(19) SUOMI - FINLAND
(FI)

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

(10) **FI 892222 A7**

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

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 892222

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
C07K 7/06
C07K 7/08
C07K 7/10

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **09.05.1989**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **09.05.1989**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **11.11.1989**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **12.06.2019**

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

10.05.1988 US 192409

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • **Merrell Dow Pharmaceuticals Inc.,** 2110 East Galbraith Road, Cincinnati, OH 45215-6300, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • **Krstenansky, John Leonard,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention
Antikoagulantteina toimivia peptidialkoholeja
Peptidalkoholer med antikoagulantverkan

Antikoagulantteina toimivia peptidialkoholeja

Tämä keksintö koskee uusia peptidialkoholeja, jotka ovat käyttökelpoisia antikoagulantteja.

Antikoagulantit ovat käyttökelpoisia lääkeaineita esim. akuuttien syvälaskimotromboosien, keuhkoembolioiden, raajavaltimoiden emboliamuodostuksen, sydänlihasinfarktien ja hajasirotteisten suonensisäisten verihyytymien farmakologisessa hoidossa. Uskotaan, että antikoagulanttien ennalta ehkäisevä anto estää embolioiden uusiutumisen potilaissa, jotka potevat reumaattista tai arteriosklerootttista sydänsairautta, ja estää määrättyjä tromboembolisia komplikaatioita leikkaushoidossa. Antikoagulanttien anto on myös indikoitunut sepelvaltimo- ja aivoverisuonisairauksissa. Valtimotromboosit, erityisesti sydänlihakseen ja aivoihin verta syöttävissä valtimoissa, ovat johtava kuolinsyy.

Hirudiini on 65-tähteinen polypeptidi, joka voidaan eristää verijuotikkaan sylkirauhasista. Se on antikoagulantti, joka toimii trombiinispesifisenä inhibiittinä. Joskin hirudiinin vaikutus on varsin voimakas, verijuotikasuutteista eristetyn hirudiinin kliininen käyttö vaikuttaa epätodennäköiseltä rajoitetun saatavuuden, kalleuden ja allergisten reaktioiden vuoksi, jotka ovat yleisiä tämän kokoisen vieraan proteiinin annon jälkeen.

Patentinhakijat ovat hirudiinista todenneet erityisen alueen, joka ainakin osaksi aiheuttaa antikoagulanttiaktiivisuuden. Tämä alue on syntetisoitu kemiallisesti ja näyttää siltä, että sen määrätyt analogit sitoutuvat trombiinin tunnistuskohtaan, mutta ei entsymaattiseen pilkkoutumiskohtaan, joka kolmiulotteisessa rakenteessa poikkeaa edellisestä kohdasta. Synteettisten peptidien kilpaileva sitoutuminen estää fibrinogeenin sitoutumisen trombiinin tunnistuskohtaan, mikä sitoutuminen on edellytyksenä fibriinin tuottamiselle ja hyytymän muodostumiselle. Paten-

tinhakijat ovat nyt valmistaneet tämän peptidin määrättyjä pelkistettyjä johdannaisia. Näiden uusien johdannaisten karboksyylihappofunktio on pelkistetty vastaavaksi alkoholifunktionaalisuudeksi. Tämän keksinnön peptidialkoholeilla on merkitsevä antikoagulanttiaktiivisuus ja niiden harvinainen kyky sitoutua vain trombiinin tunnistuskohtaan sitoutumatta sen pilkkoutumiskohtaan saattaa tehdä niistä tieteellisesti mielenkiintoisen ja terapeuttisesti merkitsevän lisän antikoagulanttiterapiaan. Alkoholifunktion mukanaolo voi lisäksi vaikuttaa voimistavasti ja pidentää vaikutuksen kestoa.

Peltidijohdannaiset, joilla on kaava

$$X\text{-}A_1\text{-}A_2\text{-}A_3\text{-}A_4\text{-}A_5\text{-}A_6\text{-}A_7\text{-}A_8\text{-}A_9\text{-}A_{10}\text{-oli}$$

jossa X on aminopäätetähde valittuna ryhmästä vety, yksi tai kaksi, 1 - 6 hiiliatomia sisältävää alkyyliryhmää, yksi tai kaksi, 2 - 10 hiiliatomia sisältävää asyyliryhmää, karbobentsyylioksi ja tert-butyylioksikarbonyyli; A_1 on sidos tai peptidi, jossa on 1 - 11 minkä tahansa aminohapon tähdettä; A_2 on Phe, SubPhe, β-(2- ja 3-tienyyli)-alaniini, β-(2- ja 3-furanyyli)alaniini, β-(2-, 3- ja 4-pyridyyli)alaniini, β-(bentsotienyl-2- ja 3-yyli)alaniini, β-(1- ja 2-naftyyli)alaniini, Tyr tai Trp; A_3 on Glu tai Asp; A_4 on mikä tahansa aminohappo; A_5 on Ile, Val, Leu, Nle tai Phe; A_6 on Pro, Hyp, 3,4-dehydroPro, tiatsolidiini-4-karboksylaatti, Sar, NMePgl tai D-Ala; A_7 on mikä tahansa aminohappo; A_8 on mikä tahansa aminohappo, A_9 on lipofiilinen aminohappo valittuna ryhmästä Tyr, Met, Trp, Phe, Leu, Nle, Ile, Val, Cha ja Pro tai se on dipeptidi, joka sisältää vähintään yhden näistä lipofiilisistä aminohapoista, ja A_{10}-oli on pelkistetty peptidifragmentti, jossa on 0 - 5 minkä tahansa aminohapon tähdettä siten, että hiilipäätteinen aminohappo on pelkistetty alkoholijohdannaisekseen, ovat käyttökelpoisia antikoagulantteja.

