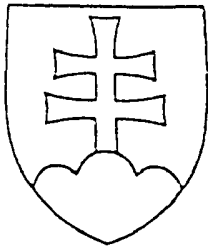


SLOVENSKÁ
REPUBLIKA

(19)



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA
VYNÁLEZU

(22) 17.11.93

(32) 15.05.91

(31) 9101472-0

(33) SE

(40) 06.04.94

(21) 1277-93

(13) A3

5(51) C 07 K 7/08,
7/10, 7/02,
A 61 K 37/24,
37/42

(71) AKTIEBOLAGET ASTRA, Södertälje, SE;

(72) BARTFAI Tomas, Stocksund, SE; HÖKFEL Tomas, Djurs-
holm, SE; LANGELO Ulo, Stockholm, SE; AHREN Bo,
Lund, SE; LINDSKOG Stefan, Lund, SE; CONSOLO Sil-
vana, Miláno, IT; LAND Tiit, Stockholm, SE;

(54) Galanínový antagonist

(57) Tento vynález sa týka galanínového antagonistu, ktorým je ligand galanínového receptora. Ďalej sa uvádzajú nové peptidy Galanin(1-12)-Pro-Substancie P(5-11), Galanin(1-12)-Pro-Bradykinin (2-9), Galanin(1-12)-Pro-Pro-Pro-(Leu⁵-Enkephalin(5-1)), Galanin((1-12)-Pro-Lys(ε-NH)-Pro-(Leu⁵-Enkephalin(5-1)) a ich funkčné analógy a ich funkčné deriváty, ktoré vykazujú v podstate rovnaký galanínový antagonistický účinok, ako uvedené peptidy. Použitie galanínového antagonistu, farmaceutických prostriedkov, ktoré túto látku obsahujú, a spôsobov ošetrovania chorôb u cicavcov, ktoré sú závislé na fyziologickej funkcii galanínu u galanínového receptora sú do vynálezu taktiež zahrnuté.

Galanínový antagonista

Oblasť techniky

Tento vynález sa týka galanínového antagonistu, ktorým je ligand galanínového receptora. Tento vynález sa ďalej týka peptidov Galanin(1-12)-Pro-Substancie P(5-11), Galanin(1-12)-Pro-Bradykinin(2-9), Galanin(1-12)-Pro-Pro-Pro-(Leu⁵-Enkephalin(5-1)), Galanin(1-12)-Pro-Lys(ε-NH)-Pro-(Leu⁵-Enkephalin(5-1)) a ich funkčných analógov a ich funkčných derivátov, ktoré prejavujú v podstate rovnaký galanínový antagonistický účinok, ako uvedené peptidy. Použitie galanínového antagonistu, farmaceutických prostriedkov, ktoré túto látku obsahujú, a spôsobov ošetrovania chorôb u cicavcov, ktoré sú závislé na fyziologickej funkcii galanínu u galanínového receptora sú taktiež popísané.

Doterajší stav techniky

Neuromediáty a hormóny môžu vyvolať svoje bunečné účinky tým, že sa viažu a aktivujú bunečné membrány receptorov. Neuropeptid galanín bol izolovaný v roku 1983 z hornej časti čreva ošípanej a bolo zistené, že obsahuje 29 aminokyselinových zvyškov (K. Tatemoto a kol., FEBS lett. 164, 124 - 128 /1983/). Boli taktiež popísané sekvencie galanínu z dvoch ďalších cicavcov, krysy a kravy (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 . Rökæus a M. Carlquist, FEBS Lett. 234, 400 - 406 (1988/)). Porovnanie peptidovej sekvencie galanínu z rôznych cicavcov, krysy, ošípanej, kravy ukazuje, že N-terminálne aminokyseliny 1-15 sú identické. Taktiež je veľmi pravdepodobné, že sa táto zakonzervovaná oblasť bude nachádzať v galaníne iných cicavcov vrátane človeka.

Galanín má široký profil distribúcie, ktorý často súvisí s viacnásobnými účinkami uplatnenými neuroforom vo variantoch rozdielnych systémov.

Až doteraz nebol popísaný žiaden galanínový antagonista, ktorým je ligand galanínového receptora. Galanínový antagonista

by bol vhodným nástrojom pre stanovenie fyziologického významu galanínu a pre vývoj farmaceutických prostriedkov pre reguláciu fyziologickej funkcie galanínu galanínového receptora.

Podstata vynálezu

Jeden znak tohoto vynálezu je zameraný na galanínového antagonistu, ktorým je ligand galanínového receptora. Tak antagonistický účinok galanínového antagonistu podľa tohoto vynálezu sa používa u galanínových receptorov. Pri uskutočnení tohoto znaku vynálezu je antagonist zvolený zo súboru zahrňujúceho peptidy vzorca

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 predstavuje aminoskupinu alebo hydroxyskupinu (jedná sa o amid alebo voľnú kyselinu) a

ich funkčné analógy a ich funkčné deriváty.

V popise a v patentových nárokoch je úmysel vyjadriť, že "funkčné analógy" peptidov podľa tohoto vynálezu okrem iného majú zahrňovať kratšie alebo dlhšie peptidy so substitúciou jedného alebo niekoľkých aminokyselinových zvyškov alebo bez tejto substitúcie, pokiaľ takéto analógy vykazujú v podstate rovnakú far-

makologickú funkciu ako peptidy podľa tohoto vynálezu, to znamená galanínové antagonisty u galanínového receptora.

Ďalej je úmyslom vyjadriť, že "funkčné deriváty" peptidov podľa tohoto vynálezu zahrňujú ľubovoľnú zlúčeninu, ktorá vykazuje v podstate rovnakú farmakologickú funkciu ako peptidy podľa tohoto vynálezu, to znamená je galanínovým antagonistom v galanínovom receptore. Predovšetkým takáto zlúčenina môže byť zlúčeninou, ktorá je odvodená od jedného z peptidov podľa tohoto vynálezu, ale v ktorej jeden aminokyselinový zvyšok je substituovaný alebo niekoľko takýchto zvyškov je substituovaných inými chemickými skupinami, to znamená organickými, rovnako ako anorganickými molekulami alebo prvkami, s výsledkom prejavujúcim sa napodobnením peptidu alebo "peptidomimeticky".

