

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 930342 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **930342**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
C07K 7/06

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **28.05.1992**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **27.01.1993**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **27.01.1993**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - **28.05.1992 PCT/US1992/004484**
Internationell ansökan - International
application

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

03.06.1991 US 708035

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Immunobiology Research Institute Inc., Route 22 East, P.O. Box 999, Annandale, NJ 08801, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Goldstein, Gideon, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 • Audhya, Tapan, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

3 • Heavner, George, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

4 • Anwer, Mohmed K., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

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

Immuunijärjestelmää ja hermostoa sääteleviä pentapeptidejä

Pentapeptider som reglerar immun- och nervsystem

Immuunijärjestelmää ja hermostoa sääteleviä pentapeptidejä

Tämä keksintö koskee yleisesti peptidejä, jotka ovat hyödyllisiä hoidettaessa vanhenemista ja immuunijärjestelmän ja keskushermoston epänormaaleja tiloja.

Keksinnön tausta

Immuunijärjestelmää moduloiva proteiini tymopoietiini on eristetty naudan ja ihmisen kateenkorvasta. Lisäksi on syntetetoitu kemiallisesti pieniä peptidejä, jotka jäljittelevät tymopoietiinin biologista aktiivisuutta. Katso esimerkiksi US-patenttijulkaisu 4 505 853 ja vastaava EP-hakemusjulkaisu nro 146 266.

Nyt on julkaistu suuri joukko artikkeleita ja patentteja, jotka koskevat sellaisia proteiineja ja syntetoituja peptidejä. US-patenttijulkaisu nro 4 190 646 paljastaa tymopentiini-pentapeptidin, joka on tymopoietiinin aktiivinen kohta ja jolla on sekvenssi Arg-Lys-Asp-Val-Tyr, samoin kuin peptidikoostumuksia, joissa tämän pentapeptidin amino- ja/tai karboksyyli-päähän substituoidaan erilaisia ryhmiä.

Tymopoietiinin tiedetään säätelevän kolinergistä välittymistä hermosta lihakseen [G. Goldstein ja W. H. Hoffman, J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry, 31, 453 - 459 (1968); ja G. Goldstein, Nature, 247:11 - 14 (1974)]. Tämän hermo-lihas-vaikutuksen aiheuttaa tymopoietiinin sitoutuminen nikotiini-asetyylikoliinireseptoriin, ligandin säätelemään ionikanavaan selkärankaisten hermon ja lihaksen välisessä liitoksessa ja kalan sähköelimeen [F. Revah ym., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:3477 - 3481 (1987); ja K. Venkatasubramanian ym., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:3171 - 3174 (1986)]. Tymopoietiini on läsnä aivoissa, kuten myös tymopoietiinireseptorit (TPR), niin että tymopoietiini on lähes varmasti osallisena aivojen toiminnassa.

Tämän jälkeen on tunnistettu, että tymopentiini on stressin aikaansaamien muutosten antagonistti ja sillä on stressiltä suojaavaa vaikutusta [V. Klusa ym., Regulatory Peptides, 27:355 - 365 (1990)].

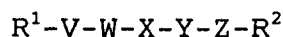
5 Alalla on edelleen tarvetta lisäpeptideille diagnostisina ja/tai terapeuttisina aineina, jotka ovat hyödyllisiä, kun halutaan hoitaa immuunijärjestelmän toimintahäiriöitä nisäkkäissä, mukaan lukien ne, jotka ovat osallisena ikääntymisessä ja erilaisissa ruumiillisissa tiloissa, samoin kuin peptideille, jotka ovat hyödyllisiä, 10 kun halutaan hoitaa aivojen toimintojen häiriöitä.

Keksinnön yhteenveto

Tämä keksintö kuvaa sarjaa uusia pentapeptidejä, jotka kykenevät säätelemään immuunijärjestelmän ja keskus- 15 hermoston solujen toimintaa ja joita karakterisoi epätavallisen suuri immunomodulaattoriaktiivisuus tunnettuihin peptideihin verrattuna.

Yhtenä aspektina tämä keksintö koskee uusia pentapeptidejä, joilla on seuraava kaava:

20



25 tai niiden farmaseuttisesti soveliaita happo- tai emäsditiosuoloja, joissa R^1 , V, W, X, Y ja Z ovat alla olevan yksityiskohtaisen kuvauksen mukaisia. Proliinin (tai proliinianalogin) läsnäolo tämän keksinnön peptidien kohdassa 4 (tai Y:ssä) antaa peptideille lisääntyneen vastustuskyvyn entsyymeille verrattuna niihin pentapeptideihin, joilla on samanlaisia aminohappokoostumuksia kohdassa nro 30 1 - 3 ja 5. Täten keksinnön peptideilla on suurempi in vivo -teho suun kautta annettuna tekniikan tason peptideihin verrattuna.

Toisena aspektina tämä keksintö tarjoaa menetelmiä, joilla voidaan valmistaa yllä kuvatut peptidit liuossyn-

teesillä, kiinteän faasin synteessillä tai entsyymaattisella synteessillä.

5 Vielä toisessa aspektissa tämä keksintö tarjoaa farmaseuttisia koostumuksia, jotka sisältävät yhden tai useamman yllä nimetyn peptidin yhdessä farmaseuttisesti soveliaan kantajan kanssa.

10 Vielä toinen tämän keksinnön aspekti tarjoaa menetelmiä, joilla voidaan hoitaa monia erilaisia immuunijärjestelmään liittyviä häiriöitä tai vajavaisuuksia, erityisesti ikääntymisen vaikutuksia, jotka aiheutuvat ka-
teenkorvan kutistumisesta ajan myötä, ja psykiatrisia häi-
riöitä, kuten ahdistusta ja masennusta, jotka sisältävät
sen, että kohteelle, joita nämä vaivaavat, annetaan teho-
kas määrä tämän keksinnön farmaseuttista koostumusta.

15 Muita tämän keksinnön аспектеja ja etuja paljaste-
taan seuraavassa yksityiskohtaisessa kuvauksessa, joka
sisältää tämänhetkisten edullisten suoritusmuotojen esi-
merkkejä.

Kuvioiden lyhyt kuvaus

20 Kuvio 1 on pylvasdiagrammi, joka havainnollistaa
tymopentiinin ja asetyyli-Arg-Pro-Asp-Pro-Phe-NH₂:n (pepti-
di IRI-514), jotka on saatettu kosketuksiin pohjukaissuo-
len kanssa diffuusiokammiossa 0, 2 ja 4 tunnin ajan, ent-
syymaattista stabiiliutta, kuten esimerkissä 19 kuvataan.

25 Kuvio 2 esittää suun kautta annetun peptidin IRI-
514 annosresponssivaikutusta hermosta lihakseen tapahtu-
vaan välittymiseen, kynnsarvona 0,05 mg/kg, kuten esimer-
kissä 18 kuvataan.

30 Kuvio 3 esittää yhteenvetona neljä koetta, joissa
arvioidaan niiden solujen kykyä, jotka ovat peräisin pep-
tidillä IRI-514 käsitellyistä ja plasebolla käsitellyistä
eläimistä, saada aikaan T-suppressorisoluja, kuten esimer-
kissä 19 kuvataan.

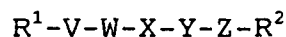
35 Kuvio 4 havainnollistaa peptidin IRI-514, vehikke-
lillä käsiteltyjen ja kontrollin (ei-stressattu) vaiku-

tuksia käyttäytymisresponssiin sosiaalisen stressin laukaiseman ahdistuksen jälkeen rotissa, kuten esimerkissä 20 kuvataan.

Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus

5 Tämä keksintö tarjoaa peptidejä, jotka kykenevät säätelemään nisäkkään immuunijärjestelmää ja/tai keskushermostoa ja vaikuttamaan siihen. Näillä pentapeptideillä on osoitettu olevan biologista aktiivisuutta hermo-lihasmäärityksessä, anti-CD3:n stimuloiman T-suppressorisolujen kehityksen tehostamisessa, stressin laukaiseman HPA-akseli-hormonien tason nousun lieventämisessä, ja stressin indusoimien käyttäytymismuutosten estämisessä. Näitä pentapeptidejä karakterisoi lisäksi yllättävä teho suun kautta annettaessa, toisin kuin muita tunnettuja peptidejä.

Tämä keksintö tarjoaa joukon uusia pentapeptidejä, joilla on seuraava kaava:



20 tai niiden farmaseuttisesti soveliaita happo- tai emäsadditiosuoloja, joissa R^1 on vety tai C_{1-10} -alempi alkyyli tai alkanoyyli;

V on Arg;

25 W on Pro, dehydro-Pro tai hydroksi-Pro;

X on Asp, Ser, Thr, Ala, Asn, Glu tai Gln;

Y on Pro, dehydro-Pro tai hydroksi-Pro;

Z on Phe tai Tyr, mahdollisesti substituoitu yhdellä tai useammalla halogeeni-, nitro- tai hydroksyyli ryhmällä;

30 ja R^2 on OH tai NR^3R^4 ,

jossa R^3 ja R^4 kukin voivat olla toisistaan riippumatta H, suoraketjuinen tai haarautunut alkyyli tai alkenyyli, jossa on 1 - 6 hiiliatomia, mahdollisesti substituoitu aryyli-ryhmällä tai aryyli-ryhmällä, joka on substituoitu

joko halogeenilla tai suoralla ketjulla, haarautuneella alkyylillä tai alkenyyllillä, jossa on 1 - 6 hiiliatomia, tai R^3 ja R^4 yhdessä muodostavat 3 - 7 hiiliatomin syklisen metyleeniryhmän, ja

5 jossa mahdollisesti yksi seuraavista: V, W, X, Y ja Z on D-aminohappo.

Koko tässä paljastuksessa peptidien aminohappokomponentit ja tietyt niiden valmistuksessa käytetyt materiaalit nimetään mukavuuden vuoksi lyhenteillä. Useimmat aminohappojen kolmikirjaimisista lyhenteistä ovat sinänsä tunnettuja. Kuten yllä osoitetaan, kaikki yllä olevassa kaavassa olevat aminohapot ovat normaalisti L-isomeerisessä konfiguraatiossa; kuitenkin missä tahansa tietyssä peptidissä yksi tai useampi aminohappo voi olla D-isomeerisessä konfiguraatiossa.

Näiden kaavojen peptideitä, joilla on Pro tai sen analogi aminohappokohdassa 2 ja aminohappokohdassa 4, karakterisoi tehostunut stabiilius ja resistenssi endo- ja eksopeptidaasien ja trypsiinin kaltaisten entsyymien hajottavalle vaikutukselle ruuansulatuskanavassa ja seerumissa. Tämä tehostunut vastustuskyky entsyymaattista pilkkomista kohtaan suolistossa tekee sellaisista peptideistä erityisen hyvin soveltuvia suun kautta annettavaksi, mikä antaa peptideille yllättävän tehon muihin tunnettuihin peptideihin verrattuna. Koska nämä peptidit ovat erittäin aktiivisia suun kautta annettavina annoksina, ne soveltuvat erityisen hyvin farmaseuttista valmistusta varten tablettimuodossa.

Yksi edullinen pentapeptidi on asetyyli-Arg-Pro-Asp-Pro-Z-NH₂, jossa Z voi olla Tyr tai mahdollisesti substituoituja Phe-valintoja. Tällä hetkellä edullisin pentapeptidi on asetyyli-Arg-Pro-Asp-Pro-Phe-NH₂ [SEQ ID nro 1], jota kutsutaan nimellä IRI-514. Yllättävää kyllä, tällä peptidillä on suuri teho suun kautta annettuna.

Näin ollen tämän keksinnön erityisen edullisiin peptideihin kuuluvat:

- 5 asetyyli-Arg-Pro-Asp-Pro-Phe-NH₂ [SEQ ID nro 1]
 asetyyli-Arg-Pro-Asp-Pro-Tyr-NH₂ [SEQ ID nro 2]
 asetyyli-Arg-Pro-Asn-Pro-Phe-NH₂ [SEQ ID nro 3]
 asetyyli-Arg-Pro-Asn-Pro-Tyr-NH₂ [SEQ ID nro 4]
 asetyyli-Arg-Pro-Ala-Pro-Phe-NH₂ [SEQ ID nro 5]
 asetyyli-Arg-Pro-Ala-Pro-Tyr-NH₂ [SEQ ID nro 6]
 asetyyli-Arg-Pro-Glu-Pro-Tyr-NH₂ [SEQ ID nro 7]
 10 asetyyli-Arg-Pro-Ser-Pro-Phe-NH₂ [SEQ ID nro 8]
 asetyyli-Arg-Pro-Thr-Pro-Phe-NH₂ [SEQ ID nro 9]
 asetyyli-Arg-Pro-Thr-Pro-Tyr-NH₂ [SEQ ID nro 10]
 asetyyli-Arg-Pro-Ser-Pro-Tyr-NH₂ [SEQ ID nro 11]
 asetyyli-Arg-Pro-Asp-Pro-pClPhe-NH₂ [SEQ ID nro 12]
 15 dekanoyyli-Arg-Pro-Asp-Pro-Phe-NH₂ [SEQ ID nro 13]
 asetyyli-Arg-Pro-Glu-Pro-Phe-NH₂ [SEQ ID nro 14]
 butyryyli-Arg-Pro-Asn-Pro-Phe-NH₂ [SEQ ID nro 15]

20 Vaikkakin ne ovat hyvin soveltuvia suun kautta annettavia hoitoja varten, keksinnön mukaisia peptidejä voidaan antaa myös mitä tahansa sopivaa reittiä, esimerkiksi injektoimalla tai paikallisesti. Paikallisissa valmisteissa käyttöä varten dekanoyyli substituoidaan edullisesti asetyyllillä kohdassa R¹, koska sen lipofiiliset ominaisuudet tekevät siitä erityisen soveliaan ihoon absorboitavaksi.

25 Tämän keksinnön peptidit voidaan valmistaa yleisesti sinänsä tunnetulla tavalla. Keksinnön mukaisen polypeptidin synteettinen tuotanto voi noudattaa mukavasti kiinteän faasin synteessimenetelmää, jonka on kuvannut Merrifield, J.A.C.S., 85: 2149 - 2154 (1963). Tämä menetelmä ymmärretään hyvin ja se on yleinen menetelmä peptidien valmistuksessa. Kiinteän faasin synteessimenetelmä sisältää suojattujen aminohappojen vaiheittaisen lisäämisen kasva-

30 vaan peptidiketjuun, joka on sidottu kovalenttisilla sidoksilla kiinteään hartsi-partikkeliin. Tällä menetelmällä

35

reagenssit ja sivutuotteet poistetaan suodattamalla, mikä eliminoi näin välituotteiden puhdistamisen tarpeen. Tämän menetelmän yleisajatus riippuu ketjun ensimmäisen aminohapon kiinnittymisestä kiinteään polymeeriin kovalenttisella sidoksella. Suojattuja aminohappoja lisätään perätysten yksi kerrallaan (vaiheittainen strategia) tai ryhminä (segmenttistrategia), kunnes haluttu sekvenssi on koottu. Lopuksi suojattu peptidi irrotetaan kiinteästä hartsikantajasta ja suojausryhmät lohkaistaan irti.

10 Aminohapot voidaan kiinnittää mihin tahansa soveliaaseen polymeeriin hartsina. Hartsiin täytyy sisältyä funktionaalinen ryhmä, johon ensimmäinen suojattu aminohappo voidaan kiinnittää lujasti kovalenttisella sidoksella. Tähän tarkoitukseen soveltuvat erilaiset polymeerit, 15 kuten selluloosa, polyvinyylialkoholi, polymetyylimetakrylaatti ja polystyreeni. Sellaisissa synteeseissä käyttökelpoisiin soveliaisiin suojausryhmiin kuuluvat t-butyylimoksykarbonyyli (Boc), bentsyyli (Bzl), t-amyylioksykarbonyyli (Aoc), tosyyli (Tos), o-bromi-fenyylimetoksykarbonyyli (BrZ), 2,6-diklooribentsyyli (BzlCl₂) ja fenyylime- 20 toksikarbonyyli (Z tai CBZ). Muita suojausryhmiä nimetään yllä siteeratussa Merrifieldin artikkelissa, samoin kuin J.F.W. McOmien teoksessa "Protective Groups in Organic Chemistry", Plenum Press, New York, 1973. Nämä molemmat 25 tekstit liitetään tähän viitteenä.

