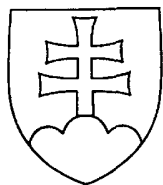


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

287714

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl. (2011.01):

A61K 31/00
A61P 23/00

- (21) Číslo prihlášky: **1290-2003**
(22) Dátum podania prihlášky: **19. 3. 2002**
(24) Dátum nadobudnutia účinkov patentu: **6. 7. 2011**
Vestník ÚPV SR č.: **7/2011**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **01107026.5**
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **21. 3. 2001**
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **EP**
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **8. 6. 2004**
Vestník ÚPV SR č.: **6/2004**
(47) Dátum sprístupnenia patentu verejnosti: **17. 6. 2011**
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:
(67) Číslo pôvodnej prihlášky úžitkového vzoru v prípade odbočenia:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **PCT/EP02/03032**
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **WO02/074297**
(96) Číslo podania európskej patentovej prihlášky:

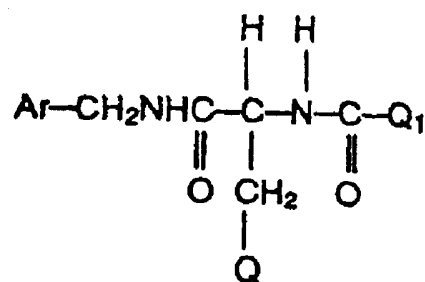
(73) Majiteľ: **SCHWARZ PHARMA AG, Monheim, DE;**

(72) Pôvodca: **Selve Norma, Troisdorf, DE;**

(74) Zástupca: **Bušová Eva, JUDr., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Použitie aminokyselinového derivátu na prípravu farmaceutickej kompozície na liečenie fantómovej bolesti alebo diabetickej neuropatickej bolesti**

(57) Anotácia:
Použitie aminokyselinového derivátu všeobecného vzorca (I), kde Ar je fenyľ, ktorý je nesubstituovaný alebo substituovaný aspoň jednou halogénskypinou; Q je nižšia alkoxyskupina obsahujúca 1 až 3 uhlíkové atómy a Q₁ je metylskypina; alebo jeho farmaceuticky prijateľnej soli na prípravu farmaceutickej kompozície na liečenie fantómovej bolesti alebo diabetickej neuropatickej bolesti.



(I)

SK 287714 B6

Oblasť techniky

Predkladaný vynález sa týka použitia skupiny špecifických aminokyselinových derivátov I na prípravu farmaceutických kompozícií na liečenie fantómovej bolesti alebo diabetickej neuropatickej bolesti.

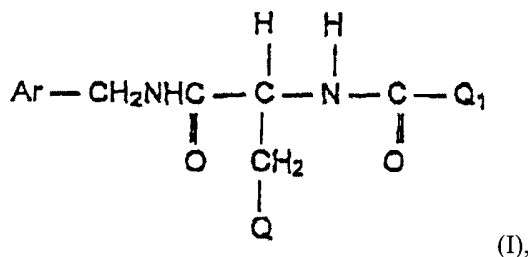
Doterajší stav techniky

Zlúčeniny používané podľa vynálezu sú známe činidlá, užitočné v protizáchvatovej liečbe pri poruchách centrálného nervového systému, takých, ako epilepsia, mŕtvica a mozgová ischemia. Jednou takou zlúčeninou je (R)-2-acetamido-N-benzyl-3-metoxypropionamid, ktorý je tiež označovaný ako harkoserid alebo zlúčenina SPM 927.

V dokumente EP A 1 243 262 je opísané použitie rovnakých zlúčenín predovšetkým na liečenie neuropatickej zápalovej bolesti, ako je bolesť pri reumatoidnej artritíde alebo sekundárna zápalová bolesť pri osteoartritíde. Napriek tomu, že sa tu tiež uvádza aktivita zlúčeniny SPM 927 pri modelovej periférnej neuropatii, konkrétne použitie na liečenie fantómovej bolesti alebo diabetickej neuropatickej bolesti v tomto dokumentu nie je opísané.

Podstata vynálezu

Predmetom vynálezu je použitie aminokyselinového derivátu všeobecného vzorca (I)



kde

Ar je fenyľ, ktorý je nesubstituovaný alebo substituovaný aspoň jednou halogénskúpinou;

Q je nižšia alkoxykupina obsahujúca 1 až 3 uhlíkové atómy a Q₁ je metylskúpinu;

alebo jeho farmaceuticky prijateľnej soli na prípravu farmaceutickej kompozície na liečenie fantómovej bolesti alebo diabetickej neuropatickej bolesti.

Symptóm fantómovej bolesti, ktorý je možné podľa vynálezu liečiť, je nezávislý od pôvodu základného ochorenia.

Prednostné zlúčeniny vynálezu sú tie, podľa vzorca (I), kde zlúčeniny sú (R), (S) alebo (R,S) izomér.

Najprednostnejšia zlúčenina vynálezu je (R)-2-acetamido-N-benzyl-3-metoxypropionamid alebo jeho farmaceuticky prijateľná soľ.

Bolesť je subjektívna skúsenosť a vnímanie bolesti je sprostredkované v špecifických častiach centrálného nervového systému (CNS).

Obvykle škodlivé (periférne) stimuly sú napred prenesené do centrálného nervového systému, ale bolesť nie je vždy spojená s nocicepciou.

Existuje veľká rozmanitosť rôznych typov klinickej bolesti, ktorá je odvodená od rozdielnych základných patofyziologických mechanizmov a ktorá bude potrebovať rozdielne liečebné prístupy.

Vnímanie bolesti môže byť charakterizované tromi hlavnými typmi klinickej bolesti:

- akútna bolesť,
- chronická bolesť,
- neuropatická bolesť.

