



NORGE

(12) PATENT

(19) NO

(11) 311892

(13) B1

(51) Int Cl⁷ C 07 K 5/12, A 61 K 38/12

Patentstyret

(21) Søknadsnr	19951645	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	
(22) Inng. dag	1995.04.28	(85) Videreføringsdag	1994.04.30, DE, 4415310
(24) Løpedag	1995.04.28	(30) Prioritet	
(41) Alm. tilgj.	1995.10.31		
(45) Meddelel. dato	2002.02.11		

(71) Patenthaver	Merck Patent GmbH, Frankfurter Strasse 250, D-64293 Darmstadt, DE
(72) Oppfinner	Alfred Jonczyk, Darmstadt, DE Günter Hölzemann, Seenheim, DE Simon Goodman, Darmstadt, DE Horst Kessler, Schwalbach, DE Roland Haubner, Garching, DE Jochen Wermuth, Garching, DE
(74) Fullmektig	Tandbergs Patentkontor AS, 0306 Oslo

(54) Benevnelse Syklopeptider, fremgangsmåte for fremstilling derav, farmasøytiske preparater, fremgangsmåte for fremstilling derav, samt anvendelse av forbindelsene

(56) Anførte publikasjoner Ingen

(57) Sammendrag

Oppfinnelsen vedrører nye syklopeptider med formel I

Syklo-(Arg-A-Asp-R¹-R²) I,

hvor A er Gly eller Ala; R¹ er en 2-karboksy-8-amino-4-tiapiperolidin-9-on-(Btd), o-aminometyl-o'-karboksy-bifenyl-(Biph), 2-aminometyl-5-karboksymetyl-tiofen-(Act), 6-aminoheksansyrerest (Aha) eller en 2-(1,7-diazaspiro[4.4]-nonan-7-yl)-4-metylpentansyre-((S,S)-spiro-Pro-Leu) eller 2-(3-amino-1-pyrrolid-2-onyl)-4-metylpentansyrerest (S)Gly[ANC-2]-Leu eller (R)Gly[ANC-2]-Leu-rest, idet resten er bundet over peptidbindinger; og R² mangler eller er også Val; samt fysiologisk akseptable salter derav.

Disse forbindelsene virker som integrin-inhibitorer og kan særlig anvendes til profylakse og behandling av sykdommer i blodomløpet og i beina, og ved tumorterapi, samt som antimikrobielt og antiviralt aktive forbindelser.

Oppfinnelsen vedrører nye syklopeptider med formel I



5 hvor

Aer Gly eller Ala,

10 R¹er en 2-karboksy-8-amino-4-tiapiperolidin-9-on- (Btd), o-aminometyl-o'-karboksybifenyl- (Biph), 2-aminometyl-5-karboksymetyltiofen- (Act), 6-aminoheksansyrerest (Aha) eller en 2-(1,7-diazaspiro[4.4]-nonan-7-yl)-4-metylpentansyre- ((S,S)spiro-Pro-Leu) eller 2-(3-amino-1-pyrrolid-2-onyl)-4-metylpentansyrerest ((S)Gly[ANC-2]-Leu eller (R)Gly[ANC-2]-Leu), idet
15 resten er bundet i form av peptidbindinger, og R² mangler eller er Val, samt deres fysiologisk akseptable salter.

Lignende forbindelser er kjent fra Pharmazie, 40 (8), 532-5 (1985).

20 Til grunn for oppfinnelsen lå den oppgave å finne frem til nye forbindelser med verdifulle egenskaper, særlig slike som kan anvendes til fremstilling av legemidler.

Det ble funnet at forbindelsene med formel I og deres salter har svært verdifulle egenskaper. Fremfor alt virker de
25 som integrininhibitorer, idet de særlig hemmer vekselvirkningen mellom β_3 - eller β_5 -integrinreseptorene med ligander. Særlig aktivitet oppviser forbindelsene i tilfellet med integrinene $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_v\beta_6$ og $\alpha_{IIB}\beta_3$. Denne virkningen kan f.eks. påvises etter en fremgangsmåte som er beskrevet av J.W.
30 Smith et al. i J. Biol. Chem., 265, 12267-12271 (1990). I tillegg opptrer antiinflammatorisk virkning. Alle disse virkningene kan påvises ved hjelp av fremgangsmåter som er kjent fra litteraturen.

35 Forbindelsene kan anvendes som aktive legemiddel- forbindelser innen human- og veterinærmedisinen, særlig til profylakse og til behandling av sykdommer i kretsløpet, trombose, hjerteinfarkt, arteriosklerose, betennelse, apopleksi, angina pectoris, tumorsykdommer, osteolytiske syk-

dommer, særlig osteoporose, ved angiogenese og restenose etter angioplasti. Videre kan forbindelsene anvendes til forbedring av sårheling.

Forbindelsene egner seg dertil som antimikrobielle og
 5 antivirale aktive stoffer som forhindrer infeksjonene som kan utløses f.eks. ved bakterier, sopp, gjærsopp eller virus. Stoffene kan således fortrinnsvis gis som ledsagende antimikrobielle aktive forbindelser når det skjer inngrep i organismen hvorved det anvendes kroppsfremmede stoffer, f.eks.
 10 biomaterialer, implantater, katetre eller hjerteslagapparat og lignende. De virker av den grunn også som antiseptika.

