



HU000227640B1

(19) **HU**(11) Lajstromszám: **227 640**(13) **B1****MAGYARORSZÁG**
Szellemi Tulajdon Nemzeti Hivatala

SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: **P 01 00626**(22) A bejelentés napja: **1998. 12. 22.**(40) A közzététel napja: **2001. 08. 28.**(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi Közlöny és Védjegyertesítőben: **2011. 10. 28.**(51) Int. Cl.: **C07K 51/07** (2006.01)**A61K 38/07** (2006.01)**C07K 51/17** (2006.01)**A61P 29/00** (2006.01)

(86) A nemzetközi (PCT) bejelentési szám:

PCT/US 98/27282

(87) A nemzetközi közzétételi szám:

WO 9932510

(30) Elsőbbségi adatok:

08/997,208**1997. 12. 23.****US**

(72) Feltaláló(k):

Junien, Jean-Louis, Sevres (FR)**Riviere, Pierre J. M., San Diego, Kalifornia (US)****Diaz, Javier Sueiras, La Jolla, Kalifornia (US)****Trojnar, Jerzy A., Solana Beach, Kalifornia (US)****Vanderah, Todd W., Tucson, Arizona (US)****Schteingart, Claudio D., La Jolla, Kalifornia (US)**

(73) Jogosult(ak):

Cara Therapeutics, Inc., Tarrytown, New York (US)

(74) Képviselő:

SBGK Szabadalmi Ügyvivői Iroda, Budapest(54) **Kappa receptor opioid tetra peptidek és ezeket hatóanyagként tartalmazó gyógyszerkészítmények**

(57) Kivonat

A találmány olyan szintetikus opioid peptidekre vonatkozik, melyek nagy hatású szelektív kappa receptor agonisták, nem szívárognak be az agyba, és in vivo hosszantartó fájdalomcsillapító aktivitásúak.

Ezek a peptidek négy D-izomer aminosavból álló szekvenciát tartalmaznak, ahogyan ezt az (I) általános képlet bemutatja.

Példák ezekre a peptidekre pl. a következők:

H-D-fenil-alanin-D-fenil-alanin-D-norleucin-D-arginin-etil-amid,
H-D-fenil-alanin-D-fenil-alanin-D-norleucin-D-arginin-morfolid,
H-D-fenil-alanin-D-fenil-alanin-D-norleucin-D-arginin-4-pikolil-amid,
H-D-fenil-alanin-D-fenil-alanin-D-norleucin-D-arginin-propil-amid,
H-D-fenil-alanin-D-fenil-alanin-D-norleucin-D-arginin-tiomorfolid,
H-D-fenil-alanin-D-fenil-alanin-D-norleucin-D-arginin-dietil-amid,
H-D-fenil-alanin-D-fenil-alanin-D-norleucin-D-arginin-metil-amid,
H-D-fenil-alanin-D-fenil-alanin-D-leucin-D-ornitin-morfolid,

A találmány tárgyát képezik a fenti peptideket tartalmazó gyógyszerkészítmények is.

I

H-Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Xaa₄-Q

70.634/PA
P0100626
2006. április

S. E. G. & K.
Szabadalmi Ügyvédi Iroda
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
Telefon: 461-1000, Fax: 461-1099

8

Kappa receptor opioid peptidok

NYOMDAPÉLDÁNY

A találmány szintetikus opioid peptidokra vonatkozik, amelyek négy aminosavat tartalmaznak és affinitást mutatnak a kappa opioid receptor iránt. Ezek az opioid peptidok nagy hatású szelektív kappa receptor agonisták. Ezek közé tartoznak azok az agonisták, melyek (a) nem szívárognak be az agyba és (b) hosszantartó fájdalomcsillapító aktivitásúak *in vivo*.

A kappa opioid receptorok (KOR-ok) az agyban, gerincvelőben, és a központi és perifériális idegvégződésekben és az elsődleges érző afferensek sejttesteiben, valamint az immunsejteken vannak jelen. A KOR-okat aktiváló molekulákat általánosságban kappa agonistáknak hívjuk.

Az agyban elhelyezkedő KOR-ok aktivációjáról kimutatták, hogy fájdalomcsillapító hatást hoznak létre. Ez a felismerés vezetett olyan agyba behatoló, nem peptid típusú kappa agonisták kifejlesztését célzó kísérletekhez, eredeti fájdalomcsillapítóként való alkalmazás céljából, melyek a mű opioid receptorokra (MOR-okra) ható morfinanalógok nem kívánt mellékhatásait (székrekedés, légzésgyengülés, dependence és addictionfüggőség*) nem mutatják. Ennek a vegyületosztálynak a fájdalomcsillapító hatását valamint a "mű-opioid-szerű" mellékhatások hiányát állatokban és emberben is megállapították. Azonban a szisztémás kappa agonisták kifejlesztését nem folytatták, mivel kimutatták róluk, hogy szintén specifikus mellékhatásokat, mint például fokozott vizelet-kiválasztást, szedálást és depressziót közvetítenek az agyban lévő kappa

MEGADÁS ALAPJÁUL
SZOLGÁLÓ VÁLTOZAI

receptorokon keresztül.

A szupraspinális KOR-ok mellett a periférián vagy a gerincvelőben elhelyezkedő KOR-ok szintén fájdalomcsillapítást hozhatnak létre. Azonban sem a perifériás, sem a gerincvelői KOR-okhoz nem kapcsolódnak a szisztémás kappa antagonisták mellékhatásai. Ezért feltéve, hogy lehetséges olyan kappa receptor opiocid agonistákat létrehozni, melyek nem jutnak be az agyba (a perifériás vagy gerincvelői beadást követően), lehetségessé válik biztonságos és eredeti fájdalomcsillapítók létrehozása.

A kappa agonisták perifériás fájdalomcsillapítást hoznak létre az enyhe és lokális gyulladás által kiváltott intesztinális valamint vastagbél hiperalgézia (fokozott fájdalomérzékenység) modellekben, és az irritálható Bowel szindróma (IBS), mely fokozott zsigeri fájdalommal jár egy valószínűleg lokális gyulladásához kapcsolódó zsigeri túlérzékenységnek köszönhetően, szintén célpontja a perifériális kappa agonistáknak. A gyomor-bél rendszer mellett más olyan patológiás állapotot mutató zsigerek, melyek részt vesznek a primer érző afferensek aktivációjában és/vagy érzékenyítésében (azaz lokális gyulladásban), szintén egy ilyen kappa receptor opiocid megfelelő célpontjának tekinthetőek. A kappa agonisták a neurogén gyulladást is gátolják a szomatikus szövetekben a P anyag primer érző afferensekből való felszabadulásának gátlásával, és az is ismert, hogy az immunrendszerre is hatnak, és elsődlegesen egy inhibitor hatást mutatnak az immunsejtekre.

Különösen előnyösek azok a peptidek, melyek nem lépnek be az agyba, a MOR-rai nem, de a KOR-rai szemben nagy affinitásúak,

nagy a potenciáljuk és a hatékonyságuk, és hosszantartó a hatásuk *in vivo*. Az 5 610 271 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás négy D-izomer aminosav-maradékot tartalmazó tetrapeptidekre vonatkozik, melyek a KOR-okhoz kötődnek, de ezek a peptidek nem mutatják az összes fentebb felsorolt kívánatos jellemzőt.

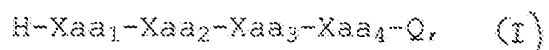
A peptidek egy olyan csoportját fedeztük fel, melyek nagy szelektivitást mutatnak a KOR-ral szemben, hosszantartó *in vivo* hatásúak, és nem mutatnak jelentős agyi penetrációt.

Ezek a peptidek négy D-izomer aminosav szekvenciáját tartalmazzák, melyeknek egyszeresen vagy kétszeresen szubsztituált amidból álló C-terminális végük van. Ezek a vegyületek a következő általános képletnek felelnek meg:

H-Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Xaa₄-szubsztituált amid,
 mely képletben Xaa₁ jelentése (A)D-Phe, (C₆Me)D-Phe, D-Tyr, D-Tic vagy (ciklopentil vagy tienil)-D-Ala, ahol A jelentése hidrogénatom, nitrocsoport, fluoratom, klóratom vagy metilcsoport; Xaa₂ jelentése (A')D-Phe, D-1Nal, D-2Nal, D-Tyr vagy D-Trp, ahol A' jelentése A vagy 3-as és 4-es helyzetű klóratom; Xaa₃ jelentése D-Nle, (B)D-Leu, D-Hle, D-Met, D-Val, D-Phe, vagy ciklopentil-D-Ala, ahol B jelentése hidrogénatom vagy metilcsoport a C_α-n; Xaa₄ jelentése D-Arg, D-Har, D-nArg, D-Lys, D-Ily, D-Arg(Et₂), D-Har(Et₂), D-Amf, D-Gmf, D-Dbu, D-Orn vagy D-Ior.

Előnyös amidok közé tartozik az etilamid, morfolid, tiomorfolid, 4-pikolil-amid, piperazid, propilamid, ciklopropilamid, dietilamid és szubsztituált benzilamid.

A találmány egyik tárgyában a találmány olyan szintetikus opioid peptid-amidokat vagy gyógyászatilag elfogadható sóit biztosítja, melyeknek akkora affinitása van a kappá opioid receptorokkal szemben, ami legalább 1000-szerese a mű opioid receptorokkal szembeni affinitásának, és mely hosszantartó hatást mutat, amikor *in vivo* beadjuk, és mely peptidek a következő általános képletnek felelnek meg:



mely képletben Xaa₁ jelentése (A)D-Phe, (C₆Me)D-Phe, D-Tyr, D-Tic vagy (ciklopentil vagy tienil)-D-Ala, ahol A jelentése hidrogénatom, nitrocsoport, fluoratom, klóratom vagy metilcsoport; Xaa₂ jelentése (A')D-Phe, D-1Nal, D-2Nal, D-Tyr vagy D-Trp, ahol A' jelentése A vagy 3-as és 4-es helyzetű klóratom; Xaa₃ jelentése D-Nle, (B)D-Leu, D-Hle, D-Met, D-Val, D-Phe, vagy D-ciklopentil-Ala, ahol B jelentése hidrogénatom vagy metilcsoport a C_α-n; Xaa₄ jelentése D-Arg, D-Har, D-nArg, D-Lys, D-Ily, D-Arg(Et₂), D-Har(Et₂), D-Amf, D-Gmf, D-Dbu, D-Orn vagy D-Ior; és Q jelentése NHR₁R₂, morfolinil-, tiomorfolinil-, (C)piperidinil-, piperazinil-, 4-mono-vagy 4,4-diszubsztituált piperazinil-, vagy ε-lizilcsoport, ahol R₁ jelentése kis szénatomszámú alkil-, szubsztituált kis szénatomszámú alkil-, benzil-, szubsztituált benzil-, amino-ciklohexil-, 2-tiazolil-, 2-pikolil-, 3-pikolil-, 4-pikolil-, egy ω-(acilamino)polimetilén- vagy egy poli(oxietilén)-csoport, és R₂ jelentése hidrogénatom vagy kis szénatomszámú alkilcsoport; és C jelentése hidrogénatom, 4-hidroxi- vagy 4-oxo-csoport.

