

ÖZET**ALFA-MELANOSİT UYARICI HORMONLARIN PEPTİD ANALOGLARI**

5 Burada sağlanan, melanokortin 1 reseptörüne (MC1R) yönelik olarak seçiciliğe sahip olan natif alfa-melanosit uyarıcı hormonun (α -MSH) stabil peptid analoglarıdır. Aynı zamanda burada sağlanan, bu analogların MC1R içeren tıbbi ve veterinerlik durumlarının tedavisinde kullanılmasının yöntemlerinin yanı sıra, α -MSH peptid analoglarının farmasötik preparasyonlarıdır.

İSTEMLER

1. Melanokortin 1 reseptörünü (MC1R) seçici bir şekilde bağlayan bir bileşik veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu olup, özelliği söz konusu bileşiğin aşağıdaki diziye sahip olan bir polipeptidi içermesidir:

Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ Xaa₆ Xaa₇ Xaa₈ Xaa₉ Xaa₁₀ Xaa₁₁ Xaa₁₂ Xaa₁₃,
burada
Xaa₁, D-Val'dir;
Xaa₂, D-Pro'dur;
Xaa₃, D-Lys, D-Orn veya D-Nle'dir;
Xaa₄, Gly'dir;
Xaa₅, D-Trp, D-3-benzotienil-Ala, D-5-hidroksi-Trp, D-5-metoksi-Trp veya D-Phe'dir;
Xaa₆, D-Arg'dir;
Xaa₇, D-Cha, D-Phe, D-4-floro-Phg, D-3-piridil-Ala, D-Thi, D-Trp veya D-4-nitro-Phe'dir;
Xaa₈, D-His'dir;
Xaa₉, D-Glu, D-Asp, D-sitrülin veya D-Ser'dir;
Xaa₁₀, D-Met, D-bütiyonin veya D-Ile'dir;
Xaa₁₁, D-Ser veya D-Ile'dir;
Xaa₁₂, D-Tyr veya D-Ser'dir; ve
Xaa₁₃, D-Ser'dir.

2. İstem 1'e göre bileşik veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu olup, özelliği söz konusu bileşiğin aşağıdaki diziye sahip olan bir polipeptidi içermesidir:

Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ Xaa₆ Xaa₇ Xaa₈ Xaa₉ Xaa₁₀ Xaa₁₁ Xaa₁₂ Xaa₁₃,
burada
Xaa₁, D-Val'dir;
Xaa₂, D-Pro'dur;
Xaa₃, D-Lys, D-Orn veya D-Nle'dir;
Xaa₄, Gly'dir;
Xaa₅, D-Trp'dir;

- Xaa₆, D-Arg'dir;
 Xaa₇, D-Cha, D-Phe veya D-Thi'dir;
 Xaa₈, D-His'dir;
 Xaa₉, D-Glu veya D-Ser'dir;
 5 Xaa₁₀, D-Met, D-bütiyonin veya D-Ile'dir;
 Xaa₁₁, D-Ser veya D-Ile'dir;
 Xaa₁₂, D-Tyr veya D-Ser'dir; ve
 Xaa₁₃, D-Ser'dir.
- 10 3. İstem 1 veya 2'ye göre bileşik veya bunun bir farmasötik olarak kabul edilebilir tuzu olup, özelliği söz konusu bileşiğin aşağıdaki diziye sahip olan bir çekirdek tetrapeptidini içermesidir:
- 15 D-Trp D-Arg Xaa D-His (SEQ ID NO: 2),
 burada
 Xaa, D-Cha veya D-Phe'dir.
- 20 4. İstemler 1-3'ten herhangi birine göre bileşik veya bunun bir farmasötik olarak kabul edilebilir tuzu olup, özelliği söz konusu bileşiğin aşağıdaki diziye sahip olan bir C-terminal polipeptidini içermesidir:
- D-Ser D-Ile D-Ile D-Ser D-Ser (SEQ ID NO: 3).
- 25 5. Melanokortin 1 reseptörünü (MC1R) seçici bir şekilde bağlayan bir bileşik veya bunun bir farmasötik olarak kabul edilebilir tuzu olup, özelliği söz konusu bileşiğin aşağıdaki diziye sahip olan bir polipeptidi içermesidir:
- 30 D-Val D-Pro D-Lys Gly D-Trp D-Arg D-Cha D-His D-Glu D-Met D-Ser D-Tyr D-Ser;
 D-Val D-Pro D-Lys Gly D-Trp D-Arg D-Phe D-Arg D-Glu D-Met D-Ser D-Tyr D-Ser;
 D-Val D-Pro D-Lys Gly D-Trp D-Arg D-Phe D-His D-Glu D- bütiyonin D-Ser D-Tyr D-Ser;
 D-Val D-Pro D-Lys D-Gly D-Trp D-Arg D-Phe D-His D-Ser D-Ile D-Ile D-Ser D-Ser;

D-Val D-Pro D-Lys Gly D-Trp D-Arg D-Cha D-His D-Glu D- bütüyonin D-Ser D-Lyr D-Ser;

D-Val D-Pro D-Lys Gly D-Trp D-Arg D-Phe D-His D-Glu D-Met D-Ser D-Tyr D-Ser veya

D-Val D-Pro D-Lys Gly D-Trp D-Arg D-Phe His D-Glu D-Met D-Ser D-Lyr D-Ser

- 5 6. İstemler 1-5'ten herhangi birine göre bileşik olup, özelliği söz konusu polipeptidin PEGile edilmesidir.
7. İstemler 1-6'dan herhangi birine göre bileşik olup, özelliği söz konusu bileşiğin aşağıdaki özelliklerden en azından birini sergilemesidir:
- 10 MC1R'yi seçici bir şekilde aktive etme kabiliyeti;
in vitro plazmada stabilite; veya
 proteaz bozulmasına direnç.
- 15 8. İstemler 1-7'nin herhangi birine göre bileşik olup, özelliği söz konusu bileşiğin MC1R'yi seçici bir şekilde bağlaması, ancak MC3R, MC4R veya MC5R'yi bağlamamasıdır.
- 20 9. İstemler 1-8'in herhangi birine göre bileşik olup, özelliği bir ilaç olarak kullanıma yönelik olmasıdır.
10. İstemler 1-9'un herhangi birine göre bileşik olup, özelliği söz konusu bileşiğin bir biyolojik olarak aktif parçaya konjüge edilmesidir.
- 25 11. Bir farmasötik bileşim olup, özelliği istemler 1-10'un herhangi birine göre olan bileşiği ve bir farmasötik olarak kabul edilebilir eksipiyanı içermesidir.
- 30 12. İstem 11'de talep edildiği gibi farmasötik bileşim veya İstemler 1-10'un herhangi birine göre bileşik olup, özelliği enflamasyon, otoimmün hastalık, melanom, nakil reddi azaltma ve nakil reddi inhibisyonundan oluşan gruptan seçilen bir durumun tedavisinde kullanıma yönelik olmasıdır.

13. İstem 12'ye göre kullanıma yönelik olarak farmasötik bileşim veya bileşik olup, özelliği söz konusu otoimmün hastalık veya durumun aşağıdakilerden oluşan veya bunlardan biri ile ilişkili gruptan seçilmesidir: multipl skleroz, diyabet tip I, aplastik anemi, Grave hastalığı, çölyak hastalığı, Crohn hastalığı, lupus, artrit, osteoartrit, otoimmün üveit, myastenia gravis, enflamatuvar bağırsak hastalığı, romatoid artrit, alerji, ateroskleroz, sedef hastalığı, gastrit ve iskemik kalp hastalığı.
14. Bir farmasötik olarak kabul edilebilir eksipiyen ve bir konjugatın bir terapötik olarak etkili miktarını içeren bir farmasötik bileşim olup, özelliği melanomun tedavisinde kullanıma yönelik olarak bir anti-tümör yüküne konjüge edilmiş istemler 1-10'dan herhangi birine göre olan bileşiği içermesidir.
15. İstem 14'e göre kullanıma yönelik farmasötik bileşim olup, özelliği söz konusu anti-tümör yükünün, bir radyonüklid, bir radyo duyarlılaştırıcı, bir ışık duyarlılaştırıcı, bir kemoterapötik ajan veya bir toksin olmasıdır.

TARİFNAME

ALFA-MELANOSİT UYARICI HORMONLARIN PEPTİD ANALOGLARI

Teknik Saha

5

Buluş, istemlerde tanımlandığı gibi peptid analogları ile ilgilidir. Özellikle, buluş, bu analogların tıbbi ve veterinerlik durumlarının tedavisinde kullanımı ile olduğu kadar, melanokortin 1 reseptörüne (MC1R) yönelik seçiciliğe sahip olan natif alfa-melanosit uyarıcı hormonun (α -MSH) peptid analogları, bunun farmasötik preparatları ile ilgilidir.

10

Alt Yapı Tekniği

Nöropeptidler, vücut boyunca geniş çapta yayılmış ve nörotransmitterden büyüme faktörüne varan fonksiyonlara sahip olan biyolojik olarak aktif küçük peptidlerdir. Birçok kanıt nöropeptidlerin anti-enflamatuar kapasitelere sahip olduğunu göstermiştir. Çoğu nöropeptid arasında olanlar melanokortin (MC) reseptörlerine bağlanır ve bunları uyaran melanokortik peptidlerdir (melanokortinler). Bir melanokortinin bir örneği, asıl olarak periferik pigmentasyonu düzenleme kabiliyeti ile bilinen, fakat aynı zamanda anti-enflamatuar ve immünodüzenleyici kapasitelere de sahip olduğu bilinen α -melanosit uyarıcı hormonu (α -MSH) içerir. α -MSH nöropeptid birkaç organda tespit edilmiştir ve nöronlar, hipofiz bezi, bağırsak, cilt ve bağışıklık hücreleri tarafından üretilir.

α -MSH'nin immünodüzenleyici kapasiteleri, haptan-spesifik toleransın α -MSH ile enjeksiyonla indüklendiği ve bakteriyel endotoksin aracılı enflamasyonu baskıladığı temas aşırı duyarlılık modellerinde gösterilmiştir. Aynı zamanda, α -MSH'nin, enflamatuar bağırsak hastalığı, artrit ve deneysel kalp nakli gibi çoğu hayvan hastalığı modelinde terapötik aktiviteye sahip olduğu da gösterilmiştir. Beyin iltihabı, böbrek hasarı ve karaciğer iltihabının diğer hayvan modelleri, bu nöropeptid ile anti-enflamatuar etkiler göstermiştir. α -MSH TNF- α , IL-6 ve IL-1 gibi pro-enflamatuar sitokinlerin üretimini baskılar ve makrofaj ve enflamatuar bölgelere nötrofilin göçünü azaltan kemokinleri inhibe eder. Nitrik oksit (NO), çeşitli iltihap formlarına yönelik bir ortak aracıdır. Endotoksinle uyarılmış makrofajlar ve nötrofiller tarafından NO sentezinin aynı zamanda α -MSH tarafından inhibe edildiği de gösterilmiştir. Sitokin üretimi üzerindeki etkilerine ilave olarak, α -MSH, monositler ve antijen sunumunu ve

ortak stimölasyonu etkileyen dendritik hücreler üzerindeki MHC sınıf I, CD86 ve CD40 ekspresyonunu azaltarak düzenler. α -MSH'nin aynı zamanda, immün baskılayıcı etkilerde bir önemli bileşen olduğuna inanılan monositlerde interlökin 10 (IL-10) oluşumunu arttırdığı da bilinir.

5

α -MSH'nin immünodüzenleyici etkilerinin moleküler mekanizmalarının tam olarak anlaşılmasına rağmen, α -MSH'nin bir potansiyel hareket mekanizması, hücrelerdeki nükleer faktör- κ B aktivasyonunu inhibe etme kabiliyetidir. NF- κ B'nin inhibisyonu, makrofajlar tarafından pro-enflamatuar sitokin üretiminin ve nitrik oksit sentezinin bir baskılanması ile sonuçlanır. α -MSH, bir G-proteinine-bağlı reseptör grubuna ait olan spesifik reseptörleri yedi transmembran domeni ile bağlayarak fonksiyon gösterir. Bu reseptörler α -MSH'nin bağlanmasıyla NF- κ B'yi inhibe ettiği makrofajlar üzerindeki melanokortin 1 ve melanokortin 3 reseptörlerini (MCR-1 ve MCR-3) içerir. α -MSH'nin immünodüzenleyici etkilerinin çoğu aynı zamanda cAMP'nin birikmesi yoluyla da aracılık edilir. α -MSH'nin melanokortin reseptörlerine bağlanması, I κ B'nin bozulmasını baskılayabilen ve bu nedenle NF- κ B translokasyonunu ve nitrik oksit üretimini inhibe edebilen cAMP seviyelerini artırır.

α -MSH'nin bağlandığı ve uyardığı MC1 reseptörleri, çeşitli anti-enflamatuar ve immünodüzenleyici yanıtlarda kapsanmıştır. Beş tip melanokortin reseptörü tanımlanmıştır, MC1-MC5. MC1-reseptörlerinin, melanositlerde, melanom hücrelerinde, makrofajlarda, nötrofillerde, glioma hücrelerinde, astrositlerde, monositlerde, endotel hücrelerinde, beyin, testis ve yumurtalığın belirli alanlarında mevcut olduğu bulunmuştur. MC1 reseptörlerini uyarmak üzere ve etkili anti-enflamatuar ve immünodüzenleyici yanıtları üretmek üzere bileşikler ve yöntemlerde devam eden ilgi kalır.

W02005120588 A2, amino asitlerin hepsinin D-formunda olduğu VPKGWRWFHE, S-K (DOTA) S peptidi açıklar. Bununla birlikte, söz konusu peptid, mevcut başvuruda talep edilen peptidlerden C-terminal amino asit kalıntıları bakımından farklılık gösterir.

Buluşun Kısa Açıklaması

Mevcut buluş, istemler tarafından tanımlanır. İstemlerin kapsamı dışına düşen herhangi bir dava konusu yalnızca bilgiye yönelik olarak sağlanır.

Açıklamadaki tedavi yöntemlere herhangi bir referans, terapiyle insan veya hayvan vücudunun tedavisine yönelik bir yöntemde kullanıma yönelik olarak mevcut buluşun bileşiklerini, farmasötik bileşimlerini ve ilaçlarını refere eder.

- 5 Burada sağlanan, melanokortin 1 reseptörünü (MC1R) seçici bir şekilde bağlayan bir büyük ölçüde saf bileşiktir, söz konusu bileşik His Xaa₁ Arg Trp (SEQ ID NO:1) veya D-Trp D-Arg Xaa₂ D-His (SEQ ID NO:2) dizisine sahip olan bir çekirdek tetrapeptid içerir; burada Xaa₁, D-Cha, D-Phe veya Cha'dır ve Xaa₂, D-Cha, D-Phe veya Phe; veya bunun bir farmasötik olarak kabul edilebilir tuzudur. Bazı düzenlemelerde, C-terminal
- 10 dizisi D-Ser D-Ile D-Ile D-Ser D-Ser'dir (SEQ ID NO:3).

Ayrıca burada sağlanan, melanokortin 1 reseptörünü (MC1R) seçici bir şekilde bağlayan bir büyük ölçüde saf bileşik veya bunun bir farmasötik olarak kabul edilebilir tuzu olup, söz konusu bileşik aşağıdaki diziye sahip olan bir polipeptid içerir:

15

Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ Xaa₆ Xaa₇ Xaa₈ Xaa₉ Xaa₁₀ Xaa₁₁ Xaa₁₂ Xaa₁₃,

burada Xaa₁ D-Val, D-Ala veya D-Lys'dir;

Xaa₂ D-Pro, D-Ala veya D-Lys'dir;

Xaa₃ D-Lys, D-Om, D-Nle, D-Ala veya D-Lys'dir;

20

Xaa₄ Gly veya D-Ala'dır;

Xaa₅ D-Trp, Trp, D-3-benzotienil-Ala, D-5-hidroksi-Trp, D-5-metoksi-Trp, D-Phe veya D-Ala'dır;

Xaa₆ D-Arg, D-His veya D-Ala'dır;

Xaa₇ D-Cha, D-Phe, Phe, D-4-floro-Phg, D-3-piridil-Ala, D-Thi, D-Trp, D-4-nitro-Phe

25 veya D-Ala'dır;

Xaa₈ D-His, His, D-Arg, Phe veya D-Ala'dır;

Xaa₉ D-Glu, D-Asp, D-sitrülin, D-Ser veya D-Ala'dır;

Xaa₁₀ D-Met, D-bütiyonin, D-Ile veya D-Ala'dır;

Xaa₁₁ D-Ser, D-Ile veya D-Ala'dır;

30

Xaa₁₂ D-Tyr, D-Ser veya D-Ala'dır;

Xaa₁₃ D-Ser veya D-Ala'dır;

burada, Xaa₁₋₃'ün tümünün D-Ala olduğu durum haricinde birden fazla Xaa₁₋₁₃ D-Ala değildir ve birden fazla Xaa₁₋₁₃ bir L-amino asit değildir.

Yine başka bakış açısında, burada sağlanan aşağıdaki diziye sahip olan bir polipeptidi içeren bir büyük ölçüde saf bileşik veya bunun bir farmasötik olarak kabul edilebilir tuzudur:

5 D-Val D-Pro D-Lys Gly D-Trp D-Arg Phe D-His D-Ser D-Ile D-Ile D-Ser D-Ser (SEQ ID NO:4).

D-Val D-Pro D-Lys Gly D-Trp D-Arg D-Cha D-His D-Ser D-Ile D-Ile D-Ser D-Ser (SEQ ID NO: 5).

Ser Tyr Ser Met Glu His Cha Arg Trp Gly Lys Pro Val (SEQ ID NO:6); veya

D-Val D-Pro D-Lys Gly D-Trp D-Arg D-Phe D-His D-Glu D-Met D-Ser D-Tyr D-Ser (SEQ ID NO:7).

10

Bazı düzenlemelerde, burada sağlanan polipeptidler PEGile edilmiştir.

Bazı düzenlemelerde, burada sağlanan bileşikler bir biyolojik olarak aktif parçaya konjuge edilebilir.

15

Bazı düzenlemelerde, burada sağlanan bileşikler MC1R'yi seçici bir şekilde bağlar. Bazı düzenlemelerde, bileşikler aşağıdaki özelliklerden en azından birini sergiler: MC1R'yi seçici bir şekilde aktive etme kabiliyeti, *in vitro* plazmada stabilite ve proteaz bozulmasına direnç.

20

Bir bakış açısında, burada sağlanan, burada sağlanan büyük ölçüde saf bileşiklerden herhangi birini ve bir farmasötik olarak kabul edilebilir ekspiyanı içeren bir farmasötik bileşimdir.

25

Başka bakış açısında, burada sağlanan, buna ihtiyacı olan bir denekteki bir otoimmün hastalığın veya durumun tedavi edilmesinin, söz konusu deneğe bir farmasötik olarak kabul edilebilir ekspiyanı ve burada sağlanan bir bileşiğin bir terapötik olarak etkili miktarını içeren bir farmasötik bileşimin uygulanmasını içeren bir yöntemidir. Bazı düzenlemelerde, otoimmün hastalık veya durum multipl skleroz, diyabet tip I, aplastik anemi, Grave hastalığı, çölyak hastalığı, Crohn hastalığı, lupus, artrit, osteoartrit, otoimmün üveit ve miyastenia gravisinden oluşan gruptan seçilir.

30

Yine başka bakış açısında, burada sağlanan, buna ihtiyacı olan bir denekteki iltihabın tedavi edilmesinin, söz konusu deneğe bir farmasötik olarak kabul edilebilir eksipiyan ve burada sağlanan bir bileşiğin bir terapötik olarak etkili miktarını içeren bir farmasötik bileşimin uygulanmasını içeren bir yöntemidir. Bazı düzenlemelerde, iltihap, iltihaplı 5 bağırsak hastalığı, romatoid artrit, alerji, ateroskleroz, sedef hastalığı, gastrit ve iskemik kalp hastalığından oluşan gruptan seçilen bir hastalık ile ilişkilidir.

Bir bakış açısında, burada sağlanan, buna ihtiyacı olan bir denekteki transplant reddini azaltmak veya inhibe etmek üzere söz konusu deneğe bir farmasötik olarak kabul edilebilir eksipiyan ve burada sağlanan bir bileşiğin bir terapötik olarak etkili miktarını 10 içeren bir farmasötik bileşimin uygulanmasını içeren bir yöntemdir.

Başka bakış açısında, burada sağlanan, buna ihtiyacı olan bir denekteki melanomu tedavi etmek üzere söz konusu deneğe bir farmasötik olarak kabul edilebilir eksipiyan ve burada sağlanan bir bileşiğin bir terapötik olarak etkili miktarını içeren bir 15 farmasötiğin uygulanmasını içeren bir yöntemdir.

Yine başka bakış açısında, burada sağlanan, buna ihtiyacı olan bir denekte melanomu tedavi etmek üzere, söz konusu deneğe bir farmasötik olarak kabul edilebilir eksipiyan ve bir anti-tümör yüküne konjuge edilmiş burada sağlanan bir bileşiği içeren bir 20 konjugatın bir terapötik olarak etkili miktarını içeren bir farmasötiğin uygulanmasını içeren bir yöntemdir. Anti-tümör yükü bir radyonüklid, bir radyo duyarlılaştırıcı, bir ışık duyarlılaştırıcı, bir kemoterapötik ajan veya bir toksin olabilir.

25 Bir başka bakış açısında, burada sağlanan, burada sağlanan bir bileşiğin farmasötik bileşimini ve isteğe bağlı olarak kullanıma yönelik talimatları içeren bir kittir.

Şekillerin Kısa Açıklaması

30 **Şekil 1**, üveitin natif α -MSH tarafından azalmasını gösterir. **Şekil 1A**, klinik puanlar 2-3 olduğunda, günlük natif α -MSH (100 μ g/fare) IV ile tedavi edilen B10.RIII farelerden gelen verileri gösterir. Üveit, tedavi edilmemiş kontrol ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde azaltılmıştır ($p < 0.01$). **Şekil 1B**, klinik puanlar 1-2 ($n=5$) olduğunda günlük natif α -MSH (100 μ g/fare) IP veya deksametazon IP (0.2 mg/kg veya 2.0 mg/kg) ile tedavi

edilmiş B10.RIII farelerden gelen verileri gösterir. Tedavi başlangıcından sonra retinal iltihap azaltılmıştır ($p < 0.05$). Yıldız işareti, kontrolden gelen önemli farklılıkları gösterir.

Şekil 2, geç aşama hastalığında üveitin RI α -MSH ve natif α -MSH ile düzelmesini göstermektedir. EAU, B10.RIII farelerinde indüklenmiştir ve 100 μ g/fare natif α -MSH, RI α -MSH veya PBS, fareler geç aşamalı hastalığa ulaştığında (3 puan) günlük, i.v., 12 günde uygulanmıştır. **Şekil 2A**, natif α -MSH veya retro-RI α -MSH ile tedavi edilen farelerden gelen verilerin PBS kontrol fareleri ile karşılaştırıldığında, üveit hastalığı göz puanlarında azalma gösterdiğini gösterir. **Şekil 2B**, EAU indüksiyonundan sonraki 16. günde her bir gruptaki farelerin bireysel maksimum göz puanlarını gösterir ($n=8$). Yıldız işareti gruplar arasındaki önemli farkları gösterir ($p < 0.05$).

Şekil 3, α -MSH veya RI α -MSH ile tedavi edilen hayvanlardan retina görüntülerini ve bireysel göz puanlarını gösterir. EAU, B10.RIII farelerde indüklenmiştir ve günlük i.v. 100 μ g/fare natif α -MSH, RI α -MSH veya PBS ile tedavi, fareler geç aşamadaki hastalığa ulaştığında 13. günde başlamıştır. 13 günlük tedaviden sonra her bir gruptan medyan göz puanlarını temsil eden retinaların fundoskopik görüntüleri gösterilir ($n=11$). Bir 3'lük göz puanına sahip olan PBS ile tedavi edilen fare, gözün birkaç kadranında iltihaplı lezyonları ve optik sinire yakın vaskülitleri gösterir (**Şekil 3A**). 1'lik göz puanlarına sahip α -MSH ve RI α -MSH ile tedavi edilmiş fareler sadece optik sinir çevresinde iltihaba sahip üveit çözünürlüğünü gösterir (sırasıyla, **Şekiller 3B ve 3C**). Retinalar her bir gruptan medyan göz puanını temsil eder. Tedavi sonrası 13. günde her bir gruptaki farelerin bireysel göz puanları grafikte gösterilir. Yıldız işareti gruplar arasındaki önemli farkları gösterir ($p < 0.01$).

Şekil 4, EAU'da RI α -MSH ve natif α -MSH ile tedavi edilmiş farelerin histopatolojisini gösterir. Dişi B10.RIII fareleri EAU'yu indüklemek üzere IRBP + CFA enjekte edilmiştir. Fareler, fareler 3 göz puanına ulaştığında günlük i.v., 100 μ g/fare retro-inverso α -MSH, natif α -MSH veya PBS ile tedavi edilmiştir. RI α -MSH veya α -MSH ile tedavi edilen farelerin grubu oküler enflamatuar yanıtını ($p < 0.05$) düzeltmiştir. Fotoğraflar, tedavinin başlangıcından 10 gün sonra, PBS (**Şekil 4A**), α -MSH (**Şekil 4B**) ve RI α -MSH (**Şekil 4C**) ile tedavi edilen fare gruplarından medyan göz puanlarını temsil eden gözlerin bir hematoksilin ve eozin boyamasını gösterir. Büyüme, 100X'tir.

Şekil 5, bir karıştırılmış peptid kontrolü ile karşılaştırıldığında retro-inverso α -MSH'nin intraperitoneal günlük dozunun üveit üzerindeki etkisini gösterir. B10.RIII fareleri, günlük 100 μ g RI α -MSH veya hastalık indüksiyonundan 11 gün sonra bir karıştırılmış D amino asit peptid kontrolü ile intraperitoneal enjeksiyonlarla tedavi edilmiştir. Veriler RI α -MSH (n=4) ve karıştırılmış kontrol peptidi (n=5) ile tedavi edilen fare gruplarının klinik ortalama göz puanlarını gösterir. Fareler bir toplam 13 gün tedavi edilmiştir. Veriler iki deneyin temsilcisidir. Yıldız işareti, gruplar arasındaki önemli farkları gösterir ($p<0.04$).

Şekil 6, RI α -MSH'nin retina iltihabının tedavisindeki etkinliğini gösterir. B10RIII fareleri, klinik puanlar 4 olduğunda günlük IP enjeksiyonları ile RI α -MSH (3, 10 veya 100 μ g/fare) ile tedavi edilmiştir. Karıştırılmış peptid kontrolü günlük 100 μ g/fare ile enjekte edilmiştir. Grafik zaman içindeki klinik puanları gösterir. Azaltılmış retina iltihabı, 100 veya 10 μ g/fare ile tedavinin başlamasından sonra gözlenmiştir. Daha düşük bir RI α -MSH dozu (3 μ g/fare) veya PBS veya kontrol karıştırılmış peptid (n=4) ile tedavi edilen farelerde sınırlı faydalı klinik tepkiler gözlenmiştir. Yıldız işareti gruplar arasındaki önemli farkları gösterir ($p<0.05$).

Şekil 7, RI α -MSH'nin murin melanom hücrelerinde cAMP üretimi üzerindeki etkisini gösterir. cAMP, B16-F1 melanom hücrelerinde, natif α -MSH, retro-inverso α -MSH veya karıştırılmış kontrol peptidi ile 0.01 ng/ml - 1000 ng/ml konsantrasyonlarda tedaviden sonra ölçülmüştür. **Şekil 7A**, natif α -MSH ve RI α -MSH'nin her ikisinin de cAMP seviyelerini önemli ölçüde arttırdığını gösterir. cAMP'yi ölçmek üzere kullanılan kontroller bir 100 μ M konsantrasyonda forkolin içermiştir. **Şekil 7B**, alanin tarama verilerini gösterir. 1 μ g/ml'de RI α -MSH'nin alanin süstitüe edilmiş peptidleri murin B16-F1 melanom hücre hattında cAMP seviyelerindeki artışlara yönelik olarak test edilmiştir. Veriler iki deneyin temsilcisidir. Dizi listesi Tablo 1'de bulunabilir. Yıldız işareti gruplar arasındaki önemli farkları gösterir ($p<0.01$).

Şekil 8, MOG indüklü EAE'nin hastalık seyrini gösterir. EAE, C57BL/6 farelerinde, bir MOG35-55 peptidi (200 μ g/fare) ve CFA emülsiyonunun enjeksiyonu ile indüklenmiştir. Pertusis toksini 0. gün ve 2. günde enjekte edilmiştir. Günlük i.p. 100 μ g/fare α -MSH, RI α -MSH veya PBS ile tedavi 10. günde başlamıştır. **Şekil 8A**, günlük kaydedilen klinik hastalık puanlarını gösterir. **Şekil 8B**, hastalık indüksiyonundan sonra 20. günde her bir gruptaki bireysel hastalık puanlarını gösterir.

Şekil 9, RI α -MSH tarafından ortalama EAE hastalığı puanlarının azaldığını gösterir. EAE, C57BL/6 farelerinde, MOG35-55 peptidi (200 μ g/fare) ve CFA emülsiyonu ile enjeksiyonlarla indüklenmiştir. Pertusis toksini 0. günde ve 2. günde enjekte edilmiştir. 5
Günlük i.p. 100 μ g veya 30 μ g/fare α -MSH veya RI α -MSH, 2 mg/kg deksametazon veya PBS ile tedavi 10. Günde başlamıştır. Klinik hastalık puanları günlük kaydedilmiştir.

Şekil 10, RI α -MSH ile tedavi edilen farelerin omurilik histolojisini gösterir. EAE, 10
C57BL/6 farelerinde, bir MOG35-55 peptidi (200 μ g/fare) ve CFA emülsiyonunun enjeksiyonu ile indüklenmiştir. Pertusis toksini 0. günde ve 2. günde enjekte edilmiştir. Günlük i.p. 100 μ g/fare RI α -MSH ile tedavi 10. günde başlamıştır. Spinal kord, hastalık indüksiyonundan sonra 24. Günde toplanmıştır. Her bir gruptan iki temsili fare gösterilir: PBS ile tedavi edilmiş (**Şekiller 10a ve 10c**) ve RI α -MSH ile tedavi edilmiş (**Şekiller 15
10b ve 10d**). Oklar, iltihaplı hücre infiltrasyon bölgelerini gösterir.

Şekil 11, EAE'nin hastalık fazı sırasında MOG peptid ile hazırlanmış farelerin dalağındaki TNF α ve IL-10 mRNA miktarını gösterir. Fareler 0. günde 200 μ g MOG peptidi ile hazırlanmıştır ve 10-15 günlerde günlük PBS, α -MSH (100 μ g) veya RI α - 20
MSH (100 μ g) ile tedavi edilmiştir. Dalaklar, tedavinin başlangıcından sonra 1. (**Şekiller 11a ve 11b**), 4. (**Şekiller 11c ve 11d**) ve 7. (**Şekiller 11e ve 11f**) Günlerde toplanmıştır ve TNF α ve IL-10 mRNA ekspresyonuna yönelik olarak kantitatif PCR ile analiz edilmiştir. Veriler, her bir tedavi grubunda 4 farenin ortalamasını gösterir. RNA seviyeleri β -aktin'e normalize edilir.

25

Şekil 12, MOG 35-55 peptidine yeniden çağırma yanıtını gösterir. Fareler, 0. günde 200 μ g MOG35-55 peptidi ile hazırlanmıştır. 2-8. Günlerde fareler, i.p. PBS, 100 μ g α -MSH veya 100 μ g RI α -MSH (n=5) ile enjekte edilmiştir. 9. günde dalak (**Şekil 12a**) ve lenf düğümü (**Şekil 12b**) hücreleri toplanmıştır ve *in vitro* 25 μ g/ml MOG35-55 peptidi 30
veya OVA peptidi ile uyarılmıştır. Hücreler [3H] timidin ile 3. günde kültürde nabızlanmıştır. Veriler ortalama $\pm$ SD'yi gösterir. Süpernatant, 24 saat sonra MOG peptidi ile uyarılmış dalak hücre kültürlerinden toplanmıştır ve sitokin TNF- α ve IFN γ (**Şekil 12c**) ve MCP-1 (**Şekil 12d**) seviyeleri akış sitometrisi ile analiz edilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ SD'yi gösterir. Natif fareler MOG peptidi hazırlanmamıştır.

35

Şekil 13, MOG prime edilmiş farelerde RI α -MSH işleminden sonra serum ve dalaktaki sitokin profillerini gösterir. Fareler, 0. günde 200 μ g MOG35-55 peptidi ile hazırlanmıştır. 2-8. Günlerde fareler i.p. PBS, 100 μ g α -MSH veya 100 μ g RI α -MSH (n=5) enjekte edilmiştir. 9. günde dalak ve serum toplanmıştır. **Şekiller 13a ve 13b**, sırasıyla gerçek zamanlı PCR ile ölçülen dalaktaki TNF- α ve IL-10 mRNA seviyelerini gösterir. Veriler, her bir tedavi grubunda 4 farenin ortalamasını gösterir. RNA seviyeleri β -aktin'e normalize edilir. Serum aynı zamanda sitokin seviyelerine yönelik olarak akım sitometrisi ile de analiz edilmiştir. **Şekil 13c**, TNF- α , MCP-1, IL-6 serum seviyelerini gösterir ve **Şekil 13d**, IL-10 ve IL-12 serum seviyelerini gösterir. Natif fareler MOG peptidi ile hazırlanmamıştır. Veriler ortalama $\pm$ SD'yi gösterir.

Şekil 14, α -MSH ve RI α -MSH'nin makrofaj markörleri üzerindeki etkisini gösterir. Fareler, *in vivo* MOG peptidi ile hazırlanmıştır ve günlük 1-7. günlerde α -MSH veya RI α -MSH (100 μ g/fare) ile tedavi edilmiştir. Splenik makrofajlar, CD14, CD40 ve CD86'nın ekspresyon seviyelerine yönelik olarak akış sitometrisi ile analiz edilmiştir. Hücreler, CD11b⁺ (**Şekil 14a**) veya F4/80⁺ (**Şekil 14b**) makrofaj hücre popülasyonu üzerine aralıklandırılmıştır. Veriler, aralıklandırılmış makrofaj popülasyonunun ortalama pozitif yüzdesinin her ikisini de gösterir (n=5).

Şekil 15, peritoneal makrofajlar (**Şekil 15a**) ve dalağın (**Şekil 15b**) her ikisinde de mMC1R mRNA seviyelerinin bir LPS indüklü artışını gösterir. C57BL/6 fareleri (n=4) i.p. LPS ile (1 μ g/fare) enjekte edilmiştir. Peritoneal makrofajlar ve dalak, 0.5 saat, 1 saatve 24 saat toplanmıştır. mMC1R mRNA seviyeleri gerçek zamanlı PCR ile ölçülmüştür. RNA seviyeleri 18 s'ye normalize edilmiştir.