De ovenfor og nedenunder oppførte forkortelser for aminosyrerester står for restene av de følgende aminosyrer:

15	Act	2-aminometyltiofen-5-eddiksyre
	Aha	6-aminoheksansyre
	Ala	alanin
	Asn	asparagin
	Asp	asparaginsyre
20	Asp(OR)	asparaginsyre (β -ester)
	Arg	arginin
	Biph	o-aminometylbifenyl-o-'-karboksylsyre
	Btd	8-amino-4-tiapiperolidin-9-on-2-karboksylsyre
25	Cys	cystein
	Gln	glutamin
	Glu	glutaminsyre
	Gly	glysin
	Gly [ANC-2] -Leu2-	(3-amino-1-pyrrolid-2-onyl) -4-metylpentansyre
30	His	histidin
	Ile	isoleucin
	Leu	leucin
	Lys	lysin
35	Met	metionin
	Nle	norleucin
	Orn	ornitin
	Phe	fenylalanin

	Pro	prolin
	Spiro-Pro-Leu2-(1,7-diazaspiro[4.4]-nonan-7-yl)-4-	
		metylpentansyre
	Ser	serin
5	Thr	treonin
	Trp	tryptofan
	Tyr	tyrosin
	Val	valin.

10 Videre betyr nedenunder:

	BOC	tert.-butoksykarbonyl
	CBZ	benzyloksykarbonyl
	DCCI	disykloheksylkarbodiimid
	DMF	dimetylformamid
15	EDCI	N-etyl-N'-(3-dimetylaminopropyl)- karbodiimidhydroklorid
	Et	etyl
	FMOC	9-fluorenylmetoksykarbonyl
	HOBt	1-hydroksybenzotriazol
20	Me	metyl
	Mtr	4-metoksy-2,3,6-trimetylfenylsulfonyl
	OBu	tert.-butoksy
	OMe	metoksy
	OEt	etoksy
25	POA	fenoksyacetyl
	TBTU2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-	
		tetrametyluroniumtetrafluorborat
	TFA	trifluoreddiksyre.

30 Såfremt de ovenfor nevnte aminosyrer kan opptre i flere enantiomere former, så er ovenfor og nedenunder alle disse formene og også blandinger derav (f.eks. DL-formene) omfattet f.eks. som bestanddeler i forbindelsene med formel I. Videre kan aminosyrene, f.eks. som bestanddel i forbindelser
35 med formel I, være forsynt med tilsvarende i og for seg kjente beskyttelsesgrupper.

Oppfinnelsens gjenstand er videre en fremgangsmåte for fremstilling av en forbindelse med formel I ifølge krav 1

eller et salt derav, kjennetegnet ved at man frisetter dem fra
et av deres funksjonelle derivater ved behandling med et
solvolyserende eller hydrogenolyserende middel,
eller at et peptid med formel II

5

H-Z-OH

II

hvor

Zer -Arg-A-Asp-R¹-R²-,
-A-Asp-R¹-R²-Arg-,
-Asp-R¹-R²-Arg-A-,
-R¹-R²-Arg-A-Asp- eller
-R²-Arg-A-Asp-R¹-,

10

eller et reaksjonsdyktig derivat av et slikt peptid,

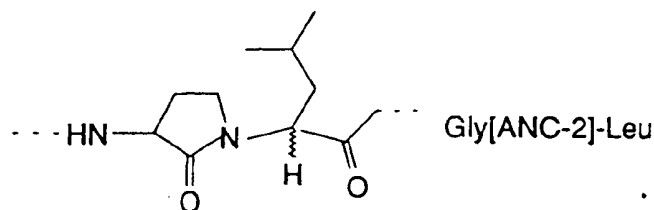
15 behandles med et ringslutningsmiddel,

og/eller at en basisk eller sur forbindelse med
formel I overføres ved behandling med en syre eller base til
et salt derav.

Ovenfor og nedenunder har restene A, R¹, R² og Z de
20 for formlene I og II angitte betydninger, såfremt ikke noe
annet er uttrykkelig angitt.

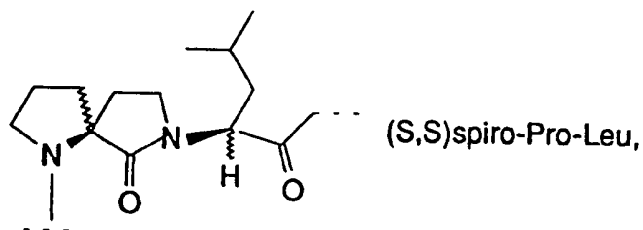
Resten (S,S)spiro-Pro-Leu står for en 2-(1,7-diaza-
spiro[4.4]-6-oksononan-7-yl)-4-metylpentansyrerest og har den
følgende struktur:

25



30

mens resten (S)Gly[ANC-2]-Leu henholdsvis (R)Gly[ANC-
2]-Leu står for en 3(S)- eller 3(R)-2-(3-amino-1-pyrrolid-2-
35 onyl)-4-metylpentansyrerest



Biph betyr en o-aminometylbifenyl-o'-karboksylsyre-
rest, idet Biph1 og Biph2 står for mulige atropisomerer.

For resten R¹ er likeens som for resten R² alle
hittil angitte definisjoner like foretrukket. Oppfinnelsen
vedrører også på samme måte sykliske penta- og tetrapeptider.

A er fortrinnsvis Gly, men kan imidlertid også stå
for Ala, særlig for DAla.

Forbindelsene med formel I og også utgangsforbindel-
sene for deres fremstilling fremstilles for øvrig etter kjente
fremgangsmåter, slik de er blitt beskrevet i litteraturen
(f.eks. i slike standardverkene som Houben-Weyl, Methoden der
organischen Chemie, Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart), og da
under reaksjonsbetingelser som er kjent og egnet for de nevnte
omsetninger. Således kan man også gjøre bruk av kjente, her
ikke nærmere belyste varianter.

Peptidbyggesteinen Gly[ANC-2]-Leu i (R)- og (S)-
formene er fremstillbare etter fremgangsmåten til R.M.
Freidinger et al., beskrevet i J. Org. Chem., 47, 104 (1982).
Byggesteinen spiro-Pro-Leu kan f.eks. fremstilles analogt med
fremgangsmåten til P. Ward et al., J. Med. Chem., 33, 1848 ff.
(1990), mens en syntese av Btd er mulig etter U. Nagai et al.,
Tetrahedron, 49, 3577-3592 (1993).

