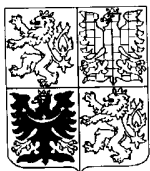


PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **20.08.1999**
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **28.08.1998**
(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/098359**
(33) Země priority: **US**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **14.11.2001**
(Věstník č. 11/2001)
(86) PCT číslo: **PCT/US99/19378**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO00/12553**

(21) Číslo dokumentu:

2001 - 655

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 07 K 14/475

A 61 K 38/18

A 61 P 25/00

(71) Přihlašovatel:
MYELOS CORPORATION, Iselin, NJ, US;

(72) Původce:
Wright David E., Ramona, CA, US;
O'Brien John S., La Jolla, CA, US;

(74) Zástupce:
PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1, Praha 4,
14000;

(54) Název přihlášky vynálezu:
**Cyklický peptid, prostředek, způsob indukce
myelinizace, způsob potlačení degenerace
neuronů a způsob léčby**

(57) Anotace:

Cyklické neurotropní a analgetické peptidy odvozené od aktivní oblasti prosaposinu, obsahující sekvenci $X_1X_2X_3NNX_4TX_5X_6X_7X_8$ (sekvence č. 4), kde X_1 je hydrofóbní aminokyselina (alanin, leucin, izoleucin, valin, tyrozin, tryptofan, fenylalanin nebo methionin), X_2 je hydrofóbní aminokyselina, X_3 je kyselina asparagová, kyselina glutamová, lysin nebo arginin, N je asparagin, X_4 je jakákoliv aminokyselina, T je threonin, X_5 je kyselina glutamová nebo asparagová, X_6 je jakákoliv aminokyselina, X_7 je hydrofóbní aminokyselina a X_8 je hydrofóbní aminokyselina. Tyto peptidy jsou použitelné pro zajištění růstu neuronů, prevenci buněčné smrti, zajištění myelinizace, léčbu neurodegradativních poruch a potlačení či prevenci neuropatické bolesti.

CYKLICKÝ PEPTID, PROSTŘEDEK, ZPŮSOB INDUKCE MYELINIZACE, ZPŮSOB POTLAČENÍ DEGENERACE NEURONŮ A ZPŮSOB LÉČBY

OBLAST TECHNIKY

Navrhovaný vynález popisuje neurotropní a analgetické peptidy. Konkrétně vynález popisuje cyklické peptidy odvozené od aktivní oblasti saposinu C, který má neurotropní a analgetické účinky

DOSAVADNÍ STAV TECHNIKY

Neurotropní faktory jsou proteiny nebo peptidy schopné ovlivnit životaschopnost nervového systému pacienta, nebo funkce buněčné populace neuronů (Barde , Neuron 2: 1525 – 1534, 1989). Účinky neurotropních faktorů in vitro a in vivo jsou dobře známy v současném stavu techniky. Například nervový růstový faktor (NGF) funguje jako trofický faktor pro cholinergní neurony předního mozku a periferní a senzorické neurony (Hefti et al., Neurobiol. Aging 10: 515-533, 1989) a dokáže zvrátit přirozená, stejně jako fyzická traumata periferních nervů (Rich et al., J. Neurocytol. 16:261-268, 1987). Neurotropní faktor mozku (BDNF) je trofický faktor pro periferní senzorické neurony, dopaminergní neurony v Substantia Nigra, centrální cholinergní neurony a retinální ganglia (Henderson et al., Restor. Neurol. Neurosci. 5:15-28, 1993). BDNF, jak bylo prokázáno, ochraňuje buňku před přirozenou smrtí jak in vitro tak in vivo (Hofer et al., Nature 331:262-262, 1998). Ciliární neurotropní faktor (CNTF) zlepšuje přežívání ciliárních ganglií z kuřecích embryí in vitro a podporuje přežívání sympatických senzoryckých a spinálních motorických neuronů v kultuře (Ip et al., J. Physiol. Paris 85:122-130, 1991). Demyelinizace je porucha běžná u řady chorob centrálního nervového systému (CNS) a nejzřetelnější je při roztroušené skleróze (MS). Roztroušená skleróza je chronická porucha, která vede k totální neschopnosti, je charakteristická poškozením myelinové pochvy, zatímco axony zůstávají v zásadě nepoškozené. V současné době v případě roztroušené sklerózy neexistuje žádný účinný léčebný postup. Dalšími poruchami centrálního nervového systému, během nichž dochází k demyelinizaci jsou např. akutní roztroušená encefalomyelitida, amyotropní laterální skleróza, akutní hemoragická leukodystrofie, progresivní multifokální leukoencefalitida, metachromatická leukodystrofie a adrenální leukodystrofie. Demyelinizací může být napaden i periferní nervový systém, jako v případě syndromu Guillian-Barré (Pathologic Basis of Disease, Robbins et al. Eds., W.B. Saunders, Philadelphia, 1979, str. 1578-1582).

Poškození periferních nervů a periferní neuropatie, jako jsou ty, které jsou následkem chemoterapie při cukrovce, jsou nejběžnější poruchy periferních nervů. Současná léčba většiny poruch periferních nervů je zaměřena pouze na potlačení projevů poruch, ale neodstraňují příčiny poruchy.

Neuropatická bolest je důsledkem poškození nervů, jako je jejich stlačením, zmáčknutím nebo traumatickým poškozením míchy a obvykle je dlouhotrvající nebo chronické. Nejhorší poškození nervů také může být způsobeno vznikem neuronů, kdy bolest je důsledkem nenormální regenerace nervů. Dalším příkladem mohou být neuropatické bolesti způsobené nádorovým onemocněním, kdy rostoucí nádor tlačí na přilehlý nerv, mozkovou tkáň nebo míchu. Neuropatické bolesti jsou také spojeny s průběhem některých chorob, jako je diabetes a alkoholismus. Ve většině případů jsou neuropatické bolesti rezistentní k potlačení současnými léčivy. Tato léčiva mají mnohdy vážné vedlejší účinky. patentová přihláška US 08/611 307 popisuje způsob potlačení nebo prevence neuropatických bolestí podáním efektivního množství aktivního fragmentu prosaposinu pacientovi.

Prosaposin je prekursor skupiny malých, termostabilních glykoproteinů, které jsou nezbytné pro hydrolýzu glykosfingolipidů lysozomálními hydrolázami (Kishimi et al., J. Lipid Res. 33:1255-1267, 1992). Prosaposin je proteolyticky štěpen v lysozómech, čímž vznikají saposiny A, B, C a D (O'Brien et al., FASEB J. 5:301-308, 1991). O'Brien et al. (Proc. Natl. Acad. Sci USA, 91:9593-9596, 1994), patent US 5 571 787 a publikovaná PCT aplikace č. WO 95/03 821 popisují, že prosaposin, saposin C stimulují růst neuritů a zvýšenou myelinizaci. Navíc. patenty US 5 571 787, US 5 696 080, US 5 714 459 a publikovaná PCT aplikace č. WO 95/03 821 popisují, že 22 aminokyselin dlouhý peptid (CEFLVKEVTKLIDNNKTEKEIL, sekvence č. 1) obsahující aminokyseliny 8 až 29 z lidského saposinu C stimuluje nárůst neuritů. Tyto publikace také říkají, že 18 aminokyselin dlouhý peptid (YKEVTKLIDNNKTEKEIL, sekvence č. 2) obsažený v 22 aminokyselin dlouhém saposinu C (kde V je nahrazeno Y) také zvyšuje růst neuritů a je schopen projít přes krevně – mozkovou bariéru. O'Brien et al., (FASEB J. 9:681-685, 1995) ukazuje, že 22 aminokyselin dlouhý peptid stimuluje cholinovou acetyltransferázovou aktivitu a chrání neurony před smrtí. Aktivní neuritogenní fragment byl lokalizován v lineární 12 aminokyselin dlouhé sekvenci nacházející se na amino konci saposinu C (LIDNNKTEKEIL, sekvence č. 3) (O'Brien et al., FASEB J. 9:681-685, 1994). Liepinsh et al., (Nature Struct. Biol. 4:793-795) ukazuje, že konformace smyčky neurotropně aktivního segmentu peptidu NK lysinu (jednotky 17 až 30) může být napodobena kruhovým peptidem.