Şekil 16, MSH'nin etkisinin bir *in vivo* LPS iltihap modeli olduğunu gösterir. C57BL/6 fareleri 1 μ g LPS ile, i.p. enjekte edilmiştir. 30 dakika sonra, fareler Deksametazon (2 mg/kg) ve α -MSH (**Şekiller 16a-16c**) veya RI α -MSH analog 891 (**Şekiller 16d-16f**), ile i.p. tedavi edilmiştir. Serum LPS meydan okumasından 2 saat sonra toplanmıştır. TNF- α (**Şekiller 16a ve 16d**), MCP-1 (**Şekiller 16b ve 16e**) ve IL-10 (**Şekiller 16c ve 16f**) seviyeleri, akış sitometrisi ile sitometrik boncuk analizi ile analiz edilmiştir. Veriler bireysel sitokin ölçümlerini ve her bir grubun ortalamasını gösterir (n=6).

Şekil 17, RI- α -MSH ve α -MSH'nin plazma ve serumdaki stabilitesini gösterir. **Şekil 17A**, 37 °C'de plazma ve PBS'de RI- α -MSH ve α -MSH peptid stabilitesini gösterir.

Şekil 17B, bir tek intravenöz enjeksiyondan sonra RI- α -MSH ve α -MSH peptidinin serum yarı ömrünü gösterir.

Şekil 18, MSH (**Şekil 18A**) ve RI-MSH'nin (**Şekil 18B**) melanokortin reseptörleri 1, 3, 4 ve 5'e bağlanma çalışmalarının sonuçlarını gösterir.

Şekil 19, çekirdek tetrapeptid HfRW ve retroinverso MSH'nin ters çevrilmesini gösterir.

Şekil 20, doğal olmayan amino asit kalıntılarının çeşitlilik gösteren RI-MSH pozisyonlarındaki süstitüsyonunu gösterir.

Şekil 21, RI-MSH ve bunun MC1R'deki varyasyonlarının bir temsili rekabetçi bağlanma analizini gösterir.

Şekil 22, RI α -MSH analoglarının B16 F1 murin melanom hücrelerinde cAMP seviyeleri üzerindeki etkisini gösterir. **Şekil 22A**: Analoglar 890, 891 ve 892; **Şekil 22B**: Analoglar 893, 894 ve 895; **Şekil 22C**: Analoglar 880, 886 ve 878; ve **Şekil 22D**: Analoglar 872, 878 ve 869.

Buluşun Detaylı Açıklaması

Tanımlar

Mevcut yöntemlerin α -MSH ve MC1R proteinleri ve nükleik asitleri, bir belirli kaynak veya tür ile sınırlı değildir. Böylece, proteinler ve nükleik asitler izole edilebilir veya rekombinant olabilir.

α -Melanosit uyarıcı hormon (α -MSH), Ser Tyr Ser Met Glu His Phe Arg Trp Gly Lys Pro Val (SEQ ID NO: 8) (SYSMEHFRWGKPV) dizisini içeren bir polipeptittir. α -MSH anti-enflamatuar ve immünodüzenleyici kapasitelere yönelik olarak yakın zamanda incelenmiştir. α -MSH, proopiomelanokortin hormonunun (POMC) hücre içi proteolitik bölünmesinden kaynaklanır. α -MSH nöropeptid birkaç organda tespit edilmiştir ve nöronlar, hipofiz bezi, bağırsak, cilt ve bağışıklık hücreleri tarafından üretilir. α -MSH'nin efektör T hücre fonksiyonunu baskıladığı, düzenleyici T hücrelerini indüklediği ve otoimmün ve transplant modellerinde faydalı etkilere sahip olduğu bildirilmiştir.

"Konjugat" veya "konjugat", birbirleri ile tutturulmuş, birleştirilmiş, bağlanmış, karıştırılmış veya başka şekilde ilişkili iki veya daha fazla üye içerir. Üyeler birbirlerine kovalent bağlar, iyonik bağlar, elektrostatik, hidrojen gövdesi, van der Waals etkileşimleri veya fiziksel araçlar ile bağlanabilir.

"Biyolojik olarak aktif" parçalar, bir fizyolojik yanıtı ortaya çıkaran veya düzenleyen bir molekülü veya bileşiği içerir. Bir bakış açısında, bir biyolojik olarak aktif bileşik, melanokortin reseptörlerini, tercih edildiği üzere MC1-reseptörlerini uyandırır.

10

"Düzenlemek" ve "düzenleme" ile, bir veya daha fazla proteinin veya protein alt ünitesinin aktivitesinin ekspresyon, seviye veya aktivitenin düzenleyicisinin yokluğunda gözlemlenenden daha büyük veya daha az olacağı şekilde arttırarak düzenlendiği veya azaltarak düzenlendiği kastedilir. Örneğin, "düzenlemek" terimi "inhibe etmek" veya "uyarmak" anlamına gelebilir.

15

"C-terminal dizisi", tipik olarak, ancak zorunlu olmayarak bir karboksil grubu tarafından sonlandırılan amino asit zincirinin sonuna referansı içerir. Peptid dizilerinin yazılmasına yönelik anlaşma, C-terminal ucunun sağa konulması ve dizinin N'-den C- terminusuna yazılmasıdır. C-terminal dizisi 1 ila 100 amino asit, tercih edildiği üzere 2 ila 15 amino asit ve daha bile fazla tercih edildiği üzere 3 ila 10 amino asit içerebilir. C-terminal dizisi bir karboksil grubu ile sona erebilir veya terminus bir fonksiyonel üye (*örneğin*, hedefleme grubu, tutma sinyali, lipid ve ankraj) içermek üzere teknikte iyi bilinen yöntemler tarafından modifiye edilebilir.

25

Mevcut buluş bir "büyük ölçüde saf bileşik" sağlar. "Büyük ölçüde saf bileşik" terimi burada, diğer proteinler, lipidler, karbonhidratlar, nükleik asitler ve doğal olarak ilişkili olduğu diğer biyolojik materyallerden büyük ölçüde arınmış olan bir polipeptid (*örneğin*, MC1R'yi bağlayan bir polipeptid veya bunun bir fragmanı) gibi bir molekülü açıklamak üzere kullanılır. Örneğin, bir polipeptid gibi bir büyük ölçüde saf molekül kuru ağırlıkça ilgi konusu molekülün en azından %60'ı olabilir. Polipeptidlerin saflığı, *örneğin* poliakrilamid jel elektroforezi (*örneğin*, SDS-PAGE), kolon kromatografisi (*örneğin*, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)) ve amino-terminal amino asit dizisi analizi dahil olmak üzere standart yöntemler kullanılarak belirlenebilir.

35

Bir düzenlemede, "seçici bir şekilde bağlar" ifadesi, mevcut buluşta yapılan veya kullanılan bir bileşik veya polipeptidin, iki veya daha fazla reseptörün (*örneğin* melanokortin reseptörleri, MC1, MC2, MC3, MC4, MC5 reseptörleri) bir karışımının varlığında olduğunda tercihli olarak bir başka reseptör tipi üzerinde bir reseptör tipine
5 bağlandığı anlamına gelir.

"Amino asit" veya "amino asit dizisi", bir oligopeptid, peptid, polipeptid veya protein dizisini veya bunlardan herhangi birinin bir fragmanını, kesitini veya alt ünitesini ve doğal olarak meydana gelen veya sentetik molekülleri içerir. "Polipeptid" ve "protein"
10 terimleri, birbirlerine peptid bağları veya modifiye edilmiş peptid bağları, *diğer bir ifadeyle* peptid izosterleri ile birleştirilmiş amino asitleri içerir ve 20 gen kodlu amino asit dışındaki modifiye edilmiş amino asitleri içerebilir. "Polipeptid" terimi aynı zamanda peptidleri ve polipeptid fragmanlarını, motifleri ve benzerlerini de içerir. Amino asitlerin büyük harfli, tek harfli kısaltmaları doğal L-izomerine refere eder. Amino asitlerin küçük
15 harfli, tek harfli kısaltmaları D-izomerini belirtir.

"Polipeptid", "peptid" ve "protein" terimleri, herhangi bir uzunluktaki amino asitlerin polimerlerine refere etmek üzere birbirlerinin yerine geçecek şekilde kullanılır. Peptidler ve polipeptidler tamamen sentetik, doğal olmayan amino asit analoglarından oluşabilir
20 veya kısmen doğal peptid amino asitlerin ve kısmen doğal olmayan amino asit analoglarının bir kimerik molekülüdür. Bir bakış açısında, buluşun bir bileşiminde, hücre sisteminde veya işleminde bir polipeptid kullanılır (*örneğin*, buluşun en azından bir enzimini eksprese eden bir plazmide sahip olan bir konakçı hücre). İlave olarak, polipeptid, başka bir fonksiyonel gruba (*örneğin* çözündürücü grup, bir hedefleme
25 grubu, PEG, amino asit olmayan grup veya diğer bir terapötik ajan) kovalent olarak tutturulmuş amino asit polimerlerinden oluşan bileşiklere refere edebilir.

Amino asitler parantezlerdeki aşağıdaki gösterim kullanılarak kısaltılabilir: Prolin (Pro), Valin (Val), Lisin (Lys), Ornitin (Om), Norlösün (Nle), Glisin (Gly), Triptofan (Trp), Alanin
30 (Ala), Fenilalanin (Phe), Arginin (Arg), Histidin (His), Glutamik asit (Glu), Aspartik asit (Asp), Serin (Ser), Metiyonin (Met), İzölösün (Ile), Tirosin (Tyr), Sikloheksilalanin (Cha), 4-floro-D-fenilglisin (4-floro-D-Phg), 2-tienil-D-alanin (D-Thi).

Burada kullanıldığında "tedavi etme", "tedavi eden", "tedavi" veya "terapi", bir
35 memeliye, bireyde bir profilaktik, küratif veya başka yararlı etkiyi ortaya çıkarabilen

ajanların uygulanmasına refere eder. Tedavi etme ilave olarak, bir denekteki bir hastalığın veya bir hastalığın semptomlarının hafifletilmesi veya düzeltilmesi ile de sonuçlanabilir.

- 5 Burada kullanıldığında, "bir", "bir" ve "bu" tekil formları, aksi belirtilmediği sürece çoklu referansları içerir. Örneğin, "bir" hedef hücre bir veya daha fazla hedef hücre içerir.

Buluşun polipeptid bileşimleri doğal olmayan yapısal bileşenlerin herhangi bir kombinasyonunu içerebilir. Bireysel peptid kalıntıları, peptid bağları, diğer kimyasal bağlar veya *örneğin* glutaraldehit, N-hidroksisüksinimit esterler, bifonksiyonel maleimidler, N,N'-disikloheksilkarbodiimid (DCC) veya N,N'-diizopropilkarbodiimid (DIC) gibi bağlama araçları ile birleştirilebilir. Geleneksel amid bağı ("peptid bağı") bağlarına alternatif olabilen bağlantı grupları *örneğin*, ketometilen (*örneğin*, -C(=O)-NH-'e yönelik -C(=O)-CH₂-), aminometilen (CH₂-NH), etilen, olefin (CH=CH), eter (CH₂-O), tiyoeter (CH₂-S), tetrazol, tiyazol, retroamid, tiyoamid veya esteri (bakınız, *örneğin*, buraya referans ile dahil edilen Spatola (1983) in Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins, Vol. 7, pp. 267-357, "Peptide Backbone Modifications," Marcel Dekker, NY) içerir.

20 Buluşun yöntemini uygulamak üzere kullanılan polipeptidler, post-translasyonel işleme (*örneğin*, fosforilasyon, asilasyon, vb.) gibi doğal işlemlerle veya kimyasal modifikasyon teknikleri ile ve ortaya çıkan modifiye polipeptidlerle değiştirilebilir. Modifikasyonlar, peptid omurgası, amino asit yan zincirleri ve amino veya karboksil terminusu dahil olmak üzere polipeptidte herhangi bir yerde meydana gelebilir. Aynı tip modifikasyonun, bir belirli polipeptidte çeşitli bölgelerde aynı veya çeşitlilik gösteren derecelerde mevcut olabileceği kabul edilecektir. Aynı zamanda bir belirli polipeptid, birçok modifikasyon tipine de sahip olabilir. Modifikasyonlar asetilasyon, asilasyon, ADP-ribosilasyon, amidasyon, kovalent flavin tutturma, bir heme parçanın kovalent tutturulması, bir nükleotid veya nükleotid türevinin kovalent tutturulması, bir lipit veya lipit türevinin kovalent tutturulması, bir fosfatidilinositolun kovalent tutturulması, çapraz bağlama siklizasyonu, disülfid bağ oluşumu, demetilasyon, kovalent çapraz bağların oluşumu, sistein oluşumu, pirolutamat oluşumu, formilasyon, gama-karboksilasyon, glikosilasyon, GPI ankor oluşumu, hidroksilasyon, iyodinasyon, metilasyon, miristolasyon, oksidasyon, PEGilasyon, proteolitik işleme, fosforilasyon, prenilasyon, selenolasyon, sülfatlama ve transfer-RNA aracılı amino asitlerin argininasyon gibi

proteine eklenmesini içerir. *Bakınız, örneğin*, buraya referans ile dahil edilen Creighton, T.E., *Proteins - Structure and Molecular Properties* 2nd Ed., W.H. Freeman and Company, New York (1993); *Posttranslational Covalent Modification of Proteins*, B.C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, pp. 1-12 (1983).

5

Bileşiklerin ilave düzenlemeleri

Bazı düzenlemelerde, burada sağlanan buluş, melanokortin 1 reseptörünü (MC1R) seçici bir şekilde bağlayan bir büyük ölçüde saf bileşiktir veya bunun bir farmasötik olarak kabul edilebilir tuzudur, söz konusu bileşik aşağıdaki diziye sahip olan bir polipeptidi içerir:

Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ Xaa₆ Xaa₇ Xaa₈ Xaa₉ Xaa₁₀ Xaa₁₁ Xaa₁₂ Xaa₁₃,
burada Xaa₁ D-Val, D-Ala veya D-Lys'dir;
15 Xaa₂ D-Pro, D-Ala veya D-Lys'dir;
Xaa₃ D-Lys, D-Orn, D-Nle, D-Ala veya D-Lys'dir;
Xaa₄ Gly veya D-Ala'dır;
Xaa₅ D-Trp, Trp, D-3-benzotienil-Ala, D-5-hidroksi-Trp, D-5-metoksi-Trp, D-Phe veya D-Ala'dır;
20 Xaa₆ D-Arg, D-His veya D-Ala'dır;
Xaa₇ D-Cha, D-Phe, Phe, D-4-floro-Phg, D-3-piridil-Ala, D-Thi, D-Trp, D-4-nitro-Phe veya D-Ala'dır;
Xaa₈ D-His, His, D-Arg, Phe veya D-Ala'dır;
Xaa₉ D-Glu, D-Asp, D-sitrülin, D-Ser veya D-Ala'dır;
25 Xaa₁₀ D-Met, D-bütyonin, D-Ile veya D-Ala'dır;
Xaa₁₁ D-Ser, D-Ile veya D-Ala'dır;
Xaa₁₂ D-Tyr, D-Ser veya D-Ala'dır;
Xaa₁₃ D-Ser veya D-Ala.

30 Bazı düzenlemelerde, burada sağlanan peptid analogları veya bunun bir farmasötik olarak kabul edilebilir tuzu MC1R'yi seçici bir şekilde bağlar ve aşağıdaki diziye sahip olan bir polipeptidi içerir: Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ Xaa₆ Xaa₇ Xaa₈ Xaa₉ Xaa₁₀ Xaa₁₁ Xaa₁₂ Xaa₁₃, burada Xaa₁ D-Val'dır; Xaa₂ D-Pro'dur; Xaa₃ D-Lys, D-Orn veya D-Nle'dir; Xaa₄ Gly'dir; Xaa₅ D-Trp, Trp, D-3-benzotienil-Ala, D-5-hidroksi-Trp, D-5-metoksi-Trp veya D-Phe'dir; Xaa₆ D-Arg veya D-His'dir; Xaa₇ D-Cha, D-Phe, Phe, D-4-floro-Phg, D-

35

3-piridil-Ala, D-Thi, D-Trp veya D-4-nitro-Phe'dir; Xaa₈ D-His, His, D-Arg, Phe veya D-Ala'dır; Xaa₉ D-Glu, D-Asp, D-sitrülin veya D-Ser'dir; Xaa₁₀ D-Met, D-bütiyonin veya D-Ile'dir; Xaa₁₁ D-Ser veya D-Ile'dir; Xaa₁₂ D-Tyr veya D-Ser'dir; Xaa₁₃ D-Ser'dir; burada birden fazla Xaa₁₋₁₃ bir L-amino asidi değildir.

5

Diğer düzenlemelerde, burada sağlanan peptid analogları veya bunun bir farmasötik olarak kabul edilebilir tuzu, aşağıdaki diziye sahip olan bir polipeptidi içerir: Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ Xaa₆ Xaa₇ Xaa₈ Xaa₉ Xaa₁₀ Xaa₁₁ Xaa₁₂ Xaa₁₃, burada Xaa₁ D-Val'dir; Xaa₂ D-Pro'dur; Xaa₃ D-Lys, D-Orn veya D-Nle'dir; Xaa₄ Gly'dir; Xaa₅ D-Trp veya Trp'dir; Xaa₆ D-Arg'dir; Xaa₇ D-Cha, D-Phe, Phe veya D-Thi'dir; Xaa₈ D-His veya His'dir; Xaa₉ D-Glu veya D-Ser'dir; Xaa₁₀ D-Met, D-bütiyonin veya D-Ile'dir; Xaa₁₁ D-Ser veya D-Ile'dir; Xaa₁₂ D-Tyr veya D-Ser'dir; Xaa₁₃ D-Ser'dir; burada birden fazla Xaa₁₋₁₃ bir L-amino asidi değildir.

10

15 Burada sağlanan bileşikler α -Melanokortin Uyarıcı Hormonun (α -MSH) peptid analoglarını içerir.

Bir alternatif düzenlemede, peptid analogları D-amino asitlerden oluşur. Diğer düzenlemelerde, peptidler D amino asitlerini, L amino asitlerini veya D ve L amino asitlerinin bir karışımını içerir. Diğer düzenlemelerde, peptidler en azından %40, %50, %60, %70, %80, %90 veya %100 D amino asitlerinden oluşur. Buluşun bileşikleri aynı zamanda aşağıdaki standart olmayan amino asitlerin sınırlayıcı olmayan örneklerini de dahil edebilir: D-ornitin, D-norlösin, 3-benzotienil-D-alanin, 5-hidroksi-D-Trp, 5-metoksi-D-Trp, 4-floro-D-fenilglisin (4-floro-D-Phg), 3-piridil-D-alanin, 2-tienil-D-alanin (D-Thi), D-sikloheksilalanin (D-Cha), 4-nitro-D-Phe, D-sitrülin, α -metil-D-Met ve D-bütiyonin.

20

25

Bazı düzenlemelerde, çekirdek tetrapeptid, tercih edildiği üzere D-amino asit konfigürasyonunda, amino asit dizisi His Phe Arg Trp veya Trp Arg Phe His'den oluşur. Başka bir düzenlemede, çekirdek tetrapeptid, tercih edildiği üzere D-amino asit konfigürasyonunda, amino asit dizisi His D-Cha Arg Trp veya Trp Arg D-Cha His'den oluşur. Bazı düzenlemelerde, çekirdek tetrapeptid, 4 D-amino asitten oluşur. Diğer düzenlemelerde, çekirdek tetrapeptid en azından bir standart olmayan amino aside sahiptir.

30

Burada sağlanan bileşikler sentetik veya rekombinant olabilir. Buluşun bileşikleri, teknikte bilinen geleneksel kimyasal tekniklerle imal edilebilir. Katı faz sentezi yöntemleri, Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach (E. Atherton, *et al.* 1989) gibi yayınlanmış literatürde açıklanır. Buluşun bileşikleri aynı zamanda teknikte

5 bilinen geleneksel moleküler biyolojik teknikler ile de imal edilebilir. Bu başvuru içerisinde, aksi belirtilmediği sürece, bu başvurunun tekniklerinin terimlerinin ve gösterimlerinin açıklamaları aşağıdakiler gibi birkaç iyi bilinen referansların herhangi birinde bulunabilir: Sambrook, J., *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Goeddel, D., ed., Gene Expression

10 Technology, Methods in Enzymology, 185, Academic Press, San Diego, CA (1991); "Guide to Protein Purification" in Deutscher, M.P., ed., Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, CA (1989); Innis, *et al.*, PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, San Diego, CA (1990); Freshney, R.I., Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 2nd Ed., Alan Liss, Inc. New

15 York, NY (1987); Murray, E.J., ed., Gene Transfer and Expression Protocols, pp. 109-128, The Humana Press Inc., Clifton, NJ and Lewin, B., Genes VI, Oxford University Press, New York (1997). Alıntı yapılan referansların tümü, referans ile buraya tamamen dahil edilir.

20 Bazı düzenlemelerde, burada sağlanan peptid analogları, melanokortin 1 reseptörünü (MC1R) seçici bir şekilde bağlar veya aktive eder. MC1R'nin bağlanması veya aktivasyonunu ölçmek üzere herhangi bir uygun analiz kullanılabilir. Örneğin, MC1R aktivasyonunu değerlendirmek üzere *in vitro* cAMP indüksiyonu kullanılabilir. *In vitro* değerlendirme, *in vivo* aktivasyonu gösterebilir. Bu buluşun ilave düzenlemeleri, MC1

25 reseptörlerine yönelik olarak seçici herhangi bir polipeptid içerir. Bir seçici MC1 reseptör bileşiğinin tanımlanması, bir elverişli tarama analizi ile belirlenebilir. Bir MC1 reseptörü bağlama analizinin bir sınırlayıcı olmayan örneği, Örnek 4'te açıklanır. Bazı düzenlemelerde, tercih edilen MC1 reseptörleri, *homo sapiens*lerden bir melanokortin 1 reseptörü içerir (GenBank Erişim No: NP_002377).

30

Buluşun diğer düzenlemeleri, cAMP, nitrik oksit (NO), TNF- α , TNF- α mRNA, IL-10 mRNA, IL-10, IFN γ , IL-6, IL-12 ve/veya MCP-1 seviyelerini düzenleyen bileşiklere yöneliktir. Bazı düzenlemelerde, bileşikler cAMP seviyelerini artırır. Başka düzenlemelerde bileşikler, nitrik oksit (NO), TNF- α , TNF- α mRNA, IL-10 mRNA, IL-10,

35 IFN γ , IL-6, IL-12 ve/veya MCP-1 seviyelerinin azaltılması veya inhibisyonuna yöneliktir.

Yukarıda bahsedilen seviyeleri düzenleyen bileşiklerin kimliği, tarama analizleri yoluyla belirlenebilir. Teknikte bilinen kabul edilebilir analizler, yukarıda bahsedilen seviyeleri ölçmek üzere kullanılabilir. Bu seviyelerin istenilen düzenlemesini sergileyen bileşiklerin tanımlanmasına yönelik olarak sınırlayıcı olmayan analiz örnekleri örneklerde açıklanır.

5

Bazı düzenlemelerde, bu buluşun bileşikleri, bir alternatif hareket mekanizması ile immün yanıtı ve iltihabını düzenleyebilir ve burada açıklanan mekanizmalarla sınırlı değildir.

- 10 Bazı düzenlemelerde, burada sağlanan peptidler iyileştirilmiş plazma stabilitesine ve proteaz bozulmasına karşı dirence sahiptir. Plazma stabilitesi ve proteaz bozulmasına karşı direnç herhangi bir uygun yöntemle analiz edilebilir. Sınırlayıcı olmayan bir örnek Örnek 19'da açıklanmıştır. *In vitro* değerlendirme, performans, iyileştirilmiş direnç ve *in vivo* bir daha uzun yarı ömür gösterebilir.

15

Burada sağlanan yöntemler *in vivo*, *ex vivo* veya *in vitro* uygulanabilir.

PEGile edilmiş peptidler

- 20 Bazı düzenlemelerde, peptidler peptidin yarı ömrünü arttırmak üzere modifiye edilir. Bazı düzenlemelerde, peptid PEGile edilir. Bazı düzenlemelerde, PEGile edilmiş peptidler bir veya daha fazla polietilen glikol (PEG) polimer zincirine kovalent olarak tutturulmuş veya konjuge edilmiş peptidlere yöneliktir. PEG polimer zincirleri modifiye edilmiş, fonksiyonelleştirilmiş veya başka türlü türevlendirilmiş PEG zincirlerini
- 25 içerebilir. Başka bir düzenlemede, PEG polimer zinciri en azından bir veya daha fazla dallanma noktasına sahip olabilir. Bazı tercih edilen düzenlemelerde, PEG polimer zincirleri ve karşılık gelen PEGile edilmiş peptid, suda çözünelirdir, çözelti içinde oldukça hareketlidir, toksisite ve immünojeniklikten yoksundur, vücuttan hazır atılıma sahiptir ve vücut içinde değiştirilmiş bir dağılıma sahip olabilir. Bazı tercih edilen
- 30 düzenlemelerde, PEGile edilmiş peptidin farmakokinetik doğası PEG zincirinin tipine göre düzenlenir. PEGile edilmiş peptidlerin hazırlanmasına yönelik stratejiler ve yöntemler, teknikte bilinen yöntemlerle yürütülür (buraya referans ile dahil edilen G. Pasuta and F.M.Veronese (2007) "Polymer-drug conjugation, recent achievements and general strategies" *Progress in Polymer Science* 32(8-9): 933-961). Protein işlemlerinin
- 35 birinci ve ikinci nesil PEGilasyonu teknikte bulunabilir.

Sınırlayıcı olmayan bir PEGilasyon örneği, PEG polimerinin bir veya her iki terminalde (doğrusal PEG'lere yönelik olarak) uygun fonksiyonlaştırılması birinci adımını içerir. Her bir terminusda aynı reaktif parça ile aktive edilen PEG'ler "homobifonksiyonel" olarak bilinir, burada mevcut fonksiyonel grupların farklı olması halinde, bu durumda PEG türevi "heterobifonksiyonel" veya "heterofonksiyonel" olarak refere edilir. PEG polimerinin kimyasal olarak aktif veya aktive edilmiş türevleri, PEG'yi istenen moleküle tutturmak üzere hazırlanır. PEG türevine yönelik olarak uygun fonksiyonel grubun seçimi, PEG'ye bağlanacak olan molekül üzerindeki ulaşılabilir reaktif grubu tipine bağlıdır. Reaktif amino asitlerin sınırlayıcı olmayan örnekleri lizin, sistein, histidin, arginin, aspartik asit, glutamik asit, serin, treonin ve tirozini içerir. Aynı zamanda N-terminal amino grubu ve C-terminal karboksilik asit de kullanılabilir.

Konjugasyona yönelik diğer heterobifonksiyonel PEG'ler aşağıdakilerdir: Bu heterobifonksiyonel PEG'ler, bir hidrofilik, esnek ve biyo-uyumlu aralayıcıya ihtiyaç duyulduğu iki varlığın bağlanmasında çok faydalıdır. Heterobifonksiyonel PEG'lere yönelik olarak tercih edilen uç grupları, maleimid, vinil sülfonlar, piridil disülfür, amin, karboksilik asitler ve N-hidroksisüksinimid (NHS) esterlerdir.

Buluşun bazı düzenlemelerinde, PEGile edilmiş peptid 0.2 kDa-100 kDa arasında bir molekül ağırlık aralığına sahip olabilir. Buluşun tercih edilen bazı düzenlemelerinde, PEGile edilmiş peptid 0.2 kDa-40 kDa arasında bir molekül ağırlık aralığına sahip olabilir. Buluşun tercih edilen bazı düzenlemelerinde, PEGile edilmiş peptid 0.2 kDa-15 kDa arasında bir molekül ağırlık aralığına sahip olabilir. Diğer düzenlemelerde, ticari olarak temin edilebilen PEG'lere yönelik olarak tercih edilen ortalama moleküler ağırlık (Da cinsinden; boyut dışlama kromatografisi ile belirlendiği gibi) <1k, 2k, 3.5k, 5k, 10k, 20k, 30k, 40k ve üzerinden seçilebilir, ancak istenilen farmakokinetiklere bağlı olarak herhangi bir MW olabilir. Örneğin, bağlayıcı olarak kullanılabilen düşük moleküler ağırlıklı heterobifonksiyonel PEG'ler ve düşük moleküler ağırlıklı PEG'ler peptid çözünürlüğünü arttırmak üzere kullanılabilir. PEG aynı zamanda çok kollu, çatallı veya dallanmış olabilir.

Bazı düzenlemelerde, peptid hedefleme moleküllerine veya bir hedefleme molekülü olarak fonksiyona konjuge edilir, burada hedefleme molekülü tercihi olarak bir istenen reseptör ile ilişkilidir. Buluşun bazı tercih edilen düzenlemelerinde, peptid bir sitotoksik

- ajana konjuge edilir. "Sitotoksik ajan" terimi, hücrelerin ekspresyon aktivitesini, hücrelerin fonksiyonunu inhibe eden veya önleyen ve/veya hücrelerin tahribine neden olan bir maddeye refere eder. Terimin, radyoaktif izotop kemoterapötik ajanları ve küçük moleküllü toksinler gibi toksinleri veya bunların fragmanları ve/veya varyantları dahil olmak üzere bakteriyel, fungal, bitki veya hayvan kaynaklı enzimatik olarak aktif toksinler dahil etmesi tasarlanır. Sitotoksik ajanın sınırlayıcı olmayan örnekleri maytansin, dolastatin ve tasidotin ve auristatin dahil olmak üzere bunun analoglarını içerir. Buluşun diğer düzenlemelerde, sitotoksik ajanların sınırlayıcı olmayan örnekleri, bunlarla sınırlı olmamak üzere, At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} ve Lu'nun radyoaktif izotopları gibi radyoizotopların yanı sıra maytansinoidler, itriyum, bizmut, risin, risin A-zinciri, saporin, doksorubisin, daunorubisin, taksol, etidyum bromid, mitomisin, etoposid, tenoposid, vinkristin, vinblastin, kolşisin, dihidroksi antrasin dion, aktinomisin, difteri toksin alt ünitesi A, kesilmiş Psödomonas ekzotoksin (PE) A, PE40, abrin, abrin A zinciri, modesin A zinciri, alfa-sarkin, gelonin, mitojellin, restriktosin, fenomisin, enomisin, kurisin, krotin, kalişeamisin, sapaonaria officinalis inhibitörü ve glukokortikoid ve diğer kemoterapötik ajanları içerir. Antikorlar aynı zamanda, pro-ilacı bunun aktif formuna dönüştürebilen bir kanser karşıtı pro ilaç aktive edici enzime de konjüge edilebilir.
- 20 Peptid, teknikte halen bilinen herhangi bir yöntemle direkt olarak veya dolaylı olarak sitotoksik veya hedefleme ajanına bağlanabilir. Buluşun bazı tercih edilen düzenlemelerinde, peptid, bağlayıcının dahil edilmesi peptidin veya konjuge edilmiş ajanın fonksiyonuna, bağlanmasına, toksisitesine veya dahil edilmesine büyük ölçüde engel olmadığı sürece, bir konjugat oluşturmak üzere bir veya daha fazla bağlayıcı
- 25 tarafından sitotoksik ajana veya hedefleme ajanına bağlanır.

- Sınırlayıcı olmayan bağlayıcı örnekleri, iyonik ve kovalent bağları ve herhangi bir diğer yeterli olarak kararlı birleşmeyi içerir, burada hedeflenen ajan, konjüge edilenin hedeflendiği bir hücre tarafından içselleştirilecektir. Bağlayıcı parça istenen özelliklere
- 30 bağlı olarak seçilir. Bağlayıcı seçiminde dikkate alınacak hususlar, konjuge edilmiş elemanların yakınlığının neden olduğu sterik engelin rahatlatılmasını veya azaltılmasını, konjugatın özgüllük, toksisite, çözünebilirlik, serum stabilitesi ve/veya konjugatın hücre içi ulaşılabilirliği gibi diğer özelliklerinin değiştirilmesini ve/veya bağların esnekliğinin artırılmasını içerebilir. Bağlayıcı herhangi bir tipte bağ olabilir ve

örnekler, her ikisi de buraya tamamen referansla dahil edilen U.S. Patent Noları. 7,166,702 ve 5,194,425'te açıklanır.

Kimyasal olarak bağlanmış konjüglara yönelik olarak uygun olan bağlayıcılar ve
 5 bağlar, bunlarla sınırlı olmamak üzere, disülfid bağları, tiyoeter bağları, engellenmiş
 disülfid bağları ve amin ve tiyol grupları gibi serbest reaktif gruplar arasındaki kovalent
 bağları içerir. Bu bağlar, polipeptidlerin biri veya her ikisi üzerinde reaktif tiyol grupları
 üretmek üzere heterobifonksiyonel reaktifler kullanılarak ve daha sonra bir polipeptid
 üzerindeki tiyol gruplarının, reaktif tiyol grupları veya diğeri üzerinde reaktif maleimido
 10 gruplarının veya tiyol gruplarının tutturulabileceği amin grupları ile reaksiyona
 sokulmasıyla üretilir. Diğer bağlayıcılar, daha asidik hücre içi kompartımanlarda
 bölünecek olan bismaleimidoetoksi propan, asit kararsız transferrin konjugatları ve
 adipik asit dihidrazit gibi asitle bölünebilen bağlayıcıları; UV'ye veya insan IgG1'in sabit
 bölgesinden CH1, CH2 ve CH3 gibi çeşitli domenler gibi görünür ışık ve bağlayıcılara
 15 maruz kalma üzerine bölünen çapraz bağlayıcıları içerir (*bakınız*, buraya referansla
 dahil edilen Batra *et al.* (1993) *Mol. Immunol.* 30:379-386).

Kimyasal bağlayıcılar ve peptid bağlayıcıları, bağlayıcının peptide ve hedefleme veya
 sitotoksik ajana kovalent olarak bağlanmasıyla yerleştirilebilir. Aşağıda açıklanan
 20 heterobifonksiyonel ajanlar, bu tür kovalent bağlamayı etkilemek üzere kullanılabilir.

Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri

Amino grupları ve tiyol grupları arasında kovalent bağlar oluşturmak üzere ve tiyol
 25 gruplarını proteinlere sokmak üzere kullanılan sayısız heterobifonksiyonel çapraz
 bağlama reaktifi bu teknikte uzman olanlarca bilinir (*bakınız, örneğin*, bu tür reaktiflerin
 hazırlanmasını ve kullanımını açıklayan ve bu reaktiflere yönelik olarak bir ticari kaynak
 sağlayan the PIERCE CATALOG, Immuno Technology Catalog & Handbook, 1992-
 1993; *bakınız aynı zamanda* Cumber *et al.* (1992) *Bioconjugate Chem.* 3:397-401;
 30 Thorpe *et al.* (1987) *Cancer Res.* 47:5924-5931; Gordon *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad.*
Sci. USA 84:308-312; Walden *et al.* (1986) *J. Mol. Cell Immunol.* 2:191-197; Carlsson
et al. (1978) *Biochem. J.* 173: 723-737; Mahan *et al.* (1987) *Anal. Biochem.* 162:163-
 170; Wawryznaczk *et al.* (1992) *Br. J. Cancer* 66:361-366; Fattom *et al.* (1992)
Infection & Immun. 60:584-589). Alıntı yapılan referansların tümü buraya tamamen
 35 referansla dahil edilir. Bu reaktifler hedefleme ajanı, kemokin ve hedeflenmiş ajan

- arasında kovalent bağlar oluşturmak üzere kullanılabilir. Bu reaktifler, bunlarla sınırlı olmamakla üzere, aşağıdakileri içerir: N-süksinimidil-3-(2-pirididitiyo)propionat (SPDP; disülfür bağlayıcı); sülfosüksinimidil 6-[3-(2-piridiltiyo)propionamido]heksanoat (sülfo-LC-SPDP); süksinimidiloksikarbonil- α -metil benzil tiyosülfat (SMBT, engellenmiş disülfat bağlayıcı); süksinimidil 6-[3-(2-pirididitiyo)propionamido]heksanoat (LC-SPDP); 5 sülfosüksinimidil 4-(N-maleimidometil)sikloheksan-1-karboksilat (sülfo-SMCC); süksinimidil 3-(2-pirididitiyo)bütirat (SPDB; engellenmiş disülfat bağlayıcı); sülfosüksinimidil 2-(7-azido-4-metilkumarin-3-asetamid) etil-1,3-ditiyopropionat (SAED); sülfosüksinimidil 7-azido-4-metilkumarin-3-asetat (SAMCA); sülfosüksinimidil 10 6-[alfa-metil-alfa-(2-pirididitiyo)toluamido]heksanoat (sülfo-LC-SMPT); 1,4-di-[3'-(2'-pirididitiyo)propionamido]bütan (DPDPB); 4-süksinimidiloksikarbonil- α -metil- α -(2-piridiltiyo) toluen (SMPT, engellenmiş disülfat bağlayıcı); sülfosüksinimidil6[α -metil- α -(2-piridiltiyo)toluamido]heksanoat (sülfo-LC-SMPT); m-maleimidobenzoil-N-hidroksisüksinimid ester (MBS); m-maleimidobenzoil-N-hidroksisülfosüksinimit ester 15 (sülfo-MBS); N-süksinimidil(4-iyodoasetil)aminobenzoat (SIAB; tiyoeter bağlayıcı); sülfosüksinimidil (4-iyodoasetil) amino benzoat (sülfo-SIAB); süksinimidil-4-(p-maleimidofenil)bütirat (SMPB); sülfosüksinimidil-4-(p-maleimidofenil)bütirat (sülfo-SMPB); azidobenzoil hidrazit (ABH).
- 20 Diğer heterobifonksiyonel bölünebilir çapraz bağlayıcılar, N-süksinimidil (4-iyodoasetil)-aminobenzoat; sülfosüksinimidil (4-iyodoasetil)-aminobenzoat; 4-süksinimidil-oksikarbonil- α -(2-pirididitiyo)-toluen; sülfosüksinimidil-6-[α -metil- α -(2-piridiltiyo)-toluamido]heksanoat; N-süksinimidil-3-(2-piridiltiyo)-propionat; süksinimidil 6[3-(2-piridiltiyo)-propionamido]heksanoat; sülfosüksinimidil 6[3-(2-piridiltiyo)-propionamido]heksanoat; 3-(2-piridiltiyo)-propionil hidrazit, Ellman reaktifi, 25 diklorotriazinik asit, S-(2-tiyopiridil)-L-sistein içerir. Diğer örnekleyici bifonksiyonel bağlantı bileşikler, tümü buraya referansla tamamen dahil edilmiş olan U.S. Patent Noları. 5,349,066, 5,618,528, 4,569,789, 4,952,394 ve 5,137,877'de açıklanır.

30 **Asitle Bölünebilir, Fotobölünebilir ve Isıya Duyarlı Bağlayıcılar**

- Aynı zamanda asitle bölünebilir bağlayıcılar, fotobölünebilir ve ısıya duyarlı bağlayıcılar da, özellikle hedeflenen ajanın bunun reaksiyona daha kolay bir şekilde erişilebilir olmasına izin vermek üzere bölünmesinin gerekli olduğu durumda kullanılabilir. Asitle 35 bölünebilir bağlayıcılar, bunlarla sınırlı olmamak üzere, bizmaleimidoetoksi propan; ve

adipik asit dihidrazit bağlayıcıları (*bakınız, örneğin, buraya referansla dahil edilen Fattom et al. (1992) Infection & Immun. 60:584-589*) ve hücre içi transferrin döngüleme yolağına girişe izin vermek üzere yeterli miktarda bir transferrin kesiti içeren asit kararsız transferrin konjugatlarını (*bakınız, örneğin, buraya referansla dahil edilen*
 5 *Welhöner et al. (1991) J. Biol. Chem. 266:4309-4314*) içerir.

Fotobölünebilir bağlayıcılar, ışığa maruz kalma üzerine bölünen, böylece ışığa kalma üzerine hedeflenen ajanı serbest bırakan bağlayıcılardır (*bakınız, örneğin, buraya referansla dahil edilen bağlayıcılar Goldmacher et al. (1992) Bioconj. Chem. 3:104-*
 10 *107*). Işığa maruz kalma üzerine bölünen, böylece ışığa kalma üzerine hedeflenen ajanı serbest bırakan fotobölünebilir bağlayıcılar bilinir (*bakınız, örneğin, bir nitrobenzil grubunun sisteine yönelik olarak bir fotobölünebilir koruyucu grup olarak kullanımını açıklayan Hazum et al. (1981) in Pept., Proc. Eur. Pept. Symp., 16th, Brunfeldt, K (Ed), pp. 105-110; hidroksipropilmetakrilamid kopolimeri, glisin kopolimeri, floresan*
 15 *kopolimeri ve metilrodamin kopolimeri dahil olmak üzere suda çözünebilir fotobölünebilir kopolimerleri açıklayan Yen et al. (1989) Makromol. Chem. 190:69-82; yakın UV ışığına (350 nm) maruz kalma üzerine fotolitik bozulmaya uğrayan bir çapraz bağlayıcı ve reaktifi açıklayan Goldmacher et al. (1992) Bioconj. Chem. 3:104-107; ve fotobölünebilir bağlar üreten nitrobenziloksikarbonil klorür çapraz bağlama reaktiflerini*
 20 *açıklayan Senter et al. (1985) Photochem. Photobiol. 42:231-237*). Alıntı yapılan referansların tümü buraya referansla tamamen dahil edilir. Bu tür bağlayıcılar, fiber optik kullanılarak ışığa maruz kalabilen dermatolojik veya oftalmik durumların tedavi edilmesinde belirli kullanıma sahip olacaktır. Konjugatın uygulanmasından sonra, göz veya cilt veya diğer vücut kısımları, hedeflenen parçanın konjugattan serbest
 25 bırakılması ile sonuçlanarak, ışığa maruz kalabilir. Bu tür fotobölünebilir bağlayıcılar, hayvanın vücudundan hızlı atılıma izin vermek üzere hedefleme ajanının çıkarılmasının istendiği teşhis protokolleri ile bağlantılı olarak yararlıdır.

Kimyasal Konjugasyona Yönelik Diğer Bağlayıcılar

30

Diğer bağlayıcılar, tritil bağlayıcıları, özellikle, çeşitli asitlik veya alkalilik derecelerinde terapötik ajanların serbest bırakılmasını sağlayan bir konjugat cinsi üretmek üzere türetilmiş tritil gruplarını içerir. Böylece terapötik ajanın serbest bırakılacağı pH aralığını önceden seçme yeteneği tarafından karşılanan esneklik, bir terapötik ajanın
 35 verilmesine ihtiyaç duyan dokular arasındaki bilinen fizyolojik farklılıklara bağlı olarak

bir bağlayıcının seçilmesine izin verir (*bakınız, örneğin* buraya referansla dahil edilen U.S. Patent No. 5,612,474). Örneğin, tümör dokularının asitliğinin normal dokularinkinden daha düşük olduğu görülür.

5 **Peptid Bağlayıcıları**

Bağlayıcı parçalar peptidler olabilir. Peptid bağlayıcıları konjugatta kullanılabilir. Peptid bağlayıcı tipik olarak yaklaşık 2 ila yaklaşık 60 amino asit kalıntısına, örneğin yaklaşık 5 ila yaklaşık 40 veya yaklaşık 10 ila yaklaşık 30 amino asit kalıntısına sahiptir. Seçilen uzunluk, bağlayıcının dahil edildiği kullanım gibi faktörlere bağlı olacaktır.

Bağlayıcı parça, tek zincirli antikor araştırmasında bilinenler gibi bir esnek aralayıcı amino asit dizisi olabilir. Bu tür bilinen bağlayıcı parçalarının örnekleri, bunlarla sınırlı olmamak üzere, GGGGS, (GGGGS)_n, GKSSGSGSESKS, GSTSGSGKSSEGKG, GSTSGSGKSSEGSGSTKG, GSTSGSGKSSEGKG, GSTSGSGKPGSGEGSTKG, EGKSSGSGSESKEF, SRSSG, SGSSC'yi içerir. AMGRSGGGCAGNRVGSSLSCGGLNLQAM dizisine sahip olan bir difteri toksini tripsin duyarlı bağlayıcı da faydalıdır.

İlave bağlantı parçaları, örneğin, tümünde yayınların buraya referansla dahil edildiği Huston *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:5879-5883, 1988; Whitlow, M., *et al.*, *Protein Engin.* 6:989-995, 1993; Newton *et al.*, *Biochemistry* 35:545-553, 1996; A. J. Cumber *et al.*, *Bioconj. Chem.* 3:397-401, 1992; Ladurner *et al.*, *J. Mol. Biol.* 273:330-337, 1997; ve U.S. Pat. No. 4,894,443'te açıklanır.

Diğer bağlayıcılar, bunlarla sınırlı olmamak üzere aşağıdakileri içerir: katepsin B substratı, katepsin D substratı, tripsin substratı, trombin substratı, subtilisin substratı, Faktör Xa substratı ve enterokinaz substratı gibi enzim substratları; çözünürlük, esneklik ve/veya hücre içi parçalanabilirliği artıran bağlayıcılar (glimser)_n ve (serimgil)_n gibi bağlayıcıları içerir (*bakınız, örneğin*, buraya referansla dahil edilen, konjugatlarda kullanıma yönelik örnekleyici bağlayıcılar sağlayan PCT Başvuru No. WO 96/06641). Bazı düzenlemelerde, her bir bağlayıcının istenen özelliklerinden yararlanmak üzere birkaç bağlayıcı dahil edilebilir.

35 **Konjugatların Hazırlanması**

Bağlanmış hedefli ajanlar ile konjugatlar kimyasal konjugasyon, rekombinant DNA teknolojisi veya rekombinant ekspresyon ve kimyasal konjugasyon kombinasyonları ile hazırlanabilir. Buluşun peptidi ve sitotoksik veya hedefleme ajanı herhangi bir oryantasyonda bağlanabilir ve birden fazla hedefleme ajanı ve/veya hedeflenmiş ajan bir konjugatta mevcut olabilir.

Buluşun bazı tercih edilen düzenlemelerinde, sitotoksik ajan, bir kısa alkil zinciri, polisialik veya hiyalüronik asit, bir polipeptid veya bir PEG dahil olmak üzere bir hidrofilik ve biyouyumlu aralayıcı polimer aracılığıyla peptide bağlanır. Buluşun bazı tercih edilen düzenlemelerinde, sitotoksik ajan, bir bölünebilir bağlayıcı, örneğin katepsinler gibi lizozomal proteazlar tarafından parçalanabilen bir dizi içeren bir disülfid bağı veya peptid aracılığıyla konjuge edilir. Buluşun bazı tercih edilen düzenlemelerinde, aralayıcı peptidin N- veya C- terminusuna tutturulur.

15

Formülasyonlar

Bu formülasyonların veya bileşimlerin hazırlanma yöntemleri, mevcut buluşun bir bileşiğinin taşıyıcı ve isteğe bağlı olarak, bir veya daha fazla yardımcı içerik maddesi ile birleştirilmesi adımını içerir. Genel olarak, bileşimler, mevcut buluşun bir bileşiğinin sıvı taşıyıcılar veya ince bir şekilde bölünmüş katı taşıyıcılar veya her ikisi ile birlikte eşit olarak ve yakın bir şekilde birleştirilmesiyle ve daha sonra, gerekli olması halinde, ürünün şekillendirilmesiyle hazırlanır.

Farmasötik formülasyonlar, farmasötiklerin imalatına yönelik olarak teknikte bilinen herhangi bir yöntemle hazırlanabilir. Bu tür formülasyonlar tatlandırıcı ajanlar, aromalandırıcı ajanlar, renklendirici ajanlar ve koruyucu ajanları içerebilir. Bir formülasyon imalata yönelik olarak uygun olan toksik olmayan farmasötik olarak kabul edilebilir ekşiyanlar ile karıştırılabilir. Bu tür bir "ekşiyan" genel olarak toksik olmayan ve bileşimin diğer bileşenleri ile zararlı bir şekilde etkileşime girmeyen bir büyük ölçüde etkisiz materyale refere eder. Farmasötik olarak kabul edilebilir ekşiyanlar, bunlarla sınırlı olmamak üzere, su, tamponlu salin, polietilen glikol, hyaluronik, gliserol ve etanol gibi sıvıları içerir. Farmasötik olarak kabul edilebilir tuzlar, örneğin trifloroasetat, hidrokloritler, hidrobromitler, fosfatlar, süfatlar ve benzerleri gibi

30

mineral asit tuzları; ve asetatlar, propiyonatlar, malonatlar, benzoatlar ve benzerleri gibi organik asitlerin tuzları buraya dahil edilebilir.

Terapötik ajan, verilmeye yönelik olarak uygun bir ilaç veya farmasötik bileşimde uygulanabilir. Formülasyonlar bir veya daha fazla seyreltici, emülsifiye edici, koruyucu, 5 tampon, ekspiyan, vb. içerebilir ve liyofilize tozlar, spreyler, kremler, losyonlar, jeller olarak bu tür formlar halinde, yamalar üzerinde, implantlarda, vb. sağlanabilir. Oral uygulamaya yönelik farmasötik formülasyonlar, teknikte iyi bilinen farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcılar kullanılarak elverişli ve uygun dozajlarda formüle edilebilir. Bu 10 tür taşıyıcılar, farmasötiklerin, hasta tarafından alınımına uygun tabletler, haplar, tozlar, drajeler, kapsüller, sıvılar, pastiller, jeller, şuruplar, bulamaçlar, süspansiyonlar, vb. olarak birim dozaj formları halinde formüle edilmesine olanak sağlar. Oral kullanıma yönelik farmasötik preparatlar, tabletler veya draje çekirdeklerini elde etmek üzere isteğe bağlı olarak bir ortaya çıkan karışımın öğütülmesiyle ve istenmesi halinde, uygun 15 ilave bileşiklerin ilave edilmesinden sonra granüllerin karışımının işlenmesiyle bir katı ekspiyan olarak formüle edilebilir. Uygun katı ekspiyanlar, *örneğin* laktoz, sukroz, mannitol veya sorbitol dahil olmak üzere şekerleri; mısır, buğday, pirinç, patates veya başka bitkilerden nişasta; metil selüloz, hidroksipropilmetil-selüloz veya sodyum karboksimetilselüloz gibi selüloz; ve arabik ve kitre dahil olmak üzere zamlar; ve 20 proteinler, *örneğin* jelatin ve kolajen içeren karbonhidrat veya protein dolgu maddeleridir. Çapraz bağlı polivinil pirolidon, agar, aljinik asit veya bunların sodyum aljinat gibi bir tuzu gibi parçalayıcı veya çözündürücü ajanlar ilave edilebilir.

Sulu süspansiyonlar, sulu süspansiyonların imalatına yönelik olarak uygun ekspiyanlar 25 ile karışım halinde bir aktif ajan (*örneğin*, bir kimerik polipeptid veya buluşun peptidomimetği) içerebilir. Bu tür ekspiyanlar, sodyum karboksimetilselüloz, metilselüloz, hidroksipropilmetilselüloz, sodyum aljinat, polivinilpirolidon, kitre ve akasya sakızı gibi bir süspanse edici ajanı ve bir doğal olarak meydana gelen fosfatit (*örneğin*, lesitin), bir alkilen oksitin bir yağ asidi (*örneğin*, polioksietilen stearat) ile 30 yoğunlaştırılmasının bir ürünü, etilen oksitin bir uzun zincirli alifatik alkol (*örneğin*, heptadekaetilen oksietanol) ile yoğunlaştırılmasının bir ürünü, etilen oksidin bir yağlı asit ve bir heksitolden türetilmiş bir kısmi ester (*örneğin*, polioksietilen sorbitol mono-oleat) ile yoğunlaştırılmasının bir ürünü veya etilen oksidin yağlı asit ve bir heksitol anhidridden türetilmiş bir kısmi ester ile (*örneğin*, polioksietilen sorbitan mono-oleat) 35 yoğunlaştırılmasının bir ürünü gibi dağıtıcı veya ıslatıcı ajanları içerir. Sulu süspansiyon

aynı zamanda etil veya n-propil p-hidroksibenzoat gibi bir veya daha fazla koruyucu, bir veya daha fazla renklendirici ajan, bir veya daha fazla aromalandırıcı ajan ve sukroz, aspartam veya sakarin gibi bir veya daha fazla tatlandırıcı ajan da içerebilir. Formülasyonlar osmolariteye yönelik olarak ayarlanabilir.

5

Yağ bazlı farmasötikler, buluşun hidrofobik aktif ajanların uygulanmasına yönelik olarak faydalıdır. Yağ bazlı süspansiyonlar bir aktif ajanın (*örneğin*, buluşun bir kimerik bileşimi), fıstık yağı, zeytin yağı, susam yağı veya hindistancevizi yağı gibi bir bitkisel yağ içinde veya sıvı parafin gibi bir mineral yağ; veya bunların bir karışımı içinde süspanse edilmesiyle formüle edilebilir. *Bakınız, örneğin*, buraya referansla dahil edilmiş, biyolojik olarak ulaşılabilirliğin artırılmasına ve oral olarak uygulanan hidrofobik farmasötik bileşiklerin bireyler arası ve bireyler içi değişkenliğinin azaltılmasına yönelik olarak esansiyel yağların veya esansiyel yağ bileşenlerinin kullanılmasını açıklayan U.S. Patent No. 5,716,928 (bakınız aynı zamanda U.S. Patent No. 5,858,401). Yağ süspansiyonları balmumu, sert parafin veya setil alkol gibi bir kalınlaştırıcı ajan içerebilir. Tatlandırıcı ajanlar gliserol, sorbitol veya sukroz gibi bir yenilebilir oral preparasyon sağlamak üzere ilave edilebilir. Bu formülasyonlar askorbik asit gibi bir antioksidanın ilavesiyle korunabilir. Enjekte edilebilir bir yağ aracının bir örneği olarak, *bakınız* buraya referansla dahil edilen Minto (1997) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 281:93-102. Buluşun farmasötik formülasyonları aynı zamanda su içinde yağ emülsiyonları formunda da olabilir. Yağlı faz, yukarıda açıklanan bir bitkisel yağ veya bir mineral yağ veya bunların bir karışımı olabilir. Uygun emülsifiye edici ajanlar akasya sakızı ve kitre gibi doğal olarak meydana gelen sakızları, soya fasulyesi lesitini gibi doğal olarak meydana gelen fosfatitleri, yağ asitleri ve sorbitan mono-oleat gibi heksitol anhidritlerinden türetilmiş esterleri veya kısmi esterleri ve bu kısmi esterlerin polioksietilen sorbitan mono-oleat gibi etilen oksit ile yoğunlaştırılmasının ürünlerini içerir. Emülsiyon aynı zamanda, şuruplar ve iksirler formülasyonunda olduğu gibi tatlandırıcı ajanlar ve aromalandırıcı ajanlar da içerebilir. Bu tür formülasyonlar aynı zamanda bir çökteltici, koruyucu veya renklendirici ajan da içerebilir.

30

Terapötik ajanı içeren bir bileşimin veya ilacın, özellikle peptid, protein, polinükleotit veya diğer benzeri ajanlara yönelik bir stabilizör olarak hizmet veren bir farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcıyı içerebileceği de tasarlanır. Peptidlere yönelik olarak stabilizörler olarak da hareket eden uygun taşıyıcıların örnekleri, sınırlama olmaksızın, dekstroz, sukroz, laktoz, trehaloz, manitol, sorbitol, inositol, dekstran ve benzerlerinin

35

farmasötik derecelerini içerir. Diğer uygun taşıyıcılar, yine sınırlama olmaksızın, nişasta, selüloz, sodyum veya kalsiyum fosfatlar, sitrik asit, tartarik asit, glisin, yüksek moleküler ağırlıklı polietilen glikoller (PEG'ler) ve bunların kombinasyonunu içerir. Aynı zamanda bir yüklü lipid ve/veya deterjanın kullanılması da faydalı olabilir. Uygun yüklü

5 lipidler, sınırlama olmaksızın, fosfatidilkolinleri (lesitin) ve benzerlerini içerir. Deterjanlar tipik olarak bir noniyonik, anyonik, katyonik veya amfoterik sürfaktan olacaktır. Uygun sürfaktanların örnekleri örneğin Tergitol® ve Triton® sürfaktanlarını (Union Carbide Chemicals and Plastics, Danbury, CT), polioksietilenesorbitleri, örneğin, TWEEN® sürfaktanları (Atlas Chemical Industries, Wilmington, DE), polioksietilen eterlerini,

10 örneğin Brij, farmasötik olarak kabul edilebilir yağ asidi esterlerini, örneğin, lauril sülfat ve bunun tuzları (SDS) ve benzeri materyalleri içerir. Farmasötik olarak kabul edilebilir ekşiyanlar, taşıyıcılar, stabilizörler ve diğer yardımcı maddelerin bir kapsamlı tartışması, buraya referansla dahil edilen Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., N. J.1991)'da ulaşılabilir.

15

Parenteral uygulamaya yönelik olarak uygun mevcut buluşun farmasötik bileşimleri, formülasyonu tasarlanan alıcının kanı ile izotonik hale getiren şekerler, alkoller, antioksidanlar, tamponlar, bakteristatlar, solütler veya süspanse edici veya kalınlaştırıcı ajanlar içerebilen bir veya daha fazla farmasötik olarak kabul edilebilir

20 steril izotonik sulu veya susuz çözeltiler, dispersiyonlar, süspanسیونlar veya emülsiyonlar veya kullanımdan hemen önce steril enjekte edilebilen çözeltiler veya dispersiyonlar halinde yeniden oluşturulabilen steril tozlar ile kombinasyon halinde buluşun bir veya daha fazla bileşimini içerir.

25 Buluşun farmasötik bileşimlerinde kullanılabilen uygun sulu ve susuz taşıyıcıların örnekleri su, etanol, polioller (gliserol, propilen glikol, polietilen glikol ve benzerleri gibi) ve bunların uygun karışımlarını, zeytinyağı gibi bitkisel yağları ve etil oleat gibi enjekte edilebilir organik esterleri içerir. Uygun akışkanlık, örneğin lesitin gibi kaplama materyallerinin kullanımıyla, dispersiyonlar durumunda gerekli parçacık boyutunun

30 sürdürülmesiyle ve sürfaktanların kullanımıyla sürdürülebilir.

Bu bileşimler aynı zamanda koruyucular, ıslatıcı ajanlar, emülsifiye edici ajanlar ve dağıtıcı ajanlar gibi adjuvanları da içerebilir. Mevcut buluşun bileşikleri üzerinde mikroorganizmaların hareketinin önlenmesi, çeşitli antibakteriyel ve antifungal ajanların,

35 örneğin paraben, klorobütanol, fenol, sorbik asit ve benzerleri, dahil edilmesiyle garanti

altına alınabilir. Aynı zamanda, şekerler, sodyum klorür, fosfat tamponlu salin ve benzerleri gibi izotonik ajanların bileşimlere dahil edilmesi de istenebilir. İlave olarak, enjekte edilebilir farmasötik formun uzatılmış emilimi, alüminyum monostearat ve jelatin gibi emilimi geciktiren ajanların dahil edilmesiyle sağlanabilir.

5

Bazı durumlarda, bir ilacın etkisini uzatmak üzere ilacın deri altı veya kas içi enjeksiyondan emiliminin yavaşlatılması istenir. Bu, zayıf su çözünürlüğüne sahip olan kristalin veya amorf materyalin bir sıvı süspansiyonunun kullanımıyla gerçekleştirilebilir. Bu durumda ilacın emiliminin hızı, karşılığında kristal boyutuna ve kristalin formuna bağlı olabilen çözünme hızına bağlıdır. Alternatif olarak, parenteral olarak uygulanan bir ilaç formunun gecikmeli emilimi ilacın bir yağ aracında çözündürülmesiyle veya süspanse edilmesiyle gerçekleştirilir.

Buluşun yöntemlerinde, farmasötik bileşikler aynı zamanda vücutta yavaş serbest bırakıma yönelik olarak mikroküreler olarak da verilebilir. Örneğin, mikroküreler, deri altından yavaş bir şekilde serbest bırakılan intradermal ilaç enjeksiyonu vasıtasıyla; *bakınız Rao (1995) J. Biomater Sci. Polym. Ed. 7:623-645*; biyobozunur ve enjekte edilebilir jel formülasyonları olarak, *bakınız, örneğin, Gao (1995) Pharm. Res. 12:857-863 (1995)*; veya oral uygulamaya yönelik mikroküreler olarak, *bakınız, örneğin, Eyles (1997) J. Pharm. Pharmacol. 49:669-674* uygulanabilir. Alıntı yapılan referansların tümü buraya referansla tamamen dahil edilir.

Enjekte edilebilir depo formları, mevcut buluşun bileşiklerinin mikrokapsül matrislerinin polilaktit-poliglikolit gibi biyolojik olarak parçalanabilen polimerlerde oluşturulmasıyla yapılır. İlacın polimere oranına ve kullanılan belirli polimerin doğasına bağlı olarak, ilaç serbest bırakım hızı kontrol edilebilir. Diğer biyolojik olarak parçalanabilen polimerlerin örnekleri poli(ortoesterler) ve poli(anhidritler) içerir. Depo enjekte edilebilir formülasyonlar aynı zamanda ilacın, vücut dokusu ile uyumlu olan lipozomlar veya mikroemülsiyonlarda yakalanmasıyla da hazırlanır.

30

Polipeptid kendi başına veya diğer terapötik bileşik ile kombinasyon halinde uygulanabilir. Özellikle, polipeptid, memelide melanom, iltihap veya bir otoimmün hastalığı tedavi etmek üzere kullanılan bir terapötik bileşik ile bağlantılı olarak uygulanabilir. Polipeptid ve ilave terapötik bileşik aynı veya farklı bileşimler halinde

formüle edilebilir. Polipeptid, ilave terapötik bileşikler ile eş zamanlı olarak, sırayla veya bundan ayrı olarak uygulanabilir.

Dozaj

5

Mevcut buluşun farmasötik bileşimlerindeki aktif içerik maddelerinin gerçek dozaj seviyeleri, hastaya toksik olmadan, bir belirli hasta, bileşim ve uygulama moduna yönelik olarak istenen terapötik yanıtı gerçekleştirmek üzere etkili olan bir aktif içerik maddesi miktarını elde edecek şekilde çeşitlilik gösterebilir. Mevcut buluşun bileşikleri

10

farmasötikler olarak insanlara ve hayvanlara uygulandığında, kendi başlarına veya bir farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcı ile kombinasyon halinde örneğin %0.1 ila 99, daha fazla tercih edildiği üzere %10 ila 30 aktif içerik maddesi içeren bir farmasötik bileşim olarak verilebilirler.

15

Seçilen dozaj seviyesi, kullanılan mevcut buluşun belirli bileşiğin aktivitesi, uygulama yolu, uygulama süresi, kullanılan belirli bileşiğin atılım veya metabolizma hızı, emilimin hızı ve ölçeği, tedavi süresi, kullanılan belirli bileşik ile kombinasyon halinde kullanılan diğer ilaçlar, bileşikler ve/veya materyaller, tedavi edilen hastanın yaşı, cinsiyeti, ağırlığı, durumu, genel sağlığı ve önceki tıbbi öyküsü ve tıbbi tekniklerde iyi bilinen benzer faktörler dahil olmak üzere çok çeşitli faktörlere bağlı olacaktır.

20

Teknikte sıradan ustalığa sahip olan bir hekim veya veteriner, gerekli farmasötik bileşimin etkili miktarını kolayca belirleyebilir ve reçete edebilir. Örneğin, hekim veya veteriner, farmasötik bileşimde kullanılan buluşun bileşiklerin dozlarını istenen terapötik etkiyi elde etmek üzere gerekenden daha düşük seviyelerde başlatabilir ve istenen etki elde edilinceye kadar dozu kademeli olarak arttırabilir.

25

Genel olarak, buluşun bir bileşiğinin bir uygun günlük dozu, bir terapötik etki üretmek üzere etkili en düşük doz olan bileşik miktarı olacaktır. Bu tür bir etkili doz genel olarak yukarıda açıklanan faktörlere bağlı olacaktır. Genel olarak, gösterilen etkilere yönelik olarak kullanıldığında, bir hastaya yönelik olarak mevcut buluşun bileşiklerinin oral, intravenöz, intraserebroventriküler ve deri altı dozları, saat başına vücut ağırlığı kilogramı başına yaklaşık 1 mcg ila yaklaşık 5 mg'lık bir sınırlayıcı olmayan aralığa sahip olacaktır. Diğer düzenlemelerde, doz, saat başına vücut ağırlığı kilogramı başına yaklaşık yaklaşık 5 mcg ila yaklaşık 2.5 mg'lık bir sınırlayıcı olmayan aralığa sahip

35

olacaktır. Başka düzenlemelerde, doz, saat başına vücut ağırlığı kilogramı başına yaklaşık yaklaşık 5 mcg ila yaklaşık 1 mg'lık bir sınırlayıcı olmayan aralığa sahip olacaktır.

İstenmesi halinde, aktif bileşiğin etkili günlük dozu, isteğe bağlı olarak, birim dozaj
5 formlarında, gün boyunca uygun aralıklarda ayrı olarak uygulanan iki, üç, dört, beş, altı veya daha fazla alt doz olarak uygulanabilir. Bir düzenlemede, bileşik, gün başına bir doz olarak uygulanır. Başka düzenlemelerde, bileşik intravenöz veya başka yollar üzerinden olduğu gibi sürekli olarak uygulanır. Başka düzenlemelerde bileşik, haftalık veya daha az gibi, günden daha az bir sıklıkta uygulanır.

10

Mevcut buluşun bir bileşiğinin tek başına uygulanması mümkün olmakla birlikte, bileşiğin bir farmasötik formülasyon (bileşim) olarak uygulanması tercih edilir.

Bu tedaviyi alan denek, primatlar, özellikle insanlar ve tavşanlar, atlar, sığır, domuz,
15 domuz, keçi ve koyun gibi büyükbaş hayvanlar gibi diğer memeliler; ve genel olarak kümes hayvanları ve evcil hayvanlar dahil olmak üzere ihtiyaç duyan herhangi bir hayvandır.

Buluşun bileşiği, bunun gibi veya farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcılar ile
20 karışımlar halinde uygulanabilir ve aynı zamanda penisilinler, sefalosporinler, aminoglikozitler ve glikopeptidler gibi antimikrobiyal ajanlar ile bağlantılı olarak da uygulanabilir. Böylece konjonktif terapi, ilk uygulananın terapötik etkilerinin sonraki uygulandığında tamamen ortadan kalkmayacağı şekilde aktif bileşiğin sıralı, eşzamanlı ve ayrı uygulanmasını içerir.

25

Açıklanan Bileşiklere Yönelik Olası Uygulama Yolları

Bu bileşikler, herhangi bir uygun uygulama yolu ile terapiye yönelik olarak insanlara ve diğer hayvanlara uygulanabilir. Burada kullanıldığında, uygulama "yolu" teriminin,
30 aşağıdakilerle sınırlı olmamak üzere, deri altı enjeksiyon, intravenöz enjeksiyon, intraoküler enjeksiyon, intradermal enjeksiyon, intramüsküler enjeksiyon, intraperitoneal enjeksiyon, intratrakeal uygulama, intraadiposal uygulama, intraartiküler uygulama, intratekal uygulama, epidural uygulama, inhalasyon, intranazal uygulama, oral uygulama, dilaltı uygulama, bukkal uygulama, rektal uygulama, vajinal uygulama,
35 intrasisternal uygulama, transdermal uygulama ve topikal uygulama veya lokal verim

vasıtasıyla uygulamayı (örneğin kateter veya stent ile) içermesi tasarlanır. Bileşikler aynı zamanda yavaş serbest bırakım dozaj formlarında da uygulanabilir veya birlikte uygulanabilir.

5 Buluşun yöntemlerinde, farmasötik bileşikler aynı zamanda fitiller, insüflasyon, tozlar ve aerosol formülasyonları dahil olmak üzere intranazal, intraoküler, periyoküler ve intravajinal yollarla da uygulanabilir (steroid inhalan örneklerine yönelik olarak, *bakınız* buraya referansla dahil edilen Rohatagi (1995) *J. Clin. Pharmacol.* 35:1187-1193; Tjwa (1995) *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 75:107-111). Fitiller formülasyonları, ilacın, normal sıcaklıklarda katı ancak vücut sıcaklıklarında sıvı olan ve bu nedenle ilacı 10 serbest bırakmak üzere vücutta eriyecek olan bir uygun tahriş edici olmayan ekspiyan ile karıştırılmasıyla hazırlanabilir. Bu tür materyaller kakao yağı ve polietilen glikollerdir.

Buluşun yöntemlerinde, farmasötik bileşikler, uygulama çubukları, çözeltiler, süspansiyonlar, emülsiyonlar, jeller, kremler, merhemler, macunlar, jeller, tozlar ve 15 aerosoller olarak formüle edilmiş bir topikal yolla transdermal olarak verilebilir.