A találmány további tárgya ezeknek a vegyületeknek az alkalmazása zsigeri fájdalmakban és hasonlóakban, húgyhólyag

instabilitásban és hasonlóakban, vagy IBD-ben vagy autoimmun rendellenességekben szenvedő humán betegek kezelésére vagy nem humán emlősök hasonló kezelésére.

Az előnyös megvalósítási módok rövid ismertetése

A peptidek meghatározására használt nevezéktant Schroeder és Lubke adta meg [The Peptides, Academic Press, (1965)], melyben a hagyományos ábrázolásnak megfelelően az N-terminális vég a baloldalon és a C-terminális vég a jobb oldalon található. Ahol az aminosav-maradéknak izomer formái vannak, ez az aminosav L-izomer formáját jelenti, hacsak nem azt kifejezetten másként nem jelöljük.

Ahogy fentebb jeleztük, a találmány olyan peptideket biztosít, melyek szelektívek a KOR-ra, és nem csak erős KOR affinitást mutatnak, hanem hosszantartó *in vivo* bicaktivitást is. Ezeknek a kappa szelektív opióid peptideknek legalább 1000-szer nagyobb a kötési affinitása a KOR-ral szemben, mint a MOR-ral szemben, ahol számos vegyület legalább 10 000-szer nagyobb affinitást mutat, és néhány vegyület 20 000-szer vagy még többször nagyobb affinitást mutat. Ezen kívül számos indikációnál fontos, hogy az ilyen nagymértékű szelektivitással együtt a kappa agonistáknak nem szabad jelentős agyi beszivárgást mutatniuk, és egy meghosszabbodott időtartamú *in vivo* fájdalomcsillapító hatással kell rendelkezniük.

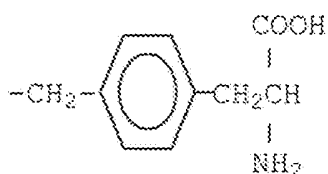
Ezért a fentebb említett szelektivitás mellett az előnyben részesített vegyületek nem mutatnak jelentős agyi beszivárgást, míg alapvető aktivitásukat legalább egy órán át megőrzik, ahol a még előnyösebb vegyületek jelentősen aktívak maradnak legalább 2 órán át, és a legelőnyösebb vegyületek ezt a jelentős aktivitást

három órán át vagy tovább is kifejezik.

Az alábbi rövidítéseket használjuk a leírás egészében. D-Nle jelentése D-norleucin, és D-Hle D-homoleucint képvisel. D-Har jelentése D-homoarginin, és D-nArg jelentése D-norarginin, mely egy szénatommal rövidebb, mint a D-Arg. D-Nal az alanin olyan D-izomerjét jelenti, mely naftil-csoporttal szubsztituált a β -szénatomon. Előnyösen D-2Nal-t alkalmazunk, azaz a naftalén a gyűrűszerkezet 2-es helyzetű atomjához kapcsolódik; mindemellett D-1Nal is használható. A D-Cpa klór-D-Phe-t és a D-Fpa fluor-D-Phe-t jelent, és a D-4Cpa-t, D-2Fpa-t, D-3-Fpa-t és a D-4Fpa-t részesítjük előnyben. D-Npa jelentése nitro-D-Phe, és D-Mpa metil-D-Phe-t jelent. D-3,4Cpa jelentése 3,4-diklór-D-Phe. D-Acp jelentése D-ciklopentil-Ala. D-Orn jelentése D-ornitin, és D-Dbu alfa,gamma-diamino- γ -vajsavat jelent. CML jelentése C_{α} -metil-Leu, és CMP jelentése C_{α} Me-Phe. A D-4Amf D-4-(NH_2CH_2)Phe-t jelent, és a D-Gmf D-amf(amidino)-t, mely olyan D-Phe, melyben a 4-es szénatom $CH_2NHC(NH)NH_2$ -csoporttal szubsztituált. D-Tic jelentése D-1,2,3,4-tetrahidro-izokinolin-3-karboxilsav. Az Ala(Thi)-ben Thi tienil-csoportot jelent, mely előnyösen a 2-es helyzetű szénatomon keresztül kötődik az alaninhoz, bár a 3-tienil-csoport is egyenértékű vele. Ily jelentése izopropil-Lys, és Ior izopropil-Orn, melyben az aminocsoport oldallánc izopropilcsoporttal alkilezett.

A kis szénatomszámú alkilcsoport jelentése 1-6 szénatomszámú alkilcsoport, magában foglalva a cikloalkilcsoportot is, és az 1-6 szénatomszámú alkilcsoport előnyösen ciklopropil- és ciklobutilcsoport. Me jelentése metilcsoport, Et-é etilcsoport, Pr-é propilcsoport, Ipr-é izopropilcsoport, Bu-é butilcsoport,

Pn-é pentilcsoport és Bzl-é benzilcsoport. Cyp jelentése ciklopropilcsoport, és Cyb jelentése ciklobutilcsoport. Bár a kapcsolódás előnyösen az alkillánc egyik végénél található, az lehet bárhol a láncon, ilyen például a 3-pentilcsoport, melyre etil-propil-csoportként hivatkozunk. Az Ahx jelentése 6-amino-hexil-csoport, azaz $-(\text{CH}_2)_6-\text{NH}_2$. A 4Acx jelentése 4-amino-ciklohexil-csoport, és hEt jelentése hidroxietil-csoport, azaz $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$. A szubsztituált benzilcsoportok közé tartozik a 4Nbz és 4Abz, mely jelentése 4-nitro-benzil- és 4-amino-benzil-csoport, és Aeb jelentése 4-(2-amino-2-karboxi-etil)-benzil-csoport, azaz



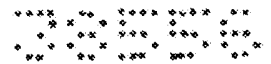
2-, 3- és 4-pikolil-csoport (2Pic, 3Pic és 4Pic) jelentése metilpiridin-csoport, melyeknél a kapcsolódások a 2-, 3- vagy 4-es helyzetű szénatomnál találhatóak. Mor jelentése morfolinil-csoport, azaz



, és Tmo jelentése tiomorfolinil-csoport

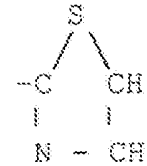


Pip jelentése piperidinilcsoport (piperidilcsoport), és 4HyP jelentése 4-hidroxi-piperidin-1-il-csoport és 4-oxo-piperidin-1-il-csoport. Ppz jelentése piperazinilcsoport. Ecp jelentése 4-etil-karbamoil-piperazin-1-il-csoport; Pop jelentése 4-fenil-karbamoil-piperazin-1-il-csoport. Alkalmazhatunk kvaterner ammóniumcsoportokat, mint például 4,4-dimetil-piperazin-1-il-csoportot (Dmp)-t vagy más kétszeres kis szénatomszámú



helyettesítéseket szintén alkalmazhatunk.

2Tzl jelentése 2-tiazolil-csoport, azaz



Ely jelentése ϵ -lizilcsoport, melyben az L-lizin aminocsoport oldallánca egy amidkötéssel csatlakozik a C-terminális véghez.

Ahogy fentebb említettük, R_1 egy ω -(acilamino)polimetilén-csoport vagy egy poli(oxietilén)-csoport, mint például Aao, Aoo, Hoh, Ghx vagy Gao lehet. Aoo jelentése 8-(acetilamino)-3,6-dioxa-okt-1-il-csoport, azaz $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{Ac}$. Aoo jelentése 8-amino-3,6-dioxa-okt-1-il-csoport, azaz $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}_2$. Hoh jelentése 6-(L-hidro-orotil-amino)-hex-1-il-csoport, azaz $-(\text{CH}_2)_6-\text{NH}-(\text{L-hidro-orotil})$; az L-hidro-orotilsav $\text{C}_4\text{N}_2\text{H}_5(\text{O})_2-\text{COOH}$. Ghx jelentése 6-(D-glükonil-amino)-hexil-csoport, azaz $-(\text{CH}_2)_6-\text{NH}-\text{CO}-(\text{CHOH})_4-\text{CH}_2\text{OH}$. Gao jelentése 6-(D-glükonil-amino)-3,6-dioxa-okt-1-il-csoport, azaz $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}(\text{CHOH})_4-\text{CH}_2\text{OH}$.

A D-Phe-t vagy a szubsztituált D-Phe-t részesítjük előnyben az 1-es helyzetben. A fenilgyűrű szubsztituált lehet a 2-es, 3-as és/vagy 4-es helyzetű szénatomnál, és általában a 2-es vagy 4-es helyzetű klórt vagy fluort tekintjük előnyösnek. Az α -szénatom metilezett is lehet. Más, a D-Phe-hez hasonló ekvivalens csoportok is alkalmazhatóak, ezek közé tartozik a tienil-D-Ala, ciklopentil-D-Ala, D-Tyr és D-Tic. A 2-es helyzetű csoport előnyösen szintén D-Phe vagy szubsztituált D-Phe, ahol a



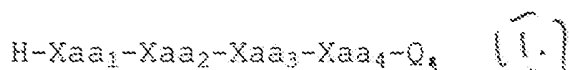
szubsztitúciókat előnyösen a fenilgyűrű 4-es helyzetű szénatomján vagy a 3-as és 4-es helyzetben lévő szubsztituensek képviselik. Alternatív lehetőségként naftil-csoporttal szubsztituált D-alanin alkalmazható, valamint D-Trp és D-Tyr. A 3-as helyzetet előnyösen egy D-Nle, D-Leu, D-CML, D-Hle, D-Met vagy D-Val foglalja el; mindemellett ciklopentil-D-Ala vagy D-Phe szintén alkalmazható. A D-Arg-ot (mely dietilcsoporttal lehet szubsztituálva) és a D-Orn-t (mely delta-aminocsoportján alkilezve lehet, például izopropilcsoporttal) általában előnyben részesítjük a 4-es helyzetben; mindemellett D-nArg és más ekvivalens csoportok is alkalmazhatók, így D-Lys (mely szintén alkilezett lehet az epszilon aminocsoportján) és a D-Har (mely dietilcsoporttal lehet szubsztituálva). Ezenfelül D-Gmf, D-Dbu, D-4Amf és D-His is alkalmazható.

Bár az volt várható, hogy a biológiai hatás időtartama meghosszabbodik a 4 D-izomer aminosavból álló szekvencia alkalmazásával, meglepő módon azt találtuk, hogy a hatóidő általában egészen rövid a szubsztituálatlan amidnál, és hosszú hatóidőt csak akkor kaptunk, amikor a C-terminális végen egy szubsztituált amid volt. Az egyszeri szubsztitúció etil-, metil-, propil-, ciklopropil- és pikolil-csoport valamint más egyenértékű csoport lehet, így hidroxietil-, tiazolil-, aminociklohexil-, benzil- és szubsztituált benzilcsoport. Általánosságban a kis szénatomszámú alkil- vagy pikolil-szubsztituenseket részesítjük előnyben az egyszeresen szubsztituált amidok esetében. Az egyszeresen szubsztituált amidok helyett egy dialkil-szubsztitúció, például dietil-aminocsoport jelent alternatívát; mindemellett a kétszeresen

szubsztituált C-terminális végen egy morfolinil-, tiomorfolinil- vagy piperidinil-csoport lehet, az utóbbi szubsztituálatlan vagy 4-hidroxi- vagy 4-oxocsoporttal szubsztituált. Alkalmazhatunk egy piperazinil- vagy 4-mono- vagy 4,4-diszubsztituált piperazinil-csoportot is, mint például e-lizil-csoportot.