Jestvuje domnienka, že existuje štrukturálne priestorové usporiadanie galanínového receptora vybraného z peptidov podľa tohoto vynálezu, ktoré je zodpovedné za farmakologickú funkciu pôsobiacu ako galanínový antagonist a pre svoju afinitu ku galanínovému receptoru (tak je ligandom galanínového receptora).

Taktiež sa verí, že funkčné deriváty a funkčné analógy zahrnuté do vynálezu môžu mať podobné štrukturálne priestorové usporiadanie galanínového receptora ako peptidy podľa tohoto vynálezu. Prostredie obklopujúce galanínový receptor by mohlo byť napodobnené napríklad krvou alebo fyziologickým roztokom chloridu sodného.

Iný znak tohoto vynálezu je zameraný na peptidy vzorca

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 predstavuje aminoskupinu alebo hydroxyskupinu (jedná sa o amid alebo voľnú kyselinu) a

ich funkčné analógy a ich funkčné deriváty, ktoré prejavujú v podstate rovnaký galanínový antagonistický účinok ako už uvedené peptidy.

Ako už bolo uvedené vyššie, peptidy sa môžu taktiež označovať ako Galanin(1-12)-Pro-Substance P(5-11), Galanin(1-12)-Pro-Bradykinin(2-9), Galanin(1-12)-Pro-Pro-Pro-(Leu⁵-Enkephalin-(5-1)) a Galanin (1-2)-Pro-Lys(ε-HN)-Pro-(Leu⁵-Enkephalin-(1-5)).

V pokusnej časti tohoto popisu majú vyššie uvedené peptidy, pokiaľ sú vo forme amidov (to znamená, že X predstavuje aminoskupinu), označenie M15, M35, M36,A a M34,A.

Funkčnými analógmi môžu byť peptidy, ako 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, alebo

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

kde

X predstavuje aminoskupinu alebo hydroxyskupinu (jedná sa o amid alebo voľnú kyselinu).

Ďalší znak tohoto vynálezu je zameraný na použitie galanínového antagonistu, ktorým je ligand galanínového receptora, pre výrobu farmaceutického prostriedku. Je možné uviesť, že vyššie zosumarizované peptidy sú rozpustné vo vode, čo uľahčuje výrobu farmaceutického prostriedku pre injekcie.

Ešte ďalší znak tohoto vynálezu je zameraný na galanínového antagonistu, ktorým je ligand galanínového receptora, pre použitie vo farmaceutickom prostriedku.

Ešte ďalší znak tohoto vynálezu je zameraný na farmaceutický prostriedok, ktorý obsahuje galanínového antagonistu, ktorým je ligand galanínového receptora, ako účinnú látku, spolu s farmaceuticky prijateľnou prísadou alebo prijateľnými prísadami. V závislosti od špecifického typu farmaceutického prostriedku, ktorý sa má vyrobiť, prísada sa môže alebo prísady sa môžu voliť tak, že sa zostaví požadovaný prostriedok. Vhodná prísada alebo vhodné prísady pre špecifický typ prostriedku určeného pre výrobu, ako sú roztoky pre injekcie, tablety alebo náplasti, sa môže alebo sa môžu zistiť v americkom liekopise (U. S. Pharmacopoeia).

Tento vynález taktiež poskytuje prostriedky obsahujúce účin-

né množstvo zlúčeniny podľa tohoto vynálezu, vrátane ich netoxických adičných solí, amidov a esterov, ktoré môžu samotné slúžiť pre dosiahnutie vyššie uvedeného priaznivého terapeutického účinku. Takéto prostriedky sa môžu taktiež dosiahnuť spolu s farmaceuticky prijateľnými riedidlami kvapalín, gélov alebo tuhých látok s pomocnými látkami (adjuvancie a vehikuly).

Tieto zlúčeniny sa môžu podávať cicavcom, ako domácim zvieratám, pre veterinárne použitie a ľuďom pri klinickom použití, spôsobom podobným podávaniu iných terapeutických prostriedkov. Zo všeobecného hľadiska bude dávka požadovaná pre terapeutický účinok v rozmedzí od približne 0,01 do 1000 $\mu\text{g/kg}$, bežnejšie od 0,1 do 1000 $\mu\text{g/kg}$, telesnej hmotnosti pacienta. Pri inom uskutočnení sa tieto dávky môžu podávať nepretržitou infúziou počas predĺženého časového obdobia, až do dosiahnutia požadovaného priaznivého terapeutického účinku.

Takéto prostriedky sa zvyčajne vyrábajú buď ako kvapalné roztoky alebo ako suspenzie, ktoré sú vhodné pre zavedenie injekcií alebo tuhej formy pre rozpustenie na roztok alebo suspenziu, pričom kvapalina pred injekciou sa môže taktiež pripraviť. Prostriedky môžu byť tiež emulgované alebo vnášané do systémov uvoľňujúcich liečivú látku, ako lipozómov alebo mikroguličiek. Účinná látka sa často mieša s riedidlami alebo vehikulom, ktoré sú fyziologicky znášateľné a kompatibilné s účinnou látkou. Vhodnými riedidlami a excipientami sú napríklad voda, fyziologický roztok chloridu sodného, dextróza, glycerol alebo podobné látky a ich kombinácie. Okrem toho, pokiaľ sa to vyžaduje, prostriedky môžu obsahovať menšie množstvo pomocných látok, ako zmáčadiel alebo emulgačných činidiel, stabilizátorov alebo činidiel upravujúcich hodnotu pH a podobne.