Tämän keksinnön peptidien yleinen valmistusmenetelmä sisältää sen, että suojattu karboksiterminaalinen aminohappo kiinnitetään aluksi hartsiin. Kiinnittämisen jälkeen hartsi suodatetaan, pestään ja suojausryhmä (edullisesti t-butyylimoksykarbonyyli) karboksiterminaalisen aminohapon alfa-aminoryhmässä poistetaan. Tämän suojausryhmän poiston täytyy tietenkin tapahtua niin, että tämän aminohapon ja hartsin välinen sidos ei katkea. Seuraava amino- 30 suojattu, ja jos välttämätöntä, sivuketjusuojattu aminohappo, liitetään sitten hartsin pinnalla olevan aminohapon 35

vapaaseen alfa-aminoryhmään. Tämä liittäminen tapahtuu niin, että muodostuu amidisidos toisen aminohapon vapaan karboksyyli-ryhmän ja hartsiin kiinnittyneen ensimmäisen aminohapon aminoryhmän välille. Tämä tapahtumasarja toistetaan seuraavilla aminohapoilla, kunnes kaikki aminohapot ovat kiinnittyneet hartsiin. Lopuksi suojattu peptidi lohkaistaan hartsista ja suojausryhmät poistetaan, jolloin haluttu peptidi paljastuu. Lohkaisumenetelmät, joita käytetään peptidin erottamisessa hartsista ja suojausryhmien poistossa, riippuvat hartsin ja suojausryhmien valinnasta ja ovat sinänsä tunnettuja peptidisynteesin alalla.

Vaihtoehtoisia peptidisynteesimenetelmiä kuvataan Bodanszkyn ym. teoksessa Peptide Synthesis, 2. laitos (John Wiley and Sons: 1976). Keksinnön peptidit voidaan esimerkiksi syntetisoida myös käyttämällä standardinomaisia liuospeptidisynteesimenetelmiä, jotka sisältävät aminohappojen tai peptidifragmenttien liittämisen joko vaiheittain tai ryhminä ja kemiallisten tai entsyymaattisten menetelmien käytön amidisidoksen muodostuksessa. [Katso esimerkiksi H.D. Jakubke teoksessa The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology, Academic Press (New York 1987), s. 103 - 165; J.D. Glass, ibid., s. 167 - 184; ja EP-patenttijulkaisu 0 324 659 A2, joka kuvaa entsyymaattisia peptidisynteesimenetelmiä.] Nämä liuossynteesimenetelmät ovat sinänsä tunnettuja.

Tämän keksinnön peptidit voidaan tuottaa myös muilla sinänsä tunnetuilla menetelmillä, esimerkiksi geeniteknologisin menetelmin. Katso esimerkiksi Sambrook ym. teoksessa Molecular Cloning, a Laboratory Manual, 2. laitos, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1989).

Tämä keksintö paljastaa myös näiden peptidien happo- tai emäsadditiosuolat käytettäväksi diagnostisina ja/ tai terapeuttisina aineina. Happoihin, jotka kykenevät muodostamaan suoloja näiden peptidien kanssa, kuuluvat,

näihin rajoittumatta, epäorgaaniset suolat, kuten suolahappo, bromivetyhappo, perkloorihappo, typpihappo, tiosyaaanihappo, rikkihappo, fosforihappo ja vastaavat. Keksinnön suolojen muodostamisessa voidaan käyttää myös orgaanisia happoja, esimerkiksi muurahaishappoa, etikkahappoa, propionihappoa, glykoliuhappoa, maitohappoa, palorypälöhappoa, oksaaliuhappoa, malonihappoa, meripihkahappoa, maleiinihappoa, fumaarihappoa, sitruunahappoa, sukkinaamihappoa, antraniiliuhappoa, kaneliuhappoa, naftaleenisulfonihappoa, sulfaniiliuhappoa ja vastaavia.

Epätäydelliseen listaan niistä emäksistä, jotka kykenevät muodostamaan suoloja niiden peptidien kanssa, joilla on happamia osia, kuuluvat epäorgaaniset emäkset, kuten natriumhydroksidi, ammoniumhydroksidi, kaliumhydroksidi ja vastaavat. Orgaanisiin emäksiin sellaista käyttöä varten kuuluvat, näihin rajoittumatta, mono-, di- ja trialkyyli- ja ariyliamiinit (esimerkiksi trietyyliamiini, di-isopropyyliamiini, metyyliamiini, dimetyyliamiini) ja mahdollisesti substituoitut etanoliamiinit (esimerkiksi etanoliamiini, dietanoliamiini).

Nämä peptidit ja koostumukset, jotka sisältävät näitä peptidejä, osoittavat yllättävästi erilaisia säätelyvaikutuksia nisäkkään immuunijärjestelmässä ja/tai keskushermostossa. Tämän keksinnön peptidit tarjoavat esimerkiksi hoitoterapioita autoimmuunisairauksia ja ikääntymistä varten, samoin kuin muita tiloja, joita karakterisoi immuunijärjestelmän häiriö.

Koska kohteena olevilla peptideillä on immuunijärjestelmää moduloivia piirteitä, ne ovat terapeuttisesti hyödyllisiä hoidettaessa ihmisiä ja mahdollisesti eläimiä, koska ne kykenevät saamaan aikaan muutoksia nisäkkään immuunijärjestelmässä.

Keksinnön peptidit voivat olla hyödyllisiä myös rauhoittavina terapeuttisina aineina. Esimerkiksi potilaan esihoito keksinnön peptidillä voi vähentää kortikotropii-

nia vapauttavan tekijän (CRF) tasoja, joka vaikuttaa stressireaktioihin. Täten sellaiset peptidit ovat hyödyllisiä masennuksen hoidoissa, ja vastaavasti hyödyllisiä hoidettaessa muita stressin laukaisemia häiriöitä.

5 Tämän keksinnön mukaisia peptidejä voidaan käyttää myös vähentämään ikääntymisen vaikutuksia immuunijärjestelmässä. Kun kateenkorva kutistuu iän myötä, tymopoietiini, joka on kateenkorvaperäinen polypeptidi, taso laskee ja tuloksena stressin laukaisemat CRF:n, adrenokortikotrooppisen hormonin (ACTH) ja kortikosteroidien tasot lisääntyvät suhteellisesti. Täten tämän keksinnön peptidien, joilla on tymopoietiinin kaltaista biologista aktiivisuutta, antaminen voi auttaa vähentämään ikääntymisen vaikutuksia, jotka liittyvät tehottomiin tai toimimattomiin immuunijärjestelmiin.

15 Keksintö tarjoaa lisäksi farmaseuttisia koostumuksia, jotka sisältävät yhden tai useamman yllä kuvatun peptidin tai niiden happo- tai emäsadditiosuolan. Kohdepeptidejä, tai farmaseuttisia koostumuksia, jotka sisältävät peptidejä tai niiden happo- tai emässuoloja, pidetään yleensä hyödyllisinä millä tahansa alueella, joka koskee soluperäistä immuniteettia ja erityisesti siellä missä immuniteetissa on vajavaisuuksia.

25 Keksintö tarjoaa myös menetelmän, jolla voidaan hoitaa tiloja, jotka johtuvat kohteen immuuni- ja/tai hermojärjestelmän häiriöstä, joka sisältää sen, että mainitulle kohteelle annetaan terapeuttisesti tehokas määrä ainakin yhtä tämän keksinnön peptidiä tai farmaseuttista koostumusta. Tässä käytettynä termi "terapeuttisesti tehokas määrä" tarkoittaa määrää, joka on tehokas hoidettaessa tiloja, joihin yllä viitataan.

30 Tämän keksinnön farmaseuttisten koostumusten valmistusta varten tämän keksinnön peptidi yhdistetään vaikuttavana aineena läheiseksi seokseksi farmaseuttisen kantajan kanssa tavanomaisten farmaseuttisten valmistusmene-

35

5 telmien mukaisesti. Tämä kantaja voi olla monissa eri muodoissa riippuen antamista varten halutusta valmistemuodosta, esimerkiksi suun kautta annettava, kielen alle annettava, peräsuolen kautta annettava, nenän kautta annettava tai parenteraalinen.

10 Kun valmistetaan koostumuksia edullisessa suun kautta annettavassa annosmuodossa, voidaan käyttää mitä tahansa tavanomaisia farmaseuttisia väliaineita. Suun kautta annettavia nestemäisiä valmisteita varten (esimerkiksi suspensiot, eliksiirit ja liuokset) voidaan käyttää väliaineita, jotka sisältävät esimerkiksi vettä, öljyä, alkoholeja, makuaineita, säilöntäaineita, väriaineita ja vastaavia. Suun kautta annettavien kiinteiden valmisteiden (esimerkiksi pulverit, kapselit ja tabletit) valmistusta varten voidaan käyttää sellaisia kantajia, kuten tärkkeykset, sokerit, laimennusaineet, rakeistusaineet, liukuaineet, sideaineet, hajotusaineet ja vastaavat. Voidaan myös käyttää muotoja, joista lääkeaine vapautuu säädellysti. Niiden antamisen helppouden takia tabletit ja kapselit edustavat edullisinta suun kautta annettavaa kerta-annosmuotoa, missä tapauksessa käytetään tietenkin kiinteitä farmaseuttisia kantajia. Haluttaessa tabletit voivat olla sokeripäällystettyjä tai enteropäällystettyjä standardinomaisin menetelmin.

25 Parenteraalisia tuotteita varten kantaja sisältää tavallisesti steriiliä vettä, vaikkakin muita ainesosia voidaan käyttää, esimerkiksi auttamaan liukoisuutta, tai säilytystarkoituksiin. Voidaan valmistaa myös injektotavissa olevia suspensioita, missä tapauksessa voidaan käyttää soveliaita nestemäisiä kantajia, suspendoivia aineita ja vastaavia.

30 Tämän keksinnön pentapeptidi on yleensä aktiivinen, kun se annetaan parenteraalisesti määrinä noin yli 0,5 - noin 10 mg/ruumiinpainokilogramma.

Nämä peptidit ovat tehokkaampia suun kautta annettuina kuin parenteraalisesti annettuina. Teorian mukaan näin käy siksi, että peptidi absorboituu suolesta verenkiertoon pitemmän ajan kuluessa, noin 6 - 8 tunnissa. Tämän absorptioajan kuluessa noin 30 % peptidistä absorboituu tehokkaasti. Kun lääkkeet ovat kerran päässeet verenkiertoon, niillä sitä vastoin on lyhyt puoliintumisaika, koska munuaiset poistavat ne elimistöstä ja erittävät sitten. Tekniikan tason peptidien nettoabsorption on havaittu olevan noin 15 %. Parenteraalisesti annetut peptidit poistuvat elimistöstä paljon nopeammin kuin suun kautta annettut peptidit.

Tämän keksinnön peptidit ovat yleensä aktiivisia, kun ne annetaan suun kautta määrinä noin 0,02 - noin 10 mg/ruumiinpainokilogramma, ja edullisesti noin 1 mg/kg. Aktiivisuus tällä tasolla tekee näistä peptideistä erityisen hyvin soveliaita farmaseuttisiin formulaatioihin tablettikoossa suun kautta tapahtuvaa antamista varten.

Seuraavat esimerkit esitetään keksinnön havainnollistamiseksi, ilman että keksintö rajoitettaisiin spesifisesti siihen. Esimerkeissä ja koko patenttihakemuksessa osat ovat painon mukaan ellei toisin ilmaista. Esimerkit käyttävät seuraavia lyhenteitä: TFA: trifluorietikkahappo; HOAc: etikkahappo; CH_2Cl_2 : metyleenikloridi; CH_3CN : asetonitriili; DMF: dimetyyliformamidi; NH_4OAc : ammoniumasetatti; NH_4OH : ammoniumhydroksidi; n-PrOH: n-propanoli; n-BuOH: n-butanoli; Pyr: pyridiini; DCC: disykloheksyylikarbodiimidi; HOBt: 1-hydroksibentsotriatsoli; DMAP: dimetyyliaminopyridiini; HF: vetyfluoridi; TCA: trikloorietikkahappo; BHA: bentshydryyliamiinihartsi; p-MBHA: p-metyyli-bentshydryyliamiinihartsi ja MeOH: metanoli. Muut standardinomaiset lyhenteet voidaan nimetä viittaamalla kirjaan The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology, Vol. 1 ja 2, toim. E. Gross ja J. Meienhofer, Academic Press (New York 1987) ja "IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomencla-

ture", J. Biol. Chem., 242:6489 - 6497 (1970) ja J. Biol. Chem., 250:3215 - 3216 (1975). Symbolia Asx käytetään osoittamaan Asn:n läsnäolo, joka havaitaan analyysin jälkeen Asp:na.

5 **Esimerkki 1**

Asetyyli-Arg-Pro-Asp-Pro-Phe-NH₂:n synteesi [SEQ ID nro 1]

Pentapeptidiamidi syntetisoitiin käyttämällä symmetristä anhydridiliittämistekniikkaa lukuun ottamatta arginiinia, joka kytkettiin DCC-HOBT-menetelmällä käyttämällä standardinomaisia liittämismenetelmiä (Std 1 -sykli, versio 1.40) Applied Biosystems ABI 430A -peptidisyntetisaattorilla. Synteesi pantiin alkuun 0,45 millimoolilla p-metyyllibentshydriyylamiinihartsi HCl:ää (0,710 g, 0,64 mmol/hartsigramma). N-terminaalinen Boc-ryhmä poistettiin "end-NH₂"-ohjelmalla (versio 1.40). Tuloksena oleva peptidi asetuloitiin käyttämällä 30 minuutin ajan etikkahappoanhydridiä (1,0 ml) CH₂Cl₂:ssa (9 ml), joka sisälsi 4-dimetyyliaminopyridiiniä (15 mg). Sitten hartsi pestiin DMF:llä (5 x 10 ml) ja CH₂Cl₂:lla (5 x 10 ml) ja kuivattiin lopuksi alipaineuunissa 40 °C:n lämpötilassa (1,073 g).

Peptidi lohkaistiin irti hartsikantajasta (1,07 g, 0,45 mmol) sekoittamalla nestemäisessä HF:ssä (10 ml), m-metyylianisolissa (1 ml) ja dimetyylisulfidissa (1 ml) yhden tunnin ajan 0 °C:n lämpötilassa. Sen jälkeen kun ylimääräinen HF oli poistettu alipaineessa, hartsi-peptidisekoitus uutettiin eetterillä (3 x 50 ml). Eetteriuutokset heitettiin pois. Vapautunut peptidi uutettiin sitten 20-prosenttisellä HOAc:n vesiliuoksella (3 x 33 ml). Sen jälkeen kun liuottimet oli poistettu alipaineessa, tuloksena oleva jäännös liuotettiin H₂O:hon (40 ml) ja lyofilioitiin (0,248 g). Tämä kiinteä aine liuotettiin H₂O:hon (10 ml) ja vietiin asetaattimuodossa olevaan Amberlite IRA-68 -ioninvaihtopylvääseen (60 g, 1,6 meq/ml, 2,73 cm i.d. x 18 cm pituus) H₂O:ssa virtausnopeudella 60 ml/tun-

ti. Sovelliaat fraktiot yhdistettiin ja lyofilisoitiin (0,240 g).

Epäpuhdas peptidi (0,240 g liuotettuna 4 ml:aan puskuria "A", katso alla) puhdistettiin preparatiivisella RP-HPLC:llä käyttämällä Vydac 218TP1022 -pylvästä (22 x 250 mm). Käytetyt liikkuvat faasit ovat alla olevan esityksen mukaisia:

A = 0,1 % TFA/H₂O

B = 0,1 % TFA/CH₃CN - H₂O 4:1 v/v

Käytettiin lineaarista gradienttia 5 % B - 23 % B 80 minuutin aikana virtausnopeudella 14 ml/min. Relevantit fraktiot yhdistettiin ja orgaaniset liuottimet poistettiin alipaineessa. Vesiliukoinen jäännös lyofilisoitiin (206 mg).