Utgangsforbindelsene kan, om ønsket, også dannes *in*
situ, slik at man ikke isolerer dem fra reaksjonsblandingen,
men straks omsetter dem videre til forbindelsene med formel I.

Forbindelsene med formel I kan fås ved at man fri-
setter dem fra funksjonelle derivater ved solvolyse, særlig
hydrolyse eller ved hydrogenolyse.

Foretrukne utgangsforbindelser for solvolysen hen-
holdsvis hydrogenolysen er slike som i stedet for én eller
flere frie amino- og/eller hydroksygrupper inneholder til-

svarende beskyttede amino- og/eller hydroksygrupper, fortrinnsvis slike som i stedet for et H-atom, som er forbundet med et N-atom, bærer en aminobeskyttelsesgruppe, f.eks. slike som tilsvare formel I, men som i stedet for en NH_2 -gruppe inneholder en NHR' -gruppe (hvor R' betyr en aminobeskyttelsesgruppe, f.eks. BOC eller CBZ).

Videre er det foretrukket med utgangsforbindelser som i stedet for H-atomet i en hydroksygruppe bærer en hydroksybeskyttelsesgruppe, f.eks. slike som tilsvare formel I, men som i stedet for en hydroksyfenylgruppe inneholder en $\text{R}''\text{O}$ -fenylgruppe (hvor R'' betyr en hydroksybeskyttelsesgruppe).

Det kan også være til stede flere, like eller forskjellige, beskyttede amino- og/eller hydroksygrupper i utgangsforbindelsens molekyl. Dersom de tilstedeværende beskyttelsesgrupper er forskjellige fra hverandre, kan de i mange tilfeller avspaltes selektivt.

Uttrykket "aminobeskyttelsesgruppe" er generelt kjent og henviser til grupper som er egnet til å beskytte (å blokkere) en aminogruppe mot kjemiske omsetninger, men som imidlertid er lett fjernbare, hvoretter den ønskede kjemiske reaksjon gjennomføres på andre steder i molekylet. Typisk for slike grupper er særlig usubstituerte eller substituerte acyl-, aryl-, aralkoksymetyl- eller aralkylgrupper. Ettersom aminobeskyttelsesgruppene fjernes etter den ønskede reaksjon (eller reaksjonsrekkefølge), er deres type og størrelse for øvrig ikke av avgjørende betydning; foretrukket er imidlertid slike med 1-20, særlig 1-8, C-atomer. Uttrykket "acylgruppe" skal i sammenheng med foreliggende fremgangsmåte oppfattes i videste betydning. Det omfatter acylgrupper som er avledet fra alifatiske, aralifatiske, aromatiske eller heterosykliske karboksylsyrer eller sulfonsyrer, samt særlig alkoksykarnonyl-, aryloksykarnonyl- og fremfor alt aralkoksykarnonylgrupper. Eksempler på slike acylgrupper er alkanoyl som acetyl, propionyl, butyryl; aralkanoyl som fenylacetyl; aroyl som benzoyl eller toluoyl; aryloksyalkanoyl som POA; alkoksykarnonyl som metoksykarnonyl, etoksykarnonyl, 2,2,2-triklor-etoksykarnonyl, BOC, 2-jodetoksykarnonyl; aralkyloksykarnonyl som CBZ ("karbobenzoksy"), 4-metoksybenzyloksykarnonyl, FMOC;

arylsulfonyl som Mtr. Foretrukne aminobeskyttelsesgrupper er BOC og Mtr, videre CBZ, FMOC, benzyl og acetyl.

Uttrykket "hydroksybeskyttelsesgruppe" er likeens generelt kjent og henviser til grupper som er egnet til å beskytte en hydroksygruppe mot kjemiske omsetninger, men som imidlertid er lett fjernbare, hvoretter den ønskede kjemiske reaksjon gjennomføres på andre steder i molekylet. Typisk for slike grupper er de ovenfor nevnte usubstituerte eller substituerte aryl-, aralkyl- eller acylgrupper, videre også alkylgrupper. Typen av og størrelsen til hydroksybeskyttelsesgruppene er ikke av avgjørende betydning, ettersom de etter den ønskede kjemiske reaksjon eller reaksjonsrekkefølge igjen fjernes; foretrukket er grupper med 1-20, særlig 1-10, C-atomer. Eksempler på hydroksybeskyttelsesgrupper er blant andre benzyl, p-nitrobenzoyl, p-toluensulfonyl, tert.-butyl og acetyl, idet benzyl og tert.-butyl er særlig foretrukket. COOH-gruppene i asparaginsyre og glutaminsyre er foretrukket beskyttet i form av sine tert.-butylestere (f.eks. Asp (OBut)).

De funksjonelle derivatene av forbindelsene med formel I som skal anvendes som utgangsf forbindelser, kan fremstilles etter vanlige fremgangsmåter innen aminosyre- og peptidsyntese, slik som de f.eks. er beskrevet i de nevnte standardverkene og patentsøknadene, f.eks. også etter fastfasemetoden ifølge Merrifield (B.F. Gysin og R.B. Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 94, 3102ff (1972)). Særlig fordelaktig er syntesen etter FMOC-strategien i gjennomstrømningsreaktoren, beskrevet av A. Jonczyk og J. Meienhofer i Peptides, Proc. 8th Am. Pept. Symp. 73-77 (1983) (red. V.J. Hruby og D.H. Rich), Pierce Co. Rockford.

