

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

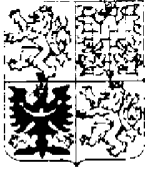
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

3440-96

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **22. 03. 96**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **24.03.95**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **95/9501067**

(33) Země priority: **SE**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **14. 05. 97**
(Věstník č. 5/97)

(86) PCT číslo: **PCT/SE96/00365**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 96/30397**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁶:

C 07 K5/10
C 07 K7/06
A 61 K38/07
A 61 K38/08

(71) Přihlášovatel:

ASTRA AKTIEBOLAG, Södertälje, SE;

(72) Původce:

Bergstrand Håkan, Bjärred, SE;

Eriksson Tomas, Lund, SE;

Lindvall Magnus, Lund, SE;

Särnstrand Bengt, Lund, SE;

(74) Zástupce:

Hakr Eduard Ing., Přístavní 24, Praha 7,
17000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Peptidy s imunomodulačními účinky,
farmaceutické formulace které je obsahu-
jí a jejich použití**

(57) Anotace:

Peptidy obsahující alespoň dva cysteinové aminokyselinové zbytky, kteréžto dva zbytky spolu navzájem bezprostředně sousedí nebo jsou odděleny ne více než jedním aminokyselinovým zbytkem, peptidy jsou absorbovatelné epiteliální buněčnou výstelkou savce, přičemž následkem této absorpce je modulovaná imunitní odpověď a tím terapeutický účinek proti onemocnění, farmaceutické formulace obsahující tyto peptidy a jejich použití.

CZ 3440-96 A3

Peptidy s imunomodulačními účinky, farmaceutické formulace které je obsahují a jejich použití

Oblast techniky

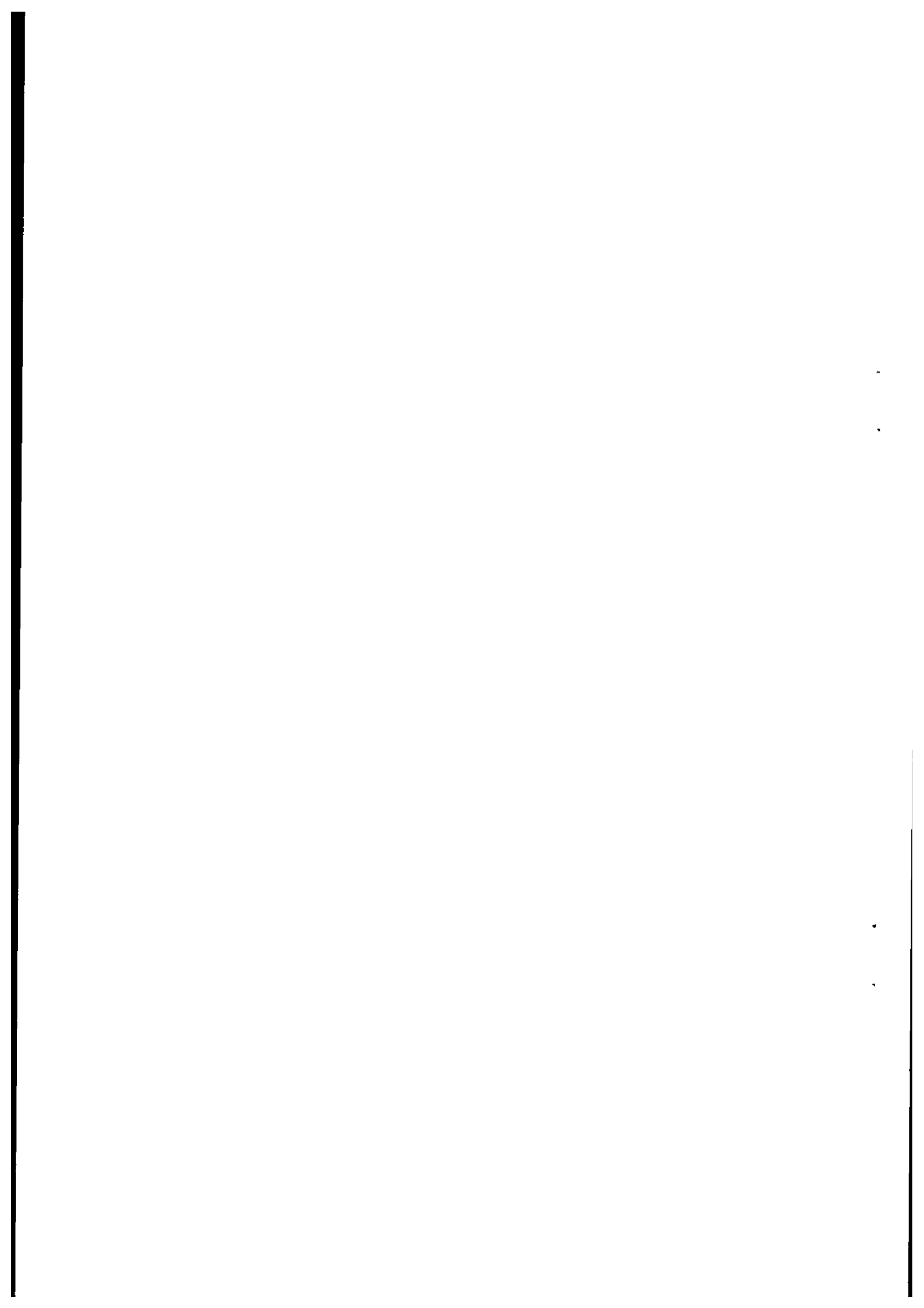
Vynález se týká antigenově nespecifické imunomodulace, včetně jak imunosuprese tak imunostimulace. Zejména se vynález týká imunomodulačních peptidů, které jsou schopné vyvolat (indukovat) u savců imunomodulační odpověď a tím terapeutický účinek, a jejich použití.

Dosavadní stav techniky

Imunitní systém, pokud správně funguje, chrání jedince před infekcí a před vznikem rakoviny. Aby mohl provádět tyto funkce, musí být schopen rozpoznat a atakovat cizí antigeny (včetně antigenů specifických pro rakovinu), ale nikoli vlastní antigeny přítomné na normálních buňkách v těle.

Imunitní systém je možné stimulovat za účelem zvýšení jeho ochranné úrovně. Pro vyvolání imunity proti konkrétnímu antigenu a tím proti konkrétní chorobě se hojně používají vakcíny, včetně antigenů tvořených jediným proteinem, jako je toxoid záškrtu. Pokud je žádoucí všeobecná stimulace imunitního systému, lze jí někdy dosáhnout nespecifickými činidly jako jsou adjuvans, interleukiny, interferony a faktory stimulující růst kolonií (colony stimulating factors).

Ve výjimečných případech se stává, že imunitní systém ztratí svou klíčovou schopnost odlišit vlastní antigeny od cizích. Výsledné imunologické napadení vlastních tkání jedince může mít formu autoimunitní choroby: jako je například systémový lupus erythematosus, diabetes typu 1 nebo revmatická artritida. V takovém případě, nebo alternativně v případě, že je ošetřovaný jedinec příjemcem



transplantovaného orgánu nebo tkáně, je žádoucí nikoli stimulace, ale potlačení imunitní odpovědi.

Nespecifického snížení imunitní odpovědi se typicky dosahuje ošetřením kortikosteroidy, azathioprinem, cyklosporinem, tacrolimem (FK506), rapamycinem nebo mycophenolat-mofetilem. Pro tento účel se rovněž používají určité imunoglobuliny, včetně monoklonální protilátky OKT3. Možné je rovněž potlačení imunity proti konkrétnímu antigenu, nazývané "indukování tolerance". Mezi způsoby používané pro indukci tolerance proti konkrétnímu antigenu patří intravenózní nebo opakované místní podání antigenu ve zředěné formě, ošetření velmi vysokou dávkou antigenu a orální podání antigenu.

EP 635621 popisuje systém pro orální podávání, který spočívá mimo jiné v tom, že má kationický polysacharidový film uložený na gelovatelném hydrokoloidu, do nějž může být zapracováno léčivo (peptid).

WO 94/20136 popisuje způsob podávání farmaceuticky účinných peptidů v komplexech obsahujících cyklodextrin. O peptidech je uváděno, že jsou vhodné jako agonisty receptorů, antagonisty receptorů a jako vakcíny. Je uvedeno, že mnohé peptidy o délce od 3 do 20 aminokyselin jsou nestabilní a mají sklon ztrácet biologickou účinnost. U popisovaných peptidů není zmíněno, že by obsahovaly cysteinové zbytky. Je uváděno, že použití cyklodextrinu zlepšuje stabilitu takových peptidů.

EP 566135 popisuje systém, ve kterém jsou peptidy podávány na mukózní výstelku spolu s derivátem cytidinového nukleotidu, ve formulaci vytvořené pro orální podání. V EP 566135 se uvádí, že peptidy nebo proteiny, pokud jsou podávány orálně a bez určité formy ochranného nebo stabilizujícího prvku, ztrácí účinnost, a jsou v něm obsaženy odkazy na řadu patentových přihlášek, které údajně poskytují různá řešení problému stability při orálním podávání peptidů.

Kromě nepříjemností, které jsou pro pacienta spojeny s injekčním podáváním peptidů nebo proteinů, může skutečné množství peptidu nebo proteinu, které se podává, vyvolávat toxické vedlejší účinky.

Nyní bylo zjištěno, že určité peptidy vykazují aktivitu jako imunomodulátory. Překvapující vlastností související s imunomodulační aktivitou je to, že o této aktivitě bylo na základě zde popsaných pokusů zjištěno, že je ve svých účincích imunoinhibiční nebo imunostimulační, a dále že se imunomodulační aktivita ukázala jako indikátor dosažení určitého terapeutického účinku při léčení některých chorob, jako je rakovina nebo artritida. Dále bylo zjištěno, že v případě, že se podání na epiteliální buněčnou výstelku provede orálním způsobem, je podání peptidů v korelaci s modulačním účinkem na růst nádorů. Dalším překvapivým zjištěním je skutečnost, že při orálním podání "nahých" (neizolovaných) peptidů podle vynálezu není nutné používat přidávaná transportní činidla. Peptidy podle vynálezu tedy není nutné podávat v kombinaci s transportními činidly, jako jsou nosná činidla pro transport, například vesikulární transportní systémy, které jsou vytvořeny pro zlepšení transportu (dodávání) na mukosální epiteliální buněčnou výstelku ve střevě. Kromě toho bylo rovněž zjištěno, že množství peptidu nutné pro vyvolání terapeutického účinku orálním podáním může být podstatně nižší než jaké je nutné pro vyvolání podobného účinku pokud je peptid podáván systémově, například parenterální injekcí.

Předmětem vynálezu je nalezení účinného způsobu pro léčení chorob za použití imunomodulačních peptidů.

Dalším předmětem vynálezu je nalezení imunomodulačních peptidů, které lze použít při léčení chorob.

Tyto a další předměty vynálezu jsou zřejmé z následujícího popisu a příkladů.

Podstata vynálezu

Vynález popisuje purifikované fyziologicky aktivní peptidy obsahující alespoň dva cysteinové aminokyselinové zbytky, kteréžto dva zbytky spolu navzájem bezprostředně sousedí nebo jsou odděleny ne více než jednou aminokyselinou, kteréžto peptidy jsou absorbovatelné epiteliální buněčnou výstelkou savce přičemž následkem této absorpce je modulovaná imunitní odpověď a tím terapeutický účinek proti onemocnění.

Uvedené peptidy jsou vytvořeny z aminokyselinových zbytků nezávisle na sobě vybraných ze souboru zahrnujícího aminokyselinové zbytky s alifatickými postranními řetězci, alifatickými hydroxylovanými postranními řetězci, bázičnými postranními řetězci, kyselými postranními řetězci, sekundárními aminoskupinami, amidickými postranními řetězci a postranními řetězci obsahujícími síru. Peptidy podle vynálezu musí být fyziologicky aktivní v tom smyslu, že musí být schopné vyvolat (indukovat) modulovanou imunitní odpověď a tím terapeutický účinek na chorobu. Vhodné aminokyseliny mohou být nezávisle na sobě vybrány ze souboru zahrnujícího přirozeně se vyskytující a přirozeně se nevyskytující aminokyselinové zbytky. Mezi příklady přirozeně se vyskytujících aminokyselinových zbytků patří isoleucin (Ile), leucin (Leu), alanin (Ala), arginin (Arg), asparagin (Asn), kyselina asparagová (Asp), cystein (Cys), glutamin (Gln), kyselina glutamová (Glu), glycin (Gly), lysin (Lys), fenylalanin (Phe), prolin (Pro), serin (Ser), threonin (Thr), tryptofan (Trp), tyrosin (Tyr), methionin (Met), valin (Val) a histidin (His). Peptidy podle vynálezu tedy mohou obsahovat další cysteinové zbytky, které buď sousedí s alespoň dvěma cysteinovými aminokyselinovými zbytky uvedenými výše nebo jsou od nich vzdálené. Odborníkovi je zcela zřejmé, že termín "přirozeně se vyskytující aminokyselinové zbytky" označuje ty aminokyselinové zbytky, které se nalézají v peptidech nebo/a proteinech živých organismů. Odborník si je rovněž vědom

toho, že takovéto přirozeně se vyskytující aminokyselinové zbytky mohou být v peptidech podle vynálezu přítomné v chemicky modifikovaných formách, například zahrnujících přídavné chránicí skupiny, jako je ethylová skupiny, tritylová skupina (Trt), allylová skupina, terc.butylová skupina a podobně. Odborník si je přirozeně vědom toho, že jakákoli chránicí skupina nebo chránicí skupiny, které mohou být přítomné na peptidech podle vynálezu, by měly být takové, aby podstatně nezasahovaly do jejich imunomodulačních vlastností a tím do jejich terapeutického účinku.

Purifikované peptidy podle vynálezu lze připravit synteticky, například chemickými způsoby, nebo za použití genového inženýrství. Alternativně lze peptidy podle vynálezu izolovat z polypeptidů nebo proteinů a podobně.