Ohutlevykromatografia (TLC) suoritettiin Merck F-254 -piidioksidilevyillä (5 x 10 cm) seuraavissa liuotinjärjestelmissä (v/v):

Rf(1) = 0,17 (1-BuOH:HOAc:H₂O, 4:1:1)

Rf(2) = 0,47 (1-BuOH:HOAc:EtOAc:H₂O, 1:1:1:1)

Rf(3) = 0,65 (1-BuOH:HOAc:Pyr:H₂O, 5:4:4:2)

Aminohappoanalyysi (AAA):

Saannot [havaitut (odotetut)] olivat Arg 1,02(1), Pro 1,98(2), Asp 0,99(1), Phe 1,02(1), NH₃ 1,04(1). Nopea-atomipommitus/massaspektrometria (FAB-MS): [MH⁺] m/z:ssä 672 a.m.u. (molekyylipaino 671,76), jossa MH⁺ edustaa positiivisesti varautunutta massaionia; m/z on massa/varaus; ja a.m.u. on atomimassayksiköitä.

Esimerkki 2

Asetyyli-Arg-Pro-Asp-Pro-Tyr-NH₂:n synteesi [SEQ ID nro 2]

Pentapeptidiamidi syntetisoitiin, kuten esimerkissä 1 kuvataan, niin että Tyr substituutiin 5. paikkaan Phe:n tilalle.

TLC: Rf(1) = 0,20, Rf(2) = 0,33, Rf(3) = 0,85.

AAA: Arg 1,06(1), Pro 1,99(2), Asp 1,03(1), Tyr 0,92(1), NH₃ 1,19(1).

FAB-MS: [MH⁺] m/z:ssä 688 a.m.u. (molekyyllipaino 687,76).

Esimerkki 3

5 Asetyyli-Arg-Pro-Asn-Pro-Phe-NH₂:n synteesi [SEQ ID nro 3]

Pentapeptidiamidi syntetisoitiin, kuten esimerkissä 1 kuvataan, niin että Asn substituutiin 3. paikkaan Asp:n tilalle. Peptidin ominaisuudet ovat seuraavat.

TLC: Rf(1) = 0,22, Rf(2) = 0,56, Rf(3) = 0,72.

10 AAA: Arg 1,02(1), Pro 1,97(2), Asx 1,01(1), Phe 1,01(1), NH₃ 1,95(2).

FAB-MS: [MH⁺] m/z:ssä 671 a.m.u. (molekyyllipaino 670,78).

Esimerkki 4

15 Asetyyli-Arg-Pro-Asn-Pro-Tyr-NH₂:n synteesi [SEQ ID nro 4]

Pentapeptidiamidi syntetisoitiin, kuten esimerkissä 1 kuvataan, niin että Asn substituutiin 3. paikkaan Asp:n tilalle ja Tyr Phe:n tilalle paikassa 5. Peptidin ominaisuudet ovat seuraavat.

TLC: Rf(1) = 0,2, Rf(2) = 0,36, Rf(3) = 0,83.

20 AAA: Arg 1,07(1), Pro 1,98(2), Asx 1,04(1), Tyr 0,91(1), NH₃ 1,92(2).

25 FAB-MS: [MH⁺] m/z:ssä 687 a.m.u. (molekyyllipaino 686,77).

Esimerkki 5

Asetyyli-Arg-Pro-Ala-Pro-Phe-NH₂:n synteesi [SEQ ID nro 5]

30 Pentapeptidiamidi syntetisoitiin, kuten esimerkissä 1 kuvataan, niin että Ala substituutiin 3. paikkaan Asp:n tilalle. Peptidin ominaisuudet ovat seuraavat.

TLC: Rf(1) = 0,18, Rf(2) = 0,49, Rf(3) = 0,69.

35 AAA: Arg 0,98(1), Pro 1,97(2), Ala 1,03(1), Phe 1,02(1), NH₃ 1,00(2).

FAB-MS: [MH⁺] m/z:ssä 628 a.m.u. (molekyyllipaino 627,75).

Esimerkki 6

Asetyyli-Arg-Pro-Ala-Pro-Tyr-NH₂:n synteesi [SEQ ID nro 6]

Pentapeptidiamidi syntetisoitiin, kuten esimerkissä 1 kuvataan, niin että Ala substituutiin 3. paikkaan Asp:n tilalle ja Tyr Phe:n tilalle paikkaan 5. Peptidin ominaisuudet ovat seuraavat.

TLC: Rf(1) = 0,16, Rf(2) = 0,32, Rf(3) = 0,71.

AAA: Arg 1,04(1), Pro 1,96(2), Ala 0,99(1), Tyr 1,02(1), NH₃ 1,03(2).

FAB-MS: [MH⁺] m/z:ssä 644 a.m.u. (molekyyllipaino 643,75).

Esimerkki 7

Asetyyli-Arg-Pro-Glu-Pro-Phe-NH₂:n synteesi [SEQ ID nro 14]

Pentapeptidiamidi syntetisoitiin, kuten esimerkissä 1 kuvataan, niin että Glu substituutiin 3. paikkaan Asp:n tilalle. Peptidin ominaisuudet ovat seuraavat.

TLC: Rf(1) = 0,26, Rf(2) = 0,58, Rf(3) = 0,74.

AAA: Arg 0,97(1), Pro 2,03(2), Glu 1,01(1), Phe 1,00(1), NH₃ 1,02(2).

FAB-MS: [MH⁺] m/z:ssä 686 a.m.u. (molekyyllipaino 685,79).

Esimerkki 8

Asetyyli-Arg-Pro-Glu-Pro-Tyr-NH₂:n synteesi [SEQ ID nro 7]

Pentapeptidiamidi syntetisoitiin, kuten esimerkissä 1 kuvataan, niin että Glu substituutiin 3. paikkaan Asp:n tilalle ja Tyr Phe:n tilalle paikkaan 5. Peptidin ominaisuudet ovat seuraavat.

TLC: Rf(1) = 0,18, Rf(2) = 0,35, Rf(3) = 0,66.

AAA: Arg 1,02(1), Pro 1,95(2), Glu 1,03(1), Tyr 1,01(1), NH₃ 0,99(1).

FAB-MS: [MH⁺] m/z:ssä 702 a.m.u. (molekyyllipaino 701,79)

Esimerkki 9

Asetyyli-Arg-Pro-Ser-Pro-Phe-NH₂:n synteesi [SEQ ID nro 8]

5 Pentapeptidiamidi syntetisoitiin, kuten esimerkissä 1 kuvataan, niin että Ser substituutiin 3. paikkaan Asp:n tilalle. Peptidin ominaisuudet ovat seuraavat.

TLC: Rf(1) = 0,28, Rf(2) = 0,62, Rf(3) = 0,78.

AAA: Arg 1,01(1), Pro 2,00(2), Ser 0,62(1), Phe 0,99(1), NH₃ 1,16(1).

10 FAB-MS: [MH⁺] m/z:ssä 644 a.m.u. (molekyyllipaino 643,75).

Esimerkki 10

Asetyyli-Arg-Pro-Thr-Pro-Phe-NH₂:n synteesi [SEQ ID nro 9]

15 Pentapeptidiamidi syntetisoitiin, kuten esimerkissä 1 kuvataan, niin että Thr substituutiin 3. paikkaan Asp:n tilalle. Peptidin ominaisuudet ovat seuraavat.

TLC: Rf(1) = 0,13, Rf(2) = 0,47, Rf(3) = 0,72.

20 AAA: Arg 1,00(1), Pro 2,00(2), Ser 0,82(1), Phe 1,15(1), NH₃ 1,19(1).

FAB-MS: [MH⁺] m/z:ssä 658 a.m.u. (molekyyllipaino 657,78).

Esimerkki 11

25 **Asetyyli-Arg-Pro-Thr-Pro-Tyr-NH₂:n synteesi [SEQ ID nro 10]**

Pentapeptidiamidi syntetisoitiin, kuten esimerkissä 1 kuvataan, niin että Thr substituutiin 3. paikkaan Asp:n tilalle ja Tyr Phe:n tilalle paikkaan 5. Peptidin ominaisuudet ovat seuraavat.

30 TLC: Rf(1) = 0,13, Rf(2) = 0,43, Rf(3) = 0,66.

AAA: Arg 1,00(1), Pro 2,00(2), Thr 0,87(1), Phe 1,00(1), NH₃ 0,93(1).

FAB-MS: [MH⁺] m/z:ssä 674 a.m.u. (molekyyllipaino 673,78).

Esimerkki 12

Asetyyli-Arg-Pro-Ser-Pro-Tyr-NH₂:n synteesi [SEQ ID nro 11]

5 Pentapeptidiamidi syntetisoitiin kuten esimerkissä 1 kuvataan, niin että Ser substituutiin 3. paikkaan Asp:n tilalle ja Tyr Phe:n tilalle paikkaan 5. Peptidin ominaisuudet ovat seuraavat.

TLC: Rf(1) = 0,29, Rf(2) = 0,65, Rf(3) = 0,82.

10 AAA: Arg 1,03(1), Pro 1,95(2), Ser 0,65(1), Tyr 1,01(1), NH₃ 1,20(1).

FAB-MS: [MH⁺] m/z:ssä 660 a.m.u. (molekyyllipaino 659,75).

Esimerkki 13

15 **Asetyyli-Arg-Pro-Asp-Pro-pClPhe-NH₂:n synteesi [SEQ ID nro 12]**

Pentapeptidiamidi syntetisoitiin, kuten esimerkissä 1 kuvataan, niin että parakloori-Phe substituutiin 5. paikkaan Phe:n tilalle. Peptidin ominaisuudet ovat seuraavat.

20 TLC: Rf(1) = 0,19, Rf(2) = 0,49, Rf(3) = 0,66.

AAA: Arg 1,00(1), Pro 1,99(2), Asp 0,97(1), pClPhe 1,04(1), NH₃ 1,02(1).

FAB-MS: [MH⁺] m/z:ssä 706 a.m.u. (molekyyllipaino 706,29).

25 **Esimerkki 14**

Butyryyli-Arg-Pro-Asn-Pro-Phe-NH₂:n synteesi [SEQ ID nro 15]

Pentapeptidiamidi syntetisoitiin, kuten esimerkissä 1 kuvataan, niin että Asn substituutiin 3. paikkaan Asp:n tilalle. N-terminaalinen Boc-ryhmä poistettiin "end-NH₂"-ohjelmalla. N-terminaalinen butyryyliryhmä tuotiin liittämällä n-butyraattihapolla käyttämällä di-isopropyyli-karbodi-imidiä ja HOBt:tä. Peptidin ominaisuudet ovat seuraavat.

35 TLC: Rf(1) = 0,32, Rf(2) = 0,65, Rf(3) = 0,84.

AAA: Arg 1,01(1), Pro 1,98(2), Asx 1,02(1), Phe 1,00(1), NH₃ 1,98(2).

FAB-MS: [MH⁺] m/z:ssä 699 a.m.u. (molekyyllipaino 698,83).

5 Esimerkki 15

Dekanoyyli-Arg-Pro-Asp-Pro-Phe-NH₂:n synteesi [SEQ ID nro 13]

Pentapeptidiamidi syntetisoiin oleellisesti, kuten esimerkissä 1 on kuvattu, seuraavilla muutoksilla. Kiinteän faasin synteesi aloitettiin 5 millimoolilla bentshydryyliamiinihartsia ja N-terminaalinen Boc-ryhmä poistettiin sen jälkeen kun aminohapot oli tuotu peräkkäin. Tuloksena oleva peptidiharts käsiteltiin dekaanihapolla DMF:ssä, joka sisälsi hydroksibentsotriatsolia ja di-isopropyylikarbodi-imidiä. Sitten harts pestiin ja kuivatettiin (11,17 g).

Peptidi lohkaistiin irti hartsikantajasta käyttämällä nestemäistä HF:ää, kuten esimerkissä 1 on kuvattu. Epäpuhtas peptidi (1,8 g) puhdistettiin ioninvaihdon jälkeen preparatiivisella RP-HPLC:llä käyttämällä samoja liikkuvia faaseja, jotka on kuvattu esimerkissä 1. Käytetty gradientti oli 25-prosenttinen B - 50-prosenttinen B 100 minuutin aikana virtausnopeudella 14 ml/min. Puhtaan tuotteen saanto oli 1,19 g. Tämän peptidin ominaisuudet ovat seuraavat.

TLC: Rf(1) = 0,30, Rf(2) = 0,64, Rf(3) = 0,82.

AAA: Arg 0,99(1), Pro 2,00(2), Asp 0,99(1), Phe 1,01(1), NH₃ 1,07(1).

FAB-MS: [MH⁺] m/z:ssä 785 a.m.u. (molekyyllipaino 784,72).

30 Esimerkki 16

Asetyyli-Arg-Pro-Asp-Pro-Phe-NH₂:n [SEQ ID nro 1] liuosfaasisynteesi

Tämä peptidi tehtiin myös liuosynteesillä, kuten alla kuvataan.

A. Boc-Pro-Phe-NH₂:

Boc-Pro-OH-liuokseen (4,304 g, 20 millimoolia) etyyliasetaatissa (200 ml) -15 °C:n lämpötilassa lisättiin N-metyylimorfoliinia (2,2 ml, 20 millimoolia) ja isobutyrylikloroformaattia (2,6 ml, 20 millimoolia). 10 minuutin aktivaatioajan jälkeen -15 °C:n lämpötilassa lisättiin HCl.Phe-NH₂:n (4,014 g, 20 millimoolia) ja N-metyylimorfoliinin (2,2 ml, 20 millimoolia) liuos dimetyyliformamidissa (20 ml). Reaktioseosta sekoitettiin -15 °C:n lämpötilassa 30 minuuttia ja annettiin lämmetä huoneenlämpötilaan. Kun oli sekoitettu 2 tuntia huoneenlämpötilassa, reaktioseos sammutettiin 10-prosenttisella kaliumkarbonaattiliuoksella (30 ml). Kaksi kirkasta kerrosta siirrettiin erotussuppiloon ja orgaaninen kerros pestiin perätysten 10-prosenttisella kaliumkarbonaattiliuoksella (2 x 30 ml), kylläisellä natriumkloridiliuoksella (1 x 30 ml), 1-normaalilla HCl:llä (2 x 30 ml) ja kylläisellä natriumkloridiliuoksella (2 x 30 ml). Sen jälkeen kun oli kuivatettu vedettömällä natriumsulfaattilla, orgaaninen liuos suodatettiin ja konsentroitiin pyöröhaihduttimella talon alipaineella. Tuote saostettiin heksaanilla, suodatettiin ja kuivatettiin.

Saanto (teoreettinen): 7,229 g.

Kokeellinen saanto: 6,795 g (94 % teoreettisesta).

B. HCl.Pro-Phe-NH₂:

Boc-Pro-Phe-NH₂-liuokseen, joka oli valmistettu, kuten A:ssa edellä (6,506 g, 18 millimoolia), etyyliasetaatissa (50 ml) ja jääetikassa (25 ml), lisättiin 5-normaalista HCl-etyyyliasetaattia (20 ml) ja anisolia (2 ml). Liuosta sekoitettiin 1 tunnin ajan ja konsentroitiin pyöröhaihduttimessa. Dipeptidin hydrokloridisuola saostettiin lisäämällä eetteriä (200 ml). Kiinteä aines suodatettiin ja kuivatettiin alipaineessa KOH-rakeilla.

C. Boc-Asp(OBzl)-Pro-Phe-NH₂:

Seka-anhydridiin, joka valmistettiin saattamalla reagoimaan Boc-Asp(OBzl) (5,82 g, 18 millimoolia), N-me-

tyylimorfoliini (1,98 ml, 18 millimoolia) ja isobutyryli-
 kloroformaattia (2,34 ml, 18 millimoolia) etyyliasetaatis-
 sa (200 ml) -15 °C:n lämpötilassa, käsiteltiin HCl.Pro-
 Phe-NH₂-liuoksella (valmistettu kuten yllä B:ssä kuvataan)
 5 ja N-metyylimorfoliinilla (1,98 ml, 18 millimoolia) dime-
 tyyliformamidissa (40 ml). Reaktion annettiin edetä 30
 minuutin ajan -15 °C:n lämpötilassa ja 2 tuntia huoneen-
 lämmössä. Tuote käsiteltiin yllä kuvatulla tavalla ja
 saostettiin uudelleen etyyliasetaatti-heksaanista.

10 Saanto (teoreettinen): 10,20 g.

Kokeellinen saanto: 9,76 g (95,7 % teoreettisesta).