Tässä selityksessä käytetään kauttaaltaan seuraavia tavanomaisia aminohappolyhenteitä:

Ac = asetyyli
Ala (tai A) = alaniini
DAla (tai a) = D-alaniini
Arg (tai R) = arginiini
Asn (tai N) = asparagiini
Asp (tai D) = asparagiinihappo
pClPhe = para-kloorifenyylialaniini
Cha = sykloheksyylialaniini
Cys (tai C) = kysteiini
3,4-dehydroPro = 3,4-dehydroproliini
Gly (tai G) = glysiini
Glu (tai E) = glutamiinihappo
D-Glu (tai e) = D-glutamiinihappo
Gln (tai Q) = glutamiini
Glt = glutaryyli
His (tai H) = histidiini
Hyp = hydroksiproliini
Ile (tai I) = isoleusiini
Leu (tai L) = leusiini
Lys (tai K) = lysiini
Mal = maleyyli
Met (tai M) = metioniini
NmePgl = N-metyylifenyyliglysiini
Npa = β-(naftyyli)alaniini
pNO_2Phe = para-nitrofenyylialaniini
Nle = norleusiini
Orn = ornitiini
pSubPhe = parasubstituoitu fenyylialaniini
Phe (tai F) = fenyylialaniini
Pgl = fenyyliglysiini
Pro (tai P) = proliini
Sar = sarkosiini (N-metyyliglysiini)
Ser (tai S) = seriini

SubPhe = orto-, meta- tai para-, mono tai disubstituoitu fenyylialaniini

Suc = suksinyyli

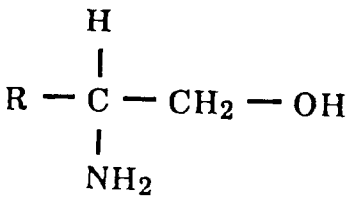
Thr (tai T) = treoniini

Trp (tai W) = tryptofaani

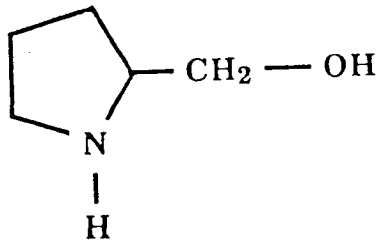
Tyr (tai Y) = tyrosiini

Val (tai V) = valiini

Sanonnalla "pelkistetty peptidifragmentti, jossa on 0 - 5 minkä tahansa aminohapon tähdettä siten, että hiilipäätteinen aminohappo on pelkistetty alkoholijohdannaisekseen" patentinhakijat tarkoittavat sitä, että hiilipäätteisen aminohapon karboksyylihapporyhmän hiiliatomi korvatan hydroksimetyyliryhmällä $-(CH_2)OH$. Joskin tämän keksinnön polypeptidien ryhmä A_{10} voi sisältää viiteen saakka aminohappoja, tarkoitus on että vain yksi hiilipäätteinen aminohappo pelkistetään vastaavaksi alkoholijohdannaisekseen. Itse asiassa tällä tavoin voidaan pelkistää vain hiilipäätteinen aminohappo, sillä muutenhan peptidisidos olisi mahdoton. Tapauksissa, joissa A_{10} muodostuu yhdestä ainoasta aminohaposta, tämä yksi ainoa happo on tietenkin happo, joka pelkistyy alkoholijohdannaiseksi. Tällaisten pelkistettyjen aminohappojen rakennekaava voidaan esittää seuraavasti:



jossa R on jokaisen aminohapon tunnusomainen ryhmä. R on esim. glysiinissä vety, alaniinissa metyyli, valiinissa isopropyyli, fenyylialaniinissa bentsyyli ja kysteiinissä merkaptometyyli. Proliinin pelkistynyt muoto on alkoholi, jolla on seuraava rakennekaava:



Tässä tapauksessa alkoholijohdannaisekseen pelkistetty aminohappo lyhennetään käyttäen joko kolmikirjainkoodia (tai muuta lyhennettä) tai yksikirjainkoodia, jota seuraa "-oli", esim. "Ala-oli" tai "A-oli" tarkoittaa alaniinia, jossa karboksyylihappo-osa on pelkistetty vastaavaksi alkoholiksi, ja "Leu-oli" tai "L-oli" tarkoittaa leusiinia, jossa karboksyylihappo-osa on pelkistetty vastaavaksi alkoholiksi.