Megállapítottuk, hogy a kötődés általában a tetrapeptid aminosav-szekvenciájának tulajdonsága, és előnyösen a szelektiv kappá receptor opioid peptidek akkor mutatnak kötési affinitást a kappá receptorral szemben, ha a K_1 -jük körülbelül 2 nM vagy kevesebb. A hosszú hatóidő, melyről úgy gondoljuk, hogy elsődlegesen a C-terminális véghez kapcsolódó amid szerkezetének tulajdonsága, hatásosan tesztelhető a későbbiekben ismertetett fájdalomcsillapító mérővizsgálattal, és a legelőnyösebb peptidek alapvető biológiai aktivitást mutatnak két vagy három órán át, és nincs szignifikáns hatásuk az agyra.

Az opioid peptidek korábban ismertetett csoportjának előnyben részesített alcsoportja a következő képlettel rendelkezik:

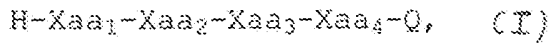


ahol Xaa_1 jelentése D-Phe (szubsztituálatlan vagy metilcsoporttal a C_α -n, 2-es helyzetű fluoratómmal, 4-es helyzetű fluoratómmal vagy 4-es helyzetű klóráttal szubsztituált) vagy (ciklopentil vagy tienil)-D-Ala; Xaa_2 jelentése (A')D-Phe, D-1Nal, D-2Nal vagy D-Trp, ahol A' jelentése hidrogénatom, 4-es helyzetű fluoratom, 4-es helyzetű klóratom, 4-nitro- vagy 3-as és 4-es helyzetű klóratom; Xaa_3 jelentése D-Nle, D-Leu, D-CML, D-Met vagy D-Acp; Xaa_4 jelentése D-Arg, D-Arg(Et_2), D-Lys, D-Ily, D-Har, D-Har(Et_2), D-nArg, D-Orn, D-Ior, D-Dbu, D-Amf és D-Gmf; és Q jelentése NR_1R_2 , Mor, Tmo, Pip, 4-HyP, OxF vagy Ppz, ahol R_1



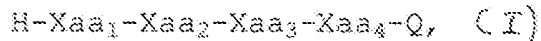
jelentése Me, Et, Pr, Bu, hEt, Cyp, Bzl vagy 4-pikolil-csoport, és R₂ hidrogénatom vagy Et.

A kappa opioid peptidek egy további előnyös alcsoportja a következő képlettel rendelkezik:



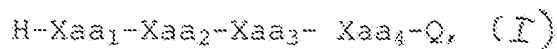
ahol Xaa₁ jelentése D-Phe, D-4Fpa, D-2Fpa, D-4Cpa, D-Acp vagy D-Ala(Thi); Xaa₂ jelentése D-Phe, D-4Fpa, D-4Cpa, D-3,4Cpa, D-1Nal, D-2Nal vagy D-Trp; Xaa₃ jelentése D-Nle, D-Met, D-CML vagy D-Leu; Xaa₄ jelentése D-Arg, D-Lys, D-Har, D-nArg vagy D-Orn; és Q jelentése NR₁R₂, Mor, Tmo, Pip, 4Hyp vagy Ppz, ahol R₁ jelentése Et, Pr, Bu, Cyp, hEt, Bzl vagy 4Pic és R₂ jelentése hidrogénatom vagy Et.

A kappa opioid peptidek egy további előnyös alcsoportja a következő képletű:



ahol Xaa₁ jelentése D-Phe, D-4Fpa, D-2Fpa, D-Acp vagy D-Ala(2Thi); Xaa₂ jelentése (A)D-Phe, D-1Nal, D-2Nal vagy D-Trp, ahol A jelentése 4-es helyzetű fluoratom vagy 4-es helyzetű klóratom; Xaa₃ jelentése D-Nle, D-Met vagy D-Leu; Xaa₄ jelentése D-Arg, D-Har, D-nArg, D-Lys, D-Orn vagy D-Gmf; és Q jelentése NHR₁, Mor, Tmo, Pip vagy Ppz, ahol R₁ jelentése Et, Pr vagy Pic.

A kappa opioid peptidek egy másik előnyös alcsoportja a következő képlettel rendelkezik:



ahol Xaa₁ jelentése D-Phe, D-4Fpa, D-2Fpa vagy D-Ala(2Thi); Xaa₂ jelentése (A)D-Phe, D-1Nal, D-2Nal vagy D-Trp, ahol A jelentése 3-as és 4-es helyzetű klóratom vagy 4-es helyzetű klóratom; Xaa₃ jelentése D-Nle vagy D-Leu; Xaa₄ jelentése D-Arg,



D-Orn vagy D-Gmf; és Q jelentése NHR₁, Mor, Tmo, Pcp, Ppz vagy N(Et)₂, ahol R₁ jelentése Et, Pr, Cyp, 4Pic, Aeb vagy Hoh.

Megállapítottuk, hogy az opioíd peptidek előző csoportjának és alcsoportjainak meghosszabbodott *in vivo* fájdalomcsillapító aktivitása van a 4-es helyzetű aminosav-maradék C-terminális végénél történt szubsztituált amid beépítésének következtében. Ez a bizonyos nem várt tulajdonság ezeket a peptideket különösen értékesé teszi, mivel ezek közül van, amelyik *in vivo* három órán át vagy ennél is hosszabb ideig aktív marad. Azok a tetrapeptidek, melyek a fentebb említett szekvenciával rendelkeznek, de egyszerű C-terminális amidjuk van, szintén nagy szelektivitást mutatnak a KOR felé, összehasonlítva a MOR-ral; azonban csak rövid hatóidejűek. Teljesen érthető, hogy az ilyen opioíd peptidek megnövekedett hatóidőt mutatnak, amikor úgy szintetizáljuk őket, hogy egy szubsztituált amiddal, úgymint morfoliddal rendelkezzenek a C-terminális végen. Következésképpen úgy találtuk, hogy amikor egy tetrapeptid primer amid nagy és szelektív KOR kötést mutat, a megfelelő szubsztituált amidok, mint például az etilamid és a morfolid, a szintetizálás után fájdalomcsillapító aktivitással rendelkeznek majd meghosszabbodott, órákban mért ideig, azaz legalább 1 órán át, anélkül, hogy az agyba szignifikáns mennyiségben bejutnának.

Bár az előnyben részesített aminosav-szekvenciákat az előzőekben ismertetett képletekkel bemutattuk, a peptidkémia szakterületén átlagosan képzettek számára érthető, hogy egy vagy több felsorolt aminosav-maradék konzervatív aminosav-szubsztitúciókkal helyettesíthető, például egy bázikus aminosav egy



másikkal, vagy egy hidrofób aminosav egy másikkal, például D-Ile lehet D-Leu helyett. Hasonló módon a különböző aminosav-maradékok a szakterületen általánosan ismert módon módosíthatók, például a D-Phe (ahogy korábban jeleztük) egy halogénatom vagy nitrocsoport beépítésével módosítható a 3-as vagy 4-es helyzetben, vagy mindkettőben, vagy az alfa szénatom metilezhető. Az ilyen módosítások úgy tekintendők, hogy ekvivalens kappa receptor opioid peptideket hoznak létre.

A peptidek bármilyen megfelelő eljárással szintetizálhatóak, mint például kizárólag szilárd fázisú módszerekkel vagy klasszikus oldat addíciós eljárással vagy alternatív lehetőségként részleges szilárd fázisú technikákkal vagy fragmentum kondenzációs módszerekkel. Például a kizárólagos szilárd fázisú peptid szintézist (SPPS) Steward és Young Solid-Phase Peptide Synthesis könyvében, 2. kiadás (Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois (1984) írják le, és példákkal ismerteti a 4 105 603 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás. A szintézis fragmentum kondenzációs eljárására ad példát a 3 972 859 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás, és egyéb alkalmas szintézisekre mutat példát a 3 842 067 és 3 862 925 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás. A klasszikus oldat addíciós szintézist részletesen ismerteti Bodanzsky és munkatársai a Peptide Synthesis című könyvben [2. kiadás, John Wiley & Sons, New York, (1976)].

A peptidek összekapcsolásos típusú kémiai szintézisében általános az aminosavhoz kapcsolt labilis oldallánc védelme, és általában az α -aminocsoport védelme is, úgy, hogy a hozzáadandó



egyedülálló aminosav vagy dipeptid vagy tripeptid karboxil-csoportjánál egy addíciót hajtunk végre. Ezek a védőcsoportok jól ismertek a szakterületen, és a terc-butil-oxikarbonil- (Boc), benziloxi-karbonil- (Z) és 9-fluorenil-metoxi-karbonil-csoportot (Fmoc) alkalmazzák előnyös α -aminocsoport védőcsoportként az SPPS vagy klasszikus oldat szintézisben, bár egy sor különböző más amino-védőcsoport létezik, melyek alternatív megoldásként alkalmazhatóak.

Amikor SPPS-t alkalmazunk, a C-terminális aminosav-gyököt egy szilárd gyantahordozóhoz, mint például O-CH₂-polisztrén hordozóhoz, O-CH₂-benzil-poliamid gyanta hordozóhoz, -NH-benzhidril-amin (BHA) gyanta hordozóhoz, vagy -NH-parametil-benzhidril-amin (MBHA) gyanta hordozóhoz kapcsoljuk. A BHA vagy MBHA gyanták alkalmazása gyakran előnyös, mikor szubsztituálatlan amidot kívánunk létrehozni, mivel a hasítás közvetlenül a C-terminális amidot eredményezi. Amikor egy N-metil-amidot szeretnénk kapni, az egy N-metil-BHA gyantáról állítható elő. Egyéb egyszeresen szubsztituált amidok szintetizálhatók W. Kornreich és munkatársai cikkében ismertetek szerint [Int. J. Peptide Protein Res. 25, 414-420 (1985)] és a 4 701 499 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás szerint. A C-terminális végen kétszeresen szubsztituált amidokkal rendelkező peptideket előnyösen klasszikus oldat szintézissel vagy oldatban végzett fragmentum-kondenzációval állítjuk elő.

Ha már megszintetizáltuk ezeket a tetrapeptideket, azok könnyen tisztíthatók a rövid peptidek tisztítására szolgáló, technika állásából jól ismert módszerekkel, például reverz

fázisú nagyteljesítményű folyadékkromatográfiával (RP-HPLC), vagy más megfelelő módszerekkel. Ilyen tisztítási eljárásokat ismertetnek részletesen Rivier és munkatársai [J. Chromatography 288, 303-328 (1984)], és C. Miller és J. Rivier [Peptide Science, Biopolymers 40, 265-317 (1996)], és a szilárd fázisú szintézist vagy hasonló szintézist követő tisztítást mutat be az 5 098 995 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás.

