ČESKÁ REPUBLIKA

(19)

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(22) 14.05.92

(32) 14.05.92, 15.05.91

(31) 92SE/9200316, 91/9101472

(33) WO, SE

(40) 13.07.94

(21) 2422-93

(13) A3

5(51)

C 07 K 7/08
C 07 K 7/10
C 07 K 7/02
A 61 K 37/02
// C 07 K 7/12, C 07 K 7/18

(71) Aktiebolaget ASTRA, Sodertalje, SE;

(72) Barfai Tamas, Stocksund, SE;
Hokfelt Tomas, Djursholm, SE;
Langel Ulo, Stockholm, SE;
Ahrén Bo, Lund, SE;
Lindskog Stefan, Lund, SE;
Consolo Silvana, Milan, IT;
Land Tiit, Stockholm, SE;
Wiesenfeld-Hallin Zsuzsanna, Stockholm, SE;

(54) Galaninový antagonista

(57) Galaninový antagonista, kterým je ligand galaninového receptoru, nové peptidy Galanin(1-12)-Pro-Substance P(5-11), Galanin(1-12)-Pro-Bradykinin(2-9), Galanin(1-12)-Pro-Pro-Pro-(Leu^5-Enkaphalin- (5-1)), Galanin(1-12)-Pro-Lys(S-NH)-Pro- (Leu^5-Enkephalin (5-1) a jejich funkční analogy a jejich funkční deriváty, které projevují v podstatě stejný galaninový antagonistický účinek, jako uvedené peptidy, a dále použití galaninového antagonisty k výrobě farmaceutického prostředku a farmaceutické prostředky, které tuto látku obsahují.

Č.j. 6 1 0 5 0
DOŠLO 12 XI 93
ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ
PŘÍL.

Galaninový antagonista

Oblast techniky

Tento vynález se týká galaninového antagonisty, kterým je ligand galaninového receptoru. Tento vynález se dále týká peptidů Galanin(1-12)-Pro-Substance P(5-11), Galanin(1-12)-Pro-Bradykinin(2-9), Galanin(1-12)-Pro-Pro-Pro-(Leu^5-Enkephalin(5-1)), Galanin(1-12)-Pro-Lys(ε-NH)-Pro-(Leu^5-Enkephalin(5-1)) a jejich funkčních analogů a jejich funkčních derivátů, které projevují v podstatě stejný galaninový antagonistický účinek, jako uvedené peptidy. Použití galaninového antagonisty, farmaceutických prostředků, které tuto látku obsahují, a způsobu ošetřování nemocí u savců, které jsou závislé na fyziologické funkci galaninu u galaninového receptoru jsou také popsány.

Dosavadní stav techniky

Neuromediátory a hormony mohou vyvolat své buněčné účinky tím, že se váží a aktivují buněčné membrány receptorů. Neuropeptid galanin byl izolován v roce 1983 z horní části střeva prasete a bylo zjištěno, že obsahuje 29 aminokyselinových zbytků (K. Tatemoto a kol., FEBS Lett. 164, 124 - 128 /1983/). Byly také popsány sekvence galaninu ze dvou dalších savců, krysy a krávy (M. E. Vrontakis a kol., J. Biol. Chem. 262, 16 755 - 16 758 /1987/, L. M. Kaplan a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85, 1065 -1069 /1988/ a . Rökaeus a M. Carlquist, FEBS Lett. 234, 400 - 406 /1988/). Porovnání peptidové sekvence galaninu z různých savců, krysy, prasete krávy ukazuje, že N-terminální aminokyseliny 1-15 jsou identické. Tak je velmi pravděpodobné, že se tato zakonzervovaná oblast bude nacházet v galaninu jiných savců včetně člověka.

Galanin má široký profil distribuce, který často souvisí s vícenásobnými účinky neuroforem uplatněnými ve variantách rozdílných systémů.

Až dosud nebyl popsán žádný galaninový antagonista, kterým je ligand galaninivého receptoru. Galaninový antagonista by byly vhodným nástrojem pro stanovení fyziologické významnosti galaninu a k vývoji farmaceutických prostředků pro regulaci fyziologické funkce galaninu u galaninového receptoru.

Podstata vynálezu

Jeden znak tohoto vynálezu je zaměřen na galaninového antagonistu, kterým je ligand galaninového receptoru. Tak antagonistický účinek galaninového antagonisty podle tohoto vynálezu se používá u galaninových receptorů. Při provedení tohoto znaku vynálezu je antagonista zvolen ze souboru zahrnujícího peptidy vzorce

H-Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-
-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-X,

H-Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-
-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg-X,

H-Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-
-Pro-Pro-Leu-Phe-Gly-Gly-Tyr-X a

H-Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-
-Lys-X
|
Pro-Leu-Phe-Gly-Gly-Tyr-X,

kde

X představuje aminoskupinu nebo hydroxyskupinu (jde o amid nebo volnou kyselinu) a

jejich funkční analogy a jejich funkční deriváty.

V popisu a patentových nárocích je v úmyslu vyjádřit, že "funkční analogy" peptidů podle tohoto vynálezu mimo jiné mají zahrnovat kratší nebo delší peptidy se substitucí jednoho nebo několika aminokyselinových zbytků nebo bez této substituce, pokud takové analogy projevují v podstatě stejnou farmakologickou funkci jako peptidy podle tohoto vynálezu, to znamená galaninové antagonisty u galaninového receptoru.

Dále se zamýšlí vyjádřit, že "funkční deriváty" peptidů podle tohoto vynálezu zahrnují libovolnou sloučeninu, která projevuje v podstatě stejnou farmakologickou funkci jako peptidy podle tohoto vynálezu, to znamená je galaninovým antagonistou u galaninového receptoru. Obzvláště taková sloučenina může být sloučeninou, která je odvozena od jednoho z peptidů podle tohoto vynálezu, ale ve které jeden aminokyselinový zbytek je substituován nebo několik takových zbytků je substituováno jinými chemickými skupinami, to znamená organickými, stejně jako anorganickými molekulami nebo prvky, s výsledkem projevujícím se napodobením peptidu neboli "peptidomimeticky".

Je domněnka, že existuje strukturální prostorové uspořádání u galaninového receptoru vybraného z peptidů podle tohoto vynálezu, které je odpovědné za farmakologickou funkci působící jako galaninový antagonista a pro svou afinitu ke galaninovému receptoru (tak je ligandem galaninového receptoru).

