú zistiteľnú inhibíciu pri $10 \mu\text{M}$. Sú 7-krát a 46-krát menej účinné ako Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu^L(CH₂-NH)Leu-NH₂ (tabuľka III, vpravo). Najúčinnnejší pseudopeptidový antagonista odvodený od SP je Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu^L(CH₂-NH)Leu-NH₂ (obr. 1, tabuľka II).

Inhibičné pôsobenie najúčinnnejšieho pseudopeptidového antagonistu odvodeného od SP, Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu^L(CH₂-NH)Leu-NH₂ je ukázané na obr. 2. Acini sa inkubujú so vzrastajúcou koncentráciou SP. Uvoľňovanie amylázy je zistiteľné $0,1 \text{ nM}$ SP, je polovičné z maxima s 1 nM SP2 a je maximálne s 10 nM (obr. 2). Pridanie Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu^L(CH₂-NH)Leu-NH₂ spôsobuje paralelný posun hore v krivke odozvy na dávku uvoľnenia amylázy stimulovanej SP. Posun je úmerný koncentrácii pridaného Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu^L(CH₂-NH)Leu-NH₂, nie sú však žiadne zmeny maximálnej odozvy (obr. 2). D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp-

Phe-D-Trp-Leu^L(CH₂-NH)Nle-NH₂ poskytuje podobné výsledky, hodnoty nie sú znázornené.

Vzájomné pôsobenie analógov odvodených od SP a spantidu s receptormi/SP pankreatických acini sa meria schopnosťou peptidu inhibovať viazanie ¹²⁵I-BH-SP na acini (viď tabuľka III a obr. 3).

Spantidom odvodené pseudopeptidy vykazujú rôznu účinnosť. D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp-Phe-D-Trp-Leu^L(CH₂-NH)Nle-NH₂ je asi rovnako účinný ako spantid a spôsobuje zistiteľnú inhibíciu pri 0,03 μM a polovicu maximálnej inhibície pri 2,2 μM (obr. 3, vľavo, tabuľka III). D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp-Phe-D-Trp^L(CH₂-NH)Leu-Nle-NH₂ a D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln^L(CH₂-NH)D-Trp-Phe-D-Trp-Leu-Nle-NH₂ sú dvakrát menej účinné ako spantid. D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp^L(CH₂-NH)Phe-D-Trp-Leu-Nle-NH₂ je trikrát menej účinný (K_i, 6,3 μM) ako spantid. D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp-Phe^L(CH₂-NH)D-Trp-Leu-Nle-NH₂ je 7-krát menej účinný (K_i, 14,7 μM) ako spantid (obr. 3, tabuľka III).

SP odvodené pseudopeptidy tiež vykazujú rad účinností. Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu^L(CH₂-NH)Leu-NH₂ spôsobuje zistiteľnú inhibíciu pri 0,1 μM a polovinu maximálnej inhibičnej účinnosti pri 3 μM. Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly^L(CH₂-NH)Leu-Leu-NH₂ má 1,5-krát nižšiu účinnosť, Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe^L(CH₂-NH)Gly-Leu-Leu-NH₂ má 20-krát nižšiu účinnosť a Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln^L(CH₂-NH)Phe-Phe-Gly-Leu-Leu-NH₂ sú viac ako 62-krát menej účinné ako Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu^L(CH₂-NH)Leu-NH₂.

Na rozdiel od skôr študovaných SP analógov sú substancie látky P podľa vynálezu špecifické pre SP receptory.

Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu^L(CH₂-NH)Leu-NH₂ sa skúšal so zreteľom na schopnosť inhibovať uvoľňovanie amylázy vytváranej rôznymi žľazami pankreasu (tabuľka IV). Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu^L(CH₂-NH)Leu-NH₂ (20 μM) inhibuje uvoľňovanie amylázy stimulované SP, nie menej však bombezín,

CCK-8, karbachol, VIP, sekretin, CGRP A23187 alebo TPA stimulované uvoľňovanie amylázy.