Alkyyliryhmänä ja alkoksiryhmän alkyyliosana voivat olla suorat, haarautuneet tai sykliset alkyyliryhmät kuten metyyli, etyyli, propyyli, isopropyyli, butyyli, isobutyyli, tert-butyyli, pentyyli, isopentyyli, sek-pentyyli, syklopentyyli, heksyyli, isoheksyyli, sykloheksyyli ja syklopentyylimetyyli. 2 - 10 hiiliatomia sisältävänä asyyliryhmänä voivat olla suorat, haarautuneet, sykliset tyydyttyneet tai tyydyttymättömät asyyliryhmät, joissa on 1 tai 2 karbonyyliosaa ryhmää kohti, esim. asetyyli, bentsoyylisuksinyyli, maleyyli ja glutaryyli. Halogeeniryhmänä on fluori-, kloori-, bromi- tai jodiryhmä.

Tässä käytetyllä sanonnalla "mikä tahansa aminohappo" ei käsitä vain minkä tahansa aminohapon, jossa on aminosubstituentti, vaan sanontaa käytetään pikemminkin ammattimiehen yleisesti käyttämällä tavalla polypeptidijohdannaisten yhteydessä, joten sanonta käsittää luonnonaminohapot samoin kuin muut "ei-proteiini"-α-aminohapot, joita käytetään yleisesti peptidikemiassa luonnonpeptidien synteettisten analogien valmistamiseksi. Luonnossa esiintyviä aminohappoja ovat glysiini, alaniini, valiini, leu-

siini, isoleusiini, seriini, metioniini, treoniini, fenyylialaniini, tyrosiini, tryptofaani, kysteiini, proliini, histidiini, asparagiinihappo, asparagiini, glutamiinihappo, glutamiini, arginiini, ornitiini ja lysiini. "Ei-proteiini"-α-aminohappojen esimerkkejä ovat norleusiini, norvaliini, alloisoleusiini, homoarginiini, tiaproliini, dehydroproliini, hydroksiproliini (Hyp), homoseriini, sykloheksyyliglysiini (Chg), α-amino-n-voihappo (Aba), sykloheksyylialaniini (Cha), aminofenyylivoihappo (Pba), fenyylialaniinit, jotka on substituoitu fenyyliosan orto-, meta- tai para-asemassa yhdellä tai kahdella seuraavista: C_{1-4}-alkyyli, C_{1-4}-alkoksi, halogeeni tai nitroryhmät tai substituoitu metyleenidioksiryhmällä, β-2- ja 3-tienyylialaniini, β-2- ja 3-furanyylialaniini, β-2-, 3- ja 4-pyridyylialaniini, β-(bentsotienyl-2- ja 3-yyli)alaniini, β-(1- ja 2-naftyyli)alaniini, seriinin, treoniinin tai tyrosiinin O-alkyloidut johdannaiset, S-alkyloitu kysteiini, tyrosiinin O-sulfaattiesteri, 3,5-dijodityrosiini ja luonnossa esiintyvien aminohappojen D-isomeerit.

Sanonta "lipofiilinen aminohappo" käsittää aminohapot Tyr, Phe, Leu, Met, Nle, Ile, Val, His ja Pro.

Luonnonaminohapoissa glysiiniä lukuunottamatta on kiraalinen hiiliatomi. Jollei toisin erikseen ilmoiteta, tässä mainituilla optisesti aktiivisilla aminohapoilla on L-konfiguraatio. Tässä mainittujen peptidien rakenne on tavalliseen tapaan sellainen, että aminopäätteinen pää on ketjun vasemmalla puolella ja karboksipäätteinen pää on ketjun oikealla puolella.

Kaavan 1 mukaiset polypeptidit voivat muodostaa farmaseuttisesti hyväksyttäviä suoloja minkä tahansa myrkyttömän orgaanisen tai epäorgaanisen hapon kanssa. Tyypillisiä epäorgaanisia happoja, jotka muodostavat sopivia suoloja, ovat kloorivety-, bromivety-, rikki- ja fosforihappo ja happamat metallisuolat kuten natriummonovetyortofosfaatti ja kaliumvetysulfaatti. Tyypillisiä orgaanisia

happoja, jotka muodostavat sopivia suoloja, ovat mono-, di- ja trikarboksyylihapot. Tyypillisiä tällaisia happoja ovat esim. etikka-, glykoli-, maito-, palorypäle-, maloni-, meripihka-, glutaari-, fumaari-, omena-, viini-, sitruuna-, askorbiini-, maleiini-, hydroksimaleiini-, bentsoe-, hydroksibentsoe-, fenyylietikka-, kaneeli-, salisyyli-, 2-fenoksibentsoe- ja sulfonihappo kuten metaanisulfonihappo ja 2-hydroksietaanisulfonihappo. Karboksipäätteisen aminohappo-osan suoloja ovat myrkyttömät karboksyylihapposuolat, jotka muodostuvat minkä tahansa sopivan epäorgaanisen tai orgaanisen emäksen kanssa. Nämä suolat ovat tyypillisesti alkalimetallisuoloja kuten natrium- ja kaliumsuolat; maa-alkalimetallien suolat kuten kalsium- ja magnesiumsuolat; ryhmän IIIA kevytmetallien mukaanlukien alumiinin suolat ja orgaanisten primaaristen, sekundaaristen ja tertiaaristen amiinien kuten trialkyyliamiinien, mukaan lukien trietyyliamiinin, prokaiinin, dibentsyyliamiinin, 1-eteeniamiinin, N,N'-dibentsyylietyleenidiamiinin, dihydroabietyyliamiinin, N-alempi-alkyylipiperidiinin ja minkä tahansa muun sopivan amiinin suolat.