Különböző vizsgálati eljárások alkalmazhatóak annak tesztelésére, hogy a tetrapeptidek nagy szelektivitásúak-e a KOR-ral szemben, erős fájdalomcsillapító bioaktivitásúak-e, hosszú időtartamú-e az *in vivo* bioaktivitás, és nincs-e agyi beszivárgás. A receptor mérőeljárások a szakterületen jól ismertek, és a közelmúltban klónozták az egér (mKOR), patkány (rKOR), tengeri malac (gpKOR) és emberi (hKOR) KOR-okat. A gpKOR kivételével a klónozott KOR-ok nagyon hasonlóak, mindegyik körülbelül 380 aminosavat tartalmaz. A hKOR aminosav-szekvenciája 93,9 %-ban homológ az rKOR-ral és 93,4 %-ban homológ az mKOR-ral. Ezzel szemben a hKOR szignifikánsan különbözik a hMOR-tól és a humán delta opioid receptortól (hDOR), mellyel csak 60,2 %-os illetőleg 59,1 %-os aminosav-azonosságot mutat. A KOR-ok valamint az egyéb opioid receptorok klasszikus, hét transzmembránon áthidaló, G-proteinhez kapcsolt receptorok (Gi). Ezekkel a klónozott receptorokkal könnyen lehetséges egy adott kiválasztott peptid szűrése; például KOR-ral és MOR-ral szembeni szűrést hajthatunk végre abból a célból, hogy meghatározzuk a szelektivitást. A humán KOR, MOR és DOR stabilan expresszálódik egy hippocampusz neuroblasztómából (HN.9.10) származó egér rákos sejtvonalban, és alkalmas arra,

hogy *in vitro* szkrinelésben alkalmazzuk. Számos jól bevett *in vivo* teszt is rendelkezésre áll, melyek általános standardokká váltak egy opioid vegyület fájdalomcsillapító aktivitásának meghatározásához. Ezek a tesztekhez általában egereket használnak, és „farokcsapás” teszt, mancsnyomási teszt, ecetsavas ingerlési teszt, farok csipési teszt és farok merítéses teszt. Vonvoigtlander, P. F. és munkatársai [J. Pharm. Exper. Therapeutics, 224, 7-12 (1983)] számos ilyen tesztet ismertetnek az opioid vegyületekhez.

A kötési affinitás a ligandum és a receptor közötti kölcsönhatás erősségére vonatkozik. Az opioid receptorok kötési affinitásának demonstrálására a találmány szerinti peptideket kompetíciós kötési vizsgálatokat alkalmazva értékeltük. Ezeket a vizsgálatokat stabilan transzfektált sejtvonalakban (HN.9.10, mely egy egér hippokampusz neuroblasztómából származó) expresszált klónozott humán kappá (hKOR) és mü opioid (hMOR) receptorokat használva végeztük el. Ezekben a vizsgálatokban a tesztvegyületeket (jelöletlen vagy hideg ligandum) növekvő koncentrációban alkalmazzuk, hogy azok radioaktívan jelölt, a vizsgált receptorral szemben nagy affinitású és szelektivitású ligandumot a specifikus kötésből kiszorítsák. $^3\text{H-U-69,593}$ -t illetőleg $^3\text{H-DAMGO}$ -t alkalmaztuk ligandumként a hKOR illetőleg hMOR vizsgálatokban. Mindkét ligandum kereskedelmi forgalomban hozzáférhető (NEN-Dupont). A DAMGO a $[\text{D-Ala}^2, \text{MePhe}^4, \text{Gly-ol}^5]$ -enkefalin mozaikszava. A radioaktívan jelölt ligandumok affinitását úgy határoztuk meg, hogy az a radioligandum azon koncentrációja, mely félmaximális specifikus kötést (K_D) eredményez a telítési vizsgálatokban. A $^3\text{H-U-69,593}$ K_D -je a hKOR-

nál körülbelül 0,3 nM és a ^3H -DAMGO K_D -je a hMOR-nál körülbelül 3,0 nM. A tesztvegyület (jelöletlen vagy hideg ligandum) affinitását kompetíciós kötési vizsgálatokban határozzuk meg a gátlási állandó (K_i) kiszámításával a következő képlet szerint:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + (F/K_D)}$$

Ahol IC_{50} = a hideg ligandum koncentrációja, mely a radioaktívan jelölt ligandum specifikus kötődését 50%-ban meggátolja

F = Szabad radioktívan jelölt ligandum koncentrációja

K_D = a radioaktívan jelölt ligandum telítési vizsgálatokban meghatározott affinitása

Amikor ezeket a mérési eljárásokat viszonylag kis receptor koncentrációkat tartalmazó specifikus körülmények között hajtjuk végre, a tesztvegyület számított K_i -je a K_D disszociációs állandójának jó megközelítését adja, mely a ligandumnak azt a koncentrációját képviseli, mely a kötési helyek felének (50%) elfoglalásához szükséges. A nanomólos és szubnanomólos nagyságrendbe eső alacsony K_i értéket úgy tekintjük, hogy egy nagy affinitású ligandumot azonosítottunk az opioidok körében. Az előnyben részesített analógok K_i -je a KOR-nál körülbelül 2 nM vagy kevesebb, míg a még előnyösebb analógok K_i -je körülbelül 1 nM vagy kevesebb. Mivel a KOR receptorok a test egészében szétszórva találhatóak, a kappa receptor opioid peptideknek lényeges hatása lesz számos perifériális hatás módosításában, és ha erősen KOR szelektívek, minimális mellékhatásuk lesz, és fiziológiailag nagyon jó gyógyszerekké válnak.

Ezeket a KOR-okat és MOR-okat alkalmazó kötési mérőeljárásokat egyszerű végrehajtani, és könnyen elvégezhetjük

a kezdetben azonosított vagy szintetizált peptidekkel, hogy meghatározzuk, vajon ezek a peptidok KOR-szelektívek-e és nagy affinitásúak-e. Ezeket a kötési vizsgálatokat számos, a szakterületen jártasak számára jól ismert módon végrehajthatjuk, és egy ilyen általános típusú mérőeljárás részletes példáját ismertetik Perrin M. és munkatársai [Endocrinology 118, 1171-1179 (1986)].

A találmányt a következő példákon keresztül ismertetjük tovább. Ezeket a példákat azonban nem azért készítettük, hogy bármely módon korlátozzuk a találmány lényegét vagy a leírás végén lévő igénypontok által leírt oltalmi körét.

1. példa:

A H-D-Phe-D-Phe-D-Nle-D-Arg-NH₂t képletű peptidet megfelelő módon, a peptidszintézis szakterületén ismert módon szintetizáljuk. Például először az (α -amino-védőcsoport)-D-Phe-D-Phe-D-Nle-(karboxil-védőcsoport) tripeptidet klasszikus oldat kémiát alkalmazva szintetizáljuk. Például a tripeptid úgy készíthető el, hogy a H-D-Nle-OMe-t DMF-ben oldjuk, és N-etil-morfolint (NEM) vagy hasonlót adunk hozzá a pH beállítására. Ezt az oldatot ezután a Boc-cal védett D-Phe-OH NEM-et tartalmazó DMF oldatával elegyítjük. Ehhez a reakcióelegyhez egy aktiváló vagy kapcsoló ágenszt adunk, mint például benzotriazol-1-il-oxi-tris-(dimetil-amino)-foszfónium-hexafluor-foszfátot (BOP) vagy N,N'-diizopropil-karbodiimid (DIC) és N-hidroxi-benzotriazol (HOBT) elegyét. A reakció befejeződését követően a közeget szárazra pároljuk, és a terméket ezután megfelelően tisztítjuk és újrakristályosítjuk. A Boc-védőcsoportot trifluor-ecetsavval (TFA) eltávolítjuk, és a dipeptidet DMF-ben újra feloldjuk. NEM-

et tartalmazó, DMF-ben oldott Boc-védett D-Phe oldatát adjuk hozzá. A reakciót BOP-ot alkalmazva a fentebb leírt módon megismételjük, hogy tripeptidet hozzunk létre, melyet miután az oldatot szárazra pároltunk, tisztítunk, és újra kristályosítunk. A kapott termék a Boc-D-Phe-D-Phe-D-Nle-OCH₃. A metilésztert ezután megfelelő módon szabad savvá alakítjuk, például dioxán vagy DMSO és víz oldatában feloldjuk, és nátrium-hidroxidot adunk hozzá. Miután a reakció lejátszódott, elkülönítéssel, tisztítással és újrakristályosítással Boc-D-Phe-D-Phe-D-Nle-OH-t nyerünk ki.

A tripeptidet NEM-et tartalmazó DMF-ben oldjuk, és D-Arg(Tos)-NH₂-tel reagáltatjuk, ismét BOP-ot alkalmazva kapcsolószerként. Alternatív megoldásként kívánt esetben a tripeptid metilésztert aziddá alakíthatjuk egy 80%-os hidrazin-hidrát oldattal kezelve, hogy hidrazidot hozzunk létre, melyet izolálunk, majd nátrium-nitrittel és ásványi savval kezelünk DMF-ben. Az azidot közvetlenül reagáltatjuk a D-Arg(Tos)-NH₂-tel trietilamint tartalmazó DMF oldatban. A reakció befejeződése után az elegyet szárazra pároljuk, majd megfelelő módon tisztítjuk, és újra kristályosítjuk. Az N-terminális véget és a D-Arg oldallánc védelmét megszüntetjük, és újra tisztítjuk és kristályosítjuk, a kívánt tetrapeptid-etilamidot létrehozva (1. számú peptid).

A peptid homogenitását reverz fázisú HPLC-vel igazoljuk két eltérő mobil fázist alkalmazva: 0,1 % trifluor-ecetsavat tartalmazó vízben lévő acetonitril gradienssel és 7-es pH-jú trietilamin-foszfát pufferben lévő acetonitril gradienssel, és fuzionált szilikával, kapillár-elektroforézissel is, melyhez

2,5-ös pH-jú foszfát-puffert alkalmazunk. Ezekkel a módszerekkel a peptid tisztaságát >98%-nak mérjük. Elektrospray ionizációt alkalmazó tömegspektrometriával és ion csapda (trap) analízissel egy pszeudomolekuláris $[MH]^+$ iont mutattunk ki 609,4-es m/z-nél, mely megfelel a tetrapeptid számított 609,5-ös m/z tömegének. A pszeudomolekuláris ion fragmentációs analízise egy olyan m/z arányú ion-sorozatot mutatott ki, mely az előállított szerkezetnél várt aminosav-szekvenciának felel meg.

Humán KOR-t és MOR-t kifejező sejtekkel kötési vizsgálatokat hajtottunk végre, ahogy fentebb említettük. A tesztpeptid affinitását az egér hipokampusz neuroblasztóma (HN.9.10) sejtekben stabilan expresszált hKOR-ral és hMOR-ral szemben határoztuk meg hKOR-nál a $^3\text{H-U-69 593}$, hMOR-nál a $^3\text{H-DAMGO}$ kompetitív helyettesítésével a már leírt módon. Legalább 3 kísérlet adatait gyűjtöttük össze, és a gátlási disszociációs konstans (K_i) értékeket (95%-os konfidenciahatárnál) egy megfelelő program, mint például Munson és Rodbard LIGAND programmal (Anal. Biochem. 107, 220-239 (1980)) számítottuk ki. A klónozott KOR az 1. számú peptidet nagy affinitással kötötte, ahogy azt a kötött radioaktívan jelzett ligandum kompetitív helyettesítésével meghatároztuk, és a K_i értékét körülbelül $0,05 \pm 0,02$ nM-nak határoztuk meg. Az affinitásban meglévő különbség drámai, összehasonlítva a hasonló humán MOR-t expresszáló, stabilan transzfektált rák sejtekkel, ahol a $K_i = 1890 \pm 990$ nM. Tehát az 1. számú peptid sokkal erősebben kötődik a hKOR-hoz, mint a hMOR-hoz, körülbelül 38 000-szererősebben.

