(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.[6]
C07K 7/00

(45) 공고일자 1999년04월01일
(11) 등록번호 특0181512
(24) 등록일자 1998년12월08일

(21) 출원번호 특1991-007287
(22) 출원일자 1991년05월06일
(65) 공개번호 특1991-020031
(43) 공개일자 1991년12월19일

(30) 우선권주장 P4014655.3 1990년05월08일 독일(DE)
(73) 특허권자 베링베르케 아크티엔게젤샤프트 스타인 부크
독일연방공화국 데-3550 마르부르크
(72) 발명자 베르너 스튀버
독일연방공화국 데-3551 란탈 쾰버 베크 12 91-19-130
칼 피켄셔
독일연방공화국 데-3550 마르부르크 손넨베크 8
(74) 대리인 이병호, 최달용

심사관 : 손민

(54) 펩티드 아미드, 이의 제조방법 및 피브린/트롬빈 응고 억제제로서 사용하기 위한 이를 함유하는 약제학적 조성물

요약

본 발명은 일반식(I)의 펩티드 아미드, 이의 제조방법 및 약제로서 또는 진단 목적을 위한 이의 용도에 관한 것이다.

$GPRP-X-NR_1-R_2$ (I)

상기 식에서, G는 아미노산 글리신이고, P는 아미노산 L-프롤린이며, R은 아미노산 L-아르기닌이고, X는 프롤린과는 다른 단백질성 아미노산이거나 프롤린을 함유하는 단백질성 아미노산으로부터의 디펩티드이며, N은 질소이고, R_1 및 R_2는 동일하거나 상이하고 수소 또는 탄소수 4이하의 저급 알킬쇄이다.

명세서

[발명의 명칭]

팹티드 아미드, 이의 제조방법 및 피브린/트롬빈 응고 억제제로서 사용하기 위한 이를 함유하는 약제학적 조성물

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 올리고펩티드 아미드 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 기술되는 당해 화합물은 혈중 응괴형성, 즉 혈액응고를 방지할 수 있다. 이러한 이유로, 당해 펩티드는 치료 및 진단에 중요하다.

선행 기술에 따르면, 혈액 응고 억제능력이 있는 화합물이 공지되어 있다. 특히, 펩티드 유도체 및 단백질이 이러한 물질이다. 치료에 사용되는 안티트롬빈 III, 및 진단에 사용되는 펩티드 클로로메틸 케톤이 특히 이 그룹에 속한다. 이러한 물질들의 효능은 트롬빈의 억제를 기초로 하는데 즉, 피브리노겐이 피브린으로 더이상 분해되지 않고, F XIII이 활성화되지 않는다. 그러나, 다양한 진단 목적상 응괴를 형성하지 않으면서, 트롬빈 형성과 함께 다단적 혈액 응고를 완전히 활성화시키거나, 시험 혼합물에 트롬빈을 직접 가하는 것이 중요하다. 이것은 트롬빈에 의해 이미 형성된 피브린이 응괴를 형성하는 것을 억제할 수 있는 응고 억제제를 사용해야 한다는 것을 의미한다.

치료학적 목적상 가용성 피브린의 존재하에 피브린 응괴형성을 방지하는 것이 중요하다. 이것은, 예를 들면, 산재성 혈관내 응고의 경우 세동맥 폐쇄방지의 경우나 응고의 국소적 활성을 유지시키면서 라이신 치료시에 피브린 응괴의 재형성을 방지하는 경우이다.

독일연방공화국 특허 제3,811,647호에 기재되어 있는 바와 같이, 혈액응고 인자 XIII에 대한 시험 시스템은 응고 억제제를 가하여 이룰 수 있다. 가해진 응고 억제제는 트롬빈을 억제하지는 않지만, 가용성 피브린 쇄의 결합을 방지한다. 사용된 펩티드는 펩티드 서열이 Gly-Pro-Arg-Pro이다. 그러나, 당해 펩티드는 비교적 다량 가해져야만 응고가 완전히 억제된다는 단점이 있다. 당해 테트라펩티드를 치료용으로 사용하는 경우에도 또한 동일하다.