Akútna bolesť väčšinou pochádza zo zápalu alebo poranenia mäkkého tkaniva. Tento typ bolesti je prispôsobivý a má príslušnú biologickú funkciu varovania a umožnenia vyliečenia a obnovenia už poškodených častí tela, aby bola neporušená. Ochranná funkcia je dosiahnutá tak, že zranená/zapálená celá plocha a okolité tkanivo je hypersenzitívne na všetky stimuly, takže sa vyhýba kontaktu s akýmkoľvek vonkajším stimulom. Neuronálne mechanizmy, tvoriace základ tohto typu klinickej bolesti, sú veľmi dobre známe a farmakologická kontrola akútnej klinickej bolesti je dostupná a účinná, použitím napríklad od nesteroidných protizápalových liekov (NSAID) až k opioidom v závislosti od typu a rozšírenia vnemu.

Chronická klinická bolesť sa javí ako vytrvalé zmyslové abnormality, pochádzajúce z trvajúceho periférneho patologického stavu, spôsobeného ochorením, takým, ako rakovina alebo chronický zápal (napríklad artritída) alebo môže byť nezávislá od počiatočných príčin. Tá posledne menovaná býva maladaptívna, neposkytuje žiadne výhody na prežitie a veľmi často nie je dostupná žiadna účinná liečba.

5 Neuropatická bolesť je spôsobená zranením alebo infekciou periférnych zmyslových nervov. To zahŕňa, ale nie je to obmedzené na bolesť traumy z periférneho nervu, infekcie herpes vírusom, cukrovky, kausalgie, avulzie nervového zväzku, neurónu, amputácie končatiny a vaskulitídy. Neuropatická bolesť je tiež spôsobená poškodením nervu z chronického alkoholizmu, infekcie vírusom ľudskej imunodeficiencie, hypotyreózy, urémie alebo nedostatku vitamínov. Neuropatická bolesť zahŕňa, ale nie je obmedzená na bolesť spôsobenú zranením nervu, takú, ako napríklad bolesť, ktorou trpia diabetici.

10 Neuropatická bolesť vykazuje dva rozdielne patofyziologické mechanizmy, ktoré musia byť vzaté do úvahy:

Za prvé, zvýšená aktivita aferentných nociceptívnych neurónov nasledujúcej sensitizácie (spiacich) neurónov (napríklad bolesť pri zápale, bolesť pri rakovine, bolesť hlavy, bolesť v spodnej časti chrbtice, viscerálna bolesť, migréna) s tým, že primárny aferentný nociceptívny neurón zostáva intaktný, aj keď aktivita receptora je zmenená a je znížený prah, typicky je zistené zvýšenie rýchlostou pálenia a počiatok alebo zvýšenie spontánnej aktivity.

Za druhé, ektopická aktivita aferentných nociceptívnych neurónov nasledujúca po poruchách svojich axónov (napríklad periférna a centrálna neuropatická bolesť), s poškodeným primárnym aferentným neurónom. Toto vedie na nevratné periférne a centrálné biochemické, morfológické a funkčné zmeny. (Periférna neuropatia je teda preto zhruba definovaná ako ochorenie (periférneho) nervového systému.

Existuje niekoľko príčin ľudskej neuropatie s veľkou variabilitou v symptómoch a neurologických deficienciách. Bolesťivé neuropatie sú definované ako neurologické poruchy, charakterizované vytrvalou bolesťou a precitlivosťou v oblasti tela, v ktorej bola poškodená zmyslová inervácia, ale poškodenie zmyslových nervov väčšinou nevytvára neuropatickú bolesť, obvykle je pozorovaná strata vnemu skôr ako precitlivosť alebo bolesť.

Špecifické poruchy somatosenzora sú označované ako alodýnia (neškodná stimulácia somatosenzora vyvoláva pocity abnormálnej intenzívnej bolesti s prudkým, sálajúcim charakterom, často pretrvávajúce počas trvania stimulu ako príčiny), hyperalgezia (škodlivá stimulácia vyvoláva intenzívnejšie a dlhšie trvajúce pocity bolesti), parestézie (spontánne averzné, ale nebolesťivé pocity, opísané ako pichanie alebo „spendlíky a ihly“), dysestézia (vyvolaná rovnako ako spontánne abnormálne pocity).

Niekoľko kľúčových udalostí je chápaných ako bežné patofyziologické udalosti abnormálnych bolesťivých stavov, najmä tých, ktoré nasledujú po periférnom zranení nervu. Vysoká frekvencia spontánneho discharge z ektopického miesta je teda nasledovaná zvýšenou citlivosťou dorzálnych rohov neurónov a rozšírením pola vnímania, často definovaného ako centrálna sensitizácia.

35 Bežné analgetiká ako opioidy a nesteroidné proti zápalové lieky (NSAID-non-steroidal anti-inflammatory drugs) zlepšujú, aj keď len nedostatočne, syndrómy chronickej abnormálnej bolesti. Počas hľadania alternatívnych liečebných režimov na vyvolanie uspokojivej a trvalej úľavy od bolesti boli skúšané kortikosteroidy, blokáda vedenia, glycerol, antidepresíva, lokálne anestetiká, gangliosidy a elektrostimulácie, ale predovšetkým bolo zistené, že anti-convulzanty sú užitočné proti rôznym typom stavov neuropatickej bolesti, ale sú najúčinnnejšie v prípadoch paroxyzmálnych, hrdzavých udalostí, napríklad bolesť trojklaného nervu.

Keď je všeobecná hyperaktivita a nízka prahová aktivácia zmyslových neurónov považovaná ako jeden z hlavných syndrómov neuropatie a pocitu neuropatickej bolesti so zreteľnou mechanoalodýniou, ako najzávažnejší klinický symptóm, poskytuje zrejme výhody selektívnej inhibície tohto patofyziologického prípadu miesto všeobecnej inhibície škodlivého stimulu s vysokým prahom (pomocou napríklad lokálnych anestetík) normálnych zmyslových nocicepcií.

