

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 832095 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 832095

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
C07C

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date 10.06.1983

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 10.06.1983

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 11.12.1983

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 12.06.2019

(32) (33) (31) Etu oikeus - Prioritet - Priority

10.06.1982 US 387005

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • The Regents of the University of, 2200 University Avenue, Berkeley, Cal. 94720, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Lee, Nancy M., TOWN UNKNOWN, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 • Loh, Horace H., TOWN UNKNOWN, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

3 • Chang, Jaw-Kang, TOWN UNKNOWN, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Dynorfinamidianalogeja.

Dynorfinamidanaloger.

Dynorfiiniamidianalogeja

Keksintö koskee yleisesti dynorfiinia ja erityisesti dynorfiinianalogeja, joita voidaan käyttää narkoottisten analgeettien kanssa, kuten opiaattialkanoiden ja peptidianalgeettien, kuten enkefaliinien ja δ -endorfiinianalogien kanssa.

Yksi äskettäin löydettyistä aivolisäkepeptideistä sisältää 17 aminohappoa; sitä nimitetään dynorfiiniksi. Dynorfiinilla on todettu olevan voimakasta agonistivai-
kutusta marsun sykkyräsuoleen ja hiiren siemenjohtimeen. Sekä dynorfiini(1-13):n että dynorfiini (1-17):n rakenne on selvitetty, ja ne on molemmat syntetisoitu. Synteettisen dynorfiini (1-13):n vaikutuksen on biokokeissa todettu olevan yhtä voimakas kuin luonnossa esiintyvän peptidin mutta hiirikokeissa sen on osoitettu olevan suhteellisen heikko analgeettisena aineena.

Dynorfiini(1-13):lla on ilmoitettu olevan merkitsevää vaikutusta, päinvastoin kuin lyhyemmällä fragmentilla, dynorfiini (1-9):llä opiaattien ja δ -endorfiinin analgeettiseen tehoon eläimillä, jotka eivät ole ennen saaneet näitä analgeetteja. Tutkimukset viittaavat siihen, että dynorfiini (1-13) häiritsee morfiinin vaikutusta heikentäen merkitsevästi tai ehkäisten morfiinin morfiinikokemattomilla eli naiiveilla eläimillä aikaansaaman analgeesian.

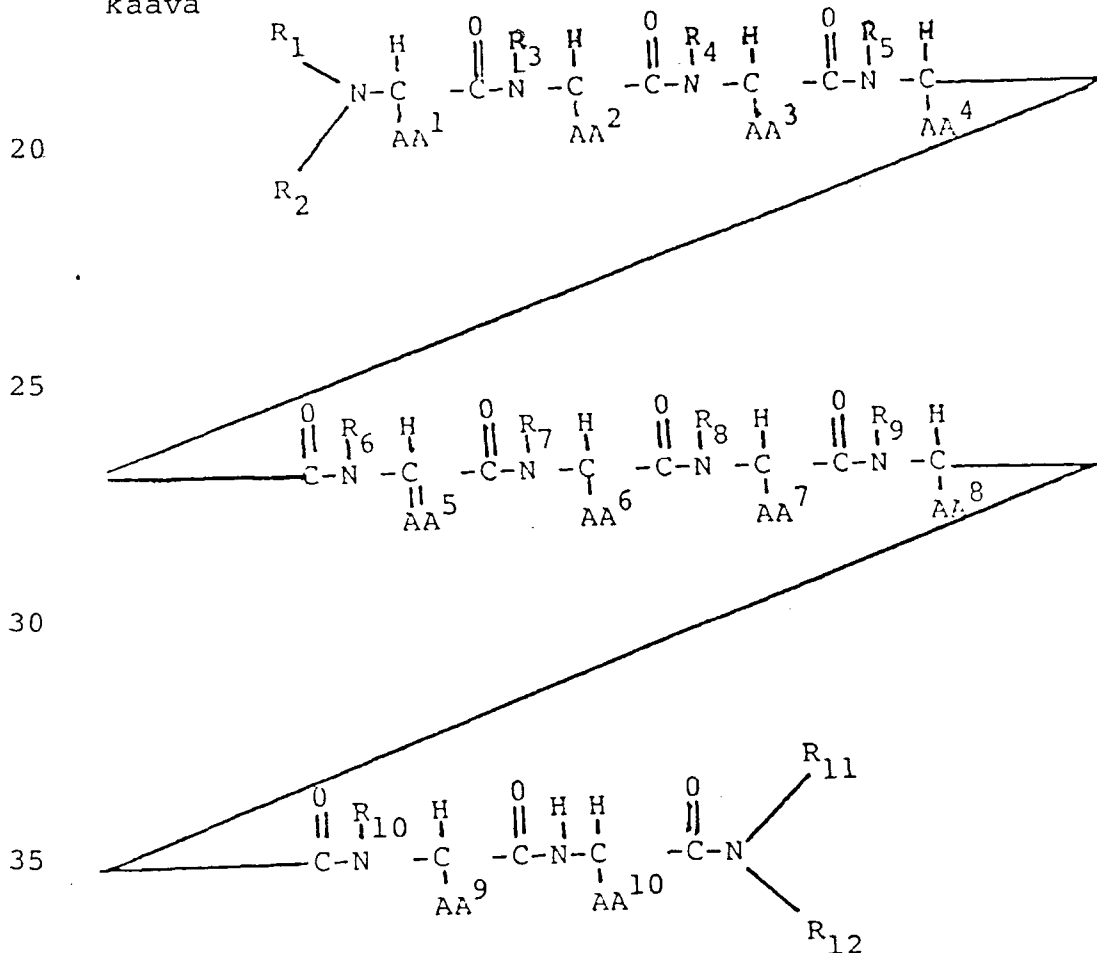
Nyt on keksitty, että dynorfiinin amidianalogit, joissa on vähintään 10 aminohappoa (mutta alle 13), ja varsinkin dynorfiini (1-10) amidi, eivät vaikuta naiiveilla eläimillä narkoottisten analgeettien antagonisteina siten kuin dynorfiini, dynorfiini (1-13) ja dynorfiini (1-13) amidi. Lisäksi dynorfiiniamidianalogien on todettu tehostavan analgeettista vaikutusta niitä sietävillä eläimillä. Dynorfiini (1-10) amidin ja sen tiettyjen amidianalogien on lisäksi todettu metaboloituvan hitaammin niitä saaneessa eläimessä, joten terapeutisessa käytössä riittävät pienem-

mät annokset kuin dynorfiini (1-13):n ollessa kyseessä.