Najúčinnejšie receptorové antagonisty sa skúšali so zreteľom na schopnosť inhibovať viazanie ^{125}I -(Tyr⁴)bombezínu na bombezínové receptory pankreatických acini. Spantid inhibuje viazanie ^{125}I -(Tyr⁴)bombezínu, ako je to vyššie uvedené (jensen a kol. 1988, Am. J. Physiol. 254, G883), spôsobuje polovinu maxima inhibície pri $3 \pm 1 \mu\text{M}$ a úplnú inhibíciu pri $100 \mu\text{M}$ (obr. 4). D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp-Phe-D-Trp-Leu^L(CH₂-NH)Nle-NH₂ inhibuje ^{125}I -(Tyr⁴)bombezínové viazanie, avšak je 3-krát menej účinný ako spantid spôsobujúci polovinu maximálnej účinnosti pri $10 \mu\text{M}$ (p menšie ako 0,05 v porovnaní so spantidom (obr.4). Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu^L(CH₂-NH)Leu-NH₂ nespôsobuje zistiteľnú inhibíciu až do koncentrácie nad $30 \mu\text{M}$ a má vypočítané K_i $300 \pm 20 \mu\text{M}$. Spantid a D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp-Phe-D-Trp-Leu^L(CH₂-NH)Nle-NH₂ má 3 až 10-krát nižšiu afinitu na inhibíciu ^{125}I -(Tyr⁴)bombezínovej väzby ako na ^{125}I -BH-SP.

Schopnosť Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu^L(CH₂-NH)Leu-NH₂ inhibovať viazanie ^{125}I -(Tyr⁴)bombezínu je 70-krát nižšie ako jeho schopnosť inhibovať viazanie ^{125}I -BH-SP.

Analógy substancie P (peptidy) podľa vynálezu sa môžu podávať cicavcom, najmä ľuďom, jedným z bežných spôsobov (napríklad orálne, parenterálne, transdermálne alebo transmuskulárne) vo forme prípravkov s kontrolovaným uvoľňovaním použitám biologicky odbúrateľného biokompatibilného polyméru alebo micel, gélov a lipozómov. Analógy substancie P sa podávajú ľuďom v dávke $0,5 \mu\text{g/kg/deň}$ až 5 mg/kg/deň .

Tabuľka I

5 koncových karboxylových zostatkov rôznych biologicky aktívnych peptidov

<u>peptid</u>	<u>karboxylová koncová sekvencia</u>
bombezín	-Val-Gly-His-Leu-Met-NH ₂
neuromedin-β	-Thr-Gly-His-Phe-Met-NH ₂
neuromedin-C	-Val-Gly-His-Leu-Met-NH ₂
litorin	-Val-Gly-His-Phe-Met-NH ₂
neurokinín-A	-Phe-Val-Gly-Leu-Leu-NH ₂
neurokinín B	-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH ₂
substancia P	-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH ₂
prototypická	
tachykinínová sekvencia	-Phe-X-Gly-Leu-Met-NH ₂ ,

kde X znamená rozvetvený alifatický alebo aromatický aminokyselinový zostatok.

V prípade podľa nasledujúcej tabuľky II sa acini inkubuje pri teplote 37 °C v priebehu 30 minút s 1 nM SP a 10 μM koncentráciou rôznych SP a spantidových pseudopeptidových analógov buď samostatných alebo v kombinácii. Uvoľňovanie amylázy sa vyjadruje jako % amylázovej aktivity v acini na začiatku inkubácie, ktoré sa uvoľňuje do extracelulárneho prostredia v priebehu skúšky. Hodnoty sú strednými hodnotami ± 1 SEM z aspoň piatich jednotlivých skúšok. Pri každej skúške sa každá hodnota zisťuje dvakrát. Skratky majú tento význam: NT-agonista = neskúšané jako antagonist, pretože ide o agonistu.

Tabuľka II

Vplyv rôznych pseudopeptidov odvodených od SP a spantidu na bazálne a SP-stimulované uvoľňovanie amylázy

Pridaný peptid	Uvoľňovanie amylázy (celkové %)	
	samotné	SP (1 nM)
žiadny	3,4 ± 0,5	6,6 ± 0,7
Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu ^L (CH ₂ -NH) Leu-NH ₂ (10 μM)	3,1 ± 0,7	4,3 ± 0,5
Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly ^L (CH ₂ -NH) Leu-Leu-NH ₂ (10 μM)	10,4 ± 1,0 ⁺⁺	NT-agonista
Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe ^L (CH ₂ -NH) Gly-Leu-Leu-NH ₂ (10 μM)	3,1 ± 1,0	5,4 ± 0,7 ⁺
Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe ^L (CH ₂ -NH) Phe-Gly-Leu-Leu-NH ₂ (10 μM)	3,8 ± 0,7	6,4 ± 0,3
Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln ^L (CH ₂ -NH) Phe-Phe-Gly-Leu-Leu-NH ₂ (10 μM)	3,1 ± 0,9	6,1 ± 1,0 ⁺
D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp-Phe-D-Trp-Leu ^L (CH ₂ -NH) Nle-NH ₂ (10 μM)	3,8 ± 0,05	3,6 ± 0,1 ⁺
D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp-Phe-D-Trp ^L (CH ₂ -NH) Leu-Nle-NH ₂ (10 μM)	3,9 ± 0,8	4,2 ± 0,2 ⁺
D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp-Phe ^L (CH ₂ -NH) D-Trp-Leu-Nle-NH ₂ (10 μM)	4,0 ± 0,5	5,6 ± 0,8 ⁺