D. Boc-Pro-Asp(OBzl)-Pro-Phe-NH₂:

Boc-Asp(OBzl)-Pro-Phe-NH₂:lle, joka valmistettiin,
 kuten yllä C:ssä kuvataan (9,067 g, 16 millimoolia), teh-
 15 tiin suojauksen poisto käyttämällä HCl-etyyliasetaattia,
 kuten yllä osassa B kuvataan, ja tripeptidin hydrokloridi-
 suola saostettiin eetterillä, suodatettiin ja kuivattiin.

Seka-anhydridiin, joka valmistettiin Boc-Pro:sta
 (3,44 g, 16 millimoolia), N-metyylimorfoliinista (1,76 ml,
 20 16 millimoolia) ja isobutyrylikloroformaattia (2,08 ml,
 16 millimoolia) etyyliasetaatissa (160 ml) käsiteltiin
 HCl.Asp(OBzl)-Pro-Phe-NH₂-liuoksella ja N-metyylimorfolii-
 nilla (1,76 ml, 16 millimoolia) dimetyyliformamidissa
 (30 ml). Reaktio-olosuhteet ja tuotteen käsittely kuvat-
 25 tiin aikaisemmin. Tuote kiteytettiin etyyliasetaatti-hek-
 saanista.

Saanto (teoreettinen): 10,62 g.

Kokeellinen saanto: 10,09 g (95 % teoreettisesta).

E. Z-Arg-Pro-Asp(OBzl)-Pro-Phe-NH₂:

30 Boc-Pro-Asp(OBzl)-Pro-Phe-NH₂:lle, joka oli valmis-
 tettu, kuten esimerkissä D yllä kuvataan (9,96 g, 15 mil-
 limoolia), tehtiin suojauksen poisto käyttämällä HCl-etyy-
 liasetaattia ja tetrapeptidin hydrokloridisuola saostet-
 tiin eetterillä, suodatettiin ja kuivattiin.

Z-Arg.HCl:n (5,17 g, 15 mmol) sekoitettuun liuokseen dimetyyliformamidissa (25 ml) lisättiin 25 °C:ssa HCl.Pro-Asp(OBzl)-Pro-Phe-NH₂:n ja N-metyylimorfoliinin liuos (1,65 ml, 15 millimoolia) dimetyyliformamidissa (25 ml). Tuloksena olevaan liuokseen lisättiin dietyyli-syaanifosfonaattia (2,45 g, 15 millimoolia) ja N-metyylimorfoliinia (1,65 ml, 15 millimoolia) ja seosta sekoitettiin 4 tunnin ajan. Reaktio sammutettiin lisäämällä 10-prosenttista etikkahappoa (10 ml) ja liuottimet poistettiin pyöröhaihduttimella alipaineessa. Tuloksena oleva kiinteä aine trituroitiin 10-prosenttisella kaliumkarbonaatilla ja sitten vedellä ja suodatettiin.

Saanto (teoreettinen): 12,81 g.

Kokeellinen saanto: 10,25 g (80 % teoreettisesta).

F. Asetyyli-Arg-Pro-Asp-Pro-Phe-NH₂ [SEQ ID nro 1]:

Z-Arg-Pro-Asp(OBzl)-Pro-Phe-NH₂-liuokseen, joka valmistettiin, kuten E:ssä yllä kuvataan (11,10 g, 13 millimoolia), etikkahapossa (50 ml), lisättiin 20-prosenttista Pd-hydroksidilla käsiteltyä hiiltä (1,0 g) ja alistettiin hydraukseen 3 105 kPa:n vetykaasun paineella. Reaktiota monitoroitiin TLC:llä ja 1 tunnin jälkeen katalysaattori suodatettiin pois ja liuottimet poistettiin alipaineella, mikä tuotti Arg-Pro-Asp-Pro-Phe-NH₂:n. Jäännös liuotettiin veteen (50 ml) ja kylmäkuivattiin.

Arg-Pro-Asp-Pro-Phe-NH₂ liuotettiin etikkahappoon (20 ml) ja käsiteltiin seka-anhydridillä (6,12 g, 60 millimoolia) jatkuvasti sekoittaen. 1 tunnin kuluttua reaktio sammutettiin lisäämällä vettä (20 ml) ja liuottimet poistettiin alipaineella. Jäännös liuotettiin veteen (50 ml) ja kylmäkuivattiin.

Näin saatu epäpuhdas peptidi puhdistettiin preparatiivisella RP-HPLC:llä noudattamalla esimerkissä 1 kuvattua menetelmää. Tuote lyofilisoitiin vakiopainoiseksi. (Peptidipitoisuus: 90 %.)

Saanto (teoreettinen): 8,73 g. Kokeellinen saanto: 7,56 g (77,9 % teoreettisesta). Yhdistettä ei voinut erottaa esimerkissä 1 saadusta tuotteesta.

Esimerkki 17

5

Entsyyminen stabiilius

Seuraava määrittäminen suoritettiin, jotta saataisiin havainnollistettua tämän keksinnön peptidin stabiilius.

Tymopentiini ja peptidi asetyyli-Arg-Pro-Asp-Pro-Phe-NH₂, johon viitataan nimellä IRI-514, liuotettiin erillään fosfaattipuskuriin (pH 5,5). Rotan pohjukaissuoli avattiin ja kiinnitettiin 3,5 ml:n diffuusiokammioon (Crown glass, NJ) niin, että puskuria oli molemmissa osastoissa. Valittu testipeptidi fosfaattipuskurissa (pH 5,5) applikoitiin molempiin osastoihin niin, että lopullinen konsentraatio oli 1 mg/ml ja näytteet otettiin 0, 2 ja 4 tunnin kuluttua. Pienet erät alistettiin korkean suorituskyvyn nestekromatografiaan (HPLC), jossa oli ultraviolettidetektio 220 nm:n aallonpituudella. Liuotinjärjestelmä tymopentiinille oli fosfaattipuskuri ja metanoli. IRI-514:lle liuotinjärjestelmänä käytettiin asetonitriiliä ja fosfaattipuskuria.

Kuvion 1 pylväsdiagrammi esittää havainnollisesti, että 0 tunnin kohdalla tymopentiini (TP-5) ja IRI-514 olivat 100-prosenttisen ehjiä. 2 tunnin kuluttua IRI-514 oli vielä noin 100-prosenttisen ehjä, kun taas vain 20 % TP-5:stä oli enää ehjänä. Lopuksi 4 tunnin kohdalla ehjän IRI-514:n määrä on noin 90 %, kun taas ehjän TP-5:n määrä oli mitätön. Lisäksi keksijät olettavat, että ehjän IRI-514:n väheneminen 4 tunnin jälkeen voi johtua absorptiota pohjukaissuolen kudokseen, koska HPLC:ssä ei havaittu hajoamispiikkejä.

Esimerkki 18 Hermo-lihas-määrittäminen

Tämä määrittäminen mittaa peptidin kykyä vaikuttaa kolinergetiseen välittymiseen hermon ja lihaksen liitoskohdas-

sa. Tymopoiettiinin ja tymopentiinin tiedetään aiheuttavan tämän vaikutuksen välittymisessä hermosta lihakseen.

Eri annoksia testipeptidiä liuotetaan fosfaattipuskuroituun suolaliuokseen ja injektoidaan ihonalaisesti tai annetaan suun kautta naaraspuolisille hiirille, jotka painavat 25 - 30 grammaa (CD1-kanta). Elektromyografinen määrittäminen suoritetaan G. Goldsteinin ym. mukaisesti, J. Neurol. Neurosurg. Psychiat., 31:453 - 459 (1968), 24 tai 48 tuntia sen jälkeen kun peptidi on annettu. Hiiret nukutetaan 0,5 ml:lla 10-prosenttista uretaaniliuosta. Hermosta stimuloitetaan Grass S-48 -stimulaattorilla ja Grass SIU-5A -stimuluksen eristysyksiköllä (Grass medical instruments, Quincy, MA) ja elektromyografinen responssi merkitään muistiin Tektronixin 5111-muistioskilloskoopilla, joka on kytketty 5A21N-differentiaalivahvistimeen ja 5B10N "time base" -yksikköön (Tektronix, Beaverton, OR).

Supramaksimaalisella hermostimulaatiolla, 30 impulssia sekunnissa, kymmenennen lihasaktiopotentiaalin korkeus ilmaistiin prosenttiosuutena ensimmäisestä. P-arvot tilastollisten erojen testausta varten kontrolloiden ja testattavien yhdisteiden välillä laskettiin Dunnettin kaksireunaisella t-testillä. Kuvio 2 esittää suun kautta annetun IRI-514:n annosresponssivaikutuksen hermosta lihakseen välittymiseen, kynnyksarvon ollessa 0,05 mg/kg.

25 **Esimerkki 19**

CD3-vasta-aineella stimuloitujen T-suppressorisolujen säätely

Naaraspuoliset NZB x NZW F1 -hiiret ostettiin Jackson Laboratories:lta (Bar Harbour, ME) ja ne majoitettiin kiinteäpohjaisiin eläinhäkkeihin, joiden pohjalla on kuivike, kuusi eläintä per häkki. Ruokaa ja vettä annettiin mielinmäärin. Eläimet uhrattiin humanisti CO₂:lla hoitotakson lopuksi.

35 Hiiriä käsiteltiin testipeptideillä ennen uhraamista yhdellä kahdesta hoitomenetelmästä. Menetelmässä A hii-

ret saivat peptidejä, jotka oli liuotettu bakteriostaatti-
seen veteen injektiota varten, 1 mg/kg ihonalaisesti ker-
ran viikossa neljän viikon ajan neljän viikon vanhoista
alkaen. Menetelmässä B seitsemän viikkoa vanhoille hiiril-
le annettiin neljä injektiota, 1 mg/kg ihonalaisesti nel-
jän peräkkäisen päivän ajan. Kaikki eläimet uhrattiin,
jotta T-suppressorisolujen aktiivisuus voitiin määrittää
viimeistä injektiota seuraavana päivänä.

Pernat poistettiin aseptisesti, kustakin yksittäi-
sestä eläimestä valmistettiin yksisolususpensioita viemäl-
lä 60-mesh-seulan läpi, ja suspendoitiin kudosisviljelyela-
tusaineeseen, joka koostui RPMI 1640:stä, joka oli 25 mM
Hepes-puskurin, 10-prosenttinen fetaalinaudan seerumin,
2-prosenttinen natriumpyruvaatin, 1-prosenttinen NEN:n ei-
välttämättömien aminohappojen, 1-prosenttinen L-glutamii-
nin (kaikki Gibcolta, Grand Island, NY), 1-prosenttinen
beeta-merkaptotoetanolin (Sigma, St. Louis, MO) ja 0,05-pro-
senttinen gentamisiinin (Flow, McLean, VA) suhteen.

Suppressorisolut mitogeenistimuloituja T-solujen
proliferatiivisia responsseja varten saatiin aikaan 35
mm:n kudosisviljelykuopissa (Corning, Corning, NY), jotka
oli päällystetty CD3-vasta-aineella (Clone 145-2C11, Boeh-
ringer Mannheim, Indianapolis, IN), joka oli laimennettu
boraattipuskuroituun suolaliuokseen, pH 8,5, konsentraa-
tioksi 0,5 µg/ml. Näitä levyjä inkuboitiin huoneenlämpöti-
lassa 4 tunnin ajan ja pestiin kolmasti Hanksin tasapaino-
tetulla suolaliuoksella ennen solujen lisäystä. Lisättiin
2 ml pernasoluja, jotka olivat peräisin yksittäisistä
eläimistä, tiheytenä 5×10^6 solua/ml, ja viljelmiä inku-
boitiin 48 tunnin ajan 5-prosenttisessä CO₂:ssa 37 °C:n
lämpötilassa. Stimuloidut viljelmät kerättiin ja solut
säädettiin tiheyteen $1,25 \times 10^6$ solua/ml suppressiomääri-
tysviljelmään lisäämistä varten 25 %:na respondoivien so-
lujen lukumäärästä. T-solujen lisääntymisen suppressio
mitattiin 48 tunnin mitogeenistimuloituissa viljelmissä

(0,25 µg/ml anti-CD3, Boehringer-Mannheim), jotka sisälsivät 5×10^5 tuoretta syngeneettistä (syngeneic) pernasolua ja $1,25 \times 10^5$ testattavaa solua kolmena rinnakkaisena viljelmänä 96-kuoppaisilla levyillä. Kuopille annettiin pulssi viimeisen seitsemän tunnin aikana 1 µCi:lla [^3H] tymidiinillä (NEN Research Products, Chadds Ford, PA), kerättiin suodatinmatoille (Pharmacia, Turku, Suomi) ja laskettiin LKB 1205 Betaplate -nestetuikelaskurilla.

Kuvio 3 esittää yhteenvetona neljä koetta, jotka osoittavat, että niistä eläimistä, joille on annettu IRI-514:ää (asetyyli-Arg-Pro-Asp-Pro-Phe-NH₂), joko päivittäin 4 päivän ajan (menetelmä B) tai kerran viikossa 4 viikon ajan (menetelmä A), peräisin olevat solut saivat tässä määrityksessä aikaan tehokkaammin suppressorisoluja kuin solut, jotka olivat peräisin vehikkelillä (plasebolla) käsitellyistä eläimistä. Kukin symboli edustaa eri eläinryhmää. Avoimet symbolit ovat kontrolleja. Mustat symbolit ovat IRI-514:llä hoidettuja eläimiä.

Esimerkki 20

IRI-514:n vaikutukset käyttäytymisresponssiin sosiaalisen stressin rotissa laukaiseman ahdistuksen jälkeen

Sosiaaliselle stressille altistus johtaa nisäkkäissä hypotalamus-aivolisäke-lisämunuais-akselin (HPA) aktivoitumiseen ja muutoksiin tunnetiloissa ja lisääntyneeseen ahdistukseen. Tätä voidaan tutkia rotissa testaamalla stressattujen eläinten käyttäytymistä korokkeilla olevassa plus-labyrintissä ("plus maze"). Labyrintti koostuu kahdesta haarasta, joissa on 40 cm korkeat seinät (suljetut haarat) ja kahdesta haarasta, joissa ei ole seiniä (avoimet haarat). Kun normaalit, stressaamattomat eläimet viettävät melkoisesti aikaa tutkimalla kutakin labyrintin haaraa, niin sitä vastoin eläimet, jotka osoittavat lisääntyntä ahdistusta ja muutoksia tunnetiloissa, viettävät

merkitsevästi vähemmän aikaa tutkimalla labyrinthin avoimia haaroja.

Sosiaalisen stressin asukas-tunkeilija-paradigmas-
sa tunkeilijaurosrotta sijoitetaan aggressiivisen asukas-
5 rotan kotihäkkiin. Tämä johtaa vuorovaikutukseen, joka va-
kiinnuttaa yleensä asukasrotan ylivallan. Hävinneet eläi-
met osoittavat kohonneita HPA-akselista peräisin olevia
hormonitasoja, samoin kuin lisääntynyttä ahdistusta plus-
labyrinthi-testillä määritettynä.

10 Näissä tutkimuksissa 15 - 17 tunkeilijarotaa käsi-
teltiin IRI-514:llä, 1 mg/kg, tai vehikkelillä (normaali
suolaliuos) ihonalaisesti, 48 tuntia ennen kuin ne sijoi-
tettiin urospuolisen asukasrotan häkkiin. Tunkeilijarotat
altistettiin tuloksena olevalle vuorovaikutukselle 30 mi-
15 nuutin ajan. Ruumiillinen vahingoittuminen estettiin suo-
jaamalla tunkeilija pleksilasihäkillä, mikä täten tarjosi
suhteellisen puhtaan psykologisen stressin mallin. Yksit-
täiset IRI-514:llä ja vehikkelillä käsitellyt eläimet si-
joitettiin sitten korotetun plus-labyrinthin keskustaan ja
20 niiden annettiin tutkia labyrinthin kaikkia neljää haaraa
5 minuutin ajan. Sellaisia IRI-514:llä ja vehikkelillä
käsiteltyjä eläimiä, joita ei altistettu asukasrotalle,
testattiin myös kontrolleina. Merkittiin muistiin tieto-
koneen automaattisesti mittaamat labyrinthin kunkin osan
25 tutkimisajat kunkin eläimen kohdalla.