Dynorfiini(1-10)amideja voidaan käyttää terapeut-
 tisesti sellaisissa tapauksissa, joissa potilaaseen eivät
 enää narkoottiset analgeetit vaikuta. Potilaille, jotka
 kivun lievittämiseksi tarvitsevat jatkuvaa käsittelyä
 5 narkoottisilla aineilla, kuten syöpäpotilailla loppu-
 vaiheessa voidaan käyttää pienempiä annoksia narkoottisia
 analgeetteja, esimerkiksi opiaattialkaloideja; samoin nar-
 koottisten aineiden väärinkäyttäjiä voidaan käsitellä
 narkoottisen aineen, kuten metadonin pienemmillä annok-
 10 silla. Tämän seurauksena erilaiset tunnetut sivuoireet,
 kuten hengityksen heikkeneminen ja ummuetus, jotka ovat
 seurauksena jatkuvista narkoottisten aineiden korkeista
 annoksista, voidaan vähentää.

Dynorfiiniamidianalogeja voidaan lisäksi käyttää
 15 narkoottisten aineiden vieroitusoireiden käsittelyyn.

Keksinnön mukaisilla edullisilla yhdisteillä on
 kaava



jossa R_1 ja R_2 ovat vety, alkyyli, allyyli, formylyli tai asetyyli, R_{11} ja R_{12} ovat vety, alkyyli tai allyyli, R_3 - R_{10} ovat vety tai $-\text{CH}_2)_n-$, jossa n on 1 tai 2, AA^1 on tyroksiini, AA^2 ja AA^3 ovat glysiini, AA^4 on fenyyli-
 5 alaniini, AA^5 on leusiini, AA^6 ja AA^7 ovat arginiini, AA^8 on isoleusiini, tyrosiini tai lysiini, AA^9 on arginiini tai proliini, ja AA^{10} on proliini.

Esillä oleva keksintö sopii käytettäväksi käytännöllisesti katsoen kaikkien narkoottisten analgeettien
 10 kanssa. Keksinnön mukaisia yhdisteitä voidaan käyttää esimerkiksi erilaisten opiumalkaloidien, kuten morfiinin, morfiinisuolojen morfiinihydrobromidi, morfiinihydrokloridi, morfiinimukaatti, morfiinioleaatti, morfiini-N-oksidi ja morfiinisulfaatti) ja morfiinianalogien (esim. normor-
 15 fiini, diasetyylidihydromorfiini, diasetyylimorfiinihydrokloridi, kodeiini ja diasetyylimorfiini eli heroiini) kanssa. Muita laajalti käytettyjä narkoottisia analgeetteja, joiden kanssa keksinnön mukaisia yhdisteitä voidaan käyttää, ovat esimerkiksi alfatrodiini, metadoni, meperidiini,
 20 levertanoli, propoksifeeni, fentanyyli, oksimorfon, analeridiini ja metoponi. Käyttöä voidaan laajentaa koskemaan peptidianalgeetteja, kuten enkefaliineja ja β -endorfiini-analogeja.

Kuten hyvin tiedetään, näiden narkoottisten analgeettien jatkuva käyttö johtaa tottumiseen tai riippuvaisuuteen, ja yhden käyttö johtaa toisten siedon paranemiseen. Näillä
 25 narkoottisilla analgeeteilla on kuitenkin niiden väärinkäyttömahdollisuudesta riippumatta terapeuttista käyttöä, esimerkiksi potilailla, jotka tarvitsevat kivun helpottamiseksi
 30 jatkuvaa käsittelyä.

Myös tällaisessa terapeuttisissa käytössä potilaissa kehittyy näiden narkoottisten analgeettien kasvava sietokyky. joten kivun helpottamiseen tarvitaan yhä voimakkaampia annoksia. Narkoottisten analgeettien suuriin, jatkuvasti annettuihin annoksiin liittyy tällöin tavallisesti ei toivottuja sivuvaikutuksia.
 35

Agonistisia vaikutuksia ihmiseen ja narkoottisten analgeettien riippuvuutta aiheuttavia ominaisuuksia voidaan tutkia (ja on tutkittu) monilla eri nisäkäslajeilla, sillä käytännön ja lainsäädäntösyistä tutkimuksia on ensin tehtävä pienillä jyrsijöillä ja/tai apinoilla ennenkuin lääkeaineiden analgeettisia ominaisuuksia tutkitaan ohmisillä. Tähän mennessä kuitenkin kaikkien sellaisten lääkeaineiden, joilla on norfiininkatlaisia ominaisuuksia nisäkkäillä, on todettu vaikuttavan ihmiseen morfiininkaltaisesti; onkin kehitetty useita erilaisia analgeettisia eläinkokeita jotka on laajalti hyväksytty käyttöön lääkeaineen vaikutuksen ennustamiseksi lääkeainetta ohmiselle annettaessa.

Keksinnön mukaisia yhdisteitä voidaan käyttää narkoottisten analgeettien yhteydessä, ja varsinkin opiaattialkalahoidien yhteydessä. Jollei muuta ilmoiteta, niin "dynorfiini" yksinään tarkoittaa tässä luonnossa esiintyvää tai synteettisesti valmistettua heptadekapeptidiä, ja ilmaisu dynorfiini lisämerkinnällä (1-10) tai (1-13) tarkoittaa polypeptidiä, jonka aminohapoista (esim. dynorfiini (1-10)) 13 luonnossa esiintyvän heptadekapeptidin aminohapoista.