D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp^L

(CH₂-NH) Phe-D-Trp-Leu-Nle-NH₂

(10 μM)

4,1 ± 0,5

4,8 ± 1,2⁺

D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln^L(CH₂-NH)

D-Trp-Phe-D-Trp-Leu-Nle-NH₂

(10 μM)

3,8 ± 0,3

4,5 ± 0,8⁺

+ výrazne menej ako samotný SP p menší ako 0,05

++ výrazne viac ako pri žiadnej prísade p menší ako 0,01.

Tabuľka III

Schopnosť SP, spantidu a pseudopeptidu inhibovať viazanie ¹²⁵I-BH-SP alebo SP-stimulované uvoľňovanie amylázy

peptid	¹²⁵ I-BH-SP	Inhibícia 1 Nmsp-stimulovaného uvoľňovania amylázy
--------	------------------------	--

D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp-Phe-D-Trp-Leu-Leu-NH₂ (spantid)

2,1 ± 0,6

3,6 ± 0,1

D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp-Phe-D-Trp-Leu^L(CH₂-NH)-Nle-NH₂

2,2 ± 0,4

1,8 ± 0,25

D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp-Phe-D-Trp^L(CH₂-NH) Leu-Nle-NH₂

3,6 ± 0,7

3,5 ± 0,6

D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp-Phe^L(CH₂-NH) D-Trp-Leu-Nle-NH₂

14,7 ± 2,0

30,8 ± 5,0

D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp^L(CH₂-NH)

Phe-D-Trp-Leu-Nle-NH ₂	6,3 ± 3,3	6,4 ± 1,4
D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln ^L (CH ₂ -NH) D-Trp-		
Phe-D-Trp-Leu-Nle-NH ₂	4,3 ± 1,1	4,7 ± 1,3
Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH ₂		
(SP)	0,0025 ± 0,005	nie-agonista
Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu ^L (CH ₂ -NH)		
Leu-NH ₂	4,3 ± 0,3	7,1 ± 0,9 ⁺
Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly ^L (CH ₂ -NH) Leu-		
Leu-NH ₂	5,6 ± 2,2	nie-agonista
Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe ^L (CH ₂ -NH) Gly-Leu-		
Leu-NH ₂	41,3 ± 16,7	väčší ako 30
Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe ^L (CH ₂ -NH) Phe-Gly-Leu-		
Leu-NH ₂	265,0 ± 89,0	väčší ako 30
Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln ^L (CH ₂ -NH) Phe-Phe-Gly-Leu-		
Leu-NH ₂	310,0 ± 88,0	väčší ako 30

Hodnoty sú strednými hodnotami ± 1SEM Kd hodnôt pre SP a získajú sa Scatchardovou analýzou ¹²⁵I-značeného SP štúdia väzby hodnôt K_i pre agonistu alebo antagonistu zo štúdia väzby ¹²⁵I-BH-SP, pričom platí rovnica $K_i = /R/1-R//SB/S + A/$, kde R je nasýtitelná väzba ¹²⁵I-BH-SP v prítomnosti antagonistu /B/, vyjadrené jako zlomok pre prípadm kedy B nie je obsiahnuté; A je koncentrácia ¹²⁵I-BH-SP /0,125 nM/. B je koncentrácia antagonistu, S je K_d SP stanovená Scatchardovou analýzou. „Nie-

agonista" znamená, že peptid nie je skúšaný na inhibičnú účinnosť pre účinnosť agonistu, pokiaľ je prítomný samotný.

Tabulka IV

Schopnosť Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu^L(CH₂-NH)Leu-NH₂ ovplyvňovať uvoľňovanie amylázy stimulovanej rôznymi faktormi

Faktor	Uvoľňovanie amylázy (celkové %)	
	samotné	Leu ¹¹ L ₁₀₋₁₁ -SP
		20 μM
Žiadny	2,7 ± 0,4	2,3 ± 0,9
substancia P (1 nM)	8,7 ± 1,8	4,3 ± 0,5 ⁺
CCK-8 (0,1 nM)	19,7 ± 4,2	21,6 ± 4,9
Bombezín (0,3 nM)	14,8 ± 4,1	14,3 ± 3,1
Karbachol (10 μM)	22,7 ± 4,1	20,7 ± 4,3
VIP (0,3 nM)	20,5 ± 3,5	18,9 ± 4,2
Sekretin (0,1 μM)	18,9 ± 3,6	18,8 ± 4,1
CGRP (0,1 μM)	12,1 ± 3,3	12,0 ± 3,9
A23187 (0,1 μM)	9,9 ± 1,5	11,6 ± 1,6
TPA (0,1 μM)	32,2 ± 5,7	30,2 ± 5,6

+ výrazne menší faktor ako faktor samotný p menší ako 0,001

Acini sa inkubujú 30 minút pri teplote 37 °C s rôznymi látkami na vylučovanie pankretického sekrétu samotné alebo s Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu^L(CH₂-NH)Leu-NH₂.