Kuten kuviossa 4 esitetään, vehikkelillä käsitellyt
ja IRI-514:llä käsitellyt (stressaamattomat) kontrolli-
eläimet viettivät $47,9 \pm 7,3 \%$ ja vastaavasti $41,3 \pm 8,3 \%$
(keskiarvo $\pm$ keskiarvon keskivirhe) ajasta tutkimalla la-
30 byrintin avoimia haaroja. Vehikkelillä käsitellyt rotat,
jotka sitä vastoin oli altistettu sosiaaliselle stressil-
le, viettivät merkittävästi vähemmän aikaa labyrinthin
avoimissa haaroissa ($26,4 \pm 5,5 \%$, keskiarvo $\pm$ keskiarvon
keskivirhe; $p = 0,038$). Mikä tärkeämpää, ne rotat, jotka
35 saivat IRI-514:ää ennen kuin ne altistettiin sosiaaliselle

stressille, viettivät vertailukelpoisesti aikaa häkin avoimissa haaroissa stressaamattomiin kontrollirottiin verrattuna ($43,8 \pm 7,9$; keskiarvo $\pm$ keskiarvon keskivirhe). Rottien yleinen aktiivisuus oli samanlainen kaikissa ryhmissä.

Nämä tulokset viittaavat vahvasti siihen, että IRI-514:llä on kyky estää tai normalisoida ne käyttäytymisresponsien muutokset, jotka liittyvät lisääntyneeseen ahdistukseen ja muuttuneeseen tunnetilaan psykologiselle (sosiaaliselle) stressille altistettaessa.

Esimerkki 21

IRI-514:n vaikutukset HPA-akselin hormoneihin rotilla sosiaalisen stressin laukaiseman stressin jälkeen

Sosiaaliselle stressille altistus johtaa nisäkkäillä HPA-akselin aktivoitumiseen ja verenkierrossa kiertävän kortikotropiinin (ACTH) ja kortikosteroidien (COR) kohonemisiin tasoihin.

Sosiaalisen stressin asukas-tunkeilija-paradigmasa tunkeilija-urosrotta sijoitetaan aggressiivisen asukasrotan kotihäkkiin. Tämä johtaa vuorovaikutukseen, joka vakiinnuttaa yleensä asukasrotan ylivallan. Hävinneet eläimet osoittavat yhtenäisesti HPA-akselista peräisin olevia kohonneita hormonitasoja ja lisääntynyttä ahdistusta.

Näissä tutkimuksissa 13 - 16 tunkeilijarotalle sovitettiin kaulalaskimoon kestokatetrit, jotta verinäytteet saataisiin koottua, ja niiden annettiin toipua. Eläimiin injektoidiin sen jälkeen ihonalaisesti joko IRI-514:ää annoksena 1 mg/kg tai yhtä suuri tilavuus vehikke-
liä (normaali suolaliuos; kontrollirotat) 24 tuntia ennen kuin ne pantiin urospuolisen asukasrotan häkkiin. Verinäyte kerättiin heti ennen stressitekijälle altistusta, jotta saataisiin määritettyä ACTH:n ja COR:n perustasot plasmas-
sa. Tunkeilijarotat altistettiin sitten asukasurokselle ja tuloksena olevalle vihamieliselle vuorovaikutukselle 30

minuutin ajan. Ruumiillinen vahingoittuminen estettiin suojaamalla tunkeilija pleksilasihäkillä, mikä täten tarjosi suhteellisen puhtaan psykologisen stressin mallin. Verinäytteet kerättiin 10 minuutin ja 20 minuutin kuluttua kohtaamisesta, ja ACTH:n ja COR:n tasot määritettiin.

Taulukko 1 esittää yhteenvetona näiden kokeiden tulokset. Esitetään ACTH:n ja COR:n tasojen geometriset keskiarvot ja luottamusvälit (C.I.) kontrollirotille tai IRI-514:llä käsitellyille rotille, jotka on mitattu ennen stressiä ja 10 ja 20 minuuttia stressille altistuksen jälkeen. ACTH:n perustasot olivat samanlaisia kontrollieläimillä ja IRI-514-altistetuille eläimillä ($p = 0,2817$). Kontrollirotissa ACTH:n periferaaliset tasot nousivat 3,4 pg/ml:sta 56,8 pg/ml:aan 10 minuutin kuluttua stressistä, ja pysyivät koholla 20 minuuttia sen jälkeen kun oli altistettu sosiaaliselle paradigmalle. Mikä tärkeämpää, 10 minuuttia stressille altistuksen jälkeen IRI-514:llä käsitellyissä rotissa havaittiin merkitsevästi alempia ACTH-tasoja (28,2 pg/ml) kontrolleihin verrattuna ($p = 0,0370$). ACTH-tasot olivat myös alempia IRI-514:llä käsitellyissä eläimissä (25,2 pg/ml) kuin kontrollieläimissä (52,5 pg/ml), kun ne mitattiin 20 minuuttia stressitekijälle altistamisen jälkeen. Tämä jälkimmäinen ero ei kuitenkaan saavuttanut tilastollista merkitsevyyttä ($p = 0,0788$). Kontrollirotissa ja IRI-514:llä käsitellyissä rotissa ei havaittu mitään eroja COR-tasoissa ennen stressitekijälle altistamista tai sen jälkeen.

Taulukko 1

		<u>Vehikkeli (plasebo)</u>					
		Aika	N	Geometrinen	Alempi	Ylempi	p-arvo
<u>Hormoni</u>	<u>(min)</u>			keskiarvo	C.I.	C.I.	
5	ACTH	Perusarvo	14	3,4	1,6	5,2	0,2817
		10	14	56,8	40,5	73,1	0,0370
		20	14	52,5	35,2	69,8	0,0788
10	Kortiko-steroni	Perusarvo	13	35,5	27,9	43,1	0,1906
		10	13	245,7	210,7	280,7	0,7022
		20	13	229,2	175,7	282,7	0,9687
<u>IRI-514 (1mg/kg)</u>							
		Aika	N	Geometrinen	Alempi	Ylempi	p-arvo
<u>Hormoni</u>	<u>(min)</u>			keskiarvo	C.I.	C.I.	
15	ACTH	Perusarvo	16	1,5	0,7	2,3	0,2817
		10	16	28,2	23,1	33,3	0,0370
		20	16	25,2	17,7	32,7	0,0788
20	Kortiko-steroni	Perusarvo	15	46,5	36,5	56,5	0,1906
		10	15	230,9	210,9	250,9	0,7022
		20	13	221,5	189,5	253,5	0,9687

p-arvo on satunnaistettu lohkokoe (randomized block design) (kaksireunainen), joka perustuu logaritmisesti muunnettuun aineistoon.

25 Alaraja = geometrinen keskiarvo - keskivirhe
Yläraja = geometrinen keskiarvo + keskivirhe

30 Nämä tulokset viittaavat vahvasti siihen, että IRI-514 kykenee suppressoimaan tai moduloimaan HPA-akselista peräisin olevien hormonien nousua, jotka liittyvät lisääntyneeseen ahdistukseen ja muuttuneisiin tunnetiloihin psykologiselle (sosiaaliselle) stressille altistettaessa.

Esimerkki 22

IRI-514:n stabiilius in vivo

35 Tämä tutkimus suoritettiin, jotta saataisiin tutkittua kokonaisradioaktiivisuuden sijoittumista ja farma-

kokinetiikkaa sen jälkeen kun annettiin laskimonsisäinen (IV) kerta-annos ^{14}C -IRI-514:ää rotille. Peptidi IRI-514 syntetisoitiin, kuten esimerkissä 1 yllä kuvataan, ja ^{14}C -Arg inkorporoitiin, jotta yhdistettä voitaisiin jäljittää detektoimalla radioaktiivisia emissioita eläimille antamisen jälkeen. Plasman ja virtsan radioaktiivisuutta analysoitiin, jotta saataisiin määritettyä ^{14}C -IRI-514:ään liittyneen materiaalin jakautumisominaisuuksia kahdella annostasolla, 0,1 ja 10 mg IRI-514:ää/kg.

Urospuoliset rotat (kolme annostasolle 0,1 mg/kg ja kaksi annostasolle 10 mg/kg) katetroitiin kaulalaskimon, kaulavaltimon ja virtsarakon kautta. Eläimiä pidettiin 5-prosenttisessa dekstroosi-infuusiossa kaulalaskimokatetrin kautta ja virtsarakkoa kasteltiin jatkuvasti steriilillä vedellä, jotta saatiin stimuloitua säännöllistä tyhjenemistä. Laimea virtsa kerättiin peniskatetrin ja fraktionkerääjän avulla. Kukin eläin sai 10 μCi ^{14}C -IRI-514:ää leimaamattoman IRI-514:n kanssa, niin että kokonaisannostaso kaulalaskimokatetrin kautta oli joko 0,1 tai 10 mg/kg. Verinäytteet kerättiin kaulavaltimokatetrasta ennen annosta ja 1, 5, 10, 20, 40, 80 minuutin ja 2, 4, 6 ja 24 tunnin kuluttua annoksesta. Laimea virtsa kerättiin aikavälein 0 - 5, 5 - 10, 10 - 20, 20 - 40, 40 - 80, 80 - 120 minuuttia ja joka 15. minuutti sen jälkeen aina 24 tuntiin saakka annoksen antamisesta. Merkittävää radioaktiivisuutta osoittavista plasma- ja virtsanäytteistä määritettiin korkean paineen nestekromatografialla (HPLC) alkuperäinen ^{14}C -IRI-514-pitoisuus, jotta aineenvaihdunnan määrä saatiin arvioitua.

Tulokset molempien annostasojen jälkeen viittasivat t_{1/2}:een (eliminoitumisen puoliintumisaikaan), joka oli välillä 25,3 - 28 minuuttia, joka määritettiin plasman kokonaisradioaktiivisuustuloksista, jotka havaittiin näytteissä, jotka otettiin 10 minuutin - 2 tunnin välillä annoksen antamisen jälkeen. Plasmakonsentraatiota ajan funktiona

kuvaavan käyrän alla oleva pinta-ala, (AUC) 0-24 tuntia, oli verrannollinen annettuun annokseen. AUC, joka seurasi alhaista annosta, oli 0,162 ja 0,164 μg -ekvivalenttia x tuntia/ml ja AUC suuren annoksen jälkeen oli 20,11 ja 22,23 μg -ekvivalenttia x tuntia/ml. Plasmanäytteiden, jotka saatiin 0 - 40 minuuttia kunkin annoksen antamisen jälkeen, HPLC-analyysi viittasi rajoitettuun metabolismiin molemmilla annostasoiilla. Noin 87,9 - 96,4 % kokonaisradioaktiivisuudesta 1 - 2 minuutin näytteessä oli alkuperäistä peptidiä; 44 - 61,9 % kokonaisradioaktiivisuudesta 40 minuutin näytteessä oli alkuperäistä peptidiä.

Virtsatulosten analyysi molemmista annostasoiista viittasi siihen, että 38,8 - 67,1 % eliminoitui 40 minuutin aikana; 73,9 - 82,9 % eliminoitui 2 tunnin aikana; ja 86,2 - 94 % alkuperäisestä ja aineenvaihduntatuotteista eliminoitui 24 tuntia antamisesta. 62,5 - 63,8 % kokonaisradioaktiivisuudesta, joka eliminoitui viiden ensimmäisen minuutin aikana, osoitettiin HPLC-analyysillä olevan alkuperäistä peptidiä. 40 - 80 minuutin kuluttua annoksesta kerätyssä näytteessä 5,4 - 18,6 % eliminoituneesta kokonaisradioaktiivisuudesta tunnistettiin alkuperäiseksi peptidiksi.

Pääteltiin, että kokonaisradioaktiivisuuden, IRI-514:n ja sen metaboliittien tasot vähenivät nopeasti plasmassa ^{14}C -IRI-514:n laskimonsisäisen antamisen jälkeen, mikä johtui poistumisesta munuaisten kautta. Laskimonsisäistä antamista seuraavan IRI-514:n jakauma ja farmakokinetiikka vaikuttavat olevan riippumattomia annoksesta (joko 0,1 tai 10 mg/kg) plasman $t_{1/2}$:n, AUC:n ja virtsaneritystulosten vertailun perusteella määritettynä. Lopuksi peptidin metabolismi on rajoittunut sen ollessa verenkielrossa.

B. Peptidin kohdassa 4 olevan Pro:n antama stabiilius

Asetyyli-Arg-Pro-Asp-Val-Phe-NH₂ ja asetyyli-Arg-Pro-Asp-Pro-Phe-NH₂ [IRI-514] syntetisoitiin yllä kuvatuil-

la menetelmillä niin, että ^{14}C -Arg inkorporoitiin, jotta yhdistettä voitiin jäljittää detektoimalla radioaktiivisia emissioita eläimille antamisen jälkeen. Sen jälkeen kun rotille oli tehty suonensisäinen antaminen yllä osassa A kuvatuilla menetelmillä, yli 90 % annetusta radioaktiivisuudesta havaittiin virtsassa yli kuuden (6) tunnin ajan molempien yhdisteiden tapauksessa.

Virtsä tutkittiin sitten HPLC:llä järjestelmässä, jonka osoitettiin erottavan ehjän alkuperäisen yhdisteen hajoamistuotteistaan. Asetyyli-Arg-Pro-Asp-Val-Phe-NH₂:lle noin 25 % virtsan radioaktiivisuudesta oli liittynään alkuperäiseen yhdisteeseen, kun taas asetyyli-Arg-Pro-Asp-Pro-Phe-NH₂:lle 64 % radioaktiivisuudesta havaittiin olevan liittynään alkuperäiseen yhdisteeseen. Täten Val:n substituoitu Pro:lla kohdassa 4 antoi yhdisteelle tehostunutta stabiiliutta ruumiissa kulkeutumisen aikana ja virtsassa poistumisen aikana laskimonsisäisen antamisen jälkeen.

Tämän keksinnön useita muutoksia ja variaatioita sisältyy yllä nimettyyn hakemukseen ja niiden odotetaan olevan ilmeisiä ammattimiehelle. Esimerkiksi eri menetelmillä voidaan tuottaa peptidejä, jotka ovat muita kuin esimerkeissä olleet, ja jotka ovat yllä olevan kaavan mukaisia. Ammattimies voi testata peptidit yllä olevilla määrityksillä ilman tarpeetonta kokeilua tämän paljastuksen avulla. Sellaisten tämän keksinnön koostumusten ja menetelmien muokkausten ja muutosten uskotaan kuuluvan tähän liitettyjen patenttivaatimusten suojapiiriin.

Sekvenssiluettelo**(1) YLEISTÄ TIETOA:**

(i) HAKIJA: Immunobiology Research Institute, Inc.
(ii) KEKSINNÖN OTSIKKO Immuunijärjestelmien ja hermostojen säätelyssä hyödyllisiä pentapeptidejä

(iii) SEKVENSSIEN LUKUMÄÄRÄ: 15

(iv) KIRJEENVAIHTO-OSOITE:

- (A) VASTAANOTTAJA: Howson and Howson
- (B) KATU: 321 Norristown Road, Box 457
- (C) KAUPUNKI: Spring House
- (D) OSAVALTIO: PA
- (E) MAA: U.S.A.
- (F) POSTINUMERO: 19477

(v) TIETOKONEELLA LUETTAVISSA OLEVA MUOTO:

- (A) VÄLINETYYPPI: Levyke
- (B) TIETOKONE: IBM PC -yhteensopiva
- (C) KÄYTTÖJÄRJESTELMÄ: PC-DOS/MS-DOS
- (D) OHJELMISTO: PatentIn Release #1.0, versio 1.25

(vi) TÄMÄN HAKEMUKSEN TIEDOT:

- (A) HAKEMUKSEN NUMERO:
- (B) JÄTTÖPÄIVÄ:
- (C) LUOKITUS:

(vii) AIKAISEMMAN HAKEMUKSEN TIEDOT:

- (A) HAKEMUKSEN NUMERO: US 07/708 085
- (B) JÄTTÖPÄIVÄ: 3. kesäkuuta 1991

(viii) ASIAMIEHEN TIEDOT:

- (A) NIMI: Bak, Mary E.
- (B) REKISTERINUMERO: 31 215
- (C) REFERENSSI/LUPANUMERO: IRIP-PC40A

(ix) TELEYHTEYSTIEDOT:

- (A) PUHELIN: (215) 540-9206
- (B) TELEFAX: (215) 540-5818
- (C) TELEX: 910-250-6892

(2) INFORMAATIO SEQ ID NRO 1:LLE:

(i) SEKVENSSIN PIIRTEET:

- (A) PITUUS: 5 aminohappoa
- (B) TYYPPI: aminohappo
- (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(ix) PIIRRE:

- (A) NIMI/AVAIN: muokattu kohta
- (B) KOHTA: 1
- (D) MUUTA TIETOA: /leima=asetyyli
/huomautus="Asetyyli sijaitsee peptidin
aminoterminalisessa tähteessä."

