



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 1998/81

(51) Int.Cl.⁵ C 07 K 7/06

(22) Indleveringsdag: 05 maj 1981

(24) Løbedag: 04 sep 1980

(41) Alm. tilgængelig: 05 maj 1981

(44) Fremlagt: 25 feb 1991

(86) International ansøgning nr.: PCT/DE80/00126

(86) Internationa indleveringsdato: 04 sep 1980

(85) Videreførelsesdag: 05 maj 1981

(30) Prioritet: 06 sep 1979 DE 2936099

(71) Ansøger: VICTOR *BRANTL; Frauenplatz 10; D-W 8000 Muenchen 2, DE, AGNES *HENSCHEN; Max Planck Institut fuer Biochemie; Am Klopferspitz; D-W 8033 Martinsried, DE, HANSJOERG *TESCHEMACHER; Pharmakolog. Institut der J. Liebig Universitaet; Frankfurter Str. 107; D-W 6300 Giessen, DE, FRIEDRICH *LOTTSPPEICH; Max Planck Institut fuer Biochemie; Am Klopferspitz; D-W 8033 Martinsried, DE

(72) Opfinder: SAMME

(74) Fuldmægtig: Ingeniørfirmaet Budde, Schou & Co.

(54) Analogifremgangsmåde til fremstilling af beta-casomorphinanalogue peptider samt farmakologisk acceptable syreadditionssalte og metalkomplekser deraf

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

1998-81

Peptider med formelen Tyr¹-X-A-Pro-B-Pro-C...., hvor Tyr er aminosyren tyrosin, pro er aminosyren prolin, A, B og C er en hvilken som helst aminosyre i L-form, og X en hvilken som helst aminosyre i D-form, har opiatagtig virkning og kan anvendes som lægemidler inden for human- og veterinærmedicin.

Den foreliggende opfindelse angår en analogifremgangsmåde til fremstilling af hidtil ukendte β -casomorphin-analoge peptider samt farmakologisk acceptable syreadditionssalte og metalkomplekser deraf, især sådanne med opiatagtig virkning.

Der kendes farmakologisk aktive peptider, der ved særlige biologiske prøvesystemer udviser en specifik opiatagtig virkning. Det drejer sig her især om de af Hughes m.fl. (Nature 258, 577, 1975) fra hjernen isolerede pentapeptider: methionin- og leucinenkephalin samt disses langkædede analoge. Disse kendte peptider og deres syntetiske derivater har den ulempe, at de efter in vitro-behandling med proteaser (f.eks. Pronase E, Merck) efter en kort inkubationstid mister deres farmakologiske virkning, i dette tilfælde en opiatagtig virkning. Ved indgivelse in vivo angribes disse peptider let af kroppens egne proteaser og ødelægges.

På Int. Narcotic Research Conference's kongres i juni 1979, North Flamouth, USA, blev hidtil ukendte peptider, β -casomorphiner, beskrevet, der frembyder en hidtil ukendt struktur, og som på overraskende måde på grund af denne struktur har en forøget stabilitet over for proteaser (f.eks. Pronase E, Merck). Disse peptider frembyder en kraftig opiatagtig virkning inden for forskellige kendte prøvesystemer (receptorbindingsprøve og isoleret marsvinetarm). Efter injektion af 0,35 μ mol β -casomorphin-5 (Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly) i ventrikelsystemet i rottehjerne fremkommer en kraftig opiatspecifik analgetisk virkning, der i løbet af 10 minutter når den maksimale virkning og efter 60 minutter er klinget fuldstændig af. Denne i forhold til morfin korte virkningstid med samme analgetiske virkning, tyder straks på en eventuelt fuldstændig eller delvis nedbrydning af stoffet ved hjælp af hjernens enzymer.

Ved parenteral eller oral anvendelse af stoffet udviser β -casomorphin-5, der i øvrigt er det hidtil kraftigste kendte opiatagtigt virkende peptid af β -casomorphinfami-

lien, ingen analgetisk virkning. Dosis er ved disse forsøg indtil 150 mg/kg legemsvægt for rotter. Denne ulempe ved de kendte peptider kan helt eller delvis føres tilbage til stoffets inaktivering i blodet og/eller i hjernen. Inkubationsforsøg med stoffet med rottehjernehomogenat eller blodplasma viser, at allerede efter en kort inkubationstid på 15 minutter forsvinder den opiatagtige virkning.

Det er formålet med opfindelsen at tilvejebringe hidtil ukendte farmakologisk aktive peptider, β -casomorphin-analoge, der efter inkubation (op til 120 minutter) med rottehjernehomogenat og/eller ovenstående væske af rottehjernehomogenat og/eller blodplasma (se udførelseseksemplet) bibeholder deres farmakologiske, f.eks. opiatagtige virkning. Det er endvidere formålet med opfindelsen at tilvejebringe farmakologisk aktive peptider, β -casomorphin-analoge, som efter parenteral (f.eks. intravenøs eller subcutan injektion) og/eller oral indgivelse udviser en farmakologisk virkning, især en opiatagtig virkning. Endelig er det formålet med opfindelsen, ved beskrivelse af aminosyresekvensen, især positionen af D-aminosyren, at gøre en fagmand i stand til at fremstille peptidet i vilkårlige mængder ved gængse metoder.

Disse formål opfyldes ifølge opfindelsen med en analogifremgangsmåde til fremstilling af β -casomorphinanaloge peptider med den almene formel

H-Tyr-X-A-R

H-Tyr-X-A-Pro-R

H-Tyr-X-A-Pro-B-R

30 H-Tyr-X-A-Pro-B-Pro-R

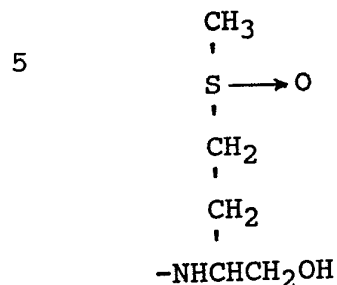
H-Tyr-X-A-Pro-B-Pro-C-R

H-Tyr-X-A-Pro-B-Pro-C-Pro-R eller

H-Tyr-X-A-Pro-B-Pro-C-Pro-D-R,

hvor Tyr er aminosyren L-tyrosin, Pro er aminosyren L-prolin, A, B, C og D er aminosyrerne Pro, Ala, Thr, Val, Tyr, Phe, Gly, Ile, Asn, Met i stereokemisk L-form, hvorhos en C-ter-

minal gruppe A, B, C eller D tillige kan være -Met(O)-OH med formlen



R kan være -OH, lavere alkoxy eller -NH₂, og X er aminosyrerne Pro, Ala, Thr, Val, Tyr, Phe, Gly, Ile, Asn, Met og/eller methioninderivatet Met(O)-OH i den stereo-
 15 kemiske D-form, deres farmakologisk acceptable syreadditionssalte eller metalkomplekser, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved, at de enkelte aminosyrer og/eller tilsvarende mindre peptidfragmenter ved knytning af peptidbindingerne i den ønskede rækkefølge overføres til de ønskede
 20 farmakologisk aktive peptider under midlertidig beskyttelse af eventuelle aktive grupper, som ikke skal deltage i peptiddannelsesreaktionen, især beskyttelse af aminogruupperne med carbobenzyloxylchlorid og beskyttelse af syregrupper som ester, idet syntesen eventuelt kan finde sted som fastfase-
 25 syntese på egnede bærermaterialer, fortrinsvis polystyren.

Ifølge en anden videreudformning betyder X D-alanin, D-threonin eller D-valin.

Ifølge endnu en udformning foreligger den endestillede, C-terminale aminosyre som et amid eller en ester.

30

35

0

De omhandlede peptiders forøgede stabilitet over for nedbrydende enzymer beror på indførelsen af en D-aminosyre i peptidets 2-stilling. Denne indførelse var på ingen måde nærliggende, idet den kemiker, der først opdagede og beskrev denne type β -casomorphinforbindelser på the International Narcotic Research Conference, juni 1979, North Falmouth, USA, berettede, at den alternerende prolinsekvens resulterer i en fuldstændig overraskende stabilitet over for peptidaser, f.eks. Pronase E, Merck. Det var således på ingen måde nærliggende at gå i gang med en yderligere stabilisering over for proteasespaltning. Aminosyren i peptidets 2-stilling forhindrer nedbrydningen ved hjælp af naturlige enzymer, da de naturlige enzymer fortrinsvis spalter peptidbindinger mellem L-aminosyrer.