Tak se věří, že funkční deriváty a funkční analogy

zahrnuté do vynálezu mohou mít podobné strukturální prostorové uspořádání u galaninového receptoru jako peptidy podle tohoto vynálezu. Prostředí obklopující galaninový receptor by mohlo být napodobeno například krví nebo fyziologickým roztokem chloridu sodného.

Jiný znak tohoto vynálezu je zaměřen na peptidy vzorce

H-Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-
-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-X,

H-Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-
-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg-X,

H-Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-
-Pro-Pro-Leu-Phe-Gly-Gly-Tyr-X a

H-Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-
-Lys-X
|
Pro-Leu-Phe-Gly-Gly-Tyr-X,

kde

X představuje aminoskupinu nebo hydroxyskupinu (jde o amid nebo volnou kyselinu) a

jejich funkční analogy a jejich funkční deriváty, které projevují v podstatě stejný galaninový antagonistický účinek jako již uvedené peptidy.

Jak bylo uvedeno výše, peptidy se mohou také označovat jako Galanin(1-12)-Pro-Substance P(5-11), Galanin(1-12)-Pro-
-Bradykinin(2-9), Galanin(1-12)-Pro-Pro-Pro-(Leu^5-Enkephalin-(5-1)) a Galanin(1-12)-Pro-Lys(ε-NH)-Pro-(Leu^5-Enkephalin-

(5-1)).

V pokusné části tohoto popisu mají svrchu uvedené peptidy, pokud jsou ve formě amidů (to znamená, že X představuje aminoskupinu), označení M15, M35, M36,A a M34,A.

Funkčními analogy mohou být peptidy, jako je

H-Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-
-(D-Arg)-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-(D-Trp)-Phe-(D-Trp)-Leu-Leu-X,

H-Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-
-Pro-Pro-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-X,

H-Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-
-Ala-Leu-Ala-Leu-Ala-Leu-Ala-X,

H-Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-
-Pro-Pro-Ala-Leu-Ala-Leu-Ala-X,

H-Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-
-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg-X,

H-Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-
-Arg-His-Tyr-Ile-Asn-Leu-Ile-Thr-Arg-Gln-Arg-Tyr-X,

H-Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Ala-
-Arg-His-Tyr-Ile-Asn-Leu-Ile-Thr-Arg-Gln-Arg-Tyr-X,

H-Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-
-Pro-Pro-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-X nebo

H-Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-
-Pro-Pro-Leu-Phe-Gly-Gly-Tyr-X,

kde

X představuje aminoskupinu nebo hydroxyskupinu (jde o amid nebo volnou kyselinu).

Další znak tohoto vynálezu je zaměřen na použití galaninového antagonisty, kterým je ligand galaninového receptoru, pro výrobu farmaceutického prostředku. Je možné uvést, že svrchu shrnuté peptidy jsou rozpustné ve vodě, co usnadňuje výrobu farmaceutického prostředku pro injekce.

Ještě další znak tohoto vynálezu je zaměřen na galaninového antagonistu, kterým je ligand galaninového receptoru, pro použití ve farmaceutickém prostředku.

Ještě další znak tohoto vynálezu je zaměřen na farmaceutický prostředek, který obsahuje galaninového antagonistu, kterým je ligand galaninového receptoru, jako účinnou látku, dohromady s farmaceuticky přijatelnou přísadou nebo přijatelnými přísadami. V závislosti na zvláštním typu farmaceutického prostředku, který se má vyrobit, přísada se může nebo přísady se mohou volit tak, že se sestaví požadovaný prostředek. Vhodná přísada nebo vhodné přísady pro zvláštní typ prostředku určeného pro výrobu, jako jsou roztoky pro injekce, tablety nebo náplasti, se může nebo mohou zjistit v americkém lékopise (U. S. Pharmacopoeia).

Tento vynález také poskytuje prostředky obsahující účinné množství sloučeniny podle tohoto vynálezu, včetně jejich netoxických adičních solí, amidů a esterů, které mohou samotné sloužit k dosažení svrchu uvedeného příznivého terapeutického účinku. Takové prostředky se mohou také dostat dohromady s farmaceuticky přijatelnými ředidly kapalin, gelů nebo tuhých látek nebo s pomocnými látkami (adjuvancii a

vehikuly).

Tyto sloučeniny se mohou podávat savcům, jako domácím zvířatům, k veterinární použití a lidem při klinickém použití, způsobem podobným podávání jiných terapeutických prostředků. Z obecného hlediska bude dávka vyžadovaná pro terapeutický účinek v rozmezí od přibližně 0,01 do 1000 µg/kg, běžněji od 0,1 do 1000 µg/kg, tělesné hmotnosti pacienta. Při jiném provedení se tyto dávky mohou podávat nepřetržitou infuzí během prodlouženého časového období, až do dosažení požadovaného příznivého terapeutického účinku.

Takové prostředky se obvykle vyrábějí buď jako kapalné roztoky nebo jako suspenze, které jsou vhodné k zavedení injekcí nebo tuhé formy vhodné pro rozpuštění na roztok nebo suspenzi, přičemž kapalina před injekcí se může také připravit. Prostředky mohou být také emulgovány nebo vnášeny do systémů uvolňujících léčivou látku, jako liposomů nebo mikrokuliček. Účinná látka se často míchá se ředidly nebo vehikuly, která jsou fyziologicky snášitelná a kompatibilní s účinnou látkou. Vhodnými ředidly a excipienty jsou například voda, fyziologický roztok chloridu sodného, dextróza, glycerol nebo podobné látky a jejich kombinace. Kromě toho, pokud je to žádoucí, prostředky mohou obsahavat menší množství pomocných látek, jako smáčedel nebo emulgačních činidel, stabilizátorů nebo činidel upravujících hodnotu pH a podobně.