(ix) PIIRRE:

- (A) NIMI/AVAIN: muokattu kohta
- (B) KOHTA: 5
- (D) MUUTA TIETOA: /leima= NH_2
/huomautus=" NH_2 on kiinnittynyt peptidin
karboksipäähän."

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NRO 1:

Arg Pro Asp Pro Phe
1 5

(2) INFORMAATIO SEQ ID NRO 2:LLE:

(i) SEKVENSSIN PIIRTEET:

- (A) PITUUS: 5 aminohappoa
- (B) TYYPPI: aminohappo
- (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(ix) PIIRRE:

(A) NIMI/AVAIN: muokattu kohta

(B) KOHTA: 1

(D) MUUTA TIETOA: /leima=asetyyli

/huomautus="Asetyyli on kiinnittynyt peptidin aminoterminaliseen päähän"

(ix) PIIRRE:

(A) NIMI/AVAIN: muokattu kohta

(B) KOHTA: 5

(D) MUUTA TIETOA: /leima= NH_2

/huomautus=" NH_2 on kiinnittynyt peptidin karboksipäähän."

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NRO 2:

Arg Pro Asp Pro Tyr

1

5

(2) INFORMAATIO SEQ ID NRO 3:LLE:

(i) SEKVENSSIN PIIRTEET:

(A) PITUUS: 5 aminohappoa

(B) TYYPPI: aminohappo

(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(ix) PIIRRE:

(A) NIMI/AVAIN: muokattu kohta

(B) KOHTA: 1

(D) MUUTA TIETOA: /leima=asetyyli

/huomautus="Asetyyli on kiinnittynyt peptidin aminopäähän."

(ix) PIIRRE:

(A) NIMI/AVAIN: muokattu kohta

(B) KOHTA: 5

(D) MUUTA TIETOA: /leima= NH_2 /huomautus=" NH_2 on kiinnittynyt peptidin
karboksipäähän."

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NRO 3:

Arg Pro Asn Pro Phe

1

5

(2) INFORMAATIO SEQ ID NRO 4:LLE:

(i) SEKVENSSIN PIIRTEET:

(A) PITUUS: 5 aminohappoa

(B) TYYPPI: aminohappo

(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(ix) PIIRRE:

(A) NIMI/AVAIN: muokattu kohta

(B) KOHTA: 1

(D) MUUTA TIETOA: /leima=asetyyli

/huomautus="Asetyyli on kiinnittynyt pep-
tidin aminopäähän."

(ix) PIIRRE:

(A) NIMI/AVAIN: muokattu kohta

(B) KOHTA: 5

(D) MUUTA TIETOA: /leima= NH_2 /huomautus=" NH_2 on kiinnittynyt peptidin
karboksipäähän."

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NRO 4:

Arg Pro Asn Pro Tyr

1

5

(2) INFORMAATIO SEQ ID NRO 5:LLE:

(i) SEKVENSSIN PIIRTEET:

- (A) PITUUS: 5 aminohappoa
- (B) TYYPPI: aminohappo
- (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(ix) PIIRRE:

- (A) NIMI/AVAIN: muokattu kohta
- (B) KOHTA: 1
- (D) MUUTA TIETOA: /leima=asetyyli
/huomautus="Asetyyli on kiinnittynyt peptidin aminopäähän."

(ix) PIIRRE:

- (A) NIMI/AVAIN: muokattu kohta
- (B) KOHTA: 5
- (D) MUUTA TIETOA: /leima=NH₂
/huomautus="NH₂ on kiinnittynyt peptidin karboksipäähän."

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NRO 5:

Arg Pro Ala Pro Phe

1

5

(2) INFORMAATIO SEQ ID NRO 6:LLE:

(i) SEKVENSSIN PIIRTEET:

- (A) PITUUS: 5 aminohappoa
- (B) TYYPPI: aminohappo
- (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(ix) PIIRRE:

- (A) NIMI/AVAIN: muokattu kohta
- (B) KOHTA: 1
- (D) MUUTA TIETOA: /leima=asetyyli
/huomautus="Asetyyli on kiinnittynyt peptidin aminopäähän."

(ix) PIIRRE:

(A) NIMI/AVAIN: muokattu kohta

(B) KOHTA: 5

(D) MUUTA TIETOA: /leima= NH_2
/huomautus=" NH_2 on kiinnittynyt peptidin
karboksipäähän."

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NRO 6:

Arg Pro Ala Pro Tyr

1

5

(2) INFORMAATIO SEQ ID NRO 7:LLE:

(i) SEKVENSSIN PIIRTEET:

(A) PITUUS: 5 aminohappoa

(B) TYYPPI: aminohappo

(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(ix) PIIRRE:

(A) NIMI/AVAIN: muokattu kohta

(B) KOHTA: 1

(D) MUUTA TIETOA: /leima=asetyyli
/huomautus="Asetyyli on kiinnittynyt pep-
tidin aminopäähän."

(ix) PIIRRE:

(A) NIMI/AVAIN: muokattu kohta

(B) KOHTA: 5

(D) MUUTA TIETOA: /leima= NH_2
/huomautus=" NH_2 on kiinnittynyt peptidin
karboksipäähän."

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NRO 7:

Arg Pro Glu Pro Tyr

1

5

(2) INFORMAATIO SEQ ID NRO 8:LLE:

(i) SEKVENSSIN PIIRTEET:

- (A) PITUUS: 5 aminohappoa
- (B) TYYPPI: aminohappo
- (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(ix) PIIRRE:

- (A) NIMI/AVAIN: muokattu kohta
- (B) KOHTA: 1
- (D) MUUTA TIETOA: /leima=asetyyli
/huomautus="Asetyyli on kiinnittynyt peptidin aminopäähän."

(ix) PIIRRE:

- (A) NIMI/AVAIN: muokattu kohta
- (B) KOHTA: 5
- (D) MUUTA TIETOA: /leima= NH_2
/huomautus=" NH_2 on kiinnittynyt peptidin karboksipäähän."

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NRO 8:

Arg Pro Ser Pro Phe

1

5

(2) INFORMAATIO SEQ ID NRO 9:LLE:

(i) SEKVENSSIN PIIRTEET:

- (A) PITUUS: 5 aminohappoa
- (B) TYYPPI: aminohappo
- (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(ix) PIIRRE:

- (A) NIMI/AVAIN: muokattu kohta
- (B) KOHTA: 1
- (D) MUUTA TIETOA: /leima=asetyyli
/huomautus="Asetyyli on kiinnittynyt peptidin aminopäähän."

(ix) PIIRRE:

(A) NIMI/AVAIN: muokattu kohta

(B) KOHTA: 5

(D) MUUTA TIETOA: /leima= NH_2
/huomautus=" NH_2 on kiinnittynyt peptidin
karboksipäähän."

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NRO 9:

Arg Pro Thr Pro Phe

1

5

(2) INFORMAATIO SEQ ID NRO 10:LLE:

(i) SEKVENSSIN PIIRTEET:

(A) PITUUS: 5 aminohappoa

(B) TYYPPI: aminohappo

(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(ix) PIIRRE:

(A) NIMI/AVAIN: muokattu kohta

(B) KOHTA: 1

(D) MUUTA TIETOA: /leima=asetyyli
/huomautus="Asetyyli on kiinnittynyt pep-
tidin aminopäähän."

(ix) PIIRRE:

(A) NIMI/AVAIN: muokattu kohta

(B) KOHTA: 5

(D) MUUTA TIETOA: /leima= NH_2
/huomautus=" NH_2 on kiinnittynyt peptidin
karboksipäähän."

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NRO 10:

Arg Pro Thr Pro Tyr

1

5

(2) INFORMAATIO SEQ ID NRO 11:LLE:

(i) SEKVENSSIN PIIRTEET:

- (A) PITUUS: 5 aminohappoa
- (B) TYYPPI: aminohappo
- (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(ix) PIIRRE:

- (A) NIMI/AVAIN: muokattu kohta
- (B) KOHTA: 1
- (D) MUUTA TIETOA: /leima=asetyyli
/huomautus="Asetyyli on kiinnittynyt peptidin aminopäähän."

(ix) PIIRRE:

- (A) NIMI/AVAIN: muokattu kohta
- (B) KOHTA: 5
- (D) MUUTA TIETOA: /leima= NH_2
/huomautus=" NH_2 on kiinnittynyt peptidin karboksipäähän."

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NRO 11:

Arg Pro Ser Pro Tyr

1

5

(2) INFORMAATIO SEQ ID NRO 12:LLE:

(i) SEKVENSSIN PIIRTEET:

- (A) PITUUS: 5 aminohappoa
- (B) TYYPPI: aminohappo
- (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(ix) PIIRRE:

- (A) NIMI/AVAIN: muokattu kohta
- (B) KOHTA: 1
- (D) MUUTA TIETOA: /leima=asetyyli
/huomautus="Asetyyli on kiinnittynyt peptidin aminopäähän."

(ix) PIIRRE:

- (A) NIMI/AVAIN: muokattu kohta
- (B) KOHTA: 5
- (D) MUUTA TIETOA: /leima=pClPhe-NH₂
/huomautus="Aminohappo Phe on substi-
tuoitu para-Cl:llä ja NH₂ on kiinnitty-
nyt peptidin karboksipäähän."

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NRO 12:

Arg Pro Asp Pro Xaa

1

5

(2) INFORMAATIO SEQ ID NRO 13:LLE:

(i) SEKVENSSIN PIIRTEET:

- (A) PITUUS: 5 aminohappoa
- (B) TYYPPI: aminohappo
- (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(ix) PIIRRE:

- (A) NIMI/AVAIN: muokattu kohta
- (B) KOHTA: 1
- (D) MUUTA TIETOA: /leima=Dekanoyyli
/huomautus="Dekanoyyli on kiinnittynyt
peptidin aminopäähän."

(ix) PIIRRE:

- (A) NIMI/AVAIN: muokattu kohta
- (B) KOHTA: 5
- (D) MUUTA TIETOA: /leima=NH₂
/huomautus="NH₂ on kiinnittynyt peptidin
karboksipäähän."

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NRO 13:

Arg Pro Asp Pro Phe

1

5

(2) INFORMAATIO SEQ ID NRO 14:LLE:

(i) SEKVENSSIN PIIRTEET:

- (A) PITUUS: 5 aminohappoa
- (B) TYYPPI: aminohappo
- (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(ix) PIIRRE:

- (A) NIMI/AVAIN: muokattu kohta
- (B) KOHTA: 1
- (D) MUUTA TIETOA: /leima=asetyyli
/huomautus="Asetyyli on kiinnittynyt peptidin aminopäähän."

(ix) PIIRRE:

- (A) NIMI/AVAIN: muokattu kohta
- (B) KOHTA: 5
- (D) MUUTA TIETOA: /leima= NH_2
/huomautus=" NH_2 on kiinnittynyt peptidin karboksipäähän."

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NRO 14:

Arg Pro Glu Pro Phe

1

5

(2) INFORMAATIO SEQ ID NRO 14:LLE:

(i) SEKVENSSIN PIIRTEET:

- (A) PITUUS: 5 aminohappoa
- (B) TYYPPI: aminohappo
- (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(ix) PIIRRE:

- (A) NIMI/AVAIN: muokattu kohta
- (B) KOHTA: 1
- (D) MUUTA TIETOA: /leima=Butyryyli
/huomautus="Butyryyli on kiinnittynyt peptidin aminopäähän."

(ix) PIIRRE:

(A) NIMI/AVAIN: muokattu kohta

(B) KOHTA: 5

(D) MUUTA TIETOA: /leima= NH_2

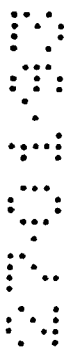
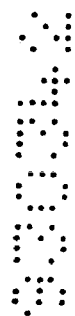
/huomautus=" NH_2 on kiinnittynyt peptidin
karboksipäähän."

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NRO 15:

Arg Pro Asn Pro Phe

1

5



Patenttivaatimukset:

1. Pentapeptidi, jolla on kaava:

5 $R^1-V-W-X-Y-Z-R^2$

tai sen farmaseuttisesti sovelias happo- tai emäsadditio-
suola, t u n n e t t u siitä, että:

10 R^1 on vety tai C_{1-10} -alempi alkyyli tai alkanoyyli;
V on Arg;
W on Pro, dehydro-Pro tai hydroksi-Pro;
X on Asp, Ser, Thr, Asn tai Glu;
Y on Pro, dehydro-Pro tai hydroksi-Pro;
15 Z on Phe tai Tyr, mahdollisesti substituoitu yhdel-
lä tai useammalla halogeeni-, nitro- tai hydroksyyli-ryh-
mällä;

ja R^2 on OH tai NR^3R^4 ,

jossa R^3 ja R^4 kukin voivat olla toisistaan riippu-
matta H, suoraketjuinen tai haarautunut alkyyli tai alke-
20 nnyyli, jossa on 1 - 6 hiiliatomia, mahdollisesti substi-
tuoitu aryyli-ryhmällä tai aryyli-llä, joka on substituoitu
joko halogeenilla tai suoralla ketjulla, haarautuneella
alkyyli-llä tai alkenyyli-llä, jossa on 1 - 6 hiiliatomia,
tai R^3 ja R^4 yhdessä muodostavat 3 - 7 hiiliatomin syklisen
25 metyleeniryhmän, ja

jossa kaikki seuraavista: V, W, X, Y ja Z ovat
L-aminohappoja tai mahdollisesti yksi tai useampi seuraa-
vista: V, W, X, Y ja Z on D-aminohappo.

30 2. Farmaseuttinen koostumus, joka sisältää tera-
peuttisesti vaikuttavan määrän ainakin yhtä patenttivaati-
muksen 1 mukaista pentapeptidiä farmaseuttisesti sove-
liaassa formulaatiossa.

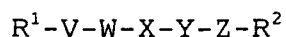
3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen koostumus, joka
soveltuu suun kautta annettavaksi.

4. Pentapeptidi, joka on joko:

- asetyyli-Arg-Pro-Asp-Pro-Phe-NH₂, SEQ ID nro 1;
 asetyyli-Arg-Pro-Asp-Pro-Tyr-NH₂, SEQ ID nro 2;
 asetyyli-Arg-Pro-Asn-Pro-Phe-NH₂, SEQ ID nro 3;
 5 asetyyli-Arg-Pro-Asn-Pro-Tyr-NH₂, SEQ ID nro 4;
 asetyyli-Arg-Pro-Glu-Pro-Tyr-NH₂, SEQ ID nro 7;
 asetyyli-Arg-Pro-Ser-Pro-Phe-NH₂, SEQ ID nro 8;
 asetyyli-Arg-Pro-Thr-Pro-Phe-NH₂, SEQ ID nro 9;
 asetyyli-Arg-Pro-Thr-Pro-Tyr-NH₂, SEQ ID nro 10;
 10 asetyyli-Arg-Pro-Ser-Pro-Tyr-NH₂, SEQ ID nro 11;
 asetyyli-Arg-Pro-Asp-Pro-pClPhe-NH₂, SEQ ID nro 12;
 dekanoyyli-Arg-Pro-Asp-Pro-Phe-NH₂, SEQ ID nro 13;
 asetyyli-Arg-Pro-Glu-Pro-Phe-NH₂, SEQ ID nro 14; ja
 butyryyli-Arg-Pro-Asn-Pro-Phe-NH₂, SEQ ID nro 15.

