

3596/95

# KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



## Biológiailag aktív vazopresszin-származékok

~~Bejelentő: FERRING B.V., Hoofddorp, Hollandia~~

~~Elsőbbség: 1993. 06. 18. (9302124-4) Svédország~~

~~A nemzetközi bejelentés száma: PCT/SE94/00594~~

~~A nemzetközi bejelentés napja: 1994. 06. 16.~~

~~A Magyar Szabadalmi Hivatalhoz való benyújtás napja:~~

73674

### KIVONAT

A találmány biológiailag aktív vazopresszin-származékokra és ilyen vegyületeket tartalmazó, például orálisan, nazálisan vagy intravénásan beadható, elsősorban antidiuretikus hatású gyógyászati készítményekre vonatkozik. Ezekkel a készítményekkel előnyösen diabetes insipidus vagy bevizelés kezelhető. A találmány szerinti vazopresszin-származékok (I) általános képletében

X jelentése (S)-2-amino-2-metil-valsav (Co.MeAbu) vagy valin (Val),

Y jelentése tienil-alanin (Thi)

vagy metionin (Met),

Z jelentése D-fenil-alanin (D-Phe),

vagy D-tienil-alanin (Thi)

vagy D-tirozin (D-Tyr),

és

Asn jelentése aszparágin,

Hyp jelentése transz-4-hidroxi-prolin,

D-Arg jelentése D-arginin, és

Gly jelentése glicin.

*jelölés ábrán: (I)*  
*Orsós*





A találmány új, biológiaiilag aktív vazopresszin-származékokra vonatkozik. Közélebről a találmány olyan vazopresszin-származékokra vonatkozik, amelyeknek specifikus antidiuretikus hatásuk van és biológiai hozzáférhetőségük jóval kedvezőbb, mint a jelenleg széles körben használatos, antidiuretikus hatású 1-dezamino-8-D-arginin-vazopressziné, mely vegyület ismeretes desmopressin vagy DDAVP név alatt is.

A DDAVP immáron körülbelül 20 éve kereskedelmi forgalomban van, mint antidiuretikus hatású gyógyászati készítmény. Először elsősorban diabetes insipidus betegségben szenvedő betegek kezelésére alkalmazták, azonban néhány éve már bevizelés, különösen éjszakai bevizelés kezelésére is hasznosítják. Sikerrel alkalmazták továbbá A típusú vérszegénység, von Willebrand-megbetegedés és ismeretlen okokra visszavezethető, megnövekedett idejű vérzés esetében.

A vegyület legjobb biológiai hasznosíthatóságát a DDAVP intravénás beadásával lehet elérni, ez azonban otthoni használatra nehézkes. Ezért a DDAVP beadásának szokásos módja az intranazális beadás. Ebben az esetben azonban a vegyület biológiai hozzáférhetősége mintegy tízszeresen csökken. A DDAVP vegyületet be lehet adni orálisan is, miként ez ismeretes a 163 723 sz. európai szabadalmi leírásból. Ilyenkor azonban a biológiai hozzáférhetőség csökkenése még nagyobb, mint az ornyálkahártyán át történő beadás esetén.

Az utóbbi időkből a kutatási tevékenység elsősorban javított DDAVP-analógok megtalálására irányult. Számos DDAVP-származékot állítottak elő és vizsgálták biológiai hozzáférhetőségüket olyan vegyületek kutatásában, amelyeknek specifikus antidiuretikus aktivitásuk van, ugyanakkor az ornyálkahártyán és az intesztinális nyálkahártyán át abszorbeálhatóságuk fokozott mértékű.

Felismertük, hogy az új (I) általános képletű vazopresszin-származékok ezeknek a célkitűzéseknek megfelelnek. Az (I) általános képletben

- X            jelentése (S)-2-amino-2-metil-vaajsav (C $\alpha$ MeAbu) vagy valin (Val),
- Y            jelentése tienil-alanin (Thi)  
              vagy metionin (Met),
- Z            jelentése D-fenil-alanin (D-Phe),  
              vagy D-tienil-alanin (Thi)  
              vagy D-tirozin (D-Tyr),



és

Asn jelentése aszparágin,

Hyp jelentése transz-4-hidroxi-prolin,

D-Arg jelentése D-arginin, és

Gly jelentése glicin.