Sloučeniny se obvykle podávají parenterálně injekcemi, například buď subkutánně, intramuskulárně, intraperitoneálně nebo intravenózně. Další prostředky, které jsou vhodné pro jiné způsoby podání, zahrnují čípky, vagitorie, intranasální postřiky, bukální prostředky, jako adhezní tablety, gely nebo náplasti, a v některých případech orální prostředky. Čípky a vagitorie mohou obsahovat běžná pojiva a vehikula, napří-

klad polyalkylenglykoly nebo triglyceridy. Čípky se mohou vyrábět ze směsí obsahujících účinnou látku v rozmezí od 0,5 do 10 %, výhodně od 1 do 2 %. Orální prostředky zahrnují normálně používaná vehikula, například mannitol, laktózu, škrob, stearát hořečnatý, sodnou sůl sacharinu, celulózu, uhličitan hořečnatý a podobně, vždy v jakosti pro farmaceutické použití. Tyto prostředky mají formu roztoků, suspenzí, tablet, pilulek, kapslí, prostředků s trvalým uvolňováním účinné látky nebo prášků a obsahují od 10 do 95 %, výhodně od 25 do 70 %, účinné látky.

Peptidické sloučeniny se mohou zpracovávat na prostředky jako neutrální formy nebo soli. Farmaceuticky přijatelné netoxické soli zahrnují adiční soli s kyselinami (které se tvoří na volných aminoskupinách) a které vznikají s anorganickými kyselinami, jako například kyselinou chlorovodíkovou nebo kyselinami fosforečnými, nebo organickými kyselinami, jako je kyselina octová, kyselina oxalová, kyselina vinná, kyselina mandlová a podobně. Soli tvořící se na volných karboxyskupinách mohou být odvozeny od anorganických bází, jako například od hydroxidu sodného, draselného, amonného, vápenatého nebo železitého a takových organických bází, jako je isopropylamin, trimethylamin, 2-ethylaminoethanol, hystidin, prokain a podobně.

Způsob ošetřování nemoci u savců, která závisí na fyziologické funkci galaninu u galaninového receptoru spočívá v tom, že se savci podává farmakologicky účinné množství galaninového antagonisty, kterým je ligand galaninového receptoru. Protože fyziologická funkce galaninu u galaninového receptoru je specifická pro každé jednotlivé farmakologicky účinné množství galaninového antagonisty, který je určen k podání pro ošetření nemoci u savce, má být rozhodnuto lékařem nebo veterinářem na jednotlivém základě.

Využitelnost

Galaninové antagonisty by měly být vhodné k regulaci přinejmenším v těchto oblastech:
uvolňování inzulinu,
uvolňování růstového hormonu,
uvolňování acetylchlolinu,
uvolňování dopaminu,
uvolňování substance P,
uvolňování somatostatinu a
uvolňování noradrenalinu.

V současné době jsou předpokládané oblasti lékařské indikace v endokrinologii, příjmu potravy, neurologii a psychiatrii: senilní demence Alzheimerova typu, schizofrenie, analgesie a intestinální nemoci.

Nyní se popisuje způsob výroby galaninového antagonisty podle tohoto vynálezu.

Pro výrobu galaninových antagonistů podle tohoto vynálezu se mohou použít obvyklé způsoby výroby peptidů, které se účelně modifikují, pokud antagonista je peptidomimetický. Kromě syntézy v kapalné fázi, obvyklé způsoby pro syntézu nových sloučenin podle tohoto vynálezu zahrnují libovolné způsoby syntézy peptidu v tuhé fázi. Při takových způsobech syntézy nových sloučenin se může jednotlivě provádět postupné zavádění požadovaných aminokyselinových zbytků do rostoucího peptidového řetězce podle obecných zásad platných pro způsoby prováděné v tuhé fázi.

V dalším textu někdy mohou být použity tyto zkratky:

NMP	= N-methylpyrrolidon
HOBt	= N-hydroxybenzotriazol
MBHA	= p-methylbenzhydrylamin
PAM	= p-acetoxymethyl
Boc	= terc.-butoxykarbonyl
DMSO	= dimethylsulfoxid
DIEA	= diisopropylethylamin
Tos	= tosyl
OcHex	= cyklohexylester
4-MeBzl	= 4-methylbenzyl
OBzl	= benzylester
Bom	= terc.-benzyloxymethyl
Clz	= 2-chlorbenzyloxykarbonyl
Bzl	= O-benzyl
For	= formyl
Brz	= 2-brombenzyloxykarbonyl
TFA	= kyselina trifluoroctová
DMS	= dimethylsulfid
DCM	= dichlormethan
DMF	= N,N-dimethylformamid.

Peptidy "M15", "M35" a "M36,A" podle tohoto vynálezu se sestavují postupným způsobem na tuhém nosiči za použití syntetizátoru Applied Biosystems Model 431A Peptide Synthesizer, při použití standardní NMP/HOBt strategie aktivace v rozpouštědle v měřítku 0,1 mmol (malý rozsah).

Peptid "M34,A" se syntetizuje stejným způsobem s tím rozdílem, že se změní chránicí skupina, kterou je ϵ-Fmoc a Boc pro Lys. Proto jedna část peptidu se syntetizuje za použití Boc-chemie a druhá část se získá syntézou využívající Fmoc-chemie.

Funkční deriváty podle tohoto vynálezu se vyrábějí analogickým způsobem.

terc.-Boc-aminokyseliny se váží na pryskyřici terc.-Boc-aminokyselina-PAM (Nova Chemical Company Ltd., Velká Británie) pro volnou kyselinu (X znamená hydroxyskupinu) nebo p-methylbenzhydrylaminovou pryskyřici (Bachem Feinchemikalien AG, Švýcarsko) pro amid (X znamená aminoskupinu) jako estery hydroxybenzotriazolu (HOBt).

Individuální cyklus pro každou aminokyselinu zahrnuje odstranění chránicí skupiny z terc.-Boc-skupiny působením 50% kyseliny trifluoroctové v dichlormethanu po dobu 19 minut a acylaci s desetinásobným přebytkem (v porovnání k množství aminoskupin na pryskyřici) chráněných aminokyselin ve směsi 15% dimethylsulfoxidu v N-methylpyrrolidonu po dobu 35 minut. Mezi každou operací se provádí několikanásobné promývání dichlormethanem, diisopropylethylaminem a N-methylpyrrolidonem. Po každé interakční acylaci (koncovém připojení skupiny) se provádí zpracování s 10% anhydridem kyseliny octové a 5% diisopropylethylaminem v N-methylpyrrolidonu po dobu 5 minut.