Peptid podle vynálezu může být ve formě dimeru vytvořeného ze dvou stejných nebo dvou rozdílných peptidových monomerů navzájem spojených pomocí vazeb síra-síra mezi alespoň jedním z uvedených alespoň dvou cysteinových aminokyselinových zbytků prvního peptidového monomeru a alespoň jedním z uvedených alespoň dvou cysteinových aminokyselinových zbytků druhého peptidového monomeru. Podle jednoho provedení vynálezu jsou peptidové monomery navzájem spojeny pomocí vazeb síra-síra mezi uvedenými alespoň dvěma cysteinovými aminokyselinovými zbytky prvního peptidového monomeru a uvedenými alespoň dvěma cysteinovými aminokyselinovými zbytky druhého peptidového monomeru. Dimery podle vynálezu mohou být v paralelní formě, to znamená, že dva peptidové monomery jsou uspořádány navzájem paralelně, takže jsou oba peptidové monomery čitelné v jednom směru například ve směru od N-konce k C-konci. Peptidové monomery tvořící dimer mohou, ale nemusí, být stejně dlouhé. Výhodně jsou peptidové monomery stejně dlouhé a N- a C-koncové aminokyselinové zbytky jednoho monomeru sousedí s N- a C-koncovými aminokyselinovými zbytky druhého peptidového monomeru.

Alternativně může být dimer podle vynálezu v antiparalelní formě. To znamená, že první monomer čtený od N-koncového aminokyselinového zbytku k C-koncovému aminokyselinovému zbytku je umístěn proti druhému monomeru čtenému od C-koncového aminokyselinového zbytku k N-koncovému aminokyselinovému zbytku, t.j. v opačném směru než první peptidový monomer; přičemž uvedené dva peptidové monomery jsou spojeny vazbami síra-síra mezi cysteinovými aminokyselinovými zbytky, jak je popsáno výše pro paralelní a antiparalelní dimery podle vynálezu. V případě, že jsou dva peptidové monomery tvořící peptidový dimer podle vynálezu navzájem rozdílné, označuje se tento dimer jako heterodimer. Heterodimer může být v paralelní nebo antiparalelní formě. Heterodimer může být tedy tvořen ze dvou stejně dlouhých peptidových monomerů lišících se například nahrazením aminokyselinového zbytku v L-formě aminokyselinovým zbytkem v D-formě. Alternativně mohou být délky peptidových monomerů tvořících dimer rozdílné. Výhodně jsou první a druhý peptidový monomer tvořící dimer podle vynálezu stejné.

Mezi peptidy podle vynálezu patří rovněž monomery, ve kterých jsou uvedené alespoň dva sousedící nebo od sebe oddělené nezbytné cysteinové aminokyselinové zbytky spojeny disulfidickými můstky. Tyto monomery mohou být lineární nebo cyklické. Výhodně jsou tyto monomery lineární.

Podání peptidů podle vynálezu například pomocí orálního podání, intratracheálního, nasálního nebo parenterálního podání, vyvolá vznik měřitelné modulované imunitní odpovědi, jak je uvedeno dále v příkladech.

"Epiteliální buněčná výstelka" je definována jako buněčná výstelka a buňky s ní související, které pokrývají vnější a vnitřní povrchy těla, včetně výstelky cév a jiných malých dutin. Pro účely vynálezu je za epiteliální buněčnou výstelku považována alespoň jedna vrstva buněk do hloubky až několik vrstev buněk do hloubky. Mezi buňky spadající do

rozsahu výrazu "epiteliální buněčná výstelka" rovněž spadají ty buňky a specializované lymfoidní tkáně, které jsou umístěny v uvedené epiteliální buněčné výstelce nebo jsou s ní spojené, a které ovlivňují imunitní odpověď, jako jsou T-lymfocyty, B-lymfocyty, enterocyty, NK-buňky, monocyty, dendritické buňky a buňky tvořící s mukózou související lymfoidní tkáň (MALT, mucosal associated lymphoid tissue), jako jsou Peyerovy skvrny a podobně. Odborník tedy bere v úvahu, že do rozsahu definice epiteliální buněčné výstelky patří takzvané putující (migrující) buňky, jako jsou T- a B-lymfocyty, které lze považovat za přechodně rezidentní buňky epiteliální buněčné výstelky, jak je definována výše. Peptidy podle vynálezu mohou být absorbovány epiteliální buněčnou výstelkou pasivním nebo aktivním způsobem. Peptidy mohou být například absorbovány na povrchu buněk nebo aktivně nebo pasivně vychytávány buňkami umístěnými na lumenové straně epiteliální buněčné výstelky nebo mohou přecházet přes zprostředkovatelské buňky umístěné na lumenové straně epiteliální buněčné výstelky a být vychytávány buňkami umístěnými hlouběji v epiteliální buněčné výstelce, například T-lymfocyty nebo Peyerovými skvrnami. Odborník bere rovněž v úvahu, že "absorpce", jak je zde definována, rovněž zahrnuje situaci, kdy peptidy podle vynálezu iniciují imunitní odpověď interakcí s receptory na povrchu buněk nacházejícími se v membránách nebo na membránách určitých specializovaných buněk umístěných v epiteliální buněčné výstelce, jako na enterocytech, a intraepiteliálních lymfocytech, bez fyzikální penetrace epiteliální buněčnou výstelkou. Odborníkovi je tedy zřejmé, že peptidy podle vynálezu mohou vstupovat do interakcí s epiteliální buněčnou výstelkou, vázat se na ni, procházet jí nebo ji penetrovat.

Peptidy podle vynálezu se výhodně podávají orálně, nasálně nebo intratracheálně v orálních, nasálních nebo intratracheálních dávkovacích formách. Bylo zjištěno, že množství peptidu podle vynálezu nutné pro vyvolání určitého

terapeutického účinku při orálním podání může být podstatně nižší než množství nutné pro vyvolání stejného účinku pomocí jiných typů podání, jako je parenterální podání.

Podle dalšího provedení vynálezu je popisována orální dávkovací forma, která obsahuje imunomodulační peptid obsahující alespoň dva cysteinové aminokyselinové zbytky, kteréžto dva zbytky spolu navzájem bezprostředně sousedí nebo jsou odděleny ne více než jedním aminokyselinovým zbytkem, kterýžto peptid je absorbovatelný epitelální buněčnou výstelkou gastrointestinálního traktu savce přičemž následkem této absorpce je modulovaná imunitní odpověď a tím terapeutický účinek proti onemocnění. Uvedený peptid může být ve formě monomeru nebo dimeru.

Podle dalšího provedení vynálezu je popisována orální dávkovací forma, která obsahuje alespoň jeden imunomodulační peptid obsahující alespoň dva cysteinové aminokyselinové zbytky, kteréžto dva cysteinové zbytky spolu navzájem bezprostředně sousedí nebo jsou odděleny ne více než jedním aminokyselinovým zbytkem, kterýžto alespoň jeden peptid je absorbovatelný epitelální buněčnou výstelkou gastrointestinálního traktu savce přičemž následkem této absorpce je modulovaná imunitní odpověď a tím terapeutický účinek proti onemocnění, přičemž množství uvedeného alespoň jednoho orálně podaného peptidu nutné pro vyvolání pozorovatelné modulace imunitní odpovědi savce je nižší než množství stejného alespoň jednoho peptidu podané parenterálně nutné pro dosažení podobné pozorovatelné modulace imunitní odpovědi tohoto savce.

Podle dalšího provedení vynálezu je popisována nasální dávkovací forma imunomodulačního peptidu obsahujícího alespoň dva cysteinové aminokyselinové zbytky, kteréžto dva zbytky spolu navzájem bezprostředně sousedí nebo jsou odděleny ne více než jedním aminokyselinovým zbytkem, kterýžto peptid je absorbovatelný epitelální buněčnou výstelkou nasálních cest

savce přičemž následkem této absorpce je modulovaná imunitní odpověď a tím terapeutický účinek proti onemocnění.

Podle dalšího provedení vynálezu je popisována nasální dávkovací forma, která obsahuje alespoň jeden imunomodulační peptid obsahující alespoň dva cysteinové aminokyselinové zbytky, kteréžto dva cysteinové aminokyselinové zbytky spolu navzájem bezprostředně sousedí nebo jsou odděleny ne více než jedním aminokyselinovým zbytkem, kterýžto peptid je absorbovatelný epiteliální buněčnou výstelkou nasálních cest savce přičemž následkem této absorpce je modulovaná imunitní odpověď a tím terapeutický účinek proti onemocnění, přičemž množství uvedeného nasálně podaného peptidu nutné pro vyvolání pozorovatelné modulace imunitní odpovědi savce je nižší než množství stejného peptidu podané parenterálně nutné pro dosažení podobné pozorovatelné modulace imunitní odpovědi tohoto savce.

Podle dalšího provedení vynálezu je popisována intra-tracheální dávkovací forma, která obsahuje imunomodulační peptid obsahující alespoň dva cysteinové aminokyselinové zbytky, kteréžto dva zbytky spolu navzájem bezprostředně sousedí nebo jsou odděleny ne více než jedním aminokyselinovým zbytkem, kterýžto peptid je absorbovatelný epiteliální buněčnou výstelkou plic savce přičemž následkem této absorpce je modulovaná imunitní odpověď a tím terapeutický účinek proti onemocnění.

Podle dalšího provedení vynálezu je popisována intra-tracheální dávkovací forma, která obsahuje alespoň jeden imunomodulační peptid obsahující alespoň dva cysteinové aminokyselinové zbytky, kteréžto dva cysteinové zbytky spolu navzájem bezprostředně sousedí nebo jsou odděleny ne více než jedním aminokyselinovým zbytkem, kterýžto alespoň jeden peptid je absorbovatelný epiteliální buněčnou výstelkou plic savce přičemž následkem této absorpce je modulovaná imunitní odpověď a tím terapeutický účinek proti onemocnění, přičemž

množství uvedeného alespoň jednoho intratracheálně podaného peptidu nutné pro vyvolání pozorovatelné modulace imunitní odpovědi savce je nižší než množství stejného alespoň jednoho peptidu podané parenterálně nutné pro dosažení podobné pozorovatelné modulace imunitní odpovědi tohoto savce.

Peptidy podle vynálezu mohou být libovolně dlouhé pokud jsou schopné vyvolat modulovanou imunitní odpověď a tím terapeutický účinek. Obecně jsou peptidy podle vynálezu krátké peptidy o délce od 4 aminokyselinových zbytků do zhruba 30 aminokyselinových zbytků. Výhodně mají tyto peptidy délku od 4 aminokyselinových zbytků do zhruba 20 aminokyselinových zbytků. Ještě výhodněji mají peptidy podle vynálezu délku od 4 do 15 aminokyselin (například 4 až 10 nebo 4 až 9) a nejvýhodněji mají délku od 4 do 7 aminokyselin. Peptid může mít délku například 4, 5, 6, 7 nebo 8 aminokyselinových zbytků, přičemž jsou nebo nejsou přítomné ochranné skupiny.

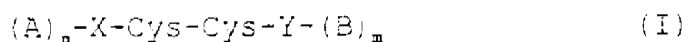
Peptidy podle vynálezu mohou nebo nemusí být spojeny s transportními činidly jak jsou zde definovány. Výhodně jsou peptidy podle vynálezu podávány v "nahé" formě, t.j. bez přidávaných transportních činidel. Přidávanými transportními činidly jsou činidla, s kterými jsou peptidy podle vynálezu úmyslně uváděny do kontaktu nebo ve spojení buď před podáním, během podávání nebo bezprostředně po podání a která mohou sloužit pro zlepšení absorpce nebo/a pro zlepšení stability peptidu.

Podle jednoho výhodného provedení je tedy popisován purifikovaný fyziologicky aktivní peptid bez přidávaných transportních činidel, o délce od 4 do 15 aminokyselinových zbytků, obsahující dva cysteinové aminokyselinové zbytky, kteréžto zbytky spolu navzájem bezprostředně sousedí nebo jsou odděleny ne více než jedním aminokyselinovým zbytkem, kterýžto peptid je absorbovatelný epiteliální buněčnou výstelkou savce přičemž následkem této absorpce je modulovaná imunitní odpověď a tím terapeutický účinek proti onemocnění.

Uvedený peptid může být ve formě monomeru nebo dimeru ze stejných nebo různých peptidů.

Vhodné peptidy podle vynálezu budou nyní popsány s odkazem na následující obecné vzorce:

Obecný vzorec I:



kde

každý ze symbolů A je nezávisle vybrán ze souboru zahrnujícího atom vodíku, chránící skupiny, například ethylovou, tritylovou (Trt), allylovou a terc.butylovou skupinu, nebo alespoň jeden aminokyselinový zbytek, jež jsou nezávisle na sobě vybrány ze souboru zahrnujícího aminokyselinové zbytky s alifatickými postranními řetězci, alifatickými hydroxylovanými postranními řetězci, bázičnými postranními řetězci, kyselými postranními řetězci, sekundárními aminoskupinami, amidickými postranními řetězci, aromatickými postranními řetězci a postranními řetězci obsahujícími síru,

n je celé číslo vybrané ze souboru zahrnujícího čísla od 1 do 11,

X je vybrán ze souboru zahrnujícího skupinu NH a aminokyselinové zbytky se sekundárními aminoskupinami, amidickými postranními řetězci a alifatickými postranními řetězci, přičemž výhodně je X vybrán ze souboru zahrnujícího Gly, Pro, Gln, Ile, Val, Asp, Leu, Glu, Ala a skupinu NH,

Y je vybrán ze souboru zahrnujícího skupinu NH a aminokyselinové zbytky se sekundárními aminoskupinami, alifatickými postranními řetězci, kyselými postranními řetězci, alifatickými hydroxylovanými postranními řetězci, aromatickými postranními řetězci a amidickými

postranními řetězci, přičemž výhodně je Y vybrán ze souboru zahrnujícího Pro, Gly, Leu, Glu, Val, Ile, Ser, Phe, Tyr, Thr, Asp, Gln a skupinu NH,

každý ze symbolů B je nezávisle vybrán ze souboru zahrnujícího atom vodíku, hydroxylovou skupinu, aminoskupinu, chránící skupiny, jako je ethylová, tritylová (Trt), allylová nebo terc.butylová skupina, nebo alespoň jeden aminokyselinový zbytek vybraný ze souboru zahrnujícího aminokyselinové zbytky s alifatickými postranními řetězci, alifatickými hydroxylovanými postranními řetězci, bázičnými postranními řetězci, kyselými postranními řetězci, sekundárními aminoskupinami, amidickými postranními řetězci, aromatickými postranními řetězci a postranními řetězci obsahujícími síru, a

m je celé číslo vybrané ze souboru zahrnujícího čísla od 1 do 11,

s tím, že pokud A neznámá alespoň jeden aminokyselinový zbytek, má n hodnotu 1 a pokud B neznámá alespoň jeden aminokyselinový zbytek, má m hodnotu 1, a celá peptidová sekvence obsahuje ne více než 15 aminokyselinových zbytků.