A peptid tesztelése egér ecetsav ingerlési vizsgálatban (ahogy később leírjuk) körülbelül $0,09$ mg/kg-os ED_{50} értéket ad,

és a peptid három óra múlva még több, mint 50 %-os fájdalomcsillapító hatást fejez ki. Tehát az 1. számú peptid úgy tekinthető, hogy nagyon hosszú ideig tartó hatást mutat.

2. példa:

Az A. táblázatban bemutatott H-D-Phe-D-Phe-D-Nle-D-Arg-Q általános képletű opioid peptideket szintetizáltuk, és az 1. példában leírt módon teszteltük.

A táblázat							
Szám	Q	K _i		μ/K	Tömegspektroszkópia		WT-ED ₅₀ mg/kg
		KOR (nM)	MOR (nM)		Számított	Mért	
2.	NHMe	0,06	3 620	60 000	595,4	595,5	0,14
3.	NHPr	0,09	1 640	18 000	623,4	623,5	0,078
4.	NHBu	0,19	1 370	7 200	637,4	637,5	0,30
5.	NH(Cyp)	0,18	3 520	20 000	621,4	621,5	0,04
6.	Mor	0,06	2 510	42 000	651,4	651,4	0,014
7.	N(Et ₂)	0,11	1 900	17 000	637,4	637,5	0,02
8.	NH(4Pic)	0,14	3 640	26 000	672,4	672,4	0,01
9.	NHbEt	0,40	1 010	2 500	625,4	625,5	0,03
10.	Tmo	0,09	2 260	25 000	667,4	667,3	0,067
11.	4-HyP	0,06	3 700	62 000	665,4	665,4	0,073
12.	Pip	0,15	1 050	7 000	649,4	649,5	0,07
13.	NH(2Txl)	0,59	1 590	2 700	664,3	664,4	0,44
14.	NHBzl	0,44	890	2 000	671,4	671,4	0,14
15.	Ppz	0,16	9 100	57 000	650,4	650,5	0,017

Úgy találtuk, hogy a 2-15. peptidek hosszú ideig tartó fájdalomcsillapító bioaktivitást mutatnak.

3. példa

A B. táblázatban bemutatott H-Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Xaa₄-Q általános képletű opioid peptidákat megszintetizáltuk, és az 1. példában leírt módon teszteltük.

B táblázat					
Szám	Xaa ₁	Xaa ₂	Xaa ₃	Xaa ₄	Q
16.	D-4Fpa	D-Phe	D-Nle	D-Arg	NHET
17.	D-Acp	D-Phe	D-Nle	D-Arg	NHET
18.	D-Ala(2Thi)	D-Phe	D-Nle	D-Arg	NHET
19.	D-Tyr	D-Phe	D-Nle	D-arg	Mor
20.	D-Phe	D-Trp	D-Nle	D-Arg	Mor
21.	D-Phe	D-4Npa	D-Nle	D-Arg	Mor
22.	D-Phe	D-4Cpa	D-Nle	D-arg	Mor
23.	D-Phe	D-1Nal	D-Nle	D-Arg	NH(4Pic)
24.	D-Phe	D-2Nal	D-Nle	D-Arg	NH(4Pic)
25.	D-Phe	D-Tyr	D-Nle	D-Arg	NH(4Pic)
26.	D-Phe	D-Phe	D-Leu	D-Arg	Mor
27.	D-Phe	D-Phe	D-Val	D-Arg	Mor
28.	D-Phe	D-Phe	D-Acp	D-Arg	Mor
29.	D-Phe	D-Phe	D-Nle	D-Lys	Mor
30.	D-Phe	D-Phe	D-Nle	D-Har	NHET
31.	D-Phe	D-Phe	D-Nle	D-Har(Et ₂)	NHET
32.	D-Phe	D-Phe	D-Nle	D-Orn	NHET
33.	D-Phe	D-Phe	D-Nle	D-Amf	NH(4Pic)
34.	D-Phe	D-Phe	D-Nle	D-Dbu	NH(4Pic)
35.	D-Phe	D-Phe	D-Leu	D-Orn	Ppz
36.	D-Phe	D-Phe	D-Phe	D-Arg	NH(4Pic)
37.	D-Phe	D-Phe	D-Nle	D-Ily	NH(4Pic)
38.	D-Phe	D-Phe	D-Nle	D-Ior	NH(4Pic)
39.	D-Phe	D-4Mpa	D-Nle	D-nArg	Mor

Úgy találtuk, hogy a 16-39. peptidek hosszú ideig tartó fájdalomcsillapító bioaktivitást mutatnak.

4. példa

A C. táblázatban bemutatott H-Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Xaa₄-Q általános képletű opioid peptideket szintetizáltuk, és az 1. példában leírt módon teszteltük.

Szám	C. táblázat					Tömegspektr.		Kötés
	Xaa ₁	Xaa ₂	Xaa ₃	Xaa ₄	Q	Számított	Mért	μ /K arány
40.	D-Phe	D-Phe	D-Nle	D-Arg	NH(4Nbz)	716,4	716,5	3 800
41.	D-Phe	D-Phe	D-Nle	D-Arg	NH(4Abz)	686,4	686,4	12 000
42.	D-Phe	D-Phe	D-Nle	D-Arg	Ecp	721,4	721,5	27 000
43.	D-CMP	D-Phe	D-Nle	D-Arg	NH(4Pic)	686,4	686,5	2 500
44.	D-Phe	D-Phe	D-Acp	D-Arg	NH(4Pic)	698,4	698,5	8 300
45.	D-Phe	D-Phe	D-Hle	D-Arg	NH(4Pic)	686,4	686,5	11 000
46.	D-Phe	D-Phe	D-CML	D-Orn	Mor	623,4	623,4	14 000
47.	D-Phe	D-Phe	D-Leu	D-Lys	NH(4Pic)	644,4	644,3	30 000
48.	D-Phe	D-Phe	D-Leu	D-Lys	NHPr	595,4	595,3	18 000
49.	D-Phe	D-Phe	D-Leu	D-Lys	Mor	623,4	623,3	92 000
50.	D-Phe	D-Phe	D-Nle	D-Har	NH(4Pic)	686,4	686,5	9 300
51.	D-Phe	D-Phe	D-Nle	D-Har	Mor	665,4	665,5	12 000
52.	D-Phe	D-Phe	D-Leu	D-Öbu	NH(4pic)	616,4	616,3	92 000
53.	D-Phe	D-Phe	D-Leu	D-Öbu	Mor	595,4	595,3	85 000

Úgy találtuk, hogy a 40-53. peptidek hosszú ideig tartó fájdalomcsillapító bioaktivitást mutatnak.

5. példa

A D. táblázatban bemutatott H-D-Phe-Xaa₂-Xaa₃-Xaa₄-Q általános képletű opioid peptideket szintetizáltuk, és az 1. példában leírt módon teszteltük.



D táblázat										
Szám	Xaa ₂	Xaa ₃	Xaa ₄	Q	K ₁	K ₂	μ/K	Tömegspektr.		WT- ED ₅₀ mg/kg
					KCR (nm)	MCR (nm)		arány	Számított Mért	
54	D-Phe	D-Nle	D-Arg	NH(3P1c)	0,39	1 220	3 100	672,4	672,5	
55	D-Phe	D-Nle	D-Amf	NHet	0,14	1 750	12 500	629,4	629,3	0,083
56	D-Phe	D-Leu	D-Orn	NHEt	0,31	4 150	13 000	567,4	567,4	0,057
57	D-Phe	D-Leu	D-Orn	Mor	0,19	5 260	28 000	609,4	609,3	0,026

Úgy találtuk, hogy az 54-58. peptidek hosszú ideig tartó fájdalomcsillapító bioaktivitást mutatnak.

6. példa

A E. táblázatban bemutatott H-Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-D-Arg-Q általános képletű opioid peptideket szintetizáltuk, és az 1. példában leírt módon teszteltük.

E. táblázat										
Szám	Xaa ₂	Xaa ₃	Xaa ₄	Q	K ₁	K ₂	μ/K	Tömegspektr.		WT- ED ₅₀ mg/kg
					KCR (nm)	MCR (nm)		arány	Számított Mért	
59.	D-Ala(2Thi)	D-4Qpa	D-Leu	Mor	0,25	3 360	13 000	691,3	691,1	0,052
60.	D-Ala(2Thi)	D-3,4Qpa	D-Leu	NH(4B1c)	0,4	769	1 900	746,3	746,3	0,083
61.	D-Ala(2Thi)	D-3,4Qpa	D-Leu	Mor	0,15	1 560	10 400	725,3	725,4	0,019
62.	D-Phe	D-Phe	D-Nle	OxP	0,11	2 970	27 000	663,4	663,5	0,18
63.	D-Ala(2Thi)	D-2Nal	D-Leu	Mor	0,2	3 170	16 000	707,4	707,4	0,04
64.	D-Phe	D-Phe	D-Nle	Dmp	0,21	7 680	37 000	678,4	678,5	0,032
65.	D-4Qpa	D-4Qpa	D-Leu	Mor	0,17	1 900	11 000	703,4	703,4	0,15

Úgy találtuk, hogy a 59-65. peptidek hosszú ideig tartó fájdalomcsillapító bioaktivitást mutatnak.

7. példa

Az fluoratom táblázatban bemutatott H-Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Xaa₄-Q

általános képletű opioid peptideket megszintetizáltuk, és az 1. példában leírt módon teszteltük.

F. táblázat					
Szám	Xaa ₁	Xaa ₂	Xaa ₃	Xaa ₄	Q
66.	D-4Cpa	D-4Cpa	D-Leu	D-Lys	NHPr
67.	D-4Fpa	D-2Nal	D-Met	D-Amf	NHBu
68.	D-4Cpa	D-Trp	D-Acp	D-Amf	Pip
69.	D-Phe	D-Phe	D-Val	D-Orn	Ecp
70.	D-Ala(2Thi)	D-4Fpa	D-Nle	D-Dbu	NH(4Abz)
71.	D-Acp	D-Phe	D-Leu	D-Har	4-HyP
72.	D-CMP	D-Trp	D-Phe	D-Arg(Et ₂)	NHBzl
73.	D-4Cpa	D-3,4Cpa	D-Met	D-Orn	Tmo
74.	D-Acp	D-1Nal	D-Nle	D-Har(Et ₂)	NH(3Pic)
75.	D-4Fpa	D-4Cpa	D-Leu	D-Gmf	NHhEt
76.	D-CMP	D-Tyr	D-Acp	D-Dbu	NHIpr
77.	D-Phe	D-2Nal	D-Acp	D-Ily	NHPn
78.	D-Tic	D-4Fpa	D-Phe	D-Lys	NH(4Pic)
79.	D-4Npa	D-Trp	D-CML	D-Ior	N(Et) ₂
80.	D-CMP	D-Phe	D-Met	D-Ior	Mor
81.	D-ala(3Thi)	D-1Nal	D-Nle	D-Lys	NH(2Tzl)
82.	D-Phe	D-4Npa	D-Nle	D-Arg	NHCyp
83.	D-Acp	D-2Nal	D-Hle	D-Har	NHCyb
84.	D-Tyr	D-2Nal	D-Phe	D-Lys	ppz
85.	D-Phe	D-1Nal	D-Met	D-Ior	OxP
86.	D-Phe	D-Trp	D-Met	D-Arg	Dmp
87.	D-Phe	D-Trp	D-Nle	D-Orn	Mor

Úgy találtuk, hogy az F. táblázat peptidjei nagy

szelektivitást mutatnak a KOR-ral szemben a MOR-hoz képest, és *in vivo* fájdalomcsillapító bioaktivitást fejeznek ki.