S excencí Boc-Lys(Fmoc) v případě peptidu 34,A, všechny použité aminokyseliny byly terc.-Boc-chráněné na konci obsahujícím dusík (látky byly získány od firmy Nova Chemical Company Ltd., Velká Británie) a jejich reaktivní boční řetězce byly chráněny Tos v Arg, OcHex v Asp, 4-MeBzl v Cys, OBzl v Glu, Bom v His, ClZ v Lys, Bzl v Ser a Thr, For v Trp a Brz v Tyr.

Všechna rozpouštědla a jiné reagencie pro automatickou syntézu peptidů byly od firmy Applied Biosystems.

Reakční činidla používaná ve stupni odstranění chránicí skupiny a ve stupni štěpení měla jakost pro analýzu a používala se bez dalšího čistění:

1,2-ethandithiol, anhydrid kyseliny octové, kyselina trifluormethylsulfonová (TFMSA), dimethylsulfoxid a p-kresol byly od firmy Fluka, diethylether a acetonitril byly od firmy Merck a kyselina fluorovodíková pocházela od firmy AGA Gas.

Plně sestavené peptidové pryskyřice se sušily přes noc za vysokého vakua. Odstranění formylové skupiny na Trp a benzylových skupin se provádělo za použití metody "low TFMSA". K tomu se 100 mg peptidové pryskyřice zpracovalo se 2 ml směsi sestávající z 10 % kyseliny trifluormethylsulfonové, 50 % kyseliny trifluoroctové, 30 % dimethylsulfidu, 8 % p-kresolu a 2 % dimerkaptoethanu, za teploty 0 °C po dobu 2 hodin za třepání a poté se provedlo promytí ethanolem, dichlormethanem, dimethylformamidem, diisopropylethylaminem a dichlormethanem, dimethylformamidem a dichlormethanem.

Po vysušení za sníženého tlaku se peptid odštěpil od pryskyřice a chránicí skupiny se odstranily působením směsi 10 ml kapalné kyseliny fluorovodíkové, obsahující 20 % směsi p-kresolu a p-thiokresolu v poměru 1:1, na 1 g peptidové pryskyřice za teploty 0 °C během 60 minut. Pryskyřice se dvakrát promyla vždy 10 ml diethyletheru, peptidy se extrahovaly 20% acetonitrilem ve vodě a poté se provedla filtrace. Lyofilizace vodného filtrátu poskytla surový peprid.

Surový peptid se preparativně čistil vysoko účinnou kapalinovou chromatografií na sloupci reverzní fáze C18. 10 mg surového peptidu se rozpustilo v 1 ml 20% acetonitrilu ve vodě a gradientově eluovalo (po dobu 45 minut) 20 až 60% směsí 0,1% kyseliny trifluoroctové v acetonitrilu v 0,1% kyselině trifluoroctové ve vodě při rychlosti průtoku 2,0 ml/min. Frakce se zachytily podle absorpce stanované při vlnové délce 238 nm.

Čistota jednotlivých peptidů se zkoušela analytickou vysoko účinnou kapalinovou chromatografií a zjistilo se, že odpovídá 99 %. Molekolová hmotnost peptidů se stanovovala za použití spektrometru Plasma Desorption Mass Spectrometer (PDMS) Model Bioion 20, Applied Biosystems, přičemž výpočet hodnot molekulové hmotnosti se prováděl v každém případě pro vyčištěný peptid.

Tabulka

Čistota jednotlivých peptidů se zkoušela analytickou vysoko účinnou kapalinovou chromatografii a bylo zjištěno, že odpovídá 99 %. Molekulová hmotnost peptidů se stanovovala za použití spektrometru Plasma Desorption Mass Spectrometer (PDMS) Model Bioion 20, Applied Biosystems, přičemž v každém případě se dostaly očekávané hodnoty.

Galanin(1-12)-Pro-SP(5-11) amid (M15):
(molekulová hmotnost = 2199) IC_{50} = 0,1 nmol

1
Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-Gln-Gln-
1 5 10 12 5

20
-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-amid
7 11

Galanin(1-12)-Pro-spantid amid (C 7):
(molekulová hmotnost = 2827) IC_{50} = 0,2 nmol

1 13
Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-(D-Arg)-

22 23 24
-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-(D-Trp)-Phe-(D-Trp)-Leu-Leu-NH_2
spantid

Galanin(1-12)-Pro-Pro-Pro-SP(5-11) amid (M 37):
(molekulová hmotnost = 2392) IC_{50} = 40 nmol

```
1                5                                   12
Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-Pro-Pro-

                              22
-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-amid
 5                            11
```

Galanin(1-13)-Ala-Leu-Ala-Leu-Ala-Leu-Ala amid (M 38):
(molekulová hmotnost = 1970) IC_{50} = 0,2 nmol

```
1                5                                      13
Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-Ala-Leu-

                     20
-Ala-Leu-Ala-Leu-Ala-amid
```

Galanin(1-12)-Pro-Pro-Pro-Ala-Leu-Ala-Leu-Ala amid (M 40):
(molekulová hmotnost = 1980) IC_{50} = 13 nmol

```
1                5                                      13
Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-Pro-Pro-

                     20
-Ala-Leu-Ala-Leu-Ala-amid
```

Galanin(1-13)-Bradykinin(3-9) amid (M 20):
(molekulová hmotnost = 2135) IC_{50} = 1 nmol

```
1                                                       13
Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-Pro-Gly-
                                                          3

                     20
-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg-amid
                     9
```

Galanin(1-13)-Bradykinin(2-9) amid (M 35):
(molekulová hmotnost = 2232) IC_{50} = 0,2 nmol

1 13
Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-Pro-Pro-
2

21
-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg-amid
9

Galanin(1-13)-NPY(25-36) amid (M 32):
(molekulová hmotnost = 2961) IC_{50} = 0,05 nmol

1 13
Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-Arg-His-

25
-Tyr-Ile-Asn-Leu-Ile-Thr-Arg-Gln-Arg-Tyr-amid
36

Galanin(1-12)-Ala-NPY(25-36) amid (M 88):
(molekulová hmotnost = 2935) IC_{50} = 1 nmol