Zlúčeniny sa zvyčajne podávajú parenterálne injekciami, napríklad buď subkutánne, intramuskulárne, intraperitoneálne alebo intravenózne. Ďalšie prostriedky, ktoré sú vhodné pre iné spôsoby podania, zahrňujú čípky, vagitóriá, intranasálne postreky, bukové prostriedky, ako adhézne tablety, gély alebo náplaste a v niektorých prípadoch orálne prostriedky. Čípky a vagitóriá môžu obsahovať bežné spájadlá a vehikulum, napríklad polyaklylénglykoly

alebo triglyceridy. Čípky sa môžu vyrábať zo zmesí obsahujúcich účinnú látku v rozmedzí od 0,5 do 10 %, s výhodou od 1 do 2 %. Orálne prostriedky zahrňujú bežne používané vehikulá, napríklad manitol, laktózu, škrob, stearát horečnatý, sodnú soľ sacharínu, celulózu, uhličitan horečnatý a podobne, vždy v akosti pre farmaceutické použitie. Tieto prostriedky majú formu roztokov, suspenzií, tabliet, piluliek, kapsúl, prostriedkov s trvalým uvoľňovaním účinnej látky alebo prášku a obsahujú od 10 do 95 %, s výhodou od 25 do 70 % účinnej látky.

Peptidické zlúčeniny sa môžu spracovávať na prostriedky ako neutrálne formy alebo soli. Farmaceuticky prijateľné netoxické soli zahrňujú adičné soli s kyselinami (ktoré sa tvoria na voľných aminoskupinách) a ktoré vznikajú s anorganickými kyselinami, ako napríklad kyselinou chlorovodíkovou alebo kyselinami fosforečnými, alebo organickými kyselinami, ako je kyselina octová, kyselina oxálová, kyselina vínna, kyselina mandľová a podobne. Soli tvoriace sa na voľných karboxyskupinách môžu byť odvodené od anorganických báz, ako napríklad od hydroxidu sodného, draselného, amónneho, vápenatého alebo železitého a takýchto organických báz, ako je izopropylamín, trimetylamín, 2-etylaminooctanol, histidín, prokaín a podobne.

Ešte iný znak tohoto vynálezu je zameraný na spôsob ošetrovania chorôb u cicavcov, ktorý závisí od fyziologickej funkcie galanínu galanínového receptora a toto ošetrovanie spočíva v tom, že sa cicavcovi podáva farmakologicky účinné množstvo galanínového antagonistu, ktorým je ligand galanínového receptora. Pretože fyziologická funkcia galanínu u galanínového receptora je špecifická pre každé jednotlivé farmakologicky účinné množstvo galanínového antagonistu, ktorý je určený na podávanie pre ošetrovanie chorôb u cicavca, má byť rozhodnuté lekárom alebo veterinárom na individuálnom základe.

Využitelnosť

Galanínové antagonisty by mali byť vhodné na reguláciu pri najmenšom v týchto oblastiach:
uvoľňovanie inzulínu,

uvoľňovanie rastového hormónu,
uvoľňovanie acetylcholínu,
uvoľňovanie dopamínu,
uvoľňovanie substancie P,
uvoľňovanie somatostatínu a
uvoľňovanie noradrenalínu.

V súčasnom období sú predpokladané oblasti lekárskej indikácie v endokrinológii, príjme potravy, neurológii a psychiatrii: senilné demencie Alzheimerovho typu, schizofrénia, analgéza a intestinálne ochorenia.

Teraz sa popisuje spôsob prípravy galanínového antagonistu podľa tohoto vynálezu.

Pre výrobu galanínových antagonistov podľa tohoto vynálezu sa môžu použiť zvyčajné spôsoby výroby peptidov, ktoré sa účelne modifikujú, pokiaľ antagonista je peptidometrický. Okrem syntézy v kvapalnej fáze, zvyčajné spôsoby pre syntézu nových zlúčenín podľa tohoto vynálezu zahrňujú ľubovoľné spôsoby syntézy peptidov v tuhej fáze. Pri takýchto spôsoboch syntézy nových zlúčenín sa môže jednotlivo uskutočňovať postupné zavádzanie požadovaných aminokyselinových zvyškov do rastúceho peptidového reťazca podľa všeobecných zásad platných pre spôsoby uskutočňované v tuhej fáze.

V ďalšom texte niekedy môžu byť použité tieto skratky:

NMP	= N-metylpyrolidon
HOBT	= N-hydroxybenzotriazol
MBHA	= p-metylbenzhydrylamín
PAM	= p-acetoxymetyl
Boc	= terc.-butoxykarbonyl
DMSO	= dimetylsulfoxid
DIEA	= diizopropyletylamín
Tos	= tosyl
OC ₆ H ₁₁	= cyklohexylester
4-MeBzl	= 4-metylbenzyl
OBzl	= benzylester

Bom	= terc.-benzyloxymetyl
Clz	= 2-chlórbenzyloxykarbonyl
Bzl	= O-benzyl
For	= formyl
Brz	= 2-brómbenzyloxykarbonyl
TFA	= kyselina trifluóroctová
DMS	= dimetylsulfid
DCM	= dichlórmetán
DMF	= N,N-dimetylformamid

Peptidy "M15", "M35" a "M36,A" podľa tohoto vynálezu sa zostavujú postupným spôsobom na tuhom nosiči za použitia syntetizátora Applied Biosystems Model 431A Peptide Synthesizer, pri použití štandardnej NMP/HOBt stratégie aktivácie v rozpúšťadle v merítke 0,1 mmol (malý rozsah).

Peptid "M34,A" sa syntetizuje rovnakým spôsobom s tým rozdielom, že sa zmení chrániaca skupina, ktorou je ϵ -Fmoc a Boc pre Lys. Preto jedna časť peptidu sa syntetizuje pri použití Boc-chémie a druhá časť sa získa syntézou využívajúcou Fmoc-chémiu.

Funkčné deriváty podľa tohto vynálezu sa vyrábajú analogickým spôsobom.

terc.-Boc-aminokyseliny sa viažu na živicu terc.-Boc-aminokyselina-PAM (Nova Chemical Company Ltd., Veľká Británia) pre voľnú kyselinu (X znamená hydroxyskupinu) alebo p-metylbenzhydrylamínovú živicu (Bachem Feinchemikalien AG, Švajčiarsko) pre amid (X znamená aminoskupinu) ako estery hydroxybenzotriazolu (HOBt).

