



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **119034** (13) **C2**
(51) МПК (2019.01)**C07K 7/16** (2006.01)**C07K 1/107** (2006.01)**A61K 38/11** (2006.01)

A61P 25/00

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

(21) Номер заявки: а 2015 06906	(72) Винахідник(и): Біссанц Катерина (FR), Блайгер Конрад (DE), Грундшобер Крістоф (CH)
(22) Дата подання заявки: 17.12.2013	(73) Власник(и): Ф. ХОФФМАНН-ЛЯ РОШ АГ, Grenzacherstrasse 124, CH-4070 Basel, Switzerland (CH)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 25.04.2019	(74) Представник: Новікова Лідія Аркадіївна, реєстр. №36
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 12199012.1	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: BELEC L. ET AL. A study of the relationship between biological activity and propyl amide isomer geometry in oxytocin using 5-tert- butylproline to augment the Cys-Pro amide cis- isomer population, JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, 2000, vol. 43, P. 1448 - 1455 STYMIEST JAKE L. ET AL. Synthesis of biologically active dicarba analogues of the peptide hormone oxytocin using ring-closing metathesis, ORGANIC LETTERS, 2003, vol. 5, no. 1, , P. 47 - 49 JAKE L STYMIEST ET AL. Synthesis of Oxytocin Analogues with Replacement of Sulfur by Carbon Gives Potent Antagonists with Increased Stability, THE JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY, 2005, vol. 70, no. 20, P. 7799 - 7809 CLARK W. SMITH ET AL. Replacement of the disulfide bond in oxytocin by an amide group. Synthesis and some biological properties of [cyclo-(1-L-aspartic acid, 6-L-alpha,.beta- diaminopropionic acid)]oxytocin, JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, 1978, vol. 21, no. 1, P. 117 - 120 WO 2011038451 A1, 07.04.2011
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 21.12.2012	
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: EP	
(41) Публікація відомостей про заявку: 10.09.2015, Бюл.№ 17	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.04.2019, Бюл.№ 8	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ РСТ/EP2013/076783, 17.12.2013	

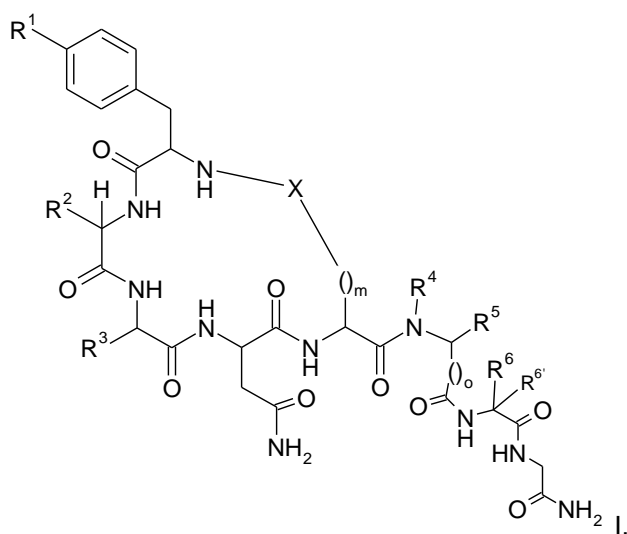
(54) АГОНІСТИ РЕЦЕПТОРА ОКСИТОЦИНУ**(57) Реферат:**

Винахід стосується сполуки, яка є агоністом рецептора окситоцину, фармацевтичної композиції, яка містить дану сполуку, та застосування сполуки для одержання лікарського засобу для терапевтичного та/або профілактичного лікування аутизму, стресу, включаючи посттравматичний стресовий розлад, тривоги, включаючи тривожні розлади і депресію,

UA 119034 C2

шизофренії, психіатричних розладів і втрати пам'яті, синдрому відміни алкоголю, звикання до лікарських засобів, а також для лікування синдрому Прадера-Віллі.

Винахід відноситься до сполук формули



- де
 5 R^1 є гідрокси або аміно;
 R^2 є втор-бутилом або ізобутилом;
 R^3 є нижчим алкілом, нижчим алкілом, заміщеним гідроксигрупою, $-(CH_2)_2C(O)-NH_2$, $-(CH_2)_3-NH_2$ або $-CH_2$ -п'ятичленною ароматичною гетероциклічною групою;
 R^4 є атомом водню або нижчим алкілом;
 10 R^5 є атомом водню або нижчим алкілом; або
 R^4 і R^5 можуть утворювати разом з атомом N і C, до якого вони приєднані, піролідинове кільце, необов'язково заміщене гідроксигрупою або атомом галогену, піперидинове кільце або азетидинове кільце;
 R^6 є атомом водню, нижчим алкілом, нижчим алкілом заміщеним гідроксигрупою, $-(CH_2)_2C(O)OH$, $-(CH_2)_2C(O)NH_2$, бензилом, необов'язково заміщеним аміно- або гідрокси, $-CH_2$ -п'ятичленною ароматичною гетероциклічною групою, індолілом, $-CH_2$ -циклоалкілом, циклоалкілом, $-(CH_2)_2-S$ -нижчим алкілом, або є $-(CH_2)_{1-4}-NH_2$;
 R^6 є атомом водню або нижчим алкілом; або
 R^6 і $R^{6'}$ разом є циклоалкілом;
 20 X є $-C(O)-CHR-NR'-C(O)-$;
 R/R' незалежно один від одного є атомом водню або нижчим алкілом;
 m дорівнює 2;
 o дорівнює 0 або 1;
 або до їх фармацевтично прийнятної кислотно-адитивної солі, до рацемічної суміші або до її
 25 відповідного енантіомера та/або оптичних ізомерів.

Виявлено, що дані сполуки є агоністами рецептора окситоцину, причому, ці сполуки є аналогами окситоцину, що зберігають біологічну активність окситоцину. Такі молекули-аналоги здібні до дій, подібних до ендогенного окситоцину, включаючи зв'язування рецептора окситоцину. Аналоги окситоцину мають абсолютно нові молекулярні структури.

30 Окситоцин є дев'ятиамінокислотним циклічним пептидним гормоном з двома залишками цистеїну, утворюючими дисульфідний місток між положенням 1 і 6. Окситоцин людини включає послідовність Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly.

Пептиди виникли як комерційно релевантний клас лікарських засобів, який забезпечує перевагу, що полягає у високій специфічності і ефективності та низьких профілях токсичності в порівнянні з традиційними низькомолекулярними фармацевтичними препаратами. Вони забезпечують методи лікування різних захворювань, таких як діабет, ВІЛ, гепатит, рак та інші, де лікарські засоби на основі пептидів стають все більш прийнятними для лікарів і пацієнтів. Даний винахід відноситься до пептидних агоністів рецептора окситоцину, які також включають природний гормон окситоцин і карбетоцин.

40 Окситоцин є ефективним утеротонічним засобом для регуляції атонії матки і надмірної кровотечі, вживаним клінічно для індукції пологів, і показано, що він підсилює появу і збереження лактації (Gimpl et al., Physiol. Rev., 81, (2001), 629-683, Ruis et al., BMJ, 283, (1981), 340-342). Карбетоцин (1-деаміно-1-карба-2-тирозин-(О-метил)-окситоцин) також є ефективним утеротонічним засобом, вживаним клінічно для регуляції атонії матки і надмірної кровотечі.

Пептидні агоністи окситоцину можна застосовувати для лікування синдрому Прадера-Віллі, що є рідкісним спадковим розладом, який вражає одну дитину з 25000.

Подальші дослідження показують, що агоністи окситоцину корисні для лікування запалення і болю, включаючи абдомінальний біль і біль в спині (Yang, Spine, 19, 1994, 867-71), статевий дисфункції як у чоловіків (Lidberg et al., Pharmacopsychiat., 10, 1977, 21-25), так і у жінок (Anderson-hunt, et al., BMJ, 309, 1994, 929), синдрому подразненого кишечника (СПК, Louvel et al., Gut, 39, 1996, 741-47), констипації і шлунково-кишкової непрохідності (Ohlsson et al., Neurogastroenterol. Motil., 17, 2005, 697-704), аутизму (Hollander et al., Neuropsychopharm., 28, 2008, 193-98), стресу, включаючи посттравматичний стресовий розлад (ПТСР) (Pitman et al., Psychiatry Research, 48, 107-117), тривоги, включаючи тривожні розлади і депресію (Kirsch et al., J. Neurosci., 25, 49, 11489-93, Waldherr et al., PNAS, 104, 2007, 16681-84), втрати крові при операції або регуляції післяродової кровотечі (Fujimoto et al., Acta Obstet. Gynecol., 85, 2006, 1310-14), індукції і підтримку пологів (Flamm et al., Obstet. Gynecol., 70, 1987, 70-12), загоєння рани і інфекції, мастита і народження плаценти, а також остеопорозу. Крім того, агоністи окситоцину можуть бути корисні для діагностики раку, а також плацентарної недостатності.

Крім того, в статтях "Intranasal Oxytocin blocks alcohol withdrawal in human subjects" (Alcohol Clin Exp Res, Vol, No. 2012) і "Breaking the loop: Oxytocin as a potential treatment for drug addiction" (Hormones and Behavior, 61, 2012, 331-339) запропоноване лікування синдрому відміни алкоголю і звикання до лікарських засобів агоністом окситоцину.

Окситоцин і його рецептори існують в зонах головного мозку, залучених в симптоми шизофренії, таких як прилегле ядро і гіпокамп. Агоністи рецепторів окситоцину можна застосовувати для лікування аутизму, стресу, включаючи посттравматичний стресовий розлад, тривоги, включаючи тривожні розлади і депресію, шизофренії, хвороби Альцгеймера, психіатричних розладів, втрати пам'яті і метаболічних захворювань (WO 2012/016229).

Об'єктами даного винаходу є нові сполуки формули I і застосування сполук формули I та їх фармацевтично прийнятних солей для лікування розладів ЦНС, пов'язаних з рецептором окситоцину, що являють собою аутизм, стрес, включаючи посттравматичний стресовий розлад, тривогу, включаючи тривожні розлади і депресію, шизофренію, психіатричні розлади і втрату пам'яті, синдром відміни алкоголю, звикання до лікарських засобів, і для лікування синдрому Прадера-Віллі.

Наступним об'єктом винаходу є одержання нових сполук формули I і лікарських засобів, що їх містять.

Даний винахід може запропонувати селективні, ефективні сполуки, які забезпечують альтернативи та/або удосконалення в лікуванні деяких розладів ЦНС, що включають аутизм, стрес, включаючи посттравматичний стресовий розлад, тривогу, включаючи тривожні розлади і депресію, шизофренію, психіатричні розлади і втрату пам'яті, синдром відміни алкоголю, звикання до лікарських засобів і синдром Прадера-Віллі.

Показано, що данні пептиди мають дуже високу селективність до рецепторів вазопресину V1a і V2, як показано в таблиці. Це може мати основну перевагу для застосування як лікарського засобу, щоб уникнути побічних ефектів. Ці фізіологічні ефекти можна розглядати як небажані побічні ефекти у разі лікарських засобів, націлених на лікування захворювань центральної нервової системи. Тому бажано одержати лікарські засоби, що мають селективність до рецептора окситоцину в порівнянні з рецептором вазопресину.

Як використовують в даному описі, термін "нижчий алкіл" означає насичену прямоланцюгову або розгалужену групу, що містить від 1 до 7 атомів вуглецю, наприклад, метил, етил, пропіл, ізопропіл, н-бутил, ізобутил, 2-бутил, трет-бутил і тому подібне.

Термін "нижчий алкіл, заміщений гідроксигрупою", означає нижчу алкільну групу, як визначено вище, де щонайменше один атом водню заміщений гідроксигрупою.

Термін "циклоалкіл" означає циклічний алкільний ланцюг, що містить від 3 до 6 атомів вуглецю.

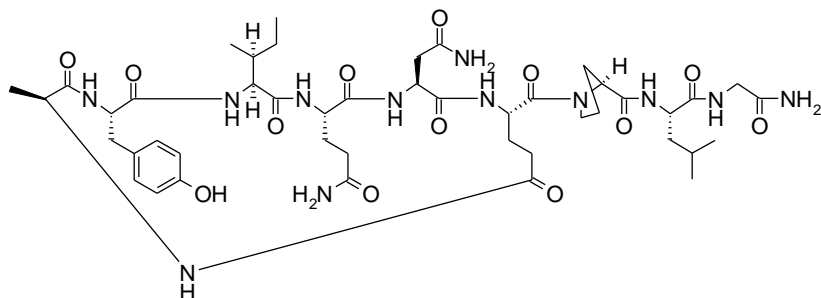
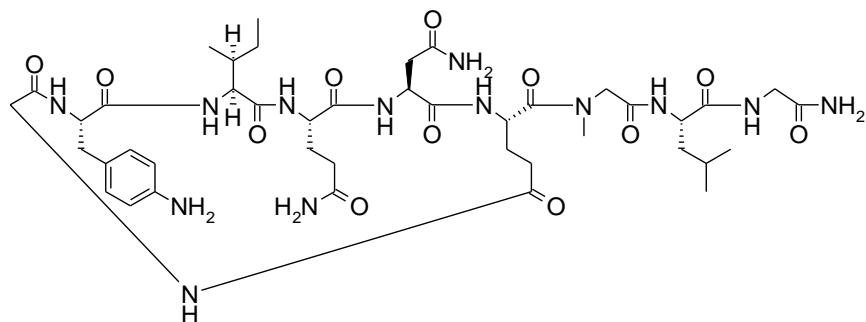
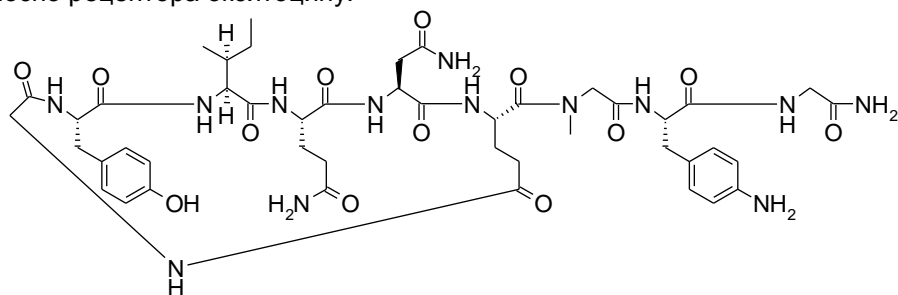
Як використовують в даному описі, термін "п'ятичленна ароматична гетероциклічна група" означає імідазолільну, тіофенільну, фуранільну, піролілільну, піразолільну, оксазолільну, оксадіазолільну або ізоксазолільну групу.

Термін "фармацевтично прийнятні кислотні адитивні солі" включає солі з неорганічними і органічними кислотами, такими як соляна кислота, азотна кислота, сірчана кислота, фосфорна кислота, лимонна кислота, мурашина кислота, фумарова кислота, малеїнова кислота, оцтова кислота, янтарна кислота, винна кислота, метансульфонова кислота, пара-толуолсульфонова кислота і тому подібне.

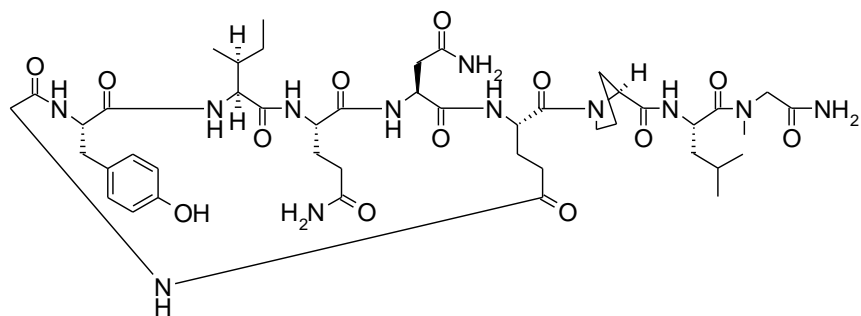
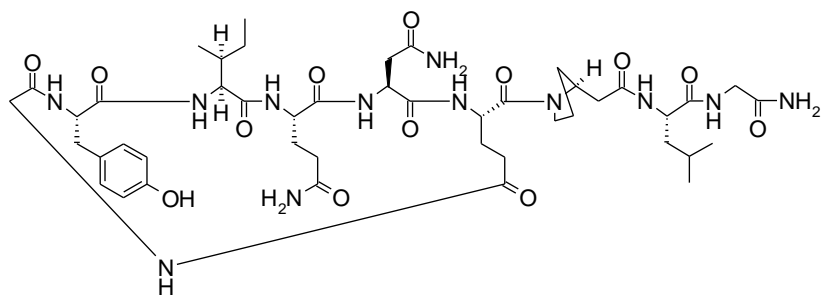
Переважаючим п'ятичленним гетероциклічним кільцем є імідазольне кільце.

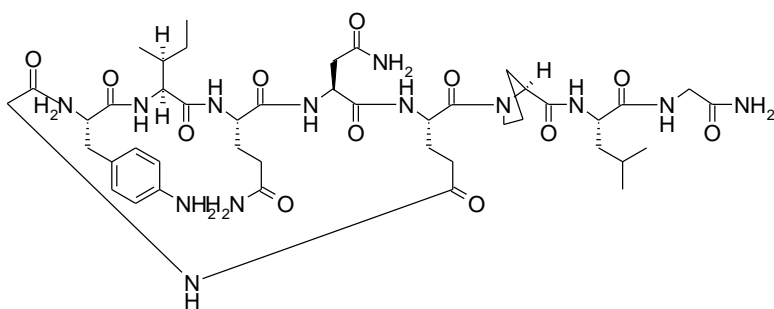
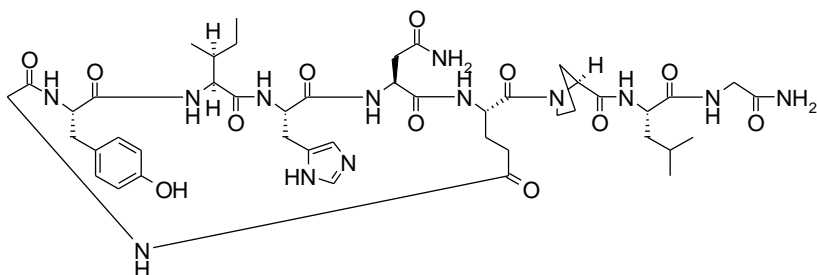
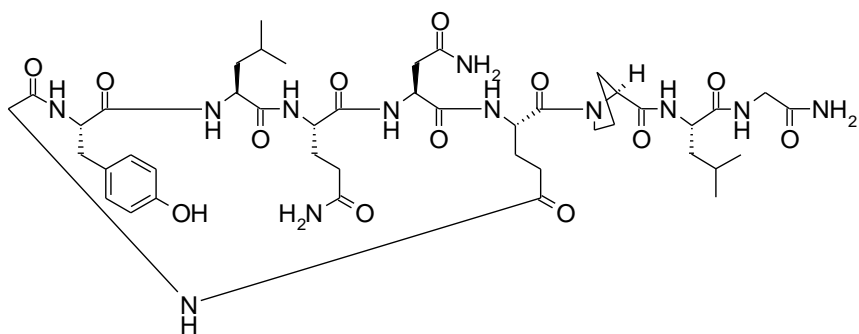
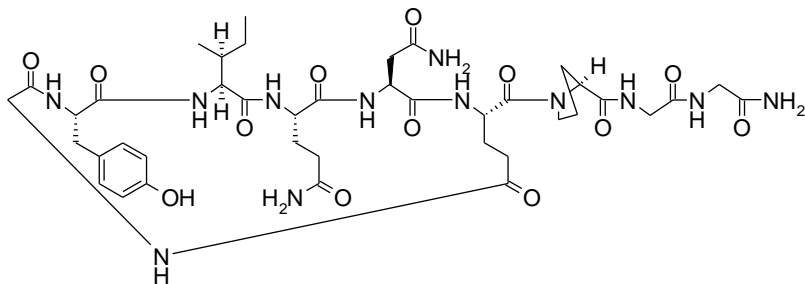
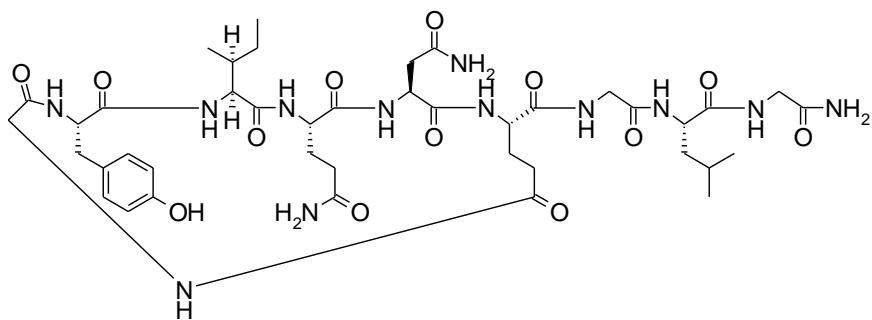
Переважні сполуки формули I, де o дорівнює 0, і m дорівнює 2.

