(19) SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 944231 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS**
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE PUBLIC

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 944231

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
C07K 5/097
C07K 5/09 (2006.01)

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **13.09.1994**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **13.09.1994**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **15.03.1995**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

14.09.1993 US 121134

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • **Eli Lilly and Company,** Lilly Corporate Center, INDIANAPOLIS, IN 46285, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • **Gesellchen, Paul David,** Indianapolis, IN 46240, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
2 • **Shuman, Robert Theodore,** Greenwood, IN 46142, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention
Antitromboottiset tripeptidiaineet
Antitrombotiska tripeptidämnen

Antitromboottiset tripeptidiaineet

Tämä keksintö kohdistuu trombiinin inhibiittoreihin, jotka ovat käyttökelpoisia antikoagulantteina ihmisillä ja eläimillä. Erityisesti se kohdistuu dipeptidin L-Proliini-L-Arginiinialdehydin johdannaisiin, joilla on korkea antitromboottinen vaikutus.

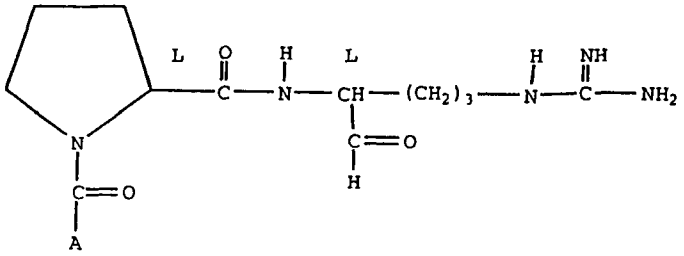
Trobiinin inhibitio aikaansaadaan nykyisin antamalla hepariineja ja kumariineja. Näiden aineiden mekanismia on paljon tutkittu. Hepariineja annetaan vain parenteraalisesti, ja pitoisuuksia pitää huolellisesti seurata. Kumariinit toimivat salpaamalla tai estämällä trombiinin esiasteen muodostumisen, ja maksimaalisen tehokkuuden saavuttamiseen tarvitaan jonkin aikaa.

Vaikka sekä hepariinit että kumariinit ovat tehokkaita antikoagulantteja, on tarvetta antitromboottisista aineista, jotka toimivat nopeasti ehkäisten hyytymän muodostumisen ja jotka eivät häiritse plasmiinin vaikutusta olemassa olevien hyytymien liuottamisessa.

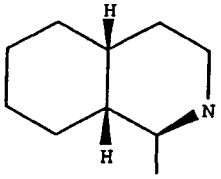
Esillä oleva keksintö kohdistuu siihen odottamattomaan havaintoon, että esillä olevan keksinnön mukainen yhdiste on huomattavasti tehokkaampi trombiinin inhibiittorina kuin vastaava 4aS,8aS-enantiomeeri.

Niinpä esillä olevan keksinnön pääasiallisena tarkoituksena on tuottaa (1R,4aR,8aR)-1,2,3,4,5,6,7,8-perhydroisokinoliini-1-karbonyyli-(L)-prolinyyli-(L)-arginiinialdehydiä ja sen farmaseuttisesti hyväksyttäviä suoloja ja solvaatteja, jotka ovat hämmästyttävän paljon tehokkaampia trombiinin inhibiittoreita ja käyttökelpoisia antikoagulanttina ja tromboembolisissa sairauksien hoidossa.

Tämän keksinnön tarjoamaa trombiinia inhiboivaa yhdistettä edustaa seuraava kaava 1.



jossa A on



ja sen farmaseuttisesti hyväksyttäviä myrkyttömiä suoloja ja solvaatteja.

Kaavan 1 esittämä peptidi on käyttökelpoinen antitromboottisena aineena, ja sitä voidaan käyttää apuna kudoksen plasminogeeniaktivaattorin (tPA), streptokinaasin tai urokinaasin terapiassa.

Yhdiste valmistetaan tavanomaisilla kytkentämenetelmillä, joita on kuvattu julkaisuissa EP 0 479 489 A2; US 5 250 660; ja US 5 252 566. Esimerkiksi Cbz-1,2,3,4,5,-6,7,8-perhydro-1-isokinoliinikarboksyylihappo kytketään L-proliinin esterin kanssa, jolloin saadaan Cbz-1,2,3,4,-5,6,7,8-perhydroisokinoliini-1-karbonyyli-Pro-esteri. Esteriryhmä poistetaan ja Cbz-1,2,3,4,5,6,7,8-perhydroisokinoliini-1-karbonyyli-Pro kytketään L-argiiniinin laktaamimuodon kanssa, jolloin saadaan Cbz-1,2,3,4,5,6,7,8-perhydroisokinoliini-1-karbonyyli-Pro-Arg-laktaami aminosuojatussa muodossa. Arg-laktaamirengas avataan pelkistämällä, ja arginiinin amino- ja perhydroisokinoliinin typpisuojaryhmät poistetaan, jolloin saadaan 1,2,3,4,5,6,7,8-perhydroisokinoliini-1-karbonyyli-Pro-Arg-aldehydi. Peptidi muutetaan sopiviksi suolamuodoiksi, kuten asetaateiksi ja sulfaateiksi.

1,2,3,4,5,6,7,8-perhydro-1-isokinoliinikarboksyylihappo muutetaan helposti hydraamalla 1-isokinoliinikarboksyylihapoksi etanolissa tai muussa sopivassa alkoholissa 5N kloorivetyhapon, tai muun sopivan vahvan epäorgaanisen hapon, läsnäollessa 5-prosenttisella Rh/Al_2O_3:lla tai muulla sopivalla katalyytillä paineessa, joka vaihtelee välillä noin 500 - 1000 psi, ja lämpötilassa välillä noin 30 - 80 °C.

Tämä menetelmä tuottaa (1R,4aS,8aS)-1,2,3,4,5,6,-7,8-perhydro-1-isokinoliinikarboksyylihappoa ja (1S,4aR,-8aR)-1,2,3,4,5,6,7,8-perhydro-1-isokinoliinikarboksyylihappoa raseemisena seoksena. Yksittäiset enantiomeerit voidaan erottaa rasemaatin resoluutiolla tavanomaisilla menetelmillä. Tällaisiin menetelmiin kuuluu suolojen muodostus optisesti aktiivisten happojen kanssa, ja myös rasemaatin korkeapainenestekromatografia kiraalisten kolonnien läpi.

(1R,4aR,8aR)-1,2,3,4,5,6,7,8-perhydro-1-isokinoliinikarboksyylihapon ja (1S,4aS,8aS)-1,2,3,4,5,6,7,8-perhydro-1-isokinoliinikarboksyylihapon termodynaamisia isomeerejä saadaan valmistamalla yllä kuvatuilla menetelmillä saadun raseemisen seoksen estereitä, ja antamalla näiden estereiden reagoida natriumetoksidin kanssa etanolissa ja sitten poistamalla esteriryhmät saadusta termodynaamisten isomeerien raseemisesta seoksesta.

Vaihtoehtoisesti isomeerien raseeminen seos ja termodynaamisten isomeerien raseemiset seokset happoina suojataan aminoryhmän osalta ja kytektään karboksista suojattuun proliiniin, jolloin saadaan dipeptidi. Diastereomeerit, jotka saadaan kytkemällä L-proliinin kanssa, erotetaan sitten kiteyttämällä.

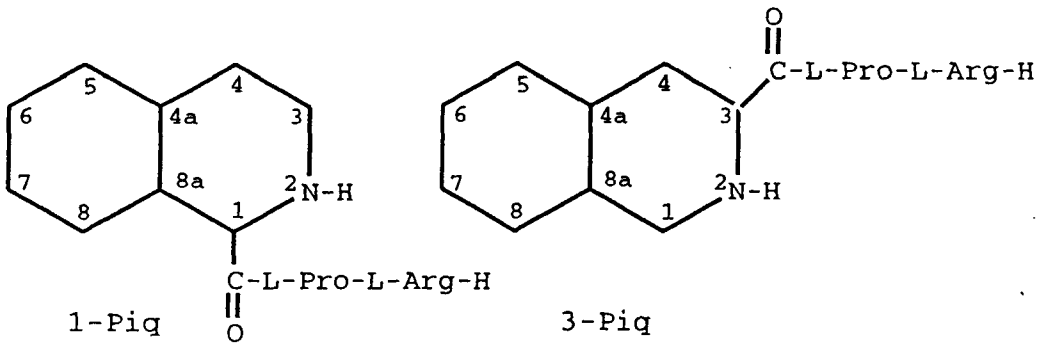
Karboksia suojaava esteriryhmä dipeptidin proliiniryhmässä poistetaan sitten (suojauksen poisto tai esteröinnin poisto), ja dipeptidin vapaa happomuoto kytketään sitten arginiinin laktaamimuodon kanssa. Kytketyn arginii-

ni(aminosuojattu)laktaamituotteen annetaan sitten reagoida hydridisen pelkistävän aineen, edullisesti litiumalumiinihydridin tai litiumtri-tert-butoksialumiinihydridin kanssa inertissä liuottimessa tai liuottimien seoksessa laktaamirenkaan pelkistämiseksi, jolloin saadaan tripeptidi arginiinialdehydin muodossa. Suojaryhmät poistetaan sitten alan ammattimiehen tuntemilla menetelmillä, kuten hydraamalla metallikatalyytin avulla.