Kuten kemiallisten yhdisteiden minkä tahansa geneerisen ryhmän kohdalla, määrätyt ryhmät ovat edullisia. Patentinhakijat pitävät edullisina peptidijohdannaisia, joilla on kaava 1, jossa X on vety, asetyyli tai suksinyyli. Edullisia ovat myös kaavan 1 mukaiset yhdisteet, joissa A_1 on

Thr-Pro-Lys-Pro-Gln-Ser-His-Asn-Asp-Gly-Asp,
-Ser-Thr-Pro-Asn-Pro-Glu-Ser-His-Asn-Asn-Gly-Asp,
-His-Asn-Asp-Gly-Asp-,
-Asn-Asp-Gly-Asp-,
-Asp-Gly-Asp-,
-Gly-Asp-,
-Asp- tai sidos;

A_2 on

Phe, β-2- tai 3-tienyylialaniini, Tyr, Trp, Npa tai pClPhe;

A_3 on
Glu;
A_4 on
Glu, Asp, Pro tai Ala;
A_5 on
Ile, Leu;
A_6 on
Pro, Sar, D-Ala, Hyp tai NMePgl;
A_7 on
Glu, Gln, Asp tai Ala;
A_8 on
Glu, Asp tai Ala;
A_9 on
Pro, Ala- Tyr, Ala-Cha, Tyr-Cha, Tyr-Leu, Ala-Phe, Tyr-Tyr;
A_{10}-oli on
Glu-oli, Asn-oli, Pro-oli, Gln-oli, Ala-oli, D-Lys-oli, Lys-oli, D-Asp-oli, Orn-oli tai Asp-Glu-oli.

Erityisen edullisia ovat kaavan 1 mukaiset peptidijohdannaiset, joissa
X on joko asetyyli ja A_1 on Gly-Asp tai Asp tai
X on suksinyyli ja A_1 on sidos, ja joissa
A_2 on Phe, β-(2-tienyylialaniini) tai Tyr;
A_3 on Glu;
A_4 on Glu tai Pro;
A_5 on Ile;
A_6 on Pro;
A_7 on Glu;
A_8 on Glu tai Asp;
A_9 on Tyr-Leu, Ala-Tyr, Tyr-Tyr, Ala-Phe, Ala-Cha tai Pro ja
A_{10}-oli on Ala-oli, Gln-oli, Asp-oli, Pro-oli, D-Asp-oli, D-Lys-oli, D-Glu-oli tai -Asp-Glu-oli.

Tämän keksinnön proteiinit voidaan valmistaa monin erilaisin menetelmin, jotka ovat ammattimiehelle tuttuja. Näitä menetelmiä ovat kiintofaasisekvenssi- ja lohkosyn-

teesi, geenikloonaus ja näiden tekniikkojen yhdistelmät. Kiintofaasisekvenssimenetelmä voidaan toteuttaa käyttäen automatisoituja vakiomenetelmiä, esim. automaattista peptidisyntetisaattoria. Tässä menetelmässä peptidit rakennettiin hartsille aloittaen viimeistä edellisestä hiilipäätteisestä, suojatusta aminohaposta. Hartsialustana voidaan käyttää mitä tahansa hartsia, jollaista käytetään yleisesti polypeptidien kiintofaasivalmistuksessa, edullisesti polystyreeniä, joka on silloitettu 0,5 - n. 3 prosentilla divinyylibentseeniä, joka on joko kloorimetyloitu tai hydroksimetyloitu kohtien synnyttämiseksi, joissa muodostuu esteri ensin lisätyn α-aminosuojatun aminohapon kanssa. Sekvenssin kytkemisen päätyttyä joko Boc-suojaryhmä jätetään paikalleen tai se poistetaan ja N-päätteinen aminoryhmä asyloidaan. Suojattu fragmentti syrjäytetään hartsista sopivalla aminoalkoholilla.