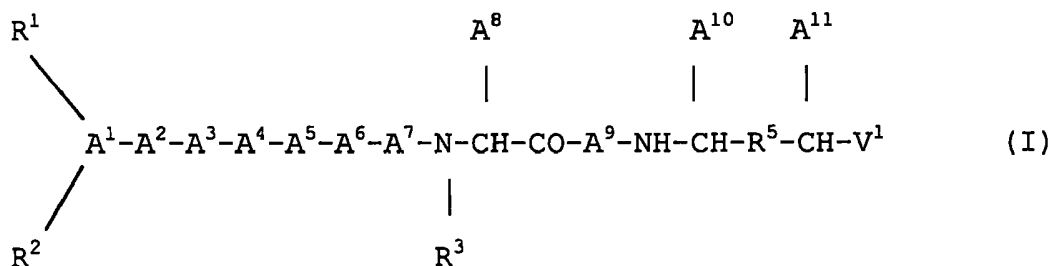
V každej skúške sa každá hodnota stanovuje dvakrát a výsledky sú stredom ±1 SEM z aspoň štyroch oddelených skúšok. Skratky majú tento význam: CCK-8, COOH koncový oktapeptid cholecystokinínu, VIP vazoaktívny intestinálny peptid, CGRP

kalcitonín na gén vzťahnutý peptid, A23187 a TPA 1,2-o-tetradekanoylforbol-1,3-acetát.

Vynález je prirodzene možné rôzne obmeňovať a modifikovať.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Analóg substancie P všeobecného vzorca I



kde

A¹ je D alebo L izomér Arg alebo LysA² je D alebo L izomér ProA³ je D alebo L izomér LysA⁴ je D alebo L izomér ProA⁵ je D alebo L izomér GlnA⁶ je D alebo L izomér Gln

A⁷ je D alebo L izomér Phe, Trp, β-Nal, o-X-Phe, v ktorom X je F, Cl, Br, NO₂, OH alebo CH₃, alebo p-X-Phe, v ktorom X je F, Cl, Br, NO₂, OH alebo CH₃

A⁸ je identifikačná skupina D alebo L izoméru Trp, β-Nal, o-X-Phe, v ktorom X je F, Cl, Br, NO₂, OH alebo CH₃, alebo p-X-Phe, v ktorom X je F, Cl, Br, NO₂, OH alebo CH₃

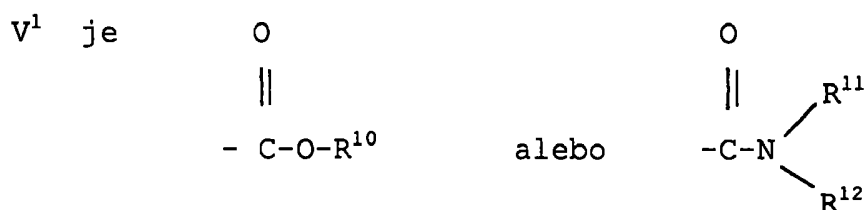
A⁹ je Gly alebo D alebo L izomér Trp, β-Nal, o-X-Phe, v ktorom X je F, Cl, Br, NO₂, OH alebo CH₃, alebo p-X-Phe, v ktorom X je F, Cl, Br, NO₂, OH alebo CH₃

A¹⁰ je identifikačná skupina D alebo L izoméru Leu, Nle, Ala, Val alebo Ile

A¹¹ je identifikačná skupina D alebo L izoméru Leu, Nle, Ala, Val alebo Ile

R^3 je H alebo C_{1-12} alkyl

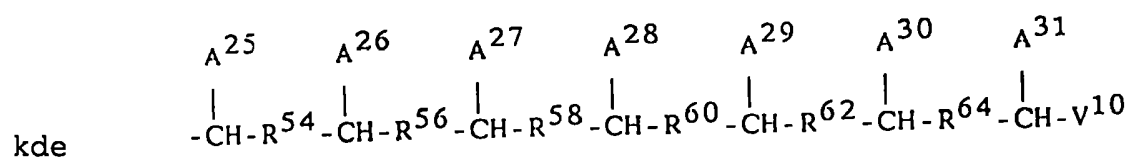
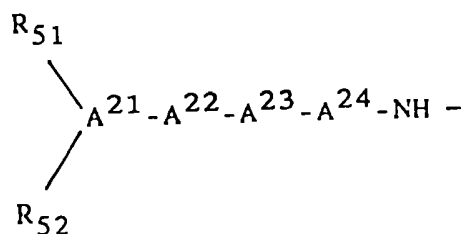
R^5 je CH_2-NH a