Pokud A nebo/a B představuje aminokyselinový zbytek nebo sekvenci aminokyselinových zbytků, může tento aminokyselinový zbytek nebo sekvence aminokyselinových zbytků zahrnovat přirozeně se vyskytující aminokyselinové zbytky, jako jsou zbytky popsané zde výše, nebo jejich analogy, nebo může zahrnovat přirozeně se nevyskytující aminokyselinové zbytky, jako jsou syntetické aminokyselinové zbytky a jejich analogy, nebo aminokyselinové zbytky nebo sekvence aminokyselinových zbytků obsahující jak přirozeně se vyskytující aminokyselinové zbytky nebo/a jejich analogy tak přirozeně se nevyskytující aminokyselinové zbytky nebo/a jejich analogy.

Odborníkovi je rovněž zřejmé, že do rozsahu obecného vzorce I spadají i peptidy, ve kterých jsou přítomny

intramolekulární disulfidické můstky mezi dvěma uvedenými cysteinovými aminokyselinovými zbytky. Takové peptidy představují oxidovanou formu peptidů obecného vzorce I. Odborník si je také vědom toho, že peptidy obecného vzorce I mohou být ve formě homodimerů nebo heterodimerů, které mohou být v paralelní nebo antiparalelní formě. Takové homodimery nebo heterodimery jsou tvořeny z monomerů obecného vzorce I a mohou být spojeny pomocí vazby síra-síra mezi cysteinovými zbytky.

Do rozsahu vynálezu spadají rovněž farmaceuticky přijatelné soli peptidů obecného vzorce I nebo jejich fyziologicky funkční deriváty, spolu s farmaceuticky přijatelným nosičem.

Výhodnými peptidy podle vynálezu spadajícími do rozsahu obecného vzorce I jsou peptidy, ve kterých:

X je Gly a Y je Gly;
X je Pro a Y je Pro;
X je Pro a Y je Val;
X je Ile a Y je Leu;
X je Pro a Y je Glu;
X je Glu a Y je Tyr;
X je Pro a Y je Phe;
X je Glu a Y je Phe;
X je Ala a Y je Val;
X je Val a Y je Ile;
X je Gln a Y je Ser;
X je Ile a Y je Thr;
X je Leu a Y je Asp;
X je Asp a Y je Ile;
X je Leu a Y je Gln;
X je Gly a Y je Asn;
X je Gly a Y je Pro; a
X je Ala a Y je Gly;

a symboly A a B mají výše definovaný význam.

Ještě výhodnější peptidy obecného vzorce I podle vynálezu jsou:

Gly-Pro-Cys-Cys-Pro-Gly;

Ala-Pro-Cys-Cys-Val-Pro;

Lys-Pro-Cys-Cys-Glu-Arg;

Pro-Asp-Cys-Cys-Ile-Pro;

Ac Ala Pro Cys Cys Val Pro;

Arg Cys Ser Gly Cys Cys Asn;

Pro-Gly-Cys-Cys-Gly-Pro;

Pro-Gly-Cys-Cys-Gly-Pro;



Gly-Pro-Cys-Cys-Pro-Gly;



Trp-Pro-Cys-Cys-Pro-Trp;



Val-Ile-Cys-Cys-Leu-Thr;



Thr-Pro-Cys-Cys-Phe-Ala;



Glu-Glu-Cys-Cys-Phe-Tyr;



Lys-Leu-Cys-Cys-Asp-Ile;

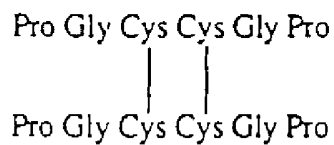
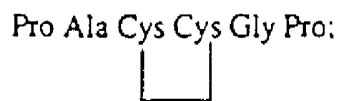


Lys-Glu-Cys-Cys-Tyr-Val;

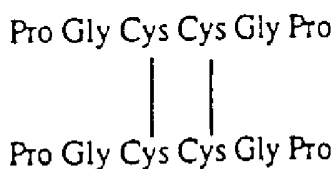
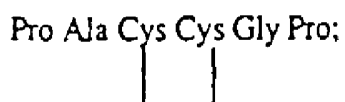
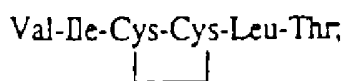
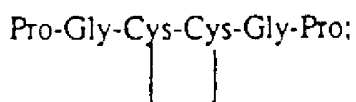
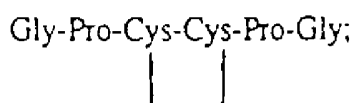
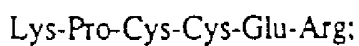
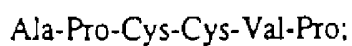
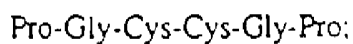
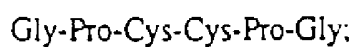


Ala Pro Cys Cys Glu Ser;



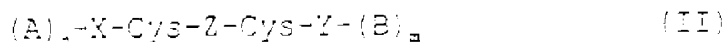


Ještě výhodnějšími peptidy obecného vzorce I podle vynálezu jsou:



Rozumí se, že aminokyselinové zbytky umístěné na N- a C-koncích výše uvedených peptidů neobsahují modifikace.

Obecný vzorec II:



kde

každý ze symbolů A je nezávisle vybrán ze souboru zahrnujícího atom vodíku, ochránící skupiny, jako je ethylová, tritylová (Trt), allylová nebo terc.butylová skupina, nebo alespoň jeden aminokyselinový zbytek vybraný ze souboru zahrnujícího aminokyseliny buď v L- nebo D-formě s alifatickými postranními řetězci, alifatickými hydroxylovanými postranními řetězci, bázičnými postranními řetězci, kyselými postranními řetězci, sekundárními aminoskupinami, amidickými postranními řetězci a postranními řetězci obsahujícími síru,

n je celé číslo vybrané ze souboru zahrnujícího čísla od 1 do 10,

X je vybrán ze souboru zahrnujícího skupinu NH a aminokyselinové zbytky s alifatickými postranními řetězci, sekundárními aminoskupinami, kyselými postranními řetězci, aromatickými postranními řetězci a amidickými postranními řetězci, přičemž výhodně je X vybrán ze souboru zahrnujícího Gly, Pro, Gln, Ile, Val, Asp, Leu, Glu, Ala, Lys a skupinu NH,

Z je vybrán ze souboru zahrnujícího aminokyselinové zbytky s alifatickými postranními řetězci, alifatickými hydroxylovanými postranními řetězci a bázičnými postranními řetězci, přičemž výhodně je Z vybrán ze souboru zahrnujícího Ile, Gly, Thr, Ala a Lys,

Y je vybrán ze souboru zahrnujícího aminokyselinové zbytky s amidickými postranními řetězci, bázičnými postranními řetězci, alifatickými postranními řetězci, kyselými postranními řetězci a sekundárními

aminoskupinami, přičemž výhodně je Y vybrán ze souboru zahrnujícího Pro, Gly, Glu, Val, Gln a Arg,

každý ze symbolů B je nezávisle vybrán ze souboru zahrnujícího atom vodíku, hydroxylovou skupinu, aminoskupinu, chránící skupiny, jako je ethylová, tritylová (Trt), allylová nebo terc.butylová skupina, nebo alespoň jeden aminokyselinový zbytek vybraný ze souboru zahrnujícího aminokyselinové zbytky s alifatickými postranními řetězci, alifatickými hydroxylovanými postranními řetězci, bázičnými postranními řetězci, kyselými postranními řetězci, sekundárními aminoskupinami, amidickými postranními řetězci, aromatickými postranními řetězci a postranními řetězci obsahujícími síru, a

m je celé číslo vybrané ze souboru zahrnujícího čísla od 1 do 10,

s tím, že pokud A neznámá alespoň jeden aminokyselinový zbytek, má n hodnotu 1 a pokud B neznámá alespoň jeden aminokyselinový zbytek, má m hodnotu 1, a celá peptidová sekvence obsahuje ne více než 15 aminokyselinových zbytků.

Stejně jako v případě obecného vzorce I je odborníkovi zřejmé, že pokud A nebo/a B představuje aminokyselinový zbytek nebo sekvenci aminokyselinových zbytků, může tento aminokyselinový zbytek nebo sekvence aminokyselinových zbytků zahrnovat přirozeně se vyskytující aminokyselinové zbytky, jako jsou zbytky popsané zde výše, nebo jejich analogy, nebo může zahrnovat přirozeně se nevyskytující aminokyselinové zbytky, jako jsou syntetické aminokyselinové zbytky a jejich analogy, nebo aminokyselinové zbytky nebo sekvence aminokyselinových zbytků obsahující jak přirozeně se vyskytující aminokyselinové zbytky nebo/a jejich analogy tak přirozeně se nevyskytující aminokyselinové zbytky nebo/a jejich analogy.

Odborníkovi je rovněž zřejmé, že do rozsahu obecného vzorce II spadají i peptidy, ve kterých jsou přítomny

intramolekulární disulfidické můstky mezi dvěma uvedenými bezprostředně sousedícími nebo oddělenými cysteinovými aminokyselinovými zbytky. Takové peptidy představují oxidovanou formu peptidů obecného vzorce II.

Odborník si je také vědom toho, že dimery obecného vzorce II mohou být v paralelní nebo antiparalelní formě a patří mezi ně heterodimery, a mohou být spojeny pomocí vazby síra-síra mezi cysteinovými aminokyselinovými zbytky. Do rozsahu vynálezu spadají rovněž farmaceuticky přijatelné soli peptidů obecného vzorce II nebo jejich fyziologicky funkční deriváty, spolu s farmaceuticky přijatelným nosičem.

Mezi výhodné peptidy obecného vzorce II podle vynálezu patří následující peptidy:

Val Cys Ile Cys Gln;

Val Cys Gly Cys Arg;

Asp Cys Ile Cys Gln;

Ile Cys Thr Cys Glu;

Phe Cys Ile Cys Lys;

Ala Cys Lys Cys Gln;

Lys Cys Arg Cys Lys;



Ile Cys Thr Cys Glu;



Leu Cys Ala Cys Val;



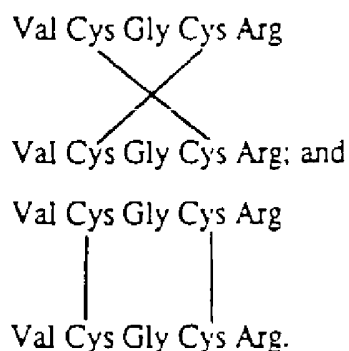
Asp Cys Ile Cys Gln;



Gly Pro Cys Ile Cys Pro Gly

Gly Pro Cys Ile Cys Pro Gly;

Two vertical lines extend upwards from the second and fourth positions of the sequence above, representing two disulfide bridges between the two cysteine residues.



Peptidy podle vynálezu lze podávat s transportními činidly nebo bez nich. Výhodně se peptidy podle vynálezu podávají orálně, intratracheálně, nasálně nebo systémově, bez přidávaných transportních činidel. Ještě výhodněji se peptidy podle vynálezu podávají intratracheálně, nasálně nebo orálně. Nejvýhodněji se peptidy podle vynálezu podávají orálně. Mezi "transportní činidla" patří přídavné prostředky pro transport (dodávání), jako jsou vesikulární transportní systémy, mikročástice, liposomy a podobné systémy, které jsou vytvořeny pro transport léčiv (například peptidů) na epiteliální buněčnou výstelku nebo endoteliální buněčnou výstelku. Mezi "transportní činidla" rovněž patří chemikálie nebo další peptidové sekvence, které se mohou spojovat, jsou fúzovány nebo tvoří komplexy s peptidy a které pomáhají zachovávat fyziologickou integritu peptidové sekvence podle vynálezu, například poskytující peptidy v jejich prepro- nebo proformě nebo připojující peptidy na nosné proteiny, například glukosyltransferasu, nebo poskytující peptidy v komplexu s chemickými činidly, jako jsou cyklodextriny a podobně. Výhodně se peptidy podle vynálezu podávají příjemci jako volné peptidy spolu s obvyklými nosnými a pomocnými látkami a ředidly běžně používanými ve farmaceutických formulacích. Peptidy podle vynálezu lze tedy podávat orálně nebo systémově v jednoduchých formulacích pro orální nebo systémové podání obsahujících pomocné látky, ředidla a nosné

látky běžně používané v orálních a systémových dávkovacích formách. Výhodně se peptidy podávají v orální dávkovací formě bez přidávaných transportních činidel.

V epiteliálních buněčných výstelkách gastrointestinálního traktu, t.j. jícnu, žaludku, dvanáctníku, kyčelníku a tlustého střeva, výstelkách průdušinek v plicích a výstelkách nasálních cest se nachází rovněž s mukózou související lymfoidní tkáň (MALT, mucosal associated lymphoid tissue). Aniž by měl být vynález vázán na tuto teorii, má se za to, že peptidy podle vynálezu vstupují do interakcí s MALT a tím dávají do pohybu sled imunomodulačních událostí, kteý má za následek terapeutický účinek proti určitému onemocnění.