Frisettelsen av forbindelsene med formel I fra deres funksjonelle derivater lykkes, alt etter den benyttede beskyttelsesgruppe, f.eks. med sterke syrer, hensiktsmessig med TFA eller perklorsyre, men også med andre sterke uorganiske syrer som saltsyre eller svovelsyre, sterke organiske karboksylsyrer som triklorediksyre, eller sulfonsyrer som benzen- eller p-toluensulfonsyre. Tilstedeværelsen av et ytterligere inert oppløsningsmiddel er mulig, men imidlertid ikke nødvendig. Som

inert oppløsningsmiddel egner seg fortrinnsvis organiske, f.eks. karboksylsyrer som eddiksyre, etere som tetrahydrofuran eller dioksan, amider som DMF, halogenerte hydrokarboner som diklormetan, videre også alkoholer som metanol, etanol eller isopropanol, samt vann. Videre kommer det på tale med blandinger av de ovenfor nevnte oppløsningsmidler. TFA anvendes fortrinnsvis i overskudd uten tilsetning av et ytterligere oppløsningsmiddel, perklorsyre i form av en blanding av eddiksyre og 70 %-ig perklorsyre i forholdet 9:1. Reaksjonstemperaturene for spaltingen ligger hensiktsmessig mellom ca. 0 og ca. 50 °C, fortrinnsvis arbeider man mellom 15 og 30 °C (romtemperatur).

Gruppene BOC, OBut og Mtr kan f.eks. avspaltes foretrukket med TFA i diklormetan, eller med ca. 3-5 N HCl i dioksan ved 15-30 °C, FMOC-gruppen med en ca. 5-50 %-ig oppløsning av sekundære aminer som dimetylamin, dietylamin eller piperidin, i DMF ved 15-30 °C.

Hydrogenolytisk fjernbare beskyttelsesgrupper (f.eks. CBZ eller benzyl) kan f.eks. avspaltes ved behandling med hydrogen i nærvær av en katalysator (f.eks. en edelmetallkatalysator som palladium, hensiktsmessig på en bærer som karbon). Som oppløsningsmiddel egner seg da de ovenfor angitte, særlig f.eks. alkoholer som metanol eller etanol, eller amider som DMF. Hydrogenolysen gjennomføres som regel ved temperaturer mellom ca. 0 og 100 °C, og trykk mellom ca. 1 og 200 bar, foretrukket ved 20-30 °C og 1-10 bar. En hydrogenolyse av CBZ-gruppen skjer f.eks. godt på 5-10 %-ig Pd-C i metanol eller med ammoniumformiat (i stedet for H₂) på Pd-C i metanol/DMF ved 20-30 °C.

Forbindelser med formel I kan også fås ved ringslutning av forbindelser med formel II under betingelsene for en peptidsyntese. Man arbeider da hensiktsmessig etter vanlige metoder innen peptidsyntese, som de f.eks. er beskrevet i Houben-Weyl, 1.c., bind 15/II, s. 1-806 (1974).

Reaksjonen skjer fortrinnsvis i nærvær av et dehydratiseringsmiddel, f.eks. et karbodiimid som DCCL eller EDCL, videre propanfosfonsyreanhydrid (jf. Angew. Chem., 92, s. 129 (1980)), difenylfosforylazid eller 2-etoksy-N-etoksykarbonyl-

1,2-dihydrokinolin, i et inert oppløsningsmiddel, f.eks. et halogenert hydrokarbon som diklormetan, en eter som tetrahydrofuran eller dioksan, et amid som DMF eller dimetylacetamid, et nitril som acetonitril, eller i blandinger av disse oppløsningsmidlene, ved temperaturer mellom ca. -10 og 40 °C, fortrinnsvis mellom 0 og 30 °C. For å befordre den intramolekylære ringslutning før den intermolekylære peptidbinding er det hensiktsmessig å arbeide i fortynnede oppløsninger (fortynningsprinsipp).

I stedet for II kan det også anvendes egnede reaksjonsdyktige derivater av disse forbindelsene i reaksjonen, f.eks. slike hvor de reaktive gruppene er midlertidig blokkert ved hjelp av beskyttelsesgrupper. Aminosyrederivatene II kan f.eks. anvendes i form av deres aktiverte estere, som hensiktsmessig dannes *in situ*, f.eks. ved tilsetning av HOBT eller N-hydroksysuccinimid.

Utgangsforbindelsene med formel II er som regel nye. De kan fremstilles etter kjente fremgangsmåter, f.eks. de ovenfor angitte fremgangsmåter innen peptidsyntese og avspaltingen av beskyttelsesgrupper.

Som regel syntetiserer man først beskyttede penta-peptidestere med formel $R'-Z-OR''$, f.eks. BOC-Z-OMe eller BOC-Z-OEt, som deretter forsåpes til syrer med formel $R'-Z-OH$, f.eks. BOC-Z-OH; fra disse avspaltes beskyttelsesgruppen R' , hvorved man får det frie peptid med formel $H-Z-OH$.

En base med formel I kan overføres med en syre til det tilhørende syreaddisjonssalt. For denne omsetningen kommer det særlig på tale med syrer som gir fysiologisk akseptable salter. Således kan det anvendes uorganiske syrer, f.eks. svovelsyre, salpetersyre, hydrogenhalogensyrer som saltsyre eller hydrogenbromsyre, fosforsyrer som ortofosforsyre, sulfaminsyre, videre organiske syrer, særlig alifatiske, alisykliske, aralifatiske, aromatiske eller heterosykliske en- eller flerbasiske karboksyl-, sulfon- eller svovelsyrer, f.eks. maursyre, eddiksyre, propionsyre, pivalinsyre, dietyl-eddiksyre, malonsyre, ravsyre, pimelinsyre, fumarsyre, maleinsyre, melkesyre, vinsyre, eplesyre, benzosyre, salisylsyre, 2- eller 3-fenylpropionsyre, sitronsyre, glukonsyre, askorbin-

syre, nikotinsyre, isonikotinsyre, metan- eller etansulfon-
syre, etandisulfonsyre, 2-hydroksyetansulfonsyre, benzen-
sulfonsyre, p-toluensulfonsyre, naftalenmono- og -disulfon-
syrer, laurylsvovelsyre. Salter med fysiologisk ikke aksep-
5 table syrer, f.eks. pikrater, kan anvendes til isolering
og/eller rensing av forbindelsene med formel I.