v ktorých každý R^{10} , R^{11} a R^{12} je nezávisle H, C_{1-12} alkyl, C_{7-10} fenylalkyl alebo C_{12-20} naftylalkyl a

R^1 a R^2 , ktoré sú viazané na α -aminodusíkový atóm N-koncovej aminokyseliny sú nezávisle H, C_{1-12} alkyl, C_{7-10} fenylalkyl alebo COE_{M}^{14} , kde E_{M}^{14} je C_{1-20} alkyl, C_{3-20} alkenyl, C_{3-20} alkinyl, fenyl, naftyl alebo C_{7-10} fenylalkyl za podmienky, že ak jeden zo symbolov R^1 alebo R^2 je COE_{M}^{14} , druhý musí byť atóm vodíka, alebo jeho farmaceuticky prijateľné soli.

2. Analóg substancie P všeobecného vzorca



A^{21} je D alebo L izomér Arg alebo Lys

A^{22} je D alebo L izomér Pro

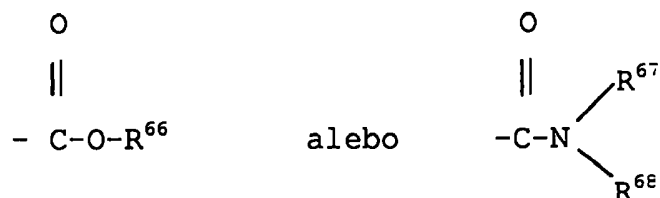
A^{23} je D alebo L izomér Lys

A^{24} je D alebo L izomér Pro

A^{25} je identifikačná skupina D alebo L izoméru Gln

A^{26} je identifikačná skupina D alebo L izoméru Gln

- A²⁷ je identifikačná skupina D-Trp alebo identifikačná skupina D alebo L izoméru Phe
- A²⁸ je identifikačná skupina D alebo L izoméru aminokyseliny zo súboru β -Nal, Phe, o-X-Phe, kde X je F, Cl, Br, NO₂, OH alebo CH₃, alebo p-X-Phe, v ktorom X je F, Cl, Br, NO₂, OH alebo CH₃
- A²⁹ je identifikačná skupina aminokyseliny D-Trp alebo identifikačná skupina D alebo L izoméru Phe
- A³⁰ je identifikačná skupina D alebo L izoméru aminokyseliny zo skupiny Leu, Nle, Ala, Val alebo Ile
- A³¹ je identifikačná skupina D alebo L izoméru aminokyseliny zo skupiny Leu, Nle, Ala, Val alebo Ile
- R⁵⁴ je CO-NH alebo CO-NCH₃
- R⁵⁶, R⁶² a R⁶⁴ sú nezávisle CO-NH alebo CH₂-NH
- R⁵⁸ je CO-NR⁶⁹, v ktorom R⁶⁹ je H alebo C₁₋₁₂ alkyl alebo CH₂-NH
- R⁶⁰ je CO-NH a
- V¹ je



v ktorých každý R⁶⁶, R⁶⁷ a R⁶⁸ je nezávisle H, C₁₋₁₂ alkyl, C₇₋₁₀ fenylalkyl alebo C₁₂₋₂₀ naftylalkyl a

- R⁵¹ a R⁵², ktoré sú viazané na α -aminodusíkový atóm N-koncovej aminokyseliny sú nezávisle H, C₁₋₁₂ alkyl, C₇₋₁₀ fenylalkyl alebo COE₂₄²⁴, kde E₂₄²⁴ je C₁₋₂₀ alkyl, C₃₋₂₀ alkenyl, C₃₋₂₀ alkinyl, fenyl, naftyl alebo C₇₋₁₀ fenylalkyl za podmienky, že ak jeden zo symbolov R⁵¹ a R⁵² je COE₂₄²⁴, druhý musí byť atóm vodíka, pričom najmenej jeden zo symbolov R⁵⁶, R⁵⁸, R⁶² alebo R⁶⁴ je CH₂NH, alebo jeho farmaceuticky prijateľné soli.