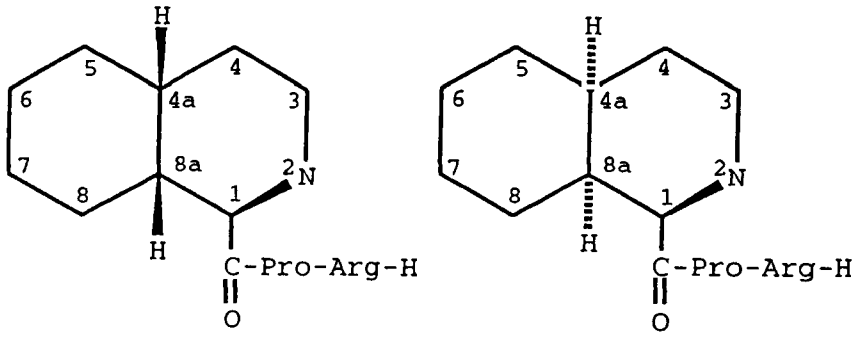
Keksintö tarjoaa myös menetelmän hyytymien muodostumisen ehkäisemiseksi nisäkkäillä ja menetelmässä käyttökelpoisia farmaseuttisia valmisteita.

Kuten kaavassa 1 on esitetty, asymmetrinen keskus proliini- ja arginiinialdehydiryhmissä on L.

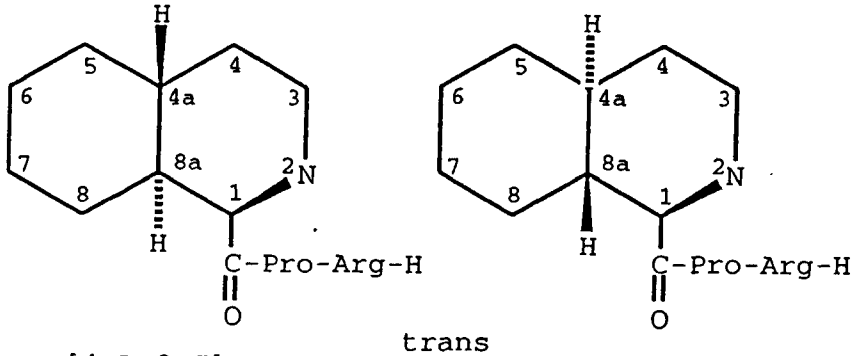
Pro-Arg-H:n perhydrojohdannaiset, joihin sisältyvät D-1,2,3,4,4a,5,6,7,8,8a-dekahydroisokinoliini-1-karbonyyli (perhydroisokinoliini-1-karbonyyli tai 1-Pig) ja D-1,2,3,-4,4a,5,6,7,8,8a-dekahydroisokinoliini-3-karbonyyli (perhydroisokinoliini-3-karbonyyli tai 3-Pig) johdannaiset, on kuvattu alla.



Perhydrojohdannaiset voivat esiintyä cis- tai trans-stereoisomeereinä. Esimerkiksi seuraava pari stereoisomeerejä, jotka on identifioitu cis-muodoksi, voidaan muodostaa D-perhydroisokinoliini-1-karbonyyli-L-prolyyli-L-arginiinialdehydille:



[4aR,8aR] cis [4aS,8aS]



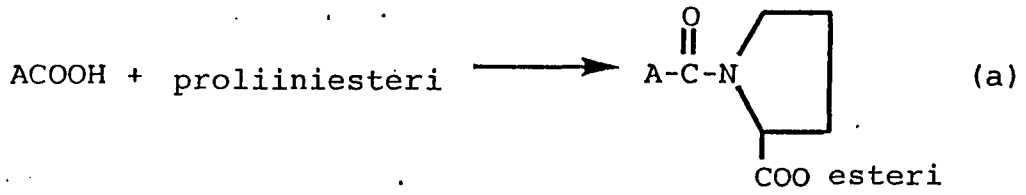
[4aR,8aS] trans [4aS,8aR]

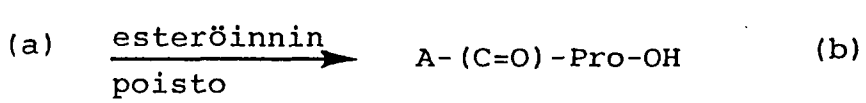
Keksinnön mukaisten peptidien farmaseuttisesti hyväksyttäviin suoloihin kuuluvat happoadditiosuolat, jotka on muodostettu epäorgaanisten happojen ja karboksyylihappojen kanssa. Esimerkkeinä suoloja muodostavista epäorgaanisista hapoista ovat halogeenivetyhapot kloorivetyhappo ja bromivetyhappo; fosforihappo ja rikkihappo. Karboksyylihapposuolat on muodostettu sellaisten happojen kuten etikka-, propioni-, maloni-, maleiini-, sitruuna-, sukkiini-, maali-, bentsoe-, fumaari- ja vastaavien karboksyylihappojen kanssa. Happoadditiosuolat valmistetaan tavanomaisella tavalla, esim. neutralisoimalla yhdisteen 1 vapaa emäsmuoto hapolla. Edullisia happoadditiosuoloja ovat sulfaatti- ja hydrokloridisuolat.

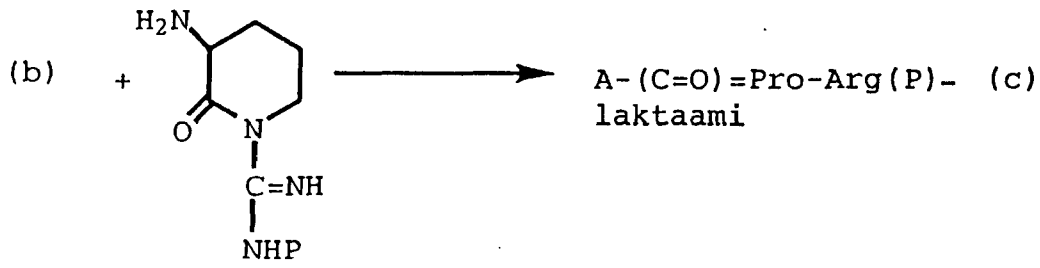
Kuten yllä mainittiin, esillä oleva keksintö pitää sisällään tämän keksinnön mukaisen yhdisteen ja sen farmaseuttisesti hyväksyttävät suolat. Esillä olevan keksinnön

mukainen yhdiste tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävä suola voi muodostaa solvaatteja veden tai tavallisten orgaanisten liuottimien kanssa. Tällaiset solvaatit sisältyvä esillä olevan keksinnön piiriin.

Kaavaa 1 edustava yhdiste valmistetaan tunnetuilla menetelmillä kytkemällä peptidejä. Erään tällaisen menetelmän mukaisesti happo A-COOH, jossa A:lla on sama merkitys kuin kaavassa 1 ja tyypiryhmä on suojattu sopivalla aminosuojaryhmällä, kytketään karboksista suojatun proliinin kanssa dipeptidin muodostamiseksi. Tuotteen proliinissa oleva karboksia suojaava esteriryhmä poistetaan ja dipeptidin vapaa happomuoto kytketään arginiinin laktaamimuodon kanssa. Yllä kuvattua reaktiosarjaa havainnollistetaan seuraavalla kaaviolla.







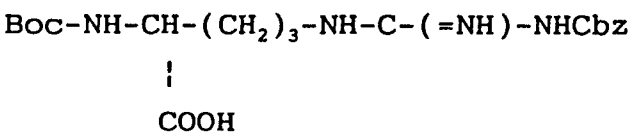
jossa P edustaa aminon suojaryhmää.

Kytketty Arg(P) laktaamituote (c) pelkistetään litiumalumiinihydridillä inertissä liuottimessa laktaamirenkaan pilkkomiseksi, jolloin saadaan seuraavan kaavan mukainen tripeptidi arginiinialdehydin muodossa

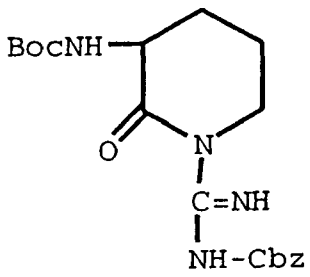
A(C=O)-Pro-Arg(P)-H

jossa Arg(P)-H edustaa aminosta suojattua argiiniinialdehydiä.

Argiiniinin laktaamimuoto saadaan aminosta suojatun argiiniinin [Arg-OH] molekyylinsisäisellä kytkennällä. Esimerkiksi Boc-Arg(Cbz)OH, jota kuvaa kaava



muutetaan ensin aktiivisen esterin muotoon, kuten aktiiviseksi sekoitetuksi anhydridiksi, kloroformaattiesterillä, esim. etyylikloroformaatilla isobutyylikloroformaatiksi. Esterinmuodostus suoritetaan tertiäärisen amiinin, kuten N-metyylimorfoliinin läsnäollessa. Vahvemman tertiäärisen amiiniemäksen, kuten trietyyliaminiinin lisäys saa aikaan sisäisen asyloinnin, jolloin saadaan diaminosuojatusta argiiniinista laktaamimuoto, kuten alla on kuvattu.



Juuri ennen käyttöä kytkennässä A(C=O)-Pro-OH:n kanssa, kuten yllä olevassa kaaviossa on kuvattu, Boc-suojaryhmä poistetaan selektiivisesti trifluorietikkahapolla, jolloin saadaan tarvittava vapaa aminoryhmä.