På den annen side kan en syre med formel I overføres
ved omsetning med en base til et av dens fysiologisk aksep-
table metall- eller ammoniumsalter. Som salter kommer det da
10 særlig i betraktning natrium-, kalium-, magnesium-, kalsium-
og ammoniumsalter, videre substituerte ammoniumsalter, f.eks.
dimetyl-, dietyl- eller diisopropylammoniumsalter, mono-
etanol-, dietanol- eller trietanolammoniumsaltene, syklo-
heksyl-, disykloheksylammoniumsaltene, dibenzyletylendiammo-
15 niumsaltene, dessuten f.eks. salter med N-metyl-D-glukamin
eller med arginin eller lysin.

De nye forbindelsene med formel I og deres fysiolog-
isk akseptable salter kan anvendes til fremstilling av farma-
søytiske preparater, idet man bringer dem sammen med minst ett
20 bærer- eller hjelpestoff og om ønsket sammen med én eller
flere ytterligere aktive forbindelser i en egnet doserings-
form. De således erholdte preparater kan anvendes som lege-
midler innen human- eller veterinærmedisinen. Som bærerstoffer
kommer det på tale med organiske eller uorganiske forbindelser
25 som egner seg for enteral (f.eks. oral eller rektal), parente-
ral (f.eks. intravenøs injeksjon) eller lokal (f.eks. topisk,
dermal, oftalmisk eller nasal) applikasjon, eller for en
applikasjon i form av en inhalasjonsspray, og som ikke rea-
gerer med de nye forbindelsene, f.eks. vann eller vandig, is-
30 oton koksaltoppløsning, lavere alkoholer, planteoljer,
benzylalkoholer, polyetylenglykol, glyseroltriacetat og andre
fettsyreglyserider, gelatin, soyalecitin, karbohydrater som
laktose eller stivelse, magnesiumstearat, talkum, cellulose,
vaselin. Til oral anvendelse tjener særlig tabletter,
35 drasjeer, kapsler, siruper, safter eller dråper; av interesse
er spesielt lakktabletter og kapsler med magesaftresistente
belegg eller kapselhylser. Til rektal anvendelse tjener suppo-
sitorier, til parenteral applikasjon oppløsninger, fortrinns-

vis olje- eller vannoppløsninger, videre suspensjoner, emulsjoner eller implantater. Til topisk anvendelse egner seg f.eks. oppløsninger som kan anvendes i form av øyedråper, videre f.eks. suspensjoner, emulsjoner, kremer, salver eller komprimater. For applikasjonen som inhalasjonsspray kan det anvendes spray som inneholder den aktive forbindelse enten oppløst eller oppslemmet i en drivgass eller drivgassblanding (f.eks. CO₂ eller klorfluorhydrokarboner). Hensiktsmessig anvender man den aktive forbindelse da i mikronisert form, idet ett eller flere ytterligere fysiologisk akseptable oppløsningsmidler kan være tilsatt, f.eks. etanol. Inhalasjonsoppløsninger kan administreres ved hjelp av vanlige inhalatorer. De nye forbindelsene kan også lyofiliseres og de erholdte lyofilisater anvendes f.eks. til fremstilling av injeksjonspreparater. Injeksjonene kan da gis som bolus eller som kontinuerlig infusjon (f.eks. intravenøst, intraperitonealt, intramuskulært, subkutant eller intratekalt). De angitte preparater kan være sterilisert og/eller inneholde hjelpestoffer som konserverings-, stabiliserings- og/eller fuktemidler, emulgatorer, salter for påvirkning av det osmotiske trykk, bufferstoffer, farge- og/eller aromastoffer. Om ønsket kan de også inneholde én eller flere ytterligere aktive forbindelser, f.eks. ett eller flere vitaminer.

Forbindelsene ifølge oppfinnelsen kan som regel administreres analogt med andre kjente peptider som befinner seg i handelen, særlig imidlertid analogt med de i US-A-4 472 305 beskrevne forbindelser, fortrinnsvis i doseringer mellom ca. 0,05 og 500 mg, særlig mellom 0,5 og 100 mg pr. doseringsenhet. Den daglige dosering ligger fortrinnsvis mellom ca. 0,01 og 2 mg/kg kroppsvekt. Den spesielle dose for hver bestemt pasient avhenger imidlertid av de forskjelligste faktorer, f.eks. av aktiviteten til den spesielle forbindelse som anvendes, av alderen, kroppsvekten, den generelle helse-tilstand, arven, av kosten, av administrasjonstidspunktet og -veien, av utskillingshastigheten, legemiddelkombinasjonen og alvorligheten av den enkelte sykdom som terapien gjelder for. Den parenterale applikasjon er foretrukket.

Videre kan de nye forbindelsene med formel I anvendes

som integrinligander til fremstilling av kolonner for affinitetskromatografi for renfremstilling av integriner.

Liganden, dvs. et peptidderivat med formel I, kobles da kovalent over ankerfunksjonen til en polymer bærer.

5 Som polymere bærermaterialer egner seg de i og for seg innen peptidkjemien kjente polymere, faste faser med fortrinnsvis hydrofile egenskaper, f.eks. tverrbundne polysukkere, som cellulose, Sepharose eller Sephadex, akrylamider, polymer på polyetylenglykolbasis eller tentakelpolymerer.

10 Som ankerfunksjoner som er forbundet med de polymere bærerene, egner seg fortrinnsvis rettkjedede alkylenkjeder med 2-12 C-atomer som er bundet direkte med en ende til polymeren, og som i den andre enden oppviser en funksjonell gruppe, som f.eks. hydroksy, amino, merkapto, maleinimido eller -COOH, og
15 som er egnet til å bli bundet sammen med en funksjonell sidekjede i det enkelte peptid.

Det er derved mulig at peptidet er bundet direkte eller eventuelt over en andre ankerfunksjon til ankeret i polymeren.