45 Stavy uvedené zhora sú známe ako zle liečiteľné pomocou v súčasnosti na trhu dostupných analgetík, takých, ako opioidy alebo nesteroidné protizápalové lieky (NSAID), a to z dôvodu nedostatočnej účinnosti alebo obmedzenia vedľajšími účinkami.

50 Predmetom tohto vynálezu je poskytnutie nového použitia zlúčenín podľa uvedeného vzorca (I) a jeho derivátov, na prípravu farmaceutických zmesí, užitočných na liečbu alodýnie, ako hlavného a jedinečného symptómu bolesti, nezávislej od pôvodu základného ochorenia, ale často spojenou s neuropatickou bolesťou alebo inými rozdielnymi typmi chronickej alebo fantómovej bolesti.

55 Predkladaný vynález najmä súvisí s novým použitím harkoseridu na prípravu farmaceutických zmesí, užitočných na liečbu alodýnie, ako hlavného a jedinečného symptómu bolesti, nezávislej od pôvodu základného ochorenia, ale často spojenou s neuropatickou bolesťou alebo inými rozdielnymi typmi chronickej alebo fantómovej bolesti.

Harkoserid, ktorého chemický názov je (R)-2-acetamido-N-benzyl-3-metoxypriónamid, je jeden derivát vybraný zo skupiny špecifických derivátov aminokyselín.

Táto skupina látok je uvedená v US 5,378,729; US 5,654,301 a 5,773,475. Ukazujú aktivitu pri liečbe epilepsie a mŕtvice. V uvedených referenciách ale nie je žiaden opis, ktorý by ozrejmil predkladaný vynález.

Zlúčeniny predkladaného vynálezu môžu tvoriť farmaceuticky prijateľné soli tak s organickými, ako aj s anorganickými kyselinami a zásadami.

5 Napríklad, kyslé soli bázičkových zlúčenín sú pripravené buď rozpustením voľnej bázy vo vodnom alebo vodnom alkoholovom roztoku, alebo v iných vhodných rozpúšťadlách, obsahujúcich vhodnú kyselinu, a izoláciou soli odparením roztoku.

Príklady farmaceuticky prijateľných solí sú hydrochloridy, hydrobromidy, hydrosulfáty atď., rovnako ako sodné, draselné, horečnaté a ďalšie soli.

10 Zlúčeniny predkladaného vynálezu môžu obsahovať jeden alebo niekoľko asymetrických uhlíkových atómov. Vynález zahŕňa jednotlivé diastereoméry alebo enantioméry a ich zmesi. Jednotlivé diastereoméry alebo enantioméry môžu byť pripravené alebo izolované spôsobmi, dobre známymi v odbore.

Podľa vynálezu je prednostné, keď sú zlúčeniny v (R) konfigurácii. Najprednostnejšia je zlúčenina (R)-2-acetamido-N-benzyl-3-metoxypriónamid.

15 Zlúčeniny tohto vynálezu môžu byť syntetizované, ako je uvedené v dokumentoch U.S. P 5,378,729; U.S. P 5,654,301 a U.S.P 5,773,475.

Zlúčeniny pripravené syntetickými spôsobmi môžu byť použité ako farmaceutické zmesi ako činidlo pri liečbe bolesti, keď je použité účinné množstvo zlúčeniny vzorca (I), spoločne s farmaceuticky prijateľným nosičom. Liečivo môže byť použité v spôsobe liečby takých porúch u cicavcov vrátane človeka, poruchami trpiaceho, podávaním týmto cicavcom účinné množstvo zlúčenín, opísaných skôr, v jednotkovej dávkovacej forme.

20 Farmaceutická zlúčenina, vytvorená v súlade s predkladaným vynálezom, môže byť pripravená a podávaná rôznymi druhmi dávkovacích foriem buď orálnymi, alebo parenterálnymi cestami podávania. Napríklad, tieto farmaceutické zmesi môžu byť vytvorené v inertných, farmaceuticky prijateľných nosičoch, ktoré sú buď pevné alebo kvapalné. Pevné formy preparátov zahŕňajú prášky, tablety, disperzné granuly, kapsuly, tobolky a čapíky. Ďalšie pevné a kvapalné formy preparátov môžu byť vytvorené podľa spôsobov, známych v odbore, a môžu byť podávané orálnou cestou vo vhodnej forme alebo parenterálnou cestou takou, ako intravenózne, intramuskulárne alebo subkutánne injikovanie kvapalnej formy.

30 Množstvo aktívnej zlúčeniny v jednotkovej dávke prípravku môže byť rôzne alebo upravené na od približne 1 mg do približne 2 x 300 mg na deň na pacienta. Rozmedzie dennej dávky od približne 1 mg do približne 300 mg je prednostné. Dávky sa ale môžu líšiť v závislosti od požiadaviek pacienta, vážnosti liečeného stavu a použitej zlúčeniny. Stanovenie vhodnej dávky pre konkrétne situácie je v rámci schopnosti v odbore.

35

Príklady uskutočnenia vynálezu

Nasledujúce pracovné príklady, vybrané zo špecifických živočíšnych modelov, ukazujú aktivitu harkoseridu a jeho derivátov najmä proti neuropatickej fantómovej bolesti.

40

1. Príklad 1: Formalínový test, krysa

Veľká a od dávky závislá účinnosť harkoseridu môže byť demonštrovaná v neskorej fáze krysieho formalinového testu.

45 Formalínový test je model chemicky indukovanej svalovej bolesti, v ktorom sú stanovené dvojfázové zmeny nociceptívneho správania a spinálna/supraspinálna plasticita nocicepcie je považovaná za molekulárny základ neuropatickej bolesti, najmä počas druhej (neskorej) fázy testu, počas ktorej je väčšina klinicky používaných liekov proti neuropatickej bolesti aktívna. Tieto znaky viedli k tomu, že formalínový test je akceptovaný ako platný model vytrvalej klinickej bolesti.