Miként az a későbbiekben ismertetésre kerülő biológiai kísérleti részből egyértelműen kiderül, a találmány szerinti új vegyületeknek kiváló antidiuretikus aktivitásuk mellett a gasztrointesztinális abszorbeálhatósága mintegy 12 - 25-szörös mértékben nagyobb, mint a DDAVP-é, és intranazális abszorbeálhatósága 2 - 5-ször nagyobb. A találmány szerinti vegyületek véralvasztó hatását még nem vizsgáltuk, azonban feltételezzük, hogy az analóg a DDAVP megfelelő hatásával, így a találmány szerinti vegyületeket is fel lehet használni A típusú vérszegénység, von Willebrand-megbetegedés és ismeretlen okokból jelentkező megnövekedett idejű vérzés esetében.

A találmány továbbá olyan gyógyászati készítményekre vonatkozik, amelyek hatóanyagként valamelyik találmány szerinti vazopresszin-származékot tartalmaznak. Ilyen értelemben a találmány kiterjed minden olyan hasznosítható gyógyászati készítményre, amely hatóanyagként valamelyik találmány szerinti vazopresszin-származékot tartalmaz. Ezek a gyógyászati készítmények előnyösen orális készítmények, például tabletták vagy kapszula, nazális készítmények, például nazális permet vagy nazális cseppek, vagy intravénás készítmények, például injektálható oldatok formájában lehetnek. A gyógyászati készítmények a hatóanyagon kívül a gyógyszergyártásban szokásosan használt hordozó- és/vagy egyéb segédanyagokat tartalmaznak. A gyógyászati hasznosítható hordozóanyagokra, illetve higítóanyagokra példaképpen megemlíthetjük az izotóniás sóoldatot. Ami a további hordozó- és segédanyagokat illeti, ezek megtalálhatók a különböző gyógyszerkönyvekben, például az európai vagy az amerikai egyesült államokbeli gyógyszerkönyvekben, és kiválasztásuk a konkrét esetben alkalmazni kívánt beadási módtól függően történhet.

A találmány kiterjed továbbá a találmány szerinti vazopresszin-származékok gyógyászati készítményekben való alkalmazására. Ezek a gyógyászati készítmények előnyösen antidiuretikus hatású készítmények. Különösen előnyösen alkalmazhatók ezek a gyógyászati készítmények diabetes insipidus kezelésére, továbbá bevétel, különösen éjszakai



bevezetés kezelésére.

A találmány szerinti vegyületekkel, illetve gyógyászati készítményekkel történő gyógyászati kezelés során úgy járunk el, hogy a készítményből, illetve a vegyületből antidiuretikusan hatásos mennyiséget juttatunk a kezelendő beteg szervezetébe.

A találmány szerinti új vazopresszin-származékok a peptidok előállítására szokásosan alkalmazott módon állíthatók elő, azaz lépésről lépésre úgy, hogy kialakítjuk a peptidkötéseket az egyes aminosav-maradékok vagy módosított aminosav-maradékok között és végül gyűrűzárást hajtunk végre.

A következőkben ismertetésre kerülő példákban előállított vegyületeket kivétel nélkül úgynevezett szilárd fázisú módszerrel szintetizáltuk. A módszert illetően utalunk Stewart, J. M. és Young, J. D. "Solid Phase Peptide Synthesis" című könyvére (megjelent a Pierce Chemical Company gondozásában 1984-ben), továbbá Atherton, E. és Sheppard, R. C. "Solid Phase Peptide Synthesis" című, 1989-ben megjelent könyvére.

A peptidokat fordított fázisú kromatográfiás eljárással tisztítjuk, mobil fázisként 0,1 % trifluor-ecetsavat tartalmazó acetonitril-víz elegyet hasznosítva. A tiszta peptidokat azután acetátsóikká alakítjuk. A peptidok tisztaságát, illetve szerkezetét HPLC, aminosav-analízis és FAB-tömegspektrum segítségével ellenőrizzük.

A következő rövidítéseket használjuk:

Boc	=	terc-butoxi-karbonilcsoport
Fmoc	=	fluorenil-metoxi-karbonilcsoport
H - C $\alpha$ MeAbu-OH	=	(S)-2-amino-2-metil-vajsav
Hyp	=	transz-4-hidroxi-prolin
Thi	=	2-tienil-alanin
TBTU	=	2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametil-
	=	-urónium-tetrafluoroborát
DMF	=	dimetil-formamid
TFA	=	trifluor-ecetsav.