1 13
Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Ala-Arg-His-
25

25
-Tyr-Ile-Asn-Leu-Ile-Thr-Arg-Gln-Arg-Tyr-amid
36

Galanin(1-12)-Pro-Pro-Pro-leuenkephalin(1-5) amid (M 36):
(molekulová hmotnost = 2078) IC_{50} = 40 nmol

1 12
Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-Pro-Pro-

```
                    20
-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-amid
 1                  5
```

Galanin(1-12)-Pro-Pro-Pro-leuenkephalin(5-1) amid (M 41):
(molekulová hmotnost = 2078) IC_{50} = 20 nmol

```
1                                                  12
Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-Pro-Pro-

                    20
-Leu-Phe-Gly-Gly-Tyr-amid
 5                  1
```

Galanin(1-13)-Lys amid (Pro-leuenkephalin(5-1)) (M 34,A):
(molekulová hmotnost = 2223) IC_{50} = 10 nmol

```
1                                                    13
Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-
N-koncova' skupina

 14
-Lys-amid
   |
  Pro-Leu-Phe-Gly-Gly-Tyr
      5                1
```

IC_{50} se stanovuje při pokusech vytěsňování na hypothalamu krysy.

Farmakologické pokusy

1. Galanin inhibuje uvolňování inzulinu, které je vyvoláno glukózou, co se měří jak popsal B. Ahrén a kol. (Biochemical and Biophysical Research Communications, sv.

140, č. 3, 1059 - 1063 /1986/). Za použití stejného způsobu, jako v citované publikaci B. Athéna a kol., peptid podle tohoto vynálezu, M15, nyní ukazuje schopnost zabránit uvolňování inzulinu inhibovanému galaninem v ekvimolární koncentraci.

Zvířata a příprava buněk

Dospělé obézní hyperglykemické myši (ob/ob) obého pohlaví se odeberou z lokální kolonie bez takových vrozených vlastností a nechají hladovět přes noc. Zvířata se usmrtí oddělením hlavy a ostrůvky se izolují technickým způsobem, založeným na izolaci vyvolané použití kolagenázy. Suspenze buněk se připraví v podstatě jak popsal . Lehrnmark v Diabetologia 10, 431 - 438 /1974/. Krátce skrnuto, ostrůvky se oddělí v jedinotlivých buňkách a malé shluky se třepou v různých prostředích Ca^{2+} - Mg^{2+} doplněných ethylenglykol--bis(β-aminoethyletherem) kyseliny N,N,N',N'-tetraoctové (EGTA, Sigma). Poté se buňky inkubují za teploty 37 °C a hodnoty pH 7,4 přes noc ve 12 ml prostředí RPMI 1640 (prostředí tkáňové kultury od firmy Sigma, které obsahuje L-glutamin a neobsahuje hydrogenuhličitan sodný) doplněného 10% NU-serum™ (Collaborative Research Inc., Lexington, Massachusetts, USA), 100 mezinárodními jednotkami na ml penicilinu, 60 µg/ml gentamycinu a 100 µg/ml streptomycinu. Aby se vyhnulo ulpění buněk na kultivačních baňkách během inkubace, suspenze se opatrně třepe.

Prostředí

Použitým základním prostředím je HEPES pufr (pufr na bázi kyseliny N-(2-hydroxyethyl)-piperazin-N'-(2-ethansulfonové), Sigma) o hodnotě pH 7,4, který je fyziologicky vyvážen v kationtech s Cl^- jako jediným aniontem. Ve všech případech je základní prostředí doplněno 1 mg/ml albuminu.

Měření uvolňování inzulinu

Kinetika uvolňování inzulinu se studuje při promývání pankreatických β-buněk (přibližně 10^6) 20 mmol nebo 5 mmol glukózy smíšené s polyakrylamidovými kuličkami Bio-Gel P-4 (velkost 0,074 až 0,038 mm, Bio-Rad Lab., Richmond, Kalifornie, USA) na 0,5ml koloně. Rychlost průtoku činí 0,5 ml/min, frakce vzniklé během 1 až 3 minut se zachycují a analýzují na inzulin za použití krystalického inzulinu získaného z krysy jako referenčního vzorku.

Výsledky

Po inkubaci trvající 60 minut v přítomnosti 8,3 mmol glukózy, galanin (10^{-7} mol) velmi omezí uvolňování inzulinu, z 34 ± 2 μU/ml na 3 ± 1 μU/ml ($P < 0,001$, $N = 32$).

Peptid podle tohoto vynálezu, samotný M15 (10^{-6} až 10^{-9} mol) v závislosti na dávce působí proti inhibici uvolňování inzulinu vyvolané galaninem.

Uvolňování inzulinu v přítomnosti glukózy, galaninu a M15 při koncentraci 10^{-6}, 10^{-7} a 10^{-8} mol činí 28 ± 2 μU/ml ($N = 16$), 17 ± 4 μU/ml ($N = 16$) a 10 ± 3 μU/ml ($N = 16$). M15 v koncentraci 10^{-9} mol je bez účinku.

Z výsledků uvedených výše se může vyvodit, že peptid podle tohoto vynálezu, M15, působí proti inhibici uvolňování inzulinu vyvolané galaninem v ostrůvcích.

2. Galanin inhibuje uvolňování acetylcholinu, jak se změří podle G. Fisone a kol. (Proc. Natl. Acad. Sci. 84, 7339 - 7343 /1987/). Za použití v podstatě stejného postupu, jako uvedl G. Fisone a kol. v práci citované výše, peptid

podle tohoto vynálezu, M15, nyní vykazuje učinek působící proti inhibičním účinkům galaninu na uvolňování acetylcholinu vyvolané scopolaminem in vivo.