Dynorfiinin 13 ensimmäisellä aminohapolla tai dynorfiini(1-13):lla on sekvenssi:

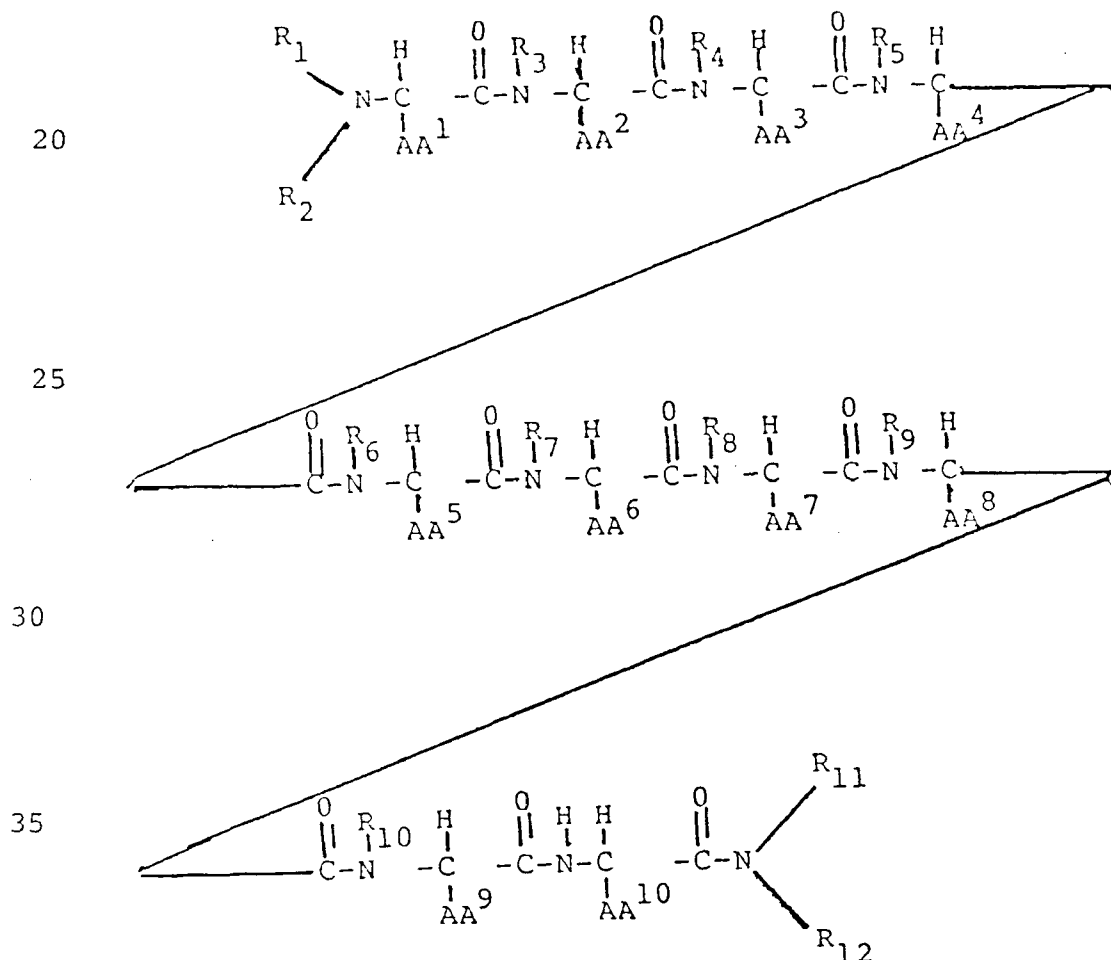
25 TYR-GLY-GLY-PHE-LEU-ARG-ARG-ILE-ARG-PRO-LYS-LEU-LYS.
 1 2 3 3 5 6 7 8 9 10 11 12 13

N-terminaalipää sisältää Leu-enkefaliinin (aminohapot 1-5) ja sen jälkeen C-terminaalijatkeen (aminohapot 6-13).
 30 Leu-enkefaliinin on uskottu olevan välttämätön biologisen aktiviteetin "sijaintina" ja Leu-enkefaliinin jatkeena olevan osuuden pituuden on uskottu olevan kriittinen vaikutuksen voimakkuuden kannalta.

Uusia dynorfiinipolypeptidianalogeja, joissa on vähintään 10 aminohappoa (mutta alle 13), on syntetisoitu ja

ne eroavat dynorfiini (1-13:sta siinä, että ne eivät potensoi eivätkä vaikuta antagonistisesti narkoottiseen analgeesiaan aikaisemmin käsittelemättömillä lääkkeensaajilla. Lääkkeeseen tottuneilla näiden analogien narkoottista analgeettista vaikutusta potenoiva vaikutus on vahvempi ja selektiivisempi kuin dynorfiini(1-13):lla.

Keksinnön mukaisissa yhdisteissä on vähintään 10 aminohappoa liittyneinä sekvenssiksi peptidisidoksin, joista aminohapoista tai rakenteellisesti samankaltaisista ryhmistä, kuten d- tai l-dopasta asemassa 1) N-terminaalipäästä 5 vastaavat Leu-enkefaliinia tai muistuttavat sitä, kun taas aminohapot 6-10 muodostavat molekyylin emäksen osan (jossa on emäksisisä tai emäksisisä ja neutraaleja ryhmiä). Keksinnön mukaisia dynorfiiniamidianalogeja, joiden aminohappojen numerointi aloitetaan N-terminaalipäästä tai aminoryhmästä, esitetään yleensä seuraavalla kuviolla I.