Buluşun yöntemlerinde, farmasötik bileşikler, intravenöz (IV) uygulama veya bir vücut boşluğuna (*örneğin*, sinoviyal boşluk) veya bir organın lümenine uygulama gibi parenteral olarak uygulanabilir. Bu formülasyonlar, bir farmasötik olarak kabul edilebilir 20 taşıyıcıda çözünmüş bir aktif ajanın bir çözeltisini içerebilir. Kullanılabilen kabul edilebilir araçlar ve çözücüler su ve bir izotonik sodyum klorür olan Ringer çözeltisidir. İlave olarak, steril sabit yağlar da bir çözücü veya süspanse edici ortam olarak kullanılabilir. Bu amaçla, sentetik mono- veya digliseritler dahil olmak üzere herhangi bir tatsız sabit yağ kullanılabilir.

25

Burada açıklandığı gibi, mevcut buluşun yöntemleri, burada açıklanan bir otoimmün hastalığın veya diğer durumların tedavisine yönelik olarak tek başına veya diğer yaklaşımlar ile kombinasyon halinde kullanılabilir.

30 Bir kombinasyon rejiminde kullanmak üzere terapilerin belirli kombinasyonları (terapötikler veya prosedürler), istenen terapötiklerin ve/veya prosedürlerin ve elde edilecek istenen terapötik etkinin uyumluluğunu dikkate alacaktır. Kullanılan terapilerin aynı rahatsızlığa yönelik olarak bir istenen etkiyi elde edebileceği (*örneğin*, bir buluşa ait bileşik aynı rahatsızlığı tedavi etmek üzere kullanılan diğer ajan ile aynı anda 35 uygulanabilir) veya farklı etkiler elde edebileceği (*örneğin*, herhangi yan etkilerin

kontrolü) de kabul edilecektir. Burada kullanıldığında, bir belirli hastalığı veya durumu tedavi etmek veya önlemek üzere normal olarak uygulanan ilave terapötik ajanlar "tedavi edilen hastalığa veya duruma yönelik olarak uygun" olarak bilinir.

- 5 Mevcut buluşun burada tanımlandığı gibi bir kombinasyon tedavisi, söz konusu tedavinin ayrı bileşenlerinin eşzamanlı, sıralı veya ayrı uygulanması yoluyla elde edilebilir.

Terapötik Uygulamalar

10

Burada tartışıldığı gibi polinükleotidin veya bir düzenleyici bileşiğin (buradan sonra "terapötik ajan") uygulanması, önleyici veya terapötik amaca yönelik olabilir. Önleyici olarak sağlandığında, terapötik ajan herhangi semptomların öncesinde sağlanır. Terapötik ajanın önleyici uygulaması, herhangi semptomları önlemek veya hafifletmek üzere hizmet verir. Terapötik olarak sağlandığında, terapötik ajan hastalık veya rahatsızlığın bir semptomunun başlangıcında (veya kısa bir süre sonra) sağlanır. Terapötik ajanın terapötik uygulaması semptomların herhangi bir gerçek şiddetlenmesini hafifletmek üzere hizmet verir.

- 20 Tedavi edilen birey herhangi bir memeli olabilir. Bir bakış açısında, memeli bir insandır. Başka bir bakış açısında, insan bir otoimmün hastalık veya duruma sahiptir. Diğer bakış açıları, otoimmün hastalık veya durum multipl skleroz, diyabet tip I, aplastik anemi, Grave hastalığı, çölyak hastalığı, Crohn hastalığı, lupus, artrit, osteoartrit, otoimmün üveit, otoimmün ensefalomyelit ve myastenia gravis ile ilişkilidir veya bunlardan oluşan gruptan seçilir.

- 30 Başka bakış açıları, insan bir iltihap hastalığına veya durumuna sahiptir. Başka bakış açısında, iltihap hastalığı veya durumu iltihaplı bağırsak hastalığı, romatoid artrit, alerji, ateroskleroz, sedef hastalığı, gastrit ve iskemik kalp hastalığından oluşan grup ile ilişkilidir veya bunlardan oluşan gruptan seçilir. Başka bakış açısında, iltihap beyin ölümü ile ilişkilidir, tercih edildiği üzere burada beyin dokusunda dolaşan endojen α -MSH veya α -MSH seviyeleri azaltılır. Yine başka bakış açısında, terapötik ajan, bir α -MSH veya MC1 reseptörü aracılı rahatsızlık veya hastalığa sahip bir deneği tedavi etmek üzere kullanılır.

35

Başka bakış açısında, mevcut buluş melanoma sahip bir deneğin tedavisine yöneliktir. Bir bakış açısında, mevcut buluş deneklerdeki melanomu hafifletir veya düzeltir. Yine başka bakış açısında, mevcut buluşun bileşikleri, melanom tespitine veya görüntülemeye yönelik tahlillerde kullanılır.

5

Açıklanan Bileşikleri İçeren Kitler

Buluş aynı zamanda, buluşun terapötik rejimlerinin yürütülmesine yönelik kitleri de sağlar. Bu tür kitler, farmasötik olarak kabul edilebilir formda, tek başlarına veya 10 farmasötik olarak kabul edilebilir formda diğer ajanlar ile kombinasyon halinde, MC1R düzenleyicileri olarak spesifik aktiviteye sahip olan bir peptidin terapötik olarak etkili miktarlarını içerir. Tercih edilen farmasötik formlar, steril salin, dekstroz çözeltisi, tamponlanmış çözelti veya diğer farmasötik olarak kabul edilebilir steril sıvı ile kombinasyon halinde peptidleri içerir. Alternatif olarak, bileşim liyofilize edilebilir veya 15 kurutulabilir. Bu örnekte, kit ayrıca, enjeksiyon amaçlarına yönelik bir çözelti oluşturmak üzere tercih edildiği üzere steril bir farmasötik olarak kabul edilebilir çözelti de içerebilir. Başka düzenlemede, kit ayrıca bileşimin enjekte edilmesine yönelik olarak, tercih edildiği üzere steril formda paketlenmiş bir iğne veya şırınga da içerebilir. Diğer düzenlemelerde, kit ayrıca bileşimin bir deneğe uygulanmasına yönelik olarak bir talimat 20 aracı da içerir. Talimat araçları bir yazılı ek, bir ses kaydı, bir görsel-işitsel kayıt veya bileşimin bir deneğe uygulanmasının talimat edilmesine yönelik herhangi bir başka araç olabilir. Bir düzenlemede, kit, (i) MC1R'ye özgü düzenleyici aktiviteye sahip olan bir peptidi içeren bir birinci konteyner; ve (ii) kullanıma yönelik talimat aracı içerir.

25 Tedavi Yönteminin İlave Düzenlemeleri

Bazı düzenlemelerde, buluş, buna ihtiyacı olan bir denekte transplant reddini azaltmak veya inhibe etmek üzere, bir farmasötik olarak kabul edilebilir eksipiyan ve burada sağlanan en azından bir peptid bileşiğinin bir etkili miktarını içeren bir farmasötik 30 bileşimin söz konusu deneğe uygulanmasını içeren bir yöntem sağlar. Bazı düzenlemelerde, buluş, nakledilen doku, hücreler veya organ tarafından ortaya çıkarılan deneğin bir immün yanıtını azaltmak veya inhibe etmek üzere bir yöntem sağlar. Bir nakledilen doku örnekleri, deneysel kalp nakli ve pankreas adacık hücrelerinde bir allogrefttir.

35

Deneyisel Otoimmün Ensefalomyelit (EAE) modelinde İmmünobaskılayıcı Aktivite

α-MSH'nin yeni D-amino asit peptid analogları üretilmiştir ve lipopolisakarit (LPS) vekil iltihaplı hastalık modelinin yanısıra, deneyisel otoimmün üveit (EAU) ve deneyisel otoimmün ensefalomyelit (EAE) modellerinde immün düzenleyici etkilere yönelik olarak değerlendirilmiştir. RI α-MSH analogu ile tedavi, EAU modelinde ve bir MOG indüklü EAE fare modelinde klinik hastalık puanlarını ve hastalık insidansını azaltmıştır. İlave olarak, MOG prime edilmiş farelerin dalak ve lenf düğümünde TNF-α ve IL-10 mRNA ekspresyon seviyeleri tedavi edilen farelerde azalmıştır. Bir LPS indüklü sistemik enflamasyon modelinde, α-MSH ve analog tedavi serum sitokin seviyelerini azaltmıştır. Bu veriler, bu yeni α-MSH analoglarının enflamasyon ve otoimmün hastalıklarda terapötik kullanıma yönelik potansiyele sahip olduğunu gösterir.

Açıklama, bununla birlikte Avrupa Patent Ofisi Hukuk Temyiz Kurulunun kararı J15/88 ile uyumlu olarak talepleri temsil etmeyen mevcut açıklamanın bir kısmını oluşturan aşağıdaki hükümlerde tanımlanan aşağıdaki bakış açılarını içerir:

(1) Melanokortin 1 reseptörünü (MC1R) seçici bir şekilde bağlayan bir büyük ölçüde saf bileşik olup, özelliği söz konusu bileşiğin aşağıdaki diziye sahip olan bir çekirdek tetrapeptidi içermesidir:

His Xaa₁ Arg Trp (SEQ ID NO:1) veya D-Trp D-Arg
Xaa₂ D-His (SEQ ID NO:2),
burada Xaa₁ D-Cha, D-Phe veya Cha'dır ve
Xaa₂ D-Cha, D-Phe veya Phe;
veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzudur.

(2) Hüküm 1'e göre bileşik olup, özelliği söz konusu bileşiğin, aşağıdaki diziye sahip olan bir C-terminal polipeptidini içermesidir: D-Ser D-Ile D-Ile D-Ser D-Ser (SEQ ID NO:3).

(3) Melanokortin 1 reseptörünü (MC1R) seçici bir şekilde bağlayan bir büyük ölçüde saf bileşik veya farmasötik olarak kabul edilebilir tuzu olup, özelliği söz konusu bileşiğin, aşağıdaki diziye sahip olan bir polipeptid içermesidir:

- Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ Xaa₆ Xaa₇ Xaa₈ Xaa₉ Xaa₁₀ Xaa₁₁ Xaa₁₂
Xaa₁₃,
burada Xaa₁ D-Val, D-Ala veya D-Lys'dir;
5 Xaa₂ D-Pro, D-Ala veya D-Lys'dir;
Xaa₃ D-Lys, D-Orn, D-Nle, D-Ala veya D-Lys'dir;
Xaa₄ Gly veya D-Ala'dır;
Xaa₅ D-Trp, Trp, D-3-benzotienil-Ala, D-5-hidroksi-Trp, D-5-metoksi-Trp,
D-Phe veya D-Ala'dır;
10 Xaa₆ D-Arg, D-His veya D-Ala'dır;
Xaa₇ D-Cha, D-Phe, Phe, D-4-floro-Phg, D-3-piridil-Ala, D-Thi, D-Trp, D-
4-nitro-Phe veya D-Ala'dır;
Xaa₈ D-His, His, D-Arg, Phe veya D-Ala'dır;
Xaa₉ D-Glu, D-Asp, D-sitrülin, D-Ser veya D-Ala'dır;
15 Xaa₁₀ D-Met, D-bütiyonin, D-Ile veya D-Ala'dır;
Xaa₁₁ D-Ser, D-Ile veya D-Ala'dır;
Xaa₁₂ D-Tyr, D-Ser veya D-Ala'dır; ve
Xaa₁₃ D-Ser veya D-Ala'dır;
burada, Xaa₁₋₃'ün tümünün D-Ala olduğu durum haricinde birden fazla
20 Xaa₁₋₁₃ D-Ala değildir ve birden fazla Xaa₁₋₁₃ bir L-amino asit değildir.

- (4) Hüküm 3'e göre bileşik veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir
tuzu olup, özelliği söz konusu bileşiğin, aşağıdaki diziye
sahip olan bir polipeptidi içermesidir:

- 25 Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ Xaa₆ Xaa₇ Xaa₈ Xaa₉ Xaa₁₀ Xaa₁₁ Xaa₁₂
Xaa₁₃,
burada Xaa₁ D-Val'dir;
Xaa₂ D-Pro'dur;
30 Xaa₃ D-Lys, D-Orn veya D-Nle'dir;
Xaa₄ Gly'dir;
Xaa₅ D-Trp, Trp, D-3-benzotienil-Ala, D-5-hidroksi-Trp, D-5-metoksi-Trp
veya D-Phe'dir;
Xaa₆ D-Arg veya D-His'dir;

- 5 Xaa₇ D-Cha, D-Phe, Phe, D-4-floro-Phg, D-3-piridil-Ala, D-Thi, D-Trp veya D-4-nitro-Phe'dir;
 Xaa₈ D-His, His, D-Arg, Phe veya D-Ala'dır;
 Xaa₉ D-Glu, D-Asp, D-sitrülin veya D-Ser'dir;
 Xaa₁₀ D-Met, D-bütiyonin veya D-Ile'dir;
 Xaa₁₁ D-Ser veya D-Ile'dir;
 Xaa₁₂ D-Tyr veya D-Ser'dir; ve
 Xaa₁₃ D-Ser'dir;
 burada birden fazla Xaa₁₋₁₃ bir L-amino asit değildir.
- 10 .
- (5) Hüküm 3'e göre bileşik veya bunun bir farmasötik olarak kabul edilebilir tuzu olup, özelliği söz konusu bileşiğin, aşağıdaki diziyeye sahip olan bir polipeptidi içermesidir:
- 15 Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ Xaa₆ Xaa₇ Xaa₈ Xaa₉ Xaa₁₀ Xaa₁₁ Xaa₁₂
 Xaa₁₃,
 burada Xaa₁ D-Val'dir;
 Xaa₂ D-Pro'dur;
 20 Xaa₃ D-Lys, D-Orn veya D-Nle'dir;
 Xaa₄ Gly'dir;
 Xaa₅ D-Trp veya Trp'dir;
 Xaa₆ D-Arg'dir;
 Xaa₇ D-Cha, D-Phe, Phe veya D-Thi'dir;
 25 Xaa₈ D-His veya His'dir;
 Xaa₉ D-Glu veya D-Ser'dir;
 Xaa₁₀ D-Met, D-bütiyonin veya D-Ile'dir;
 Xaa₁₁ D-Ser veya D-Ile'dir;
 Xaa₁₂ D-Tyr veya D-Ser'dir; ve
 30 Xaa₁₃ D-Ser'dir;
 burada birden fazla Xaa₁₋₁₃ bir L-amino asit değildir.
- .

- (6) Bir büyük ölçüde saf bileşik veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu olup, özelliği aşağıdaki diziye sahip olan bir polipeptidi içermesidir:
- 5 D-Val D-Pro D-Lys Gly D-Trp D-Arg Phe D-His D-Ser D-Ile D-Ile D-Ser D-Ser (SEQ ID NO:4);
D-Val D-Pro D-Lys Gly D-Trp D-Arg D-Cha D-His D-Ser D-Ile D-Ile D-Ser D-Ser (SEQ ID NO:5);
Ser Tyr Ser Met Glu His Cha Arg Trp Gly Lys Pro Val (SEQ ID NO:6);
10 veya
D-Val D-Pro D-Lys Gly D-Trp D-Arg D-Phe D-His D-Glu D-Met D-Ser D-Tyr D-Ser (SEQ ID NO:7).
- (7) Hükümler 1, 3, 4, 5 veya 6'ya göre bileşik olup, özelliği söz konusu polipeptidin PEGile edilmesidir.
15
- (8) Hüküm 6'ya göre bileşik olup, özelliği söz konusu bileşiğin MC1R'yi seçici bir şekilde bağlamasıdır.
- (9) Hüküm 1, 3, 4, 5 veya 6'ya göre bileşik olup, özelliği söz konusu bileşiğin aşağıdaki özelliklerden en azından birini sergilemesidir:
20 MC1R'yi seçici bir şekilde aktive etme yeteneği;
In vitro plazmada stabilite; veya
25 proteaz bozulmasına karşı direnç.
- (10) Bir farmasötik bileşim olup, özelliği hükümler 1, 3, 4, 5 veya 6'nın bileşiğini ve bir farmasötik olarak kabul edilebilir ekspananı içermesidir.
- (11) Hüküm 1, 3, 4, 5 veya 6'ya göre bileşik olup, özelliği söz konusu bileşiğin bir biyolojik olarak aktif parçaya konjuge edilmesidir.
30
- (12) Buna ihtiyacı olan bir denekte bir otoimmün hastalık veya durumun tedavisine yönelik bir yöntem olup, özelliği hüküm 1, 3, 4, 5 veya 6'ya göre bir farmasötik olarak kabul edilebilir ekspananı ve bir terapötik olarak
35

etkili miktarda bileşik içeren bir farmasötik bileşimin söz konusu deneğe uygulanmasını içermesidir.

- 5 (13) Hüküm 12'ye göre yöntem olup, özelliği söz konusu otoimmün hastalık veya durumun multipl skleroz, diyabet tip I, aplastik anemi, Grave hastalığı, çölyak hastalığı, Crohn hastalığı, lupus, artrit, osteoartrit, otoimmün üveit ve myastenia gravisden oluşan gruptan seçilmesidir.
- 10 (14) Buna ihtiyacı olan bir denekte bir otoimmün iltihabın tedavi edilmesine yönelik bir yöntem olup, özelliği hüküm 1, 3, 4, 5 veya 6'ya göre bir farmasötik olarak kabul edilebilir eksipiyan ve bir terapötik olarak etkili miktarda bileşik içeren bir farmasötik bileşimin söz konusu deneğe uygulanmasını içermesidir.
- 15 (15) Hüküm 14'e göre yöntem olup, özelliği söz konusu iltihabın iltihaplı bağırsak hastalığı, romatoid artrit, alerji, ateroskleroz, sedef hastalığı, gastrit ve iskemik kalp hastalığından oluşan gruptan seçilen bir hastalık ile ilişkili olmasıdır.
- 20 (16) Buna ihtiyacı olan bir denekte transplant reddinin azaltılmasının veya inhibe edilmesinin bir yöntemi olup, özelliği hüküm 1, 3, 4, 5 veya 6'ya göre bir farmasötik olarak kabul edilebilir eksipiyan ve bir terapötik olarak etkili miktarda bir bileşik içeren bir farmasötik bileşimin söz konusu deneğe uygulanmasını içermesidir.
- 25 (17) Buna ihtiyacı olan bir denekte melanomun tedavi edilmesinin bir yöntemi olup, özelliği hüküm 1, 3, 4, 5 veya 6'ya göre bir farmasötik olarak kabul edilebilir eksipiyan ve bir terapötik olarak etkili miktarda bir bileşik içeren bir farmasötik bileşimin söz konusu deneğe uygulanmasını içermesidir.
- 30 (18) Buna ihtiyacı olan bir denekte melanomun tedavi edilmesinin bir yöntemi olup, özelliği bir farmasötik olarak kabul edilebilir eksipiyan ve hüküm 1, 3, 4, 5 veya 6'ya göre bir anti-tümör yüküne konjuge edilmiş bir bileşik

içeren bir konjugatın bir terapötik olarak etkili miktarını içeren bir farmasötiğin söz konusu deneğe uygulanmasını içermesidir.

5 (19) Hüküm 18'e göre yöntem olup, özelliği söz konusu anti-tümör yükünün bir radyonüklid, bir radyo duyarlılaştırıcı, bir ışık duyarlılaştırıcı, bir kemoterapötik ajan veya bir toksin olmasıdır.

10 (20) Bir kit olup, özelliği hüküm 10'un farmasötik bileşimini ve isteğe bağlı olarak kullanıma yönelik talimatları içermesidir.

Materyaller ve Yöntemler

Peptidler. α -MSH (SYSMEHFRWGKPV) Bachem'den (King of Prussia, PA) satın alınmıştır. Bir D-amino asit RI α -MSH analogu (vpkgwrfhemsys), RI α -MSH'nin alanin 15 sübstitüeli peptidi, (Stearil) HfRW (820), (Ph(CH₂)₃CO) HfRW (819) ve RI α -MSH analog 891 [vpkGwr(D-Cha)hsiiss] Genzyme Corporation tarafından bir standart katı faz metodolojisi tarafından sentezlenmiştir ve ters faz HPLC tarafından saflaştırılmıştır. Bir karıştırılmış D amino asit kontrol peptidi (ksrsmgvfpeyh), Genzyme Corporation tarafından sentezlenmiştir. Bir alakasız D amino asit kontrol peptidi (plykkiikkles) 20 Genzyme Corporation tarafından sentezlenmiştir.

Hayvanlar. Beş ila altı haftalık dişi B10.RIII-H2r fareleri Jackson Laboratuvarları'ndan (Bar Harbor, ME) satın alınmıştır.

25 Altı ila sekiz haftalık dişi veya erkek C57BL/6 fareleri Jackson Laboratuvarları'ndan (Bar Harbor, ME) satın alınmıştır. Hayvan çalışmalarına yönelik tüm protokoller Genzyme Corporation'daki Kurumsal Hayvan Bakım ve Kullanım Komitesinin (IACUC) onayı ile karşılanmıştır.

30 **EAU indüksiyonu.** Dişi B10.RIII, iki bölgede (omuz kemikleri arasında ve pelvik bölgede) deri altından, bir toplam 200 μ g interfotoreseptör bağlayıcı protein peptidi (IRBP) 161-180 (New England Peptide; Fitchburg, MA) ile, sırasıyla mikobakteri tüberkülozu H37Ra (Difco, Detroit, MI) ile 2 mg/ml tamamlanmış Freund adjuvanında (CFA; Sigma, St. Louis, MO) enjekte edilmiştir.

Göz Puanlama. Farelerin gözleri bir veya iki damla Mydriacyl %1 (Alcon; Humacao, Porto Riko) kullanılarak şişirilir ve yaklaşık olarak 5 dakika boyunca bir karanlık odada dinlendirilir. Fareler manuel olarak sınırlandırılır ve her iki gözün retinası bir 78 diyoptri lensi ile bir dolaylı oftalmoskop kullanılarak görselleştirilir. Gözler iltihaplanmaya yönelik olarak 0-5 arasında bir ilerici puanlama sistemi kullanılarak puanlanır. Puan 0: Normal retina. Puan 1: Optik sinire proksimal vasküler enflamasyon. Puan 2: <5 gözün bir kadranına sınırlandırılmış iltihaplı lezyon. Puan 3: >5 gözün birden fazla kadranında iltihaplı lezyonlar. Puan 4: İltihaplı lezyonlar bitişiktir. Puan 5: Retina dekolmanı. Farelerden bütün gözler toplanmıştır ve PBS'ye yerleştirilmiştir. Gözler donmuş fiksasyona yönelik olarak OCT ortamında gömülmüştür. Papiller-optik sinir düzlemi boyunca 5 µm'lik kesitler kesilmiştir ve hematoksilin ve eozin ile boyanmıştır.

Melanokortin Reseptörlerine Bağlama Çalışmaları. α-MSH, RI α-MSH ve karıştırılmış peptide yönelik bağlama profilleri melanokortin reseptörlerine ölçülmüştür: 1, 3, 4 ve 5. Bağlama, (Nle4,D-Phe7) α-MSH (Bachem) ile bir rekabetçi bağlanma analizi kullanılarak yapılmıştır. Bağlama analizi, kodlanmış numuneler ile Cerep laboratuvarları (Paris, Fransa) tarafından yapılmıştır.

Peptidlerin bağlanması aynı zamanda HEK293 hücre hatlarından membran preparasyonları kullanılarak melanokortin reseptörleri 1, 3, 4 ve 5'in bağlanmasına yönelik olarak ¹²⁵I-NDP-MSH ile bir rekabet tarafından da takip edilmiştir. Peptidler, bağlama tamponu (25 mM HEPES pH7, 1.5 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄, 100 mM NaCl, %0.2 BSA) içinde V-tabanlı 96 gözlü plakalarda ¹²⁵I-(Nle4,D-Phe7)-α-MSH (PerkinElmer, Boston MA) ile karıştırılmıştır ve 1-10 fmol reseptörü içeren HEK293 ile transfekte edilmiş hücre hatlarından (Perkin Elmer, Boston MA) membran preparasyonları ile 1 saat boyunca 25 °C'de karıştırılmıştır. 3 µM'de (Nle4,D-Phe7)-NDP-MSH (Bachem) bir pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Karışımlar 96 gözlü GFC filtrelerden (Millipore, Billerica, MA) süzölmüştür, 3 kez BSA'sız bağlayıcı tampon ile yıkanmıştır, kurutulmuştur ve sayılmıştır.

30

cAMP Ölçümü. Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu'ndan (Manassas, VA) B16-F1 (melanom hücre hattı) hücreleri, 5x10⁴/gözde düz tabanlı 96 gözlü plakalara ekilmiştir ve 2 mM glutamin, antibiyotikler (100 U/ml penisilin ve 100 U/ml streptomisin) ve %10 ısı ile inaktive edilmiş fetal sığır serumu (Invitrogen, Grand Island, NY) ile takviye edilmiş DMEM (Cambrex, Walkersville, MD) içinde gece boyunca kültürlenmiştir.

35

Hücreler daha sonra natif α -MSH (0.01-1000 ng/ml), retro-inverso α -MSH (0.01-1000 ng/ml) veya bir karıştırılmış D amino asit kontrol peptidi (0.01-1000 ng/ml) ile 30 dakika boyunca tedavi edilmiştir. Hücreler çözündürülmüştür ve hücre içi cAMP seviyeleri bir enzim immünoanaliz kiti (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) tarafından ölçülmüştür. Forskolin (Sigma, St. Louis, MO) 100 μ M'de pozitif kontroller olarak hizmet vermiştir.

EAE indüksiyonu ve puanlama. Dişi C57BL/6 fareleri, 0.6 mg Mycobacterium tuberculosis (Difco; Detroit, MI) içeren tamamlanmış Freund adjuvanında (CFA; Sigma, St. Louis, MO) bir MOG35-55 peptidi emülsiyonu (200 μ g/fare; New England Peptide; Fitchburg, MA) ile immünize edilmiştir. Emülsiyon, iki bölgeye deri altı enjeksiyonuyla fare başına 0.2 ml'lik bir hacimde verilmiştir. PBS'deki Bordetella pertussis toksini (PTX; Sigma), bir i.p. uygulama yolu vasıtasıyla bir 400 ng/hayvan dozunda kullanılmıştır ve 0. gün ve 3. günde uygulanır. Fareler EAE'nin parolitik semptomlarına yönelik olarak günlük olarak izlenmiştir. Fareler 0-5 arasında bir ilerici puanlama sistemi kullanılarak klinik semptomlara yönelik olarak puanlanmıştır. Puan 0: hastalık yok; Puan 1: gevşek kuyruk; Puan 2; arka bacak zayıflığı; Puan 3: arka bacak felci; Puan 4: Ön bacak zayıflığı/kısmi felç; Puan 5; ölüm. Spinal kord ve beyin hasat edilmiştir ve hematoksin ve eozin boyamaya yönelik olarak parafin içine gömülmüştür.

20

Çoğalma Analizi. C57BL/6 fare splenositleri ve lenf düğümü hücreleri 5×10^5 hücre/göz 96 gözlü plakalarda kültürlenmiştir. MOG35-55 veya OVA 257-264 peptidi bir 25 μ g/ml konsantrasyonunda gözlere ilave edilmiştir. Süpernatant, MOG peptid stimülasyonundan 48 saat sonra toplanmıştır. Kültürde 3 günden sonra, hücreler 8 saat boyunca 1 μ Ci/gözde [3 H] timidin ile nabızlanmıştır. Timidin dahil edilmesi cpm ile ölçülmüştür.

25

Sitokin RNA analizleri-RT-QPCR. Toplam RNA, TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA) ile dokulardan özütlenmiştir. 1 μ g toplam RNA ters transkripte edilmiştir ve bir ABI 7900 üzerindeki Applied Biosystems'den (Foster City, CA) reaktifler ile SYBR yeşil dahil etme kullanılarak nicel PCR'de kullanılmıştır. Sitokin hedeflerine yönelik olarak her bir PCR'de bir cDNA standardı çalıştırılmıştır ve mesaj konsantrasyonları fare β -aktine yönlendirilmiştir. Bu verileri elde etmek üzere kullanılan primerler aşağıdaki gibi olmuştur: fare TNF α ileri-ggcagggtctactttggagtcattgc ve ters-acattcgaggctccagtgaattcgg (1). Fare IL-10 ileri: tgctatgctgctgctctta ve ters: tcatttccgataaggcttg (2) kullandık. Fare

35

β -aktine yönelik diziler aşağıdadır: ileri gtgggccgctctaggcaccaa ve ters ctctttgatgtcacgcacgatttc (3).

CBA analizi. Fare serumu veya hücre süpernatantın enflamatuvar sitokin profillerinin akış sitometrik analizi BD Biosciences (San Jose, CA) tarafından yapılan Sitometrik Boncuk Dizi Kiti (CBA) kullanılarak ölçülmüştür. Numuneler imalatçının protokolüne göre işlenmiştir.

mMC1R RNA analizleri-RT-QPCR. Toplam RNA, TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA) ile dokulardan özütlenmiştir. 1 μ g toplam RNA ters transkripte edilmiştir ve bir ABI 7900 üzerinde Applied Biosystems'den (Foster City, CA) reaktifler ile bir Taqman kiti kullanılarak kantitatif PCR'de kullanılmıştır. Her bir PCR'de mMC1R'ye yönelik olarak bir cDNA standardı çalıştırılmıştır ve mesaj konsantrasyonları, Ökaryotik 18S endojen kontrolüne (VIC/MGB probu, Applied Biosystems kısım # 4319413E) normalleştirilmiştir. MMC1R'ye yönelik primerler aşağıdaki gibidir: ileri CTCTGCCTCGTCACTTTCTTTCTA ve ters AACATGTGGGGCATACAGAATCG ve prob CCATGCTGGCACTCA. Bunlar Primer Express 3.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA) kullanılarak dizayn edilmiştir.

LPS modeli. Erkek C57BL/6 farelere LPS (1 μ g/fare), i.p. ile meydan okunmuştur. 30 dakika sonra fareler deksametazon (2 mg/kg; Sigma), RI- α -MSH analog 891 veya RI- α -MSH ile meydan okunmuştur. LPS meydan okumasından 2 saat sonra, fareler seruma yönelik olarak kanatılmıştır. Sitokin analizi, bir sitometrik boncuk dizisi kiti (BD Biosciences) ile akış sitometrisi ile ölçülmüştür.

25

İstatistiksel analiz. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak eksprese edilmiştir. Her bir deney en azından iki kez tekrarlanmıştır. Sonuçları analiz etmek üzere bir tek yönlü ANOVA ve Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır.

30 Buluşu göstermek üzere aşağıdaki örnekler teklif edilir.

Referans örneği 1

Deneysel Otoimmün Üveit (EAU) modelinde İmmünobaskılayıcı Aktivite

35

Otoimmün üveit ağrı ve görüş kaybına yol açabilen enflamatuar bir göz rahatsızlığıdır. Steroidler ve immünobaskılayıcı ilaçlar halihazırda üveite yönelik tek terapötiktir ve çoğunlukla ciddi oküler ve sistemik toksisitelere sahiptir. Bu nedenle, daha güvenli alternatif terapötikler istenir.

5

EAU, Birleşik Devletler'deki 2.3 milyon bireyi etkileyen insan üveitin bir hayvan modelidir. Fotoreseptör içi retinoid bağlayıcı protein (IRBP) veya bunun peptid fragmanları veya adjuvan ile retinal S-antijeni (S-Ag) ile immünizasyon kemirgenlerin duyarlı gerilimlerinde hastalığı indükleyebilir. Hastalık, gözün retinasındaki enflamatuar hücrelerin infiltrasyonunu ve kendiliğinden nüksetme olmadan doğal iyileşme ile fotoreseptör hasarı içerir. Sinjenik kemirgen alıcılarında üveitojenik T hücrelerinin adoptif transferi, üveitin, multipl skleroz, tip 1 diyabet ve romatoid artrit gibi birçok diğer benzer otoimmün hastalık gibi bir organa özgü T hücresi aracılı otoimmün hastalık olduğunu önerir.

15

Oküler mikro-ortam, lokal enflamasyonu önlemek üzere immünobaskılamayı sürdürmek üzere mekanizmalarının yürürlükte olduğu bir immün ayrıcalıklı bölgedir. Oküler dokudaki nöronlar tarafından eksprese edilen birkaç nöropeptid, gözdeki immün ayrıcalığın sürdürülmesine yardımcı olur. Bu nöropeptidlerden biri bir 30 pg/ml fizyolojik konsantrasyonda oküler mikro-ortam içinde yapısal olarak eksprese edilen α -MSH'dir.

20

Sıçanlarda endotoksin indüklü üveitin indüksiyonu sırasında natif α -MSH'nin sistemik uygulanması göz sıvısı içindeki infiltre edici hücrelerin sayısını ve IL-6, TNF- α , MCP-1, MIP-2 ve nitrik oksit seviyelerini bir doza bağımlı şekilde inhibe etmiştir. Bir fare EAU modelinde, retinal enflamasyonun tepe zamanında α -MSH uygulaması hastalığın şiddetini baskılamıştır. α -MSH, T hücrelerindeki melanokortin 5 reseptörü (MCR-5) boyunca T düzenleyici hücreleri indükleyebilir ve EAU'yu baskılayabilir.

25

Murin posterior üveit modelindeki natif α -MSH tedavisinin etkinliği değerlendirilmiştir. Üveit, B10.RIII farelerinde bir IRBP 161-180 ve CFA enjeksiyonu ile indüklenmiştir. Hastalığın başlangıcı hazırlamadan 10 gün sonra meydana gelmiştir. 13. günde 2-3'lük göz puanına ulaşıldığında, farelere 7 ardışık gün boyunca 200 μ g/fare'de, i.v. natif α -MSH uygulanmıştır veya tedavi edilmeden bırakılmıştır. Profilaktik tedavi, hastalığın efektör fazdan ziyade hazırlama fazındaki aktiviteleri hedef alabildiğinden, aktif retinal enflamasyon gözleendiğinde tedavi başlatılmıştır. İlave olarak, bu tedavi stratejisi klinik

30

35

uygulamayı daha iyi tekrarlar. α -MSH ile tedavi edilen fareler, tedavi edilmeyen fareler ile kıyaslandığında 7 günlük tedavi süresi boyunca ortalama klinik göz puanlarında bir azalma göstermiştir (Şekil 1a). α -MSH ile tedavi edilen fareler, 15.günde 3.67 ± 0.52 'lik bir maksimum ortalama göz puanına ulaşan tedavi edilmemiş fareler grubuna kıyasla 13. günde 2.83 ± 0.39 'luk bir maksimum ortalama göz puanı göstermiştir.