제11차 펩티드에 대한 아메리칸 심포지움[XIth American Symposium On Peptides(1989. 7)]에서는, 상이한 활성의 펩티드 유도체가 다수 제시되었다(약자를 하기에 설명함) :

구조	상대적 활성(소정량의 억제제로 억제되는 혈장량)
GPRP	1

GPRP 4-하이드록시피페리다이드 1.2

GPRP 3-메틸피페리다이드 1.29

GPRP-NH_2 3.52

GPRPP-NH_2 4.56

위에 나타낸 펩티드 작용의 증가는 C말단 구성블럭으로서 사이클릭 아민 유도체의 도입에 기초한 것이다.

본 발명의 목적은 선행 기술의 펩티드에 비해 활성이 훨씬 큰 펩티드를 발견하는 것이다.

따라서, 본 발명은 일반식(I)의 펩티드 아미드에 관한 것이다:

GPRP - X - NR_1 - R_2 (I)

상기식에서, G는 아미노산 글리신이고, P는 아미노산 L-프롤린이며, R은 아미노산 L-아르기닌이고, X는 프롤린 이외의 단백질성 아미노산이거나 프롤린을 포함하는 단백질성 아미노산의 디펩티드이며, N은 질소이고, R_1 및 R_2는 동일하거나 상이하며, 수소이거나 탄소수 4 이하의 저급 알킬쇄이다.

예로서 다음의 펩티드가 언급된다 :

GPRPA-NH_2, GPRPS-NH_2, GPRPK-NH_2, GPRPF-NH_2, GPRPG-NH_2, GPRPW-NH_2, GPRPY-NH_2, GPRPV-NH_2, GPRPI-NH_2, GPRPD-NH_2, GPRPE-NH_2, GPRPG-NH(에틸), GPRPG-NH(에틸)$_2$, GPRPS-NH(이소프로필), GPRPW-N(메틸)$_2$, GPRPG-NH(부틸), GPRPPP-NH_2, GPRPGG-NH_2, GPRPPR-NH_2, GPRPRP-NH_2, GPRPPP-NH(이소프로필), GPRPAG-NH_2 및 GPRPGG-NH_2.

위에서는 정의되지 않은 아미노산의 입체형은 바람직하게는 L형이지만 D형으로도 존재할 수 있다.

본 발명에 따르는 펩티드 유도체는 공지된 방법, 즉 비알킬화 아미드(R_1 = R_2 = H)의 합성에 사용되는 고체상 방법으로 제조한다. 이러한 경우 바람직하게는, 문헌[참조 : Int. J. Peptide Protein Pes. 34, 215-221, 1989]에 기재된 방법을 이용한다.

당해 펩티드는 산에 불안정한 아미드 말단 작용기로 유도체화된, 1% 가교결합된 폴리스티렌/디비닐벤젠 공중합체 위에서 바람직하게 합성된다. 초기 아미노 그룹은 수지 1g당 약 0.3 내지 0.8mmol로 형성된다. 합성은 펩티드의 C말단으로부터 N말단으로 개개의 보호된 아미노산을 반복적으로 커플링하여 수행한다. 이들의 화학적 구조에 따라, 아미노산은 N-α-질소에 대해 및, 경우에 따라, 제3작용기에 대해 보호된다. 질소 작용기(N-α-)는 Fmoc 그룹, 3급 부틸 에테르로서의 알코올성 측쇄 그룹, 3급 부틸 에스테르로서의 측쇄내 카복실 그룹 및 Mtr 또는 Pmc 그룹에 의한 구아니딘 그룹에 의해 보호된다. 이러한 경우, 펩티드의 합성은

용매 DMF(또는 디클로로메탄 또는 N-메틸피롤리돈)로 수지를 세척(수지 1g당 15ml)하는 단계, DMF중의 20% 피페리딘을 사용하여 Fmoc 그룹을 제거하는 단계, DMF(또는 N-메틸피롤리돈)로 수지를 세척하는 단계; 카보디이미드와 같은 축합제를 사용하거나, 경우에 따라, HOBt을 가하거나 혼합 또는 대칭적 무수물 또는 이것 대신 활성 에스테르를 사용하여 아미노산에 커플링 시키는 단계 및 커플링이 완료된 후, 과량의 시약(DMF)을 세척하는 단계를 포함하여, 반자동 또는 완전 자동 펩티드 합성기로 수행한다.