Imunomodulační odpověď může být ve skutečnosti imunoinhibiční nebo imunostimulační. Bylo zjištěno, že tato imunomodulační odpověď je indikátorem terapie proti rakovině. Peptidy podle vynálezu s imunomodulačním účinkem jsou indikovány jako výhodné při léčení rakovin mesenchymálního původu, jako jsou sarkomy, například fibrosarkom, myxosarkom, liposarkom, chondrosarkom, osteogenní sarkom nebo chordosarkom, angiosarkom, endotheliosarkom, lymfangiosarkom, synoviosarkom nebo mesotheliosarkom; leukemií a lymfomů jako je granulocytární leukemie, monocytická leukemie, lymfocytická leukemie, maligní lymfom, plasmocytom, retikulosarkom nebo Hodgkinsova nemoc; sarkomů jako je leiomyosarkom nebo rhabdosarkom, tumorů epiteliálního původu (karcinomů), jako je karcinom dlaždicových buněk, bazocelulární karcinom, karcinom potních žláz, karcinom mazových žláz, adenokarcinom, papilární karcinom, papilární adenokarcinom, cystadenokarcinom, medulární karcinom, nediferencovaný karcinom, bronchogenní karcinom, melanom, karcinom ledvinových buněk, hepatom - karcinom jaterních buněk, karcinom žlučovéhoodu, cholangiokarcinom, papilární karcinom, karcinom přechodných buněk (transitional cell carcinoma), choriokarcinom, semenom nebo embryonální karcinom; a tumorů centrálního nervového

systemu jako je gliom, meningom, medulloblastom, schwannom nebo ependymom. Peptidy podle vynálezu jsou na základě jejich aktivity indikovány pro léčení zhoubných bujení, jako je melanom, karcinom prsu, gastrointestinální karcinomy, jako je karcinom tlustého střeva, gliom, karcinom močového měchýře a karcinom dlaždicových buněk v oblasti krku a hlavy. Dále jsou peptidy vyvolávající ve zde popsaných testech imunomodulační účinek indikovány pro terapii při léčení akutních nebo/a chronických infekcí souvisejících s autoimunitními chorobami a autoimunitních chorob jako takových, jako je nebezpečný diabetes, systémový lupus erythematosus, sklerodermie, Sjögrenův syndrom, dermatomyositida nebo roztroušená sklerosa, revmatická artritida, artheriosklerosa, a psoriáza, astma, rinitida, fibrosa, chronická bronchitida, hepatitida, pohlavní anergie, získané imunodeficientní choroby jako je AIDS, a posttraumatická imunologická anergie.

Kromě toho lze peptidy podle vynálezu, které vykazují imunomodulační působení, výhodně použít jako pomocné látky v různých formách vakcinových preparátů a ve formulacích vytvářených pro inhibici odmítnutí orgánů při transplantacích.

Podle dalšího provedení vynálezu se popisuje způsob vyvolání modulované imunitní odpovědi savce, při kterém se na epiteliální buněčnou výstelku savce podá dávka purifikovaného fyziologicky aktivního imunomodulačního peptidu obsahujícího alespoň dva cysteinové aminokyselinové zbytky, kteréžto dva zbytky spolu navzájem bezprostředně sousedí nebo jsou odděleny ne více než jedním aminokyselinovým zbytkem dostatečným pro vyvolání uvedené modulované imunitní odpovědi a tím terapeutického účinku.

Podle dalšího provedení vynálezu se popisuje způsob vyvolání modulované imunitní odpovědi savce, při kterém se

1) identifikuje savec, u kterého je potřeba modulovat jeho

imunitní odpověď, a

2) na alespoň jednu epiteliální buněčnou výstelku tohoto savce se podá dávka fyziologicky aktivního purifikovaného peptidu bez přidávaných transportních činidel, o délce od 4 do 15 aminokyselinových zbytků, obsahujícího dva cysteinové aminokyselinové zbytky, kteréžto zbytky spolu navzájem bezprostředně sousedí nebo jsou odděleny ne více než jedním aminokyselinovým zbytkem, dostatečná pro vyvolání uvedené imunomodulační odpovědi a tím terapeutického účinku. Výhodně je epiteliální buněčnou výstelkou, na kterou se peptid podává, epiteliální buněčná výstelka gastrointestinálního traktu. Ještě výhodněji se peptid podává na MALT.

Podle výhodného provedení se popisuje způsob vyvolání modulované imunitní odpovědi savce, při kterém se podá na MALT savce dávka fyziologicky aktivního peptidu obecného vzorce I, kterýžto peptid neobsahuje přidávaná transportní činidla, dostatečná pro vyvolání uvedené modulované imunitní odpovědi a tím terapeutického účinku. Uvedený peptid může být ve formě monomeru nebo dimeru.

Podle výhodného provedení se popisuje způsob vyvolání modulované imunitní odpovědi savce, při kterém se podá na MALT savce dávka fyziologicky aktivního peptidu obecného vzorce II, kterýžto peptid neobsahuje přidávaná transportní činidla, dostatečná pro vyvolání uvedené imunomodulační odpovědi a tím terapeutického účinku. Uvedený peptid může být ve formě monomeru nebo dimeru.

Podle dalšího provedení vynálezu se popisuje použití fyziologicky aktivního peptidu o délce od 4 do 15 aminokyselinových zbytků obsahujícího dva cysteinové zbytky, které spolu navzájem bezprostředně sousedí nebo jsou odděleny ne více než jedním aminokyselinovým zbytkem, kterýžto peptid je bez přidávaných transportních činidel, k přípravě léčiva vhodného pro léčení onemocnění. Konkrétní formy rakoviny,

které lze léčit pomocí peptidů podle vynálezu, jsou uvedeny výše. Podle výhodného provedení se popisuje použití fyziologicky aktivního peptidu obecného vzorce I bez přidávaných transportních činidel k přípravě léčiva vhodného pro léčení onemocnění, zejména rakoviny a revmatické artritidy. Jako další provedení vynálezu je rovněž zahrnuto použití fyziologicky aktivního peptidu obecného vzorce II bez přidávaných transportních činidel k přípravě léčiva vhodného pro léčení onemocnění, zejména rakoviny a revmatické artritidy.

Podle dalšího provedení vynálezu se popisuje způsob přípravy peptidu podle vynálezu chemickým procesem, při kterém se jednotlivé aminokyselinové zbytky nebo fragmenty peptidů podle vynálezu spojí za vzniku peptidických vazeb a při kterém se na počátku nebo/a konci tohoto procesu použijí ochranní skupiny.

Jako další alternativní provedení vynálezu se popisuje fyziologicky aktivní peptid bez přidávaných transportních činidel o délce od 4 do 15 aminokyselinových zbytků, obsahující dva cysteinové zbytky, kteréžto uvedené aminokyselinové zbytky jsou oděleny ne více než jedním aminokyselinovým zbytkem, pro použití k léčení, například k léčení rakoviny nebo revmatické artritidy. Podle výhodného provedení se popisuje peptid obecného vzorce I nebo obecného vzorce II pro použití k léčení, například k léčení rakoviny nebo léčení revmatické artritidy.

Množství peptidů obecného vzorce I nebo obecného vzorce II, které je nutné při terapii rakoviny nebo revmatické artritidy, se samozřejmě liší a závisí hlavně na uvážení ošetřujícího lékaře nebo veterináře. Mezi faktory, které je třeba brát v úvahu, patří ošetřované onemocnění, způsob podání a povaha formulace, tělesná hmotnost savce, povrch, věk a celková kondice a to, jaký konkrétní peptid se podává. Vhodné účinné dávky peptidů podle vynálezu se obecně pohybují

v rozmezí od zhruba 0,0001 $\mu\text{mol/kg}$ do zhruba 1000 $\mu\text{mol/kg}$ tělesné hmotnosti, výhodně od zhruba 0,003 $\mu\text{mol/kg}$ do zhruba 300 $\mu\text{mol/kg}$ tělesné hmotnosti, například v rozmezí od zhruba 0,001 $\mu\text{mol/kg}$ do 100 $\mu\text{mol/kg}$ tělesné hmotnosti, například 0,0,3 až 3,0 $\mu\text{mol/kg}$ tělesné hmotnosti. Celkovou dávku lze podávat jako jedinou dávku nebo jako více dílčích dávek, například dvakrát až šestkrát denně. Například v případě savce o hmotnosti 75 kg (například člověka) bude dávka v rozmezí zhruba 2,25 $\mu\text{mol/kg/den}$ až 225 $\mu\text{mol/kg/den}$ a typická dávka může být zhruba 100 μmol peptidu. Pokud se podávají dělené dílčí dávky, může se typicky podávat 25 μmol peptidu podle vynálezu až čtyřikrát denně. Při alternativním režimu podávání lze peptidy podle vynálezu podávat každý druhý den nebo dokonce jednou nebo dvakrát za týden. Odborníkovi je zřejmé, že výběr vhodného režimu podávání závisí na posouzení lékaře nebo veterináře.

Ačkoli je možné podávat aktivní peptid samotný, může být výhodné podávat aktivní peptid ve farmaceutické formulaci. Formulace podle vynálezu, pro medicínské použití, obsahují peptid obecného vzorce I nebo obecného vzorce II nebo jeho sůl spolu s jedním nebo několika farmaceuticky přijatelnými nosiči a popřípadě dalšími terapeutickými složkami. Nosič nebo nosiče by měly být farmaceuticky přijatelné v tom smyslu, že jsou kompatibilní s dalšími složkami formulace a v podstatě neškodlivé pro příjemce. Odborníkovi je zřejmé, že do rozsahu vynálezu spadají volné adiční soli zde uváděných peptidů s kyselinami (například soli s halogenovodíkovými kyselinami), jakož i soli s bázemi. Nejvýhodnější jsou tyto soli farmaceuticky přijatelné.

Mezi vhodné adiční soli s kyselinami patří soli vytvářené s kyselinou chlorovodíkovou, bromovodíkovou, dusičnou, chloristou, sírovou, citronovou, vinnou, fosforečnou, mléčnou, benzoovou, glutamovou, šťavelovou, asparagovou, pyrohroznovou, octovou, jantarovou, fumarovou,

maleinovou, oxaloctovou, isethionovou, stearovou, ftalovou, methansulfonovou, p-toluensulfonovou, benzensulfonovou, laktobionovou a glukuronovou. Mezi vhodné soli s bázemi patří soli s anorganickými bázemi, jako jsou soli s alkalickými kovy (například sodíkem a draslíkem) a soli s kovy alkalických zemin (například vápníkem); soli s organickými bázemi, například soli s fenylethylbenzylaminem, dibenzylethylendiaminem, ethanolaminem a diethanolaminem; a soli s aminokyselinami, například lysinem a argininem. Nejvýhodnější jsou tyto soli farmaceuticky přijatelné.

Vynález tudíž dále zahrnuje farmaceutickou formulaci obsahující peptid obecného vzorce I nebo obecného vzorce II spolu s farmaceuticky přijatelným nosičem.

Odborník si je přirozeně vědom toho, že jakákoli farmaceutická formulace obsahující peptid obecného vzorce I může obsahovat více než jeden peptid obecného vzorce I. Farmaceutická formulace tedy může obsahovat alespoň dva peptidy obecného vzorce I nebo II nebo směs peptidů obecného vzorce I nebo II. Alternativně může farmaceutická formulace obsahovat alespoň dva peptidy, z nichž alespoň jeden je vybrán z peptidů obecného vzorce I a alespoň jeden je vybrán z peptidů obecného vzorce II a může obsahovat směs peptidů vybraných z peptidů obecných vzorců I a II.

Popisuje se rovněž způsob přípravy farmaceutické formulace, při kterém se smíchá peptid podle vynálezu, například alespoň jeden peptid obecného vzorce I nebo/a alespoň jeden peptid obecného vzorce II nebo jeho fyziologicky funkční derivát a farmaceuticky přijatelný nosič.

Peptidy podle vynálezu a jejich fyziologicky funkční deriváty lze podávat libovolným způsobem vhodným pro ošetřované onemocnění, přičemž mezi vhodné způsoby patří orální, intratracheální, rektální, nasální, místní (včetně

bukálního a podjazykového podání), vaginální a parenterální podání (včetně subkutánního, intramuskulárního, intravenosního, intradermálního, intrathekálního, intraperitoneálního a epidurálního podání). Je třeba vzít v úvahu, že způsob podání se může měnit například v závislosti na stavu příjemce. Výhodnými formulacemi jsou formulace vhodné pro orální, nasální nebo intratracheální podání. Nejvýhodnějšími formulacemi jsou formulace vhodné pro orální podání.

Mezi formulace pro místní podání do úst patří pastilky obsahující peptid nebo peptidy v ochuceném základu, obvykle sacharose a arabské gumě a tragantu; pastilky obsahující účinnou látku v inertním základu jako je želatina a glycerin, nebo sacharosa a arabská guma; a kloktadla obsahující peptid nebo peptidy ve vhodném kapalném nosiči.

Formulace podle vynálezu vhodné pro orální podání mohou být podávány jako samostatné jednotky, jako jsou kapsle, tobolky, tablety, pastilky obsahující peptid nebo peptidy v ochuceném základu, obvykle sacharose a arabské gumě a tragantu; pastilky obsahující účinnou látku nebo látky v inertním základu jako je želatina a glycerin, nebo sacharosa a arabská guma; a kloktadla obsahující účinnou látku nebo látky ve vhodném kapalném nosiči. Každá formulace obecně obsahuje předem stanovené množství účinného peptidu nebo peptidů, ve formě prášku nebo granulí, nebo roztoku nebo suspenze ve vodné nebo jiné než vodné kapalině, jako je sirup, elixír, emulze nebo tekutý lék a podobně.

Tabletu lze vyrobit lisováním nebo tvářením, popřípadě s jednou nebo několika dodatečnými složkami. Lisované tablety lze připravit tak, že se ve vhodném stroji slisuje účinný peptid nebo peptidy ve volně tekoucí formě, jako ve formě prášku nebo granulí, popřípadě ve směsi s pojídkem (například povidonem, želatinou, hydroxypropylmethylcelulosou), lubrikantem, inertním ředidlem, konzervační přísadou, desintegračním činidlem (například sodnou solí glykolátu škrobu,

zesítěným povidonem, zesítěnou natrium-karboxymethylcelulosem), povrchově aktivním činidlem nebo dispergačním činidlem. Tvářené tablety lze vyrobit tak, že se ve vhodném stroji tváří směs práškového peptidu nebo peptidů zvlhčená inertním kapalným ředidlem. Tablety mohou být popřípadě potaženy nebo na nich mohou být vytvořeny rýhy, a mohou být formulovány tak, aby docházelo k pomalému nebo kontrolovanému uvolňování účinné složky z těchto tablet, za použití například hydroxypropylmethylcelulosity v různých poměrech pro dosažení požadovaného profilu uvolňování.