Наведені нижче конкретні сполуки одержані і протестовані на їх агоністичну активність відносно рецептора окситоцину:

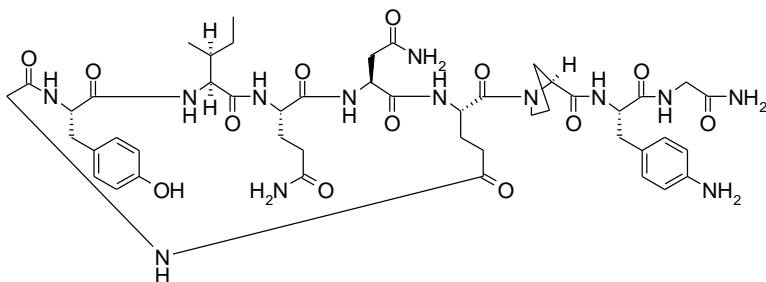


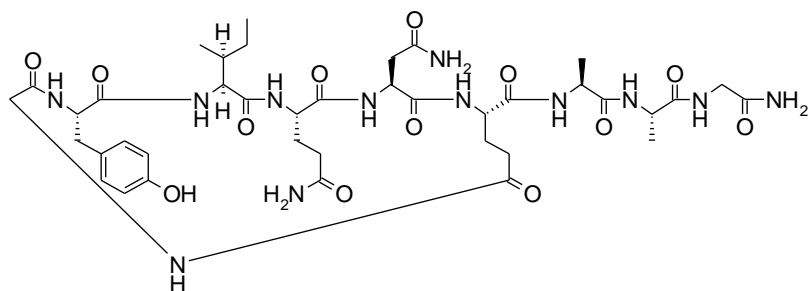
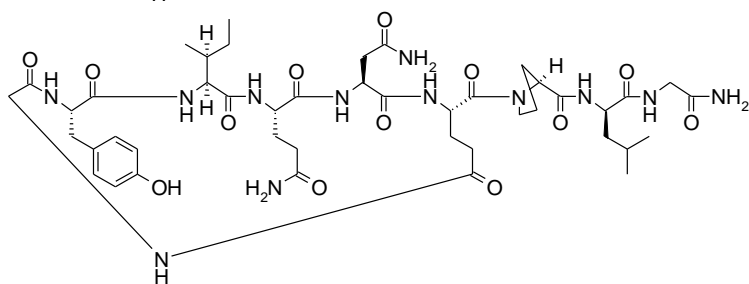
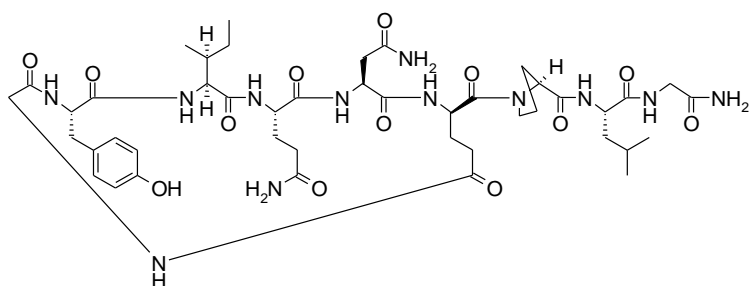
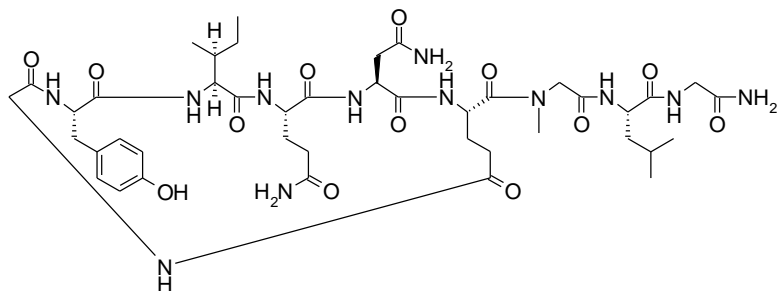
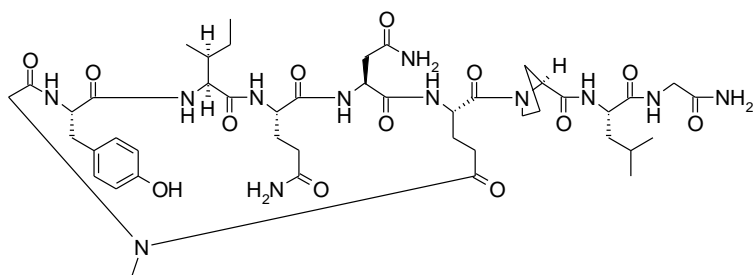
5



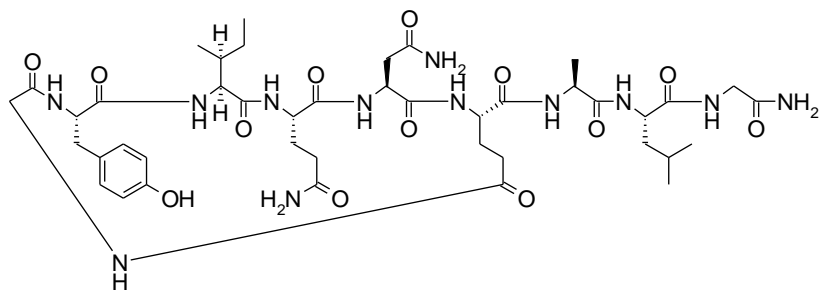


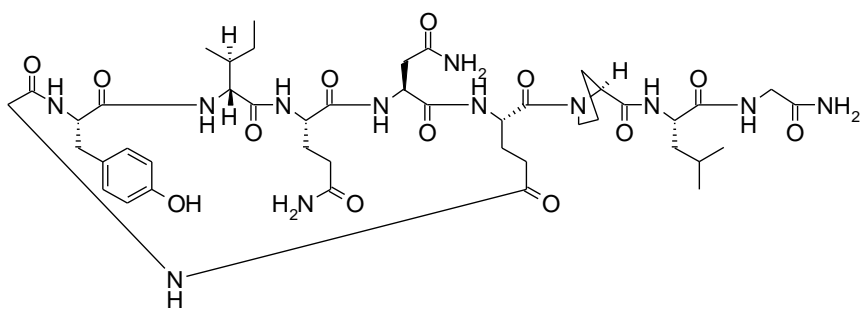
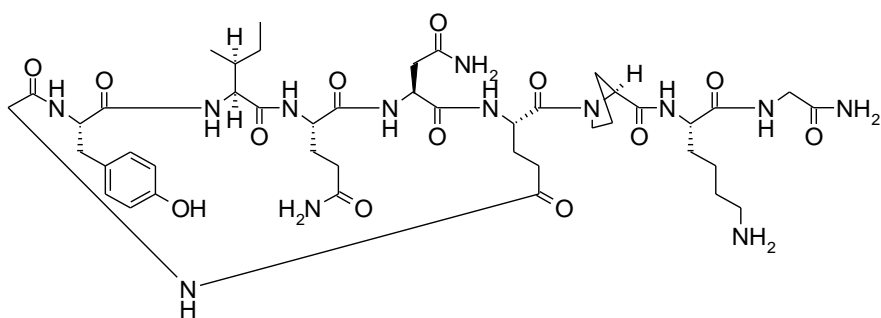
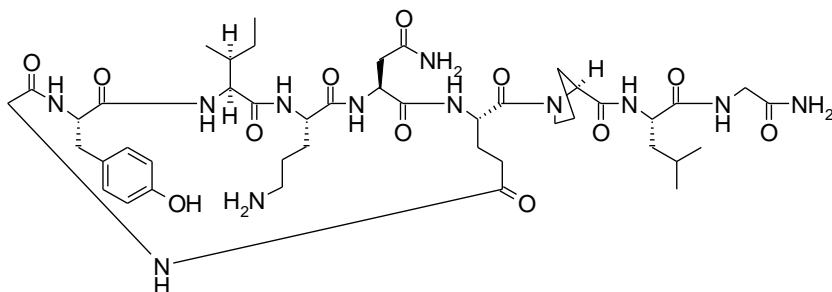
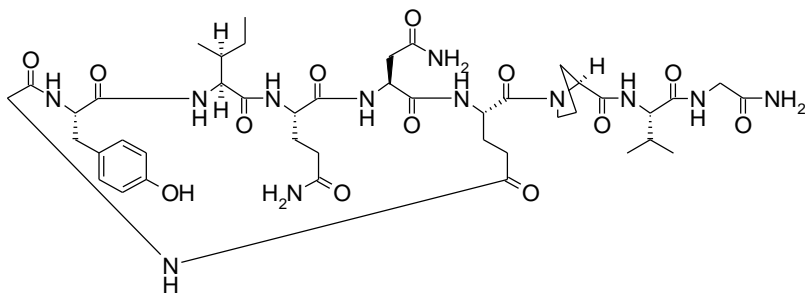
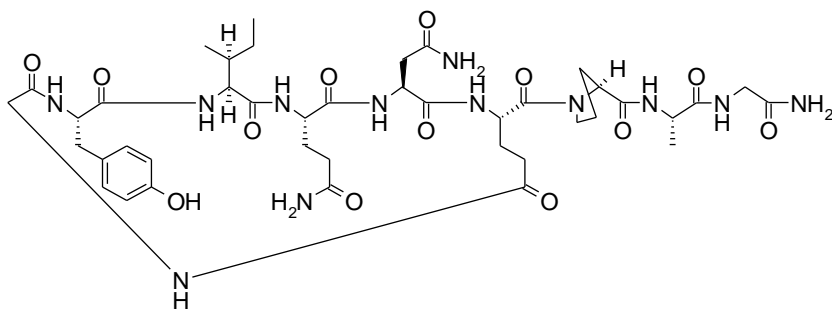
5



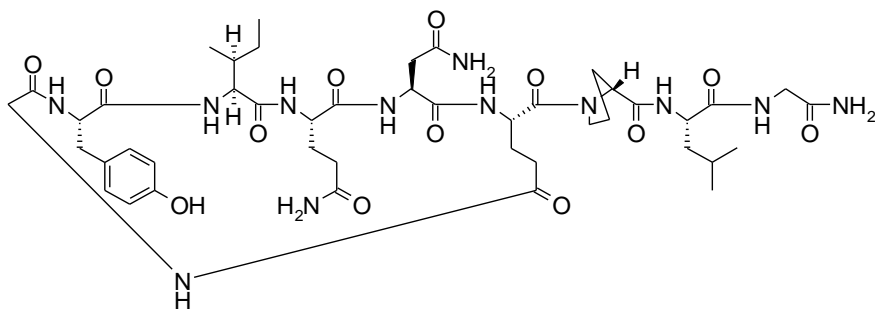


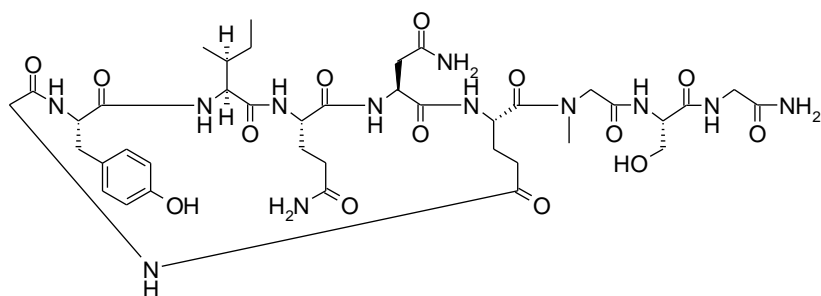
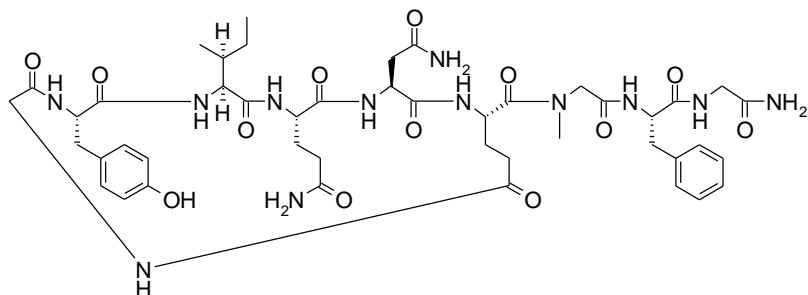
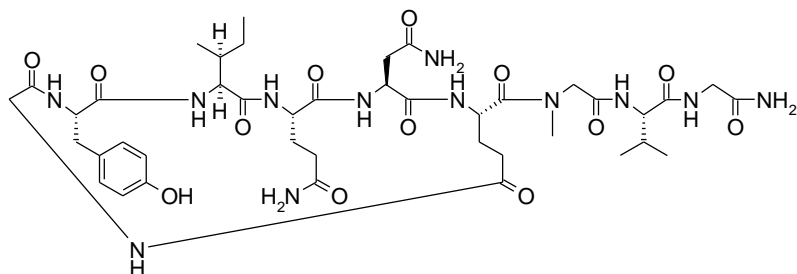
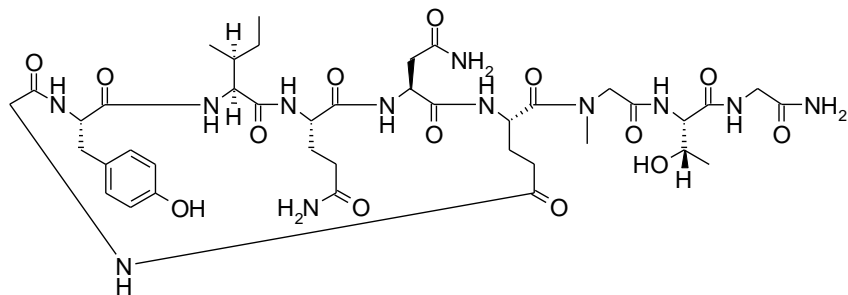
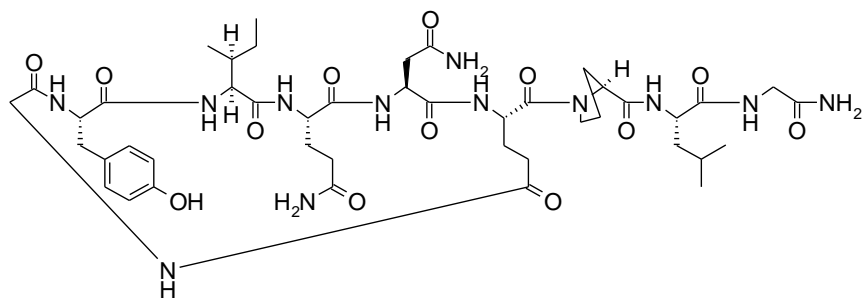
5



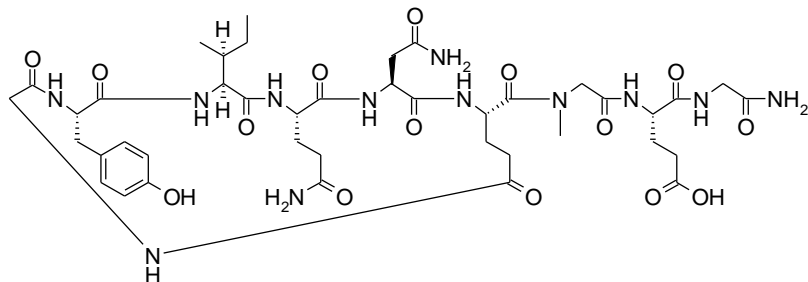


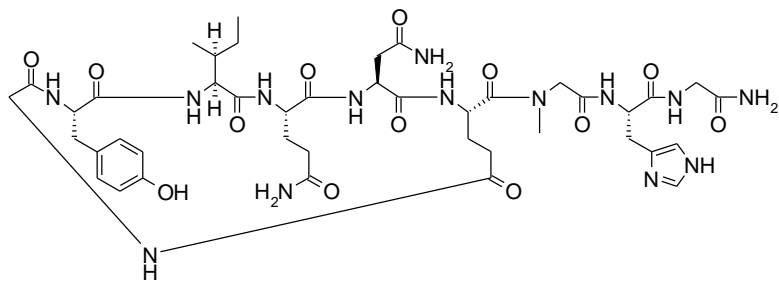
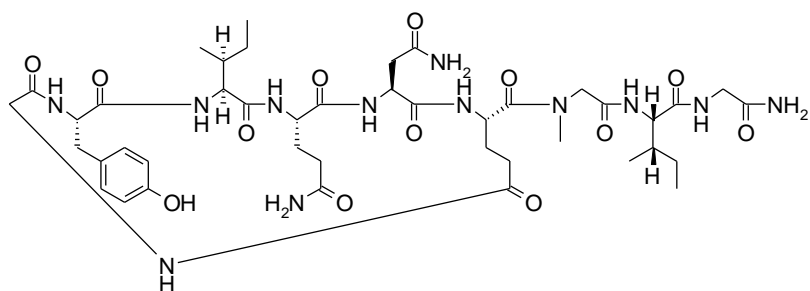
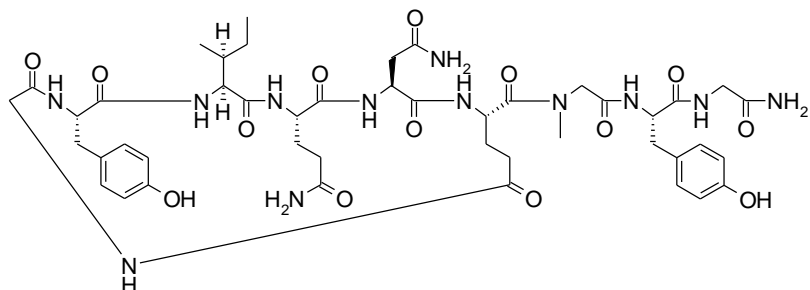
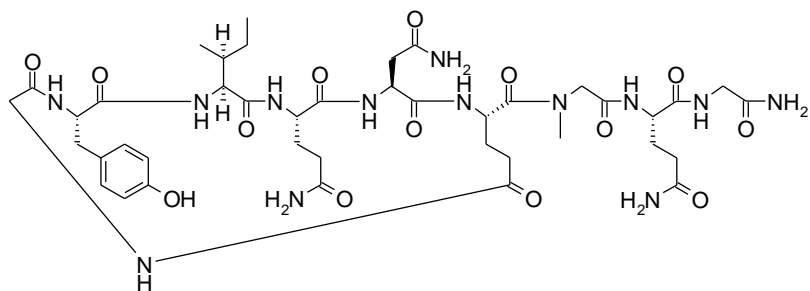
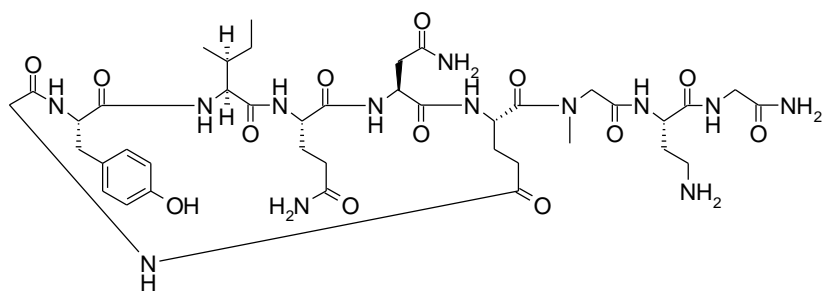
5



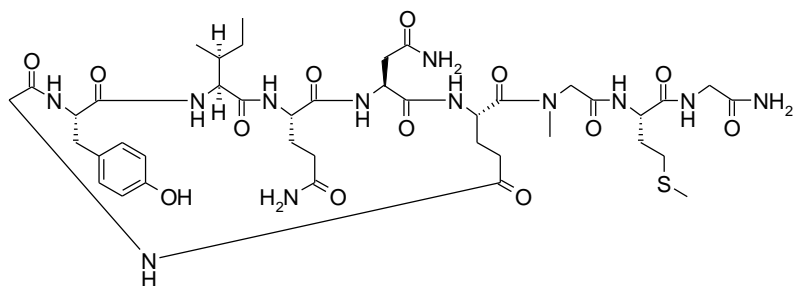


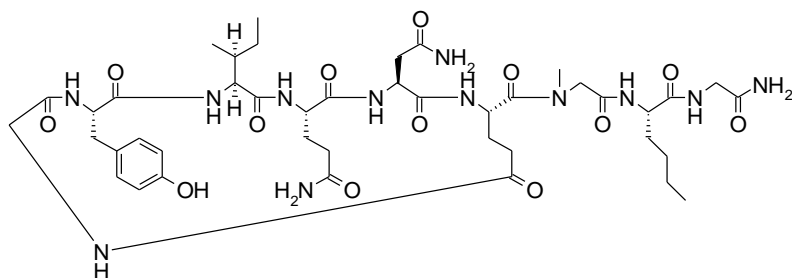
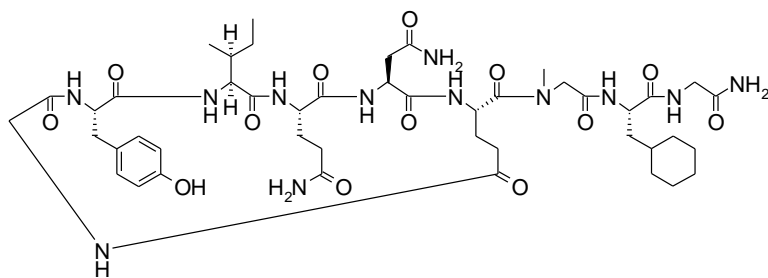
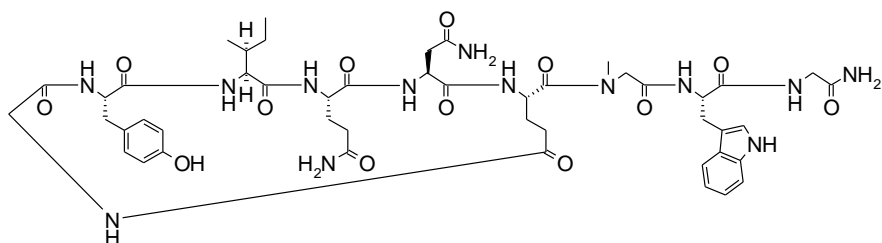
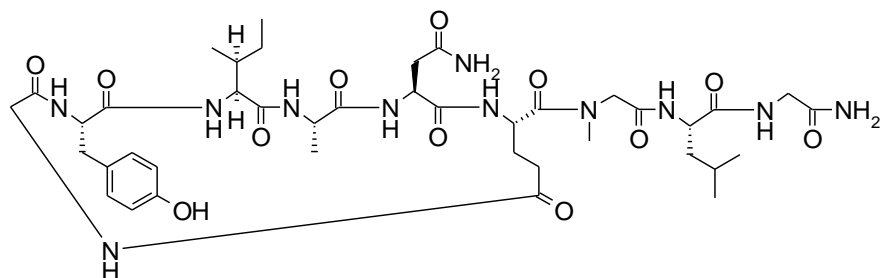
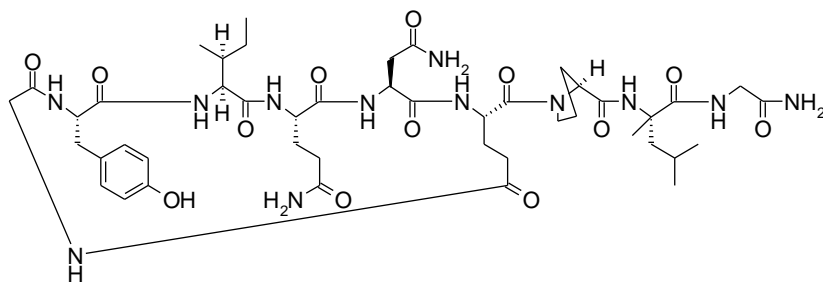
5