20 Dessuten kan bestemte aminosyrerester som er en bestanddel av peptidet med formel I, være slik modifisert i sine sidekjeder at de står til forføyning for forankring over f.eks. NH_2 , SH-, OH-, NH_2 - eller COOH-grupper med ankeret i polymeren.

25 Eksempler på aminosyrerester hvis sidekjede kan tjene direkte som ankerfunksjon, er f.eks. Arg eller Asp.

Eksempler på anker som kan bindes over de frie NH_2 -gruppene, er rester som f.eks. $-\text{CO}-\text{C}_n\text{H}_{2n}-\text{NH}_2$, $-\text{CO}-\text{C}_n\text{H}_{2n}-\text{OH}$, $-\text{CO}-\text{C}_n\text{H}_{2n}-\text{SH}$ eller $-\text{CO}-\text{C}_n\text{H}_{2n}-\text{COOH}$ med $n = 2-12$, idet alkylenkjedens
30 lengde ikke er av avgjørende betydning, og den eventuelt også kan være erstattet f.eks. gjennom tilsvarende aryl- eller alkylarylrester.

C-terminale anker som kan forbindes til frie syregrupper, er f.eks. $-\text{CO}-\text{C}_n\text{H}_{2n}-\text{SH}$, $-\text{O}-\text{C}_n\text{H}_{2n}-\text{OH}$, $-\text{O}-\text{C}_n\text{H}_{2n}-\text{NH}_2$, $-\text{O}-\text{C}_n\text{H}_{2n}-\text{COOH}$, $-\text{NH}-\text{C}_n\text{H}_{2n}-\text{SH}$, $-\text{NH}-\text{C}_n\text{H}_{2n}-\text{OH}$, $-\text{NH}-\text{C}_n\text{H}_{2n}-\text{NH}_2$ eller $-\text{NH}-\text{C}_n\text{H}_{2n}-\text{COOH}$, idet det som allerede er sagt i det forutgående
35 avsnitt gjelder for n samt alkylenkjeden.

Fremstillingen av materialene for affinitetskromato-

grafien for integrinrensing skjer under betingelser som er vanlige og i og for seg kjent for kondensasjonen av aminosyrer, og som allerede er blitt beskrevet i avsnittet vedrørende fremstilling av forbindelsene med formel I.

5 I tilfellet med de tiolholdige anker kan det anvendes addisjonsreaksjoner som Michael-addisjonen på maleinimidderivater eller disulfiddannelse med en polymerbundet tiol.

Ovenfor og nedenunder er alle temperaturer angitt i °C. I de etterfølgende eksempler betyr "vanlig opparbeidelse":

10 Om nødvendig tilsettes vann, det nøytraliseres, ekstraheres med eter eller diklormetan, separeres, den organiske fase tørkes over natriumsulfat, det filtreres, inndampes og renses ved kromatografi på silikagel og/eller krystallisasjon. RT = retensjonstid (minutter) ved HPLC på system A: LiChrosorb RP select B (250 x 4; 5 µm) eller system B: LiChrosorb RP 18 (250 x 4; 5 µm); elueringsmiddel (system A): 0,3 % TFA i vann; isopropanolgradient fra 0 til 80 vol%; 50 minutter ved 1 ml/minutt. Gjennomstrømning og påvisning ved 215 nm. Elueringsmiddel (system B): elueringsmiddel A: 0,1 % TFA i vann; elueringsmiddel B: 0,1 % TFA i acetonitril/vann (9:1); gradient 20-90 % B; 50 minutter ved 1 ml/minutt. M⁺ = molekyltopp i massespektrum, beholdt etter "Fast Atom Bombardment"-metoden (FAB), idet den angitte molekylvekt er forhøyet én masseenheter sammenlignet med den beregnede verdi.

25 Fremstilling av mellomprodukter

En oppløsning av 0,4 g H-Arg(Mtr)-Gly-Asp-Btd-ONa [som f.eks. lar seg erholde fra FMOC-Arg(Mtr)-Gly-Asp-Btd-O-Wang, idet -O-Wang betyr den ved den modifiserte Merrifield-teknikk anvendte rest av en 4-oksymetylfenoksymetyl-polystyrenharpiks, ved avspalting av FMOC-gruppen med piperidin/DMF og avspalting av harpiksen med TFA/CH₂Cl₂ (1:1)] i 15 ml DMF ble fortynnet med 85 ml diklormetan og tilsatt 50 mg NaHCO₃. Etter avkjøling i en blanding av tørris og aceton ble 35 40 µl difenylfosforylazid tilsatt. Etter å ha stått i 16 timer ved romtemperatur ble oppløsningen inndampet. Konsentratet ble filtrert (Sephadex G10-kolonne i isopropanol/vann 8:2) og så renses som vanlig ved hjelp av HPLC. Det ble beholdt syklo-

(Arg (Mtr) -Gly-Asp-Btd) .

Analogt fikk man ved ringslutning av de tilsvarende lineære peptider:

5 syklo- (Arg (Mtr) -Gly-Asp- (S) Gly [ANC-2] -Leu) ,
 syklo- (Arg (Mtr) -Gly-Asp- (R) Gly [ANC-2] -Leu) ,
 syklo- (Arg (Mtr) -Gly-Asp- (S, S) spiro-Pro-Leu) ,
 syklo- (Arg (Mtr) -Gly-Asp-Biph1) ,
 syklo- (Arg (Mtr) -Gly-Asp-Biph2) ,
 syklo- (Arg (Mtr) -Gly-Asp-Act) ,
 10 syklo- (Arg (Mtr) -Gly-Asp-Btd-Val) ,
 syklo- (Arg (Mtr) -DAla-Asp-Btd-Val) ,
 syklo- (Arg (Mtr) -Gly-Asp-Aha) ,
 syklo- (Arg (Mtr) -DAla-Asp-Btd) ,
 syklo- (Arg (Mtr) -DAla-Asp- (S) Gly [ANC-2] -Leu) ,
 15 syklo- (Arg (Mtr) -DAla-Asp- (R) Gly [ANC-2] -Leu) ,
 syklo- (Arg (Mtr) -DAla-Asp- (S, S) spiro-Pro-Leu) ,
 syklo- (Arg (Mtr) -DAla-Asp-Biph1) ,
 syklo- (Arg (Mtr) -DAla-Asp-Biph2) ,
 syklo- (Arg (Mtr) -DAla-Asp-Act) .