Sirup lze vyrobit přidáním účinného peptidu nebo peptidů do koncentrovaného vodného roztoku cukru, například sacharosu, do kterého se mohou rovněž přidat libovolné nutné složky. Mezi takovéto přídavné složky mohou patřit přísady upravující chuť, činidlo pro zpomalení krystalizace cukru nebo činidlo pro zvýšení rozpustnosti libovolných dalších složek, jako je vicemocný alkohol, například glycerol nebo sorbitol.

Kromě výše uvedených složek mohou formulace podle vynálezu dále obsahovat jednu nebo několik přídavných složek vybraných ze skupiny zahrnující ředidla, puřry, činidla upravující chuť, pojídla, povrchově aktivní činidla, zahušťovadla, lubrikanty, konzervační přísady (včetně anti-oxidantů) a podobně.

Mezi emulgátory a stabilizátory emulze vhodné pro použití ve formulaci podle vynálezu patří Tween 60, Span 80, cetostearylalkohol, myristylalkohol, glyceryl-monostearát a natrium-laurylsulfát.

Výběr vhodných olejů nebo tuků pro formulaci je založen na dosažení požadovaných terapeutických vlastností, jelikož rozpustnost účinné sloučeniny ve většině olejů, jejichž použití je pravděpodobné ve farmaceutické emulzní formulaci, je nízká. Krém by tedy měl výhodně být nemastný, nebarvící a

omyvatelný produkt vhodné konzistence pro vyhnutí se unikání z tub nebo jiných nádob. Lze použít jedno- nebo dvousytné alkylestery s přímým nebo rozvětveným řetězcem, jako je di-isoadipát, isocetylsteárat, propylenglykoldiester mastných kyselin kokosu, isopropylmyristát, decyloleát, isopropylpalmitát, butylsteárat, 2-ethylhexylpalmitát, nebo směs rozvětvených esterů známá jako Crodamol CAP, přičemž tři poslední jsou výhodnými estery. Estery lze použít samotné nebo v kombinaci, v závislosti na požadovaných vlastnostech. Alternativně lze použít lipidy s vysokou teplotou tání, jako je bílý měkký parafin nebo/a kapalný parafin nebo jiné minerální oleje.

Formulace pro rektální podání mohou být v libovolně vhodné formě, například jako čípky s vhodným základem, obsahující peptid nebo peptidy podle vynálezu ve směsi s neutrálním mastným základem, například kakaovým máslem, nebo například ve směsi se salicylátem, nebo ve formě roztoků nebo suspenzí. Alternativně lze použít formulace ve formě želatinových rektálních kapslí obsahujících účinný peptid nebo peptidy podle vynálezu ve směsi s rostlinným olejem nebo oleji nebo parafinovým olejem.

Mezi formulace vhodné pro nasální podání, ve kterých je nosičem pevná látka, patří hrubý prášek s velikostí částic například v rozmezí 20 až 500 μm . Pokud se velikost částic týká samotné účinné látky ve formě částic, může být velikost částic v rozmezí od 2 do 500 μm . Formulaci ve formě hrubého prášku lze podat rychlým vdechnutím přes nasální cesty z nádoby s práškem přidržené blízko nosu. Mezi vhodné formulace ve kterých je nosičem kapalina, pro podání například jako nosní spray nebo nosní kapky, patří vodné nebo olejové roztoky účinné složky. Peptidy podle vynálezu tedy mohou být formulovány do tlakových dávkujících inhalátorů nebo inhalátorů suchých prášků pro orální nebo nasální inhalaci nebo do kapalných formulací pro rozprašování. Účinný peptid

(nebo peptidy) se mikronizuje nebo jinak zpracuje na velikost částic vhodnou pro inhalační terapii (střední průměr menší nebo 10 μm).

V případě tlakových dávkujících inhalátorů může být mikronizovaný peptid (nebo peptidy) suspendován ve zkapalněném hnacím plynu nebo ve směsi zkapalněných hnacích plynů. Takové hnací plyny mohou rovněž, avšak nikoli nutně, působit jako rozpouštědla. V každém případě může být mikronizovaný peptid (nebo peptidy) naplněn do nádoby vybavené například dávkovacím ventilem.

Mezi vhodné hnací plyny patří ty, které se v oboru běžně používají, jako jsou hydrofluoralkany (HFA). Hydrofluoralkanové hnací plyny mohou být přítomné v libovolné směsi, která je vhodná pro dodání peptidu nebo peptidů podle vynálezu na MALT. Mezi příklady vhodných HFA pro použití ve vynálezu patří tetrafluorethan (například propellant 134a (Hoechst)) a heptafluorpropan (například propellant 227 (Hoechst)). Odborník si je přirozeně vědom toho, že v takových formulacích mohou být rovněž přítomné vhodné koncentrace povrchově aktivních látek, například sorbitan-trioleátu, lecithinu, kyseliny olejové a podobně, přičemž povrchově aktivní látky se používají pro zvýšení fyzikální stability peptidového preparátu. Formulace může rovněž obsahovat rozpouštědla, jako je ethanol, pro zlepšení rozpustnosti peptidu nebo peptidů ve vybraném hnacím plynu.

Účinné peptidy podle vynálezu lze podávat pomocí inhalačních zařízení vhodných pro inhalaci suchého prášku, jako jsou přenosná inhalační zařízení a podobně. V takových suchých prášcích může být účinný peptid (nebo peptidy) podle vynálezu použit buď samotný nebo v kombinaci s nosičem, jako je laktosa, mannitol nebo glukosa. Výběr nosiče není rozhodující, pokud jím není podstatně sníženo fyziologické působení peptidu nebo peptidů podle vynálezu. Do práškových formulací mohou být zapracována rovněž další aditiva, která

jsou potřebná například pro udržování stability atd. Tato aditiva by opět měla být taková, aby podstatně nenarušovala fyziologický a tím terapeutický účinek peptidu nebo peptidů podle vynálezu. Inhalační zařízení může být libovolného typu známého v oboru, jako je inhalátor jediné dávky s předem stanovenou dávkou nebo vícedávkový inhalátor, ve kterém se dávka měří měřicí jednotkou v inhalátoru nebo se podává ze zásobníku předem stanovených dávek.

Mezi formulace vhodné pro parenterální podání účelně patří sterilní vodné přípravky účinné sloučeniny, které jsou výhodně isotonické s krví příjemce. Takové formulace jsou účelně tvořeny roztokem farmaceuticky a farmakologicky přijatelné adiční soli peptidu nebo peptidů podle vynálezu s kyselinou, který je isotonický s krví příjemce.

Mezi vhodné formulace rovněž patří koncentrované roztoky nebo pevné látky obsahující peptid nebo peptidy podle vynálezu, které po naředění vhodným rozpouštědlem poskytnou roztok pro parenterální podání, jak je popsáno výše.

Vynález ilustrují následující příklady, jimiž se však rozsah vynálezu v žádném směru nemezuje.

Příklady provedení vynálezu

1. Syntéza peptidů

Rozumí se, že pokud na N- a C-koncích zde popsaných peptidů podle vynálezu není znázorněna žádná skupina, je N-koncem aminoskupina (NH_2) a C-koncem karboxylová skupina ($-\text{COOH}$).

System číslování peptidů v následujících příkladech je systém používaný v tabulce 1, která znázorňuje výsledky získané v příkladu 43.

Příklad 1

Syntéza Pro-Gly-Cys-Cys-Gly-Pro

Pro syntézu byl použit Fmoc-prolin (Fmoc = 9-fluorenyl-methoxykarbonylová skupina) navázaný na pryskyřici (1,11 g, 0,18 mmol/g, 0,20 mmol) tvořenou zesítěným polystyrenovým hlavním řetězcem s naroubovanými polyethylenglykolovými řetězci, funkcionalizovanou linkerem p-karboxytrifenylmethanolem (Sheppard, R. C., Williams, B. J. Acid-labile Resin Linkage Agents for Use in Solid Phase Peptide Synthesis. Int. J. Peptide Protein Res. 1982, 20, 451 - 454) od firmy Rapp Polymer. Použité pentafluorfenylestery L-aminokyselin chráněné na α atomu dusíku skupinou Fmoc byly zakoupeny od firem Bachem a Millipore, a Cys byl chráněn trifenylmethylovou skupinou (Trt). N,N-dimethylformamid (DMF) a 20% piperidin v N,N-dimethylformamidu v kvalitě vhodné pro reakce peptidů byl zakoupen od firmy Millipore. Kondenzační činidlo 1-hydroxybenzotriazol (HOBT) bylo od firmy Fluka. Syntéza byla prováděna na syntetizéru Millipore 9050 Plus PepSynthesizer.

C-koncová aminokyselina, Tentagel S trt-Pro-Fmoc (1,11 g, 0,18 mmol/g, 0,20 mmol) na pryskyřici (od firmy Rapp Polymer) se nechala bobtnat v N,N-dimethylformamidu po dobu 30 minut před přidáním suspenze na kolonu syntetizéru. Syntetizér pracoval s po sobě jdoucími cykly odblokování, promytí a kondenzace, které tvořilo 8 minut recyklace s 20% piperidinem v N,N-dimethylformamidu pro každé odblokování Fmoc, kterou po promytí následovala aktivace 0,8 mmol pentafluorfenylesteru L-aminokyseliny chráněné na α atomu dusíku skupinou Fmoc s 0,9 mmol 1-hydroxybenzotriazolu. Aktivované aminokyseliny byly přidány na kolonu a recyklovány vždy 30 minut. Syntetizér ukončil syntézu odblokováním N-koncové skupiny Fmoc a závěrečným promytím N,N-dimethylformamidem. Výsledný peptid na pryskyřici byl přenesen na filtrační nálevku ze slinutého skla a tam byl promyt dvakrát

vždy 10 ml methanolu a třikrát vždy 10 ml dichlormethanu. Pryskyřice se nechala schnout ve vakuu přes noc a poté byla z peptidu odštěpena ochránící skupina na postranním řetězci a byl odštěpen od pryskyřice za použití 20 ml směsi ethandithiolu a kyseliny trifluoroctové v poměru 5 : 95 při teplotě místnosti působící po dobu 3 hodin. Pryskyřice byla odfiltrována a promyta třikrát vždy 10 ml kyseliny octové. Smíchané kyselé frakce byly odpařeny a poté byl zbytek triturován třikrát s etherem.

Surový peptid byl rozpuštěn ve směsi vody a acetonitrilu v poměru 1 : 1 a usušen vymražením. Výsledný materiál byl purifikován pomocí vysoceúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) za použití systému Gilson 305 a 306 HPLC na koloně s obrácenými fázemi Kromasil 100-5C18 o rozměrech 25cm x 22 mm (vnitřní průměr) (eluční činidlo A = 0,1% kyselina trifluoroctová ve vodě - eluční činidlo B = 0,1% kyselina trifluoroctová v acetonitrilu: gradient 5 - 80 % za 25 minut, průtok 10 ml / min, detekce při 220 nm). Smíchané frakce získané HPLC byly usušeny vymražením, čímž bylo získáno 84 mg sloučeniny uvedené v názvu.

MH⁺ (m/z) = 533

Příklad 2

Syntéza Lys-Leu-Cys-Cys-Gln-Met

39,6 mg (54,7 μ mol) Lys-Leu-Cys-Cys-Gln-Met se připraví pomocí podobného postupu jako v příkladu 1. Lys-Leu-Cys-Cys-Gln-Met se rozpustí v 80 ml 5% vodné kyseliny octové a pH roztoku se upraví na hodnotu 6 uhličitanem amonným. Přidá se 60 ml dimethylsulfoxidu a směs se míchá při teplotě místnosti po dobu 24 hodin. Po ukončení reakce se reakční směs zahustí ve vakuu na objem zhruba 8 ml. Roztok se purifikuje pomocí semipreparativní HPLC na APEX Prep Sil ODS,

8 μ m o rozměrech 25 cm x 20 mm (vnitřní průměr), přičemž se promývání provádí lineárním gradientem za 50 minut 5 - 60 % acetonitrilu v 0,1% vodné kyselině trifluoroctové s rychlostí průtoku 10 ml / min a detekce se provádí UV-světlem při 220 nm, a poté se lyofilizuje, čímž se získá 19,7 mg (50 %) peptidu uvedeného v názvu ve formě bílého prášku.

Hmotová spektrometrie (HRMS (FAB+)):

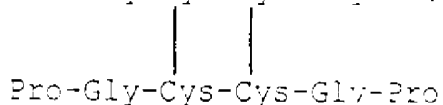
Přesná hmotnost vypočítaná pro $C_{22}H_{31}N_3O_5S_2$: 723,999;

nalezená: 723,302

Příklad 3

Syntéza paralelního mezimolekulárně oxidovaného dimeru

Pro-Gly-Cys-Cys-Gly-Pro (paralelní dimer)



Pro přípravu paralelního homodimeru se za použití stejného postupu jako v příkladu 1 syntetizuje jediný peptidový řetězec s acetamidomethylovou (Acm) chránicí skupinou na jednom z cysteinů a s druhým cysteinem nechráněným (Pro-Gly-Cys-Cys(Acm)-Gly-Pro). Monomer se dimerizuje pomocí oxidace volných cysteinů za použití stejného postupu jako v příkladu 2. Druhá disulfidická vazba se vytvoří za použití postupu který popsal Ruiz-Gayo (Ruiz-Gayo a kol., 1988, Tetrahedron Letters, 29, 3845 až 3848), při kterém se 100 mg (83 μ mol) monooxidovaného dimeru rozpustí v 16 ml methanolu. Přidá se čerstvě připravený 0,2M roztok I_2 v methanolu (8,2 ml, 1,64 mmol) a směs se míchá při teplotě místnosti po dobu 2 hodin. Přidá se 20 ml vody a poté se ke směsi pomalu přidává 0,5M vodná kyselina askorbová až zmizí zbarvení jodem. Směs se opatrně odpaří při teplotě místnosti na polovinu objemu. Surový produkt se lyofilizuje a poté se

purifikuje pomocí HPLC.