- 15 5. Menetelmä, jolla voidaan hoitaa kohdetta, jolla
 on ruumiillinen tila, jota karakterisoi immuunijärjestel-
 män häiriö, t u n n e t t u siitä, että mainitulle koh-
 teelle annetaan terapeuttisesti tehokas määrä ainakin yh-
 tä pentapeptidiä, jolla on kaava:

20



tai sen farmaseuttisesti soveliaasta happo- tai emäsaddi-
 tiosuolaa, t u n n e t t u siitä, että:

- 25 R^1 on vety tai C₁₋₁₀-alempi alkyyli tai alkanoyyli;
 V on Arg;
 W on Pro, dehydro-Pro tai hydroksi-Pro;
 X on Asp, Ser, Thr, Asn tai Glu;
 Y on Pro, dehydro-Pro tai hydroksi-Pro;

- 30 Z on Phe tai Tyr, mahdollisesti substituoitu yhdel-
 lä tai useammalla halogeeni-, nitro- tai hydroksyyli-ryh-
 mällä;

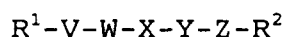
- ja R^2 on OH tai NR³R⁴,
 jossa R³ ja R⁴ kukin voivat olla toisistaan riippu-
 35 matta H, suoraketjuinen tai haarautunut alkyyli tai alke-

nyyli, jossa on 1 - 6 hiiliatomia, mahdollisesti substi-
tuoitu aryyliiryhmällä tai aryyllillä, joka on substituoitu
joko halogeenilla tai suoralla ketjulla, haarautuneella
alkyyllillä tai alkenyyllillä, jossa on 1 - 6 hiiliatomia,
5 tai R^3 ja R^4 yhdessä muodostavat 3 - 7 hiiliatomin syklisen
metyleeniryhmän, ja

jossa kaikki seuraavista: V, W, X, Y ja Z ovat
L-aminohappoja tai mahdollisesti yksi tai useampi seuraa-
vista: V, W, X, Y ja Z on D-aminohappo.

10 6. Menetelmä, jolla voidaan hoitaa kohdetta, jolla
on ruumiillinen tila, jota karakterisoi keskushermoston
häiriö, t u n n e t t u siitä, että mainitulle kohteelle
annetaan terapeuttisesti tehokas määrä ainakin yhtä penta-
peptidiä, jolla on kaava:

15



tai sen farmaseuttisesti soveliaasta happo- tai emäsaddi-
tiosuolaa, t u n n e t t u siitä, että:

20 R^1 on vety tai C_{1-10} -alempi alkyyli tai alkanoyyli;
V on Arg;

W on Pro, dehydro-Pro tai hydroksi-Pro;

X on Asp, Ser, Thr, Asn tai Glu;

Y on Pro, dehydro-Pro tai hydroksi-Pro;

25 Z on Phe tai Tyr, mahdollisesti substituoitu yhdel-
lä tai useammalla halogeeni-, nitro- tai hydroksyyli-
ryhmällä;

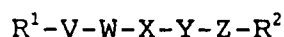
ja R^2 on OH tai NR^3R^4 ,

30 jossa R^3 ja R^4 kukin voivat olla toisistaan riippu-
matta H, suoraketjuinen tai haarautunut alkyyli tai alke-
nyyli, jossa on 1 - 6 hiiliatomia, mahdollisesti substi-
tuoitu aryyliiryhmällä tai aryyllillä, joka on substituoitu
joko halogeenilla tai suoralla ketjulla, haarautuneella
alkyyllillä tai alkenyyllillä, jossa on 1 - 6 hiiliatomia,

tai R^3 ja R^4 yhdessä muodostavat 3 - 7 hiiliatomin syklisen metyleeniryhmän, ja

jossa kaikki seuraavista: V, W, X, Y ja Z ovat L-aminohappoja tai mahdollisesti yksi tai useampi seuraavista: V, W, X, Y ja Z on D-aminohappo.

7. Menetelmä, jolla voidaan valmistaa pentapeptidi, jolla on kaava:



10

tai sen farmaseuttisesti soveliaasta happo- tai emäsadditiosuolaa, t u n n e t t u siitä, että:

R^1 on vety tai C_{1-10} -alempi alkyyli tai alkanoyyli;

V on Arg;

15

W on Pro, dehydro-Pro tai hydroksi-Pro;

X on Asp, Ser, Thr, Asn tai Glu;

Y on Pro, dehydro-Pro tai hydroksi-Pro;

Z on Phe tai Tyr, mahdollisesti substituoitu yhdellä tai useammalla halogeeni-, nitro- tai hydroksyyli-ryhmällä;

20

ja R^2 on OH tai NR^3R^4 ,

jossa R^3 ja R^4 kukin voivat olla toisistaan riippumatta H, suoraketjuinen tai haarautunut alkyyli tai alkenyyli, jossa on 1 - 6 hiiliatomia, mahdollisesti substituoitu aryyli-ryhmällä tai aryyli-ryhmällä, joka on substituoitu joko halogeenilla tai suoralla ketjulla, haarautuneella alkyylillä tai alkenyylillä, jossa on 1 - 6 hiiliatomia, tai R^3 ja R^4 yhdessä muodostavat 3 - 7 hiiliatomin syklisen metyleeniryhmän, ja

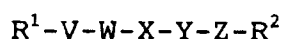
25

30

jossa kaikki seuraavista: V, W, X, Y ja Z ovat L-aminohappoja tai mahdollisesti yksi tai useampi seuraavista: V, W, X, Y ja Z on D-aminohappo, ja mainittu menetelmä sisältää kiinteän faasin synteessin.

35

8. Menetelmä, jolla voidaan valmistaa pentapeptidi, jolla on kaava:



tai sen farmaseuttisesti soveliaasta happo- tai emäsaddi-
tiosuolaa, t u n n e t t u siitä, että:

- 5 R^1 on vety tai C_{1-10} -alempi alkyyli tai alkanoyyli;
 V on Arg;
 W on Pro, dehydro-Pro tai hydroksi-Pro;
 X on Asp, Ser, Thr, Asn tai Glu;
 Y on Pro, dehydro-Pro tai hydroksi-Pro;

- 10 Z on Phe tai Tyr, mahdollisesti substituoitu yhdel-
lä tai useammalla halogeeni-, nitro- tai hydroksyyli-ryh-
mällä;

 ja R^2 on OH tai NR^3R^4 ,

- jossa R^3 ja R^4 kukin voivat olla toisistaan riippu-
15 matta H, suoraketjuinen tai haarautunut alkyyli tai alke-
nyyli, jossa on 1 - 6 hiiliatomia, mahdollisesti substi-
tuoitu aryyli-ryhmällä tai aryyllillä, joka on substituoitu
joko halogeenilla tai suoralla ketjulla, haarautuneella
alkyyllillä tai alkenyyllillä, jossa on 1 - 6 hiiliatomia,
20 tai R^3 ja R^4 yhdessä muodostavat 3 - 7 hiiliatomin syklisen
metyleeniryhmän, ja

- jossa kaikki seuraavista: V, W, X, Y ja Z ovat
L-aminohappoja tai mahdollisesti yksi tai useampi seuraa-
vista: V, W, X, Y ja Z on D-aminohappo, ja mainittu mene-
25 telmä sisältää liuosfaasisynteesin.

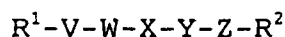
 9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen menetelmä, jossa
mainittu pentapeptidi on joko:

- asetyyli-Arg-Pro-Asp-Pro-Phe-NH₂,
 asetyyli-Arg-Pro-Asp-Pro-Tyr-NH₂,
30 asetyyli-Arg-Pro-Asn-Pro-Phe-NH₂,
 asetyyli-Arg-Pro-Asn-Pro-Tyr-NH₂,
 asetyyli-Arg-Pro-Glu-Pro-Tyr-NH₂,
 asetyyli-Arg-Pro-Ser-Pro-Phe-NH₂,
 asetyyli-Arg-Pro-Thr-Pro-Phe-NH₂,
35 asetyyli-Arg-Pro-Thr-Pro-Tyr-NH₂,

asetyyli-Arg-Pro-Ser-Pro-Tyr-NH₂,
 asetyyli-Arg-Pro-Asp-Pro-pClPhe-NH₂,
 dekanoyyli-Arg-Pro-Asp-Pro-Phe-NH₂,
 asetyyli-Arg-Pro-Glu-Pro-Phe-NH₂, ja
 butyryyli-Arg-Pro-Asn-Pro-Phe-NH₂.

5

10. Sellaisen pentapeptidin käyttö, jolla on kaava:



10 tai sen farmaseuttisesti soveliaan happo- tai emäsaddi-
 tiosuolan, t u n n e t t u siitä, että:

R^1 on vety tai C₁₋₁₀-alempi alkyyli tai alkanoyyli;

V on Arg;

W on Pro, dehydro-Pro tai hydroksi-Pro;

15

X on Asp, Ser, Thr, Asn tai Glu;

Y on Pro, dehydro-Pro tai hydroksi-Pro;

Z on Phe tai Tyr, mahdollisesti substituoitu yhdel-
 lä tai useammalla halogeeni-, nitro- tai hydroksyyli-ryh-
 mällä;

20

ja R^2 on OH tai NR³R⁴,

jossa R³ ja R⁴ kukin voivat olla toisistaan riippu-
 matta H, suoraketjuinen tai haarautunut alkyyli tai alke-
 nyyli, jossa on 1 - 6 hiiliatomia, mahdollisesti substi-
 tuoitu aryyli-ryhmällä tai aryyllillä, joka on substituoitu
 25 joko halogeenilla tai suoralla ketjulla, haarautuneella
 alkyyllillä tai alkenyyllillä, jossa on 1 - 6 hiiliatomia,
 tai R³ ja R⁴ yhdessä muodostavat 3 - 7 hiiliatomin syklisen
 metyleeniryhmän, ja

30

jossa kaikki seuraavista: V, W, X, Y ja Z ovat
 L-aminohappoja tai mahdollisesti yksi tai useampi seuraa-
 vista: V, W, X, Y ja Z on D-aminohappo, kun halutaan val-
 mistaa farmaseuttinen koostumus, joka on hyödyllinen hoi-
 dettaessa immuunijärjestelmän häiriötä ja/tai keskusher-
 moston häiriötä.

Patentkrav:

1. Pentapeptid med formeln:

5 $R^1-V-W-X-Y-Z-R^2$

eller ett farmaceutiskt godtagbart syra- eller basadditionssalt därav, k ä n n e t e c k n a d därav, att

10 R^1 är väte eller C_{1-10} -lägre alkyl eller alkanoyl;
 V är Pro, dehydro-Pro eller hydroxi-Pro;
 X är Asp, Ser, Thr, Asn eller Glu;
 Y är Pro, dehydro-Pro eller hydroxi-pro;
 Z är Phe or Tyr, valfritt substituerad med en eller
 flera halogen-, nitro- eller hydroxylgrupper;
 15 och R^2 är OH eller NR^3R^4 ,

vari R^3 och R^4 vardera självständigt valts ur gruppen bestående av H, rakkedjad eller förgrenad alkyl eller alkenyl med 1 - 6 kolatomer, valfritt substituerad med en arylgrupp eller aryl, substituerad med antingen halogen
 20 eller en rak kedja, förgrenad alkyl eller alkenyl med 1 - 6 kolatomer, eller R^3 och R^4 bildar tillsammans en cyklisk metylengrupp med 3 - 7 kolatomer, och

25 vari samtliga V, W, X, Y och Z är L-aminosyror eller valfritt en eller flera av V, W, X, Y och Z är D-aminosyror.

2. Farmaceutisk komposition, k ä n n e t e c k n a d därav, att den omfattar en terapeutisk effektiv mängd av åtminstone en pentapeptid enligt patentkravet 1 i en farmaceutiskt godtagbar sammansättning.

30 3. Komposition enligt patentkravet 2, k ä n n e t e c k n a d därav, att den lämpar sig för oral administration.

4. Pentapeptid, k ä n n e t e c k n a d därav, att den valts bland:

- acetyl-Arg-Pro-Asp-Pro-Phe-NH₂, SEQ ID nr 1;
 acetyl-Arg-Pro-Asp-Pro-Tyr-NH₂, SEQ ID nr 2;
 acetyl-Arg-Pro-Asn-Pro-Phe-NH₂, SEQ ID nr 3;
 acetyl-Arg-Pro-Asn-Pro-Tyr-NH₂, SEQ ID nr 4;
 5 acetyl-Arg-Pro-Glu-Pro-Tyr-NH₂, SEQ ID nr 7;
 acetyl-Arg-Pro-Ser-Pro-Phe-NH₂, SEQ ID nr 8;
 acetyl-Arg-Pro-Thr-Pro-Phe-NH₂, SEQ ID nr 9;
 acetyl-Arg-Pro-Thr-Pro-Tyr-NH₂, SEQ ID nr 10;
 acetyl-Arg-Pro-Ser-Pro-Tyr-NH₂, SEQ ID nr 11;
 10 acetyl-Arg-Pro-Asp-Pro-pClPhe-NH₂, SEQ ID nr 12;
 dekanoyl-Arg-Pro-Asp-Pro-Phe-NH₂, SEQ ID nr 13;
 acetyl-Arg-Pro-Glu-Pro-Phe-NH₂, SEQ ID nr 14; och
 butyryl-Arg-Pro-Asn-Pro-Phe-NH₂, SEQ ID nr 15.

5. Förfarande för behandling av en individ med ett
 15 fysiskt tillstånd, vilket utmärsk av en störning i immun-
 systemet, k ä n n e t e c k n a t därav, att man åt
 nämnda individ administrerar en terapeutiskt effektiv
 mängd av åtminstone en pentapeptid med formeln



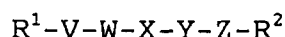
eller ett farmaceutiskt godtagbart syra- eller basaddi-
 tionssalt därav, vari

- 25 R^1 är väte eller C₁₋₁₀-lägre alkyl eller alkanoyl;
 V är Arg;
 W är Pro, dehydro-Pro eller hydroxi-Pro;
 X är Asp, Ser, Thr, Asn eller Glu;
 Y är Pro, dehydro-Pro eller hydroxi-Pro;
 Z är Phe eller Tyr, valfritt substituerad med en
 30 eller flera halogen-, nitro- eller hydroxylgrupper;
 och R^2 är OH eller NR³R⁴,
 vari R³ och R⁴ vardera självständigt valts ur grup-
 pen bestående av H, rakkedjad eller förgrenad alkyl eller
 alkenyl med 1 - 6 kolatomer, valfritt substituerad med en
 35 arylgrupp eller aryl, substituerad med antingen halogen

eller en rak kedja, förgrenad alkyl eller alkenyl med 1 - 6 kolatomer, eller R^3 och R^4 bildar tillsammans en cyklisk metylengrupp med 3 - 7 kolatomer, och

5 vari samtliga V, W, X, Y och Z är L-aminosyror eller valfritt en eller flera av V, W, X, Y och Z är D-aminosyror.

10 6. Förfarande för behandling av en individ med ett fysiskt tillstånd, vilket utmärks av en störning i det centrala nervsystemet, k ä n n e t e c k n a t därav, att man åt nämnda individ administrerar en terapeutiskt effektiv mängd av åtminstone en pentapeptid med formeln:



15 eller ett farmaceutiskt godtagbart syra- eller basadditionssalt därav, vari

R^1 är väte eller C_{1-10} -lägre alkyl eller alkanoyl;

V är Arg;

W är Pro, dehydro-Pro eller hydroxi-Pro;

20 X är Asp, Ser, Thr, Asn eller Glu;

Y är Pro, dehydro-Pro eller hydroxi-Pro;

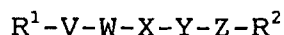
Z är Phe eller Tyr, valfritt substituerad med en eller flera halogen-, nitro- eller hydroxylgrupper;

och R^2 är OH eller NR^3R^4 ,

25 vari R^3 och R^4 vardera självständigt valts ur gruppen bestående av H, rakkedjad eller förgrenad alkyl eller alkenyl med 1 - 6 kolatomer, valfritt substituerad med en arylgrupp eller aryl, substituerad med antingen halogen eller en rak kedja, förgrenad alkyl eller alkenyl med 1 - 6 kolatomer, eller R^3 och R^4 bildar tillsammans en cyklisk metylengrupp med 3 - 7 kolatomer, och

30 vari samtliga V, W, X, Y och Z är L-aminosyror eller valfritt en eller flera av V, W, X, Y och Z är D-aminosyror.