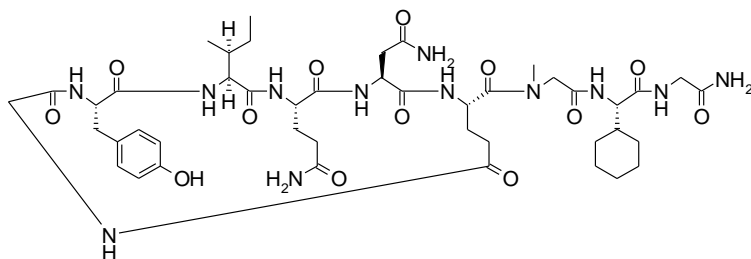


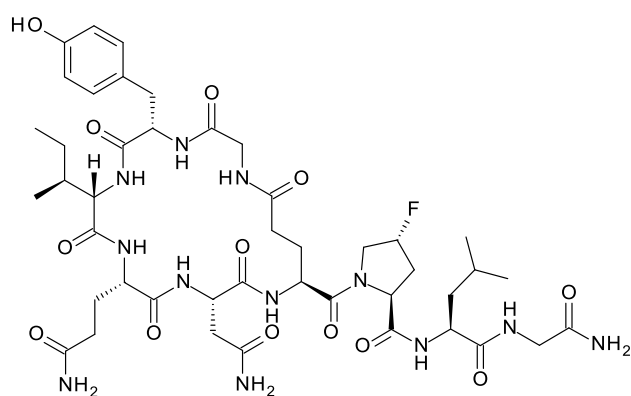
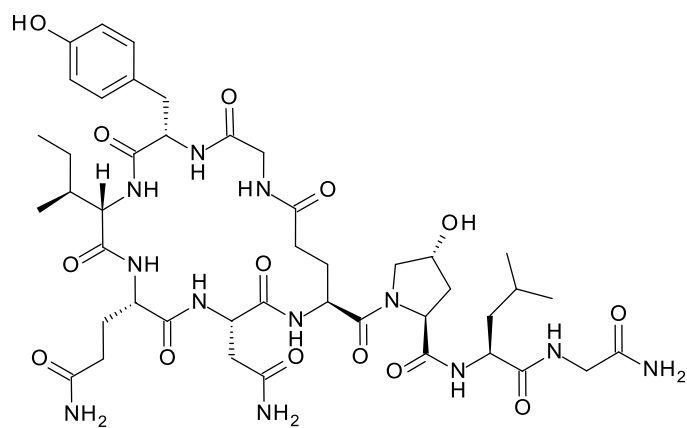
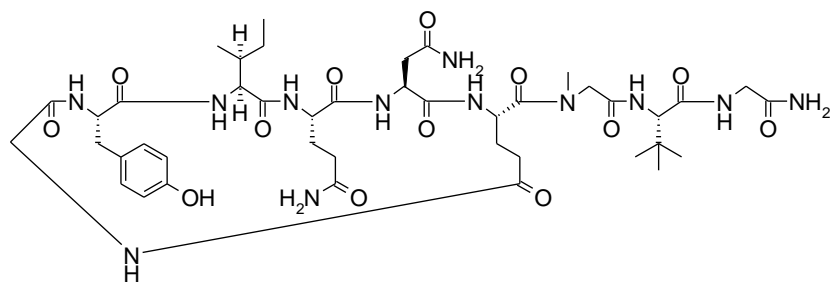
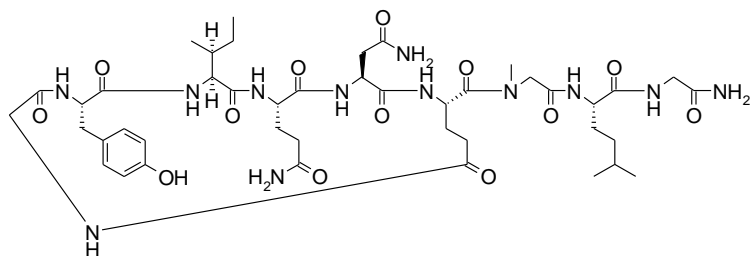
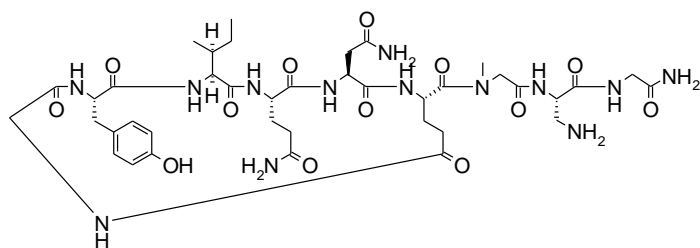
5

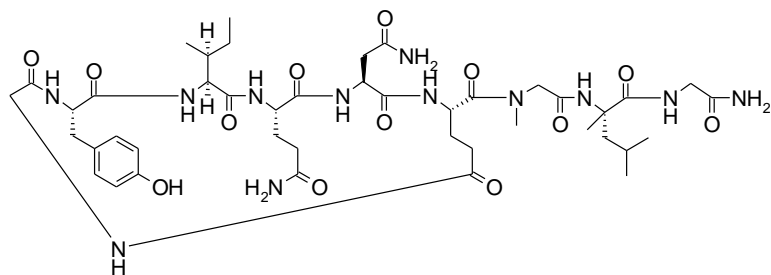
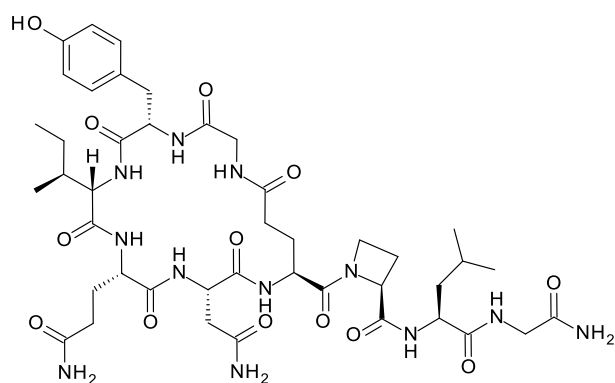
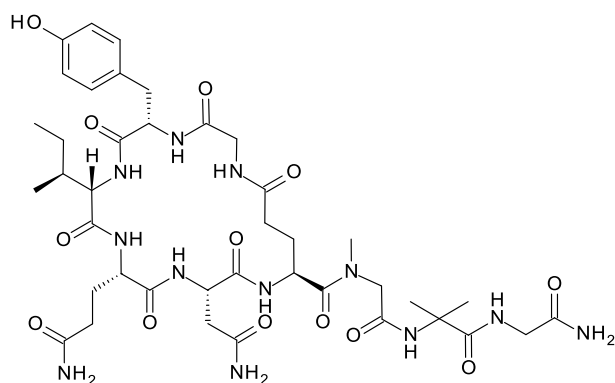
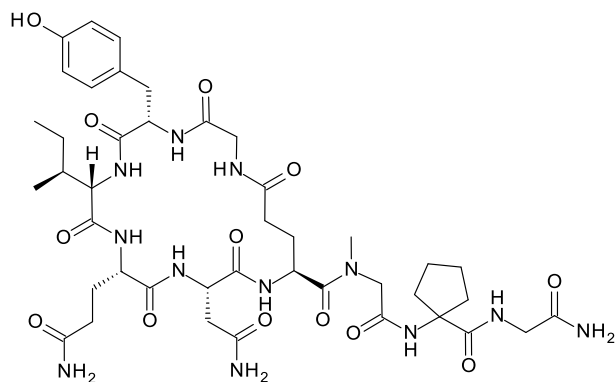
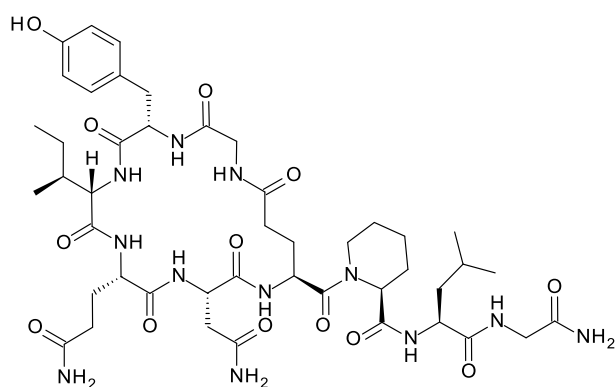


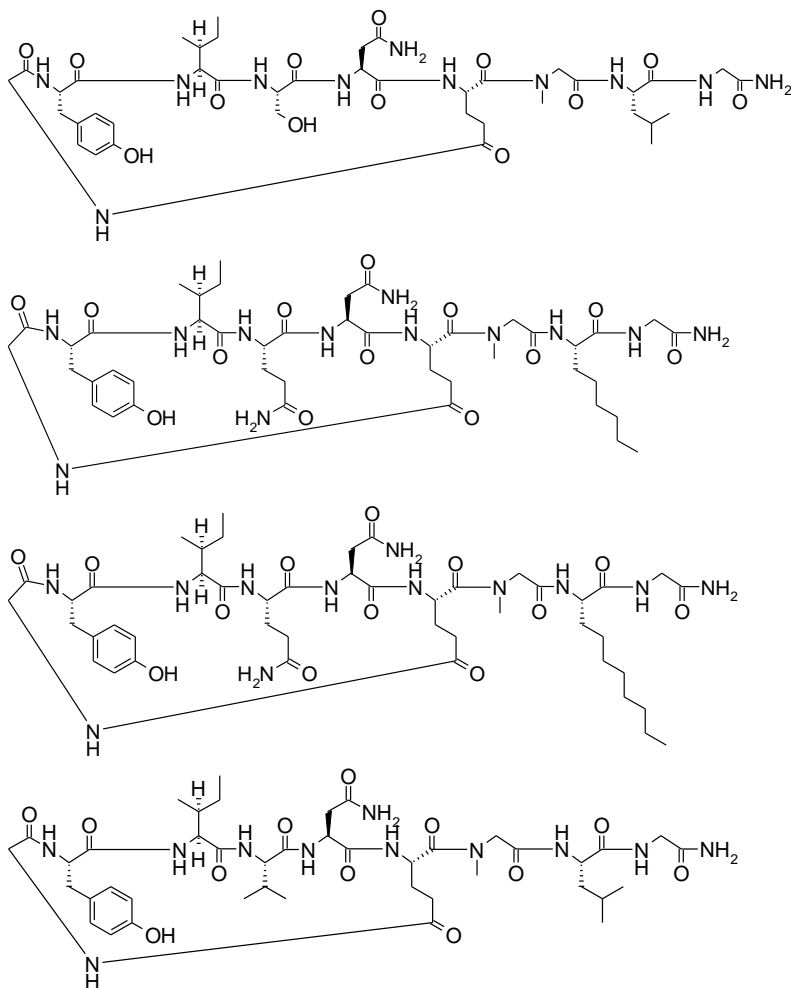


5









5 Одержання сполук формули I за даним винаходом може бути виконано в послідовних або конвергентних шляхах синтезу. Навички, необхідні для проведення реакції і очищення одержаних в результаті продуктів, відомі фахівцям в даній області техніки.

10 Сполуки за даним винаходу синтезували стандартними способами твердофазної хімії пептидів, використовуючи обидві методології, 9-флуоренілметоксикарбоніл (Fmoc; від англ. "9-fluorenylmethoxycarbonyl") і Вос. Реакції, що проводяться вручну, проводили при кімнатній температурі, тоді як пептидний синтез за допомогою мікрохвильового реактора проводили при підвищеній температурі.

Загальний опис синтезу:

15 Лінійні пептиди синтезували або вручну, або використовуючи мікрохвильову технологію за допомогою відомих в даній області техніки протоколів твердофазного синтезу (хімія Fmoc), посилання на які є, наприклад, в керівництві Kates and Albericio, Eds., "Solid Phase Synthesis: A practical guide", Marcel Decker, New York, Basel, 2000. В якості твердого носія використовували смолу TentaGel-S-RAM (0,24 мекв./г). Всі Fmoc-амінокислоти додавали в 10-кратному надлишку після активації НОБТ/НВТУ 1:1 (0,5 моль/л в диметилформаміді (ДМФ)) і 4 екв. DIPEA (2 моль/л в NMP). Відщеплення Fmoc було досягнуте за допомогою 20 % піперидину в ДМФ.

Відщеплення алілу (Allyl) /алілоксикарбонілу (Aloc) і замикання лактамного циклу:

25 Смоли обробляли вручну розчином 20 екв. фенілсилану в дихлорметані (ДХМ) і 0,05 екв. тетракис-трифенілфосфін-паладію протягом 30 хв. при кімнатній температурі (КТ). Дану операцію повторювали. Смоли промивали розчином 0,5 % дитіокарбамату натрію в ДМФ. Для утворення лактаму на гранулах до смоли знову додавали реагент активації і перемішували додатково протягом 8 г при КТ. Завершення замикання циклу перевіряли за допомогою нінгідринового тесту. Неочищені пептиди обробляли стандартними реагентами активації пептидів в ДМФ. Моніторинг замикання циклу проводили за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ).

30 Відщеплення:

До смоли додавали суміш для відщеплення, що складається з трифтороцтової кислоти (ТФО), триізопропілсилану (ТІС) і води (95/2,5/2,5) і перемішували протягом 1 г при КТ.

Відщеплений пептид осаджували в холодному ефірі (-18 °C). Пептид центрифугували, і залишок двічі промивали холодним ефіром. Залишок розчиняли в суміші вода/ацетонітрил і ліофілізували.

Очищення:

5 Пептиди очищали, використовуючи високоефективну рідинну хроматографію з оберненою фазою (ОФ-ВЕРХ), використовуючи колонку Reprospher 100 C18-t (100×4,6 мм, розмір частинок 5 мкм) як стаціонарну фазу і суміш вода/ацетонітрил як елюент (градієнт 1-50 % MeCN протягом 30 хв.). Фракції збирали і аналізували за допомогою рідинної хроматографії з мас-спектрометрією (РХ/МС). Зразки чистого продукту об'єднували і ліофілізували. Всі пептиди були
10 одержані у вигляді білих порошків, що мають чистоту більше 85 %. Ідентифікація продукту була одержана за допомогою мас-спектрометрії.

Всі стандартні амінокислоти придбали у фірмі CEM. Fmoc-Glu(Allyl)-OH, Fmoc-Phe(4-NHBoc)-OH, Fmoc-DAP(Aloc)-OH, Fmoc-DAB(Aloc)-OH і Fmoc-SAR-OH придбали у фірмі Bachem. Fmoc-β-Гомопролін придбали у фірмі Chem-Impax. Fmoc-β-Ala-OH і Mono-tBu-сукцинат
15 придбали у фірмі Sigma-Aldrich.

Докладний опис синтезу прикладу 6 наведено для додаткової ілюстрації умов синтезу.

Пептидний синтез:

Пептид синтезували, використовуючи мікрохвильову технологію CEM з періодами сполучення 5 хвилин на амінокислоту при підвищеній температурі (78 °C) і в 0,25-ммолярному
20 масштабі. Синтез виконують, використовуючи смолу TentGel-S RAM в якості твердого носія (0,24 мекв./г). Всі використовувані амінокислоти розчиняли в ДМФ до концентрації 0,2 моль. Для активації амінокислот використовували суміш НОВТ/НВТУ 1:1 (0,5 моль/л) 4 екв. і DIPEA 4 екв. Відщеплення Fmoc було досягнуте за допомогою піперидину в ДМФ (20 %) протягом 3 хв. Відщеплення Fmoc повторювали.

25 Розщеплювання Aloc-Allyl:

Смоли обробляли вручну розчином 20 екв. фенілсилану в дихлорметані (ДХМ) і 0,05 екв. тетракис-трифенілфосфін-паладію протягом 30 хв. при кімнатній температурі (КТ). Дану операцію повторювали. Смоли двічі промивали розчином 0,5 % дитіокарбамату натрію в ДМФ. Стадію відмивання повторювали з ДХМ.

30 Замикання циклу на гранулах:

До смоли знову додавали реагент сполучення (4 мл розчину 0,5 моль/л НОВТ/НВТУ (1:1) і 1 мл DIPEA (4 екв.) в ДМФ. Суспензію перемішували протягом приблизного 8 г при КТ. Смоли двічі промивали ДМФ і ДХМ. Завершення замикання циклу перевіряли за допомогою нінгідринового тесту.

35 Відщеплення від смоли:

До смоли додавали 10 мл суміші для відщеплення (ТФО; ТІС; вода (95/2,5/2,5)) і перемішували протягом 1 г при КТ. Відщеплений пептид осаджували в холодному ефірі (-18 °C). Пептид центрифугували, і осад двічі промивали холодним ефіром. Осад розчиняли в суміші H₂O/ацетонітрил і ліофілізували з одержанням 210 мг білого порошку.

40 Очищення:

Неочищений пептид очищали препаративною ВЕРХ на колонці Reprospher 100 C18-T (100×4,6 мм, розмір частинок 5 мкм). В якості системи елюювання використовували суміш 0,1 % ТФО/вода/ацетонітрил з градієнтом 0-50 % ацетонітрилу протягом 0-30 хв. Фракції збирали і перевіряли аналітичною ВЕРХ. Фракції, що містять чистий продукт, об'єднували і ліофілізували.

45 Було одержано 7,2 мг білого порошку.

Всі інші пептиди, перераховані нижче, синтезували відповідно.

Скорочення:

Fmoc: 9-флуоренілметоксикарбоніл

Gly: гліцин

50 His(Trt): тритил-захищений гістидин

Sar: саркозин

Glu: глутамінова кислота

Asn(Trt): тритил-захищений аспарагін

Gln(Trt): тритил-захищений глутамін

55 Ile: ізолейцин

Tyr: тирозин

Leu: лейцин

Pro: пролін

Ala: аланін

60 Orn: орнітин

Thr: треонін

Val: валін

Dab: діаміномасляна кислота

Dap: діамінопропіонова кислота

5 D-Pro: D-пролін

MeLeu: -Метил-лейцин

Cha: -циклогексил-аланін

Nle: норлейцин

Chg: циклогексилгліцин

10 HoLeu: гомолейцин

Tle: трет-бутилгліцин

Hyp: транс-4-гідрокси-L-пролін

FluoroPro: транс-4-фтор-L-пролін

Hpg: гомопролін

15 Aib: аміноізомасляна кислота

Aze: (S)-N-азетидин-2-карбонова кислота

Ser: серин

2AOC-OH: L-амінооктанова кислота

2ADC-OH: L-амінодеканова кислота

20 cyLeu: циклолейцин

Aloc: алілоксикарбоніл

HOBT: N-гідроксибензотриазол

HBTU: O-бензотриазол-N, N, N', N'-тетраметил-уронію гексафторфосфат

DMF: N,N-диметилформамід

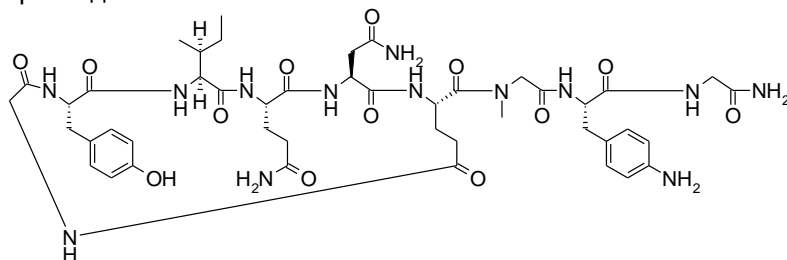
25 NMP: N-метилпіролідон

DIPEA: N,N-діізопропіламін

DXM: дихлорметан

MeCN: ацетонітрил

Приклад 1

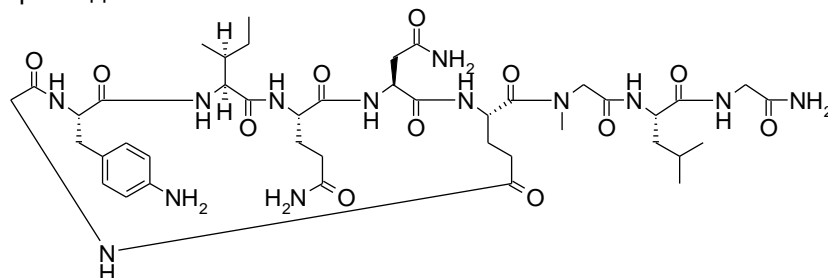


30

Використовували наступні амінокислоти: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Phe(4-NHBoc)-OH, Fmoc-SAR-OH, Fmoc-Glu(Allyl)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH.

