(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.[6]
C07K 7/08
C07K 7/02
C07K 7/10

(45) 공고일자 1999년10월01일
(11) 등록번호 10-0221769
(24) 등록일자 1999년06월29일

(21) 출원번호	10-1993-0703433	(65) 공개번호	특1994-0701024
(22) 출원일자	1993년11월13일	(43) 공개일자	1994년04월22일
번역문제출일자	1993년11월13일		
(86) 국제출원번호	PCT/SE 92/00316	(87) 국제공개번호	WO 92/20709
(86) 국제출원일자	1992년05월14일	(87) 국제공개일자	1992년11월26일
(81) 지정국	AP ARIPO특허 : 말라위 수단 EA EURASIAN특허 : 러시아 EP 유럽특허 : 핀랜드 룩셈부르크 OA OAPI특허 : 부르키나파소 베넹 중앙아프리카 콩고 코트디브와르 카메룬 가봉 기네 말리 모리타니 니제르 세네갈 차드 토고 국내특허 : 오스트레일리아 바베이도스 불가리아 브라질 캐나다 헝가리 일본 북한 대한민국 스리랑카 마다가스카르 노르웨이 폴란드 루마니아 미국 몽고		
(30) 우선권주장	9101472-0 1991년05월15일 스웨덴(SE)		

(73) 특허권자 악티에볼라게트 아스트라 클래스 빌헬름슨
스웨덴 에스-151 85 쇠더텔예

(72) 발명자 바르트파이 타마스
스웨덴왕국 에스-182 74 스톡순트 브링겐 3
회크펠트 토마스
스웨덴왕국 에스-182 61 드주르스홀름 스케르비크스베겐 27
란겔 울로
스웨덴왕국 에스-113 446 스톡홀름 비-01 스베아베겐 164
아렌 보
스웨덴왕국 에스-223 57 룬트 메르쿠리우스가탄 11
린트스코그 스테판
스웨덴왕국 에스-223 64 룬트 다그 하마르스크욀트스베겐 4에프:179
콘솔로 실바나
이탈리아공화국 아이-밀란 비아 에리트리아 62
란트 티트
스웨덴공화국 에스-104 05 스톡홀름 프로페소르스링간 11-101
비젠펠트-할린 주잔나
스웨덴왕국 에스-113 39 스톡홀름 오브제르바토리가탄 14

(74) 대리인 주성민

심사관 : 한현숙

(54) 갈라닌 길항제

요약

본 발명은 갈라닌 수용체 리간드인 갈라닌 길항제에 관한 것이며 더 구체적으로는 신규한 펩티드 갈라닌(1-12)-Pro-물질 P(5-11), 갈라닌(1-12)-Pro-브라디키닌(2-9), 갈라닌(1-12)-Pro-Pro-Pro-(Leu[5]-엔케팔린(5-1)), 갈라닌(1-12)-Pro-Lys(ε-NH-)Pro-(Leu[5]-엔케팔린(5-1)) 및 상기 펩티드오 실질적으로 동일한 갈라닌 길항 효과를 나타내는 그의 관능적 동족체 및 관능적 유도체에 관한 것이다. 본 발명은 또한 갈라닌 길항제의 용도, 그를 포함하는 제약학적 제제, 갈라닌 수용체에서 갈라닌이 생리학적 기능에 따른 포유동물 질환이 치료 방법을 포함한다.

명세서

[발명의 명칭]

갈라닌 길항제

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 갈라닌 수용체 리간드인 갈라닌 길항제에 관한 것이다. 구체적으로 본 발명은 펩티드 갈라닌(1-12)-Pro-물질 P(5-11), 갈라닌(1-12)-Pro-브라디키닌(2-9), 갈라닌(1-12)-Pro-Pro-Pro-(Leu^5-엔케팔린(5-1)), 갈라닌(1-12)-Pro-Lys(ε-NH-P개-(Leu^5-엔케팔린(5-1)) 및 상기 펩티드와 실질적으로 동일한 갈라닌 길항 효과를 나타내는 그의 관능적 동족체 및 관능적 유도체에 관한 것이다. 본 발명은 또한 갈라닌 길항제의 용도, 그를 함유한 제약학적 제제 및 갈라닌 수용체에서 갈라닌이 생리학적 기능에 따른 포유동물 질환의 치료 방법을 포함한다.

[배경]

신경 전달체 및 호로몬은 멤브레인에 결합한 수용체에 결합하여 활성화시킴으로써 그의 세포 작용을 유도할 수 있다. 신경 펩티드인 갈라닌은 1983년 돼지 장관 상부로부터 단리되었고 29 아미노산 잔기를 함유하고 있는 것으로 발견되었다.

(Tatemoto, k., et al, FEBS Lett, 164(1983) 124-128). 두 다른 동물, 즉 쥐 및 소 등으로부터의 갈라닌의 서열이 밝혀졌다. (Vrontakis M. E., et al, J. Biol, Chem. 262(1987) 16755-16758: Kaplan L. M. et al, Proc, Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85(1988) 1065-1069 and RÖkaeus Å and Carlquist M., FEBS Lett. 234(1988) 400-406). 포유동물인 쥐, 돼지 및 소로부터의 갈라닌 펩티드 서열을 비교한 결과 N-말단 아미노산 1-15가 동일하다는 것이 밝혀졌다. 따라서 상기 보존 영역이 다른 포유동물 즉 인체의 갈라닌에도 존재할 것으로 믿어진다.

갈라닌은 광범위한 분포 영역을 가지고 있으며 종종 각종 다른 계에서 작용하는 다양한 신경 작용과 관련이 있다. 갈라닌 수용체 리간드인 갈라닌 길항제가 지금까지 보고되지 않았다. 갈라닌 길항제는 갈라닌이 생리학적 중요성을 검증하고 갈라닌 수용체에서의 갈라닌의 생리학적 기능 조절용 제약학적 제제를 개발하기 위한 유용한 도구로 사용될 수 있다.

[발명의 설명]

본 발명의 한 특징은 갈라닌 수용체 리간드인 갈라닌 길항제에 관한 것이다.

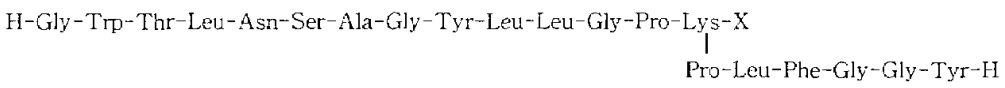
따라서, 본 발명에 따른 갈라닌 길항제의 길항 효과는 갈라닌 수용체에서 발휘된다.