ACOOH-yhdisteen kytkentä proliiniesterin kanssa suoritetaan suojaamalla ensin aminohapon aminoryhmä. Tavanomaisia aminoruojaryhmiä, joita käytetään aminoryhmän

tilapäiseen suojaukseen tai salpaukseen, käytetään. Esimerkkejä tällaisista suojaryhmistä ovat alkoksi, alkenyylioksi, sykloalkoksi ja aryylioksikarbonyyliryhmät kuten etoksikarbonyyli, t-butyylioksikarbonyyli (Boc), sykloheksyylioksikarbonyyli, admantyylioksikarbonyyli, trikloorietoksikarbonyyli, bentsyylioksikarbonyyli (Cbz), difenyylimetoksikarbonyyli ja vastaavat ryhmät. Esterisuojaryhmä, jota käytetään suojaamaan proliinin karboksiryhmää kytkentäreaktion aikana, voi olla mikä tahansa tavallisesti käytetyistä helposti poistettavista esteriryhmistä, kuten t-butyyli, bentsyyli, p-nitrobentsyyli, p-metoksibentsyyli, difenyylimetyyli, trikloorietyyli, fenasyyli tai trialkyylisilyyliesteri. Suoritettaessa kytkentäreaktiota käytetään proliinissa esteriryhmää, joka on poistettavissa olosuhteissa, joissa aminosuojaryhmä pysyy koskemattomana. Asyloivan hapon ACOOH aminosuojaryhmä täten pysyy paikallaan suojaten aminoryhmää seuraavana vuorossa olevan kytkennän argiiniinin laktaamiyhdisteen kanssa aikana c:n muodostamiseksi.

Perhydrobisykloryhmät valmistetaan hydraamalla joko osittain pelkistettyjä tai tyydyttämättömiä happoja tavanomaisilla menetelmillä. Esimerkiksi 1,2,3,4-tetrahydroisokinoliini-1-karboksyylihappo hydrataan platinaoksidilla liuottimessa, kuten etanolissa tai etikkahapossa, jolloin saadaan perhydro(dekahydro)isokinoliini-1-karboksyylihappo. Perhydrohappoja käytetään sitten kuten yllä on kuvattu proliiniesterin asyloinnissa. Esimerkkejä tällaisista kaavan 1 mukaisista perhydrojohdannaisista ovat N-(D-dekahydroisokinoliini-1-karbonyyli)-L-prolyyli-L-argiiniinialdehydi ja N-(D-dekahydroisokinoliini-3-karbonyyli)-L-prolyyli-L-argiiniini.

Yllä kuvattu hydrausprosessi tuottaa yllä kerrottujen cis- ja trans-stereoisomeerien seoksen, jolloin cis-stereoisomeerejä muodostuu suurempi määrä. Esimerkiksi yhdisteisiin sisältyvät:

D-1-(4aS,8aS)-Piq-(L)-Pro-(L)-Arg(H),
D-1-(4aR,8aR)-Piq-(L)-Pro-(L)-Arg(H),
D-1-(4aS,8aR)-Piq-(L)-Pro-(L)-Arg-H,
D-1-(4aR,8aS)-Piq-(L)-Pro-(L)-Arg-H,
D-3-(4aS,8aS)-Pig-(L)-Pro-(L)-Arg-H,
D-3-(4aR,8aR)-Piq-(L)-Pro-(L)-Arg-H,
D-3-(4aS,8aR)-Piq-(L)-Pro-(L)-Arg-H, ja
D-3-(4aR,8aS)-Piq-(L)-Arg-H.

Yllä kuvatut kytkentäreaktiot suoritetaan kylmässä, edullisesti lämpötilassa välillä noin -20 - 15 °C. Kytkentäreaktiot suoritetaan inertissä orgaanisessa liuottimessa kuten dimetyyliformamidissa, dimetyyliasetamidissa, tetrahydrofuraanissa, metyleenikloridissa, kloroformissa tai vastaavissa tavanomaisissa liuottimissa. Yleensä vedettömiä olosuhteita käytetään, kun kytkentäreaktiossa käytetään asyloivan hapon aktiivista esteriä.

Keksinnön mukaiset yhdisteet eristetään parhaiten happoadditiosuolojen muodossa. Kaavan 1 mukaisten yhdisteiden suolat, jotka on muodostettu yllä mainittujen happojen kanssa, ovat hyödyllisiä farmaseuttisesti hyväksyttyinä suoloina annettavaksi antitroboottisina aineina ja valmistettaessa näistä aineista valmisteita. Muita happoadditiosuoloja voidaan valmistaa ja käyttää eristettäessä ja puhdistettaessa peptidejä. Esimerkiksi suoloja, jotka on muodostettu sulfonihappojen, kuten metaanisulfonihapon, n-butaanisulfonihapon, p-tolueenisulfonihapon ja naftaleenisulfonihapon kanssa, voidaan käyttää.

Edullinen menetelmä kaavan 1 mukaisten yhdisteiden eristämiseksi ja puhdistamiseksi, kun samalla kertaa valmistetaan haluttu pysyvä suolamuoto, on kuvattu US-patentissa 5 250 660, ja se sisältää preparatiivisen puhdistuksen C_{18}-käänteisfaasikromatografialla. Vesifaasi koostuu rikkihaposta tai kloorivetyhaposta pitoisuuksien ollessa noin välillä 0,01 - 0,05 %, ja asetonitriilistä, THF:sta, metanolista tai muusta sopivasta liuottimesta orgaanisena

komponenttina. Happaman eluentin pH säädetään noin välille 4 - 6, tarkan pH:n ollessa funktio käytetystä peptidistä, happaman hartsin, esim. Bio-Rad AG-1X8-hartsin, joka on hydroksyylimuodossa, avulla. pH:n säädön jälkeen tripeptidisuolan, esim. sulfaatin tai hydrokloridin liuos lyofilisoidaan, jolloin saadaan puhdistettu suola kuivan jauheen muodossa. Menetelmän esimerkissä epäpuhdas 1-(1R,4aR,8aR)-Piq-L-Pro-L-Arg-H-sulfaatti, jossa on epäpuhtautena epimeeristä D-Arg-H-sulfaattia, liuotetaan veteen ja liuos laitetaan Vydac C_{18} RPHPLC 5 cm x 50 cm kolonniin. Gradienttia, jossa on 2 - 20 prosenttia B:tä (A = 0,01-prosenttinen H_2SO_4; B = asetonitriili) kymmenen tunnin ajan käytetään. Useita jakeita kerätään, ja ne, jotka sisältävät haluttua tuotetta määritettynä analyyttisellä RP-HPLC:llä, kerätään talteen. Kerättyjen jakeiden pH säädetään noin välille 4,0 - 4,5 Bio-Rad AG-1X8-hartsilla hydroksyylikierrossa. Suodatuksen jälkeen liuos lyofilisoidaan, jolloin saadaan puhdasta 1-(1R,4aR,8aR)-Piq-L-Pro-L-Arg-H-sulfaattia.

Keksinnön mukaisen yhdisteen uskotaan selektiivisesti inhiboivan trombiinia muiden proteinaasien ja eientsymaattisten proteiinien, jotka osallistuvat veren hyytymiseen, ylitse ilman, että se merkittävästi häiritsee kehon luonnollista hyytymiä sulattavaa kykyä (yhdisteillä on alhainen ehkäisevä vaikutus fibrinolyysiin). Edelleen tällaisen selektiivisyyden uskotaan sallivan trombolyyttisten aineiden käytön ilman oleellista vaikutusta trombolyysiin ja fibrinolyysiin.

Keksinnön mukainen yhdiste (kaava 1) inhiboi selektiivisesti trombiinin vaikutusta ihmisillä ja eläimillä (nisäkkäillä). Trombiinin inhibitio osoitetaan trombiinin amidaasivaikutuksen estona in vitro. Seuraavassa taulukossa 1 luetellaan ilmeiset tasapainovakiot (Kass) testattavan yhdisteen (inhibiittori) ja trombiinin vuorovaikutuksen välillä. Taulukossa olevat tulokset saatiin testissä,

jossa trombiini hydrolysoi kromogeenista substraattia, N-bentsoyyli-D-fenyylialanyyli-L-valyyli-L-arginyyli-p-nitroanilidia.

Testi suoritettiin 50 µl:ssa puskuria (0,03M Tris, 0,15M NaCl, pH 7,4) 25 µl:n kanssa ihmisen trombiiniliuosta (puhdistettu ihmisen trombiini, Enzyme Research Laboratories, South Bend, Indiana, 8 NIH yksikköä/ml) ja 25 µl:n kanssa testattavaa yhdistettä liuottimessa (50-%:inen vesipitoinen metanoli (til/til)). Sitten lisättiin 150 µl kromogeenisen substraatin vesipitoista liuosta (0,25 mg/ml), ja substraatin hydrolyysinopeudet mitattiin tarkkailemalla reaktioita 405 nm:ssä vapautuvan p-nitroaniliinin havaitsemiseksi. Standardikäyrät saatiin aikaan piirtämällä vapaa trombiinin konsentraatio hydrolyysinopeuden funktiona. Testattaville yhdisteille havaitut hydrolyysinopeudet muutettiin sitten "vapaa trombiini" -arvoksi vastaavissa kokeissa käyttämällä standardikäyriä. Sidottu trombiini (sidottu testiyhdisteeseen) laskettiin vähentämällä kussakin testissä havaitun vapaan trombiinin määrä trombiinin tunnetusta alkumäärästä kussakin testissä. Vapaan inhibiittorin määrä kussakin testissä laskettiin vähentämällä sidotun trombiinin moolimäärä lisätyn inhibiittorin (testiyhdiste) moolien lukumäärästä.