R_1 ja R_2 ovat vety, alkyyli, allyyli tai asyyli (kuten formyyli tai asetyyli); R_{11} ja R_{12} ovat bety, alkyyli tai bentsyyli (substituoitu tai substituoimaton), toinen ryhmistä R_{11} ja R_{12} voi olla emäksinen tai neutraali dipeptidi ja toinen vety tai alkyyyliryhmä; R_3 - R_{10} ovat vetyjä tai alkyyyliryhmiä, joissa on korkeintaan 4 hiiliatomia (suoria tai haarautuneita), edullisimmin metyyli tai etyyyliryhmiä; ja sekvenssien aminohapot ovat seuraavat:

5 AA^1 on tyrosiini, m-tyrosiini tai dopa (d- tai l-muoto), edullisesti tyrosiini;

AA^2 ja AA^3 voivat olla glysiini tai muita neutraaleja aminohappoja joko d- tai l-muodossa (esim. seriini, treoniini, kysteiini, tyrosiini, asparagiini, metioniini tai glutamiini) tai α -aminoisovoihappo (AIB), edullisesti glysiini;

15 AA^4 voi olla fenyylialaniini, α -alkyloitu fenyylialaniini (kuten α -metyylifenyylialaniini), p-halogeeni-fenyylialaniini tai tyrosiini, edullisesti fenyylialaniini;

20 AA^5 voi olla leusiini, isoleusiini tai valiini, edullisesti leusiini;

AA^6 ja AA^7 voivat olla d- tai l-muodossa olevia emäksisiä aminohappoja (esim. argiini, lyysiini tai histidiini), homoarginiini tai ornitiini, edullisesti argiini;

25 AA^8 voi olla neutraali tai emäksinen d- tai l-muodossa oleva aminohappo, leusiini tai isoleusiini, edullisesti tyrosiini, isoleusiini tai lyysiini;

AA^9 voi olla d- tai l-muodossa oleva emäksinen aminohappo, homoarginiini, ornitiini tai proliini, edullisesti argiini tai proliini;

30 AA^{10} voi olla d- tai l-muodossa oleva emäksinen aminohappo, proliini tai proliinianalogi (kuten tioproliini, 3,4-dehydroproliini, 4-hydroksiproliini tai piperoliinihappo), edullisesti proliini tai lyysiini.

TYR-GLY-GLY-PHE-LEU-ARG-ARG-ILE-ARG-PRO

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

jossa proliiniterminaalin karbonyylihiili on amidoitu
tässä joskus käytetään nimitystä "dynorfiini (1-10)ami-
5 di");

TYR-GLY-GLY-PHE-LEU-ARG-ARG-LYS-ARG-PRO

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

jossa proliiniterminaalin karbonyylihiili on amidoitu
(tässä käytetään joskus nimitystä "kaavan 1 mukainen
10 analogi");

Valmistusta kuvataan seuraavassa esimerkissä 1

Esimerkki 1

Dynorfiini(1-10)-NH₂ syntetisoitiin Boc-Pro-BHA-
(betsyylihydroyyliamiini)-kiintotukihartsilla (2 mM/4,5 g
15 hartsia). Merrified-menetelmällä vastaavat Boc-suojatut
aminohapot lisättiin Peninsula manual kiintofaasipepti-
disyntetisoijalla Boc-Pro-BHA-hartsille: Arg(Tos),lle,
Arg(Tos), Arg(Tos), Leu, Phe, Gly, Gly ja Tyr(o-Br-Z).
Kutakin suojattua aminohappoa käytettiin 0,5-molaari-
20 sena ylimääränä. KytKentäreaktion onnistumista seuratiin
puolikvantitatiivisella ninhydriinikokeella. Boc-suojatun
aminohapon liittämiseen Boc-Pro-BHA-hartsiin käytettiin
seuraavia vaiheita:

1. Pesu CH₂Cl₂:lla (3 x 100 ml)
- 25 2. Esipesu 33-%:isella TFA-CH₂Cl₂-seoksella, jossa
1 % indolia (1 x 100 ml)
3. Suojaryhmän poisto 33-%:isella TFA-CH₂Cl₂-seok-
sella, jossa 1 % indolia (1 x 100 ml), 20 min.
4. Pesu CH₂Cl₂:lla (1 x 100 ml)
- 30 5. Pesu EtOH:lla (1 x 100 ml)
6. Pesu CH₂Cl₂:lla (2 x 100 ml)
7. Esipesu 10-%:isella Et₃N-CH₂Cl₂-seoksella (1 x 100 ml).
8. Neutralointi 10-%:sella Et₃N-CH₂Cl₂-seoksella
(1 x 100 ml), 10 min.
- 35 9. Pesu CH₂Cl₂:lla (3 x 100 ml)

10. Lisättiin suojattua aminohappoa (5,0- m ylimäärä) DMF:ssä (10 ml ja CH_2Cl_2 :ssa (50 ml).

11. Lisättiin DCC:tä CH_2Cl_2 :ssa (0,5 M, 20 ml), reaktioaika oli jopa 3 tuntia.

5 12. Pesu CH_2Cl_2 :lla (3 x 100 ml).

Saatu suojattu Boc-Tyr(O-Br-Z)-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg (Tos)-Arg(Tos)-Ile-Arg(Tos)-Pro-BHA-hartsia pestiin hyvin 33-%:isella TFA- CH_2Cl_2 -seoksella, CH_2Cl_2 :lla ja MeOH:lla. Yön yli kestävän vakuumikuivauksen jälkeen peptidihartsia pilkottiin käsittelemällä tunnin ajan HF:llä (30 ml)g hartsia) anisolin (3 ml/g hartsia) läsnäollessa 0°C :ssa. Reaktioseos kuivattiin vakuumissa ja pestiin vedettömällä eetterillä. Haluttu peptidi liuotettiin 10-%:iseen HOAc-liuoksen ja hartsia suodatettiin pois. Suodos peptidi 10 puhdistettiin partitiokromatografialla käyttäen eluointiliuottimena n-BuOH:pyridiini: H_2O -seosta (11:5:3) ja

CM-ioninvaihtokromatografialla, jolloin saatiin puhdas dynorfiini(1-10)- NH_2 .

Keksinnön parhaassa suoritusmuodossa dynorfiini 20 (1-10) amidin tai jonkin sen keksinnön mukaisen analogin annos annetaan isäntäeläimelle samalla kun annetaan annos narkoottista analgeettia, jolloin dynorfiini (1-10)amidi tai sen analogi annetaan viimeistään noin 30 minuutin kuluessa narkoottisen analgeetin antamisesta. Edullisimmin 25 lääkeanto suoritetaan yhtenä sekoitettuna annoksena, joka sisältää narkoottisen analgeettina morfiinia, morfiini-analogia tai morfiinisulolaa tai muuta peptidianalgeettia.