Hlavní překážkou terapeutického in vivo použití těchto peptidů je jejich citlivost k proteolytické degradaci. Navrhovaný vynález popisuje cyklické peptidy napodobující části prosaposinu, která jsou však odolné k proteolytickému štěpení a schopné prostoupení přes krevně – mozkovou bariéru.

PODSTATA VYNÁLEZU

Jednou variantou navrhovaného vynálezu je cyklický peptid s neurotropními a analgetickými účinky který je složen z 11 až 25 aminokyselin a jeho struktura je odvozena od sekvence $X_1X_2X_3NNX_4TX_5X_6X_7X_8$, kde X_1 je hydrofóbní aminokyselina (alanin, leucin, izoleucin, valin, tyrozin, tryptofan, fenylalanin nebo methionin), X_2 je hydrofóbní aminokyselina, X_3 je kyselina asparagová, kyselina glutamová, lysin nebo arginin, N je asparagin, X_4 je jakákoliv aminokyselina, T je threonin, X_5 je kyselina glutamová nebo asparagová, X_6 je jakákoliv aminokyselina, X_7 je hydrofóbní aminokyselina a X_8 je hydrofóbní aminokyselina. Nejvhodnější je pokud peptid má aminokyselinovou sekvenci uvedenou jako sekvence č. 5 nebo 6.

Navrhovaný vynález popisuje prostředek obsahující výše popsany peptid v neprodyšně uzavřených nádobách upravených tak aby se produkt nerozpadal v lyofilizované formě, ve formě lipozómů, ve formě vhodné pro povrchovou aplikaci nebo v jednotkové dávkovací formě.

Další možností navrhovaného vynálezu je popsat způsob indukce myelinizace nebo inhibici demyelinizace u savců, představující podání savcům trpícím demyelinizací farmaceuticky efektivní dávku cyklických peptidů schopnou potlačit demyelinizaci, přičemž peptid je složen z 11 až 25 aminokyselin a obsahuje sekvenci $X_1X_2X_3NNX_4TX_5X_6X_7X_8$, kde X_1 je hydrofóbní aminokyselina (alanin, leucin, izoleucin, valin, tyrozin, tryptofan, fenylalanin nebo methionin), X_2 je hydrofóbní aminokyselina, X_3 je kyselina asparagová, kyselina glutamová, lysin nebo arginin, N je asparagin, X_4 je jakákoliv aminokyselina, T je threonin, X_5 je kyselina glutamová nebo asparagová, X_6 je jakákoliv aminokyselina, X_7 je hydrofóbní aminokyselina a X_8 je hydrofóbní aminokyselina. V jedné z konkrétních variant navrhovaného vynálezu, je demyelinizace způsobena roztroušenou sklerózou, ischemickým nebo traumatickým poraněním. Je vhodné, aby podání mělo formu nitrožilní, intramuskulární, intradermální, podkožní, intrakraniální, intracerebrospinální nebo povrchové aplikace. Je vhodné aby peptid byl podáván ve farmaceuticky přijatelném nosiči. V jiné variantě navrhovaného vynálezu, je peptid zahrnut v lamelární struktuře. Je vhodné, aby peptid měl sekvenci uvedenou jako sekvence č. 5 nebo 6. Další možností navrhovaného vynálezu je, že savcem je člověk.

Navrhovaný vynález dále popisuje způsob inhibice neurální degenerace nebo zajišťuje růst neuritů v nervové tkáni, který je charakteristický tím, že zahrnuje: kontakt nervové tkáně postižené touto degenerací s farmaceuticky efektivní dávkou cyklických peptidů schopnou potlačit demyelinizaci, přičemž peptid je složen z 11 až 25 aminokyselin a obsahuje sekvenci $X_1X_2X_3NNX_4TX_5X_6X_7X_8$, kde X_1 je hydrofóbní aminokyselina (alanin, leucin, izoleucin, valin, tyrozin, tryptofan, fenylalanin nebo methionin), X_2 je hydrofóbní aminokyselina, X_3 je kyselina asparagová, kyselina glutamová, lysin nebo arginin, N je asparagin, X_4 je jakákoliv aminokyselina, T je threonin, X_5 je kyselina glutamová nebo asparagová, X_6 je jakákoliv aminokyselina, X_7 je hydrofóbní aminokyselina a X_8 je hydrofóbní aminokyselina. Je vhodné, aby peptid měl sekvenci uvedenou jako sekvence č. 5 nebo 6. Je vhodné, aby podání mělo formu nitrožilní, intramuskulární, intradermální, podkožní, intrakraniální, intracerebrospinální nebo povrchové aplikace. Je vhodné aby peptid byl podáván ve farmaceuticky přijatelném nosiči. V jiné variantě navrhovaného vynálezu, je peptid zahrnut v lamelární struktuře. Je vhodné, aby peptid měl sekvenci uvedenou jako sekvence č. 5 nebo 6. Je vhodné aby savcem byl člověk.

Další variantou navrhovaného vynálezu, je způsob léčby neuropatické bolesti u savců, kteří touto poruchou trpí, zahrnující krok podání farmaceuticky efektivní dávky cyklických peptidů schopné tuto bolest potlačit savcům trpícím neuropatickou bolestí, přičemž peptid je složen z 11 až 25 aminokyselin a obsahuje sekvenci $X_1X_2X_3NNX_4TX_5X_6X_7X_8$, kde X_1 je hydrofóbní aminokyselina (alanin, leucin, izoleucin, valin, tyrozin, tryptofan, fenylalanin nebo methionin), X_2 je hydrofóbní aminokyselina, X_3 je kyselina asparagová, kyselina glutamová, lysin nebo arginin, N je asparagin, X_4 je jakákoliv aminokyselina, T je threonin, X_5 je kyselina glutamová nebo asparagová, X_6 je jakákoliv aminokyselina, X_7 je hydrofóbní aminokyselina a X_8 je hydrofóbní aminokyselina. Je vhodné, aby podání mělo formu nitrožilní, intramuskulární, intradermální, podkožní, intrakraniální, intracerebrospinální nebo povrchové aplikace. Je vhodné, aby peptid měl sekvenci uvedenou jako sekvence č. 5 nebo 6. Je vhodné aby peptid byl podáván ve farmaceuticky přijatelném nosiči. V jiné variantě navrhovaného vynálezu, je peptid zahrnut v lamelární struktuře. Je vhodné aby savcem byl člověk.

Navrhovaný vynález dále popisuje cyklický peptid, který je složen z 11 až 25 aminokyselin a obsahuje sekvenci $X_1X_2X_3NNX_4TX_5X_6X_7X_8$, kde X_1 je hydrofóbní aminokyselina (alanin, leucin, izoleucin, valin, tyrozin, tryptofan, fenylalanin nebo methionin), X_2 je hydrofóbní aminokyselina, X_3 je kyselina asparagová, kyselina glutamová, lysin nebo arginin, N je asparagin, X_4 je jakákoliv aminokyselina, T je threonin, X_5 je kyselina glutamová nebo asparagová, X_6 je jakákoliv aminokyselina, X_7 je hydrofóbní aminokyselina a X_8 je hydrofóbní

aminokyselina, pro indukci myelinizace nebo inhibici demyelinizace u savců. Je vhodné, aby peptid měl sekvenci uvedenou jako sekvence č. 5 nebo 6.