Pokusy s mikrodialýzou

Operační zákrok a základní metodologie

Pokusy se provádějí s krysami CD-COBS (Charles River, Como, Itálie) samčího pohlaví, o hmotnosti 200 až 260 g. Zvířata se anestetizují equitensinem (1 % pentobarbitalu a 4 % chloralhydrátu). Zaváděcí kanyla se implantuje stereotoxikálně do ventrálního hippokampu podle těchto souřadnic z prvního krčního obratle podle Paxinose a Watsona (G. Paxinos a C. Watson, The Rat Brain in Stereotoxic Coordinates, 2. vyd., Academic Press, Sydney /1986/): 5 mm za bregma, 4,0 mm bočně ke středové čáře a 6,8 mm pod povrch lebečnice. Pátrací jehla se potom zavede, aby se udržela zaváděcí kanyla otevřená po následující den. Současně se odstraní pátrací jehla a nahradí se zařízením pro zkoušení mikrodialýzy (CMA 10, Carnegie Medicine AB, Stockholm, Švédsko) obsahujícím membránu, která má odkrytou plochu 3 x 0,5 mm. Zařízení pro zkoušení mikrodialýzy se protáhne 3 mm za konec zaváděcí kanyly a promývá konstantní rychlostí 2 µg/min Ringerovým roztokem (147 mmol chloridu sodného, 2,2 mmol chloridu vápenatého a 4,0 mmol chloridu draselného), který obsahuje 10 µmol sulfátu fysostigminu a je upraven na hodnotu pH 10 hydroxidem sodným. Kapalina zachycená během počátečních 40 minut promývání se odloží. Poté se promývací kapalina zachycuje každých 20 minut během celého promývání trvajícího po dobu 260 minut. Na konci období zachycování se vzorky ihned zchladí tuhým oxidem uhličitým a lyofilizují. Obsah acetylcholinu se stanoví kvantitativně radioemzymatickou metodou, kterou podrobně popsal S. Consolo a kol. (J. Neurochem. 48, 1459 - 1465 /1987/) a C. F. Wu a kol.

(Neurobiol. Aging 9, 357 - 361 /1988/), a která zahrnuje

a) převedení cholinu na fosforylcholin v přítomnosti fosfokinázy cholinu a ATP,

b) enzymatickou hydrolýzu acetylcholinu na cholin a kyselinu octovou,

c) reacetylaci výsledného cholinu na [^{3}H]acetylcholin přidáním 99,9 GBq/mmol [^{3}H]acetylkoenzymu-A a acetylkoenzymu A:ChAT a

d) oddělení a vyhodnocení scintilačním počítačem výsledného [^{3}H]acetylchlolinu, extrakci do ketonové fáze obsahující tetrafenylbor iontoměničovou chromatografií z kapaliny do kapaliny. Fosforylační, hydrolýzační a acetylační reakce jsou hodnoceny jako běžná opatření.

Koncentrace acetylcholinu v každém vzorku se vypočítá lineární regresí, založenou na radioaktivitě standardů (lineární od 10 fmol do 25 pmol acetylcholinu). Relativní směrodatná odchylka z opakovaně odebraných vzorků nebo acetylcholinového standardu je přibližně 3 %.

Acetylcholin získaný in vitro třemi dialyzačními hadicemi se stanoví jak bylo již dříve popsáno (C. F. Wu, citováno výše). Průměrný výsledek je 17,6 ± 0,5 %.

Při ukončení příbuzných pokusů se místa použitá ke zkouškám dialýzy prověří hystologicky vyvoláním skvrn pro Nissl-substanci.

Účinek galaninu a M15 na uvolňování acetylcholinu, které je vyvoláno scopolaminem, měřené in vivo z ventrálního hippokampu krysy

fyziologický roztok	2,0 pmol
scopolamin	13,1 pmol
scopolamin + galanin	6,9 pmol
scopolamin + M15	9,4 pmol

1,56 nmol galaninu a 3,12 nmol M15 se injekčně i.c.v. zavede 2 minuty před subkutánním podáním 0,3 mg/kg scopolaminu. Uvolňování acetylcholinu se měří v promývací kapalině zachycené během následujících 80 minut ve čtyřech frakcích, získaných vždy během 20 minut. Hodnoty vyjadřené jako pmol acetylcholinu změřeného ve frakcích zachycených během 20 minut odpovídají vrcholům účinku scopolaminu a odpovídají frakcím zachyceným během druhých 20 minut. Hodnoty jsou průměrem z pokusů prováděných na dvou krysách (N = 2).

Jako výsledek z výše popsaného pokusu se může vyvodit, že peptid podle tohoto vynálezu, M15, působí proti galaninem vyvolané inhibici uvolňování acetylcholinu v hippokampu, které bylo vyvoláno scopolaminem.

3. Účinky intratekálního galaninu a stimulace C-flákna na reflex ohybače popsal Z. Wiesenfeld-Hallin a kol. (Brain Res. 486, 205 - 213 /1989/). Za použití v podstatě stejného způsobu, jako je popsán v citované literatuře, se ukazuje, že peptid podle tohoto vynálezu, M15, má antagonistický účinek na intratekální usnadnění reflexu ohybače vyvolaného galaninem. Při výše popsaném pokusu, jiný peptid podle tohoto vynálezu, M35, poskytuje podobné výsledky.

Elektrofyziologická studie

Při kritických pokusech velikost reflexu ohybače polysynaptické podkolení šlachy v odezvu na aktivaci vysokého práhu přivodních dráh se zkouší na decelebrovaných, spinálních, neanestetizovaných krysách zaznamenáváním elektromyogramu (EMG) z posteriornich bicepsových steheních/pološlašitých svalů. Zvířata se krátce anestetizují Breitalem^{R} a zavede se průdušnicová kanyla. Krysy se umístí do stereotaxického rámu, zbaví mozku odsátím předního a středního mozku a potom ventilují. Micha se podrobí laminektomii v úrovni hrudníku a nařízne se Th_{8-9}. Intratracheální (i.t.) katetr se implantuje kaudálně průřezem s koncem na levé straně bederní míchy (L_{4-5}). Reflex ohybače se hodnotí stimulačním testem na lýtkovém nervu nebo na jeho inervační ploše jednotlivými elektrickými šoky (0,5 ms, 10 mA) o dostatečné síle k aktivaci C-vláken (Wall a Woolf /1984/). V některých pokusech se podmíněný stimul (CS) (1 Hz, 20 s) o stejné síle jako při stimulačním testu zavádí do lýtkového nervu.

Reflex ohybače se zaznamenává jako aktivita na elektromyogramu přes jehlové elektrody z nerezavějící oceli, které jsou zavedeny do šlachových svalů vyskytujících se na stejné straně těla. Počet akcí potenciálu projevujících se během reflexu se integruje během 2 sekund. Integrovaný reflex se zaznamenává na záznamníku Gould chart recorder Model 2400 S. Během pokusů se sleduje srdeční rychlost a rektální teplota a udržuje se v obvyklém rozmezí. Vlastní umístění intratracheálního katetru se potvrzuje po každém pokusu laminektomií.