Kun narkoottinen analgeetti on morfiini ja potilas on aikaisemmin käsittelemätön (naiivi) normaaliannos on 30 suuruusluokkaa 5 mg i.v. noin 70 kg painavalle potilaalle. Sopiva dynorfiini (1-10)amidin tai sen analogin annos analgeetin yhteydessä on noin 60-200 μg /kehonpaino-kg. Vaikka dynorfiini(1-10)amidi tai sen analogi ei potensioikaan narkoottista analgeettia naiivilla potilaalla se 35 ei ole myöskään antagonistia), niin potilaan saadessa jatku-

vaa käsittelyä narkoottisella aineilla kivun lievittämiseksi tarvittava narkoottisen aineen taso riittävän analgeettisen vaikutuksen saamiseksi käsittelyajanjaksona on vähäisempi kuin jos dynorfiini(1-10)amidia tai sen analogia ei anneta narkoottisen aineen yhteydessä. Tästä
 5 seuraa, että suurien narkoottisten ainemäärien toistuvaan annostukseen liittyvät erilaiset ei-toivotut sivuvaikutukset vähenevät.

Narkoottisiin aineisiin tottuneiden potilaiden ("tolerantti" potilas) annos voidaan määrittää seuraavasti. Aluksi määritetään narkoottisen analgeetin riittävä annos, jolla on riittävä analgeettinen vaikutus potilaaseen. Riittävän annoksen sijasta annetaan kuitenkin etukäteen määrätty annos narkoottista analgeettia. Tämä etukäteen määrätty eli toinen annos sisältää
 15 narkoottista analgeettia määrän, joka ei riitä aikaansaamaan analgeettista vaikutusta potilaassa. Narkoottisen analgeetin lisänä annetaan dynorfiini(1-10)amidia tai sen analogia. Tämän lisäaineen määrä on edullisesti riittävä tuottamaan potilaalle kivun lieventymisen, joka on
 20 tasoltaan olennaisesti sama kuin pelkästään narkoottista analgeettia annettaessa.

On ymmärrettävä, että ensimmäinen eli riittävä annos, alempi toinen annos ja lisänä annettu annos vaihtelevat riippuen käsitellyn potilaan narkoottisten analgeettien toleranssista; nämä annokset määrä tavallisesti hoitava
 25 lääkäri.

Vaikka edullisin tapa soveltaa keksintöä on käyttää keksinnön mukaisia yhdisteitä narkoottisten analgeettien yhteydessä, jotta yhtenä annoksena annetun narkoottisen
 30 analgeetin määrä voitaisiin alentaa niin niillä uskotaan myös olevan terapeuttista käyttöä käsiteltäessä narkoottisten aineiden väärinkäyttäjiiä vieroitusoireiden poistamiseksi tai vähentämiseksi.

Seuraavat koemenetelmät, materiaalit ja tulokset
 35 esitetään keksinnön selventämiseksi. Kuitenkin myös muut

keksinnön suojapiirit kuuluvat aspektit, edut ja muun
 nokset ovat alan asiantuntijalle ilmeiset.

Urospuolisia ICR-hiiriä (Gilroy, CA), jotka pai-
 noivat 20-25 g, pidettiin häkissä vähintään vuorokauden
 ajan ennen koetta, ja ne käytettiin kokeisiin 5 vuoro-
 5 kauden kuluessa. Kutakin hiirtä käytettiin vain kerran.

Analgeettinen teho mitattiin hännänykäisy-menetel-
 mällä, jonka ovat kuvanneet D'Amour ja Smith, J. Pharmac.
 Exp. Ther. , 72, sivut 74-79 (1941), ja modifioituneet
 Tulunay ja Takemori, J. Pharmac. Exp. Ther., 190, sivut
 10 395-400 (1974). ED₅₀:n (vaikuttava annos 50 F:lle koe-
 ryhmän eläimistä) määrittämiseksi elänten vasteen loppu-
 pisteeksi määrättiin tietty kohta, joka edusti reaktio-
 ajan merkitsevää lisääntymistä. Loppupisteenä pidettiin
 yksittäisen eläimen reaktioajan sellaista pitenemistä,
 15 joka oli suurempi kuin kokeessa käytetyn kontrolliryhmän
 kaikkien eläinten keskimääräisen reaktioajan 3 SD (SD = stan-
 dardipoikkeama). Kontrolliryhmän tavallinen keskimääräinen
 reaktioaika oli $3,1 \pm 0,05$ sek. Eläimet, jotka eivät
 reagoineet kuumennusärsytykseen 10 sekunnissa, poistet-
 20 tiin hännän vaurioitumisen estämiseksi 30 minuuttia ennen
 koetta eläimiin injektoitiin lääkeainetta, jollei muuta
 ilmoiteta. Morfiini injektoitiin ihonalaisesti (s.c.) ja
 polypeptidit injektoitiin aivokammionsisäisesti (i.c.v.)
 4 ml:ssa suolaliuosta.

25 Eläimet jaettiin kahdeksi ryhmäksi. Toinen ryhmä
 käsitti morfiinitolerantit eläimet (addiktit) ja toinen
 eläimet, jotka eivät olleet saaneet aikaisemmin morfiinia
 (ei-addiktit). Toisen ryhmän kunkin eläimen morfiinitole-
 ranssi todettiin panemalla eläimen ihon alle morfiini-
 30 pellettisierre (75 mg morfiiniemästä) menetelmällä, jonka
 ovat esittäneet Way et al., J. Pharmac. Exp. Ther., 167,
 sivut 1-8 (1969). Pelletit poistettiin 72 tunnin kuluttua
 niiden sijoittamisesta ja hiiren morfiinitoleranssi ko-
 keiltiin 6 tuntia myöhemmin.

35 Sekä morfiini tolerantin ryhmän ja toisen naiivin

ryhmän eläimiä käytettiin vähintään 30 kummankin ryhmän annos-vaste-käyrän ja ED_{50} -arvojen määrittämiseen jokaisessa käsittelyssä. ED_{50} -arvot, niiden 95 %:n luotettavuusrajat ja kahden ED_{50} -arvon potenssisuhteen merkitsevyys määritettiin Litchfieldin ja Wilcoxonin menetelmällä,
 5 J. Pharmac. Exp. Ther., 96:99-113 (1949).