Další variantou navrhovaného vynálezu, je cyklický peptid, který je složen z 11 až 25 aminokyselin a obsahuje sekvenci $X_1X_2X_3NNX_4TX_5X_6X_7X_8$, kde X_1 je hydrofóbní aminokyselina (alanin, leucin, izoleucin, valin, tyrozin, tryptofan, fenylalanin nebo methionin), X_2 je hydrofóbní aminokyselina, X_3 je kyselina asparagová, kyselina glutamová, lysin nebo arginin, N je asparagin, X_4 je jakákoliv aminokyselina, T je threonin, X_5 je kyselina glutamová nebo asparagová, X_6 je jakákoliv aminokyselina, X_7 je hydrofóbní aminokyselina a X_8 je hydrofóbní aminokyselina, pro inhibici neurální degenerace nebo zajištění nárůstu množství neuritů. Je vhodné, aby peptid měl sekvenci uvedenou jako sekvence č. 5 nebo 6.

Navrhovaný vynález dále popisuje cyklický peptid, který je složen z 11 až 25 aminokyselin a obsahuje sekvenci $X_1X_2X_3NNX_4TX_5X_6X_7X_8$, kde X_1 je hydrofóbní aminokyselina (alanin, leucin, izoleucin, valin, tyrozin, tryptofan, fenylalanin nebo methionin), X_2 je hydrofóbní aminokyselina, X_3 je kyselina asparagová, kyselina glutamová, lysin nebo arginin, N je asparagin, X_4 je jakákoliv aminokyselina, T je threonin, X_5 je kyselina glutamová nebo asparagová, X_6 je jakákoliv aminokyselina, X_7 je hydrofóbní aminokyselina a X_8 je hydrofóbní aminokyselina, pro léčbu neuropatické bolesti. Je vhodné, aby peptid měl sekvenci uvedenou jako sekvence č. 5 nebo 6.

Navrhovaný vynález popisuje cyklické peptidy odvozené od saposinu C, které jsou složeny z 11 až 25 aminokyselin a obsahují sekvenci $X_1X_2X_3NNX_4TX_5X_6X_7X_8$, kde X_1 je hydrofóbní aminokyselina (alanin, leucin, izoleucin, valin, tyrozin, tryptofan, fenylalanin nebo methionin), X_2 je hydrofóbní aminokyselina, X_3 je kyselina asparagová, kyselina glutamová, lysin nebo arginin, N je asparagin, X_4 je jakákoliv aminokyselina, T je threonin, X_5 je kyselina glutamová nebo asparagová, X_6 je jakákoliv aminokyselina, X_7 je hydrofóbní aminokyselina a X_8 je hydrofóbní aminokyselina. Je vhodné, aby peptid měl sekvenci: cyklo-(LLDNNKTEKLY) (sekvence č. 5) nebo cyklo-(LIDNNATEEIL) (sekvence č. 6). Díky své vynucené struktuře, jsou tato cyklická prosaposinová peptidomimetika výrazně rezistentnější k enzymatické degradaci a jsou schopna překročit krevně-mozkovou bariéru v daleko větší míře než odpovídající lineární peptidy. Cyklické peptidy podle navrhovaného vynálezu jsou stejně, nebo více účinnější pro stimulaci růstu neuritů než známá lineární vysoce aktivní prosaposinová peptidomimetika („prosaptidy“) se sekvencí TXLIDNNATEEILY, kde X je D-alanin (sekvence č. 7) (příklad 1). . Navíc jsou cyklické peptidy podle navrhovaného vynálezu efektivnější, než prosaptidy v prevenci buněčné smrti neuronů in vitro (příklad 2). Tyto cyklické peptidy postrádají amino- i

karboxy- konec. Jsou tedy daleko rezistentnější k degradaci in vivo aminopeptidázami a karboxypeptidázami které degradují peptidy od amino- nebo karboxy- konce.

Cyklické peptidy odvozené od saposinu C obsahující aktivní 11 aminokyselin dlouhou oblast (sekvence č. 4), a jejich neurotropní analogy, jsou použitelné pro zajištění funkční regenerace po otravě, traumatu, ischemii a degenerativní nebo dědičné lézi v periferním nervstvu nebo centrální nervové soustavě. Navíc tyto peptidy stimulují proces myelinizace a působí proti poruchám způsobujícím demyelinizaci. Tyto peptidy stimulují tvorbu neuritů, zajišťují myelinizaci, chrání nervové buňky a zabraňují programované buněčné smrti nervové tkáně u savců, lépe pak u lidí. Peptidy podle navrhovaného vynálezu mohou být také použity pro léčbu celé řady neuropatií, jako jsou například neuropatie motorické, senzorické, periferní, indukované taxolem a diabetické. Jak je používán zde termín „neuropatie“ popisuje funkční poruchu nebo patologickou změnu v periferním nervovém systému a je charakterizovatelná klinicky senzorickými nebo motorickými neuronálními abnormalitami. Tyto peptidy jsou také použitelné jako analgetika, konkrétně pak pro léčbu neuropatické bolesti u savců, spíše u lidí, která může nastat dny nebo týdny po traumatickém poranění a obvykle trvá dlouhou dobu a jsou chronické. Druhý asparagin v přirozené sekvenci prosaposinu (odpovídá druhému „N“ v sekvenci č. 4) je, jak je známo, glykosylován N-acetylglukozaminem, což mu dodává jistou ochranu před proteolytickým štěpením. Syntetické modifikace tohoto asparátu uvnitř modifikované sekvence odvozené od saposinu C standartní technikou (např. Merrifieldovou syntézou) s různými sacharidy, nejčastěji glukózou, spadá také do rámce navrhovaného vynálezu.

Jedna varianta navrhovaného vynálezu popisuje způsob indukce růstu neuritů a nárůstu myelinizace v diferenciovaných nebo nediferenciovaných neuronech pomocí podání efektivního množství peptidu odvozeného od saposinu C, indukujícího nárůst neuritů a tvorbu myelinu, který obsahuje aktivní 11 aminokyselin dlouhou sekvenci uvedenou jako sekvence č. 4.

Cyklické peptidové analogy saposinu C podle navrhovaného vynálezu se mohou odlišovat od saposinu C v sekvencích označených jako sekvence č. 4 až 6, například nahrazením jednoho nebo více lysinů anebo argininů, nahrazením jednoho nebo více tyrosinů anebo fenylyalaninů, odstraněním jednoho nebo více fenylyalaninů anebo konzervativní záměnou jednou nebo více aminokyselin uvnitř peptidu. Nahrazení nebo odstranění lysinu, argininu nebo tyrosinu, fenylyalaninu sníží citlivost peptidu ke štěpení trypsinem anebo chymotrypsinem. Cyklické neurotropní a myelinotropní peptidové sekvence podle navrhovaného vynálezu obsahují zpravidla okolo 50 aminokyselin, lépe pak okolo 30 aminokyselin a nejlépe mezi 11 až 25 aminokyselinami, které odpovídají sekvenci uvedené jako sekvence č. 4.