Příklad 4

Syntéza antiparalelního dimeru

Pro-Gly-Cys-Cys-Gly-Pro (antiparalelní dimer)

~~Pro-Gly-Cys-Cys-Gly-Pro~~

Pro přípravu antiparalelního homodimeru se použije obecný postup, který popsal Ruiz-Gayo (Ruiz-Gayo a kol., 1988, Tetrahedron Letters, 29, 3845 - 3848). Za použití stejného postupu jako v příkladu 1 se syntetizují dva samostatné peptidové řetězce s acetamidomethylovou (Acm) chránicí skupinou na jednom z cysteinů a s druhým cysteinem nechráněným (Pro-Gly-Cys-Cys(Acm)-Gly-Pro a Pro-Gly-Cys(Acm)-Cys-Gly-Pro). Nechráněný cystein na jednom z monomerů se aktivuje dithiopyridinem tak, že se rozpustí 62 μ mol jednoho z monomerů ve 20 ml směsi isopropanolu a 3M kyseliny octové v poměru 50 : 50 a přidá se 205 μ mol 2,2'-dithiopyridinu rozpuštěného v 15 ml směsi isopropanolu a 2M kyseliny octové v poměru 50 : 50. Směs se míchá při teplotě místnosti přes noc. Směs se odpaří, poté se přidá 25 ml acetonitrilu a směs se znovu odpaří. Surový zbytek se trituruje čtyřikrát vždy 25 ml etheru a výsledný S-pyridylderivát Pro-Gly-Cys(S₂pyr)-Cys(Acm)-Gly-Pro se použije přímo bez jakékoli další purifikace. Tento aktivovaný derivát se podrobí reakci s 62 μ mol druhého peptidového řetězce tak, že se aktivovaný řetězec rozpustí v 50 ml 0,01M roztoku octanu amonného (pH = 6,5), přidá se druhý řetězec rozpuštěný v 17 ml 0,01M vodného octanu amonného a směs se míchá po dobu 30 minut. Reakční směs se lyofilizuje a surový produkt se purifikuje pomocí HPLC, čímž se získá monodisulfidový dimer. Druhá disulfidická vazba se vytvoří za použití stejného postupu

jako v příkladu 3 pomocí jodu v methanolu, čímž se, po purifikaci pomocí HPLC, získá konečný produkt.

Příklad 5

Syntéza Gly-Pro-Cys-Cys-Pro-Gly

Syntéza se provede podobným postupem jako v příkladu 1.

Příklad 6

Syntéza Ala-Pro-Cys-Cys-Val-Pro

Syntéza se provede podobným postupem jako v příkladu 1.

Příklad 7

Syntéza Phe-Cys-Ile-Cys-Lys

Syntéza se provede podobným postupem jako v příkladu 1.

Příklad 8

Syntéza Lys-Pro-Cys-Cys-Glu-Arg

Syntéza se provede podobným postupem jako v příkladu 1.

Příklad 9

Syntéza Arg-Cys-Ser-Gly-Cys-Cys-Asn

Syntéza se provede podobným postupem jako v příkladu 1.

Příklad 10

Syntéza intramolekulárně oxidovaného Gly-Pro-Cys-Cys-Pro-Gly



Syntéza se provede podobným postupem jako v příkladu 2.

Příklad 11

Syntéza intramolekulárně oxidovaného Val-Ile-Cys-Cys-Leu-Thr



Syntéza se provede podobným postupem jako v příkladu 2.

Příklad 12

Syntéza intramolekulárně oxidovaného Lys-Leu-Cys-Cys-Asp-Ile



Syntéza se provede podobným postupem jako v příkladu 2.

Příklad 13

Syntéza intramolekulárně oxidovaného Thr-Pro-Cys-Cys-Phe-Ala



Syntéza se provede podobným postupem jako v příkladu 2.

Příklad 14

Syntéza intramolekulárně oxidovaného Lys-Glu-Cys-Cys-Tyr-Val



Syntéza se provede podobným postupem jako v příkladu 2.

Příklad 15

Syntéza intramolekulárně oxidovaného Lys-Cys-Arg-Cys-Lys



Syntéza se provede podobným postupem jako v příkladu 2.

Příklad 16

Syntéza antiparalelního intermolekulárně oxidovaného dimeru

Val-Cys-Gly-Cys-Arg (antiparalelní dimer)

~~Val-Cys-Gly-Cys-Arg~~

Syntéza se provede podobným postupem jako v příkladu 4.

Příklad 17

Syntéza intramolekulárně oxidovaného Pro-Gly-Cys-Cys-Gly-Pro



Syntéza se provede podobným postupem jako v příkladu 2.

Příklad 18

Syntéza intramolekulárně oxidovaného Trp-Pro-Cys-Cys-Pro-Trp



Syntéza se provede podobným postupem jako v příkladu 2.

Příklad 19

Syntéza intramolekulárně oxidovaného

Leu-Leu-Phe-Gly-Pro-Cys-Cys-NH₂



Syntéza se provede podobným postupem jako v příkladu 2.

Příklad 20

Syntéza intramolekulárně oxidovaného Glu-Glu-Cys-Cys-Phe-Tyr



Syntéza se provede podobným postupem jako v příkladu 2.

Příklad 21

Syntéza Pro-Val-Cys-Cys-Ile-Gly

Syntéza se provede podobným postupem jako v příkladu 1.

Příklad 22

Syntéza intramolekulárně oxidovaného Pro-Val-Cys-Cys-Ile-Gly



Syntéza se provede podobným postupem jako v příkladu 2.

Příklad 23

Syntéza intramolekulárně oxidovaného Ser-Gln-Cys-Cys-Ser-Leu



Syntéza se provede podobným postupem jako v příkladu 2.

Příklad 24

Syntéza intramolekulárně oxidovaného Ser-Ile-Cys-Cys-Thr-Lys



Syntéza se provede podobným postupem jako v příkladu 2.

Příklad 25

Syntéza Pro-Asp-Cys-Cys-Ile-Pro

Syntéza se provede podobným postupem jako v příkladu 1.

Příklad 26

Syntéza Leu-Ala-Cys-Cys-Val-Val

Syntéza se provede podobným postupem jako v příkladu 1.

Příklad 27

Syntéza Pro-Gly-Cys-Cys-Pro-Gly

Syntéza se provede podobným postupem jako v příkladu 2.

Příklad 28

Syntéza Ac-Ala-Pro-Cys-Cys-Val-Pro

Syntéza se provede podobným postupem jako v příkladu 1 s následným methylačním stupněm na konci syntetického postupu na syntetizéru Millipore 9050 PlusPre Synthesizer, kdy se k pryskyřici přidá 0,3M N-acetylimidazol v N,N-dimethylformamidu a roztok se nechá cirkulovat syntetickou kolonou po dobu 2 hodin a poté se provede promytí N,N-dimethylformamidem.

Příklad 29

Syntéza Lys-Glu-Cys-Cys-Tyr-Val

Syntéza se provede podobným postupem jako v příkladu 1.

Příklad 30

Syntéza Lys-Leu-Cys-Cys-Gln-Met

Syntéza se provede podobným postupem jako v příkladu 1.

Příklad 31

Syntéza Ala-Pro-Cys-Cys-Glu-Ser

Syntéza se provede podobným postupem jako v příkladu 2.

Příklad 32

Syntéza Pro-Ala-Cys-Cys-Gly-Pro

Syntéza se provede podobným postupem jako v příkladu 2.

Příklad 33

Syntéza Val-Cys-Ile-Cys-Gln

Syntéza se provede podobným postupem jako v příkladu 1.

Příklad 34

Syntéza Gly-Pro-Cys-Ile-Cys-Pro-Gly

Gly-Pro-Cys-Ile-Cys-Pro-Gly

Syntéza se provede podobným postupem jako v příkladu 3.

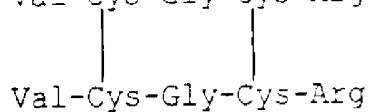
Příklad 35

Syntéza Val-Cys-Gly-Cys-Arg

Syntéza se provede podobným postupem jako v příkladu 1.

Příklad 36

Syntéza Val-Cys-Gly-Cys-Arg



Syntéza se provede podobným postupem jako v příkladu 3.

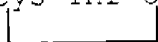
Příklad 37

Syntéza Ile-Cys-Thr-Cys-Glu

Syntéza se provede podobným postupem jako v příkladu 1.

Příklad 38

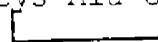
Syntéza Ile-Cys-Thr-Cys-Glu



Syntéza se provede podobným postupem jako v příkladu 2.

Příklad 39

Syntéza Leu-Cys-Ala-Cys-Val



Syntéza se provede podobným postupem jako v příkladu 2.

Příklad 40

Syntéza Asp-Cys-Ile-Cys-Gln

Syntéza se provede podobným postupem jako v příkladu 1.

Příklad 41

Syntéza Asp-Cys-Ile-Cys-Gln

Syntéza se provede podobným postupem jako v příkladu 2.

Příklad 42

Syntéza Ala-Cys-Lys-Cys-Gln

Syntéza se provede podobným postupem jako v příkladu 1.

Příklad 43

Test na hypersenzitivitě zpožděného typu (delayed type hypersensitivity, DTH)

Schopnost peptidů podle vynálezu modulovat imunitní odpovědi lze ilustrovat jejich účinkem v testu na hypersenzitivitě zpožděného typu (DTH) na myších. DTH-test se používá pro ilustraci imunomodulace a jeho postup popsali například Carlsten H., a kol. (1986) Int. Arch. Allergy Appl. Immunol 81: 322. Peptidy byly testovány v jedné nebo několika z následujících dávek: 0,0003 $\mu\text{mol/kg}$, 0,003 $\mu\text{mol/kg}$, 0,03 $\mu\text{mol/kg}$, 0,3 $\mu\text{mol/kg}$ a 3,0 $\mu\text{mol/kg}$.

Samci a samice myši Balb/c byly získány od firmy Bomholtsgaard (Dánsko), každá o hmotnosti 18 - 20 g. Jako antigen v DTH-testu byl používán 4-ethoxymethylen-2-fenyl-

oxazolin-5-on (OXA) (Sigma Chemicals).

Myši byly senzitivovány ve dni 0 epikutánní aplikací 150 μ l roztoku absolutního ethanolu v acetonu v poměru 3 : 1 obsahujícího 3 % OXA na vyholené břicho. S ošetřováním peptidy 1 až 41 (včetně) nebo nosnou látkou (kterou byl fosfátový pufr o pH 7,4, obsahující směs pufru A a pufru B v poměru 63 % A : : 37 % B, přičemž pufr A obsahuje 0,89 g hydrogenuhličitanu sodného na 100 ml a 0,05 g kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA) na 100 ml a pufr B obsahuje 0,69 g dihydrogenuhličitanu sodného na 100 ml a 0,05 g kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA) na 100 ml) se začne orálním podáním okamžitě po senzitivaci a pokračuje se v něm jednou denně (dopoledne) až do dne 6. Sedm dnů po senzitivaci se obě uši všech myši na obou stranách exponují místní aplikací 20 μ l 1% OXA rozpuštěného v podzemnicovém oleji. Tloušťka uši se měří před expozicí a 24 hodin nebo 48 hodin po ní za použití pružinového kaliperu (Oditest). Expozice a měření se provádějí v mírné pentobarbitalové anestezii.

Intenzita DTH-reakce byla měřena způsobem který popsali Lovern H. a kol. (1964) J. Immunol. Methods 67:311 a vyjádřena podle vzorce $T_{t_{24/48}} - T_{t_0}$ μ m jednotek, kde t_0 , t_{24} a t_{48} představují tloušťku ucha v čase 0, +24 hodin respektive +48 hodin po expozici, v jednotlivých testech (T). Výsledky byly vyjádřeny jako průměr +/- standardní odchylka průměru. Hladina významnosti mezi průměry skupin se zjistí pomocí Studentova dvoustranného t-testu. Imunomodulační účinek peptidu se odráží v podstatném rozdílu ve zvýšení nebo snížení tloušťky ucha ve srovnání s kontrolou (fosfátový pufr).

Tabulka 1 znázorňuje strukturu peptidů 1 - 41 testovaných v DTH-testu. Tyto peptidy vykazují podstatný rozdíl v imunostimulačním a imunoinhibičním účinku ve srovnání s kontrolou v alespoň jedné z testovaných dávek.

Tabulka 1

Peptidy 1 až 41 vyvolávají imunomodulační odpověď v DTH-testu

1	Gly Pro Cys Cys Pro Gly
2	Gly Pro Cys Cys Pro Gly <input type="checkbox"/>
3	Pro Gly Cys Cys Gly Pro
4	Pro Gly Cys Cys Gly Pro <input type="checkbox"/>
5	Trp Pro Cys Cys Pro Trp <input type="checkbox"/>
6	Leu Leu Phe Gly Pro Cys Cys NH ₂ <input type="checkbox"/>
7	Ala Pro Cys Cys Val Pro
8	Val Ile Cys Cys Leu Thr <input type="checkbox"/>
9	Thr Pro Cys Cys Phe Ala <input type="checkbox"/>
10	Glu Glu Cys Cys Phe Tyr <input type="checkbox"/>
11	Pro Val Cys Cys Ile Gly
12	Pro Val Cys Cys Ile Gly <input type="checkbox"/>
13	Val Cys Ile Cys Gln
14	Leu Ala Cys Cys Val Val
15	Val Cys Gly Cys Arg
16	Ser Gln Cys Cys Ser Leu <input type="checkbox"/>
17	Lys Pro Cys Cys Glu Arg

Pokračování tabulky 1

18	Lys Cys Arg Cys Lys ┌───┐
19	Lys Glu Cys Cys Tyr Val
20	Ser Ile Cys Cys Thr Lys ┌───┐
21	Lys Leu Cys Cys Asp Ile ┌───┐
22	Pro Asp Cys Cys Ile Pro
23	Lys Glu Cys Cys Tyr Val ┌───┐
24	Asp Cys Ile Cys Gln
25	Ile Cys Thr Cys Glu ┌───┐
26	Ile Cys Thr Cys Glu
27	Leu Cys Ala Cys Val ┌───┐
28	Lys Leu Cys Cys Gln Met
29	Phe Cys Ile Cys Lys
30	Asp Cys Ile Cys Gln ┌───┐
31	Lys Leu Cys Cys Gln Met ┌───┐
32	Ac Ala Pro Cys Cys Val Pro
33	Arg Cys Ser Gly Cys Cys Asn
34	Ala Cys Lys Cys Gln
35	Gly Pro Cys Ile Cys Pro Gly Gly Pro Cys Ile Cys Pro Gly

Pokračování tabulky 1

36	Pro Gly Cys Cys Gly Pro Pro Gly Cys Cys Gly Pro
37	Val Cys Gly Cys Arg X Val Cys Gly Cys Arg
38	Val Cys Gly Cys Arg Val Cys Gly Cys Arg
39	Pro Gly Cys Cys Pro Gly □
40	Ala Pro Cys Cys Glu Ser □
41	Pro Ala Cys Cys Gly Pro □

Příklad 44

Srovnání imunomodulačního účinku peptidu podávaného různými způsoby

Peptid (peptid č. 4 - odvozený od SEQ ID č. 2) byl podán myším (skupině 10 zvířat) orálně a parenterální injekcí (intravenózní a subkutánní injekcí) v dávkách od 0,0003 $\mu\text{mol/kg}$ tělesné hmotnosti až 3,0 $\mu\text{mol/kg}$ tělesné hmotnosti jako v příkladu 43. Zvířata byla zkoumána jako v příkladu 43 a zaznamenány změny v tloušťce uší. Byl vypočítán

průměr a standardní odchylka průměru pro každou skupinu myši (10 myši ve skupině). Bylo zjištěno, že podání peptidu orálním způsobem vyvolává výraznější imunomodulační odpověď než jaká je pozorována pokud je peptid podán jinými parenterálními způsoby.