7. Förfarande för framställning av en pentapeptid med formeln



5

eller ett farmaceutiskt godtagbart syra- eller basadditionssalt därav, k ä n n e t e c k n a t därav,

R^1 är väte eller C_{1-10} -lägre alkyl eller alkanoyl;

V är Arg;

10

W är Pro, dehydro-Pro eller hydroxi-Pro;

X är Asp, Ser, Thr, Asn eller Glu;

Y är Pro, dehydro-Pro eller hydroxi-Pro;

Z är Phe eller Tyr, valfritt substituerad med en eller flera halogen-, nitro- eller hydroxylgrupper;

15

och R^2 är OH eller NR^3R^4 ,

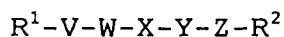
vari R^3 och R^4 vardera självständigt valts ur gruppen bestående av H, rakkedjad eller förgrenad alkyl eller alkenyl med 1 - 6 kolatomer, valfritt substituerad med en arylgrupp eller aryl, substituerad med antingen halogen eller en rak kedja, förgrenad alkyl eller alkenyl med 1 - 6 kolatomer, eller R^3 och R^4 bildar tillsammans en cyklisk metylengrupp med 3 - 7 kolatomer, och

20

vari samtliga V, W, X, Y och Z är L-aminosyror eller valfritt en eller flera av V, W, X, Y och Z är D-aminosyror, nämnda förfarande omfattar en syntes i fast fas.

25

8. Förfarande för framställning av en pentapeptid med formeln:



30

eller ett farmaceutiskt godtagbart syra- eller basadditionssalt därav, k ä n n e t e c k n a t därav

R^1 är väte eller C_{1-10} -lägre alkyl eller alkanoyl;

V är Arg;

35

W är Pro, dehydro-Pro eller hydroxi-Pro;

X är Asp, Ser, Thr, Asn eller Glu;

Y är Pro, dehydro-Pro eller hydroxi-Pro;

Z är Phe eller Tyr, valfritt substituerad med en eller flera halogen-, nitro- eller hydroxylgrupper;

5 och R^2 är OH eller NR^3R^4 ,

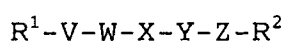
vari R^3 och R^4 vardera självständigt valts ur gruppen bestående av H, rakkedjad eller förgrenad alkyl eller alkenyl med 1 - 6 kolatomer, valfritt substituerad med en arylgrupp eller aryl, substituerad med antingen halogen eller en rak kedja, förgrenad alkyl eller alkenyl med 1 - 6 kolatomer, eller R^3 och R^4 bildar tillsammans en cyklisk metylengrupp med 3 - 7 kolatomer, och

10 vari samtliga V, W, X, Y och Z är L-aminosyror eller valfritt en eller flera av V, W, X, Y och Z är D-aminosyror, nämna förfarande omfattar en syntes i lösningsfas.

9. Förfarande enligt patentkravet 8, k ä n n e - t e c k n a t därav, att nämnda pentapeptid valts bland:

20 acetyl-Arg-Pro-Asp-Pro-Phe-NH₂,
acetyl-Arg-Pro-Asp-Pro-Tyr-NH₂,
acetyl-Arg-Pro-Asn-Pro-Phe-NH₂,
acetyl-Arg-Pro-Asn-Pro-Tyr-NH₂,
acetyl-Arg-Pro-Glu-Pro-Tyr-NH₂,
acetyl-Arg-Pro-Ser-Pro-Phe-NH₂,
25 acetyl-Arg-Pro-Thr-Pro-Phe-NH₂,
acetyl-Arg-Pro-Thr-Pro-Tyr-NH₂,
acetyl-Arg-Pro-Ser-Pro-Tyr-NH₂,
acetyl-Arg-Pro-Asp-Pro-pClPhe-NH₂,
dekanoyl-Arg-Pro-Asp-Pro-Phe-NH₂,
30 acetyl-Arg-Pro-Glu-Pro-Phe-NH₂, och
butyryl-Arg-Pro-Asn-Pro-Phe-NH₂.

10. Användning av en peptid med formeln:



eller ett farmaceutiskt godtagbart syra- eller basadditionssalt därav, vari

R^1 är väte eller C_{1-10} -lägre alkyl eller alkanoyl;

V är Arg;

5 W är Pro, dehydro-Pro eller hydroxi-Pro;

X är Asp, Ser, Thr, Asn eller Glu;

Y är Pro, dehydro-Pro eller hydroxi-Pro;

Z är Phe eller Tyr, valfritt substituerad med en eller flera halogen-, nitro- eller hydroxylgrupper;

10 och R^2 är OH eller NR^3R^4 ,

vari R^3 och R^4 vardera självständigt valts ur gruppen bestående av H, rakkedjad eller förgrenad alkyl eller alkenyl med 1 - 6 kolatomer, valfritt substituerad med en arylgrupp eller aryl, substituerad med antingen halogen eller en rak kedja, förgrenad alkyl eller alkenyl med 1 - 6 kolatomer, eller R^3 och R^4 bildar tillsammans en cyklisk metylengrupp med 3 - 7 kolatomer, och

15 vari samtliga V, W, X, Y och Z är L-aminosyror eller valfritt en eller flera av V, W, X, Y och Z är D-aminosyror, vid framställningen av en farmaceutisk komposition, vilken är användbar för behandlingen av en störning i immunsystemet och/eller en störning i det centrala nervsystemet.

27.01.83 2008

FIG. 1

TPS:n ja peptidi nro 514:n entsymaattinen stabiilius

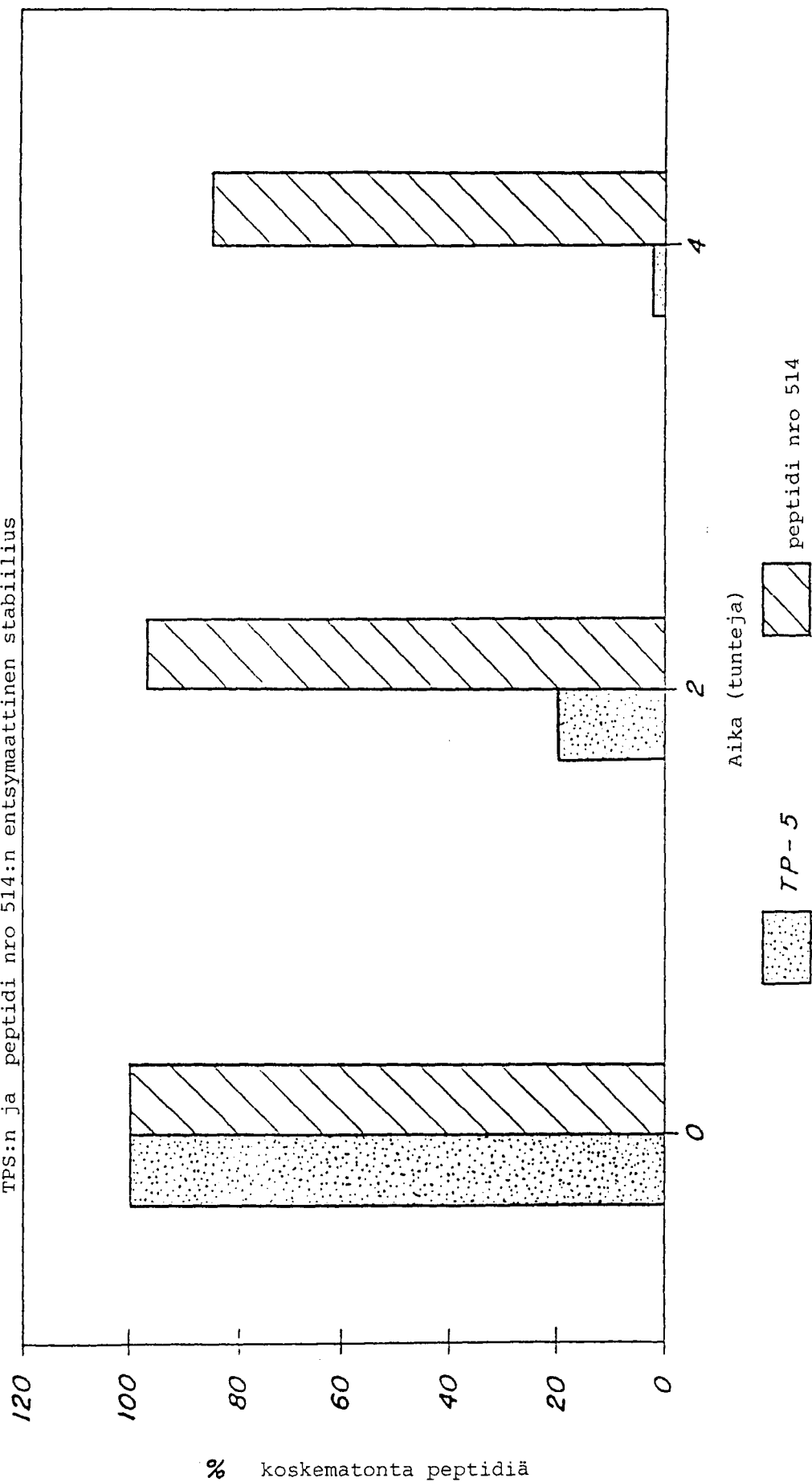


FIG. 2

Annosresponssi kahden IRI-514-päivän kohdalla (leikkauksen jälkeen)

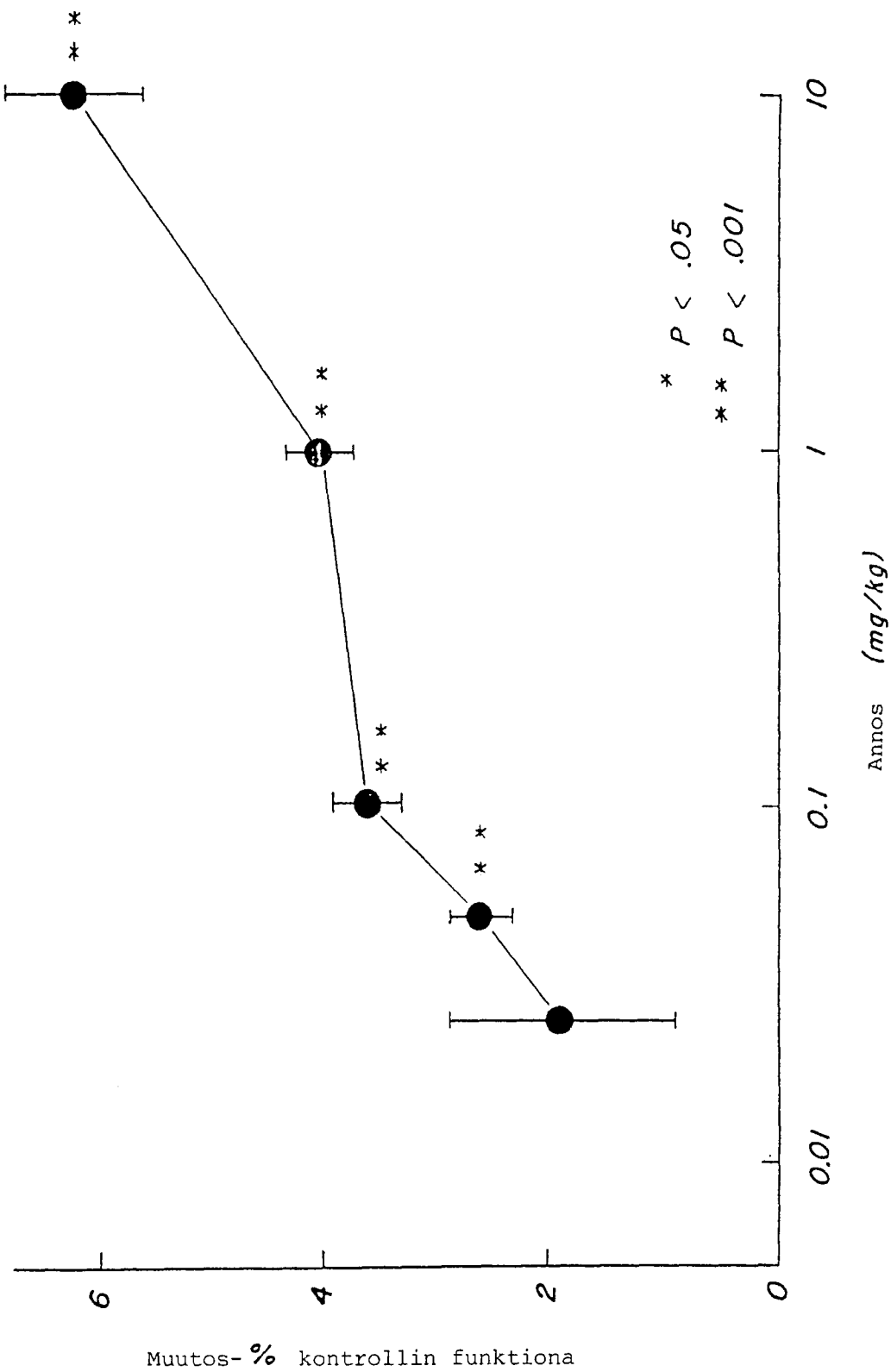


FIG. 3

CD3-vasta-aineen aikaansaama T-solujen
lisääntymisen suppressio

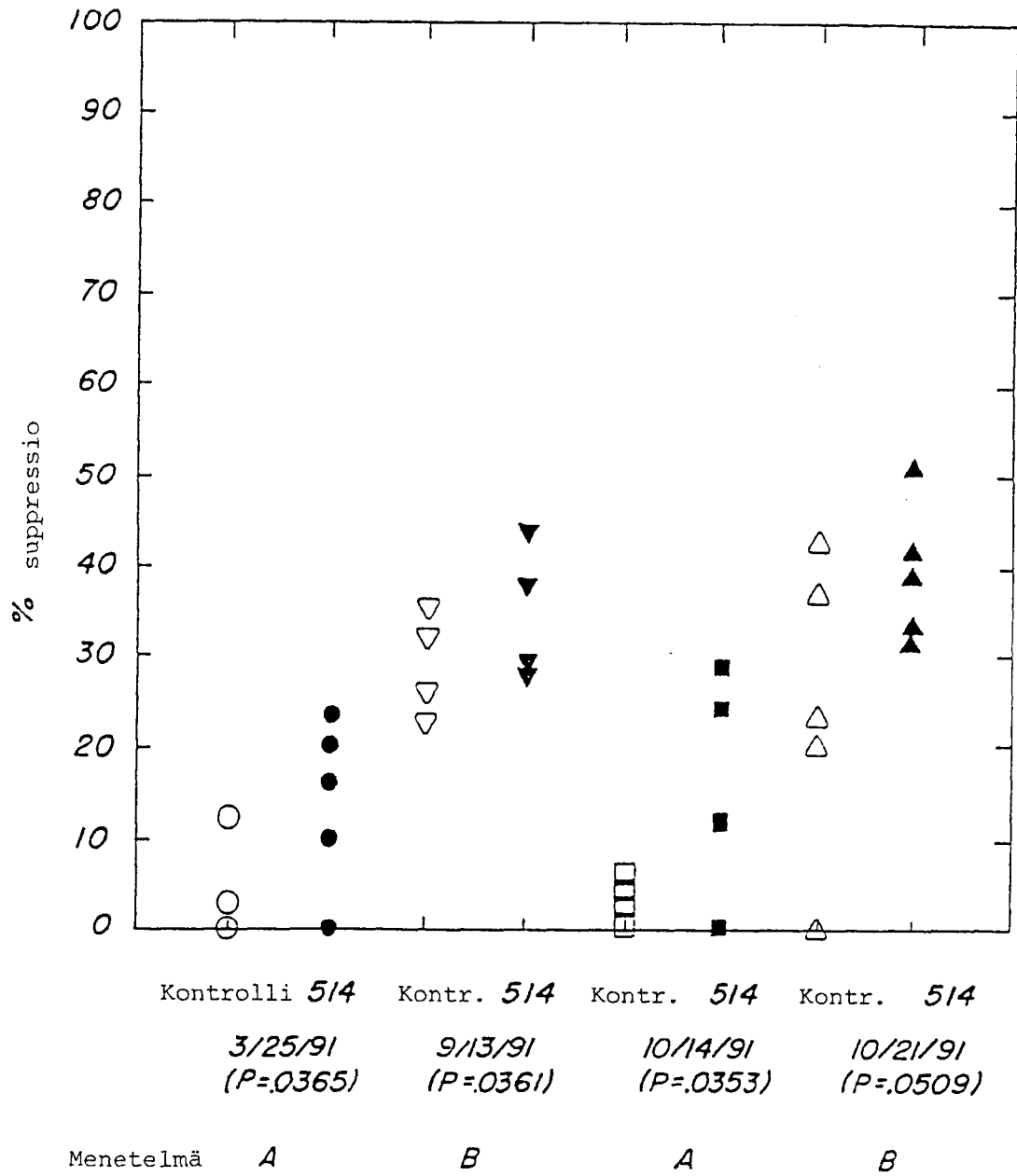


FIG. 4