Kass -arvo on hypoteettinen tasapainovakio reaktiolle trombiinin ja testattavan yhdisteen (I) välillä.

$$\text{Trombiini} + I \rightleftarrows \text{Trombiini} - I$$

$$\text{Kass} = \frac{(\text{Trombiini } I)}{(\text{Trombiini}) \times (I)}$$

Kass laskettiin testattavien yhdisteiden väkevyyksien alueella, ja keskiarvo on esitetty litran yksikköina moolia kohti.

Seuraamalla oleellisesti yllä kuvattuja menetelmiä ihmisen trombiinille, ja käyttäen toisen ihmisen veren hyytymissysteemin seriiniproteaaseja ja käyttäen fibrinolyttisen systeemin seriiniproteaaseja, sopivien kromogeenisten susbtraattien kanssa, identifioitu alla, esillä olevan keksinnön mukaisen yhdisteen selektiivisyys hyytymistekijän seriiniproteaasien ja fibrinolyyttisten seriiniproteaasien suhteen arvioitiin, samoin kuin niiltä oleellisesti puuttuva yhteisvaikutus ihmisen plasman hyytymien fibrinolyysiin.

Ihmisen faktoria Xa myy Enzyme Research Laboratories, South Bend, Indiana. Kromogeenista substraattia: N-bentsoyyli-Ile-Glu-Gly-Arg-p-nitroanilidia (faktoria Xa varten) myy KabiVitrum, Tukholma, Ruotsi, tai Midwest Biotech, Fishers, Indiana. Naudan trypsiiniä myy Worthington Biochemicals, Freehold, New Jersey. Kromogeeninen substraatti, N-bentsoyyli-Phe-Val-Arg-p-nitroanilidi, substraatti ihmisen trombiiniin ja trypsiiniin, syntetisoidaan yllä esillä olevan keksinnön mukaiselle yhdisteelle kuvattujen menetelmien mukaisesti, käyttäen tunnettuja peptidin kytkentämenetelmiä, kaupallisesti saatavissa olevista reagoivista aineista, tai se hankitaan Midwest Biotech'ilta, Fishers, Indiana.

Ihmisen plasmiini hankitaan Boehringer Mannheim'ilta, Indianapolis, Indiana; nt-PA hankitaan yksiketjuisena aktiivisuuden vertailuaineeksi American Diagnosticalta, Greenwich, Connecticut. Plasmiinin kromogeeninen substraatti H-D-Val-Leu-Lys-p-nitroanilidi ja kudoksen plasminogeenin aktivaattorin (t-PA) substraatti H-D-Ile-Pro-Arg-p-nitroanilidi hankitaan KabiVitrumilta, Tukholma, Ruotsi.

Yllä kuvatuissa kromogeenisissa substraateissa kolmikirjaimisia symboleja Ile, Glu, Gly, Pro , Arg, Phe, Val, Leu ja Lys käytetään kuvaamaan vastaavia aminohappo-

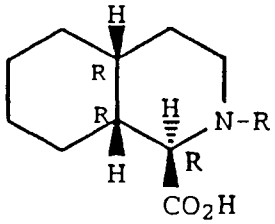
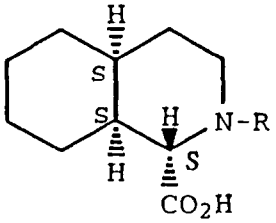
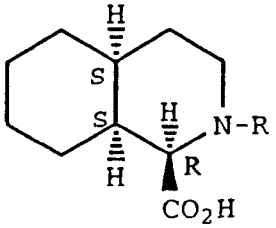
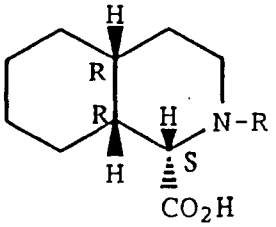
ryhmiä, isoleusiini, glutamiinihappo, glysiini, proliini, arginiini, fenyylialaniini, valiini, leusiini ja lysiini.

Seuraavassa taulukossa 1 listataan osoitetulle yhdisteelle saadut Kass -arvot.

5

Taulukko 1

Inhibition asteet

Esim. nro	Rakenne	Ihmisen trombiini	Trypsiini	Plasmiini	Xa	ntPA
1	 4 D-1-[4aR,8aR] Piq-Pro-Arg-H	9550	67	1,26	12,2	
2	 1 1-[4aS,8aS]Piq-Pro-Arg-H	140	18	0,74	4,73	
3	 2 D-1-[4aS,8aS] Piq-Pro-Arg-H	358	12	1,45	1,44	0,03
4	 3 L-1-[4aR,8aR] Piq-Pro-Arg-H	6,8	1,4	0,12	0,15	0,002

Keksinnön mukainen yhdiste inhiboi selektiivisesti hyytymän muodostusta ilman merkittävää yhteisvaikutusta kehon luonnollisen hyytymiä liuottavan vaikutuksen kanssa, eli yhdisteillä on alhainen vaikutus fibrinolyysiin.

Eräänä keksinnön piirteenä on tarjota menetelmä verihyytymien muodostuksen ehkäisemiseksi ihmisillä ja eläimillä (nisäkkäillä), jonka menetelmän mukaisesti kyseiselle ihmiselle tai eläimelle annetaan tehokas hyytymiä ehkäisevä myrkytön annos kaavan 1 mukaista yhdistettä. Antikoagulanttista yhdistettä annetaan suun kautta, parenteraalisesti, esim. suonensisäisenä infuusiona (iv), lihaksensisäisenä injektiona (im) tai ihonalaisesti (sc).

Tehokas hyytymiä ehkäisevä annos on noin välillä 5 mg - 1000 mg. Annosohjelma voi vaihdella, esim. ennaltaehkäisevässä käytössä voidaan antaa yksi päivittäinen annos tai useammat annokset, kuten 3 tai 5 kertaa päivässä, voivat olla sopivia. Kriittisessä hoitotilanteessa keksinnön mukaista yhdistettä annetaan suonensisäisenä infuusiona annoksena noin 0,1 - 1,0 mg/kg/tunti.

Suun kautta annettaessa esillä olevan keksinnön mukaisen yhdisteen annosta välillä noin 0,1 - 20 mg/kg voidaan käyttää kerran tai useampia kertoja 24 tunnin aikana. Edullisesti annos on välillä noin 0,5 - 5 mg/kg, ja se annetaan aina 4 kertaa 24 tunnin aikana. Esillä olevia yhdisteitä voidaan antaa suun kautta tavanomaisissa muodoissa, kuten tabletteina, kapseleina ja vastaavina, kuten alla esitetään.

Tämän keksinnön menetelmää käytetään myös yhdessä hyytymiä liuottavan aineen, esim. kudoksen plasminogeenin aktivaattorin (tPA), modofioidun tPA:n, streptokinaasin tai urokinaasin kanssa. Tapauksissa, joissa hyytymän muodostuminen on tapahtunut ja valtimo tai suoni on tukossa, joko osittain tai kokonaan, tavallisesti käytetään hyytymiä liuottavaa ainetta. Keksinnön mukaista yhdistettä voi-

daan antaa yhdessä liuottavan aineen kanssa tai sen jälkeen ehkäisemään hyytymän muodostuksen uusiutumista.

Tämä keksintö tarjoaa myös farmaseuttisia valmisteita käytettäväksi yllä kuvatussa terapeuttisessa menetelmässä. Keksinnön mukaiset farmaseuttiset valmisteet koostuvat tehokkaasta trombiinia ehkäisevästä määrästä kaavan I mukaista yhdistettä yhdessä farmaseuttisesti hyväksyttävän kantajan, täyteaineen tai laimentimen kanssa. Suun kautta annostelua varten antitromboottisesta yhdisteestä valmistetaan gelatiinikapseleita tai tabletteja, jotka voivat sisältää lisäaineita, kuten sitojia, liukastimia, takertumista ehkäiseviä aineita ja vastaavia. Parenteraalista annostelua varten antitromboottisesta aineesta valmistetaan liuos farmaseuttisesti hyväksyttävään laimentimeen, esim. fysiologiseen suolaliuokseen (0,9-prosenttinen), 5-prosenttiseen dekstroosiin, Ringer'in liuokseen tai vastaavaan.

Esillä olevan keksinnön mukaisesta yhdisteestä voidaan valmistaa yksikköannosmuotoja, joissa annos vaihtelee välillä noin 0,1 - 1000 mg. Edullisesti yhdiste on farmaseuttisesti hyväksyttävän suolan, kuten esimerkiksi sulfaattisuolan, asetaattisuolan tai fosfaattisuolan muodossa. Esimerkiksi yksikköannos voi sisältää 5 mg esillä olevan keksinnön mukaista yhdistettä farmaseuttisesti hyväksyttävänä suolana 10 ml:isessa steriilissä lasiampullissa. Toinen esimerkki yksikköannosmuodosta on 10 mg esillä olevan keksinnön mukaista yhdistettä farmaseuttisesti hyväksyttävänä suolana 20 ml:ssa isotonista suolaliuosta steriilissä ampullissa.