Referans örneği 2

B10.RIII deneysel otoimmün üveit modelinde natif α -MSH'nin deksametazona karşılaştırılması

Üveite yönelik güncel terapi formları kortikosteroidler ve immünobaskılayıcı ajanları içerir. Natif α -MSH'nin etkinliği bir bilinen kortikosteroid terapisi olan deksametazon ile karşılaştırılmıştır. Üveit, IRBP161-180 ve CFA enjeksiyonları ile B10.RIII farelerinde indüklenmiştir. Hastalığın başlangıç zamanında, fareler 1'lik bir klinik göze ulaştığında, farelere natif α -MSH (100 μ g/fare), 0.2 mg/kg deksametazon veya 2.0 mg/kg deksametazonun günlük intraperitoneal enjeksiyonları uygulanmıştır. Fareler 21 gün boyunca günlük olarak tedavi edilmiştir. Natif α -MSH ile tedavi edilen fareler, PBS kontrol fareleri ile karşılaştırıldığında tedavi süresi boyunca ortalama klinik göz puanlarının önemli bir azalmasını göstermiştir (Şekil 1B). Veriler, günlük i.p. natif α -MSH uygulamasının üveiti 0.2 mg/kg veya 2.0 mg/kg dozda deksametazon tedavisinden daha yüksek bir dereceye kadar baskıladığını göstermiştir.

Örnek 3

25

Bir yeni retro-inverso α -MSH analogu MCR-1'e spesifik bir şekilde bağlanır

Natif α -MSH'nin bir yeni, stabil D-amino asit peptid analogu sentezlenmiştir (RI α -MSH) ve in vitro ve deneysel otoimmün üveit (EAU) modelinde immün düzenleyici kapasitelerine yönelik olarak değerlendirilmiştir. Bağlama çalışmaları, natif α -MSH'nin aksine, RI α -MSH'nin spesifik bir şekilde anti-enflamatuar α -MSH reseptörüne (MCR-1) bağlandığını, fakat diğer α -MSH reseptörlerinden hiçbirine (MCR-3, 4 veya 5) bağlanmadığını göstermiştir.

RI α -MSH analogunun melanokortin reseptörlerine (MCR) bağlanması analiz edilmiştir. MCR 1, 3, 4 ve 5 dahil olmak üzere bir MCR paneli kullanılarak bir rekabetçi bağlanma analizi gerçekleştirilmiştir. Peptidlerin bağlanması daha önce açıklandığı gibi ^{125}I -NDP-MSH ile bir rekabet tarafından takip edilmiştir. Natif α -MSH, MCR 1, 3, 4 ve 5'e bağlanmıştır. Bununla birlikte, natif α -MSH'nin aksine, RI α -MSH'nin sadece enflamatuvar yanıtları düzenleyen MCR-1'e bağlandığı bulunmuştur (Tablo 1). Bir karıştırılmış D amino asit kontrol peptidi melanokortin reseptörlerinin herhangi birine bağlanmamıştır. MCR-1'e spesifik bağlanma ile bir α -MSH analogunun geliştirilmesi ve MCR-3 ve MCR-4 bağlanmasının hariç tutulması, natif α -MSH'nin bu reseptörleri bağlayarak ürettiği potansiyel yan etkileri azaltabilir.

Tablo 1

				Ki (nM, belirtildiği dışında)			
No.	N-terminus	Dizi	C-terminus	MC1 R	MC3 R	MC4 R	MC5 R
				0.41 $\pm$			~150
MSH	Ac	SYSMEHFRWGKPV	Amid	0.14	23	41	0
RI- MSH (720e)	Ac	vpgGwrfhemsys (SEQ ID NO:7)	Amid	4.6 $\pm$ 1.3	>30 μM	>30 μM	~25 μM
804	Ac	vpgGwrfhemsysa	Amid	nd			
805	Ac	vpgGwrfhemsas	Amid				
806	Ac	vpgGwrfhemays	Amid				
				1400 $\pm$ 190			
807	Ac	vpgGwrfheasys	Amid	2.5			
808	Ac	vpgGwrfhamsys	Amid	1200 $\pm$ 270			
809	Ac	vpgGwrfaemsys	Amid	>30			
810	Ac	vpgGwrahemsys	Amid				

Ki (nM, belirtildiği dışında)					MC1	MC3	MC4	MC5
No.	N-terminus	Dizi	C-terminus		R	R	R	R
					µM			
					13 ±			
811	Ac	vpkGwafhemsys	Amid		7 µM			
812	Ac	vpkGarfhemsys	Amid		3 µM			
813	Ac	vpkawrfhemsys	Amid					
814	Ac	vpaGwrfhemsys	Amid					
815	Ac	vakGwrfhemsys	Amid					
816	Ac	apkGwrfhemsys	Amid					
817	Ac	aaaGwrfhemsys	Amid					
818	Ac	kkkGwrfhemsys	Amid					
	(Ph(CH ₂) ₃ C							~300
819	O)	HfRW	Amid		0.07	277	27	0
820	Stearil	HfRW	Amid		1.3	1371	390	860
					104 ±			
847	H ₂ N	vpkGwrfh	(CH ₂) ₃ Fenil)		72			
847in								
t	H ₂ N	vpkGwrfh	OH		150			
		vp(D-						
857	Ac	Ornitin)Gwrfhemsys	Amid		3.0			
		vp(D-						
		Norlösin)Gwrfhems						
858	Ac	ys	Amid		18			
		vpkG(3-						
		benzotiyenil-D-						
859	Ac	Alanin)rfhemsys	Amid		206			
860	Ac	vpkG(5-hidroksi-D-	Amid		96			

				Ki (nM, belirtildiği dışında)			
No.	N-terminus	Dizi	C-terminus	MC1 R	MC3 R	MC4 R	MC5 R
		Trp)rfhemsys					
861	Ac	vpkG(5-metoksi-D-Trp)rfhemsys	Amid	75			
862-b	Ac	vpkG fr fhemsys	Amid	128			
				>100			
863	Ac	vpkG wq fhemsys	Amid	μM			
				>30			
864	Ac	vpkG wn fhemsys	Amid	μM			
865	Ac	vpkG wh fhemsys	Amid	2300			
		vpkG wr (4-floro-D-fenilglisin)hemsys		>30			
866	Ac		Amid	μM			
		vpkG wr (3-piridil-D-Alanin)hemsys					
867	Ac		Amid	480			
		vpkG wr (2-tiyenil-D-Alanin)hemsys					
868	Ac		Amid	5.4			
		vpkG wr (D-Cha)hemsys		2.2 ±	>30	>10	~25
869	Ac		Amid	0.44	μM	μM	μM
				~2.5			
870	Ac	vpkG wr w hemsys	Amid	μM			
		vpkG wr (4-Nitro-D-Phe)hemsys					
871	Ac		Amid	324			
872	Ac	vpkG wr f remsys	Amid	13.5			
873	Ac	vpkG wr f wemsys	Amid	1900			
				>100			
874	Ac	vpkG wr f femsys	Amid	μM			
875	Ac	vpkG wr f hdmsys	Amid	400			

Ki (nM, belirtildiği dışında)					MC1	MC3	MC4	MC5
No.	N-terminus	Dizi	C-terminus		R	R	R	R
876	Ac	vpkGwrfh(D-Sitrülin)msys	Amid		nd			
877	Ac	vpkGwrfhe(α-metil-D- Met)sys	Amid		282			
878	Ac	vpkGwrfhe(D-bütiyonin)sys	Amid		2.3 $\pm$ 0.8	~40 μ M	>30 μ M	~30 μ M
879	Ac	vpkGwrfheksys	Amid		832			
880	Ac	vpkGwrFh siiss (SEQ ID NO:4)	Amid		1.8 $\pm$ 0.5	~18 μ M	~10 μ M	>30 μ M
881	Ac	wrFh	C₃-Fenil		>10 μ M			
882	Ac	wrFh	(1,6-diamino-hekzan)stearil		120			
883	Ac	wrFh	Amid		>100 μ M			
884	Ac	vpkGwrFhemsys	Amid			>30 μ M	~30 μ M	>30 μ M
886	Ac	vpkgwrfh siiss	Amid		72	~19 μ M	~10 μ M	~20 μ M
890	Ac	vpkGwr(D-Cha)he(d-Bütiyonin)sys	Amid		1.0 $\pm$ 0.43	~15 μ M	~14 μ M	~4.5 μ M
891	Ac	vpkGwr(D-Cha)h siiss (SEQ ID NO:5)	Amid		0.01	~8 μ M	~3.2 μ M	~2.5 μ M
892	Ac	SYSMEH(L-	Amid		0.51			

				Ki (nM, belirtildiği dışında)			
No.	N-terminus	Dizi	C-terminus	MC1 R	MC3 R	MC4 R	MC5 R
Cha)RWGKPV (SEQ ID NO:6)							
893	Ac	vpkG W rfhemsys	Amid	6.5	~28 μM	>30 μM	~27 μM
894	Ac	vpkGw R fhemsys	Amid	380	>30 μM	>30 μM	>30 μM
895	Ac	vpkGwrf H emsys	Amid	19	~37 μM	~11 μM	~37 μM

Küçük harfler D-izomer amino asitlerini temsil eder; kalın karakterler RI α-MSH'den değişiklikleri temsil eder.

Peptidlerin bağlanması HEK293 hücre hatlarından membran preparasyonları kullanılarak melanokortin reseptörleri 1, 3, 4 ve 5'in bağlanmasına yönelik olarak ¹²⁵I-NDP-MSH ile bir rekabet tarafından takip edilmiştir. Şekil 18'de gösterildiği gibi, α-MSH, dört reseptörün tümüne, MC3R'ye göre MC1R'e yönelik olarak 100 kattan daha az seçicilik ile önemli bir bağlanma gösterirken, RI α-MSH MC 3, 4 ve 5R'nin her ikisinde 30 μM'u aşan Ki değerleri ile, MC1R'e yönelik olarak bir çok güçlü seçicilik göstermiştir.

Örnek 4

10

EAU'da retro-inverso α-MSH analogu ile tedavi hastalıkları düzeltir

Yeni retro-inverso α-MSH peptid analogunun immünodüzenleyici etkileri deneysel otoimmün üveit fare (EAU) modelinde gözlenmiştir ve sonuçlar natif α-MSH peptidi ile karşılaştırılmıştır. RI α-MSH'nin hastalığın başlangıcında veya geç aşamadaki hastalık sırasında sistemik verimi üveiti dramatik olarak ve tekrarlanabilir bir şekilde düzeltmiştir. İlave olarak, yeni RI α-MSH peptidi analogu ile tedavi üveiti natif α-MSH peptidine benzer bir büyüklük ile baskılamıştır. Bu veriler, yeni RI α-MSH analogunun anti-enflamatuar aktiviteler gösterdiğini ve üveit ve diğer otoimmün hastalıklar ve enflamasyonda terapötik kullanıma sahip olduğunu gösterir.

20

EAU, dişi B10.RIII farelerinde IRBP 161-180 ile indüklenmiştir. RI α -MSH ve natif α -MSH'nin bir profilaktik tedaviden ziyade bir terapötik olarak etkinliği incelenmiştir. Fareler, fareler bir orta aşamalı üveit hastalığına (2 göz puanı) ulaştığında başlatılarak, günlük olarak 100 μ g/fare RI α -MSH, 100 μ g/fare natif α -MSH veya PBS ile intravenöz enjeksiyon ile tedavi edilmiştir. şekil 2A'da görüldüğü gibi, kontrol PBS ile tedavi edilmiş fareler, 16. günde 2.75 ± 0.68 'lik bir ortalama göz puanı ile maksimum göz puanlarına ulaşmıştır. Bununla birlikte, günlük olarak RI α -MSH analogu veya natif α -MSH ile tedavi edilen fareler, PBS kontrol fareleri ile karşılaştırıldığında tedavi süresi boyunca ortalama klinik göz puanlarının bir önemli azalmasını göstermiştir. Tedavinin başlamasından dört gün sonra, 16. günde, 8 natif α -MSH ile tedavi edilen farenin sadece 1'i ve 8 RI α -MSH ile tedavi edilen farenin 0'ı, 3 veya daha büyük bir maksimum göz puanına sahip olmuşken, PBS ile tedavi edilen gruptaki 8 farenin 5'i, 3 veya daha büyük bir maksimum göz puanına sahip olmuştur (şekil 2B).

15

Örnek 5

RI α -MSH ile tedavi edilen deneklerin retina görüntüleri ve histolojik incelemeleri EAU modellerinde hastalığın baskılandığını gösterir

20

Günlük olarak RI α -MSH veya geç aşamadaki üveitte başlayan natif α -MSH ile tedavi edilen farelerin retinal görüntüleri, PBS kontrol fareleri ile karşılaştırıldığında hastalığın baskılandığını gösterir. Fundoskopik görüntüler tedavinin başlamasından 13 gün sonra elde edilmiştir (şekil 3). PBS ile tedavi edilen gruptaki hastalık stabilize edilmiştir veya ilerlemiştir ve göz boyunca şiddetli vaskülit ve enflamatuvar lezyonlar ile bir 3'lük medyan göz puanına sahip olmuştur (şekil 3A). Bununla birlikte, hastalık RI α -MSH ve natif α -MSH peptidin her ikisi ile tedavi edilen farelerde hızla çözülmüştür. Retina görüntüleri sadece optik sinirde enflamasyon ile 1'lik göz puanı göstermiştir (şekiller 3B ve 3C). Her bir gruptaki bireysel farelere yönelik maksimum göz puanları şekil 3D'de gösterilir. PBS ile tedavi edilen grupta, 11 farenin 7'si, 3 veya daha fazla göz puanına sahip olmuştur. Bununla birlikte, natif α -MSH ve RI α -MSH'deki 11 farenin sadece 2'si, 3 veya daha büyük göz puanına sahip olmuştur.

25

30

Günlük tedavinin başlamasından 10 gün sonra gözlerin histolojik incelemesi, RI α -MSH ve natif α -MSH'nin her ikisinin de gözdeki patolojiyi azalttığını göstermiştir (şekil 4).

natif α -MSH ve RI α -MSH ile tedavi edilen fareler optik sinir bölgesinde hafif iltihap ile normal retina mimarisi gösterir (Şekiller 4B ve 4C). Buna karşılık, PBS ile tedavi edilen fareler oküler iltihaplanma ve doku hasarı gösterir. Fotoreseptör hasarı ile retina ve optik sinir bölgelerinde enflamasyon görülür (Şekil 4A).

5

Örnek 6

Retro-inverso α -MSH'nin intraperitoneal uygulamalarının EAU'da bir karıştırılmış kontrol peptidine karşılaştırılması

10

Üveit, IRBP161-180 ve CFA enjeksiyonları ile B10.RIII farelerinde indüklenmiştir. Günlük intraperitoneal enjeksiyonlarla RI α -MSH ile geç aşamadaki hastalık (2-3 göz puanı) sırasında başlangıç tedavisini değerlendirdik ve etkinliği bir kontrol karıştırılmış D amino asit peptidi ile karşılaştırdık. Fareler günlük olarak, i.p., 13 gün boyunca RI α -MSH veya karıştırılmış peptid ile 100 μ g/farede tedavi edilmiştir. RI α -MSH ile tedavi edilen fareler, karıştırılmış peptid kontrol fareleri ile karşılaştırıldığında hastalık seyrinin 15, 21 ve 23. günlerinde ortalama klinik göz puanlarında bir önemli azalma ($p < 0.04$) göstermiştir (Şekil 5). Hastalığın indüklenmesinden sonraki 23. günde ayrı maksimum göz puanları, RI α -MSH'de ≤ 1 puanlara sahip kontrol karıştırılmış peptid grubundaki farelerin hiçbirisi ile karşılaştırıldığında ≤ 1 puanlarına sahip farelerin %75'ini göstermiştir. Farelerin bireysel ağırlıkları, hastalık süresi boyunca 4 zaman noktasında kaydedilmiştir. RI α -MSH ile tedavi edilmiş ve karıştırılmış peptid ile tedavi edilmiş grupların her ikisindeki farelerin tümü ağırlıklarını sürdürmüştür veya normal ağırlık artışı göstermiştir (veriler gösterilmemiştir). Peptidler ile günlük intraperitoneal dozlama kilo kaybı ile sonuçlanmamıştır. İlave olarak, natif α -MSH veya RI α -MSH'nin 100 μ g/farede intraperitoneal uygulama yolu, fareler 1'lik bir klinik göz puanına ulaştığında, hastalığın başlangıcında tedavi uygulandığında, üveitte etkinlik göstermiştir (veriler gösterilmemiştir). Bu nedenle, RI α -MSH'nin intraperitoneal uygulama yolu bir karıştırılmış kontrol peptidi ile karşılaştırıldığında hastalık puanlarında önemli azalma göstermiştir.

30

Örnek 7

RI α -MSH'nin EAU modeline çeşitli dozajlarda uygulanması

35

Aynı zamanda geç aşamadaki şiddetli üveit sırasında retro-inverso α -MSH tedavisinin etkinliğini ve optimal dozlamasını da inceledik. B10.RIII fareleri üveiti indüklemek üzere IRBP161-180 ve CFA ile enjekte edilmiştir. Fareler günlük, i.p., PBS, kontrol karıştırılmış peptid (100 μ g/fare) veya 100 μ g, 10 μ g veya 3 μ g/farede RI α -MSH ile tedavi edilmiştir. Tedavi, fareler, gözün posterior segmenti boyunca enflamatuvar lezyonlar ve olası kanamalar içeren 4'lük göz puanına ulaştığında, hastalığın zirve zamanında başlatılmıştır. PBS ve karıştırılmış peptid kontrol gruplarındaki hastalık şiddetli kalmıştır (Şekil 6). Buna karşılık, RI α -MSH ile 100 μ g veya 10 μ g/fare'deki tedavi üveiti hızla düzelmiştir ($p \leq 0.05$). İlave olarak, 10 ve 100 μ g/fare dozları eşit derecede etkili olmuştur. 3 μ g/fare RI α -MSH dozu hastalığı azaltmamıştır veya inhibe etmemiştir.

Örnek 8

15 Retro-inverso α -MSH'nin cAMP seviyeleri üzerindeki etkisi

Natif α -MSH, RI α -MSH veya bir karıştırılmış kontrol peptidi ile tedaviden sonra B16-F1 melanom hücrelerindeki cAMP seviyeleri incelenmiştir. B16-F10 melanom hücre hattı, sadece 100-200 reseptör/hücreyi eksprese eden makrofaj hücre hatları ile karşılaştırıldığında bir yüksek sayıda MCR1 reseptörü (3000-4000 reseptörü/hücre) eksprese eder. Bu nedenle, RI α -MSH tedavisinin melanom hücre hattı üzerindeki etkisini incelemeyi seçtik. Murin melanom B16-F1 hücreleri, natif α -MSH, RI α -MSH veya kontrol karıştırılmış peptid ile 1 pg/ml-1 μ g/ml konsantrasyonlarında tedavi edilmiştir. 30 dakika sonra hücreler çözündürülmüştür ve hücre içi cAMP bir enzim immünoanalizi ile ölçülmüştür. Yaygın olarak cAMP seviyelerini, hücrelerin kontrolünü (100 μ M) yükseltmek üzere kullanılan Forskolin, cAMP'de bir artış göstermiştir (3455.39 $\pm$ 406.6 SD). cAMP seviyeleri, tedavi edilmemiş hücreler ile karşılaştırıldığında natif α -MSH ile tedavi edilen hücrelerde bir doza bağlı şekilde önemli bir şekilde yükseltilmiştir (Şekil 7A). RI α -MSH analogu aynı zamanda, tedavi edilmemiş veya karıştırılmış peptid kontrolü ile karşılaştırıldığında cAMP seviyelerini bir doza bağlı şekilde önemli bir şekilde arttırmıştır. Bununla birlikte, bir 10 pg/ml konsantrasyonunda cAMP'ı arttırmış olan natif α -MSH ile karşılaştırıldığında cAMP'ı arttırmak üzere daha yüksek bir RI α -MSH konsantrasyonu (100 ng/ml) gerekli olmuştur. cAMP seviyelerini arttırmak üzere gerekli olan peptid konsantrasyonundaki bu fark, MCR1 reseptörüne bağlanma afinitesinin sonucu olabilir.

Örnek 9

Dizi değişimi ve cAMP seviyeleri üzerindeki etkileri ve MC1R bağlama

- 5 MC1R immün aracılı hastalıklara yönelik olarak istenen hedeflerden biri olup, MSH MC1R, MC3R, MC4R ve MC5R'ye bağlanır. Retro-inverso MSH (RI-MSH) arttırılmış plazma stabilitesine (Şekil 17) ve MC1R seçiciliğine sahip olmak üzere tasarlanmıştır, ancak bunun MC1R'ye yönelik afinitesi, natif MSH peptidinden 11 kat daha düşüktür (Tablo 1). MC1R afinitesini restore etmek üzerei MSH'nin MC1R afinitesini iyileştirdiği
- 10 bilinen RI-MSH modifikasyonlarına aşıladık. MSH'nin MC1R afinitesini artıran N-terminal SYSME dizisinin üç değişiminin - yağ asil, fenil bütirik asit ve SSIS dizisi - sadece sonuncusu RI-MSH'ye yönelik olarak önemli iyileşmelere yol açmıştır. RI-MSH'nin D-alanin tarama analoglaması MSH'nin alanin tarama analoglaması ile bir benzer yapı aktivite ilişkisi sergilemiştir, ancak çekirdek 4-kalıntı MC1R bağlama
- 15 bölgesinin stereokimya inversiyon taraması MSH ve RI-MSH arasında anlamlı farklar önerir. Bundan başka, ana fenilalanin tortusundaki sikloheksilalanin süstitüsyonu MC1R'ye MSH değil RI-MSH bağlamasını iyileştirmiştir. Sikloheksilalanin ve SSIS süstitüsyonlarının birleştirilmesi, iyileştirilmiş stabilite ve RI-MSH'nin yüksek MC1R seçiciliğine yönelik olarak kritik retro inversiyon konfigürasyonunu korurken, MC1R'e
- 20 yönelik MSH afinitesinin tam restorasyonuna yol açar.

- Retro-inverso MSH'nin (RI-MSH) bir alanin tarama analoglama seti (804-816 peptidi) hazırlanmıştır ve B16/F1 murin ve M624 insan melanom hücrelerinde cAMP indüksiyonuna yönelik olarak test edilmiştir. cAMP sonuçlarına bağlı olarak bir alt set
- 25 daha sonra MC1R bağlanmasına yönelik olarak test edilmiştir. MC1R bağlanmasına yönelik gözlenen Ki değerleri Tablo 1'de gösterilir.

- Murin melanom B16-F1 hücreleri, natif α -MSH, RI α -MSH, karıştırılmış peptid kontrolü, KPV veya 1 μ g/ml'de RI α -MSH'nin alanin süstitüe edilmiş peptidleri ile tedavi
- 30 edilmiştir (Şekil 7B). Hücrelerin forskolin kontrolü (100 μ M) tedavisi cAMP'de artış göstermiştir (3294.82 ± 54.53). cAMP seviyeleri, tedavi edilmemiş, karıştırılmış peptid veya KPV ile tedavi edilmiş hücreler ile karşılaştırıldığında natif α -MSH ve RI α -MSH ile tedavi edilen hücrelerde önemli ölçüde yükselmiştir. 810, 811 ve 812 olarak tayin edilmiş alanin süstitüe peptidler cAMP aktivitesinde hiçbir artış göstermemiştir ve
- 35 tedavi edilmemiş, karıştırılmış peptid veya KPV ile tedavi edilmiş hücrelere eşdeğer

cAMP seviyeleri sergilemiştir. 810, 811 ve 812 olarak tayin edilmiş peptidler, melanokortin reseptörüne natif α -MSH bağlanmasında ve bunun biyolojik aktivitesinde yer alması teklif edilen merkezi çekirdek tetrapeptid dizisinde (D-Trp D-Arg D-Phe D-His bölgesi; AA 5-8) alanin sübstütüsyonlarına sahiptir. RI α -MSH peptidinin N terminal veya C terminal bölgelerindeki alanin sübstütüsyonları, melanom hücrelerindeki cAMP birikimini etkilememiştir. Metiyonin ve histidin amino asitlerindeki (807 ve 809) alanin sübstütüsyonları aynı zamanda, çekirdek tetrapeptid dizisinde (810, 811 veya 812) görülen kadar büyük olmasa da cAMP birikiminde bir azalma göstermiştir. Çekirdek tetrapeptidindeki (wrfh) ve daha az bir ölçüye kalıntılar, RI-MSH'nin metiyonin 4'ü MC1R'ye bağlanmaya yönelik olarak kritiktir.

MC1R'ye yönelik olarak MSH'nin afinitesini arttırdığı gösterilen diğer araçların MSH varyant dizilerinin faj göstergesine bağlı seçimler kullanılarak gösterilmiştir. Daha sonrasında, faj gösterimli-seçilen peptid ve MC1R'e yönelik bir subnanomolar afinite kazandırmış olan ana MSH dizisinin bir kesitinin rekombinasyonu ile bir oldukça MC1R seçici dizi (MS05) bulunmuştur. Beklenmedik bir şekilde, bu dizinin retro-inverso versiyonu, MS05'in MC1R'ye yönelik olarak MSH'den biraz daha düşük bir afiniteye sahip olduğu bildirilmiş olsa da, MC1R'ye yönelik olarak RI-MSH (4 nM)'dan daha yüksek (1 nM, Tablo 1 peptid 886) bir afinite göstermiştir (MSH'ye yönelik olarak Ki 0.865nM'ye karşı 0.557 nM).

RI-MSH pozisyonlarının her birinde yük ve yapı bakımından küçük farklılıkları barındıran birkaç doğal olmayan amino asit kalıntısının sübstütüsyonu, MC1R'nin sadece oldukça koruyucu değişiklikleri tolere ettiğini göstermiştir. 3'ü hariç tümü daha az veya eşdeğer bağlama göstermiştir. İki değişiklik MC1R'ye yönelik olarak afinite bir önemli artış sağlamıştır: D-fenilalaninin D-sikloheksilalanin (D-Cha, peptid 869; 2.2 nM Ki) tarafından sübstütüsyonu ve D-metiyoninin D-bütiyonin (peptid 878, 2.3 nM Ki) tarafından sübstütüsyonu. L-sikloheksilalanin ile sübstütüsyon gerçekleştirilmiştir ve MC1R'ye bağlanmayı hafifçe inhibe ettiği bulunmuştur (peptid 892, MSH'ye yönelik olarak 0.51 nM'ye karşı 0.41 nM Ki). Beklenmedik bir şekilde, bütiyonin ve sikloheksilalanin sübstütüsyonlarının kombinasyonu MC1R'ye (peptid 890, 1.9 nM Ki) yönelik olarak afinite bir başka önemli artış üretememiştir. Bununla birlikte, C-terminal dizisine (emsys) yönelik olarak MS05 (siiss)'in N -terminal dizisinin ve RI-MSH'de D-Phe'ye yönelik olarak D-sikloheksilalanin retro-inverso sübstütüsyonunu içeren değişikliğin kombinasyonu, etkilerin sinerjistik olduğunu göstererek, değişikliklerin

her birinin sadece olduğundan daha büyük bir bağlanma geliştirmesi üretmiştir. Ortaya çıkan peptid (891), MC1R'ye yönelik olarak MSH'den ayırt edilemeyen bir Ki göstermiştir. Bu ve diğer değişikliklerin aynı zamanda diğer MCR'lerin afinitesinde de artışlar üretmesine rağmen, Ki değerleri, RI-MSH'nin seçiciliğinin büyük ölçüde korunduğunu göstererek, hala mikromolar aralıkta olmuştur. Değişiklikler şekil 20'de gösterilir. Bir temsili rekabetçi bağlanma analizi şekil 21'de gösterilir. Gözlenen Ki değerlerine yönelik olarak Tablo 1'e *bakınız*.

Örnek 10

RI α -MSH ile tedavi EAE'deki klinik hastalık puanlarını azaltır

Bir kronik ilerlemeci EAE fare modelinde natif α -MSH ve RI α -MSH analogunun uygulanmasının etkisi değerlendirilmiştir. Dişi C57BL/6 fareleri, CFA ile emülsifiye edilmiş 200 μ g MOG 35-55 peptidi ile immünize edilmiştir. Pertusis toksini 0. ve 2. günlerde uygulanmıştır. Fareler klinik semptomların ve kilo kaybının belirtilerine yönelik olarak günlük olarak izlenmiştir. Fareler, 8. günde başlanarak felç semptomlarına yönelik olarak değerlendirilmiştir ve 0-5'den bir derecelendirme sisteminde puanlanmıştır. Paralizin klinik semptomlarının görünümü çoğu farede 9-11 gün civarında ortaya çıkmıştır (Şekil 8A). 100 μ g/fare veya PBS kontrolünde α -MSH veya RI α -MSH peptidi ile günlük intraperitoneal (i.p.) tedavi 10. günde başlamıştır. 100 μ g RI α -MSH ile tedavi edilen fareler, PBS kontrolü ile karşılaştırıldığında ortalama klinik hastalık puanında bir önemli azalma göstermiştir (Şekil 8A). PBS araç kontrolü ile karşılaştırıldığında RI α -MSH'de 14-22. günlerde $p < 0.05$ önemliliğine ulaşılmıştır. Bununla birlikte, natif α -MSH peptidi tedavisi hastalık indüksiyonu veya ilerlemesi üzerinde bir etkiye sahip olmamıştır. RI α -MSH ile tedavi edilen fare grubundaki (%20) maksimum hastalık insidansı yüzdesi de PBS (%80) veya natif α -MSH ile tedavi edilen (%75) fare grupları ile karşılaştırıldığında azaltılmıştır.

Örnek 11

EAE'de RI α -MSH'nin dozaj değişimi

RI α -MSH'nin terapötik etkisi 100 μ g/fare dozunda belirgin olmuştur. 100 μ g/fare ve 30 μ g/fare'de α -MSH veya RI α -MSH peptidi ile tedavi MOG EAE fare modelinde test

edilmiştir. Günlük i.p. tedavisi MOG immünizasyonundan sonra 10. günde başlamıştır. Bir kontrol terapötik olarak günlük deksametazon (2 mg/kg) tedavisi ilave edilmiştir. 100 µg RI α-MSH ile tedavi edilen fareler PBS kontrolü ile karşılaştırıldığında ortalama klinik hastalık puanında aralıksız olarak bir azalma göstermiştir (Şekil 9). Bununla birlikte, 30 µg/fare RI α-MSH dozu ortalama klinik puanlarının azaltılmasında bir önemli etkiye sahip olmamıştır. Deksametazon tedavisi aynı zamanda hastalık seyri boyunca hastalık puanlarında da bir azalma göstermiştir. Natif α-MSH ile tedavi edilen farelerin PBS'den daha düşük bir ortalama klinik puana sahip olmasına rağmen, α-MSH ile tedavi edilen fareler, RI α-MSH veya deksametazon ile tedavi edilen fareler ile benzer etkinlik göstermemiştir. RI α-MSH ile tedavi edilen gruptaki hastalık insidansı yüzdesi bir %75'lik maksimum hastalık insidansı yüzdesi sergileyen PBS ile tedavi edilen fareler ile karşılaştırıldığında bir maksimum %35 ve %40 deksametazona ulaşmıştır (Şekil 9). Bu veriler EAE'de RI α-MSH peptid analogu ile tedavinin ortalama klinik hastalık puanlarını ve hastalık insidansını önemli bir şekilde azalttığını gösterir.

15

Örnek 12

CNS histolojisi

20 Spinal kordlar, PBS ve RI α-MSH ile tedavi edilen farelerde hastalık indüksiyonundan sonra 24. günde toplanmıştır. Spinal kord kesitlerinin hematoksilin ve eozin ile boyanması iltihaplanmanın derecesini ve lezyonların sayısını değerlendirmek üzere kullanılmıştır. EAE'nin patolojisi iltihaplı hücrelerin infiltrasyonunun ve demiyelinizasyonun fokal alanlarını gösterir. Spinal kordun histopatolojik 25 değerlendirmesi MOG EAE modelinde RI α-MSH tedavisinin etkinliğini göstermiştir. Her bir tedavi grubuna yönelik olarak ortalama klinik puanın temsilcisi farelerinden alınan dilimler, Şekiller 10a-10d'de gösterilir. Veriler, iltihaplanmanın fokal alanı eksikliği yaşayan RI α-MSH ile muamele edilmiş fareler ile karşılaştırıldığında PBS ile tedavi edilmiş fareler grubunda yoğun iltihaplı sızıntılar gösterir.

30

Örnek 13

Hastalığın ilerlemesi sırasında dalaktaki TNF-α ve IL-10'un ölçülmesi

EAE'de RI α -MSH tedavisinin etkilerinin hareket mekanizması incelenmiştir. natif α -MSH'nin TNF- α seviyelerinin azaltılmasıyla ve IL-10'un artırılmasıyla monositler/makrofajlar üzerinde bir etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. RI α -MSH veya natif α -MSH ile tedavi edilen MOG prime edilmiş farelerin dalağındaki TNF- α ve IL-10 mRNA seviyeleri kantitatif PCR ile değerlendirilmiştir. Fareler MOG p35-55 ile immünize edilmiştir ve RI α -MSH veya natif α -MSH ile günlük tedavi 10. günde başlamıştır. Dalak numuneleri farelerden günlük tedavinin başlamasından sonra 1., 4. ve 7. Günlerde toplanmıştır. Veriler, RI α -MSH ve α -MSH ile tedavinin, günlük tedavinin 7 gününden sonra PBS kontrol ile karşılaştırıldığında TNF- α 'yı önemli ölçüde ($p \leq 0.001$) azalttığını gösterir (Şekil 11e). Bununla birlikte, önceki zaman noktalarında (Gün 1 ve Gün 4; Şekiller 11a ve 11c) TNF- α seviyesinde hiçbir önemli değişiklik olmamıştır. IL-10 mRNA seviyeleri aynı zamanda, RI α -MSH ve aMSH tedavi gruplarının her ikisinde de PBS kontrolü ile karşılaştırıldığında 7. Gün zaman noktasında da azaltılmıştır (Şekil 11f). Bununla birlikte, önceki zaman noktalarında IL-10 mRNA seviyelerinde hiçbir fark tespit edilmemiştir (Şekiller 11b ve 11d). Natif α -MSH tedavisinin ortalama klinik hastalık puanlarını veya hastalık insidansı yüzdesini azaltmamış olmasına rağmen, bu çalışmada α -MSH tedavisi, hastalığın ilerlemesinin 17. Gününde PBS kontrolü ile karşılaştırıldığında dalaktaki TNF- α ve IL-10 mRNA seviyelerinin her ikisini de azaltılmıştır. RI α -MSH analogu günlük tedaviden sonra dalaktaki TNF- α mRNA seviyelerini azaltabilir.