Näissä kokeissa lääkeaineet olivat morfiinisulfaatti (Mallinckrodt Chemical Works, St. Louis, MO) ja β -endorfiini (Lahjoittaja: tri N. Ling, Salk Institute, San Diego, CA).

10 Seuraavat esimerkit II ja III valaisevat dynorfiini (1-13):n vaikutusta morfiinitolerantin eläinryhmän analgeesiaan sitä annettaessa eläimille morfiinin ja β -endorfiinin yhteydessä. Esimerkki IV esitetään esimerkkien II ja III vertailuksi.

15 Vsikka dynorfiini (1-13):a annettiin esimerkeissä II-IV i.c.v.-annostuksena, niin suonensisäisellä (i.v.) ja ihonalaisella (s.c) annostuksella saatiin vertailukelpoisilla annoksilla samankaltaiset tulokset.

Esimerkki II

20 Yli 90 morfiinitoleranttia eläintä käsiteltiin (s.c.) erilaisilla määrillä morfiinisulfaattia, jota käytettiin joko yksinään tai yhdessä erilaisten määrien kanssa dynorfiini(1-13):a (i.c.v.), ja analgeettinen vaikutus kokeiltiin. Näiden kokeiden tulokset on esitetty
 25 seuraavassa taulukossa, jonka luvut on saatu kolmesta annos-vaste-käyrästä (jokainen määritetty käyttäen vähintään 30 eläintä), joista yksi saatiin ilman dynorfiini (1-13) annostusta ja kaksi antamalla dynorfiini(1-13):a morfiiniannon yhteydessä.

30	<u>Morfiini (mg/kg)</u>	<u>Dynorfiini (ug)</u>	<u>Analgeettinen (%)</u>
	25	---	---
	60	---	---
	80	---	---
	15	10	10
	25	10	10
35	60	10	85

15	20	30
25	20	70
40	20	100

Kuten edellä olevista koetuloksista nähdään, dynorfiini (1-13) potensoi morfiinin vaikutusta morfiinitoleranteilla eläimillä, Morfiinin ED₅₀ aleni siten arvosta noin 60 mg/kg noin 29 mg/kg-arvoon käytettäessä 10 µg dynorfiini (1-13) ja noin 60:sta (mg/kg) noin 18:aan (mg/kg) käytettäessä dynorfiini (1-13) 20 µg.

Esimerkki III

Yli 90 morfiinitoleranttia eläintä käsiteltiin (i.c.v.) erilaisilla määrillä β -endorfiinia, jota käytettiin joko yksinään tai yhdessä erilaisten määrien kanssa dynorfiini(1-13):a (i.c.v.), ja analgeettinen vaikutus kokeiltiin. Näiden kokeiden tulokset on esitetty seuraavassa taulukossa, jonka luvut on saatu kolmesta annos-vaste-käyrästä (jokainen määritetty käyttäen vähintään 30 eläintä), joista yksi saatiin ilman dynorfiini (1-13)-annostusta ja kaksi antamalla dynorfiini(1-13):a morfiiniannon yhteydessä.

<u>-Enorfiini (µg/hiiri)</u>	<u>Dynorfiini (µg)</u>	<u>Analgesiittinen vaikutus (%)</u>
1	---	10
2	---	40
6	---	100
0,5	10	10
1	10	60
2	10	80
0,25	20	20
0,5	20	40
1	20	80

Kuten edellä olevista koetuloksista nähdään, dynorfiini (1-13) potensoi β -endorfiinin vaikutusta. β -endorfiinin ED₅₀ aleni siten noin 2,25 µg:sta/hiiri noin 1,00 µg:aan/hiiri annettaessa 10 µg dynorfiini(1-13):a ja noin 0,55 µg:aan/hiiri annettaessa 20 µg dynorfiini(1-13):a.

Vertailuksi esitetty seuraava esimerkki IV valaisee

dynorfiini(1-13):n vaikutusta morfiinin kanssa käytettynä analgeettisen vaikutuksen saamiseksi naiiveilla eläimillä (jotka eivät ole aikaisemmin saaneet morfiinia).

Esimerkki IV

5 Yli 90 naiivia eläintä käsiteltiin (s.c.) erilaisilla määrillä morfiinisulfaattia, jota käytettiin joko yksinään tai yhdessä erilaisten määrien kanssa dynorfiini (1-13):a (i.c.v.) ja analgeettinen vaikutus kokeiltiin. Näiden kokeiden tulokset on esitetty seuraavassa taulu-
10 kossa, jonka luvut on saatu kolmesta annos-vaate-käyrästä (jokainen määritetty käyttäen vähintään 30 eläintä), joista yksi saatiin ilman dynorfiini(1-13):a ja kaksi antamalla dynorfiini(1-13):a morfiiniannon yhteydessä.

	<u>Morfiini (mg/kg)</u>	<u>Dynorfiini (µg)</u>	<u>Analgeettinen vaikutus (%)</u>
15	2	---	10
	4	---	30
	5	---	60
	7,5	---	80
	3,75	10	10
	10	10	60
20	15	10	100
	7,5	20	10
	10	20	30
	20	20	60
	40	20	100

25 Kuten edellä olevista koetuloksista nähdään, dynorfiini (1-13) ehkäisi merkitsevästi morfiinin indusoiman analgeesian annoksesta riippuvassa suhteessa ja käänsi morfiinivastekäyrän oikealle. Morfiinin ED₅₀ (s.c.) muuttui siten arvosta noin 4,9 mg/kg noin 8,4:ksi ja noin 14,5:ksi
30 annettaessa samalla dynorfiini(1-13):a vastaavasti 10 ja 20 µg.

Samankaltainen vaikutus analgeesiaan havaittiin annettaessa β -endorfiinia (i.v.c.). Samankaltaisissa kokeissa dynorfiini (1-9) ei vaikuttanut ehkäisevästi morfiinilla saatuun analgeesiaan aina annokseen 40 µg asti
35

eikä dynorfiini (6-13) aina annokseen 80 µg asti.