Hydroksimetyylihartsin esimerkki on kuvattu viitteessä Bodanszky et al., Chem. Ind. (London) 38, 1597-98 (1966). Kloorimetyloitua hartsia myy Bio Rad Laboratories, Richmond, California, ja tällaisen hartsin valmistusta ovat kuvanneet Stewart et al., "Solid Phase Peptide Synthesis" (Freeman & Co., San Francisco 1969), luku 1, s. 1 - 6. Suojattu aminohappo voidaan sitoa hartsiin menetelmän avulla, jonka on kuvannut Gisin, Helv. Chem. Acta, 56, 1476 (1973). Kaupan on useita hartsiin sidottuja, suojattuja aminohappoja. Tämän keksinnön polypeptidin valmistamiseksi, jossa karboksipäätteinen pää on Thr-tähde, voidaan esim. käyttää tert-butyylioksikarbonyylillä (Boc) suojattua Thr:ää, joka on sidottu bentsyloituun, hydroksimetyloituun fenyyliasetamidometyylihartsiin (PAM), joka tuote on kaupan.

Kun α-aminolla suojattu aminohappo on kytketty hartsialustaan, suojaryhmä poistetaan käyttäen mitä tahansa sopivaa menettelyä, esim. trifluorietikkahappoa metyleenikloridissa, pelkkää trifluorietikkahappoa tai HCl:ää dioksaanissa. Suojaus poistetaan lämpötilassa 0°C:sta huo-

neenlämpötilaan. Voidaan käyttää muitakin vakiopilkkomisreagensseja ja olosuhteita määrättyjen α-aminosuojaryhmien poistamiseksi. Kun α-aminosuojaryhmä on poistettu, muut aminolla suojatut aminohapot kytketään vaiheittain halutussa järjestyksessä. Moninkertaiset aminohapporyhmät voidaan vaihtoehtoisesti kytkeä liuosmenetelmällä ennen kytkemistä hartsialustalla olevaan aminohapposekvenssiin.

α-aminosuojaryhmänä, jota käytetään jokaisessa polypeptidisekvenssiin liitetyssä aminohapossa, voi olla mikä tahansa tällainen tekniikan tasolla tunnettu suojaryhmä. α-aminosuojaryhmien luokilla tarkoitetaan tässä (1) asyylityyppisiä suojaryhmiä kuten formyyuli, trifluoriasetyyli, ftalyyli, tolueenisulfonyyli (tosyyli), bentseenisulfonyyli, nitrofenyylisulfenyyli, trityylisulfenyyli, o-nitrofenoksiasetyyli ja α-klooributyryyli; 2) aromaattisia uretaanityyppisiä suojaryhmiä kuten bentsyylioksikarbonyyli, p-nitrobentsyylikarbonyli- p-bromibentsyylioksikarbonyyli, p-metoksibentsyylioksikarbonyyli, 1-(p-bifenylyyli)-1-metyylietoksikarbonylyhi, α,α-dimetyyli-3,5-dimetoksibentsyylioksikarbonyyli ja bentshydryylioksikarbonyyli; 3) alifaattisia uretaanisuojaryhmiä kuten tert-butyylioksikarbonyyli (Boc), di-isopropyylimetoksikarbonyyli, isopropyylioksikarbonyyli, etoksikarbonyyli ja allyylioksikarbonyyli; 4) sykloalkyyliuretaanityyppisiä suojaryhmiä kuten syklopentyylioksikarbonyyli, adamantyylioksikarbonyyli ja sykloheksyylikarbonyyli; 5) tiouretaanityyppisiä suojaryhmiä kuten fenyylitiokarbonyyli; 6) alkyylityyppisiä suojaryhmiä kuten trifenyylimetyyli (trityyli) ja bentsyyli; ja 7) trialkyylisilaaniryhmiä kuten trimetyylisilaani. Edullinen α-aminosuojaryhmä on tert-butyylioksikarbonyyli.

Asianmukaisen kytkemisreagenssin valinta on tekniikan tasolla tunnettu. Erityisen sopivia kytkemisreagensseja, kun liitettävä aminohappo on Gln, Asn tai Arg, ovat N,N'-di-isopropyylikarbodi-imidi ja 1-hydroksibentsotriatsoli. Näiden reagenssien käyttö estää nitriili- ja lak-

taamimuodostuksen. Muita kytkemisaineita ovat 1) karbodiimidit (esim. N,N'-disykloheksyylikarbodi-imidi ja N-etyyli-N'-(γ-dimetyyliaminopropyylikarbodi-imidi); 2) syanamidit (esim. N,N-dibentsyylisyanamidi); 3) keteeni-imiinit; 4) isoksatsoliumsuolat (esim. N-etyyli-5-fenyyli-isoksatsolium-3'-sulfonaatti; 5) monosykliset, aromaattisluonteiset typpipitoiset heterosykliset amidit, joiden renkaassa on 1 - 4 typpeä, esim. imidatsolidit, pyratsolidit ja 1,2,4-triatsolidit. Valikoituja käyttökelpoisia heterosyklisiä amideja ovat N,N'-karbonyylidi-imidatsoli ja N,N-karbonyylidi-1,2,4-triatsoli; 6) alkoksyloitu asetyleeni (esim. etoksiasetyleeni); 7) reagenssit, jotka muodostavat seka-anhydridin aminohapon karboksyyliosan kanssa (esim. etyyliklooriformiaatti ja isobutyyliklooriformiaatti) tai kytkettävän aminohapon symmetrinen anhydridi (esim. Boc-Ala-O-Ala-Boc) ja 8) typpipitoiset heterosykliset yhdisteet, joiden renkaan yhdessä typessä on hydroksiryhmä (esim. N-hydroksiftalimidi, N-hydroksisuksinimidi ja 1-hydroksibentsotriatsoli). Muita aktivointireagensseja ja niiden käyttöä peptidien kytkemiseksi on kuvannut Kapoor, J. Pharm. Sci., 59, s. 1 - 27 (1970). Patentinhakijat suosivat symmetrisen anhydridin käyttöä kytkemisreagenssina kaikille aminohapoille lukuunottamatta Arg, Asn ja Gln.