Örnek 14

RI α -MSH'nin MOG peptidine yeniden çağırma yanıtı üzerindeki etkisi

Farelerin α -MSH veya RI α -MSH ile tedavi edilmesinin *in vivo* MOG 35-55 peptidine yeniden çağırma yanıtları üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Fareler MOG35-55 peptidi ile hazırlanmıştır ve 2-8. Günlerde fareler, PBS, 100 μ g α -MSH veya 100 μ g RI α -MSH ile tedavi edilmiştir. 9. günde, dalak ve kuruyan lenf düğümleri toplanmıştır ve [3H] timidin dahil edilmesiyle *in vitro* MOG35-55 peptidine yeniden çağırma yanıtlarına yönelik olarak analiz edilmiştir. Veriler, dalak hücresinin, PBS ile tedavi edilmiş grup ile karşılaştırıldığında, α -MSH grubu farelerinde MOG35-55 peptidine proliferatif yanıtlarında bir önemli düşüş gösterir (Şekil 12a). RI α -MSH ile tedavi edilen grup, MOG35-55 peptidine yeniden çağırma tepkilerinde bir hafif azalma göstermiştir. Bununla birlikte, lenf düğümü hücresi popülasyonundaki MOG peptidine yeniden

çağırma yanıtları, PBS, α -MSH ve RI α -MSH ile tedavi edilen gruplar arasındaki duyarlılıkta bir önemli fark göstermemiştir (Şekil 12b).

In vivo'daki tedavi gruplarının (natif, PBS, α -MSH, RI α -MSH) her birinden *in vitro'daki* MOG35-55 peptidi ile uyarılmış olan dalak hücrelerinden hücre süpernatantı toplanmıştır. Sitokin seviyeleri bir sitometrik boncuk dizisi üzerinden akış sitometrisi ile değerlendirilmiştir. Veriler, PBS ile tedavi edilen grup ile karşılaştırıldığında α -MSH ve RI α -MSH ile tedavi edilen grupların her ikisinde de TNF- α , IFN γ , IL-6 ve MCP-1 seviyelerinde bir azalma gösterir (Şekiller 12c ve 12d). α -MSH ve RI α -MSH ile tedavi edilen grupların her ikisinde de dalak hücreleri süpernatantın sitokin seviyeleri hazırlanmamış farelerin dalak hücrelerinden sitokin seviyelerine benzer olmuştur.

Bu nedenle, RI α -MSH peptidi tedavisi MOG peptidine sitokin yeniden çağırma yanıtları üzerinde bir etkiye sahip olmuştur, ancak T hücresi çoğalma yanıtlarını etkilememiştir.

15

Örnek 15

EAE'nin hazırlama fazı sırasında farelerin α -MSH veya RI α -MSH ile tedavi edilmesinin etkileri

20

Fareler, MOG 35-55 peptidi ile immünize edilmiştir ve 2-8. günlerde günlük olarak PBS araç kontrolü, α -MSH veya RI α -MSH ile tedavi edilmiştir. Ayrı farelerden dalaklar, 9. Günde toplanmıştır ve mRNA sitokin ekspresyonu gerçek zamanlı PCR kullanılarak ölçülmüştür. Şekil 13, hastalığın hazırlama fazındaki PBS, α -MSH veya RI α -MSH ile tedavi edilmiş farelerin dalağındaki TNF- α ve IL-10 mRNA ekspresyon seviyelerini gösterir. MOG peptidi ile immünize edilmemiş natif fareler, TNF- α ve IL-10'un baz hattı mRNA seviyelerini ölçmek üzere kullanılmıştır. α -MSH veya RI α -MSH ile tedavi, PBS araç kontrolü ile karşılaştırıldığında IL-10 ve TNF- α mRNA seviyelerini düşürmüştür.

30

Kan serumu numuneleri de çalışmanın 9. gününde toplanmıştır ve sitokin seviyelerine yönelik olarak değerlendirilmiştir: TNF- α , MCP-1, IL-12, IL-10 ve IL-6 (Şekiller 13c ve 13d). Veriler, PBS kontrol grubu ile karşılaştırıldığında α -MSH ve RI α -MSH ile tedavi edilen grupların her ikisinde de MCP-1 ve IL-6'da bir düşüş gösterir. MCP-1, PBS kontrolü ile karşılaştırıldığında RI α -MSH ile tedavi edilen grupta önemli ölçüde azalmıştır (p <0.01). İlave olarak, RI α -MSH ile tedavi edilen grup, PBS grubu ile

35

karşılaştırıldığında TNF- α ve IL-12'de bir azalma göstermiştir. Tedavi edilen üç grup arasında serum IL-10 düzeylerinde hiçbir fark olmamıştır.

Örnek 16

5

RI α -MSH makrofaj markörleri üzerinde bir etkiye sahip değildir

Splenik CD11b⁺ ve F4/80⁺ makrofajları, MOG 35-55 immünize edilmiş farelerde α -MSH veya RI α -MSH ile günlük dozlamadan 7 gün sonra akış sitometrisi ile CD86, CD40 ve CD14'ün yüzey ekspresyon seviyelerine yönelik olarak incelenmiştir. Veriler, α -MSH veya RI α -MSH ile tedavi edilmiş farelerde splenik CD11b⁺ veya F4/80⁺ makrofaj hücre popülasyonunda CD86, CD40 veya CD14 ekspresyon seviyelerinde hiçbir fark göstermez (Şekil 14). Sonuçlar, kan monositleri CD86, CD40 ve CD14 ekspresyon seviyelerine yönelik olarak incelendiğinde bir benzer bulgu göstermiştir (veriler gösterilmemiştir).

15

Örnek 17

LPS iltihaplı fare modelindeki etkiler

20

Natif α -MSH'nin, melanokortin reseptörlerinin (MCR), özellikle de melanokortin 1 reseptörünün uyarılması üzerinden TNF- α üretimini azaltarak düzenleyerek iltihaplanmayı inhibe ettiği rapor edilmiştir. LPS TNF- α , MCP-1, IL-6 ve IFN γ gibi iltihaplı mediatörleri uyarır ve bir akut iltihap modeli olarak kullanılmıştır. Bir α -MSH analogunun, bir LPS fare iltihap modelinde iltihaplı sitokinleri baskılayabilip baskılayamadığı incelenmiştir. LPS uygulamasından sonra dalakta ve peritoneal makrofajlarda MC1R ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir. C57BL/6 fareleri LPS ile, i.p. enjekte edilmiştir ve çeşitli zaman noktalarında LPS sonrası enjeksiyon dalak ve peritoneal makrofajlar analize yönelik olarak toplanmıştır. Veriler, peritoneal makrofajlardaki herhangi bir zaman noktaları arasında MC1R mRNA ekspresyon seviyelerinde hiçbir belirgin fark göstermez (Şekil 15a). Bununla birlikte, LPS uygulaması, MC1R'nin mRNA seviyelerini bir LPS meydan okuması almayan natif farelerin üstüne arttırmıştır. Dalakta, MC1R mRNA seviyeleri LPS enjeksiyonundan 30 dakika sonra yükseltilmiştir ve daha sonra enjeksiyondan bir saat sonra azaltılmıştır

30

(Şekil 15b). LPS, benzer bir şekilde, dalaktaki MC1R'nin mRNA seviyelerini natif farelerde baz hattı seviyelerinin üstüne çıkarmıştır.

Dalak ve peritoneal makrofajlarda MC1R mRNA ekspresyonunu gösteren veriler, LPS meydan okumasından 30 dakika sonra α -MSH veya RI α -MSH analog tedavisine yönelik olarak optimal zaman noktası olabileceğini göstermiştir. C57BL/6 fareleri LPS ile, i.p. enjekte edilmiştir ve 30 dakika sonra natif α -MSH veya RI α -MSH analog 891, 5 mg/kg ila 0.156 mg/kg arasında çeşitlilik gösteren dozlarda i.p. uygulanmıştır. RI α -MSH analogu 891 d-Cha ve hsiiss D-amino asitlerin çekirdek peptid dizisine ilave edildiği bir RI α -MSH analogudur. RI α -MSH analogunun 891 fare MC1R'ye bağlanma afinitesini arttırdığını ve cAMP'ı uyarma potansiyelini arttırdığını göstermiştir (veriler gösterilmemiştir). Sonuçlar, PBS araç kontrolü ile karşılaştırıldığında natif α -MSH ile tedavi edilmiş gruplarda TNF- α ve IL-10 seviyelerinde önemli azalma göstermiştir (Şekiller 16a ve 16c). MCP-1 natif α -MSH tedavisinden etkilenmemiştir (Şekil 16b). LPS ile meydan okunan farelerin RI α -MSH analogu 891 ile tedavisi, araç kontrolü ile karşılaştırıldığında MCP-1 seviyeler üzerinde hiçbir etki olmaksızın, TNF- α ve IL-10'da bir önemli düşüş ile benzer sonuçlar göstermiştir (Şekiller 16d-16f). Natif α -MSH ve RI α -MSH analogunun 891 her ikisinin de düşük dozları, iltihaplı sitokinlerin en büyük baskılanmasını göstermiştir. Deksametazon pozitif kontrol sürekli olarak TNF- α ve MCP-1 seviyelerinin baskılandığını göstermiştir.

Örnek 18

Peptidlerin plazmadaki kararlılığı

Natif α -MSH'nin serum yarı ömrünün yaklaşık olarak 10 dakika olduğu tahmin edilmiştir. Bu sınırlı yarı ömre rağmen, peptid hala etkili anti-enflamatuar aktiviteler ortaya çıkarabilir. Bununla birlikte, anti-enflamatuar aktivitelerin potansiyelini arttırmak ve bir terapötik olarak daha fazla geliştirilmek üzere daha kararlı α -MSH analogları gereklidir. Natif α -MSH'nin (retro-inverso α -MSH veya RI α -MSH olarak refere edilir) bir D-amino asit analogu sentezlenmiştir ve natif α -MSH'den daha stabildir. Peptidlerin D-amino asit formu proteolize karşı daha dirençlidir ve peptidlerin L-amino asit formundan daha yavaş bir oranda metabolize edilir.

RI- α -MSH'nin stabilitesi, plazmada veya 24 saat boyunca 37 °C'de in vitro PBS içerisinde inkübasyonla belirlenmiştir. Alikotlar alınmıştır ve proteinler 2 hacim asetonitril ile çöktürülmüştür. α -MSH bir kontrol olarak ve bradikinin bir iç standart olarak kullanılmıştır. Santrifüjlemeden sonra, numuneler bir C18 kolon ayrıştırması ve

5 pozitif elektrosprey iyonizasyon modu kullanılarak LC/MS/MS (MRM) analizine kadar -80 °C'de dondurulmuştur. Şekil 17a'da gösterildiği gibi, MSH plazmada yaklaşık 3 saatlik bir yarı ömür göstermiştir ancak PBS'de stabil olmuştur. Bununla birlikte, RI- α -MSH, PBS'de ve plazmanın her ikisinde de, 24 saat boyunca hiçbir tespit edilebilir bozulma göstermeyerek, stabil olmuştur.

10

α -MSH ve RI- α -MSH'ye yönelik olarak farmakokinetik (PK) profilleri, RI- α -MSH'nin natif α -MSH'den daha uzun bir serum yarı ömrüne sahip olduğunu önerir (Şekil 17b). Tek bir 100 μ g RI- α -MSH veya α -MSH dozu ile tedavi edilen fareler, 24 saat sonra ölçülebilir serum RI- α -MSH seviyelerine sahip olmuştur ancak tedaviden 120 dakika sonra hiçbir

15 tespit edilebilir α -MSH seviyeleri olmamıştır (n=5).

Örnek 19

Retro-inverso peptidlerin bağlanma etkileri.

20

D-Phe (HfRW) içeren bir çekirdek MSH tetrapeptid, MC1R'ye (20-50 nM Ki) önemli bağlanma üretmek üzere yeterlidir. Bununla birlikte, retro-inverso peptidinin reseptöre HfRW ile aynı şekilde tam olarak temas edemediğini göstererek, aynı tetrapeptidin retro-inverso versiyonu ile (wrFh, 883, Ki>30uM, Tablo 1) çok az bağlanma

25 gözlemlenir. Yağ asil gruplarının HfRW'nin N-terminusuna ilave edilmesi, MSH ile karşılaştırılabilir bir afinite kazandırarak, bunun MC1R'ye bağlanmasını seçici bir şekilde iyileştirir. Bu, MC1R'deki stearyl-HfRW peptidine yönelik olarak gözlenir (1.3 nM, peptid 820). Bir diaminoheksan stearyl grubunun retro-inverso wrFh'e (peptid 882) ilave edilmesi, MC1R'ye (120 nM, >250-kat) ve HfRW'nin N- terminusuna (80-kat) stearik

30 asit ilavesi olarak karşılaştırılabilir bir ölçekte bağlanmayı iyileştirir ancak, yine RI-MSH'deki diğer kalıntıların RI-MSH'nin MC1R'ye bağlanmasında MSH'den daha büyük bir rol oynadığını göstererek, RI-MSH (4.1 nM)'ye yönelik olarak görülen afiniteyi gerçekleştirmez.

Örnek 20

Stereokimya, retro-inverso peptidlerin bağlanmasına etki eder.

Çekirdekli retro-inverso tetrapeptiddeki kalıntıların stereokimyası, MC1R'ye bağlanma
 5 üzerinde L-form MSH'den bir önemli ölçüde farklı etkiye sahiptir. Şekil 19'da gösterildiği
 gibi, çekirdek tetrapeptid kalıntılarının RI-MSH'de L-formuna (peptidler 884, 893-895)
 ters çevrilmesinin tümü peptidin MC1R'ye yönelik afinitesini azaltmıştır. Çarpıcı bir
 şekilde ve beklenmedik bir şekilde, HfRW'de (L-Phe ile D-Phe) karşılık gelen
 değişikliğin bağlamayı 400 kat kadar iyileştirdiği belirtilmişken, RI-dizisinde D-Phe'nin
 10 L-Phe'ye ters çevrilmesi bağlanmada bir 20 kat azalmaya neden olmuştur. Diğer
 kalıntılara yönelik olarak, stereokimyasal inversiyonun, yine çekirdek tetrapeptiddeki
 her bir kalıntının göreceli öneminin RI-MSH'de HfRW tetrapeptidinde olduğundan daha
 düşük olduğunu göstererek, RI-MSH üzerinde çekirdek HfRW peptidi üzerinde
 olduğundan daha az bir etkiye sahip olduğu bulunmuştur.

15

Örnek 21

Uç kapaklama retro-inverso MSH'nin etkileri.

20 MC1R'ye yönelik olarak daha yüksek afinitenin gerçekleştirilmesinin başka olası yolu,
 HfRW peptidinin fenil bütirik asit ile uçtan kapaklanmasının MC1R'ye yönelik olarak
 HfRW afinitesini seçici bir şekilde ve kuvvetli bir şekilde arttırdığı gözlemine bağlıdır
 ($K_i=6$ pM). Bununla birlikte, RI-MSH ile bağlamanın, tetrapeptid dizisinin ve MC1R'deki
 histidin bağlanma elemanının yanında belirtilen aromatik etkileşim bölgesinin
 25 eşzamanlı etkileşimine izin vermeyecek bir şekilde değiştirildiğini göstererek, histidin
 kalıntısı (peptid 847int) bunun aminopropil-fenil eklentisinde (peptid 847, Tablo 1)
 kesilen peptidin her ikisine de yönelik olarak gözlemlenen 150 nM'lik bir K_i ile, bir C-
 terminal fenilpropilamidi (peptid 847) taşıyan bir kesik RI-MSH'nin afinitesinde hiçbir
 artış gözlemlenmemiştir.

30

Örnek 22

Retroinverso MSH'nin bir toksin konjugatının sentezi.

N-terminusuna bir sisteinin eklendiği peptidin (891) bir modifiye edilmiş versiyonu (Tablo 1) Fmoc kimyası tarafından üretilir. Tiyollere bağlanmaya yönelik olarak bir maleimido-kaproil parçasına sahip bir proteaz-duyarlı valin-sitrülin bağlayıcı içeren bir monometil auristatin E (MMAE) konjugatı, buraya referansla dahil edilen Doronina *et al.* (2003) *Nature Biotechnol.* 21:778-784'e göre sentezlenir. Peptid ve MMAE konjugatı, bir 25mM Na fosfat, 2mM EDTA pH7 çözeltisinde 14 saat boyunca 25°C'de inkübe edilir ve ürün C18 ters faz HPLC (RP-HPLC) ile arıtılır.

Örnek 23

10

RI α -MSH analoglarının murin melanom hücre hatlarında cAMP üzerindeki etkisi

Natif α -MSH ve RI α -MSH'nin her ikisi de murin melanom hücrelerindeki cAMP seviyelerini artırır. RI α -MSH peptidinin çekirdek dizisine değişikliklerin RI α -MSH peptidi ile karşılaştırıldığında cAMP seviyelerini yükseltip yükseltmeyeceğini belirlemek üzere RI α -MSH peptid analogları üretilmiştir. Murin B16-F1 melanom hücreleri kullanılarak cAMP analizinde üretilen RI α -MSH analoglarına yönelik olarak bir doz yanıtı deneyi yapılmıştır.

20 **İn vitro hücre kültürleri:** B16-F1 murin melanom hücreleri, L-glutamin ve pen/strep ve FBS'ye sahip ortam içerisinde gece boyunca 96 gözlü plakalara 5×10^4 hücre/göz halinde kültürlenmiştir. Ortam çıkartılmıştır ve hücrelere 1 saat boyunca IBMX'e sahip yeni ortam ilave edilmiştir. Hücreler daha sonra RI α -MSH veya RI α -MSH peptid analogları (890, 891, 892, 893, 894 veya 895) ile tedavi edilmiştir. Hücreler 30 dakika sonra bir cAMP analiz kiti kullanılarak çözündürülmüştür ve analizde süpernatant kullanılmıştır. 10 μ M'deki Forskolin pozitif kontroller olarak hizmet etmiştir.

25 **cAMP seviyeleri:** Hücre içi cAMP, bir cAMP rekabet Analiz Kiti (Amersham Biosciences) kullanılarak ölçülmüştür. Tüm hücre lizat numuneleri analize yönelik olarak 1: 100 oranında seyreltilmiştir.

30

Peptidler:

869 vpkGwr(d-Cha)hemsys

872 vpkGwrfremsys

880 vpkGwrFhsiiss
 878 vpkGwrfhe(d-bütiyonin)sys
 886 RI-MS05 vpkgwrfhsiiss
 890 vpkGwr(d-Cha)he(d-Bütiyonin)sys
 891 vpkGwr(d-Cha)hsiiss
 892 SYSMEH(Cha)RWGKPV
 893 vpkGWrfhemsys
 894 vpkGwRfhemsys
 895 vpkGwrfHemsys

Sonuçlar: Murin melanom B16-F1 hücreleri, bir 10^{-4} - 10^{-11} M konsantrasyon aralığındaki RI α -MSH veya RI α -MSH analogları 869, 872, 880, 878, 886 ve 890-895 ile tedavi edilmiştir. RI α -MSH veya RI α -MSH analogları ile tedavi edilmiş hücrelerden cAMP seviyeleri. RI α -MSH analoglarının çoğu, analog 894 hariç, RI α -MSH ile karşılaştırıldığında arttırılmış EC_{50} değerleri göstermiştir. Analoglar 891, 892 ve 886, R1 α -MSH peptidi ile karşılaştırıldığında cAMP analizinde EC_{50} değerlerinde en büyük iyileşmeyi göstermiştir. Özet olarak, RI α -MSH analogları, RI α -MSH peptidi ile karşılaştırıldığında bir iyileştirilmiş doz yanıtı ve EC_{50} değeri göstermiştir. Grafikselleştirilmiş verilere yönelik olarak Şekil 22'ye ve EC_{50} verilerine yönelik olarak Tablo 2'ye *bakınız*.

Tablo 2

	EC_{50} , μ M
α -MSH	0.0004
RI α -MSH	9.7
Analog ID:	
890	3.6
891	0.081
892	0.021
893	0.27
894	212
895	0.3

	EC₅₀, µM
α-MSH	0.0004
RI α-MSH	9.7
Analog ID:	
878	0.13
880	0.023
886	0.002
	EC₅₀, µM
α-MSH	0.0004
RI α-MSH	9.7
Analog ID:	
869	0.014
872	2.0
878	0.13

DİZİ LİSTESİ

- 5 <110> GENZYME CORPORATION
 <120> ALFA-MELANOSİT UYARICI HORMONUN PEPTİD ANALOGLARI
 <130> 3461P176EPT
 <140> PCT/US2009/037809
 < 141> 2009-03-20
- 10 <150> US 61/056,373
 < 151> 2008-05-27
 <160> 33
 <170> Windows Versiyonu 4.0 için FastSEQ
 <210> 1
- 15 < 211> 4
 < 212> PRT
 < 213> Yapay Dizi

- <220>
 < 223> sentetik olarak oluşturulan tetrapeptit
 <220>
 < 221> BÖLGE
 5 < 222> 2
 < 223> Xaa = D-Cha, D-Phe veya Cha
 <400> 1
 His Xaa Arg Trp
 1
 <210> 2
 10 < 211> 4
 < 212> PRT
 < 213> Yapay Dizi
 <220>
 < 223> sentetik olarak oluşturulan tetrapeptit
 15 <220>
 < 221> BÖLGE
 < 222> 1, 2, 4
 < 223> D-izomer formu
 <220>
 20 < 221> BÖLGE
 < 222> 3
 < 223> Xaa = D-Cha, D-Phe veya Phe
 <400> 2
 Trp Arg Xaa His
 1
 25 <210> 3
 < 211> 5
 < 212> PRT
 < 213> Yapay Dizi
 <220>
 30 < 223> sentetik yapı
 <220>
 < 221> BÖLGE
 < 222> (1)...(5)
 < 223> D-izomer formu

- <400> 3
 Ser Ile Ile Ser Ser
 1 5
 <210> 4
 < 211> 13
 5 < 212> PRT
 < 213> Yapay Dizi
 <220>
 < 223> sentetik olarak oluşturulan polipeptit
 <220>
 10 < 221> BÖLGE
 < 222> 1-3, 5-6, 8-13
 < 223> D-izomer formu
 <400> 4
 Val Pro Lys Gly Trp Arg Phe His Ser Ile Ile Ser Ser
 1 5 10
 15 <210> 5
 < 211> 13
 < 212> PRT
 < 213> Yapay Dizi
 <220>
 20 < 223> sentetik olarak oluşturulan polipeptit
 <220>
 < 221> BÖLGE
 < 222> 1-3, 5-6, 8-13
 < 223> D-izomer formu
 25 <220>
 < 221> BÖLGE
 < 222> 7
 < 223> Xaa = D-Cha
 <400> 5
 30 Val Pro Lys Gly Trp Arg Xaa His Ser Ile Ile Ser Ser
 1 5 10
 <210> 6
 < 211> 13
 < 212> PRT
 < 213> Yapay Dizi

- <220>
 < 223> sentetik olarak oluşturulan polipeptit
 <220>
 < 221> BÖLGE
 5 < 222> 7
 < 223> Xaa = L-Cha
 <400> 6
 Ser Tyr Ser Met Glu His Xaa Arg Trp Gly Lys Pro Val
 1 5 10
 <210> 7
 10 < 211> 13
 < 212> PRT
 < 213> Yapay Dizi
 <220>
 < 223> sentetik olarak oluşturulan polipeptit
 15 <220>
 < 221> BÖLGE
 < 222> 1-3, 5-13
 < 223> D-izomer formu
 <400> 7
 Val Pro Lys Gly Trp Arg Phe His Glu Met Ser Tyr Ser
 1 5 10
 20 <210> 8
 < 211> 13
 < 212> PRT
 < 213> Yapay Dizi
 25 <220>
 < 223> sentetik olarak oluşturulan polipeptit
 <220>
 < 221> DOMEN
 < 222> (1)...(13)
 30 < 223> alfa-Melanosit uyarıcı hormon
 <400> 8
 Ser Tyr Ser Met Glu His Phe Arg Trp Gly Lys Pro Val
 1 5 10
 <210> 9
 < 211> 13

- < 212> PRT
 < 213> Yapay Dizi
 <220>
 < 223> sentetik olarak oluşturulan polipeptit
- 5 <220>
 < 221> BÖLGE
 < 222> 1
 < 223> Xaa = D-Val, D-Ala veya D-Lys
 <220>
- 10 < 221> BÖLGE
 < 222> 2
 < 223> Xaa = D-Pro, D-Ala veya D-Lys
 <220>
 < 221> BÖLGE
- 15 < 222> 3
 < 223> Xaa = D-Lys, D-Orn, D-Nle, D-Ala veya D-Lys
 <220>
 < 221> BÖLGE
 < 222> 4
- 20 < 223> Xaa = Gly veya D-Ala
 <220>
 < 221> BÖLGE
 < 222> 5
 < 223> Xaa = D-Trp, Trp, D-3-benzotiyenil-Ala, D-5-hidroksi-Trp, D-5-metoksi-Trp, D-
- 25 Phe veya D-Ala
 <220>
 < 221> BÖLGE
 < 222> 6
 < 223> Xaa = D-Arg, D-His veya D-Ala
- 30 <220>
 < 221> BÖLGE
 < 222> 7
 < 223> Xaa = D-Cha, D-Phe, Phe, D-4-floro-Phg, D-3-piridil-Ala, D-Thi (2-tiyenil-D-alanin), D-Trp, D-4-nitro-Phe veya D-Ala

- <220>
 < 221> BÖLGE
 < 222> 8
 < 223> Xaa = D-His, His, D-Arg, Phe veya D-Ala
- 5 <220>
 < 221> BÖLGE
 < 222> 9
 < 223> Xaa = D-Glu, D-Asp, D-sitrullin, D-Ser veya D-Ala
 <220>
- 10 < 221> BÖLGE
 < 222> 10
 < 223> Xaa = D-Met, D-bütiyonin, D-Ile veya D-Ala
 <220>
 < 221> BÖLGE
- 15 < 222> 11
 < 223> Xaa = D-Ser, D-Ile veya D-Ala
 <220>
 < 221> BÖLGE
 < 222> 12
- 20 < 223> Xaa = D-Tyr, D-Ser veya D-Ala
 <220>
 < 221> BÖLGE
 < 222> 13
 < 223> Xaa = D-Ser veya D-Ala
- 25 <220>
 < 221> BÖLGE
 < 222> (1)...(13)
 < 223> D-Ala, konumlar 1-3'te eş zamanlı olarak var olması haricinde yalnızca 1 konumunda bulunur
- 30 <220>
 < 221> BÖLGE
 < 222> (1)...(13)
 < 223> bir L-amino asidi, yalnızca 1 konumunda bulunabilir
 <400> 9
- 35 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10

- <210> 10
 < 211> 13
 < 212> PRT
 < 213> Yapay Dizi
- 5 <220>
 < 223> sentetik olarak oluşturulan polipeptit
 <220>
 < 221> BÖLGE
 < 222> 1
- 10 < 223> Xaa = D-Val, D-Ala veya D-Lys
 <220>
 < 221> BÖLGE
 < 222> 2
 < 223> Xaa = D-Pro, D-Ala veya D-Lys
- 15 <220>
 < 221> BÖLGE
 < 222> 3
 < 223> Xaa = D-Lys, D-Orn, D-Nle, D-Ala veya D-Lys
 <220>
- 20 < 221> BÖLGE
 < 222> 4
 < 223> Xaa = Gly veya D-Ala
 <220>
 < 221> BÖLGE
- 25 < 222> 5
 < 223> Xaa = D-Trp, Trp, D-3-benzotiyenil-Ala, D-5-hidroksi-Trp, D-5-metoksi-Trp, D-Phe veya D-Ala
 <220>
 < 221> BÖLGE
- 30 < 222> 6
 < 223> Xaa = D-Arg, D-His veya D-Ala
 <220>
 < 221> BÖLGE
 < 222> 7

< 223> Xaa = D-Cha, D-Phe, Phe, D-4-floro-Phg, D-3-piridil-Ala, D-Thi (2-tiyenil-D-alanin), D-Trp, D 4-nitro-Phe veya D Ala

<220>

< 221> BÖLGE

5 < 222> 8

< 223> Xaa = D-His, His, D-Arg, Phe veya D-Ala

<220>

< 221> BÖLGE

< 222> 9

10 < 223> Xaa = D-Glu, D-Asp, D-sitrullin, D-Ser veya D-Ala

<220>

< 221> BÖLGE

< 222> 10

< 223> Xaa = D-Met, D-bütiyonin, D-Ile veya D-Ala

15 <220>

< 221> BÖLGE

< 222> 11

< 223> Xaa = D-Ser, D-Ile veya D-Ala

<220>

20 < 221> BÖLGE

< 222> 12

< 223> Xaa = D-Tyr, D-Ser veya D-Ala

<220>

< 221> BÖLGE

25 < 222> 13

< 223> Xaa = D-Ser veya D-Ala

<400> 10

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10

<210> 11

30 < 211> 13

< 212> PRT

< 213> Yapay Dizi

<220>

< 223> sentetik olarak oluşturulan polipeptit

- <220>
 < 221> BÖLGE
 < 222> 1
 < 223> Xaa = D-Val
 5 <220>
 < 221> BÖLGE
 < 222> 2
 < 223> Xaa = D-Pro
 <220>
 10 < 221> BÖLGE
 < 222> 3
 < 223> Xaa = D-Lys, D-Orn veya D-Nle
 <220>
 < 221> BÖLGE
 15 < 222> 4
 < 223> Xaa = Gly
 <220>
 < 221> BÖLGE
 < 222> 5
 20 < 223> Xaa = D-Trp, Trp, D-3-benzotiyenil-Ala, D-5-hidroksi-Trp, D-5-metoksi-Trp veya D-Phe
 <220>
 < 221> BÖLGE
 < 222> 6
 25 < 223> Xaa = D-Arg veya D-His
 <220>
 < 221> BÖLGE
 < 222> 7
 < 223> Xaa = D-Cha, D-Phe, Phe, D-4-floro-Phg, D-3-piridil-Ala, D-Thi (2-tiyenil-D-alanin), D-Trp veya D 4-nitro-Phe
 30 <220>
 < 221> BÖLGE
 < 222> 8
 < 223> Xaa = D-His, His, D-Arg, Phe veya D-Ala

- <220>
 < 221> BÖLGE
 < 222> 9
 < 223> Xaa = D-Glu, D-Asp, D-sitrullin veya D-Ser
- 5 <220>
 < 221> BÖLGE
 < 222> 10
 < 223> Xaa = D-Met, D-bütiyonin veya D-Ile
 <220>
- 10 < 221> BÖLGE
 < 222> 11
 < 223> Xaa = D-Ser veya D-Ile
 <220>
 < 221> BÖLGE
- 15 < 222> 12
 < 223> Xaa = D-Tyr veya D-Ser
 <220>
 < 221> BÖLGE
 < 222> 13
- 20 < 223> Xaa = D-Ser
 <220>
 < 221> BÖLGE
 < 222> (1)...(13)
 < 223> bir L-amino asidi, yalnızca 1 konumunda bulunabilir
- 25 <400> 11
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10
 <210> 12
 < 211> 13
 < 212> PRT
- 30 < 213> Yapay Dizi
 <220>
 < 223> sentetik olarak oluşturulan polipeptit
 <220>
 < 221> BÖLGE

- < 222> 1
 < 223> Xaa = D-Val
 <220>
 < 221> BÖLGE
 5 < 222> 2
 < 223> Xaa = D-Pro
 <220>
 < 221> BÖLGE
 < 222> 3
 10 < 223> Xaa = D-Lys, D-Orn veya D-Nle
 <220>
 < 221> BÖLGE
 < 222> 4
 < 223> Xaa = Gly
 15 <220>
 < 221> BÖLGE
 < 222> 5
 < 223> Xaa = D-Trp veya Trp
 <220>
 20 < 221> BÖLGE
 < 222> 6
 < 223> Xaa = D-Arg
 <220>
 < 221> BÖLGE
 25 < 222> 7
 < 223> Xaa = D-Cha, D-Phe, Phe veya D-Thi (2-tiyenil-D-alanin)
 <220>
 < 221> BÖLGE
 < 222> 8
 30 < 223> Xaa = D-His veya His
 <220>
 < 221> BÖLGE
 < 222> 9
 < 223> Xaa = D-Glu veya D-Ser

- <220>
 < 221> BÖLGE
 < 222> 10
 < 223> Xaa = D-Met, D-bütiyonin veya D-Ile
- 5 <220>
 < 221> BÖLGE
 < 222> 11
 < 223> Xaa = D-Ser veya D-Ile
 <220>
- 10 < 221> BÖLGE
 < 222> 12
 < 223> Xaa = D-Tyr veya D-Ser
 <220>
 < 221> BÖLGE
- 15 < 222> 13
 < 223> Xaa = D-Ser
 <220>
 < 221> BÖLGE
 < 222> (1)...(13)
- 20 < 223> bir L-amino asidi, yalnızca 1 konumunda bulunabilir
 <400> 12
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10
 <210> 13
 < 211> 5
- 25 < 212> PRT
 < 213> Yapay Dizi
 <220>
 < 223> sentetik olarak oluşturulan peptit bağı
 <400> 13
 Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5
- 30 <210> 14
 < 211> 12
 < 212> PRT
 < 213> Yapay Dizi

<220>

< 223> sentetik olarak oluşturulan peptit bağı

<400> 14

Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Ser
1 5 10

5 <210> 15

< 211> 14

< 212> PRT

< 213> Yapay Dizi

<220>

10 < 223> sentetik olarak oluşturulan peptit bağı

<400> 15

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Ser Ser Glu Gly Lys Gly
1 5 10

<210> 16

< 211> 18

15 < 212> PRT

< 213> Yapay Dizi

<220>

< 223> sentetik olarak oluşturulan peptit bağı

<400> 16

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Ser Ser Glu Gly Ser Gly Ser Thr
1 5 10 15

20 Lys Gly

<210> 17

< 211> 14

< 212> PRT

< 213> Yapay Dizi

25 <220>

< 223> sentetik olarak oluşturulan peptit bağı

<400> 17

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Ser Ser Glu Gly Lys Gly
1 5 10

<210> 18

30 < 211> 18

< 212> PRT

< 213> Yapay Dizi

<220>

< 223> sentetik olarak oluşturulan peptit bağı

<400> 18

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr
 1 5 10 15
 Lys Gly

5 <210> 19

< 211> 14

< 212> PRT

< 213> Yapay Dizi

<220>

10 < 223> sentetik olarak oluşturulan peptit bağı

<400> 19

Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Glu Phe
 1 5 10

<210> 20

< 211> 5

15 < 212> PRT

< 213> Yapay Dizi

<220>

< 223> sentetik olarak oluşturulan peptit bağı

<400> 20

20 Ser Arg Ser Ser Gly
 1 5

<210> 21

< 211> 5

< 212> PRT

< 213> Yapay Dizi

25 <220>

< 223> sentetik olarak oluşturulan peptit bağı

<400> 21

Ser Gly Ser Ser Cys
 1 5

<210> 22

30 < 211> 28

< 212> PRT

< 213> Yapay Dizi

<220>

< 223> sentetik yapı

<220>

< 221> BÖLGE

5 < 222> (1)...(28)