15

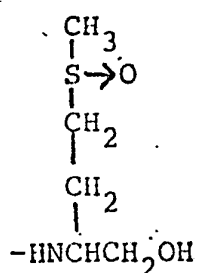
Ved en videreudformning af forbindelserne er den C-terminale aminosyre i et peptid med ulige antal grupper methionin.

20

Af særlig betydning er aminosyren methionin i C-terminal stilling i penta-, hepta- og nonapeptider. (Tyr er altid den N-terminale aminosyre.)

Yderst gunstig er methionins derivatdannelse. Her kan det C-terminale methionin foreligge som $-\text{Met(O)}-\text{OH}$:

25



30

Denne derivatdannelse medfører en forstærkning af den opiatagtige virkning, dvs. at der med mindre doser af peptiderne kan opnås stærkere virkninger.

35

De farmakologisk aktive peptider syntetiseres ved hjælp af en inden for peptidkemien og/eller i naturen gængs metode.

Ved gængse metoder skal forstås indførelsen så vel som fraspaltningen af beskyttelsesgrupper, f.eks. aminogruppens beskyttelse ved hjælp af carbobenzoxychlorid og beskyttelsen af syregrupper som estere under syntesen. Gængse er
5 ligeledes synteser på bærermaterialer såsom f.eks. polystyren.

Ved en videreudvikling af fremgangsmåden fremstilles de farmakologisk aktive peptider ved knytning af peptidbindingen mellem de enkelte aminosyrer og/eller de mindre peptidfragmenter ved hjælp af gængse metoder.
10

Der kan af forbindelserne, der fremstilles ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, fremstilles human- og veterinærlægemidler, der indeholder farmakologisk aktive peptider og/eller disses syreadditionssalte og/eller disses
15 metalkomplekser.

Disse syreadditionssalte kan fortrinsvis være hydrochlorider, lactater eller citrater. Som metalkomplekser kan anvendes zink-, magnesium- og koboltforbindelser. Lægemid-
lernes aktivitet kan på simpel måde konstateres ved relevante
20 prøver.

Lægemidlerne kan især anvendes som hostestillende midler, antidiarré-midler, analgetika, antipsychotika og beroligende midler.

De gennemførte analysemetoder, nemlig aminosyreanalyse, Edman-nedbrydning og elektroforese viser, at de som
25 eksempler i tabel I nævnte syntetiserede peptider svarer til de teoretisk forventelige analyseværdier (jvf. tabel II og III), og at peptidindholdet i den indvejede stofmængde er større end 94%.

30

35

Tabel I

5	<u>Nr.</u>	<u>Peptid</u>
	1	H-tyr-D-Ala-Phe-NH ₂
	2	H-Tyr-D-Ala-Phe-Pro-NH ₂
	3	H-Tyr-D-Ala-Phe-Pro-Gly-NH ₂
	4	H-Tyr-D-Ala-Phe-Pro-Gly-Pro-NH ₂
10	5	H-Tyr-D-Ala-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-NH ₂
	7	H-Tyr-D-Ala-Phe-Pro-Tyr-NH ₂
	8	H-Tyr-D-Ser-Phe-NH ₂
	9	H-Tyr-D-Ser-Phe-Pro-NH ₂
	10	H-Tyr-D-Ser-Phe-Pro-Gly-NH ₂
15	11	H-Tyr-D-Ser-Phe-Pro-Gly-Pro-NH ₂
	12	H-Tyr-D-Ser-Phe-Pro-Tyr-NH ₂
		Normorphin

20 Tabel II

Fundne aminosyrer (i mol pr. analyseret peptid); theoretiske værdier er angivet i parenteser.

	Peptid (nr. ifølge tabel I)	1	2	3	4	5	7
25	Tyr (1); for nr. 7 (2)	1,0	0,9	1,0	1,1	1,0	2,0
	D-Ala (1)	0,8	0,9	1,0	1,0	1,1	1,1
	Phe (1)	1,1	1,1	1,0	1,1	1,0	1,1
30	Pro (1); for nr. 4+5 (2)	-	0,8	0,9	1,9	1,8	0,9
	Gly (1)	-	-	0,8	0,9	1,0	-
	Ile (1)	-	-	-	-	0,8	-

35

0

Tabel III

Fundne aminosyrer (i mol pr. analyseret peptid); theoretiske værdier er angivet i parenteser.

5

Peptid (nr. ifølge tabel I)	8	9	10	11	12
Tyr (1,0) for nr. 12 (2,0)	0,9	1,0	1,1	1,0	1,9
D-Ser (1,0)	0,8	0,9	1,1	1,0	0,9
Phe (1,0)	1,0	1,1	1,1	1,0	1,1
Pro (1,0) for nr. 11 (2,0)	-	0,9	0,8	1,9	0,9
Gly (1,0)	-	-	1,1	1,0	-

10

15

Fremgangsmåden til elektroforesen fremgår af Hoppe
Seyler's Z. Physiol. Chem., bd. 361, s. 1837, December 1980.

20

25

30

35

0

EksempelSyntese af et pentapeptid med sekvensen: Tyr-D-Ala-Phe-Pro-Gly-methylester og Tyr-D-Pro-Phe-Pro-Gly-methylesterA. Synteseplan

5

Aminokomponenten omsættes ved -15°C eller lavere i dimethylformamid med et 0,5 molært overskud af en Z-aminosyreisobutylcarboxylsyres blandede anhydrid (hvor Z er en N-benzoyloxycarbonylgruppe, der fungerer som beskyttelsesgruppe) i 2-4 timer.

10

Det blandede anhydrid fremstilles i DMF ved -15°C eller lavere i 10-15 minutter ved anvendelse af et 6%'s overskud af Z-aminosyrederivat og N-methylmorpholin via chlormyresyreisobutylesteren. Derefter ødelægges overskudet af blandet anhydrid. Ved 0°C indstilles reaktionsproduktets pH til 8 ved hjælp af vandig mættet KHCO_3 -opløsning, og der omrøres i 30 minutter ved 0°C .

15

20

Peptiderne ekstraheres med ethylacetat. Ethylacetat/peptidblandingen vaskes for at fjerne Z-aminosyre-kaliumsaltet 3 gange med natriumchlorid/vand, 3 gange med vand og inddampes. Det således fremstillede peptid, der stadig bærer beskyttelsesgruppen Z, hydratiseres i methanol. Herved tilsættes 100-500 mg Pd/aktivt carbon-katalysator pr. mmol peptid. CO_2 -fraspaltningen kontrolleres med $\text{Ba}(\text{OH})_2$ -opløsning. Katalysatoren filtreres fra (Schleiner & Schüll papirfilter nr. 595), vaskes grundigt med vand, og filtratet inddampes i en rotationsfordamper (Büchi, Rotavapor RE). Det ønskede afblokerede peptid findes i remanensen.

25

B. Syntese af pentapeptidet Tyr-D-Ala-Phe-Pro-Gly-methylester og Tyr-D-Pro-Phe-Pro-Gly-methylester.

30

Trin 1): a) Fremstilling af det blandede anhydrid.

(A-Phe-Pro-blandet anhydrid)

35

640 mg (1,6 mmol = 6%'s overskud) af dipeptidet Z-L-Phe-L-Pro (hvor Z er en N-benzyloxycarbonylgruppe, der fungerer som beskyttelsesgruppe) omsættes i 20 ml dimethylformamid (DMF) med 200 μl (1,5 mmol) chlormyresyreisobutylester ved -15°C

0

efter tilsætning af 170 μ l (1,6 mmol) N-methylmorpholin i 15 minutter.

b) Forberedelse af aminokomponenten.