3. Analóg substance P podľa nároku 1 vzorca H-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu^L[CH₂-NH]Leu-NH₂ alebo jeho farmaceuticky prijateľná soľ.
4. Analóg substance P podľa nároku 2 vzorca H-D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp-Phe-D-Trp^L[CH₂-NH]Leu-Nle-NH₂ alebo jeho farmaceuticky prijateľná soľ.
5. Analóg substance P podľa nároku 2 vzorca H-D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp-Phe-D-Trp-Leu^L[CH₂-NH]Nle-NH₂ alebo jeho farmaceuticky prijateľná soľ.
6. Analóg substance P podľa nároku 2 vzorca H-D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-D-Trp^L[CH₂-NH]Phe-D-Trp-Leu-Nle-NH₂ alebo jeho farmaceuticky prijateľná soľ.
7. Analóg substance P podľa nároku 2 vzorca H-D-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln^L[CH₂-NH]D-Trp-Phe-D-Trp-Leu-Nle-NH₂ alebo jeho farmaceuticky prijateľná soľ.
8. Analóg substance P podľa nároku 1, kde
 - A¹ je D alebo L izomér Arg
 - A² je Pro
 - A³ je Lys
 - A⁴ je Pro
 - A⁵ je Gln
 - A⁶ je Gln
 - A⁷ je Phe alebo D-Trp
 - A⁸ je identifikačná skupina Phe
 - A⁹ je Gly alebo D-Trp
 - A¹⁰ je identifikačná skupina Leu a
 - A¹¹ je identifikačná skupina Leu alebo Nle.

9. Analóg substancie P podľa nároku 2, kde A^{29} je identifikačná skupina D-Trp.

10. Analóg substancie P podľa nároku 2, kde

A^{21} je D alebo L izomér Arg

A^{22} je Pro

A^{23} je Lys

A^{24} je Pro

A^{25} je identifikačná skupina Gln

A^{26} je identifikačná skupina Gln

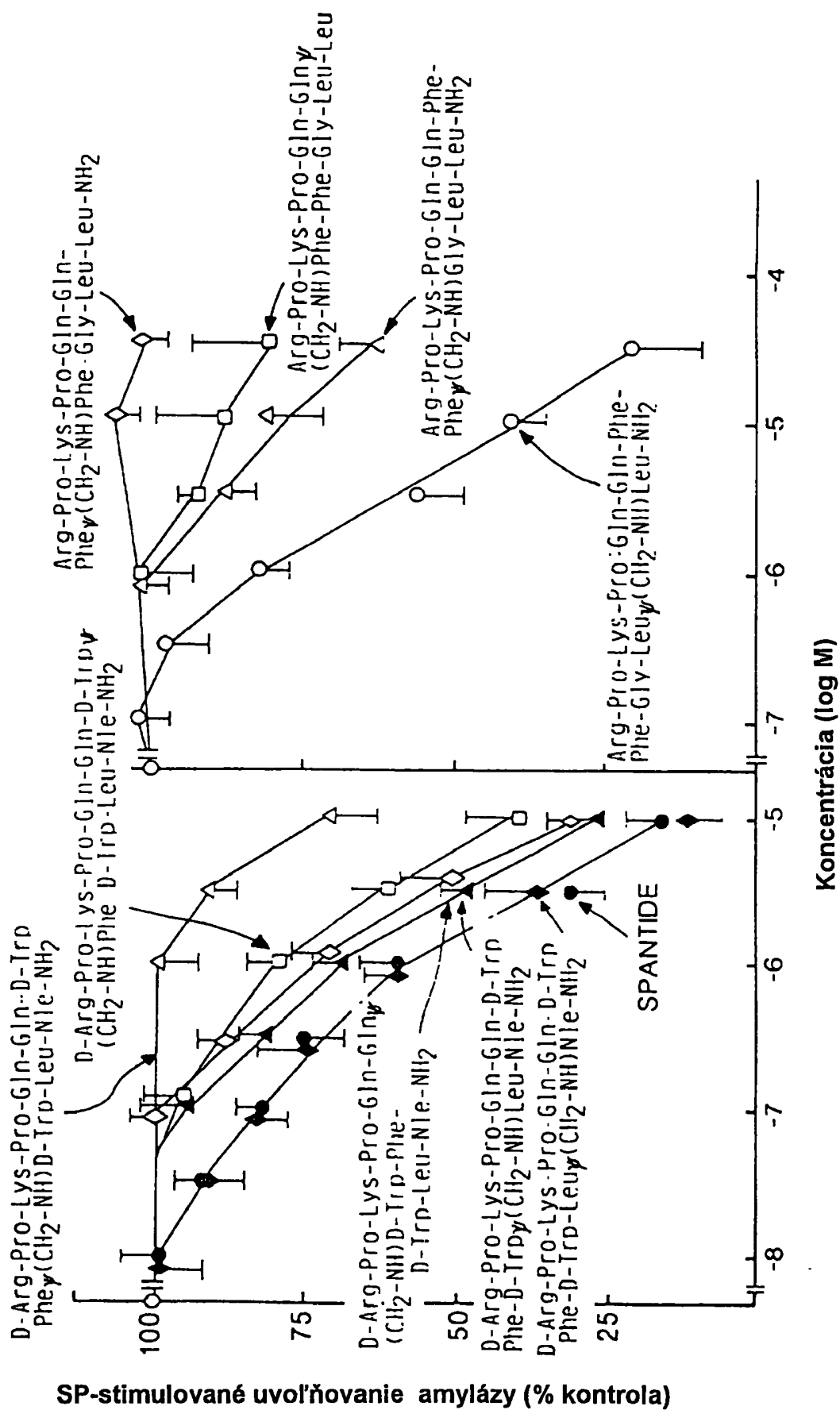
A^{27} je identifikačná skupina Phe alebo D-Trp