Dalšími variantami sekvencí těchto peptidů určených pro použití podle navrhovaného vynálezu jsou minoritní vložení, odstranění a náhrada. Například je možno použít konzervativní záměnu aminokyselin. Takové nahrazení, například takové, při kterém se nahradí aminokyseliny patřící do jedné skupiny a chemická povaha jejich postranních řetězců si je proto blízká. Skupiny aminokyselin se dělí na zásadité aminokyseliny (lysin, arginin, histidin), kyselé aminokyseliny (kyselina asparagová, glutamová), nepolární aminokyseliny (alanin, valin, leucin, isoleucin, prolin, fenylalanin, methyonin a tryptofan), neutrální polární aminokyseliny (glycin, asparagin, glutamin, cystein, serin, threonin, tyrosin) a aromatické aminokyseliny (fenylalanin, tryptofan a tyrosin). Obecně se má za to, že konzervativní náhrada aminokyselin představovaná například jednoduchou záměnou leucinu isoleucinem nebo valinem nebo kyseliny asparagové kyselinou glutamovou, nebo threoninu se serinem nebo podobných konzervativních náhrad aminokyselin se strukturálně podobnými aminokyselinami neovlivní podstatně vlastnosti peptidu. Cyklické sekvence odvozené od saposinu C, včetně sekvence č. 4, mohou být pozměněny tak, aby bylo dosaženo několika vylepšení, zejména jako je zvýšení aktivity a zlepšení stability. Mohou být přítomné také jiné aminokyseliny uvnitř této sekvence, včetně přirozené sekvence saposinu C, kdy konzervativní náhrada této přirozené sekvence, nebo nezávislé peptidové sekvence za účelem dosáhnouti zvýšení vazebné aktivity, hydrofobicity, hydrofilicity apod. Sekvence mimo aktivní neurotropní oblast nejsou obvykle nezbytné pro aktivitu peptidu. Ve většině případů tedy bude získaný peptid aktivní bez ohledu na původ těchto sekvencí. Jakýkoliv takový peptid může být poté testován vzhledem ke své aktivitě za použití dále popsanych protokolů. Schopnost těchto cyklických peptidů stimulovat růst neuritů, chránit buňky před přirozenou smrtí, zlepšovat myelinizaci, inhibovat demyelinizaci, potlačit neuropatickou bolest a léčit senzorickou neuropatii může být snadno stanovena jakýmkoliv odborníkem v oboru za použití postupů popsanych v příkladech 1 až 9. Způsoby stanovení vlastností těchto peptidů vzhledem k indukci myelinizace a inhibici demyelinizace jsou uvedeny v příkladech 3 a 4 dále. Typické minimální množství peptidů podle navrhovaného vynálezu pro neurotropní aktivitu v buněčné médium je obvykle 5 ng/ml. Toto množství nebo vyšší množství cyklických syntetických peptidů podle navrhovaného vynálezu je také zamýšleno pro použití in vitro. Obvykle jsou použity koncentrace v rozsahu 0,1 µg/ml do asi 10 mµ/ml těchto peptidů. Efektivní množství pro konkrétní tkáň pak může být stanoveno podle příkladu 1. Neurony mohou být léčeny in vitro nebo ex vivo přímým podáním peptidu podle navrhovaného vynálezu buňkám. Toho může být dosaženo například inkubováním těchto buněk v živném médiu vhodném pro příslušný buněčný typ, následovným přidáním peptidu do média. Pokud mají být buňky léčeny in vivo, obvykle u savců, prostředek může být

aplikován různými způsoby. Nejvhodnější je injikovat prostředek přímo do krve nebo tkáně v dostatečném množství, čímž bude dosaženo požadované lokální koncentrace peptidu. V peptidech postrádajících zbytky lysinu a argininu je značně snižena proteolytická degradace. Menší peptidy (20 aminokyselin nebo méně) nejlépe překročí krevně-mozkovou bariéru a vstoupí tak do centrálního nervového systému, kde potom může léčit poruchy CNS (Banks et al., Peptides, 13:1289-1294,1992).

Peptidy podle navrhovaného vynálezu mohou být také esterifikované mastnými kyselinami tak, aby vznikly estery peptidů mastných kyselin podle běžné kyselinou katalyzované esterifikace. Alternativně je možné poslední aminokyselinu přidat k syntetickému produktu a může se jednat o komerčně dostupnou esterifikovanou aminokyselinu, čímž je možno obejít esterifikační reakci. Mastné kyseliny použitelné pro použití při tvorbě esteru peptidů jsou kyselina laurová, myristová, palmitová, stearová, olejová, linoleová.

Použité peptidy mohou být acetylovány použitím komerčně dostupného acetylovaného lysinu, argininu nebo asparaginu během postupu syntézy. Tyto modifikované peptidy si zachovávají aktivitu rodičkovského peptidu. Pomocí těchto modifikací je možné ovlivnit vlastnosti peptidu a jejich schopnost projít skrz mozkovou bariéru díky zvýšené hydrofobicitě.

Pro léčbu neurálních poruch je možné také použít přímou nitrolebeční injekci nebo injekci do cerebrospinální tekutiny, čímž je dosaženo dostatečné množství a účinné lokální koncentrace neurotrofinu. V obou případech musí být použit farmaceuticky přijatelný injikovatelný nosič. Těmito nosiči může být například fyziologický roztok nebo Ringerův roztok. Další možností je aplikaci do periferní nervové tkáně přímou lokální injekcí nebo systémovou aplikací. Je možné také použít celou řadu konvenčních způsobů aplikace, jako je nitrožilní, intracerebrospinální, intramuskulární, intradermální, podkožní, intrakraniální, intranasální, epidurální, povrchová nebo orální. Pro použití jako analgetika je nejvhodnějším způsobem podání přímá intramuskulární nebo intravenózní injekce. Peptidový prostředek podle navrhovaného vynálezu může být balen a podáván v jednotkových dávkách, jako je prostředek určený pro podání pomocí injekcí nebo jako lokální preparát obsahující ekvivalent dávky odpovídající denní dávce podávané pacientovi nebo jako prostředek s kontrolovaným uvolňováním. Vzduchotěsné nádoby obsahující denní dávku aktivní složky buď v PBS nebo lyofilizované formě jsou příkladem jednotkových dávek. Přibližnou denní systémovou dávkou peptidu podle navrhovaného vynálezu založenou na tělesné hmotnosti obratlovce trpícího neurologickou poruchou, demyelinizací, nebo jako analgetické dávky obecně pro léčbu neuropatické bolesti je v rozsahu od 0,01 do asi 10 000 µg/kg. Spíše je však denní systémová dávka v rozmezí od 0,1 do 1000 µg/kg. Nejvhodnější systémová dávka je

mezi 10 a 100 $\mu\text{g/kg}$. Tedy pro 70 kg těžkého člověka může být denní dávka od 0,7 do 700 000 μg na den, lépe pak mezi 7 a 70 000 μg na den a nejlépe mezi 700 a 7 000 μg na den. Denní dávka lokálně aplikovaného léčiva bude v rozmezí pořád nižším. Stejně tak v případě orální aplikace.

V jedné preferované variantě navrhovaného vynálezu jsou neurotropní peptidy podávány lokálně k neuronům *in vivo* pomocí implantace. Například kyselina polylakotózová, polygalaktózová, regenerovaný kolagen, mnohovrstevné lipozómy a řada dalších konvenčních transportních systémů je široce využitelné pro použití v navrhovaném vynálezu. Infúzní pumpy systémy zachycující se v mezibuněčné hmotě a kombinace zařízení pro transdermální aplikaci jsou rovněž použitelné. Peptidy je možno před implantací obalit pomocí polyethylenglykolu jak popisuje patent US 5 529 914.

Neurotropní peptidy podle navrhované vynálezu je možné také podávat uzavřené v micelách nebo lipozómech. Enkapsulační technologie používající lipozómy jsou velmi dobře známé v současném stavu techniky. Lipozómy mohou být směřovány proti specifické tkáni, jako je například nervová tkáň za použití receptorů, ligandů nebo protilátek schopných vázat se na cílovou tkáň. Příprava těchto lékových forem je dobře známá v současném stavu techniky (Radin, et al., Meth. Enzymol., 98 : 613-618, 1983).