< 223> Difteri toksini tripsin duyarlı bağlayıcı

<400> 22

Ala	Met	Gly	Arg	Ser	Gly	Gly	Gly	Cys	Ala	Gly	Asn	Arg	Val	Gly	Ser
1				5				10						15	
Ser	Leu	Ser	Cys	Gly	Gly	Leu	Asn	Leu	Gln	Ala	Met				
			20				25								

<210> 23

10 < 211> 13

< 212> PRT

< 213> Yapay Dizi

<220>

< 223> sentetik yapı

15 <220>

< 221> DOMEN

< 222> (1)...(13)

< 223> alfa-MSH peptidi

<400> 23

Ser	Tyr	Ser	Met	Glu	His	Phe	Arg	Trp	Gly	Lys	Pro	Val
1				5					10			

20

<210> 24

< 211> 24

< 212> DNA

< 213> Yapay Dizi

25 <220>

< 223> ileri primer

<400> 24

ctctgcctcg tcactttctt tcta 24

<210> 25

30 < 211> 22

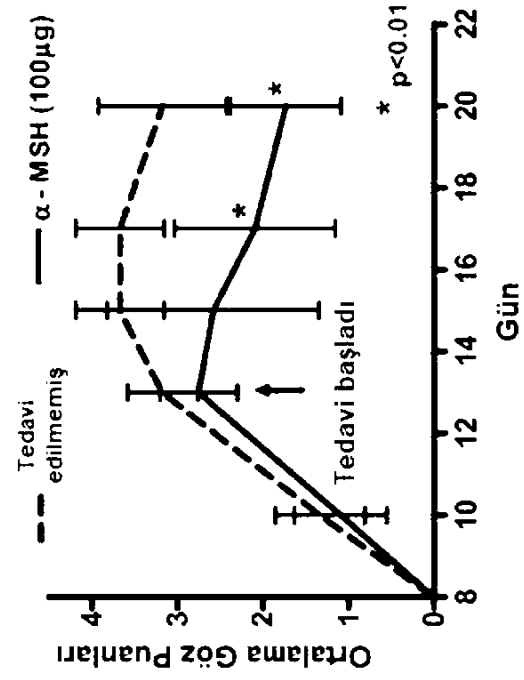
< 212> DNA

< 213> Yapay Dizi

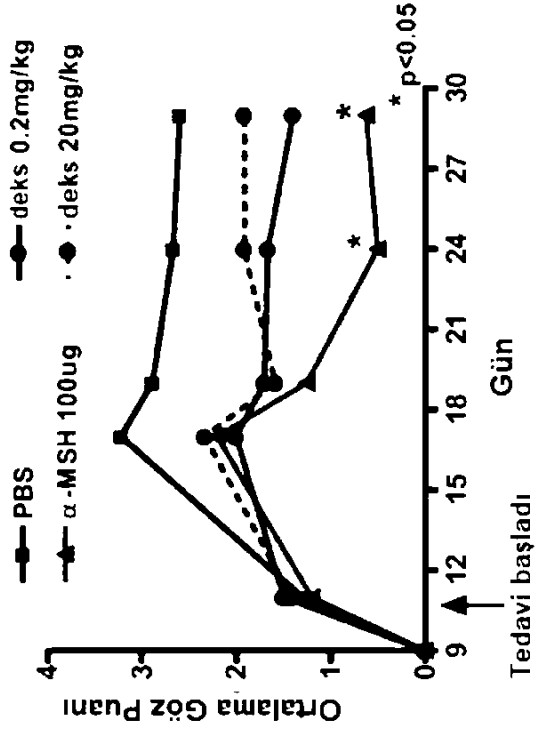
<220>
 < 223> revers primer
 <400> 25
 aacatgtggg catacagaat cg 22
 5 <210> 26
 < 211> 15
 < 212> DNA
 < 213> Yapay Dizi
 <220>
 10 < 223> prob
 <400> 26
 ccatgctggc actca 15
 <210> 27
 < 211> 25
 15 < 212> DNA
 < 213> Yapay Dizi
 <220>
 < 223> fare TNF alfa ileri primeri
 <400> 27
 20 ggcaggtcta cttggagtc attgc 25
 <210> 28
 < 211> 25
 < 212> DNA
 < 213> Yapay Dizi
 25 <220>
 < 223> fare TNF alfa revers primeri
 <400> 28
 acattcgagg ctccagtga ttcgg 25
 <210> 29
 30 < 211> 20
 < 212> DNA
 < 213> Yapay Dizi
 <220>
 < 223> fare IL-10 ileri primeri

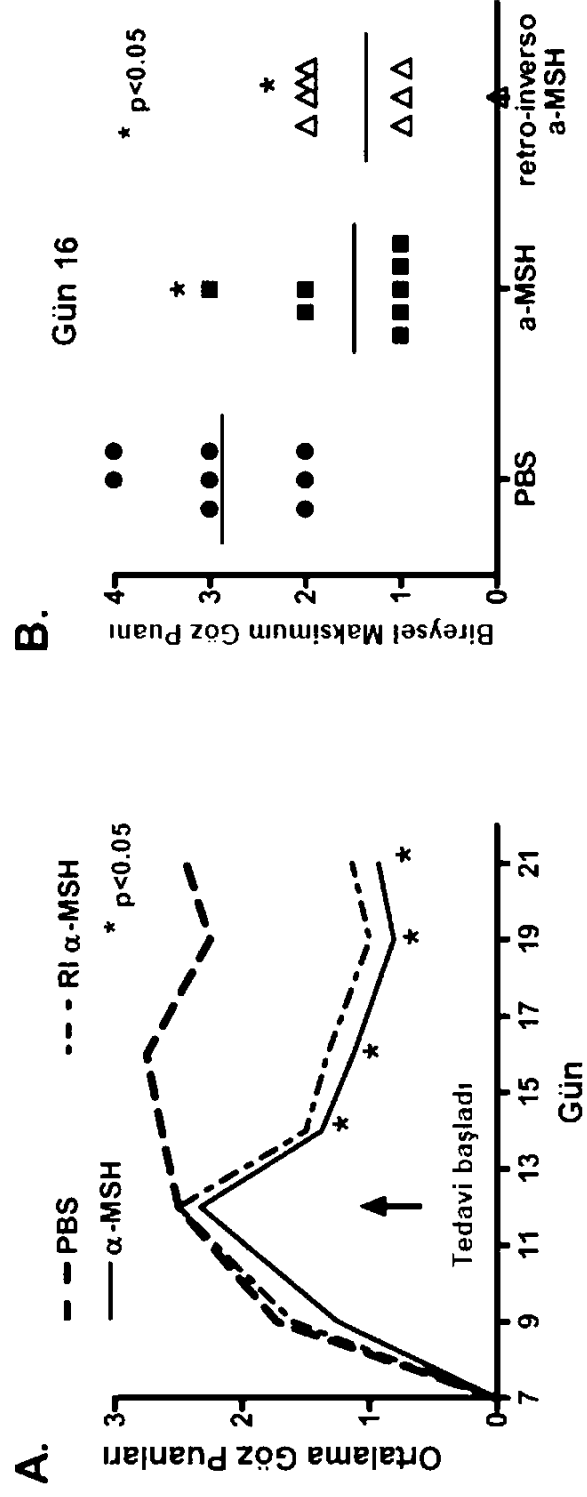
<400> 29
 tgctatgctg cctgctctta 20
 <210> 30
 < 211> 20
 5 < 212> DNA
 < 213> Yapay Dizi
 <220>
 < 223> fare IL-10 revers primeri
 <400> 30
 10 tcatttccga taaggcttgg 20
 <210> 31
 < 211> 21
 < 212> DNA
 < 213> Yapay Dizi
 15 <220>
 < 223> fare beta-aktin ileri primeri
 <400> 31
 gtgggccgct ctaggcacca a 21
 <210> 32
 20 < 211> 24
 < 212> DNA
 < 213> Yapay Dizi
 <220>
 < 223> fare beta-aktin revers primeri
 25 <400> 32
 ctctttgatg tcacgcacga tttc 24
 <210> 33
 < 211> 4
 < 212> PRT
 30 < 213> Yapay Dizi
 <220>
 < 223> sentetik olarak oluşturulan tetrapeptit
 <400> 33
 His Phe Arg Trp
 1
 35