A^{28} je identifikačná skupina Phe

A^{29} je identifikačná skupina D-Trp

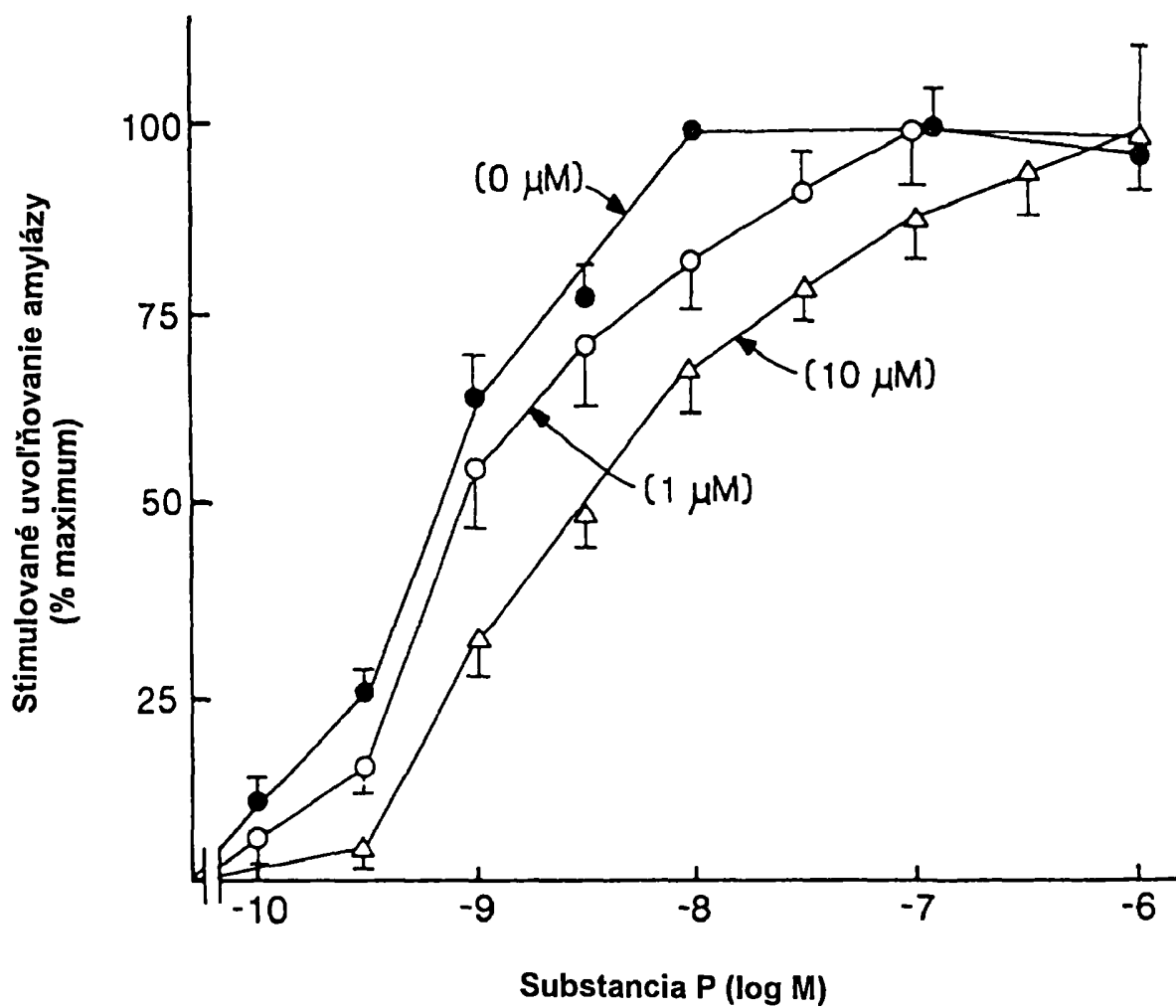
A^{30} je identifikačná skupina Leu a

A^{31} je identifikačná skupina Leu alebo Nle.