8. példa: A G. táblázatban bemutatott H-Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Xaa₄-Q általános képletű opioid peptideket szintetizáltuk, és az 1. példában leírt módon teszteltük.

G. táblázat						μ/k	WI- ED ₅₀
Szám	Xaa ₁	Xaa ₂	Xaa ₃	Xaa ₄	Q	arány	mg/kg
88.	D-4Fpa	D-Phe	D-Nle	D-Arg	NH(4Pic)	16 000	0,04
89.	D-3Fpa	D-Phe	D-Nle	D-Arg	NH(4Pic)	24 000	0,11
90.	D-2Fpa	D-Phe	D-Nle	D-Arg	NH(4Pic)	38 000	0,14
91.	D-4Fpa	D-Phe	D-Nle	D-Har	NH(4Pic)		
92.	D-4Cpa	D-Phe	D-Nle	D-Arg	NH(4Pic)	2 900	
93.	D-4Fpa	D-4Npa	D-Nle	D-Arg	NH(4Pic)	1 200	
94.	D-Phe	D-Phe	D-Nle	D-Arg	Ely	70 000	0,02
95.	D-Phe	D-Phe	D-Nle	D-nArg	NH(4Pic)	16 000	0,008
96.	D-Phe	D-Phe	D-Nle	D-Arg	Pcp	12 000	0,098
97.	D-Phe	D-Phe	D-Nle	D-Arg	NH(4Acx)	6 400	
98.	D-Phe	D-Phe	D-Leu	D-Orn	NH(Aeb)	24 000	0,014
99.	D-Ala(2Thi)	D-3,4Cpa	D-Leu	D-Orn	Mor	19 000	0,083
100.	D-Ala(2Thi)	D-2Nal	D-Leu	D-Orn	Mor	31 000	0,079
101.	D-Ala(2Thi)	D-4Cpa	D-Leu	D-Orn	Mor	38 000	0,112
102.	D-Ala(2Thi)	D-4Cpa	D-Leu	D-Orn	NH(4Pic)	24 000	0,032
103.	D-Phe	D-Phe	D-Nle	D-Arg	NH(Aao)	140 000	0,101
104.	D-Phe	D-Phe	D-Nle	D-Arg	NH(Aoo)	6 300	
105.	D-Phe	D-Phe	D-Nle	D-Arg	NH(Hob)	66 000	0,015
106.	D-Phe	D-Phe	D-Nle	D-Arg	NH(Ahz)	10 000	0,055
107.	D-Phe	D-Phe	D-Nle	D-Arg	NH(Ghz)	22 000	0,032



108.	D-Phe	D-Phe	D-Nle	D-Arg	NH(Gao)	67 000	0,034
------	-------	-------	-------	-------	---------	--------	-------

Úgy találtuk, hogy a 88-108. számú peptidek hosszú ideig tartó fájdalomcsillapító bioaktivitást mutatnak.

9. példa

Az A-G. táblázatokban azonosítható, kiválasztott peptideket a továbbiakban *in vivo* tesztelésnek vetettük alá ezen tulajdonságok a hatóidejének a meghatározására, és az eredményekről a H. táblázatban számolunk be. A korábbi táblázatokban található megfelelő peptidszámokat és a μ/K arányszámokat egyszerűen átvettük a hivatkozás céljából. Az *in vivo* tesztelést egy egér vonaglási tesztet (WT) alkalmazva hajtjuk végre, mely igen alkalmas arra, hogy a fájdalomcsillapító biológiai aktivitás időtartamát meghatározzuk. Ezt a tesztet részletesen leírja G. A. Bentley és munkatársai cikke [BR. J. Pharmac. 73, 325-332 (1981)], és tudatuknál lévő him ICR egereket használunk hozzá, melyet Harlantól szereztünk be, és 20-30 gramm tömegűek. Az egereket a teszt megkezdése előtt 12-16 órára elzárjuk. A megfigyelendő fájdalomra adott magatartást, azaz az vonaglást hígított ecetsav intraperitoneális (i.p.) beadásával váltjuk ki. Testtömeg kilogrammonként 10 milliliter 0,6 %-os vizes ecetsav oldatot alkalmazunk. Az első lépésben a vegyületeket 3-4 növekvő dózisban, egyetlen kezelés előtti időpontban intravénásan beadva vizsgáljuk (5 perccel az ecetsav injekció előtt). Ezt a lépést arra használjuk fel, hogy meghatározzuk a potenciált (WT- ED₅₀), valamint egy szubmaximálisan hatékony dózist (körülbelül 80-90 %-os fájdalomcsillapítás). Második lépésben ezt a szubmaximálisan hatékony dózist mindegyik specifikus peptidnél



különböző előkezelési időben adjuk be (azaz -5. percben, -60. percben, -120. percben és -180. percben) az ecetsav beadása előtt azért, hogy meghatározzuk a hatóidőt. A testben végig egy kontroll egércsoportot alkalmazunk, melyeknek csak a hordozót adjuk be a vizsgálandó peptidnek nélkül. a vonaglások számát egy 15 perces időszakon át mértük, kezdve az ecetsav injekció beadásával, és a bioaktivitást, azaz a fájdalomcsillapítást százalékosan fejezzük ki, és a következőképpen számoljuk ki:

$$100 \times \frac{\text{vonaglás a kontroll csop.-ban} - \text{vonaglás a kezelt cs.-ban}}{\text{vonaglás a kontroll csoportban.}}$$

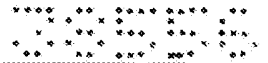
Mivel mindegyik szubmaximális dózis nagyon hasonló módon változik, így közvetlenül nem hasonlítható össze, az eredményeket matematikailag normalizáljuk a szakterületen ismert módon, hogy összehasonlítható értékeket kapjunk, melyeket a H. táblázatban mutatunk be. A H. táblázatban az 1, 2, 3 óra után megmaradt fájdalomcsillapító aktivitást a -5. percben talált aktivitás százalékaként fejezzük ki. A 100 %-nál nagyobb értékek a kísérlet megkezdésekor mértnél nagyobb fájdalomcsillapítást jeleznek. Úgy tűnik, hogy az opioid peptidnek legalább 25%-kal kell csökkentenie a vonaglást 1 óra múlva ahhoz, hogy hosszú *in vivo* hatásúnak tekinthessük.

Ezt a tesztet, amellettt hogy a fájdalomcsillapító aktivitás időtartamának meghatározására használjuk, arra is alkalmaztuk, hogy mérjük a peptid *in vivo* (rövid idejű) biopotenciálját. Ezt az értéket a WT-ED₅₀ fejléc alatt a táblázatban milligramm per kg testtömegben adjuk meg. Az érték annak a dózishoz a mértéke, mely a tesztelt egérben a vonaglások számának 50%-os csökkenéséhez (egy kontroll egérrel összehasonlítva) szükséges

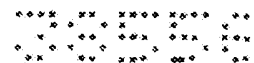


egy 15 perces időtartam után.

H. táblázat					
Peptid száma	p/k arány	WT- ED ₅₀ mg/kg	% fájdalomcsillapítás		
			1 óra	2 óra	3 óra
1	38 000	0,09	83,9	75,5	61,3
2	60 000	0,14	70,5	29,8	
3	18 000	0,078	48,6	39,8	
4	7 200	0,3	49,3		
5	20 000	0,04	66,0	34,5	
6	42 000	0,014	105,7	52,7	
7	17 000	0,02	67,5	36,8	
8	26 000	0,01	66,9	45,1	
9	2 500	0,03	72,5	39,5	
10	25 000	0,17	81,6	47,5	
11	62 000	0,07	61,8	36,9	
12	7 000	0,07	60,5	53,6	
13	2 700	0,44	30,7		
14	2 000	0,14	36,0		
15	57 000	0,017	60,0		
42	27 000	0,06	45,3	29,4	
43	2 500	0,2			
44	8 300	0,2			
46	14 000	0,083			
47	30 000	0,09			
48	18 000	0,065	53,7		
49	92 000	0,02	65,5	69,2	38,3



50	9 300	0,077	35,6		
51	12 000	0,018	32,5		
52	92 000	0,019	30,6		
53	85 000	0,026	47,7	32,6	
56	13 000	0,057	77,4	59,3	
57	28 000	0,026	100	67,2	58,2
58	6 500	0,04	93,4	45,7	
59	13 000	0,052	83,3	59,7	
60	1 900	0,083	83,8	35,5	
61	10 400	0,019	57,5	60,3	
62	27 000	0,18	38		
63	16 000	0,04	51,8	36,1	
64	37 000	0,032	74,7		
65	11 000	0,031	39,5		
88	16 000	0,04	56,6	28,9	
94	70 000	0,02	58,8		
95	16 000	0,08	45,8		
96	12 000	0,098	56,7		
98	24 000	0,014	85,5	40,8	
99	19 000	0,083	50,3	69,3	
100	31 000	0,079	82,8	27,6	
101	38 000	0,112	89,9	45,6	
102	24 000	0,032	63,9		
103	140 000	0,101	37,1		
105	66 000	0,015	48,2		
106	0,055	46,7			
107	22 000	0,032	29,0		



108	67 000	0,034	84,3	32,9	
-----	--------	-------	------	------	--

Az opioid peptidok fájdalomcsillapító szerként és más a KOR rendszerhez kapcsolódó patológiák kezelésére szolgáló gyógyászati alkalmazásokra használhatók fel. Ezek előnyösek a μ agonista fájdalomcsillapítókkal, például morfinnal szemben, melyek nemkívánatos mellékhatásokat, mint például székrekedést, légzési gyengülést és viszketést okoznak. Nagyon előnyös, hogy ezek az opioid peptidok szignifikánsan nem hatolnak keresztül a vér/agy gáton, meggátolva az ebből adódó potenciális mellékhatásokat. Ezeknek a vegyületeknek a biztonságosságát az agyi penetráció szempontjából úgy mérjük, hogy összehasonlítjuk azt a képességüket, hogy megszüntetik a perifériás hatásokat, azzal, hogy képesek-e megszüntetni a központi idegrendszeri hatásokat. A perifériális hatásokat egér vonaglasi tesztet (WT) alkalmazva mérjük a korábban leírt módon. Az agyban elhelyezkedő kápa receptorok hatása miatti központi hatásokat egér farokcsapási tesztet (TF) alkalmazva határozzuk meg.

A farokcsapási teszt az akut szomatikus fájdalom mérőeljárása, melyet arra terveztek, hogy a központi idegrendszerre ható analgetikumok potenciálját és hatóidejét mérjék. A farok forró vízbe (52°C) merítésével indukált fájdalom egy gyors farokkihúzást eredményez, mely farokcspásként is ismert. Várható, hogy a központi idegrendszerre ható fájdalomcsillapító vegyületek dóziszfüggő módon megnövelik a farok-kihúzás latenciáját. A teszteljárást Wanderah, T. W. és munkatársai írták le [J. Pharm. Exper. Therapeutics, 262, 190-197 (1992)].