Yhdisteitä voidaan annostella erilaisilla tavoilla, joihin kuuluvat suun kautta, peräsuoleen, transdermaalisesti, ihonalaisesti, suonensisäisesti, lihaksensisäisesti ja nenän kautta annostelu. Esillä olevan keksinnön mukaisista yhdisteistä valmistetaan edullisesti valmiste ennen annostelua. Eräs esillä olevan keksinnön suoritusmuoto on

farmaseuttinen valmiste, joka sisältää tehokkaan määrän kaavan I mukaista yhdistettä tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävää suolaa tai solvaattia yhdessä farmaseuttisesti hyväksyttävän kantajan, laimentimen tai täyteaineen kanssa.

Tällaisissa valmisteissa aktiivista ainetta on noin 0,1 - 99,0 prosenttia valmisteen painosta. "Farmaseuttisesti hyväksyttävällä" tarkoitetaan, että kantajan, laimentimen tai täyteaineeen täytyy olla yhteensopiva muiden valmisteen aineiden kanssa eikä se saa olla vahingollista sen saajalle.

Esillä olevat farmaseuttiset valmisteet valmistetaan tunnetuilla menetelmillä käyttäen tunnettuja ja helposti saatavissa olevia aineita. Tämän keksinnön mukaiset koostumukset voidaan muotoilla niin, että saadaan aktiivisen aineen nopea, hidastettu tai viivytetty vapautuminen potilaalle annostelun jälkeen käyttäen alalla tunnettuja menetelmiä. Valmistettaessa esillä olevan keksinnön mukaisia koostumuksia aktiivinen aine tavallisesti sekoitetaan kantajan kanssa tai laimennetaan kantajalla, tai suljetaan kantajaan, joka voi olla kapselin, pussin, paperin tai muun säiliön muodossa. Milloin kantaja toimii laimentimena, se voi olla kiinteä, puolikiinteä tai nestemäinen aine, joka toimii sideaineena, täyteaineena tai väliaineena aktiiviselle aineelle. Niinpä valmisteet voivat olla tablettien, pillerien, jauheiden, pastillien, pussien, kapselien, eliksiirien, suspensioiden, emulsioiden, siirappien, aerosolien (kiinteässä tai nestemäisessä väliaineessa), pehmeiden ja kovien gelatiinikapseleiden, peräpuikkojen, steriilien injektoitavien liuosten, steriilisti pakattujen jauheiden ja vastaavien muodossa.

Seuraavat valmiste-esimerkit ovat vain havainnollistavia, eikä niiden tarkoituksena ole rajoittaa keksinnön piiriä millään tavalla. "Aktiivinen aine" tarkoittaa

tietysti kaavan I mukaista yhdistettä tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävää suolaa tai solvaattia.

Valmiste 1

Kovat gelatiinikapselit valmistetaan käyttäen seuraavia aineita:

	Määrä (mg/kapseli)
Aktiivinen aine	250
Tärkkelys, kuivattu	200
Magnesiumstearaatti	10
Yhteensä	460 mg

Valmiste 2

Tabletti valmistetaan käyttäen seuraavia aineita:

	Määrä (mg/tabletti)
Aktiivinen aine	250
Selluloosa,mikrokiteinen	400
Piidioksidi, kuumennettu	10
Steariinihappo	5
Yhteensä	665 mg

Komponentit sekoitetaan ja puristetaan tablettien muotoon niin, että kukin painaa 665 mg

Valmiste 3

Aerosoliliuos valmistetaan niin, että se sisältää seuraavia komponentteja:

	Paino
Aktiivinen aine	0,25
Etanoli	25,75
Ponneaine 22 (kloori-difluorimetaani)	70,00
Yhteensä	100,00

Aktiivinen yhdiste sekoitetaan etanoliin ja seos lisätään osaan ponneaine 22:a, jäähdytetään -30 °C:een ja

siirretään täyttölaitteeseen. Tarvittava määrä johdetaan sitten ruostumattomasta teräksestä valmistettuun säiliöön ja laimennetaan jäljelle jääneellä ponneaineella. Sitten venttiiliyksiköt sovitetaan säiliöön.

Valmiste 4

Tabletit, joista kukin sisältää 60 mg aktiivista ainetta, valmistetaan seuraavasti:

Aktiivinen aine	60 mg
Tärkkelys	45 mg
Mikrokiteinen selluloosa	35 mg
Polyvinyylipyrrolidoni (10 %-isena liuoksena vedessä	4 mg
Natriumkarboksimetyylitärkkelys	4,5 mg
Magnesiumstearaatti	0,5 mg
Talkki	1 mg
Yhteensä	150 mg

Aktiivinen aine, tärkkelys ja selluloosa johdetaan nro 45 mesh US -seulan läpi ja sekoitetaan perusteellisesti. Vesipitoinen liuos, joka sisältää polyvinyylipyrrolidonia, sekoitetaan saadun jauheen kanssa, ja sitten seos johdetaan No. 14 mesh US -seulan läpi. Näin muodostuneet rakeet kuivataan 50 °C:ssa ja johdetaan No. 18 mesh US -seulan läpi. Natriumkarboksimetyylitärkkelys, magnesiumstearaatti ja talkki, jotka on aiemmin johdettu nro 60 mesh US -seulan läpi, lisätään sitten rakeisiin, ja tämä sekoituksen jälkeen puristetaan tablettikoneessa, jolloin saadaan tabletteja, joista kukin painaa 150 mg.

Valmiste 5

Kapselit, joista kukin sisältää 80 mg aktiivista ainetta, valmistetaan seuraavasti:

Aktiivinen aine	80 mg
Tärkkelys	59 mg
Mikrokiteinen selluloosa	59 mg
Magnesiumstearaatti	2 mg
Yhteensä	200 mg

Aktiivinen aine, selluloosa, tärkkelys ja magnesiumstearaatti sekoitetaan, johdetaan No. 45 mesh US -seulan läpi ja saadulla seoksella täytetään kovat gelatiinikapselit 200 mg määrinä.

Valmiste 6

Peräpuikot, joista kukin sisältää 225 mg aktiivista ainetta, valmistetaan seuraavasti:

Aktiivinen aine	225 mg
Tyydytettyjä rasvahappoglyseridejä	2 000 mg
Yhteensä	2 225 mg

Aktiivinen aine johdetaan No. 60 mesh US -seulan läpi ja suspendoidaan tyydytettyihin rasvahappoglyseridеihin, jotka on aiemmin sulatettu käyttäen mahdollisimman vähän lämpöä. Sitten seos kaadetaan peräpuikkomuotteihin, joiden nimelliskapasiteetti on 2 g, ja annetaan jäähtyä.

Valmiste 7

Suspensiot, joista kukin sisltää 50 mg aktiivista ainetta 5 ml:aa annosta kohti, valmistetaan seuraavasti:

Aktiivinen aine	50 mg
Natriumkarboksimetyyliselluloosa	50 mg
Siirappi	1,25 ml
Bentsoehappoliuos	0,10 ml
Makuainetta	q.v.
Väriainetta	q.v.
Puhdistettua vettä määrään	5 ml

Aktiivinen aine johdetaan No. 45 meh US -seulan läpi ja sekoitetaan natriumkarboksimetyyliselluloosan ja siirapin kanssa, jolloin muodostuu tasainen tahna. Bentsoehappoliuos, maku- ja väriaineet laimennetaan osalla vettä ja lisätään sekoittaen. Riittävä määrä vettä lisätään sitten, jotta saadaan tarvittava tilavuus.

Valmiste 8

Suonensisäinen valmiste voidaan valmistaa seuraavasti:

Aktiivinen aine	100 mg
Isotoninen suolaliuos	1 000 ml

Yllä mainittuja aineita sisältävää liuosta annetaan tavallisesti suonensisäisesti kohteelle annoksena 1 ml minuutissa.

Esimerkkinä yksikköannosmuodosta on 5 mg (1R,4aR,-8aR)-perhydroisokinoliini-1-karbonyyli-L-prolyyli-L-argiiinialdehydin sulfaattisuolaa 10 ml:n steriilissä lasiampullissa. Toinen esimerkki yksikköannosmuodosta on noin 10 mg (1R,4aR,8aR)-perhydroisokinoliini-1-karbonyyli-L-prolyyli-L-argiiinialdehydin sulfaattia 20 ml:ssa isotonista suolaliuosta steriilissä ampullissa.

Edullinen valmiste on yksikköannosmuoto, joka sisältää 5 - 50 mg (1R,4aR,8aR)-perhydroisokinoliini-1-karbonyyli-L-prolyyli-L-argiiinialdehydin sulfaattia steriileissä ampulleissa.

Seuraavien esimerkkien tarkoituksena on edelleen kuvata keksintöä, eikä niitä ole tarkoitettu sen rajoittamiseen.