МС ($M+H^+$): очікуване 994,1; спостережуване 994,9

Приклад 2

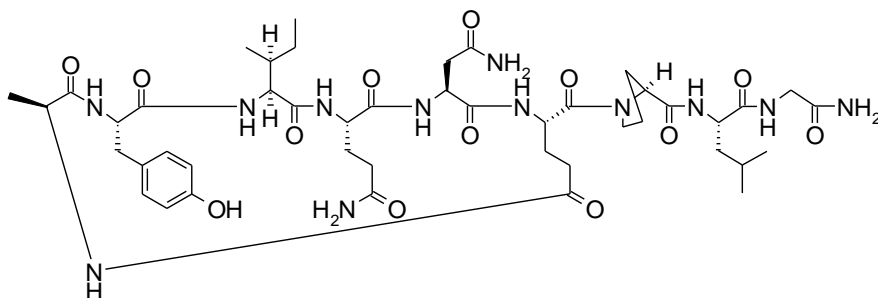


35

Використовували наступні амінокислоти: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-SAR-OH, Fmoc-Glu(Allyl)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Phe(4-NHBoc)-OH.

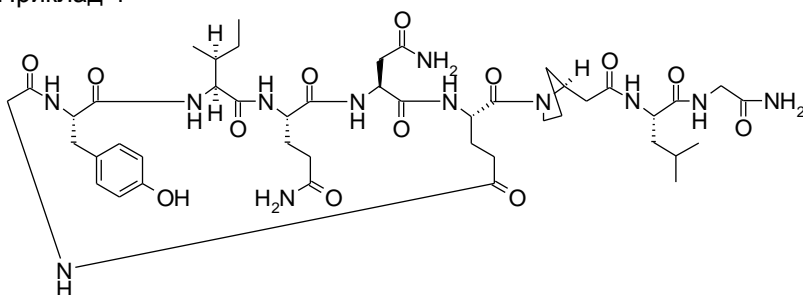
МС ($M+H^+$): очікуване 944,1; спостережуване 944,4

Приклад 3



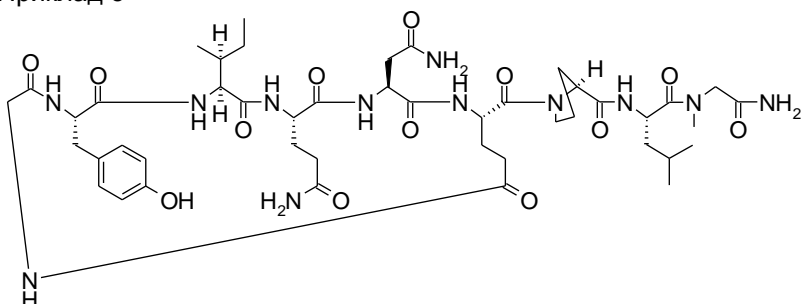
Використовували наступні амінокислоти: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Glu(Allyl)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Ala-OH.

5 МС ($M+H^+$): очікуване 985,1; спостережуване 986,3
Приклад 4



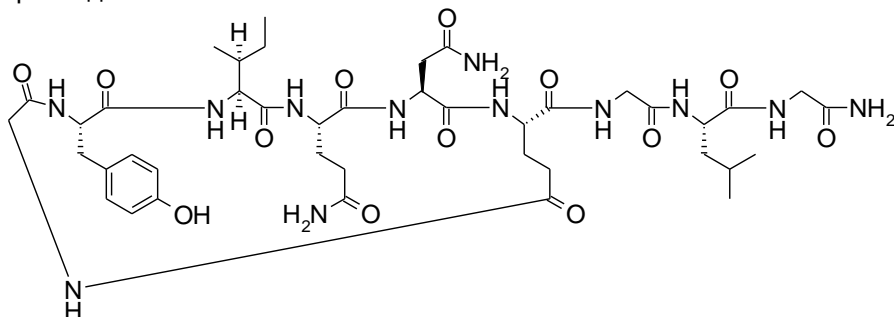
Використовували наступні амінокислоти: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-β-Pro-OH, Fmoc-Glu(Allyl)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH.

10 МС ($M+H^+$): очікуване 984,5; спостережуване 984,9
Приклад 5



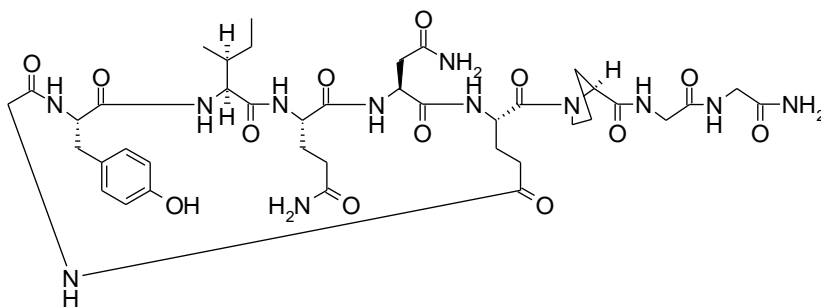
Використовували наступні амінокислоти: Fmoc-SAR-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Glu(Allyl)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH.

15 МС ($M+H^+$): очікуване 984,5; спостережуване 984,9
Приклад 6



Використовували наступні амінокислоти: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Glu(Allyl)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH.

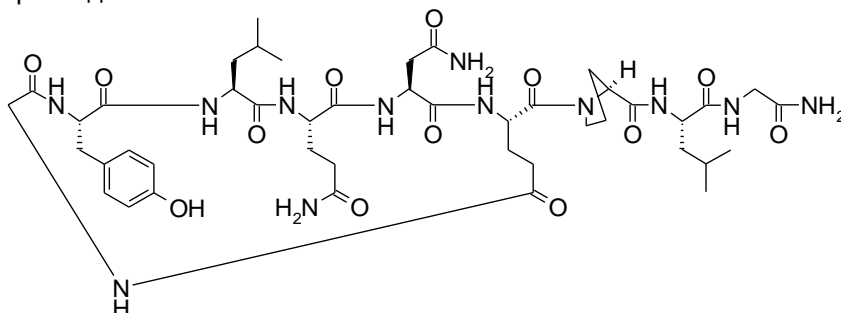
20 МС ($M+H^+$): очікуване 931,0; спостережуване 932,0
Приклад 7



Використовували наступні амінокислоти: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Glu(Allyl)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH.

МС ($M+H^+$): очікуване 914,9; спостережуване 915,9

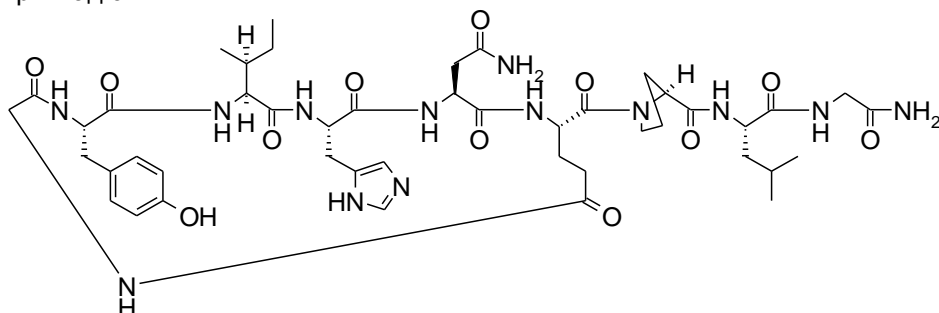
5 Приклад 8



Використовували наступні амінокислоти: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Glu(Allyl)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH.

МС ($M+H^+$): очікуване 971,1; спостережуване 971,5

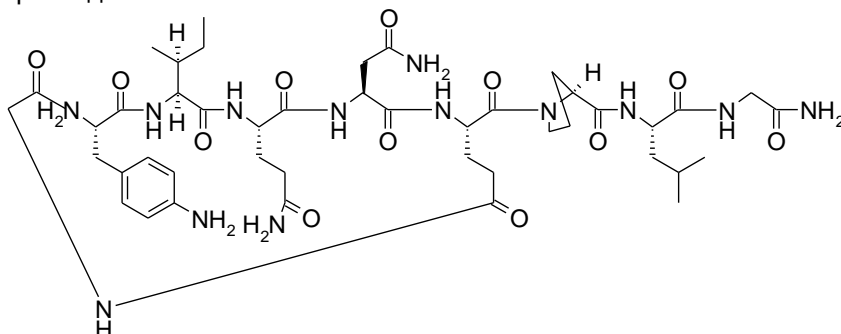
10 Приклад 9



Використовували наступні амінокислоти: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Glu(Allyl)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH.

МС ($M+H^+$): очікуване 980,1; спостережуване 981,5

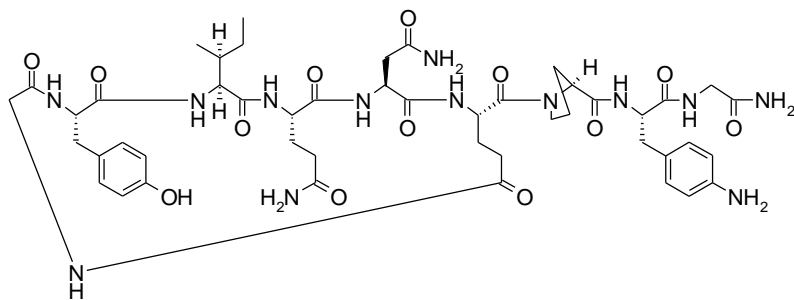
15 Приклад 10



Використовували наступні амінокислоти: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Glu(Allyl)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Phe(4-NHBoc)-OH.

МС ($M+H^+$): очікуване 970,1; спостережуване 970,8

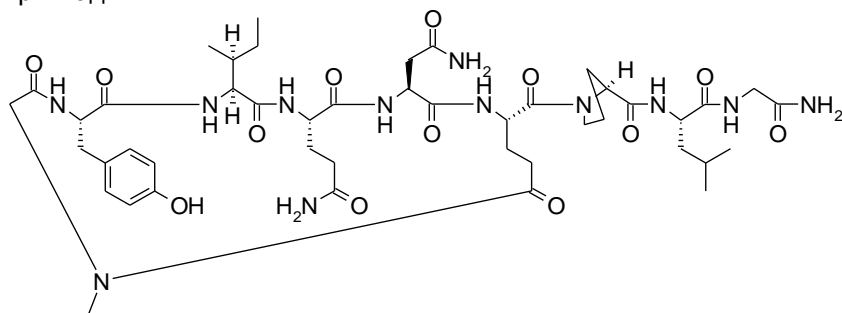
20 Приклад 11



Використовували наступні амінокислоти: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Phe(4-NHBoc)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Glu(Allyl)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH.

МС ($M+H^+$): очікуване 1020,0; спостережуване 1021,0

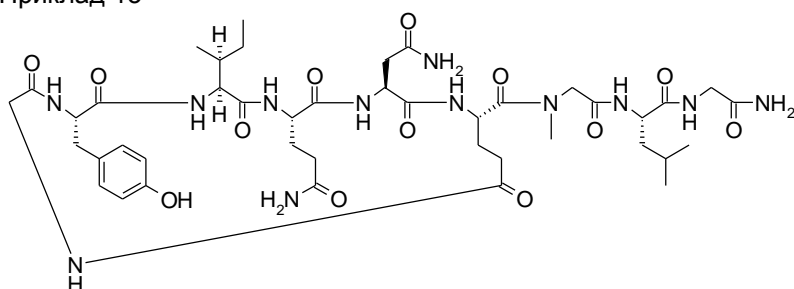
5 Приклад 12



Використовували наступні амінокислоти: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Glu(Allyl)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-SAR-OH.

МС ($M+H^+$): очікуване 985,1; спостережуване 985,4

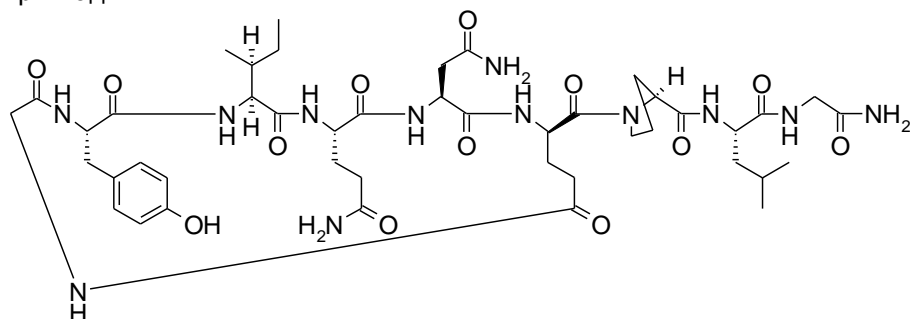
10 Приклад 13



Використовували наступні амінокислоти: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-SAR-OH, Fmoc-Glu(Allyl)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH.

МС ($M+H^+$): очікуване 945,1; спостережуване 945,4

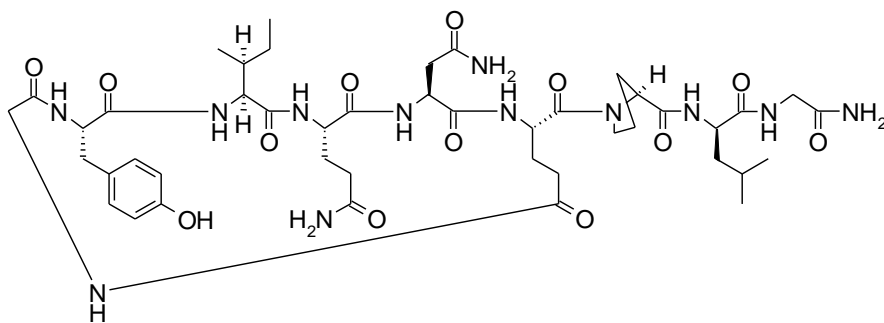
15 Приклад 14



Використовували наступні амінокислоти: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-D-Glu(Allyl)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH.

МС ($M+H^+$): очікуване 971,1; спостережуване 971,5

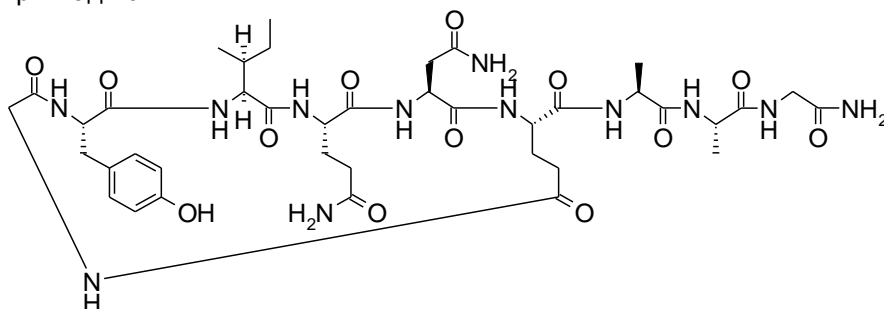
20 Приклад 15



Використовували наступні амінокислоти: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-D-Leu-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Glu(Allyl)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH.

МС ($M+H^+$): очікуване 971,1; спостережуване 971,3

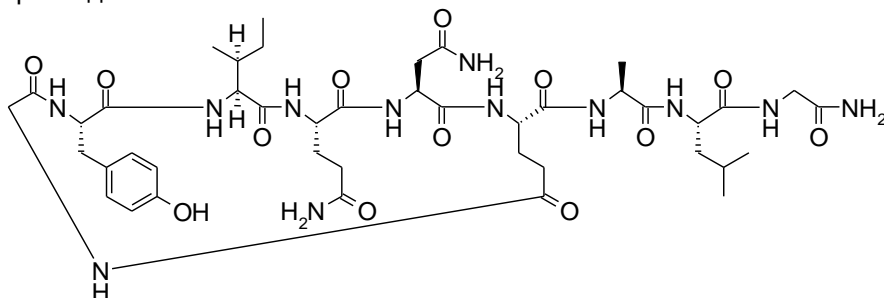
5 Приклад 16



Використовували наступні амінокислоти: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Glu(Allyl)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH.

МС ($M+H^+$): очікуване 902,9; спостережуване 903,8

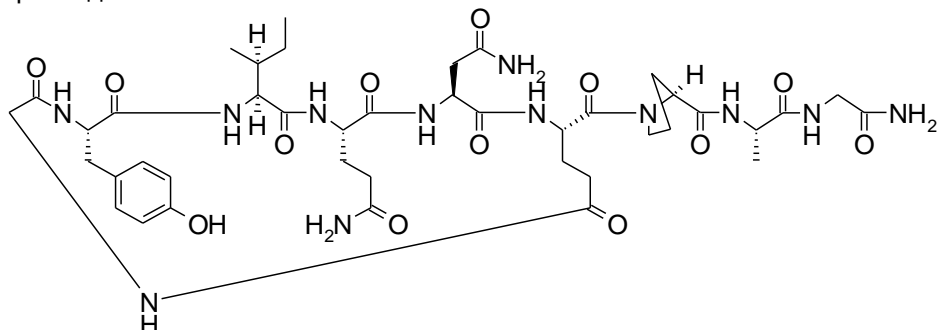
10 Приклад 17



Використовували наступні амінокислоти: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Glu(Allyl)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH.

МС ($M+H^+$): очікуване 944,5; спостережуване 945,0

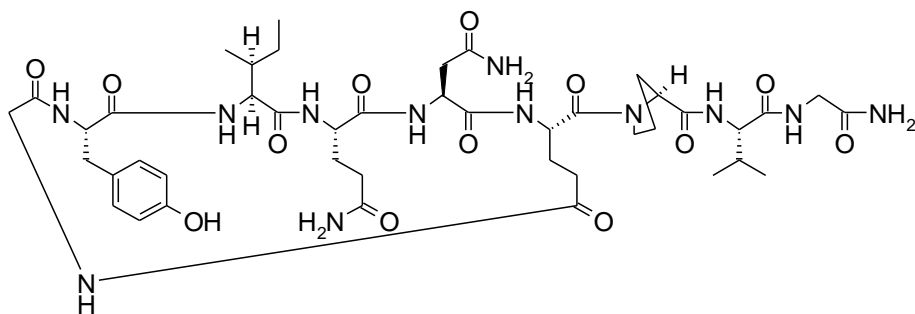
15 Приклад 18



Використовували наступні амінокислоти: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Glu(Allyl)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH.

МС ($M+H^+$): очікуване 928,9; спостережуване 929,7

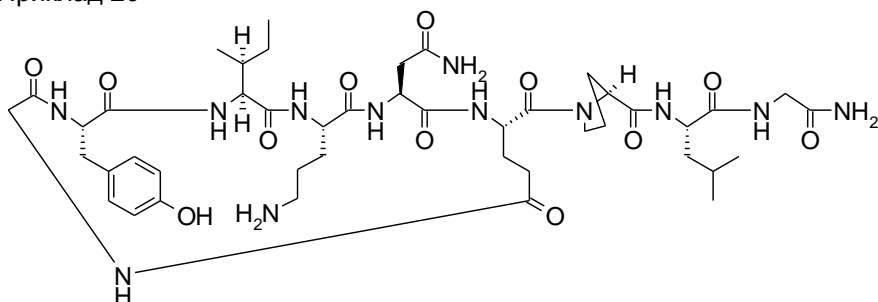
20 Приклад 19



Використовували наступні амінокислоти: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Glu(Allyl)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH.

МС ($M+H^+$): очікуване 957,1; спостережуване 957,8

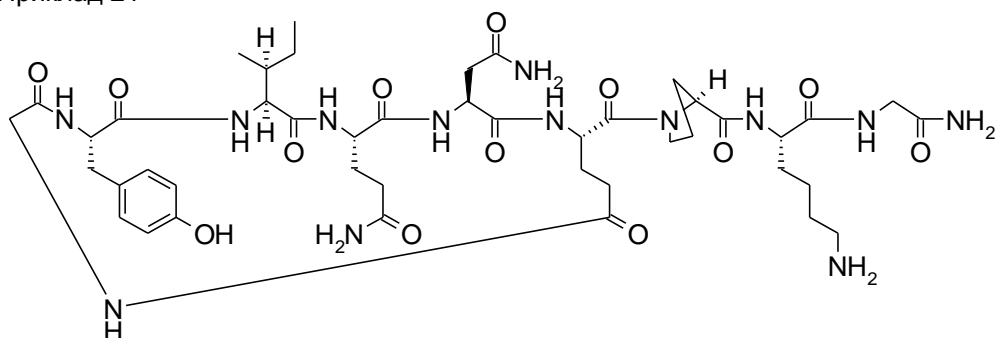
5 Приклад 20



Використовували наступні амінокислоти: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Glu(Allyl)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Orn(Boc)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH.