Boc-아미노산을 일반적으로 최종 아미노산으로서 사용한다. 이어서, 당해 펩티드를 에탄디티올, 물, 레조르시놀, 아니솔 또는 티오아니솔과 같은 제거제 단독 또는 제거제 혼합물의 존재하에 실온 또는 40℃ 이하의 온도에서 1 내지 2시간 동안 트리플루오로아세트산 혼합물을, 바람직하게는 90% 사용하여 제거한다. 당해 펩티드를 에테르에 침전시켜 결정화하고 겔투과로 정제한다. 당해 펩티드의 순도는 HPLC 및 아미노산 분석으로 측정한다.

펜타펩티드 및 헥사펩티드 알킬아미드를, 용액중에서 수행하는 종래의 방법으로 합성한다. 우선, 보호된(Boc-또는 Z-) 아미노산을 고체상 방법과 동일한 방법을 사용하여, 적합한 알킬아민에 커플링시킨다. 이들의 물리적 특성에 따라, 중간체 생성물을 재결정, 추출 및 재침전시킴으로써 정제한다. Boc의 경우에는 빙초산중의 1.2N HCl을 사용하거나 디클로로메탄 중의 50% TFA를 사용하여 산분해하고, Z의 경우에는 가수소분해하여, N말단 보호 그룹을 제거한 후, 다음의 아미노산을 이미 기재한 바와 같이 커플링시킨다. 아르기닌의 경우, 일반적으로 단지 양성자화된 구아니디노 그룹에 대해서는 보호 그룹이 사용되지 않는다. 최종적인 탈보호후, 당해 펩티드를 통상적인 방법으로 정제한다. 이러한 목적을 위해서는, 겔투과 및, 예외적으로 RP-18 물질상에서의 HPLC정제법이 적합하다. HPLC, 아미노산 분석 및 ^{13}C-NMR분광학을 이용하여 당해 화합물의 균일성 및 구조에 대해 분석한다. 본 발명에 따르는 펩티드의 억제력에 대해서도 시험한다. 이러한 목적을 위해, 억제제를 혈장 샘플에 가하고, 트롬빈을 가한 후, 샘플이 응고될 때까지의 시간을 측정한다. 나타난 결과는 실시예에 자세히 기재되어 있다.

여기서 알 수 있듯이, 본 발명에 따르는 펩티드는 공지된 화합물에 비해 억제력이 크게 증가된다. 펩타펩티드 아미드의 경우에, 놀랍게도 글리신 및 알라닌과 같이 특히 작은 아미노산이 C말단 아미노산으로서 유리하다는 것이 본 발명으로 밝혀졌다. 그러나, 선행 기술에 따르면 프롤린 또는 피페리딘 유도체와 같은 사이클릭 구조가 바람직하다.

약어

Ala = A 알라닌

Asp = D 아스파트산

Asn = N 아스파라긴

Gly = G 글리신

Val = V 발린

Leu = L 로이신

Ile = I 이소로이신

Ser = S 세린

Thr = T 트레오닌

Met = M 메티오닌

Pro = P 프롤린

Lys = K 라이신

Arg = R 아르기닌

Glu = E 글루탐산

Gln = Q 글루타민

Phe= F 페닐알라닌

Tyr = Y 티로신

Trp = W 트립토판

HOBt 하이드록시벤조트리아졸

DIC 디이소프로필카보디이미드

TFA 트리플루오로아세트산

Z 벤질옥시카보닐

Boc 부틸옥시카보닐

Fmoc 플루오레닐메틸옥시카보닐

Pmc 펜타메틸크로만설포닐

DMF 디메틸포름아미드

하기 실시예는 본 발명을 좀더 상세히 설명한다.

[실시예]