Rf-arvot seuraavissa esimerkeissä määritettiin silikageelillä ohutkerroskromatografialla käyttäen Kieselgel 60F-254:ää (Merck, Darmstradt) seuraavissa liuotinsysteemeissä:

(A) Kloroformi-metanoli-etikkahappo, 135:15:1, til:til:til

(B) etyyliasetaatti-etikkahappo-absoluuttinen etanoli, 90:10:10, til:til:til

(C) kloriformi-metanoli-etikkahappo, 90:30:5, til:til:til

(D) etyyliasetaatti-heksaanit, 30:70, til:til

Esimerkeissä käytetyt analyyttiset HPLC-menetelmät olivat seuraavia:

Menetelmä 1. Waters 600 E, käyttäen Vydac C18 käänteisfaasikolonnia, 0,46 cm x 10 cm. Kromatogrammia tarkkailtiin LDC:llä 220 nm:ssä käyttäen gradienttia A = 0,01M ammoniumasetaatti ja B = asetonitriili.

Menetelmä 2. Pharmacia FPLC käyttäen PepRPC, 0,5 cm x 5,0 cm. Monitorointi tehtiin Pharmacia UV-M:lla 214 nM:ssä käyttäen gradienttia joko A = 0,01 M ammoniumasetaatti tai B = asetonitriili.

Käytetyillä lyhenteillä on seuraavat merkitykset.

Aminohapot: Arg = arginiini, Pro = proliini, Phg = fenyyliglysiini

Boc = t-butyylioksikarbonyyli

Bzl = bentsyyli

Cbz (tai z) = bentsyylioksikarbonyyli

DCC = disykloheksyylikarbodi-imidi

DMF = dimetyyliformamidi

DMSO = dimetyylisulfoksidi

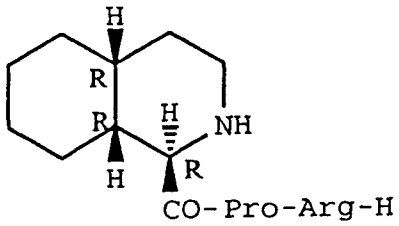
FAB-MS = nopean atomipommituksen massaspektri

THF = tetrahydrofuraani

TLC = ohutkerroskromatografia

Esimerkki 1

(1R,4aR,8aR)-perhydroisokinoliini-1-karbonyyli-L-prolyyli-L-argiiniinialdehydin valmistus



Metyylikarbamaatti-fenetyyliamiini (1)

Sekoitettuun liuokseen, joka sisälsi fenetyyliamiinia (75,2 ml, 0,6 mol) ja trietyyliamiinia (83 ml, 0,6 mol) THF:ssa (500 ml), lisättiin hitaasti metyylikloroformaattia (46,2 ml, 0,6 mol) liuotettuna THF:iin (50 ml). Sen jälkeen, kun reaktiota oli sekoitettu vielä yksi tunti huoneenlämpötilassa, dietyylieetteriä (2 l) ja 1N HCl:a (800 ml) lisättiin. Orgaaninen kerros pestiin vedellä, kuivattiin ($MgSO_4$), suodatettiin, ja suodos väkevöitiin tyhjiössä, joilloin saatiin puhdasta otsikkoyhdistettä kirkkaana öljynä (102 g, 95 %).

Metyylikarbamaatti-DL-1,2,3,4-tetrahydroisokinoliini-1-karboksyylihappo (2)

Liuokseen, joka sisälsi metyylikarbamaatti-fenetyyliamiinia (1) (102 g, 0,57 mol) trifluorietikkahapossa (300 ml), lisättiin glyoksyylihappoa (63 g, 0,68 mol) ja kuumennettiin palautusjäähdytyslämpötilaan. Neljän tunnin palautusjäähdytyksen jälkeen reaktioseos jäähdytettiin huoneenlämpötilaan, liuotin poistettiin tyhjiössä ja dietyylieetteri (800 ml)/vettä (100 ml) lisättiin jäännökseen. Reaktioseoksen pH nostettiin 12:een 5 N NaOH:lla, ja vesikerros erotettiin. Vesikerrokseen lisättiin dietyylieetteriä (500 ml), ja liuos tehtiin happamaksi, pH 2,5, 5 N HCl:lla. Orgaaninen kerros erotettiin, kuivattiin

($MgSO_4$), suodatettiin, ja suodos väkevöitiin tyhjiössä, jolloin saatiin puhdasta otsikkoyhdistettä öljynä (107 g, 80 %); FAB-MS 236 (MH^+).

Metyylikarbamaatti-DL-1,2,3,4-tetrahydroisokinoliini-1-karboksyyli-t-butyyliesteri (3)

Sekoitettuun, jäähdytettyyn (0 °C) liuokseen, joka sisälsi metyylikarbamaatti-DL-1,2,3,4-tetrahydroisokinoliini-1-karboksyylihappoa (2) (105 g, 0,45 mol) CH_2Cl_2:ssa (200 ml), lisättiin t-butanolia (52 ml, 0,54 mol), 4-dimetyyliaminopyridiiniä (10 g; 0,08 mol) ja DCC:a (92 g, 0,45 mol). Seosta pidettiin 2 tuntia 0 °C:ssa ja 24 tuntia huoneenlämpötilassa, jonka jälkeen liuotin poistettiin tyhjiössä, ja jäännökseen lisättiin etyyliasetaattia (800 ml) / 1N $NaHCO_3$:a (300 ml). Orgaaninen kerros erotettiin, pestiin ensin vedellä, 1,5 N sitruunahapolla ja vedellä. Orgaaninen kerros kuivattiin ($MgSO_4$), suodatettiin ja suodos väkevöitiin tyhjiössä, jolloin saatiin puhdasta otsikkoyhdistettä öljynä (106 g, 81 %); FAB-MS 292 (MH^+); TLC R_f (A) 0,61; alkuaineanalyysi (laskettu) $C_{16}H_{21}NO_4$: C, 65,96; H, 7,27; N, 4,81. Saatu: C, 66,24, H, 7,28, N, 4,73.

Metyylikarbamaatti-DL-1,2,3,4,5,6,7,8-perhydroisokinoliini-1-karboksyyli-t-butyyliesteri (4)

Liuoksen, joka sisälsi metyylikarbamaatti-DL-1,2,-3,4-tetrahydroisokinoliini-1-karboksyyli-t-butyyliesteriä (3) (105 g, 0,36 mol) t-butanolissa (800 ml), annettiin reagoida 5 %-isen Rh / Al_2O_3:n (52,5 g) kanssa 800 psissä vedyn kanssa suurpainelaitteistossa 50 °C:ssa 24 tuntia. Reaktioseos suodatettiin Celite^R-kerroksen läpi, ja suodos väkevöitiin tyhjiössä. Saatu öljy kuivattiin, jolloin saatiin puhdasta otsikkoyhdistettä (96,5 g, 90%) FD-MS 298 (MH^+); TLC R_f (C) 0,63.

Metyylikarbamaatti-1,2,3,4,4aS,6,7,8,8aS-perhydroisokinoliini-S-1-karboksyylihappoetyyliesteri + Metyylikarbamaatti-1,2,3,4,4aR,6,7,8,8aR-perhydroisokinoliini-R-1-karboksyylihappoetyyliesteri (5)

Liuokseen, joka sisälsi metyylikarbamaatti-DL-1,2,3,4,6,7,8-perhydroisokinoliini-1-karboksyylihappot-butyyliesteriä (4) (81,2 g, 273 mmol) EtOH:ssa (500 ml), lisättiin natriumetoksidia (21% etanolissa) (88,4 ml, 273 mmol), ja reaktioseoksen annettiin palautusjäähtyä (24 t). Orgaaninen liuotin haihdutettiin tyhjiössä, ja jäännökseen lisättiin etyyliasetaattia (400 ml) ja vettä (100 ml). Orgaaninen kerros erotettiin, pestiin kahdesti vedellä, kuivattiin ($MgSO_4$), suodatettiin ja suodos väkevöitiin tyhjiössä, jolloin saatiin puhdasta otsikkoyhdistettä öljynä (70 g, 95 %); FAB-MS 270 (MH^+); TLC R_f (A) 0,61.

Metyylikarbamaatti-1,2,3,4,4aS,6,7,8,8aS-perhydroisokinoliini-S-1-karboksyylihappo + Metyylikarbamaatti-1,2,3,4,4aR,6,7,8,8aR-perhydroisokinoliini-R-1-karboksyylihappo (6)

Liuokseen, joka sisälsi yhdistettä 5 (70 g, 260 mmol) THF:ssa (250 ml), lisättiin 2N NaOH:a (156 ml, 312 mmol) ja reaktioseosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa (30 t). Orgaaninen liuotin haihdutettiin tyhjiössä, dietyylieetteriä (400 ml) ja vettä (100 ml) lisättiin jäännökseen. Vesipitoinen kerros erotettiin ja etyyliasetaattia (400 ml) lisättiin Liuoksen pH säädettiin 2,0:aan 5 N HCl:lla. Orgaaninen kerros kuivattiin ($MgSO_4$), suodatettiin ja suodos väkevöitiin tyhjiössä, jolloin saatiin kirkasta öljyä. Öljy kiteytettiin heksaanista (200 ml), jolloin saatiin puhdasta otsikkoyhdistettä (46,4 g, 74 %); FAB-MS 242 (MH^+); TLC R_f (A) 0,36; alkuaineanalyysi (laskettu) $C_{12}H_{19}NO_4$: C, 59,74; H, 7,94; N, 5,81. Saatu: C, 59,95, H, 7,88, N, 5,54.