50 Zlúčenina bola testovaná na antinociceptívne vlastnosti použitím metódy váženého behaviorálneho skóre : voľne pohybujúce sa zvieratá boli podrobené pozorovaciemu ohodnoteniu polohy ľavej zadnej labky podľa hodnotiaceho skóre s rozmedzím 0 - 3 pred a 10, 20, 30 a 40 min. po injikovaní 0,05 ml sterilného 2,5 % formalínu pod kožu na dorzálnom povrchu labky. Harkoserid, podávaný i.p. tesne pred formalínovou injekciou, vytvoril od dávky závislé zníženie formalínom indukovaného svalového zápalového nociceptívneho správania, ako je ukázané v tabuľke 1 (vážené skóre bolesti \pm SEM, n=11-12/skupina).

Tabuľka 1: vážené skóre bolesti, formalinový test, krysa

Čas po injikovaní formalínu a SPM 927						
Dávka mg/kg	Počet zvierat	Východisková hodnota	10 min.	20 min.	30 min.	40 min.
0	11	0,00 ± 0,00	0,30 ± 0,6	0,93 ± 0,21	1,84 ± 0,19	2,10±0,24
5	12	0,01 ± 0,01	0,31 ± 0,11	0,78 ± 0,23	1,47 ± 0,20	1,46 ± 0,19*
10	11	0,00 ± 0,00	0,42 ± 0,17	0,33 ± 0,16*	1,02 ± 0,27*	1,05±0,19*
20	12	0,00 ± 0,00	0,48 ± 0,18	0,57 ± 0,14	0,78 ± 0,18*	1,02 ± 0,24*
40	12	0,00 ± 0,00	0,12 ± 0,05	0,10 ± 0,04*	0,09 ± 0,06*	0,12 ± 0,06*

* = Veľké odlišnosti od vehikula (ANOVA opravená na mnohonásobné porovnanie $p \leq 0,05$).

Výraz ANOVA je na analýzu rozptylu.

- 5 Tieto výsledky podporujú a potvrdzujú predpokladanú aktivitu zlúčeniny proti neuropatickej bolesti. Tu ukázané dáta podporujú a dodávajú potrebný vedecký základ pre skôr pozorovanú aktivitu vo writhing teste (peritoneálneho dráždenia) a v myšacom formalinovom teste. Skôr získané dáta boli obmedzené kvôli faktu, že writhing test je považovaný za veľmi nešpecifický test s určitými svalovými chemicky indukovanými nociceptívnymi aspektami, ktoré obvykle poskytujú pozitívne výsledky pre všetky psychoaktívne lieky uvoľňujúce svaly atď., a preto nie je dostatočne špecifický na preukázanie špecifickej aktivity. Okrem toho, skôr prijaté výsledky v myšacom formalinovom teste, nemali jasný dôkaz o vzťahu dávkovania a teda ani o špecificite pozorovaných účinkov harkoseridu. Navyše bolo už v prvom pokuse zistené, že jediná a najvyššia dávka, vykazujúca veľké účinky, spôsobuje jasné behaviorálne vedľajšie účinky. Pretože tieto lieky zahŕňajú zmeny v správaní, nemôžu byť tieto zmeny spojené s liekmi ďalej považované ako antinociceptívne.
- 15 Len tu poskytnuté nové ukázané dáta teda môžu byť pokladané za in vivo dôkaz antinociceptívneho účinku harkoseridu, v závislosti od dávky podávania, ako miera špecificity a zlepšenie antinociceptívneho správania, ktoré nesúvisí s toxickými účinkami.

Príklad 2

20 Chronické konštrikčné poranenie (CCI, Bennettov model)

Účinnosť harkoseridu na zníženie spontánnej chronickej bolesti, mechanickej alodýnie a teplotnej hyperalgie bola testovaná použitím modelu chronického konštrikčného poranenia (CCI) periférnej neuropatie, jedného z najlepšie charakterizovaných in vivo zvieracích modelov, používaných na štúdium chronickej bolesti, spôsobenej poranením periférneho nervu. V tomto modeli sú ischiatické nervy voľne podviazané, čo vytvára axonálny opuch a čiastočnú deafferentáciu, ktorá sa prejavuje ako veľká, ale neúplná strata axónov v distálnej časti periférneho nervu. Jedno z pozorovaných význačných správania, nasledujúce podviazanie ischiatického nervu, je objavenie sa vedenia zadnej labky, považované za indikáciu pokračujúcej spontánnej chronickej bolesti. Podpora pre túto myšlienku je odvodená z publikácií, tykajúcich sa miechovej neurálnej aktivity a zvýšenej spontánnej depolarizácie neurónov v neurónoch spinotalamického traktu a vo ventrobazálnom talame za neprítomnosti zjavnej periférnej stimulácie. Okrem vzniku spontánneho správania pri bolesti, sa vyskytovalo niekoľko abnormalít v bolesti evokovanej stimulmi ako výsledok CCI vrátane teplotnej hyperalgie a mechanickej alodýnie. Vývoj týchto abnormálnych bolestí evokovaných stimulmi bol tiež opísaný, že sa vyskytuje v oblastiach mimo inerváciu poškodeným nervom, oblasti inervovanej neporanenými nervami.