Gly-Pro-Arg-Pro-Ala-NH_2의 제조

Fmoc-아미드 말단 수지(아미노 그룹 0.47mmol/g) 1g을 DMF 15ml로 3회 세척하고, Fmoc 그룹을 DMF중의 20% 피페리딘으로 제거한다(1 x 3분; 1 x 10분). 수지를 DMF 및 이소프로판올로 각각 2회 세척한다. 이어서, Fmoc-Ala 2mmol을, DMF 15ml중의 HOBt 3mmol과 DIC 2.2mmol 및 수지와 함께 1시간 동안 배양한다. 이어서, 과량의 시약을 여과제거하고 수지를 DMF 및 이소프로판올로 각각 2회 세척한다. 닌하이드린 시험을 이용하여, 전환의 완결도를 체크하고, 완결되지 않았을 경우, 커플링을 반복한다. 당해 방법을 또한 다른 아미노산에 대한 커플링에도 이용한다. Arg의 경우에는, Pmc 보호 그룹을 사용한다. Boc-아미노산을 최종 아미노산으로서 사용한다. 펩티드-수지를 메탄올과 디에틸 에테르로 세척하고 진공하에 건조시킨다. 수지를 90% TFA와 10% 에탄디티올의 혼합물 20ml로 35℃에서 1시간 동안 처리한다. 용해된 펩티드를 에테르속에서 결정화하고 0.5% 아세트산중의 Sephadex-G 25상에서 크로마토그래피한다. 펩티드 풀(pool)을 냉동건조시키고, HPLC에 의해 분석한 순도는 95%였다. 당해 아미노산을 분석한 결과, 펩티드 함량이 68% 인 것으로 나타났다.

(시험)

다양한 농도의 응고 억제제(펩티드) 100μl를 혈장 25μl에 가한다. 피브리노겐으로부터의 피브린으로의 전환을 트롬빈(50IU/ml) 25μl를 가하여 개시한다. 혼합물의 응고는 응고 분석기(컴퓨터에 연결된 ACL 300)로 혼탁도를 측정함으로써 탐지한다.

제2혼합물에서, 각각의 경우 펩티드 용액 50μl와 트롬빈 용액 50μl를 혈장 100μl에 가하고 위와 같이 측정한다. 응고 개시는, 혈장 샘플의 경우 프로트롬빈 시간 측정용 장치의 제조사[이탈리아공화국 밀란 소재의 인스트루멘테이션 래보러토리(Instrumentation Laboratory)]가 규정한 양과 동량으로 산란된 광이 증가되는 시각으로서 간주된다.

위에 기재된 모든 펩티드는 펩티드 아미드(R_1 = R_2 = H)이다. 나열한 값은 초로 나타낸 응고시간이다.

시험 혼합물 I : 응고 억제제 100μl

혈장 25μl

트롬빈 25μl

응고억제제 농도 (mg/ml)	응고 시간 (초) 2	1	0.5	0.25	0.125	0.06
펩티드 아미드						
GPRPPP	592.2	498.1	201.7	76.3	28.8	21.2
GPRPG	999.9	718.5	229.3	73.5	27.9	20.3
GPRPPR	493.4	310.9	109.6	66.8	30.7	21.2
GPRPRP	574.1	617.8	205.5	79.2	32.6	21.2
GPRPA	635.9	535.0	300.5	148.5	51.6	24.1
GPRPD	430.7	166.6	45.9	22.2	20.3	21.2
GPRPW	879.1	726.1	190.3	70.6	26.9	20.3
GPRPK	258.1	139.9	173.2	102.0	51.6	25.0
GPRPS	115.3	114.3	83.3	41.2	23.1	20.3
GPRP	494.3	181.8	48.8	23.1	20.3	20.3
GPRPP	699.5	425.9	228.3	73.5	28.8	
GPRPV	174.2	225.5	148.5	83.0	32.6	
GPRPI	785.0	968.4	181.8	57.3	25.9	
GPRPF	482.9	196.0	88.7	33.6	21.2	
GPRPAG	201.7	191.3	142.8	84.9	33.6	
GLRPG	25.0	25.0	25.0	24.1	24.1	

시험 혼합물 II : 응고 억제제 50μl

혈장 100μl

트롬빈 50μl

응고 억제제 농도 (mg/ml)	응고 시간 (초) 2	1	0.5	0.25	0.125	0.06
펩티드 아미드						
GPRPPP	316.7	61.1	-	19.3	19.3	20.3
GPRPG	126.7	43.1	20.3	18.4	19.3	19.3
GPRPPR	89.6	32.6	19.3	18.4	19.3	19.3
GPRPRP	106.7	36.4	19.3	18.4	19.3	19.3
GPRPA	448.7	83.9	25.9	19.3	19.3	19.3
GPRPD	350.9	48.8	47.8	19.3	20.3	20.3
GPRPW	85.8	25.0	19.3	19.3	19.3	20.3
GPRPK	113.4	35.5	19.3	18.4	19.3	19.3
GPRPS	77.3	25.0	18.4	18.4	19.3	20.3
GPRP	31.7	19.3	19.3	19.3	20.3	20.3
GPRPP	239.7	60.2	21.2	18.4	19.3	19.3
GPRPV	168.4	43.1	20.3	18.4	19.3	
GPRPI	93.4	27.9	19.3	18.4	20.3	
GPRPF	47.8	20.3	18.4	19.3	19.3	
GPRPAG	195.1	49.7	20.3	18.4	19.3	
GLRPG	21.2	21.2	21.2	20.3	21.2	