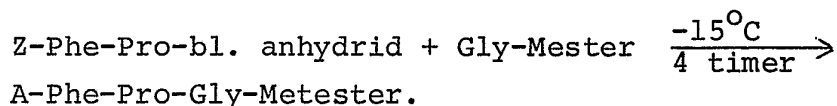
5

125,6 mg (1,0 mmol) glycinmethylester-hydrochlorid opløses i 20 ml DMF under tilsætning af 110 μ l (1 mmol) N-methylmorpholin ved -15°C .

Trin 2): Omsætning af det blandede anhydrid fra trin 1 a med aminokomponenten fra 1 b.

10

Det Z-Phe-Pro-blandede anhydrid omsættes med glycinmethylester i 40 ml DMF i 4 timer ved -15°C .



15

Før oparbejdning nedbrydes overskudet på 50% af blandet anhydrid. Ved 0°C indstilles reaktionsproduktets pH til 8 med vandig mættet KHCO_3 -opløsning, og der omrøres i 30 minutter ved 0°C .

20

Derefter ekstraheres peptidet med 50-100 ml ethylacetat (EtAc), og EtAc/peptidblandingen vaskes med mættet vandig natriumchloridopløsning. Efter en yderligere afsluttende vask med vand inddampes EtAc-fasen.

Trin 3): Fraspaltning af beskyttelsesgruppen ved hydrogenering.

25

Peptidet opløses i 30 ml methanol, og der tilsættes 100 mg palladium på aktivt carbon (Merck).

30

Efter at luften er fortrængt med nitrogen, tilføres der hydrogen til reaktionsbeholderen. Hydrogeneringen sker ved $25-30^{\circ}\text{C}$. Hydrogeneringen er afsluttet, når der ikke mere frigives CO_2 , dvs. når der efter kontrol i vandig bariumhydroxidopløsning ikke mere dannes bundfald. Opløsningen

35

filtreres, vaskes med vand og inddampes på en rotationsfordamper. Det tilbageblevne mellemprodukt anvendes derefter i trin 4 som aminokomponent.

0

Trin 4): a) Fremstilling af det blandede anhydrid Z-D-Ala- og Z-D-Pro-blandet anhydrid.

5

334,8 mg Z-D-Ala (tilsvarende også Z-D-Pro) opløses i 15 ml DMF under tilsætning af 170 μ l (1,5 mmol) N-methylmorpholin og omsættes i 15 minutter ved -15°C med 180 μ l (1,4 mmol) chlormyresyreisobutylester.

b) omsætning af det blandede anhydrid fra trin 4 a med aminokomponenten fra trin 3.

10

Z-D-Pro- eller Z-D-Ala-anhydrid + Phe-Pro-Gly-metester (i 15 ml DMF) $\xrightarrow[4 \text{ timer}]{-15^{\circ}\text{C}}$ Z-D-Ala-Phe-Pro-Gly-methylester og Z-D-Pro-Phe-Pro-Gly-methylester

(Fremstillingen af Z-D-Ala og Z-D-Pro er anført i slutningen af syntesen).

15

Nedbrydningen af overskudet af blandet anhydrid, ekstraktionstrinnene og hydrogeneringen sker som tidligere beskrevet.

Slutproduktet 4 b tjener som aminokomponent i trin 5. En kontrol af aminosyresammensætningen efter hydrolyse viser det korrekte molære aminosyreforhold i dette peptid. En prøve med henblik på opiataktivitet (prøvemetode, se eksempel I) viser ingen som helst opiatagtig virkning.

20

25

Trin 5: a) Dannelse af det blandede anhydrid (Z-Tyr-blandet anhydrid).

629,24 mg (1,4 mmol) N,O-di-Z-L-tyrosin opløses i 15 ml DMF under tilsætning af 165 μ l (1,4 mmol) N-methylmorpholin og omsættes med 175 μ l (1,3 mmol) chlormyresyreisobutylester i 15 minutter ved -15°C .

30

b) Omsætning af det blandede anhydrid fra trin 5 a med slutproduktet fra trin 4 b.

Slutproduktet fra trin 4 b opløses i 15 ml DMF og omsættes ved -15°C i 4 timer med det blandede anhydrid fra trin 5 a. Nedbrydningen af overskuddet af blandet anhydrid, ekstraktionen og hydrogeneringen sker som beskrevet ovenfor.

35

0

En derpå følgende adskillelse af reaktionsprodukterne sker ved hjælp af gelfiltrering på en "Biogel P 2"-kolonne (firma Biorad) <400 mesh, diameter 20 mm, længde 1170 mm, strømningshastighed 12 ml pr. time, med ultravioletabsorptionsmåling ved 280 nm og fraktionsopsamler (hvert 20 min/frak.). Alle fraktionerne fra gelfiltreringen bliver afprøvet på et præparat af længdemusklen Plexus myentericus ophængt i organbad med hensyn til opiatagtig virkning. Til denne prøve ind-

5

dampes de enkelte fraktioner i vakuum.

10

Efter at remanenserne er taget op i vand, tilsættes dele af disse prøver organbadet og prøves for deres hæmmende virkning på de elektrisk stimulerede kontraktioner af marsvinetarmpræparatet. Den hæmmende virkning af stofferne, der afprøves, betragtes som opiatspecifik, når den ophæves efter tilsætning af den specifikke opiatantagonist "Naloxon", og når der efter yderligere tilsætning af "Naxolon" ikke mere kan fremkaldes en hæmning med prøven. Præpareringen og den elektriske stimulering af marsvinetarm (frekvens 0,1 Hz, puls 60 volt, 0,5 ms) foregår som beskrevet af Kosterlitz m.fl. (H.W. Kosterlitz, R.J. Lydon og A.J. Watt, Brit. J. Pharmacol. 39, 398-413 (1970) og Schulz og Goldstein (R. Schulz og A. Goldstein, J. Pharmacol. exp. Ther. 183, 404-410 (1972))

15

20

De opiataktive fraktioner inddampes til tørhed.

25

Efter den sure hydrolyse foretages der af den opiataktive fraktion en aminosyreanalyse, der viser det rigtige molært aminosyreforhold i overensstemmelse med de to peptider D-Ala²-β-casomorphin-5 og D-Pro²-β-casomorphin-5.

30

Der henvises til, at allerede aktiveringen af det opiatinaktive tetrapeptid (trin 4 b) ved hjælp af tyrosin-kobling til et opiataktivt peptid udgør beviset på en vellykket syntese.

Fremstilling af Z-D-Ala (analog Z-D-Pro)

35

891 mg (10 mmol) D-Ala i 5 ml 2N NaOH behandles under isafkøling og kraftig omrøring med 3 ml 50%'s chlor-

0 myresyrebenzylester i toluen og med 5,16 ml 2N NaOH.

Opløsningen syrnes med 5,33 ml 2N HCl og ekstraheres grundigt med ethylacetat. Den fraskilte ethylacetat-fase vaskes med fortyndet HCl og vand og ekstraheres ende-
5 lig med megen KHCO_3 -opløsning. De forenede vandige ekstrakter indstilles til pH 1,5 med HCl og ekstraheres med ethylacetat. Ethylacetatfasen vaskes igen med fortyndet HCl. Efter en yderligere vaskeoperation med vand tørres over natriumsulfat. Efter afdampning af opløsningsmidlet bliver det
10 ønskede slutprodukt tilbage.

Påvisning af den opiatagtige virknings stabilitet ved inkubation med rottehjernehomogenat af D-Ala²- β -casomorphin-5

På to hanrotter (Sprague Dawley, 220 g), der er aflivet ved dekapitation, udtages hurtigt hjernen, inkl.
15 lillehjernen og disse anbringes i en isafkølet homogenisator (nr. S 587, volumen 35 cm³, Braun, Melsungen) fyldt med 7 ml 0,05 molær NaH_2PO_4 -puffer. Homogeniseringen sker derefter ved et omdrejningstal på 850 omdr./min. under ti gange op- og nedadgående bevægelse af homogenisatorstempleet.
20 En lille del af homogenatet udtages og lagres på is. Resten centrifugeres ved 5°C i 15 minutter ved 28.000 G. Både homogenatet fra før centrifugeringen og den klare ovenpå liggende væske efter centrifugeringen anvendes til de efterfølgende inkubationer.