Příklad 45

Srovnání imunomodulačního účinku při podání peptidového dimeru (peptid č. 36 - odvozený od SEQ ID č. 2) různými způsoby podání

Peptid (peptid č. 36) byl podán myšim (skupině 10 zvířat) v dávkách od 0,03 $\mu\text{mol/kg}$ tělesné hmotnosti a 3,0 $\mu\text{mol/kg}$ tělesné hmotnosti. Zvířata byla zkoumána jako v příkladu 43 a zaznamenány změny v tloušťce uší. Byl vypočítán průměr a standardní odchylka průměru pro každou skupinu myši (10 myši ve skupině). Bylo zjištěno, že uvedený peptidový dimer vyvolává podstatný imunomodulační účinek v DTH-testu ve srovnání s kontrolou a že orální způsob podání vyvolává silnější reakci ve srovnání s reakcemi pozorovanými při podání peptidu ve stejné dávce parenterálními způsoby.

Příklad 46

Účinky peptidů (peptid č. 1, peptid č. 2, peptid č. 7, peptid č. 4 a peptid č. 8) na růst nádoru

10^4 buněk spontánně vyvinutého karcinomu prsu v isotonickém solném roztoku a 5% normálním syngeneickým krysím séru bylo subkutánně inokulováno do pravých zadních končetin krys Wistar (8 zvířat ve skupině). Velikost nádoru byla stanovována palpací a měřením kaliperem prvního průměru (a), který je největším průměrem a průměru (b) kolmého k prvnímu průměru. Objem nádoru byl vypočítán za použití vzorce:

$$V = 0,4ab^2$$

Objem nádoru se uvádí v mm³ jako průměr každé skupiny krys (8 zvířat ve skupině).

Léčivo a kontrola (isotonický solný roztok) byly podávány žaludeční sondou (jicnovou trubicí) jednou denně dopoledne každý ze dnů 4 - 8 a 11 - 15 v případě peptidů

- i) Gly Pro Cys Cys Pro Gly (peptid č. 1 (SEQ ID č. 1)) v dávce 3 μ mol/kg/den,
- ii) Ala Pro Cys Cys Val Pro (peptid č. 7 (SEQ ID č. 5)) v dávce 0,03 a 0,3 μ mol/kg/den,
- iii) Val Ile Cys Cys Leu Thr (peptid č. 9 (SEQ ID č. 6)) v dávce 0,03 a 0,3 μ mol/kg/den, a
- iv) Pro Gly Cys Cys Gly Pro (peptid č. 4 (odvozený ze SEQ ID č. 2)) v dávce 0,03 a 0,3 μ mol/kg/den.

a každý ze dnů 6 - 8 a 13 - 20 v případě peptidu

Gly Pro Cys Cys Pro Gly (peptid č. 2 (odvozený ze SEQ ID č.

- 1)) v dávce 0,003, 0,03 0,3 a 3,0 μ mol/kg/den.

Výsledky pro peptidy 1, 2 a 4 vykazují výrazné snížení objemu nádoru ve srovnání s kontrolou ve všech testovaných dávkách.

Informace o sekvenci SEQ ID č. 3:

- (i) charakteristiky sekvence:
 - (A) délka: 6 aminokyselin
 - (B) typ : aminokyselinová
 - (C) počet řetězců:
 - (D) topologie : lineární

- (ix) vlastnost:
 - (A) jméno / klíč: peptid
 - (B) poloha: 1..6

- (ix) vlastnost:
 - (A) jméno / klíč: disulfidická vazba
 - (B) poloha: 3..4

- (xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 3:

Trp	Pro	Cys	Cys	Pro	Trp
1				5	

Informace o sekvenci SEQ ID č. 4:

- (i) charakteristiky sekvence:
 - (A) délka: 7 aminokyselin
 - (B) typ : aminokyselinová
 - (C) počet řetězců:
 - (D) topologie : lineární

- (ix) vlastnost:
 - (A) jméno / klíč: peptid
 - (B) poloha: 1..7

- (ix) vlastnost:
 - (A) jméno / klíč: modifikované místo
 - (B) poloha: 7
 - (D) další informace: produkt = "jiný",
poznámka = "Cys-NH₂"

(D) topologie : lineární

(xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 9:

Pro Val Cys Cys Ile Gly
1 5

Informace o sekvenci SEQ ID č. 10:

(i) charakteristiky sekvence:

(A) délka: 5 aminokyselin

(B) typ : aminokyselinová

(C) počet řetězců:

(D) topologie : lineární

(xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 10:

Val Cys Ile Cys Gln
1 5

Informace o sekvenci SEQ ID č. 11:

(i) charakteristiky sekvence:

(A) délka: 6 aminokyselin

(B) typ : aminokyselinová

(C) počet řetězců:

(D) topologie : lineární

(xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 11:

Leu Ala Cys Cys Val Val
1 5

Informace o sekvenci SEQ ID č. 12:

(i) charakteristiky sekvence:

(A) délka: 5 aminokyselin

(B) typ : aminokyselinová

(C) počet řetězců:

(D) topologie : lineární

(xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 12:

Val Cys Gly Cys Arg
1 5

Informace o sekvenci SEQ ID č. 13:

(i) charakteristiky sekvence:

- (A) délka: 6 aminokyselin
- (B) typ : aminokyselinová
- (C) počet řetězců:
- (D) topologie : lineární

(ix) vlastnosti:

- (A) jméno / klíč: disulfidická vazba
- (B) poloha: 3..4

(xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 13:

Ser Gln Cys Cys Ser Leu
1 5

Informace o sekvenci SEQ ID č. 14:

(i) charakteristiky sekvence:

- (A) délka: 6 aminokyselin
- (B) typ : aminokyselinová
- (C) počet řetězců:
- (D) topologie : lineární

(xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 14:

Lys Pro Cys Cys Glu Arg
1 5

Informace o sekvenci SEQ ID č. 15:

(i) charakteristiky sekvence:

- (A) délka: 5 aminokyselin
- (B) typ : aminokyselinová

(xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 17:

Ser Ile Cys Cys Thr Lys
1 5

Informace o sekvenci SEQ ID č. 18:

(i) charakteristiky sekvence:

(A) délka: 6 aminokyselin

(B) typ : aminokyselinová

(C) počet řetězců:

(D) topologie : lineární

(ix) vlastnost:

(A) jméno / klíč: disulfidická vazba

(B) poloha: 3..4

(xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 18:

Lys Leu Cys Cys Asp Ile
1 5

Informace o sekvenci SEQ ID č. 19:

(i) charakteristiky sekvence:

(A) délka: 6 aminokyselin

(B) typ : aminokyselinová

(C) počet řetězců:

(D) topologie : lineární

(xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 19:

Pro Asp Cys Cys Ile Pro
1 5

Informace o sekvenci SEQ ID č. 20:

(i) charakteristiky sekvence:

(A) délka: 5 aminokyselin

(B) typ : aminokyselinová

- (C) počet řetězců:
- (D) topologie : lineární

(xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 20:

Asp Cys Ile Cys Gln
1 5

Informace o sekvenci SEQ ID č. 21:

- (i) charakteristiky sekvence:
 - (A) délka: 5 aminokyselin
 - (B) typ : aminokyselinová
 - (C) počet řetězců:
 - (D) topologie : lineární

(xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 21:

Ile Cys Thr Cys Glu
1 5

Informace o sekvenci SEQ ID č. 22:

- (i) charakteristiky sekvence:
 - (A) délka: 5 aminokyselin
 - (B) typ : aminokyselinová
 - (C) počet řetězců:
 - (D) topologie : lineární
- (ix) vlastnost:
 - (A) jméno / klíč: disulfidická vazba
 - (B) poloha: 2..4

(xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 22:

Leu Cys Ala Cys Val
1 5

Informace o sekvenci SEQ ID č. 26:

- (i) charakteristiky sekvence:
 - (A) délka: 5 aminokyselin
 - (B) typ : aminokyselinová
 - (C) počet řetězců:
 - (D) topologie : lineární

- (xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 26:

Ala Cys Lys Cys Gln
1 5

Informace o sekvenci SEQ ID č. 27:

- (i) charakteristiky sekvence:
 - (A) délka: 7 aminokyselin
 - (B) typ : aminokyselinová
 - (C) počet řetězců:
 - (D) topologie : lineární

- (xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 27:

Gly Pro Cys Ile Cys Pro Gly
1 5

Informace o sekvenci SEQ ID č. 28:

- (i) charakteristiky sekvence:
 - (A) délka: 6 aminokyselin
 - (B) typ : aminokyselinová
 - (C) počet řetězců:
 - (D) topologie : lineární

- (ix) vlastnost:

- (A) jméno / klíč: disulfidická vazba
- (B) poloha: 3..4

(xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 24:

Pro Gly Cys Cys Pro Gly
1 5

Informace o sekvenci SEQ ID č. 29:

(i) charakteristiky sekvence:

(A) délka: 6 aminokyselin

(B) typ : aminokyselinová

(C) počet řetězců:

(D) topologie : lineární

(ix) vlastnost:

(A) jméno / klíč: disulfidická vazba

(B) poloha: 3..4

(xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 29:

Ala Pro Cys Cys Gly Ser
1 5

Informace o sekvenci SEQ ID č. 30:

(i) charakteristiky sekvence:

(A) délka: 6 aminokyselin

(B) typ : aminokyselinová

(C) počet řetězců:

(D) topologie : lineární

(ix) vlastnost:

(A) jméno / klíč: disulfidická vazba

(B) poloha: 3..4

(xi) znázornění sekvence SEQ ID č. 30:

Pro Ala Cys Cys Gly Pro
1 5

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Purifikovaný fyziologicky aktivní peptid obsahující alespoň dva cysteinové aminokyselinové zbytky, kteréžto dva zbytky spolu navzájem bezprostředně sousedí nebo jsou odděleny ne více než jedním aminokyselinovým zbytkem, kteréžto peptidy jsou absorbovatelné epiteliální buněčnou výstelkou savce přičemž následkem této absorpce je modulovaná imunitní odpověď a tím terapeutický účinek proti onemocnění.

2. Peptid podle nároku 1 ve formě dimeru, kde druhý peptid dimeru je spojen s prvním peptidem pomocí vazeb síra-síra mezi uvedenými alespoň dvěma cysteinovými aminokyselinovými zbytky prvního peptidu a alespoň dvěma cysteinovými aminokyselinovými zbytky druhého peptidu.

3. Peptid podle nároku 2, kde je dimer vybrán ze skupiny zahrnující paralelní dimery, antiparalelní dimery a heterodimery.

4. Peptid podle libovolného z nároků 1 až 3 o délce od 4 aminokyselin do zhruba 30 aminokyselin.

5. Peptid podle libovolného z nároků 1 až 4 o délce od 4 aminokyselin do zhruba 20 aminokyselin.

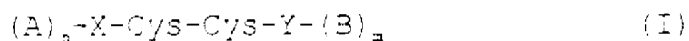
6. Peptid podle libovolného z nároků 1 až 5 o délce od 4 do 15 aminokyselin.

7. Peptid podle libovolného z nároků 1 až 6 obsahující přirozeně se vyskytující nebo/a přirozeně se nevyskytující aminokyseliny.

8. Peptid podle libovolného z nároků 1 až 7, který je tvořen aminokyselinovými zbytky nezávisle na sobě vybranými

ze skupiny zahrnující Ile, Leu, Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Met His a Val.

9. Peptid podle libovolného z nároků 1 až 8 obecného vzorce I



kde

každý ze symbolů A je nezávisle vybrán ze souboru zahrnujícího atom vodíku, chránící skupiny nebo alespoň jeden aminokyselinový zbytek nezávisle vybraný ze souboru zahrnujícího aminokyselinové zbytky buď v L- nebo D-formě s alifatickými postranními řetězci, alifatickými hydroxylovanými postranními řetězci, bázičnými postranními řetězci, kyselými postranními řetězci, sekundárními aminoskupinami, amidickými postranními řetězci, aromatickými postranními řetězci a postranními řetězci obsahujícími síru,

n je celé číslo vybrané ze souboru zahrnujícího čísla od 1 do 11,

X je vybrán ze souboru zahrnujícího skupinu NH a aminokyselinové zbytky s alifatickými postranními řetězci, sekundárními aminoskupinami, amidickými postranními řetězci, kyselými postranními řetězci a alifatickými postranními řetězci,

Y je vybrán ze souboru zahrnujícího skupinu NH a aminokyselinové zbytky se sekundárními aminoskupinami, alifatickými postranními řetězci, kyselými postranními řetězci, alifatickými hydroxylovanými postranními řetězci, aromatickými postranními řetězci a amidickými postranními řetězci,

každý ze symbolů B je nezávisle vybrán ze souboru zahrnujícího atom vodíku, hydroxylovou skupinu, aminoskupinu,

chránicí skupiny nebo alespoň jeden aminokyselinový zbytek vybraný ze souboru zahrnujícího aminokyselinové zbytky s alifatickými postranními řetězci, alifatickými hydroxylovanými postranními řetězci, bázičnými postranními řetězci, kyselými postranními řetězci, sekundárními aminoskupinami, amidickými postranními řetězci, aromatickými postranními řetězci a postranními řetězci obsahujícími síru, a

m je celé číslo vybrané ze souboru zahrnujícího čísla od 1 do 11,

s tím, že pokud A neznamená alespoň jeden aminokyselinový zbytek, má n hodnotu 1 a pokud B neznamená alespoň jeden aminokyselinový zbytek, má m hodnotu 1, a každá peptidová sekvence obsahuje ne více než 15 aminokyselinových zbytků.