V současné době nejsou komerčně dostupné žádné léky schopné zlepšit funkční regeneraci a obnovu strukturní integrity nervového systému. To se však týká pouze centrálního nervového systému. Regenerace periferních nervů pomocí neurotropních faktorů je popisováno navrhovaným vynálezem. Neurotropní faktory mohou být navíc terapeuticky použity při léčbě neurodegenerativních poruch spojených s degenerací populace neuronů ve specifických oblastech mozku. Příčinami Parkinsonovy choroby je degenerace dopaminergních neuronů v substantia nigra. Jelikož protilátky proti prosaposinu imunohistochemicky značí dopaminergní neurony v substantia nigra na lidských preparátech, je možné použít neurotropní peptidy podle navrhovaného vynálezu při léčbě Parkinsonovy choroby. Neuropatie rohovky a neurodegenerativní poruchy očí vedoucí ke ztrátě zraku ve stáří jsou rovněž použitelné za použití peptidů podle navrhovaného vynálezu.

Dlouho se věřilo, že pro léčbu populace neuronů v mozku musí neurotropní faktory být podávány výhradně nitrolebečně, neboť tyto proteiny nejsou schopny překročit krevně-mozkovou bariéru. patent US 5 571 787 popisuje, že jodovaný neurotropní fragment dlouhý 18 aminokyselin odvozený ze saposinu C je schopen krevně-mozkovou bariérou projít. Peptidy podle navrhovaného vynálezu, které nejsou delší než 22 aminokyselin jsou také schopny touto bariérou

projít a mohou tedy být podávány nitrožilně, přičemž menší peptidy procházejí rychleji. Jiné populace neuronů, jako jsou motorické neurony, mohou také léčeny pomocí nitrožilních injekcí, ačkoli přímá injekce do cerebrospinální tekutiny je také použitelná jako alternativní cesta.

Buňky mohou být léčeny pro dosažení lepší tvorby myelinu nebo pro zabránění demyelinizace, a to jakýmkoliv způsobem in vivo, ex vivo nebo in vitro. Nemoci způsobující demyelinizace nervových vláken, včetně roztroušené sklerózy, akutní roztroušené leukoencefalitidy, progresivní multifokální leukoencefalitidy, metachromatické leukodystrofie a adrenální leukodystrofie mohou být zpomaleny nebo zastaveny aplikací neurotrofních peptidů podle navrhovaného vynálezu k buňkám zasaženým chorobou. Uvažuje se i o procesu zvrácení demyelinizace nebo jiného poškození neuronů.

Prostředky podle navrhovaného vynálezu mohou být použité in vitro jako nástroje výzkumu pro studium efektu neurotrofních faktorů a látek ovlivňujících tvorbu myelinu. Praktičtější je však jejich použití v laboratoři jako složky buněčného média pro udržení růstu a životaschopnosti neuronů in vitro.

Peptidy podle navrhovaného vynálezu jsou připravovány na pevném podkladu za použití standardních postupů a Fmoc chemie podle automatizovaného protokolu pro pevnou fázi velmi dobře známého v současném stavu techniky (Traeciak et al., Tetrahedron Lett. 33 : 4557-4561, 1992) na syntetizátoru peptidů Protein Technologies Symphony. Zacyklené peptidy jsou odštěpovány z pevného podkladu pomocí roztoku TFA/voda/triisopropylsilan (95 : 2,5 : 2,5). Peptidy byly přečištěny pomocí HPLC v reverzní fázi na C-18 koloně pomocí 0,3 % kyseliny trifluorooctové (TFA) v acetonitrilu. Analýza pomocí hmotnostní spektrometrie pro sekvenci č. 5 (peptid A) a sekvenci č. 6 (peptid B) potvrdila, že byly připraveny syntetické cyklické peptidy (pro sekvenci č. 5 byla MH předpokládána 1333 a získaná 1333, pro sekvenci č. 6 byla MH předpokládána 1127 a získaná 1127).

Následující příklady jsou uvedeny pouze pro ilustraci a nemohou být brány jako limit myšlenky navrhovaného vynálezu.

PŘÍKLADY PROVEDENÍ VYNÁLEZU

PŘÍKLAD 1. Stimulace růstu neuritů in vitro

Neuroblastom NS20Y rostl v médiu DMEM obsahujícím 10 % fetálního telecího séra (FCS). Buňky byly sebrány pomocí trypsinu a přeneseny na 30 mm Petriho misku na krycí sklíčka. Po 20 až 24 hodinách bylo médium nahrazeno 2 ml média DMEM obsahujícího 0,5 FCS s různými koncentracemi peptidu A, peptidu B nebo TX14 (A). Buňky byly kultivovány dalších 24 hodin,

promyty v PBS a fixovány Bouinovým roztokem (nasycená vodná kyselina pikrová/formalin/kyselina octová 15:5:1) po dobu 30 minut. Fixační roztok byl odstraněn, Buňky byly promyty v PBS a nárůst neuritů byl stanoven pod mikroskopem pomocí kontrastní fáze. Buňky s jedním nebo více jasně definovanými neurity, které jsou dlouhé nebo delší než je průměr buňky, byly spočteny jako pozitivní. Celkem bylo stanoveno 200 buněk v různých částech každé misky pro co nejpresnější stanovení % neuronů tvořících neurit.

Všechny tři peptidy indukovaly tvorbu neuritů u NS20Y buněk. Hodnota $T_{1/2}$ (ED₅₀) je koncentrace, při které bylo jako pozitivních bráno 50 % neuronů, a ta byla pro TX14 (A) a pro peptid B 1 ng/ml. Hodnota $T_{1/2}$ pro peptid A byla 0,6 ng/ml. Z toho vyplývá, že peptid B je stejně účinný jako TX14 (A), zatímco peptid A je účinnější. To dokazuje, že zacyklené peptidy podle navrhovaného vynálezu mají lepší aktivitu ve srovnání se standardním „prosaptidem“.

PŘÍKLAD 2: Blokování buněčné smrti in vitro

Neuroblastom NS20Y byly kultivovány stejně jako v příkladu 1 a byly ponechány narůst na krycích sklíčkách v 0,5 % fetálním telecím séru po dobu 2 dní v přítomnosti nebo absenci TX14(A), peptidu A nebo peptidu B. Kultivační médium bylo odstraněno a do každé jamky byla přidána 0,2 % trypanová modř. Byly spočítány modře obarvené (mrtvé) buňky a byly stanoveny jako procento z celkové populace pomocí inverzního mikroskopu, kdy bylo v každém preparátu spočítáno 400 buněk. Průměrná odchylka duplicitních součtů byla 5 %. TX14(A), peptid A a peptid B snížily počet buněk obarvených trypanovou modří (mrtvých buněk). Hodnota $T_{1/2}$ (ED₅₀) pro ochranu před programovanou smrtí u TX14(A) byla 1,0 ng/ml. Peptidy A a B byly účinnější, když jejich hodnota $T_{1/2}$ byla 0,6 ng/ml a 0,8 ng/ml. To dokazuje, že zacyklené peptidy podle navrhovaného vynálezu mají lepší aktivitu při potlačování buněčné smrti ve srovnání se standardním „prosaptidem“.

PŘÍKLAD 3: myelinizační technika ex vivo

Cerebrální explantáty byly vyjmuty z novorozené myši podle Satomi (Zool. Sci. 9:127-137, 1992). Rychlost růstu neuritů a jejich myelinizace byla pozorována během 22 dní v kultuře, během období, kdy mozek novorozence prochází neuronální diferenciací a začíná se myelinizovat. Cyklické deriváty saposinu C o délce 11 až 25 aminokyselin, které obsahovaly sekvenci č. 4 (10 µg/kg) byly přidávány druhý den po vyjmutí explantátů (tři kontroly a tři ovlivněné vzorky) a rychlost růstu neuritů a myelinizace byla sledována mikroskopicky ve světlém poli pomocí videokamery. Osmý den bylo patrné, že kultury s přidávanými peptidy jsou tenčí a více rozprostřené než kontrolní vzorky. V patnáctý den kultury s peptidem obsahovaly

mnoho buněk s dlouhými výběžky na periferii explantátu, což u kontrolního vzorku nebylo patrné. Kultury s peptidem obsahovaly prokazatelně výše myelinovaných axonů v subkortikální bílé hmotě 22 den vzhledem k kontrolním vzorkům. To dokazuje, že zacyklené peptidy podle navrhovaného vynálezu mají lepší aktivitu při indukci myelinizace při diferenciaci mozku ex vivo.