Cbz-1,2,3,4,4aS,6,7,8,8aS-perhydroisokinoliini-S-1-karboksyylihappo +
Cbz-1,2,3,4,4aR,6,7,8,8aR-perhydroisokinoliini-R-1-karboksyylihappo (7)

Sekoitettuun liuokseen, joka sisälsi yhdistettä 6 (46 g, 191 mmol) vedettömässä CH_3CN:ssa (200 ml) huoneenlämpötilassa inertissä ilmakehässä lisättiin joditrimetyylisilaanin (62,4 ml, 440 ml) liuos CH_3CN:ssa (60 ml). Reaktiota sekoitettiin 55 °C:ssa 30 minuuttia ja jäähdytettiin huoneen lämpötilaan. Reaktio sammutettiin vedellä (100 ml) ja sitten natriummetabisulfiitilla (1 g). Reaktioseoksen pH nostettiin 10,0:aan 5N NaOH:lla ja bentsyylikloroformaattia (27,3 ml, 191 mmol) lisättiin tipoittain samalla kun pH pidettiin 10:ssä 2 N NaOH:lla. Kun reaktiota oli sekoitettu vielä 30 minuuttia huoneenlämpötilassa, orgaaninen liuotin haihdutettiin tyhjiössä, ja dietyylieetteriä (200 ml) lisättiin. Reaktion annettiin seistä huoneenlämpötilassa (2 t) ja etyyliasetaattia (200 ml) lisättiin. Vesipitoinen liuos tehtiin happamaksi pH:hon 2,5 5 N HCl:lla, orgaaninen kerros erotettiin, kuivattiin ($MgSO_4$), suodatettiin ja suodos väkevöitiin tyhjiössä, jolloin saatiin puhdasta otsikkoyhdistettä öljynä (39,5 g, 65 %); FAB-MS 318 (MH^+); alkuaineanalyysi (laskettu) $C_{18}H_{23}NO_4$: C, 68,12; H, 7,30; N, 4,41. Saatu: C, 66,37; H, 7,52, N, 4,37.

Cbz-1,2,3,4,4aS,6,7,8,8aS-perhydroisokinoliini-S-1-karbonyyli-Pro-t-Bu +
Cbz-1,2,3,4,4aR,6,7,8,8aR-perhydroisokinoliini-R-1-karbonyyli-Pro-t-Bu (8)

Sekoitettuun, jäähdytettyyn (0 °C) liuokseen, joka sisälsi yhdistettä 7 (39 g, 123 mmol) DMF:ssa (200 ml), lisättiin Proliini-t-butyyliesteriä (21,1 g, 123 mmol), 1-hydroksibentsotriatsolia (16,6 g, 123 mmol) ja DCC:a (25,3 g, 123 mmol). Reaktiota sekoitettiin 2 tuntia 0 °C:ssa ja 24 tuntia huoneenlämpötilassa. Reaktion

saostuma suodatettiin ja suodos väkevöitiin tyhjiössä öljyksi. Öljy liuotettiin EtOAc:iin (200 ml) ja veteen (100 ml). Orgaaninen kerros pestiin vuorotellen 1 N $NaHCO_3$:lla, vedellä, 1,5 N sitruunahapolla ja vedellä. Orgaaninen kerros kuivattiin ($MgSO_4$), suodatettiin ja suodos haihdutettiin amorfiseksi kiinteäksi aineeksi otsikkoyhdistettä (52,7 g, 91 %) FAB-MS 471 (MH^+).

Cbz-1,2,3,4,4aR,6,7,8,8aR-perhydroisokinoliini-(1R)-karbonyyli-Pro-OH (9)

Sekoitettuun liuokseen, joka sisälsi yhdistettä 8 (52,4 g, 111 mmol) CH_2Cl_2:ssa (20 ml), lisättiin trifluorietikkahappoa (70 ml) ja anisolia (5 ml). Reaktiota sekoitettiin huoneenlämpötilassa tunnin ajan, ja väkevöitiin tyhjiössä kuumentamatta. Reaktioseos laimennettiin dietyylieetterillä (400 ml),vedellä (100 ml), ja liuoksen pH säädettiin 10,0:aan 5 N NaOH:lla. Vesipitoinen kerros erotettiin ja etyyliasetaattia (300 ml) lisättiin. Liuoksen pH säädettiin 2,5:een 5 N HCl:lla. Orgaaninen kerros erotettiin, kuivattiin ($MgSO_4$), suodatettiin ja suodos väkevöitiin tyhjiössä, jolloin saatiin kirkasta öljyä. Öljy liuotettiin dietyylieetteriin (500 ml), ja liuokseen lisättiin L(-)-α-metyylibentsyyliamiinia. Liuoksen annettiin seistä huoneenlämpötilassa (24 t). Saatu kiinteä aine suodatettiin, pestiin dietyylieetterillä ja kuivattiin. Kiinteä aine suspendoitiin etyyliasetaattiin, pestiin 1,5 N sitruunahapolla ja vedellä. Orgaaninen kerros kuivattiin ($MgSO_4$), suodatettiin ja suodos haihdutettiin, jolloin saatiin otsikkoyhdistettä öljynä (20,2 g, 44 %) FAB-MS 415 (MH^+); $[\alpha]_D$ = 3,2° (C, 0,5 MeOH); alkuaineanalyysi (laskettu $C_{23}H_{30}N_2O_5$: C, 66,65; H, 7,30; N, 6,76. Saatu: C, 66,38, H, 7,36, N, 6,63.

(A) Boc-L-Arg(Cbz)-OH

N-Boc-arginiini hydrokloridi (Boc-Arg-OH x HCl) (82,1 g, 250 mmol) liuotettiin 250 ml:aan 5 N NaOH:a 3-kaulaisessa pyöreäpohjaisessa pullossa. Liuos jäähdytet-

tiin -5 °C:seen ja bentsyylikloroformaattia (143 ml, 1,0 moolia, 4 ekv.) lisättiin tipoittain 55 minuutin kuluessa samalla, kun seoksen pH pidettiin välillä 13,2 - 13,5 5 N NaOH:lla (250 ml). Reaktioseosta sekoitettiin yksi tunti -5 °C:essa sen jälkeen, kun kloroformaatin lisäys oli lopussa. Reaktioseos laimennettiin 100 ml:lla vettä ja 500 ml:lla dietyylieetteriä, ja vesipitoinen kerros erotettiin ja uutettiin kahdesti 40 ml:n erillä dietyylieetteriä. Vesipitoinen kerros tehtiin happamaksi, pH 3,0, 3 N H_2SO_4:llä (560 ml) ja uutettiin 550 ml:lla etyyliasetaattia. Erottunut vesipitoinen kerros uutettiin kerran etyyliasetaatilla, ja uute yhdistettiin aiemmin saatuun etyyliasetaattiuutteeseen. Yhdistetyt uutteet pestiin vedellä, kuivattiin $MgSO_4$:lla ja haihdutettiin kuiviin tyhjiössä. Jäännöstä trituroitiin eetterillä, ja saostunut tuote suodatettiin ja kuivattiin. Näin saatiin 66,1 g yhdistettä (3) Boc-Arg(Cbz)-OH (65 % teoreettisesta): TLC R_f (C) 0,43; FD-MS 408 (M^+). ^1H NMR ($CDCl_3$), δ 1,42 (s, 9H), 1,61-1,91 (m, 4H), 3,23-3,41 (m, 2H), 4,17 (d, 1H), 5,21 (s, 2H), 5,62 (d, 1H), 7,30-7,42 (m, 6H), 8,37 (m, 1H).

(B) Boc-Arg(Cbz)-laktaami

Liuos, joka sisälsi Boc-Arg(Cbz)-OH:a (A), valmistettu yllä,(66,0 g, 0,162 mmol) 230 ml:ssa kuivaa THF:a, jäähdytettiin -10 °C:eeseen jää-asetonihauteessa. Kylmään liuokseen lisättiin N-metyylimorfoliinia(18,7 ml, 1,05 ekv.), ja sitten isobutyylikloroformaattia (22,5 ml, 1,05 ekv.), ja seosta sekoitettiin 5 minuuttia -10 °C:eessa. Sitten lisättiin trietyyliamiinia (23,5 ml, 1,05 ekv), ja seosta sekoitettiin 1 tunti -10 °C:ssa ja huoneenlämpötilassa 1 tunti. Reaktioseos kaadettiin yhteen litraan jään ja veden seosta, ja otsikkoyhdiste saostui. Saostuma suodatettiin, pestiin kylmällä vedellä, kuivattiin tyhjiössä ja kiteytettiin etyyliasetaatista. Näin saatiin 38,05 g (60 % teoreettisesta) otsikkoyhdistettä, Boc-Arg(Cbz)-laktaamia: TLC R_f (A) 0,77; FD-MS 291 (MH^+). ^1H NMR ($CDCl_3$),

δ 1,48 (s, 9H), 1,78-1,98 (m, 2H), 2,50 (m, 1H), 3,41 (m, 1H), 4,43 (m, 1H), 4,90 (m, 1H), 4,16 (s, 2H), 5,27 (m, 1H), 7,28-7,45 (m, 6H), 9,41 (m, 1H), 9,68 (m, 1H).