본 발명의 한 실리 태양에 있어서, 길항제는 하기 펩티드

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,



(상기 식중, X는 $-NH_2$ 또는 -OH (아미드 또는 유리 산)을 나타냄) 및 그의 관능적 동족체 및 관능적 유도체로 이루어진 군에서 선택된다.

본 명세서 및 특허 청구 범위에 있어서, 본 발명의 펩티드의 '관능적 동족체'는 본 발명의 펩티드와 실질적으로 동일한 약물학적 기능을 나타내는 즉, 상기 유사체가 갈라닌 수용체에서 갈라닌 길항제인 한, 하나 또는 수 개의 아미노산 잔기를 다른 아미노산으로 치환하거나 치환하지 않은 더 짧거나 또는 더 긴 펩티드로 이루어진 것을 의미한다.

본 발명에 따른 펩티드의 '관능적 유도체'는 본 발명의 펩티드와 실질적으로 동일한 약물학적 기능을 나타내는, 즉 갈라닌 수용체에서 갈라닌 길항제인 화합물로 이루어진 것을 의미한다. 구체적으로는, 이 화합물은 본 발명의 펩티드 중 하나로부터 유도된 것일 수 있으나, 한개 또는 수개의 아미노산 잔기는 다른 화학기, 즉 '펩티드 유사체'를 생성하는 유기 또는 무기 분자 또는 원소로 치환될 수 있다.

본 발명에 따른 펩티드의 갈라닌 수용체의 구조 형태가 갈라닌 길항제로서의 약물학적 기능 및 갈라닌 수용체에 대한 친화성(따라서 갈라닌 수용체 리간드임)에 관여하는 것으로 믿어진다.

따라서, 본 발명에 의해 구성되는 관능적 유도체 및 관능적 동족체는 갈라닌 수용체에서 본 발명의 펩티드와 유사한 구조 형태를 가져야 할 것으로 믿어진다.

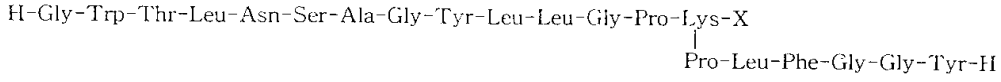
갈라닌 수용체의 주변액은 혈액 또는 생리 식염 용액에 의해 모방될 수 있다.

본 발명의 또 다른 특징은 하기 펩티드

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,



상기 식중, X는 -NH2 또는 -OH(아미드 또는 유리산)을 나타냄) 및 상기 펩티드와 실질적으로 동일한 갈라닌 길항 효과를 나타내는 그의 관능적 동족체 및 관능적 유도체에 관한 것이다.

상기 언급한 바와 같이, 또한 펩티드는 각각 갈라닌-(1-12)-Pro-물질 P(5-11), 갈라닌(1-12)-Pro-브라디키닌(2-9), 갈라닌(1-12)-Pro-Pro-Pro(Leu^{5}-엔케팔린(5-1)) 및 갈라닌(1-12-Pro-Lys(ε-NH-)Pro-(Leu^{5}-엔케팔린(5-1))으로 명명될 수 있다.

본 명세서이 실시태양의 일부로서 상기 나열한 펩티드는 아미드 형태(예, X = -NH_2)로서 각각 M15, M35, M36, A 및 M34, A로 명명될 수 있다.

관능적 동족체는

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

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

(상기 식중, X는 $-NH_2$ 또는 -OH(아미드 또는 유리산)을 나타냄)등의 펩티드일 수 있다.

본 발명의 다른 특징은 제약학적 제제의 제조를 위한, 갈라닌 수용체 리간드인 갈라닌 길항제의 용도에 관한 것이다. 상기 나열한 펩티드는 주사용 제약학적 제제의 제조에 용이하도록 수용성일 수 있다.

본 발명의 또 다른 특징은 제약하적 제제에 사용되는 갈라닌 수용체 리간드인 갈라닌 길항제에 관한 것이다.

본 발명의 또 다른 특징은 활성 성분으로서 갈라닌 수용체인 리간드인 갈라닌 길항제에 제약학적으로 허용가능한 첨가세를 가하여 이루어진 제약학적 제제에 관한 것이다. 제조될 제약학적 제제의 특정 유형에 따라, 목적하는 제제를 구성할 상기 첨가제를 선택해야 한다. 주사용 용액, 정제 또는 경고제 등 특정 유형의 제제를 위한 적합한 첨가제가 미합중국 약전에 기재되어 있다.

따라서, 본 발명은 또한 단독으로도 상기 언급한 치료 효과를 제공할 수 있는 유효량의 본 발명의 화합물을 포함한 그의 무독성 부가염, 아미드 및 에스테르를 함유하는 조성물을 제공한다. 상기 조성물은 또한 생리학적으로 허용가능한 액체, 겔, 또는 고상 희석제, 보조제 및 부형제와 함께 제공될 수 있다.

상기 화합물 및 조성물은 가축 등의 포유동물에 수의학적 용도로, 및 인체에 다른 치료제와 유사한 임상적 용도로 투여될 수 있다. 일반적으로, 치료 효능에 요구되는 용량은 환자의 체중당 약 0.01 내지 1000mcg/숙주 체중 kg, 더 일반적으로는 0.1 내지 1000mcg/숙주 체중 kg 범위이다. 한편, 상기 범위의 용량은 목적하는 치료 효과가 얻어질 때까지 연장된 시간 동안 일정한 관주에 의해 투여될 수 있다.

통상적으로, 상기 조성물은 주사용 용액제 또는 현탁액제로 제조될 수 있고, 주사하기 전의 액체 중 용액 또는 현탁액으로 적합한 고상물 형태로 제조될 수 있다. 제제는 또한 유화되거나 또는 리포좀 또는 미세구(microsphere) 등의 약물 전달 시스템 내에 함유될 수 있다. 활성 성분은 종종 생리학적으로 허용 가능하고 활성 성분과 혼화될 수 있는 희석제 또는 부형제와 혼합된다. 적합한 희석제 및 부형제는, 예를 들어 물, 식염수, 덱스트로스, 글리세롤류 및 그의 배합물 등이다. 추가로, 필요하다면, 조성물은 습윤제 또는 유화제, 안정제 또는 pH 완충제 등의 소량의 보조 물질을 함유할 수 있다.