Individuálny cyklus pre každú aminokyselinu zahrňuje odstránenie chrániacej skupiny z terc.-Boc-skupiny pôsobením 50 % kyseliny trifluóroctovej v dichlórmetáne počas 19 minút a acyláciu s desaťnásobným prebytkom (v porovnaní k množstvu aminoskupín na živici) chránených aminoskupín v zmesi 15 % dimetylsulfoxidu v N-dimetylpyrrolidíne počas 35 minút. Medzi každou operáciou sa uskutočňuje niekoľkonásobné premývanie dichlórmetánom, diizopro-

pyletylamínom a N-metylpyrolidónom. Po každej interakčnej acylácii (koncové pripojenie skupiny) sa uskutočňuje spracovanie s 10 % anhydridom kyseliny octovej a 5 % diizopropyletylamínom v N-metylpyrolidóne počas 5 minút.

S ecenciou Boc-Lys(Fmoc) v prípade peptidu 34,A, všetky použité aminokyseliny boli terc.-Boc-chránené na konci obsahujúcim dusík (látky boli získané od firmy Nova Chemical Company Ltd., Veľká Británia) a ich reaktívne bočné reťazce boli chránené 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.

Všetky rozpúšťadlá a iné reagenty pre automatickú syntézu peptidov boli od firmy Applied Biosystems.

Reakčné činidlá používané v stupni odstránenia chrániacej skupiny a v stupni štiepenia mali akosť pre analýzu a používali sa bez ďalšieho čistenia:

1,2-etánditiol, anhydrid kyseliny octovej, kyselina trifluórmetylsulfónová (TFMSA), dimetylsulfoxid a p-krezol boli od formy Fluka, dietyléter a acetonitril boli od firmy Merck a kyselina fluorovodíková pochádzala od firmy AGA Gas.

Plne zostavené peptidové živice sa sušili cez noc za vysokého vákua. Odstránenie formylovej skupiny na Trp a benzylových skupinách sa uskutočňovalo pri použití metódy "low TFMSA". Ku tomu sa 100 mg peptidovej živice spracovalo s 2 ml zmesi pozostávajúcej z 10 % kyseliny trifluórmetylsulfónovej, 50 % kyseliny trifluóroctovej, 30 % dimetylsulfidu, 8 % p-krezolu a 2 % dimerkaptoetánu, pri teplote 0 °C počas 2 hodín za trepania a potom sa uskutočnilo premytie etanolom, dichlórmetánom, dimetylformamidom, diizopropyletylamínom a dichlórmetánom, dimetylformamidom a dichlórmetánom.

Po vysušení za zníženého tlaku sa peptid odštiepil zo živice a chrániace skupiny sa odstránili pôsobením zmesi 10 ml kvapalnej kyseliny fluorovodíkovej, obsahujúcej 20 % zmesi p-krezolu a p-tiokrezolu v pomere 1 : 1, na 1 g peptidovej živice pri te-

plote 0 °C počas 60 minút. Živica sa dvakrát premyla vždy s 10 ml dietyléteru, peptidy sa extrahovali 20 % acetonitrilom vo vode a potom sa uskutočnila filtrácia. Lyofilizácia vodného filtrátu poskytla surový peptid.

Surový peptid sa preparatívne čistil vysoko účinnou kvapalinovou chromatografiou na stĺpci reverznej fázy C18. 10 mg surového peptidu sa rozpustilo v 1 ml 20 % acetonitrilu vo vode a gradientovo elovalo (počas 45 minút) 20 až 60 % zmesou 0,1 % kyseliny trifluóroctovej v acetonitrile v 0,1 % kyseliny trifluóroctovej vo vode pri rýchlosti prietoku 2,0 ml/min. Frakcie sa zachytili podľa absorpcie stanovenej pri vlnovej dĺžke 238 nm.

Čistota jednotlivých peptidov sa skúšala analytickou vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou a zistilo sa, že zodpovedá 99 %. Molekulová hmotnosť peptidov sa stanovovala pri použití spektrometra Plasma Desorption Mass Spectrometer (PDMS) Model Bio-ion 20, Applied Biosystems, pričom výpočet hodnôt molekulovej hmotnosti sa uskutočňoval v každom prípade pre vyčistený peptid.

Tabuľka

Čistota jednotlivých peptidov sa skúšala analytickou vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou a bolo zistené, že zodpovedá 99 %. Molekulová hmotnosť peptidov sa stanovovala pri použití spektrometra Plasma Desorption Mass Spectrometer (PDMS) Model Bio-ion 20, Applied Biosystems, pričom v každom prípade sa dosiahli očakávané výsledky.

Galanín(1-12)-Pro-SP(5-11) amid (M15):

(molekulová hmotnosť = 2199) IC₅₀ = 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

Galanín(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-Agr)-

22 23 24

-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-(D-Trp)-Phe-(D-Trp)-Leu-Leu-NH₂

spantid

Galanín(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

Galanín(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

Galanín(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

Galanín(1-13)-Bradykinin(3-9) amid (M 20):

(molekulová hmotnosť = 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

Galanín(1-13)-Bradykinin(2-9) amid (M 35):

(molekulová hmotnosť = 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

Galanín(1-13)-NPY(25-36) amid (M 32):

(molekulová hmotnosť = 2961) IC_{50} = 0,5 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

Galanín(1-12)-Ala-NPY(25-36) amid (M 88):

(molekulová hmotnosť = 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

Galanín(1-12)-Pro-Pro-Pro-leukenkephalin(1-5) amid (M 36):

(molekulová hmotnosť = 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

Galanín(1-12)-Pro-Pro-Pro-leukenkephalin(5-1) amid (M 41):

(molekulová hmotnosť = 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

Galanín(1-13)-Lyz amid (Pro-leukenkephalin(5-1)) (M 34,A):

(molekulová hmotnosť = 2223) IC_{50} = 10 nmol

1

13

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

N-koncová skupina

14

-Lyz-amid

|

Pro-Leu-Phe-Gly-Gly-Tyr

5

1

IC_{50} sa stanovuje pri pokusoch vytesňovania na hypotaláme krysy.

Farmakologické pokusy

1. Galanín inhibuje uvoľňovanie inzulínu, ktoré je vyvolané glukózou, a stanovuje sa ako popísal B. Arhén a kol. (Biochemical and Biophysical Research Communications, zv. 140, č. 3, 1059 - 1063 /1986/). Pri použití rovnakého spôsobu, ako je citované v publikácii B. Ahréna a kol., peptid podľa tohoto vynálezu, M15, teraz vykazuje schopnosť zabrániť uvoľňovaniu inzulínu inhibovaného galanínom v ekvimolárnej koncentrácii.