Şekil 1A



Şekil 1B



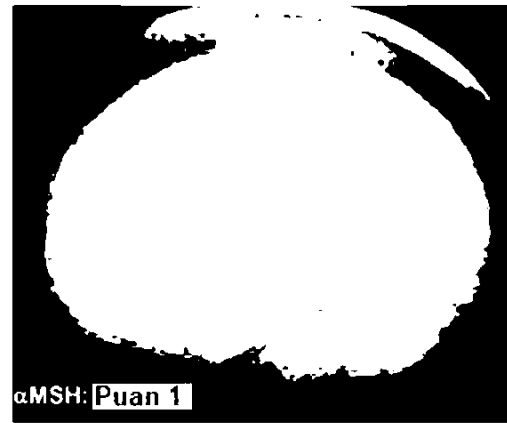


Şekil 2

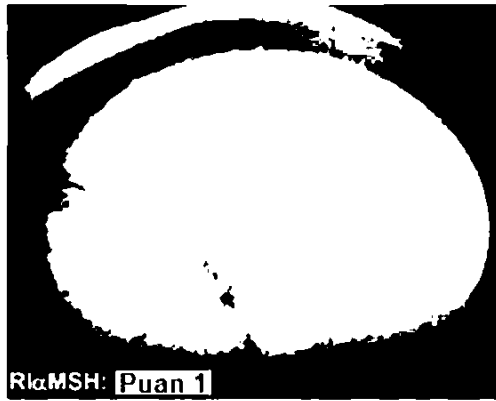
Şekil 3A



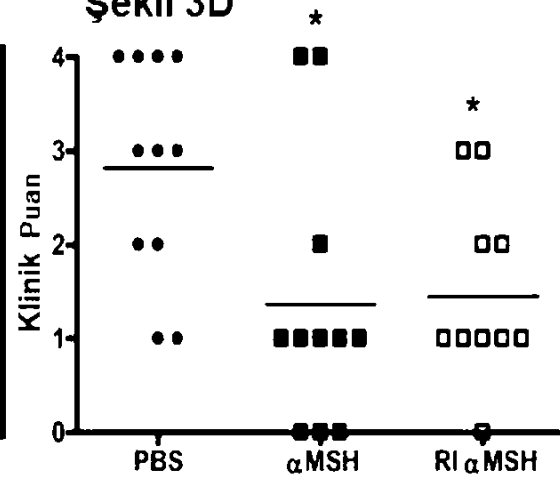
Şekil 3B



Şekil 3C



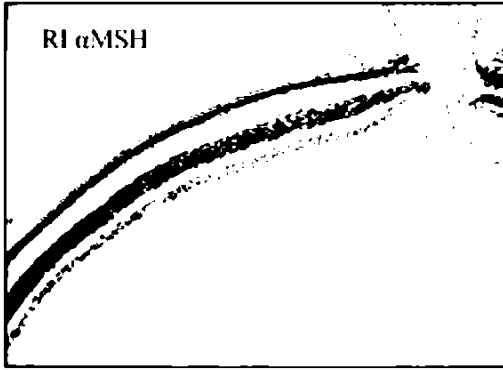
Şekil 3D



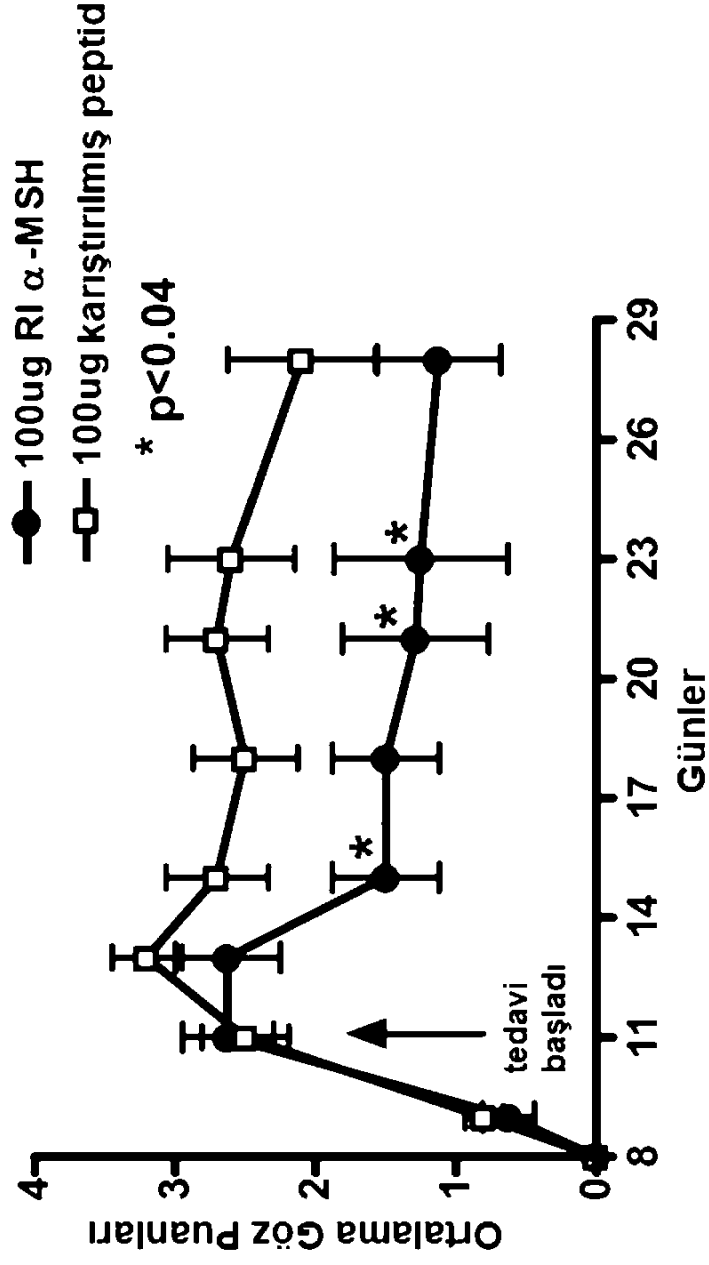
Şekil 4A



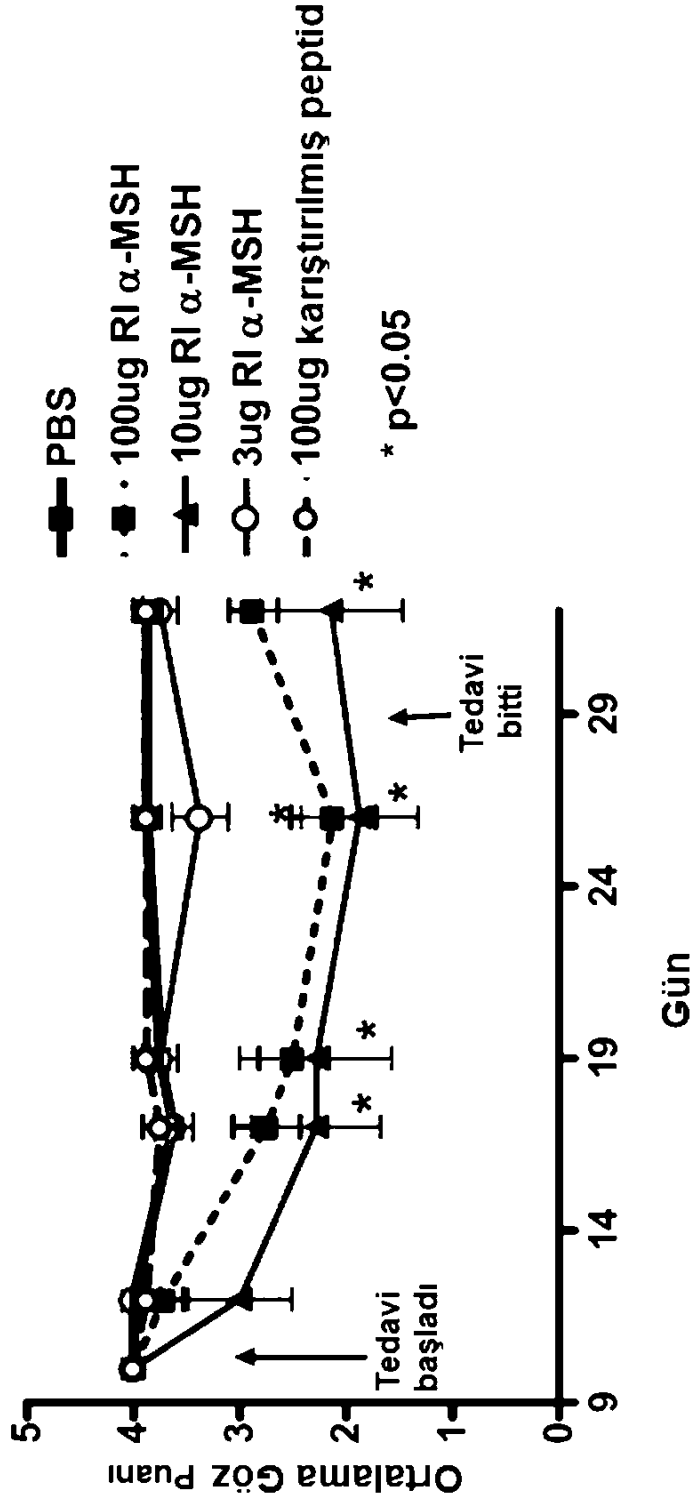
Şekil 4B



Şekil 4C

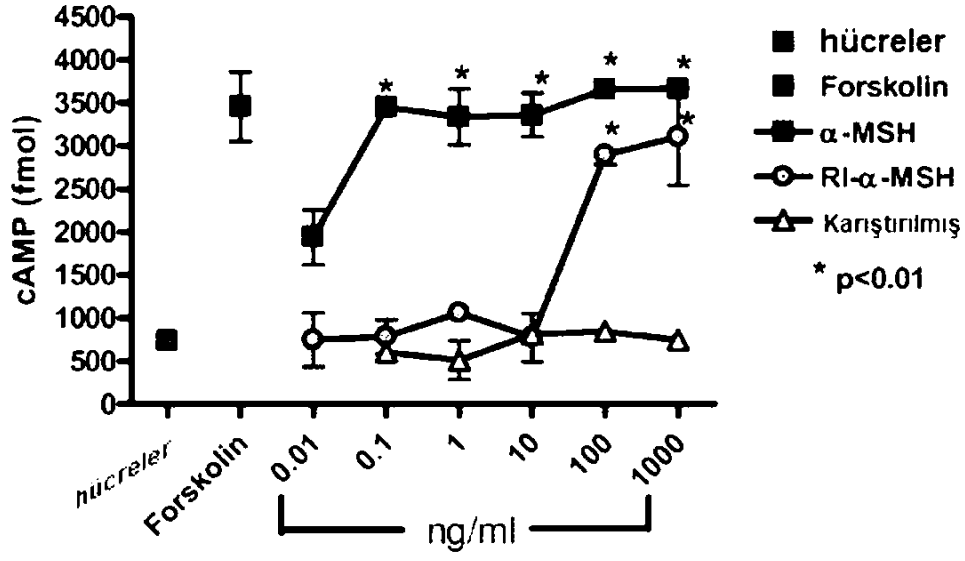


Şekil 5

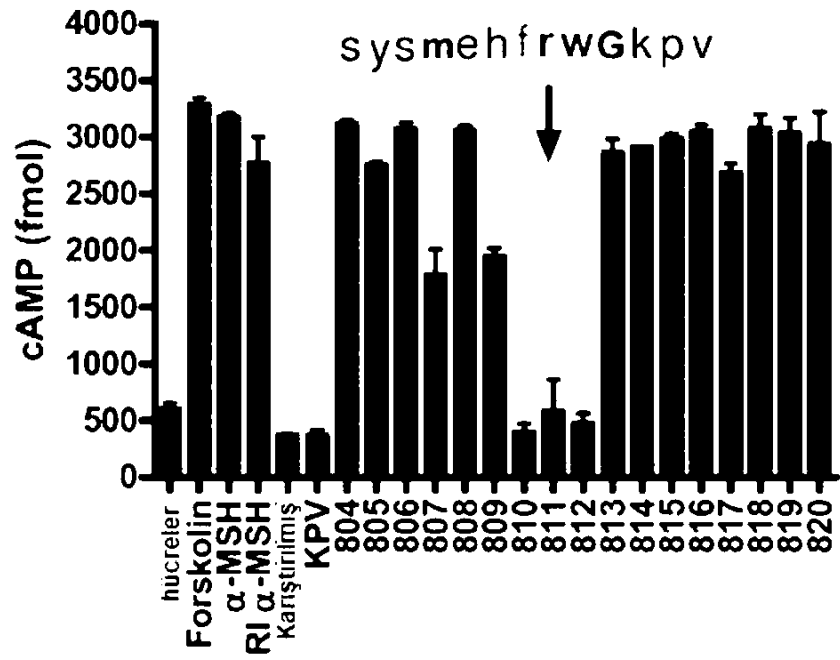


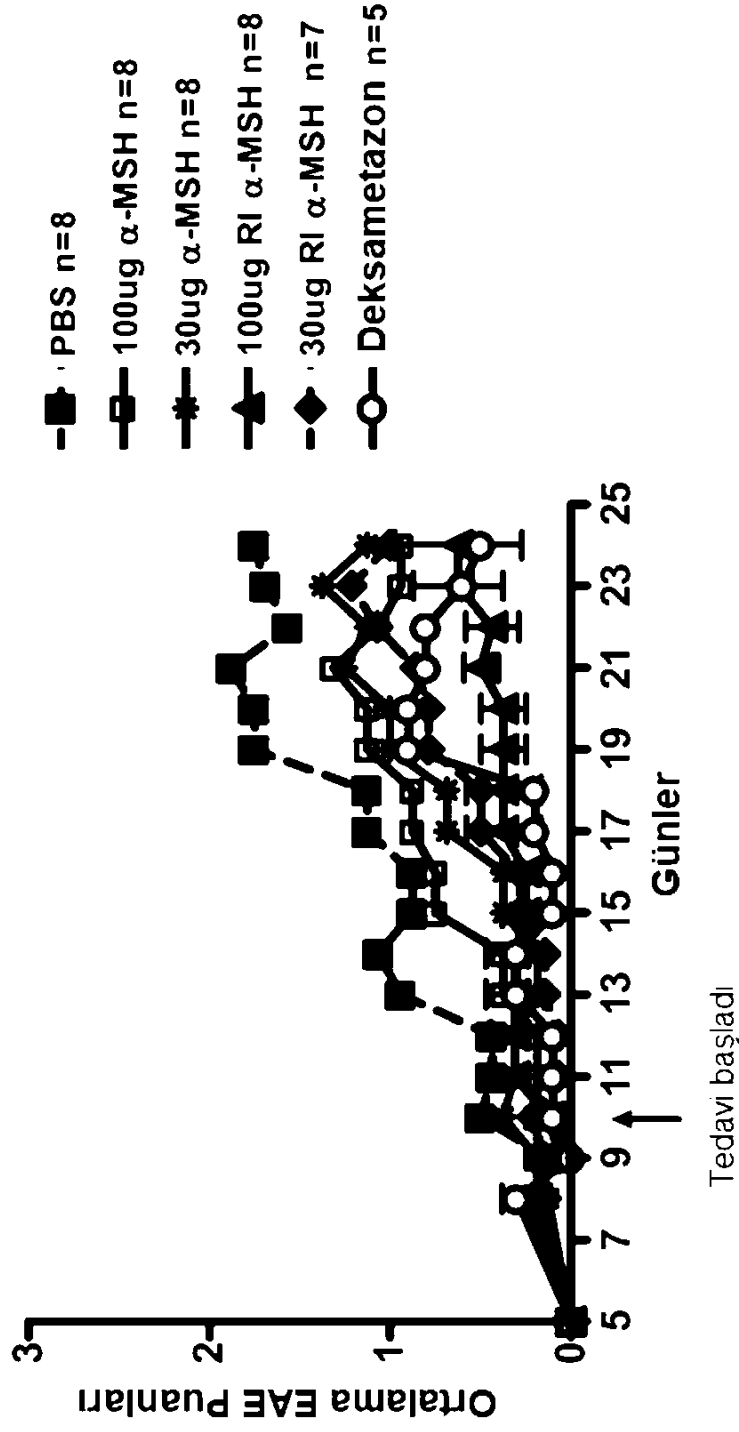
Şekil 6

Şekil 7A

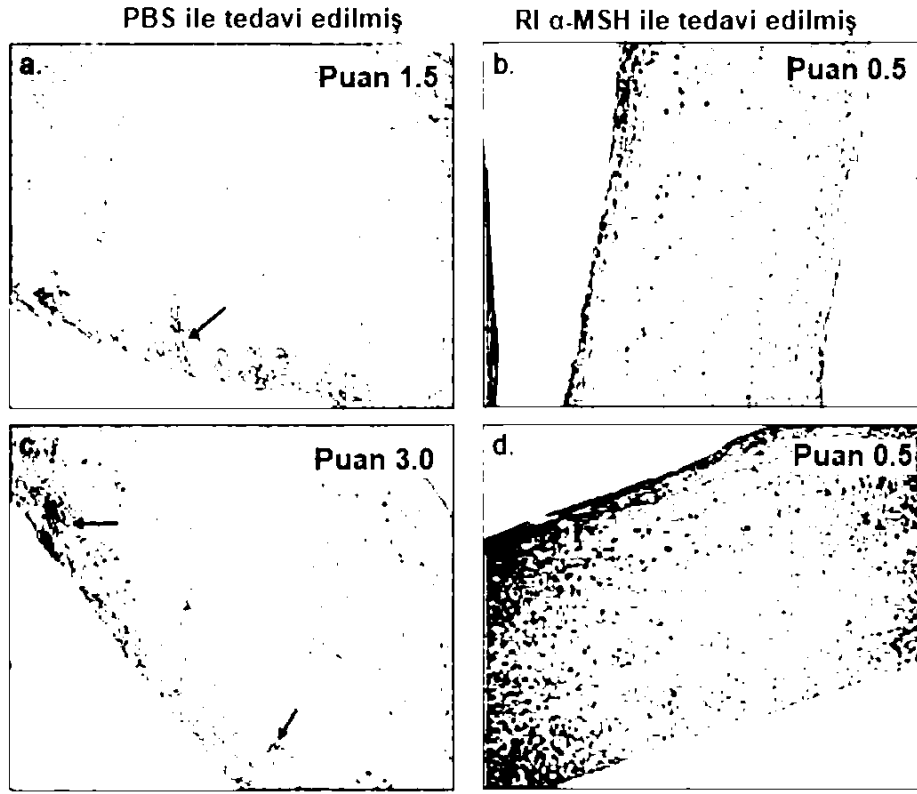


Şekil 7B

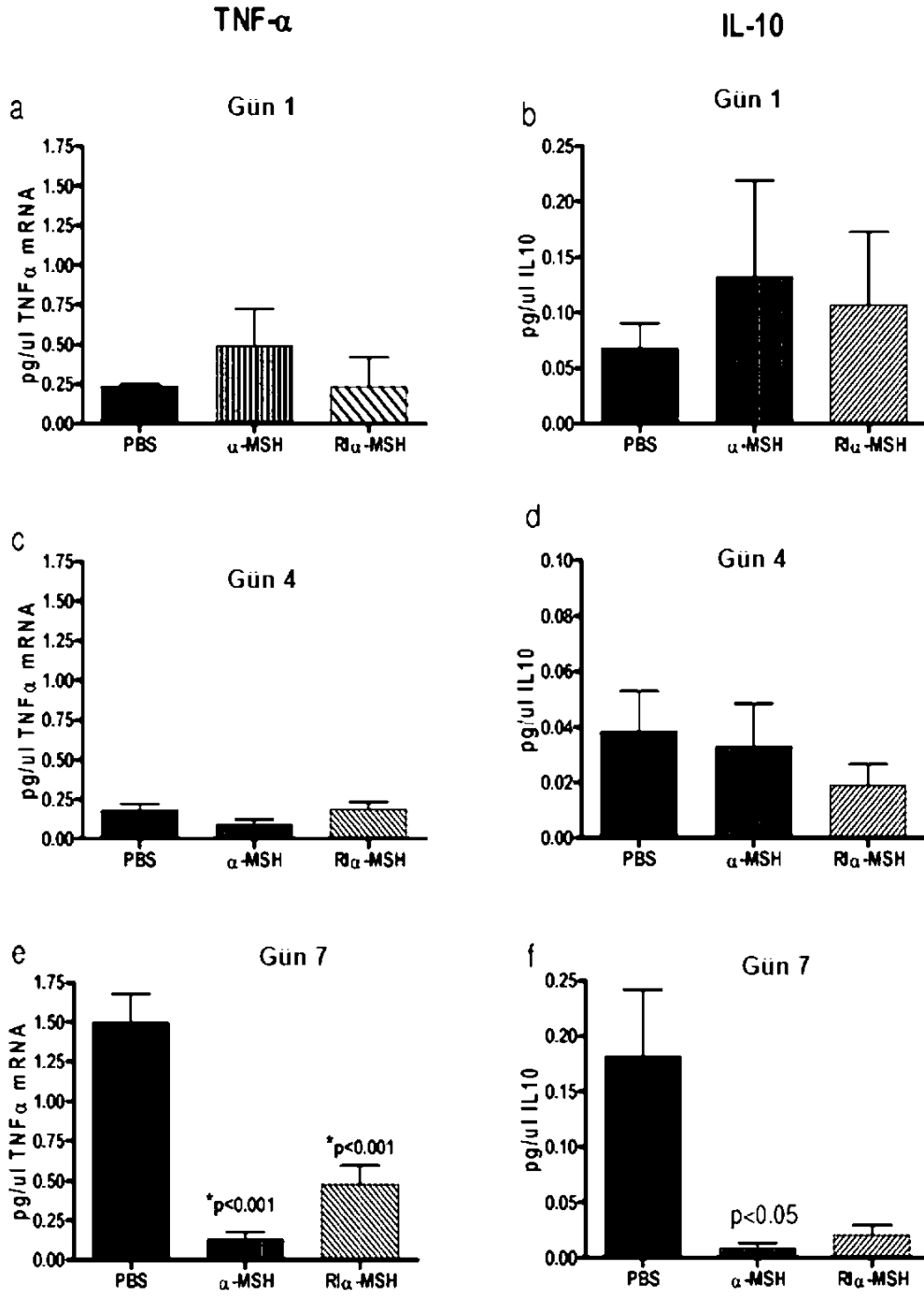




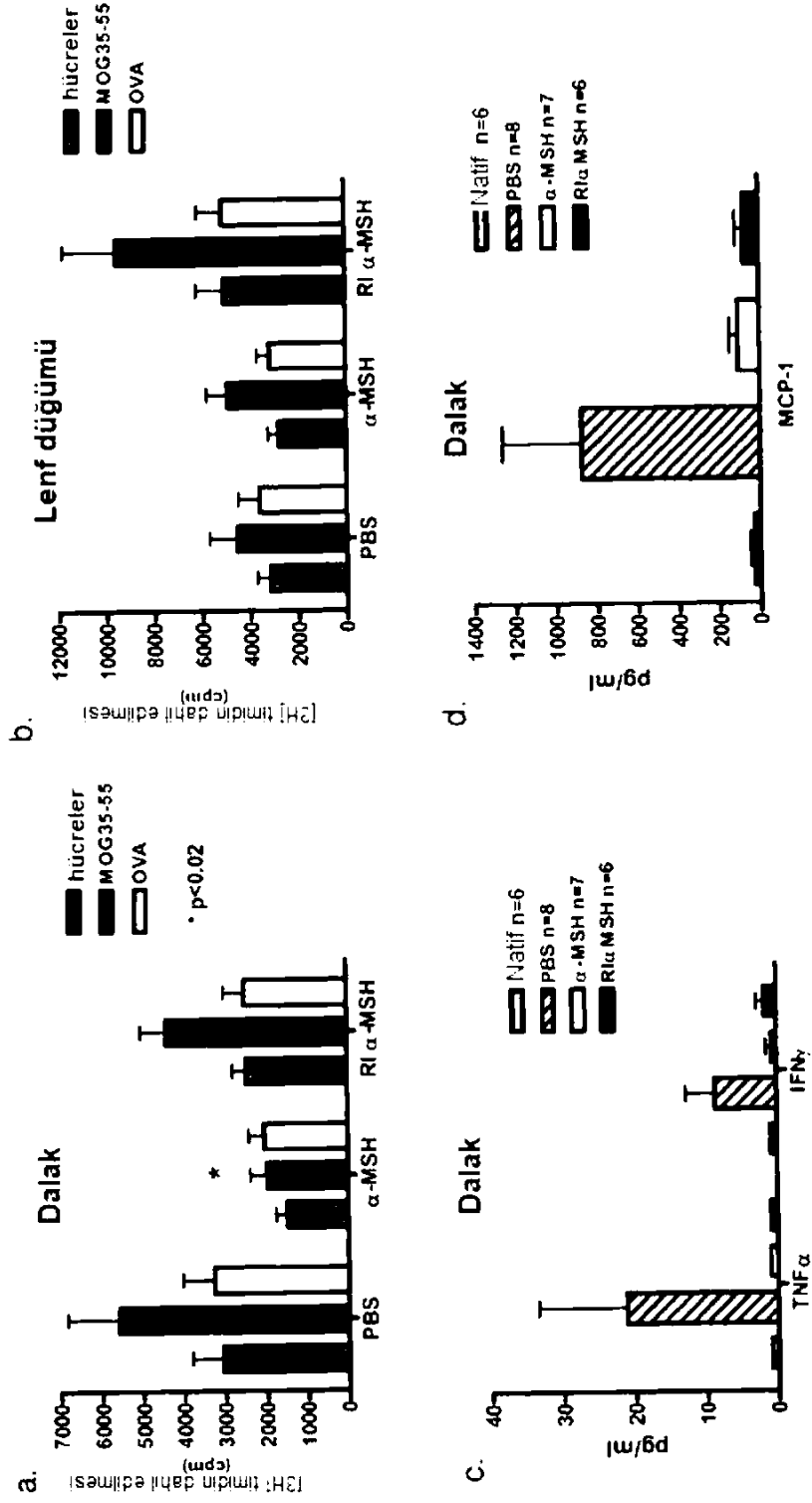
Şekil 9



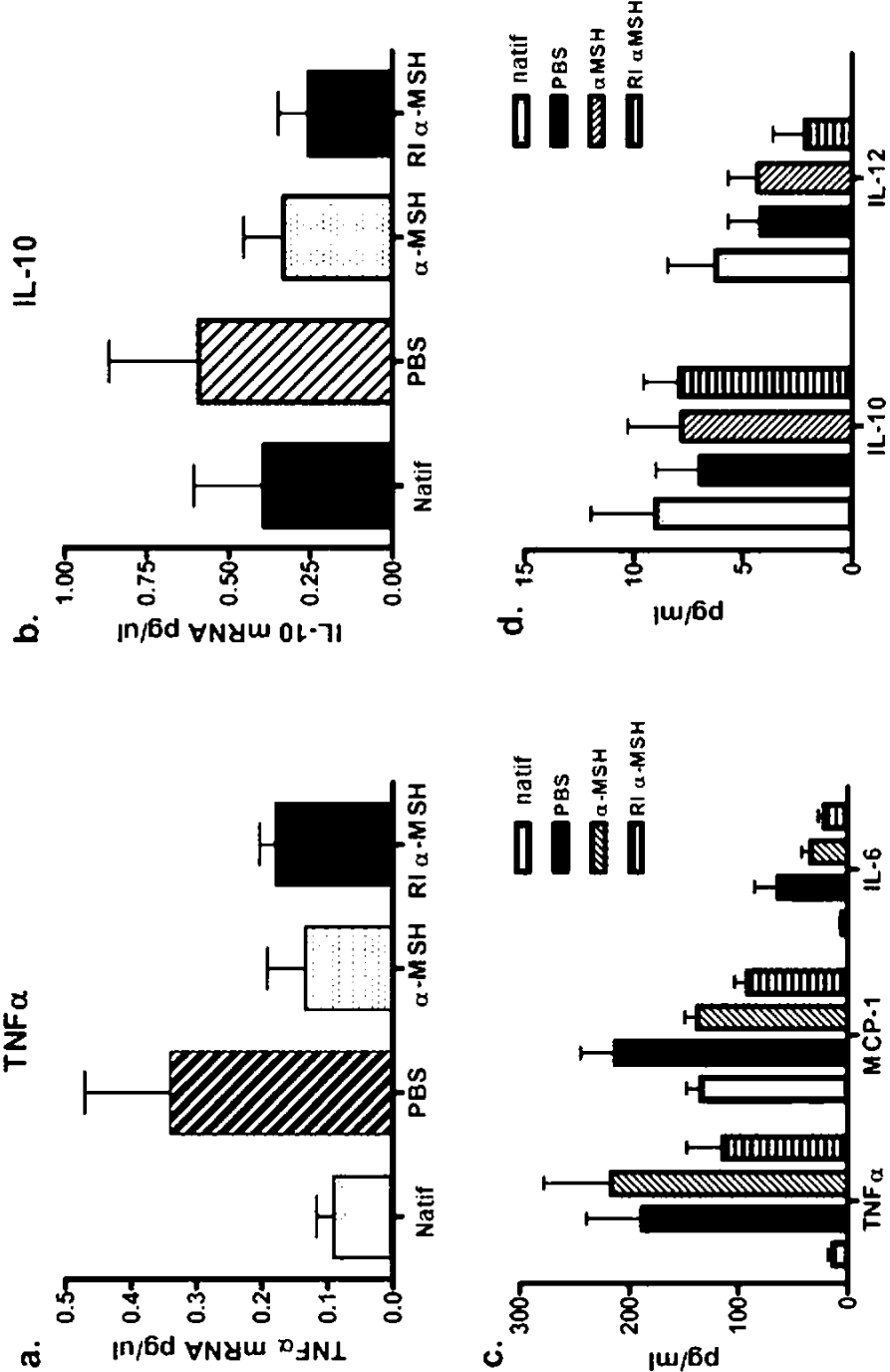
Şekil 10



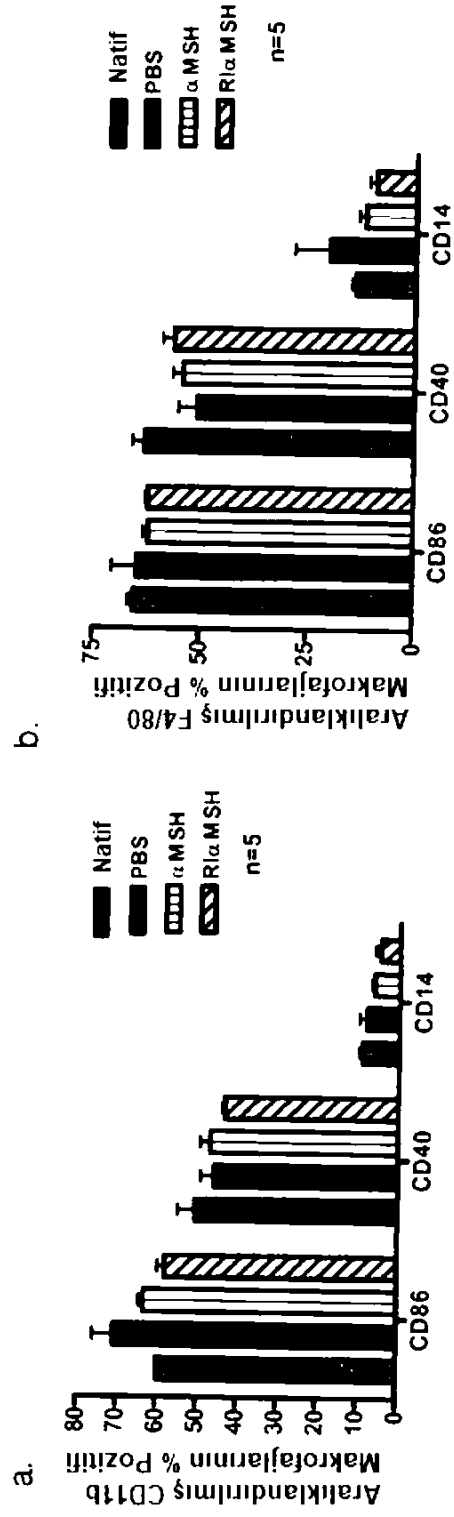
Şekil 11



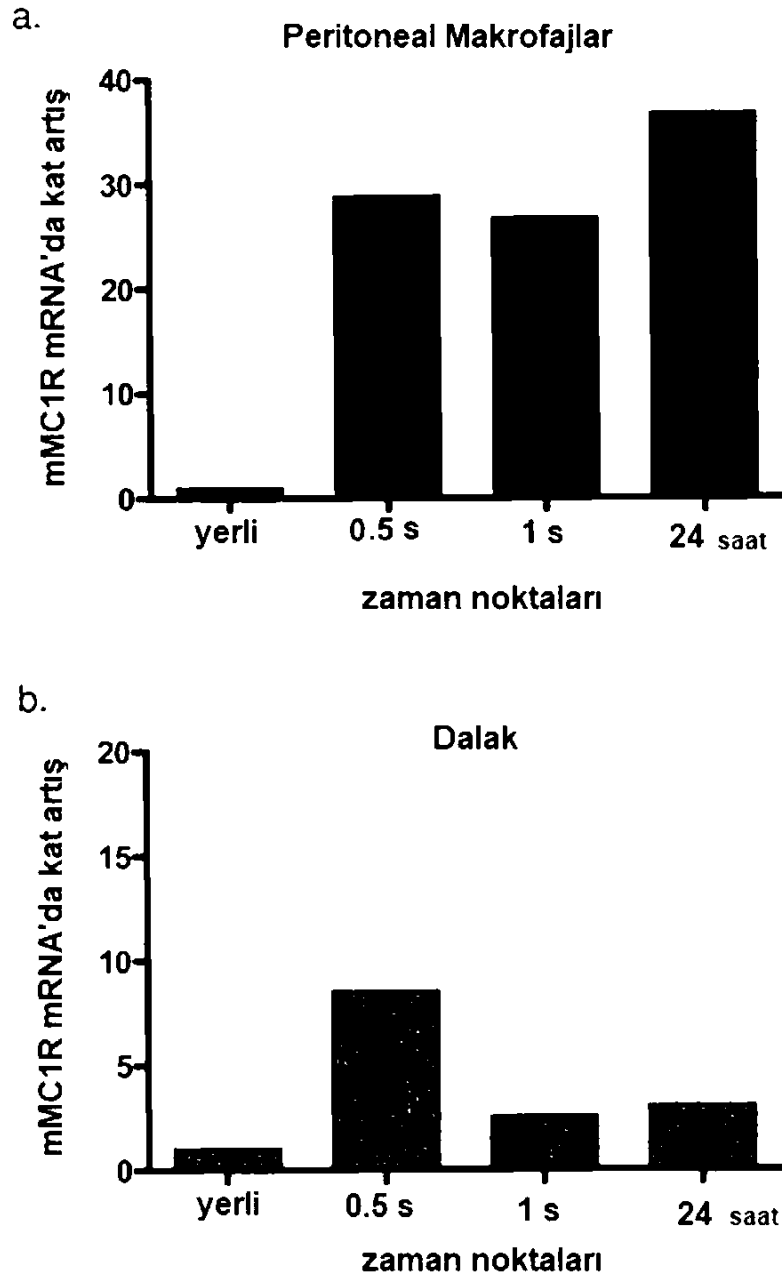
Şekil 12

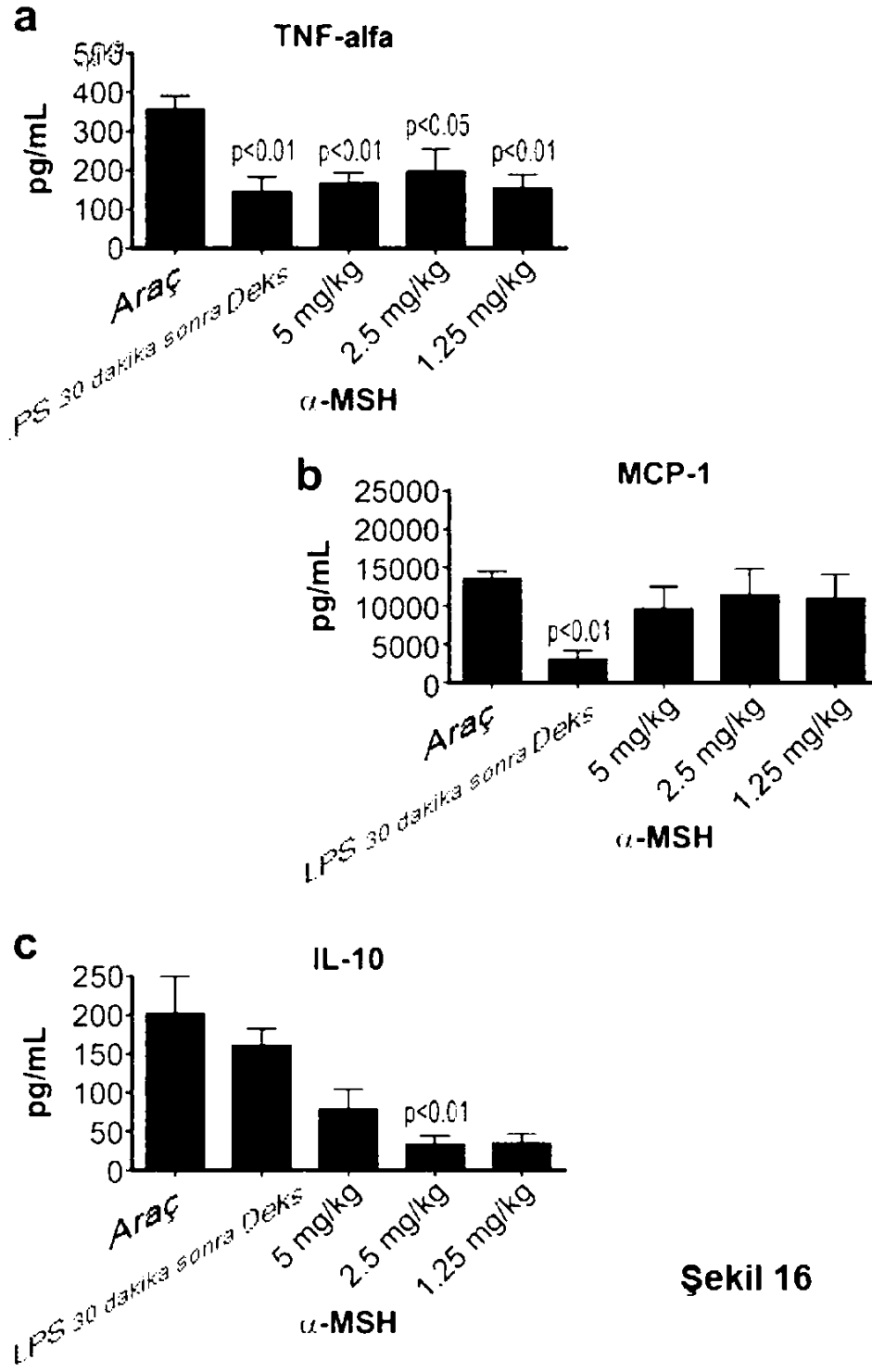


Şekil 13

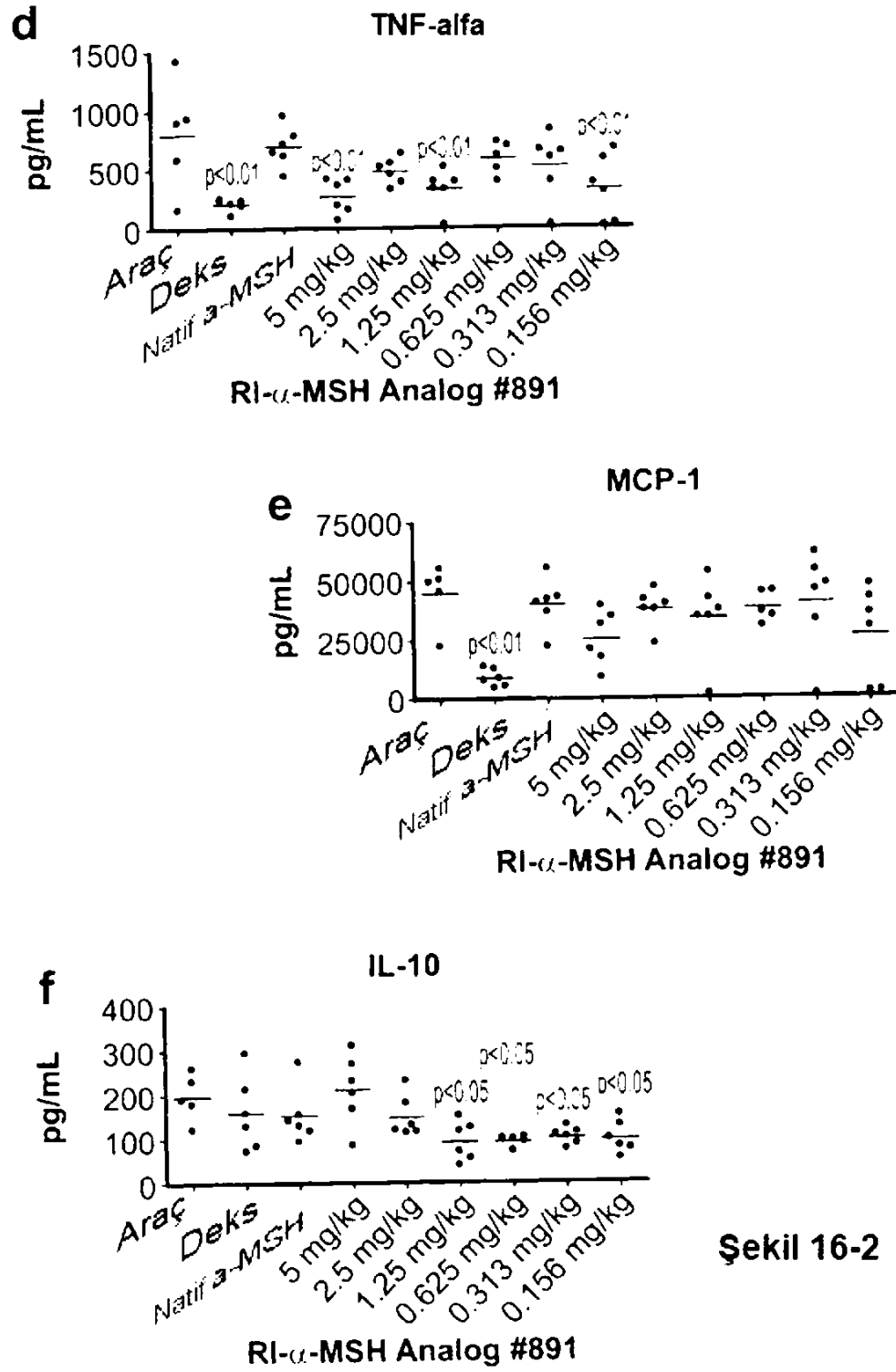


Şekil 14

**Şekil 15**

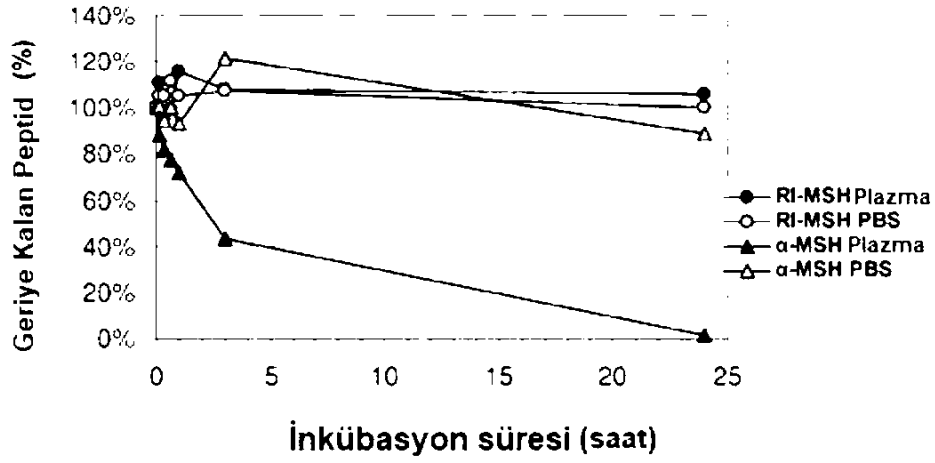


Şekil 16

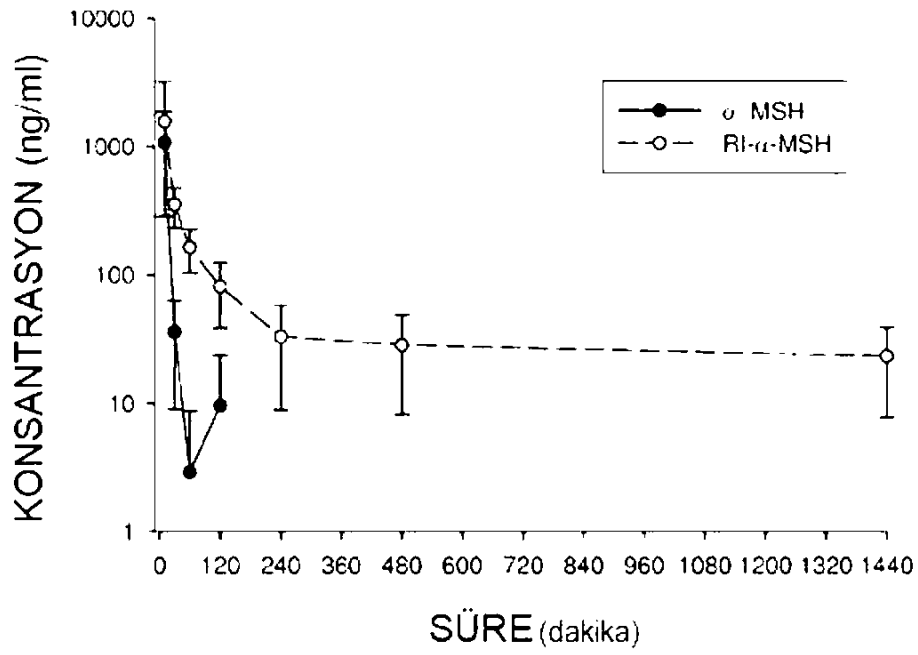


Şekil 16-2

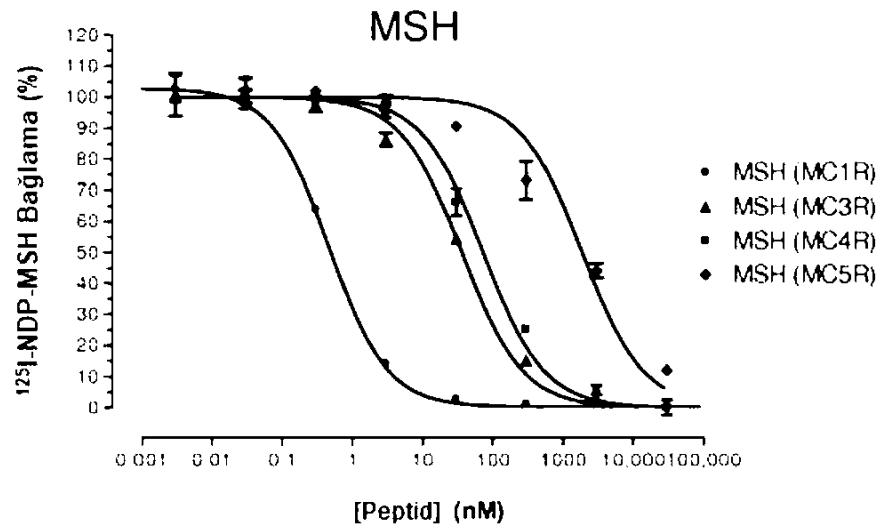
Plazma ve PBS'de MSH Peptidi Stabilitesi (37C)



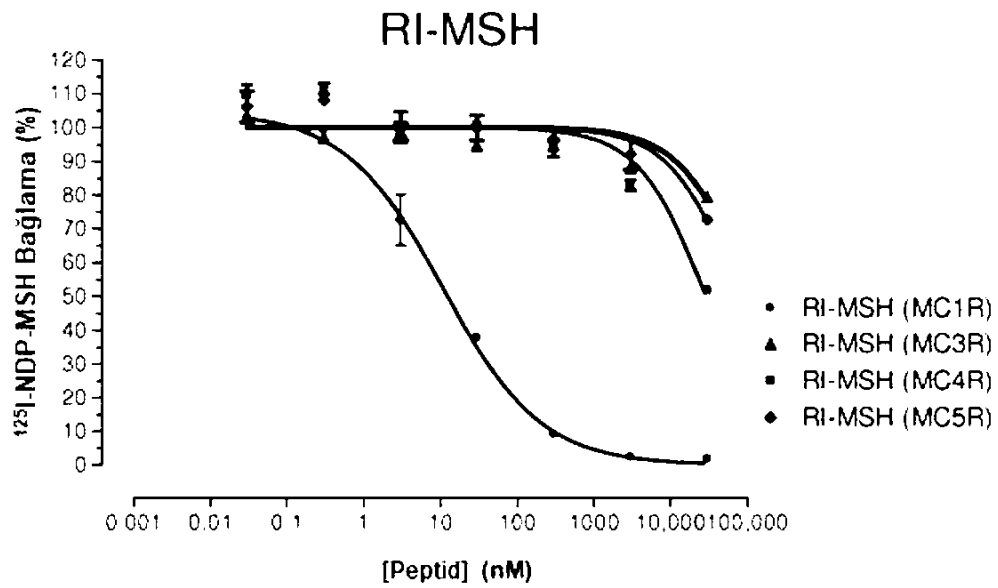
Şekil 17A



Şekil 17B

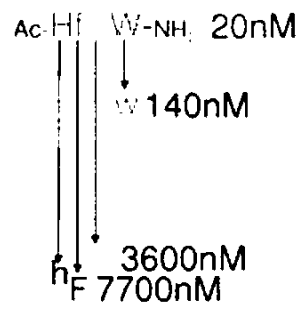


Şekil 18A

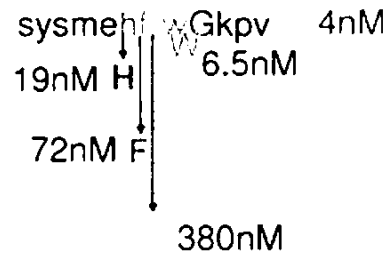


Şekil 18B

HfRW Tetrapeptid (EC50)

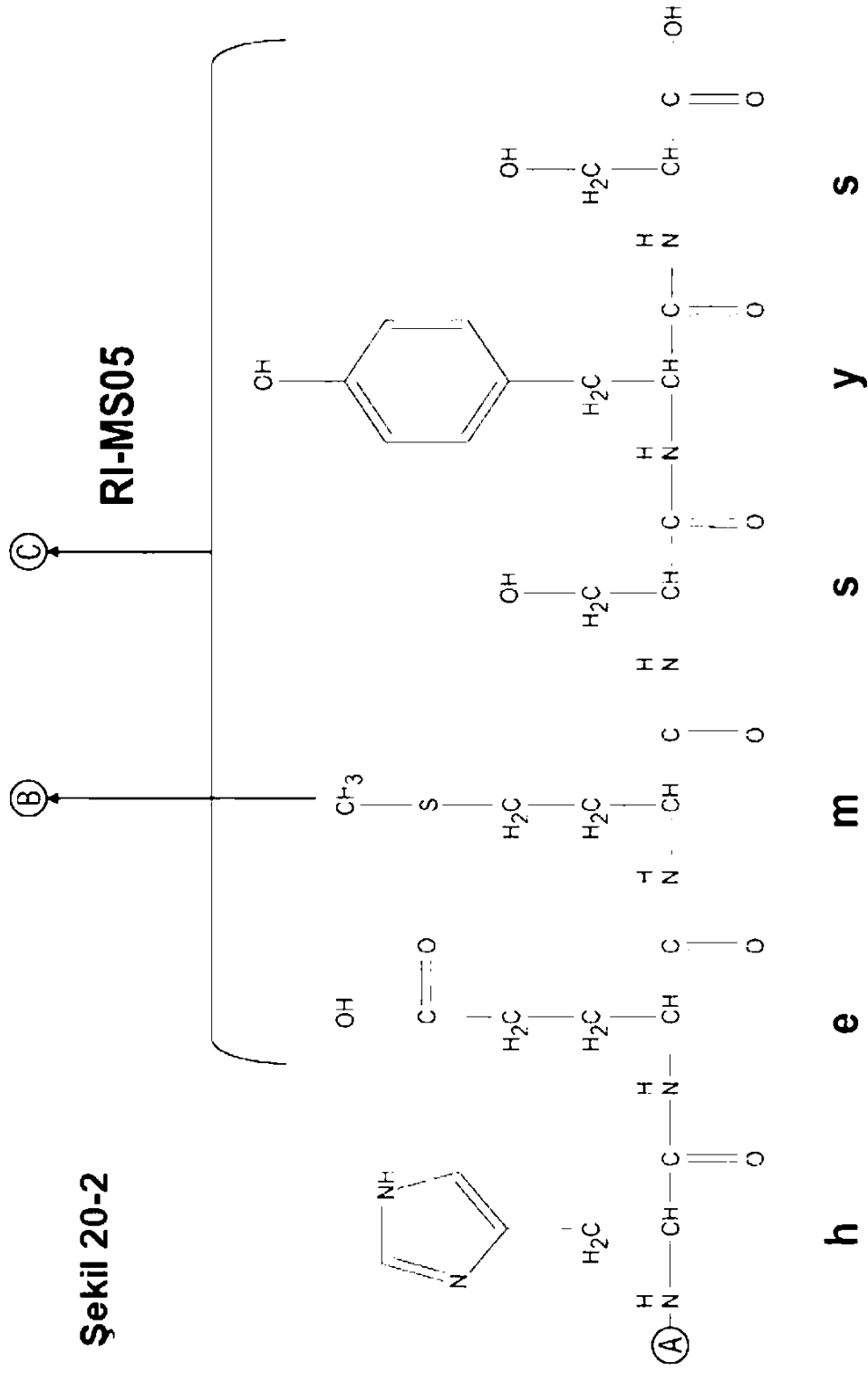


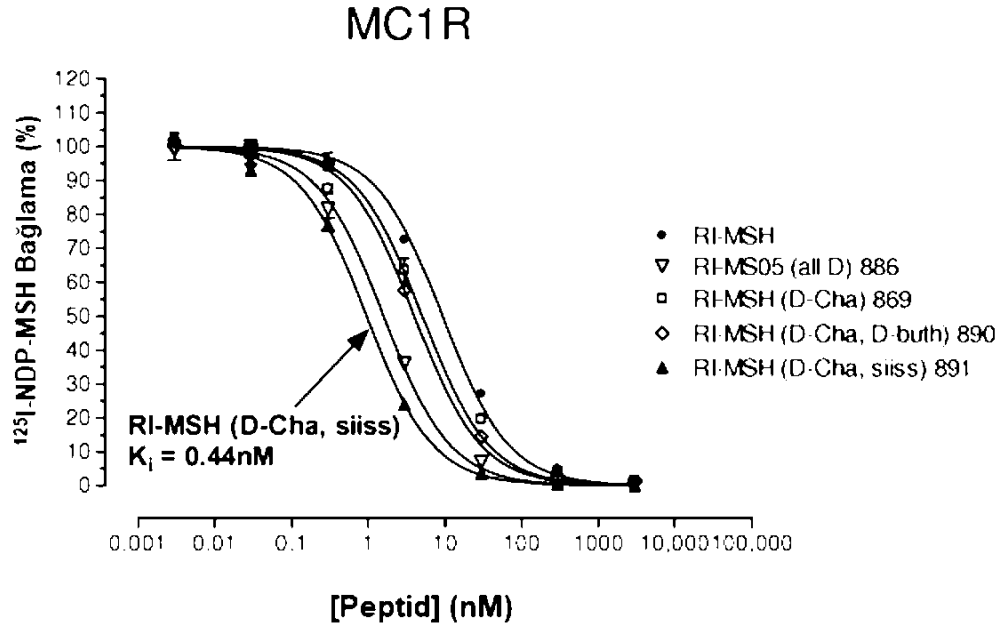
Retroinverso MSH (Ki)



Şekil 19

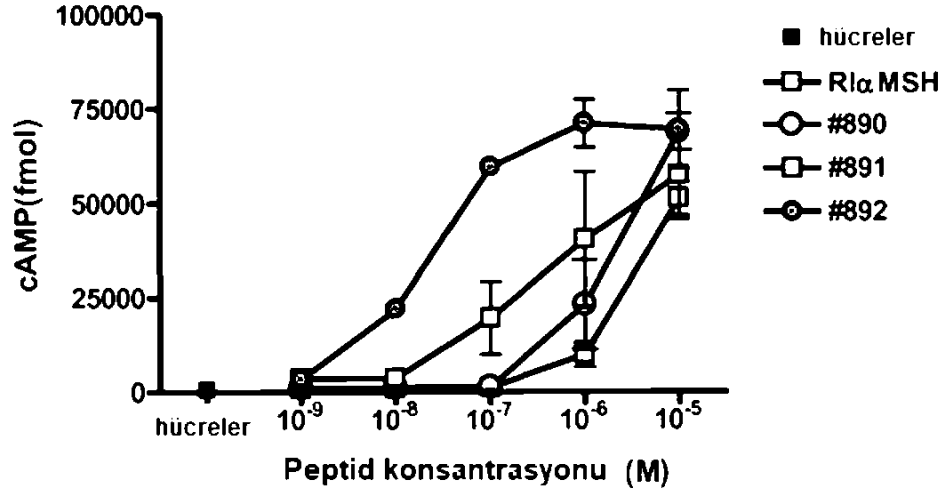
Şekil 20-2



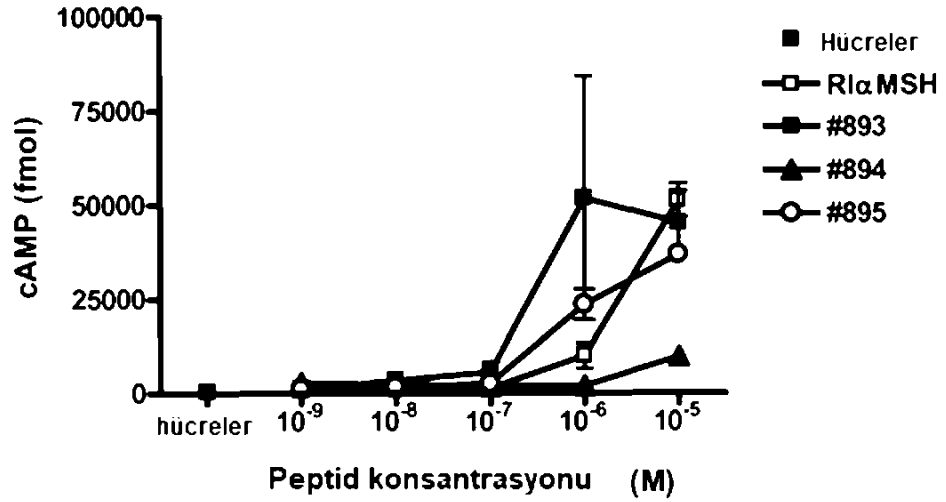


Şekil 21

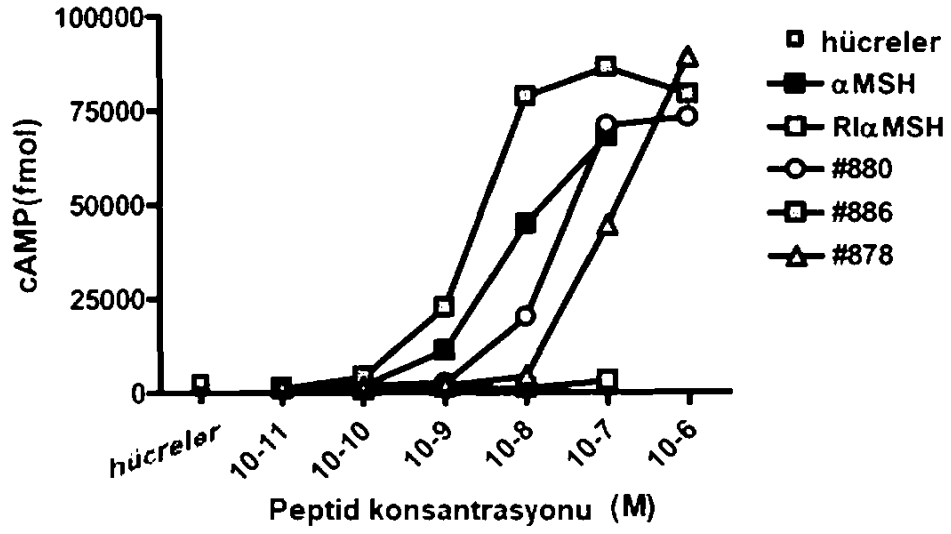
Şekil 22A



Şekil 22B



Şekil 22C



Şekil 22D