PŘÍKLAD 4: Prevence myelinizace

Ochrana Schwannových buněk před smrtí souvisí s prevencí demyelinizace. Schwannovy buňky mají silnou myelinovou pochvu. Přidáním cyklického peptidu odvozeného od saposinu C s 11 až 25 aminokyselinami obsahujícím sekvenci č. 4, ke Schwannovým buňkám v kultuře potlačuje míru jejich umírání v závislosti na dávce a stimuluje inkorporaci sulfatidů, myelin specifických lipidů do Schwannových buněk. To prokazuje, že cyklické peptidy podle navrhovaného vynálezu mohou zabránit demyelinizaci díky ochraně Schwannových buněk před smrtí.

PŘÍKLAD 5: Použití peptidů při léčbě traumatické ischemie lézí v CNS

Lidé trpící traumatickými lézemi v prodloužené míše dostávali intracerebrospinálně nebo přímo injekce asi 100 µg/ml cyklického peptidu odvozeného od saposinu C s 11 až 25 aminokyselinami obsahujícím sekvenci č. 4, ve sterilním fyziologickém roztoku, nebo v takové lékové formě, která umožňuje pomalé plynulé uvolňování peptidu v místě lézí. Zlepšení stavu pacientů bylo hodnoceno podle zlepšení funkčnosti jejich motorických nervů (např. podle pohyblivosti končetin). Léčba pokračovala dokud pacienti nepřestali vykazovat zlepšování.

PŘÍKLAD 6: Použití peptidů při léčbě demyelinizačních poruch

Pacientům s diagnostikovanou roztroušenou sklerózou v raném stádiu byl podáván cyklický peptidu odvozený od saposinu C s 11 až 25 aminokyselinami obsahujícím sekvenci č. 4, pomocí přímé intravenózní injekce do mozkomíšní tekutiny, při použití stejných dávek jako v příkladu 3. Dávky jsou podávány denně po dobu 2 až 5 dnů, nebo týdně a zlepšení v svalové síle, koordinaci kosterního svalstva a myelinizaci (jak bylo stanoveno pomocí MRI) bylo vyhodnocováno.

PŘÍKLAD 7: potlačení neuropatické bolesti u Chungova krysího modelu

Tento příklad popisuje efekt intratekální injekce cyklického peptidu odvozeného od saposinu C s 11 až 25 aminokyselinami obsahujícím sekvenci č. 4, u Chungova experimentálního krysího modelu periferní neuropatické bolesti. Každý peptid je chemicky syntetizován, přečištěn a

rozpuštěn v sterilním PBS a jeho pH je vyrovnáno na neutrální hodnotu. Chirurgický proces popsán dříve v Kim et al., (Pain, 50:335, 1992) byl proveden na samcích laboratorních potkanů aby byli převedeni do alodynního stavu. Do míchy byl zaveden spinální katetr dva týdny po chirurgickém zákroku. Pět následujících dní byly podávány peptidy v množství 0,007, 0,07 a 0,7 $\mu\text{g}/\text{zvíře}$. Změny tlaku byly poté stanoveny za použití kalibrovaného von Freyova vlákna. Delší čas nezbytný pro zřítání aby odtáhla končetinu jako reakci na tlak, který vyvolával neuropatickou bolest. Peptidy podle navrhovaného vynálezu značně zvyšovaly míru tlaku, což naznačuje značné potlačení neuropatické bolesti.

PŘÍKLAD 8: Léčba senzorické neuropatie

Myším byl podán taxol a tím u nich byla vyvolána senzorická neuropatie. Těmto myším, kterým byl dříve podán taxol, byla po té podána dávka 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ nebo 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ cyklického peptidu odvozeného od saposinu C, který obsahuje 11 až 25 aminokyselin a obsahuje sekvence uvedené jako sekvence č. 4. Ztráta citlivosti na teplotu byla měřena použitím Hargreavesova senzorického testovacího přístroje, pomocí něhož byla měřena míra senzorické neuropatie. Každá ze tří uvedených dávek peptidu byla shledána účinnou v prevenci nebo pro léčbu senzorické neuropatie vyvolané taxolem u myší. Z těchto závěrů vyplývá, že syntetické peptidy odvozené od saposinu C podle navrhovaného vynálezu jsou schopné účinně potlačovat senzorickou neuropatii.

PŘÍKLAD 9: Potlačení neuropatické bolesti u diabetických potkanů

Tento příklad popisuje účinek cyklického derivátu saposinu C, který obsahuje mezi 11 až 25 aminokyselinami a zahrnuje sekvenci uvedenou jako sekvence č. 4 po intraperitoneálním podání u krysího modelu diabetické neuropatie. U laboratorních potkanů byl vyvolán diabetes jednou intraperitoneální injekcí streptozotocinu (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tělesné váhy, čerstvě rozpuštěno v 0,9 % sterilním PBS), který zničí pankreatické β buňky a tím indukuje inzulínový deficit, jak popisuje Calcutt et Al. (Pain, 68:293-299, 1996). Po dvou dnech byl potvrzen diabetes u potkanů, kterým byl injikován streptozotocin pomocí stanovení hladiny krevní glukózy. Zvířata, kterým byl podán streptozotocin, ale jejichž hladina krevní glukózy byla nižší než 15 mmol/l byla vyřazena z následujících studií podle běžně akceptované definice nepropagující hyperglykémie při studiích s diabetózními potkany.

Jak diabetické, tak kontrolní myši byly studovány 8 týdnů analýzou jejich reakcí na nebezpečnou chemikálii – formalin jako indikátor alodinie (Calcutt et Al., viz. výše). Zkráceně, potkanům byla

podkožně vstříknuta injekce čerstvě připraveného formalinu (50 μ l 0,5 % roztoku ve sterilním PBS) na vrchní stranu jejich pravé zadní tlapy. Tato koncentrace formalinu indukuje submaximální reakci v chování u kontrolních potkanů a umožňuje detekci hyperalgie u diabetických potkanů během fází Q a 2 (Calcutt et al., Eur. J. Pharmacol., 286:189-197, 1995). Zvířata byla přenesena do pozorovací komory, konstruované tak, aby byla umožněna nepřetržitá vizualizace jejich končetiny. Počet trhnutí během jedné minuty bylo počítáno v pětiminutovém intervalu následujících 60 minut pozorovatelem, který nevěděl, která skupina zvířat byla léčena. Fáze 1 je definována jako původní měření cukání (1 až 2 a 5 až 6 minut po injekci), fáze Q (klidová) byla podle měření v 10 až 11, 15 až 16 a 20 až 21 minut a fáze 2, jako všechna následující měření po injekci, jak bylo dříve uvedeno u studií diabetických potkanů (viz. např. Malmberg et al., Neurosci. Lett. 161:45-48, 1993). Porovnání aktivity během těchto fází bylo stanoveno jako součet šubnutí během této fáze.