10. Peptid podle nároku 9, ve kterém

X je vybrán ze souboru zahrnujícího Gly, Pro, Gln, Ile, Val, Asp, Leu, Glu, Ala a skupinu NH, a

Y je vybrán ze souboru zahrnujícího Pro, Gly, Leu, Glu, Val, Ile, Ser, Phe, Tyr, Thr, Asp, Gln a skupinu NH.

11. Peptid podle nároku 9 nebo nároku 10, ve kterém

X je Gly a Y je Gly,

X je Pro a Y je Pro,

X je Pro a Y je Val,

X je Ile a Y je Leu,

X je Pro a Y je Glu,

X je Glu a Y je Tyr,

X je Pro a Y je Phe,

X je Glu a Y je Phe,

X je Ala a Y je Val,

X je Val a Y je Ile,

X je Gln a Y je Ser.

X je Ile a Y je Thr,
X je Leu a Y je Asp,
X je Asp a Y je Ile,
X je Leu a Y je Gln,
X je Gly a Y je Asn,
X je Gly a Y je Pro, nebo
X je Ala a Y je Gly.

12. Peptid podle libovolného z nároků 9 - 11 ve formě dimeru vytvořeného ze dvou peptidových sekvencí, kde druhý peptid je spojen s prvním peptidem pomocí vazeb síra-síra mezi uvedenými dvěma cysteinovými aminokyselinovými zbytky uvedeného prvního peptidu a dvěma cysteinovými aminokyselinovými zbytky uvedeného druhého peptidu.

13. Peptid v dimerní formě podle nároku 12 tvořený dvěma stejnými peptidovými sekvencemi.

14. Peptid podle nároku 11 vybraný ze skupiny zahrnující

Gly-Pro-Cys-Cys-Pro-Gly,
Pro-Gly-Cys-Cys-Gly-Pro,
Ala-Pro-Cys-Cys-Val-Pro,
Lys-Pro-Cys-Cys-Glu-Arg,
Pro-Asp-Cys-Cys-Ile-Pro a
Arg Cys Ser Gly Cys Cys Asn.

15. Peptid podle nároku 11 vybraný ze skupiny zahrnující

Gly-Pro-Cys-Cys-Pro-Gly,
Pro-Gly-Cys-Cys-Gly-Pro,
Trp-Pro-Cys-Cys-Pro-Trp,

Val-Ile-Cys-Cys-Leu-Thr,
└───┘

Thr-Pro-Cys-Cys-Phe-Ala,
└───┘

Glu-Glu-Cys-Cys-Phe-Tyr,
└───┘

Lys-Leu-Cys-Cys-Asp-Ile,
└───┘

Lys-Glu-Cys-Cys-Tyr-Val, a
└───┘

Pro Ala Cys Cys Gly Pro.
└───┘

16. Peptid

Pro Gly Cys Cys Gly Pro

┆┆┆
Pro Gly Cys Cys Gly Pro.

17. Peptid podle nároku 14 vybraný ze skupiny zahrnující

Gly-Pro-Cys-Cys-Pro-Gly,
Pro-Gly-Cys-Cys-Gly-Pro,
Ala-Pro-Cys-Cys-Val-Pro,
Lys-Pro-Cys-Cys-Glu-Arg, a
Arg Cys Ser Gly Cys Cys Asn.

18. Peptid podle nároku 15 vybraný ze skupiny zahrnující

Pro-Gly-Cys-Cys-Gly-Pro,
└───┘

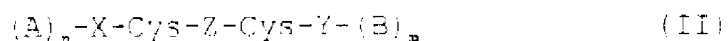
Val-Ile-Cys-Cys-Leu-Thr,
└───┘

Lys-Glu-Cys-Cys-Tyr-Val,
└───┘

Gly-Pro-Cys-Cys-Pro-Gly, a

Pro Ala Cys Cys Gly Pro.

19. Peptid podle libovolného z nároků 1 až 8 obecného vzorce II



kde

každý ze symbolů A je nezávisle vybrán ze souboru zahrnujícího atom vodíku, chránící skupiny a aminokyselinové zbytky vybrané ze souboru zahrnujícího aminokyselinové zbytky buď v L- nebo D-formě s alifatickými postranními řetězci, alifatickými hydroxylovanými postranními řetězci, bázičnými postranními řetězci, kyselými postranními řetězci, sekundárními aminoskupinami, amidickými postranními řetězci a postranními řetězci obsahujícími síru,

n je celé číslo vybrané ze souboru zahrnujícího čísla od 1 do 10,

X je vybrán ze souboru zahrnujícího skupinu NH a aminokyselinové zbytky s alifatickými postranními řetězci, sekundárními aminoskupinami, aromatickými postranními řetězci, kyselými postranními řetězci a amidickými postranními řetězci,

Z je vybrán ze souboru zahrnujícího aminokyselinové zbytky s alifatickými postranními řetězci, alifatickými hydroxylovanými postranními řetězci a bázičnými postranními řetězci,

Y je vybrán ze souboru zahrnujícího aminokyselinové zbytky s amidickými postranními řetězci, bázičnými postranními řetězci, alifatickými postranními řetězci,

kyselými postranními řetězci a sekundárními aminoskupinami,

každý ze symbolů B je nezávisle vybrán ze souboru zahrnujícího atom vodíku, hydroxylovou skupinu, aminoskupinu, chránicí skupiny a aminokyselinové zbytky vybrané ze souboru zahrnujícího aminokyselinové zbytky s alifatickými postranními řetězci, alifatickými hydroxylovanými postranními řetězci, bážickými postranními řetězci, kyselými postranními řetězci, sekundárními aminoskupinami, amidickými postranními řetězci a postranními řetězci obsahujícími síru, a

m je celé číslo vybrané ze souboru zahrnujícího čísla od 1 do 10,

s tím, že pokud A neznamená alespoň jeden aminokyselinový zbytek, má n hodnotu 1 a pokud B neznamená alespoň jeden aminokyselinový zbytek, má m hodnotu 1, a každá peptidová sekvence obsahuje ne více než 15 aminokyselinových zbytků.

20. Peptid podle nároku 19, ve kterém

X je vybrán ze souboru zahrnujícího Gly, Pro, Gln, Ile, Phe, Val, Asp, Leu, Glu, Ala, Lys a skupinu NH,

Y je vybrán ze souboru zahrnujícího Pro, Gly, Glu, Val, Lys, Gln a Arg, a

Z je vybrán ze souboru zahrnujícího Ile, Arg, Gly, Thr, Ala a Lys.

21. Peptid podle nároku 19 nebo nároku 20 ve formě dimeru vytvořeného ze dvou peptidových sekvencí, kde druhý peptid je spojen s prvním peptidem pomocí vazeb síra-síra mezi uvedenými dvěma cysteinovými aminokyselinovými zbytky uvedeného prvního peptidu a dvěma cysteinovými aminokyse-

linovými zbytky uvedeného druhého peptidu.

22. Peptid v dimerní formě podle nároku 21 tvořený dvěma stejnými peptidovými sekvencemi.

23. Peptid podle nároku 19 nebo nároku 20 vybraný ze skupiny zahrnující

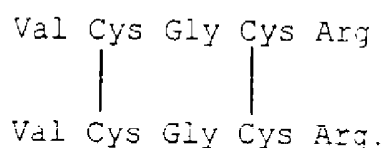
Val Cys Ile Cys Gln,
Val Cys Gly Cys Arg,
Asp Cys Ile Cys Gln,
Ile Cys Thr Cys Glu,
Phe Cys Ile Cys Lys, a
Ala Cys Lys Cys Gln.

24. Peptid vybraný ze skupiny zahrnující

Ile Cys Thr Cys Glu,
Lys Cys Arg Cys Lys,
Leu Cys Ala Cys Val, a
Asp Cys Ile Cys Gln.

25. Peptid vybraný ze skupiny zahrnující

Gly Pro Cys Ile Cys Pro Gly
Gly Pro Cys Ile Cys Pro Gly,
Val Cys Gly Cys Arg
Val Cys Gly Cys Arg, a



26. Peptid podle libovolného z nároků 1 až 25 bez přidávaného transportního činidla.

27. Adiční soli peptidů podle libovolného z nároků 1 až 26 s kyselinami.

28. Adiční soli s kyselinami podle nároku 27 vybrané ze souboru zahrnujícího soli s kyselinou chlorovodíkovou, bromovodíkovou, dusičnou, chloristou, sírovou, citronovou, vinnou, fosforečnou, mléčnou, benzoovou, glutamovou, šťavelovou, asparagovou, pyrohroznovou, octovou, jantarovou, fumarovou, maleinovou, oxaloctovou, isethionovou, stearovou, ftalovou, methansulfonovou, p-toluensulfonovou, benzensulfonovou, laktobionovou a glukuronovou.

29. Soli peptidů podle libovolného z nároků 1 až 26 s bázemi.

30. Soli s bázemi podle nároku 29 vybrané ze souboru zahrnujícího soli s alkalickými kovy a kovy alkalických zemin, soli s organickými bázemi a soli s aminokyselinami.

31. Orální dávkovací forma, v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje imunomodulační peptid podle libovolného z nároků 1 až 26.

32. Orální dávkovací forma podle nároku 31, v y z n a č u j í c í s e t í m , že množství imunomodulačního peptidu nutné pro vyvolání pozorovatelné modulace imunitní odpovědi savce při orálním podání je nižší než množství stejného imunomodulačního peptidu nutné při parenterálním

podání pro dosažení podobné pozorovatelné modulace imunitní odpovědi tohoto savce.

33. Orální dávkovací forma podle nároku 32, v y z n a č u j í c í s e t í m , že neobsahuje přidávané transportní činidlo.

34. Intratracheální dávkovací forma, v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje imunomodulační peptid podle libovolného z nároků 1 až 26.

35. Intratracheální dávkovací forma podle nároku 34, v y z n a č u j í c í s e t í m , že množství imunomodulačního peptidu nutné pro vyvolání pozorovatelné modulace imunitní odpovědi savce při intratracheálním podání je nižší než množství stejného imunomodulačního peptidu nutné při parenterálním podání pro dosažení podobné pozorovatelné modulace imunitní odpovědi tohoto savce.

36. Intratracheální dávkovací forma podle nároku 35, v y z n a č u j í c í s e t í m , že neobsahuje přidávané transportní činidlo.

37. Nasální dávkovací forma, v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje imunomodulační peptid podle libovolného z nároků 1 až 26.

38. Nasální dávkovací forma podle nároku 37, v y z n a č u j í c í s e t í m , že množství imunomodulačního peptidu nutné pro vyvolání pozorovatelné modulace imunitní odpovědi savce při nasálním podání je nižší než množství stejného imunomodulačního peptidu nutné při parenterálním podání pro dosažení podobné pozorovatelné modulace imunitní odpovědi tohoto savce.

č.j. 11258
našlo 11 11 97
PŘÍLOHA
K
VLASTNÍM
PŘÍLOHÁM
PŘÍLOHA

39. Nasální dávkovací forma podle nároku 36, v y z n a č u j í c í s e t í m , že neobsahuje přidávané transportní činidlo.

40. Farmaceutická formulace, v y z n a č u j í c í s e t í m , že jako farmaceuticky účinnou složku obsahuje alespoň jeden peptid podle libovolného z nároků 1 až 26 nebo jeho sůl spolu s farmaceuticky přijatelným nosičem.

41. Farmaceutická formulace podle nároku 40, v y z n a č u j í c í s e t í m , že je určena pro orální podání.

42. Farmaceutická formulace podle nároku 40 nebo nároku 41, v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje alespoň jeden peptid obecného vzorce I nebo jeho fyziologický derivát spolu s farmaceutickým nosičem.

43. Farmaceutická formulace podle libovolného z nároků 40 až 42, v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje alespoň jeden peptid obecného vzorce I nebo jeho sůl a alespoň jeden peptid obecného vzorce II nebo jeho sůl spolu s farmaceutickým nosičem.

44. Peptid podle libovolného z nároků 1 až 26 nebo jeho sůl v orální dávkovací formě pro použití k léčení.

45. Peptid podle libovolného z nároků 1 až 26 nebo jeho sůl v orální dávkovací formě pro použití k léčení rakoviny.

46. Peptid podle libovolného z nároků 1 až 26 nebo jeho sůl v orální dávkovací formě pro použití k léčení autoimunitního onemocnění.

47. Peptid podle libovolného z nároků 1 až 26 nebo jeho

sůl pro použití k léčení.

48. Peptid podle libovolného z nároků 1 až 26 nebo jeho sůl pro použití k léčení rakoviny.

49. Peptid podle libovolného z nároků 1 až 26 nebo jeho sůl pro použití k léčení revmatické artritidy.

50. Použití fyziologicky aktivního peptidu podle libovolného z nároků 1 až 26 nebo jeho soli k přípravě léčiva vhodného pro léčení onemocnění.

51. Použití fyziologicky aktivního peptidu podle libovolného z nároků 1 až 26 nebo jeho soli k přípravě léčiva vhodného pro léčení rakoviny.

52. Použití fyziologicky aktivního peptidu podle libovolného z nároků 1 až 26 nebo jeho soli k přípravě léčiva vhodného pro léčení autoimunitního onemocnění.

53. Použití fyziologicky aktivního peptidu podle libovolného z nároků 1 až 26 nebo jeho soli bez přidávaného transportního činidla k přípravě léčiva vhodného pro léčení revmatické artritidy.

54. Způsob přípravy farmaceutické formulace, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se smíchá alespoň jeden peptid podle libovolného z nároků 1 až 26 nebo alespoň jedna jeho sůl a farmaceuticky přijatelný nosič.

55. Způsob podle nároku 54, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se smíchá alespoň jeden peptid obecného vzorce I nebo/a alespoň jeden peptid obecného vzorce II nebo jeho sůl a farmaceuticky přijatelný nosič.