Zvieratá a príprava buniek

Dospelé obézne hyperglykemické myši (ob/ob) oboch pohlaví sa odoberú z lokálnej kolónie bez takýchto vrodených vlastností a nechajú sa hladovať cez noc. Zvieratá sa usmrtia oddelením hlavy a ostrovčeky sa izolujú technickým spôsobom, založenom na izolácii vyvolanej použitím kolagenázy. Suspenzia buniek sa pripraví v podstate ako popísal Lehrmark v Diabetologia 10, 431 - 438 /1974/. Krátko zhrnuté, ostrovčeky sa oddelia v jednotlivých bunkách a malé zhluky sa trepú v rôznych prostrediach Ca^{+2} - Mg^{+2} doplnených etylénglykol-bis(-aminoéterom kyseliny N,N,N,N-tetraoctovej (EGTA, Sigma). Potom sa bunky inkubujú pri teplote 37 °C a hodnote pH 7,4 cez noc v 12 ml prostredia RPMI 1640 (prostredie tkanivovej kultúry od firmy Sigma, ktoré obsahuje L-glutamínTM a neobsahuje hydrogénuhličitan sodný) doplneného 10 % NU-sérum (Collaborative Research Inc., Lexington, Massachusetts, USA), 100 medzinárodnými jednotkami na ml penicilínu, 60 g/ml gentamycínu a 100 g/ml streptomycínu. Aby sa zamedzilo príľnutiu buniek na kultivačných bankách počas inkubácie, suspenzia sa opatrne trepe.

Prostredie

Použitým základným prostredím je HEPES tlmivý roztok (tlmivý roztok na báze kyseliny N-(2-hydroxyetyl)-piperazin-N'-(2-etánsulfónovej), Sigma) o hodnote pH 7,4, ktorý je fyziologicky vyvážený v katiónoch s Cl^- ako jediným aniónom. Vo všetkých prípadoch je základné prostredie doplnené 1 mg/ml albumínu.

Meranie uvoľňovania inzulínu

Kinetika uvoľňovania inzulínu sa študuje premývaním pankreatických β -buniek (približne 10^6) 20 mmol alebo 5 mmol glukózy zmiešanej s polyakrylamidovými guľičkami Bio-Gel P-4 (veľkosť 0,074 až 0,038 mm, Bio-Rad Lab., Richmond, Kalifornia, USA) na 0,5 ml kolóne. Rýchlosť prietoku je 0,5 ml/min, frakcie vzniknuté v priebehu 1 až 3 minút sa zachytávajú a analyzujú na inzulín pri použití kryštalického inzulínu získaného z krysy ako referenčnej vzorky.

Výsledky

Po inkubácii trvajúcej 60 minút v prítomnosti 8,3 mmol glukózy, galanín (10^{-7} mol) veľmi obmedzí uvoľňovanie inzulínu, z 34 ± 2 μ U/ml na 3 ± 1 μ U/ml (P 0,001, N = 32).

Peptid podľa tohoto vynálezu, samotný M15 (10^{-6} až 10^{-9} mol) v závislosti od dávky pôsobí proti inhibícii uvoľňovania inzulínu vyvolanej galanínom.

Uvoľňovanie inzulínu v prítomnosti glukózy, galanínu a M15 pri koncentrácii 10^{-6} , 10^{-7} a 10^{-8} mol je 28 ± 2 μ U/ml (N = 16), 17 ± 4 μ U/ml (N = 16) a 10 ± 3 μ U/ml (N = 16). M15 v koncentrácii 10^{-9} je bez účinku.

Z výsledkov uvedených vyššie sa môže vyvodiť, že peptid podľa tohoto vynálezu, M15, pôsobí proti inhibícii uvoľňovania inzulínu vyvolanej galanínom v ostrovčekoch.

2. Galanín inhibuje uvoľňovanie acetylcholínu, ako sa stanoví podľa G. Fisone a kol. (Proc. Natl. Acad. Sci. 84, 7339 - 7343 /1987/). Použitím v podstate rovnakého postupu, ako uviedol G. Fisone a kol. v práci citovanej vyššie, peptid podľa tohoto vynálezu, M15, teraz vykazuje účinok pôsobiaci proti inhibičným účinkom galanínu na uvoľňovanie acetylcholínu vyvolaného skopolamínom in vivo.

Pokusy s mikrodialýzou

Operačný zákrok a základná metodológia

Pokusy sa uskutočňujú s krysami CD-COBS (Charles River, Como, Taliansko) samčieho pohlavia, o hmotnosti 200 až 260 g. Zvieratá sa anestetizujú equitenzínom (1 % pentobarbitalu a 4 % chloralhydrátu). Zavádzacia kanyla sa implantuje stereotoxikálne do ventrálneho hippokampu podľa týchto súradníc z prvého krčného stavca podľa Paxinosa 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 bočne k stredovej čiare a 6,8 mm pod povrch lebečnice. Pátracia ihla sa potom zavedie, aby sa udržala zavádzacia kanyla otvorená počas nasledujúceho dňa. Súčasne sa odstráni pátracia ihla a nahradí sa zariadením pre skúšanie mikrodialýzy (CMA 10, Carnegie Medicine AB, Stockholm, Švédsko) obsahujúcim membránu, ktorá má odokrytú plochu 3 x 0,5 mm. Zariadenie pre skúšanie mikrodialýzy sa pretiahne 3 mm za koniec zavádzacej kanyly a premýva sa konštantnou rýchlosťou 2 µg/min Ringerovým roztokom (147 mmol chloridu draselného, 2,2 mmol chloridu vápenatého a 4,0 mmol chloridu draselného), ktorý obsahuje 10 µmol sulfátu fysostigminu a je upravený na hodnotu pH 10 hydroxidom sodným. Kvapalina zachytená v priebehu počiatočných 40 minút premývania sa odloží. Potom sa premývacia kvapalina zachytáva každých 20 minút počas celého premývania trvajúceho 260 minút. Na konci obdobia zachytávania sa vzorky ihneď schladia tuhým oxidom uhličitým a lyofilizujú sa. Obsah acetylcholínu sa stanoví kvantitatívne rádioenzymatickou metódou, ktorú podrobne popísali S. Consolo a kol. (*J. Neurochem.* 48, 1459 - 1465 /1987/) a C. F. Wu a kol. (*Neurobiol. Aging* 9, 357 - 361 /1988/), a ktorá zahŕňa:

a) transformáciu cholínu na fosforylcholín v prítomnosti fosfokinázy cholínu a ATP,

b) enzymatickú hydrolýzu acetylcholínu na cholín a kyselinu octovú,

c) reacetyláciu výsledného cholínu na [H^3]acetylcholín pri-

daním 99,9 GBq/mmol [H^3]acetylkoenzýmu-A a acetylkoenzýmu A:ChAT a

d) oddelenie a vyhodnotenie scintilačným počítačom výsledného [H^3]acetylcholínu, extrakciou do ketónovej fázy obsahujúcej tetrafenylbór iontomeničovou chromatografiou z kvapaliny do kvapaliny. Fosforylačné, hydrolyzačné a acetylačné reakcie sú hodnotené ako bežné opatrenia.

Koncentrácia acetylcholínu v každej vzorke sa vypočíta lineárnou regresiou, založenou na rádioaktivite štandardov (lineárny od 10 fmol do 25 pmol acetylcholínu). Relatívna smerodajná odchýlka z opakovane odobraných vzoriek alebo acetylcholínového štandardu je približne 3 %.

Acetylcholín získaný in vitro troma dialyzačnými hadicami sa stanoví, ako už bolo popísané vyššie (C. F. Wu, citované vyššie). Priemerný výsledok je $17,6 \pm 0,5$ %.

Pri ukončení príbuzných pokusov sa miesta použité na skúšky dialýzy preveria histologicky vyvolaním škvrn pre Nissl - substanciu.

Účinok galanínu a M15 na uvoľňovanie acetylcholínu, ktoré je vyvolané skopolamínom, merané in vivo z ventrálneho hippocampu krysy

fyziologický roztok	2,0 pmol
skopolamín	13,1 pmol
skopolamín + galanín	6,9 pmol
skopolamín + M15	9,4 pmol

1,56 nmol galanínu a 3,12 nmol M15 sa injekčne i.c.v. zavedie 2 minúty pred subkutánnym podaním 0,3 mg/kg skopolamínu. Uvoľňovanie acetylcholínu sa meria v premývacej kvapaline zachytenej počas nasledujúcich 80 minút v štyroch frakciách, vždy počas 20 minút. Hodnoty vyjadrené ako pmol acetylcholínu nameraného vo frakciách zachytených počas 20 minút zodpovedajú vrcholom účinku skopolamínu a zodpovedajú frakciám zachyteným počas dru-

hých 20 minút. Hodnoty sú priemerom z pokusov uskutočnených na dvoch krysách (N = 2)

Ako výsledok z vyššie popísaného pokusu sa môže vyvodiť, že peptid podľa tohoto vynálezu, M15, pôsobí proti galanínom vyvolanej inhibícii uvoľňovania acetylcholínu v hippokampe, ktoré bolo vyvolané skopolamínom.

3. Účinky intratektálneho galanínu a stimulácia C-vlákna na reflex ohýbača popísali Z. Wiesenfeld-Hallin a kol. (Brain Res. 486, 205 - 213 /1989/). Použitím v podstate rovnakého spôsobu, ako je popísané v citovanej literatúre, sa ukazuje, že peptid podľa tohoto vynálezu, M15, má antagonistický účinok na intratektálne uľahčenie reflexu ohýbača vyvolaného galanínom. Pri vyššie popísanom pokuse, iný peptid podľa tohoto vynálezu, M35, poskytuje podobné výsledky.

Elektrofyziologicalká štúdia

Pri kritických pokusoch veľkosť reflexu ohýbača polysynaptickej podkolennej šľachy ako odozva na aktiváciu vysokého prahu prívodných dráh sa skúša na decelebrovaných, spinálnych, neanestetizovaných krysách zaznamenávaním elektromyogramu (EMG) z posteriorných bicepsových stehenných/pološlachovitých svalov. Zvieratá sa krátko anestetizujú Breitalom^R a zavedie sa priedušnicová kanyla. Krysy sa umiestnia do stereotaxického rámu, zbavia mozgu odsatím predného a stredného mozgu a potom ventilujú. Miecha sa podrobí laminektómii na úrovni hrudníka a narezá sa Th₈₋₉. Intratracheálny (i.t.) katéter sa implantuje kaudálne prierezom s koncom na ľavej strane bedernej miechy (L₄₋₅). Reflex ohýbača sa hodnotí stimulačným testom na lýtkovom nerve alebo na jeho inervačnej ploche jednotlivými elektrickými šokmi (0,5 ms, 10 mA) o dostatočnej sile pre aktiváciu C-vlákien (Wall a Woolf /1984/). V niektorých pokusoch sa podmienený stimul (CS) (1 Hz, 20 s) o rovnakej sile ako pri stimulačnom teste zavádza do lýtkového nervu.

Reflex ohýbača sa zaznamenáva ako aktivita na elektromyograme cez ihlové elektródy z nehrdzavejúcej ocele, ktoré sú zavedené do

šlachových svalov vyskytujúcich sa na rovnakej strane tela. Počet akcií potenciálu prejavujúcich sa v priebehu reflexu sa integruje počas 2 sekúnd. Integrovaný reflex sa zaznamenáva na záznamníku Gould chart recorder Model 2400 S. Počas pokusov sa sleduje rýchlosť srdca a rektálna teplota a udržiava sa vo zvyčajnom rozmedzí. Vlastné umiestnenie intratracheálneho katétra sa potvrdzuje po každom pokuse laminektómiou.

Galanín (Bachem, Bubendorf, Švajčiarsko) a somatostatín (Ferring, Malmö, Švédsko) sa rozpustí v 0,9 % roztoku chloridu sodného. Všetky peptidy sa zavádzajú i.t. v objeme 10 μ l a potom sa uskutoční prepláchnutie kanyly 10 μ l fyziologického roztoku chloridu amónneho.