Galanin (Bachem, Bubendorff, Švýcarsko) a somatostatin (Ferring, Malmö, Švédsko) se rozpustí v 0,9% roztoku chloridu sodného. Všechny peptidy se zavádějí i.t. v objemu 10 µl a poté se provede propláchnutí kanyly 10 µl fyziologického roztoku chloridu sodného.

Shrnutí hodnot

Velikost stabilního základního reflexu se stanovuje během posledních 20 minut před každou i.t. injekcí nebo podmíněným stimulem nervu. Účinek i.t. zavedených peptidů nebo podmíněného stimulu nervu na reflex ohybače se vyjadřuje jako procentuální změna velikosti reflexu, v porovnání k základní hodnotě, za kterou je pokládána hodnota 100 %. K testování interakce galaninu s jinými peptidy nebo podmíněným stimulem lýtka se podávají 1 5 minut před injekcí jiných peptidů, když usnadňující účinek galaninu odezněl nebo byl současně s podmíněným stimulem lýtka.

Měří se antagonistický účinek i.t. zavedeného M-15 na i.t. usnadnění reflexu ohybače vyvolaného galaninem. Vrchol usnadňujícího účinku při 30 pmol činí 167 ± 42,8 %, nad základní hodnotou velikosti reflexu. Antagonismus M15, který byl zaveden 5 až 10 minut po galaninu, se vypočítá jako procentuální snížení vrcholného usnadňujícího účinku galaninu. Hodnoty se vyjadřují jako pomocí S.E.M.

Dávka M15	n	% antagonizmu
30 pmol	4	35,8 ± 20,7
300 pmol	4	79,3 ± 8,4
3 nmol	3	93,0 ± 3,4

Pokusy se opakují za použití peptidu podle vynálezu M35 a dosáhnou se podobné výsledky.

Jako výsledek pokusů popsaných výše se může vyvodit závěr, že peptidy podle tohoto vynálezu působí proti intratekálnímu usnadnění vyvolanému galaninem při způsobu

závislém na dávce.

4. Studie vázání ligandu se provedou tím, že se vytěsní ^{125}I-galanin galaninem, galaninovým fragmentem (1-13), fragmentem (4-11) substance P nebo galaninovým fragmentem (1-13) + fragmentem (4-11) substance P v ekvimolárních koncentracích a studiují se peptidy podle tohoto vynálezu, M15, M35 a M34,A. Peptidy podle tohoto vynálezu se dokáží specificky vázat ke galaninovému receptoru.

Způsob výroby prasečího ^{125}I-monojod-Tyr^{26}-galaninu

Syntetický prasečí galanin(1-29) se joduje způsobem využívajícím chloramin T za vzniku prasečího ^{125}I-monojod--Tyr^{26}-galaninu (specifická aktivita 6660.10^{10} až 7400.10^{10} s^{-1}, jak popsal T. Land a kol. v Methods in Neurosciences, vyd. M. Conn, 5, 225 - 234 /1991/) a použije ke studii vázání ligandu, provedené při ekvilibraci.

Způsob výroby membránové frakce z buněk Rin m 5F

Stanovení buněk a buněčná kultura Rim m 5F (krysí pankreatická buněčná linie β-tumoru) je již popsáno (A. F. Gazdav a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 3519 - 3523 /1980/). Krátce zhrnuto, buňky se nechají růst v prostředí RPMI 1640 (Gibco), které obsahuje 10 % objemových fetálního telecího sera, 2,06 mmol L-glutaminu, 100 mezinárodních jednotek na ml penicilinu a 100 µg/ml streptomycinu pod směsí 10 % oxidu uhličitého a 90 % vzduchu za teploty 37 °C. Pasážování se provádí každých 5 dní. Buňky se oddělí z povrchu baňky za použití 0,25% trypsinu obsahujícího 1 mmol EDTA a odstřeďují při 2000 g po dobu 5 minut za teploty 4 °C. Pelety se vystaví na dobu 15 minut hypoosmnoticky 5 mmol HEPES pufru (o hodnotě pH 7,4). Suspenze se odstřeďuje při

20 000 g po dobu 15 minut, výsledné pelety se resuspenduji v Krebs-Ringerově roztoku (137 mmol chloridu sodného, 2,68 mmol chloridu draselného, 1,8 mmol chloridu vápenatého a 1 g/l glukózy) o hodnotě pH 7,4, který obsahuje 1 mg/mg bacitracinu a je pufrován 5 mmol HEPES, a použije se bezprostředně při ekvilibrovaných pokusech s vázáním.

Vytěsňování ^{125}I-galaninu galaninem a ligandy galaninového receptoru

Vytěsňovací pokusy se provádějí při konečném objemu 400 µl Krebs-Ringerova roztoku, který obsahuje 1 mg/ml bacitracinu a je pufrován 5 mmol HEPES, 0,05 % hmotnostně objemových BSA o hodnotě pH 7,4, v přítomnosti 0,1 až 0,2 nmol ^{125}I-galaninu. Připraví se membrána a zvyšují se koncentrace (z 10^{-12} na 10^{-6} mol) neznačeného prasečího galaninu nebo jiných ligandů galaninového receptoru. Vzorky se inkubují za teploty 37 °C po dobu 30 minut. Inkubace se ukončí přidáním 10 ml ledem chlazeného Krebs-Ringerova roztoku pufrovaného HEPES, poté se provede rychlá filtrace přes filtry Whatman GF/C a převrstvení na dobu 5 až 6 hodin v objemově 0,3% roztoku polyethyleniminu. Filtry se promyjí 10 ml zkušebního roztoku. Radioaktivita zachycená na filtru se stanoví čítačem záření gama Packard. Specifické vázání je definováno jako vázání vytěsnitelné 1 µmol galaninu (nebo příslušnou koncentrací vytěsňujícího činidla).

Hodnoty IC_{50} vytěsňujících ligandů se vypočítají z hodnot IC_{50} vytvořených na počítači, jak popsal T. Land a kol. (citováno výše).

Hodnocení pokusných údajů se provádí podle Macintoshe SE, nelineární metodou nejmenších čtverců za použití Macintoshova programu "KaleidGraph".