20

Eksempel 1

En oppløsning av 0,28 g syklo- (Arg (Mtr) -Gly-Asp-Btd) [som lar seg erholde ved ringslutning ifølge eksempel 1] i 8,4 ml TFA, 1,7 ml diklormetan og 0,9 ml tiofenol fikk stå i 4 timer ved romtemperatur, deretter ble det inndampet og etter 25 fortynning med vann frysetørket. Gelfiltrering på Sephadex G10 (eddiksyre/vann 1:1) og påfølgende rensing gjennom preparativ HPLC under de angitte betingelser ga syklo- (Arg-Gly-Asp-Btd); RT = 13,2; M⁺ 527.

30 Analogt fikk man:

fra syklo- (Arg (Mtr) -Gly-Asp- (S) Gly [ANC-2] -Leu) :
 syklo- (Arg-Gly-Asp- (S) Gly [ANC-2] -Leu); RT = 4,8;
 M⁺ 525;

35 fra syklo- (Arg (Mtr) -Gly-Asp- (R) Gly [ANC-2] -Leu) :
 syklo- (Arg-Gly-Asp- (R) Gly [ANC-2] -Leu); RT = 6,3;
 M⁺ 525;

fra syklo- (Arg (Mtr) -Gly-Asp- (S, S) spiro-Pro-Leu) :
 syklo- (Arg-Gly-Asp- (S, S) spiro-Pro-Leu); RT = 14,6;

M⁺ 565;

fra syklo-(Arg(Mtr)-Gly-Asp-Biph1):
 syklo-(Arg-Gly-Asp-Biph1); RT = 20,7; M⁺ 538;
 fra syklo-(Arg(Mtr)-Gly-Asp-Biph2):
 5 syklo-(Arg-Gly-Asp-Biph2); RT = 20,8; M⁺ 538;
 fra syklo-(Arg(Mtr)-Gly-Asp-Act):
 syklo-(Arg-Gly-Asp-Act); RT = 14,3; M⁺ 547.

Eksempel 2

- 10 80 mg syklo-(Arg-Gly-Asp-Btd) ble oppløst 5-6 ganger
 i 0,01 M HCl og frysetørket etter hver oppløsning. Påfølgende
 rensing gjennom HPLC ga syklo-(Arg-Gly-Asp-Btd) x HCl.
 Analogt fikk man:
 fra syklo-(Arg-Gly-Asp-Aha):
 15 syklo-(Arg-Gly-Asp-Aha) x HCl;
 fra syklo-(Arg-Gly-Asp-Btd-Val):
 syklo-(Arg-Gly-Asp-Btd-Val) x HCl;
 fra syklo-(Arg-Gly-Asp-Btd-Val):
 syklo-(Arg-DAla-Asp-Btd-Val) x HCl;
 20 fra syklo-(Arg-DAla-Asp-Btd-Val) ved behandling med
 eddiksyre:
 syklo-(Arg-DAla-Asp-Btd-Val) x H₃C-COOH;
 fra syklo-(Arg-Gly-Asp-Aha) ved behandling med 0,01 N
 salpetersyre:
 25 syklo-(Arg-Gly-Asp-Aha) x HNO₃.

Anvendelseseksempel 1

- For fremstilling av affinitetsfaser oppslemmet man
 0,9 g Cl-(CH₂)₃-CO-NH-(CH₂)₃-polymer [som lar seg erholde ved
 30 kondensasjon av Cl-(CH₂)₃-COOH med H₂N-(CH₂)₃-polymer] i 10 ml
 0,1 M natriumfosfatbuffer ved pH 7 og tilsatte ved 4 °C
 1 ekvivalent syklo-(Arg(Mtr)-Gly-Asp(ONa)Btd. Det ble omrørt i
 4 timer ved samtidig oppvarming av reaksjonsblandingen til
 romtemperatur, den faste resten ble frafiltrert og vasket to
 35 ganger med 10 ml bufferoppløsning (pH 7) hver gang, og der-
 etter tre ganger med 10 ml vann hver gang. Det ble erholdt
 syklo-(Arg(Mtr)-Gly-Asp(O(CH₂)₃-CONH-(CH₂)₃-polymer)-Btd).

Anvendelseseksempel 2

Analogt med anvendelseseksempel 1 fikk man ved kondensasjon av polymer- $O(CH_2)_3-NH_2$ [som lar seg erholde i handelen] og syklo-(Arg-Gly-Asp-Biphl) den følgende polymere fase: syklo-(Arg- Gly-Asp- (NH- $(CH_2)_3$ -O-polymer)-Biphl).

Analogt fikk man ved kondensasjon av syklo-(Arg-Gly-Asp-Btd-Val) med $H_2N(CH_2)_3$ -O-polymer: syklo-(Arg-Gly-Asp (NH- $(CH_2)_3$ -O-polymer)-Btd-Val) .

De etterfølgende eksempler vedrører farmasøytiske preparater.

Eksempel AInjeksjonsglass

En oppløsning av 100 g av et syklopeptid med formel I og 5 g dinatriumhydrogenfosfat i 3 l dobbeltdestillert vann ble innstilt på pH 6,5 med 2 N saltsyre, sterilfiltrert, fylt i injeksjonsglass, lyofilisert under sterile betingelser og lukket sterilt. Hvert injeksjonsglass inneholdt 5 mg aktiv forbindelse.