A példákban alkalmazásra kerülő aminosavakat a Bachem AG svájci cégtől szereztük be, kivéve az (S)-2-amino-2-metil-vajsavat, amely 29.005.02 cikkszám alatt a Janssen Chimica belga cégtől szerezhető be. A Fmoc-csoportot szokásos módszerekkel vihetjük be



[Ten Kortenaar, P. B. W. és munkatársai: *Int. J. Peptide Protein Res.*, 27, 398 (1986)], míg az  $N\alpha$ Fmoc-S-[3-(terc-butoxi-karbonil)-propil]-ciszteint a Procházka, Z. és munkatársai által a *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 57, 1335 (1992) szakirodalmi helyen ismertetett módon szintetizáltuk.

A referenciavegyületként használt DDAVP vegyületet ismert módszerrel a Ferring AB (Malmö, Svédország) cég állította elő, miként a 3. példa szerinti referenciavegyület is. Az utóbb említett vegyületet Zaoral, M. és munkatársai a "Peptides" című könyv 468. oldalán a 2. táblázatban említik [a könyv 1987-ben a Walter de Gruyter and Co. (Berlin, New York) kiadó gondozásában jelent meg].

A találmányt közelebbről a következő példákkal kívánjuk megvilágítani.

### **1. példa - (II) képletű vegyület**

A peptidet szilárd fázisú technikával szintetizáljuk, éspedig az úgynevezett Fmoc/terc-Bu-stratégiát alkalmazzuk, azzal a különbséggel, hogy a 2-helyzet (D-Phe) vonatkozásában származékként  $N\alpha$ -Boc-aminosavat (Boc-D-Phe-OH) hasznosítunk. Szilárd fázisként 1 g (0,2 mmol/g) TentaGel-S RAM gyantát (a RAPP Polymere cég S 30 023 jelzésű terméke) hasznosítunk. A peptidet a gyantáról lehasítjuk, majd a védőcsoport eltávolítása céljából másfél órán át szobahőmérsékleten trifluor-ecetsav, etán-ditiol és anizol 95 : 2,5 : 2,5 térfogatarányú elegyével kezeljük. A folyékony fázis túlnyomó részét elpárologtatjuk, majd a peptidet dietil-éterrel kicsapjuk és ezután vízből fagyasztva szárítjuk. Az 1- és 2-helyzetek közötti ciklizálást vízmentes dimetil-formamidban 1 - 2 ekvivalens TBTU és 15 - 20 ekvivalens N-metil-morfolin használatával hajtjuk végre. A peptid koncentrációja 1 mg/ml. A reakcióidő szobahőmérsékleten 4 óra. A reakció befejeződése után az oldószert elpárologtatjuk, majd a peptidet dietil-éterrel kicsapjuk. Tisztítását fordított fázisú oszlopon végezzük, eluálószerként acetonitril és víz 0,1 térfogat% trifluor--ecetsavat tartalmazó elegyét használva. A megfelelő tisztaságú frakciókat bepároljuk, majd a maradékot felvisszük fordított fázisú oszlopra. Az oszlopot 0,2 molos ammónium-acetát-oldattal és vízzel mossuk. A peptidet acetonitril és víz 1 térfogat% ecetsavat tartalmazó elegyével eluáljuk. A megfelelő tisztaságú frakciókat bepároljuk, majd fagyasztva szárítjuk. A peptid szerkezetét nagy felbontóképességű folyadékkromatográfiás vizsgálattal, aminosav-elemzéssel és FAB tömegspektrumos elemzéssel igazoljuk.



A peptid hozama 36 mg, tisztasága 99 %.

**2. példa - (III) képletű vegyület**

A peptidet az 1. példában ismertetett módon szintetizáljuk és tisztítjuk. Hozama 77 mg, tisztasága 99 %.

**3. példa (referenciapélda) - (IV) képletű vegyület**

A peptidet az 1. példában ismertetett módon szintetizáljuk és tisztítjuk. Hozama 23 mg, tisztasága 99 %.

**4. példa - (V) képletű vegyület**

A peptidet az 1. példában ismertetett módon szintetizáljuk és tisztítjuk. Hozama 30 mg, tisztasága 99 %.

**5. példa - (VI) képletű vegyület**

A peptidet az 1. példában ismertetett módon szintetizáljuk és tisztítjuk. Hozama 34 mg, tisztasága 99 %.

**6. példa - (VII) képletű vegyület**

A peptidet az 1. példában ismertetett módon szintetizáljuk és tisztítjuk. Hozama 57 mg, tisztasága 99 %.