조성물은 통상적으로 예를 들어 피하, 근육내, 복강내 또는 정맥내 등 주사에 의해 비경구 투여될 수 있다. 다른 투여 유형에 적합한 추가의 제제는 좌제, 질좌제, 비공 분무제, 접착성 정제 등의 구강 제제, 겔 또는 패취 및 특정 경우에 있어서 경구 제제 등을 포함한다. 좌제 및 질좌제에 있어서, 통상적인 결합

제 및 부형제는 예를 들어, 폴리알킬렌 글리콜 또는 트리글리세라이드 등을 포함할 수 있고, 상기 좌제는 0.5% 내지 10%, 바람직하게는 1% 내지 2% 범위의 활성 성분을 함유한 혼합물로부터 제조될 수 있다. 경구 제제는 예를 들어 제약학적 등급의 만니톨, 락토오스, 전분, 마그네슘, 스테아레이트, 나트륨 사카린, 셀롤로오스, 마그네슘 카르보네이트 등 통상적으로 사용되는 부형제 등을 포함한다. 상기 조성물은 용액제, 현탁액제, 정제, 환제, 캡슈제, 서방성 제제 또는 분말제 등의 형태를 취하며, 10%-95%, 바람직하게는 25%-70%의 활성 성분을 포함한다.

펩티드 화합물은 중성 또는 염 형태로서 조성물 내지 제제화될 수 있다. 제약학적으로 허용가능한 무독성 염은 산 부가염(유리 아미노산을 가하여 형성됨) 및 예를 들어, 염산 또는 인산 등의 무기산 또는 아세트산, 옥살산, 타르타르산, 만델산 등의 유기산을 가하여 형성된 염을 포함한다. 유리 카르복실기를 가하여 형성된 염은 예를 들어, 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘 또는 수산화제2철 등의 무기 염기, 및 이소프로필아민, 트리메틸아민, 2-에틸아미노에탄올, 히스티딘, 프로카인 등의 유기 염기로부터 유도될 수 있다.

본 발명의 또 다른 특징은 갈라닌 수용체에서 갈라닌의 기능에 의해 질환이 있는 포유 동무에게 갈라닌 수용체 리간드인 약물학적으로 유효한 양의 갈라닌 길항제를 투여하는 것으로 이루어진 치료 방법에 관한 것이다. 갈라닌 수용체에서 갈라닌의 생리학적 기능은 각 개체마다 특이하므로, 포유동물의 질환 치료를 위해 투여되는 갈라닌 길항제의 약물학적으로 유용한 양은 주치의 또는 수의사에 의해 개별적으로 결정된다.

갈라닌 길항제는 적어도 인슐린 분비, 성장 호르몬 분비, 아세틸콜린 분비, 도파민 분비, 물질 P 분비, 소마토스타틴 분비, 노르아드레날린 분비이 조절에 유용하다.

현재, 추정되는 의료적 조치 기능 분야는 내분비학, 음식물 섭취, 신경학, 정신병학, 알츠하이머형 노인성 치매, 정신분열증, 무통각증 장질환 등이다.

[본 발명에 따른 갈라닌 길항제의 제조]

펩티드를 제조하는 통상적인 방법이 본 발명의 갈라닌 길항제의 제조에 사용될 수 있고, 길항제가 펩티드 유사물일 경우에 적합하게 변형될 수 있다. 액상 합성법에 추가하여 본 발명의 신규한 화합물의 합성을 위한 통상적인 방법은 임의의 고상 펩티드 합성법을 포함한다. 상기 방법에 있어서, 신규한 화합물의 합성은 고상 제조법의 일반적인 방법에 따라 성장하는 펩티드 사슬에 한번에 한개씨 목적하는 아미노산 잔기를 연속적으로 혼입시키는 방법으로 수행될 수 있다.

하기의 약자가 사용된다.

MMP = N-메틸피롤리딘

HOBt = N-히드록시벤조트리아졸

MBHA = P-메틸벤즈히드릴아민

PAM = P-아세톡시메틸

Boc = tert-부틸옥시카르보닐

DMSO = 디메틸술폭시드

DIEA = 디이소프로필에틸아민

Tost = 토실

OcHex = 시클로헥실 에스테르

4-MeB키 = 4-메틸벤질

OBzl = 벤질 에스테르

Bom - t-벤질 옥시메틸

Clz = 2-클로로벤질옥시카르보닐

Blz = O-벤질

For = 포르밀

Brz = 2-브로모벤질옥시카르보닐

TFA = 트리플루오로아세트산

DMS = 디메틸 술피드

DCM = 디클로로메탄

DMF = N,N-디메틸포름아미드

본 발명의 펩티드 'M15''M35' 및 'M36, A'는 0.1mmole 규모(소규모)의 표준 NMP/HOBt 용매-활성화 방법을 사용한 어플라이드 바이오시스템 모델 431A(Applied Bioystem Model 431A) 펩티드 합성기를 사용하여 고상 지대 상에서 단계적 방법으로 조립하였다.

펩티드 'M34, A'는 Lys 대신 ε-Fmoc 및 Boc 등의 보호기를 사용하는 점을 제외하고는 동일한 방법으로 합성하였다. 따라서 펩티드의 일부는 Boc-합성법을 사용하여 제조되고 다른 일부는 Fmoc-합성법을 사용하여 제조하였다.

본 발명의 관능적 유도체는 유사한 방법으로 제조하였다.

tert-Boc-아미노산은 유리산(X=-OH)에 대해서는 tert-Boc-아미노산-PAM(Nova Chemical Company Ltd., 영국) 수지와 커플링되고, 또는 아미드(X=-NH_2)에 대해서는 MBHA(Bachem Feinchemikalien AG, 스위스) 수지와 히드록시벤조트 리아졸(HOBt) 에스테르로서 커플링하였다.

각 아미노산에 대한 각각의 사이클은 CH_2Cl_2(DCM) 중의 50 % 트리플루오로 아세트산을 19분간 가하여 tert-Boc-기의 보호기를 제거하고, N-메틸 피롤리돈(NMP) 중의 15 % DMSO 혼합물 중의 10배 과량의(수지 상의 아미노기의 양과 비교하여) 보호된 아미노산을 35분간 가하여 아실화시키는 과정을 포함하였다. 각 조작 과정 사이에 CH_2Cl_2, DIEA 및 NMP로 수회의 광범위한 세척을 실시하였다.

각 커플링 이후에, 10% 무수 아세트산 및 NMP 중의 5 % DIEA를 사용하여 5분간 아세틸화(캡핑)를 수행하였다.