Esimerkin IV ja esimerkkien II ja III tuloksia verat-
taessa voidaan havaita, että naiiveilla eläimillä dynor-
fiini ei vaikuttanut morfiinianalgeesiaan, kun sensijaan
morfiinitoleranteilla eläimillä dynorfiini potensoi
5 morfiinin vaikutusta. Tämä muutos morfiinin ED₅₀-arvossa
ei johdu dynorfiinin omasta tehosta, sillä dynorfiinilla
ei aina arvoon 50 µg/hiiri ole havaittua analgeettista
vaikutusta. Samankaltaiset tulokset saatiin β-endorfiinilla
aikaansaadussa analgeesiassa. Sekä morfiinin että
10 β-endorfiinin tapauksessa potensointi oli riippuvainen
annoksesta.

Seuraava esimerkki V valaisee dynorfiini (1-10) amidin
vaikutusta morfiinilla aikaansaatuun analgeesiaan naii-
veilla hiirillä.

15 Esimerkki V

Vähintään 30 naviivia eläintä käsittävälle ryhmälle
annettiin morfiinisulfaattia s.c. joko yksinään tai yh-
dessä erilaisten määrien kanssa dynorfiini (1-10)amidia
tai dynorfiini (1-13)amidia.

20 Käsittely toistettiin toisella vähintään 30 naiivia
eläintä käsittävällä ryhmällä ja tulosten vahvistukseksi
suoritettiin yksittäiset sokeakokeet.

	<u>i.c.v. (µg)</u>	<u>ED₅₀</u>
25	suolaliuos	4,7 (3,2-6,8)
	dynorfiini (1-10) amidi 20	5,0 (3,12-8,00)
	dynorfiini (1-10) amidi 10	4,3 (3,1-5,9)
	dynorfiini (1-10) amidi 50	4,4 (2,7-7,1)
30	dynorfiini (1-13) amidi 10	14,0 (11,3-17,4)

Kuten edellä olevista koetuloksista nähdään, dynor-
fiini (1-10)amidi ei muuttunut morfiinivastekäyrästä,
joten naiiveilla eläimillä ei saatu antagonismia eikä
potensointia. Tässä suhteessa vaikutus eroaa dynorfiini
35 (1-13):n vaikutuksesta naiiveihin eläimiin.

Seuraava esimerkki VI valaisee dynorfiini(1-10)amidin, kaavan 1 mukaisen analogin, kaavan 2 mukaisen analogin ja amidoidun dynorfiini(1-13):n vaikutusta morfiinianalgeesiaan morfiinitoleranteilla eläimillä.

5 Esimerkki VI

Vähintään 30 morfiinitoleranttia eläintä käsittävää ryhmää käsiteltiin morfiinisulfaatilla (s.c.) joko yksinään tai yhdessä keksinnön mukaisten dynorfiiniamidianalogien kanssa. Lisäksi syntetisoitiin dynorfiini(1-13)-amidi ja sitä käytettiin vertailukokeissa.

Käsittely toistettiin toisella vähintään 30 toleranttieläintä käsittävällä ryhmällä ja tulosten varmistamiseksi suoritettiin yksittäiset sokeakokeet.

	<u>ug</u>	<u>ED₅₀</u>
15		
	suolaliuos	41,5 (30,7-56,0)
	dynorfiini(1-10)amini 20	9,9 (6,6-15,2)
	kaavan 1 mukainen analogi 20	17,5 (13,4-22,9)
	kaavan 2 mukainen analogi 20	23,0 (17,6-30,..)
20	dynorfiini(1-13)amidi 50	10,8 (7,2-16,2)

Kuten edellä olevista koetuloksista nähdään, dynorfiini(1-10)amidi potensoi vahvasti morfiinilla aikaansaatua analgeesiaa (siirsi morfiinivastekäyrää vasemmalle) morfiinitoleranteilla eläimillä. Kaavan 1 ja 2 mukaiset analogit potensoiivat myös morfiinin vaikutusta, mutta vähäisemmässä määrin.

Morfiinitoleranteilla eläimillä myös dynorfiini(1-13)amidipotensoi morfiinianalgeesiaa.

Muissa kokeissa dynorfiini(1-10)amidi osoittautui vaikutukseltaan tehokkaammaksi kuin dynorfiini(1-13) estämään hiiren siemenjohtimen nykäyksiä (dynorfiini(1-10)amidin $IC_{50}=0,24$ nM ja dynorfiini(1-13):n $IC_{50}=3,9$ nM). Sidontakokeet osoittivat, että molemmilla opioidipeptideillä oli samankaltaiset profiilit molempien edistäessä

dihydromorfiinin (DHM) sitoutumista pikomolaarisina konsentraatioina, mutta estävät DHM:n sitoutumisen nanomolaarisina konsentraatioina (dynorfiini(1-10)amidin $IC_{50} = 5nM$). Hiiren häntänykäisykokeessa dynorfiini (1-10)amidilla on kuitenkin selektiivisempi vaikutus morfiinianalgeesiaan.

Yhteenvetona edellä olevasta: vaikka dynorfiini (1-10)amidilla ei itsessään olekaan merkitsevää analgeettista aktiviteettia (jollei sitä anneta erittäin suurina annoksina, jolloin se aikaansaa kouristuksia ja muita samankaltaisia oireita), se eroaa dynorfiini (1-13):sta siinä, ettei se potensoi morfiinia eikä ole sille antagonistinen naiiveilla eläimillä. Toisaalta morfiinitoleranteilla eläimillä dynorfiini (1-10)amidi näyttää olevan tehokkaampi ja selektiivisempi analogi kuin dynorfiini(1-13).

Edellä on kuvattu keksintöä esittäen sen erityisiä toteutusmuotoja, jolloin on kuitenkin ymmärrettävää, että näitä voidaan muunnella, ja että tämä hakemus käsittää kaikki sellaiset keksinnön variaatiot, käytöt tai käyttösovellutukset, jotka perustuvat keksinnön periaatteeseen ja että keksintöön sisältyvät sellaiset poikkeamat esillä olevasta selityksestä, jotka voidaan katsoa alalla tunnetuiksi tai tavanomaisiksi, ja kaikki tällaiset muunnokset ja variaatiot kuuluvat myös keksinnön suojapiiriin, joka on määritelty seuraavissa patenttivaatimuksissa.