A biztonságosságot egy Agy Penetrációs Index (BPI)

segítségével mérjük, melyet a következőképpen határozunk meg.

$$\text{BPI} = \text{TF-ED}_{50} / \text{W-ED}_{50} ,$$

ahol az ED_{50} értékek azok a dózisok, melyek félmaximális hatást hoznak létre az egérvonaglasi tesztben (WT-ED_{50}), illetőleg az egér farokcsapási tesztben (TF-ED_{50}), amikor azt intravénásan adjuk be. Egy magas BPI érték alacsony agyi penetrációt jelez, és azt mutatja, hogy a vegyület valószínűleg egy széles biztonsági határt fejez ki (agyi mellékhatások hiánya), amikor a bejelentésben leírt célokra alkalmazzuk. Az előnyös opioid peptidok 100 vagy magasabb értékű BPI-vel rendelkeznek, előnyösebben 300-nél magasabb BPI-vel rendelkeznek. A szisztémás nem peptid típusú kappá agonisták (például az Enadolin és az U-69 593) 5-nél kisebb BPI értékűek, mely azt jelzi, hogy jelentős agyi penetráció fordul elő, mint ahogy azt a klinikai alkalmazásnál létrejött mellékhatások (diurézis, nehéz légzés, lenyugvás) bizonyítják. Néhány reprezentatív opioid peptid BPI értékét a következő I. táblázatban mutatjuk be.

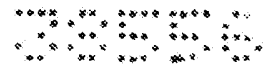
I. táblázat			
Peptid száma	WT-ED ₅₀ mg/ml	TF-ED ₅₀ mg/ml	BPI
1.	0,09	9,7	108
3.	0,078	13,82	177
5.	0,04	4,4	110
6.	0,014	6,4	457
7.	0,020	3,1	155
8.	0,01	9,84	984
15.	0,017	2,86	168
49.	0,020	1,62	81



53.	0,026	2,1	81
57.	0,026	5,6	215
58.	0,034	4,34	128
61.	0,019	>10	>526
88.	0,040	12	300
96.	0,098	>10	>102
98.	0,014	3,5	250
99.	0,083	16	193
102.	0,032	>10	>313
105.	0,015	12,6	840

Mivel ezek a peptidek erősen kötődnek a KOR-hoz, *in vitro* mérőeljárásokban is felhasználhatóak a receptorok vizsgálatára, és annak meghatározására, hogy melyik receptorok lehetnek jelen egy adott szövetmintában. Tehát ebből a szempontból felhasználhatóak diagnózis céljára és potenciálisan felhasználhatóak *in vivo* diagnózisra is.

Általánosságban ezek az opioid peptidek felhasználhatók fájdalomcsillapításra a zsigeri fájdalmak kezelésében és a rheumatoid arthritisz kezelésére is. Különösen hasznosak az hasi műtétek utáni tünetek, így az emésztési rendellenességek és fájdalom kezelésében. Hatásosnak tartjuk az IBS, húgyhólyag instabilitás, inkontinencia és más olyan indikációk kezelésére, ahol a helyi gyulladás fájdalmi állapotokat eredményez a bélben vagy más zsigerben, például gyulladósos bél betegség (IBD) és menstruációs fájdalmak kezelésére. Az opioid peptideknek az a képessége, hogy csökkentik az immunválaszt, előnyös lehet az IBD és más indikációk, mint például autoimmun betegségek elleni küzdelemben.



A peptidek beadását alkalmazhatjuk lokális fájdalomcsillapító hatás létrehozására akut és krónikus gyulladásos állapotoknál is. Alkalmazható bélelzáródás kezelésére, melyre olyan tünetek jellemzőek, mint a felfúvódás, hányinger vagy a bél fájdalommal járó táplálékszállítási gátlásai, például alkalmazható a valószínűleg a görcsös összehúzódások által okozott bélelzáródásnál. Az opioid peptidek szintén hatásosak perifériás fájdalomcsillapítás létrehozására, és az operáció utáni fájdalom valamint a krónikus fájdalom enyhítésére, mint például a gyomorbél rendszer és zsigeri szövetek által okozott fájdalmak enyhítésére, és enyhülést nyújt a kábítószer-elvonás alatt. A találmány szerinti vegyületek gyógyászatilag elfogadható formában, nem toxikus sók, mint például savaddíciós sók formájában adhatók be, ahogy az a szakterületen jól ismert.

Ilyen savaddíciós sók szemléltetésképpen a hidroklorid, hidrobromid, szulfát, foszfát, nitrát, oxalát, fumarát, glükonát, tannát, pamoát, maleát, acetát, citrát, benzoát, szukcinát, alginát, malát, aszkorbát, tartarát, és hasonlóak. Ha a hatóanyagot tablettá formájában adjuk be, a tablettá egy gyógyászatilag elfogadható nemtoxikus oldószert tartalmazhat, ide tartozik egy kötőanyag, mint például tragantmészga, kukoricakeményítő vagy zselatin. Izotóniás sóoldatban, foszfát pufferben, mannit- vagy glükóz-oldatban történő intravénás beadás is végrehajtható.

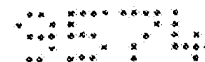
A gyógyászati készítmények általában a peptid egy hatásos mennyiségét tartalmazzák egy hagyományos gyógyászatilag elfogadható hordozóval vagy oldószerral együtt. Általában a készítmény egy fájdalomcsillapító mennyiségét tartalmaz, azaz

egy olyan mennyiséget, mely hatásos a fájdalom meggátlására. Általában a dózis körülbelül a peptid 1-10 mikrogrammjáig terjed a beteg testtömeg kilógrammjaira nézve, intravénás beadáskor. A készítmény szükség szerint adható be; például 3-6 órás időtartamonként megismételve is beadható. Ezeknek a vegyületeknek a természete valószínűleg lehetővé teszi a hatékony orális beadást; viszont az orális dózisok nagyobbak lehetnek. Ha azt kívánjuk elérni, hogy az opioid peptidet meghosszabbodott időtartam alatt juttassuk be, például egy beadással egy héten át vagy tovább, lassú felszabadulású, depó vagy implantátum dózisformákat alkalmazhatunk. Például egy alkalmas lassú kibocsátású injekciós depó-készítmény a peptidet vagy sóját egy lassan lebomló, nem toxikus vagy nem antigén polimerbe diszpergálva vagy kapszulázva tartalmazhatja, mint például egy politejsav/poliglikolsav polimerben, ahogy a 3 773 919 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban leírták. Az is ismert, hogy lassú felszabadulású beadás hajtható végre egy szilikon implantátumon keresztül.

Ezeket a vegyületeket az emlősöknek, ide értve az embereket is, intravénásan, szubkután, intramuszkulárisan, perkután, intranazálisan, intrapulmonárisan, orálisan, topikálisan, intrarektálisan, intravaginálisan, vagy a gerincvelőbe adagolva adhatjuk be, hogy fájdalomcsillapítást érzünk el, például azért hogy megfordítsuk a gasztrointesztinális szállítás gátlását, melyet peritoneális irritáció vált ki. Arra is alkalmazhatók, hogy a műtét utáni fájdalmat enyhítsük. A hatásos dózisok a beadás módjától és az adott kezelendő emlős fajától függően változnak. Egy jellemző dózisforma például egy olyan peptidet

tartalmazó bakteriosztatikus vizes oldat, mely 3-8-as pH-jú, körülbelül 6-os pH-jú, mely oldatot parenterálisan adjuk be, körülbelül 0,3 µg-3 mg/testtömeg kg dózist biztosítva naponta. Úgy véljük, hogy ezek a vegyületek *in vivo* jól tolerálhatók, és különösen alkalmasnak tartjuk szubkután injekcióval való beadásra egy bakteriosztatikus vizes oldatban vagy hasonlóban.

Bár a találmányt az előnyös megvalósítási módok alapján ismertettük, érthető, hogy a ezen a szakterületen szokásos jártassággal rendelkezők számára nyilvánvaló, hogy változtatások és módosítások tehetők anélkül, hogy a találmány csatolt igénypontokban ismertetett oltalmi körétől eltérnének. Például más olyan szubsztitúciók alkalmazhatók a találmány szerinti peptidekben, melyek a peptidek hatékonyságát szignifikánsan nem csökkentik. Más szubsztituált D-Phe gyökök, mint például 4-Br-D-Phe vagy 2,4-diklór-D-Phe alkalmazható a 2-es helyzetben. A D-Lys(Bu)-t és a D-Lys(Et₂) mindegyikét ekvivalensnek tekintjük a D-Ily-vel és a D-Arg(Et₂)-vel. Kívánt esetben a tetrapeptid N-terminális vége átmetilizethető, ahogy az a szakterületen ismert. Diamino-vegyületek alkalmazhatóak linkerként két tetrapeptid amid dimerjeinek létrehozására. Sikeresen alkalmazott linkerek közé tartozik az 1,6-diamino-hexán, 1,5-diamino-oxa-pentán és 1,8-diamino-3,6-dioxa-oktán. A kapott dimereket ekvivalensnek tekintjük a megfelelő monomerekkel.



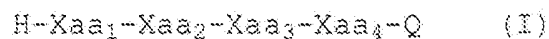
Rövidítések jegyzéke

Rövidítés	Jelentés
D-Phe	D-fenil-alanin
D-Tyr	D-tirozin
D-Tic	D-1,2,3,4-tetrahidro-izokinolin-3-karboxilsav
D-Ala	D-alanin
D-1Nal	D-alanin, amelyben a naftilcsoport a gyűrű 1-helyzetével kapcsolódik a beta-szénatomhoz
D-2Nal	D-alanin, amelyben a naftilcsoport a gyűrű 2-helyzetével kapcsolódik a beta-szénatomhoz
D-Trp	D-triptofán
D-Nle	D-norleucin
D-Leu	D-leucin
D-Hle	D-homoleucin
D-Met	D-metionin
D-Val	D-valin
D-Arg	D-arginin
D-Har	D-homoarginin
D-nArg	D-norarginin
D-Lys	D-lizin
D-Ily	izopropil-D-lizin
D-Arg (Et ₂)	dietil-D-arginin
D-Har (Et ₂)	dietil-D-homoarginin
D-Amf	D- (NH ₂ CH ₂) -fenilalanin
D-Gmf	D- (CH ₂ NHC (NH)NH ₂) -fenilalanin
D-Dbu	alfa, gamma-diamino-vajsav
D-Orn	D-ornitin
D-Ior	izopropil-D-ornitin
Aeb	4-(2-amino-2-karboxi-etil)-benzil
Ppz	piperazinil
C ^α metil	az aminosav α szénatomjához kapcsolódó metil-csoport
(c) piperidil	H,4-hidroxi- vagy 4-oxo-piperidil-csoport



Szabadalmi igénypontok

1. Szintetikus opioid peptid-amid vagy gyógyászatilag elfogadható sója, mely a kapps opioid receptorokkal szembeni affinitása legalább 1000-szer nagyobb, mint a mű opioid receptorokkal szembeni affinitása, és mely hosszantartó hatást fejt ki *in vivo* beadva, mely peptid