МС ($M+H^+$): очікуване 957,1; спостережуване 957,9

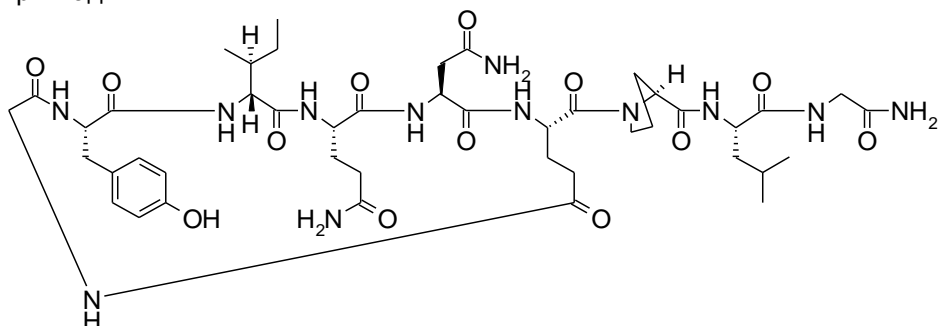
10 Приклад 21



Використовували наступні амінокислоти: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Glu(Allyl)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH.

МС ($M+H^+$): очікуване 986,1; спостережуване 986,9

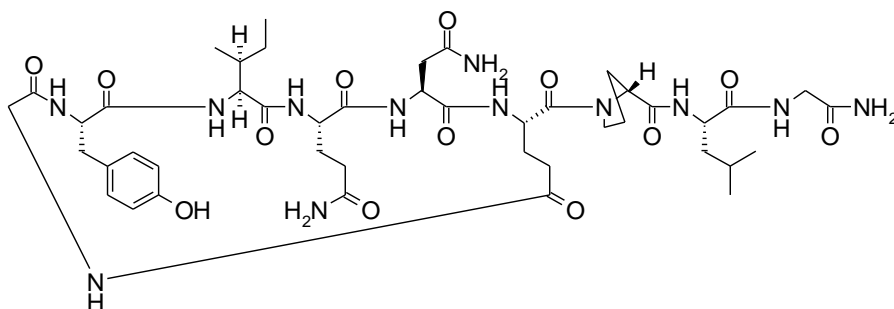
15 Приклад 22



Використовували наступні амінокислоти: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Glu(Allyl)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-D-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH.

МС ($M+H^+$): очікуване 971,1; спостережуване 971,5

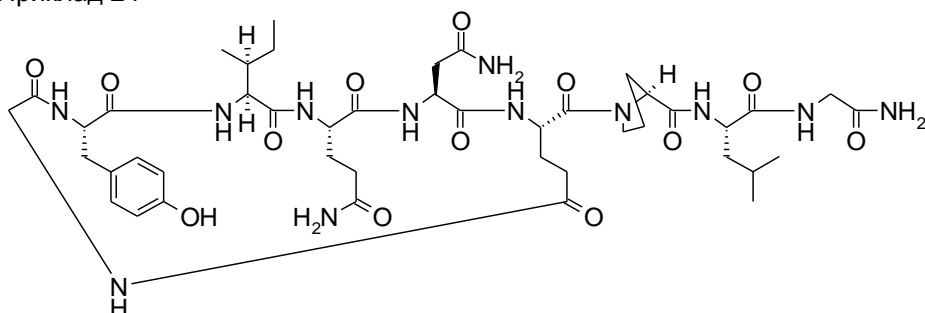
20 Приклад 23



Використовували наступні амінокислоти: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-D-Pro-OH, Fmoc-Glu(Allyl)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH.

МС ($M+H^+$): очікуване 971,1; спостережуване 971,5

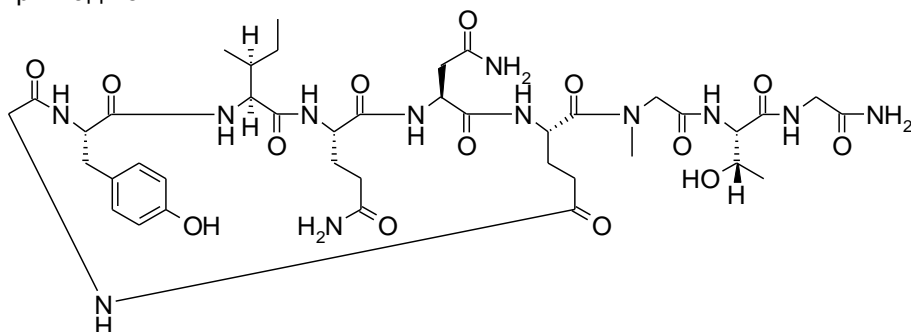
5 Приклад 24



Використовували наступні амінокислоти: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Glu(Allyl)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH.

МС ($M+H^+$): очікуване 971,1; спостережуване 971,8

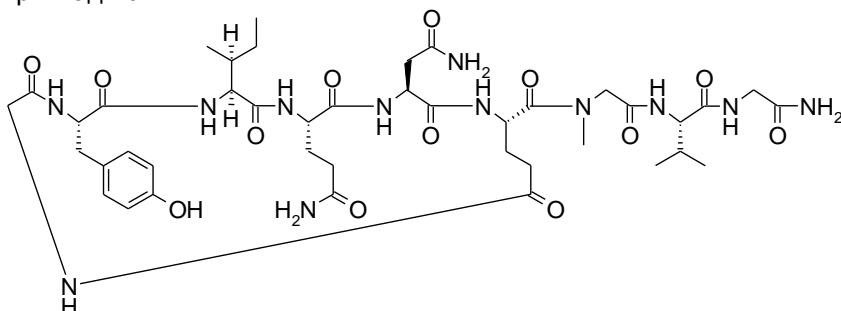
10 Приклад 25



Використовували наступні амінокислоти: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Sar-OH, Fmoc-Glu(Allyl)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH.

МС ($M+H^+$): очікуване 932,9; спостережуване 933,6

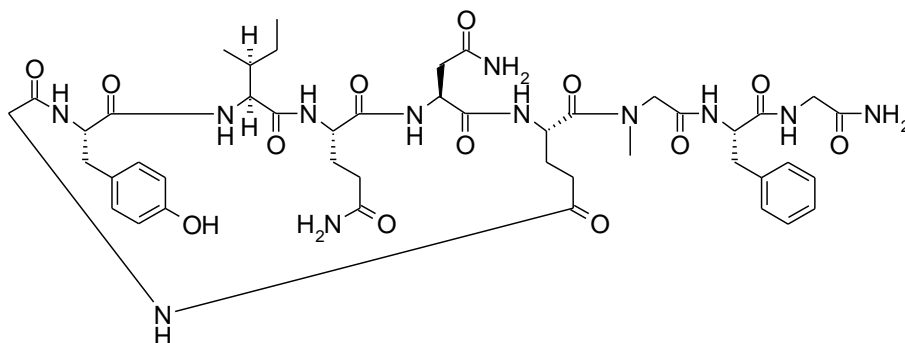
15 Приклад 26



Використовували наступні амінокислоти: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Sar-OH, Fmoc-Glu(Allyl)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH.

МС ($M+H^+$): очікуване 931,0; спостережуване 931,6.

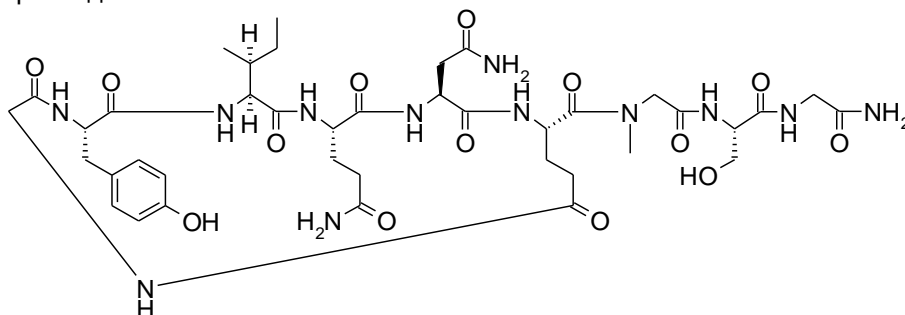
20 Приклад 27



Використовували наступні амінокислоти: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Sar-OH, Fmoc-Glu(Allyl)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH.

МС ($M+H^+$): очікуване 979,0; спостережуване 979,5

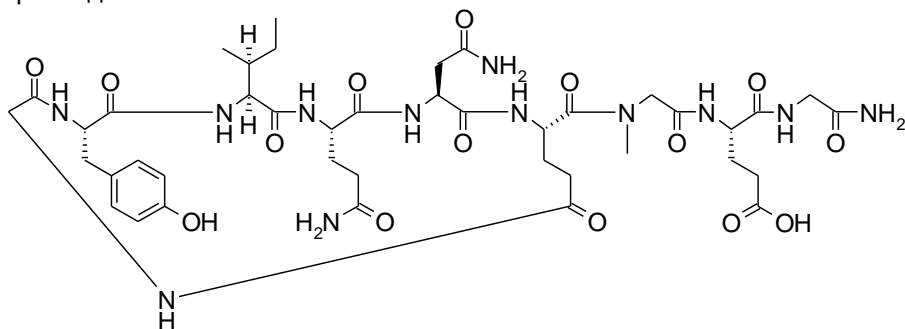
5 Приклад 28



Використовували наступні амінокислоти: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Sar-OH, Fmoc-Glu(Allyl)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH.

МС ($M+H^+$): очікуване 918,9; спостережуване 919,7

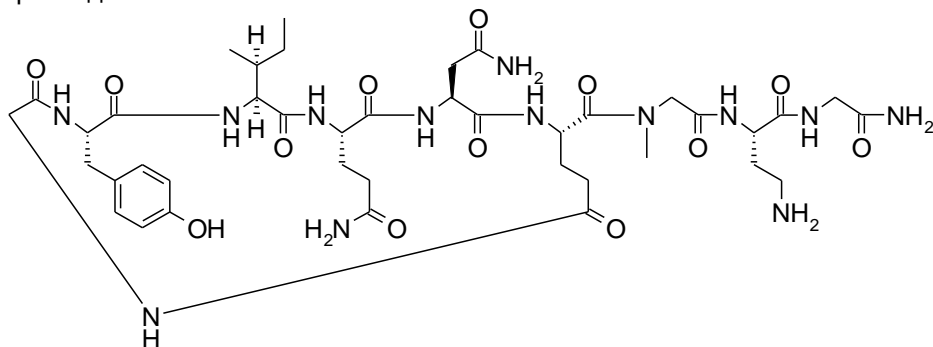
10 Приклад 29



Використовували наступні амінокислоти: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Sar-OH, Fmoc-Glu(Allyl)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH.

МС ($M+H^+$): очікуване 960,9; спостережуване 962,1

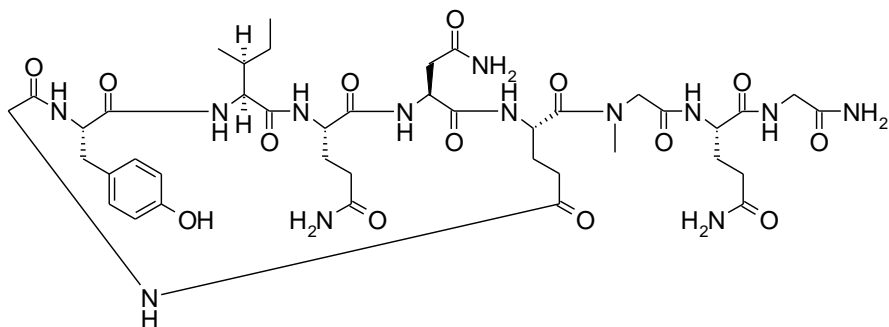
15 Приклад 30



Використовували наступні амінокислоти: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Dab(Boc)-OH, Fmoc-Sar-OH, Fmoc-Glu(Allyl)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH.

МС ($M+H^+$): очікуване 932,0; спостережуване 932,6

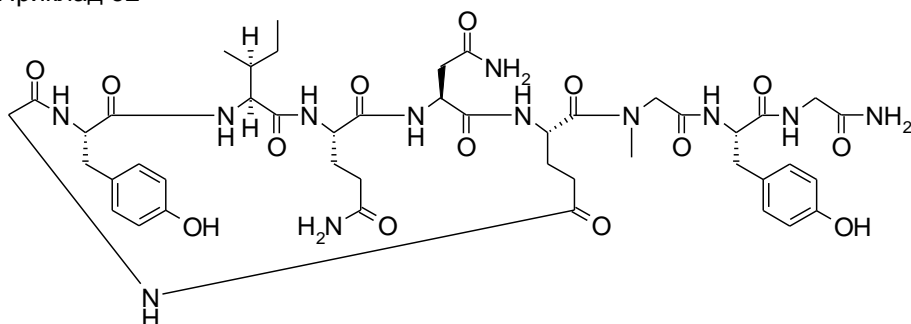
20 Приклад 31



Використовували наступні амінокислоти: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Sar-OH, Fmoc-Glu(Allyl)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH.

МС ($M+H^+$): очікуване 960,0; спостережуване 960,9

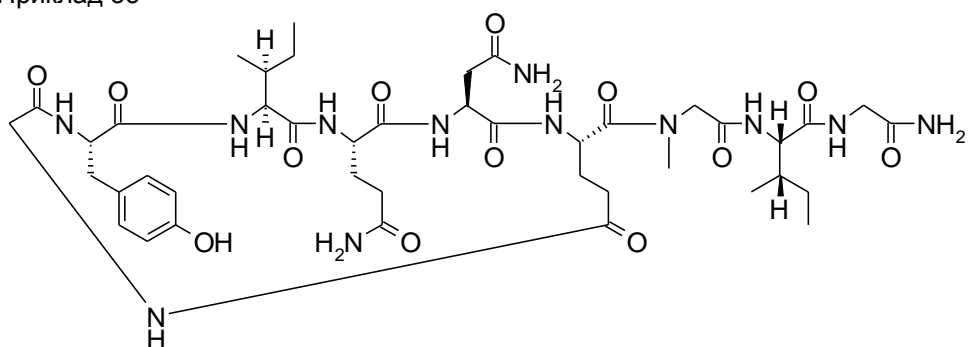
5 Приклад 32



Використовували наступні амінокислоти: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Sar-OH, Fmoc-Glu(Allyl)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH.

МС ($M+H^+$): очікуване 995,0; спостережуване 996,0

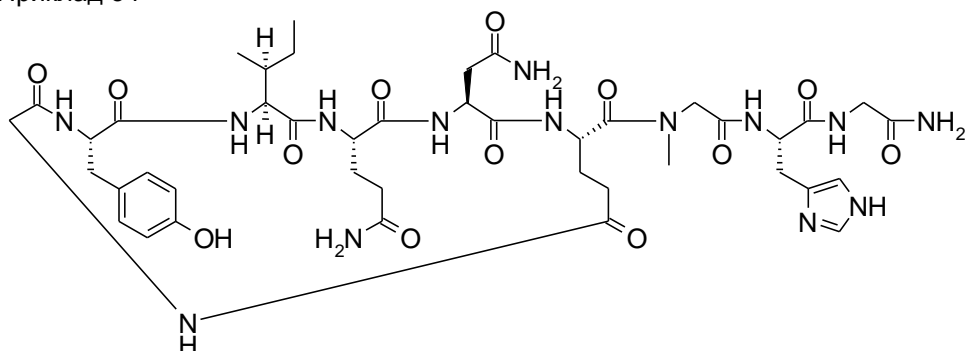
10 Приклад 33



Використовували наступні амінокислоти: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Sar-OH, Fmoc-Glu(Allyl)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH.

МС ($M+H^+$): очікуване 945,0; спостережуване 945,0

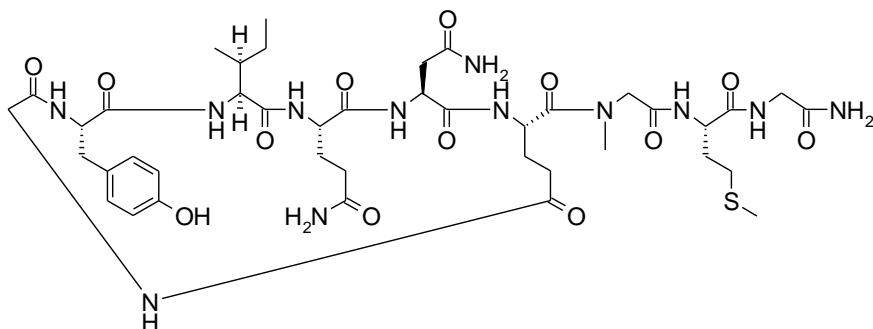
15 Приклад 34



Використовували наступні амінокислоти: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Sar-OH, Fmoc-Glu(Allyl)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH.

МС ($M+H^+$): очікуване 969,0; спостережуване 969,7

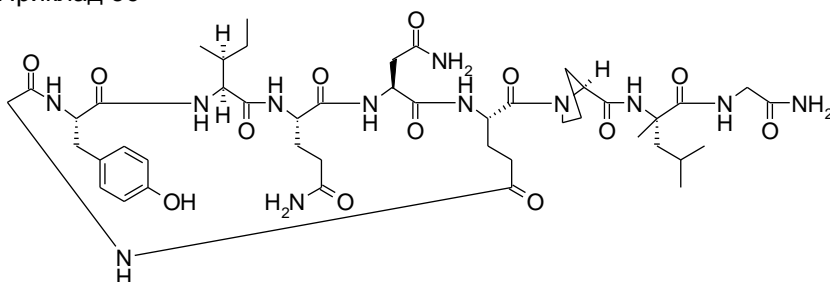
20 Приклад 35



Використовували наступні амінокислоти: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Sar-OH, Fmoc-Glu(Allyl)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH.

МС ($M+H^+$): очікуване 995,0; спостережуване 996,0

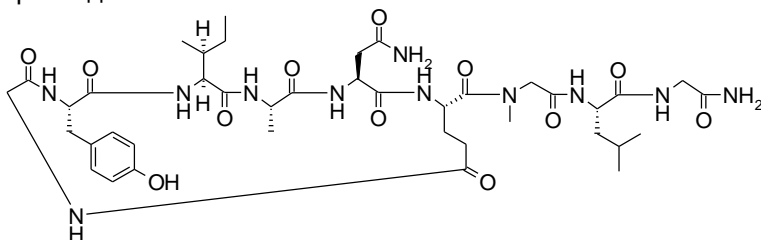
5 Приклад 36



Використовували наступні амінокислоти: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-MeLeu-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Glu(Allyl)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH.

МС ($M+H^+$): очікуване 955,1; спостережуване 985,1

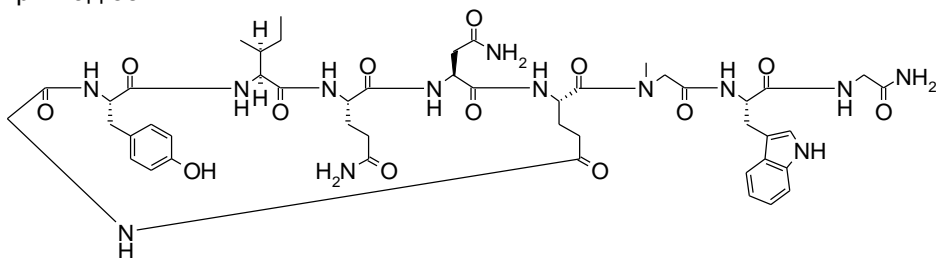
10 Приклад 37



Використовували наступні амінокислоти: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Sar-OH, Fmoc-Glu(Allyl)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH.

МС ($M+H^+$): очікуване 888,0; спостережуване 888,6

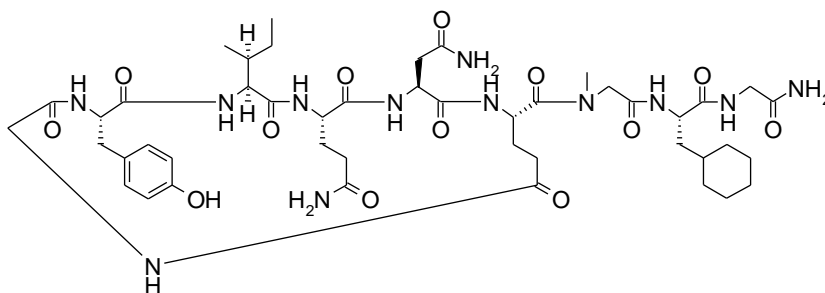
15 Приклад 38



Використовували наступні амінокислоти: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Trp-OH, Fmoc-Sar-OH, Fmoc-Glu(Allyl)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH.