Patenttivaatimukset

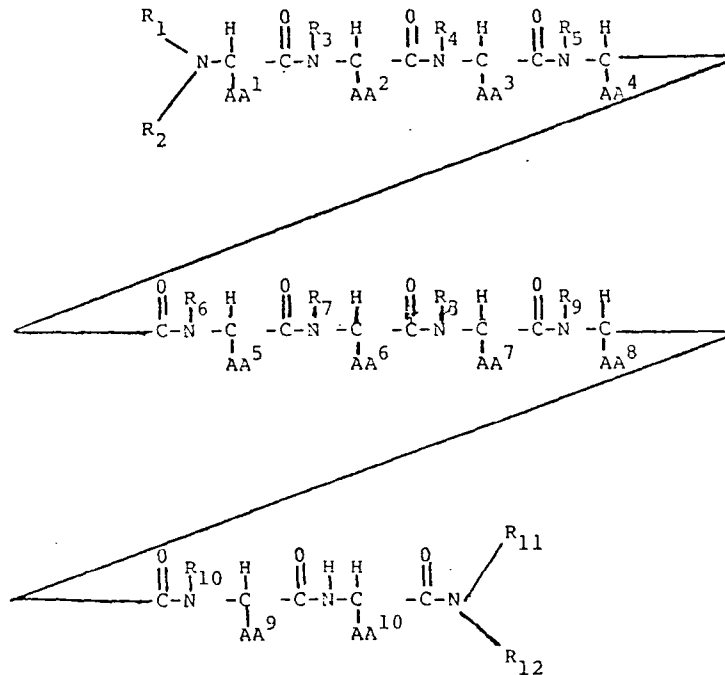
1. Menetelmä uusien terapeuttisesti käyttökel-
poisten dynorfiinianidianalogien valmistamiseksi, joilla
on kaava

5

10

15

20



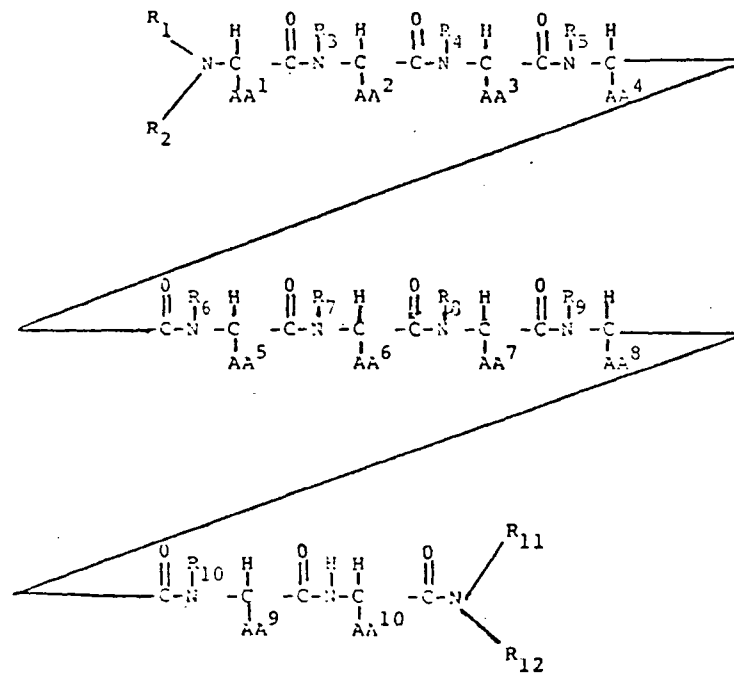
jossa R_1 ja R_2 ovat vety, alkyyli, allyyli, formylyli
tai asetyyli, R_{11} ja R_{12} ovat vety, alkyyli tai allyyli,
25 R_3 - R_{10} ovat vety tai $(-CH_2-)_n$, jossa n on 1 tai 2,
 AA^1 on tyrosiini, AA^2 ja AA^3 ovat glysiini, AA^4 on fe-
nyylialaniini, AA^5 on leusiini, AA^6 ja AA^7 ovat argi-
niini, AA^8 on isoleusiini, tyrosiini tai lysiini, AA^9 on
arginiini tai proliini, ja AA^{10} on proliini, t u n -
30 n e t t u siitä, että hartsiin, joka sisältää Boc-Pro-
BHA:ta liitetään peräkkäin AA^9 , AA^8 , AA^7 , AA^6 , AA^5 , AA^4 ,
 AA^3 , AA^2 ja AA^1 ja saatu polypeptidi poistetaan hart-
sista.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
35 t u n n e t t u siitä, että polypeptidissä on sekvenssi

TYR-GLY-GLY-PHE-LEU-ARG-ARG-AA⁸-ARG-PRO, jossa proliini on amidoitu ja AA⁸ on tyrosiini, isoleusiini tai lysini.

Patentkrav

1. Förfarande för framställning av nya terapeutiskt användbara dynorfinamidanaloger med formeln



vari R_1 och R_2 är väte, alkyl, allyl, formyl eller acetyl, R_{11} och R_{12} är väte, alkyl eller allyl, R_3 - R_{10} är väte eller $(-CH_2-)$, vari n_5 är 1 eller 2, AA^1 är tyrosin, AA^2 och AA^3 är glycin, AA^4 är fenylalanin, AA^5 är leucin, AA^6 och AA^7 är arginin, AA^8 är isoleucin, tyrosin eller lysin, AA^9 är arginin eller prolin och AA^{10} är prolin, k ä n - n e t e c k n a t därav, att till ett harts, vilket innehåller Boc-Pro-BHA, fogas efter varandra AA^9 , AA^8 , AA^7 , AA^7 , AA^6 , AA^5 , AA^4 , AA^3 , AA^2 och AA^1 , och den erhållna polypeptiden avlägsnas från hartset.

2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att polypeptiden innehåller sekvensen TYR-GLY-GLY-PHE-LEU-ARG-ARG- AA^8 -ARG-PRO, vari prolinet är amiderat och AA^8 är tyrosin, isoleucin eller lysin.