시험 혼합물 III : 응고 억제제 20μl

혈장 130μl

트롬빈 20μl

응고 억제제 농도 (mg/ml)	응고시간 (초) 10	5	2.5	1.25	0.625
펩티드 아미드					
GPRPPP	43.1	85.8	35.5	20.3	18.4
GPRPG	656.8	104.8	40.2	19.3	18.4
GPRPPR	209.3	70.6	28.8	19.3	18.4
GPRPRP	323.3	77.3	28.8	18.4	18.4
GPRPA	999.9	272.9	76.3	25.0	18.4
GPRPD	101.0	24.1	18.4	18.4	17.4
GPRPW	155.2	38.3	19.3	18.4	18.4
GPRPK	575.1	114.3	41.2	20.3	18.4
GPRP	926.6	86.7	22.2	18.4	18.4
GPRPP	327.7	97.2	37.3	20.3	18.4
GPRPV	69.7	109.6	43.1	20.3	18.4
GPRPI	448.7	107.7	32.6	19.3	18.4
GPRPF	261.6	59.2	20.3	18.4	18.4
GPRPAG	22.2	71.6	45.0	20.3	18.4
GLRPG	18.4	18.4	18.4	18.4	18.4

(57) 청구의 범위

청구항 1

일반식(I)의 팹티드 아미드.

$GPRP - X - NR_1 - R_2$ (I)

상기식에서, G는 아미노산 글리신이고, P는 아미노산 L-프롤린이며, R은 아미노산 L-아르기닌이고, X는 프롤린 이외의 다른 단백질성 아미노산이거나 프롤린을 포함하는 단백질성 아미노산의 디펩티드이며, N은 질소이고, R_1 및 R_2는 동일하거나 상이하며, 수소이거나 탄소수 4 이하의 저급 알킬쇄이다.

청구항 2

제1항에 있어서, X가 Gly 및 Ala로부터 선택된 아미노산이고 R_1 및 R_2가 수소인 펩티드 아미드.

청구항 3

제1항에 있어서, 아미노산이 L형으로 존재하는 펩티드 아미드.

청구항 4

제2항에 있어서, 아미노산이 L형으로 존재하는 펩티드 아미드.

청구항 5

$GPRPA-NH_2$, $GPRPS-NH_2$, $GPRPK-NH_2$, $GPRPF-NH_2$, $GPRPG-NH_2$, $GPRPW-NH_2$, $GPRPY-NH_2$, $GPRPV-NH_2$, $GPRPI-NH_2$, $GPRPD-NH_2$, $GPRPE-NH_2$, GPRPG-NH(에틸), $GPRPG-N(에틸)_2$, GPRPS-NH(이소프로필), $GPRPW-N(메틸)_2$, GPRPG-NH(부틸), $GPRPPP-NH_2$, $GPRPGG-NH_2$, $GPRPPR-NH_2$, $GPRPRP-NH_2$, GPRPPP-NH(이소프로필), $GPRPAG-NH_2$ 또는 $GPRPGG-NH_2$인 펩티드 아미드.

청구항 6

보호된 아미노산, 아미노산 유도체 또는 펩티드 단편을 용액상태나 고체상으로 서로 커플링시키고, 보호그룹을 제거한 다음, 고체상의 경우는 지지체 수지로부터 제거하여 일반식(I)의 펩티드를 수득함을 특징으로 하는, 제1항에 따르는 펩티드 아미드의 제조방법.

청구항 7

제1항에 따르는 펩티드 아미드를 활성 성분으로서 포함하는, 피브린/트롬빈 응고 억제제로서 사용하기 위한 약제학적 조성물.