МС ($M+H^+$): очікуване 1018,1; спостережуване 1018,8

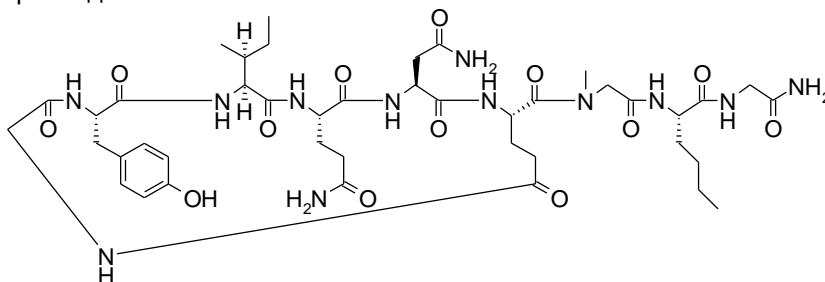
20 Приклад 39



Використовували наступні амінокислоти: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Cha-OH, Fmoc-Sar-OH, Fmoc-Glu(Allyl)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH.

МС ($M+H^+$): очікуване 985,1; спостережуване 985,6

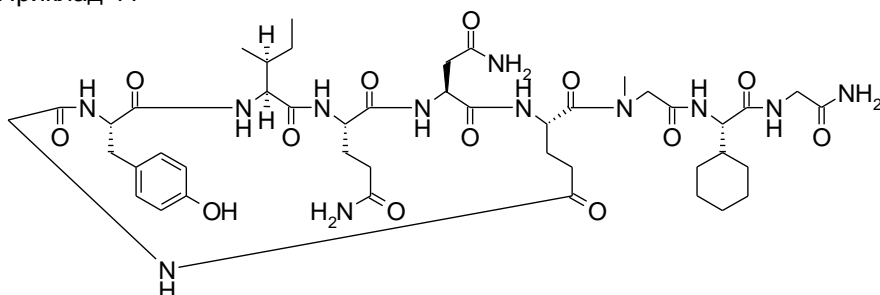
5 Приклад 40



Використовували наступні амінокислоти: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Nle-OH, Fmoc-Sar-OH, Fmoc-Glu(Allyl)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH.

МС ($M+H^+$): очікуване 945,0; спостережуване 945,5

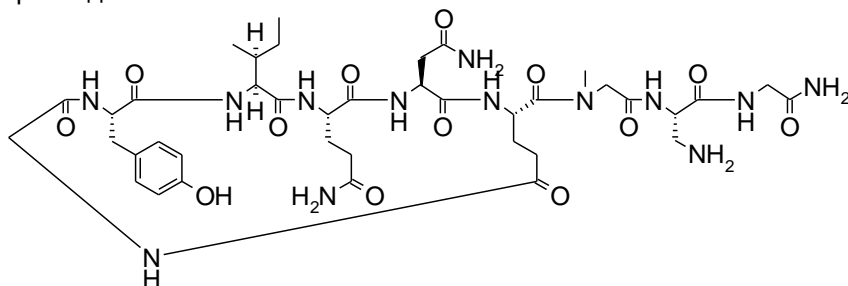
10 Приклад 41



Використовували наступні амінокислоти: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Chg-OH, Fmoc-Sar-OH, Fmoc-Glu(Allyl)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH.

МС ($M+H^+$): очікуване 971,1; спостережуване 971,9

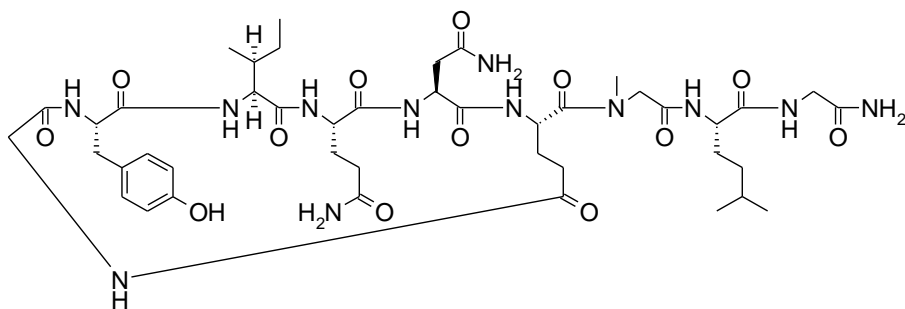
15 Приклад 42



Використовували наступні амінокислоти: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Dap-OH, Fmoc-Sar-OH, Fmoc-Glu(Allyl)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH.

МС ($M+H^+$): очікуване 918,0; спостережуване 918,7

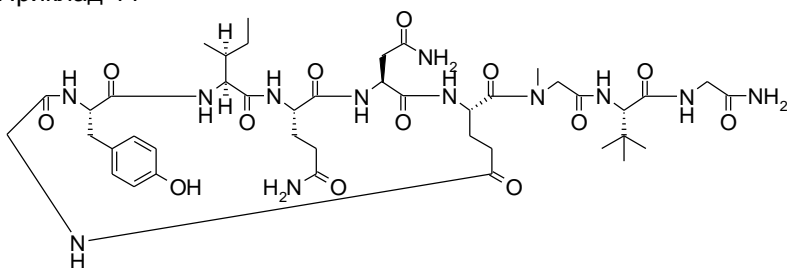
20 Приклад 43



Використовували наступні амінокислоти: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-HoLeu-OH, Fmoc-Sar-OH, Fmoc-Glu(Allyl)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH.

МС ($M+H^+$): очікуване 959,1; спостережуване 959,9

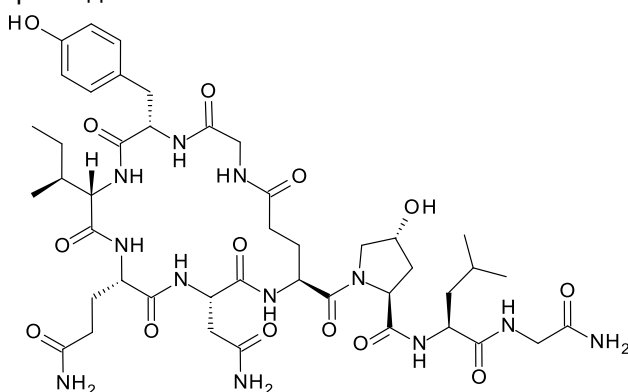
5 Приклад 44



Використовували наступні амінокислоти: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Tle-OH, Fmoc-Sar-OH, Fmoc-Glu(Allyl)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH.

МС ($M+H^+$): очікуване 945,0; спостережуване 944,7

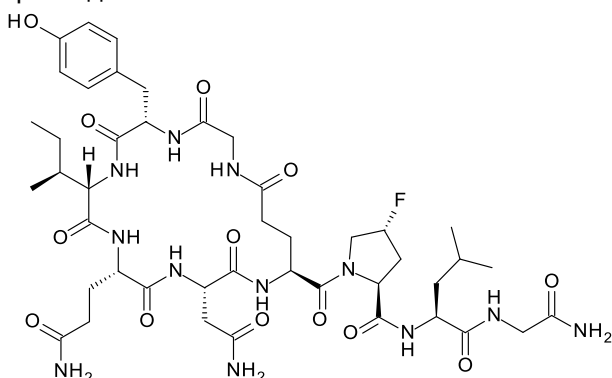
10 Приклад 45



Використовували наступні амінокислоти: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Hyp-OH, Fmoc-Glu(Allyl)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH.

МС ($M+H^+$): очікуване 987,1; спостережуване 988,0

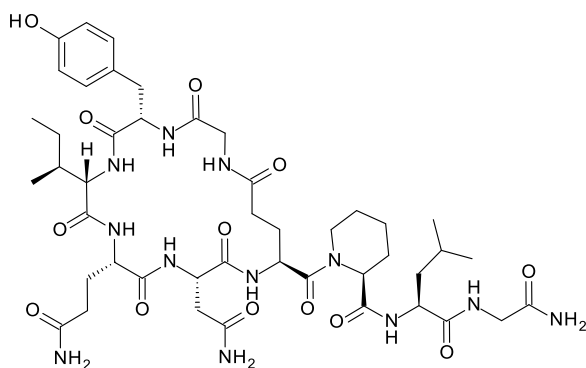
15 Приклад 46



Використовували наступні амінокислоти: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-FluoroPro-OH, Fmoc-Glu(Allyl)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH.

МС ($M+H^+$): очікуване 989,1; спостережуване 989,3

20 Приклад 47

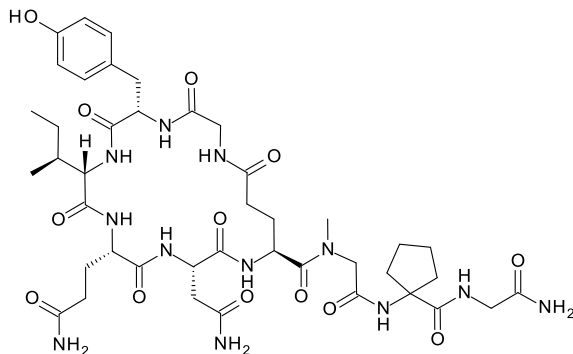


Використовували наступні амінокислоти: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Hpr-OH, Fmoc-Glu(Allyl)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH.

МС ($M+H^+$): очікуване 985,1; спостережуване 985,1

5

Приклад 48

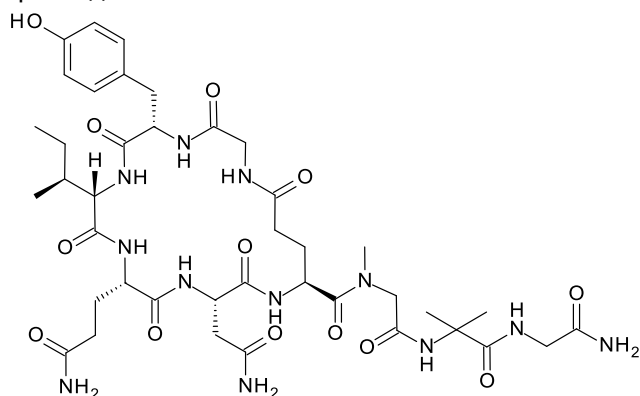


Використовували наступні амінокислоти: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-cyLeu-OH, Fmoc-Sar-OH, Fmoc-Glu(Allyl)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH.

МС ($M+H^+$): очікуване 943,0; спостережуване 943,1

10

Приклад 49

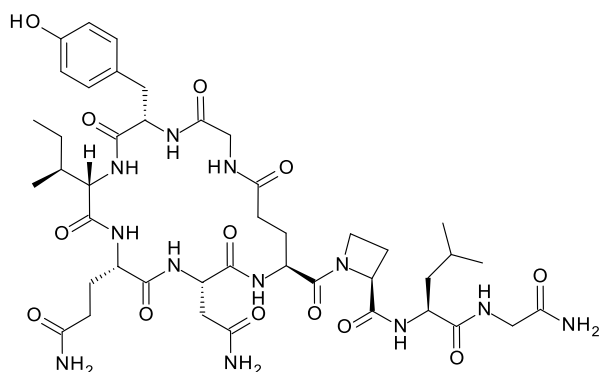


Використовували наступні амінокислоти: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Aib-OH, Fmoc-Sar-OH, Fmoc-Glu(Allyl)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH.

МС ($M+H^+$): очікуване 917,0; спостережуване 917,8

15

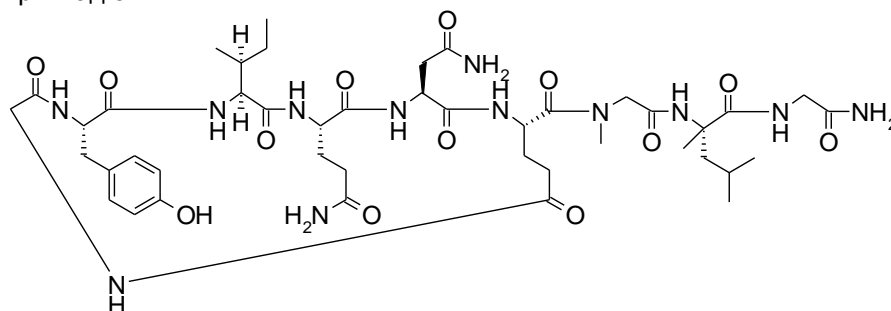
Приклад 50



Використовували наступні амінокислоти: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Aze-OH, Fmoc-Glu(Allyl)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH.

МС ($M+H^+$): очікуване 957,0; спостережуване 957,1

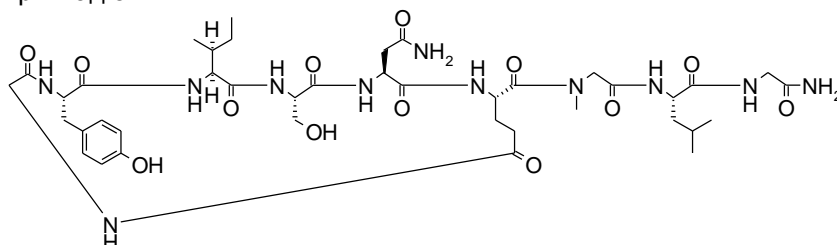
5 Приклад 51



Використовували наступні амінокислоти: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-MeLeu-OH, Fmoc-Sar-OH, Fmoc-Glu(Allyl)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH.

МС ($M+H^+$): очікуване 959,1; спостережуване 959,7

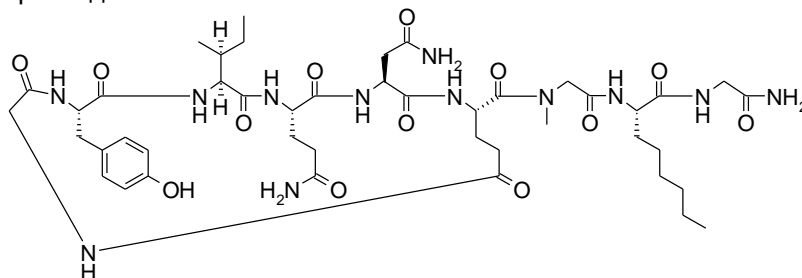
10 Приклад 52



Використовували наступні амінокислоти: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-MeLeu-OH, Fmoc-Sar-OH, Fmoc-Glu(Allyl)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH.

МС ($M+H^+$): очікуване 903,0; спостережуване 903,2

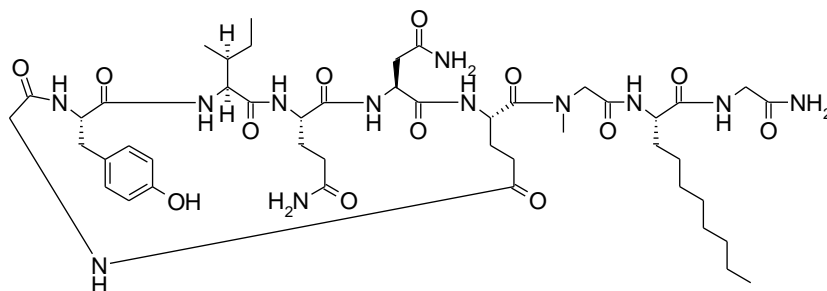
15 Приклад 53



Використовували наступні амінокислоти: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-2AOC-OH, Fmoc-Sar-OH, Fmoc-Glu(Allyl)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH.

МС ($M+H^+$): очікуване 973,0; спостережуване 973,5

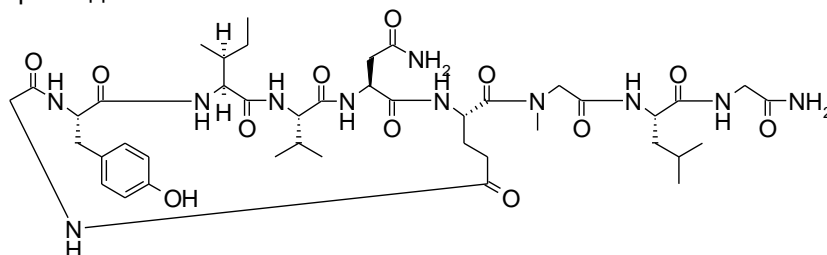
20 Приклад 54



Використовували наступні амінокислоти: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-2ADC-OH, Fmoc-Sar-OH, Fmoc-Glu(Allyl)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH.

МС ($M+H^+$): очікуване 1001,1; спостережуване 1000,5

5 Приклад 55



Використовували наступні амінокислоти: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu, Fmoc-Sar-OH, Fmoc-Glu(Allyl)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH.

МС ($M+H^+$): очікуване 916,0; спостережуване 917,2

10 Матеріал і методи

Культура клітин і одержання стабільного клона

Клітини яєчника китайського хом'яка (CHO; від англ. "Chines Hamster Ovary") трансфікували експресійними плазмідами, які кодують або рецептор V1a людини, або окситоцин людини (OTR), або рецептор V2 людини, де останній знаходиться в комбінації з химерним білком Gqs5 G для перенаправлення сигналу на потік кальцію. Стабільні клітини клонували шляхом обмежуючого розведення з одержанням моноклональних ліній клітин, експресуючих наступні рецептори: або V1a людини, або V2+Gqs5 людини, або OTR людини, і відбирали на основі функціональних відповідей, що виявляються на спектрофотометрі для читання планшетів з візуалізацією флуоресценції (FLIPR; від англ. "fluorometric imaging plate reader"), що визначає потік кальцію в клітину після активації рецептора. Стабільні лінії клітин вирощували в живильній суміші F-12 K Nutrient Mixture (Kaighns Modification), що містить 10 % фетальну бичачу сироватку (ФБС), 1 % пеніцилін-стрептоміцин, 1 % L-глутамат, 200 мкг/мл генетицину, при 37 °C в 10 % CO₂ інкубаторі при 95 % вологості.

25 Аналізи потоку кальцію з використанням флуоресцентної візуалізації (спектрофотометр для читання планшетів з візуалізацією флуоресценції, FLIPR)

30 За день до аналізу клітини висівали при щільності 50000 клітин/лунка в чорні 96-лункові планшети з прозорим дном, щоб дати можливість огляду клітин і вимірювань флуоресценції з дна кожної лунки. Щільність клітин була достатньою для одержання конфлюентного моношару наступного дня. Для кожного експерименту готували свіжий збалансований сольовий розчин Хенкса без фенолового червоного, що містить 20 мМ 4-(2-гідроксиетил)-1-піперазин-етансульфонову кислоту (ГЕПЕС) (pH 7,3) і 2,5 мМ пробенецид (аналітичний буфер). Розведення сполук готували, використовуючи автоматизоване робоче місце Beckman Biomek 2000, в аналітичному буфері, що містить 1 % ДМСО. Буфер для нанесення барвника складався з кінцевої концентрації 2 мкМ Fluo-4-AM (розчинений в ДМСО і плуоронілової кислоті) в аналітичному буфері. Існуюче культуральне середовище видаляли з лунок, і в кожну лунку додавали 100 мкл буфера нанесення барвника та інкубували протягом приблизного 60 хв. при 37 °C в 5 % CO₂ інкубаторі при вологості 95 %. Відразу після нанесення барвника клітини ретельно промивали на пристрої для промивання клітин Embla аналітичним буфером, щоб видалити який-небудь невключений барвник. У кожній лунці залишалося точно 100 мкл.

40 Кожен 96-лунковий планшет, що містить клітини з нанесеним барвником, поміщали в прилад FLIPR, та інтенсивність лазера встановлювали на рівень, відповідний для виявлення низької базальної флуоресценції. Для тестування сполук в якості агоністів 25 мкл розведеної сполуки додавали в планшет за 10 секунд при вимірюваннях флуоресценції, і флуоресцентну відповідь зчитували протягом 5 хвилин. Дані флуоресценції нормалізували за умовами доза-відповідь

ендогенного повного агоніста при 100 % для максимальної відповіді і 0 % для мінімальної відповіді. Криву концентрація-відповідь для кожного агоніста будували, використовуючи чотирьохпараметричне логістичне рівняння за допомогою програми Microsoft Excel XLFit таким чином: $Y = \text{мінімум} + ((\text{максимум} - \text{мінімум}) / (1 + 10^{(\log EC_{50} - x) / H}))$, де у є % нормалізованої флуоресценції, мінімум є мінімум у, максимум є максимум у, $\log EC_{50}$ є \log_{10} концентрації, яка дає 50 % максимуму індукованої флуоресценції, х є \log_{10} концентрації агоністичної сполуки, і Н є нахилом кривої (коефіцієнт Хілла). Максимальне значення дає ефективність агоністичної тестованої сполуки у відсотках. Концентрація агоніста, що дає половинну максимальну відповідь, представлена значенням EC_{50} , логарифм якого дає значення pEC_{50} .

Наступні значення EC_{50} (нМ) і ефективність (%) для конкретних пептидів можуть бути представлені разом з порівняльними даними для hV1a і hV2:

Приклад	hOT EC_{50} (нМ)/ ефектив- ність (%)	hV1a EC_{50} (нМ)	hV2 EC_{50} (нМ)/ ефектив- ність (%)	Приклад	hOT EC_{50} (нМ)/ ефектив- ність (%)	hV1a EC_{50} (нМ)	hV2 EC_{50} (нМ)/ ефектив- ність (%)
1	10/111	>27000	4800/107	29	32/130	>10000	10682/39
2	9/112	>27000	7906/74	30	6/119	>10000	142/104
3	4/94			31	9/131	>10000	2708/91
4	31/102			32	4/119	>10000	1985/106
5	181/108			33	2/119	>27000	3821/101
6	11/95	>27000		34	10/136	>10000	145/120
7	124/87			35	3/111	>10000	1672/104
8	100/92			36	41/138		
9	118/93			37	4/137		
10	17/91	>2700		38	1/126		
11	11/94	>27000		39	0,4/122	>27000	3707/111
12	48/82			40	0,4/124	>27000	2194/117
13	0,2/111	>27000	5110/97	41	69/117		
14	250/92			42	1/119		
15	52/102	>12000		43	26/124		
16	30/105	>12000		44	0,5/117	>27000	1230/112
17	45/92	>12000		45	0,6/113	>27000	3806/91
18	24/91	>12000		46	10/104		
19	1,5/122	127/33		47	1,5/111		
20	40	>12000		48	3,6/108		
21	12/105	32/55		49	5,9/97		
22	98/116			50	3,6/99	>27000	
23	88/64			51	13/97	>27000	
24	2,2/152	>27000	2505/98	52	4,3/121		
25	3/125	>10000	3823/103	53	1,1/127		
26	2/124	>10000	2624/102	54	0,8/134		
27	5/128	>10000	1498/101	55	20/104		
28	5/122	>10000	4173/87				

Сполуки формули I і фармацевтично прийнятні солі сполук формули I можна застосовувати як лікарські засоби, наприклад, у формі фармацевтичних препаратів. Фармацевтичні препарати можна вводити переважно трансдермальним, інтраназальним, підшкірним або внутрішньовенним (iv) шляхом.