펩티드, 34, A의 경우 Boc-Lys(Fmoc)를 사용하는 것을 제외하고는, 사용되는 모든 아미노산은 N-말단이 보호된 tert-Boc-아미노산이고(Nova Chemical Company Ltd., 영국), 그의 반응성 측쇄는 Arg 중의 Tos, Asp 중의 OcHex, Cys 중의 4-MeBzl, Glu 중의 OBzl, His 중의 Bom, Lys 중의 Clz, Ser 및 Thr 중의 Bzl, Trp 중의 For, 및 Tyr 중의 Brz로 보호되었다.

다른 자동 펩티드 합성용 모든 용매 및 시액은 어플라이드 바이오시스템사로 부터 입수한 것이다. 보호기 제거 및 절단 단계에 사용되는 시액은 분석용급이며 추가의 정제과정없이 사용하였다.

플루카(Fluka)사로부터 입수한 1,2-에탄디티올, 무수 아세트산, 트리플루오로메틸 술폰산(TFMSA), 디메틸 술피드(DMS) 및 P-크레졸, 머크사(Merck)로부터 입수한 디에틸에테르 및 아세토니트릴 및 AGA 가스사(AGA Gas)로부터 입수한 HF가 있 다. 완전히 조립된 펩티드-수지를 고 진공하에서 철야 건조시켰다. Trp 상의 포르밀기 및 벤질기로부터 보호기를 제거하는 과정을 '저 TFMSA'법을 사용하여 수행하였다. 100mg의 펩티드 수지에 TFMSA (10%), TFA(50%), DMS(30%), P-크레졸(80%) 및 디메르캅토에탄(2%)의 혼합물 2ml를 0℃에서 2시간 동안 진탕하면서 처리하고, 이어서 EtOH, DCM, DMF, DIEA/DCM, DMF 및 DCM으로 세척하였다.

진공하에서 건조시킨 다음 펩티드를 수지로부터 절단하고, 10ml의 액체 HF(P-크레졸 및 P-티오크레졸 1:1 혼합물을 20% 함유함)와 1g의 펩티드-수지를 0℃에서 60분간 혼합함으로서 보호기를 제거하였다. 수지를 10ml의 Et_2O로 2회 세척하고, 펩티드를 20 % 아세토니트릴/물로 추출하고 여과하였다. 수성 여과물을 진공건조하여 조 펩티드를 얻었다.

제조 정제는 조 생성물을 역상 C18 칼럼 상의 HPLC에 의해서 수행하였다. 10mg의 조 펩티드를 1ml의 20% 아세토니트릴/물 중에 용해시키고 0.1%의 TFA/물 중의 20-60%의 농도 구배(45분)의 0.1 % TFA/아세토니트릴 혼합물로, 2.0ml/분의 유속으로 용리시켰다. 분획물을 238nm에서의 흡광도에 따라 수집하였다.

개별적인 펩티드의 정제도는 분석용 HPLC를 사용하여 측정하여 99%로 측정되었다. 펩티드의 분자량을 어플라이드 바이오시스템사의 플라즈마 탈착 질량 분석기(Plasma desorption Mass Spectrophotometer)(PDMS) 모델 바이오이온(Bioion) 20을 사용하여 측정하였고, 정제된 펩티드 각각에 대하여 계산된 분자량 수치를 얻었다.

[표 1]

개별적인 펩티드의 정제도는 분석용 HPLC를 사용하여 측정하며 99 %로 측정함. 펩티드의 분자량은 어플라이드 바이오시스템사의 플라즈마 디솝션 질량 분석기(Plasma desorption Mass Spectrophotometer)(PDMS) 모델 바이오이온(Bioion) 20을 사용하여 측정하였고, 정제된 펩티드 각각에 대하여 계산된 분자량 수치를 얻음.

갈라닌(1-12)-Pro-SP(5-11) 아미드 (M15): (분자량 = 2199) IC_{50} = 0.1 nM

```
i                                                                                    20
Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met
1                   5                   10      12      5       7                 아미드
                                                                                    11
```

갈라닌(1-12)-Pro-스판티드(Spantide) 아미드 (C7): (분자량 = 2827) IC_{50} = 0.2 nM

```
1                                                13                                22
Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-(D-Arg)-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-(D-Trp)-Phe
                                                                                 스판티드(spantide)
 22      23  24
-(D-Trp)-Leu-LeuNH2
```

[표 1a]

갈라닌(1-2)-Pro-Pro-Pro-SP(5-11) 아미드 (M37): (분자량 = 2392) IC_{50} = 40 nM
1 5 12
Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-Pro-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-
5
22
Met 아미드
11

갈라닌(1-13)-Ala-Leu-Ala-Leu-Ala-Leu-Ala 아미드 (M38): (분자량 = 1970) IC_{50} = 0.2 nM
1 5 13 20
Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-Ala-Leu-Ala-Leu-Ala-Leu-Ala아미드

갈라닌(1-12)-Pro-Pro-Pro-Ala-Leu-Ala-Leu-Ala 아미드 (M40): (분자량 = 1980) IC_{50} = 13 nM
1 5 13 20
Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-Pro-Pro-Ala-Leu-Ala-Leu-Ala아미드