Vytěsňování ^{125}I-galaninu z membrán Rin m 5F ligandů galaninového receptoru

	IC_{50}
Galanin(1-29)	1 nmol
M15	0,1 noml
galaninový fragment (1-13)	100 nmol
fragment (4-11) substance P	nevytěsněno > 10 µmol
galaninový fragment (1-13) + fragment (4-11) substance P v ekvimolárních koncentracích	100 nmol
M35	0,1 nmol
M34,A	10 nmol

Jak je zřejmé z výše uvedených pokusů, peptidy podle tohoto vynálezu jsou ligandy galaninového receptoru.

Framakologické pokusy 1, 2 a 3 tak ukazují, že peptidy podle tohoto vynálezu jsou galaninovými antagonisty a pokus 4 ukazuje, že jsou ligandy galaninového receptoru. Tak galaninové antagonistry podle tohoto vynálezu jsou ligandy galaninového receptoru a na rozdíl od jiných sloučenin, které byly dříve uváděny k antagonizaci, specifický účinek galaninu ve zvláštní tkáni dává přednost interakci s reakčním stupněm mimo galaninový receptor, co je vyžadováno u biologického účinku galaninu v daném typu buňky. Takový antagonizmus není specifický pro účinek galaninu a není použit u galaninového receptoru. Není také použitelný pro některé tkáně, kde galanin působí, zatímco antagonisté podle tohoto vynálezu jsou při dobré vůli antagonisty ve farmakologickém významu a projevují svůj účinek v místě receptoru mimo buňku při konkurování endogennímu ligandu.

Způsob výroby membrán z hypotalamu krys

Dospělé krysy (kmene Sprague-Dawley o hmotnosti 180 až 200 g) samčího pohlaví se usmrtí oddělením hlavy, z každé se rychle nařeže hypotalamus a homogenizuje (10% hmotnostně objemových) v 0,05 mol Tris-Cl pufru o hodnotě pH 7,4. Homogenát se desetinásobně zředí a odstřeďuje při 1000 g po dobu 10 minut. Supernatant se odstřeďuje při 10 000 g po dobu 45 minut a pelety se resuspendují v 5 ml Krebs-Ringerova roztoku (137 mmol chloridu sodného, 2,68 mmol chloridu draselného, 1,8 mmol chloridu vápenatého a 1 g/l glukózy) o hodnotě pH 7,4, pufrovaného 5 mmol HEPES. Dosáhne se konečné koncentrace proteinu v rozmezí od 1,0 do 1,5 mg/ml.

Studie vázání ligandu v hypotalamu krysy

Pokusy vedoucí k vytěsnění se provádějí při konečném objemu 400 µl Krebs-Ringerova roztoku pufrovaného 5 mmol HEPES, s 0,05% hmotnostně objemového BSA o hodnotě pH 7,4, doplněného 1 mg/ml bacitracinu v přítomnosti 0,1 až 0,2 nmol ^{125}I-galaninu. Připraví se membrána z hypotalamů krys a zvyšují se koncentrace (z 10^{-12} na 10^{-6} mol) neznačeného galaninu nebo jiných ligandů galaninového receptoru. Vzorky se inkubují za teploty 37 °C po dobu 30 minut. Inkubace se ukončí přidáním 10 ml ledem chlazeného Krebs-Ringerova roztoku pufrovaného HEPES, poté se provede rychlá filtrace přes filtry Whatman GF/C a převrstvení po dobu 5 až 6 hodin v objemově 0,3% roztoku polyethyleniminu. Filtry se promyjí 10 ml zkušebního roztoku. Radioaktivita zachycená na filtru se stanoví čítačem záření gama Packard. Specifické vázání je definováno jako vázání vytěsnitelné 1 µmol galaninu. Krysí a prasečí galanin způsobuje nerozeznatelné vytěsňovací křivky s membránami z krysího hypotalamu.

Hodnoty IC_{50} vytěsňujících ligandů se vypočítají

hodnocením pokusných údajů podle Macintoshe SE, nelineární metodou nejmenších čtverců za použití Macintoshova programu "KaleidGraph".

JUDr. Ivan KORECEK
Advokátní a patentová kancelář
110 09 Praha 1, Jungmannova 16

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Galaninový antagonista, kterým je ligand galaninového receptoru.

2. Galaninový antagonista podle nároku 1, kde tento antagonista je zvolen ze souboru sestávajícího z peptidů vzorce

H-Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-
-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH_2,

H-Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-
-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg-X,

H-Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-
-Pro-Pro-Leu-Phe-Gly-Gly-Tyr-X a

H-Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-
-Lys-X
|
Pro-Leu-Phe-Gly-Gly-Tyr-X,

X představuje aminoskupinu nebo hydroxyskupinu (amid nebo volná kyselina) a

jejich funkčních analogů a jejich funkčních derivátů.

3. Peptid zvolený ze souboru sestávajícího z

H-Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-
-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH_2,

H-Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-

-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg-X,

H-Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-
-Pro-Pro-Leu-Phe-Gly-Gly-Tyr-X a

H-Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-
-Lys-X
|
Pro-Leu-Phe-Gly-Gly-Tyr-X,

kde

X představuje aminoskupinu nebo hydroxyskupinu (amid nebo volná kyselina) a

jejich funkčních analogů a jejich funkčnich derivátů, které projevují v podstatě stejný galaninový antagonistický účinek jako uvedené peptidy.

4. Způsob výroby galaninového antagonisty podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že

a) postupně se jednotlivě zavedou v tuhé fázi požadované aminokyselinové zbytky do rostoucího peptidového řetězce nebo

b) postupně se vážou aminokyseliny ve fázi roztoku za použití příslušně derivátovaných aminokyselin.

5. Použití galaninového antagonisty, kterým je ligand galaninového receptoru, k výrobě farmaceutického prostředku.

6. Galaninový antagonista, kterým je ligand galaninového receptoru, k použití pro farmaceutický prostředek.

7. Farmaceutický prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje galaninového antagonistu, kterým je ligand galaninového receptoru, jako účinnou látku, společně s farmaceuticky přijatelnou přísadou nebo přísadami.

JUDr. Ivan KORBEL
Advokátní a patentová kancelář
110 00 Praha 1, Jungmannova 16