Трансдермальний шляхом є шлях введення, де активні інгредієнти доставляються через шкіру для системного розподілу. Приклади включають трансдермальні пластири, вживані для доставки лікарського засобу, і трансдермальні імплантати, вживані в медичних або естетичних цілях.

Назальне введення можна застосовувати для доставки лікарських засобів або для локальних, або для системних ефектів, де достатньо поширеними є назальні спреї для локального ефекту. Пептидні лікарські засоби можна вводити у вигляді назальних спреїв, щоб уникнути розкладання лікарського засобу після перорального введення.

Підшкірні ін'єкції також є поширеними для введення пептидних лікарських засобів. Внутрішньом'язова ін'єкція є ін'єкцією речовини безпосередньо в м'яз. Цей спосіб є одним з

декількох альтернативних способів для введення лікарських засобів. Його часто застосовують для конкретних форм лікарського засобу, який вводять в невеликих кількостях. Ін'єкції слід вводити під шкіру.

Внутрішньовенний шлях є інфузією рідких речовин безпосередньо у вену. В порівнянні з іншими шляхами введення внутрішньовенний шлях є найшвидшим шляхом доставки рідин і лікарських засобів для дії на весь організм.

Фармацевтичні препарати можуть додатково містити консерванти, солюбілізатори, стабілізатори, зволожуючі агенти, емульгатори, підсолоджувачі, барвники, коригенти, солі для варіювання осмотичного тиску, буфери, маскуючі агенти або антиоксиданти. Вони можуть також містити також інші терапевтично цінні речовини.

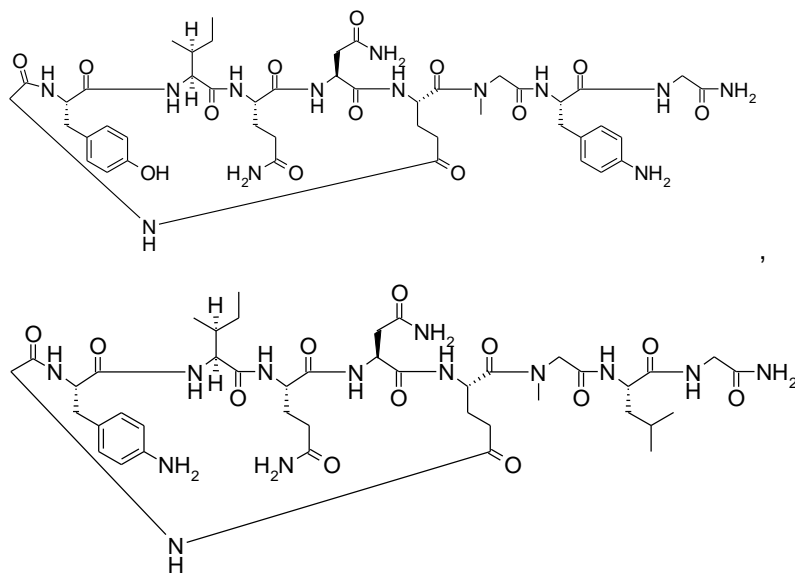
Лікарські засоби, що містять сполуку формули I або її фармацевтично прийнятну сіль і терапевтично інертний носій, також є об'єктом даного винаходу, а також спосіб їх одержання, який включає приведення одного або більше сполук формули I та/або їх фармацевтично прийнятних кислотно-адитивних солей і за бажання одного або більше інших терапевтично цінних речовин у форму галенова препарату для введення разом з одним або більше терапевтично інертних носіїв.

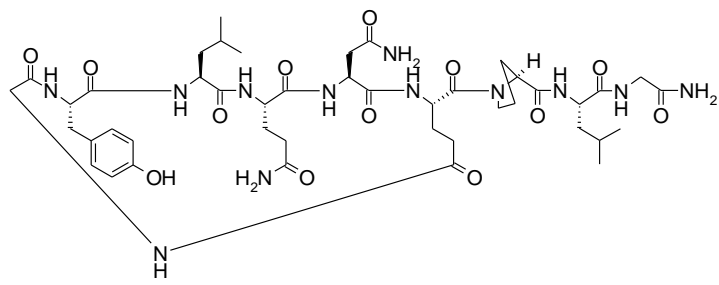
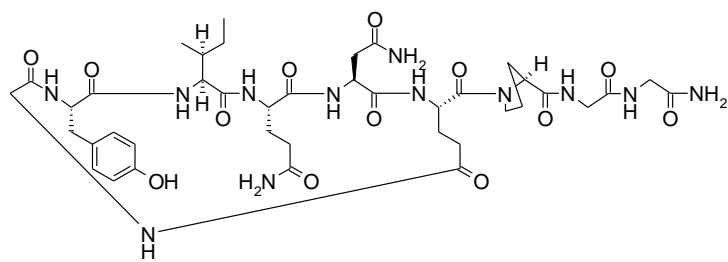
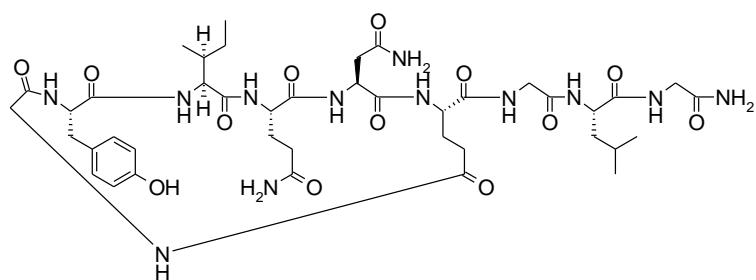
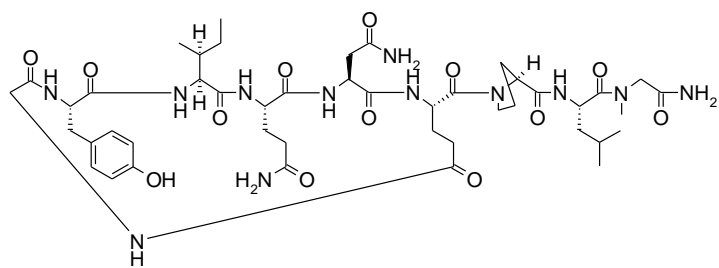
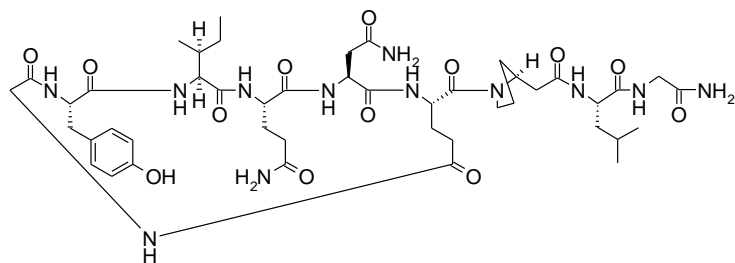
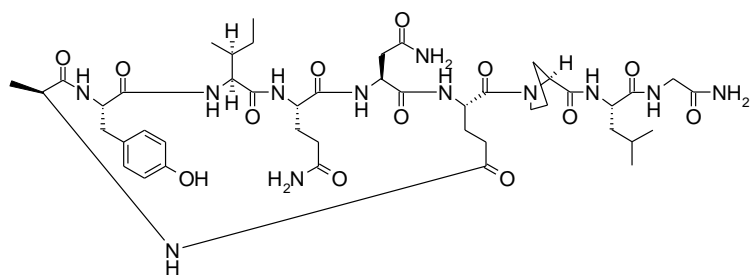
Найбільш переважними свідченнями відповідно до даного винаходу є свідчення, що включають розлади центральної нервової системи, наприклад, лікування або попередження аутизму, стресу, включаючи посттравматичний стресовий розлад, тривоги, включаючи тривожні розлади і депресію, шизофренії, психіатричних розладів і втрати пам'яті, синдрому відміни алкоголю, звикання до лікарських засобів, а також синдрому Прадера-Віллі.

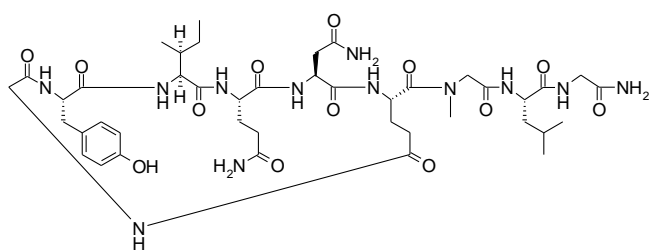
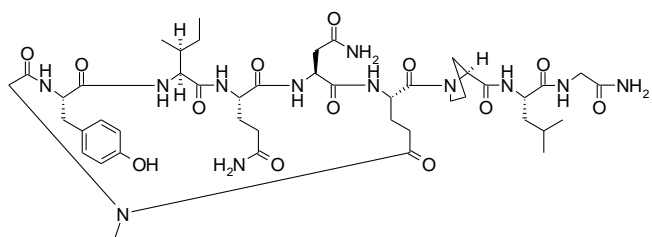
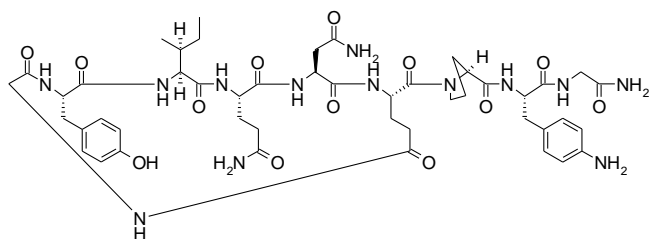
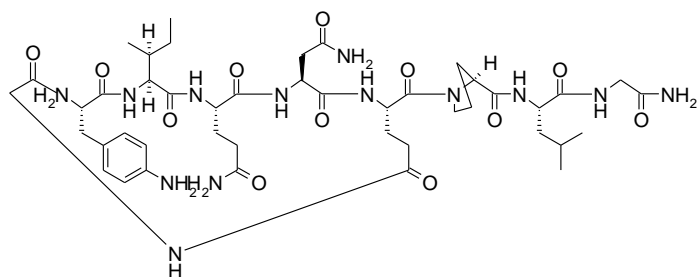
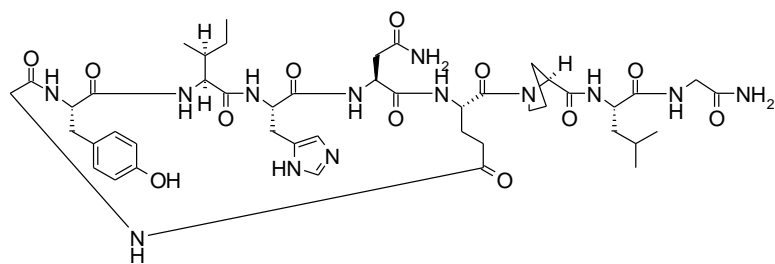
Дозування може варіювати в широких межах і, звичайно, її слід регулювати за індивідуальними потребами у кожному конкретному випадку. Дозування для дорослих може варіювати від приблизно 0,01 мг до приблизно 1000 мг на добу сполуки загальної формули I або складати відповідну кількість її фармацевтично прийнятної солі. Добове дозування можна вводити в одноразовій дозі або в розділених дозах, і, крім того, верхня межа може бути також перевищена, коли це вважають показаним.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

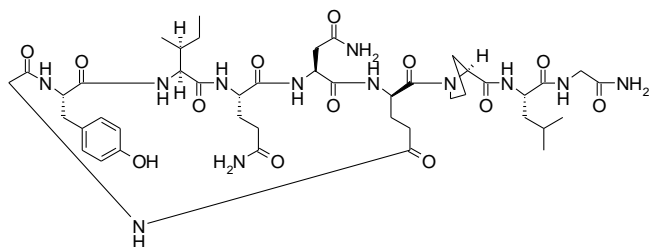
1. Сполука формули I, де сполука являє собою наступні:

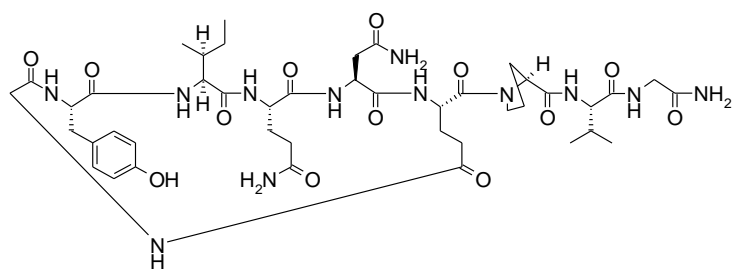
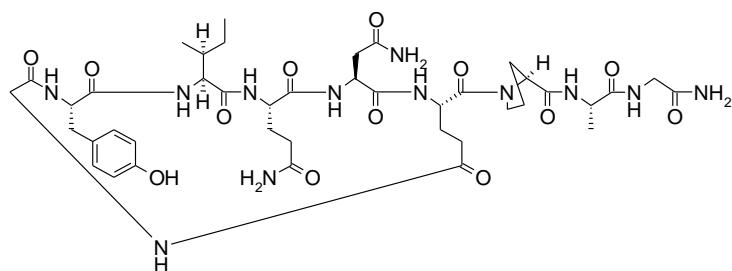
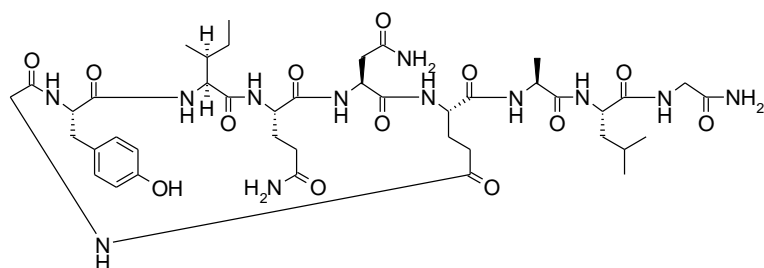
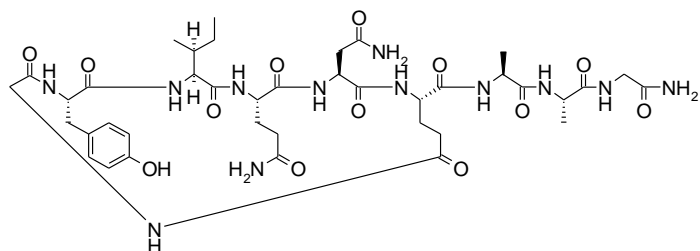
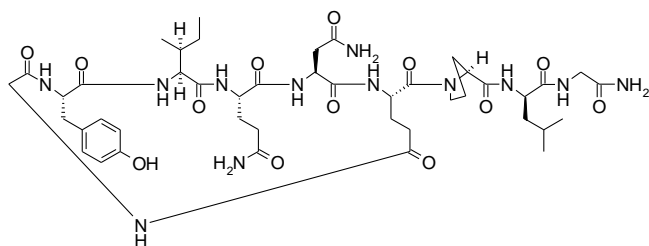




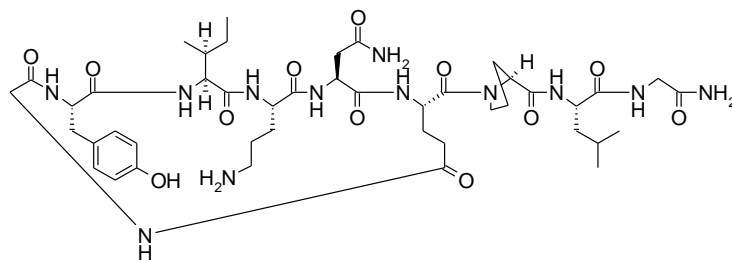


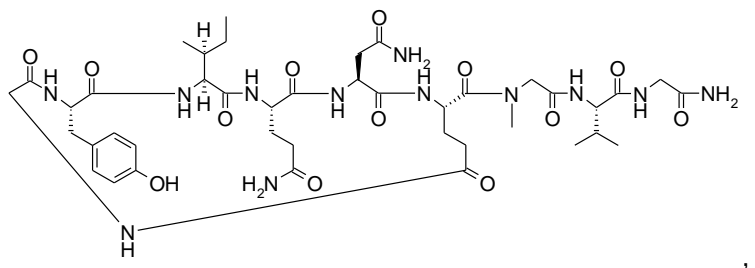
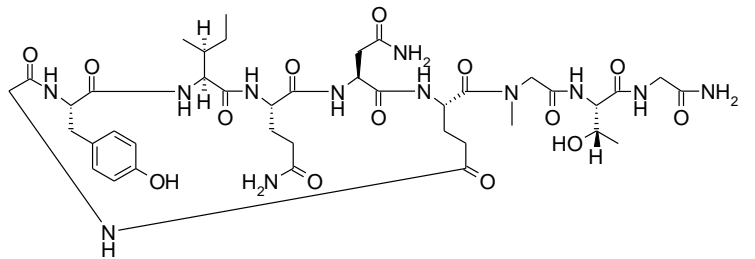
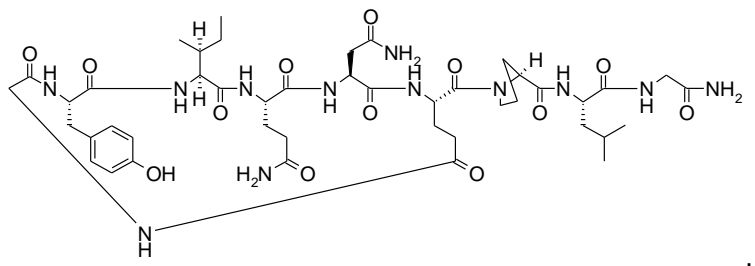
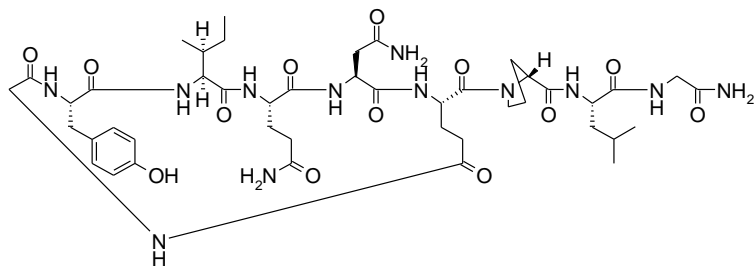
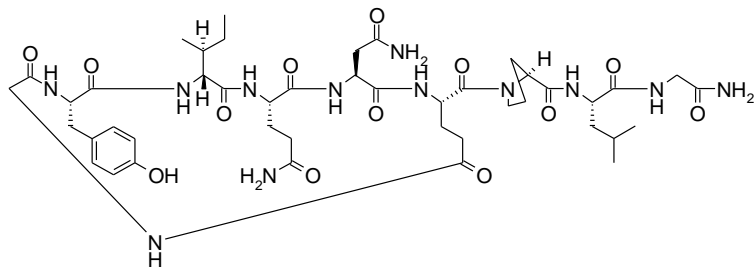
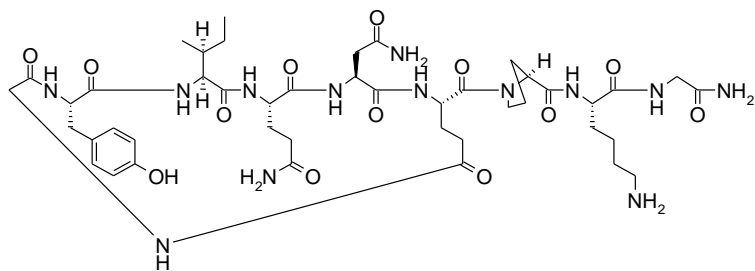
5