általános képletű, mely képletben

Xaa₁ jelentése D-fenil-alanin, metil-D-fenil-alanin, nitro-D-fenil-alanin, fluor-D-fenil-alanin, klór-D-fenil-alanin,

(C^αmetil)-D-fenil-alanin, D-tirozin, D-1,2,3,4-tetrahidroizokinolin-3-karbonsav, ciklopentil-D-alanin vagy tienil-D-alanin,

Xaa₂ jelentése D-fenil-alanin, metil-D-fenil-alanin, nitro-D-fenil-alanin, fluor-D-fenil-alanin, klór-D-fenil-alanin, 3,4-diklór-D-fenil-alanin, naftilcsoporttal helyettesített D-alanin, amelyben a naftilcsoport a gyűrű 1- vagy 2-helyzetével kapcsolódik a beta-szénatomhoz, D-tirozin vagy D-triptofán;

Xaa₃ jelentése D-norleucin, D-leucin, (C^αmetil)-D-leucin, D-homoleucin, D-metionin, D-valin, D-fenil-alanin vagy ciklopentil-D-alanin;

Xaa₄ jelentése D-arginin, D-homoarginin, D-norarginin, D-lizin, izopropil-D-lizin, dietil-D-arginin, dietil-D-homo-arginin, D-/-NH₂CH₂/-fenil-alanin, D-/CH₂NHC(NH)NH₂/-fenil-alanin, alfa,gamma-diamino-vajsav, D-ornitin vagy izopropil-D-ornitin; és

Q jelentése NR₁R₂, morfolinil-, tiomorfolinil-, piperidinil-, 4-hidroxi-piperidinil-, 4-oxo-piperidinil-, piperazinil-, 4-mono-



vagy 4,4-diszubsztituált piperazinil- vagy ϵ -lizilcsoport, ahol

R_1 jelentése 1-6 szénatomos alkil-, szubsztituált 1-6 szénatomos alkil-, benzil-, szubsztituált benzil-, amino-ciklohexil-, 2-tiazolil-, 2-pikolil-, 3-pikolil-, 4-pikolil-csoport, egy ω -(acilamino)polimetilén- vagy egy poli(oxietilén)-csoport, ahol az alkil-, benzil- vagy piperazinil-csoport helyettesítője OH, Cl, F, Br, I, amino-, karbamoil-, fenil-alaninil-, karboxi-/1-4 szénatomos/-alkil-, acetil-amino-, glukonil-amino vagy 1-4 szénatomos alkilcsoport és

R_2 jelentése hidrogénatom vagy 1-6 szénatomos alkilcsoport.

2. Az 1. igénypont szerinti szintetikus peptid, amelyben

Xaa_2 jelentése D-fenil-alanin,

Xaa_3 jelentése D-leucin vagy D-norleucin,

Xaa_4 jelentése D-arginin vagy D-ornitin

Q jelentése NHR_1 csoport és

R_1 jelentése etil-, propil-, butil-, ciklopropil- vagy ciklobutil-csoport.

3. Az 1. igénypont szerinti szintetikus peptid, amelyben

Q jelentése morfolinil-, ticmorfolinil- vagy NH-/4-pikolil/-csoport.

4. Az 1. igénypont szerinti szintetikus peptid, amelyben

Q jelentése dietil-amino-, NH-/4-(2-amino-2-karboxi-etil)-benzil/-, piperazinil-, 4-fenil-karbamoil-piperazin-1-il- vagy NHR_1 csoport, ahol

R_1 jelentése 8-acetil-amino-3,6-dioxaokt-1-il-, 8-amino-3,6-dioxaokt-1-il-, 6-/L-hidroorotil-amino/-hex-1-il-, 6-/D-glukonil-amino/-hexil- vagy 6-/D-glukonil-amino-3,6-dioxaokt-1-



-il-csoport.

5. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti szintetikus peptid, amelyben

Xaa₁ jelentése D-fenil-alanin, 2-tienil-D-alanin vagy 4-fluor-D-fenil-alanin.

6. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti szintetikus peptid, amelyben

Xaa₂ jelentése 4-klór-D-fenil-alanin vagy 3,4-diklór-D-fenil-alanin vagy

Xaa₄ jelentése D-/CH₂NHC(NH)NH₂/-fenil-alanin.

7. Az 1. igénypont szerinti szintetikus opioid peptid, amelynek WT-ED₅₀-e 0,5 mg/kg vagy kevesebb, mely peptid általános képlete

H-Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Xaa₄-Q (I), ahol

Xaa₁ jelentése D-fenil-alanin, (C^αmetil)-D-fenil-alanin, 2-fluor-D-fenil-alanin, 4-fluor-D-fenil-alanin, 4-klór-D-fenil-alanin, ciklopentil-D-alanin vagy tienil-D-alanin;

Xaa₂ jelentése D-fenil-alanin, 4-fluor-D-fenil-alanin, 4-klór-D-fenil-alanin, 4-nitro-D-fenil-alanin, 3,4-diklór-D-fenil-alanin, naftilcsoporttal helyettesített D-alanin, amelyben a naftilcsoport a gyűrű 1- vagy 2-helyzetével kapcsolódik a beta-szénatomhoz vagy D-triptofán;

Xaa₃ jelentése D-norleucin, D-leucin, (C^αmetil)-D-leucin, D-metil-tionin vagy ciklopentil-D-alanin;

Xaa₄ jelentése D-arginin, dietil-D-arginin, D-lizin, izopropil-D-lizin, D-homoarginin, D-norarginin, dietil-D-homoarginin, D-/NH₂CH₂/-fenil-alanin, D-/CH₂NHC(NH)NH₂/-fenil-alanin, alfa,gamma-



-diamino-vajsav, D-ornitin vagy izopropil-D-ornitin; és

Q jelentése NR_1R_2 , morfolinil-, tiomorfolinil-, piperidinil-, 4-hidroxi-piperidin-1-il-, 4-oxo-piperidin-1-il-, 4-fenil-karbamoil-oxo-piperazin-1-il- vagy piperazinil- csoport, ahol

R_1 jelentése metil-, etil-, propil-, butil-, hidroxi-etil, 4-/-2-amino-2-karboxi-etil/-benzil-, ciklopropil-, benzil-, 6-/L-hidroxi-crotil-amino/-hex-1-il- vagy 4-pikolil és

R_2 jelentése hidrogénatom vagy etilcsoport.

8. Az 1. igénypont szerinti szintetikus opioid peptid, amelynek WT-ED₅₀-e 0,5 mg/kg vagy kevesebb, mely peptid

H-Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Xaa₄-Q (I) általános képletű, ahol

Xaa₁ jelentése D-fenil-alanin, 2-fluor-D-fenil-alanin, 4-fluor-D-fenil-alanin, ciklopentil-D-alanin vagy 2-tienil-D-alanin;

Xaa₂ jelentése 4-fluor-D-fenil-alanin, 4-klór-D-fenil-alanin, naftilcsoporttal helyettesített D-alanin, amelyben a naftilcsoport a gyűrű 1- vagy 2-helyzetével kapcsolódik a beta-szénatomhoz vagy D-triptofán;

Xaa₃ jelentése D-norleucin, D-leucin vagy D-metionin;

Xaa₄ jelentése D-arginin, D-lizin, D-homoarginin, D-nor-arginin, D-ornitin vagy D-/CH₂NHC(NH)NH₂/-fenil-alanin; és

Q jelentése NR_1R_2 , morfolinil-, tiomorfolinil-, piperidinil- vagy piperazinil-csoport, ahol

R_1 jelentése etil-, propil- vagy 4-pikolil-csoport.

9. Az 1. igénypont szerinti szintetikus opioid peptid, amelynek WT-ED₅₀-e 0,5 mg/kg vagy kevesebb, mely peptid

H-Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Xaa₄-Q (I) általános képletű, ahol

Xaa₁ jelentése D-fenil-alanin, 2-fluor-D-fenil-alanin, 4-flu-



or-D-fenil-alanin vagy 2-tienil-D-alanin;

Xaa₂ jelentése 4-klór-D-fenil-alanin, 3,4-diklór-D-fenil-alanin, naftilcsoporttal helyettesített D-alanin, amelyben a naftilcsoport a gyűrű 1- vagy 2-helyzetével kapcsolódik a beta-szénatomhoz vagy D-triptofán;

Xaa₃ jelentése D-norleucin vagy D-leucin,

Xaa₄ jelentése D-arginin, D-ornitin vagy D-/CH₂NHC(NH)NH₂/-fenil-alanin; és

Q jelentése NHR₁, morfolinil-, tiomorfolinil-, piperazinil-, dietil-amino- vagy 4-fenil-karbamoil-piperazin-1-il-csoport, ahol

R₁ jelentése etil-, propil-, 4-/2-amino-2-karboxi-etil/-benzil-, ciklopropil-, 6-/L-hidroxi-orotil-amino/-hex-1-il- vagy 4-pikolil-csoport.

10. Az 1. igénypont szerinti szintetikus peptidok körébe tartozó következő vegyületek:

H-D-fenil-alanin-D-fenil-alanin-D-norleucin-D-arginin-etil-amid,

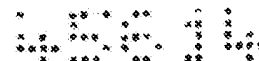
H-D-fenil-alanin-D-fenil-alanin-D-norleucin-D-arginin-morfolid,

H-D-fenil-alanin-D-fenil-alanin-D-norleucin-D-arginin-4-pikolil-amid,

H-D-fenil-alanin-D-fenil-alanin-D-norleucin-D-arginin-propil-amid,

H-D-fenil-alanin-D-fenil-alanin-D-norleucin-D-arginin-tiomorfolid,

H-D-fenil-alanin-D-fenil-alanin-D-norleucin-D-arginin-dietil-



-amid,

H-D-fenil-alanin-D-fenil-alanin-D-norleucin-D-arginin-metil-

-amid,

H-D-fenil-alanin-D-fenil-alanin-D-leucin-D-ornitin-morfolid,

H-4-fluor-D-fenil-alanin-D-fenil-alanin-D-norleucin-D-arginin-4-pikolil-amid,

H-D-fenil-alanin-D-fenil-alanin-D-norleucin-D-arginin-ciklopropil-amid,

H-D-alanin-(2-tienil)-alanin-3,4-diklór-D-fenil-alanin-D-leucin-D-arginin-morfolid,

H-D-fenil-alanin-D-fenil-alanin-D-norleucin-D-(CH₂NHC(NH)NH₂)-D-fenil-alanin-morfolid,

H-D-fenil-alanin-D-fenil-alanin-D-leucin-D-ornitin-(4-(2-amino-2-karboxi-etil)-benzil)-amid,

H-D-fenil-alanin-D-fenil-alanin-D-leucin-D-lizin-morfolid,

H-D-fenil-alanin-D-fenil-alanin-D-norleucin-D-arginin-piperazinid, és

H-D-fenil-alanin-D-fenil-alanin-D-norleucin-D-arginin-6-(L-hidroortil-amino)-hez-1-il-amid.

11. Gyógyászati készítmény, mely az 1-10. igénypontok bármelyike szerinti szintetikus peptidet, fájdalomcsillapító mennyiségben, és egy gyógyászatilag elfogadható folyékony vagy szilárd hordozóját tartalmazza.

Melléklet :

A meghatalmazott:

S. B. G. & K.
Szabadalmi Ügyvégi Iroda
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
Telefon: 461-1000, Fax: 461-1099