35 Behaviorálne testy na spontánnu bolesť, teplotnú hyperalgiu a mechanickú alodýniu sa uskutočnili na hodnotenie rozdielnych zložiek neuropatickej bolesti. Údaj východiskovej hodnoty pre každý test bol odobraný pred experimentálnym postupom; okrem toho, boli všetky zvieratá testované na vývoj správania pri chronickej bolesti 13 - 25 dní po CCI operácii, 1 deň pred dňom podania vehikula (0,04 ml sterilnej vody/10 g telesnej váhy) alebo lieku a po podaní vehikulum/liek. Poradie testov bolo (1) spontánne s bolesťou spojené správanie (2) mechanická alodýnia, (3) teplotná hyperalgie, s cieľom minimalizovať vplyv jedného testu na výsledok testu nasledujúceho. Testovacie postupy a výsledky sú predkladané oddelene pre každý aspekt chronickej bolesti. Bolo podávané buď 0 (vehikulum, 0,04 ml/10 g telesnej váhy), 5, 10, 20 alebo 40 mg/kg SPM 927 (n=7-23/skupina) i.p. 15 minút pred prvým behaviorálnym testom.

45 Spontánna bolesť (pokračujúca bolesť bez zjavného vonkajšieho podnetu) podviazanej labky bola stanovená po 5 min. nasledovaná 10 min. aklimatizačnou periódou, použitím hodnotiaceho skóre (váženého behaviorálneho skóre stupňov 0 - 5).

Harkoserid nezmenil hladinu spontánnej bolesti, indukovanej unilaterálnym chronickým konštrikčným zranením, ako je ukázané v tabuľke 2 (vážené skóre bolesti ± SEM).

Tabuľka 2 Spontánna nocicepcia, CCI model, krysa

Dávka [mg/kg]	Počet zvierat	Východisková hodnota	pooperačná	pooperačná + liek
0	23	0 ± 0	1,4 ± 0,15	1,2 ± 0,14
5	9	0 ± 0	2,0 ± 0,10	1,8 ± 0,18
10	20	0,0019 ± 0,0019	1,5 ± 0,10	1,5 ± 0,11
20	8	0 ± 0	1,1 ± 0,17	0,9 ± 0,14
40	10	0,0004 ± 0,0004	1,3 ± 0,12	0,8 ± 0,28

5 Teplotná hyperalgiezia bola stanovená spôsobom skončenia latencie v reakcii na teplo aplikované na subplantárny povrch podviazanej zadnej labky krysy. Ako je porovnané s východiskovou hodnotou latencie (latencií) bolo veľké zníženie v (postoperačnej) latencii po odstránení teplotného podnetu pôsobiaceho na labku interpretované ako indukujúca prítomnosť teplotnej hyperalgiezie nasledujúce chronické konštrikčné zranenie.

10 Dávka Harkoseridu závisle znižovala chronické konštrikčné zranenie indukovanej teplotnej hyperalgiezie, ako je ukázané v tabuľke 3 [latencia ± SEM]. Silné účinky boli pozorované len u najvyšších testovaných dávok (20 a 40 mg/kg i.p.) s maximálnym účinkom, ktorý bol už pozorovateľný pri 20 mg/kg i.p.

Tabuľka 3: Teplotná hyperalgiezia, CCI model, krysa

Dávka [mg/kg]	Počet zvierat	Východisková hodnota	Pooperačná	Pooperačná+ liek
0	13	9,8 ± 0,74	7,0 ± 0,29	7,3 ± 0,43
5	7	10,5 ± 0,68	8,1 ± 0,59	9,2 ± 0,98
10	7	9,2 ± 0,68	7,1 ± 0,60	8,1 ± 0,59
20	8	10,0 ± 0,70	7,0 ± 0,56	9,7 ± 0,96*
40	8	8,3 ± 0,57	7,4 ± 0,48	10,2 ± 0,75*

* = Veľké odlišnosti od vehikula (ANOVA opravená na mnohonásobné porovnanie $p \leq 0,05$).

15 Mechanická citlivosť a alodýnia podviazanej krysej zadnej labky bola kvantifikovaná rýchlym stiahnutím labky v reakcii na normálne neškodné mechanické stimuly, ako je opísané skôr.

20 Citlivosť na mechanický stimul bola testovaná kalibrovaným elektronickým Von Freyovým tlakovým algometrom, pripojeným na sieťový počítačový systém, na zber dát. Mechanická alodýnia je interpretovaná ako značný pokles v pooperačnej v porovnaní s východiskovou hodnotou tlaku (g/mm^2), nutného na vyvolanie rýchleho stiahnutia labky v reakcii na tento mechanický stimul.

Harkoseridová dávka závisle znižuje intenzitu mechanickej alodýnie indukovanej podviazaním unilaterálneho nervu, ako je ukázané v tabuľke 4 [tlak (g/mm^2) ± SEM]. Regresná analýza ukázala pozitívnu lineárnu koreláciu medzi dávkou Harkoseridu a zvýšením množstva sily, nutnej na vytvorenie stiahnutia labky.

25 Tabuľka 4: Mechanická alodýnia, CCI model, krysa

Dávka [mg/kg]	Počet zvierat	Východisková hodnota	Pooperačná	Pooperačná + liek
0	20	41,6 ± 2,20	18,8 ± 2,09	20,2 ± 1,90
5	11	53,6 ± 3,35	16,4 ± 2,56	21,8 ± 2,34
10	17	42,9 ± 2,55	21,2 ± 2,13	29,2 ± 2,85*
20	8	46,1 ± 2,62	24,7 ± 2,78	39,6 ± 3,62*
40	9	48,4 ± 3,84	23,9 ± 2,23	43,0 ± 5,48*

* = Veľké odlišnosti od vehikula (ANOVA opravená na mnohonásobné porovnanie $p \leq 0,05$).

30 Tieto výsledky podporujú a potvrdzujú predpokladanú účinnosť Harkoseridu proti alodýnii. Okrem toho, tento účinok navyše súvisí s neuropatickou bolesťou, a preto podporuje možné klinické použitie zlúčeniny, napodobením klinickej situácie liečby príslušných symptómov, čo najlepšie.