Zhrnutie hodnôt

Veľkosť stabilného základného reflexu sa stanovuje v priebehu posledných 20 minút pred každou i.t. injekciou alebo podmieneným stimulom nervu. Účinok i.t. zavedených peptidov alebo podmieneného stimulu nervu na reflex ohýbača sa vyjadruje ako percentuálna zmena reflexu, v porovnaní k základnej hodnote, za ktorú je pokladaná hodnota 100 %. Pre testovanie interakcie galanínu s inými peptidmi alebo podmieneným stimulom lýtky sa podávajú 15 minút pred injekciou iných peptidov, keď uľahčujúci účinok galanínu odoznel alebo bol súčasne s podmieneným stimulom lýtky.

Meria sa antagonistický účinok i.t. zavedeného M-15 na i.t. uľahčenie reflexu ohýbača vyvolaného galanínom. Vrchol uľahčujúceho účinku pri 30 pmol je $167 \pm 42,8$ %, nad základnú hodnotu veľkosti reflexu. Antagonizmus M15, ktorý bol zavedený 5 až 10 minút po galaníne, sa vypočíta ako percentuálne zníženie vrcholového uľahčujúceho účinku galanínu. Hodnoty sa vyjadrujú pomocou S.E.M.

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

Pokusy sa opakujú pri použití peptidu podľa vynálezu M35 a dosiahnu sa podobné výsledky.

Ako výsledok pokusov popísaných vyššie sa môže vyvodiť záver, že peptidy podľa tohoto vynálezu pôsobia proti intratektálnemu uľahčeniu vyvolanému galanínom pri spôsobe závislom od dávky.

4. Štúdie viazania ligandu sa uskutočnia tým, že sa vytesní ^{125}I -galanín galanínom, galanínovým fragmentom (1-13), fragmentom (4-11) substancie P alebo galanínovým fragmentom (1-13) + fragmentom (4-11) substancie P v ekvimolárnych koncentráciách a študujú sa peptidy podľa tohoto vynálezu, M15, M35 a M 34,A. Peptidy podľa tohoto vynálezu sa dokážu špecificky viazať ku galanínovému receptoru.

Spôsob výroby ^{125}I -monojodid-Tyr²⁶-galanínu ošípanej

Syntetický galanín (1-29) z ošípanej sa jóduje spôsobom využívajúcim chlóramin T za vzniku ^{125}I -monojód-Tyr²⁶-galanínu ošípanej (špecifická aktivita $6660 \cdot 10^{10}$ až $7400 \cdot 10^{10} \text{ s}^{-1}$, ako popísali T. Land a kol. v Methods in Neurosciences, vyd. M. Conn, 5, 225 - 234 /1991/ a použije ku štúdiu viazania ligandu, uskutočnenej pri ekvilibracii.

Spôsob výroby membránovej frakcie z buniek Rin m 5F

Stanovenie buniek a bunečná kultúra Rin m 5F (pankreatická bunečná línia β -tumoru krýs) je už popísané (A. F. Gazdov a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 3519 - 3523 /1980/). Krátko zhrnuté, bunky sa nechajú rásť v prostredí RPMI 1640 (Gibco), ktoré obsahuje 10 % objemových fetálneho séra teliat, 2,06 mmol

L-glutamínu, 100 medzinárodných jednotiek na ml penicilínu a 100 µg/ml streptomycínu pod zmesou 10 % oxidu uhličitého a 90 % vzduchu pri teplote 37 °C. Pasážovanie sa uskutočňuje každých 5 dní. Bunky sa oddelia z povrchu banky pri použití 0,25 % trypsínu obsahujúceho 1 mmol EDTA a odstredujú pri 2000 g počas 5 minút pri teplote 4 °C. Granule sa vystavia na čas 15 minút hypoosmoticky 5 mmol HEPES tlmivému roztoku (o hodnote pH 7,4). Suspenzia sa odstreduje pri 20 000 g počas 15 minút, výsledné granule sa resuspendujú v Krebs-Ringerovom roztoku (137 mmol chloridu sodného, 2,68 mmol chloridu draselného, 1,8 mmol chloridu vápenatého a 1 g/l glukózy) s hodnotou pH 7,4, ktorý obsahuje 1 mg/mg bacitracínu a je pufrovaný s 5 mmol HEPES, a použije sa bezprostredne pri ekvilibrovaných pokusoch s viazaním.

Vytesňovanie ^{125}I -galanínu galanínom a ligandami galanínového receptora

Vytesňovacie pokusy sa uskutočňujú pri konečnom objeme 400 µl Krebs-Ringerovho roztoku, ktorý obsahuje 1 mg/ml bacitracínu a je pufrovaný 5 mmol HEPES, 0,5 % hmotnostno objemových BSA o hodnote pH 7,4, v prítomnosti 0,1 až 0,2 nmol ^{125}I -galanínu. Pripraví sa membrána a zvyšujú sa koncentrácie (z 10^{-12} na 10^{-6} mol) nezačleneného galanínu ošípanej alebo iných ligandov galanínového receptora. Vzorky sa inkubujú pri teplote 37 °C počas 30 minút. Inkubácia sa ukončí pridávaním 10 ml ľadom chladeného Krebs-Ringerovho roztoku pufrovaného HEPES, potom sa uskutoční rýchla filtrácia cez filtre Whatman CF/C a prevrstvenie na čas 5 až 6 hodín v objemovo 0,3 % roztoku polyetylénimíne. Filtre sa premyjú 10 ml skúšobného roztoku. Rádioaktivita zachytená na filtre sa stanoví čítačom žiarenia gama Packard. Špecifické väzby sú definované ako väzby vytesniteľné 1 µmol galanínu (alebo príslušnú koncentráciu vytesňovacieho činidla).

Hodnoty IC_{50} vytesňujúcich ligandov sa vypočítajú z hodnôt IC_{50} vytvorených na počítači, ako popísali T. Land a kol. (citované vyššie).

Hodnotenie pokusných údajov sa uskutočňuje podľa Macintoshe SE, nelineárnou metódou najmenších štvorcov pri použití

Macintoshovho programu "KaleidGraph".