25 Alle inkubationerne med substanser med hjernehomogenat og ovenpå flydende væske sker ved 37°C. Den pågældende inkubationstid afsluttes med 10 minutters opvarmning ved en temperatur på 95°C. Denne opvarmning til 95°C tjener til at ødelægge endnu forekommende enzymer, der på negativ måde
30 ville kunne påvirke påvisningssystemet med henblik på opiatagtig virkning.

1-2 mg af såvel β -casomorphin 5 og det ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen fremstillede D-Ala²- β -casomorphin-5 optages i 50 μl H_2O og blandes med såvel 300 μl hjer-

0 nehomogenat som ovenpå liggende væske. Hver prøve opvarmes
før inkubering ved 37°C straks til 95°C. Disse prøver er
altså kun i meget kort tid i berøring med de aktive enzymer,
og deres indhold af opiatagtig virkning tjener som reference-
5 værdi på tidspunkt 0.

Efter henholdsvis 15, 30, 60 og 120 minutter udta-
ges yderligere prøver af begge de inkuberede opiater fra in-
kubatoren og opvarmes til 95°C.

10 Som påvisningssystem, der også omfatter opiatmæng-
derne kvantitativt, anvendes den tidligere beskrevne marsvi-
netarmprøve.

En prøve med henblik på indhold af opioidt materi-
ale i de enkelte beholdere viser, at de beholdere, som kun
i kort tid (0-værdi) har været udsat for enzymerne, for beg-
15 ge de anvendte opiaters vedkommende viser samme aktivitets-
indhold. Men allerede efter 30 minutters forløb viser de
beholdere, som indeholder β -casomorphin-5, ikke mere nogen
opiatagtig virkning, medens derimod det fulde opiatagtige
virkningsindhold er påviselig i D-Ala²- β -casomorphin-5 både
20 efter 30 og 120 minutters inkubation. Peptidet med D-amino-
syren viser derfor en forbavsende stabilitet over for pep-
tidspaltende enzymer.

Med D-Ala²- og D-Pro- β -casomorphinerne kan der ved
systemisk indgivelse (intravenøs og subcutan injektion) op-
25 nås en analeptisk virkning, hvilket ikke er muligt med de
tilsvarende L-forbindelser. Doseringen ligger, svarende
til den ringere virkning end morfin, højere.

Analogt med det ovenfor anførte inkubationseksem-
pel udføres prøven med henblik på den opiatagtige virknings
30 stabilitet over for blodplasma. Her anvendes i stedet for
de 300 μ l homogenat 300 μ l frisk udvundet rotteblodplasma.
Det viser sig atter, at β -casomorphin-5 uden D-aminosyren al-
lerede efter 30 minutter er ødelagt, medens D-Ala²- β -caso-
morphin-5 beholder sin fulde virkning.

Tabel IV

Bestemmelse af β -casomorphinens og deres analoges opiatvirkning i isolerede organpræparater a) og radioligand-bindingundersøgelser b)

Forbindelse	GPI	MVD	MVD/GPI	[³ H]DHM	[³ H]DADL	$\frac{[3H]DADL}{[3H]DHM}$
β-Casomorphin-3-forbindelser						
Tyr-Pro-Phe-OH	>200.000	>200.000	/	8.000	>50.000	>6,25
Tyr-D-Ala-Phe-NH ₂	1.700	10.000	5,9	80	1.600	20,0
β-Casomorphin-4-forbindelser						
Tyr-Pro-Phe-Pro-OH	22.000	84.000	3,8	1.800	35.000	19,0
Tyr-Pro-Phe-Pro-NH ₂	1.450	2.000	1,4	45	50.000	1110,0
Tyr-D-Ala-Phe-Pro-NH ₂	400	1.000	2,5	35	900	26,0
β-Casomorphin-5-forbindelser						
Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-OH	6.500	40.000	6,2	400	18.000	45,0
Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-NH ₂	3.500	7.000	2,0	200	25.000	125,0
Tyr-D-Ala-Phe-Pro-Gly-NH ₂	5.000	8.500	1,7	14	75	5,4
Tyr-D-Ala-Phe-Pro-Gly-OH	2.300	3.000	1,3	100	290	2,9
Tyr-D-Ala-Phe-Pro-Met-NH ₂	3.000	700	0,2	60	70	1,2
Tyr-D-Ala-Phe-Pro-Tyr-NH ₂	100	200	2,0	5	34	6,8
β-Casomorphin-6-forbindelser						
Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-OH	27.400	>150.000	>5,5	-	-	-
Tyr-D-Ala-Phe-Pro-Gly-Pro-NH ₂	8.000	40.000	5,0	450	560	1,2
Normorphin	200	1.100	5,5	-	-	-
Met-enkephalin	190	19	0,1	-	-	-
Dihydromorphin	-	-	-	3	-	-
D-Ala ² -D-Leu ³ -enkefalin	-	-	-	-	2	-

a) Opiatvirkning på et præparat af længdemusklen plexus myentericus i marsvins ileum (GPI) og vas deferens hos mus (MVD). IC₅₀-værdierne er den peptidkoncentration (nM), der forårsager 50% inhibering af de elektrisk inducerede kontraktioner af organpræparaterne. Gennemsnitsværdier fra 5-7 bestemmelser; standardafvigelse fra gennemsnitsværdierne er mindre end 13%.

b) Opiatvirkninger ved en opiatreceptorbindingsanalyse: IC₅₀-værdier (nM) er angivet for de peptidkoncentrationer, der giver 50% inhibering af bindingen af [³H]-dihydromorphin, [³H]-DHM (0,5 nM) eller [³H]-D-Ala², D-Leu³-enkephalin [³H]-DADL (0,5 nM); gennemsnitsværdier af 3 bestemmelser.

Kvotienterne mellem IC₅₀-koncentrationerne i de to analyser, MVD/GPI og [³H]-DADL/³H-DHM, angiver den foretrukne virkning af de anvendte forbindelser; høje værdier angiver en foretrukken virkning på μ -receptorer eller μ -bindingssteder.

(-) Ikke undersøgt i den specielle analyse.

0

TABEL IV (fortsat)
Opiatagtige aktiviteter af casomorphiner på isolerede organpræparater

Nr.	Forbindelse	GPI					MVD				
		IC ₅₀ nM±SEM	N	rel.virkn. CM(5) =1.0		IC ₅₀ nM±SEM	N	rel.virkn. CM(5) =1.0		IC ₅₀ MVD IC ₅₀ GPI	
5	1 Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly β-Casomorphin(5), CM(5)	2260±862	5	1.0	0.03	11400±324	6	1.0	0.03	5.0	
		6500 *		1.0	0.03	40000 *		1.0	0.03	6.2	
5	2 Tyr-Pro-Phe-Pro-NH ₂ Morphiceptin, Mc	693±123	5	3.3	0.1	667±142	6	17.6	0.6	1.0	
		1450 *		4.5	0.1	2000 *		20.0	0.55	1.4	
10	3 D-Phe ¹ -CM(5)	373± 83	5	6.1	0.2	421± 81	6	27.1	0.9	1.1	
		21± 4		9	107.6	3.4		89± 13	6	128.1	4.4
10	4 D-Pip ⁴ -CM(5), Depilorphin	63± 5	5	35.9	1.1	582±139	7	19.6	0.7	9.2	
		851±220		7	2.7	0.08		473±119	7	24.1	0.8
10	5 D-Pro ⁴ -CM(5), Deprolorphin	41± 6	5	55.1	1.7	523±130	7	21.8	0.8	12.8	
		106± 17		5	21.3	0.7		243± 63	6	46.9	1.6
15	6 D-Pip ² -CM(5)	74± 13	7	30.5	0.96	1490±180	6	7.7	0.27	20.1	
		106± 17		5	21.3	0.7		243± 63	6	46.9	1.6
15	7 D-Pro ⁴ -Mc, Deproceptin	100 *	5	65.0	2.0	200 *	6	200.0	5.5	2.0	
		5000 *		1.3	0.04	8500 *		4.7	0.1	1.7	
15	8 D-Ala ² ,D-Pro ⁴ -Mc	400 *	5	16.3	0.5	1000 *	6	40.0	1.1	2.5	
		21900 *		0.3	0.01	84300 *		0.5	0.01	3.8	
15	9 D-Ala ² ,Tyr ⁴ -NH ₂ -CM(5)	3500 *	5	1.9	0.06	7000 *	6	5.7	0.16	2.0	
		71± 18		5	31.8	1.0		395± 96	8	28.9	1.0
20	10 D-Ala ² ,Pro ⁴ -NH ₂ -CM(4)	200 *	5	32.5	1.0	1100 *	6	36.4	1.0	5.5	
		106± 17		5	21.3	0.7		243± 63	6	46.9	1.6
20	11 Tyr-Pro-Phe-Pro,CM(4)	71± 18	5	31.8	1.0	395± 96	8	28.9	1.0	5.6	
		200 *		32.5	1.0	1100 *		36.4	1.0	5.5	
20	12 Gly ⁴ -NH ₂ -CM(5)	71± 18	5	31.8	1.0	395± 96	8	28.9	1.0	5.6	
		200 *		32.5	1.0	1100 *		36.4	1.0	5.5	
20	13 Morphine-HCl	71± 18	5	31.8	1.0	395± 96	8	28.9	1.0	5.6	
		200 *		32.5	1.0	1100 *		36.4	1.0	5.5	
20	14 Normorphine	71± 18	5	31.8	1.0	395± 96	8	28.9	1.0	5.6	
		200 *		32.5	1.0	1100 *		36.4	1.0	5.5	