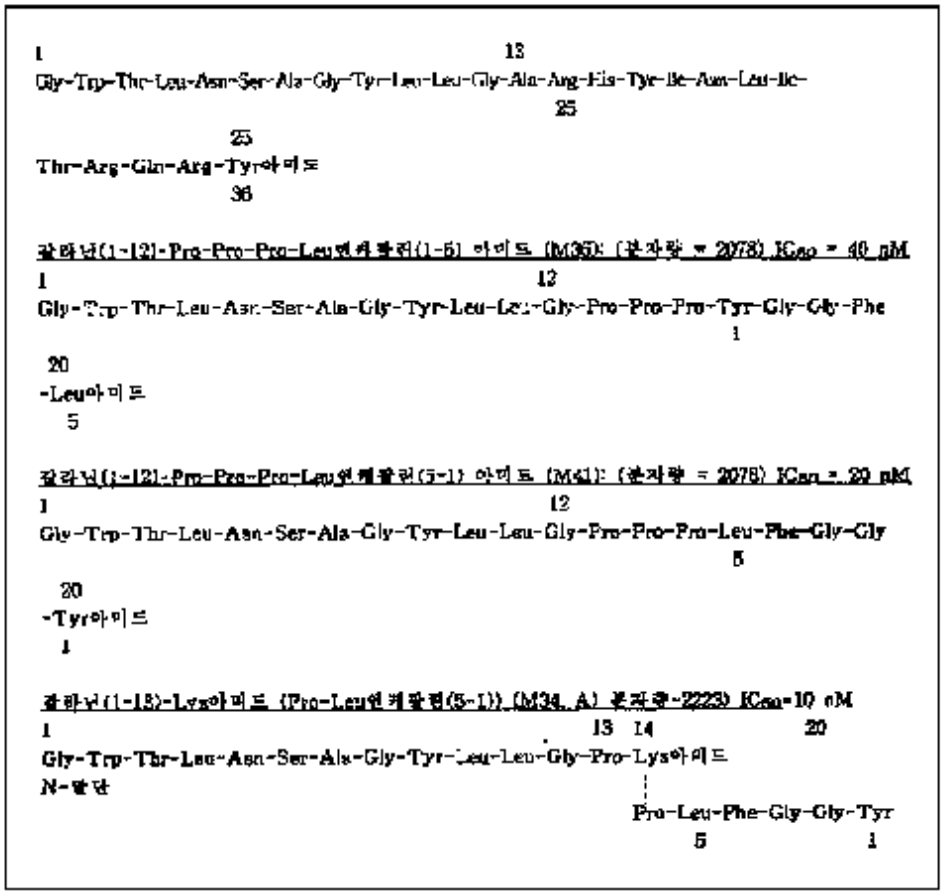
갈라닌(1-13)-브라디키닌(3-9) 아미드 (M20): (분자량 = 2135) IC_{50} = 1 nM
1 13
Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-
3
20
Arg아미드
9

갈라닌(1-13)-브라디키닌(2-9) 아미드 (M35): (분자량 = 2232) IC_{50} = 0.2 nM
1 13
Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro
2
21
-Phe-Arg아미드
9

갈라닌(1-13)-NPY(25-36) 아미드 (M32): (분자량 = 2961) IC_{50} = 0.05 nM
1 13
Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-Arg-His-Tyr-Ile-Asn-Leu-Ile
25
26
-Thr-Arg-Gln-Arg-Tyr아미드
36

갈라닌(1-12)-Ala-NPY(25-36) 아미드(M 88): (분자량=2935) IC_{50} = 1 nM

[표 1b]



IC_{50}은 쥐의 시상하부에 있어서 환치 실험에 의해 측정되었다.

[약물학적 실험]

1) 갈라닌의 포도당 유도 인슐린 부닙의 억제

아렌, 비(Ahren, B., et. al)의 문헌(Biochemical and Biophsical Research Communications, Vol. 140. 3, 1986, 1059-1063)에 따라 측정하였다. 아렌, 비(Ahern B., et al) 등에서 인용한 동일한 방법을 사용하여 본 발명에 따른 펩티드 M15가 동물량 농도로 갈라닌이 인슐린 분비를 억제하는 것을 차단함을 나타냈다.

[동물 및 세포의 제조]

양성의 성장한 비만한 과혈당중 쥐(ob/ob)를 부분 비 동종번식군으로부터 취하여, 철야 절식시켰다. 동물을 단두술로 치사시키고 콜라게나아제 단리 기법을 사용하여 소도(小島)를 단리하였다. 렌마아크 에이(Lehnmak, A)의 당뇨병학(Diabetologia) 10, 1974, 431-438에 기재된 방법으로 세포 현탁액을 제조하였다.

요약하면, EGTA(에틸렌 글리콜-비스(베타-아미노에틸 에테르)N, N, N', N'-테트라-아세트산, SIGMA)가 보충된 Ca-Mg-결핍 매질내에서 진탕하여 소도를 단일 세포 및 소괴로 분해하였다. 이후에 세포를 10% NU-혈청 TM(Collaborative Research INC., 미국 매사츄세츠주 렉싱톤 소재), 100 IU/ml 페니실린, 60㎍/ml 겐타마이신 및 100mg/ml 스트렙토마이신이 첨가된 12ml의 PRMI 1640 매질(L-글루타민을 함유하고 중탄산나트륨을 함유하지 않은 SIGMA사로부터 구입한 조직배양 매질) 중에서, 37℃, pH 7.4에서 철야 배양하였다. 배양중에 세포가 배양 플라스크에 부착하는 것을 방지하기 위해서 현탁액을 서서히 진탕하였다.

[매질]

사용된 기본 매질은 양이온에 유일 음이온으로서 Cl^-를 가하여 생리학적으로 균형있는 pH7.4의 HEPES 완충제(N-[2-히드록시에틸]-피페라진-N'-[2-에탄술폰산], SIGMA)이었다. 모든 경우에 있어서, 기본 매질은 1mg/ml의 알부민이 보충되었다.

[인슐린 분비의 측정]

0.5ml 칼럼 내에 바이오-겔 P-4 폴리아크릴아미드 비이드(200-400 메쉬, Bio-Rad Lab, 미국 캘리포니아주 리치몬드 소재)로 혼합한 20mM 또는 5mM의 포도당을 췌장의 베타 세포(약 1×10^{6})에 환류시켜 인슐린 분비 역학을 연구하였다. 유속은 0.5ml/분이고 1-3분 분획을 수집하여 대조군으로서 결정성 쥐 인슐린을 사용하여 인슐린을 방사면역학적으로 분석하였다.

[결과]

포도당(8.4mM)의 존재하에 60분간 배양한 후, 갈라닌(10^{-7} M)이 인슐린 분비를 34±2μU/ml에서 3±1μU/ml(P<0.001 : N=32)로 완전히 차단하였다. 본 발명의 펩티드 M15 단독으로 (10^{-6}M-10^{-9}M) 용량에 비례하여 갈라닌이 유도한 인슐린 분비 억제에 길항하였다.

포도당, 갈라닌 및 10^{-6}M, 10^{-7}M 또는 10^{-8}M의 M15의 존재하에 인슐린 분비량은 각각 28±2μU/ml(N-16), 17±μU/ml(N=16) 및 10±3μU/ml(N=16)이었다. 10^{-9}M의M15는 효과가 없었다.

상기 실시예의 결과, 본 발명의 펩티드 M15가 소도에서 갈라닌이 유도하는 인슐린 분비 억제를 길항하는 것으로 결론지을 수 있다.

2) 갈라닌의 아세틸콜린 분비 억제

상기 현상은 피존 쥐. 등(Fisone G., et al)의 문헌(Proc, Natl, Acad, S챠, vol 84, 1987, 7339-7343)에 따라 측정되었다. 피존 뒤. 등(Fisone G., et al)에서 인용한 것과 실질적으로 동일한 방법을 사용하여 본 발명에 따른 펩티드 M15가 생체내에서 스코폴라민이 유도하는 아세틸콜린이 분비에 대한 갈라닌의 억제 작용을 길항 하는 것을 나타냈다.