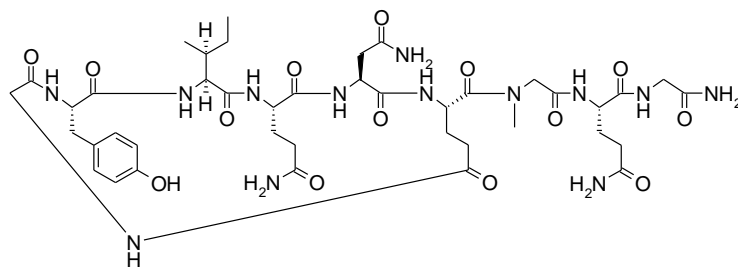
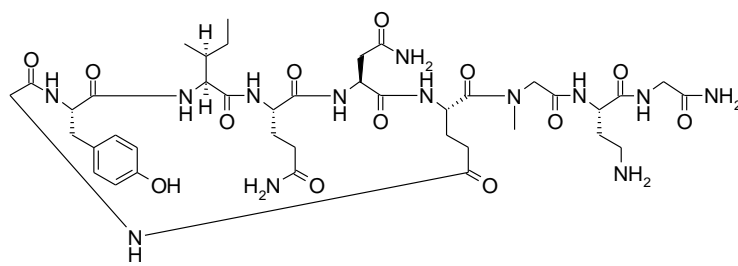
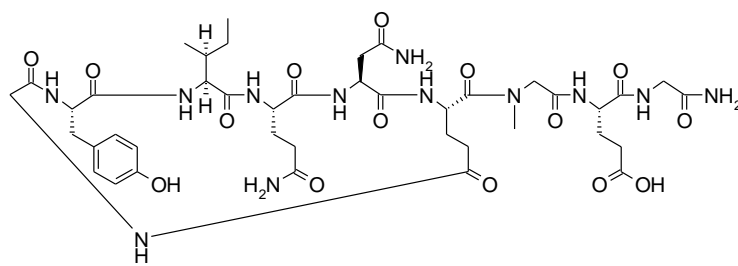
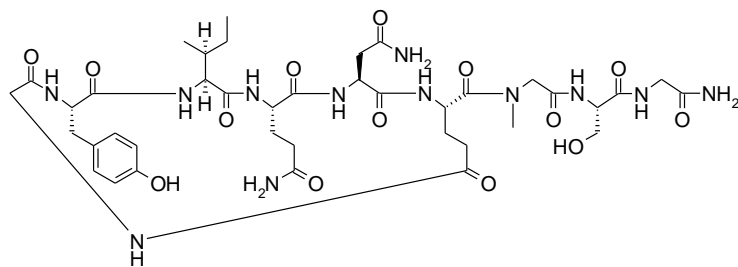
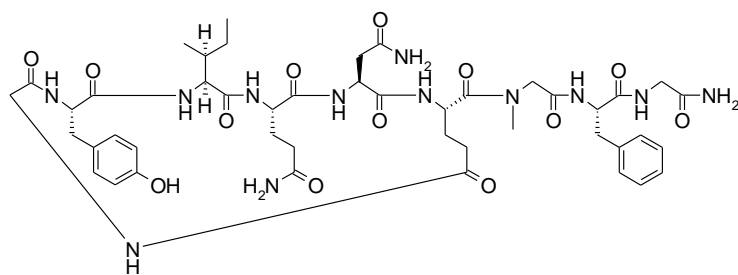




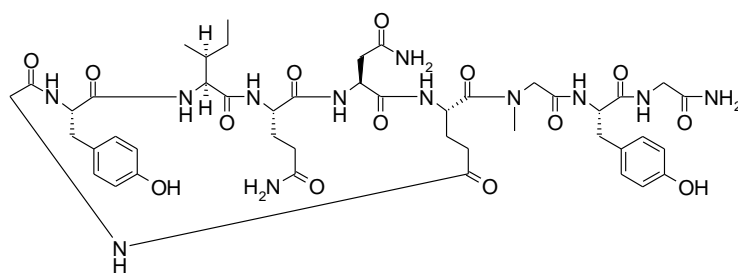
5

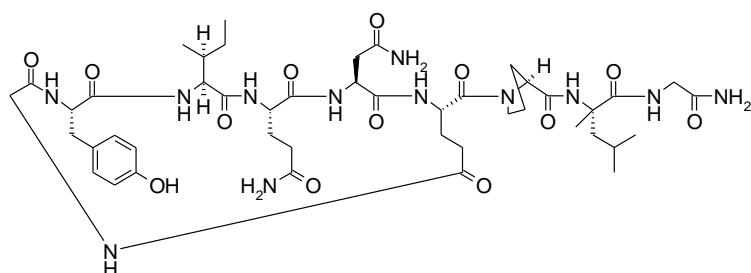
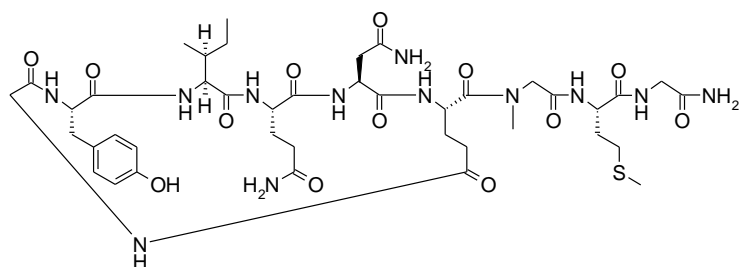
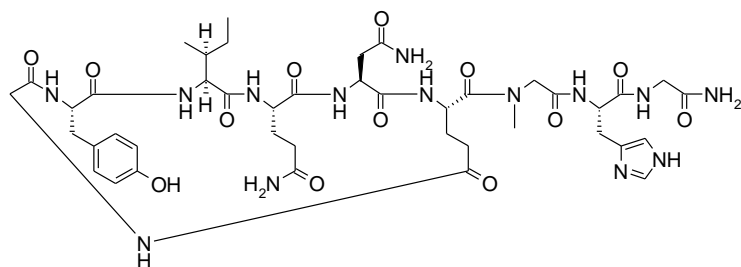
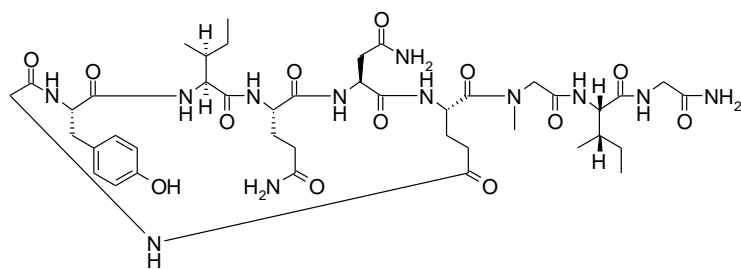




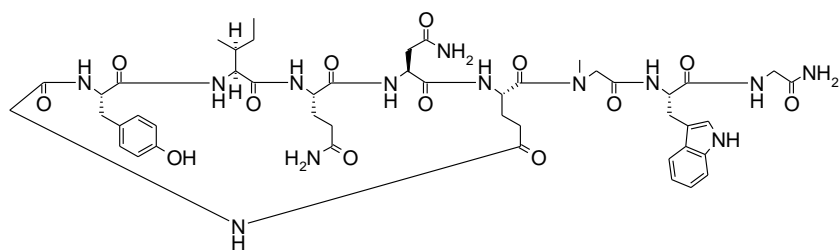
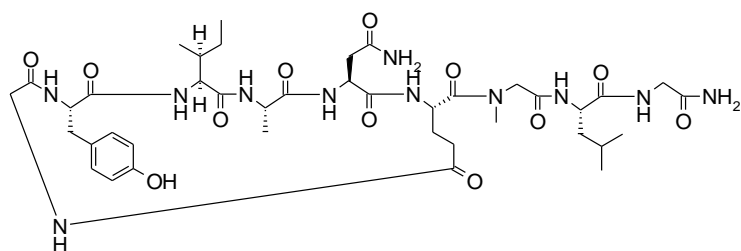


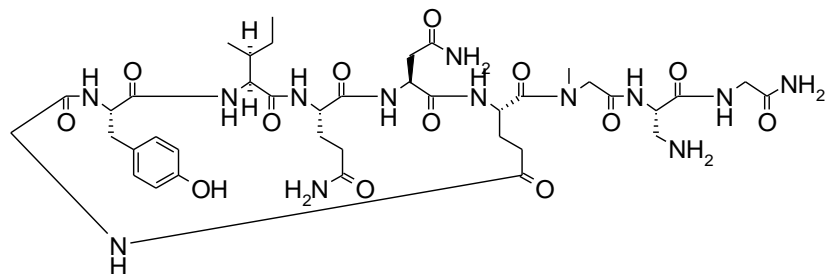
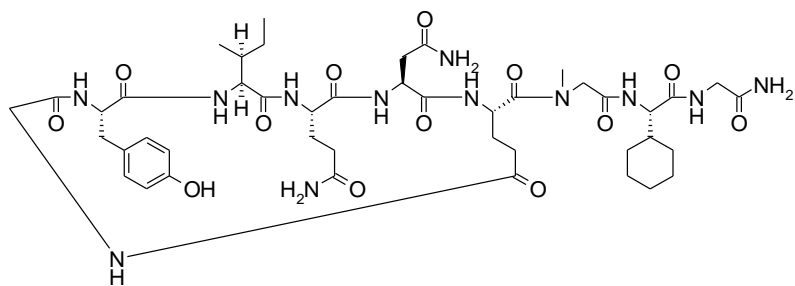
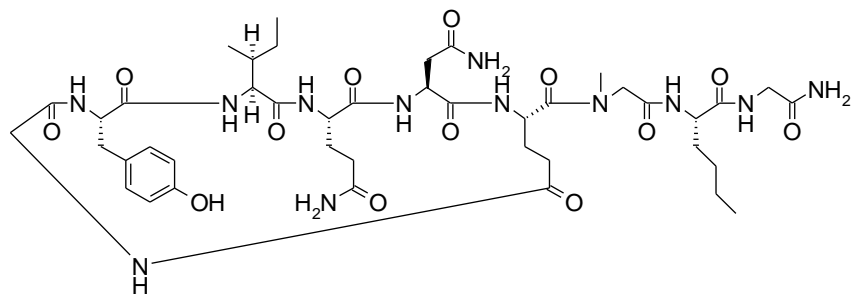
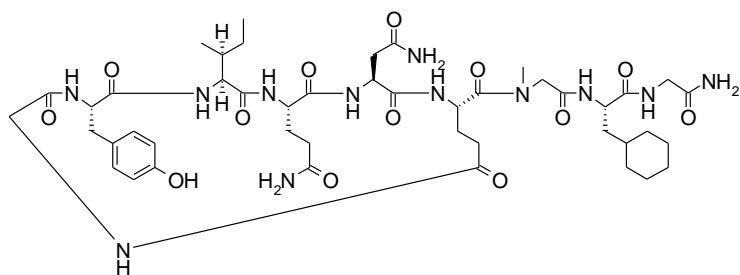
5



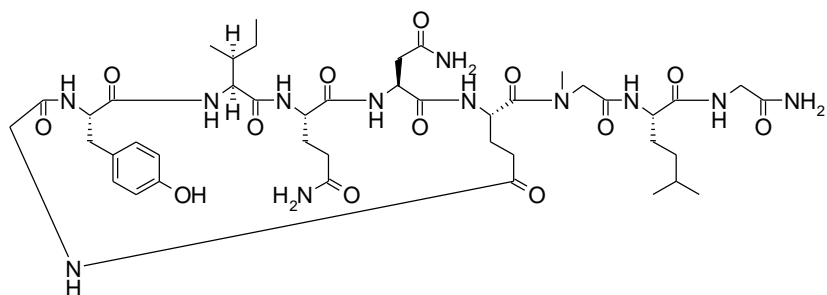


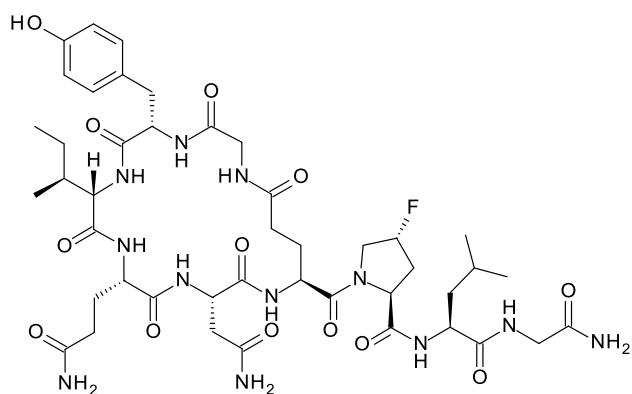
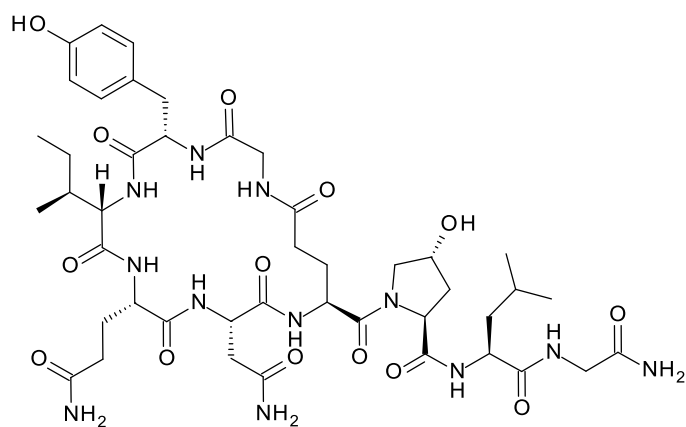
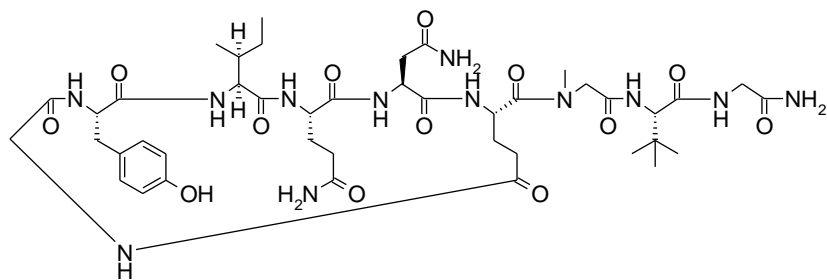
5



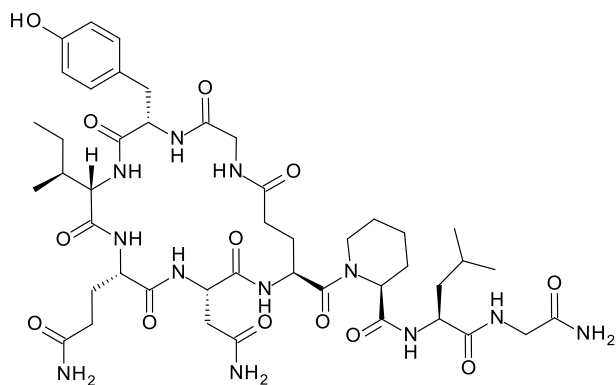


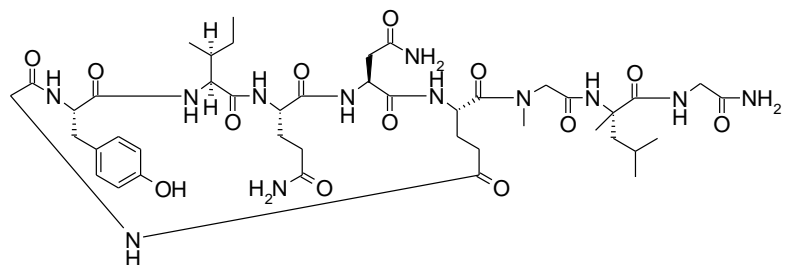
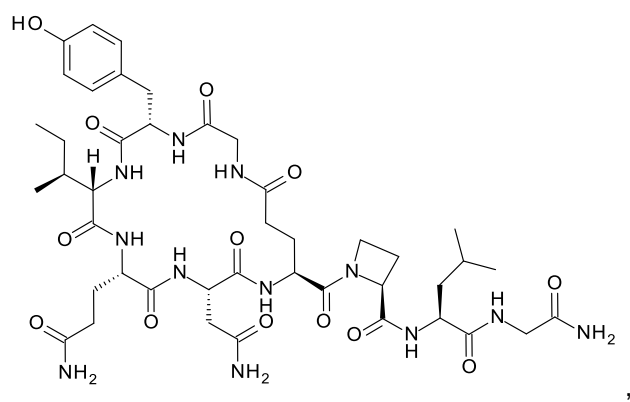
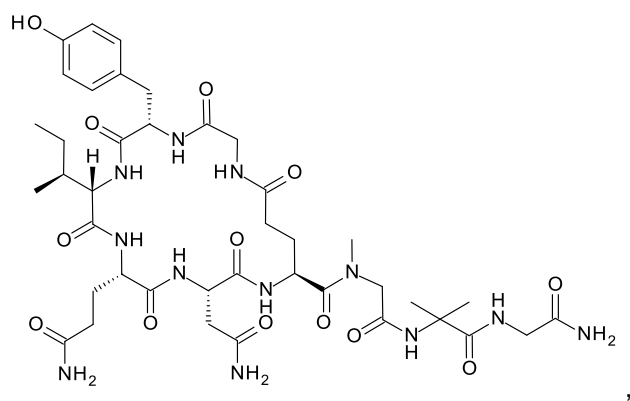
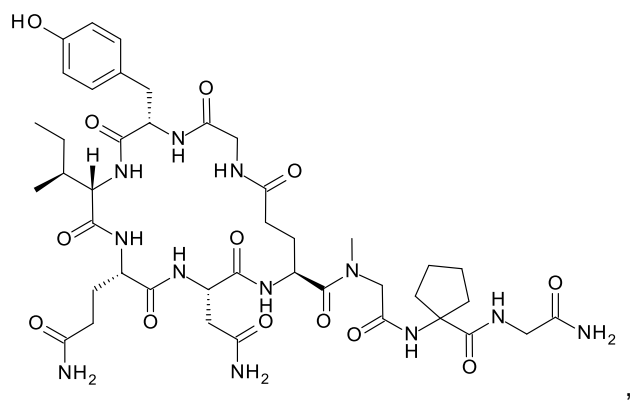
5

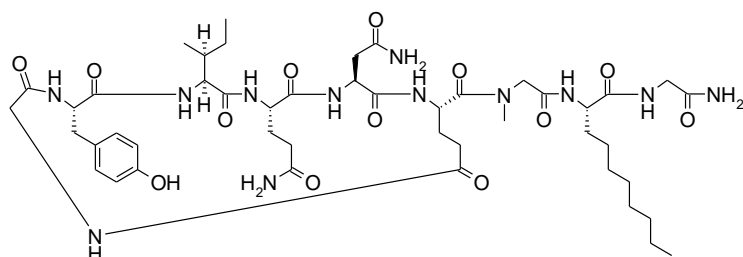
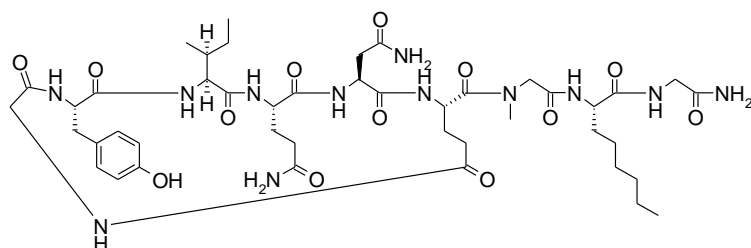
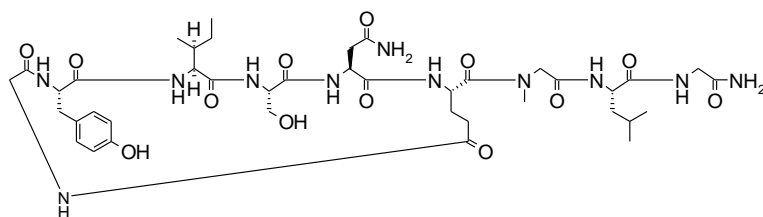




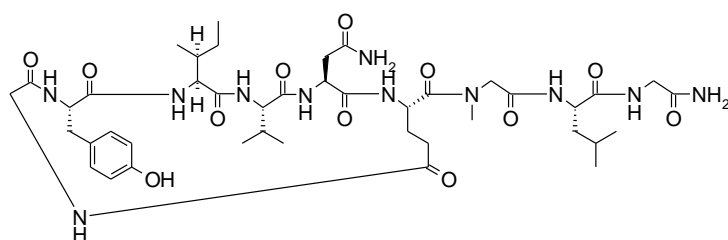
5







5



2. Фармацевтична композиція, яка містить сполуку за п. 1 і фармацевтично прийнятний носій та/або ад'ювант.
3. Фармацевтична композиція, яка містить сполуку за п. 1 і фармацевтично прийнятний носій та/або ад'ювант, для застосування при лікуванні аутизму, стресу, включаючи посттравматичний стресовий розлад, тривоги, включаючи тривожні розлади і депресію, шизофренії, психіатричних розладів і втрати пам'яті, синдрому відміни алкоголю, звикання до лікарських засобів, а також для лікування синдрому Прадера-Віллі.
4. Сполука за п. 1 для застосування як терапевтично активної речовини.
5. Сполука за п. 1 для застосування як терапевтично активної речовини при лікуванні аутизму, стресу, включаючи посттравматичний стресовий розлад, тривоги, включаючи тривожні розлади і депресію, шизофренії, психіатричних розладів і втрати пам'яті, синдрому відміни алкоголю, звикання до лікарських засобів, а також для лікування синдрому Прадера-Віллі.
6. Застосування сполуки за п. 1 для одержання лікарських засобів для терапевтичного та/або профілактичного лікування аутизму, стресу, включаючи посттравматичний стресовий розлад, тривоги, включаючи тривожні розлади і депресію, шизофренії, психіатричних розладів і втрати пам'яті, синдрому відміни алкоголю, звикання до лікарських засобів, а також для лікування синдрому Прадера-Віллі.

Комп'ютерна верстка О. Гергіль

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601