25

30

35

0

TABEL V

Analgetisk virkning af casomorphiner efter ICV og IV indgivelse (ED₂₀₀)

5	Nr.	Forbindelse	nmol.	ICV		$\frac{\mu\text{mol}}{\text{kg}}$	IV	
				N	Rel.virkn. CM(5) =1.0		N	Rel.virkn. morph. =1.0
	1	Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly β -casomorphin(5), CM(5)	129.0 (13.9-202.0) 180.0 *	17	1.0 1.0	0.04 0.1	—	—
	2	Tyr-Pro-Phe-Pro-NH ₂ Morphiceptin, Mc	13.0 (6.6-18.7) 220.0 *	25	9.9 0.8	0.43 0.08	—	—
10	3	D-Phe ³ -CM(5)	2.0 (0.5-3.2)	15	64.5	2.0	10.6	6
	4	D-Pip ⁴ -CM(5). Depilorphin	0.6 (0.04-0.9)	18	215.0	9.3	6.8	9
	5	D-Pro ⁴ -CM(5). Deprolorphin	0.2 (0.08-2.0)	27	645.0	28.0	2.4	6
	6	D-Pip ² -CM(5)	4.3 (2.9-5.8)	23	30.0	1.3	—	—
	7	D-Pro ⁴ -Mc. Deproceptin	0.7 (0.1-1.4)	27	184.0	8.0	8.6	6
15	8	D-Pip ² , D-Pro ⁴ -Mc	1.1 (0.7-1.7)	29	117.0	5.1	10.0	6
	9	D-Ala ² , D-Pro ⁴ -Mc	1.2 (0.1-2.3)	21	107.5	4.7	—	—
	10	D-Ala ² , Gly ⁴ -NH ₂ -CM(5)	7.0 *		25.7	2.6	—	—
	11	D-Ala ² , Gly ⁴ -NH ₂ -CM(5)	15.0 *		12.0	1.2	—	—
	12	D-Ala ² -Mc	18.8 *		10.0	1.0	—	—
	13	Tyr-Pro-Phe-Pro, CM(4)	650.0 *		0.3	0.03	—	—
20	14	Gly ³ -NH ₂ -CM(5)	115.0 *		1.6	0.16	—	—
	15	Morphine-HCl	5.6 (4.2-6.4)	21	23.0	1.0	4.7	17

25

30

35

Tabel VI viser den relative virkning af de ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen fremstillede peptider (enkephalinanaloge) på marsvine-ileum i forhold til Met-enkephalin (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met), der er sat til 100.

5

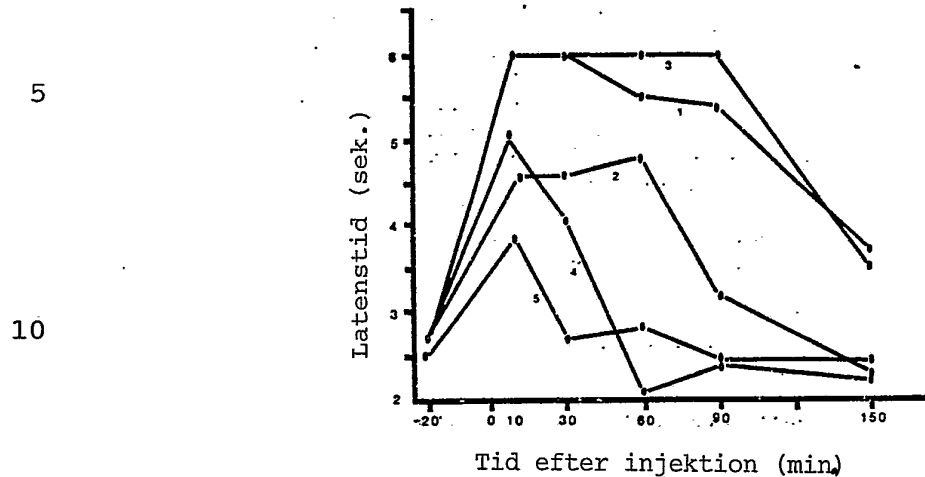
TABEL VI

Virkning af enkephalinanaloge på marsvine-ileum.

	<u>Peptid-</u> <u>nummmmer</u>	<u>Peptid-</u> <u>struktur</u>	<u>Relativ</u> <u>virkning</u>
10		Tyr-Gly-Gly-Phe-Met	100
		Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-NH ₂	160
		Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Met-NH ₂	140
		Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Met-ol	360
		Tyr-D-Ala-Phe-Met-NH ₂	120
		Tyr-D-Ala-Phe-Leu-NH ₂	120
		Tyr-D-Ala-Phe-Met-ol	50
	1	Tyr-Phe-Met	0
	2	Tyr-Phe-Leu	—
15	3	Tyr-Phe-Met-NH ₂	0
	4	Tyr-Phe-Leu-NH ₂	0
	5	Tyr-Ala-Phe-NH ₂	0
	6	Tyr-Pro-Phe-NH ₂	19
	7	Tyr-Aib-Phe-NH ₂	2
	8	Tyr-D-Ala-Phe	0
	9	Tyr-D-Phe-Met	0
	10	Tyr-D-Phe-Leu	0
	11	Tyr-D-Phe-Phe	0.1
20	12	Tyr-D-Ala-Phe-NH ₂	25
	13	Tyr-D-Ala-Phe-ol	24
	14	Tyr-D-Pro-Phe-NH ₂	0.1
	15	Tyr-D-Phe-Met-NH ₂	9
	16	Tyr-D-Phe-Leu-NH ₂	4
	17	Tyr-D-Phe-Phe-NH ₂	23
	18	Tyr-D-Phe-D-Met	0
	19	Tyr-D-Phe-D-Leu	0
	20	Tyr-D-Ala-D-Phe	0.1
25	21	Tyr-D-Phe-D-Phe	0
	22	Tyr-D-Phe-D-Met-NH ₂	1
	23	Tyr-D-Phe-D-Leu-NH ₂	0.2
	24	Tyr-D-Ala-D-Phe-NH ₂	2
	25	Tyr-D-Phe-D-Phe-NH ₂	1
	26	Tyr-D-Phe-NH ₂	0.1
	27	Tyr-D-Ala-BA (benzylamide)	8
	28	Tyr-D-Ala-PEA (phenethylamide)	6
30	29	Tyr-D-Ala-PPA (phenylpropylamide)	77
	30	Tyr-D-Ala-PBA (phenylbutylamide)	13

35

(I tabellen betyder endelsen -ol gruppen -OH)