Ďalší dôkaz špecificity účinku harkoseridu proti alodýnii bol daný negatívnymi výsledkami v tail-flick teste (test švihnutia chvostom), vylučujúcim typickú opíoidom podobnú analgéziu zlúčeniny. Skoršie dáta, získané na myšiach, mohli byť opakované a potvrdené v druhom druhu, kryse, ďalšími prostriedkami vhodnejšieho výberu testovaných dávok:

Príklad 3

Tail-flick test, krysa

Harkoserid bol ďalej testovaný na možnú aktivitu pri akútnej spinálnej teplotnej nocicepcii, použitím tail-flick testu. V tomto modeli akútnej teplotnej spinálnej/reflexnej hyperalgezie je aplikované sálavé teplo na chvost zvieratá, približne 2 cm od špičky a čas latencie na reakciu stiahnutia je automaticky stanovený pomocou algometru, definovaný maximálny čas stimulu zabraňuje poškodeniu tkaniva. Tento test je veľmi používaný ako stanovenie pre antinociceptívnu účinnosť farmakologických činidiel a je vysoko prediktívny v akútnej analgetickej účinnosti u ľudí. Neaktívne sú väčšinou čisté analgetiká opioidného typu; ani adjuvans ako amitryptilín alebo antiepileptiká alebo NSAID (nesteroidné protizápalové lieky) nie sú aktívne.

Výsledky pre 20 a 40 mg/kg harkoseridu i.p sú ukázané v tabuľke 5 [percentá antinocicepcie, spočítané ako $\left[\frac{\text{latencia po podaní lieku} - \text{latencia pred podaním lieku}}{\text{max. latencia}} - \text{latencia pred podaním lieku} \right] \times 100 \pm \text{SEM}$, n=12/skupina]. Východisková hodnota alebo latencia tail-flick pred podaním lieku bola stanovená priemerovaním 5 následných meraní, uskutočňovaných po 2 minútach. Vehikulum (sterilná voda 0,04 ml/10 g telesná váha) alebo harkoserid boli podané a tail-flick latencie boli zaznamenávané v 10-minútových intervaloch po nasledujúcich 60 minút dokonca aj pri dávkach, poskytujúcich maximálny účinok v krysom formalínovom teste (pozri skôr), mal harkoserid malý alebo žiadny účinok na latenciu tail-flick reflexu.

Tabuľka 5: Akútna teplotná hyperalgezia, tail-flick, krysa

Cas po SPM 927[min.]	Anti-nociceptívny účinok [%] rôznych dávok [mg/kg] i.p. Harkoseridu		
	0	20	40
10	-2,1 ± 3,08	5,0 ± 3,94	-1,6 ± 12,82
20	-0,5 ± 3,19	9,7 ± 7,51	-4,3 ± 14,04
30	4,4 ± 4,71	9,7 ± 2,37	-2,3 ± 9,14
40	10,4 ± 5,91	1,7 ± 7,42	-4,4 ± 11,44
50	7,6 ± 4,58	5,4 ± 4,12	0,3 ± 15,50
60	7,4 ± 6,07	8,1 ± 5,20	-5,5 ± 14,11

Pretože v tail-flick teste nebol detegovaný žiadny antinociceptívny účinok harkoseridu potvrdzuje to predpokladaný profil harkoseridu s vysoko špecifickými antialodininickými vlastnosťami a bez aktivity v stavoch akútnej bolesti.

Príklad 4

Anti-nociceptívna aktivita harkoseridu v porovnaní s gabapentínom

V nasledujúcej vysvetlenej štúdií je tu použitý harkoserid skracoovaný ako SPM 927 a gabapentín je tu skracoovaný ako GBP.

Cieľ:

Hlavným cieľom tejto štúdie je stanoviť antinociceptívnu aktivitu SPM 927 a gabapentínu (GBP) v modeloch hlodavcov na zápalovú bolesť a porovnať navzájom in vivo účinky lieku jeden s druhým.

Spôsoby:

Karagenánom indukovaná mechanická hyperalgezia v krysách bola indukovaná subplantárnou injekciou 0,1 ml suspenzie 2 % karagenánu a počas 3h bola meraná testom tlaku labky (Randall- Sellito).

Subchronická zápalová nocicepcia v myšiach bola indukovaná subplantárnou injekciou formalínu (0,02 ml 5 % roztoku). Nocicepčné správanie (lízanie labky) bolo merané a kvantifikované medzi 0 a 5 min. (akútna bolesť) a medzi 20 a 30 min. (subchronická zápalová bolesť) po formaline.

Lieky a návrh experimentu: SPM 927 a GBP boli resuspendované v 1 % metylcelulóze a podávané i.p. v dávkach 10 mg/kg, 20 mg/kg a 40 mg/kg. Čas predliečby bol 30 min. pred tým, ako bola meraná bolesť. Jedna skupina zvierat slúžila ako kontrola a postupne prijala injekciu rozpúšťadla (10 ml/kg) a ďalšia skupina zvierat obdržala referenčnú zlúčeninu (Karagenánový test: 10 mg/kg indometacínu; Formalínový test: 10 mg/kg morfinu). Každá zlúčenina bola testovaná v oddelenom experimente a každý experiment zahŕňal kontrolnú a referenčnú skupinu. V Karagenánovom teste bolo použitých 10 kryš na skupinu a vo formalínovom teste bolo použitých 6 myší na skupinu.

Výsledky:

Karagenánom-indukovaná mechanická hyperalgezia v krysách: Výsledky sú zhrnuté v nasledujúcej tabuľke 6.