[미세투석 실시예]

[외과적 기본 방법]

체중 200~260g의 암컷 CD-COBS(Charles, River, 이탈리아 코모산) 쥐에 대하여 실험을 수행하였다. 에퀴덴신 (1% 펜토바르비탈, 4% 포스 클로랄)으로 동물을 마취시켰다. 팍시노스 및 와트슨(Paxinos G. and Watson C.)의 지시서(1986. Ther Rat Brain in Stereotoxic Coordinate, 2nd ded. Academci Press, Sydney.)에 의해서 전정의 전방 5mm, 중선이 측방 4.0mm 및 경수막 표면 아래 6.8mm 지점이 복측 해마에 유도 배관을 향착 삽입하였다. 명일까지 유도 배관의 개방을 유지하기 위해 탐침을 삽입하였다. 탐침을 제거함과 동시에 3×0.5mm의 노출면적을 갖는 멤브레인을 포함하는 미세투석 소식자(CMA 10, Cargenic Medicine AB, 스웨덴 스톡홀름)로 대치하였다. 유도 배관의 단부에서 3mm연장된 미세투석 소식자가 10μM의 피조스티그민 황산염을 함유하고 NaOH를 가하여 pH 7.0으로 조절된 링게트 용액(NaCl 147 mM, $CaCl_2$ 2.2 mM 및 KCl 4.0mM)을 2μ1/분의 속도로 환류시켰다. 초기 40분의 환류액은 폐기하였다. 이후에, 총 260분의 환류시간동안 20분마다 환류액을 수집하였다. 수집 기간의 최종 시점에서 시료를 고상 CO_2 상에서 즉시 냉동시키고 친액화시켰다.

콘솔로 에스 등(Consolo S., et al)의 문헌(J. N.EUROCHEM. 48. (1987), 1459-1465) 및 우 씨. 에프. 등(Wu C.F., et al)의 문헌(Neurobiol, Aging 9 (1988) 357-361)에 의해 상세히 설명된 (a) 콜린을 콜린포스포키나아제 및 ATP의 존재하에 포스포릴콜린으로 전환시키고, (b) 아세틸콜린을 콜린 및 아세트산으로 효소적 가수부해시키고, (c) 생성된 콜린에 [^{3}H] 아세틸조효소-A 99.9 GBq/mmol 및 아세틸 조효소 A:ChAT를 가하여 [^{3}H] 아세틸콜린으로 전환시키고, (d) 액체-액체 이온 교환 크로마토그래피에 의해 테트라페닐보론 함유 케톤 층으로 추출시킴으로써 형성된 [^{3}H] 아세틸콜린을 분리하고 섬광 측정하는 함유 케톤 층으로 추출시킴으로써 형성된 [^{3}H] 아세틸콜린을 분리하고 섬광 측정하는 특이적 방사효소적 방법으로 아세틸콜린(Ach)의 함량을 정량하였다. 인산화, 가수분해 및 아세틸화 반응이 통상적인 타당한 방법이 었다.

각 시료의 아세틸콜린의 농도는 7800 총 dpm/pmol의 경사를 갖는 표준물질의 방사활성을 근거로 한 선형 회구분석(10fmol-25 pmol 아세틸콜린으로부터 선형)에 의해 계산하였다. 환류액 시료의 다양한 복제물 또는 아세틸콜린 표준물의 계수는 약 3%였다.

생체의 실험에서 3회 희석 튜브법을 통한 아세틸콜린이 회수율을 상기 언급한 바와 같이 (Wu et al., ibib) 측정하였다. 평균 회수율은 17.6±0.5%이었다.

분비 실험의 종결 시점에서 투석 프로브의 위치를 니슬 염색법을 사용하여 조직학적으로 입증하였다.

[쥐의 복측 해마로부터 생체내 측정한, 스코폴라민이 유도한 Ach의 분비에 대한 갈라닌 및 M15이 효과]

생리식염수	2.0pmol
스코폴라민	13.1pmol
스코폴라민+갈라닌	6.9pmol
스코폴라민+M15	9.4pmol

갈라닌(1.56nmol) 및 M15(3.12nmol)을 스코폴라민을 투여(0.3mg/kg, 피하)하기 2분 전에 정맥내 투여하였다. 이후에 80분 동안 20분 간격으로 4개의 분획으로 수집한 환류액내에 Ach 분비를 측정하였다. 스코플라민-효과의 정점에 대응하는 20분 분획 및 제2의 20분 분획에서 측정한 Ach의 pmol을 수치로서 나타냈다. 자료는 두마리의 쥐(n=2)에서 수행한 실시예의 평균치이다.

상기 실시예의 결과로서 본 발명의 펩티드 M15는 해마에서 스코플라민 유도 아세틸콜린 분비이 갈라닌 유

도 억제를 길항하는 것으로 결론지을 수 있다.

3) 굴근 반사에 있어서 척수막내 투여한 갈라닌 및 C 섬유 자극의 효과

상기 실험은 위젠펠드할린 제트, 등(WiesenfeldHallin Z., et al)의 문헌(Brain Res. 486(1989) 205-213)에 의해서 설명되었다. 인용한 문헌과 실질적으로 동일한 방법을 사용하여 본 발명에 따른 펩티드 M15가 척수막내 투여한 갈라닌 유도 굴근반응의 촉진에 대하여 길항 효과를 가짐을 나타냈다. 본 발명의 다른 펩티드 M35가 예비 실험에서 유사한 결과를 나타냈다.

[전기 생리학적 연구]

제뇌한 척수신경의 비마취한 쥐에 있어서, 고 역치 구심신경의 활성화에 대응하는 다시냅스 슬건 굴근 반응도를 후방 이두근이 대퇴근/반건양건이 근전도를 기록함으로써 측정하였다. 동물을 브리탈(Brietal(등록상표))로 단시간 마취시키고, 척수막내에 배관을 삽입시켰다. 쥐에 향착성 장치를 봉입하고 전뇌 및 중뇌를 흡인하여 제뇌하고 환기시켰다. 흉곽의 수준에서 척추궁절제술을 실시하여 Th_{8-9}를 절개하여 척수를 노출시켰다. 척수막내 카테테르를 절개 부위에서 미측으로 삽입하여 그 끝이 요추 척수(L_{4-5})의 좌면에 닿도록 하였다, C-섬유를 활성화시킬 수 있는 충분한 강도(Wall and woolf, 1984)의 단일 전기 자극(0.5분, 10mA)을 하각 신경 또는 그의 신경 지배 영역에 가하는 시험 자극으로 굴근 반응을 유발시켰다. 몇몇 실시예에 있어서, 시험 자극으로서 동일한 강도의 CS(대조 자극)(1Hz, 20분)를 하각 신경에 가하였다.