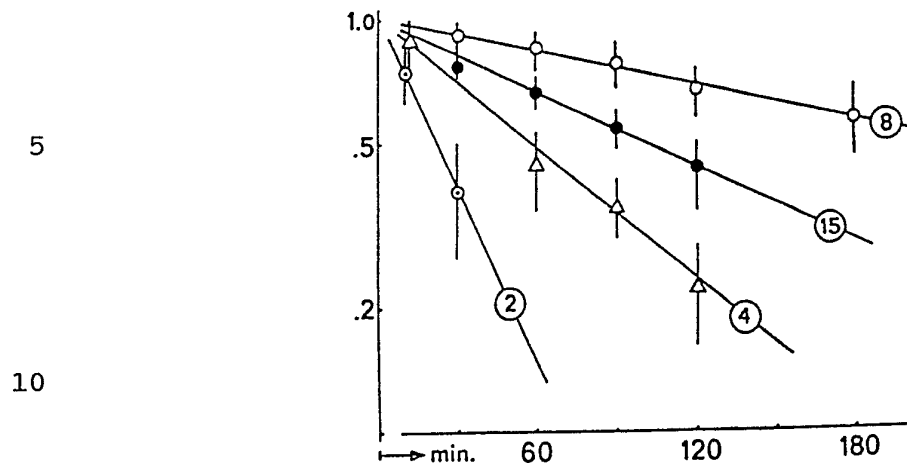
15

Ovenstående diagram viser resultaterne af en in vivo-bestemmelse af den analgetiske virkning af Tyr-D-Ala-phenylpropylamid på rottehale-slag efter intracerebroventrikulær (ICV) injektion med Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Met-NH₂ som standard.

20 Latenstiderne for haleslag bestemmes 20 min. før injektion af peptid og 10, 30, 60, 90 og 150 min. efter injektion. For at teste reversibilitet indgives naloxon (4 mg/kg) IP på tidspunktet for ICV peptidinjektion af 6 µg Tyr-D-Ala-phenylpropylamid pr. mus (N = 6). 1: standard - 10 µg/mus
 25 (N = 6); 2: standard - 1 µg/mus (N = 6); 3: Tyr-D-Ala-phenylpropylamid - 6 µg/mus (N = 5); 4: Tyr-D-Ala-phenylpropylamid - 0,6 µg/mus (N = 5); 5: Tyr-D-Ala-phenylpropylamid - 0,1 µg/mus (N = 5). På molar basis er 6 µg Tyr-D-Ala-phenylpropylamid ækvivalent med 10 µg standardpeptid.

30

35



Ovenstående diagram viser tidsforløbet af analgetisk virkning af nogle casomorphinanaloge. Ad ordinaten er anført log analgetisk virkning, idet den maksimale effekt er 1,0. Ad abscissen er anført tiden efter maksimal analgetisk virkning. 8: D-Pip²-D-Pro⁴-morphiceptin, 5 nmol ICV; 15: morphin, 7 nmol ICV; 4: D-Pip⁴-casomorphin(5), 5 nmol ICV; 2: morphiceptin, 20 nmol ICV.

Tabel VII viser halveringstiden for den analgetiske virkning af peptider fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen (nr. 3, 6 og 9).

25

TABEL VII

Halveringstid for analgetisk virkning ($t/2$) af casomorphiner efter ICV injektion.

30

35

Nr.	Forbindelse	nmol	($t/2$) _a , min
1	Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly, CM(5)	600	34
2	Tyr-Pro-Phe-Pro-NH ₂ , Mc	20	22
3	D-Phe ³ -CM(5)	10	40
4	D-Pip ⁴ -CM(5), Depilorphin	5	55
5	D-Pro ⁴ -CM(5), Deprolorphin	10	61
6	D-Pip ² -CM(5)	5	72
7	D-Pro ⁴ -Mc, Deproceptin	10	115
8	D-Pip ² , D-Pro ⁴ -Mc	5	216
9	D-Ala ² , D-Pro ⁴ -Mc	5	99
15	Morphine-HCl	7	98

Kvantitative angivelser af β -casomorphinernes virkning i biologiske forsøgssystemer.

- 5 aa) Intracerebroventrikulær injektion, se tabel VII.
 bb) Analgesiforsøg (elektrisk stimuleret rotte hale), se tabel VII.
 cc) Sammenligning med morphin.

10

TABEL VIII

<u>Forbindelse</u>	<u>Dosis til 50% smertehæmning</u>
β -Casomorphin-5	500 mmol/rotte
β -Casomorphin-5-amid	115 mmol/rotte
15 <u>D-Ala²-β-Casomorphin-5-amid</u>	<u>15 mmol/rotte</u>
<u>Morphin</u>	<u>18 mmol/rotte</u>

20 Med D-Ala²-, D-Ser²-, D-Met²- og D-Arg²- β -casomorphinerne kan der ved systemisk indgivelse (intravenøs og subcutan injektion) opnås en analgetisk virkning og en antidiarrévirksomhed, hvilket ikke er muligt med de tilsvarende L-forbindelser.

25 Forklaring til tabel V:

a) Forbindelsen D-Ala²- β -casomorphin-5-amid udviser en med morphin sammenlignelig analgetisk virkning. I sammenligning med den analgetiske virkning og styrken af forbindelserne β -casomorphin-5 og β -casomorphin-5-amid er forbindelsen
 30 D-Ala²- β -casomorphin-5-amid ifølge opfindelsen væsentlig stærkere.

b) Forbindelsen D-Ala²- β -casomorphin-5-amid er også længere analgetisk virksom end forbindelserne β -casomorphin-5- og/eller β -casomorphin-5-amid.

35 Dette kan føres tilbage til, at den enzymatiske nedbrydning på grund af indbygningen af en D-aminosyre i aminosyresekvensens 2-stilling sker langsommere end ved farmakologiske peptider, der ikke indeholder nogen D-aminosyre i

aminosyresekvensens 2-stilling. D-Aminosyren i peptidets 2-stilling forhindrer nedbrydningen af naturlige enzymer, da de naturlige enzymer fortrinsvis spalter peptidbindinger mellem L-aminosyre.

5

Fordele af forbindelser fremstillet ifølge opfindelsen med en D-aminosyre i pos. 2 i sekvensen i forhold til kendte peptider med lignende struktur:

a) Forbindelserne fremstillet ifølge opfindelsen er stabile over for proteolytisk nedbrydning. Der henvises til den eksempelvis demonstrerede stabilitet af Tyr-D-Ala-Phe-Pro-Gly-amid i sammenligning med Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly.

Analoge inkubationsforsøg med de i tabel IX angivne peptider over for

15 H-Tyr-Pro-Phe-NH₂H-Tyr-Pro-Phe-Pro-NH₂H-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-NH₂H-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-NH₂ ogH-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-NH₂

20 som kontroller viser, at de tilsvarende analoge med D-alanin i peptidets 2. position ikke ødelægges i helblod og plasma, dvs. at den fulde opiatvirkning også efter 90 minutters inkubation ved 37°C kan påvises uforandret.

b) Biologisk virkning for nogle af forbindelserne fremstillet ifølge opfindelsen.

25

30

35

TABEL IX

Peptid	IC ₅₀ (μM)
H-Tyr-D-Ala-Phe-NH ₂	1,7
5 H-Tyr-D-Ala-Phe-Pro-NH ₂	0,4
H-Tyr-D-Ala-Phe-Pro-Gly-NH ₂	5,0
H-Tyr-D-Ala-Phe-Pro-Gly-Pro-NH ₂	8,0
H-Tyr-D-Ala-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-NH ₂	7,0
H-Tyr-D-Ala-Phe-Hyp-Tyr-NH ₂	0,02
10 H-Tyr-D-Ala-Phe-Pro-Tyr-NH ₂	0,1
H-Tyr-D-Ser-Phe-NH ₂	1,0
H-Tyr-D-Ser-Phe-Pro-NH ₂	0,2
H-Tyr-D-Ser-Phe-Pro-Gly-NH ₂	2,0
H-Tyr-D-Ser-Phe-Pro-Gly-Pro-NH ₂	3,0
15 H-Tyr-D-Ser-Phe-Pro-Tyr-NH ₂	0,05
H-Tyr-D-Ser-Phe-Hyp-Tyr-NH ₂	0,01
Normorphin	0,2

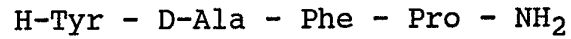
Tabel IX viser opiatvirkningen for nogle af peptiderne ifølge opfindelsen, målt på marsvineileums isolerede længdemuskelpræparat (med hensyn til præparering af marsvineileum og forsøgstopstilling henvises til Schulz og Goldstein, J. Pharmakol. exp. Ther., 183, 404-410 (1972)). IC₅₀-værdierne er anført, dvs. koncentrationen (μM) af de anførte peptider i det organbad, der bevirker en 50%'s hæmning af marsvineileums elektrisk inducerede kontraktionsamplitude.