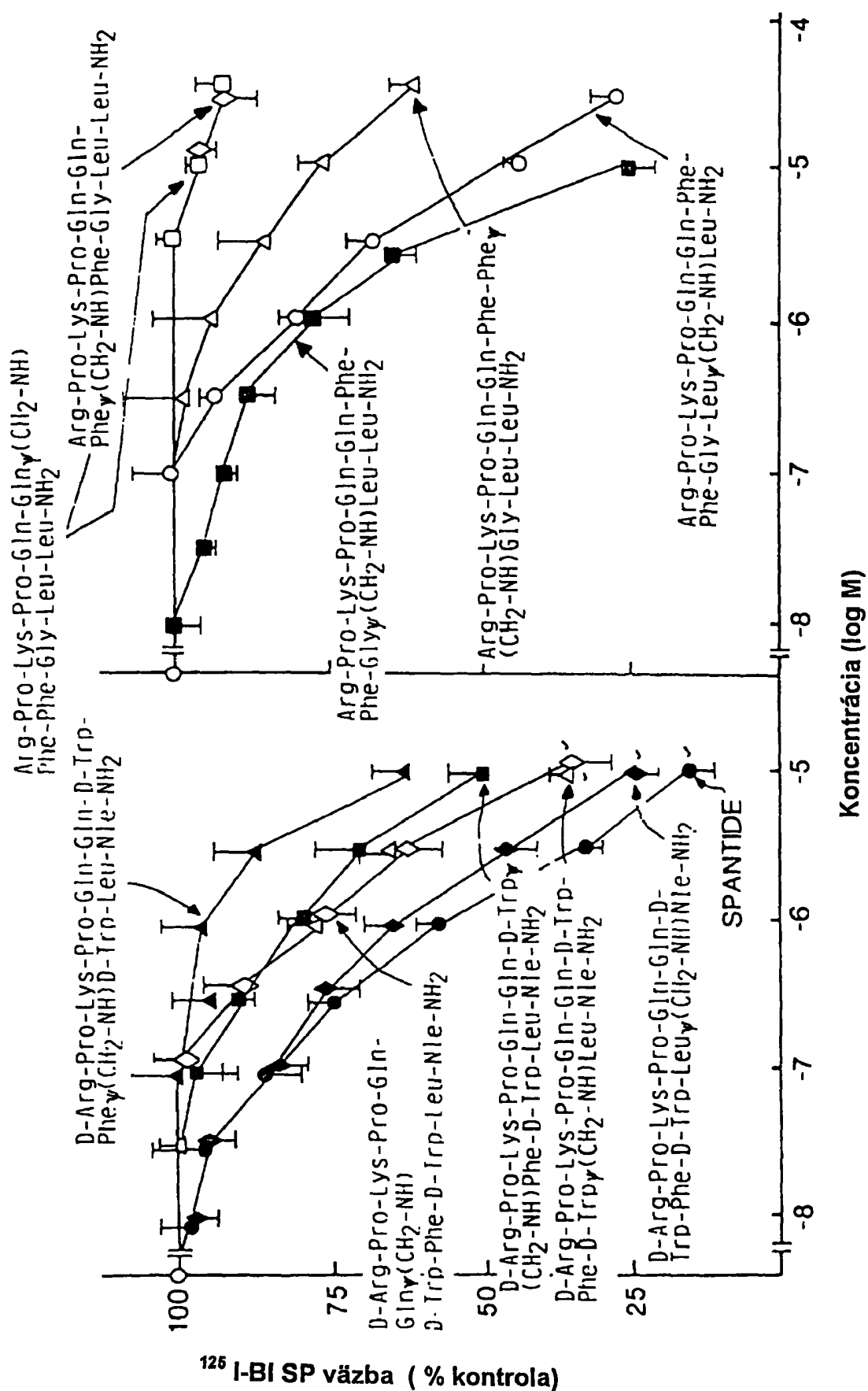


Obr. 1

Obr. 2



Obr. 3



Obr. 4