A találmány szerinti vegyületek in vivo biológiai aktivitását a kísérletekben vizsgálhatjuk.

a) Antidiuretikus aktivitás ( $AD_{iv}$ )

A találmány szerinti vegyületek antidiuretikus aktivitását a jólismert patkány-modellel határozzuk meg, amely azon alapul, hogy a peptiddel végrehajtott intravénás beadás után a patkány által kiválasztott vizelet vezetőképességét folyamatosan mérjük [J. Medicinal Chem., 21, 352 - 356 (1978)].

b) Peptidek gasztrointesztinális abszorpciója [ $(F_{AD})_v$ ]

A gyomorkaputól 10 cm távolságra sebészeti úton beiktatott műanyag-csővön át a bélbe beadagolt peptidek abszorpcióját úgy határozzuk meg, hogy a bélben át történő beadást követően mért antidiuretikus hatást (a görbe alatti terület) összehasonlítjuk az intravénás beadás utáni antidiuretikus hatással. Az antidiuretikus hatást a korábban már említett J. Medicinal Chem., 21, 352 - 356 (1978) szakirodalmi helyen ismertetett módon határozzuk meg.



c) A peptidek intranazális abszorpciója  $(F_{AD})_{in}$

Sebészeti beavatkozás nélkül 10 mm mélységbe bevezett Hamilton-fecskendőhöz kapcsolt PE20-kanülon át az orrüregbe 30  $\mu$ l térfogatban beadagolt peptidek abszorpcióját meghatározzuk úgy, hogy összehasonlítjuk az intranazális beadás utáni antidiuretikus hatást (a görbe alatti terület) az intravénás beadás utáni antidiuretikus hatással. Az antidiuretikus hatást a korábban már említett J. Medicinal Chem., 21, 352 - 356 (1978) szakirodalmi helyen ismertetett módon határozzuk meg.

Kísérleti vegyület	$AD_{iv}$ [IU/ $\mu$ mól]	$(F_{AD})_v$ [%]	$(F_{AD})_{in}$ [%]
1. példa szerinti	631	1,3	42
2. példa szerinti	1026	1,2	21
3. példa szerinti (referencia vegyület)	1530	0,4	5
4. példa szerinti (referencia vegyület)	984	2,5	22
5. példa szerinti (referencia vegyület)	911	1,4	17
6. példa szerinti (referencia vegyület)	700	1,6	22
DDAVP (referencia vegyület)	1100	0,09	8

A táblázat adatai alapján nyilvánvaló, hogy a DDAV és a 3. példa szerinti referencia-vegyületek biológiai hozzáférhetősége jóval kedvezőtlenebb, mint a találmány szerinti vegyületeké, azaz az 1., 2., 4., 5. és 6. példák szerinti vegyületeké.



## Szabadalmi igénypontok

1. (I) általános képletű vazopresszin-analógok - a képletben

X jelentése (S)-2-amino-2-metil-valsav (C $\alpha$ MeAbu) vagy valin (Val),

Y jelentése tienil-alanin (Thi)

vagy metionin (Met),

Z jelentése D-fenil-alánin (D-Phe),

vagy D-tienil-alanin (Thi)

vagy D-tirozin (D-Tyr),

és

Asn jelentése aszparágin,

Hyp jelentése transz-4-hidroxi-prolin,

D-Arg jelentése D-arginin, és

Gly jelentése glicin.

2. Gyógyászati készítmény, *azzal jellemezve*, hogy hatóanyagként valamelyik 1. igénypont szerinti vazopresszin-analógot tartalmaz.

3. A 2. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, *azzal jellemezve*, hogy orális beadásra alkalmas formában van.

4. A 2. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, *azzal jellemezve*, hogy nazális készítmény formájában van.

5. A 2. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, *azzal jellemezve*, hogy intravénás beadásra alkalmas formában van.

6. Az 1. igénypont szerinti vazopresszin-analóg gyógyszerhez való felhasználás céljából.

7. A 6. igénypont vazopresszin-analóg antidiuretikus gyógyszerhez való felhasználás céljából.

8. Az 1. igénypont szerinti vazopresszin-analóg alkalmazása diabetes insipidus kezelésére alkalmas gyógyászati készítmény előállításában.



9. Az 1. igénypont szerinti vazopresszin-analóg alkalmazása bevezetés kezelésére alkalmas gyógyászati készítmény előállításában.

A meghatalmazott:

**DANUBIA**  
Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.  
1. 

Molnár Imre  
szabadalmi ügyvivő

Aktaszámunk: 82805-521/MR  
Ügyintézőnk: Molnár Imre

*2012  
Gwal 9*