Jokainen suojattu aminohappo tai aminohapposekvenssi syötetään kiintofaasireaktoriin noin nelinkertaisena ylimääränä ja kytketään väliaineessa, joka muodostuu dimetyyliformamidista ja metyleenikloridista suhteessa 1:1 tai pelkästä dimetyyliformamidista tai edullisesti pelkästä metyleenikloridista. Kun kytkeminen tapahtuu epätäydellisesti, kytkemismenettely toistetaan ennen α-aminosuojaryhmän poistoa, joka tapahtuu ennen seuraavan aminohapon kytkemistä kiintofaasireaktorissa. Kytkemisreaktion onnistumista synteesin jokaisessa vaiheessa tarkkaillaan ninhydriinireaktiolla E. Kaiser et al., Analyt. Biochem. 34, 595 (1970) kuvaamalla tavalla.

Kun haluttu aminohapposekvenssi on saatu, peptidi poistetaan hartsista. Poisto voidaan suorittaa hydrolysoimalla, esim. käsittelemällä hartsiin sitoutunutta polypeptidiä hiilipäätteisellä aminoalkoholitähteellä, etikkahapolla ja dikloorimetaanilla (DCM).

Tekniikan tason kiintofaasipeptidisynteeseistä on tunnettua, että moniin aminohappoihin liittyy funktioita, jotka vaativat suojaamista renkaanvalmistuksen aikana. Ammattimies pystyy käyttämään ja valitsemaan asianmukainen suojaryhmä ja käyttö ja valinta riippuvat suojattavasta aminohaposta ja peptidissä olevien muiden suojattujen aminohappotähteiden läsnäolosta. Tällaisen sivuketjun suojaryhmän valinta on kriittinen siinä mielessä, että sen on oltava ryhmä, joka ei pilkkoudu irti α-amino-osan suojaryhmän pilkkomisen aikana. Esim. lysiinin sopivia sivuketjun suojaryhmiä ovat bentsyylioksikarbonyyli ja substituoitu bentsyylioksikarbonyyli, jolloin substituentti voidaan valita ryhmästä halogeeni (esim. kloori, bromi, fluori) ja nitro (esim. 2-klooribentsyylioksikarbonyyli, p-nitrobentsyylioksikarbonyyli, 3,4-diklooribentsyylioksikarbonyyli), tosyyli, tert-amyylioksikarbonyyli, tert-butyylioksikarbonyyli ja di-isoproyylimetoksikarbonyyli. Treoniinin ja seriinin alkoholinen hydroksyyliryhmä voidaan suojata asetyyli-, bentsoyyli-, tert-butyyli-, trityyli-, bentsyyli-, 2,6-diklooribentsyyli- tai bentsyylioksikarbonyyliryhmällä. Edullinen suojaryhmä on bentsyyli.

Nämä ryhmät voidaan poistaa tekniikan tasolla hyvin tunnettujen menetelmien avulla. Suojaryhmä poistetaan tyypillisesti peptidiketjun synteesin päätyttyä, mutta suojaryhmät voidaan poistaa minä tahansa sopivana ajankohtana.

Tämän keksinnön alkoholipeptidijohdannaisesta muodostuvan antikoagulantin päiväannos on 0,2 - 250 mg/kg potilaan kehonpainoa potilaasta, hoidettavan trombboottisen sairauden vakavuudesta ja valitusta peptidijohdannaisesta

riippuen. Voidaan helposti määritellä määrätylle potilaalle sopiva annostus. Annokset, joissa on tyypillisesti 5-100 mg vaikuttavaa yhdistettä annosta kohti, annetaan edullisesti 1 - 4 kertaa päivässä. Tämän keksinnön peptidialkoholin määrä, joka on tarpeen inhiboimaan eli estämään veren koaguloituminen kehon ulkopuolisessa väliaineessa kuten varastoidussa kokoveressä, on ammattimiehen helposti määriteltävissä.

Antikoagulanttiterapia on indikoitunut erilaisten tromboottisten sairauksien, erityisesti sepelvaltimo- ja aivoverisuonisairauden hoidossa ja ehkäisyssä. Tämän alan asiantuntija tuntee olosuhteet, jotka edellyttävät antikoagulanttiterapiaa. Tässä käytetyllä sanonnalla "potilas" tarkoitetaan nisäkkäitä kuten kädellisiä ihminen mukaanlukien, lammasta, hevosta, nautaa, sikaa, koiraa, rottaa ja hiirtä. Veren koaguloinnin inhibointi ei vain ole käyttökelpoinen tapa troboottisia sairauksia potevien yksilöiden antikoagulanttiterapiassa, vaan käyttökelpoinen myös kaikissa tapauksissa, joissa veren koaguloinnin inhibointi on tarpeen, esim. koaguloinnin estämiseksi varastoidussa kokoveressä ja koaguloinnin estämiseksi muissa biologisissa näytteissä, jotka aiotaan testata tai varastoida.