Normorphin er anført til sammenligning. Den hæmmende virkning af de enkelte peptider kan ophæves og blokeres af den specifikke opiatantagonisk Naloxon[®] og må således anses for opiatspecifik.

Peptiderne fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen udviser også over for forbindelser, der ikke som peptiderne ifølge opfindelsen har en aminosyre med D-konfiguration i 2-stillingen, en særlig udpræget høj enzymatisk stabilitet. Den stærkere virkning af de farmakologisk aktive peptider ifølge opfindelsen i forhold til kendte farmakologisk aktive peptider fremgår af Peptides, bd. 3, s. 793-797, hvori værdier for β-casomorphinernes

opiatvirkning er angivet. Alle forbindelser ifølge opfindelsen kan betegnes som kun lidt toksiske.

Således udviser f.eks.



- 5 a) efter oral indgivelse af 300 mg pr. kg (p.o) ingen toksiske fænomener,
b) efter intraperitoneal (i.p.) indgivelse af 200 mg pr. kg ligeledes ingen toksiske fænomener.

Heraf fås værdier for

- 10 LD₅₀ større end 300 mg pr. kg p.o.,
LD₅₀ større end 200 mg pr. kg i.p.

I Tabel IX er der anført fysiske egenskaber af peptider fremstillet ifølge opfindelsen (enkephalinanaloge).

15

20

25

30

35

TABEL IX
Fysiske egenskaber af enkephalin-analoge

Peptide	k(CCD)*	HVE†		TLC‡	
		pH 2.8	pH 5.0	834	5513
Tyr-Phe-Met	2.33	0.71	0.19	0.63	0.72
Tyr-Phe-Leu	3.17	ins§	ins	ins	ins
Tyr-Phe-Met-NH ₂	1.22	0.41	0.55	0.64	0.85
Tyr-Phe-Leu-NH ₂	1.78	0.45	0.53	0.65	0.85
Tyr-Ala-Phe-NH ₂	0.61	0.49	0.58	0.51	0.83
Tyr-Pro-Phe-NH ₂	1.00	0.49	0.57	0.50	0.82
Tyr-Aib-Phe-NH ₂	1.17	0.47	0.55	0.57	0.91
Tyr-D-Ala-Phe	1.44	0.37	0.10	0.57	0.64
Tyr-D-Phe-Met	2.70	0.71	0.18	0.58	0.71
Tyr-D-Phe-Leu	3.76	ins	ins	ins	ins
Tyr-D-Phe-Phe	4.00	0.67	0.13	0.60	0.71
Tyr-D-Ala-Phe-NH ₂	0.82	0.49	0.56	0.57	0.68
Tyr-D-Ala-Phe-ol	1.86	0.50	0.57	0.64	0.81
Tyr-D-Pro-Phe-NH ₂	1.22	0.45	0.54	0.55	0.85
Tyr-D-Phe-Met-NH ₂	1.63	0.36	0.52	0.62	0.82
Tyr-D-Phe-Leu-NH ₂	1.94	0.46	0.52	0.64	0.83
Tyr-D-Phe-Phe-NH ₂	2.85	0.38	0.49	0.62	0.78
Tyr-D-Phe-D-Met	2.33	0.31	0.14	0.60	0.69
Tyr-D-Phe-D-Leu	3.76	0.39	0.08	0.64	0.75
Tyr-D-Ala-D-Phe	1.38	0.35	0.11	0.63	0.64
Tyr-D-Phe-D-Phe	3.55	0.29	0.00	0.65	0.70
Tyr-D-Phe-D-Met-NH ₂	1.33	0.46	0.56	0.66	0.78
Tyr-D-Phe-D-Leu-NH ₂	2.03	0.45	0.58	0.67	0.84
Tyr-D-Ala-D-Phe-NH ₂	0.89	0.48	0.56	0.57	0.67
Tyr-D-Phe-D-Phe-NH ₂	2.45	0.43	0.47	0.64	0.84
Tyr-D-Ala-BA	1.56	0.54	0.62	0.67	0.81
Tyr-D-Ala-PEA	1.70	0.54	0.60	0.62	0.81
Tyr-D-Ala-PPA	3.00	0.49	0.54	0.65	0.87
Tyr-D-Ala-PBA	4.26	0.41	0.53	0.67	0.90
Tyr-D-Phe-NH ₂	1.13	0.54	0.65	0.56	0.72

(I tabellen betyder endelsen -ol gruppen -OH).

25 * Den eksperimentelt bestemte fordelingskoefficient ved modstrømsfordeling i systemet n-BuOH:AcOH:H₂O (4:1:5). Mobilitet i forhold til Lys = 1,00 ved højspændingselektroforese i 1N AcOH (pH 2,8) og pyridinacetatpuffer (pH 5,0).

30 † Rf-værdier ved tyndtlagschromatografi på Merck silicagel-overtrukne glasplader i systemet n-BuOH:AcOH:H₂O (8:3:4) og EtOAc:pyridin:AcOH:H₂O.

§ Peptidet er uopløseligt i opløsningsmidlerne anvendt til opløsning af prøver ved TLC og HVE.

35 Forkortelser: BA = benzylamid; PEA phenethylamid; PPA = phenylpropylamid; PBA = phenylbutylamid.

0 Human- og veterinærlægemidlerne er pharmaceuti-
ske præparater, der foruden ikke-toksiske, inaktive, pharma-
ceutisk egnede bærestoffer indeholder et eller flere af de
aktive stoffer, der fremstilles ved fremgangsmåden ifølge
5 opfindelsen, eller som består af et eller flere af de her
omhandlede aktive stoffer.

Af de pågældende aktive stoffer kan der fremstil-
les pharmaceutiske præparater i enhedsdoseringsformer. Det-
te vil sige, at præparaterne foreligger som f.eks. tabletter,
dragées, kapsler, piller, suppositorier og ampuller, hvis
10 indhold af aktivt stof varer til en brøkdel eller et multi-
plum af en enkeltdosis. Doseringsenhederne kan f.eks. inde-
holde 1, 2, 3 eller 4 enkeltdoser eller det halve, en tredje-
del eller en fjerdedel af en enkeltdosis. En enkeltdosis
indeholder fortrinsvis den mængde aktivt stof, der indgives
15 ved en indgivelse, og som almindeligvis svarer til en hel,
en halv, en tredjedel eller en fjerdedel af en dagsdosis.

Ved ikke-toksiske, inaktive pharmaceutisk egnede
bærestoffer skal forstås faste, halvfaste eller flydende
fortyndingsmidler, fuldstoffer og præparathjælpestoffer af
20 enhver art.

Foretrukne pharmaceutiske præparater er tabletter,
dragées, kapsler, piller, granulater, suppositorier, opløs-
ninger, suspensioner og emulsioner, pastaer, salver, geler,
25 cremer, lotioner, pudere og sprays.