Potkani s diabetem byli rozděleni do 2 skupin o 4 zvířatech, kdy každé bylo podáváno PBS nebo peptid odvozený od saposinu C o 11 až 25 aminokyselinách, který obsahuje sekvence uvedené jako sekvence č. 4. Dvě hodiny před podáním 0,5 % formalinu bylo diabetickým potkanům podáno buď PBS, nebo 200 μ g/kg peptidu intraperitoneálně. Podání peptidu zcela potlačí abnormální křeče během fáze 1 a křeče ve fázi 2 potlačí o 70 %. Z toho vyplývá, že podání peptidu potlačí bolest způsobenou injekcí formalinu a zlepší motorické funkce neuronů u kryšního modelu bolestivé diabetické neuropatie.

VÝPIS SEKVENCÍ

(1) OBECNÉ INFORMACE

(i) APLIKANT: MYELOS CORPORATION

(ii) NÁZEV VYNÁLEZU: CYKlickÝ PEPTID, PROSTŘEDEK, ZPŮSOB INDUKCE
MYELINIZACE, ZPŮSOB POTLAČENÍ DEGENERACE
NEURONŮ A ZPŮSOB LÉČBY

(iii) POČET SEKVENCÍ: 6

(iv) KORESPONDENČNÍ ADRESA:

- (A) ADRESA: Knobbe, Martens, Olson & Bear
- (B) ULICE: 620 Newport Centre Drive, 16. poschodí
- (C) MĚSTO: Newport Beach
- (D) STÁT: CA
- (E) ZEMĚ: USA
- (F) ZIP: 92660

(v) POČÍTAČOVÝ FORMÁT:

- (A) TYP MÉDIA: disketa
- (B) POČÍTAČ: kompatibilní s IBM
- (C) operační systém: Windows
- (D) SOFTWARE: FastSEQ for Windows Version 2.0b

(vi) ÚDAJE O APLIKACI

- (A) ČÍSLO APLIKACE:
- (B) DATUM PODÁNÍ:
- (C) KLASIFIKACE:

(vii) ÚDAJE O PŘEDCHOZÍ APLIKACI

- (A) ČÍSLO APLIKACE: 60/098 359

(B) DATM PODÁNÍ: 28. 7. 1998

(vii) ÚDAJE O PRÁVNÍM ZÁSTUPCI:

(A) JMÉNO: Bartfield, Neil S

(B) ČÍSLO REGISTRACE: 39 901

(C) REFERENCE / ČÍSLO KANCELÁŘE: MYELOS.014PR

(ix) TELEKOMUNIKAČNÍ INFORMACE:

(A) TELEFON: 619 235 8550

(B) TELEFAX: 619 235 0176

(C) TELEX:

(2) INFORMACE O SEKVENCI Č. 1:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(D) DÉLKA: 21 aminokyselin

(E) TYP: aminokyselina

(F) POČET ŘETĚZCŮ: jeden

(G) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) OZNAČENÍ SEKVENCE: sekvence č.1

Cys Glu Phe Leu Val Lys Glu Val Thr Lys Leu Ile Asp Asn Asn Lys

1 5 10 15

Thr Glu Lys Glu Lys

20

(2) INFORMACE O SEKVENCI Č. 2:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 18 aminokyselin

(B) TYP: aminokyselina

(C) POČET ŘETĚZCŮ: jeden

(H) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) OZNAČENÍ SEKVENCE: sekvence č.2

Tyr Lys Glu Val Thr Lys Leu Ile Asp Asn Asn Lys Thr Glu Lys Glu

1 5 10 15

Ile Leu

(2) INFORMACE O SEKVENCI Č. 3:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 12 aminokyselin

(B) TYP: aminokyselina

(C) POČET ŘETĚZCŮ: jeden

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) OZNAČENÍ SEKVENCE: sekvence č.3

Leu Ile Asp Asn Asn Lys Thr Glu Lys Glu Ile Leu

1 5 10

(2) INFORMACE O SEKVENCI Č. 4:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 11 aminokyselin

(B) TYP: aminokyselina

(C) POČET ŘETĚZCŮ: jeden

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(ix) CHARAKTERISTIKA:

(A) JMÉNO / KLÍČ: jiný

(B) UMÍSTĚNÍ: 1....2

(D) DALŠÍ INFORMACE: Ala, Leu, Ile, Val, Tyr, Trp, Phe nebo Met

(A) JMÉNO / KLÍČ: jiný

(B) UMÍSTĚNÍ: 3....3

(D) DALŠÍ INFORMACE: Asp, Glu, Lys nebo Arg

(A) JMÉNO / KLÍČ: jiný

(B) UMÍSTĚNÍ: 6....6

(D) DALŠÍ INFORMACE: jakákoliv aminokyselina

(A) JMÉNO / KLÍČ: jiný

(B) UMÍSTĚNÍ: 8....8

(D) DALŠÍ INFORMACE: Asp nebo Glu

(A) JMÉNO / KLÍČ: jiný

(B) UMÍSTĚNÍ: 9....9

(D) DALŠÍ INFORMACE: jakákoliv aminokyselina

(A) JMÉNO / KLÍČ: jiný

(B) UMÍSTĚNÍ: 10....11

(D) DALŠÍ INFORMACE: Ala, Leu, Ile, Val, Tyr, Trp, Phe nebo Met

(xi) OZNAČENÍ SEKVENCE: sekvence č.4

Xaa Xaa Xaa Asn Asn Xaa Thr Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10

(2) INFORMACE O SEKVENCI Č. 5:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 11 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) POČET ŘETĚZCŮ: jeden
- (D) TOPOLOGIE: kruhová

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) OZNAČENÍ SEKVENCE: sekvence č.5

Leu Leu Asp Asn Asn Lys Thr Glu Lys Leu Tyr
 1 5 10

(2) INFORMACE O SEKVENCI Č. 6:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 11 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) POČET ŘETĚZCŮ: jeden
- (D) TOPOLOGIE: kruhová

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) OZNAČENÍ SEKVENCE: sekvence č.6

Leu Ile Asp Asn Asn Ala Thr Glu Glu Ile Leu
 1 5 10

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Cyklický peptid mající asi 11 až 25 aminokyselin a obsahující sekvenci $X_1X_2X_3NNX_4TX_5X_6X_7X_8$, kde X_1 je hydrofóbní aminokyselina (alanin, leucin, izoleucin, valin, tyrozin, tryptofan, fenylalanin nebo methionin), X_2 je hydrofóbní aminokyselina, X_3 je kyselina asparagová, kyselina glutamová, lysin nebo arginin, N je asparagin, X_4 je jakákoliv aminokyselina, T je threonin, X_5 je kyselina glutamová nebo asparagová, X_6 je jakákoliv aminokyselina, X_7 je hydrofóbní aminokyselina a X_8 je hydrofóbní aminokyselina.
2. Peptid podle nároku 1, vyznačující se tím, že peptid má aminokyselinovou sekvenci uvedenou jako sekvence č. 5 nebo sekvence č. 6.
3. Prostředek obsahující peptid podle nároku 1 vyznačující se tím, že je v ampulích uzavřených membránou.
4. Prostředek obsahující peptid podle nároku 1 vyznačující se tím, že je ve formě materiálu s kontrolovaným uvolňováním.
5. Prostředek obsahující peptid podle nároku 1 vyznačující se tím, že je v lyofilizované formě.
6. Prostředek obsahující peptid podle nároku 1 vyznačující se tím, že je ve formě lipozómů.
7. Prostředek obsahující peptid podle nároku 1 vyznačující se tím, že je ve formě vhodné pro povrchovou aplikaci.
8. Prostředek obsahující peptid podle nároku 1 vyznačující se tím, že je ve formě jednotlivých dávek.
9. Způsob indukce myelinizace nebo potlačení demyelinizace u savců, vyznačující se tím, že zahrnuje:
podání farmaceuticky účinného množství cyklického peptidu, potlačujícího demyelinizaci, který je složený z asi 11 až 25 aminokyselin a obsahuje sekvenci $X_1X_2X_3NNX_4TX_5X_6X_7X_8$, kde X_1 je hydrofóbní aminokyselina (alanin, leucin, izoleucin, valin, tyrozin, tryptofan, fenylalanin nebo methionin), X_2 je hydrofóbní aminokyselina, X_3 je kyselina asparagová, kyselina glutamová, lysin nebo arginin, N je asparagin, X_4 je jakákoliv aminokyselina, T je

threonin, X_5 je kyselina glutamová nebo asparagová, X_6 je jakákoliv aminokyselina, X_7 je hydrofóbní aminokyselina a X_8 je hydrofóbní aminokyselina, savci trpícímu demyelinizací.