Cbz-1,2,3,4aR,6,7,8,8aR- perhydroisokinoliini-R-1-karbonyyli-Pro-Arg(Cbz)laktaami (11)

Pullossa 1 yhdiste 9 (13,9 g, 33,5 mmol) liuotettiin DMF:iin (50 ml), jäähdytettiin -15 °C:eeseen, ja N-metyylimorfoliinia (3,7 ml, 33,5 mmol) lisättiin, ja sitten isobutyylikloroformaattia (4,4 ml, 33,5 mmol). Reaktioseosta sekoitettiin -15 °C:eessa 1 tunti. Pullossa 2 HCl x Arg(Cbz)-laktaami (10,9 g, 33,5 mmol) liuotettiin DMF:iin (50 ml), jäähdytettiin 0 °C:eeseen, ja liuokseen lisättiin di-isopropyylietyyliamiinia (14,6 ml, 83,8 mmol). Reaktioseosta sekoitettiin 0 °C:eessa 1 minuutti. Pullon 2 sisältö kaadettiin pulloon 1, ja reaktioseosta sekoitettiin 2 tuntia (-15 °C) ja sitten 24 tuntia huoneenlämpötilassa. Reaktioseokseen lisättiin 1 N $NaHCO_3$:a (10 ml), ja liuotin poistettiin tyhjiössä, jolloin saatiin öljyä. Jäännös liuotettiin EtOAc:iin (200 ml) ja pestiin peräkkäin 1 N sitruunahapolla, vedellä, 1 N $NaHCO_3$:lla (100 ml) ja vedellä. Orgaaninen liuos kuivattiin ($MgSO_4$), suodatettiin ja väkevöitiin kuiviin tyhjiössä, jolloin saatiin epäpuhdasta kiinteää ainetta. Epäpuhdas kiinteä aine puhdistettiin kromatografioimalla silikageelillä käyttäen asteittaista gradienttieluointia (heksaani 100 - heksaani-EtOAc 30:70), jolloin saatiin puhdasta yhdistettä 10 (9,0 g, 39 %): FAB-MS 687 (MH^+); alkuaineanalyysi (laskettu) $C_{37}H_{46}N_6O_7$: C, 64,71; H, 6,75; N, 12,24. Saatu: C, 64,23, H, 6,69, N, 11,88.

Cbz-1,2,3,4,4aR,6,7,8,8aR-perhydroisokinoliini-R-1-karbonyyli-Pro-Arg(Cbz)-H (12)

Sekoitettuun, jäähdytettyyn (-70^R) liuokseen, joka sisälsi yhdistettä 11 (9,0 g, 13,1 mmol) typpi-ilmakehässä vedettömässä THF:ssa (100 ml), lisättiin litiumalumiinihydridiä 1M THF:ssa (13,1 ml, 13,1 mmol). Reaktioseosta

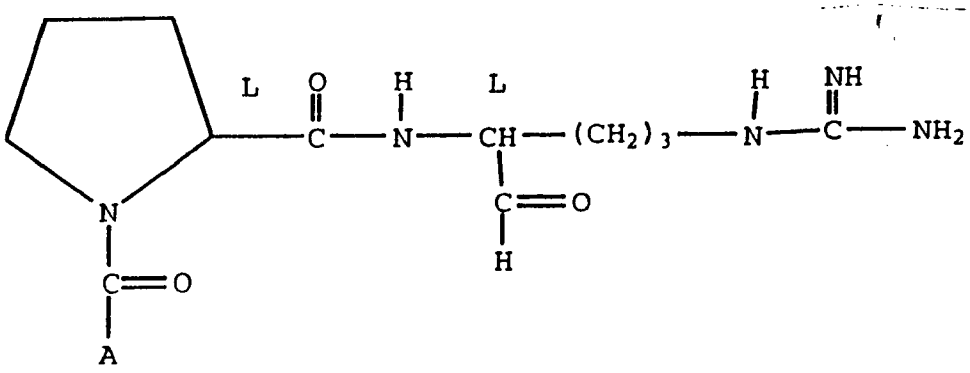
sekoitettiin 30 minuuttia -70 °C:eessa. Liuos, joka sisälsi 5 ml THF:a ja 5 ml 0,5 N H_2SO_2:a, lisättiin tipoittain reaktioseokseen. Reaktioseos laimennettiin EtOAc:lla (175 ml) ja vedellä (100 ml). Orgaaninen kerros erotettiin, kuivattiin $MgSO_4$) ja suodatettiin. Orgaaninen liuotin poistettiin tyhjiössä, jolloin saatiin otsikkoyhdistettä amorfisena kiinteänä aineena (8,2 g, 91 %): FAB-MS 689 (MH^+).

1,2,3,4,4aR,6,7,8,8aR-perhydroisokinoliini-R-1-karbonyyli-Pro-Arg-H x H_2SO_4 (12)

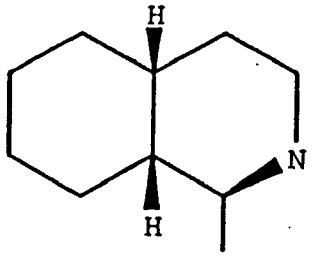
Yhdiste 12 (8,2 g, 11,9 mmol) liuotettiin etanoliin (50 ml), veteen (10 ml) ja 1 N H_2SO_4:oon (30 ml, 29,7 mmol), ja sitä hydrattiin 5 % Pd/C-katalyytin (4,0 g) läsnäollessa ympäristön lämpötilassa ja paineessa. Kun reaktio oli lopussa, katalyytti poistettiin suodattamalla. Suodos väkevöitiin 40 ml:aan, ja vettä (50 ml) lisättiin. Liuoksen pH säädettiin 4,2:een BioRad AG1-X8-hartsilla (hydroksidimuoto). Hartsi poistettiin suodattamalla ja liuos lyofilisoitiin, jolloin saatiin epäpuhdasta otsikkoyhdistettä (5,46 g). Kiinteä aine (5,46 g) liuotettiin 0,01 %:iseen H_2SO_4:oon ja laitettiin Vydac C_{18}-hartsilla täytettyyn kolonniin (5 x 25 cm). Gradienttia, jossa CH_3CN:n pitoisuudet nousivat (1 % - 5 %), käytettiin peptidin eluoimiseksi kolonnista. Jakeet otettiin talteen ja yhdistettiin analyyttisen RP-HPLC-profiilin perusteella. Yhdistettyjen jakeiden pH säädettiin 4,2:een käyttäen AG1-X8-hartsia (BioGrad analyyttinen anioininvaihtohartsi 50 - 100 mesh), joka oli hydroksidimuodossa. Liuos suodatettiin ja suodos lyofilisoitiin, jolloin saatiin puhdasta otsikkoyhdistettä (2,4 g, 39 %): FAB-MS 421 (MH^+); $[\alpha]_D$ = -102,8° (C, 0,5 /0,01 N H_2SO_4); alkuaineanalyysi (laskettu) $C_{21}H_{36}N_6O_3$ x H_2SO_4 x $2H_2O$: C, 45,47; H, 7,63; N, 15,16. Saatu: C, 45,05, H, 7,44, N, 15,02.

Patenttivaatimukset:

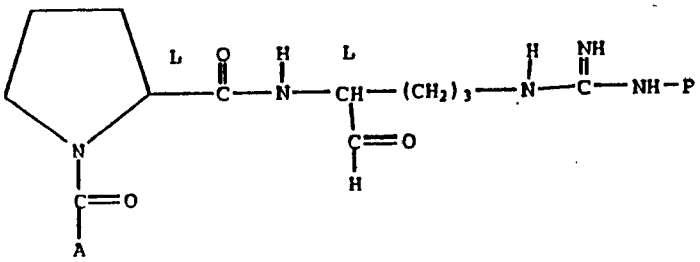
1. Menetelmä seuraavan kaavan mukaisen yhdisteen



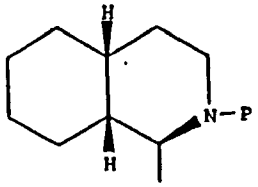
jossa A on



ja sen farmaseuttisesti hyväksyttävien suolojen valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että poistetaan aminosuojaryhmä seuraavan kaavan mukaisesta yhdisteestä



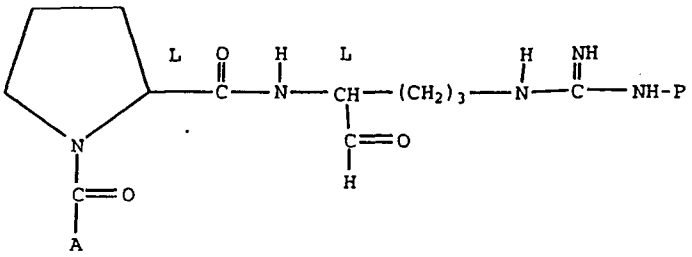
jossa A on



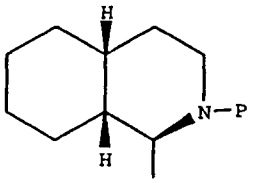
ja P on aminosuojaryhmä.

2. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että sulfaattisuola saadaan kromatografioimalla yhdiste käänteisfaasissa korkeapainenestekromatografilla eluoimalla gradientilla, joka koostuu orgaanisesta faasista, jossa on noin 2 - 10 tilavuus-% asetonitriiliä eluenttina vesipitoisessa faasissa, joka koostuu rikkihaposta pH:ssa välillä noin 2 - 3; säädetään eluaatin pH välille noin 4 - 6 veteen liukenemattomalla emäksisellä hartsilla; erotetaan hartsi eluaatista; ja poistetaan vesi eluaatista.

3. Yhdiste, jolla on kaava



jossa A on



ja P on aminosuojaryhmä.