Tabuľka 6

	VEHIKULUM nezapálená labka	VEHIKULUM zapálená labka	SPM 927 [10]	SPM 927 [20]	SPM 927 [40]	Indometacín [10]
nociceptívny prah	330 ± 16	164 ± 15 ^a	324 ± 15 ^b	426 ± 24 ^b	444 ± 13 ^b	384 ± 11 ^b
	VEHIKULUM nezapálená labka	VEHIKULUM zapálená labka	GBP [10]	GBP [20]	GBP [40]	Indometacín [10]
nociceptívny prah	396 ± 15	204 ± 10 ^a	254 ± 39	296 ± 31	282 ± 33	370 ± 15 ^b

^a označuje veľký rozdiel v porovnaní s nezapálenou labkou (p<0,05; Študentov t-test)

^b označuje veľký rozdiel v porovnaní s vehikulom liečenou skupinou (p<0,05; Dunnetov test)

5 Vo všetkých troch experimentoch sa vyvinula veľká mechanická hyperalgézia, ako je ukázané veľkými rozdielmi v nociceptívnom prahu v zapálenej v porovnaní s nezapálenou labkou.

Všetky dávky SPM 92 7 viedli k plnej zmene Karagenánom- indukovanej mechanickej hyperalgézií.

Antinociceptívne SPM 927 bolo porovnané s tým, ktoré sa získalo pre referenčnú zlúčeninu Indometacín.

10 GBP nemal žiadny význačný účinok na Karagenánom indukovanú mechanickú hyperalgéziu pri testovaných dávkach.

Subchronická zápalová nocicepcia u myši (formalínový test): Výsledky sú zhrnuté v nasledujúcej tabuľke 7.

Tabuľka 7

15

	Fáza	VEHIKULUM	SPM 927 [10]	SPM 927 [20]	SPM 927 [40]	Morfín [10]
Nociceptívny prah [s]	skorá	84 ± 16	67 ± 15	69 ± 8	8 ± 8 ^a	6 ± 3 ^a
	pozdná	119 ± 18	58 ± 16 ^a	128 ± 16	17 ± 17 ^a	10 ± 8 ^a
		VEHIKULUM	GBP [10]	GBP [20]	GBP [40]	Morfín [10]
Nociceptívny prah [s]	skorá	106 ± 15	98 ± 20	102 ± 17	72 ± 10	8 ± 6 ^a
	pozdná	111 ± 24	133 ± 30	118 ± 13	73 ± 13	0 ± 0 ^a

^a označuje veľký rozdiel v porovnaní s vehikulom liečenou skupinou (p<0,05; Dunnetov test)

20 Jasná nociceptívna reakcia bola indukovaná formalínom. Nociceptívna reakcia bola potlačená v závislosti od dávky SPM-927. Účinnosť SPM 927 bola podobná účinnosti morfinu to je takmer úplná zmena formalínom indukovanej nocicepcie. GBP inhibovalo nociceptívnu reakciu indukovanú formalínom len mierne, nie ale veľmi.

Príklad 5

25 Nasledujúce tabuľky 8 a 9 ukazujú účinnosť harkoseridu (tu označovaného ako SPM 927), karbamazepínu, levetiracetámu, gabapentínu a morfinu v teste neuropatickej bolesti (CHUNG) u krysy. Bolo použitých osem (8) kryš na skupinu.

Tabuľka 8 ukazuje skúmané účinky pomocou dotykovej stimulácie na zranenej labke.

Tabuľka 9 ukazuje skúmané účinky pomocou teplotnej stimulácie na zranenej labke.

30 Všeobecne, všetky zlúčeniny vykázali zreteľnejšie účinky na dotykovú nociceptívnu stimuláciu ako na teplotnú nociceptívnu stimuláciu, a SPM 927 bol minimálne porovnateľný, ale obvykle silnejší, ako referenčné zlúčeniny.

Tabuľka 8

Účinky SPM 927, Karbamazepínu, levetiracetátu, gabapentínu a morfinu v teste neuropatickej bolesti v kryse (8 kryš na skupinu)

35 Dotyková stimulácia (zranená labka)

LIEČBA (mg/kg) i.p.-30 min.	SILOU INDUKOVANÉ		ODTIAHNUTIE LABKY (g)	
	priemer ± s.e.m.		p hodnota	% zmeny
Kontrola	63,3 ± 4,5		-	-
Zranená kontrola	17,4 ± 2,2***(a)		0,000	-73 % (a)
SPM 927 (8)	27,2 ± 4,9 NS(b)		0,094	+56 % (b)
SPM 927 (16)	24,4 ± 3,0 NS(b)		0,086	+40 % (b)
SPM 927 (32)	37,6 ± 6,1 ** (b)		0,008	+116 % (b)

LIEČBA (mg/kg) i.p.-30 min.	SILOU INDUKOVANÉ	ODTIAHNUTIE LABKY (g)	
	priemer ± s.e.m.	p hodnota	% zmeny
Karbamazepín (16)	21,0 ± 2,3 NS(b)	0,275	+21 %(b)
Karbamazepín (32)	38,4 ± 8,1 *(b)	0,026	+121 %(b)
Karbamazepín (64)	39,2 ± 9,1 *(b)	0,036	+125 %(b)
Levetiracetám (16)	23,0 ± 4,0 NS(b)	0,243	+32 %(b)
Levetiracetám (32)	25,0 ± 5,2 NS(b)	0,199	+44 %(b)
Levetiracetám (64)	19,8 ± 4,1 NS(b)	0,612	+14 %(b)
Gabapentín (32)	17,2 ± 3,0 NS(b)	0,959	-1 %(b)
Gabapentín (64)	23,5 ± 4,2 NS(b)	0,219	+35 %(b)
Gabapentín (128)	33,6 ± 6,7*(b)	0,038	+93 %(b)
Morfín (16)	45,9 ± 8,8**(b)	0,007	+164 %(b)

Študentov t test (nepárový): NS = nevýznamné; * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001;

(a) porovnané s kontrolou

(b) porovnané so zranenou kontrolou

5 Tabuľka 9

Účinky SPM 927, karbamazepínu, levetiracetátu, gabapentínu a morfínu v teste neuropatickej bolesti (CHUNG) v kryse (8 kryš na skupinu)