10. Způsob podle nároku 9, vyznačující se tím, že demyelinizace je způsobena roztroušenou sklerózou, ischemickým poškozením nebo traumatickým poraněním.
11. Způsob podle nároku 9, vyznačující se tím, že podání je prováděno formou nitrožilní, intramuskulární, intradermální, podkožní, intrakraniální, intracerebrospinální a povrchové aplikace.
12. Způsob podle nároku 9, vyznačující se tím, že peptid je aplikován ve farmaceuticky přijatelném nosiči.
13. Způsob podle nároku 9, vyznačující se tím, že peptid je uzavřený v lamelární struktuře.
14. Způsob podle nároku 9, vyznačující se tím, že peptid má sekvenci uvedenou jako sekvence č. 5 nebo sekvence č. 6.
15. Způsob podle nároku 9, vyznačující se tím, že savcem je člověk.
16. Způsob potlačení degenerace neuronů, nebo podpoření růstu neuritů v nervové tkáni vyznačující se tím, že zahrnuje:
kontakt nervové tkáně postižené touto degenerací s účinným množstvím cyklického peptidu, potlačujícím neuronální degeneraci, který je složený z asi 11 až 25 aminokyselin a obsahuje sekvenci $X_1X_2X_3NNX_4TX_5X_6X_7X_8$, kde X_1 je hydrofóbní aminokyselina (alanin, leucin, izoleucin, valin, tyrozin, tryptofan, fenylalanin nebo methionin), X_2 je hydrofóbní aminokyselina, X_3 je kyselina asparagová, kyselina glutamová, lysin nebo arginin, N je asparagin, X_4 je jakákoliv aminokyselina, T je threonin, X_5 je kyselina glutamová nebo asparagová, X_6 je jakákoliv aminokyselina, X_7 je hydrofóbní aminokyselina a X_8 je hydrofóbní aminokyselina
17. Způsob podle nároku 16, vyznačující se tím, že podání je prováděno formou nitrožilní, intramuskulární, intradermální, podkožní, intrakraniální, intracerebrospinální a povrchové aplikace.

18. Způsob podle nároku 16, vyznačující se tím, že peptid je aplikován ve farmaceuticky přijatelném nosiči.
19. Způsob podle nároku 16, vyznačující se tím, že peptid je uzavřený v lamelární struktuře.
20. Způsob podle nároku 16, vyznačující se tím, že peptid má sekvenci uvedenou jako sekvence č. 5 nebo sekvence č. 6.
21. Způsob podle nároku 16, vyznačující se tím, že savcem je člověk.
22. Způsob léčby neuropatické bolesti u savců, kteří to potřebují, vyznačující se tím, že zahrnuje:

podání účinného množstvím cyklického peptidu, účinného pro potlačení neuropatické bolesti, který je složený z asi 11 až 25 aminokyselin a obsahuje sekvenci $X_1X_2X_3NNX_4TX_5X_6X_7X_8$, kde X_1 je hydrofóbní aminokyselina (alanin, leucin, izoleucin, valin, tyrozin, tryptofan, fenylalanin nebo methionin), X_2 je hydrofóbní aminokyselina, X_3 je kyselina asparagová, kyselina glutamová, lysin nebo arginin, N je asparagin, X_4 je jakákoliv aminokyselina, T je threonin, X_5 je kyselina glutamová nebo asparagová, X_6 je jakákoliv aminokyselina, X_7 je hydrofóbní aminokyselina a X_8 je hydrofóbní aminokyselina, savci trpícímu neurodegenerativní chorobou.
23. Způsob podle nároku 22, vyznačující se tím, že podání je prováděno formou nitrožilní, intramuskulární, intradermální, podkožní, intrakraniální, intracerebrospinální a povrchové aplikace.
24. Způsob podle nároku 22, vyznačující se tím, že peptid je aplikován ve farmaceuticky přijatelném nosiči.
25. Způsob podle nároku 22, vyznačující se tím, že peptid je uzavřený v lamelární struktuře.
26. Způsob podle nároku 22, vyznačující se tím, že peptid má sekvenci uvedenou jako sekvence č. 5 nebo sekvence č. 6.
27. Způsob podle nároku 22, vyznačující se tím, že savcem je člověk.

28. Cyklický peptid složený z asi 11 až 25 aminokyselin a obsahující sekvenci $X_1X_2X_3NNX_4TX_5X_6X_7X_8$, kde X_1 je hydrofóbní aminokyselina (alanin, leucin, izoleucin, valin, tyrozin, tryptofan, fenylalanin nebo methionin), X_2 je hydrofóbní aminokyselina, X_3 je kyselina asparagová, kyselina glutamová, lysin nebo arginin, N je asparagin, X_4 je jakákoliv aminokyselina, T je threonin, X_5 je kyselina glutamová nebo asparagová, X_6 je jakákoliv aminokyselina, X_7 je hydrofóbní aminokyselina a X_8 je hydrofóbní aminokyselina, použitelný pro indukci myelinizace, nebo potlačení demyelinizace u savců.
29. Peptid podle nároku 28, vyznačující se tím, že peptid má sekvenci uvedenou jako sekvence č. 5 nebo sekvence č. 6.
30. Cyklický peptid složený z asi 11 až 25 aminokyselin a obsahující sekvenci $X_1X_2X_3NNX_4TX_5X_6X_7X_8$, kde X_1 je hydrofóbní aminokyselina (alanin, leucin, izoleucin, valin, tyrozin, tryptofan, fenylalanin nebo methionin), X_2 je hydrofóbní aminokyselina, X_3 je kyselina asparagová, kyselina glutamová, lysin nebo arginin, N je asparagin, X_4 je jakákoliv aminokyselina, T je threonin, X_5 je kyselina glutamová nebo asparagová, X_6 je jakákoliv aminokyselina, X_7 je hydrofóbní aminokyselina a X_8 je hydrofóbní aminokyselina, použitelný pro potlačení neurální degenerace a podporu růstu neuritů.
31. Peptid podle nároku 30, vyznačující se tím, že peptid má sekvenci uvedenou jako sekvence č. 5 nebo sekvence č. 6.
32. Cyklický peptid složený z asi 11 až 25 aminokyselin a obsahující sekvenci $X_1X_2X_3NNX_4TX_5X_6X_7X_8$, kde X_1 je hydrofóbní aminokyselina (alanin, leucin, izoleucin, valin, tyrozin, tryptofan, fenylalanin nebo methionin), X_2 je hydrofóbní aminokyselina, X_3 je kyselina asparagová, kyselina glutamová, lysin nebo arginin, N je asparagin, X_4 je jakákoliv aminokyselina, T je threonin, X_5 je kyselina glutamová nebo asparagová, X_6 je jakákoliv aminokyselina, X_7 je hydrofóbní aminokyselina a X_8 je hydrofóbní aminokyselina, použitelný pro léčbu neuropatické bolesti.
33. Peptid podle nároku 32, vyznačující se tím, že peptid má sekvenci uvedenou jako sekvence č. 5 nebo sekvence č. 6.