동측 슬건 근육내에 삽입한 스테인레스 강 전극을 통한 EMG 활성으로 굴근반응을 기록하였다. 반응 중에 유발된 활동 전위의 수를 2초간 합산하였다. 합산한 반응을 골드(Gould) 도표 기록계(모델 2400S)에 기록하였다. 실시예 동안 심박 동수와 항문 체온을 기록하고 정상 범위내로 유지시켰다. 척수막내 카테테르의 적합한 위치를 척추궁절제술에 의한 각 실시예 이후에 확인하였다.

갈라닌(Bochem, Bubendorff, Switzerland) 및 소마토스타틴(Ferring, Malmo, Swden)을 0.9% 생리 식염 등장액에 용해시켰다. 모든 펩티드를 10μl 용적으로 척수막내 주사하고 10μl의 생리 식염 등장액을 카테테르에 유입시켰다.

[자료 수집]

각 척수막내 주사 및 신경 CS 전에 20분 이상 동안 안정한 기준 반응도를 이루게 하였다. 굴근 반응에 있어서 척수막내 펩티드 또는 신경 CS의 효과느 100%로 정한 기준과 비교한 반응도의 퍼센트 변화로 나타냈다. 갈라닌과 다른 펩티드 또는 하각 CS와의 신호 작용을 시험한 결과 갈라닌의 촉진 효과가 감퇴되는 경우는 다른 펩티드를 주사하기 15분 전에, 또는 하각 CS와 동시에 갈라닌을 투여한 경우이었다.

척수막내 투여한 갈라닌 유도 굴근 반응의 촉진에 대한 척수막내 투여한 M-15의 길항 효과를 측정하였다. 30pmol 피이크 촉진 효과는 기준 반응도의 비교하여 167±42.8%이었다. 갈라닌을 투여한 지 5-10분 후에 주사한 M-15의 길항 작용을 갈라닌의 피이크 촉진 효과의 감소 퍼센트로 계산하였다. 자료를 평균 S.E.M.으로 나타냈다.

M-15의 용량	회수	% 길항작용
30 pmol	4	35.8 ± 20.7
300 pmol	4	79.3 ± 8.4
3 nmol	3	93.0 ± 3.4

본 발명의 펩티드 M35를 사용하여 실시예를 반복하고 유사한 결과를 얻었다.

상기 실시예의 결과 본 발명의 펩티드가 척수막내 투여한 갈라닌 유도 굴근반응의 촉진을 용량 비례로 길항함을 결론지을 수 있다.

4) 리간드 결합 연구

갈라닌 대신 ^{125}I-갈라닌, 갈라닌 절편(1-13), 물질 p 절편(4-11), 동몰량 농도의 갈라닌 절편(1-13)+물질 p 절편(4-11) 및 본 발명의 펩티드 M15, M35 및 M 34, A를 사용하여 상기 연구를 수행하였다. 본 발명의 펩티드가 갈라닌 수용체에 특이적으로 결합하는 것이 입증되었다.

[^{125}I-모노요오드-Tyr^{26}-돼지 갈라닌의 제조]

합성 돼지 갈라닌(1-29)을 클로라민-T-법을 사용하여 요오드화시켜 125I-모노요오드-Tyr^{26}-돼지 갈라닌(비활성 1800-2000 Ci/mmol)을 얻고(랜드 티.(Land T.)등의 문헌(Neuroscience Ed. M. Conn, 5, 1991. 225-234에 기재) 평형상태에서 이루어지는 리간드 결합 연구를 실시하였다.

[Rin m 5F 세포의 멤브레인 분획의 제조]

Rin m 5F (쥐 체장 β-종양 세포-계) 세포의 수득 및 배양은 이미 언급되어 있다. (가즈다브 에이 에프(Gazdav A. F.) 등의 Proc, Natl, Acad, Sci, USA, 77(1980) 3519-3523). 요약하면 10%(v/v) 송아지 태아 혈청, 2,06mM L-글루타민, 100IU/ml 페니실린 및 100㎍/ml의 스트렙토마이신을 함유하는 RPMI-

1640(Gibco) 매질 중에서, 37℃의 10% CO_2-90% 대기 분위기 하에 세포를 재배하였다. 상기 과정을 5일마다 수행하였다. 1mM EDTA를 함유한 0.25% 트립신을 사용하여 병의 표면으로부터 세포를 떼어내고, 4℃, 2000×g에서 5분간 원심분리하였다. 괴를 저삼투압성 5mM HEPES 완충액 (pH 7.4)에 15분간 노출시켰다. 현탁액을 2000×g에서 15분간 원심분리시키고, pH 7.4의 바시트라신 함유(1mg/mg) 5mM HEPES-완충 크렙스-링게르 용액(137mM NaCl, 2.68mM KCl, 1.8mM $CaCl_2$, 1g/1 포다당) 중에 재현탁시키고 즉시 평형 결합 실시예에 사용하였다.

[갈라닌 및 갈라닌 수용체 리간드에 의한 ^{125}I-갈라닌의 환치]

0.1-0.2nM ^{125}I-갈라닌, 멤브레인 제조물 및 증가되는 농도 (10^{-12}-10^{-16}M)의 비표지 돼지 갈라닌 또는 다른 갈라닌 수용체 리간드의 존재하에 최종 용적이 400μl인 바시트라신 함유(1mg/ml) HEPES-완충 (5mM) 크렙스-링게르 용액 0.05%(w/v) BSA(pH 7.4) 중에서 환치 실시예를 수행하였다. 시료를 37℃에서 30분간 배양하였다. 10ml의 빙냉 HEPES 완충 크렙스-링게르 용액을 가하여 배양을 종결시키고 와트만(Whatman) GF/C 필터 상에서 급속 여과하고 0.3%(v/v)의 폴리에틸렌이민 용액 중에서 5-6시간 동안 예비코팅 시켰다. 필터를 10ml의 분석 용액으로 세척하였다. 필터에 잔존하는 방사능을 팩카드(Packard) 감마 계수기 내에서 측정하였다. 1μM 갈라닌으로 (또는 적합한 환치제이 농도로) 환치 가능한 경우를 특이적 결합으로 간주하였다.