Joskin eräät peptidijohdannaiset kestävät kulun suolen läpi suun kautta annon jälkeen, patentinhakijat pitävät ei-suun kautta antoa edullisena, esim. antoa ihon alle, laskimoon, lihakseen tai intraperitoneaalisti, antoa depot-ruiskeena, istutevalmisteena tai levittämistä limakalvoille esim. nenän, kurkun ja keuhkoputken limakalvoille esijm. aerosolipurkin avulla, joka sisältää tämän keksinnön peptidijohdannaista suihkeen tai kuivajauheen muodossa.

Parenteraaliannossa yhdisteet voidaan antaa ruiskeannoksina, jotka muodostuvat yhdisteen liuoksesta tai suspensiosta fysiologisesti hyväksyttävässä laimentimessa

farmaseuttisen kantajan kera, jona voi olla steriili neste kuten vesi ja öljyt pinta-aktiivisten aineiden ja muiden farmaseuttisesti hyväksyttävien apuaineiden lisäyksen kera tai ilman tällaisia lisiä. Öljyjä, jota voidaan tyypillisesti käyttää näissä valmisteissa, ovat mineraali-, eläin-, kasvi- ja synteettiset öljyt, esim. maapähkinäöljy, soijaöljy ja mineraaliöljy. Edullisia nestekantajia, erityisesti ruiskeliuoksissa, ovat yleensä vesi, keittosuolaliuos, dekstroosin ja vastaavien sokerien vesiliuokset, etanoli ja glykolit kuten propyleeniglykoli tai polyetyleeniglykoli.

Yhdisteet voidaan antaa depot-ruiskeen tai istutevalmisteen muodossa, jotka voidaan formuloida siten, että vaikuttava aine vapautuu niistä hidastetusti. Vaikuttava aine voidaan puristaa pelleteiksi tai pieniksi lieriöiksi, jotka istutetaan ihon alle tai lihakseen depot-ruiskeina tai istutteina. Istutteissa voidaan käyttää tehottomia materiaaleja kuten biologisesti hajoavia polymeerejä tai synteettisiä silikoneja, esim. Silasticia, joka on silikonikumi, valmistaja Dow Corning Corporation.

Esimerkit

Seuraavat ei-rajoittavat esimerkit valaisevat keksintöä.

Esimerkki 1

Hiilipäätteisten peptidialkoholien valmistus

Peptidit syntetisoitiin käyttäen p-nitrobentshydrylideeni-isonitrosohartsia (oksiimihartsia), joka valmistettiin DeGradon ja Kaiserin (J. Org. Chem. 45, 1295-1300 (1980)) menetelmän mukaan. Oksiimihartsi (0,54 g, substituutio 0,52 mmol/0,97 mmol/g) asetettiin Applied Biosystems malli 430A peptidisyntetisaattorin astiaan. Boc-suojatut aminohapot kytkettiin yksitellen sekvenssinä symmetrisinä anhydrideinään kaksinkertaisena ylimääränä. Käytettiin seuraavaa sivuketjusuojausta: Asp(Chx), Glu(Bzl), Tyr(2-BrZ). Syntetisaattori ohjelmoitiin siten, että jokaisen syklin pöytäkirja oli seuraava:

1) lisää 1 mmol ennalta valmistettua symmetristä anhydridiä

2) lisää 5 prosentin lisätilavuus DIEA:ta (?)

3) Pyörresekoita tunti

4) Valuta

5) Pese (5 x/1 min) DCM:llä

6) Pese (1 min) 20-prosenttisella TFA:lla DCM:ssä

7) Käsittele 20-prosenttisella TFA:lla DCM:ssä 15 minuuttia

8) Pese DCM:llä (3 x/0,5 min)

9) Pese (4 min) isopropanolilla

10) Pese (3 x/0,5 min)

11) Pese isopropanolilla (4 min)

12) Pese (3 x/0,5 min) DCM:llä

13) Pese (4 min) isopropanolilla

14) Pese (3 x/0,5 min)

Synteesin päätyttyä hartsi kuivattiin vakuumissa. Sitten hartsia käsiteltiin 2 ekvivalentilla (alkuperäisestä hartsisubstituutiosta laskettua) alaninolia ja 1 ekvivalentilla etikkahappoa DCM:ssä huoneenlämpötilassa 20 tuntia. -5°C:ssa 30 minuuttia nestemäisellä HF:llä, jossa oli 2 % anisolia. Kun HF oli poistettu vakuumissa, peptidi uutettiihn 30-prosenttisella asetonitriilillä ja kylmäkuivattiin. Jäännös puhdistettiin preparatiivisella HPLC:llä (Dynamax C18 21,4 x 150 mm kolonni) käyttäen systeemiä asetonitriili/0,1 % TFA. FAB-MS:llä todettiin tällä menetelmällä saadulla peptidillä haluttu molekyyli-ionipiikki ja sen aminohappoanalyysi oli yhtäpitävä halutun peptidin kanssa. Tällä tavoin valmistettiin seuraavat peptidit, joiden ominaisuudet olivat:

1) SucFEPIPEYL-oli. mp. 1092,6, FAB-MS $(MH)^+$ 1094,0, T_R 17,53, E_{280} 1573, peptidipitoisus 79,8 %, Glx(2) 2,08, Pro(2) 1,01, Ile(1) 0,94, Tyr(1) 0,99, Phe(1) 0,98.

2) SucFEPIPEEYChaA-oli. mp. 1332,7 FAB-MS $(MH)^+$ 1333,4, t_R 20,2 min, E_{280} 1755, peptidipitoisuus 73 %, Glx(3) 3,04, Pro(2) 2,03, Ile(1) 0,92, Tyr(1), 1,00, Phe(1) 0,97 Cha(1) 0,95.

3) SucFEPIPEEYL-oli. mp. 1221,6, FAB-MS $(MH)^+$ 1222,8, t_R 16,83, E_{280} 1686, peptidipitoisus 72,1 %, Glx(3) 3,09, Pro(2) 1,98, Ile(1) 0,96, Tyr(1) 0,97, Phe(1) 1,00.

Patenttivaatimukset:

1. Menetelmä terapeuttisesti käyttökelpoisen peptidialkoholijohdannaisen valmistamiseksi, jolla on kaava

$$X\text{-}A_1\text{-}A_2\text{-}A_3\text{-}A_4\text{-}A_5\text{-}A_6\text{-}A_7\text{-}A_8\text{-}A_9\text{-}A_{10}\text{-oli}$$

jossa X on vety tai sukkinyyli (Suc); A_1 on sidos, Asp tai Gly-Asp; A_2 on Phe tai Tyr; A_3 on Glu; A_4 on Glu tai Pro; A_5 on Ile; A_6 on Pro; A_7 on Glu; A_8 on Glu, Asp tai Tyr; A_9 on Tyr-Leu, Ala-Tyr, Ala-Phe, Ala-Cha, Tyr-Cha tai Leu; A_{10}-oli on Gln-oli, Asp-Glu-oli, Pro-oli, D-Lys-oli, Lys-oli, Glu-oli, Asp-oli tai -oli, t u n n e t t u siitä, että a) sidotaan sopiva suojattu aminohappo, joka vastaa ryhmää A_9, aktivoituun hartsialustaan, b) sidotaan tämän jälkeen muut α-aminosuojatut järjestyksessä karboksiterminaalisesta päästä aminoterminaaliseen päähän eli A_8 - A_1, kasvavan peptidin aminoterminaaliseen päähän, joka samalla on paljastettu poistamalla sen aminosuojaryhmä, ja c) käsitellään lopuksi hartsiin sidottua peptidiä noin kahdella ekvivalentilla karboksiterminaalista aminoalkoholia, joka vastaa A_{10}-olia, ja noin yhdellä ekvivalentilla etikkahappoa dikloorimetaanissa peptidin vapauttamiseksi hartsista ja karboksiterminaalisen peptidialkoholin sitomiseksi samalla peptidiin, jolloin saadaan haluttu peptidialkoholijohdannainen.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valmistetaan Suc-Phe-Glu-Pro-Ile-Pro-Glu-Glu-TyR-L-oli.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valmistetaan Suc-Phe-Glu-Pro-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Cha-Ala-oli.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valmistetaan Suc-Phe-Glu-Pro-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu-oli.

PATENTTI-JA REKISTERIHALLITUS
PATENTTIOSASTO

TUTKIMUSRAPORTTI

PATENTTIHAK.NRO	LUOKKA	TUTKIJA	TUTKIMUSTUL. SAATU
892222	C07K	JAJ	GB US X X

TUTKITUT LUOKAT	TUTKITUT MAAT FI SE NO DK CH DE WO EP GB US	TUTK. KESK. *)
C07K 7	X X X X	
C07C 103/52	X X X X	

PATENTTIVIRASTOJEN JULKAISUT	LUOKKA	HUOM!
1)		
2)		
3)		
4)		
5)		
6)		
7)		
8)		
9)		

*) TUTKIMUS KESKEYTETTY ESTEEN LÖYTYMISEN TAKIA

KÄÄNNÄ!

PATENTTIVIRASTOJEN JULKAISUT	LUOKKA	HUOM!
10)		
11)		
12)		
13)		
14)		
15)		
16)		
17)		
18)		
19)		

MUITA JULKAISUJA / ON-LINE TUTKIMUS, JOS TEHTY (TIETOKANTA, HAKUSANAT YM.)

J. Med. Chem. 36 (1987) 1688-1691

HELSINKI 11.12.1992

PÄIVÄYS

ALLEKIRJOITUS