Vytesňovanie ^{125}I -galanínu z membrán Rin m 5F ligandov galanínového receptora

	IC ₅₀
Galanín (1-29	1 nmol
M15	0,1 nmol
galanínový fragment (1-13)	100 nmol
fragment (4-11) substancie P	nevytesnené >10 μmol
galanínový fragment (1-13 + fragment (4-11) substancie P v ekvimolárnych množstvách	10 nmol
M35	0,1 nmol
M34,A	10 nmol

Ako je zrejmé z vyššie uvedených pokusov, peptidy podľa tohoto vynálezu sú ligandy galanínového receptora.

Farmakologické pokusy 1, 2 a 3 takto ukazujú, že peptidy podľa tohoto vynálezu sú galanínovými antagonistami a pokus 4 ukazuje, že sú ligandami galanínového receptora. Tak galanínové antagonisty podľa tohoto vynálezu sú ligandy galanínového receptora a na rozdiel od iných zlúčenín, ktoré boli skôr uvádzané pre antagonizáciu, špecifický účinok galanínu v špecifickom tkanive dáva prednosť interakcii s reakčným stupňom mimo galanínový receptor, čo sa vyžaduje pre biologický účinok galanínu v danom type bunky. Takýto antagonizmus nie je špecifický pre účinok galanínu a nie je použitý u galanínového receptora. Nie je taktiež použiteľný pre niektoré tkanivá, kde galanín pôsobí, zatiaľ čo antagonisty podľa tohoto vynálezu sú pri dobrej vôli antagonistami vo farmakologickom význame a prejavujú svoj účinok v mieste receptora mimo bunku pri konkurovaní endogénnemu ligandu.

Spôsob výroby membrán z hypotalámu krýs

Dospelé krysy (kmeňa Sprague-Dawley o hmotnosti 180 až 200 g) samčieho pohlavia sa usmrtia oddelením hlavy, z každej sa rýchle nareže hypotalámus a homogenizuje (10 % hmotnostno objemových) v 0,05 mol Tris-Cl tlmivého roztoku o hodnote pH 7,4. Homogenát sa desaťnásobne zriedi a odstreduje pri 1000 g počas 10 minút. Supernatant sa odstreduje pri 10 000 g počas 45 minút a granule sa resuspendujú v 5 ml Krebs-Ringerovho roztoku (137 mmol chloridu sodného, 2,68 mmol chloridu draselného, 1,8 mmol chloridu vápenatého a 1 g/l glukózy) o hodnote pH 7,4, pufrovaného 5 mmol HEPES. Dosiahne sa konečná koncentrácia proteínu v rozmedzí od 1,0 do 1,5 mg/ml.

Štúdia viazania ligandu v hypotaláme krysy

Pokusy vedúce k vytesneniu sa uskutočňujú pri konečnom objeme 400 μ l Krebs-Ringerovho roztoku pufrovaného s 5 mmol HEPES, s 0,05 % hmotnostne objemového BSA o hodnote pH 7,4, doplneného 1 mg/ml bacitracínu v prítomnosti 0,1 až 0,2 nmol ^{125} I-galanínu. Pripraví sa membrána z hypotalámu krýs a zvyšujú sa koncentrácie (z 10^{-12} na 10^{-6} mol) nezačleneného galanínu alebo iných ligandov galanínového receptora. Vzorky sa inkubujú pri teplote 37 °C počas 30 minút. Inkubácia sa ukončí pridávaním 10 ml ľadom chladeného Krebs-Ringerovho roztoku pufrovaného HEPES, potom sa uskutoční rýchla filtrácia cez filtre Whatman CF/C a prevrstvenie počas 5 až 6 hodín v objemovo 0,3 % roztoku polyetylénimíne. Filtre sa premyjú 10 ml skúšobného roztoku. Rádioaktivita zachytená na filtri sa stanoví čítačom žiarenia gama Packard. Špecifické väzby sú definované ako väzby vytesniteľné 1 μ mol galanínu. Krysí galanín a galanín ošípanej spôsobuje nerozoznateľné vytesňovacie krivky s membránami z krysieho hypotalámu.

Hodnoty IC_{50} vytesňujúcich ligandov sa vypočítajú hodnotením pokusných údajov podľa Macintosha SE, nelineárnou metódou najmenších štvorcov pri použití Macintoshovho programu "KaleidGraph".

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Galanínový antagonista, ktorým je ligand galanínového receptora.

2. Galanínový antagonista podľa nároku 1, kde tento antagonista je zvolený zo súboru pozostávajúceho z peptidov vzorca

H-Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂,

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 predstavuje aminoskupinu alebo hydroxyskupinu (amid alebo voľná kyselina) a

ich funkčných analógov a ich funkčných derivátov.

3. Peptid zvolený zo súboru pozostávajúceho z

H-Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂,

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 predstavuje aminoskupinu alebo hydroxyskupinu (amid alebo voľná kyselina) a

ich funkčné analógy a ich funkčné deriváty, ktoré prejavujú v podstate rovnaký galanínový antagonistický účinok ako už uvedené peptidy.

4. Spôsob výroby galanínového antagonistu podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že

a) postupne sa jednotlivo zavedú v tuhej fáze požadované aminokyselinové zvyšky do rastúceho peptidového reťazca alebo

b) postupne sa viažu aminokyseliny vo fáze roztoku za použitia príslušne derivátových aminokyselín.

5. Použitie galanínového antagonistu, ktorým je ligand galanínového receptora, pre výrobu farmaceutického prostriedku.

6. Galanínový antagonista, ktorým je ligand galanínového receptora, pre použitie pre farmaceuticky prostriedok.

7. Farmaceutický prostriedok, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že obsahuje galanínového antagonistu, ktorým je ligand galanínového receptora, ako účinnú látku, spoločne s farmaceuticky prijateľnou prísadou alebo prísadami.

8. Spôsob ošetrovania choroby cicavcov, ktorá závisí na fyziologickej funkcii galanínu u galanínového receptora, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa cicavcovi podáva farmaceuticky účinné množstvo galanínového antagonistu, ktorým je ligand galanínového receptora.