대체 리간드의 IC_{50} 수치를 랜드 티. (Land, T.) 등에 의해 언급된 컴퓨터 산출 IC_{50} 수치로부터 계산하였다.

매킨토시(Macintosh) 프로그램 칼라이드그래프('KaleidGraph')를 사용한 비선형 최소 제곱법(nonlinear least square method)으로 매킨토시(Macintosh) SE 상에서 실시예를 자료로 적합시켰다.

[Rin m 5F 멤브레인으로부터 ^{125}I-갈라닌을 갈라닌 수용체 리간드로 환치]

	IC_{50}
갈라닌 (1-29)	**1 nM**
M15	**0.1 nM**
갈라닌 절편 (1-13)	**100 nM**
물질 P 절편 (4-11)	**비환치 > 10 μm**
동몰량의 갈라닌 절편(1-13)+물질 P 절편(4-11)	**100 nM**
M35	**0.1 nM**
M34, A	**10 nM**

상기 실시예에서 명백한 바와 같이, 본 발명의 펩티드는 갈라닌 수용체 리간드이다.

따라서 약물학적 실시예 1), 2) 및 3)은 본 발명의 펩티드가 갈라닌 길항제임을 나타내고 실시예 4)는 상기 펩티드가 갈라닌 수용체 리간드임을 나타낸다. 따라서, 갈라닌 수용체 이후의 반응 단계에 의한 상호작용 (주어진 세포 유형에 있어서 갈라닌의 생물학적 작용에 관련된)을 통하여 특정 조직 내의 갈라닌의 특정 효과를 길항하는 것으로 기존에 나타난 다른 화합물과는 달리 본 발명이 갈라닌 길항제는 갈라닌 수용체 리간드이다. 상기 기존 길항작용은 갈라닌 작용에 특이적이지 않고, 갈라닌 수용체에서 발휘되지 않는다. 상기 기존 길항제는 갈라닌이 작용하는 수 종의 조직에는 적용되지 못하는 반면, 본 발명에 따른 길항제는 약물학적인 의미에서 진정한 길항제이며 내부 리간드와 경쟁함으로써 세포 외부의 수용체 부위에서 그의 작용을 발휘한다.

[쥐 시상하부로부터 멤브레인의 제조]

성장한 수컷 쥐(Sprague-Dawley, 180-200g)를 단두 치사시키고 시상하부를 신속히 절제하여 pH 7.4의 0.05M 트리스-Cl 완충제 중에 균질화시켰다(10% 양/용적). 균질액을 10배 희석하고, 1000×g에서 10분 동안 원심분리하였다. 상등액을 10,000×g에서 45분간 원심분리하고, 펠릿을 pH 7.4의 5mM HEPES 완충 크랩스-링게르 용액(137mM NaCl, 2.68mM KCl, 1.8mM $CaCl_2$, 1g/1 포도당) 중에 재현탁시켜 최종 단백질 농도가 1.0-1.5mg/ml가 되게 하였다.

[쥐 뇌하수체에 있어서 리간드 결합 연구]

0.1-0.2mM ^{125}I-갈라닌, 쥐 뇌하수체로부터의 멤브레인 제조물 및 증가된 농도(10^{-12}-10^{-16}M)의 비표지 갈라

닌 또는 다른 갈라닌 수용체 리간드의 존재하에 최종 용적이 400μl이고 바시트라신이 첨가된 (1mg/ml) HEPES-완충(5mM) 크렙스-링게르 용액 0.05%(w/v) BSA (pH 7.4) 중에서 환치 실시예를 수행하였다. 시료를 37℃에서 30분간 배양하였다. 10ML의 빙냉 HEPES 완충 크렙스-리게르 용액을 가하여 배양을 종결시키고, 와트만(Whatman) GF/C 필터 상에서 급속 여과하고 0.3%(v/v)의 폴리에틸렌이민 용액 중에서 5-6시간 동안 예비코팅시켰다. 피러를 10ml이 분석 용액으로 세척하였다. 필터에 잔존하는 방사능을 팩카드(Packard) 감마 계수기 내에서 측정하였다. 1μM 갈라닌으로 (또는 적합한 환치제의 농도로) 환치 가능한 경우를 특이적 결합으로 간주하였다. 쥐 및 돼지 갈라닌은 쥐 뇌하수체로부터의 멤브레인에 있어서의 거의 동일한 환치 곡선을 나타냈다.

매킨토시(Macintosh) 프로그램 칼라이드그래프('KaleidGraph')를 사용한 비선형 최소 제곱법(nonlinear least square method)으로 매킨토시(Macintosh) SE 상에서 실시예이 자료를 적합시킴으로서 환치 리간드의 IC_{50} 수치를 계산하였다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

갈라닌 수용체 리간드인 갈라닌 길항제.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 길항제가 펩티드

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

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

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

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

(식중, X는 $-NH_2$ 또는 -OH(아미드 또는 유리산)을 나타냄) 및 그의 관능적 동족체 및 관능적 유도체로 이루어진 군에서 선택된 것인 갈라닌 길항제.

청구항 3

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

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

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

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

(식중, X는 $-NH_2$ 또는 -OH(아미드 또는 유리산)을 나타냄) 및 상기 펩피드와 실질적으로 동일한 갈라닌 길항 효과를 나타내는 그의 관능적 동족체 및 관능적 유도체로 이루어진 군에서 선택된 펩피트.

청구항 4

a) 고상에서 성장하는 펩티드 사슬에 한번에 1개씩 목적하는 아미노산 잔기를 순차적으로 혼입시키거나 또는 b) 액상에서 적절한 유도체화 아미노산을 사용하여 단계적으로 아미노산을 커플링시키는 것을 특징으로 하는 제1항에 따른 갈라닌 길항제의 제조 방법.

청구항 5

활성 성분으로서 갈라닌 수용체 리간드인 갈라닌 길항제를 제약학적으로 허용 가능한 첨가제(들)과 함께 함유하는, 갈라닌 수용체에서 갈라닌의 생리적 기능에 의한 질환이 있는 포유 동물을 치료하기 위한 제약학적 제제.

청구항 6

약물학적 유효량의 갈라닌 수용체 리간드인 갈라닌 길항제를 투여하는 것을 특징으로 하는, 갈라닌 수용체에서 갈라닌의 생리하적 기능에 따른 인간을 제외한 포유동물 질환의 치료 방법.