Teplotná stimulácia (zranená labka)

LIEČBA (mg/kg) i.p. -30 min.	LATENCIA ODTIAHNUTIA LABKY (s)		
	Priemer ± s,e,m,	P hodnota	% zmeny
kontrola	40,6 ± 2,2	-	-
Zranená kontrola	16,3 ± 4,4*** (a)	0,000	-60 % (a)
SPM 927 (8)	26,1 ± 5,4 NS (b)	0,180	+60 % (b)
SPM 927 (16)	16,8 ± 4,5 NS (b)	0,933	+3 % (b)
SPM 927 (32)	21,1 ± 5,6 NS (b)	0,512	+29 % (b)
Karbamazepín (16)	35,6 ± 4,1 ** (b)	0,006	+118 %(b)
Karbamazepín (32)	22,7 ± 4,3 NS (b)	0,315	+39 % (b)
Karbamazepín (64)	28,8 ± 6,9 NS (b)	0,147	+77 % (b)
Levetiracetám (16)	19,0 ± 3,6 NS (b)	0,641	+17 %(b)
Levetiracetám (32)	17,1 ± 2,9 NS (b)	0,882	+5 % (b)
Levetiracetám (64)	26,6 ± 6,0 NS (b)	0,187	+63 % (b)
Gabapentín (32)	19,3 ± 3,6 NS (b)	0,611	+18 %(b)
Gabapentín (64)	28,5 ± 5,4 NS (b)	0,101	+75 % (b)
Gabapentín (128)	27,1 ± 5,2 NS (b)	0,135	+66 % (b)
Morfín (16)	42,4 ± 1,9 ***(b)	0,000	+160 %(b)

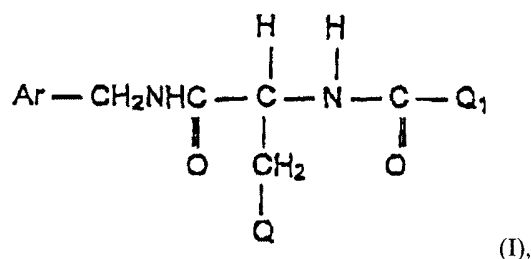
10 Študentov test (nepárový): NS = nevýznamné; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001;

(a) porovnané s kontrolou

(b) porovnané so zranenou kontrolou

15 PATENTOVE NÁROKY

1. Použitie aminokyselinového derivátu všeobecného vzorca (I)



kde

Ar je fenyl, ktorý je nesubstituovaný alebo substituovaný aspoň jednou halogénskypinou;
 Q je nižšia alkoxykupina obsahujúca 1 až 3 uhlíkové atómy a Q₁ je metylskypina;
 alebo jeho farmaceutický prijateľnej soli na prípravu farmaceutickej kompozície na liečenie fantómovej
 bolesti alebo diabetickej neuropatickej bolesti.

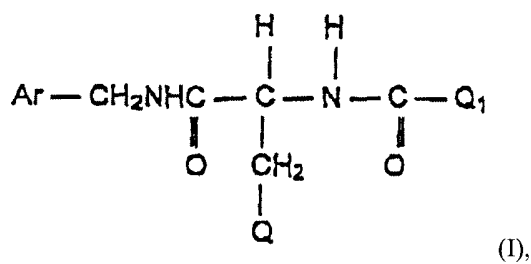
2. Použitie podľa nároku 1, kde vo všeobecnom vzorci (I) Ar znamená nesubstituovaný fenyl.

3. Použitie podľa nároku 1 alebo 2, kde halogénom je fluór.

4. Použitie podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 3, kde vo všeobecnom vzorci (I) Q znamená
 alkoxykupinu obsahujúcu 1 až 3 atómy uhlíka a Ar znamená nesubstituovanú fenylskypinu.

5. Použitie zlúčeniny podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 4 na prípravu farmaceutickej kompozície na
 liečenie tinnitus aureum.

6. Použitie aminokyselinového derivátu všeobecného vzorca (I) v R konfigurácii



kde

Ar je fenyl, ktorý je nesubstituovaný alebo substituovaný aspoň jednou halogénskypinou;
 Q je nižšia alkoxykupina obsahujúca 1 až 3 uhlíkové atómy a Q₁ je metylskypina;
 alebo jeho farmaceutický prijateľnej soli na prípravu farmaceutickej kompozície na liečenie fantómovej
 bolesti alebo diabetickej neuropatickej bolesti.

7. Použitie podľa nároku 6, kde derivát je enantioméricky čistý.

8. Použitie podľa nároku 6 alebo 7, kde vo všeobecnom vzorci (I) Ar znamená nesubstituovaný fenyl.

9. Použitie podľa ktoréhokoľvek z nárokov 6 až 8, kde halogénom je fluór.

10. Použitie podľa ktoréhokoľvek z nárokov 6 až 8, kde vo všeobecnom vzorci (I) Q znamená
 alkoxykupinu obsahujúcu 1 až 3 atómy uhlíka a Ar znamená nesubstituovanú fenylskypinu.

11. Použitie (R)-2-acetamido-N-benzyl-3-metoxypionamidu alebo jeho farmaceutický prijateľnej soli
 na prípravu farmaceutickej kompozície na liečenie fantómovej bolesti alebo diabetickej neuropatickej bolesti.

12. Použitie podľa nároku 11, kde zlúčenina je enantioméricky čistá.

13. Použitie zlúčeniny podľa ktoréhokoľvek z nárokov 6 až 12 na prípravu farmaceutickej kompozície na
 liečenie tinnitus aureum.

14. Použitie enantioméricky čistého (R)-2-acetamido-N-benzyl-3-metoxypionamidu na prípravu
 farmaceutickej kompozície na liečenie diabetickej neuropatickej bolesti.