Eksempel BSuppositorier

En blanding av 20 g aktiv forbindelse med formel I og 100 g soyalecitin ble smeltet sammen med 1400 g kakaosmør, helt i former og fikk avkjøles. Hvert suppositorium inneholdt 20 mg aktiv forbindelse.

Eksempel COppløsning

Det ble laget en oppløsning av 1 g aktiv forbindelse med formel I, 9,38 g $NaH_2PO_4 \times 2 H_2O$, 28,48 g $Na_2HPO_4 \times 12 H_2O$ og 0,1 g benzalkoniumklorid i 940 ml dobbeltdestillert vann. pH ble innstilt på pH 6,8, det ble fylt opp til 1 l og steriliseres ved bestråling. Denne oppløsningen kan anvendes i form av øyedråper.

Eksempel DSalve

500 mg aktiv forbindelse med formel I ble blandet med 99,5 g vaselin under aseptiske betingelser.

5

Eksempel ETabletter

En blanding av 100 g av et syklopeptid med formel I, 1 kg laktose, 600 g mikrokrySTALLinsk cellulose, 600 g maisstivelse, 100 g polyvinylpyrrolidon, 80 g talkum og 10 g magnesiumstearat ble presset på vanlig måte til tabletter, slik at hver tablett inneholdt 10 mg aktiv forbindelse.

10

Eksempel F15 Drasjeer

Tabletter ble presset som angitt i eksempel E, og de ble deretter belagt på vanlig måte med et belegg av sakkarose, maisstivelse, talkum, tragant og fargestoff.

20 Eksempel GKapsler

På vanlig måte ble hardgelatinkapsler fylt med en aktiv forbindelse med formel I, slik at hver kapsel inneholdt 5 mg aktiv forbindelse.

25

Eksempel HInhalasjonsspray

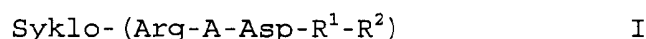
14 g aktiv forbindelse med formel I ble oppløst i 10 l isoton NaCl-oppløsning, og oppløsningen ble fylt i kommersielle sprøytebeholdere med pumpemekanisme. Oppløsningen kan sprøytes i munn eller nese. Et sprøytestøt (ca. 0,1 ml) tilsvarer en dose på ca. 0,14 mg.

30

P a t e n t k r a v

1. Syklopeptid,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det har formel I

5



hvor

Aer Gly eller Ala,

R¹er en 2-karboksy-8-amino-4-tiapiperolidin-9-on- (Btd), o-
aminometyl-o'-karboksybifenyl- (Biph), 2-aminometyl-
5-karboksymetyltiofen- (Act), 6-aminoheksansyrerest
(Aha) eller en 2-(1,7-diazaspiro[4.4]-nonan-7-yl)-4-
metylpentansyre- ((S,S)spiro-Pro-Leu) eller 2-(3-
amino-1-pyrrolid-2-onyl)-4-metylpentansyrerest
(S)Gly[ANC-2]-Leu eller (R)Gly[ANC-2]-Leu,

15

idet resten er bundet i form av peptidbindinger, og
R² mangler eller er Val,
samt deres fysiologisk akseptable salter.

20

2. Syklopeptid ifølge krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det er

- (a) syklo-(Arg-Gly-Asp-(S)Gly[ANC-2]-Leu),
- (b) syklo-(Arg-Gly-Asp-(R)Gly[ANC-2]-Leu),
- (c) syklo-(Arg-Gly-Asp-(S,S)spiro-Pro-Leu),
- (d) syklo-(Arg-Gly-Asp-Act),
- (e) syklo-(Arg-Gly-Asp-Btd),
- (f) syklo-(Arg-Gly-Asp-Aha),
- (g) syklo-(Arg-Gly-Asp-Btd-Val),
- (h) syklo-(Arg-DAla-Asp-Btd-Val).

25

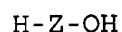
30

3. Syklopeptid ifølge krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det er en enantiomer
eller en diastereomer av en forbindelse med formel I.

35

4. Fremgangsmåte for fremstilling av en forbindelse med
formel I ifølge krav 1 eller et salt derav,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den frisettes fra et av
dens funksjonelle derivater ved behandling med et solvolyser-

ende eller hydrogenolyserende middel,
eller at et peptid med formel II



II

hvor

5 Zer -Arg-A-Asp-R¹-R²-,
-A-Asp-R¹-R²-Arg-,
-Asp-R¹-R²-Arg-A-,
-R¹-R²-Arg-A-Asp- eller
-R²-Arg-A-Asp-R¹-,

10 eller et reaksjonsdyktig derivat av et slikt peptid,
behandles med et ringslutningsmiddel,
og/eller at en basisk eller sur forbindelse med
formel I overføres ved behandling med en syre eller base til
et salt derav.

15

5. Fremgangsmåte for fremstilling av farmasøytiske
preparater,

k a r a k t e r i s e r t v e d at en forbindelse med
formel I ifølge krav 1 og/eller et av dens fysiologisk aksep-
20 table salter bringes sammen med minst ett fast, flytende eller
halvflytende bærer- eller hjelpestoff i en egnet doserings-
form.

6. Farmasøytisk preparat,

25 k a r a k t e r i s e r t v e d et innhold av minst én
forbindelse med den generelle formel I ifølge krav 1 og/eller
et fysiologisk akseptabelt salt derav.

7. Anvendelse av forbindelser med formel I ifølge krav 1
30 eller av deres fysiologisk akseptable salter til fremstilling
av et legemiddel for bekjempelse av sykdommer.

8. Anvendelse av forbindelser med formel I ifølge krav 1
til fremstilling av immobiliserte ligander for affinitets-
35 kolonnekromatografi.

9. Anvendelse av forbindelser med formel I ifølge krav 1
til rensing av integriner ved affinitetskromatografi.