Tabletterne, dragéerne, kapslerne, pillerne og
granulaterne kan indeholde det eller de aktive stof(fer) for-
uden gængse bærestoffer, såsom fyld- og strækmidler (f.eks.
stivelse, mælkesukker, rørsukker, glukose, mannit og kie-
30 selsyre), bindemidler (f.eks. carboxymethylcellulose, algi-
nater, gelatine, polyvinylpyrrolidon), fugtighedsbevarende
midler (f.eks. glycerol), disintegreringsmidler (f.eks. agar-
agar, calciumcarbonat og natriumbicarbonat), opløsningsfor-
halende midler (f.eks. paraffin) og resorptionsfremmende mid-

0 ler (f.eks. kvaternære ammoniumforbindelser), adsorptionsmid-
ler (f.eks. kaolin og bentonit) og glidemidler (f.eks. talkum,
calcium- og magnesiumstearat og faste polyethylenglykoler)
eller blandinger af de anførte stoffer.

5 Tabletterne, dragéerne, kapslerne, pillerne og gra-
nulatene kan være forsynet med gangse overtræk, der eventu-
elt indeholder opacificeringsmidler, og også være således
sammensat, at de afgiver det eller de aktive stof(fer) ude-
lukkende eller fortrinsvis i en bestemt del af mave-tarmka-
nalen, eventuelt protraheret, idet der som indlejringsmidler
10 f.eks. kan anvendes polymerstoffer og voksarter.

Det eller de aktive stof(fer) kan eventuelt sammen
med et eller flere af de ovenfor anførte bærestoffer også
foreligge i mikroindkapslet form til opnåelse af en forsin-
ket virkning.

15 Suppositorier kan foruden det eller de aktive stof-
(fer) indeholde gangse vandopløselige eller vanduopløselige
bærestoffer, f.eks. polyethylenglykoler, fedtstoffer, f.eks.
kakaosmør og højere estere (f.eks. C₁₄-alkohol med C₁₆-fedt-
syre) eller blandinger af disse stoffer.

20 Salver, pastaer, cremer og geler kan foruden det
eller de aktive stof(fer) indeholde de gangse bærestoffer
(f.eks. animalsk eller vegetabilsk fedtstof, voksarter, pa-
raffiner, stivelser, tragant) eller blandinger af disse stof-
fer.

25 Opløsninger og emulsioner kan foruden det eller
de aktive stof(fer) indeholde de gangse bærestoffer såsom
opløsningsmidler, opløseliggørende midler og emulgatorer,
f.eks. vand, ethylalkohol, isopropylalkohol, ethylcarbonat,
ethylacetat, benzylalkohol, benzylbenzoat, propylenglykol,
30 olier, især bomuldsfrøolie, jordnøddolie, majskimolie, o-
livenolie og sesamololie, glycerol, polyethylenglykoler eller
blandinger af disse stoffer.

Til parenteral indgivelse kan opløsningerne og e-
mulsionerne også foreligge i steril og blodisotonisk form.

0 Suspensioner kan foruden det eller de aktive stof-
(fer) indeholde gængse bærestoffer såsom flydende fortyn-
dingsmidler (f.eks. vand, ethylalkohol, propylenglykol), sus-
pensionsmidler (f.eks. ethoxylerede isostearylakoholer, po-
lyoxyethylensorbit- og sorbitanestere, mikrokrystallinsk
5 cellulose) eller blandinger af disse stoffer.

De nævnte præparatformer kan også indeholde far-
vestoffer konserveringsmidler samt lugt- og smagsforbedrende
tilsætningsstoffer, f.eks. pebermynteolie og eukalyptusolie
samt sødemidler, f.eks. saccharin.

10 De terapeutisk aktive forbindelser forekommer i
de ovenfor anført pharmaceutiske præparater fortrinsvis i
en koncentration på ca. 0,1-99,5, især på ca. 0,5-95% bereg-
net på vægten af den samlede blanding.

De ovenfor anførte pharmaceutiske præparater kan
15 foruden de her omhandlede aktive stoffer også indeholde an-
dre pharmaceutisk aktive stoffer.

Fremstillingen af de ovenanførte pharmaceutiske
præparater sker på gængs måde efter kendte metoder, f.eks.
ved at blande det eller de aktive stof(fer) med bærestof(fer).

20 De aktive stoffer eller de pharmaceutiske præpara-
ter kan anvendes lokalt, oralt, parenteralt, peritonealt og/
eller rectalt, fortrinsvis parenteralt.

I reglen betragtes det inden for humanmedicin som
fordelagtigt at indgive det eller de foreliggende aktive
25 stoffer i en samlet mængde på ca. 5-500, fortrinsvis 50-250
mg hver 24 timer, eventuelt i form af flere enkelte indgi-
velser, til opnåelse af det ønskede resultat. En enkeltind-
givelse indeholdet det eller de aktive stof(fer) i mængder
på ca. 10 til ca. 300, fortrinsvis 50-200 mg/dosis. Det
30 kan dog være nødvendigt at afvige fra den nævnte dosering
afhængigt af patienten og dennes legemsvægt, af sygdommens
art og sværhedsgrad, præparatets art og lægemidlets indgi-

0 velsesvej samt det tidsrum eller interval, hvormed indgi-
velsen finder sted. Det kan således i enkelte tilfælde
være tilstrækkeligt at anvende mindre end den ovennævnte
mængde aktivt stof, medens man i andre tilfælde må over-
5 skride den anførte mængde aktivt stof.

Bestemmelse af den til enhver tid nødvendige op-
timale dosering og indgivelsesmåde af det aktive stof kan
dog let foretages af enhver fagmand ud fra hans fagkundskab.

10

15

20

25

30

35

P A T E N T K R A V .

1. Analogifremgangsmåde til fremstilling af β -casomor-
phinanalogue peptider med den almene formel

H-Tyr-X-A-R

5 H-Tyr-X-A-Pro-R

H-Tyr-X-A-Pro-B-R

H-Tyr-X-A-Pro-B-Pro-R

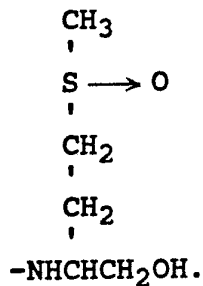
H-Tyr-X-A-Pro-B-Pro-C-R

H-Tyr-X-A-Pro-B-Pro-C-Pro-R eller

10 H-Tyr-X-A-Pro-B-Pro-C-Pro-D-R

hvor Tyr er aminosyren L-tyrosin, Pro er aminosyren L-prolin,
A, B, C og D er aminosyrerne Pro, Ala, Thr, Val, Tyr, Phe,
Gly, Ile, Asn, Met i stereokemisk L-form, hvorhos en C-ter-
minal gruppe A, B, C eller D tillige kan være -Met(O)-OH

15 med formlen



20

R kan være -OH, lavere alkoxy eller -NH₂, og X er aminosy-
rerne Pro, Ala, Thr, Val, Tyr, Phe, Gly, Ile, Asn, Met i
25 den stereokemiske D-form, deres farmakologisk acceptable
syreadditionssalte eller metalkomplekser, k e n d e t e g -
n e t ved, at de enkelte aminosyrer og/eller tilsvarende
mindre peptidfragmenter ved knytning af peptidbindingerne i
den ønskede rækkefølge overføres til de ønskede farmakolo-
30 gisk aktive peptider under midlertidig beskyttelse af even-
tuelle aktive grupper, som ikke skal deltage i peptiddannel-
sesreaktionen, især beskyttelse af aminogruupperne med car-
bobenzoylchlorid og beskyttelse af syregrupper som ester,
idet syntesen eventuelt kan finde sted som fastfasesyntese
35 på egnede bærermaterialer, fortrinsvis polystyren.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g -

n e ved, at der fremstilles en β -casomorphinanalog, hvori X er D-alanin, D-threonin eller D-valin.

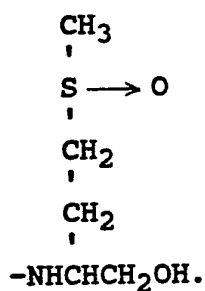
3. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g -
n e t ved, at den endestillede, C-terminale aminosyre fore-
5 kommer som amid eller ester.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g -
n e t ved, at i et peptid med ulige antal grupper er den
C-terminale aminosyre methionin.

5. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g -
10 n e t ved, at peptiderne er penta-, hepta- eller nonapep-
tider.

6. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g -
n e t ved, at det endestillede methionin foreligger som
-Met(O)-OH med formlen

15



20

25